Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Смирнова Светлана Юрьевна

Клональные реаранжировки генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов и генов Т-клеточного рецептора у пациентов с заболеваниями системы крови

14.01.21 - гематология и переливание крови

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители доктор медицинских наук Паровичникова Елена Николаевна доктор биологических наук Судариков Андрей Борисович

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ5
ВВЕДЕНИЕ7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ13
1.1. Основы молекулярно-генетического метода определения
Т- и В-клеточной клональности15
1.1.1. Строение Т-клеточных рецепторов, молекул иммуноглобулинов и их
генов. Перестройка генов Т-клеточных рецепторов и генов тяжелых и легких
цепей иммуноглобулинов. Т- и В-клеточный иммунный ответ; популяции Т-
и В-лимфоцитов
1.1.2. Основные принципы определения Т- и В-клеточной клональности.
Полимеразная цепная реакция и фрагментный анализ21
1.2. Показания к определению клональности Т- и В-лимфоцитов и
сложности при интерпретации полученных данных24
1.2.1. Определение принадлежности опухоли к Т- или В-клеточной линии
дифференцировки. Одновременное выявление Т- и В-клеточной
клональности
1.2.2. Контроль заболевания на разных этапах терапии, оценка минимальной
остаточной болезни. Стадирование при диагностике. Клональная
вариабельность и гетерогенность
1.2.3. Проведение дифференциальной диагностики опухолевой и реактивной
лимфопролиферации
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ39
2.1. Дизайн исследования39
2.2. Пациенты и группы контроля42
2.3. Выделение клеток и ДНК из крови, костного мозга, материала
биоптатов и парафиновых блоков46
2.4. Анализ Т- и В-клеточной клональности по реаранжировкам генов Т-

клеточных рецепторов и	иммуноглобулинов47
2.4.1. Критерии интерпретации р	езультатов48
2.4.2. Условия ПЦР (полимеразн	ой цепной реакции49
2.4.3. Очистка продуктов амплис	рикации и фрагментный анализ
амплификатов	50
2.4.4. Чувствительность метода.	
2.5. Агарозный гель-электрофоро	ез и секвенирование клональных
продуктов	51
2.6. Подбор и тестирование пацио	ент-специфичного праймера52
2.7. Построение стандартной кри	вой, определение общей и подсчетной
чувствительности метода опреде	ления минимальной остаточной
болезни	54
2.8. Количественная оценка мини	имальной остаточной болезни при помощи
ПЦР в реальном времени	56
2.9. Селекция популяций лимфо	цитов периферической крови57
2.10. Статистическая обработка ј	результатов57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУ	ЖДЕНИЕ58
3.1. Одновременное выявление Т	- и В-клеточной клональности58
3.1.1. Частота и характер клонал	ьных реаранжировок генов TCR и IG у
пациентов с острым лимфобласт	ным лейкозом 60
3.1.2. Одновременное выявление	е Т- и В-клеточной клональности у пациентов
с ангиоиммунобластной Т-клето	чной лимфомой63
3.1.3. Сочетанное выявление Т-1	и В-клеточной клональности при
аутоиммунной гемолитической а	мнемии 64
3.1.4. Композитные лимфомы	
Заключение по главе 3.1	67
3.2. Использование клональных	перестроек генов <i>TCR</i> и <i>IG</i> для подбора
пациент-специфичных праймеро	в и контроля минимальной остаточной

болезни и клональная эволюция у пациентов с острым лимфобласти	ΙЫМ
лейкозом	68
Заключение по главе 3.2.	76
3.3. Клональная вариабельность и гетерогенность	76
3.3.1. Гетерогенность и вариабельность Т-клеточных клонов у пациентов	C
ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой	76
3.3.2. Смена клональных перестроек генов Т-клеточного рецептора у	
пациентов после выполнения аллогенной трансплантации стволовых	
кроветворных клеток	81
Заключение по главе 3.3.	84
3.4. Дифференциальная диагностика реактивной и опухолевой	
лимфопролиферации	84
3.4.1. Персистенция CD8+ лимфоцитов у пациентов с аутоиммунной	
гемолитической анемией	84
3.4.2. Т- и В-клеточная клональность при негематологических аутоиммун	нных
заболеваниях и у здоровых доноров/добровольцев	95
Заключение по главе 3.4.	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	99
выводы	103
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	105
ПРИЛОЖЕНИЕ	139

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CDR – complementarity determining regions, гипервариабельный участок

CD – cluster of differentiation, кластер дифференцировки

EBV, ВЭБ – Epstein-Barr virus, вирус Эпштейна-Барр

CMV, ЦМВ – cytomegalovirus, цитомегаловирус

Ct – threshold cycle пороговый цикл

HIV, ВИЧ – human immunodeficiency virus, вирус иммунодефицита человека

IG – immuglobulin, иммуноглобулин

MHC – major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости

PBS – phosphate bufer saline, фосфатный буфер

REC – recombination excision circle, рекомбинационое кольцо

RSS – recombination signal sequences, рекомбинационная сигнальная последовательность

SDS – sodium dodecyl sulfate

TAL1 – T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1

TCR – T-cell receptor, Т-клеточный рецептор

WCLB – white cell lysis buffer, лизирующий буфер

АГ – антиген

АИГА – аутоиммунная гемолитическая анемия

АИТЛ – ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома

Алло-ТГСК – аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

АТ – антитело

БР – безрецидивная выживаемость

ДБККЛ – диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИГХ – иммуногистохимия

КМ – костный мозг

ЛГМ – лимфогранулематоз

ЛУ – лимфатический узел

МОБ – минимальная остаточная болезнь

МРТ – магнитно-резонансная томография

МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография

НТ – не тестировалось

НП – не применимо

НХЛ – неходжскинские лимфомы

ОВ – общая выживаемость

ОЛ – острый лейкоз

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ПТКЛн – неспецифицированная периферическая Т-клеточная лимфома

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПХТ – полихимиотерапия

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография

РА – ревматоидный артрит

РНК – рибонуклеиновая кислота

СК – стандартная кривая

СКВ – системная красная волчанка

СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита

ТКМ – трансплантация костного мозга

 $\Phi \Pi - \varphi$ олликулярная лим φ ома

ХЛЛ – хронический лимфолейкоз

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Диагностика лимфопролиферативных заболеваний требует комплексного подхода. Основными методами, позволяющими подтвердить иммунофенотипирование являются иммуногистохимическое диагноз, опухолевых клеток [203, 204]. Ключевой характеристикой исследование опухолевой пролиферации является клональность опухолевых клеток, поскольку одной, опухолевые клетки являются потомками измененной клеткипредшественницы. В настоящее время важным дополнением к лабораторным дифференциальной исследования при проведении методам диагностики лимфопролиферативных процессов является молекулярно-генетическое исследование клональных реаранжировок генов тяжелой и легких цепей иммуноглобулинов (IG) и генов Т-клеточного рецептора (TCR). При помощи мультиплексной системы праймеров ВІОМЕД-2 у 94% больных Т-клеточными и 99% - В-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями обнаруживают клональные реаранжировки [43, 82].

лимфоцитов Молекулярно-генетическое определение клональности основано на исследовании генов, которые кодируют белки, участвующие в распознавании антигенов. В норме каждый Т-лимфоцит имеет практически уникальный Т-клеточный рецептор, также, как и В-лимфоцит – иммуноглобулин. Разнообразие Т-клеточных рецепторов и молекул иммуноглобулинов необычайно велико, что обеспечивается за счет сложной перестройки генных сегментов, образование рецепторов. В кодирующих ЭТИХ клетке-предшественнице лимфоцитов гены *Т-клеточного рецептора* (далее в тексте – TCR от англ. T-cell receptor) и иммуноглобулинов (IG – immunoglobulin) находятся в зародышевой конфигурации и имеют все V (variable – вариабельный), D (diversity – привносящий разнообразие) и J (join - соединительный) генные сегменты. В процессе ранней дифференцировки лимфоцитов любой из V, D и J сегментов может соединиться друг с другом, дополнительные нуклеотиды встраиваются и удаляются случайным образом, формируя уникальную практически для каждого лимфоцита CDR3

(гипервариабельный участок – complementary determining region) область, обеспечивающую разнообразие белковых молекул. В норме при амплиифкации CDR3 области все ПЦР-продукты будут разные, и после проведения капилярного электрофореза будут представлены множеством пиков. При появлении клона лимфоцитов, CDR3 области которых одинаковые, среди амплификатов будет доминировать один ПЦР продукт в виде одного пика.

В 2003 году группой лабораторий, входящих в консорциум EuroClonality (BIOMED-2) выполнена стандартизация аналитического этапа исследования T- и В-клеточной клональности, подобраны наиболее эффективные наборы праймеров и условия реакций, определены диапазоны длин продуктов специфической и неспецифической амплификации, проведена стандартизация препостаналитического этапа исследования клональности [75]. В то же время на этапе интерпретации получаемых после проведения фрагментного анализа данных возникают закономерные сложности, так как клональная экспансия лимфоцитов может быть следствием иммунного, аутоиммунного процесса, уменьшения нормального поликлонального лимфоцитарного разнообразия. Выявление гистологических, иммунофенотипических, клональности при отсутствии клинических признаков опухоли не должно в таком случае быть расценено как признак опухолевой пролиферации. Выявление клональной экспансии Тлимфоцитов описано при различных неопухолевых состояниях, в том числе при аутоиммунных процесах [6, 9, 10, 54, 56, 70, 83, 88, 93, 119, 131, 170, 193, 215]. Поскольку определение клональности лимфоцитов используется в лабораторной практике, и, учитывая то, что аутоиммунные заболевания могут развиваться на фоне Т- и В-клеточных лимфом, также как и лимфомы могут развиваться на фоне аутоиммунных процессов, выявление и интерпретация Т-клеточной клональности представляет диагностическую проблему, однозначных решений которой, так же как и описания природы данных клональных продуктов, в доступной на сегодняшний день научной литературе не представлено.

Другой проблемой при интерпретации результатов исследования

клональности является одновременное выявление Т- и В-клеточных клонов. Изначально считалось, что перестройки генов *TCR* могут встречаться только при T-клеточных опухолях, в то время как перестройки генов IG — только при Bклеточных опухолях. В настоящее время показано, что более 90% В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) имеют реаранжировки *TCR* [206]. При остром лейкозе (ОЛ) это объясняется повышенной активностью рекомбиназного комплекса [205]. Однако Т-клеточная клональность также выявляется в ткани лимфатических узлов при В-клеточных лимфопролиферативных заболеваниях (по литературным данным, при В-ХЛЛ – до 18% случаев) [82]. Выявление В-клеточной клональности при Т-клеточных лимфомах встречается реже (от 0 до 4% случаев), исключение составляет ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома (19% случаев) [43]. На сегодняшний день нет ответа на вопрос, что означает одновременное выявление T-В-клеточной клональности. Возможно, одновременное обнаружение двух или более клональных продуктов представляет собой две (или более) опухолевые популяции, которые сосуществуют одновременно у одного пациента, представляя сочетание двух опухолей ИЛИ биклональность (олигоклональность) опухоли. Возможно, часть клональных продуктов отражает выраженный нормальный иммунный ответ. Учитывая то, что в опухолевой клетке нарушены механизмы клеточной регуляции, возможно, клональные перестройки генов Т-клеточного рецептора и иммуноглобулинов происходят одновременно в одной опухолевой клетке. В каждом отдельном случае может быть сочетание всего вышеперечисленного.

Феномен клональной гетерогенности и вариабельности — одновременного наличия нескольких клональных продуктов (отличных по количеству пар нуклеотидов) в одном биологическом материале или наличие различных клональных продуктов в различных органах и тканях, затрудняет стадирование и контроль заболевания. Являются ли данные клональные продукты опухолевыми или представляют собой «реактивную» клональность — неизвестно. Изменение клональных реаранжировок в рецидиве заболевания описано у пациентов с ОЛЛ

[8]. Так же, как и одновременное присутствие Т- и В-клеточной клональности, клональная эволюция (частичная смена клонов в рецидиве заболевания) при ОЛ объясняется незавершенностью процессов реаранжировки генов *TCR* и *IG* в ранних клетках-предшественницах и, как считается, не свидетельствует о появлении новой опухоли. Возможно ли объяснить клональную гетерогенность и вариабельность при лимфомах генетической нестабильностью, как при ОЛ, и как следует интерпретировать появление новых клональных продуктов в течение заболевания при данных нозологиях, остается неизвестным.

Правильная интерпретация данных молекулярно-генетического исследования Т- и В-клеточной клональности, а также понимание природы описанных ранее явлений – актуальная практическая и теоретическая задача, однозначных решений которой на сегодняшний день в мировой литературе не описано. Учитывая то, что оценка клональности является дополнительным методом для дифференциальной диагностики, стадирования и контроля ремиссии заболевания, необходимо изучить клональной вариабельности, природу гетерогенности и реактивной клональности при гематологических заболеваниях. С этой целью мы применили не только стандартные подходы: молекулярно-генетических результатов анализа клональности с гистологии и иммуногистохимии (ИГХ), оценку клональности в динамике на фоне лечения, но и использовали новый подход – метод магнитной селекции отдельных лимфоцитарных популяций (CD19+, CD8+, CD4+, CD57+) с последующим определением клональности в каждой из популяций.

Цель исследования: Изучить клональную эволюцию и гетерогенность у пациентов с лимфопролиферативными заболевания и клональность при отсутствии других признаков опухоли.

Задачи исследования:

1. Провести ретроспективный анализ клинико-лабораторных данных пациентов, материал которых был направлен в лабораторию молекулярной гематологии с 2008 по 2017 годы для одновременного исследования

- реаранжировок генов Т-клеточного рецептора и иммуноглобулинов и определить нозологические формы с одновременным выявлением клональных реаранжировок генов Т-клеточного рецептора и иммуноглобулинов;
- 2. Определить характер, частоту, стабильность клональных реаранжировок генов Т-клеточного рецептора и иммуноглобулинов у пациентов с острым лимфобластным лейкозом;
- 3. Исследовать клиренс минимальной остаточной болезни при помощи пациент-специфичных праймеров у пациентов с острым лимфобластным лейкозом, которым проводится лечение протоколу «ОЛЛ-2009»;
- 4. Исследовать клональную гетерогенность у пациентов с ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой;
- 5. Исследовать клональные реаранжировки генов Т-клеточного рецептора и определить их принадлежность к конкретной популяции Т-лимфоцитов при аутоиммунных заболеваниях (аутоиммунная гемолитическая анемия, системная красная волчанка, ревматоидный артрит) и у здоровых лиц;
- 6. Оценить целесообразность применения селекции отдельных лимфоцитарных популяций (CD19+, CD8+, CD4+, CD3+) в сложных диагностических случаях.

Научная новизна:

- 1. Изучена клональная гетерогенность, реактивная клональность на значительной выборке больных с опухолевыми и неопухолевыми заболеваниями системы крови и у здоровых лиц;
- лимфоцитов 2. Применен метод популяций разделения качестве предварительного этапа перед исследованием клональности ДЛЯ дифференциальной опухолевой реактивной диагностики И лимфопролиферации.

Практическая значимость полученных результатов: разработаны практические рекомендации и предложены дополнительные возможности для

интерпретации данных Т- и В-клеточной клональности в сложных диагностических случаях.

Основные положения, выносимые на защиту:

- 1. Экспансия Т-клеточных клонов не всегда является показателем опухолевого роста, характерна для аутоиммунных заболеваний и также может наблюдаться у здоровых лиц, в отличие от В-клеточной клональности;
- 2. Молекулярно-генетический метод определения клональности Т- и В- лимфоцитов позволяет оценить имеется ли опухолевое поражение того или иного органа на момент диагностики, при условии, что известна клональная реаранжировка в изначальном опухолевом очаге;
- 3. В сложных диагностических случаях метод магнитной селекции позволяет выявить популяцию лимфоцитов, несущих клональную реаранжировку, и подтвердить или опровергнуть принадлежность данных клональных продуктов к опухолевой популяции при сравнении с фенотипом опухоли
- 4. У пациентов с ОЛЛ при диагностике МОБ следует учитывать возможность клональной эволюции вследствие изначальной опухолевой гетерогенности

Апробация работы: результаты исследования обсуждены и доложены на II и III Российских конгрессах гематологов (2014, 2016 гг.), 5ом и 6ом ESLHO Симпозиуме Европейского научного общества онкогематологии (2016, 2017 гг.), 22-ом Конгрессе Европейского гематологического общества, 59-ом ежегодном Конгрессе Американского общества гематологов. По теме диссертации опубликовано 11 статей, 9 из них в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертационной работы: диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, собственные результаты и обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы (16 отечественных и 222 зарубежных источников). Работу иллюстрируют 20 рисунков, 17 таблиц, 6 приложений.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Основными методами, позволяющими установить диагноз заболевания системы крови, являются гистологическое или цитологическое исследование в иммуногистохимическим, цитохимическим, шитогенетическим исследованием и иммунофенотипированием клеток [203, 204]. Поскольку клетки являются потомками одной клетки-предшественницы, опухолевые в результате каких-либо генетических измененной нарушений, ключевым моментом диагностики лимфопролиферативного заболевания является предполагаемой клональности опухолевой подтверждение популяции лимфоцитов.

классифицировать Возможность диагностировать лимфоидные И злокачественные новообразования значительно улучшилась в 1980-х годах благодаря внедрению иммунологических методов с использованием широкого спектра моноклональных АТ к АГ клеточной поверхности [111]. Кроме того, клональная природа клеток может быть доказана при цитогенетическом исследовании [62] и с помощью проточной цитометрии [140, 232]. Цитометрия базируется на определении экспрессии аберрантных антигенов на поверхности Иммунофенотипически опухолевых клеток. клональность Bлимфопролиферативных заболеваниях определяется по рестрикции легких цепей иммуноглобулинов [29, 138], при Т-лимфопролиферативных заболеваниях по анализу β-цепи Т-клеточного рецептора [66, 138]. Однако, в некоторых случаях дифференциальной диагностики реактивных И опухолевых лимфопролиферативных заболеваний применения иммунологических методов недостаточно. В 5-10% случаях лимфопролиферативных заболеваний возникают сложности при верификации диагноза, несмотря на использование широкой панели антител при иммунофенотипировании [74]. В настоящее время важным дополнением является молекулярно-генетическое исследование клональности лимфоцитов. Согласно ВОЗ классификации, определение клональности по реаранжировкам генов IG и TCR является важным диагностическим инструментом

в дифференциальной диагностике лимфпопролифератисных заболеваний.

Специфическое узнавание антигенов клетками иммунной осуществляется за счет необычайного разнообразия репертуара рецепторов антигенов – поверхностных иммуноглобулинов (IG) на В-клетках (а также антител, секретируемых плазматическими клетками) и Т-клеточных рецепторов (TCR) на поверхности Т-клеток. Огромное разнообразие молекул IG и TCR и их высокую аффинность обеспечивают последовательные молекулярные процессы – сложная схема реаранжировки генов IG и TCR, и клеточные механизмы – разнообразие, формирующееся в процессе дифференцировки клеток в органах центральной и периферической иммунной системы [67, 187, 219]. Некоторые из образованных в процессе ранней дифференцировки IG и TCR оказываются аутореактивны к собственным АГ организма, однако в дальнейшем, в процессе дифференцировки, обеспечивается способность клеток к согласованному взаимодействию с генами главного комплекса гистосовместимости (МНС) и способность не воспринимать собственные АГ в качестве чужеродных, аутореактиные клетки подвергаются апоптозу. Такой механизм получил название иммунологической толерантности. предотвращает Толерантность развитие нежелательных реакций собственных органов и тканей [189, 197]. В результате АГ-независимой дифференцировки В- и Т-лимфоцитов, которая происходит в центральных органах иммунной системы (костном мозге и тимусе), формируется широконаправленный, поликлональный репертуар антигенспецифических рецепторов («наивный» или первичный репертуар), в то время как в результате АГ-зависимого «созревания» в периферической иммунной органах системы формируется зрелый иммунокомпетентный антигенобусловленный поликлональный репертуар [36, 148].

Любой антигензависимый иммунный ответ приводит к экспансии одного или нескольких небольших специфических клонов В- или Т-лимфоцитов на фоне поликлонального клеточного репертуара, что представляет собой олигоклональную пролиферацию иммунных клеток. Значительная пролиферация

одного единственного клона В- или Т-лимфоцитов (моноклональная пролиферация) не является нормальным событием и представляет собой характерную четру опухолевого роста. Таким образом, перестройки генов *IG* и *TCR* являются уникальными генетическими маркерами, которые можно обоснованно рассматривать как молекулярные детерминанты для определения как нормального (поликлонального репертуара), так и патологического процесса (моноклонального репертуара) [48, 51, 102, 121, 145, 147, 157, 202, 229, 234, 236].

Золотым стандартом определения клональности лимфоцитов является молекулярно-генетический метод, основанный на амплификации области CDR3 генов *IG* и *TCR* лимфоцитов методом ПЦР с последующим изучением продукта методом фрагментного анализа [75]. Выявление клональности при помощи ПЦР является дополнительным, но не основным критерием для установления диагноза.

1.1. Основы молекулярно-генетического метода определения

Т- и В-клеточной клональности

1.1.1. Строение Т-клеточных рецепторов, молекул иммуноглобулинов и их генов. Перестройка генов Т-клеточных рецепторов и генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов. Т- и В-клеточный иммунный ответ; популяции Т- и В-лимфоцитов

Т- и В-лимфоциты являются клетками иммунной системы. Их роль состоит в распознавании и элиминации чужеродных антигенов. Основой гуморального иммунного ответа является активация В-лимфоцитов и их дифференцировка в плазматические клетки, секретирующие иммуноглобулины (IG), которые в свою очередь усиливают фагоцитоз, участвуют в активации комплемента, инактивируют чужеродные антигены. Ключевая роль в клеточном иммунном ответе отводится Т-лимфоцитам, которые распознают чужеродный антиген при помощи Т-клеточных рецепторов [13].

Т-клеточный рецептор (TCR) представляет собой гетеродимер, состоящий из двух различных субъединиц — либо α и β , либо γ и δ (рисунок 1).

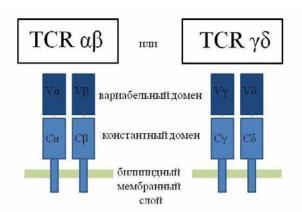


Рисунок 1. Схематичное изображение Т-клеточного рецепторного комплекса. Каждая цепь Т-клеточного рецептора ($\alpha\beta$ или $\gamma\delta$) имеет по одному наружному вариабельному (V) и константному (C) домену.

Субъединицы $\alpha\beta$ TCR несет большинство тимоцитов и свыше 95% периферических Т-клеток. Субъединицы $\gamma\delta$ TCR несут Т-клетки, встречающиеся только в определенных тканях организма: красной пульпе селезенки, коже, кишечнике, не более 2-10% в крови и крайне редко в лимфатических узлах. Иммуноглобулины, в зависимости от класса, представлены мономерами (IgG, IgA, IgD), пентамерами (IgM) и димерами (IgE). Пентамеры и димеры состоят из пяти и двух одинаковых молекул, соответственно. Мономеры иммуноглобулинов представляют собой соединение двух тяжелых и двух легких (либо κ , либо λ) полипептидных субъединиц (рисунок 2).

Каждая субъединица, как TCR, так и IG, имеет константный (С) и вариабельный (V) участки. Вариабельный домен отвечает за связывание антигена. Особую роль в этом играют три гипервариабельных участка (CDR – complementarity determining region), определяющие комплементарность – CDR1, CDR2 и CDR3. Геометрический центр контакта антигена и антитела расположен в области CDR3, которая отличается у всех Т-клеточных рецепторов и иммуноглобулинов и отвечает за связывание непосредственно с антигеном. Структура константного (С) домена одинакова у всех субъединиц данного типа, например, у всех молекул иммуноглобулина или Т-клеточного рецептора (за исключением соматических мутаций на уровне генов любых других белков).

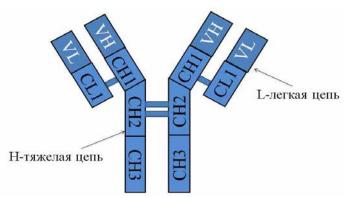


Рисунок 2. Схематичное изображение молекулы иммуноглобулина. Тяжелая цепь (H) и легкая цепь (L) имеют вариабельный (V) и константный (C) домены.

Т-клеточные рецепторы и молекулы иммуноглобулинов кодируются отдельными генами, которые формируются в процессе ранней дифференцировки Т- и В-лимфоцитов [67, 219]. Этот процесс называется реаранжировкой или перестройкой генов TCR и IG. Схема процесса реаранжировки схожа для генов TCR и IG. На рисунке 3 показано схематичное изображение этапов реаранжировки. Локусы генов TCR и IG расположены на разных хромосомах. Локусы β - и γ -цепей TCR (TCRB и TCRG) расположены на 7 хромосоме, на длинном (7q34) и коротком плече (7p14), соответственно [112]. Гены δ - цепи и α - цепи (TCRD и TCRA) располагаются вперемежку на 14 хромосоме (14q11.2), этот локус носит название α/δ локуса. Локус тяжелой цепи IG (IGH) расположен на 14 хромосоме (14q32.3). Локусы легких к-цепи (IGK) и λ -цепи (IGL) располагается на 2 (2p11.2) и 22 хромосоме (22q11.2), соответственно [75, 112].

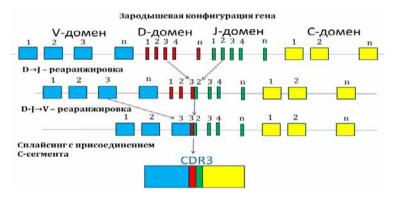


Рисунок 3. Этапы реаранжировки с образованием зрелого гена и CDR3-области. Последовательность соединения: сегмент D-домена к сегменту J-домена - D→J-реаранжировка, DJ-фрагмент к сегменту V-домена - DJ→V-реаранжировка. Сплайсинг с присоединением сегмента C-домена.

Изначально локусы генов находятся в зародышевой конфигурации и состоят из огромного числа V (variable — вариабельный), D (diversity — привносящий разнообразие) и J (joint — соединительный) генных сегментов (схематичное изображение — рисунок 3). Локус TCRB состоит из 67 V, 13 J и двух D генных сегмента, локус TCRG — из 11 V и 5 J сегментов [71, 112]. В α/δ локусе TCR, к α цепи относятся 49 V и 61 J сегмент, к δ цепи относятся 3 V, 3 D и 4 J сегмента, при этом, пять V генных сегмента этого локуса могут участвовать в перестройках как α , так и δ цепи [112]. Локус IGH состоит из 46-52 V, 27 D и δ J генных сегментов, V-домены IGH содержат четыре постоянных каркасных участка — FR (framework, FRI-IV). Локус гена IGK содержит 5 J сегментов и большое количество V генных сегментов, которые объединены в 7 семейств. Не все сегменты участвуют в перестройках, некоторые гены используются в перестройках часто, а другие — совсем редко. Некоторые генные сегменты не участвуют в реаранжировке и носят название псевдогенов (таблица 1).

Таблица 1. Количество V, D, и J генных сегментов IG и TCR, которые могут быть вовлечены в реаранжировку.

Сегмент	IGH	IGK	IGL	TCRA	TCRB	TCRG	TCRD
V-сегмент	45	18 (40)	30 (71)	45 (54)	41 (65)	6 (15)	3
	(129)*						
D -сегмент	12	-	-	-	2	-	3
Ј-сегмент	9	4	4	61	14	5	4

Примечание: * Количество функционирующих сегментов. В скобках указано общее количество сегментов, включая псевдогены [75, 112].

Дифференцировка предшественников В-лимфоцитов проходит в костном мозге, Т-лимфоцитов — в тимусе. Процессы дифференцировки Т-лимфоцитов начинаются в эмбриональном периоде в костном мозге и печени плода. Далее клетки-предшественники мигрируют из костного мозга в тимус, образуя его лимфатический компонент. В тимусе клетки-предшественники созревают до тимоцитов, а затем попадают в кровоток в виде зрелых Т-лимфоцитов.

Предшественник Т-клеток является родоначальником натуральных киллеров (NK-клеток) и Т-лимфоцитов (рисунок 4). Гены *TCR* у этих клеток еще не перестроены и находятся в зародышевой конфигурации. NK/T, формирующиеся на следующем этапе, также могут давать начало NK клеткам и претимоцитам, в процессе формирования последних происходит перестройка *TCRD* локуса [77]. На следующем этапе начинается перестройка *TCRG* и *TCRB* локусов, при этом часть тимоцитов дифференцируется в уб Т лимфоциты, у которых в последствии, в случае продуктивной реаранжировки, начинает экспрессироваться TCR γδ. В случае непродуктивной реаранжировки клетки подвергиются апоптозу. У большинства ранних двойных положительных тимоцитов *TCRB* локус уже перестроен и происходит запуск реаранжировки *TCRA* локуса. Так как гены *TCRD* располагаются внутри локуса TCRA, то они вырезаются при реаранжировке TCRA[77]. Двойные позитивные тимоциты уже имеют на своей поверхности TCR и экспрессируют CD4 и CD8 антигены. На завершающей стадии созревания Т-клеток в тимусе образуются две популяции, несущие либо CD4, либо CD8 антиген (рисунок 4). Образующиеся клетки называются моно-положительными [83]. Поступающие из тимуса зрелые Т-лимфоциты подвергаются дифференцировке в кровотоке и лимфатической системе.

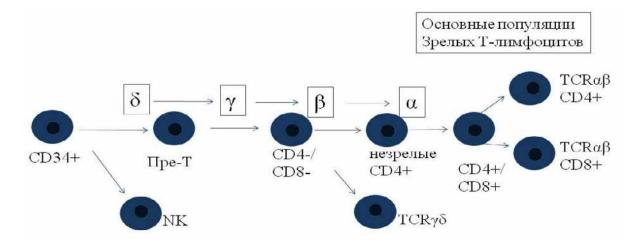


Рисунок 4. Фазы развитии тимоцитов. Последовательность реаранжировки генов цепей Т-клеточного рецептора (объяснения в тексте).

В предшественниках В-лимфоцитов реаранжировки генов тяжелой и легких

цепей IG также происходят не одновременно, а последовательно. Сначала перестраиваются тяжелой цепи, легкой к-цепи IG. Гены гены затем перестраиваются последовательно сначала на одной, затем на другой хромосоме. Это увеличивает вероятность успешной перестройки в два раза. В случае непродуктивной реаранжировки, которая не приводит экспрессии функционального гена, начинается перестройка легкой λ-цепи иммуноглобулина [77].

При перестройке генов TCRB, TCRD, IGH сначала происходит соединение Dи J- генных сегментов с формированием, так называемых неполных перестроек генов, а затем присоединяется V- генный сегмент и формируется полная перестройка (рис. 4). В ходе перестройки генов γ- и α-цепей TCR, генов IGK, IGL ввиду отсутствия D-сегмента, сразу формируются полные перестройки генов. Любой из V-, D- и J- генных сегментов может соединиться друг с другом, что обеспечивает комбинационное разнообразие. Для соединения генных сегментов расположены специальные рекомбинационные между НИМИ сигнальные последовательности (RSS – Recombination signal sequences). Они состоят из двух консервативных участков – гептамера (5' CACAGTG 3') и нонамера (5'ACAAAAACC3') и расположенного между ними соединительного участка – спейсера, состоящего из 12 или 23 пар оснований. В процессе созревания лимфоцитов и соединения V-, D- и J- генных сегментов, RSS последовательности удаляются, образуя рекомбинационые кольца (REC - Recombination excision circle). С помощью ферментов рекомбиназного комплекса RSS удаляются не в точно определенной позиции, а таким образом, что несколько пар нуклеотидов от RSSучастка остаются продолжением нити ДНК, вовлеченного в перестройку генного сегмента. В последующем при помощи других ферментов комплекса рекомбиназ происходит однонитевый разрыв ДНК в месте «остаточных» нуклеотидов с формированием палиндромной последовательности, или так называемой Р-вставки (P – Palindromic), и присоединение к свободным участкам ДНК случайных нуклеотидов с формированием N-вставки (N - Non-template). Такой механизм

обеспечивает соединительное разнообразие нуклеотидной последовательности CDR3 области. В результате перестройки формируется огромное разнообразие генов *TCR* и *IG* [75, 112]. Результат функциональной реаранжировки – это новый ген, с которого синтезируется мРНК, а затем и белок. Нуклеотидная последовательность области соединения *V-, D-* и *J-* генных сегментов определяет аминокислотную последовательность и конфигурацию гипервариабельного участка CDR3 и является уникальной для каждого Т- и В-лимфоцита. За счет необычайного разнообразия данных участков в норме различные Т- и В-клетки способны распознавать широчайший спектр различных антигенов.

1.1.2. Основные принципы определения Т- и В-клеточной клональности. Полимеразная цепная реакция и фрагментный анализ

Молекулярно-генетические методы определения Т- и В-клеточной клональности основаны на амплификации области CDR3 генов *TCR* и *IG* при помощи полимеразной цепной реакции и последующего анализа фрагментов ДНК (рисунок 5).

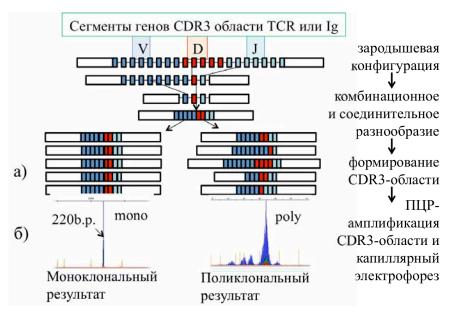


Рисунок 5. Исследование CDR3 области: а) нуклеотидная последовательность CDR3, различающаяся в норме на 1-10 нуклеотидов; б) фрагментный анализ амплификатов.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – умножение интересующего фрагмента

ДНК, которое достигается за счет многократного повторения трех температурных режимов – денатурации ДНК с образованием однонитевых фрагментов, отжига (прикрепления) праймеров к однонитевой цепи ДНК, элонгации (наращивания) цепи ДНК. Такой цикл повторяют в среднем от 35 до 40 раз. Праймеры представляют собой олигонуклеотиды, специфические для данной нуклеотидной последовательности и ограничивающие необходимый для исследования участок ДНК. Для успешного протекания ПЦР в реакционную смесь, помимо ДНК исследуемого образцы И праймеров, добавляют смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов и термостабильную ДНК-полимеразу (Tag Pol), которая достраивает интересующий фрагмент ДНК, начиная от праймера в направлении от 5' к 3' концу ДНК. Реакция происходит в буферной системе с определенным pH, ионной силой раствора и концентрацией ионов Mg^{2+} . Амплификация нуклеотидной последовательности происходит экспоненциально, поскольку каждая нить ДНК, синтезированная полимеразой в данном цикле, служит новой матрицей в последующих циклах [19, 26].

Учитывая огромное количество генных сегментов, участвующих в перестройке генов *IG* и *TCR*, синтез праймеров ко всем сегментам *V*, *D* и *J* генов невозможен. Для решения этой проблемы немецкими учеными успешно разработана система BIOMED-2, основанная на подборе специфичных праймеров, комплементарных большинству или всем сегментам конкретного семейства. Данные праймеры комплементарны консервативным участкам генов, которые есть во всех сегментах. Праймеры объединены в мультиплексные системы. Для определения В-клеточной клональности по генам тяжелой цепи *IG* (*IGH*) разработаны три мультиплексные системы – tubeA, tubeB и tubeC. Каждая из них содержит шесть прямых праймеров (VH1-6) к трем каркасным областям V-домена – FRI, FRII и FRIII, соответственно и один обратный консенсусный праймер (JHc). Такая система позволяет выявить клональные реаранжировки даже в случае возникновения в процессе созревания лимфоцитов соматических гипермутаций в одном из каркасных участков V-домена [75].

Для мультиплексной ПЦР генов *IGK* разработано два набора праймеров: VKA (Смесь прямых праймеров к семействам V-генов и обратный меченный праймер – JK1-4,5) и VKB (обратный меченный праймер – KDE).

Для мультиплексной ПЦР генов TCRG разработаны два набора праймеров — tubeA и tubeB. Локус гена TCRG содержит всего 14 V-сегментов, среди которых только 10 претерпевают перегруппировки (V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8, V8, V10 u V11). Сегменты V2 - V8 имеют общую гомологию более 90%, поэтому они объединены в одно семейство, для которого разработан один праймер — V1f. Локус J содержит 5 сегментов: J1.1 (JP1), J1.2 (JP), J1.3 (J1), J2.1 (JP2) и J2.3 (J2). Сегменты J1.3 и J2.3 обладают высокой гомологией, так же, как и J1.1 и J2.1, в связи, с чем они объединены соответственно.

Зародышевая структура гена TCRD состоит из 8V, 4J и 3D генных сегментов. Среди V сегментов — пять (V1, V2, V3, V4, V5) могут участвовать в реаранжировках. Другие перестройки считаются крайне редкими. Мультиплексные системы праймеров для генов TCRD разработаны таким образом, чтобы идентифицировать все типы полных и неполных перестроек. Между сегментами гена TCRD почти полностью отсутствует гомология. Поэтому разработаны специфичные праймеры, которые не взаимодействуют с соседними сегментами. Для определения Т-клеточной клональности по генам TCRD используются одна мультиплексная система — tube A. Перестройки с участием V7 и V8 являются крайне редкими и не используются в мультиплексной системе праймеров.

По сравнению с локусами TCRG и TCRD, V-регион кластера генов TCRB устроен гораздо сложнее. Он состоит из 65 V-сегментов. Из них функциональными являются 39-47 и все они объединены в 23 семейства. J-сегмент подразделяется на два региона в соответствии с их геномной локализацией: J1 (J1.1–J1.6) и J2 (J2.1–J2.7). Для того, чтобы идентифицировать все типы полных и неполных перестроек и учитывая сложное строение локуса TCRB, BIOMED-2 разработаны три мультиплексные системы праймеров — две для выявления полных реаранжировок (tubeA и tubeB) и одна для выявления неполных реаранжировок генов TCRB (tubeC)

(приложение 1).

Сложность исследования клональности Т- и В-лимфоцитов заключается в том, что CDR3 области имеют только небольшие нуклеотидные различия. Например, в локусе TCRG длина CDR3 в среднем составляет 1-10 нуклеотидов, в локусе IGH или *TCRB* – 10-30 нуклеотидов. С помощью фрагментного анализа продукты амплификации генов IG и TCR разделяются по длине с точностью до одного [75]. ПЦР-продукты разделяются в капиллярах, раствором полимера. При воздействии электрического поля ПЦР-продукты разделяются по молекулярной массе, метод позволяет определить длины ПЦРпродуктов с точностью до одного нуклеотида, вне зависимости от нуклеотидного состава. Фрагменты ДНК дифференциально мигрируют через раствор полимера в зависимости от длины или размера, ПЦР-продукты меньшего размера проходят быстрее, чем более крупные фрагменты. Для этого метода ПЦР проводят с праймерами, меченными флюоресцентной меткой. Система использует возбуждающий источник света с высокой интенсивностью. Данный источник направлен на окно детекции капиллярного блока, в результате чего формируется изображение на двумерном фотодетекторе прибора. «Поликлональный» результат, говорит о наличии в образце ПЦР-продуктов, различной длины и состава CDR3 области, «моноклональный» результат – одинаковых по длине и составу CDR3 области. Фрагментный анализ – метод, требующий дорогостоящего оборудования, но позволяющий более объективно судить о наличии клонального продукта. Проведение ПЦР с последующим изучением продукта с помощью фрагментного анализа в настоящее время является золотым стандартом определения Т- и Вклеточной клональности при лимфопролиферативных заболеваниях.

1.2. Показания к определению клональности Т- и В-лимфоцитов и сложности при интерпретации полученных данных

Таким образом, в 2003 году группой лабораторий консорциума EuroClonality

(BIOMED-2, euroclonality.org) выполнена стандартизация аналитического этапа исследования Т- и В-клеточной клональности, подобраны наиболее эффективные наборы праймеров и условия реакций определены диапазоны длин продуктов специфической и неспецифической амплификации [75, 132]. Система ВІОМЕД-2 широко используется ДЛЯ подтверждения клональности клеток дифференциальной диагностике реактивных злокачественных И лимфопролиферативных заболеваний [23, 94, 128, 131], а также для определения соответствующих ПЦР-мишеней для контроля уровня минимальной остаточной (резидуальной) болезни (МОБ) с высокой чувствительностью (10^{-4} - 10^{-5}) [42, 108, 129, 130, 150, 172, 175, 180]. В то же время, на этапе интерпретации, получаемых после проведения фрагментного анализа данных, возникают новые сложности. Рассмотрим основные показания определения клональности ДЛЯ сложности/трудности интерпретации, возникающие при интерпретации данных.

1.2.1. Определение принадлежности опухоли к Т- или В-клеточной линии дифференцировки. Одновременное выявление Т- и В-клеточной клональности

Согласно литературным данным при помощи мультиплексной системы праймеров ВІОМЕД-2 клональные реаранжировки обнаруживаются у 99% всех Вклеточных лимфопролиферативных заболеваний и у 94% всех Т-клеточных лимфопролифераций [43, 82]. Определение Т- и В-клеточной клональности является важным вспомогательным методом определения линейной ДЛЯ принадлежности опухолевых клеток [11]. Изначально считалось, что перестройки генов *TCR* могут встречаться только при Т-клеточных опухолях, в то время как перестройки генов IG – только при В-клеточных опухолях. В настоящее время показано, что более 90% В-клеточных ОЛЛ имеют клональные реаранжировнки генов ТСК [206] и около 30% Т-клеточных ОЛЛ имеют клональные реаранжировки генов IG [207]. При острых лейкозах (ОЛ) такая ситуация не является уникальной и объясняется повышенной и продолжающейся активностью рекомбиназного комплекса в ранних клетках-предшественницах лимфоцитов [205]. При этом, в

случае ОЛЛ само по себе выявление Т- или В-клеточной клональности не является критерием для установления диагноза, определения распространенности процесса, прогноза заболевания, также как и не позволяют судить линейной принадлежности опухоли. Диагностика ОЛЛ базируется оценке иммунофенотипических особенностей бластных клеток костного мозга и периферической крови [203, 204]. Принадлежность к Т- и В-клеточным линиям, а также этап дифференцировки бластных клеток, начиная с уровня стволовых предшественников до зрелых форм, определяется при помощи иммунофенотипирования [203, 204]. Несмотря на это, определение клональных Ти В-клеточных перестроек до начала лечения при ОЛЛ, как уже было сказано ранее, является необходимым, так как позволяет определить пациент-специфичные мишени и контролировать течение заболевания на протяжении этапов терапии [223].

Нелигитимные (недозволенные, перекрестные, кросс-линейные) клональные реаранжировки выявляются также при лимфомах [43, 82, 191] и миелоидных лейкозах [35, 173]. По данным Evans et al Т-клеточная клональность часто В материале ЛУ при В-клеточных лимфопролиферативных заболеваниях – от 13 до 38% случаев [82] (таблица 3). Среди В-клеточных лимфом чаще остальных клональные реаранжировки генов ТСР наблюдаются при Вклеточной хроническом лимолейкозе (В-ХЛЛ) – до 38%. В большинстве случаев (95%) наблюдается сочетанное выявление клональных продуктов небольшого размера по генам разных цепей ТСЯ. Предполагается, что такие продукты представляют собой минорную клональную популяцию Т-лимфоцитов. В 5% случаев выявляются неполные клональные реаранжировки генов *TCRB*. При ДБККЛ также клональные перестройки генов *TCR* встречаются часто – до 33% случаев. При этом в большинстве случаев (90%) отмечаются клональные реаранжировки по генам одной цепи TCR. При фолликулярной лимфоме ($\Phi\Pi$) во всех случаях клональные продукты имели большой размер, были выявлены изолировано перестройки генов одной цепи [82]. Предполагается, что такие нелегитимные клональные перестройки являются кросс-линейными, т.е. происходят в одной опухолевой В-клетке, однако данных подтверждающих это нет. Считается, что такие перестройки формируются случайным образом в одной клетке после ее опухолевой трансформации, могут быть использованы как альтернативные мишени для динамического мониторинга резидуальной болезни, аналогично мониторингу МОБ при ОЛЛ [141; 169, 222, 223].

Таблица 3. Выявление Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов β , γ и δ -цепи Т-клеточного рецептора (*TCRD*, *TCRG* и *TCRB*) в материале лимфатических узлов при В-клеточных ЛПЗ [82].

		ХЛЛ (n-56)	МКЛ (n-54)	ФЛ (n-109)	ДБККЛ (n-109)
TCRB	VB-JB	14 %	6%	3 %	13 %
	DB-JB	18 %	6%	4 %	16 %
<u>TCRG</u>		18 %	<u>11%</u>	2 %	<u>15 %</u>
TCRD		12 %	4%	5 %	14 %
Всего		38 %	16%	13 %	33 %

В-клеточная клональность при Т-клеточных лимфопролиферативных заболеваниях встречается редко – от 0 до 9% случаев [43] (таблица 4). Чаще выявляются клональные реаранжировки генов ІСН, клональные продукты обычно Исключение выявляются поликлональном фоне. составляет на ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома (АИТЛ), при которой полные клональные реаранжировки по генам ІСН выявляются в 19-27% случаев [12, 43]. Считается, что случаи выявления В-клеточной клональности при АИТЛ, а также при ПТКЛн, связаны с персистенцией вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) [24, 38, 141, 194, 213, 235]. Известно, что геном ВЭБ персистирует в опухолевых В-клетках у иммунокомпрометированных пациентов, у больных после трансплантации органов иммуносупрессивной терапии [49, 214, 220]. Считается, иммунодефицитное состояние при АИТЛ и ПТКЛн впоследствии может приводить к развитию ВЭБ-ассоциированной В-клеточной лимфомы [17, 25, 228, 231, 237].

Исследования ПТКЛ показали худший прогноз у пациентов с В-клеточной клональностью [57, 78, 107, 237].

Таблица 4. Выявление В-клеточной клональности по реаранжировкам генов тяжелой и легкой каппа цепи иммуноглобулинов (*IGH* и *IGK*) в материале лимфатических узлов при Т-лимфомах [43].

					АИТЛ (n-37)
IGH	DH-JH	0%	0 %	4 %	11 %
	VH-JH	0%	0 %	4 %	19 %
IGK		0%	4 %	2 %	19 %
Всего		0%	4 %	9 %	32 %

Таким образом, в части случаев, возможно одновременное выявление Т- и В-клеточной клональности, что представляет диагностическую проблему как для патоморфолога, так и для клинициста. На сегодняшний день нет ответа на вопрос, что означает одновременное выявление клональности. Возможно, это сочетание двух опухолей (Т- и В-клеточной лимфопролиферации), возможно, имеет место реактивная клональность или Т- и В-клеточные клональные реаранжировки произошли в одной опухолевой клетке. В каждом отдельном случае может быть сочетание всего вышеперечисленного. На сегодняшний день, исследований, доказывающих это предположение, не опубликовано.

1.2.2. Контроль заболевания на разных этапах терапии, оценка минимальной остаточной болезни. Стадирование при диагностике. Клональная вариабельность и гетерогенность

Минимальная остаточная болезнь — минимальное количество опухолевых клеток в КМ/крови пациента после лечения, которое можно обнаружить только с помощью высокочувствительных методов (чувствительность 10^{-3} — 10^{-5}). Минимальная остаточная болезнь является независимым фактором прогноза и

критерий стратификации пациентов на группы по риску развития рецидива в процессе лечения [30, 37, 42, 50, 64, 72, 108, 129, 130, 134, 135, 150, 151, 165, 172, 175, 176, 179–181, 196]. Клональные перестройки генов *TCR* и *IG* хорошие маркеры для контроля МОБ при лимфопролиферативных заболеваниях. В соответсвии с литературными данными, клональные перестройки генов *IG* и *TCR* находят у 95% больных с Т-ОЛЛ и у 98% пациентов с В-ОЛЛ [75]. Перестроенные гены ІС и ТСК универсальные маркеры, позволяющие отслеживать опухолевые клетки практически у всех пациентов в течение болезни/терапии. Исследование МОБ включено во все современные протоколы терапии ОЛЛ как у детей, так и у взрослых. В многочисленных исследований продемонстрировано клиническое значение показателей МОБ при ОЛЛ на различных этапах лечения, а также после терапии рецидивов заболевания, аутологичной и аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) [30, 37, 42, 50, 64, 72, 134, 135, 151, 165, 176, 181, 196, 223]. Согласно результатам оценки эффективности терапии лимфобластных лейкозов у детей, при выявлении МОБ (в количестве более 1 опухолевой клетки на 10000 нормальных (10-4)) после фазы индукции ремиссии риск развития рецидива в течение 3-х лет увеличивается с 15% до 86%. Аналогичные данные были получены у взрослых больных: выявление МОБ после курса индукции ремиссии ассоциировано с высоким риском развития рецидива [72]. По данным немецкой группы по изучению ОЛЛ (GMALL) у 25% пациентов первым консолидирующим курсом (71 день протокола лечения) определяется МОБ в количестве более 1 клетки на 10⁴ нормальных, что является признаком: неблагоприятным прогностическим 5-летняя безрецидивная выживаемость у больных этой группы не превышает 12% [42]. Эти пациенты принадлежат к группе высокого риска развития рецидива и являются кандидатами для проведения алло-ТГСК в первой полной ремиссии заболевания [95, 96]. Кроме того, выявлена группа пациентов (10%), у которых отмечалась быстрая и полная элиминация опухолевого клона, МОБ не определялась уже в период индукции ремиссии (11 и 24 день от начала терапии), и их безрецидивная выживаемость в

течение 3 лет составила 100% [42, 44].

Однако мониторинг МОБ на отдаленных этапах лечения сопряжен с определенными трудностями. Технологии поиска МОБ являются трудоемкими и дорогостоящими. Кроме того, показано, что отсутствие МОБ на отдаленных этапах терапии не является гарантией отсутствия развития рецидива впоследствии [174]. Изменение клональных реаранжировок в рецидиве заболевания, или клональная вариабельность, описана у детей [33, 137, 209–211] и взрослых [209, 221] с ОЛЛ. В ряде случаев у больных при отсутствии минимального остаточного количества ПО данным молекулярно-генетического исследования опухолевых клеток отмечалось развитие рецидива заболевания со сменой клональных продуктов. Таким образом, изменение клональных реаранжировок, т.е. клональная эволюция опухоли, приводит к потере пациент-специфичных мишеней для исследования МОБ и ложноотрицательным результатам. Пригодность клональной перестройки для контроля МОБ при ОЛЛ определяют не только частота ее выявления, но также ее стабильность – способность сохраняться при развитии рецидива заболевания. Основные данные по изучению частоты и стабильности различных реаранжировок при В-ОЛЛ и Т-ОЛЛ суммированы в таблице 2 [32, 42, 75, 76, 84, 169, 209, 221].

Таблица 2. Общие данные о стабильности и частоте выявления клональных реаранжировок при В-ОЛЛ и Т-ОЛЛ [32, 33, 41, 42, 75, 76, 84, 169, 209, 221]. Таблица повторяет аналогичную из обзорной статьи van Dongen J J; 2015 [76].

			В-О	ЛЛ	Т-ОЛЛ		
Ген	Dagnayayananga	Частота		Стабильность		Частота	
Ген Реаранжировка		встречаемости		Стаоильность		встречае	Стабильность
		Олиго	Моно	Олиго	Моно	мости	
TCRB	VB-JB (полные)	10-15%	21%	60%	89%	77%	79%
	DB-JB (неполные)	10-15%	14%	0%	67%	55%	80%
	Bce TCRB	10-15%	33%	43%	81%	92%	80%

	Реаранжировка		В-О	ЛЛ	Т-ОЛЛ		
Ген		Частота		Стабильность		Частота	
ГСН		встречаемости				встречае	Стабильность
		Олиго	Моно	Олиго	Моно	мости	
TCRG	VG-JG	15%	55%	95%	75%		86%
TCRD	VD-JD или DD-JD1	НΠ	<1%	НΠ	НΠ	50%	100%
	VD2-DD3 или DD2- DD3	20-25%	40%	26%	86%	55%	100%
	Bce TCRD	20-25%	40%	26%	86%	55%	100%
IGH	VH-JH (полные)	30-40%	93%	47%	88%	5%	HT
	DH-JH (неполные)	50-60%	20%	38%	57%	23%	HT
	Bce IGH	40%	98%	44%	85%	23%	HT
IGK	Vκ-Kde	5-10%	45%	40%	95%	0%	НП
	Intron RSS-Kde	5-10%	25%	0%	86%	0%	НП
	Bce Kde	5-10%	50%	40%	95%	0%	НΠ

П р и м е ч а н и е: моно – «моноклональный» результат; олиго – «олигоклональный» результат; НТ – не тестировалось, НП – неприменимо.

У 67-70% детей с диагнозом В-ОЛЛ и у 45-50% детей с диагнозом Т-ОЛЛ, клональные реаранжировки дебюта и рецидива частично различаются. В исследовании Szczepanski et al. представлены данные по анализу генов *TCR* у 9 взрослых больных с Т-клеточным вариантом ОЛЛ. Показано, что в целом стабильность генов *TCR* у взрослых пациентов с диагнозом Т-ОЛЛ выше (97%), чем у детей (86%). При этом оценку реаранжировок генов *IG* в дебюте и рецидиве заболевания не проводили.

Эволюция опухолевых клеток — клональная вариабельность в рецидиве заболевания была изучена в основном у детей с диагнозом ОЛЛ. Данные о клональной вариабельности для взрослых больных ОЛЛ очень ограничены. На сегодняшний день RALL (Российская исследовательская группа по лечению пациентов с диагнозом ОЛЛ) показали, что у взрослых пациентов моложе 30 лет выживаемость без рецидива в течение 5 лет составила 71,5%, в то время как у больных в возрасте 30–55 лет этот показатель был ниже – 61,8% [163]. Взрослые и дети с диагнозом ОЛЛ, отличаются по длительности общей выживаемости и

выживаемости без развития рецидива, биологическими свойствами опухоли, прогнозом заболевания [47, 79]. У взрослых пациентов к группе благоприятного прогноза относятся Т-клеточный ОЛЛ, в то время как у детей этот вариант считается неблагоприятным с точки зрения прогноза заболевания. Кроме того, у взрослых пациентов чаще выявляются неблагоприятные с точки зрения прогноза хромосомные перестройки (t(9;22), t(4;11)), экспрессию миелоидных антигенов на опухолевых клетках, в дебюте заболевания чаще выявляют гиперлейкоцитоз, чаще выявляют Т-клеточный иммунофенотип заболевания [47, 79].

Для оценки МОБ пригодными являются методы с высоким уровнем чувствительности, такие как ПЦР-анализ продуктов химерных генов многоцветная проточная цитометрия. Однако аберрантный иммунофенотип, позволяющий детектировать МОБ методом проточной цитометрии, обнаруживают по данным разных авторов от 60 до 95% пациентов с ОЛЛ, и этот метод уступает по чувствительности молекулярно-генетическому методу ПЦР с подбором пациент-специфичных праймеров к выявленным в дебюте клональным мишеням по реаранжировкам генов TCR и IG. Анализ транскриптов химерных генов при помощи ПЦР простым недорогим является И методом чувствительностью, однако метод имеет существенное ограничение в виду того, что слитные гены встречаются при ОЛЛ не так часто [35, 46, 73, 86]. Суммарная частота t(9;22)/bcr-abl, t(1;19)/E2A-PBX1, t(4;11)/MLL-AF4, t(12;21)/TEL-AML1 при В-ОЛЛ составляет 40-45%, а такие хромосомные аномалии как t(8;14), t(11;14), t(1;14), t(10;14), TAL1-делеция, обнаруживаются лишь у 10-15% взрослых пациентов с ОЛЛ. Химерные транскрипты с участием гена MLL возникают в результате реаранжировок 11q23, обнаруживаются при ОЛЛ и ОМЛ и ассоциированы с неблагоприятным прогнозом. Детекция МОБ с помощью этих транскриптов представляется трудной задачей, так как химерные гены MLL могут возникать вследствие 50 различных транслокаций [188]. Если для острых лейкозов принципиальным является контроль опухолевого клона на этапах терапии, то для зрелоклеточных лимфопролиферативных заболеваний не менее важным является

определения объема опухолевой точное массы на момент диагностики (стадирование). Стадии заболевания устанавливают, ориентируясь на классификацию Ann Arbor, посредством различных методов визуальной диагностики с обязательной мультиспиральной компьютерной томографией (МСКТ) всех зон локализации лимфатической ткани (шея, грудная клетка, брюшная полость, малый таз, головной мозг). При подозрении на вовлечение органов ЖКТ показаны эндоскопические исследования [203, 204]. Костный мозг (КМ) чаще остальных органов вовлекается в опухолевый процесс, частота вовлечения варьирует для разных лимфом [238]. Оценка вовлечения КМ имеет большое значение, поскольку свидетельствует о диссеминации заболевания и предполагает иную терапевтическую тактику [45]. Для исключения поражения КМ осуществляют билатеральную трепанобиопсию, пункцию КМ с последующим цитологическим исследование аспирата И гистологическим И иммуногистохимическим исследованием трепанобиоптата КМ [203, 204]. Таким образом, клинически локальная стадия (стадия I или II), после оценки КМ может получит статус распространенной (IV стадия). Недавние исследования показали, что значительная часть пациентов (от 10% до 44%) с МАLТ-лимфомой, имеющих согласно клинико-инструментальному обследованию поражение только одного органа, имеют поражение КМ, установленное при гистологическом исследовании [31, 161, 216].

Исследование клональности Т- и В-лимфоцитов при первичной верификации диагноза, позволяет достоверно увеличить количество случаев опухолевого поражения КМ или другого органа (печени, ЦНС – исследование спинномозговой жидкости, легких – исследование плевральной жидкости) [39, 55, 133, 146]. Так при исследовании диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (ДБККЛ) показано, что общая (ОВ) и безрецидивная выживаемость (БВ) больных в группе с поражением КМ, которое было подтверждено молекулярно-генетическим методом и отличалась от ОВ и БВ в группе больных без поражения КМ и составили 55 и 88%, 58 и 90% соответственно [2]. При дискордантном поражении КМ, когда

характер лимфоидной инфильтрации КМ отличается от такового в лимфатическом узле (ЛУ), выявление молекулярным методом В-клеточной клональности в пунктате КМ, которая совпадает с клональностью, выявленной в очаге первичного поражения, позволяет подтвердить наличие лимфомного поражения. Частота дискордантного поражения при ДБККЛ выявляется в 25% случаев [4, 127]. При этом известно, что размер моноклонального продукта амплификации уникален для опухолевого клона и неизменен во всех пораженных опухолью органах и тканях у одного пациента.

Клональная гетерогенность и вариабельность обусловливают нерешенную до сих пор проблему, возникающую при стадировании лимфом, контроле течения ОЛ и других ситуациях. Так, например, выявление разных клональных продуктов в различных тканях у одного пациента, а также смена клональных продуктов с течением времени может быть связана с опухолевой гетерогенностью и эволюцией опухоли на фоне проводимой терапии, однако также может представлять собой и реактивную клональную популяцию клеток, существующую одновременно с опухолевой и вводящую в заблуждение клинициста, молекулярного биолога и патоморфолога.

1.2.3. Проведение дифференциальной диагностики опухолевой и реактивной лимфопролиферации

инфильтация Лимфоидная костного мозга является довольно распространенной находкой при рутинном гистологическом исследовании трепанобиоптата подвздошной кости при диагностике лимфопролиферативных заболеваний. Поражение костного мозга не всегда можно обнаружить при гистологическом исследовании (ложноотрицательные результаты гистологического исследования), что может быть обусловлено характером и выраженности лимфомного поражения KM. Например, степенью незначительной интерстициальной инфильтрации КМ опухолевыми клетками поражение КМ при гистологическом исследовании может быть не выявлено.

Подобная же ситуация возможна при очаговом типе поражения КМ, когда опухолевый очаг остается за пределами объема трепанобиоптата. У пациентов с неходжкинскими лимфомами (НХЛ) очаговая инфильтрация КМ встречается чаще, чем диффузная — 70% против 30% [85], и требует тщательной дифференциальной диагностики с реактивными лимфоидными скоплениями. В ряде случаев ложноположительные результаты гистологического исследования трепанобиоптата обусловлены гипердиагностикой подобных инфильтратов, имеющих реактивную природу.

Как уже было сказано ранее, любой антигензависимый иммунный ответ приводит к экспансии одного или нескольких специфических клонов В- или Тлимфоцитов. Для большинства заболеваний характерна экспансия небольших клонов, которые характеризуются доминирующим пиком (одним или несколькими – олигоклональная экспансия) на поликлональном фоне, однако для некоторых реактивных процессов определяется «узкоспециализированный» иммунный ответ [6, 9, 10, 131, 170, 215]. Реактивная пролиферация лимфоцитов в лимфатических узлах (ЛУ) или других тканях может быть вызвана различными инфекционными агентами (например, Эпштейна-Барр, вирусом цитомегаловирусом (CMV, ЦМВ), вирусом иммунодефицита человека (HIV, ВИЧ), возбудителями токсоплазмоза, туберкулеза и болезни кошачих царапин), или быть co специфическим воспалительным процессом (саркоидоз, ассоциирована тиреоидит Хашимото) [54, 56, 70, 83, 88, 93, 119, 136, 193]. Однако, как показно Т-клеточной большой ранее, выявление клональности позволяет специфичностью дифференцировать реактивную и опухолевую Т-клеточную лимфопролиферацию. Опухолевую природу обнаруженного Т-клеточного клона подтверждает его размер, который не изменяется в образцах нескольких тканей [11]. Однако понятие клональности не является эквивалентом злокачественности. По данным разных авторов частота выявления клональности по реаранжировкам генов γ-цепи ТСЯ при неопухолевых заболеваниях крови составляет около 5 - 10% случаев. Острая фаза инфекционного мононуклеоза демонстрирует

моноклональность до 10% всех CD8+ лимфоцитов крови. При этом у 40% пациентов выявляется моноклональность по генам TCRG [10]. Высокая частота выявления клональности у больных с инфекционным мононуклеозом объясняется выраженной пролиферацией CD8+ клеток. Цитотоксические CD8+ клетки распознают антиген в комплексе с молекулами МНС-І на мембране клеток собственного организма, И элиминируют клетки зараженные вирусом. Активированные, дифференцированные цитотоксические Т-лимфоциты вызывают гибель клеток-мишеней в результате прямого контакта или посредоством участия цитотксических белков – перфорина, гранзимов, Fas-рецепторов и фактора некроза опухоли. Так, при инфекционном мононуклеозе инфицированные В-лимфоциты выполняют роль антигенпрезентирующих клеток для цитотоксических Т лимфоцитов, и в ходе нормального иммунного ответа появляется множество клонов CD8+ клеток к антигенным детерминантам вируса Эпштейна-Барр. При реактивации Эпштейн-Барр вирусной инфекции, особенно на фоне выраженной иммуносупрессии, можно наблюдать и В- и Т-клеточную моноклональность. Кроме того, длительная вирусная стимуляция может вызвать опухолевое В-лимфоцитов [60, 109, Т-И 123, 190]. Выраженный лимфопролиферативный ответ описан не только при инфекционном мононуклеозе, но и при таких инфекционых заболеваниях как иерсиниоз и ветряная оспа [10].

Отличительной особенностью Т-клеточного репертуара является его сужение с возрастом, когда происходит инволюция тимуса. После 40 лет тимус не функционирует и прекращает генерировать Т-лимфоциты с новыми реаранжировками *TCR*. Показано, что у пожилых людей наблюдается выраженная пролиферация CD8+ клеток, и частота выявления Т-клеточной клональности у людей старше 65 лет может достигать 30% [59, 97, 171, 230]. Предполагается, что повторная стимуляция уже известным иммунной системе антигеном приводит к быстрой пролиферации и более интенсивной активации цитотоксических лимфоцитов за счет популяции эффекторных CD8+ клеток-памяти. Центральные CD8+ клетки-памяти также активируются и дают начало очередному поколению

центральных и эффекторных клеток-памяти. С возрастом, в результате постоянной антигенной стимуляции, проходит несколько таких циклов активации/пролиферации и экспрессия CD28 на поверхности CD8+ T-лимфоцитов неуклонно и необратимо снижается. Это приводит к накоплению CD8+CD28- Tклеток с короткими теломерами, низкой активностью теломераз, ограниченным пролиферативным потенциалом и узкой функциональной специализацией. При этом показано, что при снижении количества CD28, происходит увеличение экспрессии молекулы CD57 на Т-лимфоцитах. Показано, что у новорожденных все Т-клетки экспрессируют CD28 и не экспрессируют CD57, в тоже время у молодых людей определяется около 20% CD8+CD57+ Т-лимфоцитов, а у людей старше 80 лет определяется уже около 50-60% CD57+ Т-лимфоцитов [199].

Выявление Т-клеточной клональности возможно при выраженной реакции трансплантат против хозяина [124, 143, 185], при иммуносупрессии, на фоне ПХТ и невозможности Т-лимфоцитов генерировать полноценный репертуар в ответ на иммунные стимулы.

Известно, что для клональных Т- и В-лимфоцитов, которые не имеют опухолевую природу, характерно исчезновение при динамическом повторном исследовании [11]. Мы обнаружили длительную персистенцию Т-клеточной клональности у значительной части пациентов с аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА), а также В-клеточную клональность у небольшой группы пациентов при отсутствии признаков опухоли при гистологическом исследовании. Известно, что основная часть АИГА приходится на идиопатическую форму, когда причину аутоиммунного гемолиза установить не удается. При этом, около 10-15% аутоиммунной гемолитической анемии возникает на фоне лимфоидных опухолей, когда патологический процесс антителообразования провоцируется опухолевыми лимфопролиферативных заболеваний, так же, как и причины, приводящие к выработке аутоантител В-лимфоцитами при идиопатической АИГА, не достаточно изучены. Тем не менее, предполагается влияние неизвестного, возможно вирусного

антигена, который способен посредством длительной стимуляции приводить к мутации CDR области легких или тяжелых цепей иммуноглобулинов при лимфомах [52, 69, 198]. Возможно, нарушение механизмов апоптоза опухолевых клеток приводит к пролиферации злокачественного Т-клеточного клона, который может стимулировать выработку антиэритроцитарных антител В-лимфоцитами. Нарушение контроля со стороны Т-регуляторных клеток и чрезмерная выработка определенных цитокинов в сочетании с нарушениями регуляции апоптоза могут приводить секреции злокачественными В-клетками антител гемопоэтических клеток [61]. Вероятно, существуют и другие механизмы, задействованные в патогенезе аутоиммунных процессов при лимфомах, однако природа этих механизмов, как на молекулярном, так и на клеточном уровне пока неизвестны.

Манифестация симптомов АИГА при лимфомах может предшествовать развитию лимфомы, диагностироваться одновременно с ней или развиваться в период терапии лимфомы [184]. Схемы лечения идиопатической АИГА и АИГА, протекающей на фоне лимфопролиферативного заболевания, принципиально разные, именно поэтому при появлении признаков аутоиммунного гемолиза следует проявить диагностическую настороженность, чтобы не пропустить опухоль.

клинико-лабораторных Диагностика гемолиза основана на наличии признаков – иктеричность склер и кожных покровов, увеличение размеров селезенки, ретикулоцитоз, гемоглобинурия, положительная прямая проба Кумбса. Цитологическое и гистологическое исследования костного мозга проводят для оценки соотношения ростков кроветворения и гистоархитектоники с целью поиска признаков лимфомного поражения. Несмотря на то, что гистологическое исследование является основополагающим диагностике при лимфопролиферативных заболеваний, при исследовании ткани костного мозга пациентов с АИГА существуют некоторые сложности. Так при гистологическом исследовании незначительную интерстициальную инфильтрацию ткани костного мозга опухолевыми клетками при одновременном избыточном расширении красного ростка, возникающем как следствие компенсаторной реакции на развитие анемии, можно не заметить. Возможно, АИГА с выявленной Т- и/или В-клеточной клональностью является паранеопластическим процессом, связанным с минимальным лимфомным поражением, которое не удается распознать при гистологическом исследовании.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Дизайн исследования

Исследование состоит из рестроспективной (рис. 6) и проспективной частей (рис. 7).

Ретроспективная часть исследования состоит из двух частей. Первая часть исследования включает анализ результатов определения клональных реаранижровок всех пациентов (n=2182), биологический материал которых был направлен в лабораторию молекулярной гематологии ФГБУ НМИЦ «гематологии» Минздрава России для одновременного определения Т- и В-клеточной

клональности в период с 2008 по 2017 гг. с целью проведения дифференциальной диагностики опухолевой/реактивной лимфопролиферации, определения принадлежности к T-/B-клеточным линиям дифференцировки.

Вторая часть ретроспективного исследования включает определение клональных реаранжировок Т- и В-лимфоцитов у всех пациентов с ОЛЛ в дебюте заболевания, для которых имеелся архивный материал (n=20), направленный на хранение в лабораторию молекулярной гематологии в период с 2008 по 2011 гг., а также у всех пациентов с рецидивом ОЛЛ (n=3) для которых имелся архивный материал за этот же временной интервал. Кроме того, для пациентов, у которых имелся архивный материал на различных этапах терапии (согласно протоколу ОЛЛ-2009: 7, 36, 70, 105, 130, 150 дни терапии), проводили мониторинг МОБ методом ПЦР в реальном времени с подбором пациент-специфичных праймеров к выявленным в дебюте заболевания клональным перестройкам генов Т-клеточного рецептора и/или иммуноглобулина.

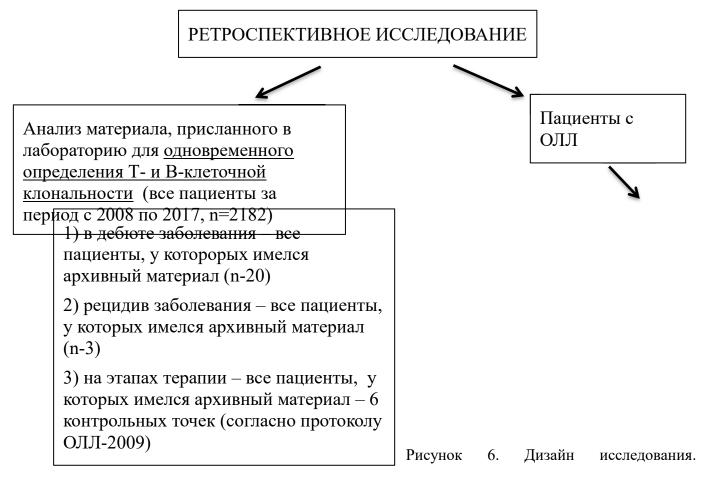
Проспективное исследование состоит из четырех частей. Первый часть исследования включает пациентов с АИГА на момент диагностики заболевания (n=33) материал которых прислан в лабораторию молекулярной гематологии для исследования Т-клеточной клональности, а также материал этимх пациентов на различных этапах терапии (n=20).

Вторая часть проспективного исследования включала молекулярногенетическое исследование Т- и В-клональности лимфатического узла (n=40), костного мозга (n=28) и периферической крови (n=28) всех пациентов с АИТЛ на момент диагностики, а также на всех контрольных точках на различных этапах терапии (n=14).

Третья часть – пациенты с ОЛЛ в дебюте заболевания (n=46), пациенты с рецидивом заболевания (n=3), пациенты на различных этапах терапии – 6 контрольных точек: 7, 36, 70, 105, 130, 150 дни терапии, согласно протоколу ОЛЛ-2009.

Четвертая часть проспективного исследования включала 8 пациентов после

алло-ТСКК с острыми лейкозами.



Схематичное изображение ретроспективной части исследования.



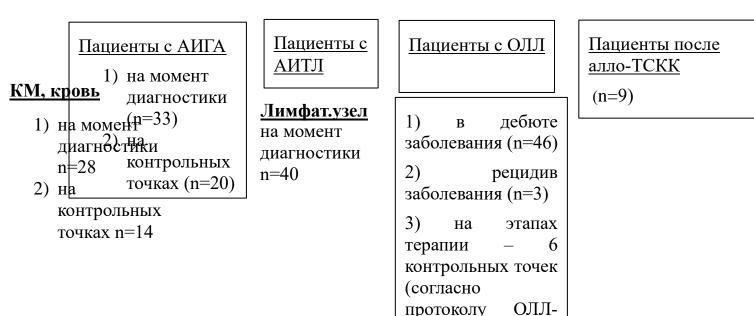


Рисунок 7. Дизайн исследования. Схематичное изображение проспективной части исследования.

2009)

2.2. Пациенты и группы контроля

Таким образом, при объединении проспективной и ретроспективной частей исследования были сформированы общие группы больных.

1) ОЛЛ: n=60 — В-ОЛЛ (n=37), Т-ОЛЛ (n=29). У 66 пациентов исследованы реаранжировки генов *TCR* и *IG* в дебюте заболевания, у 6 пациентов — в дебюте и рецидиве заболевания. Медиана возраста больных 28 лет (от 19 до 59 лет). Распределение по полу 1:1 (34 мужчины и 32 женщины). Период до развития рецидива составлял от 5,4 до 11,6 месяцев (М-6,8). Всего выполнено 1008 ПЦР на материле ДНК, выделенного из костного мозга больных. Динамическое исследование МОБ было проведено у 27 пациентов (таблица 5), из них - 20 пациентов с В-ОЛЛ и 7 пациентов с Т-ОЛЛ. У 15 пациентов проводили исследование МОБ на 36 день, у 21 на 70 день, у 23 на 105 день, у 21 на 133 день, у 18 на 150 день, и у 18 на различных этапах поддерживающей терапии.

Таблица 5. Число больных с диагнозом ОЛЛ, которым проводили мониторинг МОБ на различных этапах терапии.

Вариант	Число обследованных больных								
ОЛЛ	+36 день	+36 день							
Т-ОЛЛ	4	7	6	7	7				
В-ОЛЛ	11	14	17	14	11				
Итого	15	21	23	21	18				

Краткая характеристика пациентов с ОЛЛ представлена в таблице 6.

Таблица 6. Краткая клиническая характеристика пациентов с диагнозом ОЛЛ

		В-ОЛЛ (n=37)	Т-ОЛЛ (n=29)			
Пол	M	20	17			
Пол	Ж	17	12			
Возраст, год	ы (медиана)	19–59 (28)				
Рецидив (число больных)		4 2				
Время по развития решилива		5,4–11,6 (6,2)				

2) АИГА: n=33 тридцать три пациента. Медиана возраста — 37 лет (от 18 до 79 лет). Распределение по полу 1:2 (11 мужчин и 22 женщины). Выполнено 474 реакции на материале ДНК периферической крови. В качестве группы контроля исследованы 13 пациентов с другими анемиями (пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ) — n=4, наследственная микросфероцитарная анемия — n=3, железодефицитная анемия (ЖДА) — n=2, парциальная красноклеточная аплазия (ПККА) — n=2, наследственная гемолитическая анемия (НГА) — n=1, талассемия — n=1).

Краткая характеристика пациентов с АИГА представлена в таблице 7.

Таблица 7. Краткая клиническая характеристика пациентов с диагнозом АИГА

		АИГА с тепловыми	АИГА с холодовыми	
		AT	AT	
Число обследованных больных		29	4	
Возраст (М), годы		18 – 79 (38)	38 – 61 (52)	
Спленэктомия: да / нет / нд		8 / 15 / 6	1 / 3	
	Менее 5	6	0	
Длительность	лет	,	Ţ.	
наблюдения	Более 5	23	4	
	лет			
В-клеточная.неходжкинская		2	2	
лимфома		_	_	

 Π р и м е ч а н и е : $AU\Gamma A$ — аутоиммунная гемолитическая анемия; $A\Gamma$ — антитела, нд — нет данных, M — медиана возраста.

- 3) АИТЛ: n=40. Медиана возраста 65 лет (от 36 до 87 лет). Распределение по полу 1,7:1 (25 мужчин и 15 женщин). Определение Т- и В-клеточной клональности было выполнено на материале ДНК лимфатических узлов (n=47), кожи (n=12), костного мозга (n=53), периферической крови (n=29), селезенки (n=2). Всего 715 реакций.
- 4) Пациенты после алло-ТСКК: девять пациентов с острыми лейкозами. Медиана возраста 32,5 лет (от 26 до 46 лет). Распределение по полу 1:1,25 (4 мужчин и 5 женщин). Определение Т-клеточной клональности выполнено на материале ДНК костного мозга у пациентов до выполнения алло-ТГСК, после выполнения алло-ТГСК (медиана наблюдения 1-6 мес.) и на материале имеющейся в хранении ДНК костного мозга/крови доноров этих пациентов. Всего выполнено 36 реакций.

- 5) Группа отрицательного контроля состояла из 62 здоровых человек (23 донора и 39 добровольцев) следующих возрастных групп: 18-29 лет -17, 31-42 года 16, 45-56 лет 13, 58-71 лет 16 человек. Медиана возраста составила 41 год (от 18 до 71 года). Соотношение мужчины/женщины в контрольной группе составило 26/36. Для контрольной группы выполнено 960 реакций на материале ДНК периферической крови.
- 6) СКВ и РА: 14 пациентов (системная красная волчанка (СКВ) n=6, ревматоидный артрит (РА) n=8). Выполнено 680 реакций.

Общая характеристика групп пациентов, включенных в исследование, представлена в таблице 8.

Таблица 8. Общая характеристика групп пациентов, включенных в исследование.

Диагноз	Число	Медиана	Мужчины:женщины	Количество
	пациентов	возраста		исследований,
		(годы)		ШТ
ОЛЛ	66	28 (19-59)	1:1	1008
АИГА	33	37 (18-79)	1:2	474
АИТЛ	40	65 (36-87)	2:1	715
Пациенты	8	32,5 (26-46)	1:1	36
после алло-				
ТСКК				
РА и СКВ	14	49 (35-67)	2:1	680
Доноры	62	41 (18-71)	1:1	960

Примечание: ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз; АИГА – аутоиммунная гемолитическая анемия; АИТЛ – ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома; алло-ТСКК – аллогенная трансплантация стволовых кроветворных клеток; РА – ревматоидный артрит; СКВ – системная красная волчанка.

Все пациенты с гематологическими заболеваниями наблюдались в различных отделениях ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России в период с 2008 по 2017 год. Пациенты с СКВ и РА наблюдались в Научно-исследовательском институте ревматологии имени В.А. с 2015 по 2016 годы. Кровь здоровых доноров

была получена в «Отделении заготовки крови и ее компонентов» ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Диагнозы были установлены в соответствии с классификацией заболеваний ВОЗ 2008 года. Согласие на обработку данных получено от всех пациентов, включенных в исследование.

2.3. Выделение клеток и ДНК из крови, костного мозга, материала биоптатов и парафиновых блоков

Забор образцов костного мозга в объеме 2 мл производили при пункции грудины или верхней задней ости гребня подвздошной кости в пробирку с ЭДТА. Взятие образца периферической крови в объеме 9 мл проводили при пункции локтевой вены в пробирку с ЭДТА.

Лейкоциты периферической крови и костного мозга выделяли методом лизиса эритроцитов с последующим отмыванием PBS. Геномную ДНК из полученной фракции клеток получали путем последовательного лизиса мембран лейкоцитов WCLB с добавлением насыщенного раствора хлорида аммония для осаждения белков и последующим выделением ДНК из надосадочного раствора при добавлении равного объема изопропанола. Полученный осадок ДНК отмывали 70% этанолом, высушивали на воздухе и растворяли в деионизированной воде для дальнейшей работы.

Свежий материал биопсий (ЛУ, кожи, селезенки) поступал в лабораторию из патологоанатомического отделения в чистых 2 мл пробирках. Образец ткани заливали 100 мл 10% SDS и 900 мл 25% NH₄OH и сутки инкубировали в термостате при температуре +57°C на постоянно вращающемся штативе. После полного растворения ткани образец центрифугировали. ДНК получали из супернатанта путем последовательной нейтрализации уксусной кислотой и добавлении насыщенного раствора хлорида аммония для осаждения белков с последующим выделением ДНК из надосадочного раствора при добавлении равного объема изопропанола. Полученный осадок ДНК отмывали 70% этанолом, высушивали на воздухе и растворяли в деионизированной воде для дальнейшей работы.

Для выделения ДНК из материала парафиновых блоков с каждого блока

получали 3-5 срезов толщиной 10 мкм. Срезы помещали в чистую 2 мл пробирку и заливали 1800 мкл 1хSTE. Депарафинизацию проводили путем прогревания материала на 95°C в течение 10 минут. Далее пробирку центрифугировали, охлаждали и удаляли застывшую парафиновую пленку с поверхности раствора. С осадком тканей работали по описанной выше для свежего материала методике. Технология выделения ДНК из парафинизированных тканей биопсий была разработана в лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ НМИЦ «Гематологии» Минздрава России [192].

2.4. Анализ Т- и В-клеточной клональности по реаранжировкам генов Т-клеточных рецепторов и иммуноглобулинов

Клональность Т- и В-лимфоцитов можно оценить на молекулярногенетическом уровне с помощью анализа CDR3 участков генов *TCR* и *IG*. Участок обладает наибольшей вариабельностью и в значительной степени обеспечивает разнообразие Т-клеточных рецепторов и иммуноглобулинов. Используя праймеры к V и J сегментам этих генов, при помощи ПЦР можно получить множество копий исследуемой области. При капиллярном электрофорезе денатурированные ПЦР-продукты разделяются по длине вне зависимости от нуклеотидного состава. Вместе с ПЦР-продуктом наносится маркер длины (фирменный набор олигонуклеотидов, определенной длины, меченных флюоресцентной краской), по которому прибор определяет длину ПЦР продукта с точностью до 1-2-х нуклеотидов. Исследование проводится с использованием автоматического анализатора нуклеиновых кислот. ПЦР-продукт испускает флюоресцентный импульс, который фиксирует ССД-камера в виде пика. Каждый пик имеет определенную высоту и площадь в зависимости от интенсивности сигнала. После обработки сигнала компьютером, результатом фрагментного анализа будут наборы пиков в области ПЦР-амплификации. Амплификаты, отличающиеся по количеству пар нуклеотидов в CDR3 области, характеризуют поликлональный (отрицательный) ответ. Наличие одинаковых по длине CDR3 области ПЦР-амплификатов характеризуют моноклональный (положительный)

результат.

2.4.1. Критерии интерпретации результатов

Размеры ПЦР продуктов для реакции IGH-tubeA составляли 310-360 п.н., для IGH-tubeB — 250-295 п.н., для IGH-tubeC - 100-170 п.н., IGH-tubeD - 110-290 п.н. и 390-420 п.н., IGH-tubeE — 100-130 п.н., для IGK-tubeA — 120-160, 190-210, 360-300 п.н., для IGK-tubeB — 210-245, 270-300, 350-390 п.н., для реакции TCRG-tubeA - 145-255 п.н., TCRG-tubeB — 80-220 п.н., TCRD-tubeA — 120-280 п.н., TCRD-tubeB — 130-280 п.н., TCRB-tubeA — 240-285 п.н., TCRB-tubeC - 170-210 п.н. и 285-325 п.н.

Результат фрагментного анализа оценивался по набору пиков в области ПЦРамплификации. Отрицательный (поликлональный, Poly) результат определяли при
наличии множества пиков, профиль которых соответствовал кривой Гаусса.
Результат считался положительным (моноклональным, Mono) при наличии одного
или двух четких пиков (в случае биаллельной реаранжировки). При этом пики
должны были полностью доминировать и превышать поликлональный фон более
чем в 3 раза. Сомнительный моноклональный (Мопо (сомн)) результат — наличие
одного или двух четких пиков, превышающих поликлональный фон в 2-3 раза.
Олигоклональный результат (Oligo) — наличие нескольких доминирующих пиков
(более трех) без поликлонального фона. Критерии интерпретации результатов
фрагментного анализа представлены в таблице 9 и на рисунке 8.

Таблица 9. Критерии интерпретации результатов фрагментного анализа

Вариант	Характерная картина
Poly	Наличие множества пиков
Oligo	Наличие нескольких пиков
Mono	Наличие одного или двух (при биаллельной
	реарранжировке) пиков, без

	поликлонального фона						
Mono (сомн)	Наличие на поликлональном фоне						
	выраженного пика, превышающего все						
	остальные в 2 и более раз						

П р и м е ч а н и е : Poly – поликлональный (отрицательный) результат; Oligo – олигоклональный результат; Мопо – моноклональный (положительный) результат; Мопо (сомн) – сомнительный моноклональный результат.

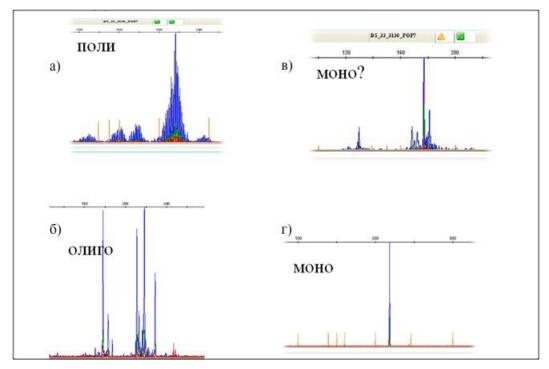


Рисунок 8. Результаты фрагментного анализа. а) Поликлональный (отрицательный) результат — наличие множества пиков. б) Олигоклональный — более 3-х четких пиков. в) Сомнительный моноклональный - одни или два пика, которые превышают поликлональный фон. г) Моноклональный (положительный) — один или два пика. (см. объяснения в тексте).

2.4.2. Условия ПЦР (полимеразной цепной реакции

Клональность Т- и В-лимфоцитов оценивали с помощью мультиплексной системы праймеров BIOMED-2 для анализа фрагментов амплификации [75]. Клональность В-лимфоцитов определяли по реаранжировкам генов *IGH* (VH–JH tubeA - FR1, tubeB - FR2, tubeC - FR3, tubeD и tubeE - DH–JH), *IGK* (tubeA - Vk–Jk, tubeB - Vk–KDE/IntronRSS–KDE). Т-клеточную – по реаранжировкам *TCRG* (tubeA

и tubeB - VG-JG), TCRB (tubeA и tubeB - VB-JB, tubeC - DB-JB), TCRD (tubeA -VD–JD и DD2–JD, tubeB - VD–DD3/DD2–DD3). Мультиплексные реакции содержали большое количество праймеров, разделенные на несколько пробирок в соответствие с протоколом BIOMED-2 (см. краткое описание в приложении 1). Для амплификации генов TCRB применяли коммерческий набор TCRB Gene Clonality Assay ABI Fluorescence Detection (Invivoscribe Technologies, США). Конечный объем смеси для ПЦР генов IGH, IGK и TCRG, TCRD составлял 25 мкл, в нее входили 5 пмоль каждого праймера («Синтол», Россия), 100–200 нг ДНК и 12.5 мкл 2×PCRMasterMix (Promega, США). Амплификация проводилась автоматическом ПЦР-амплификаторе. Условия полимеразной цепной реакции – денатурация ДНК при 95°C в течение 7 минут, затем 35 циклов элонгации – 95°C (45 c), 60°С (45 c), 72°С (45c) и 72°С (10 мин). В качестве положительного (клонального) контроля использовались клеточные опухолевые линии Daudi и Jurkat, а мононуклеары, полученные из крови здоровых людей – в качестве поликлонального (отрицательного) контроля.

2.4.3. Очистка продуктов амплификации и фрагментный анализ амплификатов

Для анализа фрагментов ПЦР-продуктов амплификации применяли анализатор нуклеиновых кислот ABIPRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). ПЦР-продукт амплификации разводили в 20 раз, затем смешивая 2 мкл полученного продукта с 10 мкл Hi-Di формамида (Applied Biosystems, США) и 0.04 мкл макрера длины GeneScan 500-LIS Size Standard (Applied Biosystems, США). Денатурацию двухцепочечных продуктов проводили при 95°С (3 мин.), затем подвергая охлаждению (5 мин.). Капиллярный электрофорез осуществляли с использованием полимера РОР-4 (Applied Biosystems, США). Оценку флюоресценции ПЦР-продуктов и их профиля проводили с использованием программного обеспечения GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems, США).

2.4.4. Чувствительность метода

Чувствительность метода определения Т-клеточной клональности составляет – 2-15%, т.е. Т-клеточная клональность выявляется при наличии 2-15% моноклональных лимфоцитов от всех лимфоцитов в образце. Чувствительность метода определения В-клеточной клональности составляет – 1-5%, т.е. В-клеточная клональность выявляется при наличии 1-5% моноклональных лимфоцитов среди всех В-лимфоцитов лимфоцитов в образце. Чувствительность метода была определена ранее [5, 6, 9].

Для определения чувствительности фрагментного анализа, ДНК клеточной линии Jurkat и Daudi смешивали в разных пропорциях с ДНК, выделенной из отсепарированных Т- и В-клеток периферической крови здорового донора.

2.5. Агарозный гель-электрофорез и секвенирование клональных продуктов

Для выделения моноклональных продуктов мы проводили агарозный гельэлектрофорез. Синтез ПЦР-продуктов выполняли с использованием немеченных праймеров. Элекрофорез проводили в 2% агарозном геле при комнатной температуре (150V, 30 – 40 минут), с предварительной окраской геля бромистым этидием (30 мин). Клональный продукт определялся в виде яркой полоски в области, соответствующей длине продукта (рисунок 9). Полоску с продуктом вырезали и выделяли ДНК из агарозного геля при помощи коммерческого набора Cleanup mini (Евроген, Россия).

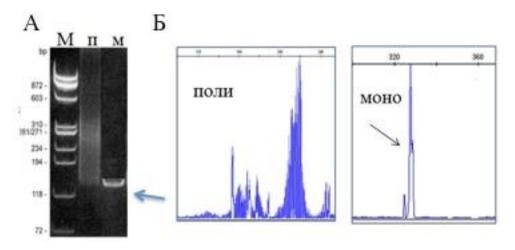


Рисунок 9. А) Агарозный гель-электрофорез: М – маркер молекулярного веса; п

поликлональный продукт; м — моноклональный продукт. Б) Соответствующие поликлональный и моноклональный результаты, полученные с помощью фрагментного анализа на первом этапе исследования.

Секвенирование проводили с использованием набора Big Dye Terminator на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems, США). Нуклеотидные последовательности генов сравнивали с последовательностями герминальных V-, D- и J -генов, опубликованных в электронных базах данных (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi и IMGT http://www.imgt.org) и находили нуклеотидную последовательность участка соединения V-, D-, J-генов – CDR3 участка (рисунок 10).

2.6. Подбор и тестирование пациент-специфичного праймера

Дизайн пациент-специфичного праймера осуществляли при помощи программы Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator (http://basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html) таким образом, чтобы температура отжига соответствовала 55 – 57°C, содержание GC составляло около 40-60%, с минимальным количеством G/C на 3' конце (рисунок 10).

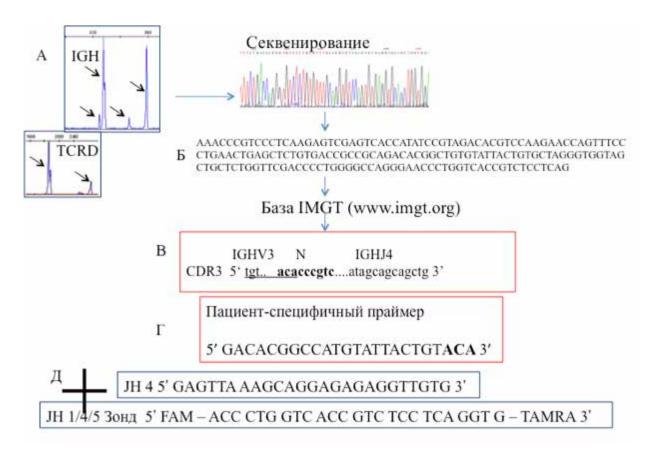


Рисунок 10. Схема подбора пациент-специфичного праймера по генам тяжелой цепи IG (пациент К., 37 лет, В-ОЛЛ). А. Моноклональный результат по генам тяжелой цепи IG, выявленный с помощью фрагментного анализа. Б. Нуклеотидная последовательность клонального продукта. В. Уникальная для данного клона CDR3 область. D. Последовательность прямого пациент-специфичного праймера. Г. Консенсусные последовательности обратного праймера и флюоресцентного зонда.

Для того, чтобы определить, является ли подобранный праймер специфичным для данного пациента и пригодным для дальнейшего определения МОБ, проводили его тестирование с помощью ПЦР в реальном времени с ДНК пациента в дебюте заболевания и ДНК поликлонального контроля (смесь ДНК, полученная от как минимум 6 здоровых доноров). Для амплификации использовали пациентспецифичный праймер, консенсусные обратные праймеры и флюоресцентный зонд. Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 10 pmol каждого праймера (Синтол, Россия), 6 pmol флюоресцентного зонда (Синтол, Россия), 50 нг ДНК. Амплификацию осуществляли на автоматическом термоциклере StepOne Plus (Applied biosystems, США). Условия ПЦР: предварительная денатурация

двухцепочечной молекулы ДНК при 95° (5 мин), 50 циклов полимеразной цепной реакции при 95°С (20 сек), 63°С (20 сек) с детекцией результата после каждого цикла. Праймер считали пригодным, если значение цикла ПЦР реакции, на котором кривая амплификации пересекает пороговый уровень (пороговый цикл, Сt) с ДНК пациента находится в пределах 20-27 циклов амплификации, а пороговый цикл с поликлональной ДНК на 10-15 циклов больше (рисунок 11).

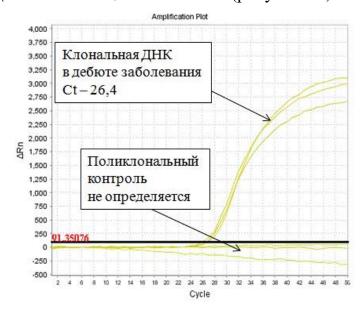


Рисунок 11. Тестирование пациент-специфичного праймера методом ПЦР в реальном времени. По оси X — цикл амплификации, Y — интенсивность флюоресценции. Нарастание флюоресцентного сигнала, свидетельствующее о начале амплификации клональной ДНК определяется на 26 цикле ПЦР. Поликлональная ДНК не амплифицируется с пациент-специфичным праймером.

2.7. Построение стандартной кривой, определение общей и подсчетной чувствительности метода определения минимальной остаточной болезни

Для построения стандартной кривой и определения общей и подсчетной чувствительности метода выполняли серию разведений моноклональной опухолевой ДНК пациента, полученной в дебюте заболевания, в поликлональной смеси ДНК, полученной из мононуклеарных клеток периферической крови как минимум 6 здоровых доноров (рис. 12). Условия ПЦР не отличались от таковых на этапе тестирования праймеров. Разведения опухолевой ДНК от 10^{-1} до 10^{-5} делали

в трех повторах.

Критерии стандартной кривой (СК):

- 1. СК должна иметь как минимум 3 точки разведения;
- 2. Значения тангенса угла наклона СК должны находиться в диапазоне от -3,1 до 3,9, оптимально -3,3–(-3,4);
- 3. Значение коэффициента корреляции должно быть выше 0,98.

Общая чувствительность представляет собой наименьшее разведение ДНК опухоли при котором:

- детерминируется специфический продукт ПЦР-амплификации;
- определяется хотя бы 1 из 3 реплик;
- наименьший Сt поликлонального контроля как минимум на 1 цикл больше наибольшего порогового цикла (Сt);
- между наибольшим Сt в повторах и Сt неразведенного образца разница циклов не превышает 20 Сt.

Подсчетная чувствительность представляет собой наименьшее разведение ДНК опухоли и удовлетворяет следующим требованиям:

- детерминирует специфический продукт ПЦР-амплификации;
- разница между пороговыми циклами в репликах (Δ Ct) не больше 1,5 цикла;
- наименьший Сt поликлонального контроля как минимум на 3 цикла больше, чем наибольший Сt в репликах;
- разница между пороговыми циклами в репликах должена находиться в диапазоне 2,6-4,0 Ct от Δ Ct предыдущего разведения, при 10-кратном разведении или, в диапазоне 0,5-1,5 Ct, при 2-кратном разведении.

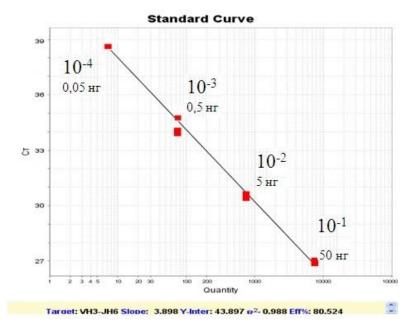


Рисунок 12. Стандартная кривая, построенная по серии разведения моноклональной опухолевой ДНК пациента K, 41 года с диагнозом В-ОЛЛ. Общая чувствительность — 10^{-4} , подсчетная чувствительность — 10^{-3} .

2.8. Количественная оценка минимальной остаточной болезни при помощи ПЦР в реальном времени

Для количественной оценки уровня минимальной остаточной болезни мы проводили ПЦР в реальном времени с пациент-специфичным праймером, определяли МОБ по СК и проводили нормирование концентрации и качества опухолевой ДНК по гену β-глобина. Условия ПЦР соответствовали описанным при тестировании праймеров. Реакционная смесь для ПЦР включала 500 нг ДНК. Для нормирования количества ДНК выполняли серийные разведения ДНК от 6 доноров, амплификацию с праймерами контрольного гена, построение соответствующей СК. По положению точки начала цикла амплификации опухолевой ДНК на СК контрольного гена производили корректировку качества и количества ДНК.

Несмотря на то, что ПЦР в реальном времени является методом количественной оценки, в случае, если значение МОБ находится за пределами подсчетной чувствительности, можно говорить лишь о наличии остаточного

минимального опухолевого клона без подсчета количества опухолевых клеток (рисунок 13).

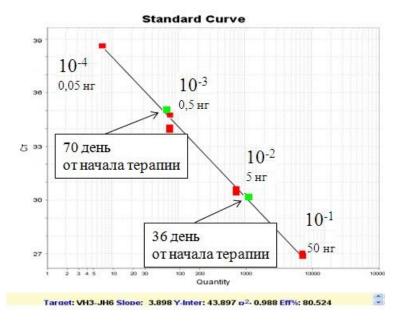


Рисунок 13. Стандартная кривая, построенная по серии разведений моноклональной опухолевой ДНК. Стрелками показан результат определения МОБ после курсов ПХТ. На 36 день от начала терапии количество опухолевых клеток составило 2,80х10⁻². На 70 день терапии определяется минимальная остаточная болезнь без подсчета количества опухолевых клеток.

2.9. Селекция популяций лимфоцитов периферической крови

Выделение CD4+, CD8+, CD19+, CD3+ и CD25+CD4+ популяций лимфоцитов проводили с помощью набора для клеточной селекции производства Miltenyi Biotec (магнитного сепаратора MiniMACS Separator; колонок для магнитной селекции MS Columns; реагента с фиксированными на магнитных микробусах соответсвующими антителами MicroBeads, буфера для селекции) согласно стандартному протоколу производителя. По данным проточной цитофлуорометрии чистота выделения фракции лимфоцитов составляла 97,5 $\pm 1,9\%$.

2.10. Статистическая обработка результатов

Для анализа данных использовались стандартные методы описательной статистики, частотный, дисперсионный, регрессионный анализ. Расчеты были сделаны с использованием статистического пакета STATISTICA.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Одновременное выявление Т- и В-клеточной клональности

За период с 2008 по 2017 год в лабораторию молекулярной гематологии поступили пробы от 2182 пациентов для одновременного исследования Т- и В-клеточной клональности.

Одновременное выявление В- и Т-клеточной клональности отмечено у 121 пациента (рис. 14, таблица 10), пациенты с сочетанным сомнительным/олигоклональным результатом определения Т- и В-клеточной клональности в таблице и на рисунке не представлены).

Одновременно четкая Т- и В-клеточная клональность выявлена у 49 из 121 (40,5%) пациентов. Из них одновременное выявление четких пиков Т- и В-клеточной клональности встречается у пациентов с острым лимфобластным лейкозом (16,3%), аутоиммунной гемолитической анемией (14,3%), ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой (14,3%). При этом остальные случаи чаще связаны с В-клеточными неходжкинскими лимфомами (18,4%) и очень редко другими Т-клеточными лимфомами (4%) – один случай представлен гепатолиенальной Т-клеточной лимфомой.

У 19 (15,7%) пациентов четкая моноклональная картина по реаранжировкам генов Т-клеточного рецептора сочеталась с сомнительным или олигоклональным результатом В-клеточной клональности. При этом, чаще остальных (10 из 19 пациентов (52,6%)) такая ситуация отмечена у пациентов с ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой. В одном случае (5%) В-клеточной неходжкинской лимфомы и в одном случае миелодиспластического синдрома (МДС) (5%) также отмечено одновременное выявление моноклональной картины по реаранжировкам генов Т-клеточного рецептора и сомнительного клонального результата по реаранжировкам генов иммуноглобулинов. При этом у пациента с диагнозом МДС была выявлена сомнительная моноклональная картина по реаранжировкам генов *IGH*, которая не определялась при повторном исследовании через 3 месяца терапии, также и четкая клональная картина по реаранжировкам генов *TCR*,

появилась на терапии, однако при динамическом исследовании не определялась через 12 месяцев наблюдения, что, вероятнее всего, отражает реактивную природу как Т-, так и В-клеточных клонов.

Таблица 10. Одновременное выявление Т- и В-клеточной клональности у пациентов с гематологическими заболеваниями.

Диагноз	T+ B+	T+ B-	B+T-
		сомн	сомн
Ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома	7	10	2
Лимфома из клеток маргинальной зоны	1	-	3
Лимфогранулематоз	1	-	1
Фолликулярная лимфома	2	-	-
Волосатоклеточный лейкоз	2	-	1
Острый лимфобластный лейкоз	8	-	-
Аутоиммунная гемолитическая	7	1	2
анемия/Иммунная тромбоцитопения			
Зрелоклеточная лимфома с поражением	1	-	-
селезенки, печени, КМ			
Хронический лимфоцитарный лейкоз	1	-	3
Острый миелобластный лейкоз	1	-	-
Диффузная В-клеточная крупноклеточная	1	-	8
лимфома			
Грибовидный микоз/синдром Сезари	1	-	-
Гепатолиенальная Т-клеточная лимфома	1	-	-
Нет данных (амб. пациенты)	15	6	18
В-клеточная лимфома, богатая Т-лимфоцитами	-	1	-
Миелодиспластический синдром	-	1	-
Лимфома из клеток мантии	-	-	1
Первичная медиастинальная лимфома	-	-	1
ВСЕГО	49	19	39

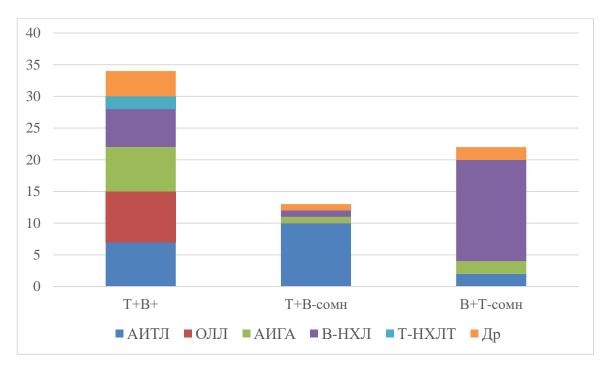


Рисунок 14. Распределение по диагнозам пациентов с сочетанным выявлением Т- и В-клеточной клональности.

У 39 (32,2%) пациентов выявлена четкая В-клеточная клональность в сочетании с сомнительным или олигоклональным результатам Т-клональности — при В-клеточных неходжкинских лимфомах (43,6%) и не встретилась при Т-клеточных неходжкинских лимфомах (0%).

У 14 (11,7%) пациентов обнаружено сочетание сомнительной Т- и В-клеточной клональности.

Таким образом, для нашего дальнейшего анализа были отобраны больные с ОЛЛ, АИТЛ, АИГА.

3.1.1. Частота и характер клональных реаранжировок генов *TCR* и *IG* у пациентов с острым лимфобластным лейкозом

Как уже было сказано ранее, одновременное выявление Т- и В-клеточной клональности характерно для пациентов с ОЛЛ и объясняется повышенной активностью рекомбиназного комплекса в опухолевых клетках.

В исследование было включено 66 пациентов с ОЛЛ: 37 (56,1%) с В-варианом ОЛЛ, 29 (43,9%) с Т-вариантом ОЛЛ.

Частота выявления клональных реаранжировок генов *TCR* и генов тяжелой и легкой цепей *IG* при В- и Т-вариантах ОЛЛ представлена в таблице 11.

Таблица 11. Частота выявления клональных реаранжировок генов гамма-, бета- и дельта-цепей TCR и генов тяжелой и легкой цепей IG при В- и Т-вариантах ОЛЛ

Реаранж	кировки	В-ОЛЛ (n-37)	Т-ОЛЛ (n-29)	
TCRG	VG – JG	70.3% (n=26)	89.7% (n=26)	
TCRB	VB – JB (полные)	32.4% (n=12)	51.7% (n=15)	
TORD	DB – JB (неполные)	24.3% (n=9)	44.8% (n=13)	
	Bce TCRB	40.5% (n=15)	65.5% (n=19)	
TCRD	VD – JD / DD2 – JD	21.6% (n=8)	51.7 % (n=15)	
	VD – DD3/ DD2 – DD3	45.9% (n=17)	31% (n=9)	
	Bce TCRD	62.2% (n=23)	65.5% (n=19)	
IGH	VH – JHFR1/FR2/FR3 (полные)	67.6% (n=25)	6.9% (n=2)	
	DH – JH (неполные)	21.6% (n=8)	20.7% (n=6)	
	Bce IGH	78.4% (n=29)	20.7% (n=6)	
	Vk – Jk	27% (n=10)	0% (n=0)	
IGH IGK	Vk – KDE / IntronRSS – KDE	29.7% (n=11)	3.4% (n=1)	
	Bce IGK	35.1% (n=13)	3.4% (n=1)	

Клональные реаранжировки генов *IG* выявлены у 7 пациентов из 29 (24,1%) пациентов с Т-клеточным вариантом заболевания, в то время как перестройки генов *TCR* были выявлены у 34 из 37 (91,9%) пациентов с В-ОЛЛ. Клональные реаранжировки генов *TCR* и *IG* не являются специфичными для В- и Т-ОЛЛ, соответственно. Это объясняется незавершенностью процессов реаранжировки генов *TCR* и *IG* в ранних клетках-предшественницах и повышенной активностью рекомбиназного комплекса. Согласно литературным данным, наиболее часто при

В-ОЛЛ выявляются неполные перекрестные клональные перестройки по генам *TCRD* – около 70% случаев [40]. Клональные перестройки генов *TCRG* выявляются приблизительно в 60% случаев В-ОЛЛ, а клональные реаранжировки *TCRB* в около 30% случаев [208]. Перекрестные клональные реаранжировки генов *IG* при Т-ОЛЛ наблюдаются сравнительно редко – в 10-22% случаев Т-ОЛЛ [207].

В нашем исследовании у пациентов с В-ОЛЛ чаще остальных встречались перестройки генов IGH (82,4%) и TCRG (76,5%), реаранжировки генов TCRB и генов IGK выявлены у 38,2% пациентов, перестройки генов TCRD — у 55,9% пациентов. В 89,3% случаев с Т-ОЛЛ выявлены реаранжировки генов TCRG. Перестройки генов TCRD обнаружены у 64,3% пациентов, перестройки генов TCRB — у 60,7% больных. Реже других при Т-клеточной варианте ОЛЛ обнаружены перестройки генов IGH — 28,6%. В одном случае Т-клеточного ОЛ обнаружена клональная перестройка генов легкой к-цепи IG — Vk/KDE (приложение 2).

ОЛЛ, При Т-клеточном варианте согласно данным зарубежных исследований, клональные перестройки генов TCRD обнаруживаются примерно в 55% случаев [40], генов *ТСRG* – у 95% пациентов [208], генов *ТСRB* – у 92% пациентов. У большой части пациентов детского возраста с В-клеточным вариантом ОЛ (26–30%) изначально выявлен олигоклональный характер реаранжировок [33, 137, 211]. Чаще других олигоклональность выявляют при исследовании реаранжировок генов *IGH*: полные реаранжировки – у 30–40% больных, неполные – у 50–60%, гены δ -цепи TCR – у 20–25% больных. Сравнительные подробные данные по частотам обнаружения клональных перестроек генов TCR и IG при В- и Т-клеточном варианте ОЛ в Российской и Европейской популяциях больных представлены в приложении 2. Как видно из приложения, наши данные отличаются от данных европейских исследований, что может быть связано с небольшим размером нашей выборки.

Олигоклональные перестройки (три и более клональных пика) наблюдались как при В-ОЛЛ (IGH у 11% (4 из 37) пациентов, TCRD у 16% (6 из 37) пациентов), так и при Т-ОЛЛ (TCRD у 31% (9 из 29) пациентов).

3.1.2. Одновременное выявление Т- и В-клеточной клональности у пациентов с ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой

По нашим данным одновременно В- и Т-клональность выявлена в 30% (12 из 40) случаев. При этом в 22% (9 из 40) случаев Т-клональность была сомнительной. Такие результаты создают сложность при первичной диагностике АИТЛ.

Известно, ЧТО при АИТЛ Т-клеточное лимфопролиферативное заболевание, нормальными аналогами опухолевых клеток при котором являются CD4+ фолликулярные Т-хелперы, однако при этом довольно часто выявляется Вклеточная клональность [203]. При гистологическом исследовании определяются клетки средних и крупных размеров, напоминающие иммунобласты, выражен реактивный компонент, содержащий плазматические клетки, гистиоциты, эозинофильные лейкоциты, что требует дифференциальной диагностики с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой, богатой Т-лимфоцитами и другими Т-клеточными лимфомами. EBV-позитивные крупные В-лимфоциты, имеют сходство с клетками Ходжкина и Рид-Штернберга, что требует проведения дифференциальной диагностики также с классическим вариантом лимфомы Ходжкина. Выявление В-клеточной клональности при АИТЛ осложняет процесс дифференциальной диагностики молекулярно-генетическим методом. Возможно ли объяснить этот феномен генетической нестабильностью, как при ОЛЛ, остается неизвестным. Предполагается, что В-клеточные клональные лимфоциты связаны с персистенцией вируса Эпштейна-Барр (EBV) [24, 38, 141, 194, 213, 235]. Несмотря на Т-клеточное происхождение опухоли, Т-клеточная клональность при АИТЛ не выявляется в 100% случаев. При совместном применении наборов праймеров для определения реаранжировок генов TCRG и TCRB, Т-клеточную клональность удается выявить в 86% случаев, а при использовании только набора для определения клональности по генам TCRG – лишь в 66 % случаев. Известно, что количество опухолевых Т-клеток при АИТЛ обычно невелико. Однако, в некоторых случаях мы выявляем четкую клональную картину не только в первичном материале (ткани ЛУ), но и в материале других органов, вовлеченных в опухолевый процесс в результате распространения лимфомного поражения. При этом, в части случаев, у одного пациента в разных органах и тканях клональные пики не совпадают по длине (по количеству пар нуклеотидов). Кроме того, при динамическом исследовании Т-клеточной клональности на этапах терапии отмечается появление новых четких клональных продуктов KM периферической крови пациентов с АИТЛ, несмотря на клиническую ремиссию заболевания. Ответа на вопрос, что представляют собой эти Т-клеточные клоны, на сегодняшний день в доступной литературе нет. Выяснение природы данных Тклеточных клонов имеет принципиальное значение, поскольку от выяснения принадлежности их к опухолевой или реактивной популяции лимфоцитов, зависит стадия опухолевого процесса и соответственно схема терапии. Феномен клональной гетерогенности при АИТЛ будет подробно рассмотрен далее в главе 3.3.1.

3.1.3. Сочетанное выявление Т- и В-клеточной клональности при аутоиммунной гемолитической анемии

При АИГА не просто одновременное выявление Т- и В-клеточной клональности, но и изолированное выявление Т- или В-клеточной клональности, вводит в заблуждение врача-гематолога. Известно, что АИГА – частое осложнение лимфом. Однако при этом часто возникает ситуация, при которой гистологическая картина реактивных изменений трепанобиоптата костного мозга сочетается с выявлением Т- или В-клеточной клональности. Это сильно затрудняют проведение дифференциальной диагностики идиопатической АИГА и АИГА, возникшей на фоне лимфопролиферативного заболевания. Феномен сочетанного выявления Т- и В-клеточной клональности при АИГА до настоящего времени в мировой литературе описан не был. У 27% пациентов с АИГА мы выявили В-клеточную клональность, у 48,5% пациентов — Т-клеточную клональность, у 12% пациентов — сочетание Т- и В-клеточной клональности. По данным гистологического исследования препаратов КМ и/или селезенки, только в 1 из 9 (11%) случаев выявлены признаки лимфомного поражения. Для пациентов с выявленной В-

клеточной клональностью и наличием архивного гистологического материала (у 4 из 8) для исключения минимальных признаков поражения КМ при лимфоме дополнительно выполнено ИГХ исследование. У 1 из 4 пациентов при ретроспективном исследовании выявлены признаки В-клеточной лимфомы из клеток маргинальной зоны. У 3 пациентов при проведении ИГХ признаков опухолевого поражения не обнаружено. Мы предполагаем, что отсутствие признаков опухолевого поражения по данным гистологического исследования в данном случае связаны с незначительной интерстициальной инфильтрацией КМ опухолевыми клетками и одновременном избыточном расширении красного ростка, возникашего как следствие компенсаторной реакции на развитие анемии. Подобная ситуация возможна при очаговом типе поражения КМ (опухолевый очаг остается за пределами объема трепанобиоптата). Данная когорта пациентов требует тщательного наблюдения и обязательного выполнения ИГХ-исследования костного мозга. Подробный анализ феномена Т-клеточной клональности при АИГА будет приведен в главе 3.4.1, посвященной дифференциальной диагностике реактивной и опухолевой лимфопролиферации.

3.1.4. Композитные лимфомы

Из таблицы 10, где представлены пациенты с различными гематологическими заболеваниями, у которых одновременно выявлены Т- и В-клеточная клональность, видно, что четкая В-клеточная клональность в сочетании с сомнительной Т-клеточной клональностью выявлена в одном случае лимфомы Ходжкина.

Лимфома Ходжкина — опухолевое лимфопролиферативное заболевание, при котором преимущественно поражаются внутригрудные лимфатические узлы, реже периферические и внутрибрюшные ЛУ. Поражение костного мозга выявляется редко (менее 5% случаев). Морфологически при лимфоме Ходжкина, среди преобладающего реактивного компонента выявляются многоядерные опухолевые клетки Березовского-Штернберга и одноядерные клетки Ходжкина. Опухолевые клетки представлены небольшой популяцией — от 0,1 до 10% [133]. Согласно литературным данным различных авторов, В-клеточная клональность по

реаранжировкам генов *IGH* в материале ЛУ с использованием праймеров протокола BIOMED-2 выявляется от 16 до 24% случаев [133]. Мы выявляем клональные реаранжировки *IGH* приблизительно в 17% случаев лимфомы Ходжкина. Небольшой процент выявляемости обусловлен низким содержанием опухолевых клеток.

Клинический случай №1: пациент В, 63 лет с диагнозом лимфомы Ходжкина, выявелна В-клеточная клональность в сочетании с сомнительной Т-клеточной клональностью. Диагноз лимфомы Ходжкина установлен в 2011 году, больному проведено 8 курсов химиотерапии по программе ВЕАСОРР-14 (10/2011 – 03/2012), достигнута ремиссия заболевания, подтвержденная ПЭТ-исследованием. При этом, в первичном материале ЛУ была выявлена В-клеточная клональность. С марта 2014 года по данным УЗИ органов брюшной полости отмечалось постепенное увеличение размеров селезенки и внутрибрюшных ЛУ. По результатам гистологического исследования биопсийного материала забрюшинных ЛУ, печени, трепанобиопсии КМ (12/2015) установлен диагноз: композитная лимфома, представленная лимфомой Ходжкина (забрюшинные л/у) и лимфомой из клеток маргинальной зоны (забрюшинные л/у, печень, костный мозг). В этом же гистологическом материале определялся Вклеточный клон, который по размеру (в количестве пар нуклеотидов) не отличался от выявленного при диагностике лимфомы Хождкина. В мае 2016 года выполнена спленэктомия и после гистологического исследования был установлен диагноз композитной лимфомы (лимфома из клеток маргинальной зоны и лимфома Ходжкина, нодулярный склероз, NS I тип). До 05/2017 проведено 5 курсов XT по программе RB (ритуксимаб + бендамустин) с минимальных кратковременным положительным эффектом (в виде уменьшения в размерах всех групп ЛУ) и дальнейшей прогрессией заболевания и развитием инфекционных осложнений. В июне 2017 года выполнена повторная биопсия забрюшинного ЛУ, при гистологическом исследовании выявлена картина диффузной В-крупноклеточной лимфомы (CD20-), non-GCB типа, с высокой пролиферативной активностью, обширными очагами некроза, резвившейся в результате опухолевой трансформации лимфомы из клеток маргинальной зоны: клетки диффузного крупноклеточного пролиферата имеют округло-овальные ядра, морфологию центробластов и иммунобластов. Обширные зоны некрозов. Эти клетки практически мономорфно экспрессируют CD19 (интенсивная мембранная реакция), CD45, PAX5 (интенсивная ядерная реакция), MUM.1 (ядерная реакция > 70% позитивных клеток), активационный антиген CD30. При реакции с антителом к BCL-6 позитивны менее 50% опухолевых клеток (гетерогенная слабая ядерная реакция). Индекс пролиферативной активности Кі67 составляет до 80% позитивных опухолевых

клеток. CD3, CD5, CD23, Cyclyn B1, CD10 негативны. Таким образом, из приведенного клинического случая можно сделать вывод о том, что при обнаружении В-клеточной клональности у пациентов с Т-клеточными неходжкинскими лимфомами, у пациентов с лимфомой Ходжкина, следует проявлять повышенную настороженность в отношении наличия В-клеточной лимфомы как второго заболевания.

Клинический случай №2: у другого пациента установлен диагноз гепатолиенальной лимфомы с вовлечением КМ (на фоне стертого рисунка единичные CD20+фолликулы, преимущественная Т-клеточная пролиферация CD3+, CD5+ клеток, много TIA1+, CD16+, CD56+, CD57+, CD4+, CD8+, bF1+ клетки немногочисленные). Однако при молекулярногенетическом исследовании выявлена как Т-клональность (что характерно для гепатолиенальной лимфомы), так и В-клональность (четкие пики, нехарактерные для Т-клеточной лимфомы) в КМ, селезенке, печени, ЛУ. Для того, чтобы определить принадлежат ли данные клональные реаранжировки к одному опухолевому клону или нет, выделены популяции CD3+ и CD19+ клеток. При дальнейшем исследовании было показано, что клональные реаранжировки ІСН принадлежат CD19+ популяции В-лимфоцитов, а клональные реаранжировки TCR - CD3+ популяции лимфоцитов. С 10/2012 пациенту проводили терапию по протоколу ОЛЛ-2009 с нейропрофилактикой. Отмечалось прогрессирующее увеличение размеров образования в мозжечке (прижизненная биопсия была технически не возможна), что привело к смерти больного. Постсекционное гистологическое исследование образца опухоли мозжечка позволило идентифицировать морфологическую картину диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы. По данным молекулярно-генетического исследования генов IGH выявлены клональные реаранжировки, несовпадающие с выявленными в материале КМ, селезенки, печени, ЛУ. При комплексной оценке клинических, гистологический, молекулярно-генетических данных у пациента подтверждена композитная лимфома с развитием одновременно трех лимфом. Приведенный клинический случай является очень редким и описан в нашем центре [16].

Таким образом, при наличии нескольких клональных реаранжировок в исследуемом материале, выделение популяций лимфоцитов позволяет определить относятся ли эти клональные реаранжировки к одной лимфоцитарной популяции или имеется несколько клональных популяций лимфоцитов.

Заключение по главе 3.1.

1. Для пациентов с В-клеточным острым лимфобластным лейкозом

характерно одновременное выявление Т- и В-клеточной клональности в 92% случаев, что связано активным процессом реаранжировки генов *TCR* и *IG* в ранних клетках-предшественниках;

- 2. При ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме одновременно Т- и Вклональность выявлена в 20% случаев;
- 3. При ОЛЛ и АИТЛ выявление Т и/или В-клеточной клональности не является признаком линейной принадлежности;
- 4. В-клеточная клональность не выявлена ни в одном из случаев Т-клеточных лимфом, за исключением пациентов с АИТЛ и в 97% случаев ассоциирована с В-клеточной лимфомой;
- 5. Т-клеточная клональность, напротив, выявлена в 21% случаев В-клеточных лимфом. Среди всех неходжкинских лимфом выявление Т-клеточной клональности только в 17% случаев ассоциировано с Т-клеточной лимфомой;
- 6. В ряде случаев одновременное выявление В- и Т-клональности может свидетельствовать о наличии нескольких опухолей (композитной лимфомы).

3.2. Использование клональных перестроек генов *TCR* и *IG* для подбора пациент-специфичных праймеров и контроля минимальной остаточной болезни и клональная эволюция у пациентов с острым лимфобластным лейкозом

В нашем исследовании, МОБ после I индукционного курса была выявлена у 80% (12 из 15) больных, после II курса индукции – у 57% (12 из 21) пациентов. Эти данные согласуются с немецкими исследованиями, которые также продемонстрировали персистенцию опухолевого клона: на различных этапах индукционной терапии у 34-52% пациентов детектировали МОБ. После двух курсов консолидирующей терапии по программе ОЛЛ-2009 МОБ выявляли у

34,7% (8 из 23) пациентов, после пятого курса консолидации — у 27,8% (5 из 18) пациентов. По данным немецких авторов к 150 дню (протокол GMALL 06/99 — окончание II курса консолидации — начало I курса реиндукции) МОБ выявляется у 20% пациентов. Данные по клиренсу клона опухолевых клеток на различных этапах терапии по протоколу ОЛЛ-2009 представлены в таблице 12.

Таблица 12. Мониторинг МОБ у пациентов с ОЛЛ на различных этапах терапии по протоколу ОЛЛ-2009.

День терапии	Число пациентов, которым был проведен анализ	Число пациентов, у которых обнаруживается МОБ (%)
36	15	12 (80)
70	21	12 (57,1)
105	23	8 (34,7)
133	21	9 (42,9)
150	18	5 (27,8)
ПТ	18	4 (22,2)

Примечание: ПТ – поддерживающая терапия (различный дни ПТ, от 1 до 6 месяцев), МОБ – минимальная остаточная болезнь.

Двое из 27 больных, включенных в мониторинг, умерли в ходе консолидирующего лечения (у обоих персистировала МОБ): один от прогрессии заболевания, один от инфекционных осложнений. У одного больного, у которого после ІІ курса консолидации была выявлена МОБ, в дальнейшем был констатирован рецидив заболевания. Одному пациенту с персистенцией остаточной опухолевой популяции клеток на протяжении всего периода лечения выполнена алло-ТКМ, после чего МОБ, детектируемая с помощью подобранных в дебюте заболевания пациент-специфичных праймеров, не определялась. В настоящее время у этого больного сохраняется ремиссия заболевания. Троим пациентам, у которых на 105 день терапии детектировалась минимальная остаточная болезнь, в настоящее время проводится поддерживающая терапия и минимальная остаточная болезнь у них не выявляется.

Клинический случай №3: интересно отметить, что у одного пациента (№10 в приложении 3 и №3 в таблице 12) с В-Ш вариантом ОЛЛ в дебюте заболевания выявлена только одна клональная реаранжировка по генам *TCRD*. Подбор пациент-специфичного праймера к данной мишени не был успешен из-за маленького вставочного региона. Контроль МОБ у данного пациента не проводили. Через 6,2 мес. у пациента констатирован рецидив заболевания. Клональные реаранжировки генов *TCRG*, *TCRB*, *TCRD*, *IGH* и *IGK* были исследованы повторно. При этом оказалось, что клональная реаранжировка генов *TCRD*, выявленная в дебюте заболевания, сохранилась и в рецидиве, но отмечалось появление нескольких новых, в том числе, клональных реаранжировок генов *IGH* и генов легкой *IGK*. Подбор пациент-специфичного праймера к *CDR3* области *IGH* позволил обнаружить минорный опухолевый клон в исходном материале, направляемом в лабораторию на этапах лечения пациента до момента развития рецидива. Минорный клон персистировал на протяжении всего лечения и не был выявлен из-за недостаточной чувствительности фрагментного анализа. Нельзя исключить, что изначальный состав опухолевых клеток неоднороден, в то время как одни опухолевые клетки уничножаются под воздействием химиопрепаратов, другие получают пролиферативное преимущество.

Нестабильность состава опухолевой популяции при остром лимфобластном лейкозе усложняет контроль минимальной остаточной болезни и эффективности химитерапии специфичным мишеням, установленным в дебюте заболевания. Изучение стабильности и эволюции опухолевых клонов со сменой перестроек генов *TCR* и *IG* в рецидиве заболевания, в основном проводили на детских острых лимфобластных лейкозах. Бессобытийная выживаемость пациентов детского возраста различается в зависимости от возраста. От 83–97% в возрасте от 1 до 5 лет и до 49–66% в возрасте от 10 до 15 лет. По данным RALL выявлено, что в группах взрослых больных моложе 30 лет 5-летняя безрецидивная выживаемость составила 71.5%, в то время как у больных 30–55 лет этот показатель был ниже – 61.8% [8].

У шести пациентов мы исследовали клональные реаранжировки в дебюте и в рецидиве ОЛЛ. Всего в дебюте заболевания нами было обнаружено 5 клональных перестроек генов *IG* и 17 клональных перестроек генов *TCR*. В рецидиве заболевания обнаружено 3 клональные перестройки генов *IG* и 6 клональных перестроек генов *TCR*, которые были отличными от обнаруженных в дебюте (таблица 13).

У двух пациентов с В-ОЛЛ одна из клональных перестроек дебюта заболевания исчезла, при этом одновременно появились новые клональные перестройки (пациенты № 5 на рисунке 13 и № 6 в таблице 13). У пациента №5 (таблица 13) в дебюте заболевания выявлено два клональных продукта размерами 142 и 207 пар нуклеотидов (п.н., указаны стрелками на рис. 15) по реаранжировкам генов TCRD, клональный продукт 347 п.н. по реаранжировкам генов IGH. При развитии рецидива заболевания у этого пациента исходные клональные перестройки генов TCRD и IGH сохранились, однако отмечено появление новых клональных перестроек генов гамма цепи TCR (TCRGA - 164 п.н., TCRGB - 151, 165 п.н.), тяжелой цепи IG (IGHA - 330 п.н., IGHB -263 п.н., IGHC – 127 п.н.

Таблица 13. Сравнене клональных реаражировок, выявленных в дебюте и в рецидиве заболевания.

	Пациент №											
	1	-	2		3		4		5		6)
	Д	P	Д	P	Д	P	Д	P	Д	P	Д	P
TCRB-A	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
TCRB-B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
TCRB-C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCRG-A	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
TCRG-B	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
TCRD-A	+	+	+	+ 1	+	+	+	+	+	+	-	-
TCRD-B	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
VK-A	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
VK-B	ı	-	ı	-	-	-	+	+	ı	-	-	-
IGH-A	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+ 1	+	+
IGH-B	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+ 1	+	+

IGH-C	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+ 1	+	+

Примечание. + моноклональные перестройки, - поликлональный результат, +1 — изначальная клональная реаранжировка выявляется с дополнительной, отличной от выявленной в дебюте заболевания, Д - дебют заболевания, P - рецидив заболевания.

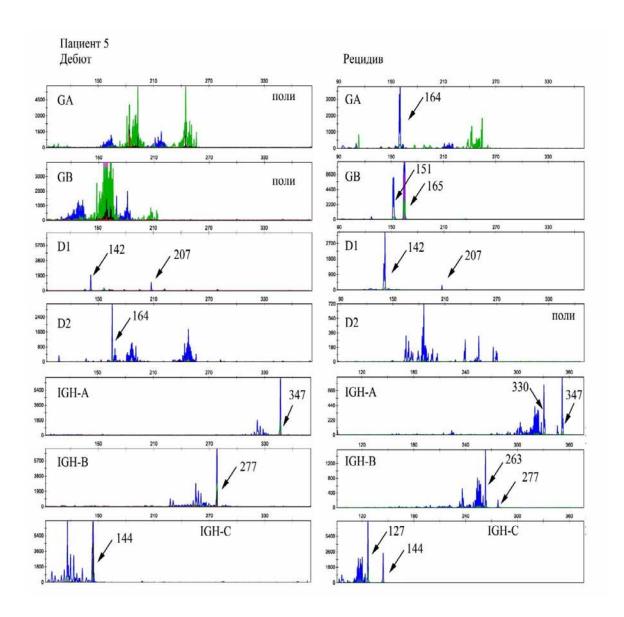


Рисунок 15. Схема данных фрагментного анализа продуктов амплификации генов *TCRG*, *TCRD*, *IGH* пациента №5 в дебюте и в рецидиве заболевания.

У 1 больной с диагнозом раннего Т-ОЛЛ клональные перестройки генов TCRG, TCRB и TCRD, выявленные в дебюте заболевания, полностью совпадали с клональными перестройками, выявленными в рецидиве заболевания (\mathbb{N} 1). У одного больного с Т-клеточным вариантом заболевания, выявленные в дебюте

клональные перестройки полностью сохранились в рецидиве заболевания, однако отмечалось появление новых клональных реаранжировок (№ 2 в таблице 13). У одного больного при развитии рецидива заболевания сохранялись только 2 из 7 клональных продукта, выявленных в дебюте заболевания (рисунок 16, № 4).

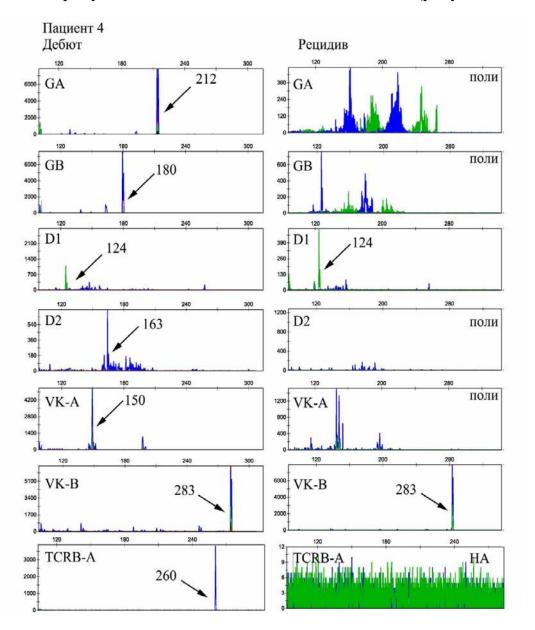


Рисунок 16. Схема данных фрагментного анализа продуктов амплификации генов *TCRG*, *TCRD*, *IGK TCRB* пациента №4 в дебюте и рецидиве заболевания.

У одного больного в дебюте В-клеточного острого лимфобластного лейкоза выявлена лишь одна клональная перестройка генов *TCRD*. Эта же клональная перестройка выявлялась при развитии рецидива заболевания. При этом при

развитии рецидива заболевания появились несколько клональных перестроек, которые ранее у данного пациента не выявлялись, в том числе клональные перестройки генов IGH и генов легкой IGK (№ 3 в таблице 13).

В нашем исследовании показано, что у всех пациентов в рецидиве заболевания сохраняелся хотя бы один клон из тех, которые были выявленны в дебюте (таблица 13). Согласно данным литературы, у детей при развитии позднего рецидива ОЛЛ (от момента констатации ремиссии заболевания должно пройти более 5 лет) отмечено сохранение хотя бы одного исходного клонального продукта [160]. Нами показано, что у 5 из 6 (83%) пациентов с диагнозом ОЛЛ клональные перестройки в дебюте и рецидиве заболевания частично изменяются. Вопрос о выборе мишеней для контроля МОБ очень актуален, ввиду того, что даже на такой небольшой выборке мы наблюдалем изменение клональных продуктов в рецидиве заболевания. Для снижения риска получения ложноположительных результатов (также, как и ложноотрицательных) рекомендовано использовать как минимум две независимые мишени, имеющие высокую стабильность. Основной проблемой является то, что не ко всем клональным реаранжировкам удается подобрать специфичный праймер, который имеет необходимую чувствительность. Прежде всего, это относится к незавершенным перестройкам, когда отсутствует D-сегмент, например, TCRG (Vy-Jy). Нами обнаружена у трех пациентов потеря пациентспецифичных мишеней, выявленных в дебюте заболевания. Для того чтобы выявить минорные субклоны в дебюте ОЛ и исследовать их изменение на фоне химиотерапии, мы повысили изначальную чувствительность метода. Используя праймеры, специфичные к семействам V- и J-регионов, мы исследовали материал дебюта заболевания повторно на предмет наличия клональных продуктов, возникших в рецидиве заболевания. Применение этих праймеров увеличило чувствительность метода с 10^{-1} до 10^{-2} – 10^{-3} . Несмотря на такую чувствительность, клональные продукты в материале дебюта заболевания обнаружены не были, что говорит о небольших размерах этих клональных продуктов и подтверждается данными других исследований [80]. У 77% (35 из 45) детей с В-вариантом ОЛЛ

клональные реаранжировки, которые появились в рецидиве, ретроспективно обнаруживались в материале дебюта заболевания лишь в минимальных количествах [80]. Содержание таких резистентных субклонов варьировало от 1 опухолевой клетки на 100 нормальных до 1 опухолевой клетки на 10000 нормальных, при этом чем меньше было остаточное количество опухолевых клеток, тем длительнее был период ремиссии [58].

В последние годы показано, что ОЛЛ характеризуется сложным и генетически неоднородным составов опухолевых клеток [90, 155]. В большинстве случаев ОЛЛ эволюция опухолевых клеток обусловлена пролиферацией одного или нескольких из минорных субклонов, который оказывается резистентным к проводимой химиотерапии [58, 101, 137]. Клональное разнообразие является проявлением опухолевой прогрессии. Часть клональных клеток, вероятно, обладает отличными от других клеток свойствами (генетическими мутациями, деления, иммунологической зрелостью), что обеспечивает скоростью устойчивостью к воздействию цитотоксических препаратов. Причины поздней пролиферации изначального клона клеток до сих пор остаются неизвестными. Возможно, ослабевает иммунологический надзор механизмы противоопухолевого иммунитета или появляются новые генетические мутации в опухолевых клетках, что в дальнейшем приводит к их активной пролиферации. Полноценный контроль МОБ можно обеспечить только, подобрав пациентспецифичный праймер для каждой клональной реаранжировки, выявленной в дебюте заболевания. Отсутствие амплификации с пациент-специфичными праймерами, подобранными к клональным реаранжировкам, нуклеотидная последовательность которых была определена в дебюте заболевания, не гарантирует отсутствия минимальной остаточной болезни. В сомнительных случаях, когда есть подозрение на развитие рецидива заболевания, даже при отсутствии амплификации с пациент-специфичными праймерами, рекомендовано полное повторное исследование Т- и В-клеточной клональности.

Заключение по главе 3.2.

- 1. Клиренс опухолевого клона у больных ОЛЛ, пролеченных по Российскому протоколу, сопоставим с таковым в зарубежных исследованиях;
- 2. Мониторинг клиренса МОБ методом ПЦР с подбором пациент-специфичных праймеров является надежным методом оценки эффективности терапии;
- 3. У 83% пациентов с рецидивом ОЛЛ клональные реаранжировки частично изменяются, что является следствием изначальной гетерогенности опухоли и наличия минорных клонов;
- 4. При рецидиве у пациентов с ОЛЛ сохраняется хотя бы один из клональных маркеров, выявленных в дебюте заболевания, поэтому успешный мониторинг МОБ возможен только при контроле всех клональных реаранжировок, выявленных в дебюте заболевания;
- 5. У пациентов с острым лимфобластным лейкозом при подозрении на рецидив и отрицательном результате определения МОБ (методом ПЦР с подбором пациент-специфичных праймеров) необходимо повторное полное исследование Т- и В-клеточной клональности.

3.3. Клональная вариабельность и гетерогенность

3.3.1. Гетерогенность и вариабельность Т-клеточных клонов у пациентов с ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой

Нами исследовано 40 пациентов с диагнозом АИТЛ. В дебюте заболевания в ткани лимфатического узла у 32 (80%) пациентов выявлена Т-клеточная клональность, у 5 (12,5%) пациентов выявлена сомнительная Т-клеточная клональность по реаранжировкам генов *TCR*, у 2 (5%) пациентов – реаранжировки генов были представлены несколькими клональными продуктами (олигоклональная картина), у одного (2,5%) пациента – Т-клеточная клональность не выявлена.

В дебюте заболевания костный мозг исследован у 28 пациентов. У 26 пациентов

выявлена Т-клеточная клональность по реаранжировкам генов *TCRG* и/или *TCRB*. При этом, лишь у 23% (6 из 26) пациентов, выявленные клональные продукты в КМ, совпадали по длине (в количестве пар нуклеотидов) с клональными продуктами, выявленными в материале ЛУ, в то время как у 46% (12 из 26) пациентов клональные продукты полностью отличались от выявленных в материале ЛУ. У 30% (8 из 26) пациентов клональные реаранжировки совпадали только частично, т.е. в КМ определялись дополнительные клональные продукты, отсутствовавшие в материале ЛУ. У 14 из 40 больных исследование клональности в крови и КМ проведено в динамике – у семи из 14 больных (50%) клональные реаранжировки выявляли на протяжении значительного периода наблюдения, они клиническо-лабораторной также выявлялись при достижении ремиссии заболевания. АИТЛ Корреляция продуктов У пациентов клональных представлена в таблице 14.

Таблица 14. Корреляция клональных продуктов лимфатического узла и костного мозга у пациентов с АИТЛ.

	ЛУ	KM				
Клональные продукты	23% (6 из 26)					
совпадают	2570 (O N3 20)					
Клональные продукты не	46% (12 из 26)					
совпадают						
Клональные продукты	30% (8	up 26)				
совпадают частично	30% (8 из 26)					

Примечание: ЛУ – лимфатический узел; КМ – костный мозг.

Ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома (АИТЛ) — периферическая Т-клеточная зрелоклеточная лимфома, которая характеризуется генерализованной лимфаденопатией, полиморфной инфильтрацией ЛУ и пролиферацией высоких эндотелиальных венул и фолликулярных дендритных клеток. При АИТЛ могут вовлекаться кожа, печень, селезенка, костный мозг [203]. Заболевание практически всегда связано с персистенцией вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ, EBV), что позволяет полагать его роль в этиологии АИТЛ, несмотря на то, что опухолевые Т-клетки

ВЭБ негативны [203]. На фоне иммунодефицита, ВЭБ-инфицированные клетки оказываются устойчивыми к иммунологическому надзору, что, как считается у пациентов с АИТЛ, приводит к полиморфной пролиферации В-лимфоцитов, плазмоцитоидных клеток и иммунобластов, как при инфекционном мононуклеозе у иммунокомпетентных лиц [106]. У пожилых, истощенных лиц, у онкологических СПИДом нередко возникает ВЭБ-ассоциированная больных лимфопролиферация, которая впоследствии может стать причиной развития опухоли [156, 163, 201]. Показано, что ВЭБ вызывает назофарингеальную карциному, ассоциируется со многими лимфопролиферативными заболеваниями, в частности с Т-клеточными лимфомами и ЛХ [87, 114, 142]. При заражении вирусом активируется как клеточный, так и гуморальный иммунитет. NK-клетки, CD8+ Т-клетки контролируют пролиферацию инфицированных лимфоцитов. Согласно литературным данным, до 44% всех CD8+ клеток могут быть специфичны к одному антигенному эпитопу ВЭБ.

Предполагая, что и в нашем случае Т-клеточная клональность связана с противовирусным ответом, мы сравнили наличие или отсутствие реактивных клонов в крови и КМ с результатом количественного определения ДНК ВЭБ в крови, КМ, материале ЛУ методом ПЦР. Были обследованы 20 пациентов: 8 пациентов, для которых были выявлены Т-клеточные клональные продукты, отличные от выявленных в материале ЛУ, и 12 пациентов, для которых были выявлены Т-клеточные клональные продукты, которые не отличались от выявленных в материале ЛУ. Как в одной, так и в другой группе пациентов, у 50% выявлена высокая вирусная нагрузка ВЭБ (>500 копий в сыворотке крови). Таким образом, ассоциации Т-клеточной клональности и активности репликации ВЭБ в крови мы не обнаружили (р>0,05).

Как было сказано ранее, распространенность опухолевого процесса (вовлечение КМ и других тканей — печени, ЦНС — исследование спинномозговой жидкости, легких — исследование плевральной жидкости) имеет большое значение, поскольку свидетельствует о диссеминации заболевания, определяет стадию

заболевания и предполагает иную терапевтическую тактику [45]. В нашем исследовании у всех пациентов с АИТЛ опухолевые клетки экспрессировали CD4+. Принадлежность выявленных нами клональных продуктов к CD4+ популяции лимфоцитов будет свидетельствовать об их опухолевой природе. Для того, чтобы определить к какой популяции лимфоцитов принадлежат, выявленные нами Т-клеточные клоны, мы применили метод магнитной селекции и исследовали CD8+ и CD4+ популяции лимфоцитов у 5 пациентов в ремиссии заболевания с персистирующей Т-клеточной клональностью. У всех пациентов клональные продукты, которые изначально были выявлены в КМ и крови и не совпадали по длине (в парах нуклеотидов) с клональными продуктами, выявленными в ткани ЛУ, принадлежали к CD8+ популяции клеток (рисунок 17).

Конечной целью иммунологического противоопухолевого надзора является уничтожение опухолевых клеток. Цитотоксические CD8+ лимфоциты играют основную роль в этом процессе [144]. При помощи поверхностных рецепторов, CD8+ клетки распознают родственные антигенам МНС класса I лиганды МІСА, МІСВ и UL16-связывающие белки, которые отсутствуют на поверхности нормальных клеток. При повреждении ДНК и/или в условиях окислительного стресса, при опухолевой пролиферации, экспрессия этих молекул на поверхности клеток значительно возрастает [166]. Взаимодействие лиганда МІСА или МІСВ с рецептором NKG2D приводит к активации CD8+ лимфоцитов и уничтожению измененных клеток [1]. Возможно, и в нашем случае выявление клональных CD8+ лимфоцитов обусловлено противоопухолевым ответом.

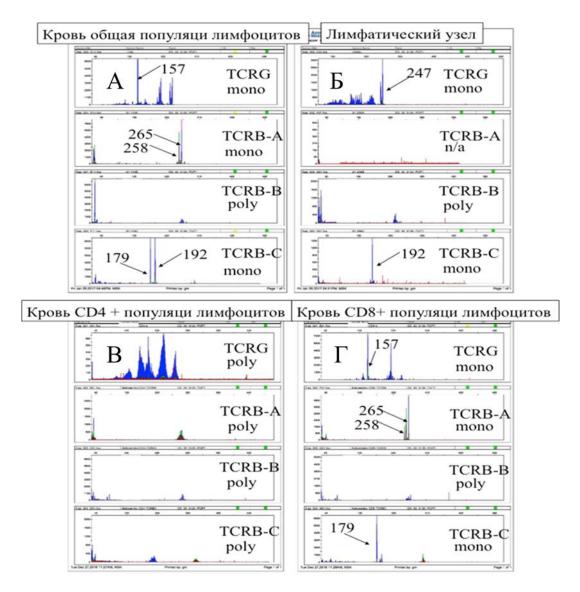


Рисунок 17. Данные определения Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов гамма и бета цепи *TCR* (*TCRG* и *TCRB*) у пациента с АИТЛ. (А) Стрелками указаны моноклональные продукты и их размеры в парах нуклеотидов (п.н.), выявленные при исследовании ткани ЛУ. (Б) Указаны моноклональные продукты, выявленные при исследовании общей популяции лимфоцитов периферической крови. (В) CD4+ популяция лимфоцитов представлена поликлональной картиной. (Г) CD8+ популяция лимфоцитов содержит клональные продукты, которые ранее выявлены в общей популяции лимфоцитов крови и не выявлены в ткани ЛУ.

У одного пациента в популяции CD4+ клеток был обнаружен клональный продукт, который соответствовал клональному продукту, обнаруженному в ЛУ в дебюте заболевания. Такая ситуация была расценена как персистенция опухолевого клона. При этом, пациент по результатам стандартного контрольного обследования находился в клиническо-гематологической ремиссии заболевания.

Таким образом, в нашем исследовании показано, что клональные продукты в

КМ и периферической крови, которые не совпадают с ЛУ, определяются у 76% больных с АИТЛ (76%), они принадлежат СD8+ популяции лимфоцитов, длительно персистируют (срок наблюдения от 1 до 40 мес.), сохраняются в ремиссии заболевания и, вероятно, имеют реактивную природу. Эти данные следует учитывать при оценке и интерпретации данных клональности в периферической крови и КМ. Длина моноклонального ПЦР-продукта является уникальной для опухолевого клона клеток и одинаковой во всех пораженных тканях и органаз у одного пациента. Стоит отметить, что для оценки распространенности заболевания на момент диагностики необходимо выявить клональную реаранжировку в субстрате, в котором по данным гистологического или иммунофенотипического исследования выявлена опухолевая пролиферация: в случае периферической лимфомы – в лимфатическом узле, селезенке, коже и т.д., а затем уже сравнивать длину полученных клональных пиков другими тканями. Изолированное исследование клональности в тканях, в которых по данным гистологического исследования опухолевый субстрат не обнаружен, может привести как к ложноположительным, так и к ложноотрицательным результатам.

3.3.2. Смена клональных перестроек генов Т-клеточного рецептора у пациентов после выполнения аллогенной трансплантации стволовых кроветворных клеток

Нами обследовано 8 пациентов с острыми лейкозами после выполнения алло-ТСКК. У 4 (50%) из них через несколько месяцев после трансплантации (от 1 до 3 месяцев) отмечено появление клональных продуктов, которые не определялись до трансплантации (таблица 15). Учитывая то, что клональные продукты могут определяться почти в половине случаев у здоровых доноров, мы обследовали доноров костного мозга у этих больных, однако во всех случаях картина реаранжировок генов *ТСRG* носила поликлональный характер.

У одного пациента с целью определения популяции лимфоцитов, к которой принадлежат выявленные нами клональные продукты, выполнена селекция лимфоцитов периферической крови: выделены CD8+ и CD4+ популяции клеток. Т-

клеточная клональность по реаранжировкам генов *TCRG*, выявленная в общей популяции, была обнаружена в CD8+ лимфоцитах. При этом, клональный продукт, выявленный в дебюте заболевания у этого пациента, не определялся ни в одной из исследованных популяций.

Таблица 15. Результаты исследования реаранжировок генов *TCRG* у пациентов до и после трансплантации, у доноров стволовых кроветворных клеток.

	Возраст	Диагноз	Реаранжиров				
Пациент№			Дебют заболевания	До алло- ТСКК	После алло- ТСКК	у донора	Статус пациента
1	31	ОЛЛ	нд	поли	олиго	поли	Жив, xРТПХ лег. ст.
2	33	ОЛЛ	нд	поли	моно (155 п.н.)	нд	Умер, инф.осл.
3	30	ОМЛ	нд	поли	моно (157 п.н.)	поли	Умер, инф.осл.
4	41	ОМЛ	нд	поли	сомн (160 п.н.)	поли	Жив, хРТПХ кожи
5	27	ОЛЛ	163 пн	поли	моно (163 п.н.)	нд	Умер, рецидив
6	28	ОЛЛ	нд	НД	поли	нд	Жив, без осл.
7	53	ОЛЛ	нд	НД	поли	нд	Жив, без осл.
8	43	ОЛЛ	нд	нд	олиго	поли	Жив, хРТПХ кожи

 Π р и м е ч а н и е : ОЛЛ — острый лимфобластный лейкоз; ОМЛ — острый миелобластный лейкоз; п.н. — пар нуклеотидов; хРТПХ — хроническая реакция «трансплантат против хозяина»; НД — нет данных.

Как известно, Т-лимфоциты играют основную роль в развитии реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [139, 233]. Пролиферация аллореактивных Т-лимфоцитов возможна [124, 143, 185] не только после пересадки костного мозга при выраженной РТПХ, но и после трансплантации солидных органов, а также длительной иммуносупрессивной терапии метотрексатом, азатиприном, кортикостероидами, циклоспорином, такролимусом [18, 92, 98, 116–118, 217, 225– 227]. Патогенез развития острой РТПХ включает в себя несколько стадий. Сначала происходит повреждение тканей, обусловленное предтрансплантационным кондиционированием, развивается системное воспаление, в ответ на которое активация, пролиферация, а также программирование путей происходит дифференцировки Т-лимфоцитов. В дальнейшей дальнейшем происходит повреждение органов и тканей посредством клеточных и воспалительных факторов [200]. Т-лимфоциты донора распознают главный комплекс гистосовместимости и связанные с ним белки на АПК хозяина, что, в последующем, приводит к повреждению тканей [177]. При развитии острой реакции «трансплантат против хозяина» селективно повреждается эпителий кожи, кишечника, печени [139]. Таким образом, реакция «трансплантат против хозяина» представляет собой собственных клеток взаимодействия организма реципиента с донорскими иммунными клетками. Возможно, выявленные нами цитотоксические Т-клеточные клоны имеют иммунную природу и отражают Т-клеточный иммунный ответ.

Другой вероятной причиной появления Т-клеточных клональных продуктов может служить реконституция, или восстановление, Т-лимфоцитов у пациентов после проведения алло-ТГСК. Зрелые донорские лимфоциты (как аллореактивные, так и аутореактивные), остаточные лимфоциты реципиента, устойчивые к химиотерапии, а также тимусзависимые или, возможно, тимуснезависимые, генерируемые de novo донорские лимфоциты последовательно восстанавливаются в течение года и даже более [20–22, 178]. В исследованиях показано, что CD4+ лимфоциты восстанавливаются позже, чем CD8+ [110, 122]. Кроме того, показано,

что быстрое восстановление CD8+ лимфоцитов к 90-му дню после выполнения алло-ТГСК связано с лучшим противоопухолевым ответом у пациентов с гемобластозами [218]. Возможно, выявленные нами CD8+ клональные лимфоциты отражают процесс реконструкции клеток иммунной системы.

Заключение по главе 3.3.

- 1. В 76% случаев у пациентов с ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой выявлены клональные продукты в КМ и крови, которые не совпадают с клональными продуктами ЛУ и носят реактивный характер;
- 2. У 44% пациентов после выполнения алло- ТГСК выявляются Т-клеточные клоны, которых не было до трансплантации, и которые имеют реактивную природу;
- 3. Для оценки распространенности заболевания на момент диагностики необходимо выявить клональную реаранжировку в субстрате, в котором по данным гистологического или иммунофенотипического исследования выявлена опухолевая пролиферация, а затем уже сравнивать длину полученных клональных пиков в других тканях. Изолированное исследование клональности в тканях, пораженных вторично, может привести к ложноположительным результатам.

3.4. Дифференциальная диагностика реактивной и опухолевой лимфопролиферации

3.4.1. Персистенция CD8+ лимфоцитов у пациентов с аутоиммунной гемолитической анемией

Как уже было сказано ранее, система BIOMED-2 широко используется для подтверждения клональности клеток при дифференциальной диагностике реактивных и злокачественных лимфопролиферативных заболеваний. При этом известно, что для реактивных клонов характерно исчезновение при динамическом исследовании. В нашем исследовании в периферической крови пациентов с АИГА выявлена статистически значимая по сравнению с группой контроля частота

встречаемости Т-клеточной клональности, которая персистировала на протяжении 10-15 лет и не зависела от пола, возрасти, количества гемоглобина, периодов ремиссий и обострений заболевания.

Из 33 пациентов с АИГА Т-клеточная клональность по генам TCRG выявлена у 16 из 33 пациентов (48,5%) и по генам TCRB — у 15 из 33 пациентов (45,5%), что стасистически значимо в сравнении с группой контроля (p<0,05).

В группе контроля, в которую были включены пациенты с другими анемиями, моноклональных результатов по генам гамма-цепи Т-клеточного рецептора не выявлено (0%), сомнительных результатов было 2 из 33 (6%): 1 при пароксизмальной ночной гемоглобинурии, 1 при наследственной гемолитической анемии.

По генам бета-цепи Т-клеточного рецептора моноклональных пиков не выявлено, сомнительные результаты определяли у 2 пациентов из 33 (6%): 1 при парциальной красноклеточной аплазии, 1 при пароксизмальной ночной гемонлобинурии. Результаты определения Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов *TCRG* и *TCRB* у пациентов с АИГА представлены в приложении 3.

Клинические данные были собраны у 27 пациентов с АИГА. Оценивали возраст, пол, тяжесть и длительность заболевания, спленэктомию, концентрацию гемоглобина.

Связи между наличием Т-клеточной клональности и тяжестью ($r_s = 0.247$; $0.05 \le p$), длительностью заболевания ($r_s = 0.278$; $0.05 \le p$), концентрацией гемоглобина ($r_s = 0.108$; $0.05 \le p$), не выявлено. Полученные данные свидетельствуют об отсутвии корреляции между наличием клона и выраженностью гемолиза.

Связи с возрастом $(r_s = 0.005; 0.05 \le p)$ и полом $(r_s = 0.239; 0.05 \le p)$ также не было выявлено. По данным литературы, частота выявления Т-клеточной клональности у людей старше 65 лет может достигать 30%. Такой феномен в пожилом возрасте обусловлен истощением Т-клеточного репертуара в результате

физиологического снижения общего количества клеток [59, 171]. В нашем исследовании большинство (n=32) пациентов было моложе 65 лет.

Связи между выявлением Т-клеточной клональности и спленэктомией (r_s = 0,013; 0,05≤р) также не выявлено. Селезенка – орган иммунной системы, в котором присутствуют Т- и В-зависимые области. Скопления лимфоцитов периартериально формируют Т-зависимые зоны, 75% из которых являются CD4+ клетками, а 25% – CD8+ клетками. Фолликул с зародышевым центром формируется за счет скопления В-лимфоцтов. Этот пласт лимфоцитов, образует белую пульпу селезенки. Другой пласт – красная пульпа селезенки образована сосудистыми синусами с расположенными вокруг макрофагами, дендритными клетками, отдельнмие В лимфоцитами плазматическими клетками. селезенке происходит АΓ, антигензависимая пролиферация распознаванея И дифференцировка лимфоцитов, их активация, а также продукция и секреция специфических антител. В селезенке происходит формирование специфического иммунного ответа на АГ, которые циркулируют в периферической крови. Удаление селезенки – один из методов лечения аутоиммунной гемолитической анемии. Несмотря на то, что селезенка не является органом, обязательным для жизни, у людей, перенесших спленэктомию, отмечается повышенная чувствительность инфекциям, вызванным пневмококком.

Таким образом, выявили корреляции между обнаружением МЫ не заболевания, длительностью заболевания, клональности И тяжестью концентрацией гемоглобина. Кроме того, в нашем исследовании не выявлено корреляции Т-клеточной клональности со спленэктомией. Полученные данные позволяют сделать вывод, о том, что выявляемые Т-клеточные клоны, скорее всего, не спровоцированы иммуносупрессивной терапией, удалением селезенки и не принимают непосредственного участия в гемолизе эритроцитов.

Все пациенты с АИГА обследованы для исключения сопутствующей патологии, прежде всего лимфоидной опухоли. У 2-х пациентов с выявленой Т-клеточной клональностью, была выполнена проточная цитометрия на предмет

исключения Т-клеточной лимфомы. У обоих пациентов было повышено количество цитотоксических Т-лимфоцитов, однако других нарушений или аберрантного иммунофенотипа, свойственного Т-клеточным лимфомам, не выявлено. В таблице 16 представлены результаты иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови двух пациентов с АИГА. Из таблицы видно, что у обоих пациентов отмечалось умеренное повышение уровня CD8+ лимфоцитов, остальные субпопуляции лимфоцитов определялись в пределах нормальных значений, признаков лимфопролиферативного заболевания выявлено не было.

Таблица 16. Результат иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови пациентов с АИГА (№ 15 и 24). Относительное и абсолютное количество (абс) клеток тыс. в мкл.

No	CD3+	CD3+4+	CD3+8+	CD3+	CD3-	CD3+	CD3+
	T-	T-	Цитоток-	16+56+	16+65+	TCRα	TCRγδ
	клетк	хелперы	сические	Т-НК-	НК-клетки	β	
	И	(N абс	лимфоциты	клетки	(N абс 0,1-		
		0,6-1,6)	(N абс 0,3-		0,65)		
			0,8)				
15	~61,5	25,6%	32,8%	8,1%	11,3%	58,1%	2,3%
	%	абс 0,63	абс 0,81		абс 0,28		
24	~85%	15,6%	72,4%	30,8%	2,8%	77,1%	6,3%
		абс 0,36	абс 1,68		абс 0,06		

Как уже было описано выше, АИГА – редкое, но типичное осложнение лимфопролиферативных заболеваний. Наиболее часто АИГА встречается при хроническом В-клеточном лимфолейкозе (от 4,5% до 11% [104, 149, 224]) и при других В-клеточных лимфомах (от 0,23 до 6,2% [3, 99, 158, 203]). АИГА считается одним из частых осложнений лейкоза из больших гранулированных лимфоцитов [182], и может встречаться при других Т-клеточных лимфомах [105]. Интересно, что в некоторых случаях Т-клеточных лимфом АИГА может предшествовать дебюту лимфомы (3-11 мес) [184].

Мы исследовали Т-клеточную клональность в динамике у 18 пациентов, для которых имелись архивные образцы периферической крови. При этом срок наблюдения составлял от 1 года до 15 лет. У 7 из них поликлональная картина периферической крови сохранялась на протяжении болезни, при этом у 11 пациентов с выявленной моноклональностью по генам *TCRG* и *TCRB* отмечено, что Т-клеточные клоны персистируют на протяжении всего периода заболевания, не зависят от проводимой терапии и не исчезают в ремиссии.

Приведем клинический пример №4: пациентка с АИГА, 1987 г.р. наблюдалась нами более 5 лет. На рисунке 18 представлена схема ее истории болезни. В 2003 году пациентке была выполнена спленэктомия, не приведшая к клиническому эффекту. В 2005 году у пациентки была проведена пульс-терапия преднизолоном (с нестойкой ремиссией заболевания). В 2009 года была проведена терапия ритуксимабом, на фоне которой достигнута ремиссия гемолитической анемии.

На рисунке 19 представлен доминирующий Т-клеточный клон по реаранжировкам генов $TCRG\ y$ этой больной. Клональный продукт имеет размер 260 пар нуклеотидов (260bp) и сохраняется на всем протяжении болезни и не зависит от проводимой терапии и клинического состояния больной.

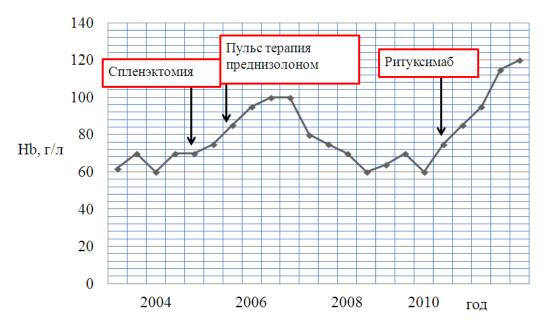


Рисунок 18. Динамика концентрации гемоглобина крови (г/л) в течение 6 лет, на фоне проводимой терапии (спленэктомия, пульс-терапия преднизолоном, ритуксимаб) пациентки с диагнозом АИГА.

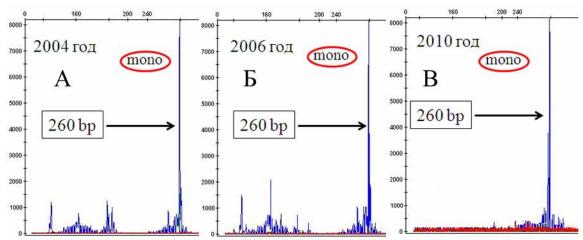


Рисунок 19. Доминирующий Т-клеточный клон по реаранжировкам генов TCRG пациентки с диагнозом АИГА. Клональный продукт имеет размер 260bp, сохраняется на протяжении болезни и не зависит от проводимой терапии и клинического состояния больной. Исследование проводилось трижды на протяжении болезни: А. 2004 год — состояние после спленэктомии; Б. 2006 год — состояние на фоне пульс-терапии преднизолоном; В. 2010 год — состояние после терапии ритуксимабом.

Стандартные терапевтические подходы к лечению АИГА включают в себя кортикостероиды, спленэктомию и иммунносупрессивную терапию [7, 91, 103]. Кортикостероиды обладают способностью угнетать активность макрофагов и снижать образование антител [91, 103]. Эффективность спленэктомии при АИГА составляет около 50-70%. При неэффективности спленэктомии или наличии противопоказаний к ней назначают циклоспорин, антилимфоцитарный глобулин, а в случае отсутствия эффекта – циклофосфамид, азатиоприн, метотрексат и др. [91, 103]. В настоящее время в лечении АИГА часто применяется ритуксимаб – моноклональное антитело к антигену CD20, экспрессируемому на поверхности зрелых В-лимфоцитов. Ритуксимаб связывается с CD20 антигеном и посредством комплемент-зависимого цитолиза приводит к уничтожению зрелых В-лимфоцитов и препятствует секреции антиэритроцитарных антител [14, 15, 89, 103]. При АИГА аутоантитела вырабатываются к эритроцитарным антигенам (чаще Rh, реже MNSs) [103]. Чаще всего это тепловые аутоантитела IgG, которые связываются с Fcрецепторами на мембране клеток ретикулоэндотелиальной системы, активируя, таким образом, фагоцитоз эритроцитов. Так как наибольшее количество Fcрецепторов для IgG синтезируется макрофагами селезенки, в ней происходит разрушение основного числа эритроцитов [103, 195]. Реже образуются холодовые аутоантитела IgM, которые фиксируются на поверхности эритроцитов и связывают комплемент, вызывающий гемолиз эритроцитов [67]. Если активации комплемента не происходит, агглютинированные эритроциты закупоривают мелкие кровеносные сосуды и приводят к ишемическим некрозам [78].

В патогенезе большинства аутоиммунных заболеваний, в том числе аутоиммунной гемолитической анемии, предположительно, принимают участие CD4+ Т-эффекторные клетки, которые индуцируют секрецию патологических аутоантител В – лимфоцитами [81, 103].

На мышиной модели АИГА (NZB мышь) было показано, что продукция IgG vivo блокировалась анти-CD4+ аутоантител частично введением моноклональных антител [164] или при делеции гена, кодирующего образование CD4 [53]. Т-хелперы (Th) клетки селезенки NZB мыши пролиферируют in vitro в ответ на стимуляцию основным мышиным эритроцитарным антигеном Band 3 [168]. На мышиных моделях АИГА, индуцированной вирусом лимфоцитарного хориоменингита, также была показана Th-зависимость гуморального ответа: введение анти-CD4+ моноклонального антитела предотвращало аутоиммунный гемолиз, индуцированный вирусом [65], а при удалении Т-клеток не развивался аутоантительный гуморальный ответ на иммунизацию кросс-реактивными крысиными эритроцитами [159]. Данные о роли Тh-клеток в патогенезе АИГА у человека не так многочисленны. В частности было показано, что Т-клетки здоровых доноров и пациентов с АИГА пролиферировали in vitro в ответ на стимуляцию короткими пептидами Rh белка [27, 28].

Выделяют два основных класса Т-эффекторных клеток в зависимости от их способности к синтезу тех или иных цитокинов. Т-хелперы 1 типа продуцируют IFN-гамма, IL-2, TNF. Т-хелперы 2 типа на фоне антигенной стимуляции продуцируют IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 [103, 152, 153].

Как известно, разнообразие антигенспецифичных рецепторов огромно и в

процессе формирования, некоторые из них оказываются специфичными к собственным организма, существует антигенам механизм поддержания иммунологической толерантности. Толерантность предотвращает нежелательные реакции против собственных органов и тканей. В норме поддержание иммунологической толерантности осуществляется за счет нескольких механизмов. Один из них связан с делецией аутореактивных клонов в тимусе за счет механизма негативной селекции (центральная толерантность) [183, 197], а другой – с индукцией анергии периферических клонов аутореактивных Т-лимфоцитов (периферическая толерантность) [183, 197]. Недавно был идентифицирован еще один механизм, в котором принимают участие так называемые Т-регуляторные обладают способностью клетки [34],которые подавлять аутоантигенспецифическую пролиферацию и эффекторные функции аутореактивных лимфоцитов [63, 100, 183].

Для изучения роли Т – регуляторных клеток в патогенезе АИГА был проведен ряд исследований на моделях мышей. Playfair и Marshall-Clarke описали особую мышиную модель, которой проводили иммунизацию крысиными эритроцитами. При этом у иммунизированных мышей вырабатывались антитела, не только против чужеродных эритроцитов, но и против собственных. Такой аутоантительный ответ приводил к развитию процесса, сходного по своей природе с АИГА с тепловыми антителами у человека [159]. В опытах на подобных моделях было показано, что примерно у 30% мышей, иммунизированных крысиными эритроцитами, появлялись аутоантитела к собственным эритроцитам, и развивалась АИГА, однако у мышей, которым перед иммунизацией вводили анти-CD25 антитела частота развития АИГА возрастала до 90%. Чтобы доказать значимость подавляющей активности Т-регуляторных клеток в развитии АИГА, ткань селезенки, полученную от иммунизированных крысиными эритроцитами мышей и содержащую Т-регуляторные клетки, вводили здоровым мышам. В результате чего, после проведения иммунизации таких мышей крысиными эритроцитами, подавлялась индукция аутоантител, и развития АИГА не наступало [154].

В настоящее время описаны как минимум две формы Т-регуляторных клеток. Естественные Т-регуляторные клетки, которые экспрессируют FoxP3 фактор (транскрипционный фактор, регулирующий транскрипцию генов, ответственных за дифференцировку Т-клеток и экспрессию цитокинов и других факторов, участвующих в супрессии иммунного ответа) и дифференцируются в тимусе, и индуцибельные Т-регуляторные клетки, которые ингибируют эффекторные клетки и образуются на периферии под влиянием различных факторов [183]. Часто эти клетки так и обозначают, как FoxP3+ регуляторные T-клетки (FoxP3+ Treg cells). В процессе нормального постэмбрионального развития Т-регуляторные клетки формируются в тимусе и на 4-5-й день после рождения расселяются в периферические лимфоидные B ткани. периферических тканях тимэктомированных в ранние сроки мышей эти клетки не обнаруживаются, что ассоциируется с развитием системного аутоиммунного синдрома.

Таким образом, в настоящее время наиболее изученным при АИГА является действие CD4+ клеток: Т-эффекторных и Т-регуляторных. Возможно, в развитии гемолиза играет роль антител-зависимая цитотоксичность, опосредованная, например, NK-клетками или Т-NK клетками. Поскольку основные сведения о патогенезе АИГА получены на мышиных моделях, в которых аутоиммунный гемолиз индуцируется при помощи различных манипуляций (заражение вирусом, введение крысиных эритроцитов, делеция генов, врожденные дефекты и т.д.), остается неясным, возможно ли перенести эти данные на человека. Между тем, наблюдается явная нехватка сведений о роли Т-клеток в развитии АИГА у человека, что не позволяет в настоящее время применять терапию, направленную на супрессию и элиминацию Т-клеточного компонента.

Чтобы получить представления о иммунофенотипе этих клеточных клонов, мы провели иммуномагнитную селекцию клеток у 5-х пациентов. Схема селекции лимфоцитов периферической крови пациентки №7 (приложение 3) представлена на рисунке 20. Из лейкоцитов периферической крови были выделены три популяции лимфоцитов: CD4+, CD8+ и CD4+25+.

Наше исследование клональности в CD4+, CD8+, CD25+CD4+ популяциях Т-лимфоцитов показало, что клональные лимфоциты принадлежат к CD8+ Т-лимфоцитам.

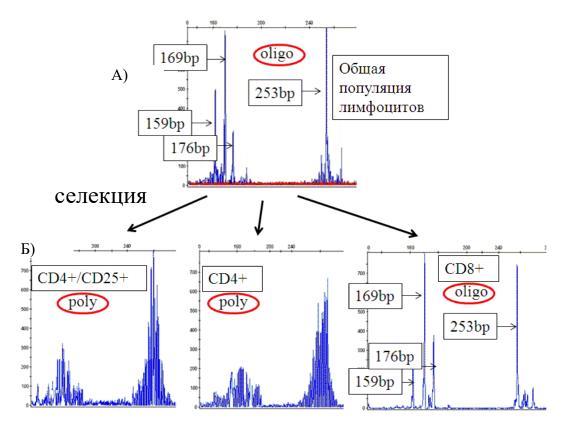


Рисунок 20. Схема селекции лимфоцитов у пациентки №17. А) В общей популяции лимфоцитов периферической крови пациентки №17 с АИГА выявлена олигоклональная картина генов ТСRG (клональные продукты размером 159, 169, 176 и 253 пар нуклеотидов). Б) В результате селекции клеток выделены три популяции лимфоцитов — CD4+/CD25+, CD4+, CD8+. Клональные реарранжировки генов TCRG не выявлены в популяциях CD4+/CD25+, CD4+ (поликлональная картина). В популяции CD8+ лимфоцитов выявлены клональные продукты генов TCRG, размеры которых соответствуют размерам, выявленным в общей популяции.

С целью определения первичной и третичной структуры *TCRB* и выявления аналогий их строения у разных пациентов, а также с целью выявления возможных мутаций или делеций в области генов V, D, J сегментов, у трех пациентов выделены доминирующие Т-клеточные получены клоны ИΧ нуклеотидные последовательности. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с герминальными последовательностями генов при помощи программы IMGT/Vдоступной QUEST, on-line режиме сервере В на

(http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/). Нуклеотидная и соответствующая ей аминокислотная последовательность CDR3 области представлена в приложении 5. Bo случаях последовательность ПЦР-продуктов всех соответствовала продуктивным реаранжировкам локуса TCRB, за исключением сиквенса 1-3, который соответствовал непродуктивной реаранжировке. Делеций или мутаций было. У всех пациентов полученные выявлено не аминокислотные **TCRB** последовательности генов сравнили последовательностями, опубликованными в различных интернет-ресурсах и базах данных. База данных 3-D структур белков и нуклеиновых кислот позволила сравнить полученные нами последовательности с исследованными ранее и опубликованными на сайте EMBL-EBI PDBe http://www.ebi.ac.uk/pdbe/. В одном случае третичная структура белка TCRB оказалась схожа со структурой TCRB CD8+ лимфоцитов, полученных в стимуляции суперантигеном вируса Эпштейна-Барр Т-клеток результате здоровых периферической крови доноров. Bce остальные продукты секвенирования уникальную нуклеотидную аминокислотную имели И последовательность CDR3 области (область соединения V-D-J сегментов), которая отвечает за связь с антигеном.

В настоящее время недостаточно известно о роли CD8+ лимфоцитов в патогенезе аутоиммунных заболеваний, хотя есть неоспоримые данные об их участии в развитии рассеянного склероза, сахарного диабета І типа, болезни Грейвса, анкилозирующем спондилите, ревматоидном артрите. С одной стороны, СD8+лимфоциты могут способствовать развитию аутоиммунных заболеваний через секрецию провоспалительных цитокинов или непосредственное CD8+уничтожение клеток-мишеней, c другой стороны, клетки ΜΟΓΥΤ предотвращать развитие болезни: устранять аутоагрессивные клоны или выступать в качестве регуляторных клеток (CD8+ Treg).

3.4.2. Т- и В-клеточная клональность при негематологических аутоиммунных заболеваниях и у здоровых доноров/добровольцев

С целью изучения клональности при других аутоиммунных заболеваниях мы исследовали пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) (n=6) и ревматоидным артритом (PA) (n=8) (приложение 6). СКВ является аутоиммунным заболеванием со сложным патогенезом, многообразием клинических проявлений, течение заболевания сменяется периодами ремиссий и обострений. Т-клеточный компонент играет важную роль в патогенезе СКВ [68, 212]. В периферической крови у больных с СКВ выявляется олигоклональная экспансия Т-лимфоцитов [120, 125]. Мы исследовали клональность в образцах периферической крови по генам IGH, TCRB, TCRG у 6 пациентов с диагнозом СКВ. Клональные реаранжировки по генам *IGH* не были выявлены ни в одном случае. По генам *TCRG* в общей популяции лимфоцитов у 1 пациентки выявлена олигоклональная картина (4 клональных продукта). После селекции клеток, 2 клональных продукта были определены в CD4+ популяции, 2 – в CD8+. Также у этой пациентки после проведения магнитной селекции клеток, в CD4+ популяции лимфоцитов были выявлены клоны, которые не определялись в общей популяции. Видимо, описанный феномен связан с тем, что чувствительность метода не позволяет выявить минорные клоны на фоне доминирующих пиков общей популяции клеток. По генам *TCRB* мы выявили аналогичную картину. У 4 пациентов с СКВ в общей популяции лимфоцитов фрагментного анализа была выявлена методом олигоклональная картина, магнитную селекцию клеток проводили у 2 из них. Клональные продукты выявляли как в CD4+, так и в CD8+ популяциях клеток. У 1 пациентки реаранжировки по генам бета и гамма цепей Т-клеточного рецептора были поликлональными.

РА является аутоиммунным заболеванием, которое характеризуется хроническими синовитами и костными эрозиями. Данные, полученные на мышиных моделях РА [113, 115, 126, 162, 186], показали роль CD4+ клеток в патогенезе данного заболевания. В нашем исследовании клональные

реаранжировки по генам *IGH* не были выявлены ни в одном случае. У 3 пациентов поликлональную картину в общей популяции клеток выявили как по реаранжировкам генов *TCRB*, так и генов *TCRG*. Учитывая это, селекцию субпопуляций лимфоцитов не проводили. У 3 пациентов в общей популяции клеток по реаранжировкам генов *TCRG* был выявлен один клональный продукт.

После выполнения селекции клеток, у двух пациентов основной клональный продукт выявили в популяции CD8+ клеток, при этом были обнаружены и другие клональные продукты в популяции CD8-CD4- клеток. У 1 пациента с РА в общей популяции лимфоцитов было выявлено 5 клональных реаранжировок по генам *TCRG*, при этом после магнитной селекции клеток 3 клональных продукта определялись в популяции CD4+, 2 других – в популяции CD8+ клеток. По генам *TCRB* методом фрагментного анализа поликлональная картина в общей популяции клеток была выявлена у 4 пациентов с РА. Магнитную селекцию клеток проводили у 4 пациентов, у которых в общей популяции были выявлены олиго и моноклональная картина. Клональные продукты выявляли как в CD4+, так и в CD8+ популяциях клеток. Данные представлены в приложении 6.

В группе контроля, которая включала здоровых доноров и добровольцев, также была исследована Т-клеточная клональность. При исследовании реаранжировок генов *TCRG* в общей популяции лимфоцитов здоровых доноров были получены следующие результаты: у 7 из 62 доноров (11,3%) — моноклональный; у 11 из 62 доноров (17,7%) — сомнительный моноклональный; 4 из 62 доноров (6,5%) — олигоклональный; у 40 из 62 доноров (64,5%) — поликлональный. Таким образом, у 35,5% (18 из 62) относительно здоровых людей в периферической крови определялось преобладание одной или нескольких популяций Т-лимфоцитов. Корреляции наличия клональных продуктов с возрастом в контрольной группе показано не было.

Для того, чтобы определить к какой популяции принадлежат выявленные клональные продукты, мы выполнили селекцию лимфоцитов периферической крови, разделив их на CD8+ популяцию и CD8- популяцию. У 10 из 12

обследованных доноров в CD8+ популяции лимфоцитов обнаружены моноклональные реаранжировки генов *TCR* (n=7), сомнительные моноклональные реаранжировки (n=1) или олигоклональные реаранжировки (n=2). Если в общей популяции был выявлен доминирующий пик, то он же доминировал в CD8+ популяции (таблица 17). При этом у большинства обследованных (у 8 из 12) оставшаяся популяция клеток (CD8-) была поликлональной.

Таким образом, нами показано, что у 35,5% здоровых людей выявляются клональные реаранжировки генов *TCR*, поэтому их следует расценивать как варианты нормы. После проведения магнитной селекции лимфоцитов периферической крови у пациентов с аутоиммунными заболеваниями и у здоровых людей, мы определили, что доминирующие Т-клеточные клоны принадлежат к CD8+ популяции лимфоцитов у абсолютного большинства исследованных пациентов (83%). Исключения наблюдались у двух пациентов с ревматоидными заболеваниями, у которых основные клоны обнаружены в CD4+ лимфоцитах. При этом фракция лимфоцитов, обедненная CD8+ клетками, в большинстве случаев была поликлональной.

Известно, что хроническая антигенная стимуляция приводит к накоплению антиген-специфичных CD8+ лимфоцитов, которые характеризуются экспрессий CD57+ и утратой экспрессии CD28. Эта популяция лимфоцитов олигоклональна по своей природе, в основном представляет собой фракцию цитотоксических больших гранулярных лимфоцитов [12-13]. Накопление таких клеток описано при множестве состояний: у возрастных пациентов, при длительной иммунной активации, связанной с хронической инфекцией, опухолями, аутоиммунными заболеваниями, при хроническом алкоголизме, при высокой физической нагрузке, после аллогенной трансплантации, при гемохроматозе [14-17]. Мы описали клональную экспансию CD8+ лимфоцитов у 45,5% пациентов с аутоиммунной гемолитической анемией. Состояния, связанные с развитием узконаправленного иммунного ответа, например, острая фаза инфекционного мононуклеоза, также сопровождаются моноклональной или олигоклональной экспансией CD8+

лимфоцитов [19-21]. Отдельное внимание уделяется сужению Т-клеточного репертуара и клональной экспансии CD8+CD57-, связанной с инволюцией тимуса и постепенной утратой его функции с возрастом [22-24].

Таблица 17. Результат определения клональности по генам *TCRG*, *TCRB* в CD8+ и CD8-клетках периферической крови здоровых доноров.

№	п о л	В 03	Общая популяция		Селектированные клетки			
		pa	TCRG	TCRB	TCRG		TCRB	
		ст			CD8+	CD8-	CD8+	CD8-
1	M	19	поли	поли	поли	поли	НИ	НИ
2	ж	26	поли	поли	сомн	поли	НИ	НИ
3	M	26	поли	поли	олиго	поли	НИ	НИ
4	M	25	сомн	сомн	моно *	сомн	моно *	поли
5	M	29	сомн	поли	моно *	поли	НИ	НИ
6	M	33	сомн	поли	моно *	олиго	НИ	НИ
7	M	31	моно	сомн	моно *	сомн	моно *	поли
8	Ж	33	сомн	поли	моно *	поли	НИ	НИ
9	ж	60	сомн	поли	моно *	поли	НИ	НИ
10	ж	41	моно	поли	моно *	сомн*	НИ	НИ
11	ж	29	поли	поли	поли	поли	НИ	НИ
12	M	62	олиго	сомн	олиго	поли	олиго	поли

Примечание: поли – поликлональные реаранжировки; моно – моноклональные реаранжировки; олиго – оликлональные реаранжировки; сомн – сомнительный моноклональный результата по реаранжировкам генов *TCR*; НИ – не исследовали; * – выявлен основной клон, доминирующий в общей популяции.

Заключение по главе 3.4.

- 1. У 45,5% пациентов с АИГА выявляются Т-клеточные клоны, которые относятся к CD8+ популяции лимфоцитов, персистируют на протяжении длительного времени и имеют реактивную природу;
- 2. В 79% случаев ревматологических заболеваний выявляются Т-клеточные клональные продукты, которые принадлежат как к CD4+ популяции

- лимфоцитов, так и к CD8+ популяции. В-клеточная клональность у пациентов с ревматологическими заболеваниями не выявляется;
- 3. У 11,3% здоровых лиц выявляются клональные Т-клеточные продукты, принадлежащие к CD8+ популяции лимфоцитов. В-клеточная клональность у здоровых лиц не выявляется;
- 4. В-клеточная клональность является более чувствительным и специфичным критерием лимфопролиферативного заболевания, при ее выявлении необходимо динамическое наблюдение и выполнение ИГХ-исследования субстрата, в котором была выявлена В-клональность;
- 5. Т-клеточная клональность является менее чувствительным и специфичным критерием лимфопролиферативного заболевания, определяется в CD8+ клетках у пациентов с неопухолевыми заболеваниями и у здоровых лиц, ее выявление и персистенция должны оцениваться только в совокупности с клиническими данными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стандартизированный протокол для определения клональности Т- и Влимфоцитов BIOMED-2 используется в клиническо-лабораторной практике в качестве дополнительного метода обследования для подтверждения клональной природы лимфоцитов уже 15 лет. Однако, на этапе интерпретации данных, полученных после проведения ПЦР с последующим фрагментным анализом продуктов амплификации, возникают закономерные сложности, поскольку клональная экспансия лимфоцитов может быть следствием иммунного, поликлонального аутоиммунного процесса, уменьшения нормального лимфоцитарного разнообразия.

В нашей работе показано, что одновременное выявление клональных реаранжировок генов Т-клеточного рецептора и генов иммуноглобулинов характерно для пациентов с острым лимфобластным лейкозом. Клональные реаранжировки генов ІС выявлены у 24% пациентов с Т-клеточным вариантом заболевания, генов ТСЯ – у 92% пациентов с В-клеточным вариантом заболевания и не могут служить показателем линейной принадлежности опухолевых клеток при этом заболевании. Нами продемонстрирован медленный клиренс клональных продуктов: у большинства пациентов (80%) полная элиминация опухолевого клона происходит лишь через полгода – к этапу начала поддерживающей терапии. Клиренс опухолевого клона у больных ОЛЛ, пролеченных по Российскому протоколу, сопоставим с таковым в зарубежных исследованиях. Учитывая то, что ОЛЛ-2009 характеризуется меньшей интенсивностью, можно сделать вывод о том, химиочувствительность опухолевых клеток важнее интенсивности воздействия. Кроме того, нами показано, что для взрослых пациентов с ОЛЛ характерна эволюция опухолевого клона при развитии рецидива, которая в некоторых случаях связана с персистенцией минорных опухолевых клонов в дебюте заболевания, их устойчивостью к стандартной полихиотерапии и реактивацией с течением времени. В нашей работе у 5 из 6 (83%) больных отмечается частичное несоответствие клональных реаранжировок дебюта и Полноценный рецидива заболевания. контроль остаточного опухолевых клеток возможен только при удачном подборе пациент-специфичных праймеров для каждой клональной реаранжировки дебюта заболевания.

Отсутствие амплификации с пациент-специфичными праймерами, подобранными к мишеням дебюта заболевания не гарантирует полное отсутствие остаточного заболевания. При подозрении на развитие рецидива заболевания, даже при отсутствии амплификации с пациент-специфичным праймером, рекомендовано полное повторное исследование Т- и В-клеточной клональности.

При анализе структуры нозологических форм с сочетанным выявлением Т- и В-клеточной клональности показано, что В-клеточная клональность редко определяется при реактивных состояниях. Исключение составляют пациенты с ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой, для которых выявление В-клеточной клональности связано с персистенцией вируса Эпштейна-Барр в В-лимфоцитах. В нашем исследовании из 44 пациентов с Т- и В-клеточными неходжкинскими лимфомами (исключая ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому), материал которых был исследован на Т- и В-клеточную клональность одновременно, В-клеточная клональность была выявлена только у 7% пациентов с Т-клеточными лимфомами, в то время как Т-клеточная клональность выявлена в большинстве случаев (66%) В-клеточных лимфом. Учитывая эти данные, вероятно, часть клональных продуктов по реаранжировкам генов *ТСR* представляет собой реактивные, не имеющие отношения к опухоли клоны. При обнаружении В-клеточной клональности следует проявлять повышенную настороженность в отношении В-клеточной лимфомы.

В нашем исследовании показано, что Т-клеточная клональность выявляется при опухолевых лимфопролиферативных заболеваниях, системных аутоиммунных заболеваниях, у пациентов после выполнения алло-ТГСК и у здоровых лиц. Таким образом, наличие клональной экспансии Т-лимфоцитов в периферической крови при исследовании реаранжировок генов *ТСR* методом ПЦР и фрагментного анализа не может быть принято в качестве однозначно специфичного признака злокачественного лимфопролиферативного процесса. Характерной чертой подобных состояний является экспансия олигоклональных CD8+ клеток. В нашем исследовании клональные продукты в материале костного мозга и крови, не

совпадающие по длине с клональными продуктами, выявленными в ткани лимфатического узла, выявляются у большинства (76%) пациентов с АИТЛ. Нами показано, что такие клональные продукты относятся к CD8+ популяции лимфоцитов, персистируют в течение значительного периода (от 1 до 40 мес.), сохраняются в ремиссии заболевания и носят реактивный характер. Эти данные следует учитывать при оценке и интерпретации данных клональности в периферической крови и КМ. Кроме того, почти в половине случаев (48,5%) неопухолевого гематологического заболевания — аутоиммунной гемолитической анемии, выявляются Т-клеточные клональные продукты, принадлежащие к CD8+ популяции лимфоцитов. Выявляемые Т-клеточные клоны персистируют на протяжении длительного времени (от 1 года до 15 лет), не приводят к развитию Т-клеточной лимфомы, не связаны со степенью тяжести гемолиза и, по всей видимости, не принимают участия в патогенезе заболевания.

Анализ общей и отдельных субпопуляций лимфоцитов периферической крови у здоровых лиц показал, что выявление клональных продуктов в CD8+ популяции клеток — не редкое событие и, по всей видимости, не является патологией. В нашей работе у здоровых лиц моноклональность CD8+ популяции лимфоцитов была идентифицирована в 35,5% случаев. Появление клональных пиков в CD8+ популяции обусловлено функциональными особенностями этих клеток, которые представляют собой цитотоксические лимфоциты в стадии терминальной дифференцировки, у которых происходит рестрикция репертуара антигенных рецепторов.

Нами впервые были изучены патогенетические механизмы клональной гетерогенности, вариабельности, реактивной клональности на значительной выборке больных с опухолевыми и неопухолевыми заболеваниями системы крови, негематологическими аутоиммунными заболеваниями и у здоровых лиц. Показано, что метод магнитной селекции отдельных лимфоцитарных популяций с последующим исследованием клональности, позволяет выявить популяцию лимфоцитов, которая несет клональные реаранжировки, повысить

чувствительность метода и выявить минорную опухолевую популяцию лимфоцитов на фоне терапии пациентов с лимфомами и у пациентов после алло-ТСКК. Принадлежность клональной популяции к CD8+ лимфоцитам, особенно в случаях лимфопролиферативных заболеваний, для которых предшественниками опухолевых клеток являются CD4+ Т-лимфоциты, может указывать на реактивную природу выявленного клонального продукта.

Таким образом, необходимо с осторожностью относится к выявлению Тклеточной клональности в образцах периферической крови, а интерпретация результатов определения клональности возможна только с учетом клинических данных, иммунофенотипирования. Наличие клональных реаранжировок генов IG редко связано с реактивной лимфопролиферацией, поэтому к выявлению Вклеточной клональности без признаков опухоли необходимо относится с большой настороженностью.

Учитывая то, что длина моноклонального ПЦР-продукта уникальна для опухолевого клона и неизменна во всех пораженных тканях у данного пациента, для проведения стадирования заболевания необходимо сначала исследовать клональную реаранжировку в очаге поражения, в котором по данным гистологического или иммунофенотипического исследования была выявлена опухолевая пролиферация, а затем уже сравнивать длину полученных клональных пиков другими тканями. Изолированное исследование клональности в костном мозге, периферической крови, плевральной или спинномозговой жидкости и других тканях, в которых по данным гистологического исследования не выявлено опухолевого поражения, может привести к ложноположительным результатам.

выводы

1. Среди лимфопролиферативных заболеваний, сочетанное выявление Т- и В- клеточной клональности чаще встречается у пациентов с В-клеточными лимфомами. Среди пациентов с Т-лимфомами, сочетанное выявление Т- и В-

- клеточной клональности не встречается, исключение составляют пациенты с диагнозом ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы;
- 2. У пациентов с диагнозом ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы одновременно могут присутствовать несколько клональных реаранжировок генов Т-клеточного рецептора в одном биологическом материале и/или различные клональные реаранжировки в образцах из различных органов и тканей. Часть клональных Т-лимфоцитов принадлежит к CD8+ популяции лимфоцитов и не имеет отношения к опухоли;
- 3. Для пациентов с диагнозом ОЛЛ наличие Т- и/или В-клеточной клональности не может служить признаком линейной принадлежности опухоли; для этих пациентов характерна клональная эволюция опухоли, что следует учитывать при контроле минимальной остаточной болезни;
- 4. CD8+ лимфоциты, имеющие клонально перестроенные гены TCR, могут персистировать в течение длительного времени, выявляются при аутоиммунных заболеваниях, неопухолевых гематологических заболеваниях, у здоровых лиц и, вероятно, не имеют отношения к опухоли;
- 5. Разделение популяций лимфоцитов методом магнитной селекции с последующим исследованием Т- и В-клеточной клональности в каждой из выделенных популяций помогает выявить популяцию лимфоцитов, несущих клональную реаранжировку, и подтвердить или опровергнуть принадлежность данных клональных продуктов к опухолевой популяции при сравнении с фенотипом опухоли.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- І. Определение Т- и В-клеточной клональности у пациентов с ОЛЛ:
 - 1. При подозрении на рецидив заболевания необходимо проводить повторное полное исследование всех реаранжировок генов *IG* и *TCR*, чтобы оценить возможную смену клональных реаранжировок;

- 2. Выявление Т и/или В-клеточной клональности при ОЛЛ нельзя расценивать как признак линейной принадлежности опухоли;
- 3. Мониторинг МОБ с подбором пациент-специфичных праймеров невозможен при отсутствии материала (костного мозга), полученного в дебюте заболевания.
- II. Использование Т- и В-клеточной клональности у пациентов с неходжкинскими лимфомами и при подозрении на лимфому:
 - 1. Изолированное исследование клональности в крови, к/м и тканях в процессе лечения без данных о клональности в изначальном опухолевом очаге может привести к ложноположительным результатам;
 - 2. В сложных диагностических случаях рекомендовано исследование клональности в отдельных лимфоцитарных популяциях;
 - 3. При выявлении В-клеточной клональности необходимо динамическое наблюдение и выполнение ИГХ-исследования субстрата, в котором была выявлена В-клональность, всем пациентам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Абакушина Е.В. Стрессиндуцированные молекулы MICA/В и их роль в развитии онкологических заболеваний / Абакушина Е.В., Кузьмина Е.Г. // Молекулярная медицина. 2012. (2). С. 16–20.
- 2. Гаврилина О.А. Детекция В-клеточной клональности в костном мозге при диффузной В-крупноклеточной лимфоме / Гаврилина О. А., Звонков Е. Е.,

- Судариков А. Б., Никулина Е. Е., Сидорова Ю. В., Бидерман Б. В., Ковригина А. М., Троицкая В. В., Кравченко С. К., Габеева Н. Г., Куликов С. М., Паровичникова Е. Н., Савченко В. Г. // Гематология и трансфузиология. 2015. (14). С. 26–31.
- 3. Джулакян У.Л. Селезеночная В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны, протекающая с аутоиммунной гемолитической анемией / Джулакян У.Л., Магомедова А.У., Кравченко С.К., Карагюлян С.Р., Цветаева Н.В., Капланская И.Б., Ковригина А.М. // Гематология и трансфузиология. 2012. (57). С. 106.
- 4. Магомедова А.У. Диффузная В-крупноклеточная лимфосаркома лимфоидных органов: клинические формы, лечение. / Диссертационная работа. // 2008.
- 5. Бидерман Б. В. Определение В-клеточной клональности методом фрагментного анализа / Бидерман Б.В., Никитин Е.А., Меликян А.Л., Капланская И.Б., Звонков Е.Е., Магомедова А.У., Рыжикова Н.В., Судариков А.Б. // Гематология и трансфузиология. 2003. (4). С. 3–6.
- 6. Никитин Е.А. Определение Т-клеточной клональности по гамма-цепи Т-клеточного рецептора: окончательные данные / Никитин Е.А., Сидорова Ю.В., Рыжикова Н.В., Судариков А.Б. // Терапевтический архив. − 2006. − № 7. − (78). − С. 52–57.
- 7. Никулина О.Ф. Спленэктомия при острых формах аутоиммунных гемолитических анемий (АИГА) / Никулина О.Ф., Цветаева Н.В., Колодей С.В., Карагюлян С.Р., Гржимоловский А.В. // Гематология и трансфузиология. 2004. $N \ge 2 (49)$. С. 52—54.
- 8. Паровичникова Е.Н. Промежуточные результаты по лечению острых Рһнегативных лимфобластных лейкозов у взрослых больных (итоги Российской исследовательской группы по лечению острых лимфобластных лейкозов (RALL)) / Паровичникова Е. Н., Троицкая В. В., Соколов А. Н., Ахмерзаева З. Х., Кузьмина Л. А., Менделеева Л. П., Клясова Г. А., Кравченко С. К., Грибанова Е. О., Бондаренко С. Н., Баранова О. Ю., Капорская Т. С., Рыльцова Т. В., Низамутдинова А. С., Загоскина Т. П., Зинина Е. Е., Самойлова О. С., Климович А. В., Карякина Е. А., Елуферьева А. С., Гаврилова Л. В., Константинова Т. С., Торопова И. Ю.,

- Приступа А. С., Вопилина Н. А., Тикунова Т. С., Скаморина О. П., Капланов К. Д., Обухова Т. Н., Гальцева И. В., Русинов М. А., Куликов С. М., Савченко В. Г. // Онкогематология. 2014. № 3 (9). С. 6–15.
- 9. Сидорова Ю.В. Опыт использования полимеразной цепной реакции для определения Т-клеточной клональности / Сидорова Ю.В., Пекло Е.А., Власик Т.Н., Меликян А.Л. // Терапевтический архив. 2003. № 7 (75). С. 48–52.
- 10. Сидорова Ю.В. Определение Т-клеточной клональности при инфекционном мононуклеозе методом PCR-SSCP-TCR γ / Никитин Е.А., Меликян А.Л. // Гематология и трансфузиология. 2004. № 6 (49). С. 1–7.
- 11. Сидорова Ю.В. Т-клеточная клональность в диагностике лимфопролиферативных заболеваний. / Диссертационная работа. // 2004.
- 12. Сидорова Ю.В. Определение клональности методом ПЦР при ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме / Сидорова Ю. В., Никулина Е. Е., Чернова Н. Г., Горенкова Л. Г., Гилязитдинова Е. А., Кравченко С. К., Ковригина А. М., Судариков А. Б. // Онкогематология. 2014. № 2 (7). С. 192–196.
- 13. Хаитов Р.М. Иммунология / Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. // 2000.
- 14. Цветаева Н.В. Успешное лечение ритуксимабом больной пожилого возраста с резистентной аутоиммунной гемолитической анемией / Цветаева Н. В., Никулина О. Ф., Варламова Е. Ю., Шурхина Е. С., Дмитриева М. Г., Грецов Е. М., Воробьев И. А. // Клиническая онкогематология. − 2009. − № 2 − (2). − С. 200–204.
- 15. Цветаева Н.В. Эффективность долгосрочного лечения ритуксимабом больных с резистентной аутоиммунной гемолитической анемией / Цветаева Н.В., Никулина О.Ф., Шухрина Е.С. // Гематология и трансфузиология. 2014. (59). С. 70.
- 16. Чернова Н.Г. Композитная лимфома: одновременное развитие трех различных лимфом у одного пациента / Чернова Н.Г., Сидорова Ю.В., Синицына М.Н., Судариков А.Б., Ковригина А.М., Звонков Е.Е. // Терапевтический архив. 2015. (7). С. 101–104.
- 17. Abruzzo L. V. B-cell lymphoma after angioimmunoblastic lymphadenopathy: a case

- with oligoclonal gene rearrangements associated with Epstein-Barr virus. / Abruzzo LV, Schmidt K, Weiss LM, Jaffe ES, Medeiros LJ, Sander CA, Raffeld M. // Blood. 1993. $N_{\rm D}$ 1 (82). C. 241–246.
- 18. Aguilar H.I. Azathioprine-induced lymphoma manifesting as fulminant hepatic failure. / Aguilar HI1, Burgart LJ, Geller A, Rakela J. // Mayo Clinic proceedings. 1997. N_{\odot} 7 (72). C. 643–645.
- 19. Allison L. Biology, Fundamental Molecular / L. Allison // 2007
- 20. Altman J.D. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. / Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. // Science (New York, N.Y.). 1996. № 5284 (274). C. 94–96.
- 21. Andrade W.N. The relationship of blood lymphocytes to the recirculating lymphocyte pool./ Andrade W.N., Johnston M.G., Hay J.B. // Blood. − 1998. − № 5. − (91). − C. 1653–1661.
- 22. Appay V. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. / Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. // Nature medicine. -2002. No. 4 (8). C. 379-385.
- 23. Appenzeller S. Immunoglobulin rearrangement analysis from multiple lesions in the same patient using next-generation sequencing. / Appenzeller S, Gilissen 3, Rijntjes J, Tops BB, Kastner-van Raaij A, Hebeda KM, Nissen L, Dutilh BE, van Krieken JH, Groenen PJ. // Histopathology. -2015. $-N_{\odot}$ 6 (67). C. 843–858.
- 24. Attygalle A. Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. / Attygalle A, Al-Jehani R, Diss TC, Munson P, Liu H, Du MQ, Isaacson PG, Dogan A. // Blood. -2002. -No 2 -(99). -C. 627–633.
- 25. Attygalle A. Histologic evolution of angioimmunoblastic T-cell lymphoma in consecutive biopsies: clinical correlation and insights into natural history and disease progression. / Attygalle AD, Kyriakou C, Dupuis J, Grogg KL, Diss TC, Wotherspoon AC, Chuang SS, Cabeçadas J, Isaacson PG, Du MQ, Gaulard P, Dogan A. // The

- American journal of surgical pathology. $-2007. \cancel{N} \ 7 (31). C.\ 1077 1088.$
- 26. Ausubel F.M. Current Protocols in Molecular Biology / F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman. // 2003. 146-146 c.
- 27. Barker R.N. T-cell subsets in autoimmune haemolytic anaemia. / Obert N. Barker, Chla-Rui Shen, Graziella Mazza Frances E. Perry, Andrew M. Hall And Christopher J. Elson // Biochemical Society transactions. -1997. No. 2 (25). C. 312.
- 28. Barker R.N. Identification of T-cell epitopes on the Rhesus polypeptides in autoimmune hemolytic anemia. / Barker RN1, Hall AM, Standen GR, Jones J, Elson CJ. // Blood. -1997. N = 7 (90). C. 2701-2715.
- 29. Barr I.G. Routine flow cytometric diagnosis of lymphoproliferative disorders. / Barr I.G., Toh B.H. // Journal of clinical immunology. -1983. N = 2 (3). C. 184-195.
- 30. Bassan R. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). / Bassan R, Spinelli O, Oldani E, Intermesoli T, Tosi M, Peruta B, Rossi G, Borlenghi E, Pogliani EM, Terruzzi E, Fabris P, Cassibba V, Lambertenghi-Deliliers G, Cortelezzi A, Bosi A, Gianfaldoni G, Ciceri F, Bernardi M, Gallamini A, Mattei D, Di Bona E, Romani C, Scattolin AM, Barbui T, Rambaldi A. // Blood. − 2009. − № 18 − (113). − C. 4153–4162.
- 31. Bayraktar S. Primary ocular adnexal mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALT): single institution experience in a large cohort of patients. / Bayraktar S, Bayraktar UD, Stefanovic A, Lossos IS. // British journal of haematology. -2011. N = 1 -(152). C. 72-80.
- 32. Beishuizen A. Multiple rearranged immunoglobulin genes in childhood acute lymphoblastic leukemia of precursor B-cell origin. / Beishuizen A, Hählen K, Hagemeijer A, Verhoeven MA, Hooijkaas H, Adriaansen HJ, Wolvers-Tettero IL, van Wering ER, van Dongen JJ. // Leukemia. 1991. \mathbb{N}_2 8 (5). C. 657–667.
- 33. Beishuizen A. Analysis of Ig and T-cell receptor genes in 40 childhood acute lymphoblastic leukemias at diagnosis and subsequent relapse: implications for the detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction analysis. / Beishuizen

- A, Verhoeven MA, van Wering ER, Hählen K, Hooijkaas H, van Dongen JJ. // Blood. $1994. N_{\odot} 8 (83). C. 2238-2247.$
- 34. Bettelli E. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. / Bettelli E., Korn T., Kuchroo V.K. // Current opinion in immunology. $-2007. N_0 6 (19). C. 652-657.$
- 35. Boeckx N. Fusion gene transcripts and Ig/TCR gene rearrangements are complementary but infrequent targets for PCR-based detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. / Boeckx N, Willemse MJ, Szczepanski T, van der Velden VH, Langerak AW, Vandekerckhove P, van Dongen JJ. // Leukemia. 2002. N_{\odot} 3 (16). C. 368–375.
- 36. Boehmer H. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. / Boehmer H. von, Melchers F. // Nature immunology. -2010. N = 1 (11). C. 14-20.
- 37. Borowitz M.J. [и др.]. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. / Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, Linda S, Martin PL, Pullen DJ, Viswanatha D, Willman CL, Winick N, Camitta BM // Blood. -2008. № 12-(111). C. 5477-5485.
- 38. Bräuninger A. Survival and Clonal Expansion of Mutating "Forbidden" (Immunoglobulin Receptor–Deficient) Epstein-Barr Virus–Infected B Cells in Angioimmunoblastic T Cell Lymphoma / Bräuninger A, Spieker T, Willenbrock K, Gaulard P, Wacker HH, Rajewsky K, Hansmann ML, Küppers R. // The Journal of Experimental Medicine. 2001. T. 194. № 7. C. 927–940.
- 39. Braunschweig R. Contribution of IgH-PCR to the evaluation of B-cell lymphoma involvement in paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. / Braunschweig R, Baur AS, Delacrétaz F, Bricod C, Benhattar J. // American journal of clinical pathology. -2003. N = 5 (119). C. 634-642.
- 40. Breit T.M. Southern blot patterns, frequencies, and junctional diversity of T-cell receptor-delta gene rearrangements in acute lymphoblastic leukemia. / Breit TM, Wolvers-Tettero IL, Beishuizen A, Verhoeven MA, van Wering ER, van Dongen JJ. // Blood. − 1993. − \mathbb{N} 10 − (82). − C. 3063–3074.

- 41. Bruggemann M. Rearranged T-cell receptor beta genes represent powerful targets for quantification of minimal residual disease in childhood and adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. / Brüggemann M, van der Velden VH, Raff T, Droese J, Ritgen M, Pott C, Wijkhuijs AJ, Gökbuget N, Hoelzer D, van Wering ER, van Dongen JJ, Kneba M. // Leukemia. -2004. -N 4 -(18). -C. 709-719.
- 42. Brüggemann M. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia / Brüggemann M, Raff T, Flohr T, Gökbuget N, Nakao M, Droese J, Lüschen S, Pott C, Ritgen M, Scheuring U, Horst HA, Thiel E, Hoelzer D, Bartram CR, Kneba M // Blood. − 2006. − № 3 − (107). − C. 1116–1123.
- 43. Brüggemann M. Powerful strategy for polymerase chain reaction-based clonality assessment in T-cell malignancies Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4 CT98-3936 / Brüggemann M, White H, Gaulard P, Garcia-Sanz R, Gameiro P, Oeschger S, Jasani B, Ott M, Delsol G, Orfao A, Tiemann M, Herbst H, Langerak AW, Spaargaren M, Moreau E, Groenen PJ, Sambade C, Foroni L, Carter GI, Hummel M, Bastard C, Davi F, Delfau-Larue MH, Kneba M, van Dongen JJ, Beldjord K, Molina TJ.// Leukemia. 2006. (21). C. 215.
- 44. Brüggemann M. Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL? / Brüggemann M, Raff T, Kneba M. // Blood. 2012. № 23 (120). C. 4470–4481.
- 45. Buhr T. Reliability of lymphoma classification in bone marrow trephines. / Buhr T, Länger F, Schlué J, von Wasielewski R, Lehmann U, Braumann D, Kreipe H. // British journal of haematology. -2002. -№ 2 (118). C. 470–476.
- 46. Campana D. Determination of minimal residual disease in leukaemia patients./ Campana D. // British journal of haematology. -2003. N = 6 (121). C.823 838.
- 47. Campana D. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. / Campana D., Pui C.H. // Blood. − 1995. − № 6 − (85). − C. 1416–1434.
- 48. Cappione A.J. [и др.]. Lupus IgG VH4.34 antibodies bind to a 220-kDa glycoform of

- CD45/B220 on the surface of human B lymphocytes. / Cappione AJ, Pugh-Bernard AE, Anolik JH, Sanz I. // Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950). 2004. № 7 (172). C. 4298–4307.
- 49. Carbone A. EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment. / Carbone A., Gloghini A., Dotti G. // The oncologist. -2008. N = 5 (13). C. 577-585.
- 50. Cave H. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer-Childhood Leukemia Cooperative Group. / Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, Bakkus M, Thielemans K, Grandchamp B, Vilmer E. // The New England journal of medicine. -1998. No. 9 (339). C. 591-598.
- 51. Chang Q. A pneumococcal capsular polysaccharide vaccine induces a repertoire shift with increased VH3 expression in peripheral B cells from human immunodeficiency virus (HIV)-uninfected but not HIV-infected persons. / Chang Q, Abadi J, Alpert P, Pirofski L. // The Journal of infectious diseases. -2000. N = 4 (181). C. 1313-1321.
- 52. Chapman C.J. Insight into Burkitt's lymphoma from immunoglobulin variable region gene analysis. / Chapman C.J., Wright D., Stevenson F.K. // Leukemia & lymphoma. $1998. N_{\odot} 3-4 (30). C. 257-267.$
- 53. Chen S.Y. The natural history of disease expression in CD4 and CD8 gene-deleted New Zealand black (NZB) mice. / Chen SY, Takeoka Y, Ansari AA, Boyd R, Klinman DM, Gershwin ME. // Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950). − 1996. − № 6 − (157). − C. 2676–2684.
- 54. Chen W. Characterization of the pathogenic autoreactive T cells in cyclosporine-induced syngeneic graft-versus-host disease. / Chen W., Thoburn C., Hess A.D. // Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950). -1998. N = 12 (161). C. 7040 7046.
- 55. Cheson B.D. Revised response criteria for malignant lymphoma. / Cheson BD1, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, Coiffier B, Fisher RI, Hagenbeek A, Zucca E, Rosen ST, Stroobants S, Lister TA, Hoppe RT, Dreyling M, Tobinai K, Vose JM, Connors JM, Federico M, Diehl V // Journal of clinical oncology:

- official journal of the American Society of Clinical Oncology. $-2007. \cancel{N} \ 5 (25). C.$ 579–586.
- 56. Chetty R. Epstein-Barr virus status and the histopathological changes of parotid gland lymphoid infiltrates in HIV-positive children. / Chetty R., Vaithilingum M., Thejpal R. // Pathology. -1999. N = 4 (31). C. 413-417.
- 57. Chihara T. Peripheral T-cell lymphoma of Lennert type complicated by monoclonal proliferation of large B-cells. / Chihara T1, Wada N, Kohara M, Matsui T, Masaya H, Maeda T, Shibayama H, Kanakura Y, Tani M, Morii E, Aozasa K. // Pathology, research and practice. -2010. N = 3 (206). C. 185-190.
- 58. Choi S. Relapse in children with acute lymphoblastic leukemia involving selection of a preexisting drug-resistant subclone. / Choi S1, Henderson MJ, Kwan E, Beesley AH, Sutton R, Bahar AY, Giles J, Venn NC, Pozza LD, Baker DL, Marshall GM, Kees UR, Haber M, Norris MD. // Blood. -2007. $-N_{\odot} 2 (110)$. -C. 632–639.
- 59. Clambey E.T. CD8 T cell clonal expansions & aging: a heterogeneous phenomenon with a common outcome. / Clambey E.T., Kappler J.W., Marrack P. // Experimental gerontology. -2007. $-\frac{N_2}{2}$ 5 (42). C. 407–411.
- 60. Cohen J.I. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease in non-immunocompromised hosts: a status report and summary of an international meeting. / Cohen JI1, Kimura H, Nakamura S, Ko YH, Jaffe ES. // Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology. −2009. − T. 20. − № 9. − C.1472−1482.
- 61. Coiffier B. T-cell lymphomas: immunologic, histologic, clinical, and therapeutic analysis of 63 cases. / Coiffier B1, Berger F, Bryon PA, Magaud JP. // Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. -1988. N = 10 -(6). -C. 1584-1589.
- 62. Cook J.R. Utility of Routine Classical Cytogenetic Studies in the Evaluation of Suspected Lymphomas. / Cook J.R., Shekhter-Levin S., Swerdlow S.H. // American Journal of Clinical Pathology. -2004. -N = 6 (121). -C. 826–835.
- 63. Cottrez F. Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1

- and TH3 regulatory T cells. / Cottrez F., Groux H. // Transplantation. -2004. $\cancel{N} = 1 1$ Suppl (77). \mathbb{C} . S12-5.
- 64. Coustan-Smith E. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. / Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, Sandlund JT, Rivera GK, Rubnitz JE, Ribeiro RC, Pui CH, Campana D. // Blood. -2000. N = 8 (96). C. 2691 2696.
- 65. Coutelier J.P. Involvement of CD4+ cells in lymphocytic choriomeningitis virusinduced autoimmune anaemia and hypergammaglobulinaemia. / Coutelier JP, Johnston SJ, El Idrissi M el-A, Pfau CJ. // Journal of autoimmunity. -1994. N = 5 (7). C. 589 599.
- 66. Craig F.E. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. / Craig FE, Foon KA. // Blood. 2008. C. 3941-67
- 67. Davis M. The T cell antigen receptor genes and T cell recognition / M. Davis, P. J. Bjorkman // Nature. -1988.-C.395-402.
- 68. Desai-Mehta A. Structure and specificity of T cell receptors expressed by potentially pathogenic anti-DNA autoantibody-inducing T cells in human lupus. / Desai-Mehta A1, Mao C, Rajagopalan S, Robinson T, Datta SK. // The Journal of clinical investigation. 1995. N = 2 (95). C. 531-541.
- 69. Dighiero G. Biology of the neoplastic lymphocyte in B-CLL./ Dighiero G. // Bailliere's clinical haematology. -1993. N = 4 (6). C. 807 820.
- 70. Doisne J.-M. CD8+ T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection. / Doisne JM, Urrutia A, Lacabaratz-Porret C, Goujard C, Meyer L, Chaix ML, Sinet M, Venet A. // Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950). -2004. -N = 4 (173). -C. 2410-2418.
- 71. Dongen J.J. van. Development of human T lymphocytes and their thymus-dependency. / van Dongen JJ1, Comans-Bitter WM, Wolvers-Tettero IL, Borst J. // Thymus. $-1990. N_{\odot} 3-4 (16). C. 207-234.$
- 72. Dongen J.J. van. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic

leukaemia in childhood. / van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, Gadner H, van Wering ER, Ludwig WD, Basso G, de Bruijn MA, Cazzaniga G, Hettinger K, van der Does-van den Berg A, Hop WC, Riehm H, Bartram CR. // Lancet (London, England). − 1998. − № 9142 − (352). − C. 1731–1738.

- 73. Dongen J.J. van. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. / JJM van Dongen, EA Macintyre, JA Gabert, E Delabesse, V Rossi, G Saglio, E Gottardi, A Rambaldi, G Dotti, F Griesinger, A Parreira, P Gameiro, M Gonza lez Dia z, M Malec, AW Langerak, JF San Miguel and A Biondi// Leukemia. − 1999. − № 12 − (13). − C. 1901–1928.
- 74. Dongen J.J. van. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part II: Possibilities and limitations in the diagnosis and management of lymphoproliferative diseases and related disorders. / Dongen J.J. van, Wolvers-Tettero I.L. // Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. -1991. N = 1-2 (198). C. 93-174.
- 75. Dongen J.J.M. van. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 concerted action BMH4-CT98-3936 / van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuuring E, García-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. // Leukemia. − 2003. − № 12 − (17). − C. 2257–2317.
- 76. Dongen J.J.M. van. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. / van Dongen JJ, van der Velden VH, Brüggemann M, Orfao A. // Blood. − 2015. − № 26 − (125). − C. 3996–4009.
- 77. Dongen J.J.M. van. Immunobiology of leukemia. / Dongen J.J.M. van, Szczepanski T., Adriaansen H.J. // Leukemia. 2002. C. 85–130.

- 78. Dupuis J. Prognostic significance of Epstein-Barr virus in nodal peripheral T-cell lymphoma, unspecified: A Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) study.

 / Dupuis J1, Emile JF, Mounier N, Gisselbrecht C, Martin-Garcia N, Petrella T, Bouabdallah R, Berger F, Delmer A, Coiffier B, Reyes F, Gaulard P. // Blood.

 2006.

 № 13 (108). C. 4163–4169.
- 79. Copelan E.M. The biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults / Copelan EA, McGuire EA. // Blood. -1995. N = 5 (85). C. 1151-1168.
- 80. Eckert C. Very early/early relapses of acute lymphoblastic leukemia show unexpected changes of clonal markers and high heterogeneity in response to initial and relapse treatment. / Eckert C, Flohr T, Koehler R, Hagedorn N, Moericke A, Stanulla M, Kirschner-Schwabe R, Cario G, Stackelberg A, Bartram CR, Henze G, Schrappe M, Schrauder A. // Leukemia. -2011. N = 8 (25). C. 1305-1313.
- 81. Elson C.J. Helper T cells in antibody-mediated, organ-specific autoimmunity. / Elson C.J., Barker R.N. // Current opinion in immunology. − 2000. − № 6 − (12). − C. 664–669. 82. Evans P.A. Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell
- malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936 / Evans PA, Pott Ch, Groenen PJ, Salles G, Davi F, Berger F, Garcia JF, van Krieken JH, Pals S, Kluin P, Schuuring E, Spaargaren M, Boone E, González D, Martinez B, Villuendas R, Gameiro P, Diss TC, Mills K, Morgan GJ, Carter GI, Milner BJ, Pearson D, Hummel M, Jung W, Ott M, Canioni D, Beldjord K, Bastard C, Delfau-Larue MH, van Dongen JJ, Molina TJ, Cabeçadas J. // Leukemia. 2006. (21). C. 207.
- 83. Farzati B. Hashimoto's thyroiditis is associated with peripheral lymphocyte activation in patients with systemic sclerosis. / B. Farzati, G. Mazziotti, G. Cuomo, M. Ressa, F. Sorvillo, G. Amato, G. La Montagna, C. Carella, G. Valentini. // Clinical and experimental rheumatology. -2005. -No 1-(23). -C. 43-49.
- 84. Flohr T. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute

- lymphoblastic leukemia. / Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grümayer R, van der Velden V, Fischer S, Stanulla M, Basso G, Niggli FK, Schäfer BW, Sutton R, Koehler R, Zimmermann M, Valsecchi MG, Gadner H, Masera G, Schrappe M, van Dongen JJ, Biondi A, Bartram CR // Leukemia. $-2008. N \cdot 2008. 1000 \cdot 1000$
- 85. Foucar K. Bone marrow and blood involvement by lymphoma in relationship to the Lukes-Collins classification. / Foucar K, McKenna RW, Frizzera G, Brunning RD. // Cancer. -1982. N = 5 (49). C. 888-897.
- 86. Gabert J. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia − A Europe Against Cancer Program. / Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cavé H, Pane F, Aerts JL, De Micheli D, Thirion X, Pradel V, González M, Viehmann S, Malec M, Saglio G, van Dongen JJ. // Leukemia. − 2003. − № 12 − (17). − C. 2318–2357.
- 87. Gaillard F. Primary Epstein-Barr virus infection with clonal T-cell lymphoproliferation. / Gaillard F, Mechinaud-Lacroix F, Papin S, Moreau A, Mollat C, Fiche M, Peltier S, De Faucal PJ, Rousselet MC, Praloran V. // American journal of clinical pathology. -1992. No 3 (98). C. 324-333.
- 88. Gamadia L.E. The size and phenotype of virus-specific T cell populations is determined by repetitive antigenic stimulation and environmental cytokines. / Gamadia LE, van Leeuwen EM, Remmerswaal EB, Yong SL, Surachno S, Wertheim-van Dillen PM, Ten Berge IJ, Van Lier RA. // Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950). 2004. N = 10 (172). C. 6107 6114.
- 89. Garvey B. Rituximab in the treatment of autoimmune haematological disorders. / Garvey B. // British journal of haematology. $-2008. N_{\odot} 2 (141). C. 149-169.$
- 90. Gawad C. Massive evolution of the immunoglobulin heavy chain locus in children with B precursor acute lymphoblastic leukemia. / Gawad C1, Pepin F, Carlton VE, Klinger M, Logan AC, Miklos DB, Faham M, Dahl G, Lacayo N. // Blood. − 2012. − № 22 − (120). − C. 4407–4417.

- 91. Gehrs B.C. Autoimmune hemolytic anemia. / Gehrs B.C., Friedberg R.C. // American journal of hematology. $-2002. N_{\odot} 4 (69). -C. 258-271.$
- 92. Georgescu L. Lymphoma in patients with rheumatoid arthritis: association with the disease state or methotrexate treatment. / Georgescu L, Quinn GC, Schwartzman S, Paget SA. // Seminars in arthritis and rheumatism. -1997. N = 6 (26). C. 794-804.
- 93. Gerber M.A. Cell-mediated immunity in cat-scratch disease. / Gerber MA, Rapacz P, Kalter SS, Ballow M. // The Journal of allergy and clinical immunology. -1986. -1986. -1986. (Pt 1). -1986. -1986. -1986. -1986.
- 94. Geurts-Giele W.R.R. Successive B-cell lymphomas mostly reflect recurrences rather than unrelated primary lymphomas. / Geurts-Giele WR, Wolvers-Tettero IL, Dinjens WN, Lam KH, Langerak AW. // American journal of clinical pathology. -2013. N = 1 (140). C. 114-126.
- 95. Gokbuget N. Risk-adapted treatment according to minimal residual disease in adult ALL. / Gökbuget N, Kneba M, Raff T, Bruggemann M, Scheuring U, Reutzel R, Hoelzer D. // Best practice & research. Clinical haematology. − 2002. − № 4 − (15). − C. 639–652. 96. Gokbuget N. Risk/MRD adapted GMALL trials in adult ALL. / Gökbuget N, Raff R, Brügge-Mann M, Flohr T, Scheuring U, Pfeifer H, Bartram CR, Kneba M, Hoelzer D. // Annals of hematology. − 2004. − (83 Suppl 1). − C. S129-31.
- 97. Goronzy J.J. Naive T cell maintenance and function in human aging. / Goronzy JJ, Fang F, Cavanagh MM, Qi Q, Weyand CM. // Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950). -2015. No 9 (194). C. 4073-4080.
- 98. Greiner T. Atypical Lymphoproliferative Diseases. / Greiner T., Armitage J.O., Gross T.G. // Hematology. American Society of Hematology. Education Program. 2000. C. 133–146.
- 99. Gronbaek K. Autoimmune phenomena in non-Hodgkin's lymphoma. / Gronbaek K., D'Amore F., Schmidt K. // Leukemia & lymphoma. 1995. № 3–4 (18). –C. 311–316.
- 100. Groux H. An overview of regulatory T cells./ Groux H. // Microbes and infection. 2001. № 11 (3). C. 883–889.

- 101. Haas V. de. Quantification of minimal residual disease in children with oligoclonal B-precursor acute lymphoblastic leukemia indicates that the clones that grow out during relapse already have the slowest rate of reduction during induction therapy. / de Haas V, Verhagen OJ, von dem Borne AE, Kroes W, van den Berg H, van der Schoot CE. // Leukemia. -2001. -N 1-(15). -C. 134-140.
- 102. Hadzidimitriou A. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. / Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N, Murray F, Delfau-Larue MH, Pedersen LB, Lopez AN, Dagklis A, Rombout P, Beldjord K, Kolstad A, Dreyling MH, Anagnostopoulos A, Tsaftaris A, Mavragani-Tsipidou P, Rosenwald A, Ponzoni M, Groenen P, Ghia P, Sander B, Papadaki T, Campo E, Geisler C, Rosenquist R, Davi F, Pott C, Stamatopoulos K. // Blood. 2011. № 11 (118). C. 3088–3095.
- 103. Hall A.M. Helper T cells point the way to specific immunotherapy for autoimmune disease. / Hall AM, Vickers MA, Barker RN, Erwig LP. // Cardiovascular & hematological disorders drug targets. -2009. No 3 (9). C. 159-166.
- 104. Hamblin T. Autoimmune complications of chronic lymphocytic leukemia. / Hamblin T. // Seminars in oncology. -2006. No. 2 (33). C. 230-239.
- 105. Hauswirth A.W. Autoimmune hemolytic anemias, Evans' syndromes, and pure red cell aplasia in non-Hodgkin lymphomas. / Hauswirth AW, Skrabs C, Schützinger C, Gaiger A, Lechner K, Jäger U. // Leukemia & lymphoma. − 2007. − № 6 − (48). − C. 1139–1149.
- 106. Henle G. The Virus as the Etiologic Agent of Infectious Mononucleosis BT The Epstein-Barr Virus / Henle G., Henle W. // Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1979. C. 297–320.
- 107. Higgins J.P. Peripheral T-cell lymphoma complicated by a proliferation of large B cells. / Higgins JP, van de Rijn M, Jones CD, Zehnder JL, Warnke RA. // American journal of clinical pathology. -2000. N = 2 (114). C. 236-247.
- 108. Hillmen P. A randomized phase II trial of fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone (FCM) with or without rituximab in previously treated chronic lymphocytic

- leukaemia. / Hillmen P, Cohen DR, Cocks K, Pettitt A, Sayala HA, Rawstron AC, Kennedy DB, Fegan C, Milligan DW, Radford J, Mercieca J, Dearden C, Ezekwisili R, Smith AF, Brown J, Booth GA, Varghese AM, Pocock C; NCRI CLL Sub-Group. // British journal of haematology. $-2011. N_{\odot} 5 (152). C. 570-578.$
- 109. Hislop A.D. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. / Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, Rickinson AB. // Annual review of immunology. 2007. (25). C. 587–617.
- 110. Huttunen P. Impact of very early CD4+/CD8+ T cell counts on the occurrence of acute graft-versus-host disease and NK cell counts on outcome after pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / Huttunen P, Taskinen M, Siitonen S, Saarinen-Pihkala UM. // Pediatr Blood Cancer. − 2014. − №62. − (3). − C. 522-528.
- 111. Jaffe E.S. The role of immunophenotypic markers in the classification of non-Hodgkin's lymphomas. / Jaffe E.S. // Seminars in oncology. -1990. N = 1 (17). C. 11–19.
- 112. Janeway C.A. Immunobiology / C.A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik. // 2001. C. 884.
- 113. Jang E. Prevention of spontaneous arthritis by inhibiting homeostatic expansion of autoreactive CD4+ T cells in the K/BxN mouse model. / Jang E, Kim HR, Cho SH, Paik DJ, Kim JM, Lee SK, Youn J. // Arthritis and rheumatism. -2006. N = 2 (54). C. 492–498.
- 114. Jones J.F. T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. / Jones JF, Shurin S, Abramowsky C, Tubbs RR, Sciotto CG, Wahl R, Sands J, Gottman D, Katz BZ, Sklar J. // The New England journal of medicine. -1988. -N 12 -(318). -C. 733–741.
- 115. Kadowaki K.M. CD4+ T cells from collagen-induced arthritic mice are essential to transfer arthritis into severe combined immunodeficient mice. / Kadowaki KM, Matsuno H, Tsuji H, Tunru I. // Clinical and experimental immunology. -1994. N = 2 (97). C. 212–218.
- 116. Kamel O.W. Brief report: reversible lymphomas associated with Epstein-Barr virus

- occurring during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis and dermatomyositis. / Kamel OW, van de Rijn M, Weiss LM, Del Zoppo GJ, Hench PK, Robbins BA, Montgomery PG, Warnke RA, Dorfman RF. // The New England journal of medicine. $1993. N_{\odot} 18 (328). C. 1317-1321.$
- 117. Kamel O.W. Lymphoid neoplasms in patients with rheumatoid arthritis and dermatomyositis: frequency of Epstein-Barr virus and other features associated with immunosuppression. / Kamel OW, van de Rijn M, LeBrun DP, Weiss LM, Warnke RA, Dorfman RF.// Human pathology. -1994. No 7 (25). C. 638-643.
- 118. Kamel O.W. Hodgkin's disease and lymphoproliferations resembling Hodgkin's disease in patients receiving long-term low-dose methotrexate therapy. / Kamel OW, Weiss LM, van de Rijn M, Colby TV, Kingma DW, Jaffe ES. // The American journal of surgical pathology. -1996. -No 10 -(20). -C. 1279–1287.
- 119. Katchar K. Highly activated T-cell receptor AV2S3(+) CD4(+) lung T-cell expansions in pulmonary sarcoidosis. / Katchar K1, Wahlström J, Eklund A, Grunewald J. // American journal of respiratory and critical care medicine. − 2001. − № 7 − (163). − C. 1540–1545.
- 120. Kato T. Analysis of accumulated T cell clonotypes in patients with systemic lupus erythematosus. / Katchar K, Wahlström J, Eklund A, Grunewald J. // Arthritis and rheumatism. -2000. -№ 12 (43). C. 2712–2721.
- 121. Khan N. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. / Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, Nayak L, Moss PA. // Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950). -2002. N = 4 (169). C. 1984-1992.
- 122. Kielsen K. T cell Reconstitution in Allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplantation: Prognostic Significance of Plasma Interleukin-7 / Kielsen K, Jordan KK, Uhlving HH, Pontoppidan PL, Shamim Z, Ifversen M, Heilmann C, Nielsen CH, Sengelov H, Ryder LP, Müller KG. // Scand J Immunol. − 2014. − №81 − (1). − C. 72-80.
- 123. Klein E. Epstein-Barr virus infection in humans: from harmless to life endangering

virus-lymphocyte interactions. / Klein E., Kis L.L., Klein G. // Oncogene. $-2007. - N_{\odot} 9$ -(26). - C. 1297-1305.

124. Kluin-Nelemans H.C. Correction of abnormal T-cell receptor repertoire during interferon-alpha therapy in patients with hairy cell leukemia. / Kluin-Nelemans HC, Kester MG, van deCorput L, Boor PP, Landegent JE, van Dongen JJ, Willemze R, Falkenburg JH. // Blood. -1998. - N 11 - (91). - C.4224-4231.

125. Kolowos W. CD4 positive peripheral T cells from patients with systemic lupus erythematosus (SLE) are clonally expanded. / Kolowos W, Gaipl US, Voll RE, Frank C, Haas JP, Beyer TD, Kalden JR, Herrmann M. // Lupus. -2001. - N = 5 - (10). - C. 321 - 331.

126. Kremer J.M. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. / Kremer JM, Westhovens R, Leon M, Di Giorgio E, Alten R, Steinfeld S, Russell A, Dougados M, Emery P, Nuamah IF, Williams GR, Becker JC, Hagerty DT, Moreland LW. // The New England journal of medicine. – 2003. - N = 20 - (349). - C. 1907 - 1915.

127. Kremer M. Discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma: comparative molecular analysis reveals a heterogeneous group of disorders. / Kremer M, Spitzer M, Mandl-Weber S, Stecker K, Schmidt B, Höfler H, Quintanilla-Martínez L, Fend F. // Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. -2003. $-N_{\Omega} 1 - (83)$. -C. 107-114.

128. Krieken J.H.J.M. van. Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. / van Krieken JH, Langerak AW, Macintyre EA, Kneba M, Hodges E, Sanz RG, Morgan GJ, Parreira A, Molina TJ, Cabeçadas J, Gaulard P, Jasani B, Garcia JF, Ott M, Hannsmann ML, Berger F, Hummel M, Davi F, Brüggemann M, Lavender FL, Schuuring E, Evans PA, White H, Salles G, Groenen PJ, Gameiro P, Pott Ch, Dongen JJ. // Leukemia. – 2007. – \mathbb{N} 2 – (21). – C. 201–206.

129. Kwok M. Minimal residual disease is an independent predictor for 10-year survival in CLL / Kwok M, Rawstron AC, Varghese A, Evans PA, O'Connor SJ, Doughty C,

- Newton DJ, Moreton P, Hillmen P. // Blood. 2016. (128). C. 2770-2773.
- 130. Ladetto M. Persistence of minimal residual disease in bone marrow predicts outcome in follicular lymphomas treated with a rituximab-intensive program. / Ladetto M, Lobetti-Bodoni C, Mantoan B, Ceccarelli M, Boccomini C, Genuardi E, Chiappella A, Baldini L, Rossi G, Pulsoni A, Di Raimondo F, Rigacci L, Pinto A, Galimberti S, Bari A, Rota-Scalabrini D, Ferrari A, Zaja F, Gallamini A, Specchia G, Musto P, Rossi FG, Gamba E, Evangelista A, Vitolo U. // Blood. 2013. № 23 (122). C. 3759–3766.
- 131. Langerak A.W. Polymerase chain reaction-based clonality testing in tissue samples with reactive lymphoproliferations: usefulness and pitfalls. A report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. / Langerak AW1, Molina TJ, Lavender FL, Pearson D, Flohr T, Sambade C, Schuuring E, Al Saati T, van Dongen JJ, van Krieken JH. // Leukemia. − 2007. − \mathbb{N} 2 − (21). − C. 222–229.
- 132. Langerak A.W. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations / Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, Boone E, Carter GI, Catherwood M, Davi F, Delfau-Larue MH, Diss T, Evans PA, Gameiro P, Garcia Sanz R, Gonzalez D, Grand D, Håkansson A, Hummel M, Liu H, Lombardia L, Macintyre EA, Milner BJ, Montes-Moreno S, Schuuring E, Spaargaren M, Hodges E, van Dongen JJ. // Leukemia. − 2012. − № 10 − (26). − C. 2159–2171.
- 133. Lassmann S. Application of BIOMED-2 primers in fixed and decalcified bone marrow biopsies: analysis of immunoglobulin H receptor rearrangements in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. / Lassmann S, Gerlach UV, Technau-Ihling K, Werner M, Fisch P.// The Journal of molecular diagnostics: JMD. -2005. -No. 5 (7). -C. 582–591.
- 134. Lee S. Minimal residual disease based role of imatinib as a first-line interim therapy prior to allogeneic stem cell transplantation in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia / Lee S, Kim DW, Kim YJ, Chung NG, Kim YL, Hwang JY, Kim CC. // Blood. 2003. No 8 (102). C. 3068–3070.
- 135. Lee S. Risk factors for adults with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia in remission treated with allogeneic bone marrow

transplantation: the potential of real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction. / Lee S, Kim DW, Cho B, Kim YJ, Kim YL, Hwang JY, Park YH, Shin HJ, Park CY, Min WS, Kim HK, Kim CC. // British journal of haematology. $-2003. - N_{\odot} 1 - (120). - C. 145-153.$

- 136. Leeuwen E.M.M. van. Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. / van Leeuwen EM, Remmerswaal EB, Vossen MT, Rowshani AT, Wertheimvan Dillen PM, van Lier RA, ten Berge IJ. // Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950). -2004. -No 3 -(173). -C. 1834-1841.
- 137. Li A. Sequence analysis of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in children with acute lymphoblastic leukemia at diagnosis and at relapse: implications for pathogenesis and for the clinical utility of PCR-based methods of minimal residual disease detection. / Li A, Zhou J, Zuckerman D, Rue M, Dalton V, Lyons C, Silverman LB, Sallan SE, Gribben JG. // Blood. -2003. N 13 (102). C. 4520–4526.
- 138. Li S. Lack of surface immunoglobulin light chain expression by flow cytometric immunophenotyping can help diagnose peripheral B-cell lymphoma. / Li S., Eshleman J.R., Borowitz M.J. // American journal of clinical pathology. − 2002. − № 2 − (118). − C. 229–234.
- 139. Li Pira G. Specific Removal of Alloreactive T-Cells To Prevent Gvhd In Hemopoietic Stem Cell Transplantation: Rationale, Strategies And Perspectives / G. Li Pira, S. Di Cecca, M. Montanari, L. Moretta, F. Manca. // Blood Rev. $-2016 N \cdot 200 (4) \cdot C \cdot 297-307$.
- 140. Lisenko K. Flow cytometry-based characterization of underlying clonal B and plasma cells in patients with light chain amyloidosis / K. Lisenko, S. O. Schonland, A. Jauch, M. Andrulis, C. Rocken, A. D. Ho, H. Goldschmidt, U. Hegenbart, M. Hundemer // Cancer Medicine. -2016. -N 7 -(5). -C. 1464–1472.
- 141. Lome-Maldonado C. Angio-immunoblastic T cell lymphoma (AILD-TL) rich in large B cells and associated with Epstein-Barr virus infection. A different subtype of

- AILD-TL? / Lome-Maldonado C1, Canioni D, Hermine O, Delabesse E, Damotte D, Raffoux E, Gaulard P, Macintyre E, Brousse N. // Leukemia. − 2002. − № 10 − (16). − C. 2134–2141.
- 142. Malik U.R. Atypical clonal T-cell proliferation in infectious mononucleosis. // Medical oncology (Northwood, London, England). 1996. № 4 (13). C. 207–213.
- 143. Mariani S. Severe and long-lasting disruption of T-cell receptor diversity in human myeloma after high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell infusion. / Malik UR, Oleksowicz L, Dutcher JP, Ratech H, Borowitz MJ, Wiernik PH. // British journal of haematology. -2001. N = 4 (113). C. 1051 1059.
- 144. Martinez-Lostao L. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? / L. Martinez-Lostao, A. Anel, J. Pardo. // Clin Cancer Res. 2015. №21 (22). C. 5047-5056.
- 145. Matsutani T. Restricted usage of T-cell receptor α -chain variable region (TCRAV) and T-cell receptor β -chain variable region (TCRBV) repertoires after human allogeneic haematopoietic transplantation / Matsutani T, Yoshioka T, Tsuruta Y, Iwagami S, Toyosaki-Maeda T, Horiuchi T, Miura AB, Watanabe A, Takada G, Suzuki R, Hirokawa M. // British Journal of Haematology. -2000. -No. 4-(109). -C. 759-769.
- 146. Mitterbauer-Hohendanner G. Prognostic significance of molecular staging by PCR-amplification of immunoglobulin gene rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). / Mitterbauer-Hohendanner G, Mannhalter C, Winkler K, Mitterbauer M, Skrabs C, Chott A, Simonitsch-Klupp I, Gleiss A, Lechner K, Jaeger U. // Leukemia. 2004. N = 6 (18). C. 1102 1107.
- 147. Miura Y. Characterization of the T-cell repertoire in autologous graft-versus-host disease (GVHD): evidence for the involvement of antigen-driven T-cell response in the development of autologous GVHD. / Miura Y1, Thoburn CJ, Bright EC, Sommer M, Lefell S, Ueda M, Nakao S, Hess AD. // Blood. -2001. N = 3 (98). C.868-876.
- 148. Monroe J.G. Fate decisions regulating bone marrow and peripheral B lymphocyte development. / Monroe J.G., Dorshkind K. // Advances in immunology. -2007. (95). -C. 1-50.

- 149. Moreno C. Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukemia: prevalence, clinical associations, and prognostic significance. / Moreno C, Hodgson K, Ferrer G, Elena M, Filella X, Pereira A, Baumann T, Montserrat E. // Blood. − 2010. − № 23 − (116). − C. 4771–4776.
- 150. Moreton P. Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. / Moreton P, Kennedy B, Lucas G, Leach M, Rassam SM, Haynes A, Tighe J, Oscier D, Fegan C, Rawstron A, Hillmen P. // Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. − 2005. − \mathbb{N} 13 − (23). − C. 2971–2979.
- 151. Mortuza F.Y. Minimal residual disease tests provide an independent predictor of clinical outcome in adult acute lymphoblastic leukemia. / Mortuza FY, Papaioannou M, Moreira IM, Coyle LA, Gameiro P, Gandini D, Prentice HG, Goldstone A, Hoffbrand AV, Foroni L. // Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. -2002. -N = 4 -(20). -C. 1094-1104.
- 152. Mosmann T.R. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. / Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. // Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950). -1986. N = 7 (136). C. 2348 2357.
- 153. Mosmann T.R. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. / Mosmann T.R. Coffman R.L. // Annual review of immunology. 1989. (7). C. 145–173.
- 154. Mqadmi A. CD4+CD25+ regulatory T cells control induction of autoimmune hemolytic anemia. / Mqadmi A., Zheng X., Yazdanbakhsh K. // Blood. -2005. $\cancel{N} 9 (105)$. C. 3746–3748.
- 155. Mullighan C.G. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. / Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, Lerach S, Payne-Turner D, Phillips LA, Heatley SL, Holmfeldt L, Collins-Underwood JR, Ma J, Buetow KH, Pui CH, Baker SD, Brindle PK, Downing JR. // Nature. − 2011. − № 7337 − (471). − C. 235–239.
- 156. Mustafa M.M. Epstein-Barr virus lymphoproliferative disorder in children with

- leukemia: case report and review of the literature. / Mustafa M.M., Winick N.J., Margraf L.R. // Journal of pediatric hematology/oncology. -1997. N = 1 (19). C. 77-81.
- 157. Naylor K. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. / Naylor K, Li G, Vallejo AN, Lee WW, Koetz K, Bryl E, Witkowski J, Fulbright J, Weyand CM, Goronzy JJ. // Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950). − 2005. − № 11 − (174). − C . 7446–7452.
- 158. Nazel Khosroshahi B. Cold Autoimmune Hemolytic Anemia due to High-grade non Hodgkin's B cell Lymphoma with Weak Response to Rituximab and Chemotherapy Regimens / B. N. Khosroshahi, M. Jafari, H. Vazini, A. Ahmadi, K. Shams, M. Kholoujini. // International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research. − 2015. − T. 9. − № 3. − C.157−160.
- 159. Nifontova I. Stromal cells altered function in patients with aplastic anemia / Nifontova I. // Haematologica/The Hematology Journal. 2007. (92). C. 27.
- 160. Nigro L. Lo. Clonal stability in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) who relapsed five or more years after diagnosis. / Lo Nigro L, Cazzaniga G, Di Cataldo A, Pannunzio A, D'Aniello E, Masera G, Schiliró G, Biondi A. // Leukemia. 1999. \mathbb{N}° 2 (13). C. 190–195.
- 161. Oh S.Y. Stage IV marginal zone B-cell lymphoma--prognostic factors and the role of rituximab: Consortium for Improving Survival of Lymphoma (CISL) study. / Oh SY, Kim WS, Kim JS, Kim SJ, Lee S, Lee DH, Won JH, Hwang IG, Kim MK, Lee SI, Chae YS, Yang DH, Kang HJ, Choi CW, Park J, Kim HJ, Kwon JH, Lee HS, Lee GW, Eom HS, Kwak JY, Suh C, Kim HJ. // Cancer science. 2010. № 11 (101). C. 2443–2447.
- 162. Okada Y. Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. / Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Kawaguchi T, Stahl EA, Kurreeman FA, Nishida N, Ohmiya H, Myouzen K, Takahashi M, Sawada T, Nishioka Y, Yukioka M, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Tohma S, Takasugi K, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Matsuo K, Tanaka H, Tajima K, Suzuki T, Iwamoto T, Kawamura Y, Tanii H, Okazaki Y, Sasaki T, Gregersen PK, Padyukov L,

Worthington J, Siminovitch KA, Lathrop M, Taniguchi A, Takahashi A, Tokunaga K, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Mimori T, Plenge RM, Yamanaka H, Momohara S, Yamada R, Matsuda F, Yamamoto K. // Nature genetics. − 2012. − № 5 − (44). − C. 511–516.

163. Okano M. Epstein-Barr virus and human diseases: recent advances in diagnosis. / M Okano, G M Thiele, J R Davis, H L Grierson, D T Purtilo // Clinical Microbiology Reviews. – 1988. – T. 1. – № 3. – C. 300–312.

164. Oliveira G.G. Production of erythrocyte autoantibodies in NZB mice is inhibited by CD4 antibodies. / Oliveira GG, Hutchings PR, Roitt IM, Lydyard PM. // Clinical and experimental immunology. -1994. - N = 2 - (96). - C. 297-302.

165. Pane F. Significant reduction of the hybrid BCR/ABL transcripts after induction and consolidation therapy is a powerful predictor of treatment response in adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. / Pane F, Cimino G, Izzo B, Camera A, Vitale A, Quintarelli C, Picardi M, Specchia G, Mancini M, Cuneo A, Mecucci C, Martinelli G, Saglio G, Rotoli B, Mandelli F, Salvatore F, Foà R. // Leukemia. – 2005. – (19). – C. 628. 166. Park M.-J. Induction of NKG2D Ligands and Increased Sensitivity of Tumor Cells to NK Cell-mediated Cytotoxicity by Hematoporphyrin-based Photodynamic Therapy / M.-J. Park, J. Bae, J. Chung, S.H. Kim, C.D. Kang. // Immunol Invest. – 2011. – №40 – (4). – C. 367-382.

167. Parovichnikova E.N. Non-Intensive but Constant and Exhausting Action on the Leukemic Clone Is a Reasonable and Effective Treatment Approach in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of the Russian Acute Lymphoblastic Leukemia (RALL) Study Group / Elena N. Parovichnikova, Vera Troitskaya, Andrey N Sokolov, Galina Klyasova, Larisa A Kuzmina, Sergey K. Kravchenko, Elena O. Gribanova, Sergey N Bondarenko, Olga Yu Baranova, Tatiana Kaporskaya, T Ryltzova, Tamara Pavlovna Zagoskina, E Zinina, Olga Samoilova, Alfiya Nizamutdinova, A Klimovich, E Karyakina, A Eluferieva, L Gavrilova, T Konstantinova, N Vopilina, Valeri Lapin, Alexander Pristupa, T Tikunova, Zalina Akhmerzaeva, Tatiana Obukhova, Mikhail Rusinov, Sergey M. Kulikov and Valeri G Savchenko // Blood. – 2014. – № 21 – (124).

– C. 3662.

168. Perry F.E. Autoreactive T cell specificity in autoimmune hemolytic anemia of the NZB mouse. / Perry FE, Barker RN, Mazza G, Day MJ, Wells AD, Shen CR, Schofield AE, Elson CJ.// European journal of immunology. − 1996. − № 1 − (26). − C. 136–141. 169. Pongers-Willemse M.J. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. / Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, Gonzalez M, Bartram CR, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, San Miguel JF, van Dongen JJ. // Leukemia. − 1999. − № 1 − (13). − C. 110–118.

- 170. Poopak B. PCR Analysis of IgH and TCR- γ Gene Rearrangements as a Confirmatory Diagnostic Tool for Lymphoproliferative Disorders / Poopak B, Valeshabad AK, Elahi F, Rezvani H, Khosravipour G, Jahangirpour MA, Bolouri S, Golkar T, Salari F, Shahjahani M, Saki N. // Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion. 2015. N0 1 (31). C. 38–45.
- 171. Posnett D.N. Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to «benign monoclonal gammapathy». / Posnett DN, Sinha R, Kabak S, Russo C. // The Journal of experimental medicine. -1994. N = 2 (179). C. 609-618.
- 172. Pott C. Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study. / Pott C, Hoster E, Delfau-Larue MH, Beldjord K, Böttcher S, Asnafi V, Plonquet A, Siebert R, Callet-Bauchu E, Andersen N, van Dongen JJ, Klapper W, Berger F, Ribrag V, van Hoof AL, Trneny M, Walewski J, Dreger P, Unterhalt M, Hiddemann W, Kneba M, Kluin-Nelemans HC, Hermine O, Macintyre E, Dreyling M. // Blood. − 2010. − № 16 − (115). − C. 3215–3223.
- 173. Przybylski G. Molecular characterization of illegitimate TCR delta gene rearrangements in acute myeloid leukaemia. / Przybylski G, Oettle H, Ludwig WD, Siegert W, Schmidt CA. // British journal of haematology. − 1994. − № 2 − (87). − C.

301–307.

174. Pui C.H. Clinical utility of sequential minimal residual disease measurements in the context of risk-based therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prospective study. / Pui CH, Pei D, Coustan-Smith E, Jeha S, Cheng C, Bowman WP, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Inaba H, Bhojwani D, Gruber TA, Leung WH, Downing JR, Evans WE, Relling MV, Campana D. // The Lancet. Oncology. -2015. - N - 4 - (16). - C. 465–474.

175. Puig N. Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. / Puig N, Sarasquete ME, Balanzategui A, Martínez J, Paiva B, García H, Fumero S, Jiménez C, Alcoceba M, Chillón MC, Sebastián E, Marín L, Montalbán MA, Mateos MV, Oriol A, Palomera L, de la Rubia J, Vidriales MB, Bladé J, Lahuerta JJ, González M, Miguel JF, García-Sanz R. // Leukemia. − 2014. − № 2 − (28). − C. 391–397.

176. Raghavachar A. Analyses of phenotype and genotype in acute lymphoblastic leukemias at first presentation and in relapse. / Raghavachar A., Thiel E., Bartram C.R. // Blood. -1987. - N = 4 - (70). - C. 1079 - 1083.

177. Ram R. Prophylaxis regimens for GVHD: Systematic review and meta-analysis / R. Ram, A. Gafter-Gvili, M. Yeshurun, M. Paul, P. Raanani, Shpilberg O. // Bone Marrow Transplant. -2008. $-N_{2}$ 43. -(8). -C. 643-653.

178. Brink M., Alpdogan O., Boyd R. Strategies to enhance T-cell reconstitution in immunocompromised patients / M. R M van den Brink, O. Alpdogan, R. Boyd. // Nat Rev Immunol. -2004. $-N_{\odot}$ 4. -(11). -C. 856-867.

179. Ravandi F. Detection of MRD may predict the outcome of patients with Philadelphia chromosome–positive ALL treated with tyrosine kinase inhibitors plus chemotherapy / Ravandi F, Jorgensen JL, Thomas DA, O'Brien S, Garris R, Faderl S, Huang X, Wen S, Burger JA, Ferrajoli A, Kebriaei P, Champlin RE, Estrov Z, Challagundla P, Wang SA, Luthra R, Cortes JE, Kantarjian HM. // Blood. − 2013. − № 7 − (122). − C. 1214-1221. 180. Rawstron A.C. Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: independent prediction of survival benefit per log reduction. / Rawstron AC, Gregory

- WM, de Tute RM, Davies FE, Bell SE, Drayson MT, Cook G, Jackson GH, Morgan GJ, Child JA, Owen RG. // Blood. -2015. No 12 (125). C. 1932-1935.
- 181. Ribera J.M. Treatment of high-risk Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in adolescents and adults according to early cytologic response and minimal residual disease after consolidation assessed by flow cytometry: final results of the PETHEMA / Ribera JM, Oriol A, Morgades M, Montesinos P, Sarrà J, González-Campos J, Brunet S, Tormo M, Fernández-Abellán P, Guàrdia R, Bernal MT, Esteve J, Barba P, Moreno MJ, Bermúdez A, Cladera A, Escoda L, García-Boyero R, Del Potro E, Bergua J, Amigo ML, Grande C, Rabuñal MJ, Hernández-Rivas JM, Feliu E. // Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. − 2014. − № 15 − (32). − C. 1595–1604.
- 182. Rose M.G. T-cell large granular lymphocyte leukemia and related disorders. / Rose M.G., Berliner N. // The oncologist. -2004. $\cancel{N} \ 3 (9)$. C. 247-258.
- 183. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. / Sakaguchi S. // Annual review of immunology. 2004. (22). C. 531–562.
- 184. Sallah S. Autoimmune hemolytic anemia in patients with non-Hodgkin's lymphoma: characteristics and significance. / Sallah S, Sigounas G, Vos P, Wan JY, Nguyen NP. // Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology. -2000. N = 12 (11). C.1571 1577.
- 185. Sarzotti M. T cell repertoire development in humans with SCID after nonablative allogeneic marrow transplantation. / Sarzotti M, Patel DD, Li X, Ozaki DA, Cao S, Langdon S, Parrott RE, Coyne K, Buckley RH. // Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950). -2003. N = 5 (170). C. 2711 2718.
- 186. Scally S.W. A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. / Scally S.W. // The Journal of experimental medicine. -2013. No. 12 (210). C. 2569-2582.
- 187. Schlissel M.S. Regulating antigen-receptor gene assembly. / Schlissel M.S. // Nature reviews. Immunology. -2003. N = 11 (3). C. 890-899.

- 188. Scholl C. Development of a real-time RT-PCR assay for the quantification of the most frequent MLL/AF9 fusion types resulting from translocation t(9;11)(p22;q23) in acute myeloid leukemia. / Scholl C, Breitinger H, Schlenk RF, Dohner H, Frohling S, Dohner K // Genes, chromosomes & cancer. $-2003. N_{\odot} 3 (38). C. 274-280.$
- 189. Schwartz R.H. T cell anergy. / Schwartz R.H. // Annual review of immunology. 2003. (21). C. 305–334.
- 190. Shimoyama Y. Age-related Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders: special references to lymphomas surrounding this newly recognized clinicopathologic disease. / Shimoyama Y, Yamamoto K, Asano N, Oyama T, Kinoshita T, Nakamura S. // Cancer science. -2008. N = 6 (99). C. 1085-1091.
- 191. Shin S. Analysis of Immunoglobulin and T Cell Receptor Gene Rearrangement in the Bone Marrow of Lymphoid Neoplasia Using BIOMED-2 Multiplex Polymerase Chain Reaction / S. Shin, A. H. Kim, J. Park, M. Kim, J. Lim, Y. Kim, K. Han, S. A. Lee, SG Cho. // Int J Med Sci. -2013. -N 10. -(11). -C. 1510-1517.
- 192. Sidorova J. A simple and efficient method for DNA extraction from skin and paraffin-embedded tissues applicable to T-cell clonality assays. / Sidorova JV1, Biderman BV, Nikulina EE, Sudarikov AB. // Exp. Dermatol. − 2012. № 1 (21). − C. 57–60.
- 193. Sinclair E. CMV antigen-specific CD4+ and CD8+ T cell IFNgamma expression and proliferation responses in healthy CMV-seropositive individuals. / Sinclair E, Black D, Epling CL, Carvidi A, Josefowicz SZ, Bredt BM, Jacobson MA. // Viral immunology. $-2004. N_{\odot} 3 (17). C.445-454.$
- 194. Smith J.L. Frequent T and B cell oligoclones in histologically and immunophenotypically characterized angioimmunoblastic lymphadenopathy. / Smith JL, Hodges E, Quin CT, McCarthy KP, Wright DH. // The American journal of pathology. 2000. N = 2 (156). C. 661 669.
- 195. Sokol R.J. Autoimmune hemolysis: a critical review. / Sokol R.J., Hewitt S. // Critical reviews in oncology/hematology. -1985. N = 2 (4). C. 125 154.
- 196. Spinelli O. Clearance of minimal residual disease after allogeneic stem cell transplantation and the prediction of the clinical outcome of adult patients with high-risk

- acute lymphoblastic leukemia / Spinelli O, Peruta B, Tosi M, Guerini V, Salvi A, Zanotti MC, Oldani E, Grassi A, Intermesoli T, Micò C, Rossi G, Fabris P, Lambertenghi-Deliliers G, Angelucci E, Barbui T, Bassan R, Rambaldi A. // Haematologica. -2007. N 0.00
- 197. Sprent J. The thymus and negative selection. / Sprent J., Kishimoto H. // Immunological reviews. 2002. (185). C. 126–135.
- 198. Stevenson F.K. Identification of normal B-cell counterparts of neoplastic cells which secrete cold agglutinins of anti-I and anti-i specificity. / Stevenson FK, Smith GJ, North J, Hamblin TJ, Glennie MJ. // British journal of haematology. -1989. N = 1 (72). C. 9–15.
- 199. Strioga M. CD8+CD28- and CD8+CD57+ T cells and their role in health and disease. / Strioga M., Pasukoniene V., Characiejus D. // Immunology. 2011. № 1 (134). C. 17–32.
- 200. Sung A.D. Concise Review: Acute Graft-Versus-Host Disease: Immunobiology, Prevention, and Treatment. / Sung A.D., Chao N.J. // Stem Cells Translational Medicine. $-2013. N_{\odot} 1 (2). C. 25-32.$
- 201. Sung L. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorder in a child undergoing therapy for localized rhabdomyosarcoma. / Sung L, Dix D, Allen U, Weitzman S, Cutz E, Malkin D. // Medical and pediatric oncology. -2000. N = 5 (34). -C. 358-360.
- 202. Suzuki N. Characterization of a germline Vk gene encoding cationic anti-DNA antibody and role of receptor editing for development of the autoantibody in patients with systemic lupus erythematosus. / Suzuki N, Harada T, Mihara S, Sakane T. // Journal of Clinical Investigation. -1996. T. 98. No. 8. C. 1843–1850.
- 203. Swerdlow S.H. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues / S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris, E.S. Jaffe, S.A. Pileri. // 2008. C. 326.
- 204. Swerdlow S.H. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms / S.H. Swerdlow, E. Campo, S.A. Pileri, N. Lee Harris, H. Stein.

// - 2016. - C. 2375-2390.

205. Szczepanski T. Unusual immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement patterns in acute lymphoblastic leukemias. / Szczepański T, Pongers-Willemse MJ, Langerak AW, van Dongen JJ. // Current topics in microbiology and immunology. – 1999. – (246). – C. 205.

206. Szczepanski T. Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. / Szczepański T, Beishuizen A, Pongers-Willemse MJ, Hählen K, Van Wering ER, Wijkhuijs AJ, Tibbe GJ, De Bruijn MA, Van Dongen JJ. // Leukemia. -1999. - N = 2 - (13). - C. 196-205.

207. Szczepanski T. Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T-cell receptor alpha beta lineage. / Szczepański T, Pongers-Willemse MJ, Langerak AW, Harts WA, Wijkhuijs AJ, van Wering ER, van Dongen JJ. // Blood. − 1999. − № 12 − (93). − C. 4079–4085.

208. Szczepanski T. T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in T cell acute lymphoblastic leukemia refelct «end-stage» recombinations: implications for minimal residual disease monitoring. / Szczepański T, Langerak AW, Willemse MJ, Wolvers-Tettero IL, van Wering ER, van Dongen JJ. // Leukemia. – 2000. – № 7 – (14). – C. 1208–1214.

209. Szczepanski T. Comparative analysis of T-cell receptor gene rearrangements at diagnosis and relapse of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) shows high stability of clonal markers for monitoring of minimal residual disease and reveals the occurrence of second T-ALL / Szczepański T, van der Velden VH, Raff T, Jacobs DC, van Wering ER, Brüggemann M, Kneba M, van Dongen JJ. // Leukemia. − 2003. − № 11 -(17). − C. 2149–2156.

210. Szczepanski T. Late recurrence of childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia frequently represents a second leukemia rather than a relapse: first evidence for genetic predisposition. / Szczepanski T, van der Velden VH, Waanders E, Kuiper RP, Van

- Vlierberghe P, Gruhn B, Eckert C, Panzer-Grümayer R, Basso G, Cavé H, Stadt UZ, Campana D, Schrauder A, Sutton R, van Wering E, Meijerink JP, van Dongen JJ. // Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. -2011. N = 12 (29). C. 1643-1649.
- 211. Szczepański T. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease / Szczepański T, Willemse MJ, Brinkhof B, van Wering ER, van der Burg M, van Dongen JJ. // Blood. -2002. N = 7 (99). C. 2315-2323.
- 212. Takeuchi T. Cellular mechanism of DNA-specific antibody synthesis by lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients. / Takeuchi T, Abe T, Koide J, Hosono O, Morimoto C, Homma M. // Arthritis and rheumatism. -1984. N = 7 (27). C.766-773.
- 213. Tan B.T. The frequency of B- and T-cell gene rearrangements and epstein-barr virus in T-cell lymphomas: a comparison between angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified with and without associated B-cell proliferations. / Tan B.T., Warnke R.A., Arber D.A. // The Journal of molecular diagnostics: JMD. -2006. -N = 4 (8). -C. 466-475.
- 214. Taylor A.L. Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after solid organ transplantation. / Taylor A.L., Marcus R., Bradley J.A. // Critical reviews in oncology/hematology. -2005. N = 1 (56). C. 155 167.
- 215. Theriault C. PCR analysis of immunoglobulin heavy chain (IgH) and TcR-gamma chain gene rearrangements in the diagnosis of lymphoproliferative disorders: results of a study of 525 cases. / Thériault C, Galoin S, Valmary S, Selves J, Lamant L, Roda D, Rigal-Huguet F, Brousset P, Delsol G, Al Saati T. // Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. − 2000. − № 12 − (13). − C. 1269–1279.
- 216. Thieblemont C. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma is a disseminated disease in one third of 158 patients analyzed. / Thieblemont C, Berger F, Dumontet C,

- Moullet I, Bouafia F, Felman P, Salles G, Coiffier B. // Blood. $-2000. \cancel{N} \ 3 (95). C.$ 802–806.
- 217. Thomason R.W. Epstein-Barr virus and lymphoproliferation in methotrexate-treated rheumatoid arthritis. / Thomason RW1, Craig FE, Banks PM, Sears DL, Myerson GE, Gulley ML. // Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. -1996. -No 3 -(9). -C. 261–266.
- 218. Tian D.M. Rapid Recovery of CD3(+)CD8(+) T Cells on Day 90 Predicts Superior Survival after Unmanipulated Haploidentical Blood and Marrow Transplantation. / DM Tian, Y Wang, XH Zhang, KY Liu, XJ Huang, YJ Chang. // PLoS ONE. 2016. \mathbb{N} 6 (11). e0156777.
- 219. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. / Tonegawa S. // Nature. $1983. N_{\odot} 5909 (302). C. 575-581.$
- 220. Tran H. Immunodeficiency-associated lymphomas. / Tran H, Nourse J, Hall S, Green M, Griffiths L, Gandhi MK. // Blood reviews. -2008. $-\cancel{N}$ 5 (22). C. 261–281.
- 221. Velden V.H.J. van der. Age-related patterns of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in precursor-B-ALL: Implications for detection of minimal residual disease / van der Velden VH, Szczepanski T, Wijkhuijs JM, Hart PG, Hoogeveen PG, Hop WC, van Wering ER, van Dongen JJ. // Leukemia. -2003. N = 9 (17). C. 1834 1844.
- 222. Velden V.H.J. van der. TCRB gene rearrangements in childhood and adult precursor-B-ALL: frequency, applicability as MRD-PCR target, and stability between diagnosis and relapse. / van der Velden VH, Bruggemann M, Hoogeveen PG, de Bie M, Hart PG, Raff T, Pfeifer H, Lüschen S, Szczepański T, van Wering ER, Kneba M, van Dongen JJ. // Leukemia. 2004. № 12 (18). C. 1971–1980.
- 223. Velden V.H.J. van der. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. / van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, Flohr T, Sutton R, Cave H, Madsen HO, Cayuela JM, Trka J, Eckert C, Foroni L, Zur Stadt U, Beldjord K, Raff T, van der Schoot CE, van Dongen JJ // Leukemia. − 2007. − № 4 −

- (21). C. 604–611.
- 224. Visco C. Autoimmune cytopenias in chronic lymphocytic leukemia. / Visco C, Barcellini W, Maura F, Neri A, Cortelezzi A, Rodeghiero F. // American journal of hematology. -2014. N $_{2}$ 11 (89). C. 1055-1062.
- 225. Weinblatt M.E. Long-term prospective study of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. 84-month update. / Weinblatt ME, Weissman BN, Holdsworth DE, Fraser PA, Maier AL, Falchuk KR, Coblyn JS. // Arthritis and rheumatism. -1992. N = 2 (35). C. 129-137.
- 226. Weinstein A. Low-dose methotrexate treatment of rheumatoid arthritis. Long-term observations. / Weinstein A, Marlowe S, Korn J, Farouhar F. // The American journal of medicine. -1985. $-N_{\odot}$ 3 (79). C. 331–337.
- 227. Weinstein G.D. Cytotoxic and immunologic effects of methotrexate in psoriasis. / Weinstein G.D., Jeffes E., McCullough J.L. // The Journal of investigative dermatology. $-1990. N_{\odot} 5 (95). C. 49-52.$
- 228. Weiss L.M. Detection and localization of Epstein-Barr viral genomes in angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. / Weiss LM, Jaffe ES, Liu XF, Chen YY, Shibata D, Medeiros LJ. // Blood. -1992. N = 7 (79). C. 1789-1795.
- 229. Weller S. Human blood IgM «memory» B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. / Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, Plebani A, Kumararatne DS, Bonnet D, Tournilhac O, Tchernia G, Steiniger B, Staudt LM, Casanova JL, Reynaud CA, Weill JC. // Blood. − 2004. − T. 104. − № 12. − C. 3647–3654.
- 230. Weng N.P. CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. / Weng N.P., Akbar A.N., Goronzy J. // Trends in immunology. -2009. N = 7 -(30). C. 306-312.
- 231. Willenbrock K. Frequent occurrence of B-cell lymphomas in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and proliferation of Epstein-Barr virus-infected cells in early cases. / Willenbrock K., Brauninger A., Hansmann M.L. // British journal of haematology. —

- $2007. N_{2} 6 (138). C. 733 739.$
- 232. Wu D. Clinical Experience With Modified, Single-Tube T-Cell Receptor Vbeta Flow Cytometry Analysis for T-Cell Clonality. / Wu D, Anderson MM, Othus M, Wood BL. // American journal of clinical pathology. -2016. $-N_{\odot} 4 (145)$. -C. 467-485.
- 233. Xhaard A. Reconstitution of regulatory T-cell subsets after allogeneic hematopoietic SCT / A. Xhaard, H. Moins-Teisserenc, M. Busson, M. Robin, P. Ribaud. // Bone Marrow Transplant. -2014. -N249. -(8). -C. 1089-1092.
- 234. Xu J.L. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. / Xu J.L., Davis M.M. // Immunity. -2000. N = 1 (13). C. 37-45.
- 235. Zaki M.A.A. Presence of B-cell clones in T-cell lymphoma. / Zaki MA, Wada N, Kohara M, Ikeda J, Hori Y, Fujita S, Ogawa H, Sugiyama H, Hino M, Kanakura Y, Morii E, Aozasa K. // European journal of haematology. − 2011. − № 5 − (86). − C. 412–419.
- 236. Zemlin M. The diversity of rearranged immunoglobulin heavy chain variable region genes in peripheral blood B cells of preterm infants is restricted by short third complementarity-determining regions but not by limited gene segment usage. / Zemlin M, Bauer K, Hummel M, Pfeiffer S, Devers S, Zemlin C, Stein H, Versmold HT. // Blood. $-2001. N_{\odot} 5 (97). C. 1511-1513.$
- 237. Zettl A. Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders in angloimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified. / Zettl A, Lee SS, Rüdiger T, Starostik P, Marino M, Kirchner T, Ott M, Muller-Hermelink HK, Ott G. // American journal of clinical pathology. − 2002. − № 3 − (117). − C. 368–379.
- 238. Zhang Q.Y. Bone marrow involvement by hodgkin and non-hodgkin lymphomas. / Zhang Q.Y., Foucar K. // Hematology/oncology clinics of North America. -2009. N = 4 -(23). C. 873-902.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1. Описание мультиплексных реакций и ПЦР-праймеров по протоколу BIOMED-2 [19].

Гены	tube	Прямые	Обратные праймеры	Длина продуктов
		праймеры	(меченные)	(п.нпары
				нуклеотидов)
IGH	A	VH1-7 (FR1)	JHcons FAM	310-360
	В	VH1-7 (FR2)	JHcons FAM	250-295
	С	VH1-7 (FR3)	JHcons FAM	100-170
	Е	DH1-6	JHcons TAMPA	110-290 и 390-420
	D	DH7	JHcons TAMPA	100-130
IGK	A	Vκ1/6-7	Jκ1-4, Jκ5 FAM	120-300
	В	Vκ1/6-7, INTR	KDE-FAM	210-390
TCRD	RD D1 D δ 2,V δ 1-V δ 6		Jδ1FAM, Jδ2R6G	120-280
			J83TAMPA,J84ROX	
	D2	Dδ2,Vδ1-Vδ6	Dδ3FAM	130-280
TCRG	GA	Vγ1f, Vγ10	Jγ1/2FAM, Jp1/2 R6G	145-255
	GB	Vγ9, Vγ11	Jγ1/2FAM, Jp1/2 R6G	80-220
TCRB	A	Vβ2-Vβ24	Јβ1.1 -Јβ1.6НЕХ	240-285
			Jβ2.2, Jβ2.6,	
			Jβ2.7FAM	

В	Vβ2-Vβ24	Јβ2.1, Јβ2.3, Јβ2.4,	240-285
		Jβ2.5 FAM	
С	Dβ1, Dβ2	Јβ1.1 -Јβ1.6НЕХ	170-210
		Jβ2.1- Jβ2.7FAM	285-325

Приложение 2. Частота (%) выявления клональных реаранжировок генов TCRG, TCRB, TCRD и генов тяжелой и легкой цепей IG при В- и Т-вариантах ОЛЛ

		Наши данные		Данные van Dongen J.J. et al.		
Реаран	жировки	В-ОЛЛ (<i>n</i> = 37)	Т-ОЛЛ (<i>n</i> = 29)	В-ОЛЛ	Т-ОЛЛ	
TCRG	VG–JG	70.3% (n=26)	89.7% (n=26)	55	95	
TCRB	VB–JВ (полные)	32.4% (n=12)	51.7% (n=15)	21	77	
ICKB	DB-JB (неполные)	24.3% (n=9)	44.8% (n=13)	14	55	
	Bce TCRB	40.5% (n=15)	65.5% (n=19)	33	92	
TCRD	VD-JD/DD2-JD	21.6% (n=8)	51.7 % (n=15)	н/д	н/д	
ICKD	VD-DD3/DD2- DD3	45.9% (n=17)	31% (n=9)	н/д	н/д	
	Bce TCRD	62.2% (n=23)	65.5% (n=19)	40	50	
	VH– JHFR1/FR2/FR3 (полные)	67.6% (n=25)	6.9% (n=2)	93	5	
IGH	DH–JH (неполные)	21.6% (n=8)	20.7% (n=6)	20	23	
	Bce IGH	78.4% (n=29)	20.7% (n=6)	98	23	
	Vk–Jk	27% (n=10)	0% (n=0)			
IGK	Vk– KDE/IntronRSS– KDE	29.7% (n=11)	3.4% (n=1)			

В	Sce IGK	35.1% (n=13)	3.4% (n=1)	50	0
---	---------	-----------------	------------	----	---

Приложение 3. Результаты контроля МОБ у пациентов с ОЛЛ на протоколе ОЛЛ-2009.

-	-	1		•		1		
№	Вариант заболевания	Мишень	36 день	70 день	105 день	133 день	150 день	ПТ
1	В	VH1- JH6	н/м	н/м	отр	отр	н/м	отр
2	В	VH5-JH4	н/м	пол	отр	отр	отр	отр
3	В	VH1-JH4	пол	пол	пол — транспла нтация	пол	пол	пол
4	В	VH3-JH4	отр	отр	отр	отр	н/м	отр
5	В	VH3-JH4	пол	пол	отр	н/м	н/м	отр
6	В	VB12-JB2.3	пол	н/м	пол — ремиссия	пол	н/м	отр
7	В	VH3-JH5	отр	отр	н/м	отр	отр	отр
8	В	VH3 - JH6	н/м	отр	н/м	отр	отр	отр
9	В	VH3-JH6	н/м	пол	отр	пол	пол	отр
10	В	VH4-JH3	пол	пол	пол - ремиссия	пол	отр	отр
11	В	VH4-JH2	н/м	пол	<mark>пол</mark> - ремиссия	отр	отр	отр
12	В	VH2-JH4	н/м	н/м	отр	отр	н/м	отр
13	В	VH1-JH6	пол	пол	н/м	отр	отр	н/м
14	В	VH3-JH6	н/м	отр	отр	отр	отр	отр
15	В	VH4-JH4	н/м	пол	пол	смерть — сепсис	-	-
16	В	VH3-JH6	н/м	н/м	отр	н/м	отр	16 мес отр
17	В	VH6-JH4	пол	пол	пол	пол	смерть— прогресс ия	-
18	В	VH6-JH4	пол	н/м	<mark>пол</mark> - рецидив	н/м	н/м	пол
19	T	VB15-JB2.3	отр	отр	отр	пол	пол	отр

20	Т	VB7-JB1.2	пол	пол	<mark>пол</mark> - рецидив	пол	пол	пол
21	T	VB5/1-JB1.2	н/м	пол	н/м	пол	пол	пол
22	Т	VB3-JB2.1	пол	отр	отр	отр	отр	отр
23	Т	VB1-JB1.4	н/м	пол	отр	пол	отр	отр
24	T	VB1-JB2.1	пол	отр	отр	отр	отр	н/м
25	T	VB8a-Jb2.1	н/м	отр	отр	отр	отр	н/м
26	В	VH1-JH4	пол	н/м	отр	отр	отр	н/м
27	В	VH3-JH6	пол	отр	отр	отр	н/м	отр

Примечание. H/M- нет материала; пол - МОБ определяется; отр - МОБ не определяется; $\Pi T-$ поддерживающая терапия.

Приложение 4 Результаты определения Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов TCRG и TCRB у пациентов с $AU\Gamma A$, характеристика пациентов.

			Особенности АИГА	СЭ	Длительность		TCRB	TCRG
		лет			течения	Dβ-Jβ	Vβ-Jβ	Vγ-Jγ
1	Ж	30	тепловые АТ	-	>5 лет	-	-	-
2	Ж	54	холодовые АТ	-	>5 лет	-	+	+/-
3	Ж	59	тепловые АТ	_	>5 лет	+	+	+/-
4	Ж	26	тепловые АТ	+	>10 лет	-	-	+/-
5	Ж	28	тепловые АТ	+	>10 лет	-	-	_
6	M	50	тепловые АТ	-	>15 лет	+	-	+/-
7	Ж	54	холодовые АТ + В-	-	>10 лет	+	+	+/ -
			клеточная лимфома					
8	Ж	61	холодовые AT + В- клеточная лимфома	-	>5 лет	+	+	+/ -
9	Ж	46	тепловые АТ	 	>5 лет	+		+/-
	M	23	тепловые АТ	+	>5 лет >5 лет	+ н/д	- н/д	+/ -
11	Ж	50	тепловые АТ	-	>15 лет	H /Д +	<u>H1/Д</u> +	+/ -
	Ж	30	тепловые АТ	-	>5 лет	+	<u> </u>	
	Ж	23	тепловые АТ	-	>5 лет	+	-	+/-
	M	34	тепловые АТ	+	>3 лет >10 лет	+	+	+/ - +
	Ж	29	тепловые АТ	+	>10 лет	+	+	+
16		56	тепловые АТ	+	>5 лет			
	M	79	тепловые АТ + В-клеточная		>10 лет	L		
1 /	141	17	лимфома	1	7 10 3101			
18	M	38	холодовые АТ	+	>10 лет	+	+	+
19		26	тепловые АТ	-	>15 лет	-	-	_
	Ж	30	тепловые АТ	-	>5 лет	+	+	_
	M	18	тепловые АТ + синдром	+	>5 лет	-	-	-
			Фишера-Эванса					
22	M	32	тепловые АТ + синдром	-	>5 лет	-	+	-
			Фишера-Эванса					
	Ж	63	тепловые АТ	-	>5 лет	н/д	н/д	+
	Ж	22	тепловые АТ	+	>5 лет	+	+	+
25	Ж	59	тепловые АТ	-	>5 лет	-	-	_

26	Ж	46	тепловые АТ	•	>5 лет	н/д	н/д	-
27	M	47	тепловые АТ + синдром	-	>5 лет	н/д	н/д	-
			Фишера-Эванса					
28		27	тепловые АТ	н/д	<5 лет	н/д	н/д	-
29	Ж	20	тепловые АТ	н/д	<5 лет	н/д	н/д	_
30	Ж		тепловые АТ + синдром	н/д	<5 лет	н/д	н/д	+
			Фишера-Эванса + В- клеточная лимфома					
31	Ж	57	тепловые АТ	н/д	<5 лет	н/д	н/д	-
32	Ж	37	тепловые АТ	н/д	<5 лет	+	+	+
33	Ж	28	тепловые АТ	н/д	<5 лет	н/д	н/д	-

Примечание. СЭ — спленэктомия, АТ — антитела, + — моноклональный (положительный) результат, +/- — сомнительный моноклональный, - — поликлональный (отрицательный) результат, н/д — нет данных.

Приложение 5. Результаты секвенирования доминирующих клонов Т-лимфоцитов у пациентов с АИГА.

Паци	TCRB гены	Нуклеотидная последовательность CDR3 области
ент –		Аминокислотная последовательность CDR3 области
сикве		
нс		
1-1	TRBV7-8	TGTGCCAGCAGCTTAaatga <i>GGGAG</i> cagggGAGACCCAGTACTTC
	TRBD2	CASSLNEGAGETQYF
	TRBJ2-5	преобладающий клон
1-2	TRBV19	TGTGCCAGTAccccctgggAGGGGGTCACCCCTCCACTTT
	TRBD1	CASTPLGGGSPLHF
	TRBJ1-6	минорный клон
1-3	TRBV30	$TGTGCCTGGctaattattcc \textbf{\textit{GGGACAGGGG}} acgACACCGGGGAGCTG$
	TRBD1	TTTTT
	TRBJ2-2	CAWLIIPGQGT#TGELFF
		минорный клон
2-1	TRBV29-1	TGCAGCGT <i>CAGGG</i> TGAACACTGAAGCTTTCTTT
	TRBD1	CSVRVNTEAFF
	TRBJ1-1	минорный клон
2-2	TRBV7-8	TGTGCCAGCAGt <i>GCGGGG</i> cagggGAACACTGAAGCTTTCTTT
	TRBD1	CASSAGQGNTEAFF
	TRBJ1-1	минорный клон
2-3	TRBV29	$TGCAGCGTTGAAGtggct \textbf{\textit{GGA}} gCTAACTATGGCTACACCTTC$

	TRBD1	CSVEVAGANYGYTF
	TRBJ1-2	преобладающий клон
3-1	TRBV15	TGTGCCACCAGCAGAGAGAGAGACCCAGTACTTC
	TRBD2	CATSRDGGETQYF
	TRBJ2-5	преобладающий клон

Приложение 6 Данные определения Т-клеточной клональности по реаранжировками генов *TCRG* и *TCRB* в CD4+, CD8+ и CD4-CD8- популяциях лимфоцитов у пациентов с PA и CKB

№	диагно 3	TCRG				TCRB			
		CD4+	CD8+	CD4 - CD8	Общая популяци я	CD4+	CD8+	CD4 - CD8	Общая популяци я
1	PA	основной клон	oligo	oligo	oligo	oligo	oligo	oligo	oligo
2	PA	poly	основно й клон	oligo	mono	основно й клон	oligo	oligo	mono
3	PA	основной клон	poly	oligo	mono	основно й клон	poly	oligo	mono
4	PA	poly	основно й клон	poly	mono	н/д	н/д	н/д	poly
5	СКВ	oligo	основно й клон	oligo	oligo	oligo	основно й клон	oligo	oligo
6	СКВ	н/д	н/д	н/д	poly	oligo	основно й клон	oligo	oligo
7	PA	н/д	н/д	н/д	poly	poly	oligo	н/а	oligo
8	СКВ	н/д	н/д	н/д	poly	н/а	н/а	н/а	oligo
9	СКВ	н/д	н/д	н/д	poly	н/д	н/д	н/д	poly
1	СКВ	н/д	н/д	н/д	poly	н/д	н/д	н/д	oligo
1	СКВ	н/д	н/д	н/д	poly	н/д	н/д	н/д	oligo
1	PA	н/д	н/д	н/д	poly	н/д	н/д	н/д	poly
1	PA	н/д	н/д	н/д	poly	н/д	н/д	н/д	poly
1	PA	н/д	н/д	н/д	poly	н/д	н/д	н/д	poly

Примечание: РА — ревматоидный артрит, СКВ — системная красная волчанка, TCRG — реаранжировки генов гамма цепи Т-клеточного рецептора, TCRB - реаранжировки генов гамма цепи Т-клеточного рецептора, н/а — нет амплификации, н/д — нет данных.