

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
BIOMEDICINOS MOKSLŲ INSTITUTO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**FOLIKULINIŲ T LIMFOCITŲ-PAGALBININKŲ IMUNOFENOTIPO PAPLITIMAS
ŽMOGAUS KRAUJYJE IR KAULŲ ČIULPUOSE ESANT NEOPLASTINIAMS IR
REAKCINIAMS LIMFOCITŲ POKYČIAMS**

Magistrantė AGNĖ STANKEVIČIŪTĖ _____

(parašas)

Darbo vadovas
dr., doc. R. Matuzevičienė

(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
dr., doc. D. Karčiauskaitė

leidžiama ginti

(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

2018 m., Vilnius

TURINYS

SANTRUMPOS.....	4
ĮVADAS	6
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	8
1.1. B limfocitų kilmės neoplazmos.....	8
1.1.1. B ląstelių lėtinė limfoleukemija.....	8
1.2. T limfocitų kilmės neoplazmos	8
1.2.1. Angioimunoblastinė T ląstelių limfoma	9
1.3. Žmogaus folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai	10
1.3.1. Folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai ligų patogenezėje	11
1.4. Ląstelių diferenciacijos žymenys	13
1.4.1. CD3.....	13
1.4.2. CD4.....	15
1.4.3. CD7.....	15
1.4.4. CD10.....	17
1.4.5. CD45.....	19
1.4.6. CD279.....	20
1.4.7. CXCR5	21
1.4.8. ŽLA-DR	22
2. TYRIMŲ METODAI IR APIMTIS	24
2.1. Tėkmės citometrija.....	24
2.2. Naudotos priemonės ir reagentai.....	25
2.3. Mėginių paruošimas	26
2.4. Ląstelių žymenų tyrimai tėkmės citometrijos metodu	27
2.5. T _{FH} populiacijos identifikavimas tėkmės citometrijos metodu	28
2.6. Statistinė analizė.....	34
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	35
3.1. Pacientų charakteristikos	35
3.2. Ląstelių populiacijų paplitimas kaulų čiulpuose ir periferiniame kraujyje įvairiuose susirgimuose	36
3.3. T _{FH} ir kitų T limfocitų-pagalbininkų žymenų paplitimas įvairiose neoplazijose	39
3.4. T _{FH} ir kitų T limfocitų-pagalbininkų populiacijų žymenų ekspresijos palyginimas.	44

3.5. AIBL T _{FH} imunofenotipo palyginimas su T _{FH} populiacijų imunofenotipu 5 grupėse.	46
IŠVADOS	51
SUMMARY.....	52
LITERATŪROS SĄRAŠAS	53
PRIEDAS Nr. 1.....	65
PRIEDAS Nr. 2.....	66
PRIEDAS Nr. 3.....	68

SANTRUMPOS

AIBL - angioimunoblastinė T ląstelių limfoma

Anti-CCP - antikūnai prieš ciklinį citrulininį peptidą.

APC - alofikocianinas

APL - antigenus pateikianti ląstelė

BA - fenotipas be abreacijų

Bcl-6 - B ląstelių limfomos 6 transkripcijos faktorius (angl. *B-cell lymphoma 6 protein*)

BLLL - B ląstelių lėtinė limfoleukemija

CALLA - ūminės limfoblastinės leukemijos antigenas; CD10 (angl. *common acute lymphoblastic leukemia antigen*)

CD - diferenciacijos žymuo (angl. *cluster of differentiation*)

CD40L - CD40 žymens ligandas

DNR - deoksiribonukleorūgštis

EBV - Epštein-Baro virusas

FITC - fluoresceinoizotiocianatas

GC - gemalinis centras

HRS - Hodžkino ir Reed- Sternberg ląstelės (angl. *Hodgkin and Reed-Sternberg cells*)

ITAM - imunoreceptoriaus tirozinu pagrįsto aktyvinimo motyvas molekulėje (angl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)

ITIM- imunoreceptoriaus tirozinu pagrįsto slopinimo motyvo molekulė (angl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*)

ITSM- imunoreceptoriaus tirozinu pagrįsto perjungimo motyvo molekulė (angl. *immunoreceptor tyrosine-based switch motif*)

KBLLL - kitos B limfocitinės kilmės lėtinės limfoproliferacinės ligos

KTLLL - kitos T limfocitinės kilmės lėtinės limfoproliferacinės ligos

MHC - pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas (angl. *major histocompatibility complex*)

PD-L1 - CD279 žymens 1 ligandas (angl. *programmed death-ligand 1*)

PE - fikoeritinas

PerCP- peridino chlorofilo baltymų kompleksas

PŠS - priekinė šviesos sklaida

RLH - reaktyvi limfoidinė hiperplazija (angl. *reactive lymphoid hyperplasia*)

RP - reakciniai pokyčiai

RPTP - receptorinė proteino tirozino fosfotazė (angl. *receptor-like protein tyrosine phosphatase*)

SCID - sunkus kombinuotas imunodeficitas (angl. *severe combined immunodeficiency*)

ŠFŠS - šoninė fluorescencinės šviesos sklaida

ŠŠS - šoninė šviesos sklaida

T-ALL – ūminė T limfoblastinė leukemija (angl. *T- acute lymphoblastic leukemia*)

TCM - centrinės atminties CD4⁺T ląstelės (angl. *central memory CD4⁺T cells*)

TCR - T ląstelių receptorius (angl. *T cell receptor*)

T_{FH} - folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai (angl. *follicular helper T cells*)

XLP - su X chromosoma susijusios limfoproliferacinės ligos (angl. *X-linked lymphoproliferative disease*)

ŽIV - žmogaus imunodeficito virusas

ŽLA - žmogaus leukocitų antigenas

ĮVADAS

Folikuliniai T limfocitai - pagalbininkai (T_{FH} , angl. *follicular T helper cells*) pirmą kartą paminėti literatūros šaltiniuose prieš mažiau nei 20 metų. Šiuo metu yra žinoma, kad šios ląstelės pasižymi pagalbine funkcija B limfocitams, indukuoja B limfocitų aktyvaciją bei virtimą į plazmines ląsteles, yra svarbūs gemalinių centrų formavimuisi ir dalyvauja įvairiose imuninės sistemos funkcijose.

Daugiausiai tyrinėjami folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai, kilę iš gemalinio centro, tačiau pastaruoju metu yra didelis susidomėjimas periferinio kraujo folikuliniais T limfocitais-pagalbininkais. Šiek tiek mažesnis susidomėjimas stebimas kaulų čiulpų kilmės folikuliniais T limfocitais-pagalbininkais. Pastebėta, kad šios ląstelės yra svarbios pirminių imunodeficitų, autoimuninių ligų ir ypač kraujo T ir B ląstelių kilmės neoplazmų patogenezėje. T_{FH} ląstelių, kilusių iš limfmazgių, imunofenotipas yra žinomas ($CD3^+CD4^+CD7-CD279^+CXCR5^+$), tačiau nėra tiksliai žinoma periferinio kraujo ir kaulų čiulpų T_{FH} ląstelių imunofenotipas ir kaip jis pakinta sergant neoplazijomis.

Folikuliniai T limfocitų-pagalbininkai manoma yra angioimunoblastinės T ląstelių limfomos (AIBL, angl. *angioimmunoblastic T cell lymphoma*) substratas. AIBL yra reta ir agresyvi liga, pradinėse stadijose aptinkama tik 10% sergančiųjų [1]. Ši neoplazma kartais yra vadinama „daugiaveide“, nes mokslininkų nustatytas AIBL imunofenotipas yra variabilus, todėl AIBL diagnostika yra sudėtinga. Pastebėta, kad angioimunoblastinės T ląstelių limfomos ląstelių populiaciją sudaro ne tik piktybiniai T_{FH} , bet ir sveiki, nepakitę T_{FH} , todėl yra svarbu nustatyti imunofenotipų skirtumus tarp minėtų dviejų T_{FH} populiacijų, esančių ne tik gemaliniame centre, limfazgiuose, bet ir periferiniame kraujyje bei kaulų čiuluose.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas: Nustatyti folikulinių T limfocitų-pagalbininkų paplitimą piktybinėmis kraujo ligomis sergančiųjų periferiniame kraujyje ir kaulų čiulpuose.

Darbo uždaviniai:

1. Identifikuoti žmogaus folikulinių T limfocitų-pagalbininkų populiacijos žymenų ekspresiją tėkmės citometru.
2. Įvertinti folikulinių T limfocitų-pagalbininkų populiacijos dydį sergant T ar B limfocitų neoplazijomis.
3. Įvertinti folikulinių T limfocitų-pagalbininkų populiacijos dydį esant reakciniams kraujo rodiklių pokyčiams.
4. Nustatyti folikulinių T limfocitų-pagalbininkų populiacijos žymenų ekspresijos ypatumus lyginant ją su kitų T limfocitų-pagalbininkų populiacijų žymenų ekspresija tiriamųjų asmenų grupėse.
5. Nustatyti folikulinių T limfocitų-pagalbininkų populiacijos žymenų ekspresijos ypatumus lyginant ją su angioimunoblastinės T ląstelių limfomos blastų imunofenotipu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. B limfocitų kilmės neoplazmos

Subrendusių B limfocitų neoplazmos yra heterogeninė ligų grupė (daugiau nei 80% visų limfoidinių piktybinių susirgimų [2]), kuriai priklauso B ląstelių limfomos bei plazminių ląstelių neoplazmos. Subrendusioms B ląstelių neoplazmoms būdinga kloninė įvairaus subrendimo (nuo naiviųjų B limfocitų iki subrendusių plazminių ląstelių) B limfocitų proliferacija [3]. Šių neoplazmų eiga gali būti tiek itin agresyvi, tiek ir neagresyvi. Vakarų šalyse B limfocitų kilmės neoplazmos diagnozuojamos maždaug 20 žmonių iš 100,000 [4]. B limfocitų kilmės neoplazmoms priklauso: monokloninė B ląstelių limfocitozė, B ląstelių prolimfocitinė leukemija, B ląstelių lėtinė limfoleukemija, blužnies marginalinės zonos limfoma, plaukuotųjų ląstelių leukemija, Valdenštremo makroglobulinemija, plazminių ląstelių limfoma, folikulinė limfoma, mantijos ląstelių limfoma, difuzinė didelių B ląstelių limfoma, Burkitt limfoma ir kitos neoplazmos [5].

1.1.1. B ląstelių lėtinė limfoleukemija

B ląstelių lėtinė limfoleukemija (BLLL), dar žinoma kaip smulkių B limfocitų limfoma, yra viena dažniausiai diagnozuojamų leukemijų (20-25% visų leukemijų) suaugusiems asmenims Vakarų šalyse. Ši neoplazma daugiausiai diagnozuojama pagyvenusiems pacientams (<10% pacientų yra jaunesni nei 40 metų [6]). BLLL diagnozuojama dažniau vyrams nei moterims [7]. BLLL klinikinė eiga yra įvairi, o sergančiųjų išgyvenamumas trunka nuo mėnesių iki dešimtmečių. Kai kuriems pacientams simptomai nepasireiškia arba yra minimalūs, o kitiems pacientams yra stebima ryški simptomatika, yra sparčiai blogėjantys kraujo rodikliai [8]. BLLL pasižymi CD19, silpna CD20, stipria CD5 ir CD23 žymenų ekspresija. Vėžiniai B limfocitai ekspresuoja mažus kiekius paviršinių imunoglobulinų (ypač IgG ir IgM), taip pat randama lengvųjų grandinių restrikcija.

1.2. T limfocitų kilmės neoplazmos

Subrendusių arba periferinių T ląstelių neoplazmos yra biologiškai ir kliniškai heterogeninė retų susirgimų grupė (10-12% visų limfoidinių piktybinių susirgimų), kurių metu limfocitai kloniškai

proliferuoja palikę užkrūčio liauką [9]. T limfocitų kilmės neoplazmų klinikinė išraiška yra įvairi bei gali nekoreliuoti su morfologija [10]. T limfocitų kilmės neoplazmos diagnozuojamos dažniau vyrams nei moterims, o vidutinis sergančiųjų amžius – 61 metai. T limfocitų kilmės neoplazmos yra gana agresyvios, 5 metų išgyvenamumą pasiekia apie 36-56% pacientų, piklausomai nuo lyties ir rasės [11]. T limfocitų kilmės neoplazmoms priklauso T ląstelių prolimfocitinė leukemija, T ląstelių didelių grūdėtų limfocitų leukemija, suaugusiųjų T ląstelių limfoma, Mycosis fungoides ir Sezary sindromai, angioimunoblastinė T ląstelių limfoma, folikulinė T ląstelių limfoma ir kitos neoplazmos [5].

1.2.1. Angioimunoblastinė T ląstelių limfoma

Angioimunoblastinė T ląstelių limfoma yra gana reta neoplazma (0,05 atvejų iš 100,000), priklausanti periferinių T ląstelių limfomoms [12]. AIBL diagnozuojama dažniausiai pagyvenusiems asmenims ir yra siejama su blogu išgyvenamumu, išgyvenamumo mediana yra mažesnė negu 3 metai, nepriklausomai nuo taikomo gydymo. Šios neoplazmos periferiniame kraujyje cirkuliuojančios vėžinės ląstelės pasižymi gemalinio centro (GC) folikulinių T limfocitų-pagalbininkų imunofenotipu. Limfmazgiuose, kartu su AIBL ląstelių infiltracija randama difuzinio tipo įvairių ląstelių infiltracija, pavyzdžiui: reaktyvių ląstelių, mažų limfocitų, histiocitų, epitelinių ląstelių, imunoblastų, eozinofilų bei plazminių ląstelių. Sergant AIBL vėžinės T ląstelės sudaro tik mažą dalį (apie 10%) ląstelių. Taip pat AIBL yra siejama su Epšteino-Bar (EBV) infekcija (80-90% AIBL biopsijų atvejų randama EBV [13]) nors pačios AIBL vėžinės ląstelės ir nėra infekuotos EBV virusu [14].

Angioimunoblastinės T ląstelių limfomos imunofenotipas yra $CD2^+CD3^+CD4^+CD5^+CD7^+CD8^-CD10^+CXCL13^+$, nors yra pastebėta ir $CD3^-$ ir $CD5^-$ ekspresijos praradimas bei $CD7^-$ ekspresijos buvimas. Kartais membraninio $CD3$ žymens ekspresija neaptinkama, arba ji būna silpnesnė nei sveikų T limfocitų, bet ekspresuojamas citoplazminis $CD3$. Daugelyje AIBL neoplazijų randama gemalinio centro žymenų $CD10$ ir $CD279$ ekspresija. Sergant AIBL aptinkami ir $CD57$, $CD52$ ir $CD45$ žymenys, kurie kartu su $CD27^-$ ekspresija rodo, kad neoplazminės ląstelės yra kilusios iš efektorinių atminties T limfocitų [15]. Kaulų čiulpuose sergant AIBL $CD3$ ir $CD5$ ekspresija yra stipri, tačiau $CD2$ - silpna. Aberantinė $CD10$ ekspresija kaulų čiulpuose stebima 50% AIBL susirgimų [16]. AIBL T vėžinės ląstelės pasižymi folikulinių T limfocitų-pagalbininkų ekspresuojamais žymenimis, pavyzdžiui, $CXCR5$, $CXCL13$, $ICOS$, $CD279$, $Bcl-6$ [14]. Dėl to yra manoma, kad būtent angioimunoblastinę T ląstelių limfomą ir sukelia pakitusios T_{FH} ląstelės.

1.3. Žmogaus folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai

2000 m. pirmą kartą terminas folikulinis T limfocitas-pagalbininkas buvo panaudotas apibūdinant žmogaus CD4⁺T limfocitus, kurie ekspresuoja chemokinių receptorių CXCR5, lokalizuojasi tonzilių antriniuose folikuluose bei yra svarbūs B limfocitų funkcijai [17]. Tuo metu T_{FH} nebuvo laikomi atskira CD4⁺T limfocitų grupe, kitaip negu Th1, Th2, T_{reg} ar Th17 ląstelės. Nebuvo žinomas transkripcijos faktorius, atsakingas už T_{FH} diferenciaciją (Th1, Th2, T_{reg} ir Th17 transkripcijos faktoriai atitinkamai yra T-bet, GATA3, ROR γ t, Foxp3) [18], taip pat buvo nežinoma ar T_{FH} turėjo kitų išskirtinių požymių be CXCR5 ekspresijos.

Šiuo metu žinoma, kad T_{FH} ląstelės ekspresuoja efektorines molekules, kurios yra būtinos folikulinių T limfocitų-pagalbininkų vystymuisi ir funkcionavimui. Šios molekulės yra CXCR5, paviršinis receptorių ICOS, OX40, CD3, CD4, CD40 ligandas (CD40L), CD45, CD57, CD69, CD84, CD95, CD279, BTLA, taip pat citokinai IL-4, IL-10 [19] bei IL-21, su SLAM susietas baltymas SAP, B ląstelių limfomos 6 (Bcl-6) ir c-Maf transkripcijos faktoriai [20]. T_{FH} silpnai ekspresuoja CCR7 (kaip ir kiti T limfocitai-pagalbininkai) ir CD62L [21; 22]. Vienos iš svarbiausių molekulių, apibūdinančių folikulinius T limfocitus-pagalbininkus yra Bcl-6, ICOS, CXCR5, CD279 bei IL-21 [23].

Folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai pasižymi efektorine, pagalbine funkcija B limfocitams. T_{FH} indukuoja B limfocitų aktyvaciją bei diferenciaciją į imunoglobulinus sekretuojančias ląsteles [24], taip pat šios ląstelės dalyvauja gemalinių centrų formavimase [20] (reguliuoja GC dydį, slopina mažo giminingumo ir skatina didelio giminingumo B ląstelių patekimą į GC [25]. Šios ląstelės daugiausia lokalizuoja antriniuose limfiniuose organuose. Priklausomai nuo dominuojančio sekretuojamo citokino, folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai klasifikuojami į 3 grupes: T_{FH1}, T_{FH2} ir T_{FH10}. T_{FH1} sekretuoja IFN- γ ir skatina IgG2a gamybą, T_{FH2} sekretuoja IL-4, kuris skatina IgG1 ir IgE gamybą bei T_{FH10} sekretuodamas IL-10 skatina IgA sekreciją [26]. Yra pastebėta ląstelių populiacija periferiniame kraujyje, panaši į T_{FH}, nes yra priklausoma nuo Bcl-6 transkripcijos faktoriaus, ekspresuoja CXCR5 bei suteikia pagalbą B limfocitams. Cirkuliuojančios CXCR5⁺T ląstelės ekspresuoja mažiau ICOS ir Bcl-6 lyginant su T_{FH}, esančiais tonzilėse [22], kas yra netikėta, nes Bcl-6 yra reikalingas T_{FH} ląstelių diferenciacijai [24].

1.3.1. Folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai ligų patogenezėje

T_{FH} ląstelių diferenciacijos ar funkcijos sutrikimai gali pasireikšti imunodeficitais, autoimuninėmis ligomis ar net vėžiniais susirgimais [20].

T_{FH} ląstelės yra svarbios pirminių imunodeficitų, pavyzdžiui, su X chromosoma susijusios limfoproliferacinė ligos (XLP, angl. *X-linked lymphoproliferative disease*), Hiper-IgM sindromo, įprasto variabilaus imunodeficito dėl ICOS trūkumo, patogenezėje. Su X chromosoma susijusią limfoproliferacinę ligą sukelia *SH2DIA* geno, koduojančio SAP baltymą, mutacija. SAP baltymas yra reikalingas normaliai funkcionuojančių T_{FH} gamybai. Su X chromosoma susijusi limfoproliferacinė liga pasižymi mažu B atminties ląstelių skaičiumi, sutrikusiu gemalinio centro formavimusi, hipogamaglobulinemija. Pastebėta, kad XLP pacientai pasižymi nepakitusiu CD4⁺CD279⁺CXCR5⁺ ląstelių populiacijos skaičiumi, T_{FH} ląstelės ekspresuoja ICOS, CD40L, IL-4, IL-10 bei IL-21, tačiau šių molekulių ekspresijos kinetika yra kitokia nei nesergant XLP. Sergant XLP T_{FH} ląstelės negali palaikyti normalios imunoglobulinų gamybos B ląstelėse. Hiper-IgM sindromą sukelia mutacijos *CD40* ar *CD40L* genuose. Dėl negalimo signalo perdavimo per CD40-CD40L, sutrikdoma B ląstelių diferenciacija ir aktyvacija, Ig izotipų perjungimas, sutrikdomas GC formavimasis. Pastebėtas sumažėjęs kiekis CD4⁺CXCR5⁺T ląstelių, kurių diferenciacijai reikalinga CD40-CD40L sąveika. Sergantiems įprastu variabiliu imunodeficitu dėl ICOS trūkumo pasireiškia sutrikusi antigenams specifinių antikūnų gamyba, hipogamaglobulinemija ir padidėjęs jautrumas bakterinėms infekcijoms. Šis imunodeficitas siejamas su ICOS trūkumu, kuris gali lemti B ląstelių kiekio sumažėjimą, defektyvią B atminties ląstelių gamybą ir sumažėjusius imunoglobulinų kiekius serume. Sergant įprastu variabiliu imunodeficitu dėl ICOS trūkumo stebimas CD4⁺CXCR5⁺T ląstelių sumažėjimas, sutrikusi šių ląstelių CXCR5 žymens ekspresija, todėl manoma, kad ICOS yra reikalingas T_{FH} ląstelių funkcijų palaikymui ir išgyvenamumui [24]. Žmogaus imunodeficito viruso infekcija pasižymi bendru CD4⁺T limfocitų populiacijos sumažėjimu, išskyrus T_{FH} populiacijos, kuri pagausėja. Sergant ŽIV infekcija T_{FH} sekretuoja didesnius kiekius IL-21, tačiau nėra žinoma ar IL-21 ekspresijos padidėjimas atsiranda būtent dėl žmogaus imunodeficito viruso buvimo. Pacientų, užsikrėtusių ŽIV, T_{FH} padidėjimas limfmazgiuose koreliuoja su gemalinio centro B ląstelių ir plazminių ląstelių padidėjimu bei B atminties ląstelių sumažėjimu. Nepaisant to, T_{FH} ląstelės prastai skatina B ląstelių išgyvenamumą ir defektyviai indukuoja IgG gamybą. Šie T_{FH} požymiai siejami su T_{FH} ekspresuojamo CD279 ir jo ligando PD-L1 sąveika, lemianti sumažėjusią IgG gamybą [27].

Svarstoma, kad folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai gali būti naudojami kaip žymuo nustatant įvairias autoimunines ligas, pavyzdžiui Greivso ligą, sisteminę raudonąją vilkligę, reumatoidinį artritą.

Sergant Greivso liga gaminami antikūnai prieš skydliaukėje esančius hormonų receptorių, ko pasekoje yra sukeliama hipertiroiditas. Pacientams, sergantiems Greivso liga, pastebėtas didesnis $CD4^+CD279^+CXCR5^+T$ ląstelių, stipriai sekretuojančių IL-21, kiekis, kuris sumažėja pritaikius gydymą. Sisteminė raudonojo vilkligė yra sisteminė autoimuninė jungiamojo audinio liga. Šią ligą apibūdina antikūnų prieš dvigrandę DNR buvimas, ji yra siejama su autoreaktyviais T ir B limfocitais. Sergant sisteminė raudonąja vilklige taip pat stebimas T_{FH} populiacijos ir IL-21 koncentracijos kraujo serume padidėjimas. Sergant SRV $CD4^+CXCR5^+IL-21^+T$ ląstelės teigiamai koreliuoja su atminties B ląstelėmis ir neigiamai koreliuoja su naiviaisiais B limfocitais, tačiau nekoreliuoja su antikūnų, nukreiptų prieš dvigrandės DNR, kiekiu. Tuo tarpu $CD4^+CD279^+CXCR5^+T$ limfocitų kiekis tiesiogiai koreliuoja su antikūnų, nukreiptų prieš dvigrandės DNR, ir plazminių ląstelių kiekiais.

Reumatoidinis artritas yra lėtinė sisteminė autoimuninė liga pažeidžianti sąnarių (pagrindė kojų ir rankų) sinoviją. Kaip ir kitos autoimuninės ligos, reumatoidinis artritas pasižymi padidėjusia $CD4^+CD279^+CXCR5^+T$ ląstelių populiacija bei IL-21 kiekiais kraujo serume, tačiau po gydymo T_{FH} bei IL-21 kiekiai serume sumažėja. Taip pat padidėję T_{FH} bei IL-21 kiekiai siejami su anti-CCP antikūnų buvimu. Kiti mokslininkai nepitaria šiems duomenims, ir teigia, kad T_{FH} ir IL-21 padidėjimas stebimas tik reumatoidinio artrito ligos pradžioje, o ligos eigoje cirkuliuojančios periferiniame kraujyje T_{FH} ląstelės migruoja į gemalinius centrus, tad jų kiekis kraujyje sumažėja ir nesiskiria nuo kontrolinės grupės.

Su neoplazijomis siejami folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai gali būti suskirstyti į dvi grupes: vėžines ląsteles su T_{FH} fenotipu ir nepiktybines ląsteles su T_{FH} fenotipu. Pagrindinė neoplazija, siejama su folikuliniiais T limfocitais yra angioimunoblastinė T ląstelių limfoma. AIBL vėžinės ląstelės tipiška yra $CD4^+$ fenotipo ir ankstyvoje ligos eigoje randamos limfmazgių folikuliniuose regionuose bei ekspresuoja daug T_{FH} žymenų (CXCL13, CXCR5, CD40L, OX40, SAP, ICOS, c-maf ir Bcl-6), tad manoma, kad AIBL vėžinės ląstelės yra kilusios iš folikulinių T limfocitų-pagalbininkų. Būtina pabrėžti, kad AIBL ląstelės yra heterogeniškos, ir ne visose neoplazijose vėžinės ląstelės ekspresuoja anksčiau minėtus žymenis. AIBL siejama ir su sutrikusia B limfocitų reguliacija- B limfocitų kiekiu padidėjimu, hipergamaglobulinemija ir autoantikūnų atsiradimu, kas rodo, kad vėžinės AIBL ląstelės geba atlikti T_{FH} funkcijas. Kitų T ląstelių neoplazijų ląstelės taip pat ekspresuoja T_{FH} žymenis, kaip Bcl-6, CD279, CXCL13, SAP bei ICOS, ir yra siejamos su B limfocitų disreguliacija [24].

Nepiktybinės ląstelės, ekspresuojančios T_{FH} žymenis, aptinkamos ir B limfomų, kilusių iš gemalinio centro (pavyzdžiui, folikulinės limfomos), neoplazijose. Lėtinėje limfocitinėje leukemijoje pastebima didesnė CD4⁺CXCR5⁺T ląstelių populiacija periferiniame kraujyje. Atlikti tyrimai parodė, kad T_{FH} ląstelių buvimas sergant neoplazijomis (krūties, gaubtinės ir tiesiosios žarnos [25]) didina vėžinių ląstelių išgyvenamumą ir proliferaciją dėl CD40L, IL-4 ir IL-21 ir CXCL13 ekspresijos. Gauti ir priešingi rezultatai, teigiantys, kad T_{FH} dalyvauja priešvėžiniame atsake, o T_{FH} ląstelių infiltracija siejama su didesniu išgyvenamumu [24].

1.4. Ląstelių diferenciacijos žymenis

1.4.1. CD3

Leukocitų diferenciacijos antigenas 3 (CD3), kitaip dar žinomas kaip T3 kompleksas, yra multimerinis baltymų kompleksas, priklausantis imunoglobulinų superšeimai bei kurį sudaro skirtingos polipeptidinės grandinės: epsilon(ε), gamma(γ), delta(δ), zeta(ζ) [28], formuojančios dimerus: γ/ε, δ/ε ir ζζ [29], bei eta (η) polipeptidinė grandinė. CD3ε polipeptidinė grandinė yra 20kDa dydžio ir yra neglikozilinta. Tiek CD3γ, tiek CD3δ polipeptidinės grandinės yra glikozilintos bei yra atitinkamai 25-28kDa ir 20kDa dydžio. CD3ζ polipeptidinė grandinė yra neglikozilinta ir yra 17kDa dydžio bei neturi jokių sekos panašumų su kitomis CD3 polipeptidinėmis grandinėmis. CD3ζ dažniausiai randamas kaip homodimeras, tačiau apie 10% atvejų yra randamas kaip heterodimeras su CD3η. CD3η yra CD3ζ koduojančio geno alternatyvaus splaisingo 23kDa dydžio produktas. Kiekvienas iš CD3 subvienetų turi ekstraląstelinį Ig domeną ir po vieną ITAM molekulę, išskyrus ζ grandinė turi trumpą ekstraląstelinį domeną bei tris ITAM molekules [30]. Be to kiekvienas iš signalinių dimerų turi aspartatinės rūgšties liekanas transmembraninėje dalyje [31].

Leukocitų diferenciacijos antigenas 3 yra specifinis T limfocitų žymuo, nes aptinkamas tik αβ-T ląstelėse [32]. CD3 antigenas gali būti citoplazminis arba membraninis. Citoplazminis CD3 antigenas (cyCD3) yra aptinkamas perinuklearinėje ląstelės zonoje anksstyvose T limfocitų vystymosi stadijoje, o tuo tarpu ląstelių paviršiaus CD3 aptinkamas tik subrendusiuose T limfocituose [33]. Vykstant timocito brendimui, CD3 antigenas citoplazmoje prarandamas ir vėliau aptinkamas subrendusių T limfocitų ląstelių paviršiuje [34].

CD3 antigeninis kompleksas kaip koreceptorius nekovalentiškai yra susijęs su specifiniu T ląstelių receptoriu (TCR, angl. *T cell receptor*) [28]. TCR:CD3 kompleksas stochiometriškai

apibūdinamas 1:1:1:1 ($\alpha\beta$ TCR: CD3 $\epsilon\gamma$:CD3 $\epsilon\delta$:CD3 $\zeta\zeta$ dimerai) [30]. CD3, susijungus kartu su heterodimerinio antigenui specifinio T ląstelių receptoriaus $\alpha\beta$ arba $\gamma\delta$ grandinėmis, yra ekspresuojama T ląstelių. Paprastai receptorių, dalyvaujančių imuniniame atsake, citoplazminėje dalyje yra keleta imunoreceptoriaus tiroziniu pagrįsto aktyvinimo motyvais molekulių (ITAM, angl. *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) (YXXL A-X6-8-YXXL A). Tuo tarpu TCR:CD3 komplekse ITAM molekulių skaičius gali siekti iki 10, todėl manoma, kad toks skaičius yra svarbus T limfocitų diferenciacijai [35].

Per TCR:CD3 transmembraninį [34] kompleksą yra inicijuojami įgyto imuninio atsako signalai [35]. TCR:CD3 kompleksas dalyvauja nuo T limfocitų priklausomame imuniniame atsake atpažįstant antigeną, tolimesniame signalo perdavime iš ląstelės aplinkos į ląstelės vidų dalyvaujant citoplazminių CD3 domenų ITAMs molekulėms, imunokompetentinių ląstelių aktyvavime [32]. CD3 intraląstelinės ITAMs molekulės fosforilinimas bei Nck adaptorinių baltymų (angl. *adaptor protein Nck*) sužadimas lemia T limfocitų aktyvaciją, proliferaciją bei išgyvenamumą [30]. Tad signalo perdavimas per TCR kontroliuoja pagrindinius įvykius T ląstelėse: išsivystymą čiobrialiaukėje iš pro-T ląstelių, naiviųjų T ląstelių išgyvenime pereinant iš čiobrialiaukės žievinės į šerdinę dalį bei šių ląstelių diferenciacijoje iki efektorinių ląstelių [31], o TCR pirmtakas, pre-TCR, yra būtinas timocitų vystymuisi ir selekcijai [29]. Bent minimalus TCR:CD3 komplekso sužadimas yra reikalingas efektyviai T ląstelių aktyvacijai [36].

Esant CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ subvienetų trūkumui yra stebimas T ląstelių proliferacijos sutrikdymas, tačiau esant ζ trūkumui nepastebimi jokie sutrikimai [29]. CD3 transmembraninės dalies dimerų aspartatinės rūgšties liekanų mutacijos sąlygoja receptoriaus ekspresijos praradimą ląstelės paviršiuje [31]. Kadangi CD3 antigeną ekspresuoja tik T limfocitai ir yra skirtinga CD3 ekspresijos vieta įvairaus ląstelių brendimo stadijose, tai leidžia atskirti subrendusius, sveikus nuo nesubrendusių, supiktybėjusių T limfocitų [34]. Paviršinio CD3 antigeno ekspresija yra stipriai sumažėjusi arba net neaptinkama T limfocitų lėtiniuose limfoproliferaciniuose susirgimuose [37] dėl CD3 genų aberacijų arba delecijų, ar pačio antigeno praradimo piktybinėse ląstelėse [34]. CD3 antigenas yra silpnai ekspresuojamas kai kurių makrofagų, Purkinjė ląstelių smegenyse bei Hodžkino ir Reed-Sternberg ląstelėse (HRS, angl. *Hodgkin and Reed-Sternberg cells*), kilusiose iš B ląstelių linijos, ir sergant Hodžkino limfomai [29].

1.4.2. CD4

Leukocitų diferenciacijos antigenas 4 yra dar žinomas kaip CD4, T4, L3T4, Ly1, Leu3 [38] bei OKT4 [39]. CD4 yra 55kDa dydžio [40] I tipo transmembraninis glikoproteinas, priklausantis Ig superšeimai, ir ekspresuojamas kaip viena polipeptidinė grandinė MHC II klasės apribotuose T limfocituose [39]. CD4 antigeną sudaro keturi, 370 aminorūgščių ilgio ekstraląsteliniai imunoglobulinų tipo domenai (D1, D2, D3, D4 [41]), 25 aminorūgščių ilgio hidrofobinis transmembraninis domenai bei 38 aminorūgščių [42], turinčių tris fosforilnamas serino liekanas, ilgio citoplazminis domenai, susijungęs su p56lck kinaze [43; 44]. CD4 turi sąlyginai mažą giminingumą visiems imunoglobulinų tipams [45].

CD4 antigeną pagrinde ekspresuoja timocitai (80-90% visų timocitų), T limfocitai, ypač T limfocitai-pagalbininkai (daugiau kaip 50% visų T limfocitų periferiniame kraujyje [3] bei 60% visų T ląstelių pirmtakų kaulų čiulpuose bei čiobrialiaukėje [42]), o nedideliais ekspresijos kiekiais pasižymi monocitai, makrofagai, dendritinės, Langerhanso bei smegenų mikroglijos ląstelės [39].

CD4 veikdamas kaip koreceptorius, prisijungia prie MHC II klasės nepolimorfinių regionų, ekspresuojamų antigeną pateikiančių ląstelių [32], ir tokiu būdu didina giminingumą [39], sustiprina bei stabilizuoja sąveiką tarp TCR:CD3 komplekso ir ligando, be to dalyvauja signalo sustiprinime ir perdavime [38], T limfocitų-pagalbininkų atpažinime bei aktyvacijoje [46; 40]. CD4 reikalingas timocitų brendime ir efektorinių T ląstelių diferenciacijoje [39].

CD4 antigeno N galo imunoglobulinų tipo domeniui (40-55 aminorūgščių pozicijoje) sąveikaujant su MHC II klasės nepolimorfiškais $\alpha 2$ ir $\beta 2$ domenais pakinta ekstraląstelinų imunoglobulinų tipo domenų D1-D4 konformacija [47], kinazės disocijuoja nuo citoplazminio CD4 antigeno domeno ir yra perduodamas signalas [39].

Normaliai CD4 antigeno ekspresija žmogaus T limfocituose-pagalbininkuose yra pastovi [41], tad monokloniniai antikūnai prieš žmogaus CD4 antigeną naudojami kaip žymenys atskirti T limfocitų-pagalbininkų populiaciją nuo kitų T limfocitų [46].

1.4.3. CD7

CD7 (dar žinomas kaip Leu 9, 3A1, gp40, Tp41, p41 ir T ląstelių leukemijos antigenas) yra 40kDa dydžio [48] homodimerinis transmembraninis glikoproteinas [39] koduojamas *CD7* geno 17 chromosomoje (17q25.2q25.3) bei priklausantis imunoglobulinų G superšeimos grupei. CD7

antigenas yra svarbus T ląstelių ir T-B limfocitų sąveikai ankstyvoje limfopoezėje [49]. CD7 yra viena pirmųjų membranoje ekspresuojančių, su T ląstelėmis susijusių, molekulių kamieninėse ląstelėse [50], timocituose (CD7⁻ ekspresija pastebima tik 1% - 2% priimtakuose [51]), ir kuri aptinkama iki pat subrendusio T limfocito. CD7 daugiausiai ekspresuoja timocitai, T limfocitai periferiniame kraujyje [52] bei natūralieji kileriai, o maža ekspresija pasižymi pluripotentinės kamieninės ląstelės, galinčios diferencijuotis į T limfocitus, taip pat eritroidinių, mieloidinių ir megakariocitų ląstelių pirmtakai [3].

CD7 tiksli funkcija nėra pilnai žinoma. CD7 antigenas yra svarbus T limfocitų proliferacijai, aktyvacijai bei funkcijai. Priklausomai nuo eksperimentinių sąlygų, CD7 sukeliamas signalas T ląstelių proliferacijoje gali būti kostimuliacinis arba slopinantis [53]. CD7 dalyvauja signalo perdavime bei gali veikti kaip adhezinė molekulė T ląstelių aktyvacijoje [52], nors prieštaringi tyrimai su pelėmis parodė, kad CD7⁻ ekspresija pasižymiančiose pelėse yra 60% daugiau timocitų negu laukinio tipo pelėse [54]. CD7 antigenas T limfocitų aktyvacijos pradžioje perduoda signalą per CD3:TCR kompleksą, didina intraląstelinio Ca²⁺ kiekį, bei skatina IL-2 autokrinią kelią [55].

Nenormali CD7 antigeno ekspresija pastebima daugelyje ligų, tad sumažėjusi CD7 ekspresija *in vivo* yra svarbi patloginėje fiziologijoje [55]. Manoma, kad CD7 sukelia T_β geno persitvarkymus ir TCR ekspresijos pokyčius bei yra svarbus veiksnys T ląstelių neoplazijose, nes pastebėta CD7 antigeno ekspresija, T_β geno pakitimai (retais atvejais ir sergant B ląstelių neoplazija) bei paviršinio CD3 ekspresija T limfocituose sergant T ląstelių neoplazijomis [56].

Dažnai leukeminiai T limfocitai pasižymi tokiu pat fenotipu kaip ir normalūs T limfocitai. Tėkmės citometrijos pagalba įmanoma atskirti šias dvi ląstelių populiacijas pagal ekspresuojamų antigenų kiekį, pavyzdžiui, padidėjęs CD7 kiekis randamas piktybiniuose T limfocituose sergant ūmine T limfoblastine leukemija bei T prolimfocitine leukemija lyginant su nepiktybiniais kraujyje esančiais T limfocitais [57], nes normaliai CD7 antigeno ekspresija yra pastovi žmogaus T ląstelių brendimo laikotarpiu [58] bei mažesnė negu daugumoje neoplazijų. Pastebėta, kad nesubrendę T limfocitai (CD3⁻) limfocitai ekspresuoja stipriau CD7 lyginant su labiau subrendusiais T limfocitais (CD3⁺) sergant ūmine T limfoblastine leukemija (A-TLL, angl. *T- acute lymphoblastic leukemia*) ([57]. Padidėjusi CD7 ekspresija ant CD4⁺ T limfocitų aptinkama ne tik sergant T limfoblastinėmis ir T prolimfocitinėmis leukemijomis, bet stebima ir sergant klasikine Hodžkino limfoma [59], lėtine mieloidine [53] bei kitoms leukemijomis ir yra siejama su blogu išgyvenamumu [49].

CD7 antigeno ekspresijos trūkumas siejamas ne tik su sunkiais, kombinuotais imunodeficitais [52], bet ir su įvairiomis kraujo neoplazijomis, o CD7 yra puikus žymuo tiriant T ląstelių kilmės limfoproliferacinius sutrikimus, nes šis antigenas nėra aptinkamas B ląstelių neoplazmų primtakuose

[56]. Yra pastebėta, kad CD7⁻ ekspresijos subpopuliacija būdinga ir normaliems, sveikiems T limfocitams [48]. CD7 antigeno ekspresija yra labai silpna arba net jos nėra sergant Mycosis fungoides, Sezary sindromu ir suaugusiųjų T ląstelių leukemija [3]. CD7⁻ ekspresija pasižymiančių piktybinių ląstelių populiacija dominuoja progresuojant Sezary sindromui.

CD7 antigeno ligandas galektinas-1 sukelia signalų kaskadą lemiančią CD7⁺ T ląstelių apoptozę [60]. Galektinas-1 sukelia T limfocitų apoptozę audiniuose (pavyzdžiui, čiobrialiaukėje), kur T ląstelės žūsta vykstant proliferacijai arba limfiniuose organuose vykstant imuniniam atsakui [61]. Manoma, kad dėl Sezary sindromo piktybinių ląstelių CD7⁻ fenotipo, ląstelės yra atsparios galektino-1 sukeltai apoptozei [60].

Kitas CD7 ligandas- galektinas-3 (galektino-1 homologas) turi įtakos tiek ląstelių apoptozei, tiek ląstelių proliferacijai. Suaugusiųjų T limfomos ląstelės išvengia galektino-3 sukeltos apoptozės sumažindamos CD7 ekspresiją, be to galektinas-3 skatina proliferaciją, kas lemia agresyvesnę ligos eigą [62].

1.4.4. CD10

CD10 (ūminės limfoblastinės leukemijos antigenas, Zn turinti metalopeptidazė, CALLA (angl. *common acute lymphoblastic leukemia antigen*), enkefalinazė) molekulę koduoja *MME* genas 3 chromosomoje (3q21-q27) bei ekspresuoja pre-B ląstelės, gemalinio centro B ląstelės, embriono timocitai, neutrofilai, granulocitai, kaulų čiulpų stromos ląstelės bei kai kurios epitelinės ląstelės (tiek normoje, tiek neoplazijose). CD10 yra 90-100kDa dydžio [63; 64] glikoproteinas, II tipo membraninė nuo cinko priklausoma [65] metaloproteinazė, turinti neutralų peptidazinį aktyvumą [39; 3]. Dėl alternatyvaus splaisingo aptinkami trys skirtingi CD10 tipai: 135bp, 115 bp ir 203bp. Manoma, kad šie tipai atsiranda dėl skirtingos, audiniui specifinės, *CD10* geno ekspresijos. CD10 peptidazės substratai gali būti cirkuliuojantys aplinkoje, sekretuojami arba transmembraniniai peptidai [66].

Šios metalopeptidazės ekstraląstelinis domenai skaldo hidrofobinių liekanų amino grupės signalinius peptidus, reguliuojančius augimą bei diferenciaciją [67] (bombezina, endotelina-1 ir kt. [68]) ir taip juos inaktyvina [69]. CD10 dalyvauja reguliuojant T ir B limfocitų brendimą bei neutrofilų aktyvumą [39]. Limfoidinių ląstelių diferenciaciją iš multipotentinių hematopoetinių kaulų čiulpų ląstelių manoma lemia CD10 antigeno ekspresija, nes CD10⁺ primatei stokoja potencialo diferencijuotis į mieloidinės ar eritroidinės kilmės ląsteles, bet geba diferencijuotis į limfoidinės

kilmės ląsteles, ypač B limfocitus [70]. Normaliai nesubrendę, ankstyvieji B limfocitai stipriai ekspresuoja CD10 [39].

Neoplazmų tyrimuose CD10 pirmą kartą aptiktas 1975 metais tiriant ūminės limfoblastinės leukemijos antigenus [67]. CD10 yra nesubrendusių T ir B ląstelių bei gemalinio centro B ląstelių žymuo, todėl CD10 yra naudingas klasifikuojant ūmines leukemijas ir piktybines limfomas [64]. CD10 neaptinkamas cirkuliuojančiuose subrendusiuose T limfocituose, tačiau CD10 ekspresija pastebima CD5⁺ T ląstelėse sergant reaktyvia limfoidine hiperplazija (RLH, angl. *reactive lymphoid hyperplasia*), marginalinių zonų limfoma bei piktybiniuose T_{FH} sergant angioimunoblastine T ląstelių limfoma [71]. CD10 ekspresija bei T_{FH} ekspresuojamos ICOS bei CD279 molekulės imunologiškai apibūdina angioimunoblastinę T ląstelių limfomą. L. Baseggio *et al.* duomenimis AIBL neoplazijoje CD10 molekulę ekspresuoja 80-90% piktybinių T ląstelių limfmazgiuose bei periferiniame kraujyje [72; 73]. Kadangi CD10 ekspresija CD4⁺ T ląstelėse gali būti per silpna, angioimunoblastinės T ląstelių limfomos patvirtinimui, be CD10 žymens yra naudojami ir kiti žymenys, pavyzdžiui, ICOS, CD279 ir rutininėje klinikoje nenaudojami CXCL13 bei Bcl-6 [72].

CD10 taip pat ekspresuoja folikulinės limfomos, Burkitt limfomos, ūminės T limfoblastinės leukemijos bei ūminės mielogeninės leukemijos ląstelės, be to pre-B ląstelės sergant ūmine limfoblastine leukemija, tačiau ši metalopeptidazė yra ekspresuojama ir normalių pre-B ląstelių kaulų čiulpuose [3]. Kitavertus, lėtinės B limfocitinės leukemijos ląstelės nepasižymi CD10 ekspresija [39], o sergant T ląstelių limfoma CD10 yra retai ekspresuojamas.

CD10⁺ ekspresija sergant ūmine B ląstelių limfoblastine leukemija siejamas su geresne ligos prognoze vaikams lyginant su CD10⁻ ekspresija. CD10 sąveikaudamas su receptore proteino tirozino kinaze perduoda signalą. Priklausomai nuo signalą sukeliančio ligando, CD10 apsaugo nuo vėžinių ląstelių migracijos, invazijos bei slopina angiogenezę. [66]. Priešingi rezultatai gauti skirtinguose tyrimuose parodė koreliaciją tarp CD10 ekspresijos ir tarp tolimųjų metastazių, ligos recidyvavimo bei atsparumo gydymui sergant neoplazijomis [65]. Tikslī CD10 funkcija T ir B ląstelių limfomų onkogenezeje nėra žinoma [68], taip pat manoma, kad skirtingi tyrimų rezultatai gauti tiriant CD10 ekspresiją yra dėl to, kad vėžinius susirgimus lemia ne CD10 molekulės kiekiai ląstelėje, o CD10 metalopeptidazės fermentinio aktyvumo praradimas [66].

1.4.5. CD45

CD45 yra 180-220kDa dydžio [74] I tipo transmembraninis glikoproteinas, koduojamas *PTPRC* geno [75] 1 chromosomoje, ir priklausantis receptorinių proteino tirozino fosfotazių (RPTP, angl. *receptor-like protein tyrosine phosphatase*) šeimai [76] bei užimantis iki 10% viso ląstelės paviršiaus [77]. CD45 yra dar žinomas kaip LCA, LY5, B220, T200 bei GP180.

Citoplazminė CD45 dalis, kaip ir kitos RPTP, turi du homologinius proteino tirozino fosfotazės domenus: aktyvų domeną 1 (D1) bei sutrikusiu kataliziniu aktyvumu domeną 2 (D2), kurio tiksli funkcija nėra žinoma. Svarstoma, kad D2 domenas turi įtakos D1 domeno aktyvumui ar prisijungia svarbius substratus, kuriuos defosforilina D1 domenas, taip pat kad D2 yra kaip pagalbinis katalizinis domenas, veikiantis esant tik specifinei ląstelės būklei ar esant specifiniams substratams. T ląstelių receptoriaus dvigubai fosforilinta CD3ζ polipeptidinė grandinė jungiasi tik prie D1 domeno [78]. CD45 ekstraląstelinio, receptorinio domeno ilgis yra įvairus skirtingose CD45 izoformose dėl alternatyvaus 4 egzonų (4, 5, 6 ir 7) splaisingo [77]. Skirtingos CD45 izoformos aptinkamos specifinėse ląstelių populiacijose: mažiausia izoforma CD45RO aptinkama efektorinėse-atminties T ląstelėse, didžiausia izoforma CD45RABC aptinkama B ląstelėse [79]. Naivieji T limfocitai daugiausiai ekspresuoja CD45RB izoformą, aktyvuoti T limfocitai- CD45RO, B limfocitai- CD45RABC, o mieloidinės ląstelės- CD45RO, tačiau po aktyvacijos ekspresuoja daugiausiai CD45RA⁺ [77].

CD45 stipriai ekspresuojamas visose hematopoetinėse, turinčiose branduolį, ląstelėse [75]. Šio glikoproteino ekspresija didėja bręstant ląstelėms (pavyzdžiui, dvigubai teigiami timocitai pasižymi stipresne CD45 ekspresija nei dvigubai neigiami timocitai) [77]. CD45 yra būtinas ląstelių diferenciacijai, nuo antigenų priklausomoje T ir B limfocitų aktyvacijoje [78], svarbus perduodant signalą, gautą per TCR ar BCR [80]. CD45 kontroliuoja imuninį atsaką tiek neigiamai, tiek teigiamai, defosforilindamas įvairias signalines molekules, pavyzdžiui, Src šeimos kinazes (Lck ir Fyn), T ląstelių receptoriaus CD3ζ polipeptidinę grandinę bei ZAP-70 kinazę [78].

CD45 trūkumas labiausiai paveikia T limfocitus. Timocitų diferenciacija vykstant teigiamai selekcijai yra blokuojama. Tuo tarpu B ląstelės, stokojančios CD45, bręsta normaliai kaulų čiulpuose, tačiau blužnyje B ląstelių brendimas yra dalinai blokuojamas. Įvairūs tyrimai parodė, kad stokojant CD45 molekulės, gali būti įgyjamas sunkus kombinuotas imunodeficitas (SCID, angl. *severe combined immunodeficiency*) [75], taip pat I tipo diabetas, reumatoidinis artritas, sisteminė raudonoji vilkligė bei Greivso liga [81].

CD45 yra laikomas priešvėžiniu veiksmu sergant ūmia T ląstelių limfoblastine leukemija. Sergant ūmine T ląstelių limfoblastine leukemija labai maža arba neaptinkama CD45 ekspresija aptinkama 3,7% pacientų, o sergant ūmine B ląstelių limfoblastine leukemija CD45 sumažėjusi ekspresija aptinkama 12,9% pacientų. CD45 trūkumas lemia padidėjusį JAK/STAT jautrumą aktyvacijai, sukeltai citokinų ar onkogeninių baltymų, kas gali lemti vėžinių ląstelių proliferaciją [82].

1.4.6. CD279

CD279 (PD-1) yra 288 aminorūgščių I tipo transmembraninis baltymas priklausantis CD28 kostimuliacinių receptorių superšeimai [83]. CD279 koduojamas *PDCDI* geno 2 chromosomoje [84]. CD279 membraninę dalį sudaro imunoglobulino superšeimos domenai, o citoplazminę dalį sudaro imunoreceptoriaus tiroziniu pagrįsto slopinimo motyvo molekulė (ITIM, angl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) bei imunoreceptoriaus tiroziniu pagrįsto perjungimo motyvo molekulė (ITSM, angl. *immunoreceptor tyrosine-based switch motif*), kuri slopina TCR perduodamą signalą. CD279 yra inhibuojantis T ląstelių koreceptorius, turintis tris savo ligandus: PD-L1 (dar žinomas kaip B7-H1 ar CD274), PD-L2 (vadinamu dar B7-DC arba CD273) [85] bei B7-1 (CD80) [86]. CD279 ekspresuojamas T ir B ląstelių (ypač stipriai ekspresuoja T_{FH}) kaulų čiupuose bei periferiniame kraujyje [87], natūraliųjų kilerių, aktyvuotų monocitų ir dendritinių ląstelių. CD279 ligandą PD-L1 ekspresuoja hematopoetinės, endotelinės, epitelinės ląstelės bei vėžinės ląstelės, o PD-L2- antigeną pateikiančios ląstelės (makrofagai ir dendritinės ląstelės) [88].

CD279 pagrindinė funkcija yra slopinti imuninį atsaką, o CD279 bei PD-L1 sąveika palaiko periferinę ląstelių toleranciją [89; 90]. CD279 inhibuoja T limfocitus, apsaugant nuo perteklinės CD4⁺T limfocitų proliferacijos, antigenams veikiant ląsteles ilgą laiką tarpą sergant virusinėmis infekcijomis ar neoplazijomis [91]. Periferiniame kraujyje CD279 riboja T limfocitų aktyvaciją uždegiminės infekcijos patogenezėje, taip pat CD279 susijungęs su savo ligandais, slopina T ląstelių proliferaciją [92], citokinų gamybą bei riboja autoimunitetą [88]. CD279 ekspresuojamas gemalinio centro T ląstelėse esant reaktyviam limfoidiniam audiniui [83]. CD279 sukulto slopinančio signalo stiprumas priklauso nuo TCR signalo stiprumo (esant silpnai T ląstelių receptoriaus stimuliacijai, yra stipresnis CD279 inhibicinis poveikis). CD279 turi didesnę poveikį citokinų gamybai (ypač IFN- γ , TNF- α bei IL-2,) o ne ląstelių proliferacijai [84].

CD279- molekulė, atsakinga už navikų sukeltus imunosupresinius mechanizmus. B limfocitų kilmės neoplazmose CD279 ligandas PD-L1 yra retai ekspresuojamas, tačiau PD-L2 ligandas yra stipriai ekspresuojamas sergant mantijos ląstelių limfoma, o CD279- sergant B ląstelių lėtine limfocitine leukemija [83] (nuo 69% iki 100% visų BLLL susirgimų [87]). CD279 ekspresija padidėja naviką infiltruojančiuose T limfocituose, taip pat ši molekulė beveik visada (apie 85%) yra ekspresuojama sergant T ląstelių angioimunoblastine limfoma [84; 87], dažnai ekspresuojama KTLLL grupėje, tačiau niekad nėra ekspresuojama sergant ne Hodžkino limfoma [92]. Kraujo vėžinės ląstelės yra ypač jautrios TCR signalams, tad CD279 blokavimas padidina TNF- α ir IFN- γ ekspresiją [84].

Padidėjusi CD279 ekspresija neoplazijose yra siejama su trumpesniu išgyvenamumu. Rusak et al. duomenimis, pacientai, sergantys BLLL ir kurių daugiau nei 15,79% CD4⁺T ląstelių ekspresuoja CD279, yra didelės trumpo išgyvenamumo rizikos grupėje, be to CD4⁺CD279⁺T ląstelių padidėję kiekiai siejami su hemoglobino bei baltųjų kraujo ląstelių padidėjusiu kiekiu ir limfocitoze [83].

1.4.7. CXCR5

CXCR5 (Berkito limfomos receptorius 1, monocitų kilmės receptorius 15, CD185) yra koduojamas *BLR1* geno 11 chromosomoje. Tai yra 42kDa dydžio heterotrimerinis, su G baltymu susijęs receptorius, turintis septynis transmembraninius regionus [93], ekstraląstelinį ir citoplazminį domeną.

Chemokinių receptorių CXCR5 ekspresuoja cirkuliuojantys bei gemalinio centro subrendę B limfocitai, folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai, migruojančios dendritinės ląstelės [94] bei CD4⁺ ir CD8⁺T limfocitai (išskyrus naivuosius CD4⁺T limfocitus, Th1 bei Th2 ląsteles [96]): maža dalis (20-25%) centrinių atminties CD4⁺T ląstelių (TCM, anlg. *central memory CD4⁺T cells*) [95] bei CD8⁺ atminties T ląstelių (<2%) [96]. CXCR5 neekspresuoja limfoidinių ląstelių primtakai kaulų čiulpuose [97].

CXCR5 yra atsakingas už periferiniame kraujyje cirkuliuojančių B limfocitų migraciją į B ląstelių zoną antriniuose limfiniuose organuose [94; 98], o esant CXCR5 ar jo ligando CXCL13 trūkumai, B limfocitų migracija sutrinka [99], ko pasekoje netinkamai susiformuoja pirminiai folikulai ir gemaliniai centrai blužnyje bei Pejerio plokštelės [98]. Atlikti tyrimai parodė, kad T ląstelių migracijai reikia CXCR5, tačiau šio receptoriaus ekspresija T ląstelėse nenulemia

CXCR5⁺CD4⁺T ląstelių lokalizacijos folikuluose [99]. Todėl manoma, kad ląstelių migracijai į folikulus reikalingas papildomos sąlygos- nuslopinti T ląstelių CCR7 chemokiną [24]. Ankstyva CXCR5 ekspresija T ląstelėse siejama su APC ir T limfocitų sąveika, nes OX40L ir OX40 signalinis kelias skatina didesnę CXCR5 ekspresiją [100].

Padidėjusi CXCR5 ekspresija stebima bręstant B ląstelėms bei yra svarbi palaikant ląstelių ilgaamžiškumą [98]. Padidėjusi CXCR5 receptoriaus ekspresija pastebima CD4⁺T ląstelės aktyvacijos pradžioje, o CXCR5 ekspresijos sužadinimas lemia ankstesnę T ląstelės proliferaciją ir diferenciaciją. Po aktyvacijos T limfocitai ekspresuoja silpniau CXCR5 [101]. Kiti mokslininkai teigia, kad T ląstelės po aktyvacijos, negrįžtamai praranda CXCR5 ekspresiją [96]. T ląstelėse su padidėjusia CXCR5 ekspresija yra pastebėta didesnė IL-4 bei CD279 ekspresija, tačiau daug mažesnė CCR7 ekspresija [102].

B lėtinės limfocitinės leukemijos ląstelės ekspresuoja didelius kiekius CXCR5, taip pat stipriau ekspresuoja šį receptorių nei folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai ar vėžinės B ląstelės įvairių B limfocitų kilmės neoplazijose. CXCR5 receptorių sergant BLLL manoma prailgina vėžinių ląstelių išgyvenamumą [98]. CXCR5 gali turėti įtakos piktybinių B ląstelių migracijai į limfoidinius audinius. Šio receptoriaus ekspresija nėra aptinkama sergant plaukuotų ląstelių leukemija, ūmine B ląstelių kilmės limfoblastine leukemija ir mielomine liga. [97].

1.4.8. ŽLA-DR

ŽLA-DR yra pagrindinio audinių suderinamumo komplekso (MHC, angl. *major histocompatibility complex*) II klasės izotipas [103] koduojamas 6 chromosomos DR lokuse [104]. Yra žinoma daugiau nei 500 ŽLA-DR alelių [105], tad šios molekulės yra itin polimorfiškos. Šią heterodimerinę molekulę sudaro dvi nekovalentiškai susijungusios grandinės: α (α_1 ir α_2 subvienetai; 24-32kDa) bei β (β_1 ir β_2 subvienetai; 29-31kDa) [106], sudarančios N-galinį, ekstraląstelinį ir imunoglobuliną panašų, hidrofobinį transmembraninį ir citoplazminį domenų [39]. Normaliai ŽLA-DR ekspresuoja hemapoetinių ląstelių priimtakai, T ir B limfocitai, įskaitant ir aktyvuotus CD4⁺T limfocitus, taip pat makrofagai ir kitos antigeną pateikiančios ląstelės [107- 109].

ŽLA-DR prisijungia tiek šeimininko, tiek patogenų ekstraląstelinį antigeninių peptidų 10-30 aminorūgščių ilgio liekanas [110; 105] ląstelės citoplazmoje. Vėliau ŽLA-DR ir antigeno liekanų kompleksas atsiduria ląstelės paviršiuje ir ŽLA-DR pateikia CD4⁺T limfocitams antigeną per TCR.

Šiame procese yra atpažįstamos savos nuo svetimų molekulės, aktyvinami naivieji T imfocitai ir sukiamas ląstelinis ar humoralinis imuninis atsakas kai yra patogeninis antigenas [108].

ŽLA-DR ekspresuoja ūminės mieloidinės leukemijos blastai (80% atvejų) kaulų čiulpuose, išskyrus ūminės promielocitinės leukemijos ląstelės, kurios neekspresuoja šio antigeno [111]. ŽLA-DR ekspresija yra stipriai sumažėjusi sergant lėtine limfocitine leukemija, ypač kai yra pažengusi liga (III ir IV stadijose pagal Rai klasifikaciją) [112]. Sergant difuzine didelių B ląstelių limfoma ŽLA-DR ekspresija yra visiškai prarandama, taip pat pastebėta, kad šioje neoplazmoje sumažėja T limfocitų-pagalbininkų santykinis kiekis T limfocitų populiacijoje, tačiau CD4⁺ ir CD8⁺ T limfocitų kiekiai padidėja naviko mikroaplinkoje. ŽLA-DR praradimas sergant difuzine didelių B ląstelių neoplazma siejamas su ligos stadija ir blogesne prognoze. Manoma, kad ŽLA-DR ekspresijos praradimas padeda vėžinėms ląstelėms apsisaugoti nuo imuninio atsako [113]. Sergant kitomis neoplazmomis ŽLA-DR ekspresijos praradimas yra retas (pavyzdžiui, ŽLA-DR yra stipriau ekspresuojamas sergant BLLL neoplazma kaulų čiulpuose [114]) ir yra siejamas su agresyvesne ligos eiga, nors ŽLA-DR⁻ vėžinės ląstelės pasižymi ribotu proliferaciniu pajėgumu, o ŽLA-DR⁺ su neribotu proliferaciniu pajėgumu [111].

2. TYRIMŲ METODAI IR APIMTIS

Tyrimai atlikti Vilniaus Universiteto Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro hematologijos ir bendrosios citologijos laboratorijoje 2016-2018 metais pacientams gydytiems Hematologijos Onkologijos ir Transfuziologijos centre. Tyrimo metodas - tėkmės citometrija. Šis metodas pasirinktas siekiant nustatyti folikulinių T limfocitų-pagalbininkų ir kitų T limfocitų-pagalbininkų ekspresuojamų CD3, CD4, CD10, CD45, CD279, CXCR5 bei ŽLA-DR žymenų kiekius, nustatyti fenotipo bei aberacijų, reakcinių pokyčių, B ląstelių lėtinių limfocitų, kitų B limfocitų kilmės lėtinių limfoproliferacinių ligų bei kitų T limfocitų kilmės lėtinių limfoproliferacinių ligų grupes. Tyrimui pasirinktos folikulinių T limfocitų-pagalbininkų ir kitų T limfocitų-pagalbininkų populiacijos siekiant identifikuoti žymenų ekspresijos skirtumus anksčiau minėtose grupėse. Tiriamoji medžiaga - periferinio kraujo bei kaulų čiulpų mėginiai. Iš viso ištirta 250 mėginių, iš kurių 133 yra kaulų čiulpų ir 117 periferinio kraujo.

2.1. Tėkmės citometrija

Tėkmės citometrija- tai greitas, jautrus ir pažangus metodas, apibūdinantis ne tik ląsteles, bet ir kitas daleles suspensijoje (mikroorganizmus, latekso daleles, tiek kiekybiškai, tiek kokybiškai [115]). Šiuo metodu galima ištirti viso kraujo, kaulų čiulpų, serozinių ertmių skysčių, smegenų skysčio, šlapimo ar net standžių audinių mėginius [116]. Tad tėkmės citometrija gali būti taikoma imunologijos, hematologijos, onkologijos ir kitose klinikinės medicinos srityse.

Tyrimo metu naudojant monochrominės šviesos šaltinį bei antikūnus, sujungtus su fluorescuojančiais junginiais, vadinamais fluorochromais, heterogeniniame mėginyje yra identifikuojamas tiriamų ląstelių dydis, viduląstelinis sudėtingumas, ląstelės paviršiaus ar intraląsteliniai antigenai bei nukleorūgštys. Dėl didelio ląstelę charakterizuojančių parametrų spektro galima išskirti atskiras ląstelių populiacijas [117].

Tėkmės citometrą sudaro trys pagrindinės dalys:

1. Skysčių sistema su tėkmės kamera, kurioje vykdomas hidrodinaminis fokusavimas;
2. Šviesos šaltinis su optine sistema, kurios metu surenkama informacija apie išsklaidytą šviesą;
3. Kompiuterinė/ Elektroninė sistema, paverčianti optinį signalą skaitmeniniu.

Ląstelių suspensija įleidžiama į greičiau tekantį nešantį izotoninį skystį (dažniausiai tai yra buferinis fosfatinis druskos tirpalas) ir yra vykdomas hidrodinaminis fokusavimas, kurio metu ląstelės, pažymėtos antikūnų-fluorochromų kompleksais, išsidėsto nešančiojo skysčio viduryje ir yra nukreipiamos į siaurėjančią angą. Slėgio, tankio ir skysčių tekėjimo greičio skirtumai tarp ląstelių suspensijos ir nešančiojo skysčio neleidžia šiems komponentams susimaišyti. Nešantysis skystis apsaugo nuo ląstelių adhezijos bei sukuria laminarų tekėjimą, apsaugantį nuo skysčio turbulencijos [118]. Tokiu būdu pavienės ląstelės išrikiuojamos vorele, viena paskui kitą ir matavimo kameroje kerta šviesos šaltinio (lazerio, UV lempos) spindulį.

Tėkmės citometro optinę sistemą sudaro šviesos sužadavimo ir surinkimo dalys. Šviesos sužadavimo dalį sudaro lazeris su fokusuojančiu lęšiu. Šviesos surinkimo dalį sudaro fluorescencijos rinkimo lęšis, dichroiniai veidrodžiai ir filtrai, surenkantys ir nukreipiantys išsklaidytą šviesą į detektorius. Ląstelėms tekant per šviesos šaltinio spindulį, pastarosios išsklaido šviesos spindulį ar išspinduliuoja šviesą per sužadintą fluorochromą. Keli fluorochromai, turintys panašų sužadavimo, tačiau skirtingą šviesos emisijos bangos ilgį gali būti naudojami išmatuoti kelias ląstelių savybes vienu metu [116]. Fluorochromas absorbuodamas šviesą, įgauna energiją ko pasekoje yra sužadunami fluorochromo elektronai. Sužadintam elektronui grįžtant į pradinę būseną, perteklinė energija išskiriama kaip fotonai, kurie nulemia fluorescencijos atsiradimą.

Priklausomai nuo dalelės dydžio, paviršiaus ir vidinės struktūros sudėtingumo, šviesa yra išsklaidoma į skirtingas puses. Išsklaidyta šviesa ir jos stiprumas yra registruojamas priekinės šviesos sklaidos (PŠS), apibūdinančios ląstelės dydį, 90° šoninės šviesos sklaidos (ŠŠS), apibūdinančios ląstelės struktūros sudėtingumą, ir šoninės fluorescencinės šviesos sklaidos (ŠFŠS), apibūdinančios ląstelės biochemines savybes, detektoriais.

Jei detektorių užfiksuoti šviesos impulsai yra silpni, tai jie sustiprinimi fotodaugintuvais. Sustiprinti signalai yra paverčiami elektriniais signalais, kurie toliau yra paverčiami skaitmeniniu pavidalu ir apipavidalinami kaip taškinės tankio diagramos, daugiasluoksnės dažnio histogramos, kontūrinės ar trimatės diagramos.

2.2. Naudotos priemonės ir reagentai

Naudoti prietaisai:

1. Tėkmės citometras „BD FACSCanto™“ (BD Biosciences, JAV) su programine įranga (versija 6.1.2, BD Biosciences, JAV)

2. Purtyklė „Vortex V-1“ (Vortex Biosciences, JAV)
3. Centrifuga „Sigma 3-16“ (Sigma-Aldrich, JAV)

Naudotos priemonės:

1. BD Falcon Cell Stainers 40µm Nylon komerciniai filtrai (BD Biosciences, JAV).
2. Monokloninių antikūnų ir fluorochromų konjugatai (1 lentelė) (BD Biosciences, JAV).
3. BD CellWASH™ plovimo buferis (BD Biosciences, JAV).
4. BD IntraSure™ Reagentas A (1.0% formaldehidus (CAS numeris 50-00-0) ir 0,35% metanolis (CAS numeris 67-56-1; BD Biosciences, JAV).
5. BD FACS™ 10x lizuojantis tirpalas (BD Biosciences, JAV)
6. Tėkmės citometriniai mėgintuvėliai Falcon (Corning, JAV)
7. Monokloniniai antikūnai bei fluorochromai (pateikti 1 lentelėje; BD Biosciences, JAV)

1. lentelė. Naudoti fluorochromų ir monokloninių antikūnai leukocitų žymenų nustatyme.

Monokloniniai antikūnai	Klonas	Konjuguotas fluorochromas
CD3	SK7	V500
CD4	SK3	APC-Cy7
CD7	M-T701	APC
CD10	HI10a	PE-Cy7
CD45	2D1	V450
CD279	MIH4	PE
CXCR5	RF8B2	PerCP
ŽLA-DR	G46-6	FITC

2.3. Mėginių paruošimas

1. Sumaišytas ėminys filtruojamas naudojant BD Falcon Cell Stainers 40µm Nylon komercinius filtrus.
2. Nufiltruotos 50µl ląstelių suspensijos sumaišoma su plovimo buferiu iki bendro tūrio 15ml. Centrifuguojama kambario temperatūroje 1530rpm 10min. Po centrifugavimo nupilamas supernatantas.
3. Pridedama 1-10µl (priklausomai nuo naudojamų žymenų) fluorochromų-antikūnų konjugato.
4. Pridedama 50-100µl (priklausomai nuo mėginio citozės) reagento A, kurį sudaro 1.0% formaldehidus ir 0,35% metanolis.

5. Švelniai sumaišius, mėginys inkubuojamas tamsoje, kambario temperatūroje 20min.
6. Po inkubacijos pridedama 1ml 1x lizuojančio tirpalo, mėginys sumaišomas ir inkubuojamas tamsoje, kambarioje temperatūroje 10 min.
7. Po inkubacijos mėginys centrifuguojamas kambario temperatūroje 1530rpm 5min.
8. Nupilamas supernatantas ir ant nuosėdų užpilama 2 ml plovimo buferio. Vykdomas centrifugavimas kambario temperatūroje 1530rpm 5min.
9. Nupilamas supernatantas, nuosėdos užpilamos 500μl plovimo buferiu ir sumaišomas mėginys purtyklėje.

2.4. Ląstelių žymenų tyrimai tėkmės citometrijos metodu

Tyrimo metu naudotas FACSCanto analizatorius leidžia išmatuoti aštuonis ląstelių parametrus: ląstelės dydį naudojant PŠS, ląstelės vidines struktūros savybes naudojant ŠŠS, bei ląstelės žymenų ekspresiją naudojant 8 fluorescencijas.

Mūsų tyrime naudojamo tėkmės citometro optinę sistemą sudaro sužadavimo šaltinis su 3 lazeriais: violetiniu (sužadavimo bangos ilgis yra 405nm), mėlynu (sužadavimo bangos ilgis yra 488nm) bei raudonu (sužadavimo bangos ilgis 640nm). Tyrimo metu naudoti šie fluorochromai: BD Horizon V500 ir V450 (organinis patentuotas dažas), PerCP (peridino chlorofilo baltymų kompleksas), APC (alofikocianinas), PE (fikoeritinas), FITC (fluoresceinoizotiocianatas). Fluorochromų ir monokloninių antikūnų konjugatai (1 lentelė) naudoti nustatyti limfocitų CD3, CD4, CD7, CD10, CD45, CD279, CXCR5 ir ŽLA-DR žymenų ekspresiją.

Violetiniu lazeriu sužadinta fluorescencija išmatuota žaliame kanale naudojant V500 fluorochromą. Mėlynu lazeriu sužadinta fluorescencija išmatuota žaliame kanale naudojant FITC fluorochromą, raudoname kanale naudojant PerCP fluorochromą, o geltoname kanale naudojant PE fluorochromą. Raudonu lazeriu sužadinta fluorescencija išmatuota raudoname kanale naudojant APC fluorochromą.

V450 fluorochromo sužadavimo bangos ilgis- 489nm, o detektoriaus diapozonas- 525/20nm, tuo tarpu PerCP sužadavimo bangos ilgis- 675nm ir detektoriaus diapozonas- 695/40nm, APC sužadavimo bangos ilgis- 660nm, o detektoriaus diapozonas-670/30nm, PE sužadavimo bangos ilgis- 575nm, o

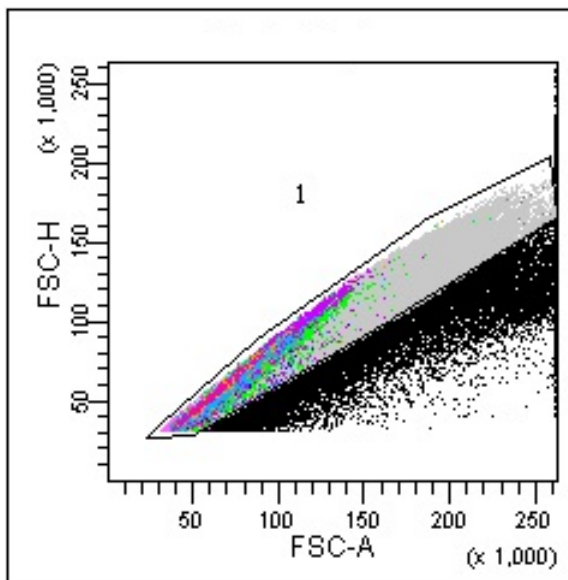
detektoriaus diapozonas- 575/26nm, FITC sužadavimo bangos ilgis- 525nm, o detektoriaus diapozonas -530/30nm.

Tėkmės citometrijos tyrimo metu gauti signalai, paversti skaitmeniniu pavidalu kaip taškinės tankio diagramos.

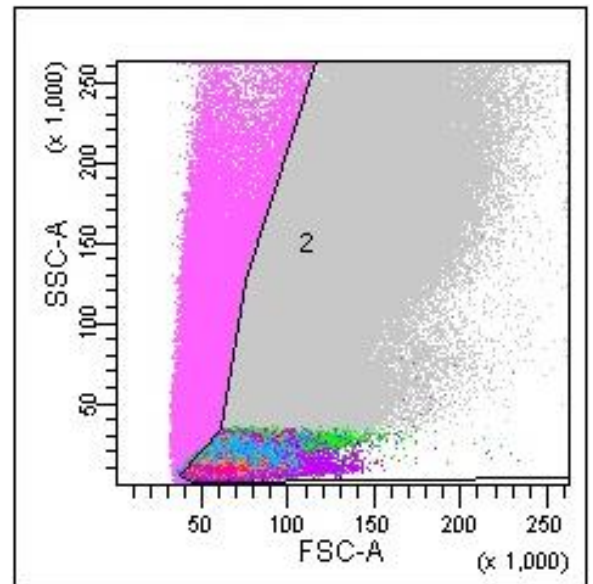
2.5. T_{FH} populiacijos identifikavimas tėkmės citometrijos metodu

Folikuliniais T limfocitais-pagalbininkais savo tyrime nustatome T ląstelių populiaciją, pasižymintį CD3⁺CD4⁺CD7⁻CD279⁺CXCR5⁺ imunofenotipu.

Atlikus paruoštų mėginių analizę tėkmės citometru, pirmiausia yra išskiriamos pavieniui išsidėsčiusios ląstelės (1 paveiklas) pagal dydį, naudojant PŠS. Toliau išskiriamos gyvybingos, nesuirusios, pavienės ląstelės. Šios ląstelės atskiriamos nuo suirusių ląstelių, riebalų lašelių ir kitų sulipusių dalelių (2 paveiklas).

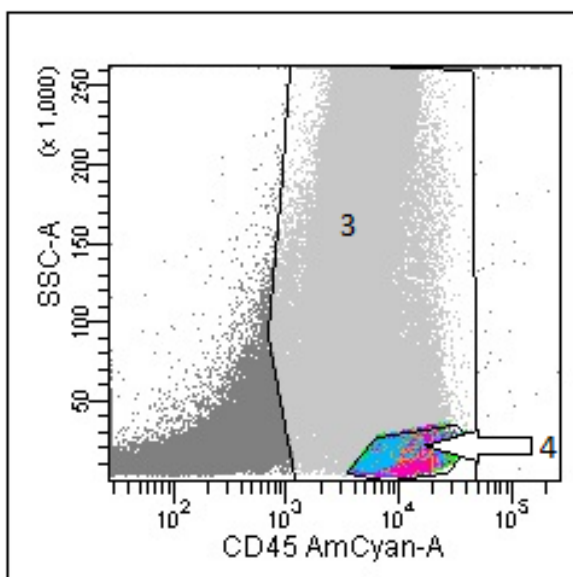


1pav. Pavieniui išsidėsčiusios ląstelės (1) taškinėje diagramoje.

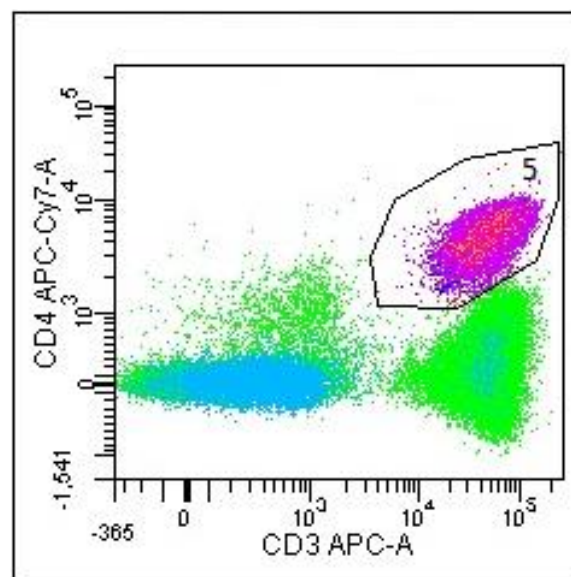


2pav. Gyvybingos ląstelės (2), taškinėje diagramoje išsidėsčiusios pagal PŠS (x ašis) ir ŠŠS (y ašis) sklaidas.

Panaudojus CD45 V450 monokloninio antikūno su fluorochromu junginį kartu su ŠŠS, išskirta leukocitų, o kartu ir limfocitų populiacija (3 paveikslas) iš gyvybingų ląstelių grupės. T limfocitų-pagalbininkų (CD3⁺CD4⁺T limfocitus) populiacijos (4 paveikslas) išskyrimui iš nustatytos bendros limfocitų populiacijos, naudojami CD3 APC bei CD4 APC monokloninių antikūnų ir fluorochromų kompleksai.



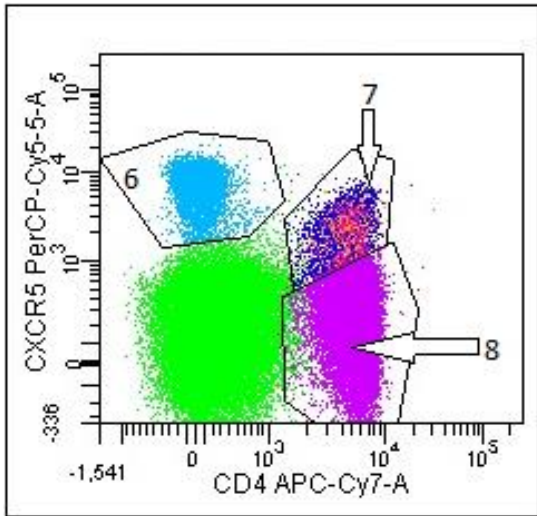
3 pav. Leukocitų (3 regionas) ir limfocitų (4 regionas) populiacijų nustatymas naudojant CD45 V450 monokloninių antikūnų su fluorochromu junginį (x ašis) ir ŠSS (y ašis)



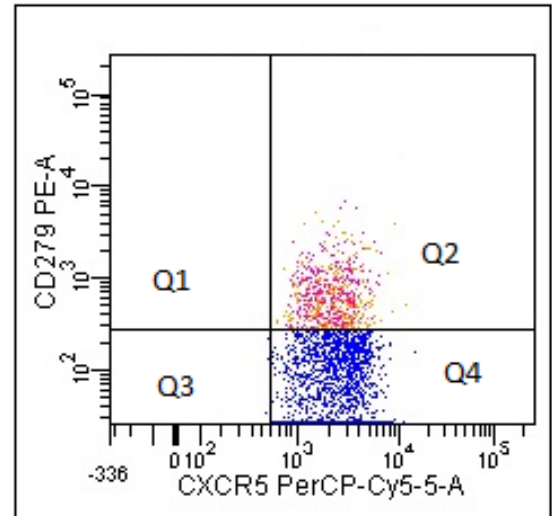
4 pav. T limfocitų-pagalbininkų (5 regionas) išskyrimas iš limfocitų populiacijos naudojant CD3 APC (x ašis) ir CD4 APC (y ašis) monokloninių antikūnų ir fluorochromų junginius.

Iš T limfocitų-pagalbininkų populiacijos yra nustatyta populiacija, ekspresuojanti ne tik CD3 ir CD4, bet ir CXCR5 žymenį (5 paveikslas) naudojant CD4 APC bei CXCR5 PerCP monokloninius antikūnus, sujungtus su fluorochromais. Stebima ne tik CD4⁺CXCR5⁺ T limfocitų populiacija, bet ir kiti T limfocitai-pagalbininkai, neekspresuojantys CXCR5 žymens, bei į B limfocitus panašios ląstelės, ekspresuojančios CXCR5 žymenį. Mūsų tyrimo metu šioje taškinėje tankio diagramoje mus labiausiai dominanti ląstelių populiacija yra T limfocitų-pagalbininkų, ekspresuojančių CXCR5 žymenį, populiacija.

6 paveiksle išskirta T limfocitų populiacija, ekspresuojanti CXCR5 žymenį, į du pogrupius: ląstelės, ekspresuojančios CD279 žymenį, ir ląstelės, neekspresuojančios šio žymens. Identifikuoti šias dvi ląstelių populiacijas naudojami CXCR5 PerCP ir CD279 PE monokloninių antikūnų ir fluorochromų kompleksai. Q2 kvadrante išsidėsčiusi CD4⁺CD279⁺CXCR5⁺T limfocitų-pagalbininkų populiacija, o Q4 kvadrante- CD4⁺CD279⁻CXCR5⁺T limfocitų-pagalbininkų populiacija.



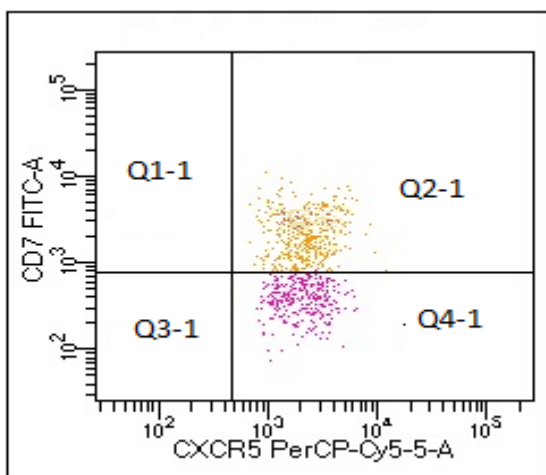
5 pav. CD4 APC (x ašis) ir CXCR5 PerCP (y ašis) monokloninių antikūnų ir fluorochromų junginių kompleksų pagalba identifikuotos į B limfocitus panašių ląstelių (6 regionas), T limfocitų-pagalbininkų, ekspresuojančių CXCR5 žymenį (7 regionas) ir kitų T limfocitų-pagalbininkų (8 regionas) populiacijos.



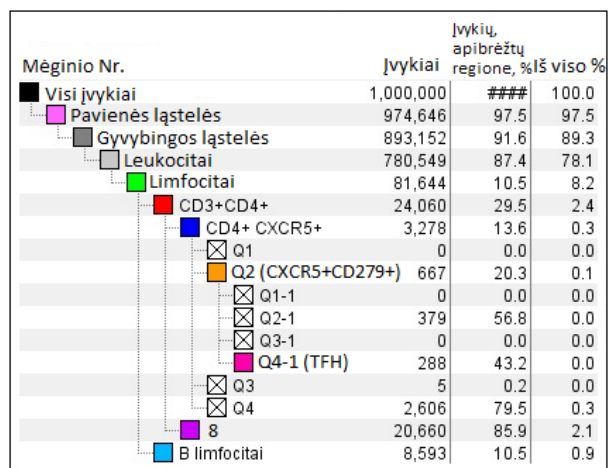
6 pav. CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺T limfocituose-pagalbininkuose CD279 žymens ekspresijos nustatymas naudojant CXCR5 PerCP (x ašis) ir CD279 PE (y ašis) monokloninių antikūnų ir fluorochromų kompleksus.

Folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai pasižymi CD7⁻ fenotipu, tad CD3⁺CD4⁺CD7⁻CD279⁺CXCR5⁺ T limfocitų populiacija yra išskiriama iš CD3⁺CD4⁺CD279⁺CXCR5⁺T limfocitų-pagalbininkų populiacijos (7 paveikslas). Naudojant CXCR5 PerCP bei CD7 FITC monokloninių antikūnų ir fluorochromų kompleksus yra nustatyta CD3⁺CD4⁺CD279⁺CXCR5⁺T limfocitų-pagalbininkų, ekspresuojančių CD7 žymenį populiacija Q2-1 kvadrante, ir CD3⁺CD4⁺CD279⁺CXCR5⁺T limfocitų-pagalbininkų, neekspresuojančių CD7 žymenį Q4-1 kvadrante, populiacija, kurią mes laikome folikulinių T limfocitų-pagalbininkų populiacija.

Apibendrinus, 8 paveiksle, galima matyti folikulinių T limfocitų-pagalbininkų populiacijos identifikavimą iš kitų ląstelių, pakopomis.

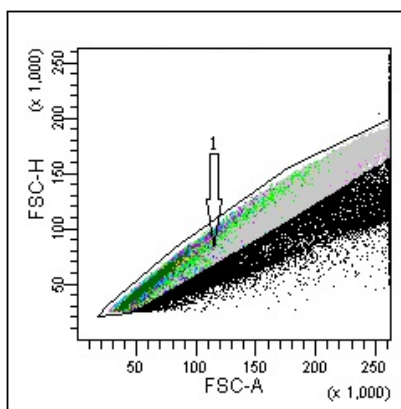


7 pav. CD7 ekspresijos nustatymas $CD4^+CD279^+CXCR5^+T$ limfocitų-pagalbininkų populiacijoje naudojant CXCR5 PerCP (x ašis) bei CD7 FITC (y ašis) monokloninių antikūnų ir fluorochromų kompleksus.

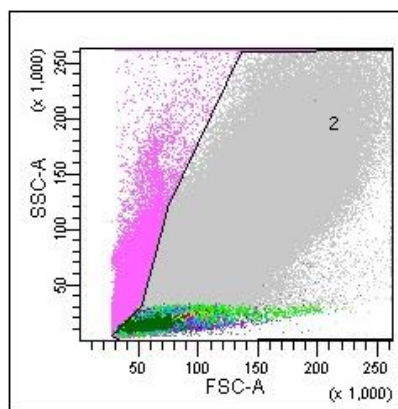


8 pav. Folikulinių T limfocitų-pagalbininkų populiacijos nustatymas tėkmės citometrijos metodu.

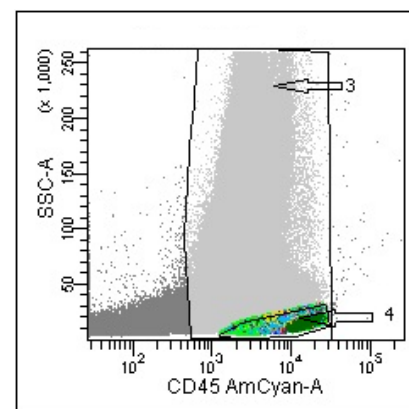
Tiriant folikulinių T limfocitų populiacijos imunofenotipą, sergant angioimunoblastinė T ląstelių limfoma, matomas skirtingas ląstelių pasiskirstymas taškinėse diagramose. Kaip ir fenotipo aberacijų nustatyme, tėkmės citometrijos diagramų analizavimas prasideda pavienių ląstelių (9 paveikslas) ir gyvybingų ląstelių (10 paveikslas) nustatymu naudojant PŠS ir ŠŠS. Taip pat yra identifikuojami leukocitai bei limfocitai (11 paveikslas) naudojant ŠŠS bei CD45 V450 monokloninio antikūno ir fluorochromo konjugatą.



9 pav. Pavienių ląstelių nustatymas naudojant PŠS.



10 pav. Gyvybingų ląstelių (2 regionas) nustatymas naudojant PŠS ir ŠŠS.

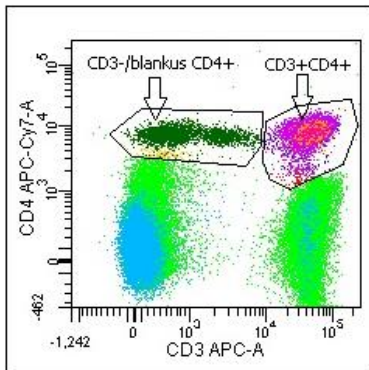


11 pav. Leukocitų (3 regionas) ir limfocitų (4 regionas) nustatymas naudojant ŠŠS bei CD45 V450 monokloninio antikūno ir fluorochromo junginį.

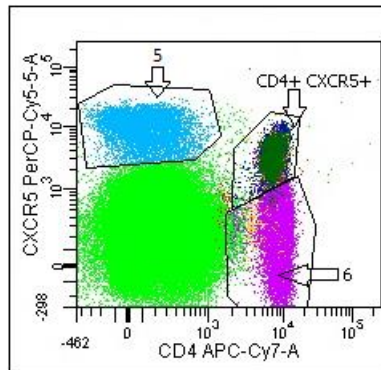
Žinoma, kad angioimunoblastinės T ląstelių limfomos substratas yra folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai, kurių normaliai fenotipas yra $CD3^+CD4^+CD7^-CD279^+CXCR5^+$, tačiau piktybinėse T_{FH} ląstelėse yra kartais stebimas CD3 ekspresijos sumažėjimas ar nebuvimas. Norint identifikuoti T_{FH} ląsteles AIBL neoplazijos, toliau yra tiriamos tiek $CD3^+$ tiek $CD3^-$ pasižymiančios T limfocitų-pagalbininkų populiacijos.

Pirmiausia atskirta T limfocitų-pagalbininkų ląstelių populiacija (12 paveikslas). Naudojant CD3 APC bei CD4 APC monokloninius antikūnus, sujungtus su fluorochromais. Stebimos dvi, mus dominančios populiacijos: $CD3^-CD4^+$ bei $CD3^+CD4^+$.

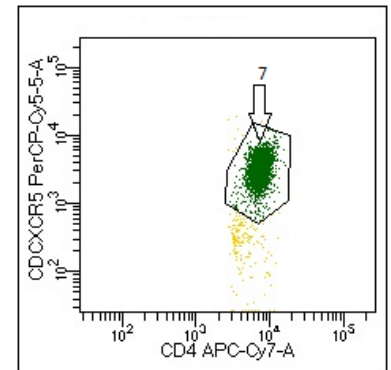
13 paveiksle pavaizduotos $CD3^-CD4^+$ bei $CD3^+CD4^+$ ląstelių populiacijos, pasižymiančios CXCR5 žymens ekspresija, naudojant CD4 APC bei CXCR5 PerCP monokloninius antikūnus konjuguotus su fluorochromais. Taškinėje diagramoje matoma ir kitų T limfocitų-pagalbininkų populiacija (pažymėta 6 numeriu), bei į B limfocitus panašios ląstelės, ekspresuojančios CXCR5 (pažymėtos 5 numeriu). Toliau analizėje atskirta $CD3^-CD4^+CXCR5^+$ T limfocitų populiacija nuo $CD3^+CD^+CXCR5^+$ T limfocitų populiacijos (14 paveikslas), norint identifikuoti skirtingo imunofenotipo vėžines T_{FH} ląsteles, dalyvaujančias AIBL patogenezeje.



12 pav. $CD3^-CD4^+$ ir $CD3^+CD4^+$ T limfocitų-pagalbininkų populiacijų identifikacija naudojant CD3 APC (x ašis) bei CD4 APC (y ašis) monokloninius antikūnus, sujungtus su fluorochromais.



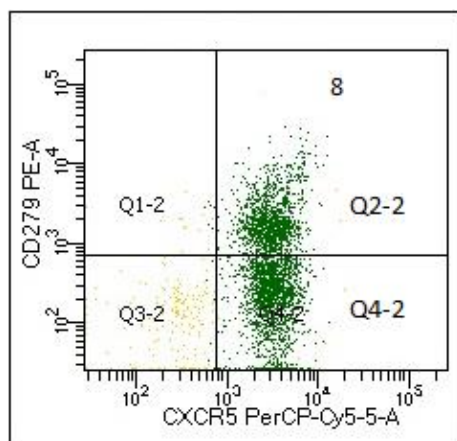
13 pav. $CD3^-/CD3^+CD4^+$ T limfocitų populiacijos CXCR5 žymens ekspresijos nustatymas naudojant CD APC (x ašis) bei CXCR5 PerCP (y ašis) monokloninius antikūnus, sujungtus su fluorochromais.



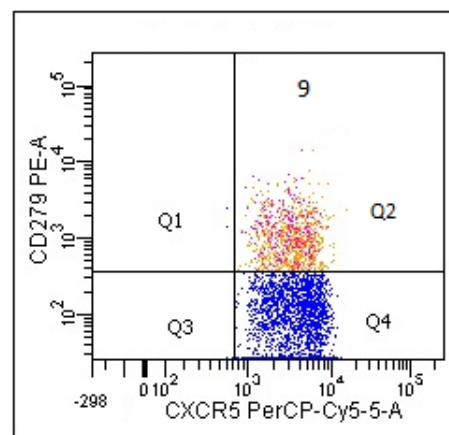
14 pav. Atskirta $CD3^-CD4^+CXCR5^+$ T limfocitų populiacija

Tyrimo metu toliau analizuojama CD279 žymens ekspresija $CD3^-CD4^+CXCR5^+$ (15 paveikslas) ir $CD3^+CD4^+CXCR5^+$ (16 paveikslas) T ląstelių populiacijose, naudojant CXCR5 PerCP bei CD279 PE monokloninius antikūnus, sujungtus su fluorochromais. $CD3^+CD4^+CXCR5^+$ T

limfocitų populiacijos CD279 ekspresija pasižymi silpniau nei CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ ląstelių populiacija, nors abiejuose populiacijose CD279 ekspresija yra variabili.

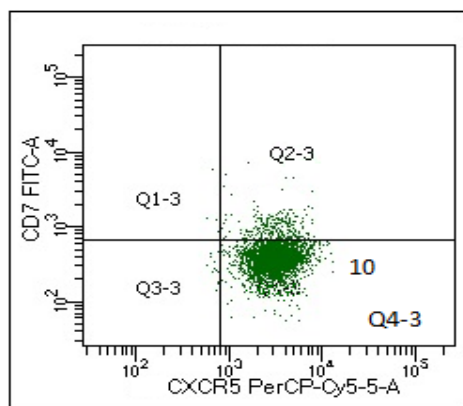


15 pav. CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ T limfocitų populiacijos (pažymėta 8 numeriu) CD279 žymens variabili ekspresija (dominuojanti Q2-2 bei Q4-2 regionuose), nustatyta naudojant CXCR5 PerCP (x ašis) ir CD279 (y ašis) monokloninius antikūnus, konjuguotus su fluorochromu.

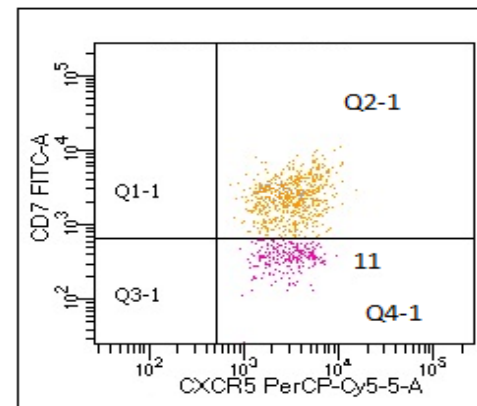


16 pav. CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ T ląstelių populiacijos (pažymėtos 9 numeriu) CD279 žymens variabili ekspresija (dominuojanti Q2-2 bei Q4-2 regionuose), nustatyta naudojant CXCR5 PerCP (x ašis) ir CD279 (y ašis) monokloninius antikūnus, konjuguotus su fluorochromu.

Toliau tirta CD7 žymens ekspresija CD3⁺CD4⁺CD279⁺CXCR5⁺ (17 paveikslas) ir CD3⁺CD4⁺CD279⁺CXCR5⁺ T limfocitų (18 paveikslas) populiacijose naudojant CXCR5 PerCP bei CD7 FITC monokloninius antikūnus sujungtus su fluorochromais.



17 pav. CD3⁺CD4⁺CD7⁺CD279⁺CXCR5⁺ T limfocitų populiacijos (pažymėtos 10 numeriu) identifikavimas naudojant CXCR5 CP (x ašis) bei CD7 FITC (y ašis) monokloninius antikūnus, konjuguotus su fluorochromu.



18 pav. CD3⁺CD4⁺CD7⁻CD279⁺CXCR5⁺ T limfocitų populiacijos (pažymėta 11 numeriu) identifikavimas naudojant CXCR5 CP (x ašis) bei CD7 FITC (y ašis) monokloninius antikūnus, konjuguotus su fluorochromu.

Apibendrinus, 19 paveiksle galima matyti folikulinių T limfocitų-pagalbininkų populiacijos tiek ekspresuojančios CD3, tiek blankiai ar neekspresuojančios CD3 žymenį populiacijos nustatymą pakopomis AIBL neoplazijoje.

Mėginio Nr.	Ivykiai	Ivykių, apibrėžtų regione, %	Iš viso %
■ Visi ivykiai	1,000,000	###	100.0
■ Pavienės ląstelės	982,657	98.3	98.3
■ Gyvybingos ląstelės	954,529	97.1	95.5
■ Leukocitai	784,289	82.2	78.4
■ Limfocitai	98,640	12.6	9.9
■ CD3+CD4+	20,368	20.6	2.0
■ CD4+ CXCR5+	5,116	25.1	0.5
□ Q1	3	0.1	0.0
□ Q2 (9)	882	17.2	0.1
□ Q1-1	0	0.0	0.0
□ Q2-1	641	72.7	0.1
□ Q3-1	0	0.0	0.0
□ Q4-1 (11)	241	27.3	0.0
□ Q3	3	0.1	0.0
□ Q4	4,228	82.6	0.4
■ 6	15,128	74.3	1.5
■ 5	7,427	7.5	0.7
■ CD3-/blankus CD4+	3,144	3.2	0.3
■ 7	2,948	93.8	0.3
□ Q1-2	8	0.3	0.0
□ Q2-2 (8)	1,244	42.2	0.1
□ Q1-3	0	0.0	0.0
□ Q2-3	90	7.2	0.0
□ Q3-3	6	0.5	0.0
□ Q4-3 (10)	1,148	92.3	0.1
□ Q3-2	7	0.2	0.0
□ Q4-2	1,689	57.3	0.2

19 pav. Vėžinių folikulinių T limfocitų populiacijos nustatymas AIBL neoplazijoje tėkmės citometrijos metodu.

2.6. Statistinė analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant statistinės analizės „SPSS Statistics“ (versija 19.0.0, Armonk, NY: IBM Corp.) programą bei Microsoft Excel 2016 programą. Gauti rezultatai pateikiami vidurkiais su standartiniais nuokrypiais. Duomenų normalumas tikrintas Shapiro-Vilko testu ($p < 0,05$). Kadangi duomenys netenkina normalumo prielaidos, naudojami Kruskal-Wallis χ^2 bei Mann-Whitney testai vidurkių palyginimui bei taikoma Pirsono korealiacijos koeficientas r . Korealiacijos ryšys tarp dviejų kintamųjų vertinamas kaip labai silpnas ($r = 0,00-0,19$), silpnas ($r = 0,20-0,39$), vidutinis ($r = 0,40-0,59$), stiprus ($r = 0,60-0,79$) ir labai stiprus ($r = 0,80-1,0$). Tyrimo metu pasirinktas statistinio reikšmingumo lygmuo $\alpha = 0,05$, o rezultatai statistiškai reikšmingais laikomi, kai $p < 0,05$.

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

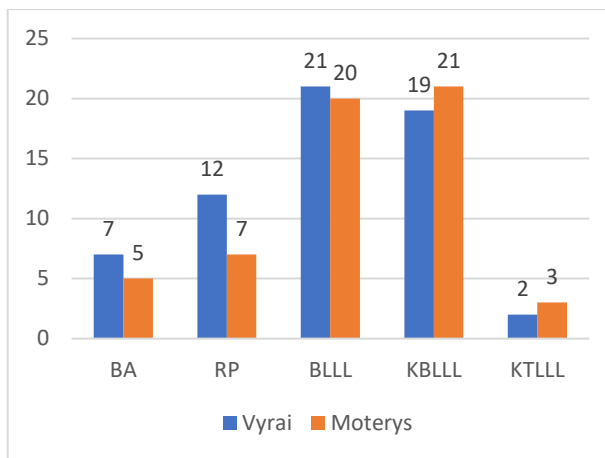
3.1. Pacientų charakteristikos

Tiriamąją grupę sudaro 250 asmenų, 2016-2018 metais besigydžiusių Vilniaus Universiteto ligoninės Santaros klinikose, kuriems buvo įtariama kraujo neoplazija. Tiriamojoje grupėje buvo 126 vyrai (50,4%) ir 124 moterys (49,6%), kurių amžiaus vidurkis $62,61 \pm 15,38$ (Min/Max 18-96). Iš pacientų buvo imami kaulų čiulpų ($n = 133$; 53,2%) ir periferinio kraujo ($n = 117$; 46,8%) mėginiai.

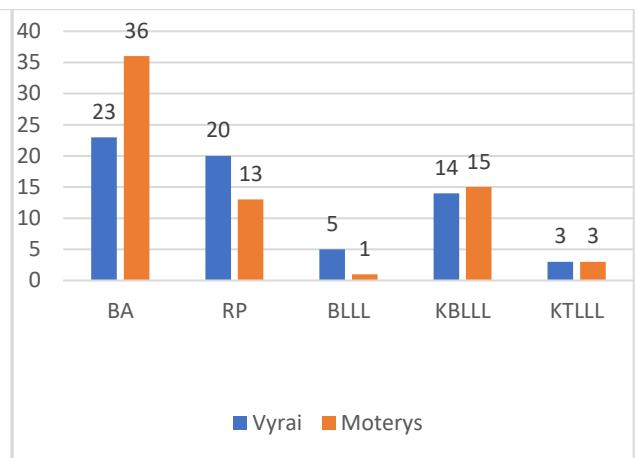
Tyrimo metu analizuoti $CD7^-$ iš $CD3^+CD4^+$, folikulinių T limfocitų-pagalbininkų ir B limfocitų populiacijų dydžiai, kurie išreikšti procentiškai. Taip pat tirti folikulinių T limfocitų-pagalbininkų, ir kitų T limfocitų-pagalbininkų populiacijų $CD3$, $CD4$, $CD7$, $CD10$, $CD45$, $CD279$, $CXCR5$ bei ŽLA-DR žymenų kiekiai tėkmės citometru.

Pagal gautus leukocitų tėkmės citometrijos imunofenotipavimo rezultatus pacientai suskirstyti į 5 grupes: fenotipas be aberacijų (BA), reakcinių pokyčių fenotipas (RP), B ląstelių lėtinė limfocitėmija (BLLL), kitos B limfocitinės kilmės lėtinės limfoproliferacinės ligos (KBLLL), kitos T limfocitinės kilmės lėtinės limfoproliferacinės ligos (KTLLL). Reakcinių pokyčių grupę apibūdina pacientai, kuriems nustatytas $CD4$ ir $CD8$ T limfocitų pakitęs santykis, padidėjęs aktyvuotų T limfocitų kiekis, padidėjęs ŽLA-DR, $CD56$, $CD57$, $CD3$ žymenų kiekis bei kiti pokyčiai, kurių neužtenka patvirtinti neoplazmą.

Vyrų ir moterų pasiskirstymas skirtingose ligų grupėse periferinio kraujo ir kaulų čiulpų mėginiuose pavaizduotas 20 ir 21 paveiksluose.



20 pav. Pacientų pasiskirstymas pagal imunofenotipą periferiniame kraujyje (n=117)

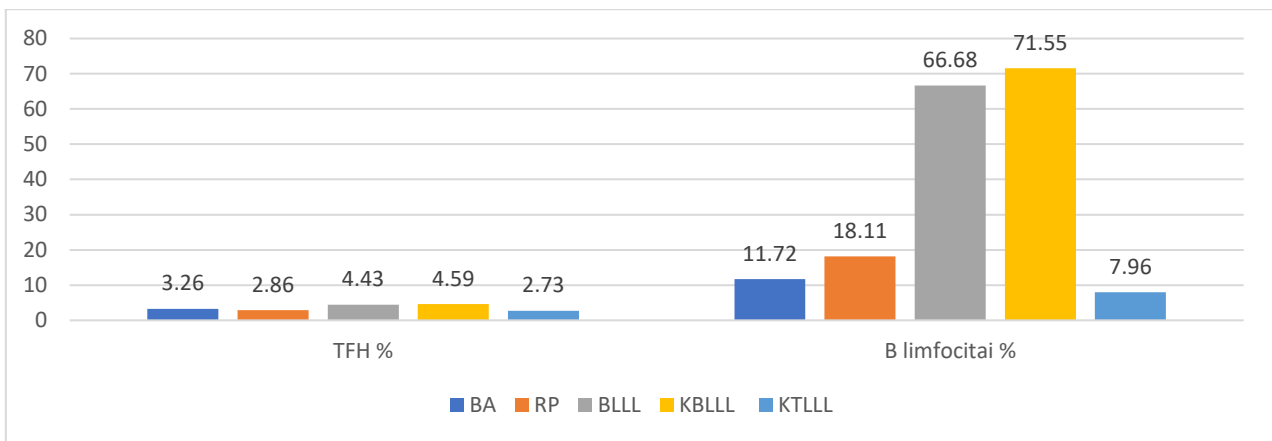


21 pav. Pacientų pasiskirstymas pagal imunofenotipą kaulų čiulpuose (n=133)

Didžiausias pacientų pasiskirstymas pagal imunofenotipą periferiniame kraujyje yra BLLL (n=41, 35,04%) grupėje, mažesniais kiekiais pasiskirsto KBLLL (n=40, 34,19%), RP (n=19, 16,24%) ir BA (n=12, 10,26%) grupėje. Mažiausias pacientų pasiskirstymas yra KTLLL (n=5, 4,27%) grupėje. Tuo tarpu didžiausias pacientų pasiskirstymas kaulų čiulpuose yra BA (n=59, 44,36%) grupėje, po to RP (n=33, 24,81%) ir KBLLL (n=29, 21,81%) grupėse, o mažiausias pasiskirstymas yra BLLL su KTLLL (po n=6, 4,51%) grupėse.

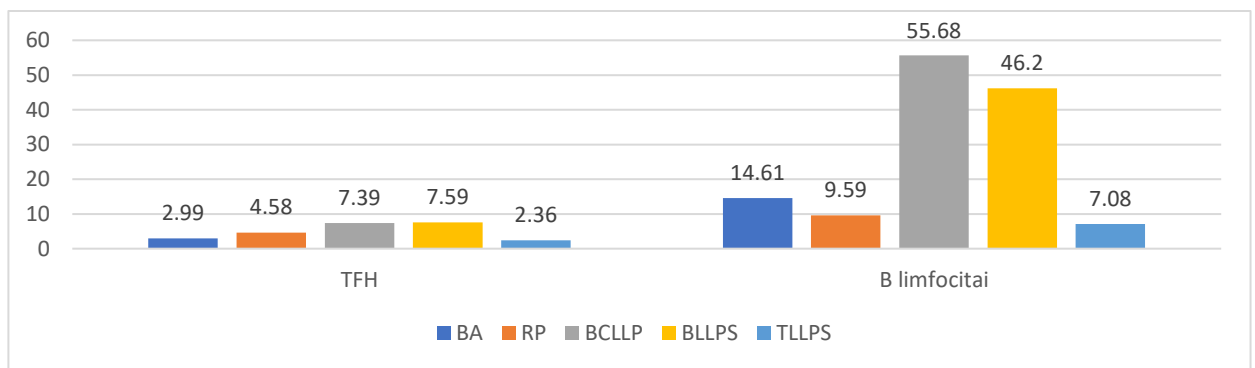
3.2. Ląstelių populiacijų paplitimas kaulų čiulpuose ir periferiniame kraujyje įvairiuose susirgimuose

Folikulinių T limfocitų-pagalbininkų ir B limfocitų populiacijų dydžiai nustatyti tėkmės citometru ir išreikšti procentiškai. B limfocitų procentiniai kiekiai išskaičiuoti iš nustatytų visų limfocitų populiacijos, o folikulinių T limfocitų-pagalbininkų populiacija iš CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ populiacijos. Ląstelių populiacijų paplitimai tirti įvairiuose susirgimuose ir yra pavaizduoti 22 (periferiniame kraujyje) ir 23 (kaulų čiulpuose) paveiksluose.



22 pav. Ląstelių populiacijų vidutiniai kiekiai periferiniame kraujyje įvairiuose susirgimuose.

Folikulinių T limfocitų-pagalbininkų didžiausias vidutinis kiekis nustatytas KBLLL grupėje (4,59(3,2)), mažesni kiekiai nustatyti BLLL (4,43(3,5)), BA (3,26(2,8)) ir RP grupėse (2,86(1,4)), tuo tarpu mažiausi T_{FH} kiekiai aptikti KTLLL grupėje (2,73(3,5)). Mūsų gauti rezultatai (22 pav.) sutampa su kitų tyrimų rezultatais [119], kurie teigia, kad didžiausi T_{FH} kiekiai randami KBLLL neoplazijose, o maži kiekiai aptinkami periferinių T ląstelių limfomų neoplazijose (tik trečdalis atvejų piktybinės ląstelės pasižymi fenotipu, panašiu į T_{FH}). Taip pat J. Matthew ir kolegų tyrimas [120] parodė, kad folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai yra pastovūs, bet ne didžiausias komponentas BLLL neoplazijoje, ir T_{FH} kiekiai didesni nei kontrolinėje grupėje (fenotipe be abreacijų) periferinio kraujo mėginiuose. T_{FH} padidėjimas B ląstelių kilmės neoplazijose yra siejamas su folikulinių T limfocitų-pagalbininkų diferenciacija, kuriai yra būtina T_{FH} ir B limfocito sąveika. T_{FH} ekspresuojamo CD40 ligando ir B limfocitų ekspresuojamos CD40 antigeno sąveika bei T_{FH} sekretuojamas IL-21 lemia B limfocitų diferenciaciją bei klasės persijungimą [121]. Manome, kad T_{FH} populiacijos padidėjimas lemia vėžinių B ląstelių proliferaciją ir išgyvenamumą.



23 pav. Ląstelių populiacijų vidutiniai kiekiai kaulų čiulpuose įvairiuose susirgimuose.

Folikulinių T limfocitų-pagalbininkų didžiausias vidutinis kiekis (23pav.) kaulų čiulpuose yra KBLLL grupėje (7,59 (6,1)), mažiau BLLL (7,39(7,9)), RP (4,58(5,2)) bei BA grupėse (2,99(2,2)), o mažiausias populiacijos dydis nustatytas KTLLL (2,36(1,9)) grupėje. Duomenų apie folikulinių T limfocitų-pagalbininkų kiekius kaulų čiulpuose įvairiose neoplazijose neaptikta. T_{FH} ląstelės daugiausiai yra siejamos su angioimunoblastine T ląstelių limfoma, kuri priklauso mūsų KTLLL grupei, tačiau šios neoplazijos grupėje tirti limfmazgiuose arba periferiniame kraujyje, o ne kaulų čiulpuose, esančių T_{FH} kiekiai.

Mūsų tyrime T_{FH} kiekių pasiskirstymas kaulų čiulpuose ir periferiniame kraujyje 5 grupėse yra labai panašus.

Iš kitų mokslinių tyrimų yra žinoma, kad folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai yra svarbūs B limfocitų proliferacijai ir funkcijų atlikime, todėl tirta T_{FH} ląstelių koreliacija (Spearman koreliacija) su B limfocitais penkiose grupėse (2 lentelė).

2 Lentelė. Koreliacija tarp TFH ir B limfocitų penkiose ligų grupėse.

		B limfocitai Koreliacijos stiprumas (p-reikšmė)
T_{FH}	BA	0.151 (0.21)
	RP	-0.065 (0.648)
	BLLL	0.335 (0.021)
	KBLLL	0.376 (0.001)
	KTLLL	0.391 (0.235)

Folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai silpnai koreliuoja su B limfocitais BLLL, KBLLL bei KTLLL grupėse, tačiau statistškai reikšminga koreliacija tarp T_{FH} ir B limfocitų yra tik BLLL (p=0,021) bei KBLLL (p=0,001) grupėse. Šiose dviejose grupėse didėjant folikulinių T limfocitų-pagalbininkų procentiniam kiekiui, didėja ir B limfocitų procentinis kiekis. Mūsų gauti rezultatai patvirtina literatūros duomenis [122], kad didėjant folikulinių T limfocitų-pagalbininkų kiekiui, didėja ir B limfocitų kiekis B ląstelių kilmės neoplazijose, kas rodo, kad T_{FH} yra svarbūs B limfocitų proliferacijai ne tik normos grupėje, bet ir neoplazmų.

Norint išsiaiškinti ar T_{FH} populiacijos kiekių skirtumas neoplazijose yra statistškai reikšmingas, atlikti Kruskal-Wallis χ^2 ir Mann-Whitney testai. Folikulinių T limfocitų-pagalbininkų populiacijos vidutiniai procentiniai kiekiai nėra statistškai reikšmingai skirtingi (p>0,05) periferiniame kraujyje (1 priedas), todėl 3 lentelėje pavaizduoti tik kaulų čiulpuose esantys skirtumai.

3 Lentelė. Ląstelių populiacijų paplitimo skirtumai kaulų čiulpuose 5 grupėse. 1- BA; 2- RP; 3- BLLL; 4- KBLLL; 5-KTLLL.

Kaulų čiulpai						
Ląstelių populiacija	Ligų grupės					Mann-Whitney testas, p reikšmės
	1 (Vidurkis, standartinis nuokrypis)	2 (Vidurkis, standartinis nuokrypis)	3 (Vidurkis, standartinis nuokrypis)	4 (Vidurkis, standartinis nuokrypis)	5 (Vidurkis, standartinis nuokrypis)	
T _{FH}	2,99(2.2)	4.58 (5.2)	7.39 (7.9)	7.59 (6.1)	2.36 (1.9)	1*2, p=0.118 1*3, p=0.094 1*4, p=0.000 1*5, p=0.511 2*3, p=0.330 2*4, p=0.004 2*5, p=0.184 3*4, p=0.630 3*5, p=0.150 4*5, p=0.004

T_{FH} ląstelių populiacija yra mažesnė KTLLL neoplazijų grupėje nei BA (p=0,000), RP grupėse (p=0,004), ir sergant KBLLL (p=0,004).

Literatūros duomenų apie kaulų čiulpuose esančių T_{FH} populiacijų paplitimo skirtumus įvairių neoplazmų bei BA ir RP grupėse, nerasta, todėl negalime palyginti su savo gautais rezultatais. Manome, kad T_{FH} ląstelių padidėjimas kaulų čiulpuose sergant KBLLL yra dėl T_{FH} ląstelių svarbos B limfocitų proliferacijoje, kuri yra itin aktyvi B ląstelių kilmės neoplazmose.

3.3. T_{FH} ir kitų T limfocitų-pagalbininkų žymenų paplitimas įvairiose neoplazijose

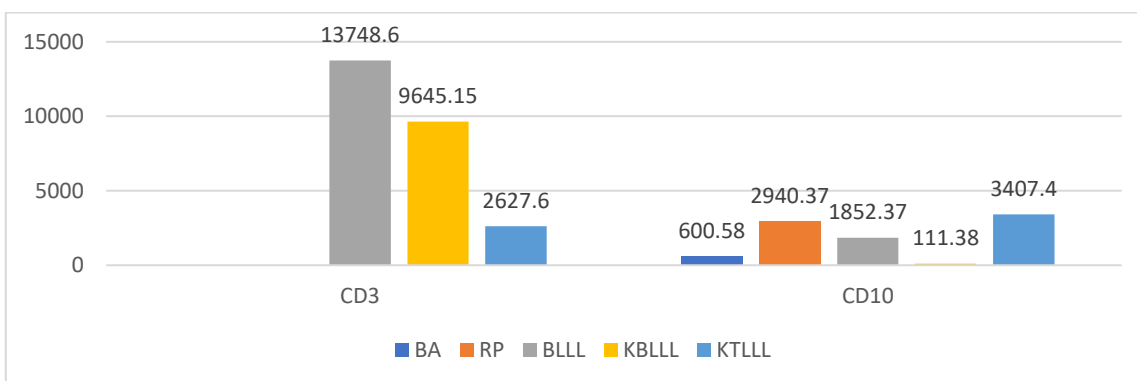
T_{FH} ir kitų T limfocitų-pagalbininkų CD3, CD4, CD7, CD10, CD45, CD279, CXCR5 ir ŽLA-DR žymenų vidutinė ekspresija ant ląstelių apskaičiuota periferiniame kraujyje ir kaulų čiulpuose BA, RP, BLLL, KBLLL ir KTLLL grupėse (2 priedas).

Statistinis reikšmingumas aptiktas tarp CD3 (T_{FH} periferiniame kraujyje), CD4 (kitų T limfocitų-pagalbininkų periferiniame kraujyje), CD10 (T_{FH} bei kitų T limfocitų-pagalbininkų periferiniame kraujyje), CD279 (folikulinių T limfocitų-pagalbininkų ir kitų T limfocitų-pagalbininkų kaulų čiulpuose) ir ŽLA-DR (kitų T limfocitų-pagalbininkų kaulų čiulpuose) žymenų ekspresijos ant ląstelių.. Kitų žymenų ekspresijos reikšmingi padidėjimai ar sumažėjimai neaptikti kaulų čiulpuose ar periferiniame kraujyje (4 lentelė).

4. Lentelė. T_{FH} ir kitų T limfocitų-pagalbininkų žymenų ekspresija kaulų čiulpuose ir periferiniame kraujyje 5 grupėse.

		Kaulų čiulpai		Periferinis kraujas	
		χ^2 statistika	p-reikšmė	χ^2 statistika	p-reikšmė
Folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai	CD3	4.7	0.314	9.9	0.042
	CD4	2.7	0.608	8.6	0.071
	CD7	7.6	0.106	8.8	0.066
	CD10	4.8	0.307	13.6	0.009
	CD45	7.5	0.114	4.7	0.321
	CD279	14.2	0.007	2.8	0.591
	CXCR5	3.3	0.503	5.2	0.270
	ŽLA-DR	8.7	0.070	8.6	0.072
Kiti T limfocitai-pagalbininkai	CD3	4.3	0.369	8.4	0.078
	CD4	2.9	0.571	12.0	0.018
	CD7	2.9	0.583	7.8	0.099
	CD10	2.5	0.644	13.8	0.008
	CD45	8.3	0.080	4.9	0.299
	CD279	16.4	0.003	5.0	0.290
	CXCR5	2.3	0.677	3.7	0.454
	ŽLA-DR	11.4	0.022	5.1	0.276

Folikulinių T limfocitų-pagalbininkų CD3 ir CD10 žymenų ekspresija periferiniame kraujyje įvairiose neoplazijose pavaizduoti 24 paveiksle.



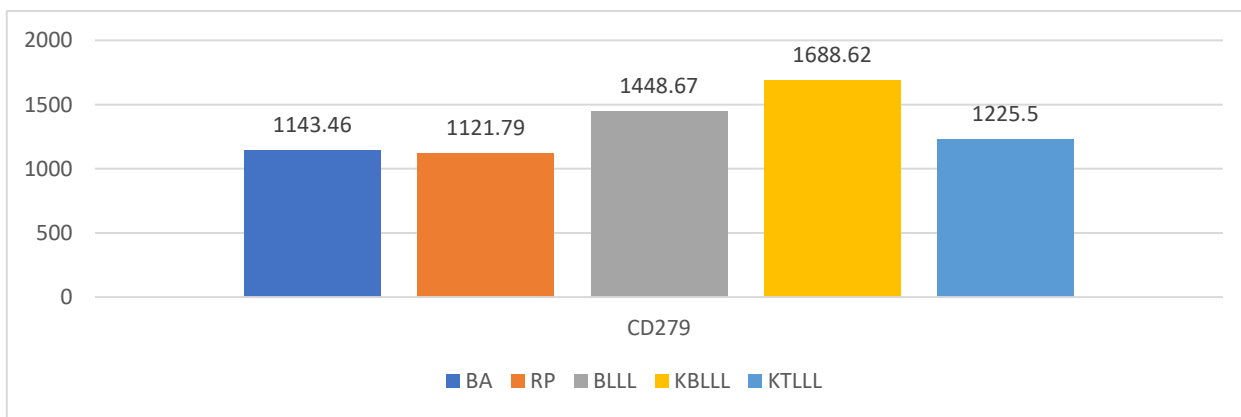
24 pav. T_{FH} CD3 bei CD10 žymenų paplitimas periferiniame kraujyje 5 grupėse

Folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai stipriausia CD3 ekspresija pasižymi BLLL grupėje (13748.6(19271,7)), ir statistiškai reikšmingai stipresne ekspresija nei KBLLL (9645,15(19271,7), p=0,002) ir KTLLE (2627,6(890,1), p=0,036) grupėse (24 pav.). Literatūros duomenimis [123]

nuslopinus CD3 ekspresiją ant T_{FH} ląstelių yra nuslopinama B limfocitų diferenciacija bei Ig klasės perjungimas, taip pat CD3 ekspresijos sumažėjimas būdingas lėtinėms T limfocitų kilmės neoplazmoms [37], ką patvirtina ir mūsų gauti rezultatai, rodantys, kad CD3 ekspresija ant ląstelių yra mažiausia KTLLL grupėje. Taigi, padidėjusi CD3 ekspresija lemia aktyvesnę B limfocitų proliferaciją. T_{FH} ląstelės turi įtakos Ig klasės persijungime, o būtent BLLL neoplazmos pasižymi imunoglobulinų variabilių sričių sunkiųjų grandinių mutacijomis, tačiau nėra aišku ar šiuos imunoglobulinų pokyčius sukelia aberantinė CD3 ekspresija ant T_{FH} ląstelių. Taip pat duomenų, kad CD3 ekspresija periferinio kraujo folikulinių T limfocitų-pagalbininkų populiacijoje yra didesnė BLLL grupėje nei KBLLL grupėje, neaptikta.

Tuo tarpu CD10 žymens stipriausia ekspresija ant T_{FH} ląstelių aptinkama KTLLL grupėje (3407,4(5189, 1)), o reikšmingas padidėjimas stebimas lyginant su šiomis grupėmis: BA (600,58(501,3), p=0,020), BLLL (1852,37(5184,1), p=0,036) ir KBLLL (1110,38(1855), p=0,023). Periferinio kraujo CD10 žymens ekspresija ant T_{FH} ląstelių yra stipresnė RP grupėje (2940,37(4969,3)) nei BA (p=0,012), BLLL (p=0,010) ir KBLLL (p=0,025) grupėse. Literatūros duomenimis randama [124], kad CD10 žymens ekspresija ant T_{FH} yra padidėjusi sergant KTLLL neoplazijomis, pavyzdžiui, periferinės T limfocitų leukemijos neoplazmoje CD10 žymuo aptinkamas 72% sergančiųjų [125]. Kiti literatūros šaltiniai [66] teigia, kad CD10 ekspresija yra sumažėjusi arba jos iš vis nėra sergant T limfocitų kilmės neoplazmoms, tad nustatyta CD10 žymens ekspresija ant T_{FH} ląstelių yra įvairi KTLLL grupėje. Mūsų gauti rezultatai pritaria tyrimams, teigiantiems, kad CD10 ekspresija ant T_{FH} ląstelių yra stipri sergant T limfocitų kilmės neoplazijomis. Duomenų, lyginančių folikulinių T limfocitų-pagalbininkų CD10 ekspresiją T ir B kilmės neoplazmose bei BA ir RP grupėse, neaptikta, tad negalime palyginti mūsų gautų rezultatų su literatūros šaltiniais.

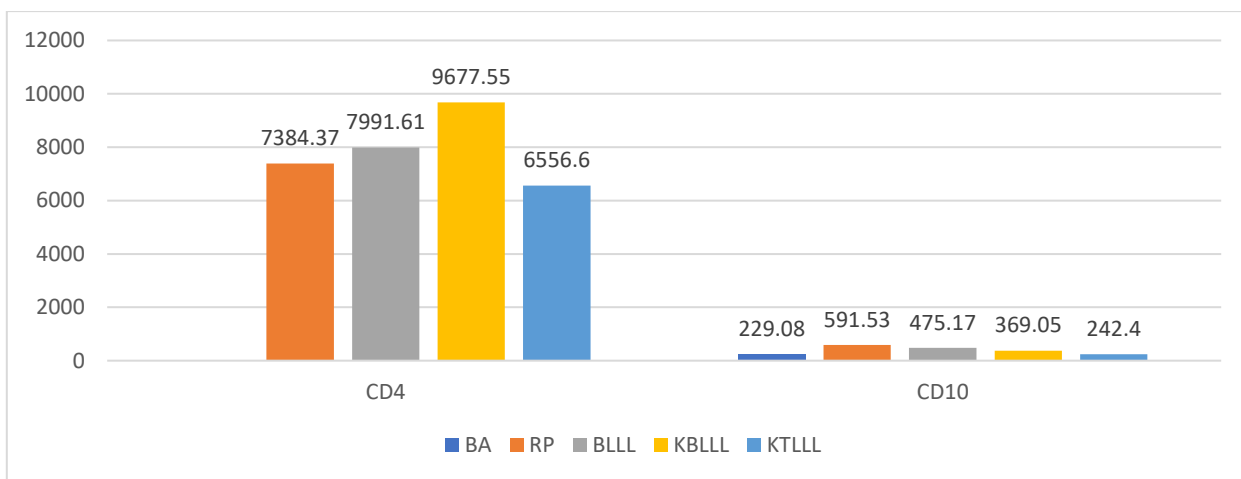
Kaulų čiulpuose folikulinių T limfocitų-pagalbininkų žymens CD279 ekspresija skirtingose pacientų grupėse pavaizduota 25 paveiksle.



25 pav. T_{FH} CD279 žymens paplitimas kaulų čiulpuose 5 grupėse.

Kaulų čiulpų T_{FH} CD279 žymens ekspresija BA (1143,46(426,6)) grupėje yra mažesnė nei BLLL (1448,67(399,8), p=0,049) ir KBLLL (1688,62(1080,7), p=0,001) grupėse. CD279 žymens ekspresija KBLLL grupėje ne tik didesnė už BA grupės, bet ir už RP grupės (1121,79(382,3), p=0,005). Literatūros duomenimis [126] CD279 žymens ekspresija kaulų čiulpuose, kai nėra neoplazijos yra neaptinkama arba yra maža, ką patvirtina ir mūsų rezultatai. Taip pat literatūros šaltiniai [127] teigia, kad CD279 yra stipriai ekspresuojama kaulų čiulpuose sergant BLLL ir AIBL [128], tačiau nėra nurodoma kokiose T limfocitų subpopuliacijose. Mūsų duomenys yra panašūs tuo, kad didžiausia CD279 ekspresija kaulų čiulpuose yra B limfocitų kilmės neoplaziose, tačiau dėl neaiškios tikslios T limfocitų populiacijos, negalime palyginti su mūsų duomenimis, o daugiau literatūros šaltinių duomenų, aptariančių T_{FH} CD279 žymens ekspresiją kaulų čiulpuose sergant neoplazijomis, neaptikta.

Periferinio kraujo kitų T limfocitų-pagalbininkų ląstelių populiacijos CD4 ir CD10 žymenų bei kaulų čiulpų kitų T limfocitų-pagalbininkų CD279 bei ŽLA-DR žymenų ekspresija yra reikšmingai pakitusi (26 ir 27 paveikslai atitinkamai).

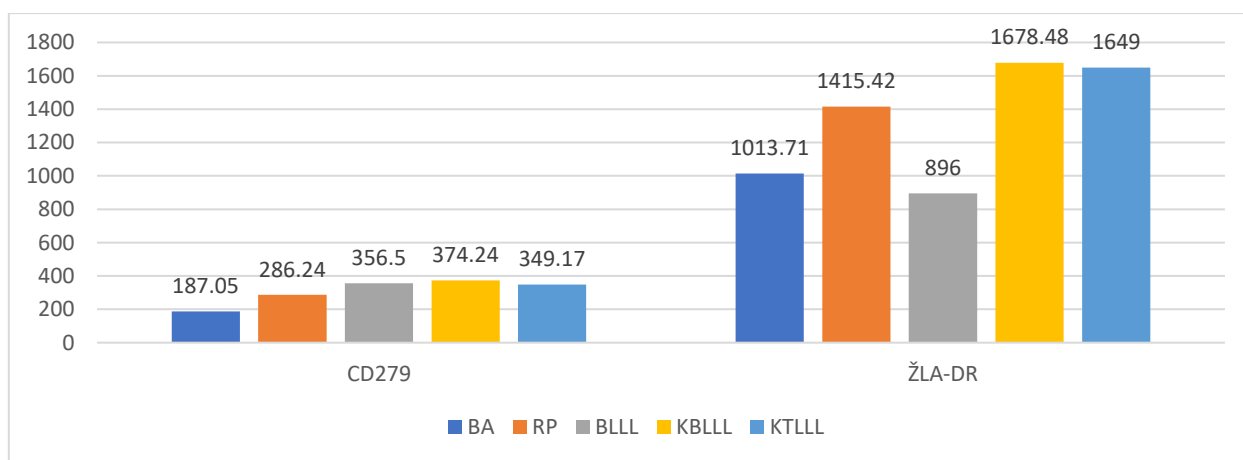


26 pav. Kitų T limfocitų-pagalbininkų CD4 ir CD10 žymenų paplitimas periferiniame kraujyje 5 grupėse.

Kitų T limfocitų-pagalbininkų CD4 žymens ekspresija periferiniame kraujyje RP grupėje (7384,37 (1356)) yra mažesnė nei BLLL (7991,61 (854,2), p=0,007) ar KBLLL (9677,55 (11273,8), p=0,011) grupėse. Be to CD4 žymens vidutinė ekspresija ant ląstelių yra mažesnė ir KTLLL grupėje (6556,6 (1635,3)) lyginant su BLLL (p=0,027) ir KBLLL (p=0,040) grupėmis. Literatūros duomenimis [129] CD4⁺ T limfocitų kiekiai BLLL bei KBLLL grupėse yra padidėję, tačiau pačio CD4 antigeno ant kitų T limfocitų-pagalbininkų ekspresijos padidėjimas ar sumažėjimas sergant šiomis neoplazijomis, nepašaukiamas. Literatūros duomenimis [3] CD4 antigeno ekspresijos ant T limfocitų padidėjimas

stebimas sergant T limfocitų kilmės neoplazmomis, pavyzdžiui, Sezary sindromu [130], tačiau didelių granuliuotų limfocitų leukemija nepasižymi CD4 ekspresija [131]. Dianzani et al. duomenimis [132] sergant BLLL T limfocitai silpniau ekspresuoja CD4. Mūsų gauti duomenys patvirtina literatūros duomenis, nes didžiausia CD4 ekspresija ant ląstelių aptikta sergant B limfocitų kilmės neoplazmomis.

Kitų T limfocitų-pagalbininkų CD10 žymens ekspresija RP grupėje (591,53(1119)) yra didesnį, lyginant su BA (229,08(157,6), $p=0,047$), BLLL (475,17(179,6), $p=0,002$) bei KBLLL (369,05(1085,7), $p=0,002$) grupėse CD10 žymens kiekiais ant kitų T limfocitų-pagalbininkų. Literatūros duomenimis [15] randama, kad dalis T limfocitų, ypač GC T_{FH}, pasižymi CD10 žymens ekspresija reakcinių pokyčių grupėje, tačiau duomenų ar yra reikšmingas CD10 žymens kiekio pokytis ant ląstelių reakcinių pokyčių ir neoplazmų grupėse periferiniame kraujyje neaptikta, tad negalime palyginti su savo gautais rezultatais. Taip pat literatūros duomenimis [125] KTLLL grupėje periferinio kraujo CD4⁺T limfocitai pasižymi CD10 ekspresija, ypač sergant angioimunoblastine T ląstelių limfoma [15], o mūsų gauti rezultatai nerodo jokio reikšmingo padidėjimo ar sumažėjimo CD10 ekspresijos kitų T limfocitų-pagalbininkų populiacijoje KTLLL grupėje.



27 pav. Kitų T limfocitų-pagalbininkų CD279 ir ŽLA-DR žymenų paplitimas kaulų čiulpuose 5 grupėse.

Kaulų čiulpų CD279 žymens ekspresija ant kitų T limfocitų-pagalbininkų reikšmingai didesnė KBLLL (374,24(315,7)) grupėje lyginant su BA (187,05(154,6), $p=0,000$) ir RP (286,24(286,8), $p=0,044$) grupėmis. Literatūros duomenų apie kaulų čiulpuose ant CD4⁺T limfocitų ekspresuojamo CD279 žymens ekspresiją sergant neoplazijomis neaptikta, nors yra duomenų, kad periferinio kraujo CD279 ekspresija ant T limfocitų padidėja sergant B ląstelių kilmės neoplazmomis [83]. Kitų T limfocitų-pagalbininkų, kaip ir T_{FH}, CD279 ekspresija didžiausia KBLLL grupėje, bei dalinai galima

palyginti su anskčiau aptartais literatūros duomenimis [127], teigiančiais, kad T limfocitai stipriai ekspresuoja CD279 žymenį kaulų čiulpuose sergant B limfocitų kilmės neoplazmomis.

ŽLA-DR žymens ekspresija BA (1013,71(930)) grupėje yra mažesnė nei RP grupėje (1415,42(1006,7), $p=0,015$) ant kitų T limfocitų-pagalbininkų kaulų čiulpuose. Normaliai T limfocitai-pagalbininkai ekspresuoja ŽLA-DR žymenį [133], tačiau literatūros duomenų, palyginančių ŽLA-DR ekspresiją ant kitų T limfocitų-pagalbininkų kaulų čiulpuose tarp reakcinių pokyčių ir fenotipo bei aberacijų grupių, nerasta.

3.4. T_{FH} ir kitų T limfocitų-pagalbininkų populiacijų žymenų ekspresijos palyginimas.

Periferinio kraujo ir kaulų čiulpų T_{FH} bei kitų T limfocitų-pagalbininkų populiacijų žymenys palyginti tarpusavyje fenotipo bei aberacijų, reakcinių pokyčių, B ląstelių lėtinės limfocitų limfocitų, kitų B limfocitų lėtinės lėtinės limfoproliferacinių ligų ir kitų T limfocitų lėtinės lėtinės limfoproliferacinių ligų grupėse.

Folikulinių T limfocitų-pagalbininkų su kitų T limfocitų-pagalbininkų žymenų vidutinės ekspresijos pateiktos 2 priede, o palyginimai su statistiniu reikšmingumu pavaizduoti 5 lentelėje (periferinis kraujas) ir 6 lentelėje (kaulų čiulpai).

5 Lentelė. Periferinio kraujo T_{FH} ir kitų T limfocitų-pagalbininkų žymenų ekspresijos palyginimas 5 ligų grupėse.

Periferinis kraujas								
T _{FH} ir kitų T limfocitų-pagalbininkų žymenys	CD3	CD4	CD7	CD10	CD45	CD279	CXCR5	ŽLA-DR
Neoplazijos								
BA	0.729	0.204	0.050	0.033	0.273	0.000	0.000	0.583
RP	0.827	0.422	0.314	0.000	0.125	0.000	0.000	0.559
BLLL	0.711	0.071	0.003	0.000	0.041	0.000	0.000	0.000
KBLLL	0.840	0.504	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000
KTLLL	0.602	0.602	0.602	0.009	0.251	0.009	0.009	0.465

BA grupėje T_{FH} populiacija pasižymi stipresne CD10 ($p=0,033$), CD279 ($p=0,000$), CXCR5($p=0,000$) ir ŽLA-DR($p=0,000$) žymenų ekspresija lyginant su kitų T limfocitų-pagalbininkų žymenų ekspresija. RP bei KTLLL grupėse CD10 ($p=0,000$ ir $p=0,009$), CD279 ($p=0,000$ ir $p=0,009$) ir CXCR5 ($p=0,000$ ir $p=0,009$) žymenų ekspresija taip pat yra didesnė ant T_{FH} ląstelių. BLLL ar KBLL

grupėse T_{FH} pasižymi didesne CD10 (p=0,000), CD45 (p=0,041 ir p=0,005), CD279 (p=0,000), CXCR5 (p=0,000) ir ŽLA-DR (p=0,000) žymenų ekspresija, tačiau mažesne CD7 (p=0,003 ir p=0,000) žymens ekspresija.

6 Lentelė. Kaulų čiulpų T_{FH} ir kitų T limfocitų-pagalbininkų žymenų ekspresijos palyginimas 5 ligų grupėse.

Kaulų čiulpai								
T _{FH} ir kitų T limfocitų-pagalbininkų žymenys	CD3	CD4	CD7	CD10	CD45	CD279	CXCR5	ŽLA-DR
Neoplazijos								
BA	0.493	0.016	0.000	0.000	0.056	0.000	0.000	0.008
RP	0.530	0.108	0.129	0.000	0.097	0.000	0.000	0.720
BLLL	0.749	1	0.631	0.006	0.150	0.006	0.004	0.262
KBLLL	0.514	0.146	0.007	0.000	0.211	0.000	0.000	0.072
KTLLL	0.522	0.749	0.873	0.109	0.423	0.010	0.004	0.749

Kaulų čiulpų T_{FH} pasižymi stipresne žymenų CD10 (p=0,000), CD279 (p=0,000), CXCR5 (p=0,000) ir ŽLA-DR (p=0,008) ekspresija, tačiau mažesne CD4 (p=0,16) ir CD7 (0,000) ekspresija nei kiti T limfocitai-pagalbininkai BA grupėje. RP ar BLLL grupėse CD10 (p=0,000 ir p=0,006), CD279 (p=0,000 ir p=0,006) bei CXCR5 (p=0,000 ir p=0,004) žymenų ekspresija stipresnė ant T_{FH} ląstelių. KBLLL grupėje CD10 (p=0,000), CD279 (p=0,000) ir CXCR5 (p=0,000) žymenų ekspresija stipresnė ant T_{FH} ląstelių, tačiau CD7 (p=0,007) žymens ekspresija stipresnė ant kitų T limfocitų-pagalbininkų. KTLLL grupėje CD279 (p=0,010) ir CXCR5 (p=0,004) stipresne ekspresija pasižymi folikulinių T limfocitų-pagalbininkų populiacija kaulų čiulpuose.

Taigi periferinio kraujo ir kaulų čiulpų T_{FH}, lyginant su kitais T limfocitais-pagalbininkais, pasižymi stipresne CD10 (tik periferiniame kraujyje), CD279 ir CXCR5, tačiau silpnesne CD7 ekspresija. Mūsų gauti rezultatai patvirtina literatūros šaltinių duomenis, kurie teigia, kad T_{FH} ląstelės pasižymi šioms ląstelėms būdingais žymenimis, kaip CD279 ir CXCR5. Vėžinės T_{FH} ląstelės pasižymi CD10 ekspresija, bei CD7 ekspresijos praradimu (nepiktybiniai T_{FH} yra CD7⁺CD10⁻) [121].

CD7 antigeno ekspresijos praradimas ant T_{FH} ląstelių - tai būdas apsisaugoti nuo piktybinės ląstelės žūties. CD7 ligandų galektino-1 ir galektino-3 ir CD7 sąveika sukelia signalų kaskadą, lemiančią apoptozę.

CD10 metalopeptidazė skaldo medžiagas, reguliuojančias ląstelės augimą ir diferenciaciją, pavyzdžiui, bombeziną. Padidėjusi CD10 ekspresija ant ląstelių mažina reguliuojančių medžiagų kiekius, dėl ko yra didesnė T_{FH} ląstelių populiacija sergant neoplazijomis.

CD279 vaidmuo piktybinėse T_{FH} ląstelėse yra slopinti priešnavikinį imuninį atsaką, yra palaikoma vėžinių ląstelių tolerancija dėl CD279 ir PD-L1 sąveikos. Tad padidėjusi CD279 ekspresija suteikia vėžinėms T_{FH} ląstelėms išvengti imuninės sistemos.

CXCR5 žymuo lemia ankstyvesnę T_{FH} proliferaciją ir diferenciaciją, tad vėžinės ląstelės, ekspresuodamos stipriau CXCR5 antigeną, skatina šiuos procesus. Pastebėta, kad CXCR5 ekspresijos padidėjimas ant ląstelių didina ir CD279 ekspresiją.

Taigi, CD10, CD279, CXCR5 žymenų ekspresijos padidėjimas ir CD7 sumažėjimas ant T_{FH} ląstelių, leidžia šioms ląstelėms išvengti priešnavikinio imuniteto mechanizmų, sparčiau proliferuoti ir diferencijuotis bei prailgina piktybinės ląstelės išgyvenamumą.

Literatūros šaltinių duomenų, palyginančių mūsų tiriamų žymenų ekspresijos skirtumus ant įvairių $CD3^+CD4^+$ T limfocitų normos, reakcinių pokyčių ar T ir B ląstelių kilmės neoplazmų grupėse, neaptikta. Daugiausia tyrimų atlikta apie T limfocitų populiacijos kiekio, įvykusių mutacijų ar žymenų ekspresijos skirtumus sergant T neoplazijomis ir atitinkamai B limfocitų pokyčius B neoplazijose.

3.5. AIBL T_{FH} imunofenotipo palyginimas su T_{FH} populiacijų imunofenotipu 5 grupėse.

Mūsų tyrimo metu buvo nustatyti du angioimunoblastinės T ląstelių limfomos susirgimai. Abu AIBL mėginiai yra kaulų čiulpu, todėl tolimesniame rezultatų aptarime yra lyginami kaulų čiulpuose esančių T_{FH} žymenų kiekiai su nustatytais T_{FH} žymenų kiekiais sergant AIBL neoplazija (7 lentelė). Kadangi tirti tik du AIBL atvejai, palyginimai statistiniais metodais negalimi, nes gauti rezultatai nebūtų statistiškai patikimi, todėl T_{FH} populiacijų palyginimai atlikti aprašomuoju būdu.

7 Lentelė. Folikulinių T limfocitų-pagalbininkų žymenų palyginimas

	AIBL T _{FH}			T _{FH}					
	1 atvejis	2 atvejis	Bendra imtis	BA	RP	BLLL	KBLLL	KTLLL	Bendra imtis
Populiacijos dydis %	52,8	1,96	27,38 (35,95)	2.99 (2.2)	4.58 (5.2)	7.39 (7.9)	7.59 (6.1)	2.36 (1.9)	4.56 (4.8)
CD3	46888	54	23471 (33116,63)	17036.43 (23549)	7958.24 (16839.5)	26080.83 (25790.2)	9716.79 (15846.6)	17195.5 (22440.2)	13577.12 (20812.4)
CD4	7706	9929	8817,5 (1571,90)	6834.15 (872.6)	7153.3 (750.3)	6939.33 (544)	6783.31 (1092.4)	6790.33 (585.1)	6905.02 (877.5)
CD7	844	8959	4901,5 (5738,17)	7083.2 (4215.8)	10240.03 (6298.1)	5979 (4837.7)	8430.83 (5403.2)	9234.67 (5886.6)	8207.56 (5263.1)
CD10	397	2320	1358,5 (1359,77)	585.76 (612.4)	563.27 (417.6)	768 (717.6)	825.14 (1013)	416.83 (264.6)	632.98 (678.4)
CD45	18469	35717	27093 (12196,18)	26990.68 (9398.8)	29882.39 (8064.1)	19669.67 (5654.4)	26012.28 (9842)	25979.67 (7002.9)	27118.95 (9108.4)
CD279	5623	1206	3424,5 (3123,29)	1143.46 (426.6)	1121.79 (382.3)	1448.67 (399.8)	1688.62 (1080.7)	1225.5 (468.9)	1274.42 (655.9)
CXCR5	613	2110	1361,5 (1058,54)	2566.64 (759.6)	2302.03 (589.4)	2439.17 (391.9)	2347.93 (562.1)	2658.33 (1066.3)	2451.68 (685.2)
ŽLA-DR	915	4391	2653 (2457,9)	1290.64 (1148.1)	1492.36 (1177.1)	1404 (948.4)	2363.48 (2913.9)	1800.33 (2312.4)	1602.73 (1769.2)

Lyginant folikulinių T limfocitų-pagalbininkų procentinį kiekį BA (2,99 (2,2)), RP (4,58 (5,2)), BLLL (7,39 (7,9)), KBLLL (7,59 (6,1)), KTLLL (2,36 (1,9)) bei AIBL (27,38 (35,95)) grupėse, yra ryškus T_{FH} % populiacijos padidėjimas AIBL neoplazijoje. Įdomu tai, kad AIBL T_{FH}% populiacijų kiekiai tarp dviejų tirtų atvejų yra labai skirtingi; T_{FH}% kiekis 1 atvejo metu yra 52,8%, o 2 atvejo- 1,96%. Taigi 2 atvejo AIBL neoplazijoje yra žymiai mažesni T_{FH}% populiacijų kiekiai.

Tiriant T_{FH} ląstelių CD3, CD4, CD7, CD10, CD45, CD279, CXCR5 ir ŽLA-DR žymenis AIBL grupėje, yra pastebėti dideli skirtumai žymenų CD3, CD7, CD10, CD279, CXCR5 ir ŽLA-DR ekspresijos kiekių skirtumai tarp 1 ir 2 atvejo.

Pirmame AIBL atvejyje CD3 kiekis (46888) yra didesnis, o antrame atvejyje mažesnis (54) nei T_{FH} CD3 žymens kiekiai BA (1703,43 (23549)), RP (7958,24 (16839,5)), BLLL (26080,83 (25790,2)),

KBLLL (9716,79 (15846,6)) ir KTLLL (17195,5 (22440.2)) grupėse. Neatsižvelgiant į atskirus atvejus, T_{FH} CD3 ekspresija (23471(33116,63)) sergant AIBL neoplazma yra mažesnė tik už T_{FH} populiacijos CD3 ekspresiją sergant BLLL neoplazma.

Sergant AIBL neoplazma folikulinių T limfocitų-pagalbininkų CD4 žymens ekspresija (8817,5 (1571,90)) yra didesnė nei BA(6834,15 (872,6)), RP(7153,3 (750,3)), BLLL(6939,33 (544)), KBLLL(6783,31 (1092,4)) ir KTLLL(6790,33 (585,1)) grupių T_{FH} CD4 ekspresija.

CD7 žymens kiekiai T_{FH} ląstelių populiacijoje tarp 1 ir 2 AIBL atvejo žymiai skiriasi (844 ir 8959 atitinkamai). 1 atveju metu CD7 žymens kiekis AIBL neoplazijoje yra mažesnis nei CD7 žymens kiekiai 5 grupėse: BA (7083.2 (4215.8)), RP (10240.03 (6298.1)), BLLL (5979 (4837.7)), KBLLL (8430.83 (5403.2)) bei KTLLL (9234.67 (5886.6)). 2 AIBL atveju CD7 žymens kiekis yra mažesnis už RP bei KTLLL grupių T_{FH} CD7 kiekius. Neatsižvelgiant į atskirus AIBL atvejus, CD7 kiekiai (4901,5 (5738,17)) yra vis tiek mažesni AIBL grupėje nei CD7 kiekiai 5 grupėse.

Bendrai T_{FH} CD10 kiekis (1358,5 (1359,77)) AIBL neoplazijoje yra didesnis nei BA (585.76 (612.4)), RP (563.27 (417.6)), BLLL (768 (717.6)), KBLLL (825.14 (1013)), KTLLL (416.83 (264.6)), tačiau T_{FH} CD10 žymens kiekis, kaip ir CD7 žymens, yra mažesnis pirmame (397) AIBL atvejuje nei antrame (2320). Taigi 1 atvejo CD10 žymens kiekiai sergant AIBL yra mažesni, o 2 atvejo- didesni nei T_{FH} CD10 žymens kiekiai minėtose 5 grupėse.

CD45 kiekiai (27093 (12196,18)) folikuliniuose T limfocituose-pagalbininkuose sergant angioimunoblastine T ląstelių limfoma yra didesni nei T_{FH} CD45 kiekiai BA (26990.68 (9398.8)), BLLL (19669.67 (5654.4)), KBLLL (26012.28 (9842)) ir KTLLL (25979.67 (7002.9)) grupėse, tačiau mažesni nei RP (29882.39 (8064.1)) grupėje.

CD279 žymens kiekiai sergant AIBL T_{FH} ląstelėse taip pat skiriasi tarp 1 (5623) ir 2 (1206) atvejo. Pirmame atvejuje CD279 žymens kiekis yra didesnis nei T_{FH} ląstelių CD279 kiekiai 5 grupėse: BA (1143.46 (426.6)), RP (1121.79 (382.3)), BLLL (1448.67 (399.8)), KBLLL (1688.62 (1080.7)), KTLLL(1225.5 (468.9)), tuo tarpu antrame AIBL atvejuje CD279 kiekis yra didesnis tik už BA ir RP grupių T_{FH} CD279 žymenų vidutinius kiekius. Bendrai AIBL CD279 kiekiai (3424,5 (3123,29)) yra didesni nei BA, RP, BLLL, KBLLL ir KTLLL grupėse.

T_{FH} CXCR5 žymens kiekis, kaip ir CD7 bei CD10, sergant AIBL neoplazija 1 atvejuje (613) yra mažesnis nei 2 (2110) atvejuje. Vis dėl to abiejuose atvejuose (1361,5 (1058,54)) CXCR5 žymens kiekiai AIBL neoplazijoje vis tiek yra mažesni nei T_{FH} CXCR5 žymens kiekiai BA (2566.64 (759.6)), RP (2302.03 (589.4)), BLLL (2439.17 (391.9)), KBLLL (2347.93 (562.1)) ir KTLLL (2658.33 (1066.3)) grupėse.

ŽLA-DR folikuliniuose T limfocituose-pagalbininkuose sergant AIBL neoplazija skiriasi tarp 2 tirtų atvejų. Pirmame atvejuje (915) ŽLA-DR žymens kiekis yra mažesnis nei antrame (4391) AIBL atvejuje bei BA (1290.64 (1148.1)), RP (1492.36 (1177.1)), BLLL (1404 (948.4)), KBLLL (2363.48 (2913.9)) ir KTLLL (1800.33 (2312.4)) grupėse. Antrame ir bendrai abiejuose atvejuose (2653 (2457,9)) ŽLA-DR kiekiai T_{FH} ląstelėse sergant AIBL yra didesni nei ŽLA-DR kiekiai minėtose 5 grupėse.

3.5.1. AIBL T_{FH} populiacijos imunofenotipo palyginimas su literatūros duomenimis

Mūsų tyrime nustatytos T_{FH} ląstelių populiacijos žymenų ekspresija, sergant AIBL, palygintos su literatūros šaltiniuose nurodomu angioimunoblastinės T ląstelių limfomos blastų imunofenotipu (8 lentelė).

8 Lentelė. T_{FH} imunofenotipų palyginimas

T_{FH} žymenys	T_{FH} Imunofenotipas (nustatytas mūsų tyrimo metu)	T_{FH} Imunofenotipas (literatūros šaltinių duomenimis)
CD3	Variabili (blanki/ ryški)	Variabili
CD4	Normali	Normali
CD7	Variabili (blanki/ normali)	Variabili
CD10	Variabili (vidutinė/ ryški)	Variabili
CD45	Ryški	Normali
CD279	Variabili (normali/ ryški)	Variabili
CXCR5	Variabili (blanki/ normali)	Ryški
ŽLA-DR	Variabili (blanki/ ryški)	Vidutinė

Mūsų duomenys patvirtina literatūros šaltinių duomenis (8 lentelė), kad vėžinės AIBL T_{FH} ląstelės CD3 žymenį ekspresuoja įvairiai. CD3 intraląstelinės ITAMs molekulės fosforilinimas bei Nck adaptorinių baltymų aktyvinimas lemia T limfocitų aktyvaciją, proliferaciją bei išgyvenamumą, tad AIBL T_{FH} ląstelėse padidėjusi CD3 ekspresija lemia stipresnę T limfocitų proliferaciją ir aktyvaciją,

prailgina vėžinės ląstelės išgyvenamumą. Tuo tarpu CD3 ekspresijos sumažėjimas galimas dėl CD3 geno mutacijų.

Nustatyta CD4 ekspresija sutampa su literatūros šaltinių duomenimis, teigiančiais, kad T_{FH} CD4 žymens ekspresijos pakitimų neaptikta, jo ekspresija ant angioimunoblastinės T limfomos ląstelių yra gan pastovi [41].

CD7 ekspresija T_{FH} ląstelėse literatūros duomenimis dažniausiai yra itin silpna, nors kartais būna ir ryški ($CD7^{++}$). CD7 ekspresijos praradimas apsaugo piktybinę T_{FH} ląstelę nuo apoptozės. Mūsų rezultatai patvirtina silpnos CD7 ekspresijos ant AIBL ląstelių teiginį, nes stiprios $CD7^{++}$ ekspresijos neaptikome.

Įprastai ant AIBL ląstelių CD10 ekspresija yra stebima, tačiau literatūros duomenimis kaulų čiulpuose CD10 ekspresija 50% atvejų yra laikoma aberantine. Mūsų gautų rezultatai rodo, kad CD10 ekspresija taip pat yra variabili, taigi patvirtina teiginį, kad kaulų čiulpuose CD10 ekspresija gali būti skirtinga. CD10 ekspresijos padidėjimas mažina ląstelės proliferaciją reguliuojančių medžiagų aktyvumą, taigi vėžinėse T_{FH} ląstelėse proliferacija yra aktyvesnė.

Mūsų gauti rezultatai patvirtina literatūros duomenis kurie teigia, kad vėžinės AIBL T_{FH} ląstelės pasižymi įprasta CD45 ekspresija. Kiti literatūros duomenys teigia, kad CD45 trūkumas lemia vėžinių ląstelių proliferaciją dėl padidėjusio JAK/STAT signalinės kaskados jautrumo. T_{FH} CD45 ekspresija yra būtina ląstelių brendimui ir aktyvacijai, tad šio antigeno ekspresijos padidėjimas gali lemti vėžinių ląstelių sustiprėjusią aktyvumą.

Nustatyta padidinta CD279 ekspresija AIBL ląstelėse sutampa su literatūros duomenimis. Padidėjusi CD279 ekspresija padeda vėžinėms T_{FH} ląstelėms išvengti imuninės sistemos, nes CD279 ir šio antigeno PD-L1 ligando sąveika slopina priešnavikinį imuninį atsaką bei palaiko piktybinių ląstelių toleranciją.

CXCR5 žymens ekspresija mūsų tirtuose T_{FH} AIBL atvejuose yra gan maža, ir paneigia literatūros šaltinių duomenis, kad AIBL vėžinės ląstelės pasižymi ryškia CXCR5 žymens ekspresija. Literatūros duomenimis [107] po T_{FH} aktyvacijos, yra prarandamas Bcl-6 transkripcijos faktorius, skatinantis CXCR5 ekspresiją [121], o minimalią CXCR5 ekspresiją palaiko kitas transkripcijos faktorius - c-Maf.

Nustatyta variabili ŽLA-DR ekspresija ant angioimunoblastinės T limfomos ląstelių. Literatūros duomenimis, šio antigeno ekspresija yra pastovi, o jo praradimas sergant neoplazijomis yra retas. ŽLA-DR praradimas siejamas su T_{FH} vėžinių ląstelių gebėjimu apsisaugoti nuo priešnavikino imuninio atsako.

IŠVADOS

1. Žmogaus folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai pasižymi CD3⁺, CD4⁺, CD7⁻, CD10⁺, CD45⁺, CD279⁺, CXCR5⁺ ir ŽLA-DR⁺ žymenų ekspresija.
2. Kaulų čiulpų folikulinių T limfocitų-pagalbininkų populiacija didžiausia KBLLL grupėje, o mažiausia KTLLL grupėje. Periferinio kraujo folikulinių T limfocitų-pagalbininkų populiacijos kiekiai sergant T ir B neoplazmomis reikšmingai nesiskiria.
3. Kaulų čiulpų ir periferinio kraujo folikulinių T limfocitų-pagalbininkų populiacijų kiekiai reakcinių pokyčių grupėje nesiskiria.
4. Periferiniame kraujyje folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai pasižymi stipresne CD10, CD45, CD279, CXCR5 ir ŽLA-DR, bet silpnesne CD7 žymens ekspresija, o CD3 ir CD4 žymenų ekspresija lyginant su kitais T limfocitais-pagalbininkais nesiskiria. Kaulų čiulpų folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai pasižymi stipresne CD10, CD279, CXCR5 ir ŽLA-DR, bet silpnesne CD7 bei vienoda CD3 ir CD45 žymenų ekspresija lyginant su kitais T limfocitais-pagalbininkais.
5. Folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai pasižymi stipresne CD7 bei silpnesne CD3, CD4, CD10, CD45, CD279 ir ŽLA-DR ir vienoda CXCR5 žymenų ekspresija lyginant su angioimunoblastinės T ląstelių limfomos blastų imunofenotipu.

SUMMARY

Prevalence of Follicular T Helper Cells Immunophenotype in Human Blood and Bone Marrow with Neoplastic and Reactive Lymphocytosis

Introduction: First time human follicular T helper cells (T_{FH}) were mentioned almost 20 years ago. Today we know, that these cells support B cell proliferation, activation, immunoglobulin production and are involved in the regulation of B-cell responses. Most researchers focus on germinal center T_{FH} cells population, however peripheral blood T_{FH} cells are associated with angioimmunoblastic T cell lymphoma, a rare and aggressive T cell neoplasm.

The aim of this study was to determine the prevalence of human follicular T helper cells in peripheral blood and bone marrow of patients with suspected malignant blood disorders.

Patients and Methods: Participants were 250 males (n=126) and females (n=124) aged 18-96 years. In this study we examined 133 bone marrow and 117 peripheral blood samples. All participants were divided into 5 groups: immunophenotype without aberrations, reactive phenotype changes, chronic lymphocytic leukemia, other chronic B cell lymphoproliferative disorders and other chronic T cell lymphoproliferative disorders. Flow cytometry was used to evaluate CD3, CD4, CD7, CD10, CD45, CD279, CXCR5, HLA-DR marker expression on follicular T helper cells and other T helper cells. The statistical analysis was performed using “SPSS Statistics” and Microsoft Excel software.

Results: Human follicular T helper cells immunophenotype is $CD3^+$, $CD4^+$, $CD7^-$, $CD10^+$, $CD45^+$, $CD279^+$, $CXCR5^+$ and $HLA-DR^+$. In bone marrow most abundant T_{FH} cells population was found in the group of other chronic B cell lymphoproliferative disorders, while the smallest – in the group of other chronic T cell lymphoproliferative disorders. In peripheral blood, however, T_{FH} population amounts between all groups was not significantly different. T_{FH} population amounts in bone marrow and peripheral blood are not different in patients with reactive phenotype changes. T_{FH} cells express higher amounts of CD10, CD279, CXCR5 and HLA-DR markers, and less amounts of CD7 marker than other T helper cells in peripheral blood and bone marrow. Also T_{FH} cells express higher levels of CD7 and lower levels of CD3, CD4, CD10, CD45, CD279 and HLA-DR than angioimmunoblastic T-cell lymphomas blasts, with the same CXCR5 expression.

Key words: human follicular T helper cells, angioimmunoblastic T cell lymphoma, neoplasm, flow cytometry, peripheral blood, bone marrow.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Lunning MA, Vose JM. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: the many-faced lymphoma. *Blood*. 2017; 129 (9): 1095-1100
2. Sandes AF, Chauffaille ML, Oliveira CRMC, Maekawa Y, Tamashiro N, Takao TT, Ritter EC, Rizzatti EG. CD200 Has an Important Role in the Differential Diagnosis of Mature B-Cell Neoplasms by Multiparameter Flow Cytometry. *Clinical Cytometry*. 2014; 86B: 98-105
3. Naeim MD F, Nagesh-Rao PN, Grody WW. Hematopathology: Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics, and Molecular Approaches. 1 leidimas. Academic Press. Didžioji Britanija: 2008
4. Cardoso ChCh, Moraes AC, Gonzaga Del Moral JA, Santos-Silva MC. Mature B cell neoplasms: retrospective analysis of 93 cases diagnosed between 2011 and 2014 in a University Hospital in southern Brazil. *Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy*. 2016; 38(2): 121–127
5. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016; 127(20): 2375-2387
6. Hallek M, Pflug N. Chronic lymphocytic leukemia. *Annals of Oncology*. 2010; 21(7): 154-164
7. Ghia P, Ferreri AJM, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2007; 64: 234-246
8. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic Lymphocytic Leukemia. *American Society of Hematology*. 2014; 163-179
9. Dearden CE, Johnson R, Pettengell R, Devereux S, Cwynarski K, Whittaker S, McMillan A. Guidelines for the management of mature T-cell and NK-cell neoplasms (excluding cutaneous T-cell lymphoma). *British Journal of Haematology*. 2011; 153(4): 1-56
10. Greer JP, Kinney MC, Loughran TP. T Cell and NK Cell Lymphoproliferative Disorders. *American Society of Hematology*. 2001; 259-274
11. Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, Morton LM, Jemal A, Flowers ChR. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. *A Cancer Journal for Clinicians*. 2016; 66(6): 1-31

12. Lemonnier F, Mak TW. Angioimmunoblastic T cell lymphoma: More than a disease of T follicular helper cells. *J Pathol.* 2017; 242:129-133
13. Willemsen M, Dielis WJHA, Samarska IV, Koster A, Marion A. A Rare Case of Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma with Epstein-Barr Virus Negative Reed-Sternberg-Like B-Cells, Chylous Ascites, and Chylothorax. *Case Reports in Hematology.* 2017; 1-6
14. Wang M, Zhang Sh, Chuang ShS, Ashton-Key M, Ochoa E, Bolli N, Vassiliou G, Gao Z, Du MQ. Angioimmunoblastic T cell lymphoma: novel molecular insights by mutation profiling. *Oncotarget.* 2017; 8(11):17763-17770
15. Ortolani C. *Flow Cytometry of Hematological Malignancies.* 1 leidimas. Blackwell Publishing Ltd. Italija: 2011.
16. Gorczyca W. *Atlas of Differential Diagnosis in Neoplastic Hematopathology.* 3 leidimas. CRC Press Taylor & Francis Group. JAV. 2013.
17. Suan D, Nguyen A, Moran I, Bourne K, Hermes RJ, Arshi M, Hampton HR, Tomura M, Miwa Y, Kelleher AD, Kaplan W, Deenick EK, Tangye SG, Brink R, Chtanova T, Phan TG. T Follicular Helper Cells Have Distinct Modes of Migration and Molecular Signatures in Naive and Memory Immune Responses. *Immunity* 2015;42: 704–718
18. Crotty S. Follicular Helper CD4 T Cells (T_{FH}). *Annu. Rev. Immunol.* 2011; 29: 621-663
19. Laurent C, Fazilleau N, Brousset P. A novel subset of T-helper cells: follicular T-helper cells and their markers. *haematologica* | 2010; 95(3): 356-358
20. Ma CS, Deenick EK, Batten M, Tangye SG. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *The Journal of Experimental Medicine.* 2010; 209(7): 1241-1250
21. King C, Tangye SG, Mackay CR. T Follicular Helper (T_{FH}) Cells in Normal and Dysregulated Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2008; 26: 741-7466
22. Vinuesa .G. Cook MC. Blood Relatives of Follicular Helper T Cells. *Immunity.* 2011; 34: 10-12
23. Vinuesa C.G, Linterman M.A, Goodnow C.C, Randall K.L. T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. *Immunological Reviews.* 2010; 237: 72–89
24. Ma CS, Deenick .K. Human T follicular helper (T_{fh}) cells and disease. *Immunology and Cell Biology.* 2014; 92: 64–71
25. Crotty S. T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity.* 2014; 41: 529-538

26. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012; 1-8
27. Lindqvist M, Lunzen J, Soghoian DZ, Kuhl BD, Ranasinghe S, Kranias G, Flanders MD, Cutler S, Yudanin N, Muller MI, Davis I, Farber D, Hartjen P, Haag F, Alter G, Wiesch JS, Streeck H. Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012; 122(9): 3271-3280
28. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T Cell Activation. *Annu Rev Immunol*. 2009 ; 27: 591-619
29. Sommers CL, Dejarnette JB, Huang K, Lee J, Khoury DE, Shores EW, Love PE. Function of CD3 ϵ -mediated Signals in T Cell Development. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000; 192(6): 913-919
30. Birnbaum ME, Berry R, Hsiao YS, Chen Z, Shingu-Vazquez MA, Yu X, Waghray D, Fischer S, McCluskey J, Rossjohn J, Walz T, Garcia KCh. Molecular architecture of the $\alpha\beta$ T cell receptor-CD3 complex. *PNS*. 2014; 111(49): 17576-17581
31. Call ME, Wucherpfennig KW. Molecular mechanisms for the assembly of the T cell receptor-CD3 complex. *Mol Immunol*. 2004; 40(18): 1295-1305
32. Yang H, Parkhouse RME, Wileman T. Monoclonal antibodies that identify the CD3 molecules expressed specifically at the surface of porcine $\gamma\delta$ -T cells. *Immunology*. 2005; 115: 189-196
33. Knapp W, Strobl H, Majdic O. Flow Cytometric Analysis of Cell-Surface and Intracellular Antigens in Leukemia Diagnosis. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)*. 1994; 18: 187-198
34. Chetty R, Gatter K. CD3: structure, function, and role of immunostaining in clinical practice. *Journal of pathology*. 1994; 173: 303-307
35. Guy C, Vignali DAA. Organization of proximal signal initiation at the TCR:CD3 complex. *Immunological Reviews*. 2009; 232:7-21
36. Hentati FZ, Gruy F, Iobagiu C, Lambert C. Variability of CD3 Membrane Expression and T Cell Activation Capacity. *Clinical Cytometry (Cytometry Part B)*. 2010; 78B: 105-114
37. Dongen J.J.M, Krissansen G.W, Wolvers-Tettero I.L.M, Cytoplasmic Expression of the CD3 Antigen as a Diagnostic Marker for Immature T-Cell Malignancies. *Blood Journal*. 1988; 71(3): 603-612

38. Koretzky GA. Multiple Roles of CD4 and CD8 in T Cell Activation. *The Journal of Immunology*. 2010; 185: 2643-2644
39. Mak TW, Saunders ME. *The Immune Response Basic and Clinical Principles*. Elsevier Academic Press. 1 edimas. JAV. 2006
40. Rudd ChE, Trevillyan JM, Dasgupta JD, Wong LL, Schlossman SF. The CD4 Receptor is Complexed in Detergent Lysates to a Protein-tyrosine Kinase (pp58) from Human T Lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988; 85(14): 5190-5194
41. Wang M, Misakian M, He HJ, Bajcsy P, Abbasi F, Davis JM, Cole KD, Turko IV, Wang L. Quantifying CD4+ receptor protein in two human CD4+ lymphocyte preparations for quantitative flow cytometry. *Clinical Proteomics*. 2014; 11(43): 1-10
42. Rubbert A, Behrens G, Ostrowski M. Pathogenesis of HIV-1 Infection. 2011. Internetinė prieiga: <https://hivbook.com/tag/cd4-receptor/>
43. Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Samelson LE, Bolen JB. Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane Tyrosine-protein kinase p56^{lck}. *Letters To Nature*. 1989; 338: 257-259
44. Ladygina N, Martin BR, Altman A. Dynamic Palmitoylation and the Role of DHHC Proteins in T Cell Activation and Anergy. *Advances in Immunology*. 2011; 109: 1-31
45. Nezlin R, Ghetie V. Interactions of Immunoglobulins Outside the Antigen-Combining Site. *advances in immunology*. 2004; 82: 155-201
46. Wang M, He HJ, Turko IV, Phinney KW, Wang L. Quantifying the Cluster of Differentiation 4 Receptor Density on Human T Lymphocytes Using Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2013; 1773-1777
47. Ashish, Juncadella IJ, Garg R, Boone ChD, Anguita J, Krueger JK. Conformational Rearrangement within the Soluble Domains of the CD4 Receptor Is Ligand-specific. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2008; 283(5): 2761-2772
48. Chan A.S.H, Reynolds P.J, Shimizu Y. Tyrosine kinase activity associated with the CD7 antigen: correlation with regulation of T cell integrin function. *Eur. J. Immunol*. 1994; 24: 2602-2608
49. Rogers SL, Zhao Y, Jiang X, Eaves CJ, Mager LD, Rouhi A. Expression of the leukemic prognostic marker CD7 is linked to epigenetic modifications in chronic myeloid leukemia. *Molecular Cancer*. 2010; 9(41): 1-14

50. Barcena A, Muench MO, Galy AHM, Cupp J, Roncarolo MG, Phillips JH, Spits H. Phenotypic and Functional Analysis of T - c e l l Precursors in the Human Fetal Liver and Thymus: CD7 Expression in the Early Stages of T- and Myeloid-Cell Development. *Blood Journal*. 1993; 82(11): 3401-3414
51. Hao QL, George AA, Zhu J, Barsky L, Zielinska E, Wang X, Price M, Ge Sh, Crooks GM. Human intrathymic lineage commitment is marked by differential CD7 expression: identification of CD7⁻ lympho-myeloid thymic progenitors. *Immunobiology*. 2008; 111(3): 1318-1325
52. Moll M, Reinhold U, Kukel S, Abken H, Muller R, Oltermann I, Kreysel H.W. CD7⁻ Negative Helper T Cells Accumulate in Inflammatory Skin Lesions. *The Journal Of Investigative Dermatology*. 1994; 102(3): 328-332
53. Satoh Ch, Tamura H, Yamashita T, Tsuji T, Dan K, Ogata K. Aggressive characteristics of myeloblasts expressing CD7 in myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. 2008; 33: 326-331.
54. Koh HS, Lee Ch, Lee KS, Ham ChS, Seong RhH, Kim .S, Jeon SH. CD7 expression and galectin-1-induced apoptosis of immature thymocytes are directly regulated by NF-κB upon T-cell activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008; 370: 149-153
55. Jung LKL, Roy AK, Chakkalath HR. CD7 Augments T Cell Proliferation via the Interleukin-2 Autocrine Pathway. *Cellular Immunology*. 1992; 141: 189-199
56. Pittaluga S, Raffeld M, Lipford EH, Cossman J. 3A1 (CD7) Expression Precedes T_β Gene Rearrangements In Precursor T (Lymphoblastic) Neoplasms. *Blood*. 1986; 68(1): 134-139
57. Ginaldi L, Matutes E, Farahat N, Martinis MD, Morilla R, Catovsky D. Differential expression of CD3 and CD7 in T-cell malignancies: a quantitative study by flow cytometry. *British Journal of Haematology*. 1996; 93: 921-927
58. Gerby, Clappier E, Armstrong F, Deswarte C, Calvo J, Poglio S, Soulier J, Boissel N, Leblanc T, Baruchel A, Landman-Parker J, Rome PH, Ballerini P, Pflumio F. Expression of CD34 and CD7 on human T-cell acute lymphoblastic leukemia discriminates functionally heterogeneous cell populations. *Leukemia*. 2011; 25: 1249-1258
59. Seegmiller AC, Karandikar NJ, Kroft SH, McKenna RW, Xu Y. Overexpression of CD7 in Classical Hodgkin Lymphoma-Infiltrating T Lymphocytes. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*. 2009; 76B: 169-174

60. Rappl G, Abken H, Muche JM, Sterry W, Tilgen W, Andre S, Kaltner H, Ugurel S, Gabius H.J, Reinhold U. CD4+CD7- leukemic T cells from patients with Sezary syndrome are protected from galectin-1-triggered T cell death. *Leukemia*. 2002; 16: 840-845
61. Pace KE, Hahn HP, Pang M, Nguyen JT, Baum LG. Cutting Edge: CD7 Delivers a Pro-Apoptotic Signal During Galectin-1-Induced T Cell Death. *The Journal of Immunology*. 2015; 165: 2331-2334.
62. Liu TY, Chen ChY, Tien HF, Lin ChW. Loss of CD7, independent of galectin-3 expression, implies a worse prognosis in adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Histopathology*. 2009; 54: 214-220
63. Marini O, Costa S, Bevilacqua D, Calzetti F, Tamassia N, Spina C, Sabata D, Tinazzi E, Lunardi C, Scupoli M.T, Cavallini Ch, Zoratti E, Tinazzi I, Marchetta A, Vassanelli A, Cantini M, Gandini G, Ruzzenente A, Guglielmi A, Missale F, Vermi W, Tecchio C, Cassatella M.A, Scapini P. Mature CD10+ and immature CD10- neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood*. 2017; 129(10): 1343-1356
64. Iwaya K, Ogawa H, Izumi M, Kuroda M, Mukai K. Stromal expression of CD10 in invasive breast carcinoma: a new predictor of clinical outcome. *Virchows Arch*. 2002; 440: 589-593
65. Fukusumi T, Ishii H, Konno M, Yasui T, Nakahara S, Takenaka Y, Yamamoto Y, Nishikawa S, Kano Y, Ogawa H, Hasegawa S, Hamabe A, Haraguchi N, Doki Y, Mori M, Inohara H. CD10 as a novel marker of therapeutic resistance and cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*. 2014; 111: 506-514
66. Satta V. M, Besancon R, Bachelard-Cascales E. Concise Review: Neutral Endopeptidase (CD10): A Multifaceted Environment Actor in Stem Cells, Physiological Mechanisms, And Cancer. *Stem Cells*. 2011; 29: 389-396
67. Bachelard-Cascales E, Chapellier M, Delay E, Pochon G, Voeltzel T, Puisieux A, Fromentel C.C, Maguer-Satta V. *Stem Cells*. 2010; 28: 1081-1088
68. Fleischmann A, Schlomm T, Huland H, Kollermann J, Simon Ph, Mirlacher M, Salomon G, Chun F.H.K, Steuber T, Simon R, Sauter G, Graefen M, Erbersdobler A. Distinct Subcellular Expression Patterns of Neutral Endopeptidase (CD10) in Prostate Cancer Predict Diverging Clinical Courses in Surgically Treated Patients. *American Association for Cancer Research*. 2008; 14(23): 7838-7842
69. Chu P, Arber DA. Paraffin-Section Detection of CD10 in 505 Nonhematopoietic Neoplasms. *Anatomic Pathology*. 2000; 113: 374-382

70. Kohn LA, Hao QL, Sasidharan R, Parekh Ch, Ge Sh, Zhu Y, Mikkola HKA, Crooks GM. Lymphoid priming in human bone marrow begins before expression of CD10 with upregulation of L-selectin. *Nature immunology*. 2012; 13(10): 963-973
71. Ame-Thomas P, Hoeller S, Artchounin C, Misiak J, Braza MS, Jean R, Priol J, Monvoisin C, Martin N, Gaulard Ph, Tarte K. CD10 delineates a subset of human IL-4 producing follicular helper T cells involved in the survival of follicular lymphoma B cells. *Blood*. 2015; 125(15): 2381-2384
72. Baseggio L, Traverse-Glehen A, Berger F, Ffrench M, Jallades L, Morel D, Goedert G, Magaud JP, Salles G, Felman P. CD10 and ICOS expression by multiparametric flow cytometry in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Modern Pathology*. 2011; 24: 993-1003
73. Attygalle A, Al-Jehani R, Diss TC, Munson Ph, Liu H, Du MQ, Isaacson PG, Dogan A. Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. *Blood*. 2002; 99(2): 627-633
74. Alexander DR. The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function. *Immunology*. 2000; 12: 349-359
75. Zhu J.W, Brdicka T, Katsumoto T.R, Lin J, Weiss A. Structurally Distinct Phosphatases CD45 and CD148 Both Regulate B Cell and Macrophage Immunoreceptor Signaling. *Immunity*. 2008; 28: 183-196
76. Saunders AE, Johson P. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. *Cellular Signalling*. 2010; 22: 339-348
77. Hermiston ML, Zikherman J, Zhu JW. CD45, CD148, and LypPep: critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells. *Immunological Reviews*. 2009; 228: 288-311
78. Nam HJ, Poy F, Saito H, Frederick Ch. Structural basis for the function and regulation of the receptor protein tyrosine phosphatase CD45. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005; 201(3): 441-452
79. Rhee I, Veillette A. Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. *Nature immunology*. 2012; 13(5): 439-447
80. Gabaev I, Steinbruck L, Pokoyski C, Pich A, Stanton RJ, Schwinzer R, Schulz TF, Jacobs R, Messerle M, Kay-Fedorov PC. The Human Cytomegalovirus UL11 Protein Interacts with the Receptor Tyrosine Phosphatase CD45, Resulting in Functional Paralysis of T Cells. *PLoS Pathogens*. 2011; 7(12): 1-13

81. Wiede F, Shields B.J, Chew S.H, Kyparissoudis K, Vliet C, Galic S, Tremblay M.L, Russell S.M, Godfrey D.I, Tiganis T. T cell protein tyrosine phosphatase attenuates T cell signaling to maintain tolerance in mice. *The Journal of Clinical Investigations*. 2011; 121(12): 4758-4774
82. Porcu M, Kleppe M, Gianfelici V, Geerdens E, Keersmaecker KD, Tartaglia M, Foa R, Soulier J, Cauwelier B, Uyttebroeck A, Macintyre E, Vandenberghe P, Asnafi V, Cools J. Mutation of the receptor tyrosine phosphatase PTPRC (CD45) in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012; 119(19): 4476-4479
83. Rusak M, Eljaszewicz A, Bołkun L, Łuksza E, Łapuć I, Piszcz J, Singh P, Dąbrowska M, Bodzenta-Łukaszyk A, Kłoczko J, Moniuszko M. Prognostic significance of PD-1 expression on peripheral blood CD4+ T cells in patients with newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. 2015; 125(7-8): 553-558
84. Keir ME, Butte, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *The Annual Review of Immunology*. 2008; 26: 677-704.
85. Lin SJ, Peacock CD, Bahl K, Welsh RM. Programmed death-1 (PD-1) defines a transient and dysfunctional oligoclonal T cell population in acute homeostatic proliferation. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007; 204(10): 2321-2333
86. Hina K, Gucalp R, Shapira I. Evolving Concepts: Immunity in Oncology from Targets to Treatments. *Journal of Oncology*. 2015; 1-15
87. Cogbill ChH, Swerdlow SH, Gibson S.E. Utility of CD279/PD-1 Immunohistochemistry in the Evaluation of Benign and Neoplastic T-Cell-Rich Bone Marrow Infiltrates. *Am J Clin Pathol*. 2014; 142: 88-98
88. Topalian SL, Drake ChG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Current Opinion in Immunology*. 2012; 24: 207-212
89. Riley JL, PD-1 signaling in primary T cells. *Immunological Reviews*. 2009; 229: 114-125
90. Kantekure K, Yang Y, Raghunath P, Schaffer A, Woetmann A, Zhang Q, Odum N, Wasik M. Expression patterns of the immunosuppressive proteins PD-1/ CD279 and PD-L1/CD274 at different stages of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)/mycosis fungoides (MF). *Am J Dermatopathol*. 2012; 34(1): 126-128
91. Ribas A. Tumor Immunotherapy Directed at PD-1. *The New England Journal of Medicine*. 2014; 366(26): 2517-2519
92. Greaves P, Gribben JG. The role of B7 family molecules in hematologic malignancy. *Blood Journal*. 2012; 121(5): 734-741

93. Forster R, Emrich T, Kremmer E, Lipp M. Expression of the G-Protein-Coupled Receptor BLR1 Defines Mature, Recirculating B Cells and a Subset of T-Helper Memory Cells. *Blood Journal*. 1994; 84(3): 830-840
94. Muller G, Hopken UE, Lipp M. The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. *Immunological Reviews*. 2003; 195: 117-135
95. Chevalier N, Jarrossay D, Ho E, Avery DT, Ma CS, Yu MD, Sallusto F, Tangye SG, Mackay ChR. CXCR5 Expressing Human Central Memory CD4 T Cells and Their Relevance for Humoral Immune Responses. *The Journal of Immunology*. 2011; 186: 5556-5568
96. Moser B, Schaerli P, Loetscher P. CXCR5+ T cells: follicular homing takes center stage in T-helper-cell responses. *TRENDS in Immunology*. 2002; 23(5): 250-254
97. Durig J, Schmucker U, Duhrsen U. Differential expression of chemokine receptors in B cell malignancies. *Leukemia*. 2001; 15: 752-756
98. Burkle A, Niedermeier M, Schmitt-Graff A, Wierda WG, Keating MJ, Burger JA. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood Journal*. 2007; 110(9): 3316-3325
99. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, Forster R. Follicular B Helper T Cells Express CXC Chemokine Receptor 5, Localize to B Cell Follicles, and Support Immunoglobulin Production. *Journal of Experimental Medicine*. 2000; 192(11): 1545-1551
100. Hardtke S, Ohl L, Forster R. Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help. *Blood Journal*. 2004; 106(6): 1924-1930
101. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 9 leidimas. ELSEVIER. JAV. 2015
102. Haynes NM, Allen ChDC, Lesley R, Ansel KM, Killeen N, Cyster JG. Role of CXCR5 and CCR7 in Follicular Th Cell Positioning and Appearance of a Programmed Cell Death Gene-1^{Hig} Germinal Center-Associated Subpopulation. *The Journal of Immunology*. 2007; 179: 5099-5108
103. Zabriskie JB. *Essential Clinical Immunology*. Cambridge University Press. 1 leidimas. Didžioji Britanija. 2009
104. Volcheck GW. *Clinical Allergy: Diagnosis and Managment*. 1 leidimas. Humana Press. Springer. JAV.

105. Nielsen M, Lundegaard C, Blicher T, Peters B, Sette A, Justesen S, Buus S, Lund O. Quantitative Predictions of Peptide Binding to Any HLADR Molecule of Known Sequence: NetMHCIIpan. *PLoS Computational Biology*. 2008; 4(7): 1-10
106. Nagy Z, Hubner B, Lohning C, Rauchenberger R, Reiffert S, Thomassen-Wolf E, Zahn S, Leyer S, Schier EM, Zahradnik, Brunner Ch, Lobenwein K, Rattel B, Stanglmaier M, Hallek M, Wing M, Anderson S, Dunn M, Kretzschmar T, Tesar M. Fully human, HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells. *Nature Medicine*. 2002; 8(8): 801-807
107. Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler D.A. MHC Class II Expression Identifies Functionally Distinct Human Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*. 2006; 176: 4622-4631
108. Wang P, Sidney J, Kim Y, Sette A, Lund O, Nielsen M, Peters B. Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC Bioinformatics*. 2010; 11: 1-12
109. Amatruda TT, Bohman R, Ranyard J, Koeffler HP. Pattern of Expression of HLA-DR and HLA-DQ Antigens and mRNA in Myeloid Differentiation. *Blood Journal*. 1987; 69(4): 1225-1236
110. Takeshima SN, Sarai Y, Saitou N, Aida Y. MHC class II DR classification based on antigen-binding groove natural selection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009; 385: 137-142
111. Wetzler M, McElwain BK, Stewart CC, Blumenson L, Mortazavi A, Lord LA, Slack JK, Barcos M, Ferrone S, Baer MR. HLA-DR antigen-negative acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2003; 17: 707-715
112. Elzubeir AM, Alaaldeen N, Osman, Ali D, Mohamad A, Angi AM, Rahoum HM, Ismail A, Mohammed M, Yousef MM, Khair SM, Ali O. Prognostic Significance of HLA-DR Expression in Sudanese Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *International Journal of Multidisciplinary and Current Research*. 2016; 4: 2321-3124
113. Higashi M, Tokuhira M, Fujino S, Yamashita T, Abe K, Arai E, Kizaki M, Tamaru JI. Loss of HLA-DR expression is related to tumor microenvironment and predicts adverse outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*. 2015; 1-6
114. Os A, Burgler S, Ribes AP, Funderund A, Wang D, Thompson KM, Tjønnfjord GE, Bogen B, Munthe LA. Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Are Activated and Proliferate in Response to Specific T Helper Cells. *Cell Reports*. 2013; 4: 566-577

115. Macheta A, Radko K, Szymczyk A, Podhorecka M. The Technique Of Flow Cytometry In Diagnostic Research. *Advances in Science and Technology Research Journal*. 2013; 19(7): 55-59
116. Brown M, Wittwer C. *Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. Clinical Chemistry*. 2000; 46(8B): 1221, 1229
117. Leach M, Drummond M, Doig A. *Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis*. 1 leidimas. John Wiley & Sons, Ltd. Didžioji Britanija. 2015
118. Matuzevičienė R. *Tėkmės Citometrija Ir Jos Taikymas Laboratorinėje Medicinoje*. 1 leidimas. 5 Spaudos lankai. 2013
119. Gaulard Ph, Leval L. Follicular helper T cells: implications in neoplastic hematopathology. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2011; 25: 202-213
120. Ahearne M, Allchin R, Fox ChP, Wagner SD. Follicular helper T-cells: expanding roles in T-cell lymphoma and targets for treatment. *British Journal of Haematology*. 2014; 166: 326-335
121. Schmitt N, Bentebibel SE, Ueno H. Phenotype and Functions of Memory Tfh cells in Human Blood. *Trends Immunol*. 2014; 35(9): 436-442
122. Laurent C, Fazilleau N, Brousset P. A novel subset of T-helper cells: follicular T-helper cells and their markers. *Haematologica*. 2010; 95(3): 356-358
123. Lopez-Ocasio MD, Shevach EM, T Follicular Regulatory (TFR) Cells Regulate B Cell Responses By Targeting TF Helper (TFH) Cells. *The Journal of Immunology*. 2017; 198(1): 223
124. Pileri SA. Follicular helper T-cell-related lymphomas. *Blood Journal*. 2015; 126(15): 1733-1734
125. Huang Y, Moreau A, Dupuis J, Streubel B, Petit B, Gouill S, Martin-Garcia N, Copie-Bergman Ch, Gaillard F, Qubaja M, Fabiani B, Roncador G, Haioun C, Delfau-Larue MH, Marafioti T, Chot A, Gaulard Ph, Peripheral T-cell lymphomas with a follicular growth pattern are derived from follicular helper T cells (TFH) and may show overlapping features with angioimmunoblastic T-cell lymphomas. *American Journal of Surgical Pathology*. 2009; 33(5): 682-690
126. Shnan CK, Warnke RA, Arber DA, Natkunam Y. PD-1 Expression In T-Cell Lymphomas And Reactive Lymphoid Entities: Potential Overlap In Staining Patterns Betw Een Lymphoma And Viral Lymphadenitis. *Am J Surg Pathol*. 2010; 34(2): 178-198

127. Giannopoulos K, Grzywnowicz M, Karabon L, Piechnik A, Zajac M, Skorka K, Zaleska J, Tomczak W, Wlasiuk P, Frydecka I, Dmoszynska A. In Chronic Lymphocytic Leukemia PD-1 Is Expressed Independently From PDCD1 Gene Polymorphisms and Does Not Influence BCR Signaling. *Blood Journal*. 2013; 122: 1625-1630
128. Cogbill CH, Swerdlow SH, Gibson SE. Utility of CD279/PD-1 Immunohistochemistry in the Evaluation of Benign and Neoplastic T-Cell-Rich Bone Marrow Infiltrates. *American Journal of Clinical Pathology*. 2014; 142: 88-98
129. Palma M, Gentilcore G, Heimersson K, Mozaffari F, Näsman-Glaser B, Young E, Rosenquist R, Hansson L, Österborg A, Mellstedt H. T cells in chronic lymphocytic leukemia display dysregulated expression of immune checkpoints and activation markers. *Haematologica*. 2017; 102(3): 562-572
130. Novelli M, Fava P, Sarda C, Ponti R, Osella-Abate S, Savoia P, Bergallo M, Lisa F, Fierro MT, Quaglino P. Blood Flow Cytometry in Sézary Syndrome New Insights on Prognostic Relevance and Immunophenotypic Changes During Follow-up. *American Journal of Clinical Pathology*. 2015; 143: 57-69
131. Jennings CD, Foon KA. Recent Advances in Flow Cytometry: Application to the Diagnosis of Hematologic Malignancy. *Blood Journal*. 1997; 90(8): 2863-2892
132. Dianzani U, Ornedo P, Marmont F, DiFranco D, Fusaro A, Bragardo M, Redoglia Y, Giaretta F, Mairone L, Boccadoro M, Resegotti L, Pileri A. Expansion of T Cells Expressing Low CD4 or CD8 Levels in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: Correlation With Disease Status and Neoplastic Phenotype. *Blod Journal*. 1994; 83(8): 2198-2205
133. Matsushima G, Itoh-Lindstrom Y, Ting Jp. ctivation of the HLA-DRA Gene in Primary Human T Lymphocytes: Novel Usage of TATA and the X and Y Promoter Elements. *Molecular And Cellular Biology*. 1992; 12(12): 5610-5619

PRIEDAS Nr. 1

T_{FH} B limfocitų paplitimo palyginimas 5 grupėse kaulų čiulpuose ir periferiniame kraujyje.

Ląstelių populiacijos	Kaulų čiulpai		Periferinis kraujas	
	χ^2 statistika	p-reikšmė	χ^2 statistika	p-reikšmė
T_{FH}	24.690	0.000	8.784	0.067
B limfocitai	41.211	0.000	52.337	0.000

PRIEDAS Nr. 2

Ląstelių žymenų vidutinis kiekis 5 grupėse periferiniame kraujyje.

		Periferinis kraujas					
		BA	RP	BLLL	KBLLL	KTLLL	Bendra imtis
Folikuliniai T limfocitai- pagalbininkai	CD3	22817.33 (30119.2)	16214.26 (23727.7)	13748.6 (21741.7)	9645.15 (19271.7)	2627.6 (890.1)	13196.27 (21947.5)
	CD4	7290.83 (888.4)	7666.37 (1356)	7740.32 (729.8)	7875.63 (835.7)	6806 (1144.3)	7688.54 (941.7)
	CD7	6579.33 (3471.6)	6945.42 (4001.5)	6712.9 (8041.4)	7793.15 (3685)	11619.6 (8863.7)	7315.97 (5855.3)
	CD10	600.58 (501.3)	2940.37 (4969.3)	1852.37 (5184.1)	1110.38 (1855)	3407.4 (5189.1)	1713.44 (3979.8)
	CD45	26521.58 (9329.7)	26714.95 (9373.5)	30581.46 (9814.6)	26415.3 (7961.6)	29074.8 (6767.5)	28048.45 (9042.1)
	CD279	913.25 (204.1)	1064.26 (573.3)	970.83 (305.4)	1030.78 (336.4)	825.8 (150.9)	994.39 (359.6)
	CXCR5	3105.42 (844)	3159.53 (646.3)	3331.9 (794.1)	3511.58 (863.4)	2714.2 (1087.2)	3315.71 (823.8)
	ŽLA-DR	1126.08 (1132.5)	2061.11 (2385.1)	1689.41 (1321.5)	1897.33 (2421.9)	1376.6 (654.1)	1749.71 (1914.2)
Kiti T limfocitai- pagalbininkai	CD3	23884.83 (31692.5)	15688.26 (23032.7)	13583 (21489)	9469.88 (18785.5)	2504.8 (948.2)	13097.71 (21868)
	CD4	7825.42 (989.1)	7384.37 (1356)	7991.61 (854.2)	9677.55 (11273.8)	6556.6 (1635.3)	8391.02 (6665.2)
	CD7	12306.5 (8201.7)	8704.37 (5848.4)	8912.83 (4853)	11684.7 (5366.6)	11041.6 (5371.4)	10265.67 (5716.9)
	CD10	229.08 (157.6)	591.53 (1119)	475.17 (1790.6)	369.05 (1085.7)	242.4 (83.7)	422.6 (1307.9)
	CD45	23125.33 (8369.3)	23270.84 (8808.9)	27104.83 (9401)	22651.88 (7889.9)	25351.8 (5003.7)	24476.77 (8660.3)
	CD279	112.25 (82.3)	159.79 (164.8)	136.85 (124.7)	165.2 (127.4)	149.2 (148.3)	148.27 (129.4)
	CXCR5	160.08 (59.1)	143.47 (55.1)	134.22 (57)	137.18 (45.3)	132 (30.7)	139.29 (52)
	ŽLA-DR	1086.42 (1007.2)	2098.89 (3051.3)	1107.73 (916.5)	1367.98 (2275.7)	1087.6 (409.7)	1354.62 (1923.6)

Ląstelių žymenų vidutinis kiekis 5 grupėse kaulų čiulpuose.

		Kaulų čiulpai					
		BA	RP	BLLL	KBLLL	KTLLL	Bendra imtis
Folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai	CD3	17036.43 (23549)	7958.24 (16839.5)	26080.83 (25790.2)	9716.79 (15846.6)	17195.5 (22440.2)	13577.12 (20812.4)
	CD4	6834.15 (872.6)	7153.3 (750.3)	6939.33 (544)	6783.31 (1092.4)	6790.33 (585.1)	6905.02 (877.5)
	CD7	7083.2 (4215.8)	10240.03 (6298.1)	5979 (4837.7)	8430.83 (5403.2)	9234.67 (5886.6)	8207.56 (5263.1)
	CD10	585.76 (612.4)	563.27 (417.6)	768 (717.6)	825.14 (1013)	416.83 (264.6)	632.98 (678.4)
	CD45	26990.68 (9398.8)	29882.39 (8064.1)	19669.67 (5654.4)	26012.28 (9842)	25979.67 (7002.9)	27118.95 (9108.4)
	CD279	1143.46 (426.6)	1121.79 (382.3)	1448.67 (399.8)	1688.62 (1080.7)	1225.5 (468.9)	1274.42 (655.9)
	CXCR5	2566.64 (759.6)	2302.03 (589.4)	2439.17 (391.9)	2347.93 (562.1)	2658.33 (1066.3)	2451.68 (685.2)
	ŽLA-DR	1290.64 (1148.1)	1492.36 (1177.1)	1404 (948.4)	2363.48 (2913.9)	1800.33 (2312.4)	1602.73 (1769.2)
Kiti T limfocitai-pagalbininkai	CD3	17739.12 (24812)	8274.27 (17677.1)	26383.83 (25996)	10703.38 (17803.1)	19667.33 (25610)	14307.77 (22091.4)
	CD4	7250.49 (896.5)	7450.06 (776.5)	7020.17 (480.6)	7116.41 (1060.6)	6654.33 (1318.1)	7233.49 (919)
	CD7	11077.1 (6381.6)	12664.88 (6700.9)	8953.67 (7488.4)	11504.69 (5757.3)	9103.33 (4877.3)	11379.46 (6308.4)
	CD10	198.78 (104.6)	210.27 (186.7)	153.67 (23.4)	342.83 (522.8)	211.17 (128.7)	231.56 (274.7)
	CD45	23952.39 (8881.8)	26897.36 (8235.6)	16872.5 (5390.4)	23018.28 (9285.2)	23400 (7770.5)	24135.11 (8797.7)
	CD279	187.05 (154.6)	286.24 (286.8)	356.5 (305.7)	374.24 (315.7)	349.17 (331)	267.44 (255.8)
	CXCR5	164.29 (62.8)	150.3 (64.4)	182.67 (55.8)	158.66 (56.1)	160.67 (69.7)	160.26 (61.4)
	ŽLA-DR	1013.71 (930)	1415.42 (1006.7)	896 (530.3)	1678.48 (2207.2)	1649 (1464.5)	1281.68 (1354.7)

PRIEDAS Nr. 3

AIBL neoplazijoje nustatyti T_{FH}, kitų T limfocitų-pagalbininkų ir CD7⁻CD3⁺CD4⁺ T limfocitų žymenų kiekiai.

Folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai							
CD4	CD7	CD10	CD45	CD279	CXCR5	ŽLA-DR	
7706	844	397	18469	5623	613	915	
9929	8959	2320	35717	1206	2110	4391	
8817,5 (1571,90)	4901,5 (5738,17)	1358,5 (1359,77)	27093 (12196,18)	3424,5 (3123,29)	1361,5 (1058,54)	2653 (2457,9)	

Atvejo Nr.	Amžiu	Folikuliniai T limfocitai-pagalbininkai %	CD3
2	46	1,96	54
Vidurkis (Standartinis nuokrypis)	60 (19,80)	27,38 (35,95)	23471 (33116,63)