

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ И ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЕ Т-КЛЕТОЧНОЙ КЛОНАЛЬНОСТИ В РАЗГРАНИЧЕНИИ ОПУХОЛЕВОЙ И РЕАКТИВНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ БОЛЬШИХ ГРАНУЛЯРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Flow cytometry and PCR-based T-cell clonality testing for discriminating between reactive and neoplastic proliferation of large granular lymphocytes

Чернова Н. Г.¹, Сидорова Ю. В.¹, Захарько Е. И.¹, Наумова Е. В.², Рыжикова Н. В.¹, Гальцева И. В.¹, Дvirnyk В. Н.¹, Смирнова С. Ю.¹, Судариков А. Б.¹, Кохно А. В.¹, Моисеева Т. Н.¹, Луговская С. А.², Звонков Е. Е.¹, Савченко В. Г.¹

Chernova N. G.¹, Sidorova Yu. V.¹, Zakharko E. I.¹, Naumova E. V.², Ryzhikova N. V.¹, Galtseva I. V.¹, Dvirnyk V. N.¹, Smirnova S. Yu.¹, Sudarikov A. B.¹, Kokhno A. V.¹, Moiseeva T. N.¹, Lugovskaya S. A.², Zvonkov E. E.¹, Savchenko V. G.¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

¹ National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

² Кафедра клинической лабораторной диагностики ФГБУЗ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² Department of clinical laboratory diagnostics, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

РЕЗЮМЕ

Введение. Пролиферация больших гранулярных лимфоцитов (БГЛ) может быть ассоциирована с вирусной инфекцией, аутоиммунными заболеваниями или быть проявлением хронического лимфопролиферативного заболевания НК-клеток (ХЛПЗ-НК) и Т-клеточного лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов (Т-ЛБГЛ). Дифференциальная диагностика пролиферации БГЛ до сих пор представляет определенные трудности.

Цель: оценить значение иммунофенотипирования методами проточной цитометрии и ПЦР-исследования Т-клеточной клональности в разграничении реактивной и опухолевой пролиферации БГЛ.

Материалы и методы. Проведен анализ основных клинико-лабораторных показателей у 68 пациентов с БГЛ-лимфоцитозом (20 мужчин и 48 женщин) в возрасте от 22 до 79 лет (медиана возраста 53 года). Всем больным было выполнено цитологическое исследование мазка периферической крови, иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови методом проточной цитометрии, исследование Т-клеточной кло-

ABSTRACT

Background. Proliferation of large granular lymphocytes (LGL) can be associated with viral infections, autoimmune disorders, chronic lymphoproliferative disorder of NK-cells (CLPD-NK), or T-cell large granular lymphocytic leukemia (T-LGL). Differential diagnosis between reactive and neoplastic LGL proliferation could be a challenge.

Objective. To evaluate the role of morphological, immunophenotypic (flow cytometry) and molecular genetic (PCR-based T-cell clonality) studies in differential diagnosis of LGL proliferation.

Materials and methods. 68 patients with increased peripheral blood LGL counts were enrolled in the study. Male/female ratio was 20/48; the median age was 53 (22–79) years. Blood smear, immunophenotyping by flow cytometry, and PCR-based T-cell clonality assays (TCRG (Vγ-Jγ) and TCRG (Dβ-Jβ and Vβ-Jβ)) were performed in all cases.

Results. We found that morphology, immunophenotype, relative and absolute LGL counts, or heterogenic expression of T-cell markers can not distinguish between

нальности методом ПЦР по реаранжировкам генов γ - и β -цепей Т-клеточного рецептора.

Результаты. В результате исследования было показано, что морфологические и иммунофенотипические признаки, относительный и абсолютный лимфоцитоз, гетерогенность экспрессии Т-клеточных маркеров не позволяют разграничить опухолевую и реактивную пролиферацию БГЛ. Наиболее специфичным для разграничения реактивного и опухолевого БГЛ-лимфоцитоза оказалось одновременное выявление моноклональности по *TCRG* ($V\gamma$ - $J\gamma$) и *TCRG* ($V\beta$ - $J\beta$) локусам или выявление полной реаранжировки *TCRG* ($V\beta$ - $J\beta$).

Ключевые слова: большие гранулярные лимфоциты, хроническое лимфопролиферативное заболевание НК-клеток, Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов, проточная цитометрия, ПЦР-исследование Т-клеточной клональности, клональные реаранжировки

Для цитирования: Чернова Н. Г., Сидорова Ю. В., Захарько Е. И., Наумова Е. В., Рыжикова Н. В., Гальцева И. В., Двирнык В. Н., Смирнова С. Ю., Судариков А. Б., Кохно А. В., Моисеева Т. Н., Луговская С. А., Звонков Е. Е., Савченко В. Г. Проточная цитометрия и ПЦР-исследование Т-клеточной клональности в разграничении опухолевой и реактивной пролиферации больших гранулярных лимфоцитов. Гематология и трансфузиология. 2018; 63(2):124–133 doi: 10.25837/HAT.2018.48..2..003

Для корреспонденции: Чернова Наталья Геннадьевна, к. м. н., врач-гематолог отделения интенсивной высокодозной химиотерапии лимфом с круглосуточным и дневным стационаром ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, 126167, г. Москва, Россия E-mail: ngchernova@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 19.03.18

Принята к печати 15.10.2018

neoplastic and reactive LGL proliferation. Clonal *TCRG* ($V\gamma$ - $J\gamma$) and *TCRG* ($D\beta$ - $J\beta$) gene rearrangements were observed in reactive LGL lymphocytes and T-LGL. Complete rearrangements of *TCRG* ($V\beta$ - $J\beta$) genes were specific for malignancies and were not detected in any case of reactive lymphocytosis.

Keywords: large granular lymphocytes, chronic lymphoproliferative disorder of NK-cells, T-cell large granular lymphocytic leukemia, flow cytometry, PCR-based T-cell clonality testing, reactive lymphocytosis

For citation: Chernova N. G., Sidorova Yu. V., Zakharko E. I., Naumova E. V., Ryzhikova N. V., Galtseva I. V., Dvirnyk V. N., Smirnova S. Yu., Sudarikov A. B., Kokhno A. V., Moiseeva T. N., Lugovskaya S. A., Zvonkov E. E., Savchenko V. G. Flow cytometry and PCR-based T-cell clonality testing for discriminating between reactive and neoplastic proliferation of large granular lymphocytes. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2018; 63(2):124–133 (in Russian) doi: 10.25837/HAT.2018.48..2..003

For correspondence: Chernova Natalia, MD, PhD, hematologist in National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: ngchernova@mail.ru

Information about authors:

Chernova N. G., <http://orcid.org/0000-0002-0827-4052>;
Sidorova Yu. V., <http://orcid.org/0000-0003-1936-0084>;
Zakharko E. I., <https://orcid.org/0000-0002-1884-352X>;
Naumova E. V., <http://orcid.org/0000-0002-6048-5746>;
Ryzhikova N. V., <http://orcid.org/0000-0003-2424-9524>;
Galtseva I. V., <https://orcid.org/0000-0002-8490-6066>;
Dvirnyk V. N., <http://orcid.org/0000-0002-9877-0796>;
Smirnova S. Yu., <http://orcid.org/0000-0001-6220-8868>;
Sudarikov A. B., <https://orcid.org/0000-0001-9463-9187>;
Kokhno A. V., <http://orcid.org/0000-0003-0261-5941>;
Moiseeva T. N., <https://orcid.org/0000-0001-9591-8508>;
Lugovskaya S. A., <http://orcid.org/0000-0002-6405-3422>;
Zvonkov E. E., <http://orcid.org/0000-0002-2639-7419>;
Savchenko V. G., <https://orcid.org/0000-0001-8188-5557>.

Financial disclosure. The study had no sponsorship.

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

Received 19 Mar 2018

Accepted 15 Oct 2018

Введение

Термин «Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов» ввел Т. Loughran в 1993 г. для описания клональной пролиферации зрелых посттимических клеток [1]. Большие гранулярные лимфоциты (БГЛ) — это антигенпримированные цитотоксические Т-, НКТ-лимфоциты и НК-клетки [2]. В норме у взрослого человека БГЛ составляют 10–15% общего числа мононуклеарных клеток периферической крови [3]. Большинство БГЛ представлено $CD3^{--}$ НК-клетками, и

лишь около 15% составляют $CD3^{+}$ цитотоксические Т- и НКТ-лимфоциты. Клональная пролиферация $CD3^{--}/CD56^{+}$ -клеток в классификации ВОЗ (2017) обозначена термином «хроническое лимфопролиферативное заболевание НК-клеток» (ХЛПЗ-НК), а $CD3^{+}/CD8^{+}$ -клеток — термином «Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов» (Т-ЛБГЛ). Клональная пролиферация цитотоксических Т-лимфоцитов составляет около 85% всех случаев БГЛ-лимфопролиферации [4].

Т-ЛБГЛ диагностируют преимущественно в возрасте 55–60 лет [5, 6]. В литературе не отмечено значительных различий в заболеваемости мужчин и женщин или в географическом распространении болезни. Этиология Т-ЛБГЛ до конца не известна, однако отмечена четкая связь с аутоиммунными заболеваниями. У 30% больных наблюдается сочетание Т-ЛБГЛ с ревматоидным артритом, при других ревматологических заболеваниях Т-ЛБГЛ встречается значительно реже [7–9]. При Т-ЛБГЛ в гемограмме наблюдается относительный и/или абсолютный БГЛ-лимфоцитоз. При цитологическом исследовании мазка периферической крови опухолевые БГЛ не отличаются от нормальных: лимфоциты средних или крупных размеров с эксцентрично расположенным ядром, умеренно конденсированным хроматином, обильной слабо базофильной цитоплазмой, грубыми и/или нежными азурофильными гранулами [4]. Общее количество лейкоцитов может быть нормальным или слегка повышенным, у 85% больных наблюдается гранулоцитопения (количество гранулоцитов не превышает $0,5 \times 10^9/\text{л}$), у 50% — анемия, у 20% — тромбоцитопения [4].

Опухолевые лимфоциты при Т-ЛБГЛ, как и их нормальные аналоги, имеют зрелый цитотоксический Т-клеточный иммунофенотип и экспрессируют поверхностные маркеры CD3, CD8, CD2, CD16, CD56, CD57 [4]. В отличие от нормальных БГЛ, на опухолевых клетках наблюдается снижение и/или отсутствие и/или гетерогенность экспрессии Т-клеточных маркеров, в частности CD2, CD5, CD7 [10]. По наличию Т-клеточных маркеров CD3, CD4 и CD8 на поверхности опухолевых клеток выделяют 4 иммунофенотипических варианта: CD8-позитивный (CD3⁺CD4⁺CD8⁺), CD4-позитивный (CD3⁺CD4⁺CD8⁻), дубль-позитивный (CD3⁺CD4⁺CD8⁺), дубль-негативный (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) [3, 11, 12]. В зависимости от типа Т-клеточного рецептора (TCR) выделяют два варианта Т-ЛБГЛ: $\gamma\delta$ и $\alpha\beta$. В большинстве случаев Т-ЛБГЛ имеется реаранжировка генов β -цепи TCR (*TCRB*), в редких случаях *TCRB* остается в герминальной конфигурации, и имеется реаранжировка только γ -цепи TCR (*TCRG*) [13].

Диагноз Т-ЛБГЛ устанавливают на основании повышения в периферической крови показателей БГЛ с характерной морфологией и иммунофенотипом выше $2 \times 10^9/\text{л}$ в течение более чем 6 мес без какой-либо причины [4, 11]. Однако на сегодняшний день нет единого мнения относительно того, какие значения БГЛ-лимфоцитоза достаточны для верификации диагноза Т-ЛБГЛ [11]. Считается, что реактивный БГЛ-лимфоцитоз не должен превышать $0,5 \times 10^9/\text{л}$, а для Т-ЛБГЛ характерно большее количество БГЛ. Если количество БГЛ в периферической крови превышает $2,0 \times 10^9/\text{л}$, диагноз Т-ЛБГЛ не вызывает сомнений [4].

В этой статье представлен собственный опыт дифференциальной диагностики БГЛ-лимфоцитоза, иммунофенотипические и молекулярные аспекты верификации Т-ЛБГЛ и реактивного лимфоцитоза.

Цель работы — оценить значение иммунофенотипирования методом проточной цитометрии и ПЦР-исследования Т-клеточной клональности в разграничении реактивной и опухолевой пролиферации БГЛ.

Материалы и методы

Проведен анализ основных клинико-лабораторных показателей у 68 пациентов с БГЛ-лимфоцитозом (20 мужчин и 48 женщин) в возрасте от 22 до 79 лет (медиана возраста 53 года), обратившихся в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России с 2010 по 2017 год.

Всем больным было выполнено цитологическое исследование мазка периферической крови, иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови методом проточной цитометрии, исследование Т-клеточной клональности методом ПЦР по реаранжировкам генов γ - и β -цепей Т-клеточного рецептора. БГЛ-лимфоцитоз верифицировался при выявлении в лейкоцитарной формуле увеличенного количества БГЛ (более 10–15% мононуклеарных клеток или более 5% всех лейкоцитов) при наличии относительного и/или абсолютного лимфоцитоза по данным клинического анализа крови и иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови методом проточной цитометрии. Комплексное клинико-лабораторное обследование, в том числе исследование пунктата костного мозга, проводили при подозрении на Т-ЛБГЛ, ХЛПЗ-НК или другие заболевания кроветворной системы.

Иммунофенотипическое исследование образцов периферической крови и костного мозга выполняли методом многоцветной проточной цитометрии на FACS Canto II (Becton Dickinson, США) или проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США) с использованием реагентов производства Becton Dickinson, BeckmanCoulter и Dako. Диагностические панели включали CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16, CD45, CD56, CD57, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$.

Оценку Т-клеточной клональности проводили по реаранжировкам генов γ - и β -цепей TCR ($V\gamma$ -J γ и $V\beta$ -J β , D β -J β). Для этого использовали метод мультиплексной ПЦР по протоколу BIOMED-2 [14] и последующий фрагментный анализ на секвенаторе ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Флюоресценцию амплификатов и их профиль (распределение по длинам) оценивали при помощи компьютерной программы GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems, США).

Результаты

На основании проведенного обследования пациентов с БГЛ-лимфоцитозом было выделено три группы: 1-я группа (n = 8) — хроническое ХЛПЗ-НК; 2-я группа (n = 42) — Т-ЛБГЛ; 3-я группа (n = 17) — реактивный БГЛ-лимфоцитоз. У 1 больного наблюдалось развитие лимфомы Ходжкина на фоне Т-ЛБГЛ.

Среди 8 больных ХЛПЗ-НК было 5 мужчин и 3 женщины, медиана возраста — 55,5 (37–69) года (табл. 1) Средние показатели лейкоцитов были $10,3 (2,7–18,6) \times 10^9/\text{л}$, нейтрофилов — $2,78 (1,03–5,72) \times 10^9/\text{л}$, лимфоцитов — $6,8 (1,4–13,3) \times 10^9/\text{л}$, гемоглобина — 135 (86–160) г/л, тромбоцитов — $282 (161–383) \times 10^9/\text{л}$. Среднее содержание лимфо-

цитов составило 63 (50–79)%, нейтрофилов — 29 (19–40)%.

В большинстве случаев размер селезенки оставался в пределах нормы, и только у 1 больного продольный размер превышал 12 см.

При иммунофенотипировании лимфоцитов периферической крови была выявлена лимфоидная популяция

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика пациентов с БГЛ-лимфоцитозом

Table 1. Clinico-laboratory characteristics of patients with LGL lymphocytosis

Параметр Parameter	ХЛПЗ-НК, n = 8 CLPD-NK, n = 8	Т-ЛБГЛ, n = 42 T-LGL, n = 42	Реактивный БГЛ-лимфоцитоз, n = 17 Reactive LGL lymphocytosis, n = 17
Соотношение м/ж Ratio m/f	5/3	9/33	5/12
Медиана возраста Median age	55,5 (37–69)	57 (29–79)	48 (22–77)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$ Leukocytes, $\times 10^9/\text{l}$	10,3 (2,7–18,6)	8,8 (1,8–51,1)	5,4 (1,2–10,7)
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/l	135 (86–160)	111 (66–160)	119 (53–161)
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$ Platelets, $\times 10^9/\text{l}$	282 (161–383)	217 (19–459)	217 (6–342)
Нейтрофилы, $\times 10^9/\text{л}$ Neutrophils, $\times 10^9/\text{l}$	2,8 (1,03–5,72)	1,5 (0–8,5)	1,9 (0–8,5)
Нейтрофилы, % Neutrophils, %	29 (19–40)	19 (1–55)	32 (3–49)
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$ Lymphocytes, $\times 10^9/\text{l}$	6,8 (1,4–13,3)	6,8 (1,2–49,1)	2,4 (1,2–7)
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	63 (50–79)	73 (38–96)	60,5 (45–96)
Гетерогенность экспрессии Т-клеточных маркеров Heterogeneity of expression of T-cell markers	2 из 8 2 of 8	34 (85%) из 40 34 (85%) of 40	8 (47,1%) из 17 8 (47,1%) of 17

Таблица 2. ПЦР-исследование Т-клеточной клональности у пациентов с ХЛПЗ-НК, Т-ЛБГЛ и реактивным БГЛ-лимфоцитозом

Table 2. PCR studies of T-cell clonality in patients with CLPD-NK, T-LGL and reactive LGL lymphocytosis

Варианты БГЛ-лимфоцитоза Variants of LGL lymphocytosis	n	TCRG (V γ -J γ)	TCRB (D β -J β)	TCRB (V β -J β)	TCRB (D β -J β и/или V β -J β) TCRB (D β -J β and/or V β -J β)
ХЛПЗ-НК CLPD-NK	8	0	0	0	0
Т-ЛБГЛ T-LGL	42	36 (85,7%)	22 (52,4%)	33 (78,6%)	37 (88,1%)
TCR $\alpha\beta$ -вариант Т-ЛБГЛ TCR $\alpha\beta$ -positive T-LGL	30	25 (83,3%)	17 (56,7%)	29 (96,7%)	30 (100%)
TCR $\gamma\delta$ -вариант Т-ЛБГЛ TCR $\gamma\delta$ -positive T-LGL	12	11 (91,7%)	5 (41,7%)	4 (33,3%)	7 (58,3%)
Реактивный БГЛ-лимфоцитоз Reactive LGL lymphocytosis	17	3 (17,6%)	1 (5,9%)	0	1 (5,9%)

с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD8[±]CD16⁺CD56[±], гетерогенность экспрессии маркера CD7 наблюдалась у 2 больных. Среднее содержание NK-клеток составило 60,9 (26,6—89,7)% общего количества лимфоцитов, среднее абсолютное содержание — 4,091 (0,805—7,740) × 10⁹/л. При исследовании Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов γ- и β-цепей TCR (Vγ-Jγ и Vβ-Jβ, Dβ-Jβ) ни у кого не выявлено клональных перестроек генов цепей Т-клеточного рецептора (табл. 2).

Диагноз Т-ЛБГЛ был установлен у 42 больных (9 мужчин и 33 женщин) в возрасте от 29 до 79 лет (медиана возраста 57 лет) (см. табл. 1), во всех случаях БГЛ-лимфоцитоз сохранялся более 6 мес без какой-либо известной причины. Увеличение продольного размера селезенки более 12 см наблюдалось у 17 (40,5%) из 42 больных.

Средние показатели гемоглобина — 111 (66—160) г/л, лейкоцитов — 8,8 (1,8—51,1) × 10⁹/л, тромбоцитов — 217 (19—459) × 10⁹/л, нейтрофилов — 1,46 (0—8,5) × 10⁹/л, лимфоцитов — 6,8 (1,2—49,1) × 10⁹/л; содержание лимфоцитов — 73 (38—96)%, нейтрофилов — 19 (1—55)%.

Показания к началу иммуносупрессивной терапии (снижение гемоглобина менее 100 г/л, и/или гранулоцитопения менее 0,5 × 10⁹/л, и/или тромбоцитопения менее 50 × 10⁹/л) были отмечены у 20 (47,6%) из 42 больных.

При иммунофенотипировании лимфоцитов периферической крови αβ-вариант Т-ЛБГЛ был установлен у 30 (71,4%) из 42 больных, γδ-вариант — у 12 (28,6%). Были выделены следующие варианты иммунофенотипа: CD3⁺CD4⁺CD8⁺CD16⁺CD56⁺ — у 13 (43,4%), CD3⁺CD4⁺CD8⁺ с экспрессией CD16 и/или CD56 — у 9 (30%), CD3⁺CD4⁺CD8⁺ с вариационной экспрессией CD16 и CD56 — у 4 (13,3%), CD3⁺CD4⁺CD8⁺ с вариационной экспрессией CD16 и CD56 — у 4 (13,3%) из 30 больных αβ-вариантом Т-ЛБГЛ. У 12 больных γδ-вариантом Т-ЛБГЛ опухолевые клетки характеризовались CD3⁺CD4⁺-иммунофенотипом, экспрессия маркеров CD8, CD16, CD56 была вариационной. Дубль-негативный вариант (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) Т-ЛБГЛ был определен у 5 больных. Относительные и абсолютные показатели опухолевой БГЛ-популяции представлены в табл. 3.

Таблица 3. Средние относительные и абсолютные показатели опухолевой популяции при Т-ЛБГЛ

Table 3. The mean relative and absolute values of the tumor population with T-LGL (flow cytometry)

Варианты иммунофенотипа Т-ЛБГЛ Variants of immunophenotype T-LGL		n	Средние относительные и абсолютные показатели опухолевой БГЛ-популяции в ПК (данные ПЦ) <i>The mean relative and absolute values of the tumor population with T-LGL in PB (flow cytometry)</i>		Референсные значения* Т-лимфоцитов с соответствующим иммунофенотипом в ПК <i>The reference values* of T-lymphocytes with the corresponding immunophenotype (flow cytometry)</i>	
			%	× 10 ⁹ /л × 10 ⁹ /l	%	× 10 ⁹ /л × 10 ⁹ /l
α β	CD3 ⁺ CD4 [−] CD8 ⁺ CD16 [−] CD56 [−]	13	63,5 (33,4—85,2)	4,4 (0,2—28,5)	19—27	0,3—0,8
	CD3 ⁺ CD4 [−] CD8 ⁺ CD16 ⁺ и/или CD56 ⁺ <i>CD3⁺CD4[−]CD8⁺ CD16⁺ and/or CD56⁺</i>	9	69,2 (17,2—86,5)	4,0 (0,22—8)	0,5—6	0,007—0,165
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 [−] с вариабельной экспрессией CD16 и CD56 <i>CD3⁺CD4⁺CD8[−] with variable expression CD16 and CD56</i>	4	90,3 (82,3—98)	15,5 (2,8—35,9)	33—55	0,576—1,336
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ с вариабельной экспрессией CD16 и CD56 <i>CD3⁺CD4⁺CD8⁺ with variable expression CD16 and CD56</i>	4	38,7 (14—65,5)	1,9 (0,4—3,4)	0—3	—
γ δ	CD3 ⁺ CD4 [−] CD8 [±] CD16 [±] CD56 [±]	12	57,1 (22,9—88,1)	3,9 (0,4—18,2)	1,8—7,4	0,22—0,115

ПК — периферическая кровь, ПЦ — проточная цитометрия, * — референсные значения относительного и абсолютного количества основных популяций Т-лимфоцитов в ПК представлены в работе Хайдукова С. В. и Байдун Л. В. [15].

PB — peripheral blood, * — reference values of the relative and absolute number of subpopulations of T-lymphocytes in the PB are presented in the work of S. V. Khaydukov and L. V. Baidun [15].

Таблица 4. Характеристика больных с реактивным БГЛ-лимфоцитозом
Table 4. Characteristics of patients with reactive LGL lymphocytosis

Пол/ Возраст Gender/ age	Заболевание, сопровождающееся реактивным БГЛ-лимфоцитозом Disease accompanied by reactive LGL lymphocytosis	Срок разрешения БГЛ-лимфоцитоза, мес The term of resolution of LGL lymphocytosis, mos	ИФТ Immunophenotype	Гетерогенность экспрессии Т-клеточ- ных маркеров Heterogeneity of expression of T-cell markers	TCRG (Vγ-Jγ)	TCRB (Dβ-Jβ)	TCRB (Vβ-Jβ)	TCRB (Dβ-Jβ и/или Vβ-Jβ) TCRB (Dβ-Jβ and/or Vβ-Jβ)
ж/22 f/22	нет no	4	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	нет no	поли poly	поли poly	поли poly	поли poly
ж/48 f/48	нет no	6	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	нет no	поли poly	поли poly	поли poly	поли poly
ж/46 f/46	нет no	5	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	нет no	поли poly	поли poly	поли poly	поли poly
м/31 m/31	нет no	7	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	нет no	поли poly	поли poly	поли poly	поли poly
ж/39 f/39	нет no	8	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ & CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	CD2, CD5, CD7	поли poly	поли poly	поли poly	поли poly
ж/52 f/52	нет no	3	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	CD5, CD7	сомн dub	моно mono	поли poly	моно mono
ж/52 f/52	нет no	4	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	нет no	поли poly	поли poly	поли poly	поли poly
ж/63 f/63	нет no	5	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	нет no	поли poly	сомн dub	поли poly	сомн dub
ж/57 f/57	нет no	5	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	CD3, CD5, CD7	сомн dub	поли poly	поли poly	поли poly
м/26 m/26	через 7 лет после алло-ТКМ по поводу рецидива АККЛ, ALK⁺ 7 years after allo-HSCT for recurrence of ALCL, ALK⁺	4	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	нет no	сомн dub	поли poly	поли poly	поли poly
ж/66 f/66	через 1,5 мес после лечебно- диагностической спленэктомии (ДВККЛ селезенки, богатая гистиоцитами) 1,5 months after the treatment-diagnostic splenectomy (THRLBCL of spleen)	8	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	CD2, CD5, CD7	поли poly	поли poly	поли poly	поли poly
м/24 m/24	Дебют экстранодальной НК/Т-лимфомы, назальный тип Extranodal NK/T-lymphoma, nasal type	2	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	CD5, CD7	поли poly	поли poly	поли poly	поли poly

Таблица 4 (окончание). Характеристика больных с реактивным БГЛ-лимфоцитозом
Table 4. Characteristics of patients with reactive LGL lymphocytosis

Пол/ Возраст Gender/ age	Заболевание, сопровождающееся реактивным БГЛ-лимфоцитозом Disease accompanied by reactive LGL lymphocytosis	Срок разрешения БГЛ-лимфоцитоза, мес The term of resolution of LGL lymphocytosis, mos	ИФТ Immunophenotype	Гетерогенность экспрессии Т-клеточ- ных маркеров Heterogeneity of expression of T-cell markers	TCRG (Vγ-Jγ)	TCRB (Dβ-Jβ)	TCRB (Vβ-Jβ)	TCRB (Dβ-Jβ и/или Vβ-Jβ) TCRB (Dβ-Jβ and/or Vβ-Jβ)
ж/77 f/77	дебют МДС, РАИБ-1 MDS	3	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ CD16 ⁻ CD56 ⁻	нет no	моно mono	поли poly	поли poly	поли poly
ж/61 f/61	дебют МДС, РАИБ-1 MDS	2	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ CD16 ⁻ CD56 ⁻	нет no	поли poly	поли poly	поли poly	поли poly
м/48 m/48	дебют МДС, РАИБ-2 MDS	4	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	CD5, CD8	моно mono	поли poly	поли poly	поли poly
м/60 m/60	дебют МДС, РАИБ-2 MDS	6	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	CD3, CD5, CD7, CD8	сомн dub	поли poly	поли poly	поли poly
ж/45 f/45	дебют МДС, РАИБ-2 MDS	3	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ CD16 ⁻ CD56 ⁺	нет no	моно mono	поли poly	сомн dub	сомн dub

МДС — миелодиспластический синдром, ДВКЛ — диффузная В-крупноклеточная лимфома, АКЛ, ALK⁺ — анапластическая крупноклеточная лимфома, ALK-позитивная, алло-ТКМ — трансплантация аллогенного костного мозга, ИФТ — иммунофенотип, РАИБ — рефрактерная анемия с избытком бластов, моно — моноклональная картина, поли — поликлональная картина, сомн — сомнительный пик.
MDS — myelodysplastic syndrome, ThRLBCL — T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma, ALCL, ALK⁺ — anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive, allo-HSCT — allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, mono — monoclonal case, poly — polyclonal case, dub — dubious peak.

Гетерогенность экспрессии хотя бы одного из Т-клеточных маркеров CD2, CD5, CD7 была отмечена в 34 (85%) из 40 оцененных случаев.

При исследовании Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов γ- и β-цепей TCR (Vγ-Jγ и Vβ-Jβ, Dβ-Jβ) в 41 (97,6%) из 42 случаев были выявлены перестройки генов либо *TCRG*, либо *TCRB*, лишь в одном случае γδ-варианта Т-ЛБГЛ наблюдались реаранжировки генов только δ-цепи TCR (см. табл. 2).

У 17 больных БГЛ-лимфоцитоз имел реактивный характер, со временем относительные и/или абсолютные показатели БГЛ нормализовались. Соотношение мужчин и женщин — 5/12, медиана возраста — 48 (22–77) лет (см. табл. 1).

Среднее содержание лейкоцитов было 5,4 (1,2–10,7) × 10⁹/л, нейтрофилов — 1,9 (0–8,5) × 10⁹/л, лимфоцитов — 2,4 (1,2–7,0) × 10⁹/л, гемоглобина — 119 (53–161) г/л, тромбоцитов — 217 (6–342) × 10⁹/л. Среднее процентное содержание лимфоцитов составило 60,5 (45–96)%, нейтрофилов — 31,8 (3–49)%.

В 11 из 17 случаев реактивный БГЛ-лимфоцитоз был представлен популяцией цитотоксических лимфоцитов (CD3⁺CD4⁻CD8⁺CD16⁻CD56⁻), в 7 — NKT-лимфоцитами (CD3⁺CD4⁻CD8⁺ с экспрессией CD16 и/или CD56), причем у одной больной был отмечен реактивный БГЛ-лимфоцитоз за счет обеих популяций. В 8 (47,1%) из 17 случаев наблюдалась гетерогенность экспрессии хотя бы одного Т-клеточного маркера (CD2, CD3, CD5, CD7, CD8). В 5 из 17 случаев повышение относительного и абсолютного содержания БГЛ-лимфоцитов было значимым и превышало верхнюю границу нормы более чем в 2 раза.

При исследовании Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов *TCRG* (Vγ-Jγ) и *TCRB* (Vβ-Jβ, Dβ-Jβ) перестройки генов γ-цепи Т-клеточного рецептора были выявлены в 3 случаях, еще в 5 случаях результат носил сомнительный характер. Неполная реаранжировка генов *TCRB* (Dβ-Jβ) была определена только в одном случае, тогда как ни в одном случае реактивного БГЛ-лимфоцитоза не было выявлено полной реаранжировки генов *TCRB* (Vβ-Jβ) (см. табл. 2).

Интересно, что у 7 из 17 больных этой группы реактивный БГЛ-лимфоцитоз был выявлен на фоне опухолевых заболеваний кроветворной системы (табл. 4).

Проведенное комплексное обследование, включающее морфологическое, цитогенетическое и молекулярное исследования костного мозга, позволило верифицировать диагноз. Различия иммунофенотипических маркеров опухолевых клеток и реактивных цитотоксических NKT-лимфоцитов позволили исключить лейкомизацию опухолевого процесса у больной экстранодальной НК/Т-лимфомой. У больной гистиоцитами, реактивный БГЛ-лимфоцитоз наблюдался через полтора месяца после спленэктомии. В гемограмме количество лейкоцитов было 8,3 × 10⁹/л,

лимфоцитоз до 70%, причем 59% лимфоцитов содержали крупные азурофильные гранулы. Иммунофенотипическое исследование лимфоцитов периферической крови выявило увеличение абсолютного числа цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺CD8⁺CD16⁺CD56⁺) с гетерогенностью экспрессии маркеров CD2, CD5 и CD7; В-лимфоциты были поликлональны. Молекулярное исследование образца периферической крови не выявило реаранжировок генов *TCRG* и *TCRB*. После завершения терапии по поводу В-клеточной лимфомы селезенки при повторном цитологическом и иммунофенотипическом исследованиях лимфоцитов периферической крови (через 8 мес) было отмечено уменьшение лейкоцитоза до $4,9 \times 10^9/\text{л}$, процентного содержания лимфоцитов — до 46% и БГЛ — до 28%. У остальных 5 больных при дополнительном обследовании был верифицирован диагноз миелодиспластического синдрома. Морфологическое исследование костного мозга выявило признаки дисмиелопоэза, в миелограмме отмечено увеличение количества бластных клеток. При иммунофенотипировании лимфоцитов периферической крови в 2 из 5 случаев было выявлено преобладание популяции цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺CD8⁺CD16⁺CD56⁺), в 3 случаях — NKT-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺CD8⁺ с экспрессией CD16 и/или CD56) с гетерогенной экспрессией Т-клеточных маркеров CD2, CD3, CD5, CD7 и CD8. При молекулярном исследовании образцов периферической крови у 3 из 5 больных с реактивным БГЛ-лимфоцитозом на фоне миелодиспластического синдрома была выявлена Т-клеточная клональность по перестройкам генов *TCRG*, тогда как перестройки генов *TCRB* не были обнаружены ни в одном из случаев. У одного больного наблюдали развитие лимфомы Ходжкина на фоне CD4-позитивной Т-клеточной лимфопролиферации, протекающей с аплазией кроветворения. Т-ЛБГЛ дебютировал с анемии (Hb 54 г/л), тромбоцитопении менее $50 \times 10^9/\text{л}$ и лейкопении менее $2,4 \times 10^9/\text{л}$. В лейкоцитарной формуле был отмечен лимфоцитоз 92%. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови выявило CD3⁺CD4⁺CD8⁺CD16⁺CD56⁺TCRαβ⁺-популяцию лимфоидных клеток. При молекулярном исследовании Т-клеточной клональности в образцах крови и костного мозга были определены перестройки генов *TCRG* и *TCRB*. Больному была начата иммуносупрессивная терапия циклоспорином. Через 9 мес с момента манифестации заболевания было обнаружено увеличение размеров печени и селезенки, периферических и висцеральных лимфатических узлов. Размер конгломерата медиастинальных лимфатических узлов составлял 69 × 24 мм. При гистологическом и иммуногистохимическом исследованиях биоптата внутригрудного лимфатического узла был верифицирован диагноз лимфомы Ходжкина, ассоциированной с вирусом Эпштейна—Барр. При молекулярном исследовании Т-клеточной клональности

в биоптатах селезенки и лимфатического узла были выявлены те же клональные продукты, что в образцах крови и костного мозга.

Обсуждение

На большом клиническом материале представлен опыт дифференциальной диагностики БГЛ-лимфоцитоза. Было продемонстрировано, что БГЛ-лимфоцитоз может быть проявлением ХЛПЗ-НК, Т-ЛБГЛ и реактивного процесса.

Т-ЛБГЛ развивается в результате накопления онкогенных мутаций в реактивных БГЛ [16]. Поликлональный иммунный ответ, сопровождающийся хронической антигенной стимуляцией цитотоксических Т-лимфоцитов на эндогенный или экзогенный антиген, служит первоначальным стимулом к экспансии одного из клонов БГЛ [17, 18]. Моноклональный БГЛ-лимфоцитоз на первых этапах протекает индолентно, но в дальнейшем в 60—70% случаев сменяется агрессивным клиническим течением с развитием цитопенического синдрома и связанных с ним осложнений [19].

Верификация Т-ЛБГЛ и дифференциальная диагностика БГЛ-лимфоцитоза представляет определенные трудности. В настоящее время не выявлены патогномоничные хромосомные аномалии, характерные иммунофенотипические маркеры и отличительные морфологические признаки, обнаружение которых позволяет безошибочно установить диагноз Т-ЛБГЛ.

Морфологическое и иммунофенотипическое исследования со стандартной панелью моноклональных антител позволяют лишь констатировать факт относительного и/или абсолютного БГЛ-лимфоцитоза, который имеет опосредованное значение. В ряде случаев реактивного БГЛ-лимфоцитоза мы наблюдали значительное увеличение популяции цитотоксических лимфоцитов. В то же время при Т-ЛБГЛ, протекающем с лейкопенией, выявляли относительный БГЛ-лимфоцитоз при абсолютной лимфопении. Относительное и абсолютное количества опухолевых БГЛ различались в зависимости от варианта иммунофенотипа, однако небольшое число случаев с CD3⁺CD4⁺CD8⁺ и CD3⁺CD4⁺CD8⁺ не позволило нам провести статистический анализ. Гетерогенность экспрессии Т-клеточных маркеров не является патогномоничным признаком опухолевого процесса [10]. В нашем исследовании наблюдалась гетерогенность экспрессии Т-клеточных маркеров (CD2, CD5, CD7, CD8) при ХЛПЗ-НК, реактивном БГЛ-лимфоцитозе и Т-ЛБГЛ, хотя, несомненно, снижение или отсутствие экспрессии Т-клеточных маркеров при Т-ЛБГЛ встречалось с большей частотой. Моноклональность Т-лимфоцитов по перестройкам генов *TCRG* также не является однозначным доказательством опухолевого процесса [20, 21]. При нормальном иммунном ответе на инфекционный агент или на опухолевый процесс

при аутоиммунных процессах может появляться моноклональная популяция цитотоксических лимфоцитов. Например, при инфекционном мононуклеозе у 40% пациентов выявляется моноклональная популяция лимфоцитов [22]. При аутоиммунной гемолитической анемии до 50% пациентов имеют моноклональную картину реаранжировки генов *TCRG* популяция лимфоцитов [22]. При аутоиммунной гемолитической анемии до 50% пациентов имеют моноклональную картину реаранжировки генов *TCRG* и клональную экспансию CD8⁺ лимфоцитов [23]. Выявление Т-клеточной клональности лимфоцитов возможно при выраженной реакции «трансплантат против хозяина» [24]. В то же время описаны редкие случаи развития Т-ЛБГЛ после аутологичной и аллогенной трансплантаций [25, 26], которые должны быть ограничены от олигоклональных Т-клеточных популяций, часто наблюдаемых у реципиентов гемопоэтических клеток [24]. Клональная популяция Т-лимфоцитов может определяться даже у здоровых доноров без признаков каких-либо заболеваний [27].

Моноклональный реактивный БГЛ-лимфоцитоз может наблюдаться при опухолевых процессах и маскировать основное заболевание. Например, в исследуемой нами группе больных среди 17 случаев реактивного цитотоксического лимфоцитоза у 7 пациентов были выявлены другие опухолевые гематологические заболевания.

При анализе реаранжировки генов *TCRG* и *TCRB* в образцах периферической крови мы получили интересные данные. Оказалось, что наиболее специфичными маркерами для разграничения Т-ЛБГЛ и реактивного БГЛ-лимфоцитоза является одновременное выявление моноклональности по *TCRG* и *TCRB*-локусам или выявление полной моноклональной реаранжировки гена *TCRB* (Vβ-Jβ). Эти события не были выявлены ни в одном из случаев реактивного цитотоксического лимфоцитоза.

Отсутствие опухолевых и ревматических заболеваний, клинически значимой вирусной инфекции, В-симптомов, снижения концентрации гемоглобина, числа тромбоцитов и гранулоцитов позволяет проводить динамическое наблюдение за больным с БГЛ-лимфоцитозом. Лечение Т-ЛБГЛ назначается только при наличии строгих показаний. По данным литературы, при диагностике заболевания две трети больных не нуждаются в лечении [12, 18].

Таким образом, выявление БГЛ-лимфоцитоза в периферической крови не дает оснований для верификации Т-ЛБГЛ, а лишь служит поводом для полного обследования с целью исключения заболеваний и состояний, которые могут сопровождаться пролиферацией БГЛ.

На большом клиническом материале была продемонстрирована дифференциальная диагностика БГЛ-лимфоцитоза, представлены иммунофенотипические и молекулярные аспекты разграничения опухолевой и реактивной пролиферации больших гранулярных лимфоцитов.

Информация об авторах

Чернова Наталья Геннадьевна (Chernova N. G.), к. м. н., врач-гематолог отделения интенсивной высокодозной химиотерапии лимфом с круглосуточным и дневным стационаром ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, ngchernova@mail.ru

Сидорова Юлия Владимировна (Sidorova Y. V.), к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, iouliavl@rambler.ru

Захарько Екатерина Игоревна (Zakharko E. I.), врач централизованной клинико-диагностической лаборатории, руководитель группы проточной цитометрии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, flowlabgnc@gmail.com

Наумова Елена Владимировна (Naumova E. V.), к. м. н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБУЗ ДПО РМАНПО МЗ РФ, e_naum@mail.ru

Рыжикова Наталья Валерьевна (Ryzhikova N. V.), научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, nataly25-76@mail.ru

Гальцева Ирина Владимировна (Galtseva I. V.), к. м. н., заведующая научно-клинической лабораторией иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга, ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, irag@blood.ru

Двирник Валентина Николаевна (Dvirnyk V. N.), к. м. н., заведующая централизованной клинико-диагностической лабораторией, ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, vdvirnyk@mail.ru

Смирнова Светлана Юрьевна (Smirnova S. Yu.), научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, smirnova-s-yu@yandex.ru

Судариков Андрей Борисович (Sudarikov A. B.), д. б. н., заведующий лабораторией молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, dusha@blood.ru

Кохно Алина Владимировна (Kokhno A. V.), к. м. н., ведущий научный сотрудник отделения интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с круглосуточным и дневным стационаром ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, alina@blood.ru

Моисеева Татьяна Николаевна (Moiseeva T. N.), к. м. н., заведующая консультативным гематологическим отделением с дневным стационаром по проведению интенсивной и высокодозной химиотерапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, taniamoiseeva@mail.ru

Луговская Светлана Алексеевна (Lugovskaya S. A.), д. м. н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБУЗ ДПО РМАНПО МЗ РФ, slugovskaya@mail.ru

Звонков Евгений Евгеньевич (Zvonkov E. E.), д. м. н., заведующий отделением интенсивной высокодозной химиотерапии лимфом с кругло-

суточным и дневным стационаром ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, dr.zvonkov@gmail.com

Савченко Валерий Григорьевич (Savchenko V. G.), академик РАН, генеральный директор ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, director@blood.ru

Литература

6. Виноградова Ю. Е., Луценко И. Н., Кременецкая А. М. и др. Структура Т/НК-клеточных лимфатических опухолей в Гематологическом научном центре РАМН. Проблемы гематологии и переливания крови. 2005; 4:30–34.

12. Виноградова Ю. Е., Луценко И. Н., Самойлова Р. С. и др. Клинические и иммуноморфологические варианты Т/НК-клеточных лимфолейкозов из больших гранулярных лимфоцитов. Гематология и трансфузиология. 2009; 54(2):14–18.

15. Хайдуков С. В., Байдун Л. В. Современные подходы к оценке клеточной составляющей иммунного статуса. Медицинский алфавит. 2015; 2(8):44–51.

16. Воробьев А. И., Воробьев И. А., Грецов Е. М. и др. Вопросы теоретической гематологии. Терапевтический архив. 2003; 75(9):22–29.

22. Сидорова Ю. В., Никитин Е. А., Меликян А. Л. и др. Определение Т-клеточной клональности при инфекционном мононуклеозе методом ПЦР-SSCP-TCR γ . Гематология и трансфузиология 2004; 49(6):1–7.

Остальные источники см. в References.

References

1. Loughran T. P. Jr. Clonal diseases of large granular lymphocytes. Blood. 1993; 82(1):1–14.

2. Sokol L., Loughran T. P. Jr. Large granular lymphocyte leukemia. Oncologist. 2006; 11(3):263–273. DOI: 10.1007/s11899-007-0038-7.

3. Lamy T., Loughran T. P. Jr. Large granular lymphocyte leukemia. Cancer Control. 1998; 5(1):25–33.

4. Swerdlow S. H., Campo E., Harris N. L. et al. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC; 2017, 348–350.

5. Zambello R., Trentin L., Facco M. et al. Analysis of the T cell receptor in the lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: superantigen activation of clonal CD3+ granular lymphocytes. Cancer Res. 1995; 55(24):6140–6145.

6. Vinogradova Yu. E., Lutsenko I. N., Kremenetskaya A. M. et al. Structure of T/NK-cell lymphomas in the National Research Center for Hematology of the Russian Academy of Medical Sciences. Russian Journal of Problems of Hematology and Blood Transfusion (Problemy gematologii i perelivaniya krvi). 2005; 50(4):30–34. (In Russian)

7. Lamy T., Loughran T. P. Jr. Clinical features of large granular lymphocyte leukemia. Semin Hematol. 2003; 40(3):185–195.

8. Sampalo Lainz A., López-Gómez M., Jimenez-Alonso J. Proliferation of large granular lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus. Rev Clin Esp. 1995; 195(6):373–379.

9. Starkebaum G. Chronic neutropenia associated with autoimmune disease. Semin Hematol. 2002; 39(2):121–127.

10. Morice W. G., Kurtin P. J., Leibson P. J. et al. Demonstration of aberrant T-cell and natural killer-cell antigen expression in all cases of granular lymphocytic leukaemia. Br J Haematol 2003; 120(6):1026–1036.

11. Semenzato G., Zambello R., Starkebaum G. et al. The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis. Blood. 1997; 89(1):256–260.

12. Vinogradova Yu. E., Lutsenko I. N., Samoylova R. S. et al. Clinical and immunomorphological variants of large granular lymphocyte T/NK lymphocytic leukemia. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2009; 54(2):14–18. (In Russian)

13. Vie H., Chevalier S., Garand R. et al. Clonal expansion of lymphocytes bearing the gamma delta T-cell receptor in a patient with large granular lymphocyte disorder. Blood. 1989; 74(1):285–290.

14. Dongen J. J., Langerak A. W., Bruggemann M. et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia. 2003; 17(12):2257–2317. DOI: 10.1038/sj.leu.2403202.

15. Khaydukov S. V., Baydun L. V. Modern approach to assessing cellular constituents immune status. Russian Journal of Medical Alphabet. (Meditsinskiy alfavit). 2015; 2(8):44–51. (In Russian)

16. Vorobiev A. I., Vorobiev I. A., Gretsov E. M. et al. Problems of the theoretical hematology. Russian Journal of Therapeutic Archive (Terapevticheskiy arkhiv). 2003; 75(9):22–29. (In Russian)

17. O’Keefe C. L., Plasilova M., Wlodarski M. et al. Molecular analysis of TCR clonotypes in IGL: a clonal model for polyclonal responses. J Immunol. 2004; 172(3):1960–1969.

18. Wlodarski M. W., O’Keefe C., Howe E. C. et al. Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell-receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia. Blood. 2005; 106(8):2769–2780. DOI: 10.1182/blood-2004-10-4045.

19. Pandolfi F., Loughran T. P. Jr., Starkebaum G. et al. Clinical course and prognosis of the lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. A multicenter study. Cancer. 1990; 65(2):341–348.

20. Sidorova Yu. V., Chernova N. G., Ryzhikova N. V. et al. Clonal rearrangements and malignant clones in peripheral T-cell lymphoma. Acta Naturae (English version). 2015; 7(3):116–125.

21. Smirnova S., Sidorova Y., Chernova N. et al. CD8+ T-cell clones persistent in bone marrow and peripheral blood during course of CD4+ angioimmunoblastic T-cell lymphoma. Haematologica. 2017; 102(1):578, E1403.

22. Sidorova Yu. V., Nikitin E. A., Melikyan A. L. et al. Use of PCR-SSCP-TCR γ method to determine T-cell clonality in infectious mononucleosis. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2004; 49(6):1–7. (In Russian)

23. Smirnova S. J., Sidorova J. V., Biderman B. V. et al. Expansion of CD8+ cells in autoimmune hemolytic anemia. Autoimmunity. 2016; 49(3):147–154. DOI: 10.3109/08916934.2016.1138219.

24. French L.E., Alcindor T., Shapiro M. et al. Identification of amplified clonal T cell populations in the blood of patients with chronic graft-versus-host disease: positive correlation with response to photopheresis. Bone Marrow Transplant. 2002; 30(8):509–515. DOI: 10.1038/sj.bmt.1703705.

25. Narumi H., Kojima K., Matsuo Y. et al. T-cell large granular lymphocytic leukemia occurring after autologous peripheral blood stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2004; 33(1):99–101. DOI: 10.1038/sj.bmt.1704298.

26. Au W. Y., Lam C. C., Lie A. K. et al. T-cell large granular lymphocyte leukemia of donor origin after allogeneic bone marrow transplantation. Am J Clin Pathol 2003; 120(4):626–630. DOI: 10.1309/VA75-5A03-PVRV-9XDT.

27. Sychevskaya K. A., Smirnova S., Sidorova J. et al. Clonal T-lymphocyte populations in healthy donors. Blood. 2017; 130(1):3598.