

Araştırma Makalesi | Research Article

KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ HASTALARINDA CXCR5⁺CD8⁺ FOLİKÜLER SİTOTOKSİK T HÜCRELERİ, CD8⁺ T HÜCRELERİ VE NK HÜCRELERİNDE PERFORİN VE GRANZİM SEVİYELERİ

PERFORIN AND GRANZYME LEVELS IN CXCR5⁺CD8⁺ FOLLICULAR CYTOTOXIC T CELLS, CD8⁺ T CELLS, AND NK CELLS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA PATIENTS

 Metin Yusuf Gelmez¹,  Fatma Betül Öktelik¹,  Murat Ozbalak²,  İpek Yönel Hindilerden²,   Günnur Deniz^{1*}

¹İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye ²İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye



Öz

Amaç: Kronik lenfositik lösemi (KLL), bir T hücre belirtici olan CD5 proteinini aberan olarak ifade eden CD19⁺ malign B hücrelerin lenf nodu, kan ve kemik iliğinde biriktiği lösemi tipidir. KLL hastalarında CD8⁺ T, NK ve foliküler sitotoksik T (T_{FC}) hücre oranları ve fonksiyonlarını inceleyen farklı çalışmalar bulunmakla birlikte, bu hücrelerin perforin ve granzim içeriklerini karşılaştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada KLL hastalarında CD8⁺ T, NK ve T_{FC} hücrelerin perforin ve granzim seviyeleri incelenmiştir.

Yöntem: Tedavi almayan KLL tanılı 14 hasta ve 9 sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir. CD8⁺ T, NK ve T_{FC} hücre oranları ve bu hücrelerde perforin ve granzim seviyeleri akan hücre ölçer sistemi ile saptanmıştır.

Bulgular: KLL hastalarında NK hücrelerinin azaldığı, buna karşılık CD8⁺ T ve T_{FC} hücrelerinin arttığı tespit edilmiştir. Sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında, KLL hastalarının NK hücrelerinde granzim B seviyesinin düşük, T_{FC} hücrelerinde ise yüksek olduğu gözlenirken, perforin seviyesinin her üç hücre grubunda da arttığı belirlenmiştir. KLL hastalarının CD8⁺ T, NK ve T_{FC} hücrelerindeki perforin ve granzim içerikleri kendi aralarında değerlendirildiğinde, NK ve T_{FC} hücrelerinde CD8⁺ T hücrelerine göre daha yüksek perforin seviyelerine sahip olduğu gözlenmiştir.

Sonuç: KLL hastalarında NK hücrelerinin sayıca azalması ve düşük perforin içerikleri, NK hücrelerinin KLL patogenezindeki rolünün diğer sitotoksik hücrelere göre daha sınırlı olabileceğini düşündürmektedir. Bulgularımız T_{FC} hücrelerin KLL patogenezinde malign B hücrelerine karşı daha etkili olabileceğini ve immünoterapilerde hedeflenebilecek potansiyel bir hücre grubu olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kronik lenfositik lösemi, CD8⁺ T, NK, Foliküler sitotoksik T hücreler, T_{FC}

ABSTRACT

Objective: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a type of leukemia characterized by the accumulation of CD19⁺ malignant B cells in lymph nodes, blood, and bone marrow, which aberrantly express the T-cell marker CD5. Although several studies have investigated the frequencies and functions of CD8⁺ T, NK, and follicular cytotoxic T (T_{FC}) cells in CLL patients, no study has specifically compared the perforin and granzyme contents of these cells. This study aimed to analyse the levels of perforin and granzyme in CD8⁺ T, NK, and T_{FC} cells in CLL patients.

Methods: A total of 14 untreated CLL patients and 9 age-matched healthy individuals were enrolled in this study. The proportions of CD8⁺ T, NK, and T_{FC} cells, as well as their perforin and granzyme levels, were determined using flow cytometry.

Results: Decreased NK cells and increased T_{FC} and CD8⁺ T cells were observed in CLL patients. Compared to healthy individuals, granzyme B levels were lower in NK cells but higher in T_{FC} cells of CLL patients, while perforin levels were elevated in all three cell groups. When comparing perforin and granzyme content among CD8⁺ T, NK, and T_{FC} cells in CLL patients, NK and T_{FC} cells exhibited higher perforin levels than CD8⁺ T cells.

Conclusion: The reduced number and low perforin content of NK cells in CLL patients suggest that their role in CLL pathogenesis may be more limited compared to other cytotoxic cells.

Our findings indicate that T_{FC} cells may be more effective in targeting malignant B cells in CLL pathogenesis and could be considered as a potential target for immunotherapy.

with high perforin and granzyme levels, along with their higher perforin content compared to CD8⁺ T cells, suggests that T_{FC} cells might be more effective in the lysis of malign B-CLL cells in CLL and could represent a potential new cell population for use in immunotherapies.

Keywords: Chronic lymphocytic leukemia, CD8⁺ T, NK, Follicular cytotoxic T cells, T_{FC}

Giriş

Bağışıklık sistemi hem enfekte hem de tümör hücrelerini tanıyıp yok ederek enfeksiyonlara ve kansere karşı organizmayı korur.¹ Doğal öldürücü (NK) hücreler ve CD8⁺ sitotoksik T lenfositler tümöre karşı yanıtta rol alan en önemli hücrelerdir. MHC sınıf I molekülleri tarafından sunulan antijenleri tanıyarak hücre içi patojenle enfekte hücreleri veya tümör hücrelerini hedef alan CD8⁺ T lenfositlere karşın, NK hücreleri ise MHC-I ifade etmeyen hücreleri tanıyarak bu hücrelerin lizisini gerçekleştirir.² Güncel çalışmalar, sitotoksik CD8⁺ T lenfosit popülasyonu içinde CXCR5 ifade eden ayrı bir hücre grubunun olduğunu ve bu hücrelerin özellikle malign ya da enfekte B ve foliküler yardımcı T (T_{FH}) hücrelerin lizisinde rol aldıklarını göstermektedir.³ Uzun süreli antijenik maruziyet, CD8⁺ T lenfositlerde LAG-3, TIM-3, PD-1 gibi tükenme (exhausted) belirteçlerinin ekspresyonunu artırarak bu hücrelerin immün yanıtsızlık durumuna geçmesine neden olmaktadır. Buna karşın foliküler sitotoksik T (T_{FC}) hücreleri olarak adlandırılan CXCR5 eksprese eden CD8⁺ T hücrelerinin tükenme belirteçlerini daha düşük düzeyde ifade ettikleri ve kronik enfeksiyonlar ya da kanser hücrelerine karşı immün yanıtta daha aktif rol aldıkları bildirilmektedir.^{3,4} Kronik lenfositik lösemi (KLL), T hücrelerde eksprese edilen CD5 proteinini aberan olarak ifade eden CD19⁺ malign B hücrelerin lenf nodları, kan ve kemik iliğinde biriktiği bir lösemi alt tipidir ve genellikle ileri yaş yetişkinlerde gözlenir.⁵ Malign B hücreleri CD5, CD19 ve CD23 ifade ederken, CD79b ve FMC7 ifade etmezler.⁶ KLL'nin klinik seyri genel olarak yavaştır ve hastaların büyük bir kısmı tedavi almadan klinik olarak takip edilmektedir.⁷ KLL hastalarında CD8⁺ T, NK ve T_{FC} hücre oranları ve fonksiyonlarını inceleyen farklı çalışmalar bulunmaktadır.⁸⁻¹⁰ Ancak, KLL hastalarında bu hücrelerin perforin ve granzim seviyelerini karşılaştıran herhangi bir çalışma henüz yapılmamıştır. Bu çalışmada, KLL tanılı hastalarda CD8⁺ T, NK ve T_{FC} hücrelerin perforin ve granzim seviyeleri değerlendirilmiştir.

Yöntem

Hasta Grubu

Bu çalışmaya, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Hematoloji polikliniğinde takip edilen ve herhangi bir ilaç tedavisi almayan, periferik kan lenfosit değeri $5 \times 10^3/\text{mm}^3$ üzerinde, kan örneği alındığında aktif enfeksiyon öyküsü bulunmayan toplam 14 KLL hastası dahil edilmiştir. Hastaların yaş ortalaması kadınlar için 66 yıl (58-71 yıl, n: 7) ve erkekler için 69 yıl (65-74 yıl, n: 7) olarak saptanmıştır. Binet evreleme sistemine göre sınıflandırıldığında 5 hasta evre A ve 9 hasta evre B iken, Rai sınıflamasına göre 4 hasta evre 0, 3 hasta evre I, 3 hasta evre II ve 4 hasta evre III olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu ise ailesinde veya kendisinde kanser ya da otoimmün hastalık öyküsü olmayan, yaş ve cinsiyet uyumlu 10 sağlıklı bireyden (2 kadın/8 erkek) oluşmuştur. Çalışmaya katılan tüm gönüllülerden bilgilendirilmiş onam formları alınmıştır (İ.Ü. İTF Etik Kurulu, no:1302, tarih:06.11.2017).

CD8⁺ T, NK ve T_{FC} Hücrelerde Perforin ve Granzim Seviyeleri

Gönüllülerden alınan periferik kan örnekleri, Ficoll-Hypaque üzerine yayılarak 2100 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek periferik kan mononükleer hücreler izole edildi. İzole edilen hücreler fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile 1700 rpm'de 5 dakika yıkandı. Anti-CXCR5 BV711, -CD4 APC, -CD3 Pac. Blue, -CD8 APC.CY7, -CD16 FITC monoklonal antikorları 2×10^6 hücre/ml üzerine eklendi. Karanlıkta 20 dakika inkübasyonun ardından örnekler 1700 rpm'de 5 dakika yıkanarak fazla antikor uzaklaştırıldı. Hücreler, Fix-Perm Medium A (ThermoFisher, ABD) solüsyonu ile fikse edilip yıkandıktan sonra Fix-Perm Medium B (ThermoFisher, ABD) solüsyonu eklendi. Permeabilize hücrelere anti-perforin BV510 ve -granzim B AlxF700 monoklonal antikorları eklendi. Çalışmada kullanılan tüm antikorlar BioLegend (ABD) firmasından temin edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonları, NovoCyte (Agilent, ABD) akan hücre ölçer cihazında analiz edildi ve NovoExpress programında değerlendirildi. Her analizde SSC/FSC grafiğinde kapılanan lenfosit popülasyonu içinde en az 100.000 hücre sayıldı. NK, CD8⁺ T ve T_{FC} hücre oranları ve bu hücrelerin perforin ve granzim seviyeleri değerlendirildi.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 9.1 programı kullanılarak yapıldı. Normal dağılım göstermeyen grupların karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı ve istatistiksel anlamlılık sınırı $P \leq 0.05$ olarak belirlendi.

Bulgular

SSC/FSC grafiğinde kapılanan lenfositler, CD3 ekspresyonuna göre önce CD3⁺ T hücre ve CD3⁻ hücreler olarak ayrıldı. CD3⁺ T hücreleri içinde CD8⁺ hücreler sitotoksik T hücreler olarak tanımlandı. Bu hücreler içinde CXCR5 ifade eden hücreler T_{FC} hücreler olarak seçildi. CD3⁻ hücreler içinde CD16 ifade eden hücreler total NK hücreler olarak belirlendi. CD8⁺ T, T_{FC} ve NK hücrelerinde perforin ve granzim B seviyeleri değerlendirildi (Şekil 1).

Öncelikle, KLL hastalarında tümör hücrelerine karşı sitotoksik özellik gösteren NK, CD8⁺ T ve T_{FC} hücre oranları analiz edildi. Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, KLL hastalarında NK hücre oranının azaldığı ($p=0.0005$), buna karşın T_{FC} ve CD8⁺ T hücrelerin arttığı gözlemlendi (sırasıyla; $p=0.03$ ve $p<0.0001$) (Şekil 2A).

Sitotoksik enzimler perforin ve granzim seviyeleri hasta ve sağlıklı bireyler arasında incelendiğinde, CD8⁺ T hücre granzim B seviyeleri arasında anlamlı bir fark gözlenmezken, KLL hastalarında granzim B seviyesinin NK hücrelerde azaldığı, T_{FC} hücrelerde yükseldiği bulundu (sırasıyla; $p=0.02$ ve $p=0.0009$) (Şekil 2B). Bununla birlikte, perforin seviyesinin KLL hastaların NK, CD8⁺ T ve T_{FC} hücrelerinde arttığı saptandı (sırasıyla; $p=0.04$, $p=0.001$ ve $p=0.001$) (Şekil 2C).

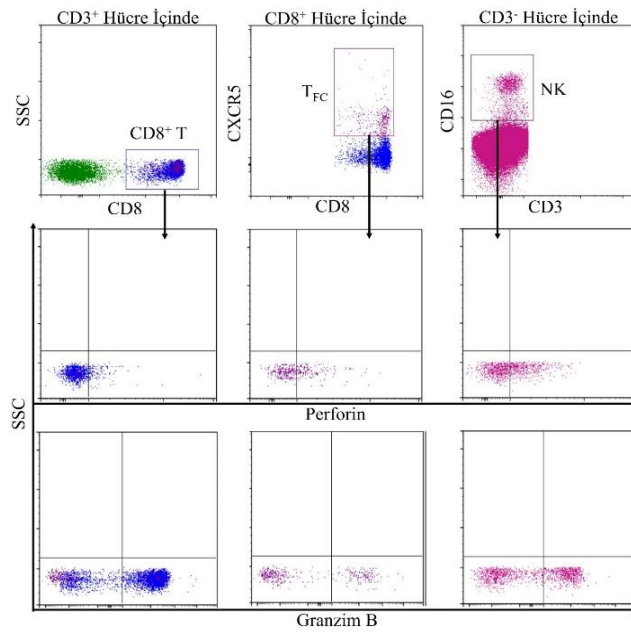
NK, CD8⁺ T ve T_{FC} hücreler hedef hücre lizisinde perforin ve granzim enzimlerini kullanmakla birlikte KLL hastalarında bu üç hücrenin perforin ve granzim seviyesinin birbirinden farklı olup olmadığı ayrıca analiz edildi. Granzim B

seviyesinin CD8⁺ T hücrelerde NK hücrelerine göre arttığı bulundu ($p=0.01$) (Şekil 3A). Bununla birlikte NK ve T_{FC} hücre perforin seviyesinin CD8⁺ T hücrelerine göre arttığı tespit edildi (sırasıyla, $p=0.05$ ve $p=0.05$) (Şekil 3B). NK ve

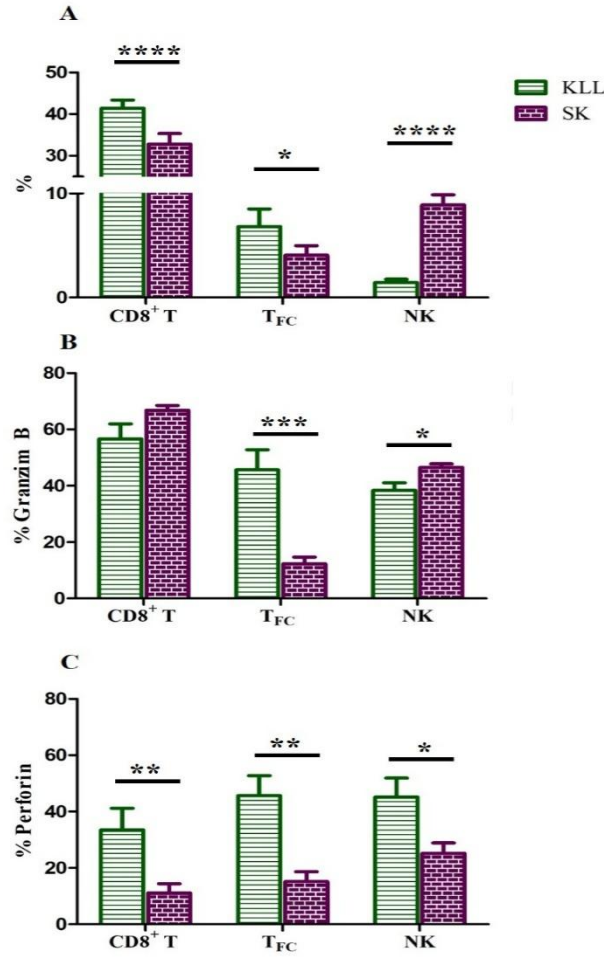
T_{FC} hücre perforin seviyeleri arasında istatistiksel farklılık gözlenmedi.

Tablo 1. Hastalara ait demografik ve klinik veriler

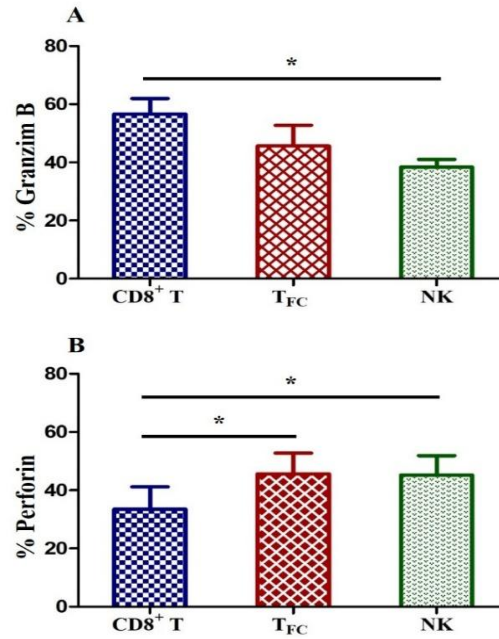
		KLL	Sağlıklı Kontrol
n		14	10
Cinsiyet	Erkek (n)	7	8
	Kadın (n)	7	2
Yaş Ortalaması (Yıl) (En düşük - En yüksek)	Erkek	66 (58 - 71)	60 (51 - 65)
	Kadın	69 (65 - 74)	58 (54 - 60)
WBC ($10^3/\text{mm}^3$) (ortalama) (En düşük - En yüksek)		42000 (9000 - 162000)	-
LYM ($10^3/\text{mm}^3$) (ortalama) (En düşük - En yüksek)		33000 (7000 - 145000)	-
Kromozomal Anomali	del11q (n)	0	-
	del13q (n)	0	-
	del17p (n)	-	-
	tri12 (n)	-	-
CD38	Pozitif (n)	4	-
	Negatif (n)	10	-
BINET Evre	A (n)	5	-
	B (n)	9	-
	C (n)	0	-
Rai Evre	0 (n)	4	-
	I (n)	3	-
	II (n)	3	-
	III (n)	4	-
	IV (n)	-	-
Tedavi	Yok (n)	14	-
	Var (n)	0	-



Şekil 1. Kapılama Stratejisi. SSC/FSC grafiğinde lenfosit kapısında CD3⁺ T hücreler içinde CD8⁺ hücreler sitotoksik T hücreler (mavi renk) olarak belirlendi. CD3⁺CD8⁺ T hücre kapısında, CXCR5 ifade eden hücreler, T_{FC} hücreler (mor renk) olarak seçildi. CD3⁻ hücreler içinde CD16 ifade eden hücreler total NK hücreler (kırmızı renk) olarak belirlendi. Bu hücrelerin perforin ve granzim içerikleri, dot-plot analiz grafikleri ile gösterilmiştir.



Şekil 2. CD8⁺ T, T_{FC} ve NK hücre oranlarının KLL (yeşil renk) ve sağlıklı kontroller (SK) (kırmızı renk) arasındaki fark. (A) CD8⁺ T, T_{FC} ve NK hücrelerinde granzim B (B) ve perforin (C) seviyelerinin KLL (yeşil renk) ve sağlıklı kontrollerdeki (SK) dağılımı * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.



Şekil 3. KLL hastalarındaki CD8⁺ T (mavi renk), T_{FC} (kırmızı renk) ve NK hücrelerinde (yeşil renk) granzim B (A) ve perforin (B) seviyeleri. * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Tartışma

CD5⁺CD19⁺ fenotipindeki malign B hücrelerinin kan, lenf nodları ve dalakta birikimi ile karakterize olan KLL, çoğunlukla ileri yaşta gözlenen ve yavaş seyirli bir hastalıktır. Hastaların büyük bir kısmı, ilaç tedavisi almadan yalnızca klinik olarak takip edilmektedir.⁷ KLL immünopatogenezinde NK, CD8⁺ T hücre gibi hücreler önemli rol oynamaktadır.^{2,11} Güncel çalışmalar, CXCL13 kemokinine yanıt olarak B hücre foliküllerinde lokalize olan CD3⁺CD8⁺CXCR5⁺ T_{FC} hücrelerinin, fenotipik ve transkripsiyonel olarak CD8⁺ T hücrelerinden farklı olduğunu ve KLL, diffüz büyük B hücreli lenfoma gibi birçok hematolojik hastalığın patogenezinde rol oynadığını göstermektedir.^{4,10,12}

Önceki ve mevcut çalışmamızda, literatürle uyumlu olarak sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında CD8⁺ T ve T_{FC} hücre oranlarının KLL hastalarında arttığı gözlenmiştir.^{10,13,14} Kanser hücrelerini özgül olarak tanıyan CD8⁺ T ve T_{FC} hücrelerinin, farklı kanser türlerinde sayılarının arttığı ve bu artışın hastalığın klinik seyri ile ilişkili olduğu bilinmektedir.¹⁵ Bu nedenle KLL hastalarında gözlenen CD8⁺ T ve T_{FC} hücre artışının, hastalığın patogenezinde koruyucu bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, güncel veriler KLL patogenezinde CD8⁺ T hücrelerinin PD-1, TIM-3 ve TIGIT gibi tükenme belirteçlerini eksprese ederek exhausted fenotipe yöneldiğini ve bu durumun T hücre disfonksiyonuna neden olduğunu göstermektedir.¹⁶ Buna karşın T_{FC} hücrelerinin tükenme belirteçlerini daha düşük seviyede ifade ettiği ve CD8⁺ T hücrelerine kıyasla tümör hücrelerine karşı daha etkin bir yanıt oluşturduğu bildirilmiştir.^{3,16}

Çalışmamızda, KLL hastalarında T_{FC} hücrelerinin perforin ve granzim seviyelerinin CD8⁺ T ve NK hücrelerine kıyasla daha yüksek olduğu bulgusu, T_{FC} hücrelerinin hastalığın immunopatogenezinde CD8⁺ T ve NK hücrelerine göre daha etkin rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Literatürde, KLL hastalarında NK hücre oranları ile ilgili farklı sonuçlar bulunmaktadır. Bazı çalışmalar, KLL hastalarında NK hücre oranlarının azaldığını, bazıları ise arttığını bildirilmektedir.¹⁷⁻¹⁹ Bununla birlikte, hastalarda gözlenen NK hücre sayılarındaki artışa rağmen, bu hücrelerin sitotoksik fonksiyonlarının azaldığı gösterilmiştir.¹⁸ Çalışmamızda, KLL hastalarında NK hücre oranlarının azalması ve bu hücrelerde perforin ve granzim B seviyesinin düşük bulunması, NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesinin azaldığını ve malign B hücrelerine karşı yeterli bir immün yanıt oluşturamadıklarını düşündürmektedir.

Kanser tedavisinde, özellikle kimerik antijen reseptör (CAR) immünoterapisi ile yapılan adaptif hücre tedavisi çalışmaları başta olmak üzere, hücresel immünoterapilere odaklanan araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır.^{2,20} Son çalışmalar, CAR-T ve CAR-NK uygulamalarının birbirine kıyasla farklı avantajlara sahip olduğunu ortaya koymaktadır.²⁰ Bununla birlikte, KLL patogenezinde gözlenen T hücre disfonksiyonu, yeterli miktarda fonksiyonel T hücresi elde edilememesi gibi faktörler, KLL hastalarında CAR-T hücre tedavisinin, diğer malign tümörlere kıyasla daha düşük başarı göstermesine neden olmaktadır.²¹ Ayrıca, NK hücrelerinin düşük proliferasyon

kapasitesi, viral transfeksiyon zorlukları ve T lenfositlere göre daha az yaşam süresine sahip olması, CAR-NK stratejilerinin önündeki engeller olarak değerlendirilmektedir.²² T_{FC} hücrelerinin, PD-1 ve TIGIT gibi tükenme belirteçlerini daha az ifade etmelerinin yanı sıra, grubumuzun önceki çalışmasında T_{FC} hücrelerinin ICOS ve OX-40 gibi aktivatör belirteçleri daha fazla eksprese ettikleri ve daha aktif hücreler oldukları gösterilmiştir.¹⁰ Bu bulgularla paralel olarak, çalışmamızda T_{FC} hücrelerinin yüksek perforin ve granzim içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu veriler ışığında, T_{FC} hücrelerinin, KLL gibi malign B hücre birikimiyle karakterize hematolojik hastalıklarda, yeni bir immün terapötik hücre grubu olarak değerlendirilebileceği öngörülmektedir.

Çalışmanın önemli kısıtlılıkları arasında, çalışma popülasyonunun sınırlı olması ve yalnızca erken evre ve tedavi endikasyonu bulunmayan hastalardan veri elde edilmesi yer almaktadır. Daha geniş hasta popülasyonlarında gerçekleştirilecek ve tedavi yanıtlarının hücrelerin sitotoksik kapasitesi üzerindeki olası etkilerini inceleyen yeni çalışmalar, CD8⁺ T, NK ve T_{FC} hücrelerin KLL immünopatogenezindeki rollerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Sonuç olarak, bulgularımız T_{FC} hücrelerin KLL patogenezinde malign B hücrelerine karşı daha etkin olabileceğini ve immünoterapilerde kullanılabilecek potansiyel bir hücre grubu olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.

Etik Standartlara Uygunluk

Çalışmanın etik kurul onayı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (No:1302, tarih:06.11.2017).

Çıkar Çatışması

Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Finansal Destek

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje no: TDP-2019-32394) tarafından desteklenmiştir.

Yazar Katkısı

G.D., M.Y.G., F.B.O., İ.Y.H. ve M.O., araştırma ve yazı için fikir ve hipotezin oluşturulması; İ.Y.H. ve M.O. hasta örneklerinin temini; M.Y.G., F.B.O. ve G.D., flow sitometrik çalışmalarda; G.D., M.Y.G., F.B.O., İ.Y.H. ve M.O. sonuçların değerlendirilmesi ve yorumunda, G.D., M.Y.G., F.B.O., İ.Y.H. ve M.O. makalenin yazımı aşamalarında katkı sunmuşlardır.

Teşekkür

Bu çalışmaya sağladığı katkılar için merhum Prof. Dr. Melih AKTAN'a en içten teşekkürlerimizi sunarız.

References

1. Cao J, Yan Q. Cancer Epigenetics, Tumor Immunity, and Immunotherapy. *Trends Cancer*. Jul 2020;6(7):580-592. doi:10.1016/j.trecan.2020.02.003

2. Rosenberg J, Huang J. CD8(+) T Cells and NK Cells: Parallel and Complementary Soldiers of Immunotherapy. *Curr Opin Chem Eng.* Mar 2018;19:9-20. doi:10.1016/j.coche.2017.11.006
3. Lv Y, Ricard L, Gaugler B, Huang H, Ye Y. Biology and clinical relevance of follicular cytotoxic T cells. *Front Immunol.* 2022;13:1036616. doi:10.3389/fimmu.2022.1036616
4. Yu D, Ye L. A Portrait of CXCR5(+) Follicular Cytotoxic CD8(+) T cells. *Trends Immunol.* Dec 2018;39(12):965-979. doi:10.1016/j.it.2018.10.002
5. Kikushige Y. Pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia and the development of novel therapeutic strategies. *J Clin Exp Hematop.* Dec 15 2020;60(4):146-158. doi:10.3960/jslrt.20036
6. Braish J, Cerchione C, Ferrajoli A. An overview of prognostic markers in patients with CLL. *Front Oncol.* 2024;14:1371057. doi:10.3389/fonc.2024.1371057
7. Brown JR. Clinical Risks for Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Natl Compr Canc Netw.* Apr 2024;22(3)doi:10.6004/jnccn.2024.7020
8. Metin Yusuf Gelmez SÇ, Aynur Dağlar-Aday, Gülce Özçit-Gürel, İpek Yönel-Hindilerden, Günnur Deniz, Melih Aktan. Evaluation of T Lymphocyte Subgroups in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Turkish Journal of Immunology.* 2020;8(1):6. doi:https://doi.org/10.25002/tji.2020.1240
9. Yano M, Byrd JC, Muthusamy N. Natural Killer Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia: Functional Impairment and Therapeutic Potential. *Cancers (Basel).* Nov 24 2022;14(23)doi:10.3390/cancers14235787
10. Gelmez MY, Oktelik FB, Cinar S, et al. High expression of OX-40, ICOS, and low expression PD-L1 of follicular helper and follicular cytotoxic T cells in chronic lymphocytic leukemia. *J Hematop.* Sep 2022;15(3):117-129. doi:10.1007/s12308-022-00497-5
11. Taghiloo S, Asgarian-Omran H. Cross-talk between leukemic and immune cells at the tumor microenvironment in chronic lymphocytic leukemia: An update review. *Eur J Haematol.* Jul 2024;113(1):4-15. doi:10.1111/ejh.14224
12. Tang J, Zha J, Guo X, Shi P, Xu B. CXCR5(+)CD8(+) T cells present elevated capacity in mediating cytotoxicity toward autologous tumor cells through interleukin 10 in diffuse large B-cell lymphoma. *Int Immunopharmacol.* Sep 2017;50:146-151. doi:10.1016/j.intimp.2017.06.020
13. Gelmez MY, Çınar, S., Dağlar-Aday, A., Özçit-Gürel, G., Yönel-Hindilerden, İ., Deniz, G., Aktan, M. Evaluation of T Lymphocyte Subgroups in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Turkish Journal of Immunology.* 2020;8(1):1-7. doi:10.25002/tji.2020.1240
14. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood.* Feb 28 2013;121(9):1612-21. doi:10.1182/blood-2012-09-457531
15. Philip M, Schietinger A. CD8(+) T cell differentiation and dysfunction in cancer. *Nat Rev Immunol.* Apr 2022;22(4):209-223. doi:10.1038/s41577-021-00574-3
16. Peters FS, Strefford JC, Eldering E, Kater AP. T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia from an epigenetic perspective. *Haematologica.* May 1 2021;106(5):1234-1243. doi:10.3324/haematol.2020.267914
17. Rubino V, Carriero F, Palatucci AT, et al. Adaptive and Innate Cytotoxic Effectors in Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL) Subjects with Stable Disease. *Int J Mol Sci.* May 31 2023;24(11)doi:10.3390/ijms24119596
18. MacFarlane AWt, Jillab M, Smith MR, et al. NK cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia is associated with loss of the mature cells expressing inhibitory killer cell Ig-like receptors. *Oncoimmunology.* 2017;6(7):e1330235. doi:10.1080/2162402X.2017.1330235
19. Akboga F, Hindilerden F, Gulturk E, et al. Increased Perforin- and IL-21-Expressing NK Cells in Patients with Early-Stage Chronic Lymphocytic Leukemia. *Experimed.* 2022;12(3):225-231.
20. Pan K, Farrukh H, Chittepu V, Xu H, Pan CX, Zhu Z. CAR race to cancer immunotherapy: from CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy. *J Exp Clin Cancer Res.* Mar 31 2022;41(1):119. doi:10.1186/s13046-022-02327-z
21. Todorovic Z, Todorovic D, Markovic V, et al. CAR T Cell Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia: Successes and Shortcomings. *Curr Oncol.* May 18 2022;29(5):3647-3657. doi:10.3390/curroncol29050293
22. Herrera L, Santos S, Vesga MA, et al. The Race of CAR Therapies: CAR-NK Cells for Fighting B-Cell Hematological Cancers. *Cancers (Basel).* Oct 28 2021;13(21)doi:10.3390/cancers13215418