

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького Національна академія наук України

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЩЕРБІНА ВАЛЕРІЯ МИХАЙЛІВНА

УДК: 616-066.04:577.27

ДИСЕРТАЦІЯ

**ПОВЕРХНЕВІ РЕЦЕПТОРИ ТА ЦИТОКІНИ ЯК ПРЕДИКТИВНІ
ФАКТОРИ, АСОЦІЙОВАНІ ІЗ ЧУТЛИВІСТЮ В-ЛІМФОЦИТІВ
ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ЛІМФОЛЕЙКОЗ ДО ЦИТОСТАТИКІВ**

091 – Біологія

09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____Щербіна В.М.

Науковий керівник роботи Шлапацька Лариса Миколаївна, кандидат
біологічних наук

Київ-2021

АНОТАЦІЯ

Щербіна В.М. Поверхневі рецептори та цитокіни як предиктивні фактори, асоційовані із чутливістю В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до цитостатиків – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктор філософії у галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія. – Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національна академія наук України. Київ, 2021.

Хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ) є найбільш розповсюдженою нозологічною формою серед лімфопроліферативних захворювань, характерною особливістю якого є різні варіації перебігу процесу від індолентного, коли хворі не потребують лікування протягом тривалого часу, до агресивного, при якому необхідним є негайне призначення специфічної терапії. Злоякісно трансформовані В-лімфоцити хворих на ХЛЛ значно відрізняються за імунофенотиповими, генотиповими та молекулярними характеристиками, що обумовлює різницю в клінічній картині перебігу ХЛЛ, темпах прогресії пухлинного процесу та, зрештою, в ступені чутливості пацієнтів до медикаментозного лікування. Спектр препаратів, що на сьогодні застосовуються для лікування хворих на ХЛЛ, та алгоритм їх підбору, який постійно удосконалюється, обумовлений вище згаданою гетерогенністю молекулярно-генетичних особливостей злоякісно трансформованих В-лімфоцитів. Проте, ефективність дії окремих препаратів характеризується значною варіабельністю серед пацієнтів. Враховуючи вищезазначене, доцільним є пошук маркерів, оцінка особливостей експресії яких дозволить виокремити групи хворих на ХЛЛ з найбільш вираженою чутливістю до дії окремих препаратів, що дозволить покращити віддалені результати терапії. Дисертаційна робота присвячена з'ясуванню предиктивної значимості маркерів імунофенотипового та цитокінового профілю В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ, які визначають чутливість до цитотоксичної дії цитостатиків.

Імунофенотипування злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ виявило значну гетерогенність у рівнях експресії CD5, CD20, CD22, CD37, CD38, CD40, CD150 та CD180 на плазматичній мембрані клітин. Зокрема, експресія CD22 на В-лімфоцитах була детектована у 82,1% хворих, CD38 – у 50,0%, CD150 – у 51,6% та 38,7% випадків ХЛЛ характеризувались наявністю CD180 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів. В той же час, експресія CD5, CD20, CD37 та CD40 була виявлена у 100% досліджених випадків. Для встановлення асоціативних зв'язків між рівнем експресії цільових антигенів та чутливістю В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до компонентів схем хіміотерапії, досліджувані випадки були розподілені на групи з урахуванням наявності чи відсутності експресії антигена (для CD22, CD38, CD150 та CD180) або залежно від медіани (М) рівня експресії антигена (за показником середньої геометричної інтенсивності флуоресценції клітин для кожного антигена, нормалізованих до відповідного значення контролю ізотипу антитіл – GeoMean ratio) на В-лімфоцитах, яка для CD5 складала 6,29; для CD20 – 2,64; для CD37 – 10,71 та 5,08 для CD40.

Нами вперше було ідентифіковано зв'язок між рівнем експресії імунофенотипових маркерів В-лімфоцитів при ХЛЛ та чутливістю клітин до ключових цитостатиків - бендамустину (БН), циклофосфаміду (ЦФ) та флударабіну (ФЛ), що входять до складу різних схем лікування хворих на ХЛЛ. Цитотоксичну дію хіміопрепаратів щодо В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ визначали за допомогою резазуринового тесту, де відсоток відновлення резазурину прямо пропорційний відсотку життєздатних клітин. Так, зокрема, нами встановлено, що високий рівень чутливості В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до БН асоціюється з $CD5^{M>}$, $CD37^{M<}$, $CD38^{-}$ та $CD40^{M<}$ фенотипом ($p<0,05$). Кращий цитотоксичний ефект ЦФ по відношенню до В-лімфоцитів при ХЛЛ *ex vivo* спостерігається за умов високого рівня експресії CD5 та CD20 ($>M$, $p=0,01$). Чутливість В-лімфоцитів до ФЛ у монорежимі не асоційована із статусом експресії CD5, CD20, CD37, CD38 або CD40, однак є

достовірно вищою у випадку одночасної експресії на В-лімфоцитах CD150 і CD180 ($p=0,04$). Слід відмітити, що за наявності CD150⁺ фенотипу та незалежно від статусу експресії CD180 спостерігається підсилення цитотоксичного ефекту за умов одночасної дії ФЛ та ЦФ на В-лімфоцити порівняно із аналогічними показниками за умов дії названих хіміопрепаратів у монорежимі ($p<0,05$). Статус експресії CD22 не визначає чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії БН, ФЛ або ЦФ *ex vivo*.

Вперше встановлено, що активація CD180 призводить до зростання чутливості В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до БН у 9,8 разів ($p=0,04$), але не впливає на їх чутливість до ФЛ та ЦФ. При одночасній активації CD150 та CD180 цитотоксичний ефект БН на В-лімфоцити є аналогічним до такого, що спостерігається за умов активації лише CD180 ($p=0,04$), натомість спричиняє достовірне зниження чутливості клітин до дії ФЛ (72,8% vs 34,7%, $p=0,04$). Індукція CD150-опосередкованого сигнального шляху не впливає на зміну чутливості В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії ФЛ, ЦФ та БН *ex vivo*.

Крім того, вперше досліджено чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до ФЛ, ЦФ та БН з урахуванням рівня експресії ізоформ CD150 – mCD150, pCD150 та sCD150. Встановлено, що рівень експресії мРНК жодної з ізоформ CD150 не корелює із чутливістю В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичної дії ФЛ, ЦФ та БН, тому надалі досліджувані зразки В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ було розподілено на групи відповідно до медіани (М) експресії мРНК ізоформ CD150, яка для даної вибірки становила 0,44 ум.од. для mCD150, 0,01 ум.од. – для pCD150 та 0,05 ум.од. – для sCD150. Показано, що чутливість В-лімфоцитів до ФЛ є вищою за умов високого рівня експресії мРНК mCD150 ($>M$), а також низького рівня pCD150 ($<M$), ($p=0,03$). Натомість низький рівень експресії мРНК mCD150 асоційований із кращою чутливістю В-лімфоцитів при ХЛЛ до дії ЦФ ($p=0,02$).

Однією з основних складових схем протипухлинної терапії першої лінії хворих на ХЛЛ є Ритуксімаб – МКАТ проти CD20. Для клітин патологічного клону при ХЛЛ характерним є низький рівень експресії CD20, що є однією із

причин низької ефективності анти-CD20 таргетної терапії. В рамках проведення даного дисертаційного дослідження вперше встановлено, що активація CD150 або/та CD180 призводить до зростання рівня експресії CD20 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ до 2,5 разів ($p < 0,03$). Виявлена можливість позитивної регуляції рівня експресії CD20 на плазматичній мембрані злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ шляхом активації CD150 та CD180-опосередкованих сигнальних шляхів може стати підґрунтям для оптимізації анти-CD20 таргетної терапії.

CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 є одними з ключових цитокінів, що секретуються В-лімфоцитами та вміст яких в плазмі крові хворих на ХЛЛ має прогностичне значення.

При дослідженні особливостей експресії цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 на рівні мРНК та білка нами виявлено ряд закономірностей залежно від статусу експресії CD150 та CD180 на В-лімфоцитах. Зокрема, для CD150⁺CD180⁺ В-лімфоцитів характерною є в 30 разів вища експресія мРНК CCL3 ($p = 0,01$) та в 15 разів вища експресія мРНК CCL4 ($p = 0,01$) порівняно до CD150⁻CD180⁻ клітин. В той же час, рівень експресії мРНК IL-6 та IL-10 у CD150⁺CD180⁺ В-лімфоцитах є нижче порівняно до агалогічних показників CD150⁻CD180⁻ клітин у 3,8 та 12,7 разів, відповідно ($p = 0,02$). Варто зазначити, що отримана закономірність щодо низького рівня експресії IL-6 та IL-10 у позитивних за статусом експресії CD150 та CD180 В-лімфоцитах зберігається і на білковому рівні ($p < 0,03$).

Враховуючи, що високі показники вмісту CCL3, CCL4 в плазмі крові корелюють із агресивною клінічною картиною перебігу ХЛЛ та несприятливим прогнозом для пацієнтів, а підвищений рівень секреції IL-6 та IL-10 до того ж сприяє розвитку стану загальної імуносупресії, пошук можливих механізмів регуляції рівня секреції вищеперерахованих цитокінів має вагоме значення. Нами вперше було встановлено, що CD150 та CD180 є негативними регуляторами експресії мРНК IL-6 та IL-10, так як лігація

CD150 або/та CD180 призводить до достовірного зниження рівня експресії мРНК IL-6 та IL-10 ($p < 0,05$) та до достовірного зниження у 1,6-2,4 рази рівня секреції IL-10 В-лімфоцитами *ex vivo* ($p < 0,05$). Проте, активація CD150 та CD180 не впливає на рівень експресії мРНК CCL3 та CCL4.

В результаті вивчення зв'язку між чутливістю В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитостатиків та рівнем експресії мРНК IL-6, IL-10, CCL3 та CCL4 нами відмічено ряд достовірних закономірностей. Більша чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ, яких було включено у досліджувану вибірку, до цитотоксичної дії ФЛ та БН асоційована із високим рівнем експресії мРНК CCL3 ($M > 1,47$ ум.од.), CCL4 ($M > 2,81$ ум.од.) та низьким рівнем експресії мРНК IL-10 ($M < 1,08$ ум.од.). Натомість низький рівень експресії мРНК IL-6 ($M < 0,22$ ум.од.) та IL-10 ($M < 1,08$ ум.од.) асоційований із високою чутливістю злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до дії ФЛ і ЦФ *ex vivo*.

Жодної достовірної залежності між показниками вмісту CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 у плазмі крові і чутливістю В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичної дії ФЛ, ЦФ та БН не було виявлено.

Отже, чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичної дії препаратів, які включені до складу комплексної хіміотерапії розрізняється в залежності від їх біологічних характеристик. Результати проведеного дослідження свідчать про доцільність удосконалення алгоритму комплексного підходу до вибору схеми лікування хворих на ХЛЛ, що включатиме оцінку експресії ряду поверхневих маркерів В-лімфоцитів, а саме CD5, CD20, CD37, CD38, CD40, CD150 та CD180, визначення рівня експресії мРНК ізоформ mCD150 та nCD150, а також мРНК цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10.

Ключові слова: хронічний лімфолейкоз, В-лімфоцити, CD150, CD180, IL-6, IL-10, CCL3, CCL4, чутливість до дії цитостатиків.

SUMMARY

Shcherbina V.M. Cell surface receptors and cytokines as predictive factors associated with sensitivity of chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes to cytostatics. – Qualifying scientific work preserving manuscript rights.

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in the field of 09 Biology in the speciality 091 – Biology. – R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv, 2021.

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common nosological form of lymphoproliferative diseases characterized by variations in the course of the disease from indolent when patients do not require treatment for a long time to aggressive one which requires the immediate appointment of specific therapy. The malignant CLL B lymphocytes differ significantly in their immunophenotypic, genotypic and molecular characteristics underlying the differences in the clinical features of CLL, the rate of disease progression and sensitivity to drug treatment. The range of drugs that currently used for treatment of CLL patients as well as the algorithm for their selection are constantly improving due to the heterogeneity of molecular and genetic characteristics of malignant B-lymphocytes. However, the effectiveness of individual drugs is characterized by significant variability among CLL patients. Considering the above it is advisable to search for markers the assessment of the expression of which will identify groups of CLL patients who will have the most pronounced sensitivity to certain drugs and thus will improve the long-term results of therapy. The thesis is devoted to elucidation of predictive component of markers of immunophenotypic and cytokine profile of B-lymphocytes in CLL to cytotoxic action of cytostatics.

Immunophenotyping of malignant B lymphocytes of CLL patients revealed significant heterogeneity in the expression levels of CD5, CD20, CD22, CD37, CD38, CD40, CD150 and CD180 on the plasma membrane of cells within the studied sample. In particular, the expression of CD22 on B-lymphocytes was detected in 82.1% patients with CLL, CD38 in 50.0%, CD150 in 51.6%. 38.7% of

CLL cases were characterized by the presence of CD180 on the plasma membrane of B-lymphocytes. At the same time, the expression of CD5, CD20, CD37 and CD40 was detected in 100% of the studied cases. To establish associative relationships between the expression level of target antigens and the sensitivity of B lymphocytes of CLL patients to the components of chemotherapy regimens, the studied cases were divided into groups based on the presence or absence of antigen expression (for CD22, CD38, CD150 and CD180) or median (M) of antigen expression on B-lymphocytes (according to the geometric mean fluorescence intensity value of antigen normalized to such value for mAb isotype control – GeoMean ratio), which for CD5 was 6.29; for CD20 – 2.64; for CD37 – 10.71 and 5.08 for CD40.

In the study, we identified for the first time a relationship between the expression level of immunophenotypic markers of malignant B lymphocytes and their sensitivity to key cytostatics, which are the components of different chemotherapy schemes for CLL treatment – bendamustine (BEN), cyclophosphamide (CP) and fludarabine (FL). The cytotoxic effect of chemotherapeutics on CLL B lymphocytes was determined using a resazurin test, where the percentage of resazurin reduction is directly proportional to the percentage of viable cells. In particular, we found that a high level of sensitivity of CLL B lymphocytes to BEN is associated with the CD5^{M>}, CD37^{M<}, CD38⁻ and CD40^{M<} phenotype ($p < 0.05$). The better cytotoxic effect of CP on CLL B-lymphocytes *ex vivo* is observed in cases of high expression of CD5 and CD20 (M>, $p = 0.01$). The sensitivity of CLL B-lymphocytes to FL is not associated with the expression status of CD5, CD20, CD37, CD38 or CD40, but is significantly higher in the case of simultaneous expression of CD150 and CD180 on B-lymphocytes ($p = 0.04$). It should be noted that CD150⁺ phenotype of CLL B lymphocytes regardless of the expression status of CD180 is associated with an increase in cytotoxic effect under the simultaneous action of FL and CP as compared to FL and CP used as single agents ($p < 0.05$). The expression status of

CD22 does not relate to the sensitivity of CLL B lymphocytes to BEN, FL or CP *ex vivo*.

For the first time, it was found that CD180 activation leads to 9.8-fold increase in the sensitivity of CLL B lymphocytes to BEN ($p = 0.04$) while not affecting their sensitivity to FL and CP. The cytotoxic effect of BEN on CLL B lymphocytes in the setting of simultaneous CD150 and CD180 activation is similar to that observed when only CD180 is activated ($p = 0.04$), instead causing a significant decrease in cell sensitivity to FL (72.8% vs 34.7%, $p = 0.04$). Induction of the CD150-mediated signaling pathway does not change sensitivity of CLL B lymphocytes to FL, CP and BEN *ex vivo*.

In addition, for the first time the sensitivity of CLL B lymphocytes to FL, CP and BEN was studied taking into account the expression of CD150 mRNA isoforms – mCD150, nCD150 and sCD150. It was found that the level of mRNA expression of any of the CD150 isoforms does not correlate with the sensitivity of CLL B lymphocytes to FL, CP and BEN. Therefore, it was decided to divide the tested samples into groups according to the medians (M) of mRNA expression of CD150 isoforms (0.44 r.u. for mCD150, 0.01 r.u. for nCD150 and 0.05 r.u. for sCD150). It is shown that the sensitivity of CLL B lymphocytes to FL is higher in the case of high mCD150 mRNA expression ($M>$), as well as low mRNA levels of nCD150 ($M<$), ($p = 0.03$). In contrast, low mCD150 mRNA expression is associated with better sensitivity of CLL B lymphocytes to CP ($p = 0.02$).

One of the main components of first-line chemotherapy schemes for CLL treatment is Rituximab - monoclonal antibody against CD20. CLL B lymphocytes are characterized by a low level of CD20 expression on their cell membrane, which is one of the reasons for the low effectiveness of anti-CD20 targeted therapy. As a part of this dissertation study, it was found for the first time that the activation of CD150 or/and CD180 leads to an increase in the expression of CD20 on CLL B lymphocytes - up to 2.5 times ($p < 0.03$). The possibility of positive regulation of CD20 expression on the plasma membrane of CLL B lymphocytes by activating

CD150 and CD180-mediated signaling pathways could be advantageous for optimizing anti-CD20 targeted therapy.

CCL3, CCL4, IL-6 and IL-10 are among the key cytokines secreted by B lymphocytes and their content in the blood plasma of CLL patients has prognostic value.

We found a number of patterns in mRNA expression of CCL3, CCL4, IL-6 and IL-10 relative to the expression status of CD150 and CD180 in CLL B lymphocytes. In particular, CD150⁺CD180⁺ B lymphocytes are characterized by up to 30 times higher mRNA expression of CCL3 ($p = 0.01$) and up to 15 times higher mRNA expression of CCL4 ($p = 0.01$) compared to CD150⁻CD180⁻ cells. At the same time, the mRNA expression levels of IL-6 and IL-10 in CD150⁺CD180⁺ B lymphocytes are 3.8 and 12.7-fold lower, respectively, as compared to those in CD150⁻CD180⁻ cells ($p = 0.02$). It should be noted that the obtained low mRNA expression level of IL-6 and IL-10 in CD150⁺CD180⁺ B lymphocytes is also confirmed at the protein level ($p < 0.03$).

High levels of CCL3, CCL4 in blood plasma correlate with an aggressive clinical course and unfavorable prognosis. Besides, increased secretion of IL-6 and IL-10 also contributes to the development of general immunosuppression state. Based on above, it seemed important to explore the possible mechanisms regulating secretion of these cytokines. We first found that CD150 and CD180 are negative regulators of IL-6 and IL-10 expression, as ligation of CD150 or/and CD180 leads to a significant decrease in the level of IL-6 and IL-10 mRNA expression ($p < 0.05$) and to a significant reduction of IL-10 secretion by CLL B lymphocytes *ex vivo* up to 1.6-2.4 times ($p < 0.05$). However, activation of CD150 and CD180 does not affect the mRNA expression levels of CCL3 and CCL4.

Our study of the relationship between the sensitivity of CLL B lymphocytes to cytostatics and mRNA expression levels of IL-6, IL-10, CCL3 and CCL4, demonstrated several reliable patterns. Within the studied group of patients, the higher sensitivity of CLL B lymphocytes to FL and BEN is associated with high mRNA expression levels of CCL3 ($M > 1.47$ r.u.), CCL4 ($M > 2.81$ r.u.) and low

mRNA expression level of IL-10 ($M < 1.08$ r.u.). In contrast, low mRNA expression levels of IL-6 ($M < 0.22$ r.u.) and IL-10 ($M < 1.08$ r.u.) are associated with a high sensitivity of CLL B lymphocytes to FL and CP *ex vivo*.

No significant relationship was found between the content of CCL3, CCL4, IL-6 and IL-10 in blood plasma and the sensitivity of CLL B lymphocytes to the cytotoxic effects of FL, CP and BEN.

Therefore, the sensitivity of CLL B lymphocytes to the drugs used in the chemotherapy schemes varies depending on their biological characteristics. The results of the study indicate the expediency of improving the algorithm of a comprehensive approach to the choice of treatment scheme for CLL patients. It would be beneficial to include into such survey the assessment of the expression of a number of surface markers of B lymphocytes, namely CD5, CD20, CD37, CD38, CD40, CD150 and CD180; mRNA expression levels of mCD150 and nCD150 isoforms of CD150 as well as mRNA expression levels of cytokines CCL3, CCL4, IL-6 and IL-10.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, B lymphocytes, CD150, CD180, IL-6, IL-10, CCL3, CCL4, sensitivity to cytostatics.

Список публікацій здобувача

1. I. Gordiienko, L. Shlapatska, V. Kholodniuk, L. Sklyarenko, D. Gluzman, E. Clark, S. Sidorenko / The interplay of CD150 and CD180 receptor pathways contribute to the pathobiology of chronic lymphocytic leukemia B cells by selective inhibition of Akt and MAPK signaling // PLoS ONE. – 2017, 12(10): e0185940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185940>.
2. I.M. Gordiienko, L.M. Shlapatska, V.M. Kholodniuk, L.M. Kovalevska, T.S. Ivanivskaya, S.P. Sidorenko / CD150 and CD180 are involved in regulation of transcription factors expression in the chronic lymphocytic leukemia B cells // Experimental Oncology. – 2017. – Vol. 39, N4. - P. 291-298.
3. V. Shcherbina, I. Gordiienko, L. Shlapatska, T. Ivanivska, S. Sidorenko / Sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells to chemotherapeutic drugs ex vivo depends on expression status of cell surface receptors // Experimental Oncology. – 2020. – Vol. 42, N1. - P. 16-24.
4. V. Shcherbina, I. Gordiienko, L. Shlapatska, D. Gluzman, S. Sidorenko / CD150 and CD180 are negative regulators of IL-10 expression and secretion in chronic lymphocytic leukemia B cells // Neoplasma. – 2021. – Vol. 68, N4. - P. 760-769.
5. Спосіб прогнозування чутливості до дії хіміопрепаратів при хронічному лімфолейкозі: інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №212-2019 / Сидоренко С.П., Шлапацька Л.М., Гордієнко І.М., Щербіна В.М., Скляренко Л.М., Іванівська Т.С., Поліщук А.С.; МОЗ України, Укрмедпатентінформ. – Київ: Укрмедпатентінформ, 2019. – 4с.
6. V. Kholodniuk, I. Gordiienko, V. Huryn, T. Ivanivskaya, L. Shlapatska / *In vitro* sensitivity of CLL B cells to chemotherapy agents is depend on CD150 and CD180 cell surface expression level // Тези науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопаталогією», 4-5 лютого 2019 р., м. Київ, Україна. Онкологія. – 2019. – Т. 21, N 1(79). - С.75.
7. V. Kholodniuk, V. Huryn, I. Gordiienko, L. Shlapatska / CD150 and CD180 cell surface receptors are negative regulators of IL-6 and IL-10 mRNA expression in

chronic lymphocytic leukemia B cells // Тези XV міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 9-11 квітня 2019 р., м.Львів, Україна. – 2019. – С. 81.

8. V. Shcherbina, I. Gordiienko, T. Ivanivskaya, L. Shlapatska / Connection between cell surface receptor status of CLL B cells and their sensitivity to chemotherapy agents *ex vivo* // 6-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 18-21 червня 2019 р., м.Яремче, Україна. – 2019. – С. 119.

9. V. Shcherbina, I. Gordiienko, T. Ivanivskaya, L. Shlapatska / CD150 is a positive regulator of CD20 expression in chronic lymphocytic leukemia B cells // Тези II міжнародної конференції «Tumor and Host: Novel Aspects of Old Problem», 21-22 листопада 2019 р., м.Київ, Україна. Experimental Oncology. – 2019. – Vol. 41, N3. - P. 276.

10. V. Shcherbina, I. Gordiienko, L. Shlapatska / CD150 and CD180 receptors are negative regulators of IL-10 expression and secretion in chronic lymphocytic leukemia B cells // Тези XVI міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 27-29 квітня 2020 р., м.Львів, Україна. – 2020. – С. 134.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	17
ВСТУП	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	25
1.1 Загальні відомості про хронічний лімфолейкоз	25
1.2 Прогностичні та предиктивні маркери хронічного лімфолейкозу	28
1.2.1 Рецептори CD150 та CD180 як потенційні кандидати на роль предикативних маркерів хронічного лімфолейкозу	37
1.3 Роль компонентів локального мікрооточення у патобіології хронічного лімфолейкозу	40
1.4 Хіміотерапевтичні підходи до лікування хронічного лімфолейкозу	44
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	50
2.1 Клінічна характеристика хворих на хронічний лімфолейкоз, які були включені в дослідження	50
2.2 Виділення популяції В-лімфоцитів із периферичної крові хворих на хронічний лімфолейкоз	51
2.3 Антитіла, що використовувались в роботі	51
2.4 Непрямий варіант імуофлуоресцентного методу для імуофенотипування клітин із використанням проточної цитометрії	52
2.5 Індукція сигналу через поверхневі рецептори у В-лімфоцитах хворих на хронічний лімфолейкоз	54
2.6 Визначення чутливості В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до дії хіміопрепаратів в умовах <i>ex vivo</i>	54
2.7 Виділення тотальної РНК	56
2.8 Синтез кДНК	56
2.9 Кількісна полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу	57

	15
2.10 Вестерн блот аналіз	59
2.11 Твердофазний імуносорбентний сендвідж-метод ELISA	60
2.12 Статистична обробка даних	60
РОЗДІЛ 3. ЧУТЛИВІСТЬ В-ЛІМФОЦИТІВ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ЛІМФОЛЕЙКОЗ ДО ЦИТОСТАТИКІВ <i>EX VIVO</i> З УРАХУВАННЯМ ЇХ ІМУНОФЕНОТИПУ	62
3.1 Імунофенотип злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз	62
3.2 Зв'язок між імунофенотиповими маркерами В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз та їх чутливістю до дії хіміопрепаратів <i>ex vivo</i>	66
3.2.1 Підбір оптимальних концентрацій хіміопрепаратів на В-лімфоцитах хворих на хронічний лімфолейкоз <i>ex vivo</i>	66
3.2.2 Чутливість В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до дії хіміопрепаратів <i>ex vivo</i> з урахуванням клініко-лабораторних показників	69
3.2.3 Чутливість В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до дії хіміопрепаратів <i>ex vivo</i> залежно від їх імунофенотипу	70
РОЗДІЛ 4. ЧУТЛИВІСТЬ В-ЛІМФОЦИТІВ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ЛІМФОЛЕЙКОЗ ДО ЦИТОСТАТИКІВ <i>EX VIVO</i> З УРАХУВАННЯМ СТАТУСУ ЕКСПРЕСІЇ CD150 ТА CD180	77
4.1 Зв'язок між чутливістю В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до дії хіміопрепаратів <i>ex vivo</i> та показниками експресії CD150 та CD180 на плазматичній мембрані	77
4.2 Вплив активації CD150 та CD180 на чутливість В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до дії хіміопрепаратів <i>ex vivo</i>	82
4.3 Визначення залежності між рівнем експресії мРКН ізоформ CD150 у В-лімфоцитах хворих на хронічний лімфолейкоз та чутливістю до дії хіміопрепаратів	85
4.4 Вплив лігації CD150 та CD180 на рівень експресії CD20 на В-	90

лімфоцитах хворих на хронічний лімфолейкоз *ex vivo*

РОЗДІЛ 5. ЧУТЛИВІСТЬ В-ЛІМФОЦИТІВ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ЛІМФОЛЕЙКОЗ ДО ЦИТОСТАТИКІВ <i>EX VIVO</i> З УРАХУВАННЯМ ПРОФІЛЮ ЕКСПРЕСІЇ ЦИТОКІНОВИХ ФАКТОРІВ	93
5.1 Базальний рівень експресії мРНК цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 у В-лімфоцитах хворих на хронічний лімфолейкоз з урахуванням статусу експресії CD150 та CD180	93
5.2 Регуляція рівня експресії мРНК цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 за умов лігації CD150 та CD180 на В-лімфоцитах хворих на хронічний лімфолейкоз <i>ex vivo</i>	96
5.3 Базальний рівень експресії білків IL-6 та IL-10 у В-лімфоцитах хворих на хронічний лімфолейкоз з урахуванням статусу експресії CD150 та CD180	100
5.4 Оцінка вмісту IL-6 та IL-10 в плазмі крові хворих на хронічний лімфолейкоз залежно від статусу експресії CD150 та CD180 на В-лімфоцитах	102
5.5 Зв'язок між чутливістю В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до хіміопрепаратів та рівнем експресії мРНК цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10	109
5.5.1 Чутливість В-лімфоцитів до дії хіміопрепаратів <i>ex vivo</i> з урахуванням вмісту IL-6 та IL-10 в плазмі крові хворих на хронічний лімфолейкоз	113
РОЗДІЛ 6. УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	117
ВИСНОВКИ	132
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	135
ДОДАТОК Б	158

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- ХЛЛ – хронічний лімфолейкоз
- ЛМЛ – лімфома з малих лімфоцитів
- МВЛ – моноклональний В-лімфоцитоз
- ВКР – В-клітинний рецептор
- ДВКЛ – дифузна В-крупноклітинна лімфома
- МПІ - міжнародний прогностичний індекс
- АФК – активні форми кисню
- ЛПЛ – ліпопротеїніліпаза
- ТФ – транскрипційний фактор
- ФЛ – флударабін
- ЦФ – циклофосфамід
- БН – бендамустин
- РБ – ритуксимаб
- ХА – хлорамбуцил
- ХТ – хіміотерапія
- ЛВ – лімфатичний вузол
- ЗФР – забуферений фізіологічний розчин
- МКАТ – моноклональні антитіла
- ЕСТ – ембріональна сироватка телят
- ТБР-Т – фізіологічний розчин, забуферений трисом, з 0,1% твін-20
- М< – експресія на рівні нижче значення медіани
- М> – експресія на рівні вище значення медіани
- IGHV - immunoglobulin heavy chain variable region
- TLR – Toll-like receptor

ВСТУП

Актуальність теми. Хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ) є найбільш розповсюдженою нозологічною формою серед лімфопроліферативних захворювань, при якому внаслідок розбалансування механізмів елімінації В-лімфоцитів відбувається їх клональна експансія, що призводить до накопичення зрілих неопластичних клітин у периферичній крові, кістковому мозку та вторинних лімфоїдних органах [1, 2]. Розвиток ХЛЛ є досить довготривалим процесом, характер перебігу якого значно розрізняється в окремих хворих. У більшості випадків захворювання протікає індолентно протягом тривалого часу [3]. Однак, з часом індолентний характер перебігу ХЛЛ може перейти в більш агресивну форму, яка потребує призначення комплексного лікування, у тому числі хіміотерапії (ХТ), і обумовлює стратегію постійного моніторингу, що наразі застосовується для ведення таких пацієнтів [4, 5].

Алгоритм рекомендацій щодо персоніфікованого підходу до вибору схем лікування хворих на ХЛЛ постійно удосконалюється у відповідності до нових даних щодо прогностичного значення молекулярно-генетичних та імунофенотипових маркерів злоякісно трансформованих В-лімфоцитів [6, 7]. У відповідності до низки прогностичних чинників (мутаційний статус генів важких ланцюгів імуноглобулінів, наявність мутацій гена *TP53* або/та делецій 17p, вік та загальний стан хворого тощо) на сьогодні в клінічній практиці для лікування хворих на ХЛЛ найчастіше застосовується одна із двох схем ХТ, що включає комбіноване застосування цитостатиків флударабіну (ФЛ) та циклофосфаміду (ЦФ) або ж бендамустину (БН) в комплексі з моноклональними антитілами проти CD20 [8].

Враховуючи той факт, що вибір між ФЛ- або БН-вмісною схемою терапії обумовлений здебільшого віком пацієнта та наявністю супутніх ускладнень, даний алгоритм потребує реформування з включенням маркерів для індивідуалізованої оцінки чутливості В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до компонентів даного виду ХТ.

Серед потенційних кандидатів на роль предиктивних маркерів особливе місце займають диференційно експресовані поверхневі рецептори, які мають сигнальні властивості, і завдяки цьому можуть бути залучені до формування біологічних особливостей злоякісно трансформованих клітин, у тому числі і чутливості до ХТ.

Вагоме місце у координації процесів, що регулюють виживаність, проліферацію злоякісно трансформованих В-лімфоцитів, їх чутливість до хіміопрепаратів та, зрештою, сприяють прогресуванню ХЛЛ належить елементам мікрооточення [9, 10]. Важливо зазначити, що не останню роль у формуванні локального мікрооточення при ХЛЛ відіграють власне злоякісно трансформовані В-лімфоцити, які здатні до активної секреції цитокінів та подальшого ауто- та паракринного впливу. До ключових цитокінів, що секретують В-лімфоцити, рівень вмісту в плазмі крові хворих на ХЛЛ яких має прогностичне значення, належать CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 [11-15]. Проте у якості предиктивних маркерів чутливості до дії хіміопрепаратів ці цитокіни не вивчалися. Враховуючи все вище викладене, доцільним є з'ясування предиктивного значення маркерів імунотипового та цитокінового профілю при ХЛЛ, що потенційно дозволить удосконалити алгоритм підбору схеми ХТ.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України у межах виконання науково-дослідної роботи «Рецептор-опосередковані сигнальні каскади у патобіології злоякісно трансформованих клітин при хронічному лімфолейкозі» (2017-2019 рр., № державної реєстрації 0116U007817), гранту НАН України дослідницьким лабораторія/групам молодих учених «Пошук нових підходів до регуляції патобіології хронічного лімфолейкозу» (2018-2019 рр., № державної реєстрації 0118U002325) та стипендії Президента України для молодих вчених «Пошук шляхів підвищення чутливості клітин

хворих на В-ХЛЛ до дії хіміопрепаратів (експериментальні дослідження)» (2020-2022 рр.).

Мета дослідження: З'ясувати предиктивну значимість маркерів імунотипового та цитокінового профілю В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфлейкоз, які визначають чутливість до цитотоксичної дії цитостатиків.

Задачі дослідження:

- 1) Дослідити чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії флударабіну, циклофосфаміду та бендамустину *ex vivo* з урахуванням рівня експресії ряду імунотипових маркерів цих клітин.
- 2) Визначити зв'язок між статусом експресії CD150 та CD180 на В-лімфоцитах при ХЛЛ, а також рівня експресії мРНК ізоформ CD150, та їх чутливістю до цитотоксичної дії флударабіну, циклофосфаміду та бендамустину *ex vivo*. Дослідити вплив активації CD150 та CD180 на ефективність дії досліджуваних хіміопрепаратів.
- 3) Вивчити вплив активації CD150- та CD180-опосередкованих сигнальних шляхів на рівень експресії CD20 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ.
- 4) Проаналізувати рівень експресії CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 на рівні мРНК та білка у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ. Визначити можливість регуляції рівня експресії мРНК CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 через CD150 та CD180-опосередковані сигнальні шляхи.
- 5) Визначити вміст IL-6 та IL-10 в плазмі крові хворих на ХЛЛ та з'ясувати вплив активації CD150 та CD180 на рівень секреції зазначених цитокінів В-лімфоцитами.
- 6) З'ясувати зв'язок між показниками експресії мРНК CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 та їх вмістом в плазмі крові хворих на ХЛЛ із чутливістю В-лімфоцитів до цитотоксичної дії флударабіну, циклофосфаміду та бендамустину при ХЛЛ *ex vivo*.

Об'єкт дослідження: В-лімфоцити та плазма крові хворих на ХЛЛ.

Предмет дослідження: чутливість В-лімфоцитів до дії хіміопрепаратів *ex vivo* з урахуванням ряду молекулярно-біологічних маркерів клітин; вплив активації CD150 та CD180 на експресію CD20 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів, рівень експресії та секреції ними IL-6, IL-10 та ефективність дії досліджуваних хіміопрепаратів.

Методи дослідження. Імунофенотип В-лімфоцитів, виділених із периферичної крові хворих на ХЛЛ на градієнті щільності Lymphoprep, встановлювали за допомогою непрямого варіанту імуофлуоресцентного методу з використанням проточної цитометрії. Оцінку життєздатності злоякісно трансформованих В-лімфоцитів проводили за результатами резазуринового тесту. Рівень експресії мРНК ізоформ CD150 та цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 оцінювали методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. Рівень експресії білків IL-6 та IL-10 в клітинах визначали з використанням вестерн блот аналізу. Твердофазний імуносорбентний сендвіч-метод ELISA був застосований з метою детекції вмісту IL-6 та IL-10 в сироватці крові хворих на ХЛЛ та середовищі культивування злоякісно трансформованих В-лімфоцитів. Оцінка достовірності отриманих результатів визначалась з використанням методів статистики.

Наукова новизна отриманих результатів. В результаті комплексного підходу із застосуванням сучасних методів дослідження ідентифіковано спектр маркерів імунофенотипового та цитокінового профілю злоякісно трансформованих В-лімфоцитів при ХЛЛ, які потенційно можуть бути використані у якості предиктивних факторів чутливості до дії цитостатиків.

Вперше серед імунофенотипових маркерів, які включені до діагностичної панелі ХЛЛ, виявлені такі, що асоційовані із високою чутливістю В-лімфоцитів до дії цитостатиків. Зокрема, встановлено зв'язок між високою чутливістю В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичної дії БН та CD5^{М[>]}, CD37^{М[<]}, CD38⁻ та CD40^{М[<]} фенотипом клітин ($p < 0,05$). Достовірно краща чутливість до дії ЦФ виявлена за умов експресії CD5 та

CD20 на рівні вище значення медіани серед дослідженої вибірки хворих на ХЛЛ.

Вперше з'ясовано предиктивну значимість CD150 та CD180 при ХЛЛ: наявність експресії CD150 та/або CD180 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ асоційована із низькими показниками життєздатності цих клітин за умов дії ФЛ у монорежимі, а також у комбінації із ЦФ, що може бути обумовлено характером експресії деяких ізоформ CD150 у В-лімфоцитах. Так, достовірно більш чутливими до дії ФЛ є В-лімфоцити, у яких визначено високий рівень експресії мРНК mCD150 (M>) та низький рівень експресії nCD150 (M<), а до ЦФ – за умов низького рівня експресії мРНК mCD150 (M<) ізоформи ($p<0,05$).

Вперше доведено можливість підвищення чутливості В-лімфоцитів до БН *ex vivo* за рахунок активації CD180-опосередкованого сигнального шляху, що призводить до зменшення кількості життєздатних клітин у 8,9 разів.

Доповнені наукові відомості щодо експресії мРНК цитокінів CCL3, CCL4 та IL-6, IL-10 у В-лімфоцитах при ХЛЛ з урахуванням їх імунофенотипу. Вперше встановлено, що для CD150⁺CD180⁺ В-лімфоцитів властивий достовірно вищий рівень експресії мРНК CCL3 і CCL4, а також низька експресія IL-6 та IL-10 як на рівні мРНК, так і білка, порівняно із відповідними показниками у CD150⁻CD180⁻ клітинах ($p<0,05$). Виявлено, що активація CD150 та/або CD180 обумовлює достовірне зниження рівня експресії мРНК IL-6 і IL-10 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ та зменшує секрецію ними імуносупресорного IL-10 *ex vivo*. Вперше встановлено предиктивну значимість показників високого рівня (M>) експресії мРНК CCL3 і CCL4 до цитотоксичної дії ФЛ і БН та низького рівня експресії (M<) мРНК IL-10 і IL-6 - до ФЛ і ЦФ, а також до БН відносно IL-10 *ex vivo*.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані в ході виконання дисертаційного дослідження результати аргументують необхідність комплексного підходу при виборі схеми лікування хворих на ХЛЛ із урахуванням клінічних характеристик хворих та предиктивних

маркерів молекулярного профілю В-лімфоцитів, асоційованих із чутливістю до дії цитостатиків, що забезпечить індивідуальний підбір оптимальної схеми лікування. Враховуючи вперше встановлену предиктивну значимість імунофенотипових маркерів, включених до діагностичної панелі лімфопроліферативних захворювань, індивідуалізація лікувальної тактики хворих на ХЛЛ можлива вже на етапі встановлення діагнозу.

Зважаючи, що В-лімфоцити хворих на ХЛЛ характеризуються низьким рівнем експресії CD20 на плазматичній мембрані порівняно із нормальними В-лімфоцитами, отримані нами фундаментальні дані щодо підвищення рівня експресії даного антигена шляхом активації CD150 та CD180-опосередкованих сигнальних каскадів є підґрунтям для розробки нових підходів до підвищення ефективності анти-CD20 таргетної терапії. Крім того, виявлена можливість регулювати чутливість В-лімфоцитів до дії бендамустину через лігацію CD180 дозволяє розробити стратегію підвищення ефективності хіміотерапії через активацію поверхневих рецепторів у тих хворих на ХЛЛ, В-лімфоцити яких мають низьку чутливість до хіміопрепарату.

Безпосереднє залучення CD150 та CD180 до негативної регуляції рівня експресії та секреції злоякісно трансформованими В-лімфоцитами імуносупресорного IL-10, який є фактором несприятливого прогнозу перебігу пухлинного процесу, спонукає до подальших досліджень, спрямованих на зниження рівня секреції IL-10 та інгібування IL-10-залежного стану загальної імуносупресії при ХЛЛ.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно опрацьовано та проаналізовано наукову літературу згідно тематики дослідження, виконано основний об'єм експериментальних досліджень та їх статистичну обробку. Спільно з науковим керівником сформульовано мету та завдання роботи, а на основі отриманих в ході виконання роботи результатів проведено їх узагальнення та сформульовано висновки. Верифікація діагнозу

ХЛЛ проводилась співробітниками відділу онкогематології ІЕПОР ім. Р.Є.Кавецького під керівництвом зав.відділу д.мед.н., проф. Д.Ф. Глузмана.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені та обговорені на: конференції молодих вчених «Fundamental Medicine: Integrated Approaches to Cancer Therapy» (Київ, 2019 р.), XV міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2019 р.), 6-му Українському конгресі клітинних біології з міжнародних представництвом (Яремче, Україна, 2019 р.), II міжнародній конференції «Tumor and Host: Novel Aspects of Old Problem» (Київ, 2019 р.) та XVI міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2020 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 10 наукових праць, зокрема 4 статті, з яких 2 у журналах, що належать до фахових видань із переліку затверджених МОН України та 2 статті в наукових виданнях держав, що входять до Організації економічного співробітництва та розвитку, 1 інформаційний лист МОЗ України та 5 тез у збірках наукових конференцій.

Обсяг та структура дисертації. Дисертацію викладено українською мовою на 160 сторінках комп'ютерного набору. Робота містить наступні розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи дослідження, 3 розділи власних досліджень, узагальнення та обговорення результатів, висновків та списку використаної літератури, який налічує 207 посилань, з них 5 кирилицею. Робота проілюстрована 20 рисунками та 20 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальні відомості про хронічний лімфолейкоз

Хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ) – лімфопроліферативне захворювання, в основі якого лежить клональне накопичення зрілих неопластичних В-лімфоцитів у периферичній крові, кістковому мозку та вторинних лімфоїдних органах [1, 2]. Клінічно діагноз ХЛЛ встановлюється відповідно до переліку рекомендацій ВООЗ (2008 рік) щодо класифікації новоутворень кровотворної та лімфоїдної тканини. Слід зазначити, що у 2016 році було переглянуто ряд положень цих рекомендацій щодо підходів до діагностики та лікування ХЛЛ, особливо у пацієнтів із асимптоматичним перебігом захворювання. Крім того, на сьогодні значно розширилось розуміння біології ХЛЛ, роль мутаційного статусу генів важких ланцюгів імуноглобулінів (*IGHV*) та наявність делецій у гені *TP53* в злоякісно трансформованих В-лімфоцитах, як ключових маркерів, які корелюють із виживаністю пацієнтів та чутливістю до різних режимів хіміотерапії і тому є важливі при підборі схем лікування [3, 16].

У класифікації ВООЗ ХЛЛ не виділений в окрему нозологічну форму, а об'єднаний із лімфомою з малих лімфоцитів (ЛМЛ) на основі їх схожості за морфологічними, імунофенотиповими та генетичними показниками, а також підходами до лікування. Вважається, що ХЛЛ та ЛМЛ є різновидами однієї і тієї ж онкопатології, які відрізняються за рівнем лімфоцитозу на фоні наявної в клінічній картині перебігу аденопатії [17, 18]. ХЛЛ не виникає раптово, зазвичай йому передуює стан моноклонального В-лімфоцитозу (МВЛ), який на відміну від ХЛЛ та ЛМЛ, не класифікується як онкогематологічне захворювання [18]. МВЛ діагностується у приблизно 12% здорових пацієнтів і характеризується наявністю в периферичній крові В-лімфоцитів в кількості менше $5 \times 10^9/\text{л}$. В-лімфоцити в переважній більшості випадків МВЛ мають типовий для ХЛЛ імунофенотип ($\text{CD5}^+ \text{CD22}^{\text{low/-}} \text{CD23}^+ 79b^{\text{low/-}}$), однак також зустрічаються атипові $\text{CD5}^+ \text{CD20}^{\text{high}} \text{CD23}^{\text{var}}$ (ХЛЛ-подібні) та CD5^- (ХЛЛ-

неподібні) форми МВЛ [19]. Разом з тим, такі характерні для ХЛЛ/ЛМЛ ознаки як органомегалія, лімфаденопатія, цитопенія, ураження кісткового мозку тощо, не детектуються за МВЛ. При типовій формі МВЛ важливе прогностичне значення щодо ймовірності подальшого розвитку ХЛЛ/ЛМЛ відіграє ступінь В-лімфоцитозу. Відомо, що при МВЛ із лімфоцитозом $<0,5 \times 10^9/\text{л}$ частота генетичних мутацій та кількість В-лімфоцитів із стереотиповими В-клітинними рецепторами (ВКР) є значно нижчою, ніж це спостерігається при лімфоцитозі $0,5-5,0 \times 10^9/\text{л}$. Загалом, МВЛ із низьким лімфоцитом вважається стабільною формою перебігу з малою ймовірністю розвитку ХЛЛ, в той же час картина перебігу МВЛ із високим вмістом В-лімфоцитів є схожою до такої, що спостерігається на «0» стадії ХЛЛ згідно класифікації Rai і тому потребує постійного ретельного моніторингу [19-21]. Цікавим є факт, що для МВЛ характерним є більший вміст про-запальних цитокінів (IL-8, IFN- γ , TNF- α) та низька активність фагоцитарних клітин порівняно із початковими стадіями ХЛЛ, що ймовірно вносить вклад в процес ініціації пухлинного процесу [22].

У 2-10% випадків ХЛЛ спостерігається розвиток синдрому Ріхтера, тобто перехід типового ХЛЛ у дифузну В-крупноклітинну лімфому (ДВКЛ), що характеризується вкрай агресивним перебігом. Даний синдром зазвичай розвивається раптово та діагностується при появі у хворих на ХЛЛ таких симптомів, як раптове схуднення, швидке збільшення розміру лімфатичних вузлів, тромбоцитопенія, шкірні висипи [23, 24]. Слід зазначити, що загалом прогноз для пацієнтів із ХЛЛ, у яких встановлено синдром Ріхтера, є вкрай несприятливим. Медіана показників загальної виживаності у пацієнтів із ХЛЛ без синдрому Ріхтера в анамнезі становить 167 місяців проти 71 місяців у тих випадках, коли у хворих спостерігається перехід ХЛЛ в ДВКЛ, причому показники загальної виживаності з моменту діагностування зазначеного синдрому зазвичай не перевищують 1 року [23, 25]. Застосування класичних підходів до лікування пацієнтів із ДВКЛ, яка виникла *de novo*, практично не дає задовільних результатів для хворих із

синдромом Ріхтера. Аналіз ефективності ряду хіміотерапевтичних схем з різним механізмом дії (антрациклін-/платино-/флударабін-вмісні препарати) показав, що, не зважаючи на позитивну відповідь 40-60% хворих на лікування, повної ремісії вдалось досягти лише у 7-20% пацієнтів. Показники загальної виживаності цих хворих коливалися в межах 8-27 місяців залежно від застосованої схеми хіміотерапії [26]. Більш того, було показано, що у разі відсутності попереднього хіміотерапевтичного лікування у хворих на ХЛЛ, показники загальної виживаності за наявності синдрому Ріхтера є значно вищими (46,3 місяців) в порівнянні із пацієнтами, що раніше отримували протипухлинну терапію (7,8 місяців відповідно) [27]. Серед можливих підходів до лікування хворих на ХЛЛ з синдромом Ріхтера значне місце займає імунотерапія з використанням антагоніста рецептора PD-1 (пембролізумаб), що успішно пройшла II фазу клінічних випробувань [28]. Ефективність даного підходу обумовлена високим рівнем експресії PD-1 на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах за наявності у пацієнтів синдрому Ріхтера, тоді як при ДВКЛ *de novo* та ХЛЛ/ЛМЛ експресія PD-1 є дуже низька або взагалі відсутня [29]. Наразі немає чітко визначених прогностичних критеріїв, за якими можна оцінити ризик виникнення синдрому Ріхтера у пацієнтів із ХЛЛ. В той же час, доведено, що високі показники вмісту лактатдегідрогенази в плазмі крові, трисомія 12 хромосоми, поліморфізм генів *CD38*, *LRP4*, *BCL-2* та наявність мутацій в гені *NOTCH1*, асоційовані із високим ризиком виникнення зазначеного синдрому [1, 24, 26, 30].

Згідно статистичних даних ВООЗ лейкемії входять до переліку найбільш розповсюджених типів онкопатологій у світі, серед яких ХЛЛ знаходиться на 3 місці по кількості діагностованих випадків на рік, з невеликим відривом (4-6%) поступаючись місцем лише ДВКЛ та новоутворенням плазмочитарного походження [31, 32]. Кількість нових випадків захворюваності на ХЛЛ у США за оцінками Національного інституту раку протягом 2019 та 2020 років досягала позначки у 20 тис.

випадків на рік, що становить приблизно 1,2% від усіх діагностованих онкопатологій за цей період. Для порівняння, на долю гострого лімфобластного лейкозу та хронічного мієлолейкозу припадало близько 0,3% та 0,5% випадків, відповідно, від загального числа онкологічних хворих [33, 34]. В українському канцер-реєстрі Національного інституту раку надано статистичну інформацію щодо кількості нових випадків захворюваності на лейкемії загалом, без поділу на окремі нозології. Станом на 2019 рік показник захворюваності на лейкемії в Україні становив 7,8 на 100 тис. населення або 2795 випадків (2% від усіх діагностованих онкопатологій за рік) [35]. Для ХЛЛ відмічена гендерна та географічна гетерогенність щодо захворюваності серед населення. На основі розподілу випадків ХЛЛ з урахування статі пацієнтів встановлено, що в середньому коефіцієнт співвідношення кількості хворих на ХЛЛ чоловічої статі по відношенню до хворих жіночої статі (Ч/Ж) становить 1,5. Крім того, для пацієнтів із ХЛЛ жіночої статі показник 10 річної виживаності є в 2 рази вищим порівняно із чоловіками (27% проти 15%) [36]. Чітко окреслених причин такого розподілу немає, однак є припущення щодо домінування генетичної складової у виникненні цієї нозологічної форми раку, що обумовлено більш високою частотою діагностованих генетичних мутацій серед пацієнтів чоловічої статі, показники якої співпадають із величиною співвідношення захворілих Ч/Ж [37]. Щодо регіонального розподілу, то кількість випадків ХЛЛ на 100 тис. населення у країнах Азії є в декілька разів нижчою за той самий показник у країнах західного світу [38].

1.2. Прогностичні та предиктивні маркери хронічного лімфолейкозу

На сьогодні одним із ключових завдань досліджень в області онкології є пошук нових маркерів для ранньої діагностики та прогнозування перебігу онкопатологій в цілому. Однак, при аналізі характеру експресії певного маркеру і його використання для оцінки стану пацієнта та подальшого

прогнозування перебігу захворювання, потрібно розрізняти і враховувати з якими саме показниками корелює рівень його експресії. Загалом всі маркери, що використовуються в клінічній практиці розподілені на діагностичні, прогностичні та предиктивні [39]. До групи діагностичних належать ті з них, що визначають ризики розвитку певної онкопатології, ймовірність прогресування пухлинного процесу, а також використовуються на початковому етапі обстеження пацієнтів з метою диференційної діагностики. Характер експресії прогностичних маркерів тісно пов'язаний із показниками виживаності пацієнтів і оцінка яких дозволяє виокремити групу пацієнтів із агресивним характером перебігу захворювання. Натомість предиктивні маркери дозволяють передбачати ефективність використання певних схем медикаментозного лікування. Для ХЛЛ відмічена значна гетерогенність клінічних проявів пухлинного процесу, що обумовлено в першу чергу генотипово-фенотиповою варіабельністю злоякісно трансформованих В-лімфоцитів. Пошук нових молекулярно-генетичних маркерів забезпечує постійне вдосконалення розуміння патобіології ХЛЛ, зокрема механізмів його виникнення, характеру перебігу та можливість оцінки прогнозу на майбутнє.

Наразі описано цілий ряд молекулярно-генетичних маркерів, які асоційовані із прогнозом перебігу ХЛЛ [4, 5]. З метою стандартизації процедури прогнозування було проведено оцінку вагомості 28 найбільш відомих прогностичних маркерів у 3400 пацієнтів з лікарень по всьому світі, в результаті чого було обрано 5 з них, які виявились найбільш асоційованими із показниками загальної виживаності хворих. Виокремлені таким чином маркери лягли в основу розробки, так званого, міжнародного прогностичного індексу ХЛЛ (ХЛЛ-МПІ), за яким всі випадки цієї нозологічної форми раку залежно від характеру експресії цих маркерів розподіляються на 4 групи ризику з відповідними показниками очікуваної 5-річної виживаності пацієнтів [40, 41]. До переліку критеріїв ХЛЛ-МПІ включено вік пацієнта, вміст $\beta 2$ -мікроглобуліну в сироватці крові, мутаційний статус генів *IGHV*,

наявність мутації *TP53*/делеції *17p*, а також стадія ХЛЛ за Rai, яка в свою чергу включає визначення загальних показників периферичної крові (лейкоцитоз, рівень гемоглобіну, вміст тромбоцитів), наявність лімфаденопатії та збільшення паренхіматозних органів (печінка, селезінка) [40, 42]. Згодом було переглянуто перелік параметрів оцінки прогнозу перебігу ХЛЛ, що були включені до першої редакції ХЛЛ-МПП, на основі яких всі випадки ХЛЛ розподіляються вже на 3 аналогічні групи ризику. На думку авторів, найбільш вагомими для прогнозування перебігу даного захворювання є мутаційний статус генів *IGHV* та наявність мутації *TP53*/делеції *17p* у В-лімфоцитах, оскільки саме ці показники безпосередньо відображають біологічні властивості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів, а також асоціюються із чутливістю хворих на ХЛЛ до хіміопрепаратів [6, 43].

Мутаційний статус генів *IGHV* залежить від стадії диференціювання злоякісно трансформованих В-лімфоцитів, на якій вони зупинили свій розвиток [44]. Дозрівання зрілих В-лімфоцитів починається з формування наївних В-лімфоцитів, які в подальшому можуть активуватись у відповідь на антиген Т-залежним або Т-незалежним шляхом. Активація В-лімфоцитів по Т-залежному шляху відбувається в межах зародкових центрів у вторинних лімфоїдних органах, обов'язковим етапом якої є соматична гіпермутація генів *IGHV* ВКР. Т-незалежний шлях не передбачає реаранжування генів *IGHV* та призводить до прямої активації В-лімфоцитів антигеном без етапу формування зародкового центру [45, 46]. Частота випадків ХЛЛ з мутованим статусом генів *IGHV* становить ~60%, тоді як з немutowаним ~ 40% від загальної кількості відповідно. Немutowаний статус встановлюється у разі, якщо послідовність генів *IGHV* злоякісно трансформованих В-лімфоцитів є більш як на 98% гомологічною із послідовністю *IGHV* наївних В-лімфоцитів [47, 48]. Хворі на ХЛЛ із мутованим статусом генів *IGHV* характеризуються втричі більшою медіаною виживаності та сприятливим прогнозом перебігу

захворювання в цілому порівняно із пацієнтами з немутованим статусом генів *IGHV* [9].

Визначення мутаційного статусу генів *IGHV* при ХЛЛ є досить складним та дороговартісним, тому проводились пошуки сурогатних прогностичних маркерів, експресія яких корелює із мутаційним статусом генів *IGHV*. До найбільш відомих таких маркерів відносять поверхневий рецептор CD38 та кіназу Zap70, наявність експресії яких корелює із несприятливим перебігом захворювання пухлинного процесу, низькими показниками 5-річної виживаності та відповіді хворих на лікування [49-51].

Функціонально Zap70 залучений до позитивної регуляції ВКР-опосередкованого підвищення рівня експресії рецепторів хоумінгу CCR7 та CXCR4 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів, що призводить до підвищення міграційної здатності злоякісно трансформованих В-лімфоцитів у вторинні лімфоїдні органи для їх додаткової стимуляції [52, 53]. Окрім того, експресія Zap70 асоційована із високим рівнем секреції цитокінів CCL3 та CCL4, що є ознакою несприятливого прогнозу перебігу ХЛЛ [51, 54]. Слід зауважити, що переважна більшість сигнальних шляхів, до регуляції яких залучена кіназа Zap70 в В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ, спрямована на регуляцію механізмів прямого чи опосередкованого контакту цих клітин із елементами локального мікрооточення. Це дозволило переглянути роль Zap70 як ймовірного регулятора сприйняття та передачі сигналів, опосередкованих впливом факторів локального мікрооточення при ХЛЛ [55, 56]. Наявність експресії CD38 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ асоційована із високим ступенем лімфаденопатії та низькими показниками безрецидивної виживаності пацієнтів [57]. Слід наголосити, що лігація CD38 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ призводить до активації кінази Zap70 шляхом її фосфорилування, яка при цьому залучена до передачі сигналів, опосередкованих активацією CD38, що підкреслює існування взаємозв'язку між даними молекулами та пояснює швидкі темпи прогресії серед тих

випадків ХЛЛ, у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах яких одночасно була детектована експресія CD38 та Zap70 [49, 58, 59].

Високі рівні експресії CD49d на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах асоційовані із несприятливим прогнозом перебігу захворювання, наявністю експресії CD38 і Zap 70, такими клінічними проявами, як високий лімфоцитоз, тромбоцитопенія і низькі показники гемоглобіну та вказує на необхідність проведення курсів хіміотерапії [60-63]. Стан лімфаденопатії, що часто супроводжує етап прогресування ХЛЛ, пояснюється активацією процесів трансендотеліальної міграції окремої групи В-лімфоцитів, яким, на відміну від циркулюючого пулу клітин, властивий високий рівень експресії CD49d, до лімфатичних вузлів з метою отримання ко-стимуляторних сигналів [10, 64]. Не зважаючи на те, що більшість випадків ХЛЛ характеризуються наявністю CD49d⁺ або CD49d⁻ популяції В-лімфоцитів (гомогенні), у 20% випадків ХЛЛ відмічено існування обох популяцій В-лімфоцитів одночасно (гетерогенні). Враховуючи вибіркове зростання популяції CD49d⁺ В-лімфоцитів після проведення хіміотерапії та їх значно вищий проліферативний потенціал порівняно з CD49d⁻ В-лімфоцитами, а також низькі показники безрецидивної виживаності у групі гетерогенних випадків ХЛЛ порівняно із гомогенними, визначення профілю експресії CD49d вказує на його важливість для прогнозування перебігу пухлинного процесу [65].

У В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ та ЛМЛ також відмічається високий рівень експресії транскрипційного фактору LEF1, який задіяний в регуляції процесів проліферації, життєздатності, міграції та інвазії клітин, що позитивно корелює із низькими показниками загальної виживаності хворих на ХЛЛ та наявністю експресії Zap70 у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах [66-68]. Слід зазначити, що високий рівень експресії LEF1 при ХЛЛ/ЛМЛ дозволяє здійснювати диференційну діагностику цих нозологій від лімфоми маргінальної зони, лімфоплазмочитарної лімфоми та фолікулярної лімфоми, при яких експресія LEF1 у В-лімфоцитах не виявлена

[69]. Крім того у хворих на ХЛЛ, які мають синдром Ріхтера, рівень експресії LEF1 є значно вищим за відповідні показники у випадку ДВКЛ, яка виникла *de novo* [70].

Одним із ключових етапів процесу злоякісної трансформації клітин, є активація метаболічних шляхів та накопичення активних форм кисню (АФК) [71]. У злоякісно трансформованих В-лімфоцитах при ХЛЛ також спостерігається зростання показника споживання кисню, а також високий рівень окисного фосфорилювання в мітохондріях, що асоційовано із станом окисного стресу в клітинах [72]. Вважається, що провідна роль в дисбалансі споживання кисню В-лімфоцитами при ХЛЛ належить ВКР-опосередкованим сигналам, адже використання інгібіторів РІЗкінази призводить до зниження даного показника в клітинах [73]. Враховуючи, що стан окисного стресу сприяє окисленню компонентів мембран, пошкодженню ДНК та накопиченню мутацій, високі рівні АФК у В-лімфоцитах можна вважати факторами несприятливого прогнозу перебігу захворювання. Зокрема, відмічено наявність коеляційного зв'язку між рівнем окисного фосфорилювання в В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ та статусом генів *IGHV*, експресією *Zap70* та стадіями ХЛЛ за Rai [73, 74]. Слід також зазначити, що у хворих на ХЛЛ із високим рівнем АФК в В-лімфоцитах, латентний період безсимптомного перебігу захворювання був значно довшим, ніж у групі пацієнтів із низьким рівнем АФК [75].

Поряд із наведеними метаболічними порушеннями, при ХЛЛ також відмічається накопичення гранул ліпідної природи в цитоплазмі В-лімфоцитів, що не характерно для клітин умовно здорових донорів. Високі показники експресії ліпопротеїнліпази (ЛПЛ), що залучена до процесів метаболізму тригліцеридів, у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ корелюють із немутованим статусом генів *IGHV* та несприятливим прогнозом перебігу пухлинного процесу [76-78]. Експресія ЛПЛ позитивно регулюється транскрипційним фактором STAT3, що є конститутивно активним в злоякісно трансформованих В-лімфоцитах і експресія якого асоційована із

кращою виживаністю клітин, високим проліферативним потенціалом та блокуванням систем активації апоптозу [79, 80]. Крім того, STAT3 підвищує рівень експресії рецептора CD36 на В-лімфоцитах, який відповідає за зв'язування та транслокацію жирних кислот в клітині [81].

Окремим питанням залишається прогностичне значення генетичних порушень, які детектуються у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах, для оцінки прогнозу перебігу ХЛЛ. На сьогодні для ХЛЛ описано ряд хромосомних аберацій, зокрема *del(13q)*, *del(11q)*, *del(17p)*, трисомія по 12 хромосомі та точкові мутації у генах *SF3B1*, *ATM*, *TP53*, *NOTCH1*, *POT1*, *CHD2*, *XPO1*, *BIRC3*, *BRAF*, *MYD88*, *EGR2*, *MED12*, *FBXW7*, *ASXL1*, *KRAS*, *NRAS*, *MAP2K1*, *NFKBIE*, *TRAF3*, *DDX3X* тощо [1, 82, 83]. Вагоме значення при виборі стратегії лікування первинних хворих на ХЛЛ відіграє наявність мутації у гені-супресорі пухлинного росту *TP53*, причинами чого можуть бути точкові мутації в гені або *del(17p13)*, наявність яких серед всіх випадків ХЛЛ з наявністю змін в нуклеотидній послідовності *TP53* зустрічається у ~5-9% випадків. Однак, найчастіше (~90% випадків ХЛЛ) В-лімфоцити характеризуються одночасно наявністю *del(17p13)* на одній з алелей гена та точковою мутацією *TP53* на другій алелі [84]. Показники загальної виживаності та тривалість латентного характеру перебігу ХЛЛ є значно меншими у групі хворих з мутацію *TP53/del(17p13)* порівняно з пацієнтами, у яких відсутнє дане генетичне порушення. Крім того, у разі якщо мутація *TP53/del(17p13)* у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах виникає в результаті прогресії захворювання, показники загальної виживаності хворих є нижчими в порівнянні із тими випадками ХЛЛ, коли дане генетичне порушення детектується при первинному обстеженні, і становлять 1-1,5 роки проти 4-5 років, відповідно [82, 85, 86].

В межах ділянки 11q22-q23 розташований ген протеїнкінази АТМ, яка в разі появи дволанцюгових розривів в ДНК ініціює зупинку клітинного циклу та залучена до координації процесів подальшої репарації або ініціації апоптозу. Факт *del(11q22-q23)*, що реєструється у ~10% випадках ХЛЛ,

вказує на збільшення ймовірності накопичення додаткових мутації через інактивовану АТМ та асоційований із агресивним перебігом захворювання, пізніми стадіями за Binet і немутованим статусом генів *IGHV* [82, 85, 87, 88].

del(13q14) є найбільш численною хромосомною аберацією за кількістю випадків ХЛЛ, у яких вона діагностується (~55-60%) і, на відміну від вищеописаних делецій, вказує на сприятливий перебіг пухлинного процесу [85]. В ділянці 13q14 локалізується кластер генів *miPHK15* та *miPHK16*, що відповідають за блокування анти-апоптотичного білка Bcl-2 і сприяють порушенню процесу активації NF-κB сигнального шляху у В-лімфоцитах через вплив на експресію гена *DLEU7* [89, 90]. Окрім того, *miPHK15* та *miPHK16* позитивно регулюють рівень експресії ROR1, що обумовлює зростання темпів проліферації В-лімфоцитів, корелює із низькими показниками загальної виживаності хворих та короткою індолентною фазою захворювання [91-93].

Трисомія 12 хромосоми зустрічається у ~10-25% пацієнтів із ХЛЛ та корелює із немутованим статусом генів *IGHV*, експресією CD38, CD49d і Zap70, мутаціями в генах *TP53* і *NOTCH1*, високим рівнем експресії поверхневих інтегринів (CD11b, CD18, CD29) та молекули адгезії CD323 [50, 94-96]. Натомість при трисомії 12 хромосоми у В-лімфоцитах детектуються високі рівні експресії мРНК транскрипційного фактора (ТФ) NFAT2, що більш характерно для випадків ХЛЛ із індолентним перебігом даного захворювання та нечутливістю клітин до сигналів активації ВКР [97, 98]. Низька ж експресія NFAT2 вказує на агресивний перебіг ХЛЛ, вищий рівень аденопатії і спленомегалії та наявність експресії CD38, Zap70 у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах [99]. Враховуючи, що для даної генетичної аномалії відмічені зв'язки як зі сприятливими так і з несприятливими маркерами перебігу ХЛЛ, на сьогодні точно не встановлено роль трисомії 12 хромосоми в біології ХЛЛ.

Окрім хромосомних аберацій, у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ відмічають наявність точкових генних мутацій,

що обумовлює особливості перебігу пухлинного процесу. Найбільш часто (~8%) при ХЛЛ зустрічається активуюча мутація в гені *NOTCH1* і при цьому спостерігається тенденція до зростання даного показника із прогресуванням ХЛЛ, що досягає максимальних показників при синдромі Ріхтера (30-40%) [100, 101]. Наявність мутації в *NOTCH1* є ознакою несприятливого прогнозу для пацієнтів, так як протеїн, кодований даним геном, залучений до позитивної регуляції процесів росту, виживаності та хоумінгу В-лімфоцитів [100, 102]. Також встановлено кореляційний зв'язок між наявністю мутації в гені *NOTCH1* та експресією CD38, CD49d, Zap70 [103, 104] у В-лімфоцитах, а також із трисомією 12 хромосоми [105] та точковими мутаціями в генах *MGA*, *BCOR*, *XPO1*, *SF3B1*, *BIRC3* та *MYD88* [100, 106].

Наявність мутацій в гені *MGA*, який є супресором протоонкогена *MYC*, більш характерно для випадків ХЛЛ групи високого ризику згідно ХЛЛ-МПІ та під час розвитку синдрому Ріхтера (30%), що вказує на ймовірну роль *MGA* в прогресуванні ХЛЛ [107]. Мутації в генах *SF3B1* та *BIRC3* теж асоційовані із прогресуванням ХЛЛ та є факторами несприятливого прогнозу для пацієнтів в цілому [9, 85, 108]. Для ~80% випадків ХЛЛ, В-лімфоцити яких мають точкові міссенс-мутації у гені експорину *XPO1*, характерним є короткий індолетний період, немутований статус *IGHV*, високий рівень експресії CD38, Zap70 та наявність del(13q14) у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах [109, 110].

На відміну від широкого спектру прогностичних маркерів перебігу ХЛЛ, інформація про наявність предиктивних маркерів при даній нозології є достатньо обмеженою [111]. При цьому слід зазначити, що для більшості відомих факторів, першочерговим було відкриття їх прогностичної складової, а предиктивна роль рівня їх експресії при ХЛЛ була виявлена як другорядна.

У пацієнтів із порушенням гена *TP53* спостерігаються низькі показники відповіді на флударібін-вмісну терапію, короткий термін безрецидивної виживаності та детектуються ознаки мінімальної залишкової

хвороби [112, 113]. Разом з тим для таких пацієнтів відмічено високі показники ефективності хіміопрепаратів, направлених на блокування ВКР-опосередкованих сигнальних шляхів [111, 114]. Крім *TP53*, наявність саме мутованого статусу генів *IGHV* позитивно корелює із високими показниками загальної та безрецидивної виживаності пацієнтів після їх лікування із комбінованим застосуванням флударабіну (ФЛ), циклофосфаміду (ЦФ) та ритуксімабу [115]. Щодо *NOTCH1* – у разі наявності мутацій в даному гені, додавання анти-CD20 МКАТ до терапії на основі ФЛ та ЦФ не призводило до значних змін у відповіді пацієнтів на лікування. Однак, у разі немутованого статусу гену *NOTCH1*, присутність анти-CD20 МКАТ у складі комбінованої хіміотерапії призводило до зростання показників загальної та безрецидивної виживаності до 1,5-2 разів порівняно із ефектом від комбінації ФЛ лише із ЦФ [112].

Враховуючи диференційний характер експресії поверхневих рецепторів, а також їх здатність регулювати внутрішньоклітинні процеси, а відтак формувати біологічні властивості В-лімфоцитів, саме вони є перспективними кандидатами на роль можливих предиктивних маркерів чутливості клітин до цитостатиків. Наразі відомо, що чутливість злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичної дії бендамустину (БН) є низькою за умов високого рівня експресії CD38 або CD69 [116, 117]. Крім того, у випадку низького рівня експресії CD20, злоякісно трансформовані В-лімфоцити є менш чутливі до дії ритуксімаба [112].

1.2.1. Рецептори CD150 та CD180 як потенційні кандидати на роль предикативних маркерів хронічного лімфолейкозу

CD150 належить до родини трансмембранних молекул SLAM, які володіють рецепторними функціями, і експресія яких детектується на Т-лімфоцитах, В-лімфоцитах, макрофагах, дендритних клітинах і тромбоцитах [118-120]. Експресія CD150 також відмічена при злоякісних новоутвореннях

гематопоезичної системи (лімфомі Ходжкіна, множинній мієломі, ДВКЛ та ХЛЛ), новоутвореннях центральної нервової системи, деяких пухлинах шлунково-кишкового тракту та у випадку плоскоклітинного раку шийки матки [121-123].

Активация CD150-опосередкованих сигнальних каскадів відбувається за рахунок гомотипової взаємодії двох CD150 рецепторів, так як CD150 є лігандом сам до себе. Трансдукція CD150-індукованого сигналу в середині клітини здійснюється за рахунок сигнального ITSM мотиву, який знаходиться в складі цитоплазматичного хвоста CD150 рецептора. Цей сигнальний мотив є сайтом зв'язування ряду білків, зокрема адапторного білка SH2D1A, тирозинфосфатази SHP-2, інозитолфосфатази SHIP та тирозинкіназ *Srk*, *Fyn* і *Lyn*. Зрештою, результатом активації CD150 рецептора із наступною передачею сигналу із залученням вищеперерахованих адапторних білків та кіназ є активація Akt та MAPK сигнальних шляхів, які відповідають за виживаність злокісно трансформованих В-лімфоцитів, підтримку їх проліферативного потенціалу та уникнення апоптозу, що в цілому сприяє прогресії захворювання [121, 124, 125]. Крім того, існують відомості щодо залучення CD150-опосередкованих сигнальних каскадів до негативної регуляції рівня секреції цитокінів IL-6, IL-8, IL-12 та TNF- α дендритними клітинами [120, 126].

Слід відмітити, що наявність експресії CD150 при ХЛЛ позитивно корелює із наявністю мутованого статусу генів *IGHV*, відсутністю генетичних аберацій та низьким рівнем експресії CD38 та CD49d [127]. Натомість у групі хворих на ХЛЛ із CD150⁻ фенотипом В-лімфоцитів перебіг захворювання характеризується більш агресивним характером, показники 10-річної виживаності таких пацієнтів є значно нижчими порівняно до CD150⁺ випадків ХЛЛ (94,7% проти 77,5%), а індолентна фаза захворювання триває 7,6 років проти 2,2 роки, відповідно [128]. Крім того, відсутність експресії CD150 асоційована із резистентністю клітин хворих на ХЛЛ до інгібіторів Bcl2, що може бути обумовлено відсутністю вільного Bcl2 в клітині, який

знаходиться у зв'язаному із *beclin 1* стані, дисоціація яких відбувається, зокрема, в результаті CD150-опосередкованих сигнальних шляхів [129].

CD180 належить до родини Toll-like рецепторів (TLRs), експресія якого в межах гемопоетичної системи детектується на В-лімфоцитах, дендритних клітинах та макрофагах [130]. Кількість CD180⁺ випадків ХЛЛ складає 60%, однак порівняно із В-лімфоцитами умовно здорових донорів, експресія CD180 при ХЛЛ є нижчою [130, 131]. Окрім ХЛЛ, низький рівень експресії CD180 спостерігається при лімфомі мантийної зони, фолікулярній лімфомі, лімфоплазмоцитомі та на більш високому, порівняно із ХЛЛ, рівні при лімфомі маргінальної зони та неходжкінській лімфомі [130].

Найбільший ступінь гомології CD180 відмічено із TLR4, однак функціонально дані рецептори вважаються антагоністами. TLR4 виступає в ролі бактеріального сенсора та надалі індукує імунну відповідь на патоген шляхом активації NF- κ B сигнального шляху і секреції IL-6, IL-8 та TNF- α . Активація ж CD180, навпаки, призводить до інактивації NF- κ B-сигнального шляху [132]. В той же час, відмічено, що в результаті лігації CD180 на В-лімфоцитах умовно здорових донорів відбувається активація NF- κ B сигнального шляху і секреція IL-10 [133]. Наведені дані щодо можливості різнонаправленого впливу CD180 на стан активації NF- κ B-сигнального шляху підкреслює необхідність подальшого вивчення ефектів, опосередкованих активацією CD180. Аналогічно до CD150, результатом лігації CD180 на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ є активація кіназ Akt, MAPK, а також Zap70. Проте, важливо зазначити, що дана активація спостерігалась лише у 50% CD180⁺ В-лімфоцитів, що свідчить про блокування передачі CD180-опосередкованих сигнальних шляхів у В-лімфоцитах значної частини випадків ХЛЛ [131]. Разом з тим наявність експресії CD180 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів прямо корелює із мутованим статусом генів *IGHV* [134]. Роль експресії CD180 у визначенні чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до дії хіміопрепаратів наразі не була висвітлена в літературних джерелах і, враховуючи залучення

CD180-опосередкованих сигнальних шляхів до регуляції біологічних властивостей В-лімфоцитів, потребує подальшого дослідження.

1.3. Роль компонентів локального мікрооточення у патобіології хронічного лімфолейкозу

Етап взаємодії В-лімфоцитів із елементами мікрооточення в межах кісткового мозку (КМ) та лімфатичних вузлів (ЛВ) є важливим для підтримки їх виживаності, проліферації та прогресування ХЛЛ [9, 10]. Осідаючи в межах ЛВ, злоякісно трансформовані В-лімфоцити контактують з різними типами клітин, що включає мезенхімальні та епітеліальні клітини строми, «клітини-няньки», антиген-презентуючі клітини, Т-лімфоцити, НК-клітини тощо, кожен з яких вносить певний вклад в біологію ХЛЛ [135].

Злоякісно трансформовані В-лімфоцити здатні проліферувати виключно в межах ЛВ/КМ за наявності костимуляторних сигналів, тому необхідним є процес їх рециркуляції між ЛВ та периферичною кров'ю (ПК), який відбувається за механізмом хемотаксису. Профіль хемокінів, що секретують клітини ЛВ є досить широким, однак найбільш вивченим на сьогодні є роль взаємодії хемокіну CXCL12 із рецептором CXCR4 на В-лімфоцитах [10, 136].

Проліферуючі В-лімфоцити ЛВ та В-лімфоцити ПК відрізняються за статусом експресії CD5 та CXCR4, яких змінюється в процесі рециркуляції В-лімфоцитів між ЛВ та ПК [137]. В-лімфоцити ПК, які або знаходяться в стані спокою, або нещодавно вийшли за межі ЛВ характеризуються CXCR4^{low}CD5^{high} фенотипом. В той час, як зростання рівня поверхневої експресії CXCR4 на В-лімфоцитах (CXCR4^{high}CD5^{low} фенотип) асоційовано із їх міграцією до ЛВ та подальшою проліферацією [137].

CD5 є негативним регулятором ВКР-опосередкованих сигнальних шляхів у нормальних В-лімфоцитах [138], рівень експресії якого є гетерогенним при ХЛЛ. При цьому точно не встановлена прогностична роль рівня експресії CD5 на В-лімфоцитах при даній нозології. Згідно одних

даних, низька експресія CD5 корелює із поганим прогнозом для пацієнтів [139], але разом з тим виживаність хворих із CD5⁺ та CD5⁻ фенотипом В-лімфоцитів є однаковою [140]. Кращі показники виживаності хворих на ХЛЛ із CD5^{high} фенотипом В-лімфоцитів можуть бути асоційовані із негативним впливом CD5 на ВКР, який виконує провідну роль у прогресії ХЛЛ [141].

CXCR4-опосередковані сигнальні шляхи залучені до регуляції процесів хоумінгу лімфоцитів, проліферації та виживаності, а також сприяє розвитку імуносупресії шляхом підвищення рівня секреції В-лімфоцитами IL-10, який є супресором CD4⁺ Т-лімфоцитів [142, 143]. Висока експресія CXCR4 є характерною для багатьох онкопатологій, включаючи гострий лімфобласний лейкоз, фолікулярну лімфому, множинну мієлому та ХЛЛ, при якому відчений факт зростання рівня експресії CXCR4 із прогресуванням даного захворювання [144].

При тривалому культивуванні В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ *ex vivo* спостерігається їх загибель через відсутність контактів із компонентами локального мікрооточення. Натомість присутність мезенхімальних клітин або «клітин-няньок» у культуральному середовищі В-лімфоцитів значно знижує відсоток апоптотичних клітин [145-147].

Враховуючи моноцитарне походження, характерний імунотип та профіль секретованих цитокінів було встановлено, що «клітини-няньки» є аналогами пухлино-асоційованих макрофагів при солідних пухлинах, які відіграють важливу підтримуючу роль у забезпеченні прогресії пухлинного процесу [148-150].

Для «клітин-няньок» наразі описано декілька можливих механізмів, завдяки яким вони забезпечують підтримку життєздатності В-лімфоцитів при ХЛЛ. Зокрема, антиапоптотичний ефект «клітин-няньок» здійснюється за рахунок секреції ними CXCL12 (SDF-1), BAFF та APRIL. На відміну від SDF-1, який активує Akt та MAPK сигнальні шляхи у В-лімфоцитах, BAFF/APRIL зв'язуються із їх поверхневим рецептором TACI, що в подальшому опосередковує активацію канонічного NF-κB сигнального

шляху та підвищення рівня експресії антиапоптотичного білка Mcl-1 [151, 152]. Крім того, «клітини-няньки» здатні секретувати фактор BDNF, що за рахунок взаємодії із рецептором TrkB на В-лімфоцитах, який надалі через вплив на NTSR2-опосередковані сигнальні шляхи позитивно регулює рівень експресії антиапоптотичних білків Bcl-2 та Bcl-xL [153, 154]. Однак, з іншого боку, високий вміст BDNF в плазмі крові хворих на ХЛЛ корелює із кращою виживаністю хворих та показниками сприятливого прогнозу перебігу ХЛЛ, а BDNF-залежна активація внутрішньоклітинних сигнальних шляхів призводить до зниження рівня експресії CXCR4 на В-лімфоцитах при ХЛЛ [155].

Роль «клітин-няньок» у прогресії ХЛЛ не обмежується лише забезпеченням градієнту хемокінів для направленої хоміну В-лімфоцитів та підтримкою їх життєздатності, але і сприяє резистентності В-лімфоцитів до хіміопрепаратів. Зокрема, в результаті сумісного культивування В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ із «клітинами-няньками» відмічено зниження рівня експресії поверхневого рецептора CD20, а відтак сприяє зниженню чутливості клітин до дії Ритуксимабу [156].

Хоча кількість Т-лімфоцитів при ХЛЛ є нижчою порівняно із умовно здоровими донорами, відмічено наявність кореляційного зв'язку між збільшенням кількості CD4⁺ і CD8⁺ Т-лімфоцитів із прогресією ХЛЛ [157]. При даній нозології спостерігається стан виснаження Т-лімфоцитів, що обумовлено високим ступенем їх активації. Однак, при цьому Т-лімфоцити при ХЛЛ зберігають здатність до активної секреції цитокінів, що не характерно для класичного стану виснаження Т-лімфоцитів [158, 159]. Зокрема, для Т-лімфоцитів при ХЛЛ характерним є високий рівень експресії PD1, що в подальшому за рахунок зв'язування із PD-L1 на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах призводить до розвитку стану імуносупресії шляхом блокування механізму активації Т-лімфоцитів. Саме цей факт став підґрунтям для розробки таргетних препаратів з метою блокування зв'язування PD1/PD-L1 та зниження рівня імуносупресії [28, 160-162].

Не останню роль у формуванні локального мікрооточення при ХЛЛ відіграють власне злоякісно трансформовані В-лімфоцити, що здатні до активної секреції цитокінів. Зокрема, ключовими серед них є цитокіни CCL3 та CCL4, які є прогностичними маркерами перебігу ХЛЛ, а саме високі показники CCL3, CCL4 в плазмі крові корелюють із несприятливим прогнозом для пацієнтів [11, 12]. Слід зазначити, що сумісне культивування В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ із «клітинами-няньками» призводить до значного зростання рівня секреції CCL3 та CCL4 в результаті активації ВКР-опосередкованого сигнального шляху, що ще раз підкреслює важливість контакту В-лімфоцитів із елементами строми ЛВ для прогресії захворювання [146]. Крім того, CCL3 та CCL4 є хемоатрактантами для моноцитів та НК-клітин, результатом чого є збільшення їх інфільтрації в ЛВ та додаткова активація злоякісно трансформованих В-лімфоцитів [163]. Зокрема, в результаті CCL3-опосередкованої активації моноцитів спостерігається підвищення рівня секреції ними TNF- α та активація рівня експресії VCAM-1 на клітинах строми ЛВ, який є лігандом для CD49d на В-лімфоцитах та опосередковує зростання міграції В-лімфоцитів до ЛВ [164, 165].

В-лімфоцити хворих на ХЛЛ, у яких відмічена експресія CD38 та CD49d характеризуються більш високим рівнем секреції CCL3, CCL4, який до того ж зростає у разі активації CD38 *ex vivo* [164]. Важливо відмітити, що моніторинг рівня CCL3/CCL4 в плазмі крові хворих на ХЛЛ є важливим не лише в контексті прогнозування перебігу захворювання, а й у випадку оцінки ефективності лікування з використанням хіміопрепарату ібрутініб. Так як дія даного хіміопрепарата спрямована на елементи ВКР-сигнального шляху, який, зокрема, регулює рівень експресії CCL3, CCL4 у В-лімфоцитах, зниження вмісту CCL3, CCL4 в плазмі крові є свідчення позитивного терапевтичного ефекту [166].

Окрім CCL3/CCL4, показниками несприятливого прогнозу перебігу ХЛЛ є високий рівень секреції В-лімфоцитами IL-6 та IL-10, що корелює із низькими показниками загальної та безрецидивної виживаності пацієнтів,

відсутністю повної ремісії, а також впливає на формування стану загальної імуносупресії [13-15].

Злоякісно трансформовані В-лімфоцити активно секретують ІЛ-6, що обумовлює аутокринну стимуляцію за рахунок зв'язування із CD126, рівень експресії якого на В-лімфоцитах при ХЛЛ є підвищеним [167]. Крім того, в результаті такого зв'язування зростає експресія ТФ STAT3 та NF-κB, які в подальшому позитивно регулюють процеси виживаності клітин [15]. Крім аутокринної стимуляції, ІЛ-6 здатен зв'язуватись із CD130 на плазматичній мембрані регуляторних CD4⁺ Т-лімфоцитів, що індукує зниження їх супресивної функції [168]. Завдяки високому рівню секреції ІЛ-10 злоякісно трансформованими В-лімфоцитами та стан імуносупресії в результаті ІЛ-10-опосередкованого інгібування Т-лімфоцитів, припускають їх функціональну спорідненість із популяцією регуляторних В-лімфоцитів (так звані, В10-лімфоцити), які характеризуються активною секрецією ІЛ-10 і опосередковують розвиток запальних та аутоімунних реакцій [13]. Одним із можливих механізмів, за яким відбувається ІЛ-10-залежне інгібування CD8⁺ Т-лімфоцитів є активація експресії гена глікозилтрансферази *Mgat5*, яка перешкоджає зв'язуванню Т-клітинного рецептора із антигенами і призводить до інгібування імунної відповіді [169].

1.4. Хіміотерапевтичні підходи до лікування хронічного лімфолейкозу

Класичний підхід до лікування хворих на ХЛЛ ґрунтується на комбінованому застосуванні хіміопрепаратів із моноклональними антитілами проти поверхневого рецептора CD20 (ритуксимаб – РБ). Спектр ключових хіміопрепаратів, що входять до складу різних схем лікування ХЛЛ включає алкілюючі агенти (хлорамбуцил – ХА, циклофасфамід – ЦФ), пуринові аналоги (флударабін – ФЛ), а також бендамустин – БН, який поєднує в собі ознаки обох вищенаведених груп хіміопрепаратів [8]. На етапах розробки комбінованих схем хіміопрепаратів для лікування хворих на ХЛЛ

проводиться оцінка загальної відповіді пацієнтів на застосування обраної комбінації хіміопрепаратів, показники безрецидивної виживаності, ймовірність розвитку супутніх ускладнень, також враховується відсоток пацієнтів, у яких в результаті лікування спостерігалась повна ремісія [41].

В результаті порівняння ефективності дії різних ФЛ-вмісних схем, а саме FCR (ФЛ+ЦФ+РБ), FCM (ФЛ+ЦФ+цитостатик метаксантрон) та FC (ФЛ+ЦФ), які використовувались для лікування хворих на ХЛЛ, встановлено, що найменш ефективною серед досліджуваних схем виявилась FC, натомість різниця у загальній відповіді хворих, що отримували FCR та FCM терапію становила всього 3%. Однак відповідь пацієнтів на застосування FCR у групі первинних хворих становила 80%, а у групі, які раніше проходили курс лікування – 53%, в той час як ефективність застосування FCM схеми склала 75% та 42%, відповідно [170].

За попередніми дослідженнями комбіноване застосування ФЛ із мітоксантроном не дало вагомого зростання чутливості пацієнтів із ХЛЛ до даної схеми лікування порівняно до ефекту від застосування ФЛ в монорежимі. Різниця в показниках загальної відповіді хворих на застосування ФЛ та ФЛ+мітоксантрон становила $\leq 10\%$ при однакових показниках повної ремісії (20%) [171].

Також було проведено аналіз різниці в показниках ефективності лікування первинних хворих на ХЛЛ (програма випробування «CLL-8») та тих, що вже попередньо проходили хіміотерапію з приводу лікування ХЛЛ (програма випробування «REACH») із застосування FC та FCR схем лікування. В обох програмах досліджень була показана значна перевага в застосуванні саме комбінованого підходу із одночасним застосування хіміопрепаратів із моноклональними антитілами (FCR) порівняно із ефектом від FC [172, 173]. Зокрема медіани значень безрецидивної виживаності у випадку застосування FCR або FC схеми у групі первинних хворих становили 52 проти 33 місяців відповідно, а у групі раніше лікованих пацієнтів – 31 проти 21 місяця.

За результатами даних, отриманих в ході проведення декількох незалежних досліджень щодо ефективності лікування хворих на ХЛЛ із застосуванням різних комбінацій хіміопрепаратів, найбільш вагомим результатом дає застосування FCR схема, яка на сьогодні вважається золотим стандартом лікування хворих на ХЛЛ в першій лінії терапії [8]. Однак, застосування FCR терапії можливе тільки для пацієнтів молодого віку (≤ 65 років) та у випадку відсутності тяжких супутніх захворювань через високу токсичність складових компонентів даної схеми хіміотерапії та високий ризик розвитку супутніх інфекційних ускладнень та нейтропенії [174, 175].

Одним із підходів до вирішення проблеми високої токсичності FCR у пацієнтів старшої вікової групи є застосування FCR терапії у менших дозах (FCR-lite), а саме зменшення доз ФЛ та ЦФ при тій самій концентрації РБ. Показники відповіді пацієнтів із ХЛЛ на застосування FCR-lite схеми лікування лише на 5-9% відрізнялись за такі при використанні класичної FCR терапії, однак частота проявів нейтропенії виявилась значно нижчою (спостерігається у 13% проти 52% пацієнтів). Крім того, показники медіани безрецидивної виживаності становили 29 місяців у групі пацієнтів із немутованим статусом *IGHV* проти 53 місяців у випадку мутованого статусу *IGHV* та 74 місяців за умов відсутності делецій в регіонах 11q 17p, що ще раз підкреслює важливість оцінки мутованого статусу генів *IGHV* при оцінці прогнозу перебігу ХЛЛ [176-178].

Для лікування пацієнтів із ХЛЛ, які є нечутливими до ФЛ або мають високий ризик виникнення супутніх ускладнень в результаті застосування FCR терапії, пропонується використання ХА в комбінації із РБ. Додавання РБ значно підвищує показники загальної відповіді хворих (до 84%) та кількість пацієнтів, які досягли повної ремісії (10%) порівняно із застосуванням ХА в монорежимі, ефективність від застосування якого становить 31%-72% і при цьому рідко вдається досягнути стану повної ремісії. Слід зазначити, що у випадку збільшення дози ХА (в 6 разів), показники загальної відповіді пацієнтів із ХЛЛ на лікування досягали досить

високих значень (до 87%), однак ступінь гематотоксичності та вторинних інфекційних уражень був на високому рівні, що не допускає високодозове використання ХА в монорежимі для пацієнтів старшої вікової групи [179].

Крім комбінації із ХА, можливе застосування РБ із БН (BR), порівняльний аналіз ефективності яких проводився в рамках випробування «MABLE». Попри однаково високі показники загальної відповіді (98% при РБ+БН проти 97% при РБ+ХА), показники повної ремісії при застосуванні комбінації РБ+БН були в 2,7 рази вищими (24% проти 9%) ніж у випадку РБ+ХА. Крім того, серед пацієнтів, які досягли повної ремісії в результаті лікування, ознаки мінімальної залишкової хвороби детектувались у 34% та 66% хворих, які отримували РБ+БН та РБ+ХА терапію відповідно [180]. Таким чином, золотим стандартом лікування первинних хворих на ХЛЛ старшої вікової групи та пацієнтів із супутніми захворюваннями в анамнезі є комбінована схема хіміотерапії, що передбачає застосування РБ в комбінації із БН [8].

Одним із ключових етапів діагностики первинних випадків ХЛЛ та визначення групи ризику відповідно до розробленої класифікації ХЛЛ-МПП є цитогенетичний аналіз на визначення наявності мутації *TP53/del(17p13)* у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ [40, 181]. У випадку наявності даної генетичної аномалії у пацієнтів із ХЛЛ, використання класичного підходу із застосуванням FCR або BR схем хіміотерапії не рекомендується через низькі показники загальної відповіді хворих та коротку тривалість безрецидивної виживаності [181]. Для лікування хворих на ХЛЛ із мутаціями *TP53/del(17p13)* застосовують підхід таргетної терапії, складові компоненти якої направлені на блокування ВКР-асоційованих протеїнказ. В основному в клінічній практиці застосовують два типи препаратів – це інгібітор ВТК кінази ібрутініб та інгібітор РІЗ кінази іделасіб, які перешкоджають їх активації шляхом фосфорилування [114, 182].

РЕЗЮМЕ

ХЛЛ – лімфопроліферативне захворювання, при якому спостерігається значна варіабельність в симптоматиці клінічної картини перебігу, що обумовлено широким спектром фенотипово-генотипових характеристик злоякісно трансформованих В-лімфоцитів.

Відповідно до останніх рекомендацій ВООЗ та міжнародного прогностичного індексу ХЛЛ, ключовими характеристиками, які безпосередньо відображають біологічні властивості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів та строго асоційовані із прогнозом перебігу ХЛЛ і тому є вагомими при прогнозуванні перебігу даного захворювання, є мутаційний статус генів *IGHV* та наявність генетичних аберацій, зокрема, мутацій гена *TP53* або делецій 17p13. Найбільш сприятливий прогноз для пацієнтів встановлюється у випадку мутованого статусу генів *IGHV* із нормальним каріотипом В-лімфоцитів на противагу вкрай несприятливому прогнозу при немутованому статусі генів *IGHV* на фоні детектованих генетичних аберацій.

Слід зауважити, що оцінка наявності вищезазначених мутацій є недоступною в багатьох країнах світу, зокрема в Україні, через високу собівартість даного дослідження та потребує у спеціалізованому технічному забезпеченні діагностичних лабораторій, що стало причиною пошуку нових прогностичних маркерів перебігу ХЛЛ, аналіз яких був би більш доступним для широкого загалу. Наразі можна виділити декілька описаних прогностичних маркерів перебігу ХЛЛ, характер експресії яких корелює із показниками сприятливого або несприятливого прогнозу перебігу захворювання у хворих на ХЛЛ (табл. 1.1). Важливо зазначити, що наведені маркери характеризують як власне злоякісно трансформовані В-лімфоцити (від фенотипу до профілю хромосомних аберацій та енергетичного статусу В-лімфоцитів), так і показники, які детектують в плазмі крові хворих, що розширює діапазон можливих методів оцінки прогнозу перебігу ХЛЛ. Не дивлячись на те, що на сьогодні в клінічній практиці активно

використовується ряд прогностичних факторів, які визначають перебіг захворювання, проблема прогнозування ефективності застосування хіміотерапії залишається відкритою, що обумовлено існуючою на сьогодні вкрай малою вибіркою специфічних маркерів чутливості злякисно трансформованих клітин до протипухлинних препаратів.

Таблиця 1.1

**Перелік прогностичних молекулярно-генетичних маркерів,
асоційованих із прогнозом перебігу ХЛЛ**

	Сприятливий прогноз	Несприятливий прогноз
Фенотип В-лімфоцитів	CD38 ⁻ Zap70 ⁻ CD49d ^{-/low} CXCR4 ^{low}	CD38 ⁺ Zap70 ⁺ CD49d ^{high} CXCR4 ^{high} HLA-G ⁺
Мутаційний статус генів <i>IGHV</i>	Мутований статус генів <i>IGHV</i>	Немутований статус генів <i>IGHV</i>
Хромосомні аберації та генні мутації	del (13q14)	Мутації в гені <i>TP53</i> /del(17p13) del(11q22-q23) Трисомія 12 хромосоми Мутації в гені <i>NOTCH1</i> , <i>MGA</i> , <i>XPO1</i>
Енергетичний статус	Не встановлені	Високий вміст АФК (окисний стрес) Високий рівень окисного фосфорилування Високі рівні ліпопротеїнліпази
Показники мікрооточення	Не встановлені	CCL3/CCL4/IL-6/IL-10 ^{high} CXCL12 ^{high} β2-мікроглобулін ^{high}

Саме тому ми вважали за доцільне продовжити пошук нових молекулярно-біологічних маркерів В-лімфоцитів при ХЛЛ, які можна було б використовувати у якості предиктивних факторів. Слід зазначити, що увага нашого дослідження направлена не на пошук принципово нових молекул, а на визначення предиктивної складової у тому числі і серед відомих прогностичних маркерів ХЛЛ.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Клінічна характеристика хворих на хронічний лімфолейкоз, які були включені в дослідження

Дисертаційне дослідження було виконано на злужісно трансформованих В лімфоцитах та плазмі, отриманих із периферичної крові хворих на ХЛЛ, що перебували на обліку в гематологічних відділеннях онкологічних лікарень України та люб'язно надані співробітниками відділу онкогематології ім. Р.С. Кавецького НАН України (зав. відділу – д.мед.н., проф. Д.Ф. Глузман). Для експериментальної роботи матеріал хворого на ХЛЛ був використаний виключно після попередньої верифікації діагнозу співробітниками відділу онкогематології на підставі комплексного аналізу результатів морфологічних, цитохімічних та імунофенотипових досліджень. Слід також зауважити, що злужісно трансформовані В-лімфоцити більшості хворих на ХЛЛ характеризувались переважно $CD5^+CD19^+CD23^+CD20^{+/-}$ фенотипом (60%-95% клітин у зразку), що відповідає даній нозології [2].

Таблиця 2.1

Клініко-лабораторна характеристика хворих на ХЛЛ

Показник	Mean $\pm$ SE	Мін-Макс
1	2	3
Вік, роки	65,11 $\pm$ 1,34	54,00-81,00
Лімфоцитоз, %	85,86 $\pm$ 1,46	68,00-97,00
Лейкоцити, $\times 10^9$	114,30 $\pm$ 16,05	9,40 – 370,50
Еритроцити, $\times 10^{12}$	3,71 $\pm$ 0,22	1,20 – 5,17
Тромбоцити, $\times 10^9$	162,80 $\pm$ 14,04	54,00 – 270
Гемоглобін, г/л	116,80 $\pm$ 6,11	42,00 – 171,00

Загалом для дослідження були відібрані зразки периферичної крові 82 пацієнтів, з них 48% жінок та 52% чоловіків, обов'язковим критерієм відбору яких була відсутність попереднього лікування з приводу ХЛЛ в анамнезі. Всі пацієнти були попередньо проінформовані про включення їх біологічного матеріалу в дослідження та надали письмову згоду на використання

клінічного матеріалу в дослідницьких цілях. Загальна клініко-лабораторна характеристика хворих на ХЛЛ наведена в табл. 2.1.

2.2. Виділення популяції В-лімфоцитів із периферичної крові хворих на хронічний лімфолейкоз

Для виділення фракції моноклеарів 10 мл периферичної крові хворих на ХЛЛ наслоювали на 4 мл Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Осло, Норвегія) у 15 мл пробірках та центрифугували за кімнатної температури на швидкості 1600 RPM протягом 20 хв. Фракція моноклеарів, яка при ХЛЛ на 95% представлена популяцією злоякісно трансформованих В-лімфоцитів, концентрується на межі розподілу Lymphoprep та плазми крові у вигляді кільця. Отримане кільце моноклеарів обережно відбирали, тричі промивали у забуференому фізіологічному розчині (ЗФР). На етапі забору моноклеарів також відбирали 2 мл плазми крові хворих на ХЛЛ та зберігали при температурі -20°C для подальшого аналізу вмісту цитокінів.

2.3. Антитіла, що використовувались у роботі

Для встановлення імунотипу злоякісно трансформованих В-лімфоцитів у хворих на ХЛЛ методом проточної цитометрії було використано наступні антитіла: мишачі моноклональні антитіла (МКАТ) проти CD20 (93-1B3), CD22 (MYG13), CD37 (IPO-24), CD38 (AT1) та CD150 (IPO-3) (ІЕПОР ім.Р.Є.Кавецького НАН України) та мишачі МКАТ проти CD5 (10.2), CD40 (G28-5), CD180 (G28-8), та МКАТ MOPC21 (ізотиповий контроль до IgG1) (люб'язно надані проф. Е.А. Clark, Університет Вашингтон, Сієтл, США). В якості вторинних антитіл використовували F(ab)₂-фрагменти поліклональної сироватки кролика проти імуноглобулінів миші, кон'юговані із флуорохромним барвником FITC (флуоресцеїн ізотіоціанат) (Sigma-Aldrich, США). МКАТ проти CD150 та CD180 також були використані для індукції сигналу через поверхневі рецептори CD150 та CD180 у В-лімфоцитах.

Антитіла, використані для детекції білків методом вестерн-блот аналізу, включали первинні поліклональні антитіла проти ІЛ-6 та ІЛ-10, мічені біотином, (Gen-Probe Inc, США) та козячі поліклональні антитіла проти актину (Santa Cruz Biotechnology, США). Стрептовідин, мічений пероксидазою хрому, та вторинні ослині поліклональні антитіла проти імуноглобулінів кози (Santa Cruz Biotechnology, США) використовували для детекції результатів вестерн блот аналізу.

2.4. Непрямий варіант імуофлуоресцентного методу для імуофенотипування клітин із використанням проточної цитометрії

З метою визначення рівня експресії антигенів на плазматичній мембрані злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ, проводили імуофенотипування клітин з використанням МКАТ проти CD3, CD5, CD20, CD22, CD37, CD38, CD40, CD150, CD180. В якості контролю ізотипу антитіл використовували МКАТ проти МОРС-21. Імуофенотипування проводили в непрямому варіанті імуофлуоресцентного методу з використанням первинних та вторинних антитіл.

1. Первинні МКАТ в робочій концентрації 10 мкг/мл вносили в лунки 96-лункового круглодонного імунологічного планшета в об'ємі 40 мкл.

2. Досліджувані зразки В-лімфоцитів розводили до кінцевої концентрації 10×10^6 клітин/мл і додавали до лунок круглодонного імунологічного планшета, що містили первинні МКАТ, в об'ємі 40 мкл. Інкубацію клітин з МКАТ проводили протягом 30 хв за температури $+4^{\circ}\text{C}$. В-лімфоцити розводили у ЗФР, що містив 0,25% ембріональної сироватки телят (ЕСТ) та 0,05% NaN_3 . Цей же розчин у подальшому використовували в процедурах відмивки препаратів.

3. До лунок круглодонного імунологічного планшета додавали по 150 мкл розчину для відмивання з наступним центрифугуванням на швидкості 1800 RPM протягом 5 хв за температури $+4^{\circ}\text{C}$. Після центрифугування супернатант відбирали.

4. До лунок додавали по 200 мкл розчину для відмивання з наступним центрифугуванням на швидкості 1800 RPM протягом 5 хв за температури +4°C. Процедуру відмивання проводили двічі. В кінці другого етапу промивки обережно видаляли супернатант шляхом аспірації.

5. До осаду клітин додавали F(ab)₂-фрагменти поліклональної сироватки кролика проти імуноглобулінів миші, кон'юговані із FITC у робочому розведенні в об'ємі 30 мкл, обережно ресуспендували. Інкубацію проводили у темноті протягом 30 хв за температури +4°C.

6. До лунок круглодонного імунологічного планшета додавали по 150 мкл розчину для відмивання з наступним центрифугуванням на швидкості 1800 RPM протягом 5 хв за температури +4°C. Після центрифугування супернатант зливали.

7. До лунок додавали по 200 мкл розчину для відмивання з наступним центрифугуванням на швидкості 1800 RPM протягом 5 хв за температури +4°C. Процедуру відмивання проводили двічі. В кінці другого етапу промивки обережно видаляли супернатант шляхом аспірації.

8. Осад клітин ресуспендували в 200 мкл 0,01% параформальдегіду і зберігали у темноті за температури +4°C.

Аналіз експресії досліджуваних маркерів проводили на проточному цитофлуориметрі Beckman Coulter EPICS XL (USA) на каналі FL1 із урахуванням рівня експресії антигена за показником середньої геометричної інтенсивності флуоресценції клітин (GeoMean). Крім того, нами визначалась кількість клітин, що експресують даний маркер, із використанням програмного забезпечення FCS Express V3 (De Novo Software). Оцінку рівня експресії антигена проводили шляхом аналізу співвідношення показника його середньої геометричної інтенсивності флуоресценції клітин, після виявлення за допомогою відповідних МКАТ, порівняно до показника середньої геометричної інтенсивності флуоресценції клітин після їх інкубації із МКАТ проти МОРС-21 (GeoMean ratio). У випадку, якщо значення показника GeoMean ratio для досліджуваного антигена становило <1,3, то

даний випадок ХЛЛ вважали негативним за експресією досліджуваного антигена на поверхневій мембрані злоякісно трансформованих В-лімфоцитів. Натомість, якщо GeoMean ratio для антигена був $\geq 1,3$, то такий випадок ХЛЛ відносили до групи позитивних за експресією досліджуваного антигена.

2.5. Індукція сигналу через поверхневі рецептори у В-лімфоцитах хворих на хронічний лімфолейкоз

Для індукції сигналу через поверхневі рецептори CD150 та CD180, 10×10^6 В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ ресуспендували в 2 мл середовища RPMI-1640 з 10% ЕСТ, після чого до культурального середовища додавали МКАТ проти CD150 та/або CD180 із розрахунку 10 мкг/мл та інкубували за температури 37°C з 5% CO₂ протягом 48 год. Зупинку активації сигнальних каскадів проводили шляхом додавання холодного ЗФР, що містив 0,1% NaN₃.

2.6. Визначення чутливості В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до дії хіміопрепаратів в умовах *ex vivo*

Для оцінки чутливості В-лімфоцитів до цитотоксичної дії хіміопрепаратів проводили культивування попередньо виділених із периферичної крові хворих на ХЛЛ В-лімфоцитів у 96-лункових плоскодонних культуральних планшетах протягом 48 годин за температури 37°C в атмосфері, що містить 5% CO₂, у культуральному середовищі RPMI-1640 з 10% ЕСТ з додаванням хіміопрепаратів. Всі дослідження проводили в триплікатах. Кінцева концентрація клітин становила 5×10^5 на лунку, об'єм середовища культивування клітин із хіміопрепаратом – 100 мкл. В дослідження були включені хіміопрепарати першої ланки терапії, що на сьогоднішній день активно використовують у клінічній практиці для лікування хворих на ХЛЛ, а саме: Флударабін (ФБ; S.C. Sindan-Pharma S.R.L., Bucuresti, Romania), Циклофосфамід (ЦФ; Baxter Healthcare Corporation, Germany) та Бендамустин (БН; S.C.Sindan-Pharma S.R.L., Bucuresti, Romania).

Цитотоксичну дію хіміопрепаратів щодо В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ визначали за допомогою резазуринового тесту, який дозволяє виявити кількість життєздатних клітин. Після культивування В-лімфоцитів із хіміопрепаратами до кожної лунки вносили по 10 мкл розчину резазурину (кінцева концентрація 1 мкг/мл; Sigma-Aldrich, США) та інкубували протягом 4 годин за температури 37°C в атмосфері, що містить 5% CO₂. Активна речовина резазурин (синій колір) в живих клітинах відновлюється ферментами мітохондрій до резофурину (червоний колір). Ступінь відновлення резозурину до резофурину оцінювали спектрофотометрично при довжині хвилі 540 нм та 620 нм. Результати виражали як відсоток редукції резазурину, що прямо пропорційно життєздатності клітин і розраховували за формулою:

$$\frac{\varepsilon_{ox}(620\text{нм}) \times Abs(540\text{нм}) - \varepsilon_{ox}(540\text{нм}) \times Abs(620\text{нм})}{\varepsilon_{ox}(620\text{нм}) \times Abs(540\text{нм}) - \varepsilon_{ox}(540\text{нм}) \times Abs(620\text{нм})} \times 100\%$$

дослідна лунка
контроль клітин

де

ε_{ox} – коефіцієнт молярної екстинції резазурину, який при довжині хвилі 540 нм становить 47,619, при 620 нм – 34,798;

Abs – абсорбція експериментальної лунки при довжинах хвиль 540 нм та 620 нм;

Для з'ясування чи можуть поверхневі рецептори CD150 та CD180 модулювати чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії хіміопрепаратів, попередньо злякiсно трансформовані В-лімфоцити були активованні шляхом додавання до середовища культивування клітин анти-CD150 та анти-CD180 МКАТ у концентрації 10 мкг/мл, а через 24 години вносили хіміопрепарати в дозах, за яких спостерігається інгібування життєздатності 40%-60% В-лімфоцитів у зразку. Життєздатність клітин оцінювали після 72 годин культивування за допомогою резазуринового тесту.

2.7. Виділення тотальної РНК

1. Для виділення тотальної РНК В-лімфоцити ресуспедували у розчині TRIzol (GibcoBRL, США) із розрахунку 10×10^6 клітин на 1 мл лізуючого розчину. До отриманого лізату додавали 400 мкл стерильної бідистильованої води (biH_2O), інтенсивно перемішували та інкубували протягом 15 хв за кімнатної температури.

2. Цетрифугування зразків на швидкості 12000 RPM протягом 20 хв за температури $+4^\circ\text{C}$.

3. Для преципітації РНК 1 мл супернатанту змішували з ізопропанолом у співвідношенні 1:1. На цьому етапі зразки РНК можуть зберігатися протягом року за температури -20°C .

4. Для кінцевого виділення РНК пробірки із сумішшю, що містить лізат клітин та ізопропанол, інкубували протягом 15 хв за кімнатної температури, після чого зразки центрифугували на швидкості 12000 RPM протягом 20 хв за температури $+4^\circ\text{C}$.

5. До сформованого осаду додавали 500 мкл 75% етанолу та центрифугували на швидкості 12000 RPM протягом 15 хв за температури $+4^\circ\text{C}$. Даний етап проводили двічі.

6. Надосадову рідину відбирали методом аспірації, а осад підсушували на льоду.

7. Отриманий осад, що містить виділену тотальну РНК, розчиняли у 20 мкл стерильної biH_2O , після чого визначали концентрацію РНК на спектрофотометрі «ND 1000» з використанням програмного забезпечення «NanoDrop 1000 v. 3.7» (Thermo Scientific, США), вимірюючи співвідношення поглинання при довжинах хвиль 260нм та 280нм, аліквотили та зберігали за температури -70°C .

2.8. Синтез кДНК

Синтез кДНК виконували в 2 етапи. На першому етапі змішували 1-2 мкг розчину тотальної РНК (фінальна концентрація 25 нг/мкл), 2 мкл розчину

праймера oligo(dT)18 (Thermo Scientific, США), 5 мкл 10 мМ розчину суміші нуклеотидів (dNTP) (Thermo Scientific, США) та стерильну biH_2O до загального об'єму 49 мкл. Отриману суміш ретельно ресуспендували і ставили у апарат для ампліфікації GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, США). Використовували наступну програму: 65°C - 5хв, охолодження до +4°C.

На другому етапі до отриманого продукту додавали 8 мкл 5-кратного розчину реакційного буфера (Thermo Scientific, США), 2 мкл розчину інгібітора РНК-аз (Thermo Scientific, США) та 1,5 мкл розчину зворотної транскриптази M-MLV Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, США). Реакційну суміш (фінальний об'єм якої становив 60 мкл) ставили у апарат для ампліфікації та використовували наступну програму: 42°C - 10хв; 42°C - 50 хв; охолодження до +4°C. Кінцевим продуктом є дволанцюгова ДНК, комплементарна до РНК.

2.9. Кількісна полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу

Праймери для постановки кількісної полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (кПЛР) підбирали за допомогою інтернет ресурсу Primer Design and Search Tool (<http://bisearch.enzim.hu/?m=search>). Специфічність праймерів перевіряли додатково в інтернет ресурсі NCBI, розділ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Синтез підібраних праймерів замовляли у виробника Invitrogen (by Thermo Scientific, США). Нуклеотидні послідовності використаних праймерів наведено в табл. 2.2.

Реакційні суміші для кПЛР готували шляхом змішування 2 мкл розчину попередньо синтезованої кДНК, 10 мкл 2-кратного розчину SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, США) та 1 мкл стокового розчину відповідних праймерів (прямий та зворотній праймери у співвідношенні 1:1, фінальна концентрація стокового розчину становить 25pM) відповідно до протоколу дослідження. Загальний об'єм реакції доводили до 20 мкл

додаванням стерильної biH_2O . Реакцію кПЛР проводили в 96-лункових планшетах (Applied Biosystems, США) на приладі Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System у триплетах. Для всіх досліджуваних генів було встановлено наступні умови ампліфікації: $[(95^\circ\text{C}-10 \text{ хв.}); (95^\circ\text{C}-15 \text{ сек}, 62^\circ\text{C}-40 \text{ сек}) \times (40 \text{ циклів})]$. Для визначення специфічності новосинтезованого продукту в кінці кожної реакції проводили етап дисоціації за умов $[(95^\circ\text{C}-15 \text{ сек}); (64^\circ\text{C}-40 \text{ сек}); (95^\circ\text{C}-5 \text{ сек})]$.

Таблиця 2.2

Нуклеотиді послідовності праймерів, використаних у дослідженнях

Назва гена	Прямий праймер 5' → 3'	Зворотний праймер 3' → 5'
TBP	<i>ccactcacagactctcacaac</i>	<i>ctgcggtacaatcccagaact</i>
mCD150	<i>ntgtatgctgggctgtagg</i>	<i>agaggtaaaaacgaaccattacca</i>
nCD150	<i>egagaagaagagccaccttga</i>	<i>ggttcgttttaccatgggaag</i>
sCD150	<i>ϕgacccctcaggtaaaacg</i>	<i>tctggacttgggcatagatcg</i>
CCL3	<i>naaggacacgggcagcagaca</i>	<i>gcagcaagtgatgcagagaactgct</i>
CCL4	<i>cttttcttacaccgcgagga</i>	<i>gcttgcttcttttggttgg</i>
IL-6	<i>ecaatgaggagacttgctggtga</i>	<i>tcatctgcacagctctggcttgtt</i>
IL-10	<i>ctttaagggttacctgggttgc</i>	<i>ccttgatgtctgggtcttggt</i>

Відносний рівень експресії досліджуваних генів обраховували за формулою $2^{-\Delta\text{Ct}}$, де Ct – середнє по триплікату граничне значення циклу (threshold) для досліджуваного гена; ΔCt – різниця між Ct досліджуваного гена та Ct ендogenous контролю, в якості якого для всіх досліджуваних генів було використано ген *TBP* (TATA-box binding protein); для обрахунку відносної зміни експресії досліджуваних генів в результаті лігації поверхневих рецепторів, отримані дані нормалізували до відповідних значень у контролі (В-лімфоцити хворих на ХЛЛ, які культивували без додавання МКАТ до середовища культивування) за формулою $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Дані виражали в умовних одиницях.

2.10. Вестерн блот аналіз

1. В-лімфоцити хворих на ХЛЛ промивали холодним ЗФР, після чого до осаду клітин додавали охолоджений лізуючий буфер (20 mM трис-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X100) із розрахунку 250 мкл лізуючого розчину на 10×10^6 клітин. Обов'язковим етапом було додавання до складу лізуючого розчину коктейлю інгібіторів протеаз (апротинін – 2 мкг/мл, леупептин – 5мкг/мл, пепстатин А – 1 мкг/мл, інгібітор трипсину із сої – 5 мкг/мл) та фосфатаз (50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM Na₄P₂O₇, 10 mM PMSF) безпосередньо перед етапом лізису. Клітини ретельно ресуспендували та лізували протягом 40 хв за температури +4°C.

2. Отримані лізати клітин центрифугували на швидкості 12000 RPM протягом 20 хв за кімнатної температури.

3. Після процедури центрифугування обережно відбирали супернатант до нового епендорфу та додавали 4-кратний буфер Леммлі (25 mM трис-HCl pH 6.8, 50% гліцерин, 10% β-меркаптоетанол, 5% натрій додецилсульфат) у співвідношенні 3:1. На цьому етапі зразки можуть зберігатися протягом 2 місяців за температури -20°C.

4. Безпосередньо перед нанесенням зразків у лунки, їх прогрівали протягом 5 хв за температури +95°C.

5. Білки розділяли методом електрофорезу у 12% поліакриламідному гелі, що містить додецилсульфат натрія, за напруги у 100V. Для визначення молекулярної маси білків в одну із лунок одночасно із завантаженням гелю лізатами наносили молекулярні маркери ваги (Thermo Fisher Scientific, США).

6. По закінченню електрофорезу білки переносили на нітроцелюлозну мембрану в трис-гліциновому буфері з додаванням 20% метанолу у апараті для електроблоттингу протягом 12-16 годин за напруги 30V і при температурі +4°C.

7. Для блокування сайтів неспецифічного зв'язування, нітроцелюлозні мембрани із іммобілізованими білками (блоти) інкубували протягом 4 год за

кімнатної температури у фізіологічному розчині, забуференому трисом, з 0,1% твін-20 (ТБР-Т) та додаванням 5% ЕСТ.

8. Після блокування блоти інкубували із первинними антитілами, розведеними у ТБР-Т з 5% ЕСТ у робочих концентраціях, протягом 12-16 год за температури +4°C (або 2 год за кімнатної температури).

9. Блоти промивали протягом 5 хв у ТБР-Т (5 разів) та інкубували із міченим пероксидазою хрому стрептовідином, розведеним у ТБР-Т з 5% ЕСТ у робочій концентрації, протягом 2 год за кімнатної температури. Після інкубації зі стрептовідином блоти знову промивали протягом 5 хв у ТБР-Т (5 разів).

10. Для візуалізації реакції блоти обробляли розчином для підсилення хемілюмінесценції (Immun-Star HRP, BioRad, США) протягом 2 хв та проводили експозицію на рентгенівській плівці (AGFA, Бельгія), після чого проявляли її за стандартною схемою.

2.11. Твердофазний імуносорбентний сендвідж-метод ELISA

Концентрацію IL-6 та IL-10 в плазмі хворих на ХЛЛ визначали з використанням наборів “IL-6 (Human) ELISA Kit” та “IL-10 (Human) ELISA Kit” (ThermoFisher Scientific) згідно протоколу виробника. Обрахунок результатів проводили на спектрофотометрі за показниками абсорбції при довжині хвилі 450нм. Отримані дані показників абсорбції в дослідному зразку співставляли із калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартів згідно протоколу виробника. Для кожного випадку ХЛЛ реакцію проводили в триплікатах.

2.12. Статистична обробка даних

Різниця між досліджуваними групами вважалась достовірною при умові $p < 0,05$. Аналіз та обробку отриманих результатів здійснювали в програмному забезпеченні GraphPad Prism 8 з використанням критерію Манн-Уїтні для непараметричних даних. Результати представлені графічно у вигляді

коробкових графіків з зазначенням медіани (лінія посередині прямокутника), максимальних та мінімальних значень у групі (розкиди), а також першу і третю квартиль (верхня і нижня частина прямокутника відповідно). Наявність кореляційних зв'язків між досліджуваними параметрами обчислювали за допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона.

РОЗДІЛ 3

ЧУТЛИВІСТЬ В-ЛІМФОЦИТІВ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ЛІМФОЛЕЙКОЗ ДО ЦИТОСТАТИКІВ *EX VIVO* З УРАХУВАННЯМ ЇХ ІМУНОФЕНОТИПУ

Злоякісно трансформовані В-лімфоцити хворих на ХЛЛ відрізняються значною фенотипо-генотиповою гетерогенністю, в тому числі за характером експресії ряду рецепторів на плазматичній мембрані клітин, визначення яких є обов'язковим при диференційній діагностиці даної нозології [2]. Поряд з цим, аналіз експресії поверхневих антигенів в якості предиктивних маркерів медикаментозної чутливості може потенційно привнести вагомий вклад на шляху удосконалення алгоритму комплексного підходу до вибору схеми лікування хворих на ХЛЛ.

3.1. Імунофенотип злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз

Імунофенотип злоякісно трансформованих В-лімфоцитів, виділених із периферичної крові хворих на ХЛЛ вивчали за допомогою імунофлуоресцентного методу із використанням проточної цитометрії. Спектр антигенів, рівень експресії яких на плазматичній мембрані В-лімфоцитів при ХЛЛ був предметом вивчення даного дослідження, включав CD5, CD20, CD22, CD37, CD38, CD40, CD150 та CD180. Зауважимо, що показник кількості клітин із позитивною експресією для деяких досліджуваних антигенів був нижчим за діагностично-значимий. Однак, навіть невисокий із точки зору діагностики показник експресії антигена обумовлює його функціональну значимість та участь у формуванні морфо-функціональних особливостей злоякісно трансформованих В-лімфоцитів при ХЛЛ. Тому, в подальшому при оцінюванні наявності експресії антигенів на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ, оперували показником GeoMean ratio.

Згідно результатів проточної цитометрії нами відмічена гетерогенність у рівнях експресії цільових антигенів на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ, що були включені до складу вибірки. Експресія CD5, CD20, CD37 та CD40 була встановлена у 100% досліджуваних випадків ХЛЛ (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Експресія антигенів на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ

Антиген	GeoMean ratio *		Кількість позитивних клітин у зразку, %		Кількість позитивних випадків ХЛЛ %
	Мін-Макс	Медіана	Мін-Макс	Медіана	
CD5	2,62 – 56,72	6,29	37,54 – 94,89	73,87	100
CD20	1,27 – 16,52	2,64	14,61 – 85,21	43,35	100
CD22	1,19 – 4,59	1,79	7,91 – 60,01	20,93	82,1
CD37	2,71 – 79,33	10,71	26,87 – 95,80	83,31	100
CD38	1,16 – 1,80	1,25	5,47 – 34,89	11,51	50
CD40	1,34 – 23,06	5,08	18,82 – 92,53	71,62	100
CD150	1,19 – 3,29	1,54	6,41 – 58,55	13,57	51,6
CD180	1,14 – 1,49	1,29	5,15 – 27,10	10,73	38,7

Примітка. GeoMean ratio * – GeoMean антигена/GeoMean контролю ізо типу антитіл

Однак, рівень експресії цих антигенів відрізнявся значною варіабельністю у зразках В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ, що стало підґрунтям для їх розподілення на групи з урахуванням медіани показника GeoMean ratio по всій вибірці, яка для CD5 складала 6,29; CD20 – 2,64; CD37 – 10,71 та для CD40 – 5,08. Відповідно до цих показників, всі випадки ХЛЛ, рівень поверхневої експресії цільового антигена на В-лімфоцитах яких був встановлений на рівні нижче медіани значень GeoMean ratio були віднесені

до групи випадків ХЛЛ з низьким рівнем експресії антигена ($M <$) на плазматичній мембрані В-лімфоцитів, тоді як за умови його експресії на рівні вище медіани значень GeoMean ratio – до групи випадків ХЛЛ із високим рівнем експресії антигена ($M >$) на плазматичній мембрані В-лімфоцитів (рис. 3.1).

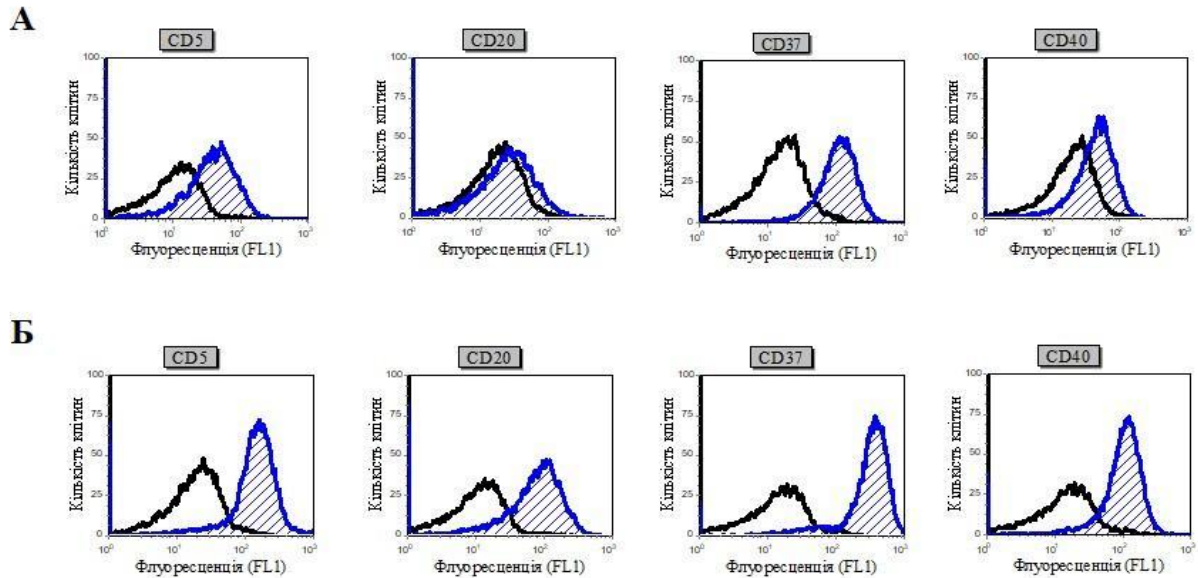


Рис. 3.1 Репрезентативні гістограми рівня експресії CD5, CD20, CD37 та CD40 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ. Результати проточної цитометрії. Ряди А та Б – випадки ХЛЛ, для яких рівень експресії досліджуваних антигенів (GeoMean ratio) на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах, відповідно, є нижче ($M <$) та вище ($M >$) за значення медіани. Гістограми: вісь ординат – кількість клітин, вісь абсцис – інтенсивність флуоресценції (FL1, FITC): чорна – логарифмічна крива контролю ізо типу антитіл, синя – логарифмічна крива досліджуваного антигена.

Аналіз експресії антигенів CD22, CD38, CD150 та CD180 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ виявив, що у частині зразків показники GeoMean досліджуваних антигенів були на рівні показника GeoMean контролю ізо типу антитіл, що свідчило про відсутність їх експресії. На основі цього у разі, якщо показник GeoMean ratio для цільового антигена був $< 1,3$, даний зразок відносили до групи негативних випадків ХЛЛ. Натомість при GeoMean ratio $\geq 1,3$ – до позитивних (табл. 3.1, рис. 3.2).

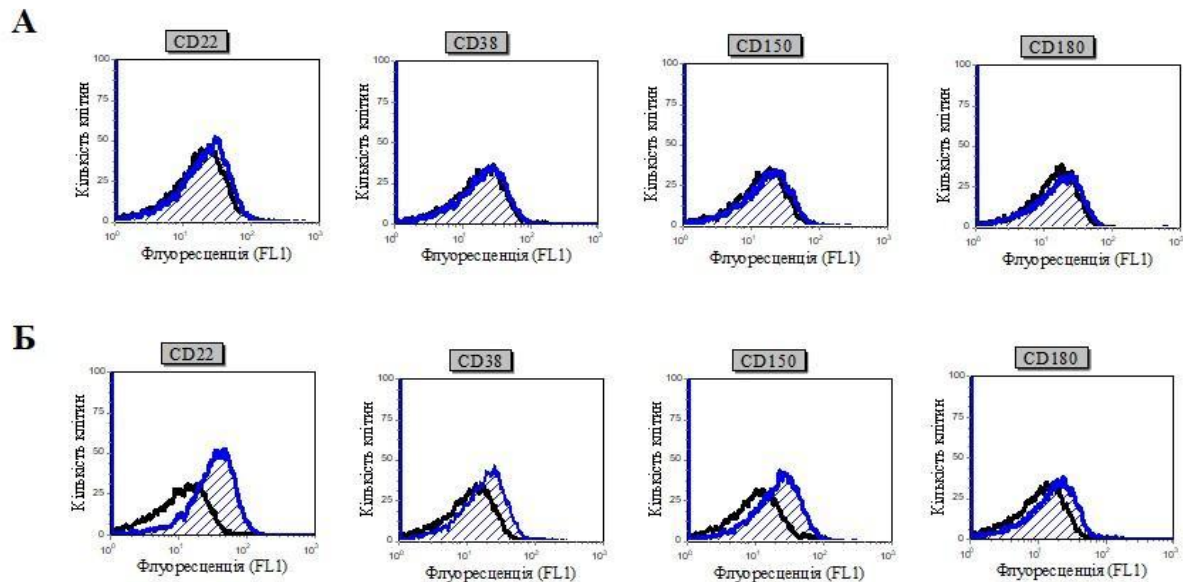


Рис. 3.2 Репрезентативні гістограми рівня експресії CD22, CD38, CD150 та CD180 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ. Результати проточної цитометрії. Ряди А та Б – відповідно негативні (GeoMean ratio < 1,3) та позитивні (GeoMean ratio $\geq$ 1,3) випадки ХЛЛ за рівнем експресії досліджуваних антигенів на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах. Гістограми: вісь ординат – кількість клітин, вісь абсцис – інтенсивність флуоресценції (FL1, FITC): чорна – логарифмічна крива контролю ізо типу антитіл, синя – логарифмічна крива досліджуваного антигена.

Серед досліджуваної вибірки 82,1% випадків ХЛЛ характеризувались CD22⁺ фенотипом злоякісно трансформованих В-лімфоцитів. Кількість випадків ХЛЛ із CD38⁺ або CD150⁺ фенотипом В-лімфоцитів становила 50% та 51,6%, відповідно, що свідчить про приблизно однаковий розподіл позитивних та негативних за статусом експресії CD38 і CD150 випадків серед хворих на ХЛЛ, біологічний матеріал яких було включено до складу вибірки. CD180⁺ фенотип злоякісно трансформованих В-лімфоцитів був встановлений лише для 38,7% досліджених випадків ХЛЛ (табл. 3.1).

Підсумок. За результатами аналізу імунофенотипу злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ нами було встановлено гетерогенність у рівнях експресії CD5, CD20, CD22, CD37, CD38, CD40, CD150 та CD180, що лягло в основу подальшого поділу випадків ХЛЛ на

групи залежно від рівня експресії антигена на плазматичній мембрані злужісно трансформованих В-лімфоцитів.

3.2. Зв'язок між імунофенотиповими маркерами В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз та їх чутливістю до дії хіміопрепаратів *ex vivo*

3.2.1. Підбір оптимальних концентрацій хіміопрепаратів на В-лімфоцитах хворих на хронічний лімфолейкоз *ex vivo*

Для аналізу чутливості злужісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичної дії хіміопрепаратів залежно від їх імунофенотипу, першочерговим завданням було підібрати оптимальні концентрації хіміопрепаратів в умовах експерименту *ex vivo*. В дослідження були включені хіміопрепарати першої ланки терапії, що на сьогоднішній день активно використовуються в клінічній практиці для лікування хворих на ХЛЛ, а саме: флударабін (ФБ), циклофосфамід (ЦФ) та бендамустин (БН). Слід зазначити, що крім вищеперерахованих хіміопрепаратів, які володіють цитотоксичними властивостями, обов'язковим компонентом поліхіміотерапії при лікуванні хворих на ХЛЛ є ритуксимаб (МКАТ проти антигена CD20), механізм дії якого базується на комплементзалежній цитотоксичності і не може бути реалізований в умовах експерименту *ex vivo*. Саме тому в подальших експериментах в рамках роботи по вивченню чутливості В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії хіміопрепаратів *ex vivo* було оцінено вплив лише ФЛ, ЦФ та БН. Підбір робочих концентрацій хіміопрепаратів попередньо проводили на зразках В-лімфоцитів 13 хворих на ХЛЛ шляхом їх титрування із подальшим культивуванням протягом 48 год за температури 37°C в атмосфері, що містила 5% CO₂ у культуральному середовищі RPMI-1640 з 10% ЕСТ. Ефективність цитотоксичної дії хіміопрепаратів по відношенню до В-лімфоцитів оцінювали за кількістю життєздатних клітин з використанням резазуринового тесту.

Злоякісно трансформовані В-лімфоцити хворих на ХЛЛ характеризувались значною гетерогенністю щодо чутливості до досліджуваних хіміопрепаратів залежно від їх концентрацій в середовищі культивування клітин (рис.3.3).

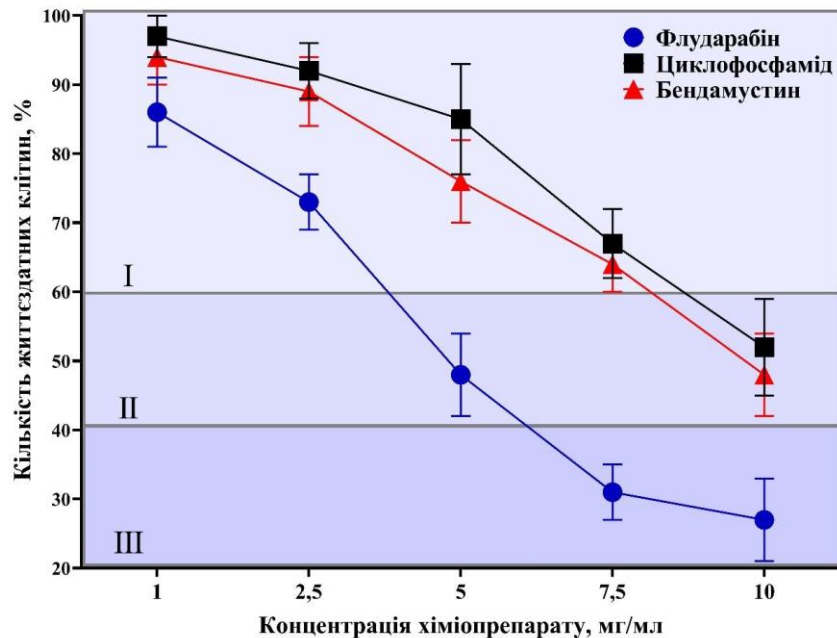


Рис.3.3 Життєздатність В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ (n=13) за умов дії різних концентрацій ФЛ, ЦФ та БН в експериментах *ex vivo*. Результати резазуринового тесту, де відсоток редукції резазурину прямо пропорційний відсотку життєздатних клітин. Зона I – низький цитотоксичний ефект внаслідок дії хіміопрепаратів (>60% життєздатних клітин); зона II – оптимальний цитотоксичний ефект хіміопрепаратів (40-60% життєздатних клітин); зона III – надмірний цитотоксичний ефект хіміопрепаратів (<40% життєздатних клітин).

Аналіз отриманих даних стосовно кількості життєздатних злоякісно трансформованих В-лімфоцитів після їх культивування із хіміопрепаратами в різних дозах обґрунтував вибір їх подальших робочих концентрацій, при застосуванні яких спостерігалось інгібування життєздатності 40-60% В-лімфоцитів у зразку (рис.3.3). У випадку застосування БН та ЦФ, оптимальна робоча концентрація становила 10 мкг/мл, а для ФЛ – 5 мкг/мл.

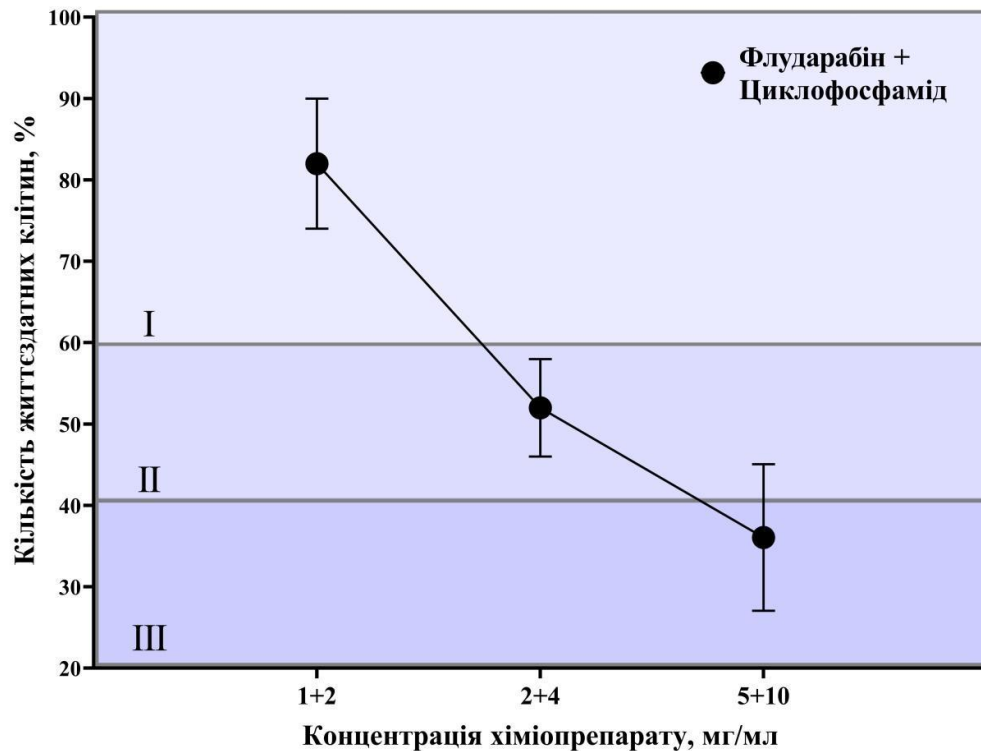


Рис.3.4 Життєздатність В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ (n=13) за умов комбінованої дії ФЛ та ЦФ *ex vivo* в різних концентраціях. Результати резазуринового тесту, де відсоток редукції резазурину прямо пропорційний відсотку життєздатних клітин. Зона I – низький цитотоксичний ефект внаслідок дії хіміопрепаратів (>60% життєздатних клітин); зона II – оптимальний цитотоксичний ефект хіміопрепаратів (40-60% життєздатних клітин); зона III – надмірний цитотоксичний ефект хіміопрепаратів (<40% життєздатних клітин).

Розрахунок оптимальних концентрацій хіміопрепаратів для оцінки комбінованого ефекту при одночасному застосуванні ФЛ із ЦФ по відношенню до В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ проводили шляхом титрування цих хіміопрепаратів у концентраціях, що еквівалентні співвідношенню їх робочих концентрацій при поодинокому впливі, яка становила 1:2 (рис. 3.4). Згідно отриманих даних, робоча концентрація для оцінки цитотоксичної дії на злоякісно трансформовані В-лімфоцити хворих на ХЛЛ за умов комбінованого впливу ФЛ із ЦФ була визначена як 2 мкг/мл для ФЛ та 4 мкг/мл для ЦФ.

3.2.2. Чутливість В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до дії хіміопрепаратів *ex vivo* з урахуванням клініко-лабораторних показників

Клініко-лабораторна характеристика пацієнта є невід'ємним етапом діагностики та подальшого моніторингу перебігу захворювання. Тому, одним із завдань дослідження було з'ясувати наявність кореляційного зв'язку між клініко-лабораторними характеристиками хворих на ХЛЛ та чутливістю їх злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до дії хіміопрепаратів *ex vivo*.

Таблиця 3.2

Результати кореляційного аналізу Пірсона між чутливістю В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії іміопрепаратів *ex vivo* та клініко-лабораторними показниками пацієнтів

Показник	Флударабін	Циклофосфамід	Бендамустин
Вік, роки	$r = -0,10; p = 0,73$	$r = 0,09; p = 0,77$	$r = 0,05; p = 0,87$
Лімфоцитоз, %	$r = -0,38; p = 0,19$	$r = -0,44; p = 0,14$	$r = -0,30; p = 0,32$
Лейкоцити, $\times 10^9$	$r = -0,50; p = 0,07$	$r = 0,05; p = 0,86$	$r = -0,03; p = 0,92$
Еритроцити, $\times 10^{12}$	$r = -0,04; p = 0,91$	$r = -0,15; p = 0,64$	$r = 0,29; p = 0,36$
Тромбоцити, $\times 10^9$	$r = -0,29; p = 0,35$	$r = 0,07; p = 0,84$	$r = 0,04; p = 0,90$
Гемоглобін, г/л	$r = -0,07; p = 0,83$	$r = -0,21; p = 0,49$	$r = 0,12; p = 0,69$

Примітка. Кореляційний зв'язок вважали досвідним при $p < 0,05$

Для дослідження було обрано ряд показників, визначення яких є рутинним при диференційній діагностиці ХЛЛ, а саме лімфоцитоз, кількісний вміст формених елементів крові (лейкоцити, еритроцити, тромбоцити) та рівень гемоглобіну (табл. 3.2).

Кореляційний аналіз між лабораторними характеристиками хворих на ХЛЛ та чутливістю В-лімфоцитів до БН, ФЛ та ЦФ у монорежимах показав відсутність кореляційних зв'язків між досліджуваними параметрами. Також не виявлено кореляційного зв'язку між віком пацієнта та відповіддю злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до цитотоксичної дії БН, ФЛ або ЦФ *ex vivo*.

3.2.3. Чутливість В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до дії хіміопрепаратів *ex vivo* залежно від їх імунофенотипу

З метою оцінки чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії хіміопрепаратів залежно від їх імунофенотипу та пошуку можливих предиктивних маркерів чутливості клітин до цитостатиків, було проведено культивування В-лімфоцитів первинних хворих на ХЛЛ із БН, ФЛ і ЦФ в умовах *ex vivo*.

Медіана кількості життєздатних В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ у яких відсутня експресія CD38 на плазматичній мембрані після їх культивування у присутності БН становить 35,08% проти 51,80% В-лімфоцитів, які характеризуються CD38⁺ фенотипом. Отримані дані вказують на те, що В-лімфоцити хворих на ХЛЛ, які є негативні за статусом поверхневої експресії CD38 є у 1,47 разу більш чутливі ($p=0,05$) до цитотоксичної дії БН *ex vivo* порівняно із позитивними за експресією CD38 В-лімфоцитами (рис.3.5, Б).

Нами не встановлено достовірної різниці у медіані кількості життєздатних В-лімфоцитів за умов дії ФЛ та ЦФ у монорежимах, а також за умов комбінованого впливу ФЛ із ЦФ, із урахуванням рівня експресії CD38. Отримані дані свідчать про відсутність зв'язку між наявністю експресії CD38 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ та їх чутливістю до ФЛ та ЦФ *ex vivo* (табл. 3.3).

В-лімфоцити хворих на ХЛЛ, що характеризуються низьким ($M<$) рівнем експресії CD37 або CD40 на плазматичній мембрані є достовірно ($p=0,01$) більш чутливі до цитотоксичної дії БН *ex vivo* порівняно до тих випадків ХЛЛ, у яких рівень експресії CD37 або CD40 є високим ($M>$). Зокрема, медіана кількості життєздатних В-лімфоцитів, які культивували у присутності БН становить 29,69% vs 64,75% у групах із, відповідно, низьким ($M<$) та високим ($M>$) рівнем експресії CD37 (рис. 3.5, А). Щодо В-лімфоцитів із низьким рівнем експресії CD40 ($M<$) на плазматичній мембрані, то у разі їх культивування із БН медіана кількості життєздатних клітин становить 27,95%, що є у 2,2 разу менше порівняно із показником

життєздатності В-лімфоцитів (60,41%), для яких рівень експресії CD40 був визначений як високий ($M>$) (рис. 3.5, В). Після культивування $CD37^{M<}$ та $CD37^{M>}$ злякiсно трансформованих В-лімфоцитів у присутності ФЛ або/та ЦФ, різниця між медіанами кількості життєздатних клітин становила приблизно 1-7%, що вказує на відсутність зв'язку між рівнем експресії CD37 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ та їх чутливістю до ФЛ та ЦФ *ex vivo*. Аналогічно до CD37, відсутність різниці в чутливості В-лімфоцитів до ФЛ та ЦФ у монорежимах простежується при порівнянні показників життєздатності В-лімфоцитів із низьким ($M<$) та високим ($M>$) рівнем експресії CD40.

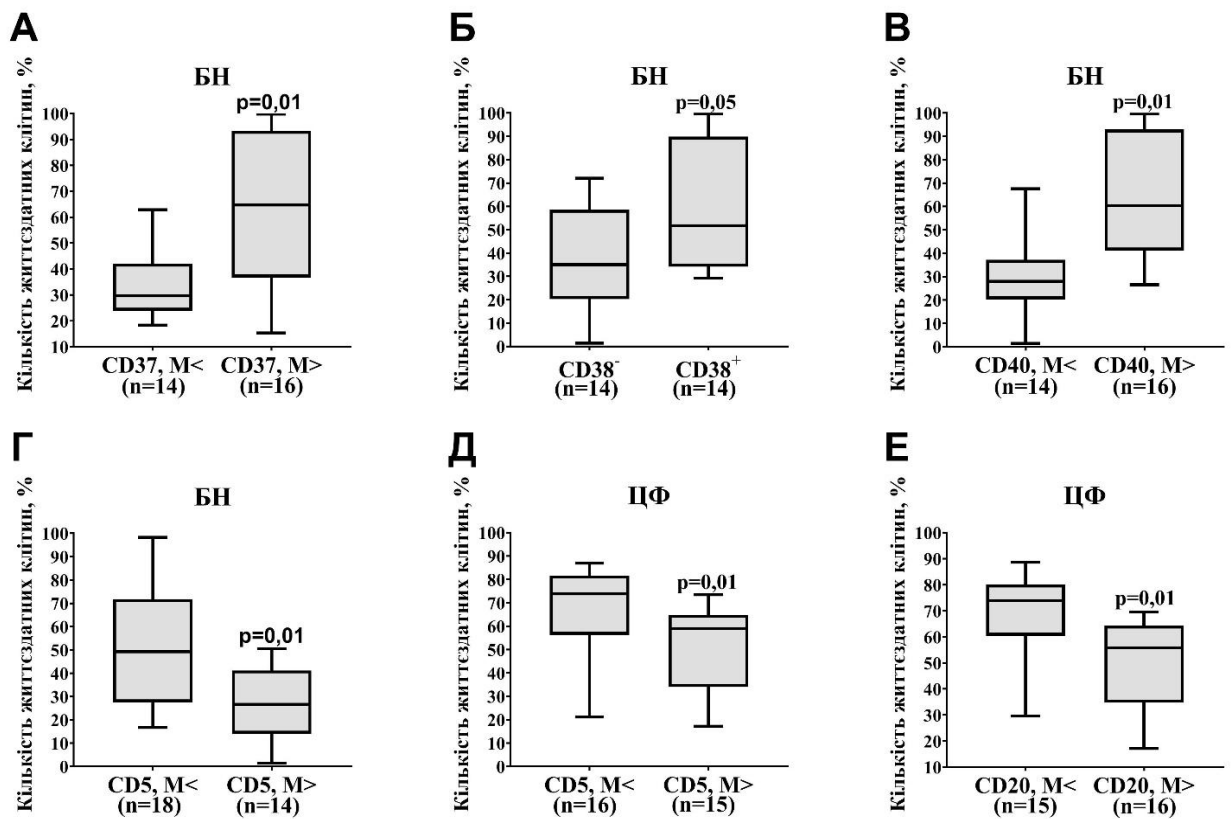


Рис.3.5. Життєздатність В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ за умов дії бендамустину (А-Г) та циклофосфаміду (Д-Е) *ex vivo* залежно від їх рецепторного статусу. Результати Резаурин-тесту, де відсоток редукції резазурину прямо пропорційний відсотку життєздатних клітин. БН – бендамустин, ЦФ – циклофосфамід.

Натомість, за умов комбінованого впливу ФЛ та ЦФ медіана кількості життєздатних клітин за умови високого ($M>$) рівня експресії CD40 становить 23,55%, що є у 2,1 разу менше (50,38%, відповідно) порівняно із такою для В-лімфоцитів, які характеризуються низьким ($M<$) рівнем експресії CD40. Однак за рахунок великого розкиду значень в межах досліджуваних груп, різниця між вище зазначеними показниками не є достовірною (табл. 3.3).

За умов високого рівня експресії CD5 ($M>$) злоякісно трансформовані В-лімфоцити є достовірно ($p=0,01$) більш чутливі до цитотоксичної дії БН *ex vivo* порівняно із ефектом, що спостерігається при дії даного хіміопрепарату по відношенню до В-лімфоцитів із низьким ($M<$) рівнем експресії CD5 (рис. 3.5, Г). Свідченням цього є у 1,8 разу нижча медіана кількості життєздатних клітин – 26,59% проти 49,19% після культивування В-лімфоцитів із високим ($M>$) та низьким ($M<$) рівнем експресії CD5 на плазматичній мембрані, відповідно. Слід зазначити, що не зважаючи на кращу чутливість В-лімфоцитів до дії БН за умов високого ($M>$) рівня експресії CD5, показники чутливості $CD5^{M>}$ клітин до цитотоксичного впливу ЦФ є протилежними (рис. 3.5, Д).

Зокрема, медіана кількості життєздатних В-лімфоцитів із $CD5^{M<}$ та $CD5^{M>}$ фенотипом під дією ЦФ *ex vivo* становить 73,92% vs 58,99%, відповідно, що свідчить про те, що В-лімфоцити хворих на ХЛЛ є в 1,3 разу достовірно ($p=0,01$) більш чутливі до дії ЦФ *ex vivo* за умови високого ($M>$) рівня експресії CD5 на плазматичній мембрані клітин.

Детектована різноспрямованість у показниках чутливості В-лімфоцитів до дії БН та ЦФ *ex vivo* з урахуванням рівня поверхневої експресії CD5 підкреслює необхідність комплексного підходу до оцінки їх прогнозованої чутливості до компонентів поліхіміотерапії.

Таблиця 3.3

Чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії хіміопрепаратів ex vivo залежно від імунофенотипу клітин

Рівень поверхневої експресії антигена	Показник	Кількість життєздатних клітин після культивування із хіміопрепаратом (%)			
		ФЛ	ЦФ	БН	ФЦ
1	2	3	4	5	6
CD5, M<	Мін-Макс	5,53 – 87,60	21,19 – 99,95	16,71 – 98,16	9,38 – 56,46
	Медіана	47,84	73,92	49,19	33,93
CD5, M>	Мін-Макс	2,48 – 87,60	17,11 -73,42	1,41 – 50,49	10,13 – 56,88
	Медіана	43,80	58,99¹	26,59¹	20,73
CD20, M<	Мін-Макс	9,57 – 87,60	29,63 – 88,59	1,41 – 99,78	9,38 – 85,50
	Медіана	47,84	73,90	35,11	27,92
CD20, M>	Мін-Макс	2,48 – 87,00	17,11 – 69,44	9,46 – 98,94	10,13 – 87,66
	Медіана	45,30	55,82²	47,33	28,39
CD22 ⁻	Мін-Макс	5,53 – 73,88	24,06 – 83,54	20,92 – 62,91	НВ
	Медіана	46,29	60,47	26,59	НВ
CD22 ⁺	Мін-Макс	9,57 – 87,60	17,11 – 99,95	1,41 – 99,78	НВ
	Медіана	50,33	72,94	36,08	НВ
CD37, M<	Мін-Макс	5,53 – 87,60	17,11 – 94,71	18,33 – 62,91	9,38 – 56,88
	Медіана	46,22	71,67	29,69	27,30
CD37, M>	Мін-Макс	2,48 – 87,60	31,66 – 91,20	15,37 – 99,78	10,13 – 87,66
	Медіана	46,32	64,90	64,75³	27,92
CD38 ⁻	Мін-Макс	5,53 – 84,21	17,60 – 86,95	1,41 – 72,00	9,38 – 56,46
	Медіана	47,26	71,69	35,08	36,11

Продовження таблиці 3.3

1	2	3	4	5	6
CD38 ⁺	Мін-Макс	9,82 – 87,00	17,11 – 99,95	29,30 – 99,78	10,29 – 87,66
	Медіана	51,80	71,19	51,80⁴	24,67
CD40, M<	Мін-Макс	5,53 – 87,00	17,11 – 94,71	1,41 – 67,59	27,92 – 56,88
	Медіана	43,11	71,69	27,95	50,38
CD40, M>	Мін-Макс	28,09 – 87,60	29,63 – 91,20	29,59 – 99,78	10,13 – 42,19
	Медіана	46,30	60,77	60,41⁵	23,55

Примітка. НВ – не визначали, ФЛ – флударабін, ЦФ – циклофосфамід, БН – бендамустин, ФЦ – флударабін + циклофосфамід; M< - експресія антигена на рівні нижче медіани, M> - експресія антигена на рівні вище медіани, 1 - p=0,01 порівняно із CD5, M<; 2 - p=0,01 порівняно із CD20, M<; 3 - p=0,01 порівняно із CD37, M<; 4 - p=0,05 порівняно із CD38⁺; 5 - p=0,01 порівняно із CD40, M<.

При вивченні показників життєздатності В-лімфоцитів із низьким ($M<$) та високим ($M>$) рівнем експресії CD5 за умов дії ФЛ у монорежимі, а також за умов його комбінованого впливу із ЦФ, нами не встановлено достовірної різниці медіанах кількості життєздатних клітин у досліджуваних групах. Отримані дані свідчать про відсутність зв'язку між рівнем експресії CD5 на В-лімфоцитах та їх чутливістю до дії ФЛ у монорежимі або за умов комбінованого впливу ФЛ із ЦФ *ex vivo* (табл. 3.3).

Аналогічно до CD5, високий ($M>$) рівень експресії CD20 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ є ознакою їх достовірно ($p=0,01$) більшої чутливості до дії ЦФ *ex vivo* порівняно з В-лімфоцитами, у яких рівень експресії CD20 був визначений як низький ($M<$). Зокрема, медіана кількості життєздатних CD20^{M>} та CD20^{M<} та В-лімфоцитів після їх культивування із ЦФ становить 55,82% vs 73,90% відповідно (рис. 3.5, Е). Нами не встановлено достовірної різниці в чутливості різних за рівнем експресії CD20 В-лімфоцитах до цитотоксичного впливу БН або ФЛ у монорежимах, а також за умов одночасної дії ФЛ із ЦФ *ex vivo* (табл. 3.3).

При культивуванні В-лімфоцитів із високим ($M>$) та низьким ($M<$) рівнем експресії CD22 в умовах *ex vivo* із БН, ФЛ або ЦФ у монорежимах різниця в медіанах кількості життєздатних клітин становила лише 4% - 12% в залежності від хіміопрепарату. Враховуючи відсутність достовірної різниці в медіанах кількості життєздатних клітин, а також великий розкид значень в межах досліджуваних груп, можна зробити висновок, що чутливість злякано трансформованих В-лімфоцитів до цитотоксичної дії жодного із досліджуваних хіміопрепаратів в умовах *ex vivo* не залежить від статусу експресії CD22 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ (табл. 3.3).

Підсумок. Чутливість злякано трансформованих В-лімфоцитів до цитотоксичного впливу ФЛ, ЦФ і БН *ex vivo* не залежить від клініко-лабораторних характеристик хворих на ХЛЛ. Нами вперше було ідентифіковано зв'язок між рівнем експресії імунофенотипових маркерів В-лімфоцитів та чутливістю клітин до хіміопрепаратів. Зокрема, визначено, що високий рівень чутливості В-лімфоцитів

хворих на ХЛЛ до БН асоціюється з наявністю $CD37^{M<}$, $CD38^{-}$ та $CD40^{M<}$ фенотипу, в той час як низький рівень експресії $CD5$, навпаки, свідчить про низьку чутливість В-лімфоцитів до БН *ex vivo*. Кращий цитотоксичний ефект ЦФ по відношенню до злоякісно трансформованих В-лімфоцитів *ex vivo* спостерігається за умов високого рівня експресії $CD5$ та $CD20$. Щодо цитотоксичної дії ФЛ у монорежимі та за умов його комбінованої дії із ЦФ, нами не було отримано достовірної різниці в показниках чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів *ex vivo* залежно від рівня експресії $CD5$, $CD20$, $CD37$, $CD38$ або $CD40$ на плазматичній мембрані клітин. Статус експресії $CD22$ не асоціюється із чутливістю В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії БН, ФЛ або ЦФ *ex vivo*.

Результати, описані в розділі 4 опубліковані у [183].

РОЗДІЛ 4

ЧУТЛИВІСТЬ В-ЛІМФОЦИТІВ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ЛІМФОЛЕЙКОЗ ДО ЦИТОСТАТИКІВ *EX VIVO* З УРАХУВАННЯМ СТАТУСУ ЕКСПРЕСІЇ CD150 ТА CD180

Згідно попередніх досліджень, одночасна активація CD150 та CD180 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ призводить до інгібування Akt та MAPK сигнальних шляхів і, ймовірно, перешкоджає передачі сигналів, що підтримують життєздатність злоякісно трансформованих В-лімфоцитів та сприяють їх клональній експансії [184]. Разом з тим, відкритим залишається питання чи впливає активація CD150 та CD180-опосередкованих сигнальних на їх чутливість до компонентів схем поліхіміотерапії.

4.1. Зв'язок між чутливістю В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до дії хіміопрепаратів *ex vivo* та показниками експресії CD150 та CD180 на плазматичній мембрані

З метою з'ясування особливостей чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ з урахування статусу експресії CD150 та CD180, досліджувані зразки первинних хворих на ХЛЛ були розподілені на групи з залежно від статусу експресії CD150 та CD180 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів.

В ході аналізу показників чутливості різних за статусом експресії CD150 або CD180 В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичної дії БН, ФЛ і ЦФ у монорежимах *ex vivo*, різниця в медіанах кількості CD150⁻/CD150⁺ та CD180⁻/CD180⁺ життєздатних В-лімфоцитів коливалась в межах 10-12% і не була достовірно значущою (табл. 4.1). Враховуючи відсутність достовірної різниці, а також великий розкид значень в межах дослідних груп можна зробити висновок, що наявність експресії CD150 або CD180 не визначає чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до БН, ФЛ та ЦФ у монорежимах *ex vivo* (рис. 4.1, А, Б).

За умови одночасного внесення до середовища культивування В-лімфоцитів ФЛ і ЦФ нами встановлено достовірну ($p=0,04$) різницю у показниках чутливості

В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до комбінованого ефекту названих хіміопрепаратів залежно від статусу експресії CD180 (рис. 4.1, Б). Медіана кількості життєздатних CD180⁺ В-лімфоцитів становила 12,7%, що є у 2,2 разу нижче порівняно із цитотоксичним ефектом, який спостерігається при дії ФЛ і ЦФ по відношенню до CD180⁻ В-лімфоцитів (медіана кількості життєздатних клітин становить 27,92%) (табл. 4.1). Аналогічні результати нами отримано при вивченні зв'язку між чутливістю В-лімфоцитів до хіміопрепаратів залежно від наявності експресії CD150. Зокрема, В-лімфоцити хворих на ХЛЛ, які характеризуються CD150⁺ фенотипом, є у 1,9 разу більш чутливі ($p=0,06$) до комбінованої дії ФЛ і ЦФ, ніж CD150⁻ В-лімфоцити (23,55% проти 44,31% життєздатних клітин) (табл. 4.1).

Потрібно також відмітити факт підсилення цитотоксичного ефекту з боку хіміопрепаратів на CD150⁺, але не на CD150⁻, злоякісно трансформовані В-лімфоцити при комбінованому застосування ФЛ і ЦФ порівняно із ефектом, що спостерігається за умов дії ФЛ та ЦФ у монорежимах. Зокрема, медіана кількості життєздатних клітин за умов дії ФЛ або ЦФ на CD150⁺ В-лімфоцити становить 38,49% та 65,98%, що є у 1,6 та 2,8 разу, відповідно, вище ($p<0,05$) за значення медіани В-лімфоцитів, які зазнали одночасної дії ФЛ і ЦФ (23,55%).

Крім того, підсилення цитотоксичного ефекту ФЛ та ЦФ *ex vivo* при їх одночасному використанні спостерігається незалежно від статусу експресії CD180 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів (табл. 4.1). Отже, нами виявлено синергізм цитотоксичної дії ФЛ та ЦФ *ex vivo* за умов наявності CD150 на плазматичній мембрані злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ та незалежно від статусу експресії CD180.

Беручи до уваги, що рецептори CD150 та CD180 мають високий ступінь колокалізації на плазматичній мембрані злоякісно трансформованих В-лімфоцитів та синергізм їх дії у випадку інгубування Akt та MAPK сигнальних шляхів [184], важливо було з'ясувати чи зміниться ступінь чутливості В-лімфоцитів до дії хіміопрепаратів *ex vivo* за умов одночасної експресії CD150 та CD180 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ.

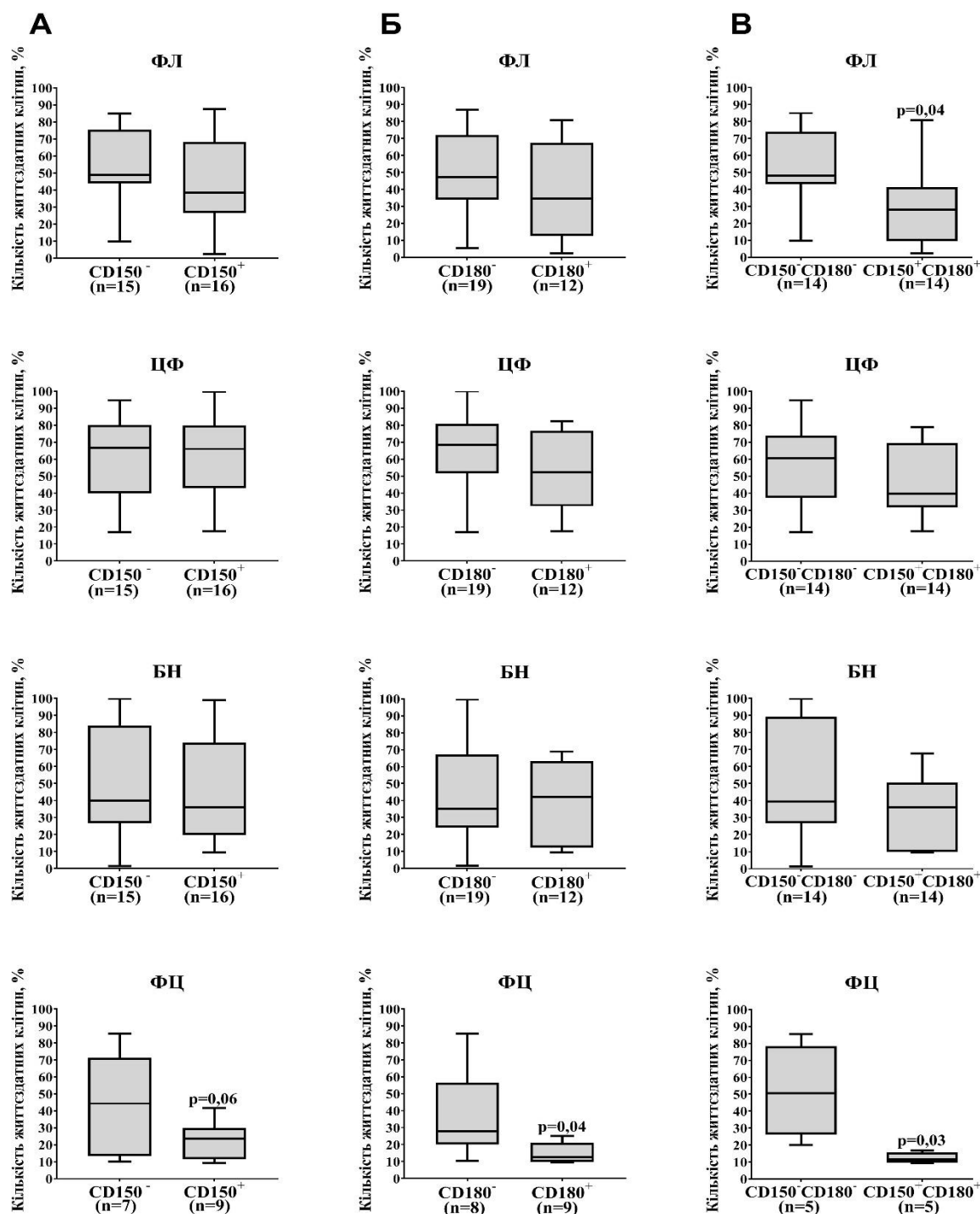


Рис.4.1 Життєздатність В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ під впливом хіміопрепаратів *ex vivo* залежно від статусу експресії CD150 (стовпчик А), CD180 (стовпчик Б) окремо, а також у випадку одночасної відсутності/наявності їх експресії (стовпчик В) на плазматичній мембрані клітин. Результати резазуринового тесту, де відсоток редукції резазурину прямо пропорційний відсотку життєздатних клітин. ФЛ – флударабін, ЦФ – циклофосфамід, БН – бендамустин, ФЦ – флударабін + циклофосфамід.

Таблиця 4.1

Чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії хіміопрепаратів ex vivo з урахуванням рівня експресії CD150 та CD180

Поверхневий фенотип В-лімфоцитів	Показник	Кількість життєздатних клітин після культивування із хіміопрепаратом (%)			
		ФЛ	ЦФ	БН	ФЦ
1	2	3	4	5	6
CD150 ⁻	Мін-Макс	9,81 – 84,95	17,11 – 94,71	1,41 – 99,78	10,29 – 87,66
	Медіана	48,81	66,70	39,91	44,31¹
CD150 ⁺	Мін-Макс	2,47 – 87,60	17,60 – 99,95	9,46 – 98,94	9,38 – 41,71
	Медіана	38,49	65,98	36,08	23,55*
CD180 ⁻	Мін-Макс	5,53 – 87,60	17,11 – 99,95	1,41 – 99,78	10,29 – 87,66
	Медіана	47,28	68,51	35,03	27,92^{2,*}
CD180 ⁺	Мін-Макс	2,47 – 80,84	17,60 – 82,19	9,46 – 68,89	9,38 – 25
	Медіана	34,55	52,35	42,03	12,7*
CD150 ⁻ CD180 ⁻	Мін-Макс	9,81 – 84,95	17,11 – 94,71	1,41 – 99,78	20,00 – 85,50
	Медіана	48,24³	60,47	39,35	50,59³
CD150 ⁺ CD180 ⁺	Мін-Макс	2,47 – 80,84	17,6 – 79,05	9,46 – 67,59	9,37 – 16,78
	Медіана	28,09	39,79	36,08	11,42[#]

Примітка. ФЛ – флударабін, ЦФ – циклофосфамід, БН – бендамустин, ФЦ – флударабін + циклофосфамід; 1 – $p=0,06$, порівняно із CD150⁺ В-лімфоцитами, 2 – $p=0,04$, порівняно із CD180⁺ В-лімфоцитами, 3 – $p=0,04$, порівняно із CD150⁺CD180⁺ В-лімфоцитами, * - $p<0,05$ порівняно із ефектом дії ФЛ і ЦФ на у монорежимі, # - $p=0,006$ порівняно із ефектом дії ФЛ і ЦФ у монорежимі.

В результаті проведених досліджень, нами встановлено, що медіана кількості життєздатних $CD150^+CD180^+$ В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ після їх культивування із ФЛ *ex vivo* становив 28,09%. Натомість, у випадку відсутності експресії обох зазначених рецепторів на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах – 48,24% (табл. 4.1). Таким чином, В-лімфоцити, що характеризуються $CD150^+CD180^+$ фенотипом є у 1,7 разу достовірно ($p < 0,04$) більш чутливими до цитотоксичної дії ФЛ *ex vivo* порівняно із ефектом, який спостерігається при дії ФЛ по відношенню до $CD150^-CD180^-$ В-лімфоцитів (рис.4.1, В).

Після культивування В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ у присутності ЦФ *ex vivo*, медіани кількості життєздатних В-лімфоцитів із $CD150^-CD180^-$ та $CD150^+CD180^+$ фенотипом становили 60,47% та 39,79%, відповідно (табл. 4.1). Однак, не зважаючи на суттєву різницю у зазначених показниках, отримана різниця в чутливості В-лімфоцитів до дії ЦФ не є достовірною ($p = 0,4$) через широкий діапазон отриманих даних.

За умов одночасної дії ФЛ і ЦФ на злоякісно трансформовані В-лімфоцити хворих на ХЛЛ *ex vivo*, цитотоксичний ефект при по відношенню до $CD150^+CD180^+$ В-лімфоцитів є у 4,4 разу достовірно ($p < 0,04$) вищим порівняно до такого, що спостерігається по відношенню до $CD150^-CD180^-$ В-лімфоцитів (рис. 4.1, В). Зокрема, медіани кількості життєздатних В-лімфоцитів, у яких було детектовано одночасну експресію CD150 та CD180 на плазматичній мембрані клітин, після їх культивування із ФЛ та ЦФ становив 11,42%, а у випадку $CD150^-CD180^-$ В-лімфоцитів – 50,59%, відповідно (табл. 4.1).

При аналізі показників чутливості $CD150^+CD180^+$ та $CD150^-CD180^-$ В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ за умов дії БН *ex vivo* встановлено, що різниця в показниках медіан кількості життєздатних В-лімфоцитів становить менше 4% (36,08% vs 39,35% життєздатних В-лімфоцитів, відповідно) (табл. 4.1). Отримані результати вказують на те, що одночасна експресія CD150 та CD180 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ не асоціюється із ступенем чутливості клітин до цитотоксичної дії БН *ex vivo* (рис.4.1, В).

При порівнянні результатів аналізу дії цитотоксичного ефекту в результаті комбінованого застосування ФЛ і ЦФ та у монорежимах *ex vivo* встановлено синергізм дії ФЛ і ЦФ виключно у тих випадках ХЛЛ, В-лімфоцити яких одночасно експресують CD150 та CD180 на плазматичній мембрані ($p=0,006$). Натомість показники цитотоксичної дії ФЛ і ЦФ щодо CD150⁺CD180⁺ В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ відповідають таким за умов впливу ФЛ та ЦФ у монорежимах (табл. 4.1).

Отже, чутливість злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичної дії хіміопрепаратів *ex vivo* відрізняється гетерогенністю та залежить від статусу експресії CD150 або/та CD180 на плазматичній мембрані клітин. Нами встановлено, що як CD150⁺, так і CD180⁺ В-лімфоцити хворих на ХЛЛ є достовірно більш чутливими до комбінованої дії ФЛ і ЦФ *ex vivo* ніж В-лімфоцити, негативні за експресією обох зазначених рецепторів. Наявність експресії CD150 та CD180 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ, асоціюється із їх високою чутливістю до цитотоксичної дії ФЛ у монорежимі *ex vivo*.

4.2. Вплив активації CD150 та CD180 на чутливість В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфлейкоз до дії хіміопрепаратів *ex vivo*

Згідно отриманих нами результатів, статус експресії CD150 або/та CD180 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ їх асоційований із чутливістю клітин до цитотоксичної дії хіміопрепаратів *ex vivo*. Однак залишається відкритим питання, чи є CD150 та CD180 безпосередньо залученими до регуляції чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до вищеперерахованих хіміопрепаратів.

Для пошуку відповіді на поставлене запитання, нами було проведено лігацію рецепторів CD150 та CD180 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ шляхом додавання до середовища культивування клітин МКАТ проти CD150 та CD180 поодиночі та в комбінації з наступним аналізом їх чутливості до хіміопрепаратів.

При аналізі життєздатності В-лімфоцитів після попередньої лігації CD150 або CD180 встановлено, що медіани кількості життєздатних клітин після їх

культивування із ФЛ *ex vivo* становили 44,90% та 50,26%, відповідно. В той же час, медіана кількості життєздатних клітин в результаті дії ФЛ на В-лімфоцити без попередньої лігації CD150/CD180 складала 34,67% і достовірно не відрізнялась від показників серед В-лімфоцитів, які культивувались у присутності анти-CD150 або анти-CD180 МКАТ (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

**Чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії хіміопрепаратів *ex vivo*
за умов лігації CD150 та CD180**

Мішені лігації	Показник	Кількість життєздатних клітин після культивування із хіміопрепаратом (%)		
		ФЛ	ЦФ	БН
Без лігації	Мін – Макс	28,14 – 49,90	49,01 – 91,34	53,16 – 81,34
	Медіана	34,67	82,55	73,01
CD150	Мін – Макс	37,53 – 53,88	42,65 – 91,14	36,20 – 56,35
	Медіана	44,90	80,53	47,36
CD180	Мін – Макс	46,59 – 51,94	62,72 – 86,92	1,64 – 7,47
	Медіана	50,26	81,22	7,45[#]
CD150+CD180	Мін – Макс	71,83 – 72,83	74,64 – 99,95	3,62 – 8,74
	Медіана	72,79[#]	79,73	8,16[#]

Примітка. ФЛ–флударабін, ЦФ–циклофосфамід, БН–бендамустин; # – $p=0,04$, порівняно з В-лімфоцитами, рецептори CD150 або/та CD180 яких не були попередньо ліговані.

Однак, одночасна лігація CD150 та CD180 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ призводила до достовірного ($p=0,04$) зниження чутливості клітин до ФЛ у 2 рази порівняно до ефекту, обумовленого дією ФЛ по відношенню до В-лімфоцитів, на яких попередня лігація CD150 і CD180 не проводилась – 72,79% життєздатних клітин vs 34,67% (табл. 4.2, рис. 4.2, А).

Нами не встановлено достовірної різниці в чутливості В-лімфоцитів до дії БН за умов попередньої лігації CD150 порівняно із ефектом даного хіміопрепарату на клітини, які культивували без додавання МКАТ проти CD150. Хоча при цьому медіани кількості життєздатних В-лімфоцитів в досліджуваних групах відрізнялись вдвічі (73,01% проти 47,36%), що мож бути обумовлено великим

діапазоном значень в межах досліджуваних груп. Натомість ефективність цитотоксичного впливу БН *ex vivo* по відношенню до В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ за умов попередньої одночасної лігації CD150 та CD180 є на такому ж самому рівні, як і за умов лігації лише CD180 – медіани кількості життєздатних клітин становлять 8,16% та 7,45%, відповідно.

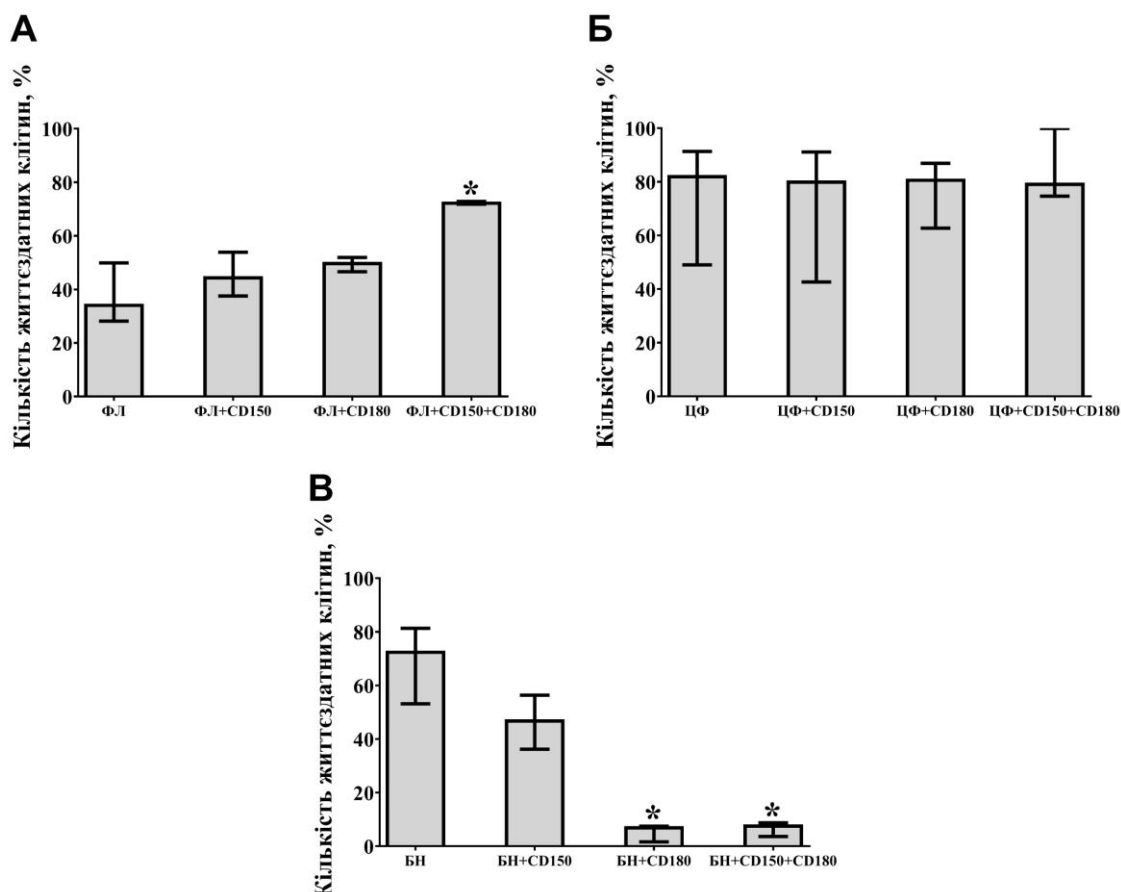


Рис.4.2 Життєздатність В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії ФЛ (А), ЦФ (Б) та БН (В) за умов лігації CD150 та/або CD180 *ex vivo*. Результати резазуринового тесту, де відсоток редукції резазурину прямо пропорційний відсотку життєздатних клітин. ФЛ – флударабін, ЦФ – циклофосфамід, БН – бендамустин. * - $p=0,04$ порівняно до ефекту від застосування хіміопрепарату без попередньої лігації рецепторів (перша колонка). В якості контролю було враховано показник життєздатності В-лімфоцитів без додавання МКАТ та хіміопрепаратів до культурального середовища, який приймали за 100%.

Отже, в результаті попередньої поодинокі лігації CD180 або в комбінації із лігацією CD150, В-лімфоцити хворих на ХЛЛ стають у 9,8 та 8,9 разів достовірно

($p=0,04$) більш чутливішими до дії БН *ex vivo* ніж В-лімфоцити, у яких рецептори CD150 або CD180 попередньо не були активовані (табл. 4.2, рис. 4.2, В).

При порівнянні показників чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до цитотоксичної дії ЦФ *ex vivo* за умов окремої або сумісної попередньої лігації CD150 та CD180, нами не встановлено достовірної різниці із ефектом дії ЦФ на В-лімфоцити хворих на ХЛЛ, які культивували без додавання анти-CD150 або/та анти-CD180 МКАТ до середовища культивування. Зокрема, різниця в медіанах кількості життєздатних клітин в межах досліджуваних зразків не перевищувала 3% (табл. 4.2, рис. 4.2, Б).

Отже, лігація CD150 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ не впливає на ступінь їх чутливості до дії ФЛ, БН *ex vivo*, однак активація CD180 на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах обумовлює зростання ступеня їх чутливості до цитотоксичного впливу БН *ex vivo*. При цьому важливо відмітити, що наслідком культивування В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ із одночасним внесенням анти-CD150 та анти-CD180 МКАТ до середовища культивування клітин, чутливість В-лімфоцитів до дії БН залишається на рівні такої, що спостерігається при активації лише CD180, однак при цьому знижується чутливість В-лімфоцитів до дії ФЛ *ex vivo*. Стан активації CD150 та CD180-опосередкованих сигнальних шляхів не визначає ступінь чутливості В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичного впливу ЦФ *ex vivo*.

4.3. Визначення залежності між рівнем експресії мРНК ізоформ CD150 у В-лімфоцитах хворих на хронічний лімфолейкоз та чутливістю до дії хіміопрепаратів

Враховуючи, що для CD150 характерна наявність декількох ізоформ, що формуються під час транскрипції мРНК шляхом альтернативного сплайсингу, а саме трансмембранні ізоформи mCD150 і nCD150 та розчинна ізоформа sCD150, важливо було з'ясувати наявність асоціативного зв'язку між чутливістю злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до дії хіміопрепаратів та рівнем

експресії мРНК ізоформ CD150. Першочерговим завданням було визначення базального рівня експресії мРНК окремих ізоформ CD150 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ методом кількісної ПЛР з використанням пар праймерів, що розпізнають унікальні області транскриптів кожної з ізоформ.

За результатами дослідження, не зважаючи на високу гетерогенність в рівнях експресії мРНК досліджуваних ізоформ серед В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ, нами встановлено, що домінуючою є експресія саме mCD150 ізоформи CD150, медіана рівня експресії мРНК якої є у 44 та 8,8 разів достовірно ($p < 0,01$) вищою за аналогічні показники для nCD150 і sCD150 ізоформ (0,44 ум. од. проти 0,01 ум.од. та 0,05 ум.од., відповідно). В той же час, рівень експресії мРНК sCD150 ізоформи у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах є у 5 разів достовірно ($p = 0,02$) вищим за такий, що був встановлений для мРНК ізоформи nCD150 – 0,01 ум.од. vs 0,05 ум.од. (табл. 4.3, рис. 3.8).

Проаналізувавши для кожного випадку ХЛЛ рівні експресії окремих ізоформ CD150 у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах та їх чутливість до хіміопрепаратів *ex vivo*, нами не було встановлено жодних кореляційних зав'язків між досліджуваними параметрами.

Таблиця 4.3

Рівень експресії мРНК ізоформ CD150 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ

Показник	Рівень експресії мРНК, ум.од.		
	mCD150	nCD150	sCD150
Мін – Макс	0,02 – 1,93	0,0004 – 0,19	0,003 – 0,29
Медіана	0,44	0,01*	0,05*[#]

Примітка. * - $p < 0,01$ порівняно із рівнем експресії мРНК mCD150 ізоформи CD150, # – $p = 0,02$ порівняно із рівнем експресії мРНК nCD150 ізоформи CD150

Враховуючи гетерогенність значень за рівнем експресії мРНК ізоформ CD150, наступним кроком був розподіл досліджуваних випадків ХЛЛ на групи із високим ($M >$) та низьким ($M <$) рівнем експресії мРНК mCD150, nCD150 та sCD150 ізоформ з урахуванням медіани рівня експресії мРНК по всій вибірці пацієнтів. Для ізоформи mCD150 медіана рівня експресії мРНК становила 0,44 ум.од., для nCD150 – 0,01 ум.од., а для sCD150 - 0,05 ум.од.

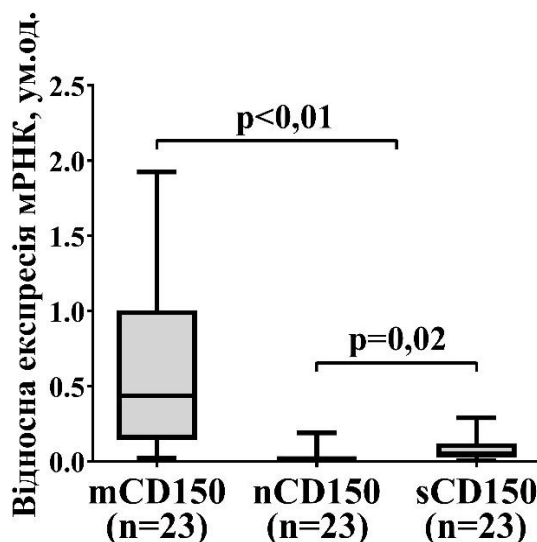


Рис. 4.3 Рівень експресії мРНК mCD150, nCD150 та sCD150 ізоформ CD150 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ. Результати кПЛР у режимі реального часу, рівень експресії мРНК нормалізований до рівня експресії мРНК гена *TBP*.

В ході виконання експерименту нами було відмічено достовірну різницю у показниках кількості життєздатних В-лімфоцитів після їх культивування із ФЛ та ЦФ *ex vivo* залежно від рівня експресії мРНК ізоформ CD150. Зокрема, В-лімфоцити хворих на ХЛЛ, для яких була характерна висока (М>) експресія мРНК mCD150 ізоформи є у 2 разу достовірно ($p=0,03$) більш чутливі до цитотоксичної дії ФЛ *ex vivo* порівняно до з В-лімфоцитами, у яких рівень експресії мРНК mCD150 був низький (М<). Медіана кількості життєздатних В-лімфоцитів для названих випадків становили 35,58% проти 74,90% (табл. 4.4, рис.4.4, А). Натомість медіана кількості життєздатних В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ із високим (М>) рівнем експресії мРНК nCD150 ізоформи (65,77%) після їх культивування у присутності ФЛ є вищим за такий у випадку низького (М<) рівня експресії мРНК nCD150 ізоформи (37,74%). Отже, чутливість злякисно трансформованих В-лімфоцитів до дії ФЛ *ex vivo* є у 1,7 разу достовірно ($p=0,03$) вищою за умов низького (М<) рівня експресії мРНК nCD150 ізоформи нижче медіани (табл. 4.4, рис.4.4, Б).

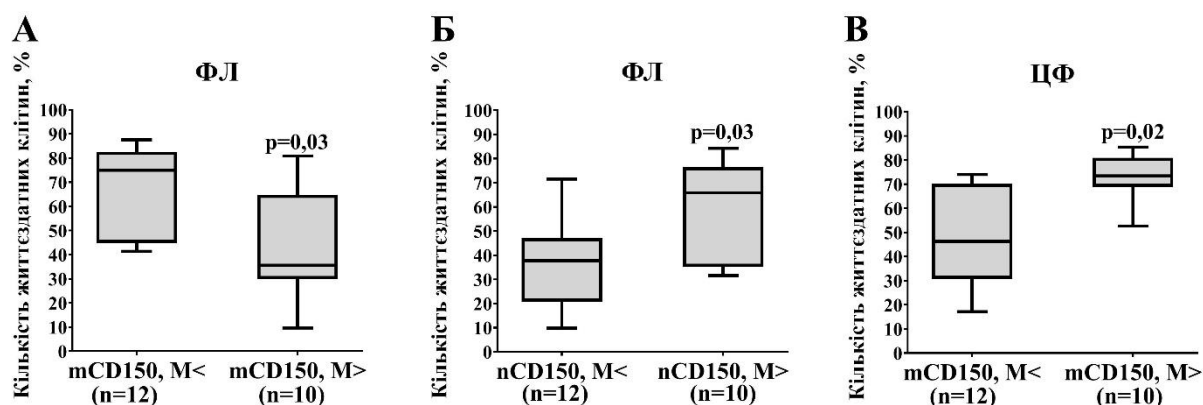


Рис.4.4 Життєздатність В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ в результаті дії флударабіну (А-Б) та циклофосфаміду (В) *ex vivo* залежно від рівня експресії мРНК mCD150 та nCD150 ізоформ CD150. Результати резазуринового тесту, де відсоток редукції резазурину прямо пропорційний відсотку життєздатних клітин. ФЛ - флударабін, ЦФ – циклофосфамід. М< - експресія на рівні нижче медіани, М> - експресія на рівні вище медіани.

Різниця в медіанах кількості життєздатних клітин після впливу ЦФ *ex vivo* у групах ХЛЛ із високим (М<) та низьким (М<) рівнем експресії мРНК nCD150 ізоформи у В-лімфоцитах становила менше 3% (67,05% vs 69,71%), що свідчить про відсутність зв'язку між їх чутливістю до ЦФ *ex vivo* та рівнем експресії nCD150 ізоформи (табл. 4.4). Разом з тим, нами відмічено в 1,6 разу достовірно ($p=0,02$) вищу чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до впливу ЦФ *ex vivo* за умов низького (М<) рівня експресії мРНК mCD150 ізоформи (медіана кількості життєздатних клітин становить 46,25% проти 73,42% серед В-лімфоцитів із високим (М>) рівнем експресії мРНК mCD150) (рис. 4.4, В). Рівень експресії мРНК sCD150 ізоформи не асоціювався з чутливістю злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до дії ФЛ або ЦФ *ex vivo* – різниця в медіанах кількості життєздатних клітин в межах досліджуваних груп не перевищувала 5% (табл. 4.4).

Чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії хіміопрепаратів *ex vivo* залежно від рівня експресії мРНК ізоформ CD150

Рівень експресії мРНК	Показник	Кількість життєздатних клітин після культивування із хіміопрепаратом (%)		
		ФЛ	ЦФ	БН
mCD150, M<	Мін – Макс	41,39 – 87,60	17,11 – 73,95	1,41 – 98,94
	Медіана	74,90	46,25[#]	36,64
mCD150, M>	Мін – Макс	9,57 – 80,84	52,65 – 85,33	15,37 – 91,75
	Медіана	35,58[*]	73,42	47,97
nCD150, M<	Мін – Макс	9,82 – 71,56	17,11 – 91,20	9,93 – 98,94
	Медіана	37,74^{**}	69,71	44,22
nCD150, M>	Мін – Макс	31,60 – 84,21	17,60 – 85,33	1,41 – 92,71
	Медіана	65,77	67,05	46,69
sCD150, M<	Мін – Макс	21,71 – 87,60	29,63 – 91,20	26,59 – 98,94
	Медіана	46,29	73,90	65,90
sCD150, M>	Мін – Макс	9,57 – 84,21	17,11 – 83,54	1,41 – 80,40
	Медіана	41,74	69,71	40,46^{##}

Примітка. ФЛ – флударабін, ЦФ – циклофосфамід, БН – бендамустин; M< - експресія на рівні нижче медіани, M> - експресія на рівні вище медіани; * – $p=0,03$, порівняно з В-лімфоцитами, що експресують мРНК mCD150 на рівні нижче значення медіани, ** – $p=0,03$, порівняно з В-лімфоцитами, що експресують мРНК nCD150 на рівні вище значення медіани, # – $p=0,02$, порівняно з В-лімфоцитами, що експресують мРНК mCD150 на рівні вище значення медіани, ## – $p=0,07$, порівняно з В-лімфоцитами, що експресують мРНК sCD150 на рівні нижче значення медіани.

Нами відмічена тенденція ($p=0,07$) до більшої чутливості В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичної дії БН *ex vivo* у випадку високого (M>) рівня експресії мРНК sCD150 ізоформи (медіана кількості життєздатних клітин становить 40,46% проти 65,90% для В-лімфоцитів із низьким рівнем експресії мРНК sCD150), але за рахунок великого розкиду значень в межах досліджуваних груп, різниця не є достовірною (табл. 4.4).

Підсумок. Встановлено, що чутливість злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичної дії ЦФ або ФЛ *ex vivo* асоційована із рівнем експресії мРНК ізоформ CD150. Зокрема, високий (M>) рівень експресії

mPНК mCD150 у В-лімфоцитах асоційований із їх вищою чутливістю до дії ФЛ та меншою чутливістю до дії ЦФ *ex vivo* порівняно з В-лімфоцитами, у яких рівень експресії mPНК mCD150 є низьким (M<). Вища чутливість В-лімфоцитів до дії ФЛ *ex vivo* також спостерігається за умов низького (M<) рівня експресії mPНК nCD150.

4.4. Вплив лігації CD150 та CD180 на рівень експресії CD20 на В-лімфоцитах хворих на хронічний лімфолейкоз *ex vivo*

Одним із основних складових схем протипухлинної терапії першої лінії хворих на ХЛЛ є Ритуксімаб – МКАТ проти поверхневого CD20, експресія якого на плазматичній мембрані В-лімфоцитів детектується починаючи із стадії пре-В клітин і закінчуючи на етапі формування плазматичних клітин. Однак, на противагу неходжкінським лімфомам, ХЛЛ характерним є низький рівень експресії CD20 на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах [185, 186]. Саме тому, пошук можливих шляхів підвищення рівня експресії CD20 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів є важливим етапом при оптимізації лікування хворих на ХЛЛ.

Враховуючи отримані нами попередні дані щодо участі CD150 у позитивній регуляції рівня експресії mPНК транскрипційного фактора PU.1, до переліку мішеней якого входить ген *CD20*, а також достовірно вищі показники експресії CD20 на CD150⁺ В-лімфоцитах [187], на наступному етапі дослідження було проведено лігацію рецепторів CD150 або/та CD180 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ шляхом додавання до середовища культивування клітин МКАТ проти CD150 та CD180 з наступним аналізом рівня експресії CD20 на В-лімфоцитах.

В результаті проведених досліджень нами відмічено зростання рівня експресії CD20 на плазматичній мембрані злоякісно трансформованих В-лімфоцитів як за умов нарізної лігації рецепторів CD150 або CD180 *ex vivo*, так і в комбінації (рис. 4.5).

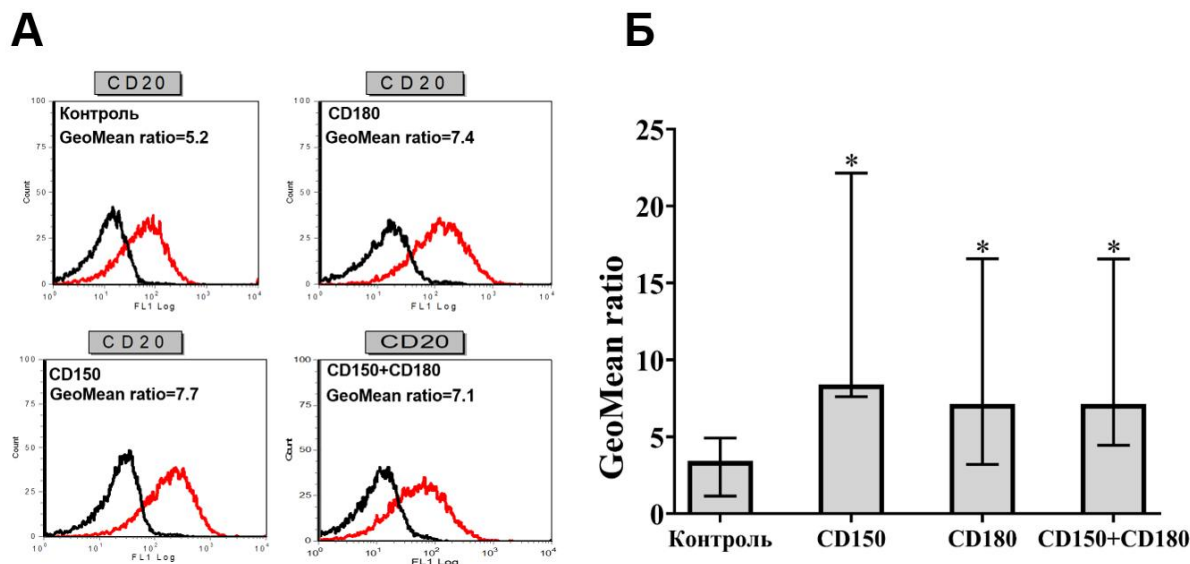


Рис. 4.5 CD150 або/та CD180-опосередкована регуляція рівня експресії антигена CD20 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ. Результати проточної цитометрії. А – репрезентативні гістограми: вісь ординат – кількість клітин, вісь абсцис – інтенсивність флуоресценції (FL1, FITC); чорна гістограма – GeoMean контролю ізо типу антитіл, червона гістограма – GeoMean CD20; Б – узагальнення результатів по 5 незалежним експериментам, в якості контролю слугував показник GeoMean ratio для CD20 до лігації CD150/CD180.

Зокрема, в результаті попередньої лігації CD150 медіана GeoMean ratio для CD20 становила 8,41, що є у 2,5 разу достовірно ($p < 0,03$) вище порівняно з експресією CD20 у групі хворих на ХЛЛ, В-лімфоцити яких попередньо не були ліговані (табл. 4.5). Активація CD180-опосередкованих сигнальних шляхів у В-лімфоцитах з використанням анти-CD180 МКАТ призводила до достовірного ($p < 0,03$) зростання рівня експресії CD20 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів у 2,1 разу (медіана GeoMean ratio для антигена CD20 становила 7,14 проти 3,44 у групі контролю). Сумісна лігація CD150 та CD180 призводила до достовірного ($p < 0,03$) зростання у 2,1 разу рівня експресії CD20 на В-лімфоцитах (7,13 vs 3,44), що співставляється із ефектом від нарізної лігації CD180 (табл. 4.5, рис.4.5).

**Рівень експресії CD20 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих
на ХЛЛ за умов лігації CD150 або/та CD180 *ex vivo***

Мішені лігації	GeoMean ratio* для CD20		
	Мін – Макс	Медіана	Mean ± SE
Без лігації	1,14 – 4,92	3,44	3,27 ± 0,54
CD150	7,60 – 22,14	8,41*	11,64 ± 3,52
CD180	3,20 – 16,57	7,14*	8,19 ± 2,29
CD150 + CD180	4,44 – 16,57	7,13*	8,82 ± 2,67

Примітка. GeoMean ratio* – GeoMean антигена/GeoMean контролю ізотипу антитіл; * - $p < 0,03$ порівняно із відповідними показниками за умов відсутності лігації CD150 або/та CD180

Підсумок. Встановлено можливість позитивної регуляції рівня експресії CD20 на плазматичній мембрані злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ шляхом активації CD150 та CD180-опосередкованих сигнальних шляхів.

Результати, описані в розділі 3 опубліковані у [183].

РОЗДІЛ 5

ЧУТЛИВІСТЬ В-ЛІМФОЦИТІВ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ЛІМФОЛЕЙКОЗ ДО ЦИТОСТАТИКІВ *EX VIVO* З УРАХУВАННЯМ ПРОФІЛЮ ЕКСПРЕСІЇ ЦИТОКІНОВИХ ФАКТОРІВ

Відомо, що злоякісно трансформовані В-лімфоцити хворих на ХЛЛ перебувають у тісному контакті із елементами мікроточення в межах кісткового мозку, вторинних лімфоїдних органів та у периферичній крові. Наявність таких контактів обумовлює активацію внутрішньоклітинних сигнальних шляхів у В-лімфоцитах, що в кінцевому рахунку сприяє їх загальній виживаності, перешкоджанню контролю з боку імунної системи, блокуванню апоптозу і, зрештою, призводить до прогресування ХЛЛ та асоціюється з агресивністю його перебігу в цілому [10]. До ключових факторів, що залучені до перебігу ХЛЛ, і рівень яких, як відомо, є підвищеним при даній нозології та асоційований із несприятливим прогнозом для пацієнтів, належать цитокіни CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 [13-15]. Враховуючи вищеописане, пошук можливих шляхів регуляції рівня експресії та секреції цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 є важливим напрямком в контексті контролю над прогресією ХЛЛ.

5.1. Базальний рівень експресії мРНК цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 у В-лімфоцитах хворих на хронічний лімфолейкоз з урахуванням статусу експресії CD150 та CD180

Першочерговим завданням було з'ясувати базальний рівень експресії мРНК цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ із урахуванням показників експресії CD150 та CD180 на плазматичній мембрані клітин. За результатами імунофенотипування було сформовано 2 групи хворих на ХЛЛ, В-лімфоцити яких характеризувались CD150⁻CD180⁻ (n=10) та CD150⁺CD180⁺ (n=10) фенотипом.

В ході аналізу отриманих даних нами встановлено різницю в показниках базального рівня експресії мРНК цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 залежно від

статусу експресії CD150 та CD180 на плазматичній мембрані злужісно трансформованих В-лімфоцитів (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Базальний рівень експресії мРНК цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ із урахуванням статусу експресії CD150 та CD180 (ум.од.)

Цитокін	Показник	Фенотип злужісно трансформованих В-лімфоцитів	
		CD150 ⁻ CD180 ⁻	CD150 ⁺ CD180 ⁺
CCL3	Мін – Макс	0,05 – 2,00	3,25 – 45,10
	Медіана	0,69*	26,17
CCL4	Мін – Макс	0,18 – 6,68	10,48 – 49,01
	Медіана	1,36*	20,82
IL-6	Мін – Макс	0,25 – 0,77	0,07 – 0,13
	Медіана	0,34**	0,09
IL-10	Мін – Макс	1,01 – 4,41	0,17 – 0,51
	Медіана	3,82**	0,30

Примітка. * - $p=0,01$ порівняно із CD150⁺CD180⁺ В-лімфоцитами, ** - $p=0,02$ порівняно із CD150⁺CD180⁺ В-лімфоцитами.

Медіана базального рівня експресії мРНК CCL3 у В-лімфоцитах із CD150⁻CD180⁻ фенотипом становила 0,69 ум.од., що є у 37,9 разів достовірно ($p=0,01$) нижче за аналогічний показник для лімфоцитів хворих на ХЛЛ, які характеризуються одночасною експресією CD150 та CD180 на плазматичній мембрані – 26,17 ум.од. відповідно (табл. 5.1, рис. 5.1, А). Аналогічно до CCL3, медіана базального рівня експресії мРНК CCL4 у CD150⁻CD180⁻ В-лімфоцитах є у 15 разів достовірно ($p=0,01$) вищою за аналогічний показник у CD150⁺CD180⁺ клітинах – 20,82 ум.од. проти 1,36 ум.од., відповідно (табл. 5.1, рис. 5.1, Б).

За результатами оцінки базального рівня експресії мРНК цитокінів IL-6 та IL-10 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ встановлено протилежну до CCL3 та CCL4, закономірність (рис.5.1, В, Г). Для CD150⁻CD180⁻ В-лімфоцитів медіани рівня експресії мРНК цитокінів IL-6 та IL-10 становили 0,34 ум.од. та 3,82 ум.од., відповідно.

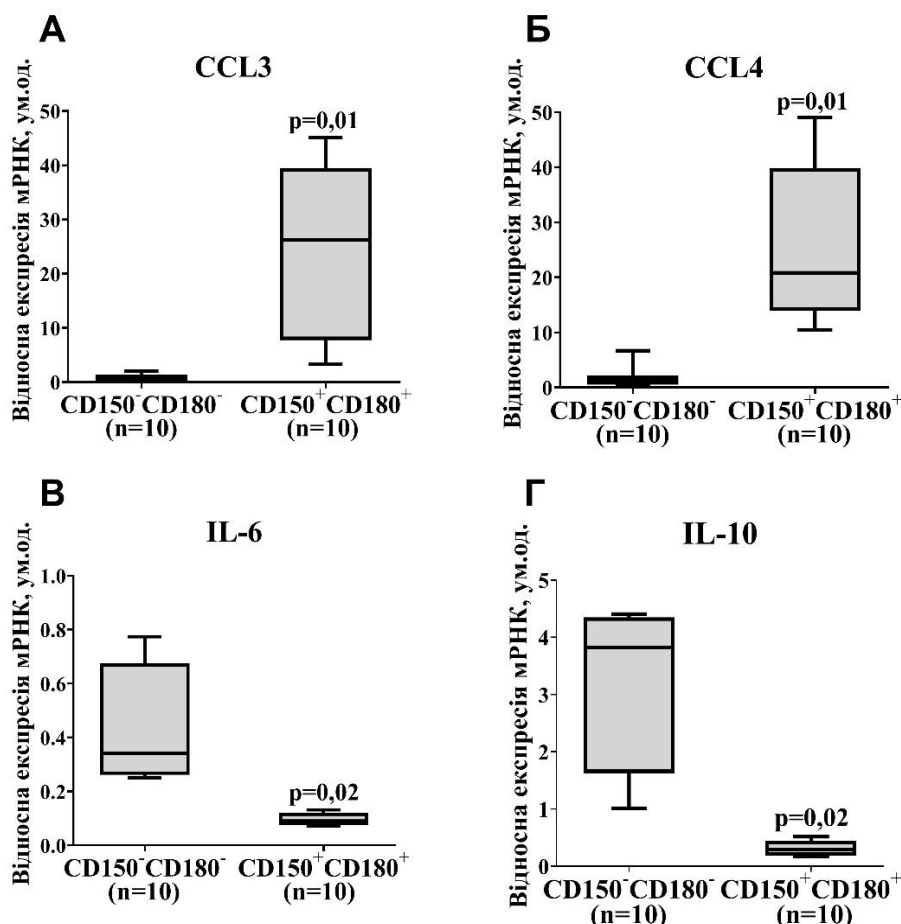


Рис.5.1 Базальний рівень експресії мРНК CCL3(А), CCL4(Б), IL-6 (В) та IL-10 (Г) у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ із урахуванням статусу експресії CD150 та CD180. Кількісна полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу, нормалізація проведена по рівню експресії *TBP*.

Натомість у групі хворих на ХЛЛ, В-лімфоцити яких були позитивними за обома рецепторами, медіана рівня експресії мРНК становила 0,09 ум.од. для IL-6 та 0,30 ум.од. для IL-10 (табл. 5.1). Таким чином, базальний рівень експресії мРНК цитокінів IL-6 та IL-10 у CD150⁺CD180⁺ злоякісно трансформованих В-лімфоцитах є у 3,8 та 12,7 разів достовірно ($p=0,02$) нижчим за показники В-лімфоцитів, у яких одночасна експресія CD150 та CD180 на плазматичній мембрані не була детектована.

Підсумок. Встановлено відмінності показників базального рівня експресії мРНК цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 залежно від фенотипу злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ. Зокрема, у CD150⁺CD180⁺ В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ відмічено достовірно вищий рівень експресії мРНК

CCL3 та CCL4 на тлі низьких показників експресії мРНК IL-6 та IL-10 у CD150⁺ CD180⁺ В-лімфоцитах.

5.2. Регуляція рівня експресії мРНК цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 за умов лігації CD150 та CD180 на В-лімфоцитах хворих на хронічний лімфолейкоз *ex vivo*

Враховуючи отримані нами дані щодо широкого діапазону значень експресії мРНК цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ залежно від статусу експресії CD150 та CD180 перед нами постало запитання: чи можливо за рахунок лігації CD150 та CD180 здійснювати регуляцію рівня експресії мРНК CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах? Для перевірки даної гіпотези було відібрано 7 випадків ХЛЛ, В-лімфоцити яких одночасно експресують CD150 та CD180 на плазматичній мембрані клітин. З метою аналізу можливості регуляції рівня експресії мРНК досліджуваних цитокінів за рахунок активації CD150 та CD180 було проведено лігацію поверхневих рецепторів на В-лімфоцитах з використанням анти-CD150 та анти-CD180 МКАТ окремо, а також комплексно в умовах *ex vivo*. В якості контролю слугували В-лімфоцити хворих на ХЛЛ, які культивували за тих самих умов без внесення до середовища культивування клітин МКАТ проти CD150 або CD180.

За результатами проведеного дослідження встановлено, що нарізна активація CD150 або CD180 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ не викликає достовірних змін показників експресії мРНК цитокінів CCL3 та CCL4 порівняно до таких в групі контролю. За умов одночасного внесення анти-CD150 та анти-CD180 МКАТ до середовища культивування В-лімфоцитів, нами також не було відмічено достовірних змін у рівні експресії мРНК CCL4 порівняно до контролю. Разом з тим, встановлено, що одночасна активація CD150 та CD180 призводила до достовірного підвищення медіани рівня експресії мРНК CCL3 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ у 1,5 разу порівняно до такого, що спостерігався у

злоякісно трансформованих В-лімфоцитах, які культивували без додавання МКАТ (табл. 5.2, рис. 5.2, А, Б).

У В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ спостерігали зниження медіани рівня експресії мРНК цитокінів IL-6 та IL-10 як в результаті нарізної лігації CD150 або CD180 на плазматичній мембрані, так і за умов комплексного впливу на названі рецептори *ex vivo* (рис.5.2, В, Г). Зокрема, поодинокі лігації CD150 призводила до достовірного ($p < 0,05$) зменшення медіани рівня експресії мРНК IL-6 у В-лімфоцитах у 4 рази порівняно до контролю (табл. 5.2). В той же час, наслідком одночасної активації CD150 та CD180 є достовірне ($p < 0,05$) зниження медіани рівня експресії мРНК IL-6 лише у 2 рази, що співставляється із ефектом, який досягається у випадку нарізної лігації CD180 на В-лімфоцитах (рис.5.2, В). Рівень експресії мРНК IL-10 у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах після їх культивування із МКАТ проти CD150, а також у комбінації із МКАТ проти CD180, є в 3 рази достовірно ($p < 0,05$) нижчим при порівнянні із таким, що спостерігається у групі контролю. Лігація ж лише CD180 на В-лімфоцитах призводить до достовірного ($p < 0,05$) зниження медіани рівня експресії мРНК IL-10 у 2 рази в порівнянні з контролем (табл. 5.2, рис. 5.2, Г).

Отже, нами вперше встановлено, що лігація CD150 або/та CD180 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ призводить до достовірного зниження рівня експресії мРНК як IL-6, так і IL-10. Отримані дані дозволяють припустити, що сигнальні каскади, опосередковані через CD150 та CD180 можуть брати участь у негативній регуляції експресії мРНК зазначених цитокінів. Слід відмітити, що найбільший інгібуючий ефект на показники експресії мРНК IL-6 та IL-10 у В-лімфоцитах досягається за умов лігації CD150 на відміну від такого, який спостерігається у разі лігації лише CD180 або при одночасній активації обох рецепторів. Отримані дані свідчать про домінуючу роль саме CD150 в якості негативного регулятора експресії мРНК IL-6 та IL-10.

Таблиця 5.2

Відносний рівень експресії мРНК цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ за умов лігації CD150 та CD180 *ex vivo* (ум.од.)

Мішень лігації	Показник	Цитокін			
		CCL3	CCL4	IL-6	IL-10
CD150	Мін – Макс	0,13 – 4,45	0,42 – 1,29	0,07 – 1,19	0,14 – 0,70
	Медіана	1,18	0,88	0,25*	0,30*
CD180	Мін – Макс	0,56 – 2,09	0,54 – 2,08	0,16 – 0,76	0,38 – 0,88
	Медіана	0,88	0,56	0,53*	0,61*
CD150 + CD180	Мін – Макс	1,04 – 2,99	0,35 – 2,99	0,20 – 0,71	0,16 – 1,30
	Медіана	1,56[#]	1,25	0,60*	0,30*

Примітка. Дані нормалізовано по відношенню до рівня експресії мРНК CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 у В-лімфоцитах, рецептори CD150 або/та CD180 яких попередньо не були ліговані (контроль) і приймалися за одиницю. [#]-p=0,02 порівняно до контролю, *-p<0,05 порівняно до контролю.

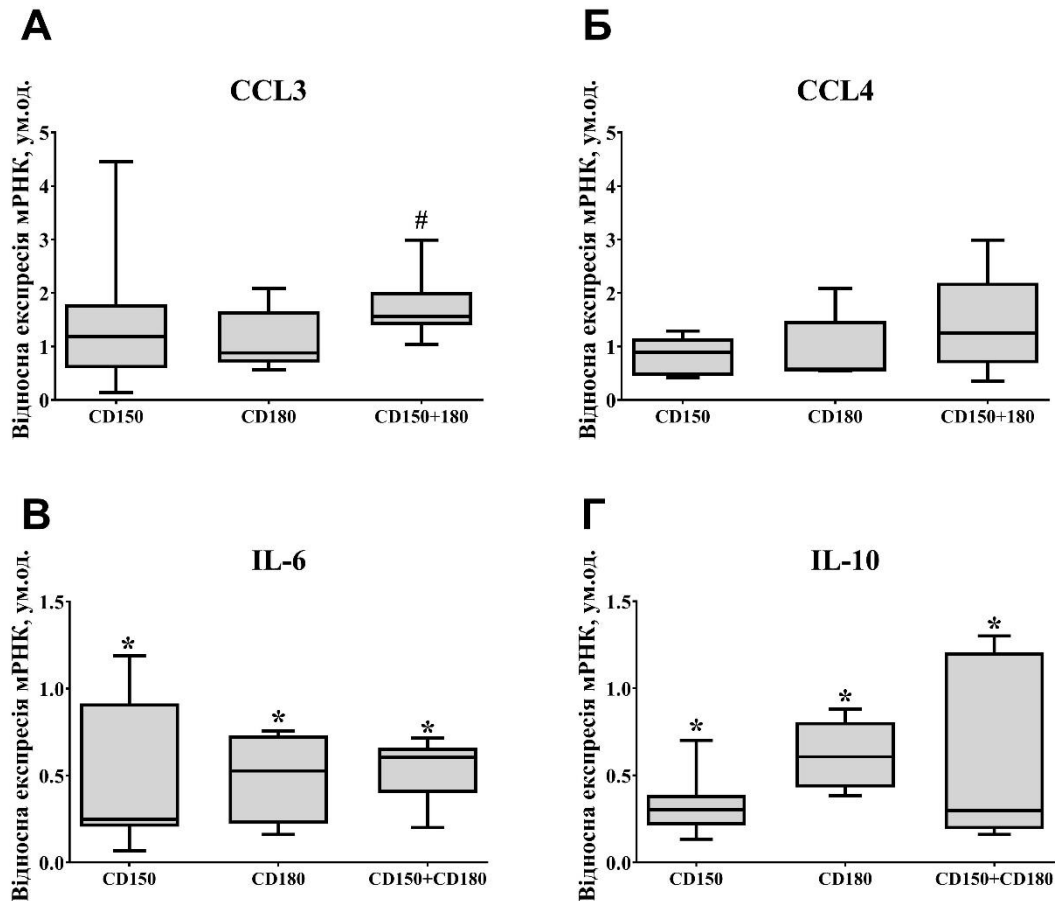


Рис.5.2 Рівень експресії мРНК цитокінів CCL3(А), CCL4(Б), IL-6 (В) та IL-10 (Г) у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ після лігації CD150 або/та CD180 *ex vivo*. Кількісна полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу, нормалізація проведена по рівню експресії *TBP*. В якості контролю було враховано показник рівня експресії цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 у В-лімфоцитах, в яких рецептори CD150 або/та CD180 попередньо не були ліговані, і приймався за одиницю. [#]- $p=0,02$ порівняно з групою контролю, ^{*}- $p<0,05$ порівняно з групою контролю.

Встановлено, що лігація CD150 або CD180 на злякiсно трансформованих В-лімфоцитах *ex vivo* не впливає на експресію мРНК CCL3 та CCL4. І лише за умов одночасної лігації CD150 та CD180 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ встановлено достовірне зростання експресії мРНК цитокіну CCL3 у 1,5 разу по відношенню до значень в контролі.

Враховуючи отримані дані щодо залучення CD150 та CD180 до регуляції експресії мРНК IL-6 та IL-10 та відсутність їх впливу на рівень

експресії мРНК CCL3 та CCL4 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ, увага подальших досліджень була сконцентрована лише на цитокінах IL-6 та IL-10.

Підсумок. Наслідком лігації CD150 та CD180 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ є негативна регуляція експресії мРНК IL-6 та IL-10, що, разом з тим, не впливає на рівень експресії мРНК CCL3 та CCL4.

5.3. Базальний рівень експресії білків IL-6 та IL-10 у В-лімфоцитах хворих на хронічний лімфолейкоз з урахуванням статусу експресії CD150 та CD180

Наступним етапом роботи було перевірити чи зберігається виявлена закономірність між рівнем експресії мРНК цитокінів IL-6 та IL-10 також і на рівні білка у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ із різним статусом експресії CD150 та CD180. Для вирішення даного питання нами було відібрано 16 випадків ХЛЛ, які були розподілені на групи з урахуванням статусу експресії CD150 та CD180 на плазматичній мембрані злужено трансформованих В-лімфоцитів. Вміст білків IL-6 та IL-10 в лізатах В-лімфоцитів виявляли методом вестерн блот аналізу. Згідно отриманих результатів, нами встановлено різницю у показниках рівня експресії білків IL-6 та IL-10 у CD150⁻CD180⁻ та CD150⁺CD180⁺ В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ (рис. 5.3).

Зокрема, медіана відносного вмісту білка IL-6 у CD150⁻CD180⁻ В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ становила 2,41 ум.од., тоді як у В-лімфоцитах, в яких відмічена одночасна експресія CD150 та CD180 на плазматичній мембрані клітин, даний показник був у 2 рази достовірно ($p < 0,03$) нижче і становив 1,17 ум.од., (табл. 5.3, рис.5.3, А, Б).

Рівень експресії білка IL-10 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ також асоціювався зі статусом експресії CD150 та CD180 на плазматичній мембрані клітин і був вищим у В-лімфоцитах, негативних за експресією обох досліджених рецепторів.

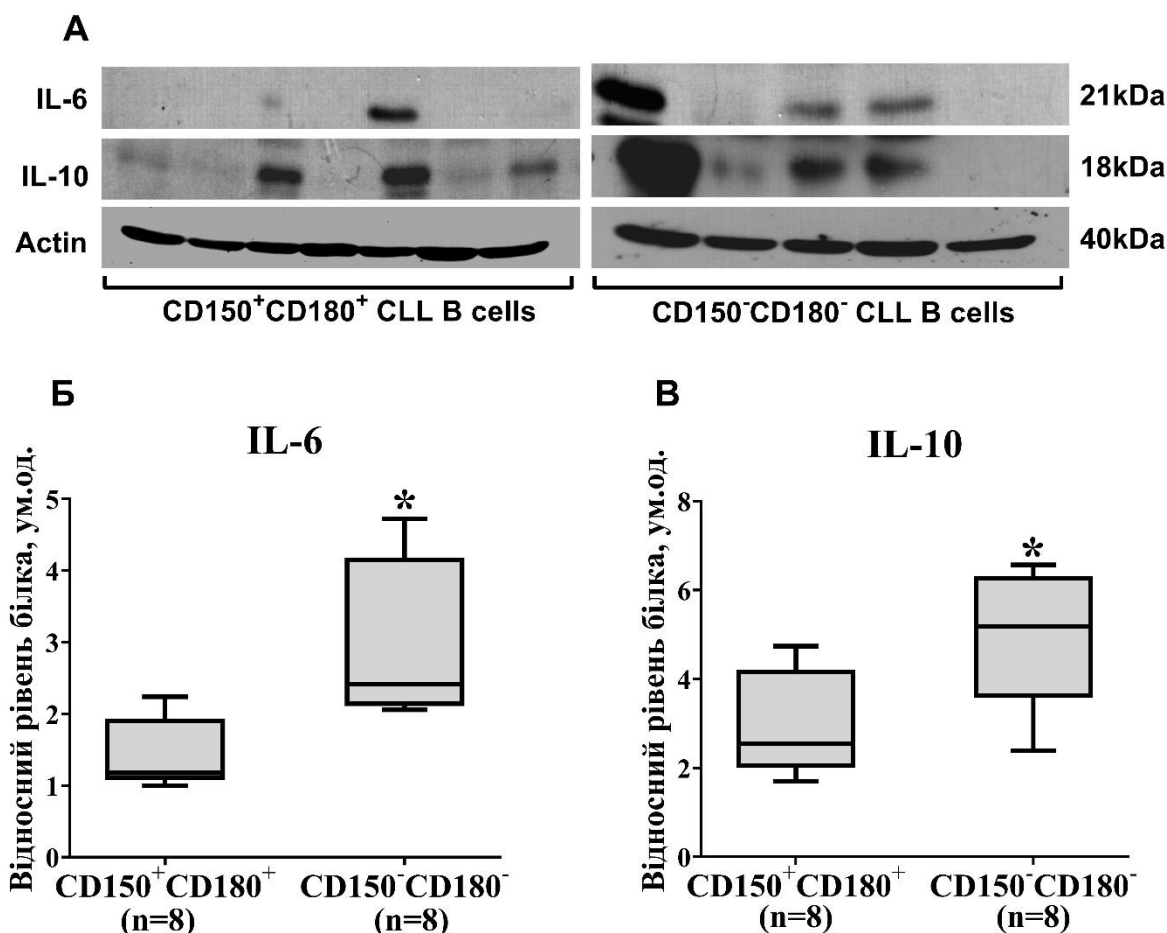


Рис.5.3 Експресія IL-6 та IL-10 на рівні білка у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ з урахуванням статусу експресії CD150 та CD180 (А). Результати вестерн блот аналізу. В якості контролю рівномірного нанесення білка в лунки було використано експресію β -актину. Б, В – денситометричний аналіз експресії білків IL-6 та IL-10 відповідно. Відносна кількість білка визначалась за інтенсивністю сигналу та була нормалізована до рівня експресії β -актину окремо для кожного зразка. *- $p < 0,03$ порівняно із CD150⁺CD180⁺ В-лімфоцитами.

Так, показник медіана експресії білка IL-10 у CD150⁻CD180⁻ та CD150⁺CD180⁺ В-лімфоцитах становила 5,18 ум.од. та 2,55 ум.од., відповідно. Тобто, для випадків ХЛЛ із CD150⁻CD180⁻ фенотипом злоякісно трансформованих В-лімфоцитів характерним є у 2,1 разу достовірно ($p < 0,03$) більш високий базальний рівень експресії білка IL-10 ніж для CD150⁺CD180⁺ випадків ХЛЛ (табл. 5.3, рис. 5.3, А, В).

Таблиця 5.3

Експресія IL-6 та IL-10 на рівні білка у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ із урахуванням статусу експресії CD150 та CD180 (ум.од.)

Цитокін	Показник	Фенотип злоякісно трансформованих В-лімфоцитів	
		CD150 ⁻ CD180 ⁻	CD150 ⁺ CD180 ⁺
IL-6	Мін – Макс	2,05 – 4,72	1,02 – 2,24
	Медіана	2,41*	1,17
IL-10	Мін – Макс	2,39 – 6,57	1,70 – 4,74
	Медіана	5,18*	2,55

Примітка. *-p≤0,03 порівняно із CD150⁺CD180⁺ В-лімфоцитами.

Отже, у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ із CD150⁺CD180⁺ фенотипом відмічено вдвічі нижчий рівень експресії білків IL-6 та IL-10 ніж у CD150⁻CD180⁻ В-лімфоцитах. Слід також зазначити, що отримана закономірність щодо низького рівня експресії білків IL-6 та IL-10 у CD150⁺CD180⁺ ніж у CD150⁻CD180⁻ злоякісно трансформованих В-лімфоцитах є аналогічною до такої, що простежувалась при аналізі базального рівня експресії мРНК IL-6 та IL-10 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ з урахуванням статусу експресії CD150 та CD180.

5.4. Оцінка вмісту IL-6 та IL-10 в плазмі крові хворих на хронічний лімфолейкоз залежно від статусу експресії CD150 та CD180 на В-лімфоцитах

Основною функцією цитокинових факторів є їх дистанційний вплив на клітини з метою активації чи інгібування у них відповідних внутрішньоклітинних процесів. Відомо, що у випадку ХЛЛ вміст цитокинів IL-6 та IL-10 у плазмі крові хворих в цілому є підвищеним порівняно з умовно здоровими донорами [188]. При цьому не виключається ймовірність того, що активна секреція цитокинів у локальне мікрооточення злоякісно трансформованими В-лімфоцитами може сприяти прогресуванню пухлинного процесу.

Беручи до уваги отримані дані щодо асоціації експресії IL-6 та IL-10 на рівні мРНК та на рівні білка зі статусом експресії CD150 та CD180 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів, однією із задач дослідження було порівняти вміст IL-6 та IL-10 в плазмі крові хворих на ХЛЛ, В-лімфоцити яких характеризуються CD150⁻CD180⁻ або CD150⁺CD180⁺ фенотипом.

Цей фрагмент дослідження проведений на зразках плазми крові 20 пацієнтів хворих на ХЛЛ, які були розподілені на групи з урахуванням статусу експресії CD150 та CD180 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів – по 10 зразків у групах випадків ХЛЛ із CD150⁻CD180⁻ та CD150⁺CD180⁺ фенотипом В-лімфоцитів. Вміст білків IL-6 та IL-10 в плазмі крові хворих на ХЛЛ визначали з використанням фірмових наборів “IL-6 (Human) ELISA Kit” та “IL-10 (Human) ELISA Kit” (ThermoFisher Scientific) згідно протоколу виробника.

Оцінка вмісту цитокінів в плазмі крові 20 хворих показала, що IL-10 в плазмі крові при ХЛЛ детектується у 1,8 разу достовірно ($p=0,001$) вищій концентрації, ніж IL-6: медіана вмісту IL-6 в плазмі крові у загальній вибірці хворих становила 39,33 пг/мл, тоді як для IL-10 це значення складало 70,93 пг/мл (табл. 5.4). Отримані результати щодо співвідношення IL-6 та IL-10 в плазмі крові співпадають із даними щодо більш високих показників базального рівня експресії IL-10 на рівні білка в В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ порівняно із такими для IL-6 (табл. 5.3).

Крім того, нами було проведено аналіз випадків ХЛЛ, які належали до досліджуваної вибірки, щодо наявності кореляційного зв'язку між вмістом IL-10 в плазмі крові та рівнем експресії IL-10 на рівні білка у В-лімфоцитах того ж самого пацієнта і було виявлено прямий сильний кореляційний зв'язок ($r=0,9$) між досліджуваними параметрами на рівні тенденції ($p=0,1$). В той же час, у випадку IL-6, кореляційний зв'язок встановлено не було ($r=0,2$, $p=0,8$).

Аналіз вмісту досліджуваних цитокінів в плазмі крові із урахуванням статусу експресії CD150 та CD180 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів

хворих на ХЛЛ не виявив достовірної різниці у вмісті білка IL-6 в досліджуваних зразках. Зокрема, медіана вмісту IL-6 в плазмі крові становила 36,50 пг/мл та 40,61 пг/мл для випадків ХЛЛ із CD150⁻CD180⁻ та CD150⁺CD180⁺ фенотипом В-лімфоцитів відповідно (табл. 5.5, рис.5.4, А).

Таблиця 5.4

Вміст IL-6 та IL-10 в плазмі крові хворих на ХЛЛ

Цитокін	Показник, (пг/мл)	
	Мін – Макс	Медіана
IL-6	4,17 – 58,06	39,33
IL-10	43,55 – 205,70	70,93*

Примітка. * - p=0,001 порівняно із відповідним показником для IL-6

Для випадків ХЛЛ із CD150⁻CD180⁻ фенотипом В-лімфоцитів медіана вмісту IL-10 в плазмі крові становила 57,24 пг/мл, тоді як для В-лімфоцитів, позитивних за обома дослідженими рецепторами аналогічний показник був у 2,2 рази вищим і складав 127,7 пг/мл. Однак, із-за великого розкиду показників в межах досліджуваної вибірки зразків, нами не було виявлено достовірної різниці між вмістом IL-10 в плазмі крові пацієнтів залежно від статусу експресії CD150 і CD180 на злоякісно трансформованих -лімфоцитах (табл. 5.5, рис.5.4, Б).

Таблиця 5.5

Вміст IL-6 та IL-10 в плазмі крові хворих на ХЛЛ з урахуванням статусу експресії CD150 та CD180 на В-лімфоцитах (ум.од.)

Цитокін	Показник	Фенотип злоякісно трансформованих В-лімфоцитів	
		CD150 ⁻ CD180 ⁻	CD150 ⁺ CD180 ⁺
IL-6	Мін – Макс	10,17 – 58,06	4,17 – 55,72
	Медіана	36,50	40,61
IL-10	Мін – Макс	1,17 – 73,79	3,31 – 205,70
	Медіана	57,24	127,7

Отже, у хворих на ХЛЛ відмічено достовірну різницю у концентрації IL-6 та IL-10 в плазмі крові хворих з переважанням вмісту IL-10. Разом з тим встановлено, що рівень вміст IL-6 в плазмі крові при ХЛЛ не залежить від статусу експресії CD150 і CD180 на плазматичній мембрані злоякісно

трансформованих В-лімфоцитів, а низький вміст IL-10 є характерним для хворих на ХЛЛ із CD150⁺CD180⁺ фенотипом В-лімфоцитів порівняно із CD150⁻CD180⁻.

Враховуючи, що активація CD150 та CD18 опосередковує зниження рівня експресії мРНК цитокінів IL-6 та IL-10 у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ *ex vivo*, ми вважали за доцільне з'ясувати чи впливає лігація CD150 та CD180 на рівень секреції IL-6 та IL-10. Для цього злоякісно трансформовані В-лімфоцити 7 хворих на ХЛЛ, у яких була детектована одночасна експресія CD150 та CD180 на плазматичній мембрані, культивували протягом 48 год із додаванням до середовища культивування клітин анти-CD150 та анти-CD180 МКАТ окремо і в комбінації. Після цього відбирали середовище культивування та оцінювали в ньому вміст білків IL-6 та IL-10 із використанням фірмових наборів “IL-6 (Human) ELISA Kit” та “IL-10 (Human) ELISA Kit” (ThermoFisher Scientific) згідно протоколу виробника. В якості контролю було використано середовище культивування злоякісно трансформованих В-лімфоцитів, які культивували без додаванням МКАТ за тих самих умов, що і В-лімфоцити, активовані за допомогою анти-CD150 та анти-CD180 МКАТ.

Нами не встановлено достовірної зміни в показниках вмісту IL-6 в середовищі культивування В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ за умов лігації CD150 або/та CD180 *ex vivo*. Заокрема, медіана вмісту IL-6 в середовищі культивування В-лімфоцитів за умов нарізної лігації CD150 або CD180 на В-лімфоцитах з використанням анти-CD150 або анти-CD180 МКАТ становила 78,50 пг/мл та 96,83 пг/мл відповідно. В результаті одночасної лігації CD150 та CD180 *ex vivo* медіанавмісту IL-6 в середовищі культивування В-лімфоцитів досягала 91,61 пг/мл (табл. 5.6).

Порівнюючи отримані результати із показниками медіани вмісту IL-6 в середовищі культивування В-лімфоцитів, рецептори CD150 та CD180 яких не були ліговані (95,17 пг/мл), можна зробити висновок, що CD150 або/та

CD180-опосередковані сигнальні шляхи не залучені до регуляції секреції IL-6 В-лімфоцитами при ХЛЛ (рис. 5.5, А).

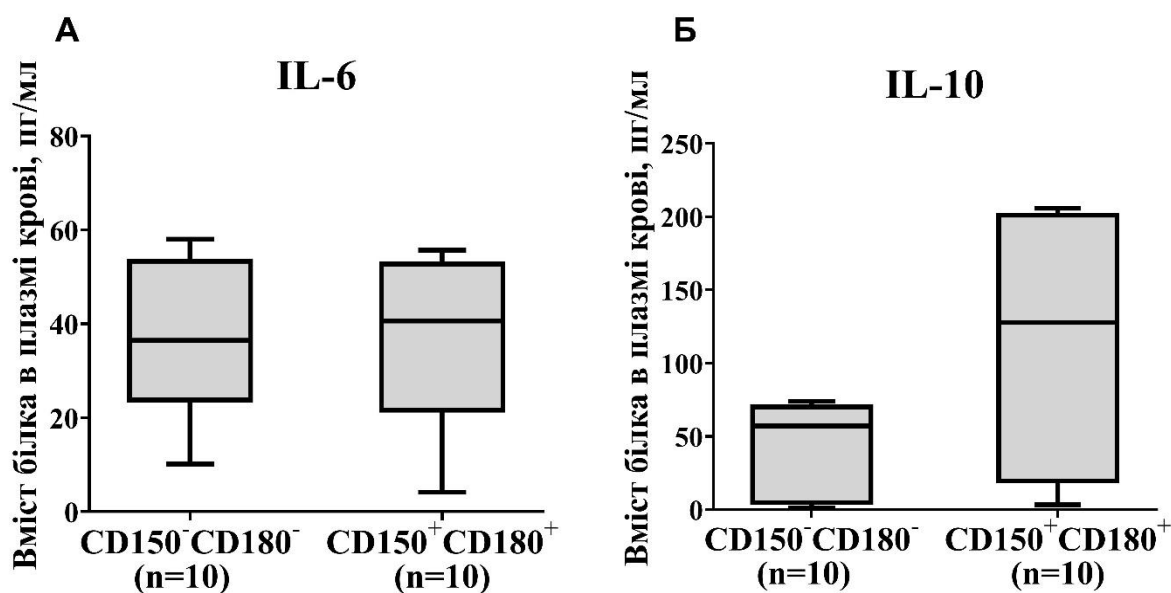


Рис.5.4 Вміст цитокінів IL-6 (А) та IL-10 (Б) в плазмі крові хворих на ХЛЛ залежно від статусу експресії CD150 та CD180 на В-лімфоцитах. Результати імуносорбентного сендвідж-метода ELISA.

Натомість, в результаті культивування злоякісно трансформованих В-лімфоцитів із додаванням до культурального середовища МКАТ проти CD150 та CD180 окремо або одночасно було встановлено достовірне ($p < 0,05$) зниження вмісту секретованого В-лімфоцитами IL-10 порівняно до такого, що спостерігається у середовищі культивування В-лімфоцитів, які культивували без додавання МКАТ (рис.5.5, Б). Зокрема, внаслідок нарізної лігації CD150 або CD180 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ *ex vivo*, медіани медіана вмісту IL-10 в середовищі культивування становила 175 пг/мл та 112,80 пг/мл відповідно, що є у 1,6 та 2,4 разу нижчим за такий в контрольному середовищі (275,50 пг/мл).

Одночасна лігація CD150 та CD180 на В-лімфоцитах призводила до зниження вмісту IL-10 в середовищі культивування злоякісно трансформованих В-лімфоцитів у 2,4 разу (117,70 пг/мл проти 275,50 пг/мл), що відповідає ефекту від лігації лише CD180 рецептора на В-лімфоцитах *ex vivo* (табл. 5.6).

Таблиця 5.6

**Вміст ІЛ-6 та ІЛ-10 в середовищі культивування В-лімфоцитів
хворих на ХЛЛ за умов лігації CD150 або/та CD180 *ex vivo* (пг/мл)**

Мішень лігації	Показник	Цитокін	
		ІЛ-6	ІЛ-10
Без лігації	Мін – Макс	30,39 – 254,80	167,80 – 400,70
	Медіана	95,17	275,50
CD150	Мін – Макс	36,28 – 304,20	98,55 – 243,80
	Медіана	78,50	175,00*
CD180	Мін – Макс	39,17 – 243,60	11,40 – 172,40
	Медіана	96,83	112,80*
CD150+CD180	Мін – Макс	66,61 – 279,30	23,79 – 242,80
	Медіана	91,61	117,70*

Примітка. *- $p < 0,05$ порівняно із відповідними показниками за умов відсутності лігації CD150 або/та CD180.

Отже, CD150 та CD180 є негативними регуляторами секреції ІЛ-10 злужісно трансформованими В-лімфоцитами при ХЛЛ, про що свідчить достовірне зниження його вмісту в середовищі культивування після лігації CD150 або/та CD180 на В-лімфоцитах *ex vivo*. Важливо відмітити, що отримана закономірність співпадає із результатами щодо CD150 та CD180-опосередкованої негативної регуляції рівня експресії мРНК ІЛ-10 в В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ. При цьому, не зважаючи на зниження рівня експресії мРНК ІЛ-6 в результаті лігації CD150 та CD180, індуковані через ці рецептори сигнальні шляхи не залучені до регуляції секреції ІЛ-6 В-лімфоцитами хворих на ХЛЛ.

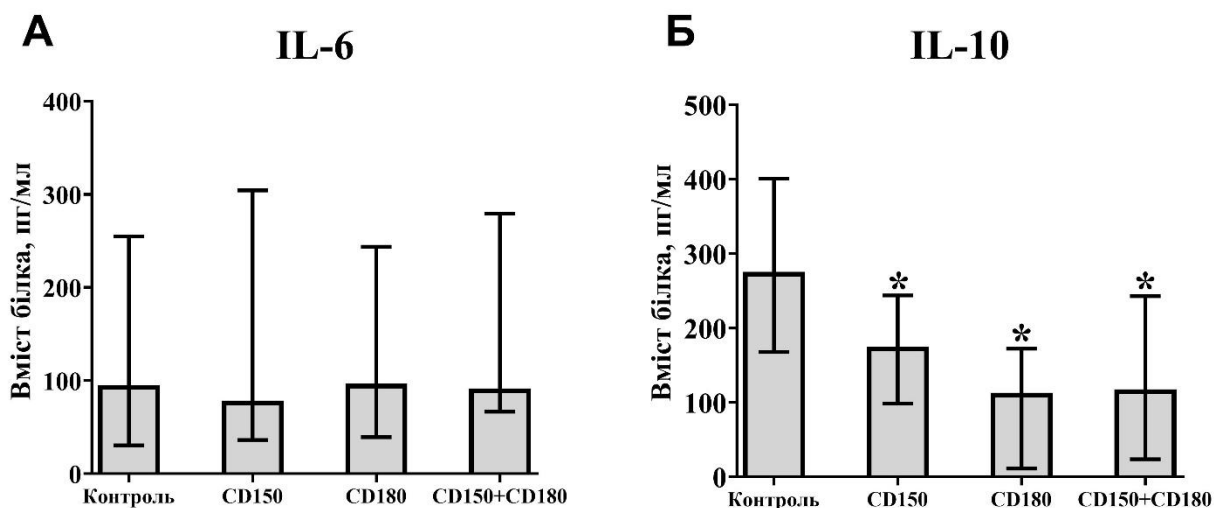


Рис.5.5 Вміст IL-6 (А) та IL-10 (Б) в середовищі культивування В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ за умов лігації CD150 або/та CD180 *ex vivo*. Результати імуносорбентного сендвідж-метода ELISA. *- $p < 0,005$ порівняно з групою контролю.

Підсумок. Наявність одночасної експресії CD150 та CD180 на плазматичній мембрані злоякісно трансформованих В-лімфоцитів асоційована із високим вмістом IL-10 в плазмі крові пацієнтів, порівняно із хворими, В-лімфоцити яких є негативні за експресією CD150 та CD180. Однак, за умов лігації CD150 та CD180 *ex vivo*, рівень секреції IL-10 В-лімфоцитами достовірно знижувався. Враховуючи CD150 та CD180-опосередковане зниження секреції IL-10 В-лімфоцитами хворих на ХЛЛ *ex vivo*, слід було очікувати нижчі показники вмісту IL-10 в плазмі крові саме у CD150⁺CD180⁺ випадках ХЛЛ, однак картина виявилась протилежною. Можливим поясненням цього феномену може бути вплив з боку ряду інших факторів локального мікрооточення, яких зазнають В-лімфоцити хворих на ХЛЛ *ex vivo*, але дана гіпотеза потребує подальшого вивчення.

Натомість, у випадках ХЛЛ із CD150⁻CD180⁻ фенотипом В-лімфоцитів, вмісту медіана вмісту IL-6 в плазмі крові відповідає такій у CD150⁺CD180⁺ випадках ХЛЛ, а лігація CD150 або/та CD180 *ex vivo* не впливає на секрецію IL-6 злоякісно трансформованими В-лімфоцитами.

На основі встановлених даних можна стверджувати, що CD150 та CD180 залучені до регуляції секреції IL-10 і не регулюють продукцію IL-6 злоякісно трансформованими В-лімфоцитами при ХЛЛ.

5.5. Зв'язок між чутливістю В-лімфоцитів хворих на хронічний лімфолейкоз до хіміопрепаратів та рівнем експресії мРНК цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10

Одним із факторів, який є вагомим при оцінці клінічної картини перебігу захворювання, є прогнозування чутливості злоякісно трансформованих клітин до дії застосованих хіміопрепаратів. Попередньо нами було встановлено, що чутливість В-лімфоцитів до дії хіміопрепаратів асоційована із особливостями їх імунофенотипу, зокрема із статусом експресії CD150 і CD180. В той же час, встановлено достовірну різницю в рівнях експресії мРНК CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 залежно від статусу експресії CD150 і CD180 на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах. Все вищеописане спонукало нас до перевірки гіпотези, чи існує залежність між чутливістю В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії хіміопрепаратів та рівнем експресії мРНК досліджуваних цитокінів. Крім того, було проаналізовано зв'язок між чутливістю клітин хворих на ХЛЛ до дії хіміопрепаратів з урахуванням вмісту IL-6 та IL-10 в плазмі крові цих пацієнтів.

Першочерговим завданням було проаналізувати зв'язок між рівнем чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до дії хіміопрепаратів *ex vivo* та рівнем експресії у них мРНК CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10.

Всі досліджувані випадки ХЛЛ було розподілено на групи із низьким ($M <$) та високим ($M >$) рівнем експресії мРНК цитокінів у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах з урахування медіани для всієї вибірки пацієнтів. Для CCL3 значення медіани рівня експресії мРНК становило 1,47 ум.од., CCL4 – 2,81 ум.од., IL-6 – 0,22 ум.од. та 1,08 ум.од. для IL-10 (табл. 5.7).

В ході виконання цього фрагменту дослідження нами було виявлено ряд достовірних відмінностей у показниках чутливості В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ за умов їх культивування у присутності ФЛ, ЦФ та БН *ex vivo* залежо від рівня експресії мРНК цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10.

Таблиця 5.7

Рівень експресії мРНК цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ

Показник	Рівень експресії мРНК, ум.од.			
	CCL3	CCL4	IL-6	IL-10
Мін – Макс	0,03 – 45,10	0,12 – 51,98	0,03 – 4,03	0,02 – 4,53
Медіана	1,47	2,81	0,22	1,08

Зокрема, за умов експресії мРНК CCL3 та CCL4 на рівні вище медіани ($M>$) В-лімфоцити є достовірно ($p<0,05$) більш чутливі до дії ФЛ, про що свідчить у 2,2 разу нижча медіана кількості життєздатних В-лімфоцитів ніж за умов низького ($M<$) рівня експресії – 73,88% vs 34,09% (табл. 5.8, рис. 5.6 А-Б).

В той же час, кількість життєздатних В-лімфоцитів після їх культивування у присутності ФЛ за умов високого ($M>$) рівня експресії IL-6/IL-10 навпаки є достовірно ($p<0,05$) більшою за таку, що спостерігається у випадках ХЛЛ із низьким ($M<$) рівнем експресії мРНК вищезазначених цитокінів (рис. 4.6 В-Г). Так, медіана кількості життєздатних клітин за умов низького ($M<$) або високого ($M>$) рівня експресії мРНК становлять 31,60% vs 65,93% для IL-6 та 34,09% vs 65,93% для IL-10 відповідно (табл. 5.8).

Нами не встановлено різницю у рівні чутливості злякано трансформованих В-лімфоцитів до цитотоксичної дії ЦФ *ex vivo* з урахування рівня експресії мРНК CCL3 або CCL4 (табл. 5.8). Натомість за умов експресії мРНК IL-6 та IL-10 нижче значення медіани чутливість клітин до дії ЦФ є у 2 та 1,6 разу достовірно ($p<0,05$) вище (рис. 5.6 Д-Е). Зокрема, медіана кількості життєздатних клітин у групі випадків ХЛЛ із низьким ($M<$) та

високим (М>) рівнем експресії мРНК IL-6/IL-10 становила 37,11% vs 73,95% та 40,15% vs 65,93% відповідно (табл. 5.8).

Таблиця 5.8

Чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії хіміопрепаратів *ex vivo* залежно від рівня експресії мРНК CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10

Рівень експресії мРНК	Показник	Кількість життєздатних клітин після культивування із хіміопрепаратом (%)		
		ФЛ	ЦФ	БН
1	2	3	4	5
CCL3, М<	Мін – Макс	46,29 – 77,67	29,63 – 82,19	62,91 – 92,71
	Медіана	73,88	73,42	80,40
CCL3, М>	Мін – Макс	9,57 – 49,39	17,11 – 83,54	1,41 – 46,69
	Медіана	34,09*	53,54	21,39*
CCL4, М<	Мін – Макс	46,22 – 77,67	29,63 – 82,19	46,69 – 92,71
	Медіана	73,88	62,80	80,40
CCL4, М>	Мін – Макс	9,57 – 49,39	17,11 – 83,54	1,41 – 62,91
	Медіана	34,09*	71,69	21,39*
IL-6, М<	Мін – Макс	9,57 – 46,29	17,11 – 73,42	1,41 – 80,40
	Медіана	31,60	37,11	35,56
IL-6, М>	Мін – Макс	34,09 – 77,67	69,97 – 83,54	15,37 – 92,71
	Медіана	65,93*	73,95*	54,68
IL-10, М<	Мін – Макс	9,74 – 46,29	9,57 – 48,46	1,41 – 62,91
	Медіана	34,09	40,15	21,39
IL-10, М>	Мін – Макс	31,60 – 77,67	31,60 – 77,67	40,46 – 92,71
	Медіана	65,93*	65,93*	80,40*

Примітка. ФЛ – флударабін, ЦФ – циклофосфамід, БН – бендамустин; М< - експресія на рівні нижче значення медіани, М> - експресія на рівні вище значення медіани; * – $p < 0,05$, порівняно із чутливістю В-лімфоцитів, що експресують мРНК досліджуваного цитокіну на рівні нижче значення медіани.

Достовірно ($p < 0,05$) вищий цитотоксичний ефект БН спостерігається по відношенню до В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ, в яких рівень експресії мРНК CCL3 та CCL4 був детектований на рівні вище медіани (рис. 5.6 Є-Ж).

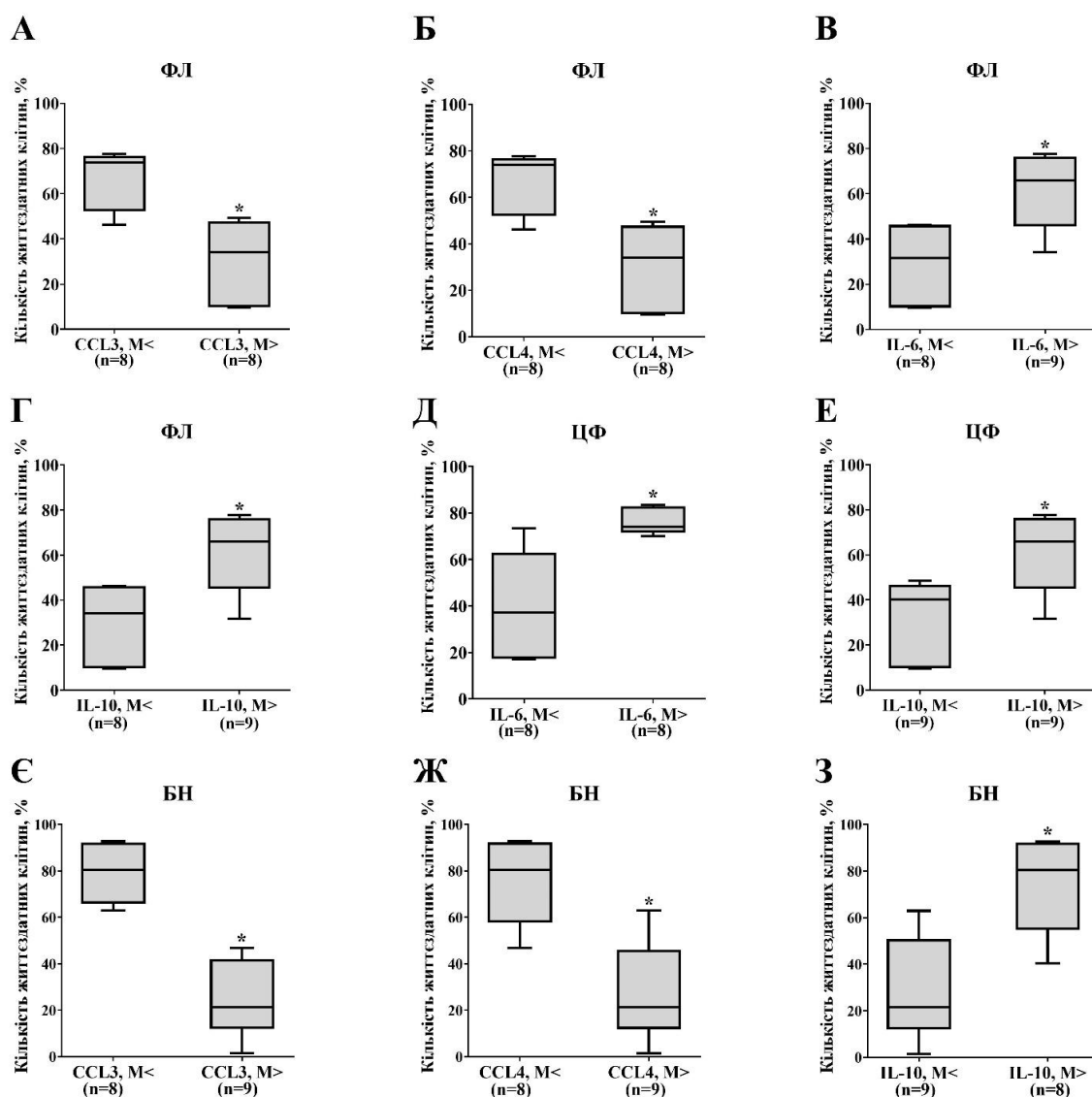


Рис. 5.6 Життєздатність В-лімфоцитів хворих на ХЛІ за умов дії флударабіну (А-Г), циклофосфаміду (Д-Е) та бендамустину (Є-З) *ex vivo* залежно від рівня експресії мРНК CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10. Результати резазуринового тесту, де відсоток редукції резазурину прямо пропорційний відсотку життєздатних клітин, ФЛ-флударабін, ЦФ – циклофосфамід, БН – бендамустин, * – $p < 0,05$.

Так, медіана кількості життєздатних клітин із високим (M>) та низьким (M<) рівнем експресії мРНК CCL3/CCL4 становив 80,40% vs 21,39% (табл. 4.8). Різниця в чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до цитотоксичної дії БН не залежить від рівня експресії мРНК IL-6 в клітинах, однак за умов низького (M<) рівня експресії мРНК IL-10 клітини є у 3,8 разу

достовірно ($p < 0,05$) більш чутливі до дії БН (21,39% vs 80,40% життєздатних клітин при високому ($M >$) рівні експресії мРНК IL-10) (рис. 5.6 З, табл. 5.8).

5.5.1. Чутливість В-лімфоцитів до дії хіміопрепаратів *ex vivo* з урахуванням вмісту IL-6 та IL-10 в плазмі крові хворих на хронічний лімфолейкоз

Кореляційний аналіз між ступенем чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до дії хіміопрепаратів *ex vivo* та вмістом цитокінів IL-6 та IL-10 у плазмі крові загальної вибірки хворих на ХЛЛ не виявив жодних достовірних зв'язків. Приймаючи до уваги широкий розкид у значеннях вмісту IL-6 та IL-10 в зразках плазми крові досліджених хворих, всі випадки ХЛЛ були розподілені на групи із високим та низьким вмістом IL-6 та IL-10 в плазмі крові відповідно до значення медіани, яка становила 40,61 пг/мл для IL-6 та 68,55 пг/мл для IL-10.

Нами не відмічено достовірної різниці у ступені чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до цитотоксичної дії ФЛ, ЦФ та БН залежно від вмісту IL-6 в плазмі крові хворих, оскільки різниця у медіанах кількості життєздатних В-лімфоцитів при різних за вмістом IL-6 в плазмі крові випадках ХЛЛ за умов дії ФЛ та БН *ex vivo* не перевищувала 10% (табл. 5.9).

За умов цитотоксичної дії ЦФ, медіана кількості життєздатних В-лімфоцитів була у 1,5 рази більшою за умов низького ($M <$) вмісту IL-6 в плазмі крові хворих порівняно до такого при випадках ХЛЛ із високим ($M >$) вмістом IL-6 в плазмі крові (69,16% vs 46,22%), однак різниця не була достовірною за рахунок широкого діапазону значень (табл. 5.9, рис.5.7).

За умов високого ($M >$) вмісту IL-10 в плазмі крові чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ була вищою по відношенню до дії всіх досліджуваних хіміопрепаратів порівняно із клітинами хворих з низьким ($M <$) вмістом IL-10 в плазмі крові (табл. 5.9).

Таблиця 5.9

Чутливість В-лімфоцитів при ХЛЛ до дії хіміопрепаратів *ex vivo* залежно від вмісту IL-6 та IL-10 у плазмі крові хворих на ХЛЛ (ум.од.)

Вміст цитокіну в плазмі крові	Показник	Кількість життєздатних клітин після культивування із хіміопрепаратом (%)		
		ФЛ	ЦФ	БН
IL-6, М<	Мін – Макс	9,82 – 99,12	17,11 – 83,54	9,46 – 80,40
	Медіана	80,37	46,22	25,52
IL-6, М>	Мін – Макс	9,57 – 98,01	17,60 – 94,71	1,41 – 92,71
	Медіана	83,28	69,16	34,13
IL-10, М<	Мін – Макс	31,60 – 99,12	21,19 – 79,05	15,37 - 80,40
	Медіана	83,28	64,90	36,08
IL-10, М>	Мін – Макс	9,57 – 96,36	17,11 – 83,54	18,33 - 92,71
	Медіана	63,54	29,63	25,59

Примітка. ФЛ – флударабін, ЦФ – циклофосфамід, БН – бендамустин; М< - вміст в плазмі на рівні нижче значення медіани, М> - вміст в плазмі на рівні вище значення медіани.

Зокрема, медіана кількості життєздатних В-лімфоцитів в групах хворих на ХЛЛ із низьким (М<) та високим (М>) вмістом IL-10 в плазмі крові була нижчою після їх культивування *ex vivo* у присутності ФЛ у 1,3 разу (83,28% vs 63,54%), ЦФ – у 2,2 разу (64,90% vs 29,63%) та у 1,5 разу (36,08% vs 25,59%) за умов впливу БН, проте дана закономірність не була достовірною (рис.5.7).

Не зважаючи на те, що збільшення рівня експресії IL-10 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ, а також рівня його секреції є ознакою несприятливого прогнозу перебігу пухлинного процесу [14], нами відмічено тенденцію до кращого цитотоксичного ефекту досліджених хіміопрепаратів *ex vivo* по відношенню до В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ саме за умов високо (М>) рівня IL-10 в плазмі крові. Слід зазначити, що отримана закономірність співставляється із високими показниками вмісту IL-10 в плазмі крові у групі CD150⁺CD180⁺ випадків ХЛЛ, а сам факт наявності експресії CD150 та

CD180 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів вказує на їх більшу чутливість до дії хіміопрепаратів *ex vivo*.

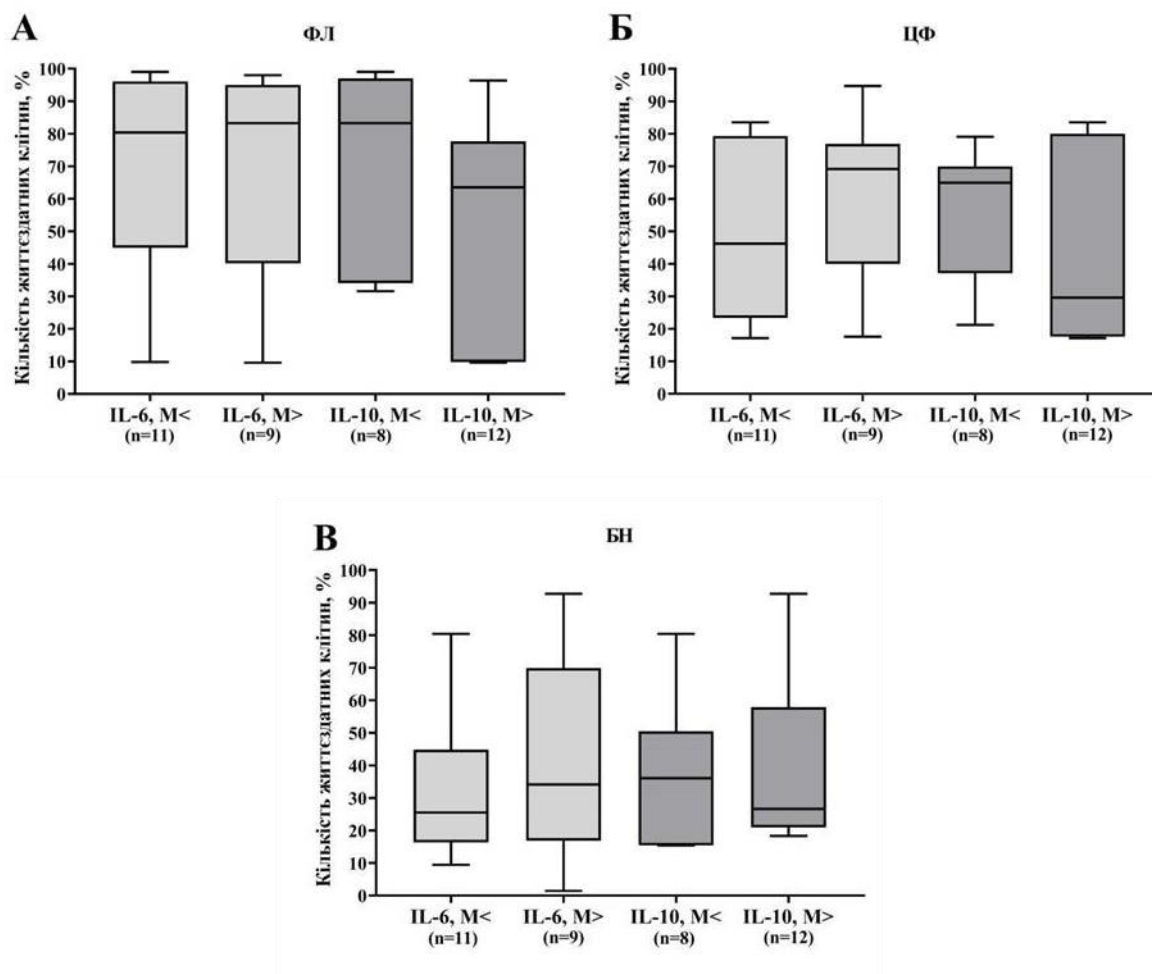


Рис.5.7 Життєздатність В-лімфоцитів за умов впливу флударабіну (А), циклофосфаміду (Б) та бендамустину (В) *ex vivo* залежно від вмісту цитокінів IL-6 та IL-10 у плазмі крові хворих на ХЛЛ. Результати резазуринового тесту, де відсоток редукції резазурина прямо пропорційний відсотку життєздатних клітин. ФЛ - флударабін, ЦФ – циклофосфамід, БН-бендамустин. М< - вміст на рівні нижче значення медіани, М> - вміст на рівні вище значення медіани.

Підсумок. В результаті вивчення залежності між показниками експресії мРНК CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10, вмісту даних цитокінів в плазмі крові і чутливістю злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії таких хіміопрепаратів як ФЛ, ЦФ та БН, виявлено ряд закономірностей. Зокрема, встановлено, що високий (М>) рівень експресії мРНК CCL3/CCL4 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ вказує на їх високий ступінь чутливості до

цитотоксичної дії ФЛ та БН *ex vivo* та не асоціюється із чутливістю до ЦФ. Разом з тим, достовірно більший рівень чутливості В-лімфоцитів до дії ФЛ, ЦФ та БН встановлений за умов низької експресії мРНК IL-10. Низький рівень експресії мРНК IL-6 також асоціюється із високою чутливістю злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до дії ФЛ або ЦФ. Вміст цитокінів IL-6 та IL-10 в плазмі крові хворих на ХЛЛ не корелює зі ступенем чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до цитотоксичної дії ФЛ, ЦФ та БН.

Результати, описані в розділі 4 опубліковані у [189].

РОЗДІЛ 6

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Клінічна картина перебігу ХЛЛ є вкрай гетерогенною за рахунок широкого спектру молекулярно-генотипових характеристик злоякісно трансформованих В-лімфоцитів, що ускладнює процес діагностики, прогнозування характеру перебігу захворювання та вибору оптимальної тактики лікування. Слід відмітити, що в останні десятиліття розуміння біології ХЛЛ значно розширилось за рахунок дослідження можливих механізмів злоякісної трансформації В-лімфоцитів та ідентифікації прогностичних маркерів, асоційованих з перебігом пухлинного процесу [1, 38]. Однак, не зважаючи на великий масив даних щодо маркерів прогнозу перебігу ХЛЛ, для розподілу пацієнтів на групи ризику і вибору відповідних стратегій лікування на сьогодні враховується невелика кількість показників, а саме мутований статус генів *IGHV* та наявність делецій в 17 хросомосомі або/та мутацій в гені *TP53* [6].

Розвиток сучасної медицини набуває все більш персоналізованого характеру та вимагає розширення і вдосконалення підходів до лікування з урахуванням молекулярного профілю злоякісно трансформованих В-лімфоцитів кожного конкретного пацієнта, з метою оптимізації алгоритму вибору найбільш ефективної схеми терапії з одночасною мінімізацією її побічних проявів. Дослідження останніх років, спрямовані на аналіз молекулярно-генетичних особливостей злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ, виявили низку маркерів, що диференційно експресовані серед випадків ХЛЛ і які мають зв'язок із прогнозом перебігу даного захворювання. Закономірним продовженням відкриття нових прогностичних маркерів перебігу ХЛЛ став стрімкий розвиток ланки таргетної терапії [8, 190].

Зокрема, серед останніх розробок було запропоновано декілька МКАТ проти CD37, що, на відміну від CD20, МКАТ проти якого з аналогічним принципом дії активно використовуються в лікуванні ХЛЛ сьогодні,

експресується на високому рівні при ХЛЛ [191]. Інтерес дослідників до даного рецептора обумовлений одночасною наявністю в його цитоплазматичному хвості ITIM та ITAM сигнальних мотивів та факт виявленої активації апоптозу В-лімфоцитів за умов лігації CD37 [192]. В деяких випадках ХЛЛ спостерігається Mcl-1-залежна резистентність до хіміопрепарату венетоклакс, дія якого спрямована на блокування анти-апоптотичного білка Bcl-2, що в подальшому призвело до пошуків селективних інгібіторів Mcl-1 [190]. Багатообіцяючим є використання препарату CUDC-907, механізм дії якого реалізується через його інгібуючий вплив по відношенню до широкого діапазону сигнальних шляхів, які сприяють виживаності В-лімфоцитів шляхом блокування активації PI3K/Akt, MAPK та STAT3 сигнальних шляхів, інгібування рівня експресії білків родини Bcl-2 та цитокінів BAFF і APRIL тощо [193].

Натомість перелік наукових досліджень, спрямованих на відкриття предиктивних маркерів чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ, асоційованих з чутливістю до хіміопрепаратів є вкрай обмеженим. Найбільш багатообіцяючими кандидатами на роль зазначених предиктивних маркерів є поверхневі рецептори, оскільки по-перше, їх диференційний характер експресії відображає фенотип злоякісно трансформованих В-лімфоцитів та визначає їх функціональну активність, яка тісно пов'язана із характером відповіді патологічних клітин на дію хіміопрепаратів. По-друге, включення декількох поверхневих маркерів, інформація про характер експресії яких несе предиктивну складову, в стандартну панель імунофенотипової діагностики ХЛЛ не призведе до значних часових та фінансових затрат, однак значно підвищить результативність обстеження [194].

Потрібно зазначити, що до сьогодні вже проводились дослідження, присвячені пошуку предиктивних маркерів чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії хіміопрепаратів серед поверхневих рецепторів, але їх коло є вкрай обмеженим. Зокрема, наразі

відомо лише, що за умов високого рівня експресії CD38 або CD69 на плазматичній мембрані злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ спостерігається їх резистентність до цитотоксичної дії БН [116, 117]. Однак, щодо інших хіміопрепаратів, які є складовими ключових схем поліхіміотерапії для лікування первинних хворих на ХЛЛ, то такі данні відсутні.

Саме тому пошук ймовірних предиктивних маркерів чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до дії хіміопрепаратів серед рецепторів, які диференційно експресовані на плазматичній мембрані злоякісно трансформованих В-лімфоцитів, стало метою даного дослідження.

В ході проведення досліджень нами вперше було виявлено ряд достовірних зв'язків між рівнем експресії CD5, CD20, CD37, CD38, CD40, CD150 та CD180 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ та чутливістю цих клітин до цитотоксичної дії БН, ФЛ та ЦФ *ex vivo*. Зокрема, чутливість злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до цитотоксичної дії БН є достовірно вищою за умов експресії CD5^{M>} у 1,8 разу порівняно із CD5^{M<}; CD37^{M<} і CD40^{M<} у 2,2 разу порівняно із CD37^{M>} і CD40^{M>}; CD38⁻ у 1,5 разу порівняно із CD38⁺ (рис. 3.5, А-Г, табл. 3.3). Натомість достовірно кращий цитотоксичний ефект ЦФ у монорежимі (у 1,3 разу) спостерігається по відношенню до В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ у випадку експресії CD5 та CD20 на їх плазматичній мембрані на рівні вище за значення медіани (рис. 3.5, Д-Е, табл. 3.3). Чутливість злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до дії ФЛ у монорежимі за умов одночасної експресії CD150 та CD180 є у 1,7 разу вищою порівняно із В-лімфоцитами хворих на ХЛЛ, експресія CD150 та CD180 на плазматичній мембрані яких не була виявлена. Проте, за умов комбінованого впливу ФЛ із ЦФ на В-лімфоцити хворих на ХЛЛ відмічено достовірно кращу їх чутливість за умов експресії CD150, CD180 на плазматичній мембрані, а також за умов їх коекспресії – у 1,9, 2,2 та 4,4 разу порівняно із CD150⁻/CD180⁻ та CD150⁺CD180⁺ клітинами (рис. 4.1, табл. 4.1).

Який же можливий зв'язок між статусом експресії рецепторів на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ та чутливістю клітин до цитотоксичної дії хіміопрепаратів, які за механізмом своєї дії є класичними цитостатиками?

Принцип дії цитостатичних хіміопрепаратів полягає у пошкодженні структури ДНК, в результаті чого дуже часто утворюються дволанцюгові розриви та, як наслідок, активується програма апоптозу. Ступінь прояву цитотоксичності цих препаратів по відношенню до злоякісно трансформованої клітини залежить від стану систем репарації ДНК. Одними із основних координаторів механізмів репарації дволанцюгових розривів є кіназа АТМ та каталітична субодиниця ДНК-залежної протеїн кінази (DNA-PKcs), що активують процеси відновлення цілісності ДНК шляхом гомологічної рекомбінації або за механізмом негомологічного з'єднання кінців, відповідно [195, 196].

Гетерогенність відповіді хворих на ХЛЛ після застосування цитостатичних хіміопрепаратів може бути обумовлено різним станом систем репарації ДНК, що спостерігається при даній нозології. Зокрема, однією з ключових генетичних аберацій, які діагностують у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах, є делеція в 11 хромосомі у зоні розташування гена серин/треонінової кінази *АТМ* [88]. Показано, що результатом дії ФЛ та ЦФ у монорежимі на злоякісно трансформовані В-лімфоцити хворих на ХЛЛ є фосфорилювання гістона H2AX, що є прямим свідченням утворення дволанцюгових розривів у ДНК в результаті дії цих препаратів. Крім того, через 24 год інкубації В-лімфоцитів із del(11q22-q23) у присутності ФЛ або ЦФ спостерігається значне зниження рівня фосфорилювання білка-мішені АТМ кінази p53 у разі мутації в одній із алелей гена *АТМ* та повна відсутність p53 у випадку інактивуючої мутації обох алелей гена *АТМ* в результаті делеції в 11 хромосомі [197].

Поява дволанцюгових розривів в структурі ДНК у результаті дії цитостатиків є схожою до механізму дії іонізуючого радіаційного

випромінювання, до якого, як виявилось, також спостерігається резистентність серед окремої вибірки злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ. Встановлено, що у резистентних до іонізуючого випромінювання випадках ХЛЛ, активність механізму репарації дволанцюгових розривів у ДНК шляхом негомологічного з'єднання кінців у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах є значно вищою порівняно із чутливими випадками [198]. Крім того, результатом застосування препаратів, направлених на інгібування DNA-PKcs, які блокують процес її фосфорилування, є зниження показників репарацій ДНК шляхом негомологічного з'єднання кінців, наслідком чого є відновлення чутливості В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії іонізуючого випромінювання.

Як АТМ кіназа, так і DNA-PKcs, належить до групи фосфотидилінозитол-3 споріднених кіназ (PIKKs), які за будовою каталітичного домену та спектром виконуваних ними функцій є дуже подібними до фосфотидилінозитол-3 кінази PI3K [199]. У нормальних В-лімфоцитах, а також при їх злоякісній трансформації, PI3K є ключовим регулятором сигналів від BCR, CD19, CD40, рецепторів цитокінів CXCR4/CD184, CXCR5/CD184, рецептора IL-6 тощо. Активація PI3K призводить до фосфорилування її ключової мішені –Akt кінази, яка надалі залучена у позитивній регуляції ряду сигнальних шляхів, що координують процеси проходження клітинного циклу, запуску програми апоптозу, активність метаболічних шляхів та в цілому сприяють виживаності клітин [200].

Враховуючи, що саме Akt кіназа є ключовим регулятором активації процесу апоптозу в результаті виникнення розривів в ланцюзі ДНК, можна припустити, що чутливість злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ залежить певною мірою від рівня фосфорилування Akt кінази, що, в свою чергу, регулюється станом сигнальних мереж у В-лімфоцитах (рис.6.1). Трансдукція CD37-, CD38- та CD40-опосередкованих сигналів у В-лімфоцитах також відбувається за рахунок активації PI3K кінази,

результатом дії якої є фосфорилювання Akt кінрази та подальша активація Akt-залежних сигнальних шляхів [192, 201]. Натомість активація CD5 призводить до негативної регуляції PI3K-опосередкованих сигнальних шляхів у В-лімфоцитах шляхом зв'язування адапторного білка SHP-1 із CD5, який є інгібітором ВКР-опосередкованої активації PI3K [202]. У випадку CD150 та CD180, нами попередньо було встановлено, що одночасна лігація названих рецепторів на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах призводить до зниження рівня фосфорилювання Akt кінрази та, відповідно, інгібування Akt-залежних сигнальних шляхів [184].

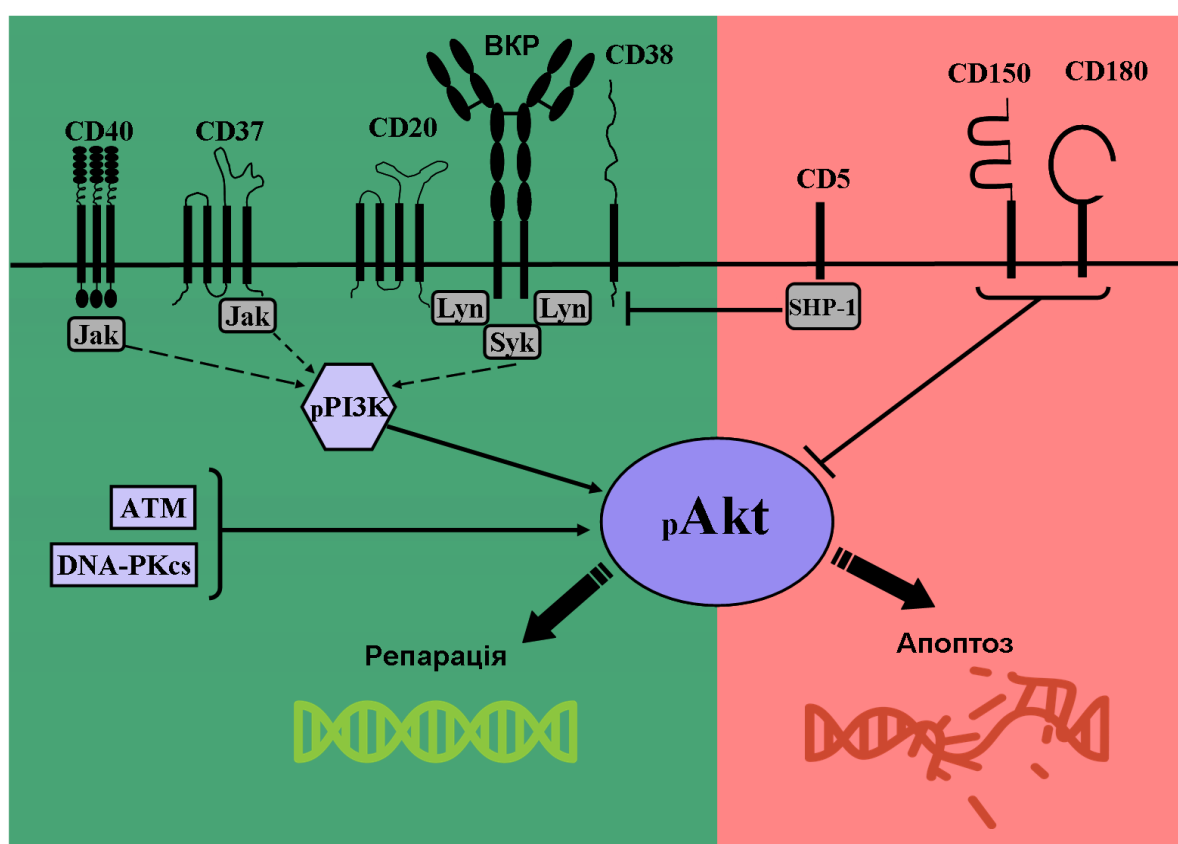


Рис. 6.1 Механізми, залучені до регуляції відповіді злоякісно трансформованих В-ліфоцитів на дію ДНК-пошкоджуючих агентів.

Таким чином, враховуючи, що сигнальні шляхи, опосередковані активацією CD37, CD38 та CD40, призводять до активації Akt кінрази у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах, логічно припустити, що за умов низького рівня названих рецепторів спостерігається відмічена нами вища чутливість В-лімфоцитів до цитостатичних препаратів, що опосередковано інгібуванням основного координатора процесів репарації ДНК у відповідь на

дію цитостатиків. Натомість, за умов високо рівня експресії інгібіторів активації PI3K-Akt сигнального шляху у В-лімфоцитах, а саме CD5, CD150 та CD180, чутливість клітин до дії цитостатиків є вищою порівняно до такої за умов низького рівня експресії вищеперерахованих рецепторів на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ.

В роботі Bologna (2016 р.) показано, що сигнальний шлях, індукований активацією CD150, сприяє процесам аутофагії В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ, що опосередковувало зростання їх чутливості до цитотоксичної дії ФЛ. Однак, не зважаючи на виявлену нами закономірність щодо більш високої чутливості В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичної дії ФЛ або комбінованого впливу ФЛ із ЦФ у випадку високого рівня експресії CD150 та CD180 (рис.4.1), одночасна активація CD150 та CD180, навпаки, призводила до зниження чутливості В-лімфоцитів до дії ФЛ (рис. 4.2, А).

Для CD150 характерна експресія декількох ізоформ із потенційно різними сигнальними властивостями, рівень експресії яких є гетерогенним серед випадків ХЛЛ, що можливо може обумовлювати різну чутливість злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до дії ФЛ. Проаналізувавши показники чутливості В-лімфоцитів до дії ФЛ з урахуванням рівня експресії мРНК окремих ізоформ CD150, вища чутливість В-лімфоцитів до дії ФЛ є асоційованою із високим (>M) рівнем експресії мРНК mCD150 ізоформи та низьким (<M) рівнем експресії мРНК nCD150 (рис. 4.4, А-Б), що потенційно може бути поясненням отриманої різниці в чутливості В-лімфоцитів до дії ФЛ після стимуляції CD150 та CD180, однак гіпотеза потребує подальшого дослідження.

Слід також відмітити, що, незважаючи на відсутність різниці в чутливості В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії БН з урахуванням статусу експресії CD150 або/та CD180, сумісна лігація названих рецепторів призводить до достовірного збільшення чутливості клітин до БН (рис. 4.2, В). Крім того, домінуюча роль в індукції чутливості В-лімфоцитів до дії БН

належить саме CD180, адже внаслідок поодинокі лігації CD180 чутливість В-лімфоцитів до дії БН є на рівні комбінованого впливу CD150 та CD180.

Для лікування хворих на ХЛЛ зазвичай використовується полікомпонентна схема із застосуванням цитостатичних препаратів разом із МКАТ проти CD20 – ритуксімабом [8]. Саме тому рівень експресії даного рецептора є важливим при прогнозуванні відповіді хворих на лікування. Варто зазначити, що при ХЛЛ спостерігається зниження рівня експресії CD20 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів, що стоїть на заваді високої ефективності дії ритуксімаба у значної частини хворих на ХЛЛ [185, 186]. В даній роботі вперше виявлено, що активація CD150 та CD180 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ *ex vivo* призводить до значного зростання рівня експресії CD20 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів, що потенційно може обумовлювати кращу чутливість хворих на застосування хіміопрепарату ритуксамаб (рис. 4.5). Враховуючи попередньо отримані дані щодо позитивної регуляції рівня експресії ТФ PU.1, що позитивно регулює рівень експресії CD20, у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ за умов одночасної лігації CD150 та CD180 [187], нами була висунута гіпотеза, що виявлене зростання рівня експресії CD20 внаслідок лігації CD150 та CD180 відбувається саме через PU.1-опосередкований сигнальний шлях.

Прогресія ХЛЛ значною мірою обумовлена впливом позаклітинних сигналів, які отримують злоякісно трансформовані В-лімфоцити в межах мікрооточення [14]. При цьому потрібно зазначити, що наявність контакту В-лімфоцитів із елементами мікрооточення не лише опосередковує активацію сигнальних шляхів, що сприяють прогресії захворювання, а й забезпечують підтримку життєздатності злоякісно трансформованих клітин. Свідченням цього є факт спонтанного апоптозу, якого зазнають В-лімфоцити хворих на ХЛЛ у випадку їх культивування у відсутності елементів стромы лімфатичного вузла [145, 146].

Злоякісно трансформовані В-лімфоцити є не лише пасивними мішеннями впливу стимуляторних факторів мікрооточення, а й здатні до активної секреції цитокінів з метою подальшої аутокринної стимуляції. Серед ключових цитокінів, що секретуються В-лімфоцитами та вміст яких в плазмі крові хворих на ХЛЛ має прогностичне значення, належать CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10. Враховуючи, що високі показники вмісту CCL3/CCL4 в плазмі крові корелюють із агресивною клінічною картиною перебігу ХЛЛ та несприятливим прогнозом для пацієнтів [12], а підвищений рівень секреції IL-6/IL-10 до того ж сприяє розвитку стану загальної імуносупресії [13, 15], пошук можливих механізмів регуляції рівня секреції вищеперерахованих цитокінів має вагоме значення.

Аналіз базального рівня експресії мРНК CCL3, CCL4 виявив значно вищі показники у групі хворих на ХЛЛ, В-лімфоцити яких характеризувались наявністю експресії CD150 та CD180 на плазматичній мембрані клітин (рис. 5.1, А-Б). Відомо, що регуляція рівня секреції CCL3/CCL4 В-лімфоцитами відбувається через ВКР-опосередкований сигнальний шлях [141], що підтверджено значним зниженням рівня секреції CCL3/CCL4 в результаті культивування В-лімфоцитів із селективним інгібітором кінази Syk, яка залучена на перших етапах трансдукції сигналу у відповідь на активацію ВКР [54]. Враховуючи, що одночасна лігація CD150 та CD180 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ безпосередньо призводить до блокування Akt та MAPK сигнальних шляхів, які належать до переліку основних координаторів передачі сигналів, опосередкованих активацією ВКР [141, 184], нами було висунуто гіпотезу щодо можливого залучення CD150 та CD180 до негативної регуляції рівня експресії CCL3/CCL4 В-лімфоцитами хворих на ХЛЛ. Однак, в результаті проведеної лігації з використання анти-CD150 та анти-CD180 МКАТ, не було встановлено достовірних змін в показниках експресії мРНК CCL3/CCL4 як за умов поодинокую активації CD150 або CD180, так і комплексно (рис. 5.2, А-Б). Ймовірною причиною відсутності змін в експресії CCL3/CCL4 у відповідь на активацію CD150 або CD180-опосередкованих

сигнальних шляхів може бути необхідність залучення додаткових костимуляторних сигналів, однак для спростування або підтвердження цього необхідним є подальше дослідження стану сигнальних мереж у злякисно трансформованих В-лімфоцитах.

На відміну від CCL3/CCL4, CD150⁺, CD180⁺ В-лімфоцити хворих на ХЛЛ характеризуються достовірно більш високою експресією IL-6 та IL-10 як на рівні мРНК, так і на білковому рівні, порівняно із відповідними показниками у CD150⁻, CD180⁻ випадках ХЛЛ (рис. 5.1, В-Г, рис. 5.3, Б-В). Крім того, в результаті культивування злякисно трансформованих В-лімфоцитів у присутності МКАТ проти CD150 та CD180 окремо і в комбінації, нами вперше встановлено факт достовірного зниження рівня експресії мРНК IL-6 та IL-10 (рис. 5.2, В-Г), що у випадку IL-10 також простежується і на рівні секреції IL-10 цими клітинами (рис. 5.5, Б).

Враховуючи те, що CD150 та CD180 залучені до негативної регуляції рівня експресії мРНК IL-6 та IL-10 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ, а у випадку IL-10 ще і на рівень його секреції, виникає питання про можливі механізми даного явища.

Завдяки здатності злякисно трансформованих В-лімфоцитів до активної секреції IL-10, їх дуже часто прирівнюють до популяції регуляторних В10-лімфоцитів, для яких характерним є високий рівень секреції IL-10 з метою модуляції запальних та аутоімунних реакцій, на основі їх функціональної схожості [13, 203]. Відомо, що рівень експресії ТФ Blimp1, XBp1 та IRF4, які позитивно регулюють рівень експресії IL-10, є високим у В10-лімфоцитах, в той час експресія негативних регуляторів IL-10, а саме ТФ PAX5 і BCL6, детектується на дуже низькому рівні [204, 205]. У попередніх роботах нами було показано, що лігація CD150 або/та CD180 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ безпосередньо призводить до зниження рівня експресії мРНК ТФ IRF4. Натомість, рівень експресії мРНК ТФ BCL6 в результаті лігації вищезазначених рецепторів достовірно зростає [187]. Отже, з великою долею ймовірності можна припустити, що CD150- та CD180-опосередковане

зниження рівня експресії та секреції IL-10 В-лімфоцитами хворих на ХЛЛ відбувається через активацію ТФ BCL6 з одночасним інгібуванням ТФ IRF4 (рис. 6.2).

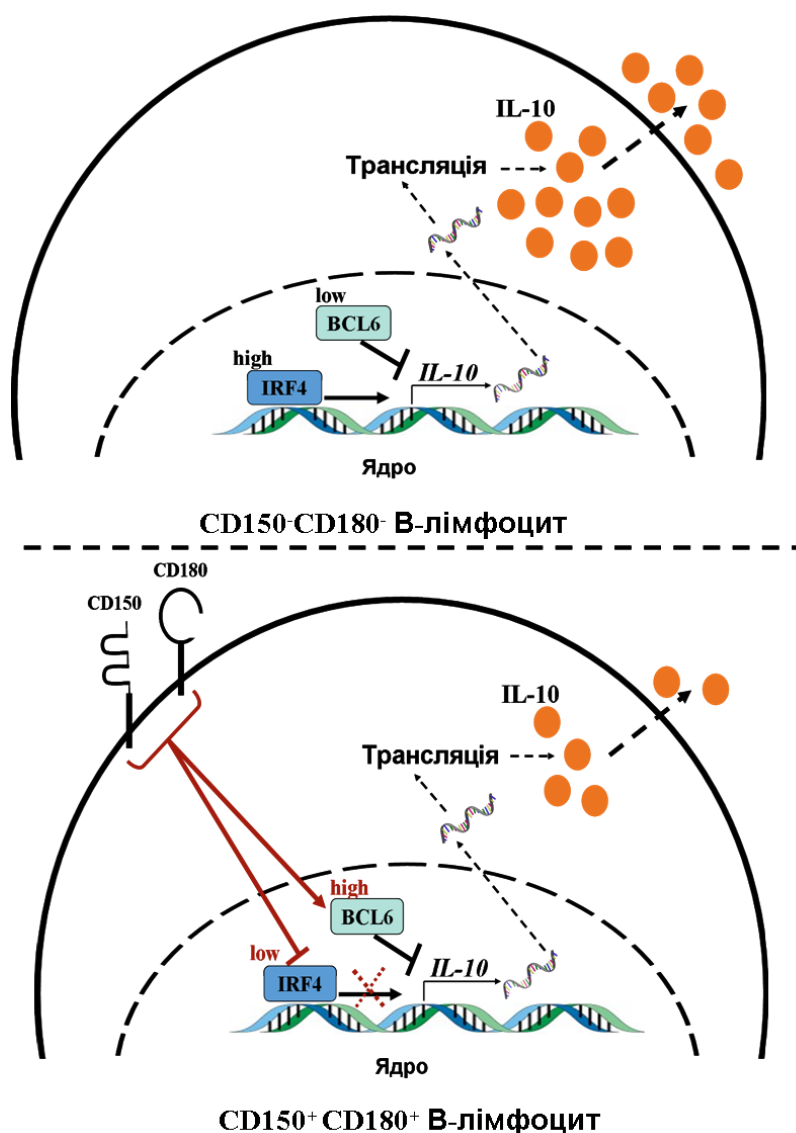


Рис. 6.2 CD150 та CD180-опосередкована регуляція рівня експресії мРНК та секреції IL-10 у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ.

Однією із мішеней впливу кінрази Akt є NF-κB сигнальний шлях, активація якого відбувається в результаті Akt-залежного фосфорилування інгібітора NF-κB – IκBα [206]. Приймаючи до уваги, що ген *IL-6* належить до переліку мішеней впливу NF-κB та факт негативної регуляції Akt шляхом активації CD150 та CD180, відмічене нами зниження рівня експресії мРНК IL-6 в результаті лігації вищезазначених рецепторів може бути частково

обумовлене інгібуванням NF- κ B сигнального шляху в клітинах [184, 207]. Однак для підтвердження/спростування даної гіпотези необхідне подальше дослідження змін в NF- κ B сигнальному шляху у відповідь на активацію CD150 або/та CD180 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ.

Виявлений нами факт CD150 та CD180 негативної регуляції рівня експресії В-лімфоцитами цитокінів, які вважають маркерами несприятливого прогнозу перебігу ХЛЛ, а також наявність зв'язку між статусом експресії названих рецепторів на плазматичній мембрані В-лімфоцитів та їх чутливістю до хіміопрепаратів, доцільним було порівняти життєздатність В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ за умов дії хіміопрепаратів з урахуванням рівня експресії мРНК CCL3/CCL4 та IL-6/IL-10.

Не зважаючи на те, що підвищений вміст цитокінів CCL3/CCL4 у плазмі крові хворих на ХЛЛ є фактором несприятливого прогнозу, у випадку експресії мРНК CCL3^{M>}/CCL4^{M>} злоякісно трансформовані В-лімфоцити характеризуються високим ступенем чутливості до цитотоксичної дії ФЛ та БН *ex vivo* (рис. 5.6 А, Б, Є, Ж). При цьому важливо відмітити ряд фактів: значно вищі показники рівня експресії мРНК CCL3/CCL4 є характерними саме для CD150⁺CD180⁺ В-лімфоцитів (рис.5.1, А-Б); виключно у випадку одночасної наявності CD150 та CD180 життєздатність В-лімфоцитів за умов дії ФЛ є низькою (рис. 4.1); одночасна лігація CD150 та CD180 призводить до значного зростання чутливості В-лімфоцитів до дії БН *ex vivo* (рис. 4.2, В). Враховуючи вищеописане, можна припустити про існування зв'язку між статусом експресії CD150 та CD180, рівнем експресії мРНК CCL3/CCL4 та чутливістю В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до ФЛ та БН. Однак, зважаючи на те, що нами не було виявлено факт безпосередньої регуляції рівня експресії мРНК CCL3/CCL4 через CD150 та CD180-опосередковані сигнальні шляхи, необхідним є подальший пошук можливих коstimуляторних механізмів.

Нами виявлена висока чутливість злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до дії ФЛ, а також ЦФ за умов експресії мРНК IL-6^{M<} (рис. 5.6. В, Д). Слід зазначити, що за наявності експресії CD150 або/та CD180 на В-

лімфоцитах хворих на ХЛЛ спостерігається їх висока чутливість до комбінованого впливу ФЛ із ЦФ (рис. 4.1). Разом з тим, низька експресія IL-6 на рівні мРНК, а також на білковому рівні у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах асоційована із CD150⁺CD180⁺ фенотипом (рис. 5.1, В, рис. 5.3, Б). Приймаючи до уваги CD150/CD180-опосередковане інгібування рівня експресії мРНК IL-6, можна припустити про залучення CD150 та CD180 до регуляції чутливості В-лімфоцитів до дії ФЛ та ЦФ через вплив на експресію IL-6.

У випадку аналізу чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до дії ФЛ, ЦФ та БН *ex vivo* з урахуванням рівня експресії мРНК IL-10 нами встановлено достовірно вищий цитотоксичний ефект в результаті дії всіх досліджуваних хіміопрепаратів за умов експресії мРНК IL-10^{M<} (рис. 5.6, Г, Е, З), що робить його універсальним предиктивним маркером.

Таким чином, отримані під час проведення дослідження дані вказують на існування зв'язку між ступенем чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ та маркерами, що визначають фенотипові характеристики цих клітин. Враховуючи вищенаведене, нами було запропоновано можливий варіант алгоритму більш оптимального підбору цитостатиків у тих випадках, коли на основі прийнятої на сьогодні схеми стадіювання, прогнозування та лікування хворих на ХЛЛ пацієнтам рекомендовано призначати поліхіміотерапію на основі ФЛ із ЦФ або БН-вмісню (рис.6.3).

Зазначимо, що у випадку початкових стадій розвитку ХЛЛ (А/В за Banet), а також за умов відсутності клінічних симптомів у хворих, необхідно забезпечити проведення постійного моніторингу стану захворювання без проведення курсів хіміотерапії. У разі маніфестації симптомів захворювання або ж діагностування ознак пізніх стадій розвитку ХЛЛ (С за Binet), необхідним є провадження медикаментозного лікування [8, 181].

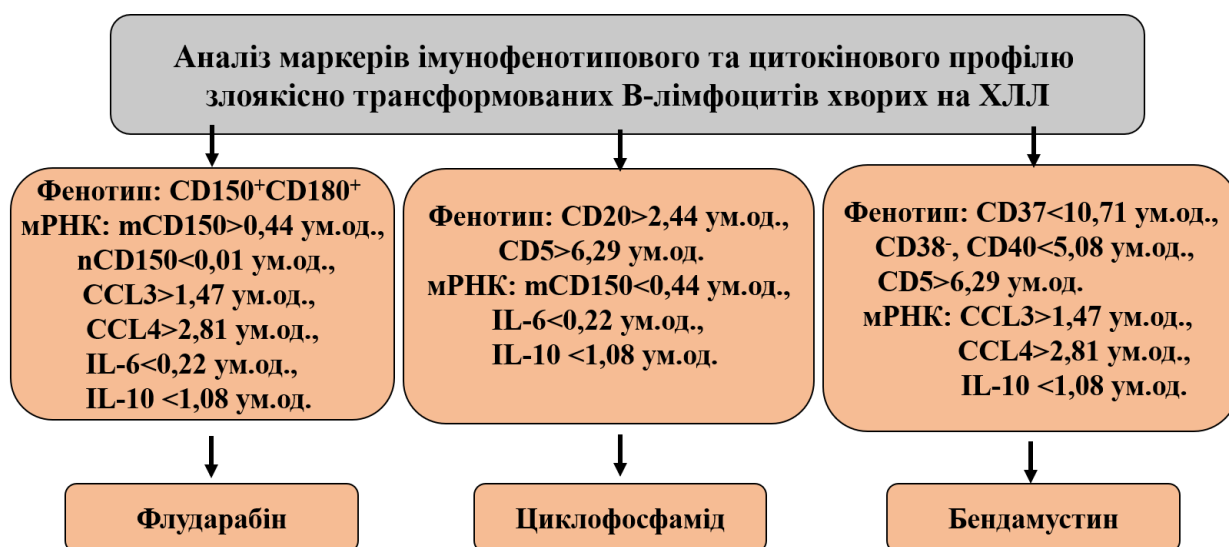


Рис. 6.3 Алгоритм оптимального підбору компонентів схем хіміотерапії для лікування первинних хворих на ХЛЛ з урахуванням індивідуальних характеристик В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ

У разі відсутності експресії CD38 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ, а також за низьких (М<) показників рівня експресії CD37 та CD40 але високих (М>) CD5, застосування БН є більш ефективним. Також при прогнозуванні чутливості В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії БН доцільно враховувати рівень експресії мРНК цитокінів. Зокрема, за умов високого (М>) рівня експресії мРНК CCL3, CCL4 та низького (М<) рівня експресії мРНК IL-10 кількість життєздатних В-лімфоцитів після їх культивування у присутності БН *ex vivo* є достовірно нижчою. У випадку високого (М>) рівня експресії CD5, CD20 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів та низького (М<) рівня експресії мРНК ізоформи mCD150 та мРНК IL-6 та IL-10, більш доречним є застосування ЦФ. У випадку ж CD150⁺CD180⁺ фенотипу В-лімфоцитів, високого (М>) рівня експресії мРНК ізоформи mCD150, CCL3, CCL4 і низького (М<) – ізоформи nCD150, IL-6 та IL-10 рекомендованим є вибір ФЛ для лікування хворих на ХЛЛ через більш високі показники ефективності його цитотоксичної дії.

Отже, чутливість злужісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичної дії компонентів схем поліхіміотерапії є гетерогенною

в залежності від їх молекулярно-фенотипових характеристик. Результати проведеного дослідження є вагомими аргументами щодо важливості комплексного підходу до більш оптимального підбору цитостатиків для лікування хворих на ХЛЛ, що включатиме: оцінку ступеня експресії ряду поверхневих маркерів В-лімфоцитів, а саме CD5, CD20, CD37, CD38, CD40, CD150 та CD180, визначення рівня експресії мРНК ізоформ mCD150 та nCD150, а також мРНК цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10. Висвітлені в дисертаційній роботі експериментальні дані можуть в майбутньому бути використані як підґрунтя для проведення клінічних випробувань щодо можливої оптимізації FCR та BR схем хіміотерапій для лікування хворих на ХЛЛ.

ВИСНОВКИ

Широкий спектр молекулярно-біологічних характеристик В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ обумовлює гетерогенність клінічних проявів та визначає особливості перебігу пухлинного процесу, а також асоціюється із ефективністю лікування. Однією з причин недосконалості розробленої на сьогодні моделі вибору схеми хіміотерапії для лікування хворих на ХЛЛ полягає у відсутності чітких критеріїв для її індивідуалізованого підбору. Тому пошук можливих предиктивних маркерів чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до хіміопрепаратів з метою більш точного прогнозу відповіді хворих на застосування різних схем хіміотерапії і, зрештою, оптимізації ефективності лікування, стало метою даного дисертаційного дослідження.

1. Висока чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичної дії БН асоційована із $CD5^{M>}$, $CD37^{M<}$, $CD38^{-}$ та $CD40^{M<}$ фенотипом клітин ($p<0,05$), натомість за умов експресії $CD5$ та $CD20$ на рівні вище значення медіани В-лімфоцитам властива достовірно краща чутливість до дії ЦФ *ex vivo*. Показники чутливості В-лімфоцитів до дії ФЛ у монорежимі або за умов комбінованого впливу із ЦФ не залежать від рівня експресії $CD5$, $CD20$, $CD37$, $CD38$ або $CD40$. Статус експресії $CD22$ не визначає чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії БН, ФЛ або ЦФ *ex vivo*.

2. В експериментальних дослідженнях *ex vivo* встановлено, що чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до ФЛ, ЦФ і БН у монорежимі не залежить від статусу експресії $CD150$ та $CD180$ на плазматичній мембрані. Однак, комплексне застосування ФЛ із ЦФ є достовірно більш ефективне, ніж застосування даних препаратів у монорежимі за умов експресії $CD150$ та/або $CD180$ на плазматичній мембрані ($p<0,05$). Крім того, у випадках ХЛЛ з $CD150^{+}CD180^{+}$ фенотипом клітин було констатовано достовірно більшу чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії ФЛ ($M=28,09\%$) ніж у випадках ХЛЛ, В-лімфоцити яких негативні за експресією $CD150$ та $CD180$ ($M=48,24\%$).

3. Вперше встановлено, що активація CD180 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ збільшує чутливість злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до дії БН в 8,9 разів, але не впливає на їх чутливість до ФЛ та ЦФ. Одночасна ж лігація CD150 і CD180 збільшує чутливість В-лімфоцитів до цитотоксичного впливу БН на такому ж рівні, як і за умов впливу CD180 у монорежимі, проте спричиняє достовірне зниження чутливості клітин до дії ФЛ ($M=72,8\%$ vs $34,7\%$). Індукція CD150 -опосередкованого сигнального шляху не впливає на зміну чутливості В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії ФЛ, ЦФ та БН *ex vivo*.
4. В-лімфоцити хворих на ХЛЛ із високим рівнем експресії мРНК mCD150 ізоформи ($M>$) та низьким рівнем експресії мРНК nCD150 ($M<$), є достовірно більш чутливі до цитотоксичної дії ФЛ *ex vivo*. Натомість низький рівень експресії мРНК mCD150 ізоформи ($M<$) асоційований із високою чутливістю злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до цитотоксичної дії ЦФ. Чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії БН *ex vivo* не залежить від рівня експресії мРНК mCD150, nCD150 та sCD150 ізоформ.
5. CD150 та CD180-опосередковані сигнальні шляхи залучені до позитивної регуляції рівня експресії CD20 на плазматичній мембрані злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ, що призводить до його зростання в 2,1 – 2,4 разу.
6. Встановлено відмінності в базальному рівні експресії мРНК цитокінів CCL3, CCL4, IL-6 та IL-10 у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ залежно від їх фенотипу: у $CD150^+CD180^+$ В-лімфоцитах виявлено достовірно вищий рівень експресії мРНК CCL3 та CCL4 ($p<0,05$) та нижчий рівень експресії мРНК IL-6 та IL-10 ($p<0,05$) порівняно з $CD150^-CD180^-$ В-лімфоцитами. Дана закономірність щодо експресії IL-6 та IL-10 на рівні мРНК підтверджена і на білковому рівні.
7. Встановлено достовірну різницю у концентрації IL-6 та IL-10 в плазмі крові хворих на ХЛЛ з переважанням вмісту IL-10 (70,93 пг/мл vs 39,33 пг/мл). З'ясовано один із можливих механізмів регуляції секреції IL-10 В-лімфоцитами хворих на ХЛЛ шляхом активації CD150 та CD180, що

призводить до достовірного зниження вмісту IL-10 у середовищі культивування клітин *ex vivo* у 1,6 та 2,4 разу, відповідно. Водночас, активація вищезазначених сигнальних шляхів у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ не впливає на секрецію ними IL-6.

8. Встановлено, що В-лімфоцити хворих на ХЛЛ із високим (М>) рівнем експресії мРНК CCL3/CCL4 є достовірно більш чутливі до цитотоксичної дії ФЛ та БН *ex vivo*. Низький (М<) рівень експресії мРНК IL-10 у В-лімфоцитах асоційований із їх високою чутливістю до дії ФЛ, ЦФ та БН. Натомість низький (М<) рівень експресії мРНК IL-6 вказує на високу чутливість злоякісно трансформованих В-лімфоцитів лише до дії ФЛ або ЦФ *ex vivo*. Життєздатність злоякісно трансформованих В-лімфоцитів за умов впливу ФЛ, ЦФ та БН не залежить від вмісту IL-6/IL-10 в плазмі крові.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:16096.
2. Глузман Д.Ф. СЛМ, Надгорная В.А. Диагностическая онкогематология. Київ: ДИА; 2011. 256 p.
3. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-56.
4. Chen C, Puvvada S. Prognostic Factors for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2016;11(1):37-42.
5. Lee J, Wang YL. Prognostic and Predictive Molecular Biomarkers in Chronic Lymphocytic Leukemia. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2020;22(9):1114-25.
6. Delgado J, Doubek M, Baumann T, Kotaskova J, Molica S, Mozas P, et al. Chronic lymphocytic leukemia: A prognostic model comprising only two biomarkers (IGHV mutational status and FISH cytogenetics) separates patients with different outcome and simplifies the CLL-IPI. *American journal of hematology*. 2017;92(4):375-80.
7. Наказ України «Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при хронічному лімфоїдному лейкозі». Міністерство охорони здоров'я 2016;439.
8. Burger JA. Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2020;383(5):460-73.
9. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(3):145-62.
10. Dubois N, Crompton E, Meuleman N, Bron D, Lagneaux L, Stamatopoulos B. Importance of Crosstalk Between Chronic Lymphocytic Leukemia Cells and the

Stromal Microenvironment: Direct Contact, Soluble Factors, and Extracellular Vesicles. *Front Oncol.* 2020;10:1422.

11. Hartmann EM, Rudelius M, Burger JA, Rosenwald A. CCL3 chemokine expression by chronic lymphocytic leukemia cells orchestrates the composition of the microenvironment in lymph node infiltrates. *Leukemia & lymphoma.* 2016;57(3):563-71.
12. Sivina M, Werner L, Rassenti L, Ferrajoli A, Wierda WG, Keating MJ, et al. Dynamic changes in CCL3 and CCL4 plasma concentrations in patients with chronic lymphocytic leukaemia managed with observation. *British journal of haematology.* 2018;180(4):597-600.
13. Alhakeem SS, McKenna MK, Oben KZ, Noothi SK, Rivas JR, Hildebrandt GC, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia-Derived IL-10 Suppresses Antitumor Immunity. *Journal of immunology.* 2018;200(12):4180-9.
14. Andersen BL, Goyal NG, Weiss DM, Westbrook TD, Maddocks KJ, Byrd JC, et al. Cells, cytokines, chemokines, and cancer stress: A biobehavioral study of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 2018;124(15):3240-8.
15. Wang HQ, Jia L, Li YT, Farren T, Agrawal SG, Liu FT. Increased autocrine interleukin-6 production is significantly associated with worse clinical outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Journal of cellular physiology.* 2019;234(8):13994-4006.
16. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood.* 2018;131(25):2745-60.
17. Tees MT, Flinn IW. Chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma: two faces of the same disease. *Expert Rev Hematol.* 2017;10(2):137-46.
18. Hasserjian RP. Chronic Lymphocytic Leukemia, Small Lymphocytic Lymphoma, and Monoclonal B-Cell Lymphocytosis. *Surg Pathol Clin.* 2010;3(4):907-31.

19. Maitre E, Troussard X. Monoclonal B-cell lymphocytosis. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2019;32(3):229-38.
20. Vardi A, Dagklis A, Scarfo L, Jelinek D, Newton D, Bennett F, et al. Immunogenetics shows that not all MBL are equal: the larger the clone, the more similar to CLL. *Blood*. 2013;121(22):4521-8.
21. Kostopoulos IV, Paterakis G, Pavlidis D, Kastritis E, Terpos E, Tsitsilonis OE, et al. Clonal evolution is a prognostic factor for the clinical progression of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Blood cancer journal*. 2017;7(8):e597.
22. Blanco G, Puiggros A, Sherry B, Nonell L, Calvo X, Puigdecenet E, et al. Chronic lymphocytic leukemia-like monoclonal B-cell lymphocytosis exhibits an increased inflammatory signature that is reduced in early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Experimental hematology*. 2021;95:68-80.
23. Al-Sawaf O, Robrecht S, Bahlo J, Fink AM, Cramer P, J VT, et al. Richter transformation in chronic lymphocytic leukemia (CLL)-a pooled analysis of German CLL Study Group (GCLLSG) front line treatment trials. *Leukemia*. 2021;35(1):169-76.
24. Rossi D, Spina V, Gaidano G. Biology and treatment of Richter syndrome. *Blood*. 2018;131(25):2761-72.
25. Wang Y, Ding W. Richter transformation of chronic lymphocytic leukemia in the era of novel agents. *Clinical advances in hematology & oncology : H&O*. 2020;18(6):348-57.
26. Khan M, Siddiqi R, Thompson PA. Approach to Richter transformation of chronic lymphocytic leukemia in the era of novel therapies. *Ann Hematol*. 2018;97(1):1-15.
27. Wang Y, Tschautscher MA, Rabe KG, Call TG, Leis JF, Kenderian SS, et al. Clinical characteristics and outcomes of Richter transformation: experience of 204 patients from a single center. *Haematologica*. 2020;105(3):765-73.
28. Ding W, LaPlant BR, Call TG, Parikh SA, Leis JF, He R, et al. Pembrolizumab in patients with CLL and Richter transformation or with relapsed CLL. *Blood*. 2017;129(26):3419-27.

29. He R, Ding W, Viswanatha DS, Chen D, Shi M, Van Dyke D, et al. PD-1 Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma (CLL/SLL) and Large B-cell Richter Transformation (DLBCL-RT): A Characteristic Feature of DLBCL-RT and Potential Surrogate Marker for Clonal Relatedness. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(7):843-54.
30. Kohlhaas V, Blakemore SJ, Al-Maarri M, Nickel N, Pal M, Roth A, et al. Active Akt signaling triggers CLL toward Richter transformation via overactivation of Notch1. *Blood*. 2021;137(5):646-60.
31. Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology. *J Epidemiol Glob Health*. 2019;9(4):217-22.
32. Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, Morton LM, Jemal A, Flowers CR. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(6):443-59.
33. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(1):7-34.
34. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020;70(1):7-30.
35. Федоренко З.П. ГЛО, Михайлович Ю.Й., Горох Є.Л., Ришов А.Ю., Сумкіна О.В., Куценко Л.Б. Рак в Україні, 2019-2020. Київ: Бюлетень Національного канцер-реєстру; 2021.
36. Catovsky D, Wade R, Else M. The clinical significance of patients' sex in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2014;99(6):1088-94.
37. Cantu ES, McGill JR, Stephenson CF, Hoffmann HM, Tang L, Yan J, et al. Male-to-female sex ratios of abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization in a population of chronic lymphocytic leukemia patients. *Hematol Rep*. 2013;5(1):13-7.
38. Delgado J, Nadeu F, Colomer D, Campo E. Chronic lymphocytic leukemia: from molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Haematologica*. 2020.
39. Califf RM. Biomarker definitions and their applications. *Experimental biology and medicine*. 2018;243(3):213-21.

40. International CLLIPIwg. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2016;17(6):779-90.
41. Muchtar E, Kay NE, Parikh SA. Early intervention in asymptomatic chronic lymphocytic leukemia. *Clinical advances in hematology & oncology : H&O.* 2021;19(2):92-103.
42. Rai KR. Clinical staging of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood.* 1975;46(2):219-34.
43. Sharma S, Rai KR. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) treatment: So many choices, such great options. *Cancer.* 2019;125(9):1432-40.
44. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood.* 2011;117(6):1781-91.
45. А.А. Я. Иммунология. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2010. 740 p.
46. Wang Y, Liu J, Burrows PD, Wang JY. B Cell Development and Maturation. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1254:1-22.
47. Chiorazzi N, Stevenson FK. Celebrating 20 Years of IGHV Mutation Analysis in CLL. *HemaSphere.* 2020;4(1):e334.
48. Shi K, Sun Q, Qiao C, Zhu H, Wang L, Wu J, et al. 98% IGHV gene identity is the optimal cutoff to dichotomize the prognosis of Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Med.* 2020;9(3):999-1007.
49. D'Arena G, Tarnani M, Rumi C, Vaisitti T, Aydin S, De Filippi R, et al. Prognostic significance of combined analysis of ZAP-70 and CD38 in chronic lymphocytic leukemia. *American journal of hematology.* 2007;82(9):787-91.
50. Balakrishna J, Basumallik N, Matulonis R, Scott D, Salem D, Jasper G, et al. Intensity of antigen expression reflects IGHV mutational status and Dohner-defined prognostic categories in chronic lymphocytic leukemia, monoclonal B-cell lymphocytosis, and small lymphocytic lymphoma. *Leukemia & lymphoma.* 2021:1-12.

51. Chen J, Sathiaselvan V, Moore AD, Tan S, Chilamakuri CS, Roamio Franklin VN, et al. ZAP-70 constitutively regulates gene expression and protein synthesis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2021.
52. Calpe E, Codony C, Baptista MJ, Abrisqueta P, Carpio C, Purroy N, et al. ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes toward CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation. *Blood*. 2011;118(16):4401-10.
53. Laufer JM, Lyck R, Legler DF. ZAP70 expression enhances chemokine-driven chronic lymphocytic leukemia cell migration and arrest by valency regulation of integrins. *FASEB J*. 2018;32(9):4824-35.
54. Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E, Burkle A, Wierda WG, Keating MJ, et al. High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood*. 2009;113(13):3050-8.
55. Chen J, Moore A, Ringshausen I. ZAP-70 Shapes the Immune Microenvironment in B Cell Malignancies. *Front Oncol*. 2020;10:595832.
56. Carabia J, Carpio C, Abrisqueta P, Jimenez I, Purroy N, Calpe E, et al. Microenvironment regulates the expression of miR-21 and tumor suppressor genes PTEN, PIAS3 and PDCD4 through ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia. *Scientific reports*. 2017;7(1):12262.
57. Malavasi F, Deaglio S, Damle R, Cutrona G, Ferrarini M, Chiorazzi N. CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood*. 2011;118(13):3470-8.
58. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, Bergui L, D'Arena G, Bonello L, et al. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood*. 2007;110(12):4012-21.
59. Kirtava T, Vatsadze T, Azrmaiparashili E, Ghirdaladze D. The Prognostic Significance of Combined Expression of Zap-70 and Cd38 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Georgian Med News*. 2017(267):12-6.

60. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F, et al. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;111(2):865-73.
61. Dal Bo M, Bulian P, Bomben R, Zucchetto A, Rossi FM, Pozzo F, et al. CD49d prevails over the novel recurrent mutations as independent prognosticator of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2016;30(10):2011-8.
62. Strati P, Parikh SA, Chaffee KG, Achenbach SJ, Slager SL, Call TG, et al. CD49d associates with nodal presentation and subsequent development of lymphadenopathy in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*. 2017;178(1):99-105.
63. Nematollahi P, Shakery M, Kefayat A, Goli P. Association of CD49d expression with clinicopathological features of chronic lymphocytic leukemia patients in the Iranian population. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2020;12(1):32-9.
64. Pasikowska M, Walsby E, Apollonio B, Cuthill K, Phillips E, Coulter E, et al. Phenotype and immune function of lymph node and peripheral blood CLL cells are linked to transendothelial migration. *Blood*. 2016;128(4):563-73.
65. Tissino E, Pozzo F, Benedetti D, Caldana C, Bittolo T, Rossi FM, et al. CD49d promotes disease progression in chronic lymphocytic leukemia: new insights from CD49d bimodal expression. *Blood*. 2020;135(15):1244-54.
66. Santiago L, Daniels G, Wang D, Deng FM, Lee P. Wnt signaling pathway protein LEF1 in cancer, as a biomarker for prognosis and a target for treatment. *Am J Cancer Res*. 2017;7(6):1389-406.
67. Wu W, Zhu H, Fu Y, Shen W, Miao K, Hong M, et al. High LEF1 expression predicts adverse prognosis in chronic lymphocytic leukemia and may be targeted by ethacrynic acid. *Oncotarget*. 2016;7(16):21631-43.

68. Menter T, Dirnhofer S, Tzankov A. LEF1: a highly specific marker for the diagnosis of chronic lymphocytic B cell leukaemia/small lymphocytic B cell lymphoma. *J Clin Pathol.* 2015;68(6):473-8.
69. Patel N, Durkin L, Bodo J, Hsi ED. Immunohistochemical Expression of Lymphoid Enhancer Binding Factor 1 in CD5-Positive Marginal Zone, Lymphoplasmacytic, and Follicular Lymphomas. *Am J Clin Pathol.* 2020;153(5):646-55.
70. Lyapichev KA, Sakhdari A, Khoury JD, O'Malley DP, El Hussein S, Yin CC, et al. Lymphoid enhancer binding factor 1 (LEF1) expression is significantly higher in Hodgkin lymphoma associated with Richter syndrome relative to de novo classic Hodgkin lymphoma. *Ann Diagn Pathol.* 2020;49:151636.
71. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* 2016;23(1):27-47.
72. Jitschin R, Hofmann AD, Bruns H, Giessel A, Bricks J, Berger J, et al. Mitochondrial metabolism contributes to oxidative stress and reveals therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2014;123(17):2663-72.
73. Vangapandu HV, Havranek O, Ayres ML, Kaiparettu BA, Balakrishnan K, Wierda WG, et al. B-cell Receptor Signaling Regulates Metabolism in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Molecular cancer research : MCR.* 2017;15(12):1692-703.
74. Roy Chowdhury S, Bouchard EDJ, Saleh R, Nugent Z, Peltier C, Mejia E, et al. Mitochondrial Respiration Correlates with Prognostic Markers in Chronic Lymphocytic Leukemia and Is Normalized by Ibrutinib Treatment. *Cancers.* 2020;12(3).
75. Linley A, Valle-Argos B, Steele AJ, Stevenson FK, Forconi F, Packham G. Higher levels of reactive oxygen species are associated with anergy in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2015;100(7):e265-8.
76. Kristensen L, Kristensen T, Abildgaard N, Royo C, Frederiksen M, Mourits-Andersen T, et al. LPL gene expression is associated with poor prognosis in CLL and closely related to NOTCH1 mutations. *Eur J Haematol.* 2016;97(2):175-82.

77. Heintel D, Kienle D, Shehata M, Krober A, Kroemer E, Schwarzingen I, et al. High expression of lipoprotein lipase in poor risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2005;19(7):1216-23.
78. Bilous N, Abramenko I, Chumak A, Dyagil I, Martina Z. Analysis of LPL gene expression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Experimental oncology*. 2019;41(1):39-45.
79. Boudny M, Trbusek M. The Important Role of STAT3 in Chronic Lymphocytic Leukaemia Biology. *Klin Onkol*. 2020;33(1):32-8.
80. Rozovski U, Grgurevic S, Bueso-Ramos C, Harris DM, Li P, Liu Z, et al. Aberrant LPL Expression, Driven by STAT3, Mediates Free Fatty Acid Metabolism in CLL Cells. *Molecular cancer research : MCR*. 2015;13(5):944-53.
81. Rozovski U, Harris DM, Li P, Liu Z, Jain P, Ferrajoli A, et al. STAT3-activated CD36 facilitates fatty acid uptake in chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncotarget*. 2018;9(30):21268-80.
82. Rossi D, Gaidano G. The clinical implications of gene mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer*. 2016;114(8):849-54.
83. Kikushige Y. Pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia and human B1 cell development. *Int J Hematol*. 2020;111(5):634-41.
84. Malcikova J, Tausch E, Rossi D, Sutton L.A, Soussi T et al. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia—update on methodological approaches and results interpretation. *Leukemia*. 2018;32:1070-80.
85. Puiggros A, Blanco G, Espinet B. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *Biomed Res Int*. 2014;2014:435983.
86. Campo E, Cymbalista F, Ghia P, Jager U, Pospisilova S, Rosenquist R, et al. TP53 aberrations in chronic lymphocytic leukemia: an overview of the clinical implications of improved diagnostics. *Haematologica*. 2018;103(12):1956-68.
87. Nabhan C, Raca G, Wang YL. Predicting Prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Contemporary Era. *JAMA Oncol*. 2015;1(7):965-74.

88. Srinivasan VK, Naseem S, Varma N, Lad DP, Malhotra P. Genomic alterations in chronic lymphocytic leukemia and their correlation with clinico-hematological parameters and disease progression. *Blood Res.* 2020;55(3):131-8.
89. Gaidano G, Rossi D. The mutational landscape of chronic lymphocytic leukemia and its impact on prognosis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2017;2017(1):329-37.
90. Calva-Lopez A, Tirado CA. The Role of miR-15a and miR-16-1 in the Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia, and the Importance of microRNAs in Targeted Therapies. *J Assoc Genet Technol.* 2018;44(3):84-7.
91. Cui B, Ghia EM, Chen L, Rassenti LZ, DeBoever C, Widhopf GF, 2nd, et al. High-level ROR1 associates with accelerated disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2016;128(25):2931-40.
92. Balatti V, Croce CM. MicroRNA dysregulation and multi-targeted therapy for cancer treatment. *Adv Biol Regul.* 2020;75:100669.
93. Javandoost E, Firoozi-Majd E, Rostamian H, Khakpoor-Koosheh M, Mirzaei HR. Role of microRNAs in Chronic Lymphocytic Leukemia Pathogenesis. *Curr Med Chem.* 2020;27(2):282-97.
94. Autore F, Strati P, Laurenti L, Ferrajoli A. Morphological, immunophenotypic, and genetic features of chronic lymphocytic leukemia with trisomy 12: a comprehensive review. *Haematologica.* 2018;103(6):931-8.
95. Riches JC, O'Donovan CJ, Kingdon SJ, McClanahan F, Clear AJ, Neuberg DS, et al. Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells exhibit upregulation of integrin signaling that is modulated by NOTCH1 mutations. *Blood.* 2014;123(26):4101-10.
96. Roos-Weil D, Nguyen-Khac F, Chevret S, Touzeau C, Roux C, Lejeune J, et al. Mutational and cytogenetic analyses of 188 CLL patients with trisomy 12: A retrospective study from the French Innovative Leukemia Organization (FILO) working group. *Genes Chromosomes Cancer.* 2018;57(11):533-40.

97. Apollonio B, Scielzo C, Bertilaccio MT, Ten Hacken E, Scarfo L, Ranghetti P, et al. Targeting B-cell anergy in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(19):3879-88, S1-8.
98. Abruzzo LV, Herling CD, Calin GA, Oakes C, Barron LL, Banks HE, et al. Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia expresses a unique set of activated and targetable pathways. *Haematologica*. 2018;103(12):2069-78.
99. Marklin M, Heitmann JS, Fuchs AR, Truckenmuller FM, Gutknecht M, Bugl S, et al. NFAT2 is a critical regulator of the anergic phenotype in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Commun*. 2017;8(1):755.
100. Rosati E, Baldoni S, De Falco F, Del Papa B, Dorillo E, Rompietti C, et al. NOTCH1 Aberrations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Front Oncol*. 2018;8:229.
101. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*. 2011;208(7):1389-401.
102. Zou Y, Fan L, Xia Y, Miao Y, Wu W, Cao L, et al. NOTCH1 mutation and its prognostic significance in Chinese chronic lymphocytic leukemia: a retrospective study of 317 cases. *Cancer Med*. 2018;7(5):1689-96.
103. Benedetti D, Tissino E, Pozzo F, Bittolo T, Caldana C, Perini C, et al. NOTCH1 mutations are associated with high CD49d expression in chronic lymphocytic leukemia: link between the NOTCH1 and the NF-kappaB pathways. *Leukemia*. 2018;32(3):654-62.
104. Villamor N, Conde L, Martinez-Trillos A, Cazorla M, Navarro A, Bea S, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia*. 2013;27(5):1100-6.
105. Balatti V, Lerner S, Rizzotto L, Rassenti LZ, Bottoni A, Palamarchuk A, et al. Trisomy 12 CLLs progress through NOTCH1 mutations. *Leukemia*. 2013;27(3):740-3.

106. Cortese D, Sutton LA, Cahill N, Smedby KE, Geisler C, Gunnarsson R, et al. On the way towards a 'CLL prognostic index': focus on TP53, BIRC3, SF3B1, NOTCH1 and MYD88 in a population-based cohort. *Leukemia*. 2014;28(3):710-3.
107. De Paoli L, Cerri M, Monti S, Rasi S, Spina V, Bruscaggin A, et al. MGA, a suppressor of MYC, is recurrently inactivated in high risk chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2013;54(5):1087-90.
108. Miao Y, Zou YX, Gu DL, Zhu HC, Zhu HY, Wang L, et al. SF3B1 mutation predicts unfavorable treatment-free survival in Chinese chronic lymphocytic leukemia patients. *Ann Transl Med*. 2019;7(8):176.
109. Jain P, Kanagal-Shamanna R, Wierda W, Keating M, Sarwari N, Rozovski U, et al. Clinical and molecular characteristics of XPO1 mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia. *American journal of hematology*. 2016;91(11):E478-E9.
110. Camus V, Miloudi H, Taly A, Sola B, Jardin F. XPO1 in B cell hematological malignancies: from recurrent somatic mutations to targeted therapy. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):47.
111. Cohen JA, Bomben R, Pozzo F, Tissino E, Harzschel A, Hartmann TN, et al. An Updated Perspective on Current Prognostic and Predictive Biomarkers in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Context of Chemoimmunotherapy and Novel Targeted Therapy. *Cancers*. 2020;12(4).
112. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Dohner K, et al. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood*. 2014;123(21):3247-54.
113. Gonzalez D, Martinez P, Wade R, Hockley S, Oscier D, Matutes E, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(16):2223-9.

114. Ferrer G, Montserrat E. Critical molecular pathways in CLL therapy. *Molecular medicine*. 2018;24(1):9.
115. Jain P, Nogueras Gonzalez GM, Kanagal-Shamanna R, Rozovski U, Sarwari N, Tam C, et al. The absolute percent deviation of IGHV mutation rather than a 98% cut-off predicts survival of chronic lymphocytic leukaemia patients treated with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab. *British journal of haematology*. 2018;180(1):33-40.
116. Kost SE, Bouchard ED, LaBossiere E, Ye X, Queau ML, Liang WS, et al. Cross-resistance and synergy with bendamustine in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia research*. 2016;50:63-71.
117. Montraveta A, Lee-Verges E, Roldan J, Jimenez L, Cabezas S, Clot G, et al. CD69 expression potentially predicts response to bendamustine and its modulation by ibrutinib or idelalisib enhances cytotoxic effect in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2016;7(5):5507-20.
118. Sidorenko SP, Clark EA. Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. *Journal of immunology*. 1993;151(9):4614-24.
119. Nanda N, Andre P, Bao M, Clauser K, Deguzman F, Howie D, et al. Platelet aggregation induces platelet aggregate stability via SLAM family receptor signaling. *Blood*. 2005;106(9):3028-34.
120. Rethi B, Gogolak P, Szatmari I, Veres A, Erdos E, Nagy L, et al. SLAM/SLAM interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2006;107(7):2821-9.
121. Gordiienko I, Shlapatska L, Kovalevska L, Sidorenko SP. SLAMF1/CD150 in hematologic malignancies: Silent marker or active player? *Clinical immunology*. 2019;204:14-22.
122. Yurchenko O.V. SLM, Skryma M.R. , Berdova G.G., Kovalevska L.M. , Tarasova T.A. , Yurchenko M.Y., Kulik G.I. , Sidorenko S.P. . Immunohistochemical studies of CD150 expression in some human tumors. *Experimental oncology*. 2003;25(3):186-90.

123. Romanets-Korbut O, Najakshin AM, Yurchenko M, Malysheva TA, Kovalevska L, Shlapatska LM, et al. Expression of CD150 in tumors of the central nervous system: identification of a novel isoform. *PloS one*. 2015;10(2):e0118302.
124. Shlapatska LM MS, Berdova AG, Zelensky OM, Yun TJ, Nichols KE. CD150 association with either the SH2-containing inositol phosphatase or the SH2-containing protein tyrosine phosphatase is regulated by the adaptor protein SH2D1A. *Journal of immunology*. 2001;166(9):5480-7.
125. Mikhalap SV SL, Yurchenko OV, Yurchenko MY, Berdova GG,, KE N. The adaptor protein SH2D1A regulates signaling through CD150 (SLAM) in B cells. *Blood cancer journal*. 2004;104(13):4063-70.
126. Bleharski JR, Niazi KR, Sieling PA, Cheng G, Modlin RL. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *Journal of immunology*. 2001;167(6):3174-81.
127. Schweighofer CD, Coombes KR, Barron LL, Diao L, Newman RJ, Ferrajoli A, et al. A two-gene signature, SKI and SLAMF1, predicts time-to-treatment in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *PloS one*. 2011;6(12):e28277.
128. Bologna C, Buonincontri R, Serra S, Vaisitti T, Audrito V, Brusa D, et al. SLAMF1 regulation of chemotaxis and autophagy determines CLL patient response. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(1):181-94.
129. Bologna C, Deaglio S. Linking SLAMF1 to autophagy and sensitivity to therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Molecular & cellular oncology*. 2018;5(3):e1143077.
130. Mayeur-Rousse C, Guy J, Miguet L, Bouyer S, Genevieve F, Robillard N, et al. CD180 expression in B-cell lymphomas: A multicenter GEIL study. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2016;90(5):462-6.
131. Porakishvili N, Memon A, Vispute K, Kulikova N, Clark EA, Rai KR, et al. CD180 functions in activation, survival and cycling of B chronic lymphocytic leukaemia cells. *British journal of haematology*. 2011;153(4):486-98.

132. Guo X, Jiang H, Yang J, Chen J, Yang J, Ding JW, et al. Radioprotective 105 kDa protein attenuates ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis and autophagy by inhibiting the activation of the TLR4/NF-kappaB signaling pathway in rats. *International journal of molecular medicine*. 2016;38(3):885-93.
133. Simon D, Erdo-Bonyar S, Rapp J, Balogh P, Minier T, Nagy G, et al. Analysis of PI3K Pathway Associated Molecules Reveals Dysregulated Innate and Adaptive Functions of B Cells in Early Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(6).
134. Porakishvili N, Kulikova N, Jewell AP, Youinou PY, Yong K, Nathwani A, et al. Differential expression of CD 180 and IgM by B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells using mutated and unmutated immunoglobulin VH genes. *British journal of haematology*. 2005;131(3):313-9.
135. Choi MY, Kashyap MK, Kumar D. The chronic lymphocytic leukemia microenvironment: Beyond the B-cell receptor. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2016;29(1):40-53.
136. Davids MS, Burger JA. Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Open J Hematol*. 2012;3(S1).
137. Herndon TM, Chen SS, Saba NS, Valdez J, Emson C, Gattmaitan M, et al. Direct in vivo evidence for increased proliferation of CLL cells in lymph nodes compared to bone marrow and peripheral blood. *Leukemia*. 2017;31(6):1340-7.
138. Gary-Gouy H, Harriague J, Dalloul A, Donnadieu E, Bismuth G. CD5-negative regulation of B cell receptor signaling pathways originates from tyrosine residue Y429 outside an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *Journal of immunology*. 2002;168(1):232-9.
139. Friedman DR, Guadalupe E, Volkheimer A, Moore JO, Weinberg JB. Clinical outcomes in chronic lymphocytic leukaemia associated with expression of CD5, a negative regulator of B-cell receptor signalling. *British journal of haematology*. 2018;183(5):747-54.
140. Romano C, Sellitto A, Chiurazzi F, Simeone L, De Fanis U, Raia M, et al. Clinical and phenotypic features of CD5-negative B cell chronic

- lymphoproliferative disease resembling chronic lymphocytic leukemia. *Int J Hematol.* 2015;101(1):67-74.
141. Koehrer S, Burger JA. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia and other B-cell malignancies. *Clinical advances in hematology & oncology : H&O.* 2016;14(1):55-65.
 142. Nagasawa T. CXCL12/SDF-1 and CXCR4. *Frontiers in immunology.* 2015;6:301.
 143. Montresor A, Toffali L, Rigo A, Ferrarini I, Vinante F, Laudanna C. CXCR4- and BCR-triggered integrin activation in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells depends on JAK2-activated Bruton's tyrosine kinase. *Oncotarget.* 2018;9(80):35123-40.
 144. Kaiser LM, Hunter ZR, Treon SP, Buske C. CXCR4 in Waldenstrom's Macroglobulinemia: chances and challenges. *Leukemia.* 2020.
 145. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood.* 2000;96(8):2655-63.
 146. Filip AA, Cisel B, Wasik-Szczepanek E. Guilty bystanders: nurse-like cells as a model of microenvironmental support for leukemic lymphocytes. *Clin Exp Med.* 2015;15(1):73-83.
 147. Trimarco V, Ave E, Facco M, Chiodin G, Frezzato F, Martini V, et al. Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia (CLL) tumor B cells and mesenchymal stromal cells (MSCs): implications for neoplastic cell survival. *Oncotarget.* 2015;6(39):42130-49.
 148. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers.* 2014;6(3):1670-90.
 149. Boissard F, Fournie JJ, Laurent C, Poupot M, Ysebaert L. Nurse like cells: chronic lymphocytic leukemia associated macrophages. *Leukemia & lymphoma.* 2015;56(5):1570-2.

150. Mesaros O, Jimbu L, Neaga A, Popescu C, Berceanu I, Tomuleasa C, et al. Macrophage Polarization in Chronic Lymphocytic Leukemia: Nurse-Like Cells Are the Caretakers of Leukemic Cells. *Biomedicines*. 2020;8(11).
151. Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, et al. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood*. 2005;106(3):1012-20.
152. Endo T, Nishio M,ENZLER T, Cottam HB, Fukuda T, James DF, et al. BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway. *Blood*. 2007;109(2):703-10.
153. Talbot H, Saada S, Barthout E, Gallet PF, Gachard N, Abraham J, et al. BDNF belongs to the nurse-like cell secretome and supports survival of B chronic lymphocytic leukemia cells. *Scientific reports*. 2020;10(1):12572.
154. Abbaci A, Talbot H, Saada S, Gachard N, Abraham J, Jaccard A, et al. Neurotensin receptor type 2 protects B-cell chronic lymphocytic leukemia cells from apoptosis. *Oncogene*. 2018;37(6):756-67.
155. Azoulay D, Herishanu Y, Shapiro M, Brandshaft Y, Surui C, Akria L, et al. Elevated serum BDNF levels are associated with favorable outcome in CLL patients: Possible link to CXCR4 downregulation. *Experimental hematology*. 2018;63:17-21 e1.
156. Marquez ME, Hernandez-Uzcategui O, Cornejo A, Vargas P, Da Costa O. Bone marrow stromal mesenchymal cells induce down regulation of CD20 expression on B-CLL: implications for rituximab resistance in CLL. *British journal of haematology*. 2015;169(2):211-8.
157. Elston L, Fegan C, Hills R, Hashimdeen SS, Walsby E, Henley P, et al. Increased frequency of CD4(+) PD-1(+) HLA-DR(+) T cells is associated with disease progression in CLL. *British journal of haematology*. 2020;188(6):872-80.
158. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, Fatah R, Iqbal S, Agrawal S, et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood*. 2013;121(9):1612-21.

159. Roessner PM, Seiffert M. T-cells in chronic lymphocytic leukemia: Guardians or drivers of disease? *Leukemia*. 2020;34(8):2012-24.
160. Dermani FK, Samadi P, Rahmani G, Kohlan AK, Najafi R. PD-1/PD-L1 immune checkpoint: Potential target for cancer therapy. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(2):1313-25.
161. Kater AP, van der Windt GJ. PD-L1 blockade: rejuvenating T cells in CLL. *Blood*. 2015;126(2):126-8.
162. Grzywnowicz M, Karczmarczyk A, Skorka K, Zajac M, Zaleska J, Chocholska S, et al. Expression of Programmed Death 1 Ligand in Different Compartments of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Acta haematologica*. 2015;134(4):255-62.
163. Redondo-Munoz J, Garcia-Pardo A, Teixido J. Molecular Players in Hematologic Tumor Cell Trafficking. *Frontiers in immunology*. 2019;10:156.
164. Zucchetto A, Benedetti D, Tripodo C, Bomben R, Dal Bo M, Marconi D, et al. CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer research*. 2009;69(9):4001-9.
165. Benedetti D, Tissino E, Caldana C, Dal Bo M, Bomben R, Marconi D, et al. Persistent CD49d engagement in circulating CLL cells: a role for blood-borne ligands? *Leukemia*. 2016;30(2):513-7.
166. Chen LS, Bose P, Cruz ND, Jiang Y, Wu Q, Thompson PA, et al. A pilot study of lower doses of ibrutinib in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2018;132(21):2249-59.
167. Liu FT, Jia L, Wang P, Farren T, Li H, Hao X, et al. CD126 and Targeted Therapy with Tocilizumab in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(10):2462-9.
168. Bin Dhuban K, Bartolucci S, d'Hennezel E, Piccirillo CA. Signaling Through gp130 Compromises Suppressive Function in Human FOXP3(+) Regulatory T Cells. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1532.

169. Smith LK, Boukhaled GM, Condotta SA, Mazouz S, Guthmiller JJ, Vijay R, et al. Interleukin-10 Directly Inhibits CD8(+) T Cell Function by Enhancing N-Glycan Branching to Decrease Antigen Sensitivity. *Immunity*. 2018;48(2):299-312 e5.
170. Загоскина Т. П. ТСБ, Голубева М. Е., Кудрявцева А. В., Исаева Н. В., Малых О. В. Сравнительная оценка эффективности флударабинсодержащих режимов и иммунохимоотерапии при хроническом лимфолейкозе. *Терапевтический архив*. 2010;1:35-9.
171. Tsimberidou AM, Keating MJ, Giles FJ, Wierda WG, Ferrajoli A, Lerner S, et al. Fludarabine and mitoxantrone for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2004;100(12):2583-91.
172. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376(9747):1164-74.
173. Robak T, Dmoszynska A, Solal-Celigny P, Warzocha K, Loscertales J, Catalano J, et al. Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide prolongs progression-free survival compared with fludarabine and cyclophosphamide alone in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(10):1756-65.
174. Wierda WG. Does FCR have the potential to cure a subgroup of patients with chronic lymphocytic leukemia? *Clinical advances in hematology & oncology : H&O*. 2019;17(4):214-6.
175. Shah N, Tam C, Seymour JF, Rule S. How applicable is fludarabine, cyclophosphamide and rituximab to the elderly? *Leukemia & lymphoma*. 2015;56(6):1599-610.
176. Foon KA, Boyiadzis M, Land SR, Marks S, Raptis A, Pietragallo L, et al. Chemoimmunotherapy with low-dose fludarabine and cyclophosphamide and high dose rituximab in previously untreated patients with chronic lymphocytic

- leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(4):498-503.
177. Herishanu Y, Tadmor T, Braester A, Bairey O, Aviv A, Rahimi-Levene N, et al. Low-dose fludarabine and cyclophosphamide combined with standard dose rituximab (LD-FCR) is an effective and safe regimen for elderly untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: The Israeli CLL study group experience. *Hematological oncology*. 2019;37(2):185-92.
 178. Smolej L, Brychtova Y, Cmunt E, Doubek M, Spacek M, Belada D, et al. Low-dose fludarabine and cyclophosphamide combined with rituximab in the first-line treatment of elderly/comorbid patients with chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL): long-term results of project Q-lite by the Czech CLL Study Group. *British journal of haematology*. 2021.
 179. Hillmen P, Gribben JG, Follows GA, Milligan D, Sayala HA, Moreton P, et al. Rituximab plus chlorambucil as first-line treatment for chronic lymphocytic leukemia: Final analysis of an open-label phase II study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(12):1236-41.
 180. Michallet AS, Aktan M, Hiddemann W, Ilhan O, Johansson P, Laribi K, et al. Rituximab plus bendamustine or chlorambucil for chronic lymphocytic leukemia: primary analysis of the randomized, open-label MABLE study. *Haematologica*. 2018;103(4):698-706.
 181. Parikh SA. Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm 2018. *Blood cancer journal*. 2018;8(10):93.
 182. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *American journal of hematology*. 2019;94(11):1266-87.
 183. Shcherbina V, Gordiienko I, Shlapatska L, Ivanivska T, Sidorenko S. Sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells to chemotherapeutic drugs ex vivo depends on expression status of cell surface receptors. *Experimental oncology*. 2020;42(1):16-24.

184. Gordiienko I, Shlapatska L, Kholodniuk V, Sklyarenko L, Gluzman DF, Clark EA, et al. The interplay of CD150 and CD180 receptor pathways contribute to the pathobiology of chronic lymphocytic leukemia B cells by selective inhibition of Akt and MAPK signaling. *PloS one*. 2017;12(10):e0185940.
185. Engelhard M. Anti-CD20 antibody treatment of non-Hodgkin lymphomas. *Clinical immunology*. 2016;172:101-4.
186. Prevodnik VK, Lavrencak J, Horvat M, Novakovic BJ. The predictive significance of CD20 expression in B-cell lymphomas. *Diagnostic pathology*. 2011;6:33.
187. Gordiienko I, Shlapatska L, Kholodniuk VM, Kovalevska L, Ivanivskaya TS, Sidorenko SP. CD150 and CD180 are involved in regulation of transcription factors expression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Experimental oncology*. 2017;39(4):291-8.
188. Fayad L, Keating MJ, Reuben JM, O'Brien S, Lee BN, Lerner S, et al. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood*. 2001;97(1):256-63.
189. Shcherbina V, Gordiienko I, Shlapatska L, Gluzman D, Sidorenko S. CD150 and CD180 are negative regulators of IL-10 expression and secretion in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Neoplasma*. 2021;68(4):760-9.
190. Yosifov DY, Wolf C, Stilgenbauer S, Mertens D. From Biology to Therapy: The CLL Success Story. *HemaSphere*. 2019;3(2):e175.
191. Payandeh Z, Noori E, Khalesi B, Mard-Soltani M, Abdolalizadeh J, Khalili S. Anti-CD37 targeted immunotherapy of B-Cell malignancies. *Biotechnology letters*. 2018;40(11-12):1459-66.
192. Lapalombella R, Yeh YY, Wang L, Ramanunni A, Rafiq S, Jha S, et al. Tetraspanin CD37 directly mediates transduction of survival and apoptotic signals. *Cancer cell*. 2012;21(5):694-708.

193. Chen Y, Peubez C, Smith V, Xiong S, Kocsis-Fodor G, Kennedy B, et al. CUDC-907 blocks multiple pro-survival signals and abrogates microenvironment protection in CLL. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2019;23(1):340-8.
194. Varady G, Cserepes J, Nemeth A, Szabo E, Sarkadi B. Cell surface membrane proteins as personalized biomarkers: where we stand and where we are headed. *Biomarkers in medicine*. 2013;7(5):803-19.
195. Knittel G, Rehkamper T, Nieper P, Schmitt A, Flumann R, Reinhardt HC. DNA damage pathways and B-cell lymphomagenesis. *Current opinion in hematology*. 2018;25(4):315-22.
196. Alhmoud JF, Mustafa AG, Malki MI. Targeting DNA Repair Pathways in Hematological Malignancies. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(19).
197. Austen B, Skowronska A, Baker C, Powell JE, Gardiner A, Oscier D, et al. Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(34):5448-57.
198. Deriano L, Guipaud O, Merle-Beral H, Binet JL, Ricoul M, Potocki-Veronese G, et al. Human chronic lymphocytic leukemia B cells can escape DNA damage-induced apoptosis through the nonhomologous end-joining DNA repair pathway. *Blood*. 2005;105(12):4776-83.
199. Paull TT. Mechanisms of ATM Activation. *Annual review of biochemistry*. 2015;84:711-38.
200. Okkenhaug K, Burger JA. PI3K Signaling in Normal B Cells and Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Current topics in microbiology and immunology*. 2016;393:123-42.
201. Buggins AG, Levi A, Gohil S, Fishlock K, Patten PE, Calle Y, et al. Evidence for a macromolecular complex in poor prognosis CLL that contains

- CD38, CD49d, CD44 and MMP-9. *British journal of haematology*. 2011;154(2):216-22.
202. Tibaldi E, Brunati AM, Zonta F, Frezzato F, Gattazzo C, Zambello R, et al. Lyn-mediated SHP-1 recruitment to CD5 contributes to resistance to apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2011;25(11):1768-81.
203. DiLillo DJ, Weinberg JB, Yoshizaki A, Horikawa M, Bryant JM, Iwata Y, et al. Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. *Leukemia*. 2013;27(1):170-82.
204. Maseda D, Smith SH, DiLillo DJ, Bryant JM, Candando KM, Weaver CT, et al. Regulatory B10 cells differentiate into antibody-secreting cells after transient IL-10 production in vivo. *Journal of immunology*. 2012;188(3):1036-48.
205. Wu H, Su Z, Barnie PA. The role of B regulatory (B10) cells in inflammatory disorders and their potential as therapeutic targets. *International immunopharmacology*. 2020;78:106111.
206. Song M, Bode AM, Dong Z, Lee MH. AKT as a Therapeutic Target for Cancer. *Cancer research*. 2019;79(6):1019-31.
207. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*. 2017;2.

Додаток Б

Список публікацій здобувача

1. I. Gordiienko, L. Shlapatska, V. Kholodniuk, L. Sklyarenko, D. Gluzman, E. Clark, S. Sidorenko / The interplay of CD150 and CD180 receptor pathways contribute to the pathobiology of chronic lymphocytic leukemia B cells by selective inhibition of Akt and MAPK signaling // PLoS ONE. – 2017, 12(10): e0185940. *(Дисертантом виконано стимуляцію В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ через поверхневі рецептори, проведено дослідження експресії білків методом вестерн блот аналізу, участь у обробці та аналізі результатів, написанні та оформленні статті).*
2. I.M. Gordiienko, L.M. Shlapatska, V.M. Kholodniuk, L.M. Kovalevska, T.S. Ivanivskaya, S.P. Sidorenko / CD150 and CD180 are involved in regulation of transcription factors expression in the chronic lymphocytic leukemia B cells // Experimental Oncology. – 2017. – Vol. 39, N4. - P. 291-298. *(Дисертантом виконано стимуляцію В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ через поверхневі рецептори, проведено виділення РНК, синтез кДНК та постановка кПЛР у режимі real-time, участь у обробці та аналізі результатів, написанні та оформленні статті).*
3. V. Shcherbina, I. Gordiienko, L. Shlapatska, T. Ivanivska, S. Sidorenko / Sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells to chemotherapeutic drugs ex vivo depends on expression status of cell surface receptors // Experimental Oncology. – 2020. – Vol. 42, N1. - P. 16-24. *(Дисертантом проведено основну частину експериментальної роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті).*
4. V. Shcherbina, I. Gordiienko, L. Shlapatska, D. Gluzman, S. Sidorenko / CD150 and CD180 are negative regulators of IL-10 expression and secretion in chronic lymphocytic leukemia B cells // Neoplasma. – 2021. – Vol. 68, N4. - P. 760-769. *(Дисертантом проведено основну частину експериментальної роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті).*

5. Спосіб прогнозування чутливості до дії хіміопрепаратів при хронічному лімфолейкозі: інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №212-2019 / Сидоренко С.П., Шлапацька Л.М., Гордієнко І.М, Щербіна В.М., Скляренко Л.М., Іванівська Т.С., Поліщук А.С.; МОЗ України, Укрмедпатентінформ. – Київ: Укрмедпатентінформ, 2019. – 4с.
6. V. Kholodniuk, I. Gordiienko, V. Huryn, T. Ivanivskaya, L. Shlapatska / In vitro sensitivity of CLL B cells to chemotherapy agents is depend on CD150 and CD180 cell surface expression level // Тези науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопаталогією», 4-5 лютого 2019 р., м. Київ, Україна. Онкологія. – 2019. – Т. 21, N 1(79). - С.75.
7. V. Kholodniuk, V. Huryn, I. Gordiienko, L. Shlapatska / CD150 and CD180 cell surface receptors are negative regulators of IL-6 and IL-10 mRNA expression in chronic lymphocytic leukemia B cells // Тези XV міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 9-11 квітня 2019 р., м.Львів, Україна. – 2019. – С. 81.
8. V. Shcherbina, I. Gordiienko, T. Ivanivskaya, L. Shlapatska / Connection between cell surface receptor status of CLL B cells and their sensitivity to chemotherapy agents ex vivo // 6-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 18-21 червня 2019 р., м.Яремче, Україна. – 2019. – С. 119.
9. V. Shcherbina, I. Gordiienko, T. Ivanivskaya, L. Shlapatska / CD150 is a positive regulator of CD20 expression in chronic lymphocytic leukemia B cells // Тези II міжнародної конференції «Tumor and Host: Novel Aspects of Old Problem», 21-22 листопада 2019 р., м.Київ, Україна. Experimental Oncology. – 2019. – Vol. 41, N3. - P. 276.
10. V. Shcherbina, I. Gordiienko, L. Shlapatska / CD150 and CD180 receptors are negative regulators of IL-10 expression and secretion in chronic lymphocytic leukemia B cells // Тези XVI міжнародної наукової конференції студентів і

аспірантів «Молодь і поступ біології», 27-29 квітня 2020 р., м.Львів, Україна. – 2020. – С. 134.

Відомості про апробацію результатів дисертації

1. Науково-практична конференція молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопаталогією» (м. Київ, 2019 р.) – усна доповідь.
2. XV міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (м.Львів, 2019 р.) – усна доповідь.
3. 6-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (м.Яремче, 2019 р.) – тези.
4. II міжнародна конференція «Tumor and Host: Novel Aspects of Old Problem», (м.Київ, 2019 р.) – постерна доповідь.
5. XVI міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (м.Львів, 2020 р.) – усна доповідь.