

В.М. Щербіна
І.М. Гордієнко

Інститут експериментальної
патології, онкології
і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: хронічний
лімфолейкоз, В-лімфоцити,
Toll-подібні рецептори,
рецептор CD150.

ВПЛИВ АКТИВАЦІЇ TOLL-ПОДІБНИХ РЕЦЕПТОРІВ НА РІВЕНЬ ЕКСПРЕСІЇ CD150 У ЗЛОЯКІСНО ТРАНСФОРМОВАНИХ В-ЛІМФОЦИТАХ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ЛІМФОЛЕЙКОЗ

Хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ) є найбільш поширеною нозологічною формою лімфопрліферативних захворювань, які діагностують у дорослого населення. Молекулярна варіабельність злоякісно трансформованих В-лімфоцитів, зумовлена як генетичними альтераціями, так і станом внутрішньоклітинних сигнальних мереж, лежить в основі формування гетерогенності біологічних властивостей клітин, що безпосередньо пов'язано з особливостями клінічної картини перебігу захворювання та відповіддю хворих на застосування хіміотерапії. Значна увага під час дослідження ХЛЛ приділяється вивченню особливостей експресії сигнальних молекул та стану відповідних рецептор-опосередкованих сигнальних шляхів. Доведено, що експресія рецептора CD150 на плазматичній мембрані злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ може вказувати на різницю в чутливості клітин до цитотоксичної дії хіміопрепаратів. Більше того, шляхом безпосередньої активації рецептора CD150 з використанням моноклональних антитіл було продемонстровано, що CD150-опосередкований сигнальний шлях безпосередньо задіяний у регуляції чутливості В-лімфоцитів до хіміопрепаратів. **Мета:** визначити можливість регуляції експресії рецептора CD150 у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ шляхом активації TLR2/6 та TLR4-опосередкованих сигнальних каскадів. **Об'єкт і методи:** дослідження проводили на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах, виділених із периферичної крові хворих на ХЛЛ. Рівень експресії CD150 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів оцінювали непрямим варіантом імунофлуоресцентного методу для імунофенотипування клітин з використанням проточної цитометрії. Метод кількісної полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу та вестерн-блот аналіз використовували для визначення рівня експресії мРНК та білка CD150 у В-лімфоцитах після стимуляції TLR2/6 та TLR4. Кількість життєздатних В-лімфоцитів визначали за допомогою резазурину з метою аналізу зміни чутливості В-лімфоцитів до дії хіміопрепаратів за умови попередньої активації досліджуваних TLR. **Результати:** продемонстровано, що активація TLR4 та TLR2/6-опосередкованих сигнальних шляхів призводить до підвищення рівня експресії мРНК mCD150, pCD150 та sCD150 ізоформ CD150 рецептора. Встановлено, що, окрім впливу на рівні мРНК, активація TLR4 та TLR2/6 також позитивно регулює експресію білка CD150 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ. Однак разом з тим не спостерігається транслокація рецептора CD150 на плазматичну мембрану клітин. Активація сигнальних шляхів, опосередкована зв'язуванням TLR4 та TLR2/6 з відповідними агоністами, призводить до зниження чутливості клітин до бендамустину та циклофосфаміду в монорежимі, однак натомість підвищує чутливість до флударабіну як в монорежимі, так і за умови комбінованої дії флударабіну та циклофосфаміду. **Висновок:** отримані результати свідчать, що стан активації TLR4 та TLR2/6-опосередкованих сигнальних шляхів є одним із факторів, які залучені до регуляції рівня експресії рецептора CD150, однак не впливає на експресію CD150 на плазматичній мембрані. Разом з тим TLR4 та TLR2/6 залучені до регуляції ступеня чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до цитотоксичної дії хіміопрепаратів ex vivo.

Згідно зі статистичними даними ВООЗ, хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ) займає провідні позиції у списку найбільш розповсюджених нозологічних форм лімфопроліферативних захворювань і за кількістю щорічно діагностованих випадків займає третій шабель, поступаючись місцем лише дифузній В-крупноклітинній лімфомі та пухлинам плазмодитарного походження [1, 2]. Щодо показників захворюваності на ХЛЛ у світі, то, за останніми даними канцер-реєстру США, цей показник зареєстровано на рівні 4,9 на 100 тис. населення; тоді як для країн Азії ХЛЛ взагалі є досить рідкісним захворюванням, яке діагностують лише на рівні 0,1–0,2 на 100 тис. населення [3, 4]. В українському канцер-реєстрі Національного інституту раку надано статистичну інформацію щодо кількості нових випадків захворювання на лейкемії загалом, без поділу на окремі нозології. Згідно з останньою редакцією цей показник знаходиться на досить високому рівні та становить 7,4 на 100 тис. населення [5].

Значна молекулярна варіабельність є однією з ключових особливостей злоякісно трансформованих В-лімфоцитів при ХЛЛ, яка зумовлює стан внутрішньоклітинних сигнальних шляхів та, відповідно, зумовлює різні біологічні властивості клітин, що безпосередньо лежить в основі гетерогенності відповіді хворих на застосування хіміотерапії [6, 7]. Останнім часом спостерігається все більш виражена тенденція до переходу на персоналізований характер лікування пацієнтів з метою підвищення ефективності та нівелювання можливих ускладнень. Щодо ХЛЛ наразі накопичено достатньо великий масив даних стосовно молекулярно-генетичних маркерів, що диференційно експресовані при цьому захворюванні, і статус експресії яких корелює з показниками прогнозу перебігу ХЛЛ [8].

У попередніх дослідженнях нами було виявлено, що статус експресії рецепторів CD150 та CD180 на плазматичній мембрані злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ може вказувати на різницю в їх чутливості до цитотоксичної дії хіміопрепаратів. Зокрема, фенотип CD150⁺CD180⁺ В-лімфоцитів асоційований з високими показниками чутливості цих клітин до флударабіну (ФЛ) та циклофосфаміду (ЦФ), що входять до ключових схем хіміотерапії при цій нозології [9]. Більше того, активація CD150 та CD180-опосередкованих сигнальних шляхів у В-лімфоцитах *ex vivo* з використанням відповідних моноклональних антитіл (МкАт) призводить до значного зростання цитотоксичного впливу бендамустину (БН) на злоякісно трансформовані В-лімфоцити. Отримані дані вказують на наявність безпосереднього зв'язку між станом сигнальних шляхів, опосередкованих активацією CD150 та CD180 рецепторів, та чутливістю В-лімфоцитів до дії БН.

Зважаючи на зв'язок між експресією CD150 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ та чутливістю клітин до хіміопрепа-

ратів, наша подальша робота була присвячена пошуку можливих шляхів підвищення рівня експресії CD150 на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах при ХЛЛ. Наразі відомо, що позитивними регуляторами рівня експресії CD150 на Т-лімфоцитах виступають рецептори CD3 та CD28, тоді як активація CD20, CD40 і CD180-опосередкованих сигнальних шляхів підвищує рівень експресії CD150 на В-лімфоцитах [10, 11]. На рівень експресії CD150 впливають бактеріальні та вірусні агенти, що в контексті частих ускладнень при ХЛЛ у вигляді супутніх інфекційних захворювань є достатньо цікавим фактом. Зокрема, відомо, що ліпополісахариди (lipopolysaccharide — LPS), продуковані бактеріями, підвищують рівень експресії CD150 у клітинах моноцитарно-макрофагального ряду, а білки вірусу Епштейна — Барр EBNA-2 і LMP1 активують експресію CD150 на В-лімфоцитах [11, 12].

Поруч з LPS, Toll-подібні рецептори (Toll-like receptor — TLR) 2/4/6 відповідають за розпізнавання консервативних структурних елементів бактеріальних агентів (патоген-асоційовані молекулярні патерни; pathogen-associated molecular patterns — PAMPs). Активація зазначених TLRs призводить до індукції експресії CD150 на поверхні макрофагів та дендритних клітин [13, 14].

Враховуючи вищезазначене, метою цієї роботи було визначення можливості регуляції експресії рецептора CD150 у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ шляхом активації TLR2/6 та TLR4-опосередкованих сигнальних каскадів в умовах експерименту *ex vivo*.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для проведення досліджень було використано зразки злоякісно трансформованих В-лімфоцитів, виділених із периферичної крові 8 пацієнтів з ХЛЛ, що перебували на обліку в гематологічних відділеннях онкологічних лікарень України. Усі пацієнти були поінформовані про використання їхнього біологічного матеріалу в наукових цілях та надали письмову згоду на проведення дослідження. Верифікацію діагнозу ХЛЛ проводили співробітники відділу онкогематології Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) ім. Р.Є. Кавецького НАН України на основі аналізу даних імунофенотипового, цитохімічного та морфологічного досліджень.

Фракцію мононуклеарів, яка при ХЛЛ на 90–95% представлена злоякісно трансформованими В-лімфоцитами, виділяли шляхом центрифугування периферичної крові пацієнтів на градієнті щільності Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Норвегія). Експресію рецептора CD150 на плазматичній мембрані злоякісно трансформованих В-лімфоцитів визначали за допомогою непрямого варіанту імунофлуоресцентного методу на проточному цитофлуориметрі Beckman Coulter EPICS XL (США). Рівень експресії CD150 оцінювали

за співвідношенням середньої геометричної інтенсивності флуоресценції клітин (GeoMFI) після взаємодії з анти-CD150 МкАт (ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України) до GeoMFI клітин, що взаємодіяли з ізотиповими антитілами МОРС-21 (Abcam, Великобританія) (GeoMean ratio); обидва кон'юговані із флуорохромним барвником FITC (флуоресцеїн ізотіоціанат). Випадок ХЛЛ вважався позитивним за експресією CD150 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів у разі, якщо співвідношення GeoMean $\geq 1,3$.

Для стимуляції TLR-опосередкованих сигнальних шляхів у В-лімфоцитах до середовища культивування клітин додавали відповідні агоністи TLR4 та TLR2/TLR6 (обидва від InvivoGen, США). Досліджувані концентрації K12LPS (агоніст TLR4) становили 50 нг/мл, 100 нг/мл та 200 нг/мл, а FSL-1 (агоніст TLR2/6) — 100 нг/мл, 200 нг/мл та 400 нг/мл. Клітини культивували у середовищі RPMI-1640, що містило 10% ембріональної телячої сироватки та 2 μ M L-глутаміну за стандартних умов (37 °C в атмосфері, що містить 5% CO₂). Для визначення впливу активації TLRs на рівень експресії мРНК ізоформ рецептора CD150 реакцію зупиняли через 4 год культивування, а у разі подальшого аналізу зміни рівня експресії загального білка CD150 — через 48 год шляхом додавання до клітин холодного фосфатно-сольового буфера (Phosphate buffered saline — PBS) із 0,1% NaN₃.

Для виділення тотальної мРНК використовували лізуючий розчин TRIzol (Sigma, США) згідно з протоколом виробника. З отриманої мРНК дали синтезували комплементарну ДНК з використанням комерційного набору RevertAid cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США) на ампліфікаторі GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, США) відповідно до програми: 5 хв, 65 °C; 60 хв, 42 °C. Визначення рівня експресії мРНК ізоформ рецептора CD150 проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у режимі реального часу; ампліфікаційна суміш містила 2 мкл кДНК, 2x SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, США), а також прямий і зворотній праймери (у концентрації 25 рМ кожен). Зміну відносного рівня експресії досліджуваних генів обраховували за формулою $2^{-\Delta\Delta Ct}$; у якості ендogenous контролю використовували ген *TBP*. Нуклеотидні послідовності праймерів, які використовували у дослідженні, наведено в табл. 1; для підбору праймерів використовували інтернет-ресурс NCBI, розділ BLAST; синтез підібраних праймерів замовляли у виробника Invitrogen (США).

Таблиця 1

Нуклеотидні послідовності праймерів, використаних у дослідженні

Назва гена	Прямий праймер (5'→3')	Зворотній праймер (3'→5')
<i>TBP</i>	ccactcacagactctacaac	ctgcggtacaatcccagaact
<i>mCD150</i>	gtgtatgctggcgttagg	agaggtaaacgaaccattacca
<i>nCD150</i>	tgagaagaagaccacttga	gggtcgtttaccatgggaag
<i>sCD150</i>	agaccsctcaggtaaaacg	tctggacttggcatagatcg

Для виділення загальної фракції білка з клітин до злякисно трансформованих В-лімфоцитів додавали лізуючий розчин (20 мМ трис-НСІ рН 8, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЕДТА, 1 мМ EGTA, 1% Triton X100), що обов'язково містив у складі інгібітори протеаз та фосфатаз. Лізуючий розчин вносили з розрахунку 250 мкл на 10×10^6 клітин і проводили виділення білків згідно зі стандартним протоколом. Для визначення фракції білка CD150 зразки розділяли методом електрофорезу в 10% поліакриламідному гелі з наступною детекцією непрямим методом з використанням первинних МкАт миші проти CD150 (ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького) та первинних МкАт кози проти актину (Santa Cruz Biotechnology, США), що використовувався в якості контролю рівномірності нанесення зразку в лунки; та вторинних поліклональних антитіл кроля проти імуноглобулінів миші та поліклональних антитіл осла проти імуноглобулінів кози, мічених пероксидазою хрому (Sigma-Aldrich, США).

З метою визначення можливості впливу активації TLRs на ступінь чутливості злякисно трансформованих В-лімфоцитів до дії хіміопрепаратів клітини культивували за наявності агоністів K12LPS та FSL-1 протягом 24 год, після чого до середовища культивування вносили хіміопрепарати та культивували ще протягом 48 год за стандартних умов. Для дослідження було обрано хіміопрепарати, що активно використовуються в клінічній практиці для лікування хворих на ХЛЛ, а саме: ФЛ (S.C. Sindan-Pharma S.R.L., Румунія), ЦФ (Baxter Healthcare Corporation, Німеччина) та БН (S.C.Sindan-Pharma S.R.L., Румунія). Цитотоксичну дію хіміопрепаратів щодо В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ визначали за допомогою резазурину (Sigma-Aldrich, США), який дозволяє виявити кількість життєздатних клітин. Фінальна концентрація хіміопрепаратів становила для БН та ЦФ 10 мкг/мл, для ФЛ — 5 мкг/мл. За умови комбінованої дії ФЛ та ЦФ концентрації становили 2 мкг/мл та 4 мкг/мл відповідно.

Аналіз та обробку отриманих результатів здійснювали в програмному забезпеченні GraphPad Prism 8 з використанням критерію Манна — Уїтні для непараметричних даних. Дані представлені графічно у вигляді медіани значень показника досліджуваних груп. Різниця між досліджуваними групами вважалася достовірною за умови $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі роботи визначали, чи впливає активація поверхневих рецепторів TLR4 та TLR2/6 на рівень експресії мРНК ізоформ рецептора CD150 у злякисно трансформованих В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ. Для цього було відібрано зразки злякисно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ, негативні за експресією CD150 (CD150⁻), які культивували за наявності агоністів TLR4 та FSL-1. Показники рівня експресії мРНК ізоформ

CD150 у злякисно трансформованих В-лімфоцитах, які культивували за тих самих умов без додавання агоністів до середовища культивування, враховували як референтні.

Активация TLR4-опосередкованого сигнального шляху в результаті впливу агоніста K12LPS у концентраціях 100 та 200 нг/мл призводила до достовірного зростання рівня експресії мРНК ізоформ mCD150 та sCD150 ($p < 0,05$), підвищення рівня експресії мРНК nCD150 щодо показників контролю виявлено на рівні тенденції ($p > 0,05$, рис. 1, а–в). Цікавим є той факт, що за умови впливу низьких доз K12LPS (50 нг/мл) на В-лімфоцити хворих на ХЛЛ *ex vivo* спостерігається різноспрямований ефект на зміни в експресії мРНК ізоформ CD150. Зокрема, було відмічено достовірне підвищення рівня експресії мРНК mCD150 ($p < 0,05$, див. рис. 1, а), тоді як показники рівня експресії мРНК ізоформи nCD150 були нижчими за референтні ($p < 0,05$, див. рис. 1, б).

Результатом активації сигнальних шляхів, опосередкованих зв'язуванням FSL-1 із TLR2/6 на В-лімфоцитах, було підвищення рівня експресії мРНК усіх досліджуваних ізоформ CD150 незалежно від концентрації агоніста в культуральному середовищі. Найбільший вплив FSL-1 спостерігався щодо nCD150 ізоформи, свідченням чого є підвищення показника відносного рівня експресії мРНК nCD150 більш як у 3 рази порівняно з референтними показниками ($p < 0,05$, рис. 1, б). Отже, активация TLR4- та TLR2/6-опосередкованих сигнальних шляхів індукує підвищення рівня експресії мРНК CD150 у злякисно трансформованих В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ.

Далі нами було проаналізовано вплив активації TLR4 та TLR2/6 на рівень експресії білка CD150 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ. Культивування злякисно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ із K12LPS та FSL-1 призводило до зростання у них рівня експресії білка CD150 в середньому в 2 рази (рис. 2, а). Варто зазначити, що у хворих на ХЛЛ, В-лімфоцити яких не експресували CD150 на рівні білка, в результаті активації рецепторів TLR4 та TLR2/6 відмічено синтез білка CD150 у клітинах *de novo* (рис. 2, б).

Оскільки нами було виявлено факт наявності білка CD150 у В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ, ми вважали за доцільне з'ясувати вплив активації досліджуваних Toll-подібних рецепторів на експресію CD150 на плазматичній мембрані CD150-клітин. Було встановлено, що активация TLR4 та TLR2/6 CD150-В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ протягом 48 год агоністами K12LPS та FSL-1 не призводить до транслокації рецептора CD150 на плазматичну мембрану (рис. 3).

Підсумовуючи вищенаведене, можна зробити висновок, що результатом активації TLR4 та TLR2/6-опосередкованих сигнальних шляхів у злякисно трансформованих В-лімфоцитах хво-

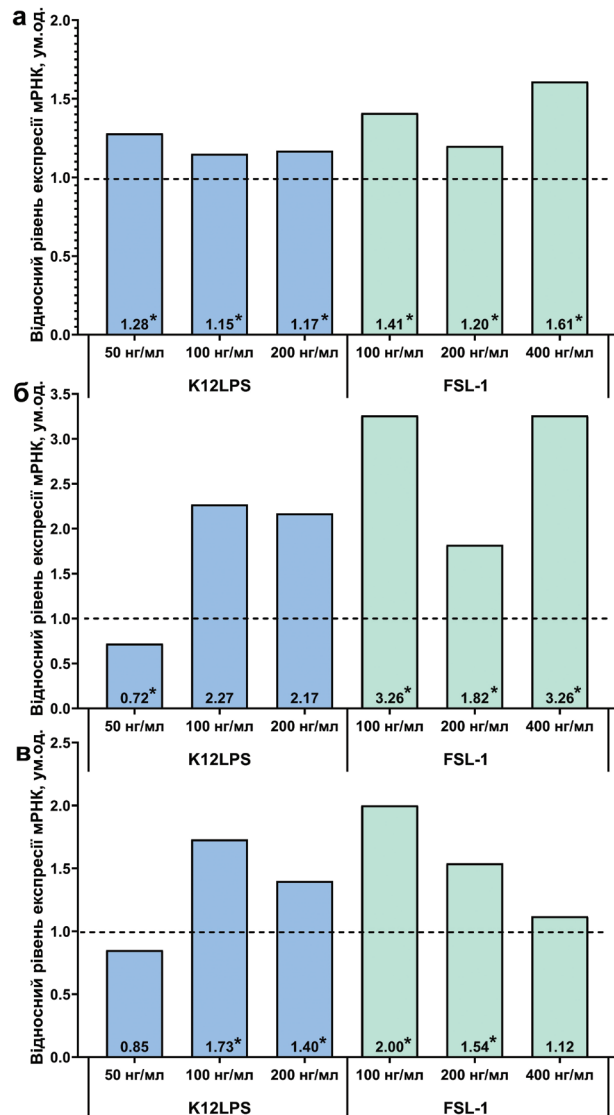


Рис. 1. Експресія мРНК mCD150- (а), nCD150- (б) та sCD150-ізоформ (в) рецептора CD150 у злякисно трансформованих В-лімфоцитах при ХЛЛ після активації TLR4 та TLR2/6 агоністами K12LPS та FSL-1 відповідно. Результати кількісної ПЛР в режимі реального часу, нормалізацію проведено за рівнем експресії ТВР (TATA-box binding protein). Дані представлені у вигляді медіани значень, ум.од. * $p < 0,05$ порівняно з контролем, що приймався за одиницю (пунктирна лінія)

рих на ХЛЛ є підвищення експресії CD150 на рівні мРНК і білка. Однак при цьому не спостерігається появи рецептора CD150 на плазматичній мембрані.

Згідно з нашими попередніми результатами, статус експресії рецептора CD150 на В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ асоційований із чутливістю клітин до цитотоксичної дії хіміопрепаратів *ex vivo* [9]. Незважаючи на той факт, що активация TLR4 та TLR2/6 на злякисно трансформованих В-лімфоцитах не індукує появу рецептора CD150 на плазматичній мембрані, встановлена зміна рівня експресії мРНК та білка CD150 може певним чином впливати на біологічні властивості клітин. Тому надалі порівнювали чутливість злякисно

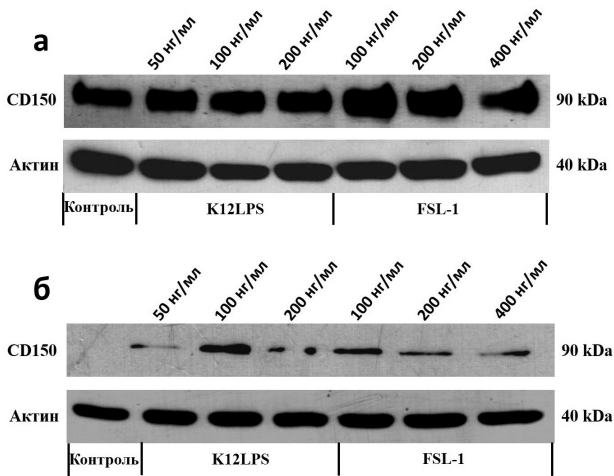


Рис. 2. Експресія білка CD150 у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ після активації TLR4 та TLR2/6 агоністами K12LPS та FSL-1 відповідно. Результати вестерн-блот-аналізу. У якості контролю за рівномірністю нанесення білка в лунки використовували експресію β-актину

трансформованих В-лімфоцитів до дії цитотоксичних препаратів *ex vivo* за умови попередньої активації TLR4 та TLR2/6-опосередкованих сигнальних шляхів.

На основі отриманих результатів щодо впливу агоністів K12LPS та FSL-1 на рівень експресії CD150 в злоякісно трансформованих В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ для подальшого аналізу рівня життєздатності клітин було обрано ті концентрації агоністів, за яких зміна експресії CD150 була найбільш вираженою. У разі FSL-1 було обрано концентрацію 100 нг/мл, при застосуванні якої спостерігали

максимальне підвищення рівня експресії мРНК усіх досліджуваних ізоформ CD150. Для K12LPS було обрано дві дози: 100 нг/мл, за якої спостерігали найбільше підвищення рівня експресії мРНК усіх ізоформ CD150; 50 нг/мл — враховуючи різноспрямованість ефекту цієї дози на рівень експресії мРНК окремих ізоформ CD150. У якості контролю використано значення показників життєздатності злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ, що культивували із хіміопрепаратами без попередньої лігації TLR4 та TLR2/6, і які приймали за 100%.

Встановлено, що в результаті дії K12LPS та FSL-1 у концентрації 100 нг/мл кількість життєздатних В-лімфоцитів після культивування із БН зростає порівняно з контролем (рис. 4). Тобто активація TLR4-опосередкованих сигнальних шляхів призводить до зниження чутливості клітин до дії БН *ex vivo*. Аналогічний ефект було встановлено стосовно показників життєздатності злоякісно трансформованих В-лімфоцитів щодо цитотоксичної дії ЦФ у монорежимі після культивування клітин з K12LPS в обох робочих концентраціях та FSL-1. При культивуванні В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ із ФЛ у монорежимі, а також за умови комбінованої дії ФЛ із ЦФ *ex vivo* характер зміни показників життєздатності В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ залежав від концентрації агоністів. Зокрема, вплив K12LPS у концентрації 50 нг/мл дещо знижував ефективність дії ФЛ у монорежимі порівняно з контролем, однак підвищення концентрації K12LPS до 100 нг/мл, а також використання агоністу FSL-1 призводило до підвищення чутливості клітин до ФЛ майже в 2 рази (див. рис. 4).

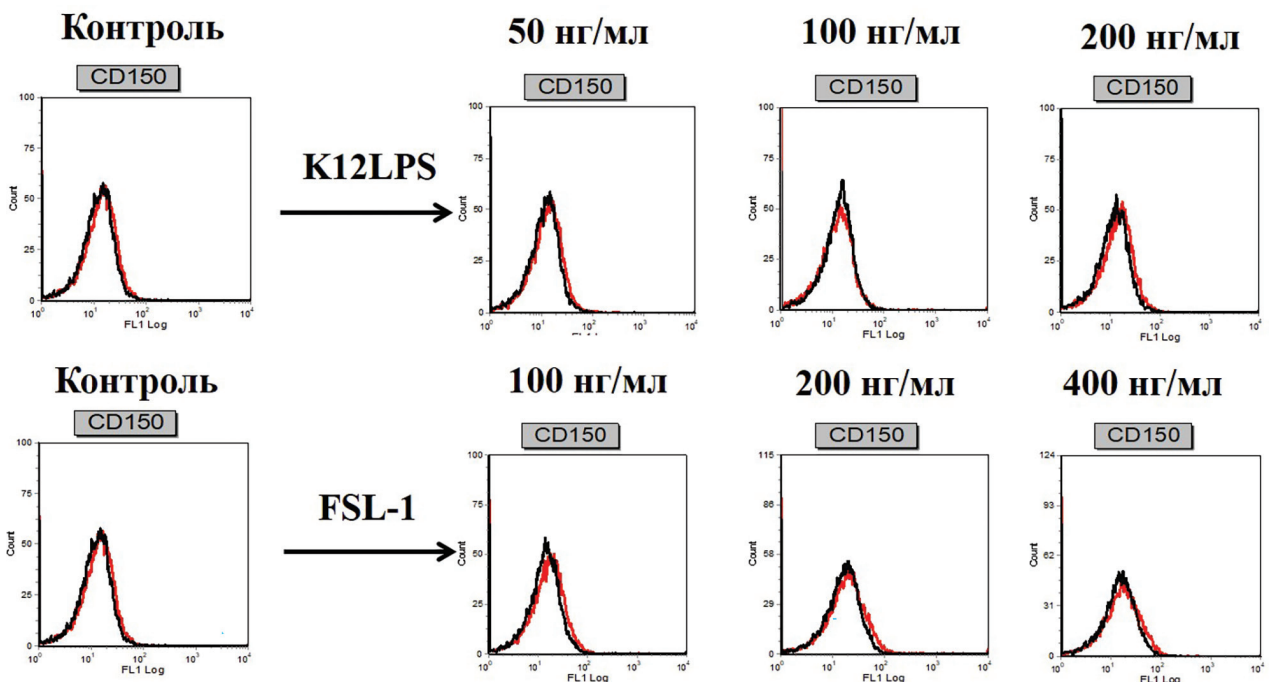


Рис. 3. Експресія рецептора CD150 на плазматичній мембрані злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до (контроль) та після активації TLR4 та TLR2/6 агоністами K12LPS та FSL-1. Репрезентативні гістограми одного з проаналізованих випадків. Результати проточної цитометрії

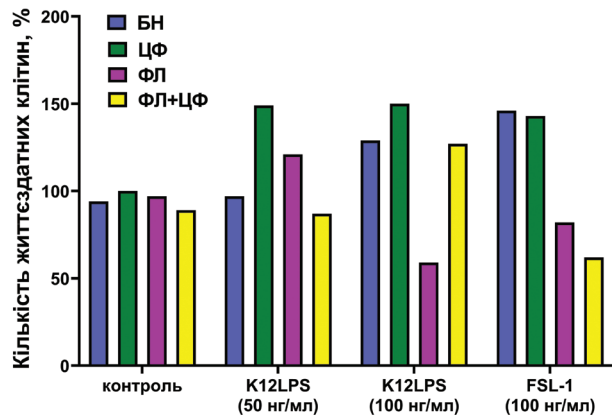


Рис. 4. Життєздатність злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ у результаті дії хіміопрепаратів *ex vivo* за умови попередньої лігації TLR4 та TLR2/6 агоністами K12LPS та FSL-1 відповідно. Репрезентативний результат з проаналізованих випадків ХЛЛ. ФЛ — флударабін

При комбінованому застосуванні ФЛ та ЦФ активація TLR4-опосередкованого сигнального шляху відповідним агоністом у низьких дозах (50 нг/мл) не впливала на показники життєздатності клітин. Ефективність цитотоксичної дії досліджуваних хіміопрепаратів щодо В-лімфоцитів за умови попереднього культивування клітин з агоністами K12LPS та FSL-1 (у концентраціях 100 нг/мл) була різною. Відмічено підвищення ефективності дії хіміопрепаратів за умови попередньої активації рецепторів TLR2/6, наслідком впливу K12LPS на TLR4 є зниження чутливості В-лімфоцитів до дії ФЛ із ЦФ в середньому на 40%. Отже, активація TLR4 та TLR2/6 призводить до зміни ступеня чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії БН, ФЛ та ЦФ *ex vivo*, однак це питання потребує подальшого вивчення, враховуючи різноспрямованість виявленого ефекту залежно від концентрації агоністів.

Таким чином, виявлено факт прямого залучення внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, опосередкованих активацією TLR4 та TLR2/6, до регуляції експресії CD150 як на рівні мРНК, так і на білковому рівні. Отримані результати доповнюють наявні дані щодо залучення TLRs до регуляції експресії поверхневих рецепторів на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах при ХЛЛ. Зокрема, відомо, що активація TLR9 призводить до значного підвищення рівня експресії CD38, CD86 та CD95 на плазматичній мембрані В-лімфоцитів при ХЛЛ, тоді як експресія рецептора CD40 позитивно регулюється через TLR7 та TLR9-опосередковані сигнальні шляхи [15, 16].

Слід зазначити, що порівняно з В-лімфоцитами умовно здорових донорів, рівень експресії TLR2 та TLR4 на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах при ХЛЛ є зниженим. У цілому TLR2^{low}/TLR4^{low}-фенотип клітин асоційований з відомими ознаками несприятливого прогнозу для пацієнтів (напри-

клад: стадія В/С за Rai, наявність делецій 17p та 11q, CD38⁺Zap70⁺-фенотип), а також низькими показниками загальної виживаності та коротшими термінами індолентної форми перебігу захворювання до моменту необхідності призначати лікування [17, 18]. Рівень сигналу TLRs на плазматичній мембрані В-лімфоцитів може залежати від локалізації клітин. Злоякісно трансформовані В-лімфоцити, які локалізуються в межах лімфатичного вузла, експресують TLR1/2/4/6/7/8/9 та TLR10 на значно вищому рівні, ніж циркулюючі клітини периферичної крові [19]. Незважаючи на низьку експресію TLRs при ХЛЛ, цей рівень все ж є достатнім для активації відповідних сигнальних шляхів і модуляції біологічних властивостей клітин.

Результати дослідження ймовірності існування зв'язку між станом активації TLR4- та TLR2/6-опосередкованих сигнальних шляхів та чутливістю В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичної дії хіміопрепаратів показали, що активація вищезазначених сигнальних шляхів призводить до підвищення чутливості В-лімфоцитів до ФЛ в монорежимі та за умови його комбінованої дії із ЦФ. Одним із свідчень на користь наявності безпосереднього впливу активації TLR4 та TLR2/6 на зміну чутливості клітин до хіміопрепаратів через ймовірне залучення CD150 є те, що дія K12LPS та FSL-1 достовірно підвищує рівень експресії мРНК ізоформи mCD150, що, як показано нами раніше, корелює з високою чутливістю В-лімфоцитів саме до дії ФЛ [9]. Описані в цій роботі результати стосовно показників життєздатності В-лімфоцитів після дії ФЛ *ex vivo* за умови попередньої лігації TLR4 та TLR2/6 підтвердили нашу гіпотезу про роль CD150 в регуляції біологічних властивостей В-лімфоцитів, зокрема їх відповіді на дію ФЛ.

У разі комбінованої дії ФЛ із ЦФ, спостерігається підвищення чутливості злоякісно трансформованих CD150⁺ В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії зазначених препаратів [9], однак аналогічний ефект нами було відмічено лише за умов активації TLR2/6, але не TLR4. Хоча під час оцінки відповіді злоякісно трансформованих В-лімфоцитів на дію ЦФ в монорежимі зміну характеру чутливості клітин до впливу препарату відмічено при застосуванні обох агоністів. Ймовірно, такий феномен може бути зумовлений домінуванням впливу ФЛ (та модуляцією цитотоксичного ефекту переважно саме цього препарату щодо В-лімфоцитів) при комбінованому застосуванні ФЛ із ЦФ. Однак для спростування або підтвердження цієї гіпотези необхідним є проведення додаткових досліджень.

Хоча попередньо нами не було виявлено різниці в чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії БН *ex vivo* [9], в цій роботі відмічено, що попередня активація TLR4 та TLR2/6-опосередкованих сигнальних шляхів призводить до зниження чутливості клітин до впливу цього хіміопрепарату. Вірогідно, мо-

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

дуляція відповіді клітин на цитотоксичну дію БН відбувається із залученням інших, не залежних від експресії CD150 сигнальних шляхів. Враховуючи продемонстровану позитивну регуляцію рівня експресії CD150 внаслідок дії агоністів K12LPS та FSL-1 та відомості щодо значного зниження життєздатності В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ у разі дії БН за умови лігації CD150 на плазматичній мембрані, слід було очікувати підвищення ефективності БН *ex vivo*. Можливо, відсутність такого ефекту зумовлена тим, що активація TLR4 та TLR2/6 не призводить до транслокації рецептора CD150 на плазматичну мембрану злоякісно трансформованих В-лімфоцитів, і, таким чином, не є достатньою умовою для підвищення чутливості до БН. Наразі існують дані щодо залучення низки TLRs у процес регуляції рівня чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії хіміопрепаратів. Зокрема, активація TLR1/2, TLR2/6 та TLR9 з використанням відповідних агоністів призводила до достовірного зниження чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до дії ФЛ незалежно від концентрації останнього. До того ж найбільш вираженим є ефект підвищення резистентності В-лімфоцитів до ФЛ-індукованого апоптозу при активації TLR9-опосередкованого сигнального шляху, що посилюється у разі наявності ознак несприятливого прогнозу для пацієнта (немутований статус *IGHV*-генів, CD38⁺-фенотип, наявність хромосомних аберацій) [20]. Разом з тим показано підвищення чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів до кладрибіну внаслідок застосування агоністів TLR7 та TLR9 *ex vivo*, що проявлялося у збільшенні кількості некротичних клітин у досліджуваному зразку в середньому на 14% [15].

ВИСНОВКИ

1. Активація TLR4 -та TLR2/6-опосередкованих сигнальних шляхів у злоякісно трансформованих В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ *ex vivo* призводить до достовірного підвищення рівнів експресії мРНК mCD150-, nCD150- та sCD150-ізоформ рецептора CD150.

2. Внаслідок культивування злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ з агоністами TLR4 та TLR2/6 *ex vivo* рівень загального білка CD150 в клітинах достовірно підвищується, однак при цьому не спостерігається транслокація рецептора CD150 на плазматичну мембрану клітин.

3. Стан активації TLR4 та TLR2/6 і відповідних сигнальних шляхів впливає на ступінь чутливості злоякісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії хіміопрепаратів *ex vivo*. Зокрема, активація TLR4 та TLR2/6 призводить до зниження чутливості клітин до БН та ЦФ в монорежимі, однак натомість підвищує чутливість до флударабіну як в монорежимі, так і за умови комбінованої дії флударабіну та циклофосфаміду.

1. Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology. J epidemiol glob health 2019; 9 (4): 217–22. doi: 10.2991/jegh.k.191008.001.

2. Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, et al. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. CA: a cancer journal for clinicians 2016; 66 (6): 443–59. doi: 10.3322/caac.21357.

3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. CA: a cancer journal for clinicians 2020; 70 (1): 7–30. doi: 10.3322/caac.21590.

4. Chihara D, Ito H, Matsuda T, et al. Differences in incidence and trends of haematological malignancies in Japan and the United States. Br J Haematol 2014; 164 (4): 536–45. doi: 10.1111/bjh.12659.

5. Fedorenko ZP, Kutsenko LB, Ryzhov AY. Cancer in Ukraine, 2020–2021. Bull National Cancer Registry of Ukraine 2022; 23: 1–132 (in Ukrainian).

6. Lee J, Wang YL. Prognostic and predictive molecular biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. J Mol Diagn 2020; 22 (9): 1114–25. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.06.004.

7. Sharma S, Rai KR. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) treatment: So many choices, such great options. Cancer 2019; 125 (9): 1432–40. doi: 10.1002/cncr.31931.

8. Yosifov DY, Wolf C, Stilgenbauer S, et al. From biology to therapy: the CLL success story. HemaSphere 2019; 3 (2): e175. doi: 10.1097/HS9.000000000000175.

9. Shcherbina V, Gordiienko I, Shlapatska L, et al. Sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells to chemotherapeutic drugs *ex vivo* depends on expression status of cell surface receptors. Exp oncol 2020; 42 (1): 16–24. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-1.14093.

10. Sidorenko SP, Clark EA. Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. J Immunol 1993; 151 (9): 4614–24.

11. Gordiienko I, Shlapatska L, Kovalevska L, et al. SLAMF1/CD150 in hematologic malignancies: Silent marker or active player? Clin immunol 2019; 204: 14–22. doi: 10.1016/j.clim.2018.10.015.

12. Takeda S, Kanbayashi D, Kurata T, et al. Enhanced susceptibility of B lymphoma cells to measles virus by Epstein-Barr virus type III latency that upregulates CD150/signaling lymphocytic activation molecule. Cancer science 2014; 105 (2): 211–8. doi: 10.1111/cas.12324.

13. Grandjette C, Kennel A, Faure GC, et al. Expression of functional toll-like receptors by B-chronic lymphocytic leukemia cells. Haematologica 2007; 92(9): 1279–81. doi: 10.3324/haematol.10975.

14. Yurchenko M, Skjesol A, Ryan L, et al. SLAMF1 is required for TLR4-mediated TRAM-TRIF-dependent signaling in human macrophages. J cell biol 2018; 217 (4): 1411–29. doi: 10.1083/jcb.201707027.

15. Wolska A, Cebula-Obrzut B, Smolewski P, et al. Effects of Toll-like receptor 7 and Toll-like receptor 9 signaling stimulators and inhibitors on chronic lymphocytic leukemia cells *ex vivo* and their interactions with cladribine. Leuk Lymphoma 2013; 54 (6): 1268–78. doi: 10.3109/10428194.2012.741233.

16. Mongini PK, Gupta R, Boyle E, et al. TLR-9 and IL-15 synergy promotes the *in vitro* clonal expansion of chronic lymphocytic leukemia B cells. J immunol 2015; 195 (3): 901–23. doi: 10.4049/jimmunol.1403189.

17. Szymanska A, Bojarska-Junak A, Drobiecki A, et al. TLR2 expression on leukemic B cells from patients with chronic lymphocytic leukemia. Arch Immunol Ther Exp 2019; 67 (1): 55–65. doi: 10.1007/s00005-018-0523-9.

18. Barcellini W, Imperiali FG, Zaninoni A, et al. Toll-like receptor 4 and 9 expression in B-chronic lymphocytic leukemia: relationship with infections, autoimmunity and disease

progression. *Leuk Lymphoma* 2014; 55 (8): 1768–73. doi: 10.3109/10428194.2013.856426.

19. Dadashian EL, McAuley EM, Liu D, et al. TLR signaling is activated in lymph node-resident CLL cells and is only partially inhibited by ibrutinib. *Cancer res* 2019; 79 (2): 360–71. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0781.

20. Fonte E, Apollonio B, Scarfo L, et al. In vitro sensitivity of CLL cells to fludarabine may be modulated by the stimulation of Toll-like receptors. *Clin Cancer Res* 2013; 19 (2): 367–79. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1922.

THE EFFECT OF ACTIVATION OF TOLL-LIKE RECEPTORS ON THE CD150 EXPRESSION LEVEL IN MALIGNANT B-LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

V.M. Shcherbina, I.M. Gordiienko

RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine,
Kyiv, Ukraine

Summary. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common nosological form of lymphoproliferative diseases diagnosed in the adult population. The molecular variability of malignant B-lymphocytes, due to both genetic alterations and the state of intracellular signaling networks, underlies the formation of heterogeneity in the biological properties of cells, which is directly related to the features of the clinical course of the disease and the patients' response to chemotherapy. Major attention in CLL studying is paid to the characterization of the expression pattern of signaling molecules and the state of the corresponding receptor-mediated signaling pathways. It has been proven that the expression of the CD150 receptor on the plasma membrane of CLL B-lymphocytes may indicate a difference in the sensitivity of cells to the cytotoxic effect of drugs. Moreover, activation of the CD150 receptor using monoclonal demonstrated that the CD150-mediated signaling pathway is directly involved in regulating the sensitivity of CLL B-lymphocytes to drugs. **Aim:** to determine the possibility of regulating the CD150 expression in malignant B-lymphocytes of CLL patients by activating the TLR2/6 and TLR4-mediated signal-

ing pathways. **Object and methods:** the study was conducted on B-lymphocytes isolated from the peripheral blood of patients with CLL. The level of CD150 expression on the plasma membrane of B-lymphocytes was assessed by an indirect variant of the immunofluorescence method for immunophenotyping of cells using flow cytometry. Quantitative real-time PCR and western blot analysis were used to determine the level of CD150 mRNA and protein expression in B-lymphocytes after TLR2/6 and TLR4 stimulation. The number of viable B-lymphocytes was determined using resazurin in order to analyze changes in the cell sensitivity to chemotherapeutic drugs under the conditions of prior activation of the studied TLRs. **Results:** It was demonstrated that activation of TLR4 and TLR2/6-mediated signaling pathways leads to an increase in mRNA expression levels of mCD150, nCD150 and sCD150 isoforms of the CD150 receptor. In addition to the effect on the mRNA level, the activation of TLR4 and TLR2/6 also positively regulates the expression of the CD150 protein in CLL B-lymphocytes. However, translocation of the CD150 receptor to the plasma membrane of cells was not observed. The sensitivity of malignant B-lymphocytes depends on the state of activation of signaling pathways, mediated by the binding of TLR4 and TLR2/6 with the corresponding agonists. **Conclusion:** the obtained results indicate that the expression of the CD150 receptor in CLL B-lymphocytes, as well as cell sensitivity to the cytotoxic effect of chemotherapeutic drugs, depends on the state of activation of TLR4- and TLR2/6-mediated signaling pathways.

Key Words: chronic lymphocytic leukemia, B-lymphocytes, Toll-like receptors, CD150 receptor.

Адреса для листування:

Щербіна В.М.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України