

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол № _____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 2024 р.

**ІНФЕКЦІЙНИЙ СТАТУС НЕЛІКОВАНИХ ПАЦІЄНТІВ З
ПІДОЗРОЮ НА EBV ТА ХРОНІЧНИМ ЛІМФОЛЕЙКОЗОМ**

Кваліфікаційна робота
магістра
денної форми навчання
за спеціальністю «Біологія»
Назаренко Марії Андріївни

Науковий керівник від кафедри
канд. біол. наук, ст.н.с., доц.
Шевченко О.В.

Робота виконана на базі Інституту мікробіології та вірусології Ризького університету імені Страдіня під керівництвом д.б.н. Ірини Холоднюк

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. Вірус Епштейна-Барр	8
1.1. EBV – загальна інформація про вірус.....	8
1.2. EBV-асоційовані типи раку.....	11
1.3. Діагностика та антитіла до EBV.....	15
1.4. Антитіла до EBV та автоімунні захворювання.....	17
1.5. EBV та хронічний лімфолейкоз.....	18
РОЗДІЛ 2. Хронічний лімфолейкоз	21
2.1. CLL – загальна інформація про захворювання.....	21
2.2. Методи діагностики та лікування CLL	22
РОЗДІЛ 3. Рецептори В-клітин	29
3.1. Соматичні гіпермутації варіабельної ділянки імуноглобуліну	29
3.2. Статус мутацій у регіоні генів важкого ланцюга імуноглобуліну у діагностиці CLL	31
РОЗДІЛ 4. Матеріали та методи досліджень	33
4.1. Виділення моноклеарних клітин з периферійної крові пацієнтів методом градієнтного центрифугування	33
4.2. Виділення ДНК з моноклеарних клітин периферійної крові пацієнтів, використовуючи фенол-хлороформну екстракцію.....	34

4.3. Ампліфікація генів методом мультиплексної ПЛР.....	36
4.4. Виділення продуктів ПЛР IGHV з агарозного гелю після електрофорезу ДНК.....	38
4.5. Секвенування очищених продуктів ПЛР та аналіз послідовностей генів з використанням бази даних NCBI.....	39
4.6. ПЛР в реальному часі для виявлення ДНК EBV.....	40
4.7. Імуноферментний аналіз.....	41
4.8. Статистичний аналіз результатів.....	44
4.9. Етичні аспекти проведення досліджень	45
РОЗДІЛ 5. Результати досліджень та обговорення.....	46
5.1. CLL та стать.....	47
5.2. CLL та стадії захворювання.....	49
5.3. CLL та EBV.....	51
5.4. Мутаційний статус В-клітинного рецептора IGHV.....	54
5.5. Мутаційний статус В-клітинного рецептора IGHV та EBV.....	56
5.6. Мутаційний статус В-клітинного рецептора IGHV та рівні імуноглобулінів.....	58
5.7. Клінічні стадії пацієнтів з CLL та рівні імуноглобулінів.....	61
5.8. EBV та рівні імуноглобулінів.....	64
ВИСНОВКИ.....	69
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	70

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

EBV – Epstein Barr virus (вірус Епштейна-Барр)

CLL – Chronic lymphocytic leukaemia (хронічний лімфолейкоз)

NK - Natural killer cells (натуральні кілери)

IgV – immunoglobulin variable region (варіабельна ділянка імуноглобуліну)

IgH – immunoglobulin heavy chain (важкий ланцюг імуноглобуліну)

IgL – immunoglobulin light chain (легкий ланцюг імуноглобуліну)

IGHV – genes of the variable region of the immunoglobulin heavy chain (гени варіабельної ділянки важкого ланцюга імуноглобуліну)

NPC - nasopharyngeal carcinoma (назофарингальна карцинома)

GC – gastric carcinoma (карцинома шлунка)

HL - Hodgkin's lymphoma (лімфома Ходжкіна)

NHL - non-Hodgkin's lymphoma (неходжкінська лімфома)

BL - Burkitt's lymphoma (лімфома Беркітта)

DLBCL - diffuse large B-cell lymphoma (дифузна великоклітинна В-клітинна лімфома)

ENKTL-NT – extranodal NK/T-cell lymphoma of the nasal type (екстранодальна НК/Т-клітинна лімфома назального типу)

FISH - Fluorescence in situ hybridization (флуоресцентна гібридизація in situ)

EBV-CA – EBV capsid antigen (капсидний антиген EBV)

MA – EBV membrane antigen (мембранний антиген EBV)

EA - early antibodies to EBV (ранні антитіла до EBV)

EBNA1 - Epstein–Barr virus nuclear antigen 1 (ядерний антиген вірусу EBV)

SAD - systemic autoimmune disease (системне автоімунне захворювання)

RA - rheumatoid arthritis (реваматойдний артрит)

SS - Schanger's syndrome (синдром Шангера)

SLE - systemic lupus erythematosus (системний червоний вовчак)

EBER - RNAs encoded by EBV (РНК, кодована EBV)

SHM - somatic hypermutations (соматичні гіпермутації)

ВСТУП

Хронічний лімфолейкоз є найпоширенішою формою лейкемії у дорослих. На це захворювання припадає приблизно 1/4 нових випадків серед усіх лейкемій. Захворюваність на CLL (chronic lymphocytic leukaemia) різна, і залежить, наприклад, від географічного регіона, статі, віку та походження. Так, для латиноамериканців, темношкірих, корінних американців ризик та азіатів набагато нижчий ризик розвитку CLL, ніж для європейців. Захворювання вдвічі частіше за жінок зустрічається у чоловіків, а також, в групі високого ризику знаходяться літні люди: майже 70% пацієнтів з CLL досягли 65 років на момент встановлення діагнозу [1].

CLL є злоякісним новоутворенням В-клітин згідно з класифікацією ВООЗ [2]. CLL характеризується надзвичайно різноманітними клінічними проявами у пацієнтів, які можуть вимагати лікування протягом багатьох років, тоді як в інших випадках пацієнти можуть взагалі ніколи не потребувати лікування [1]. Близько 30% з пацієнтів з CLL продовжують жити понад 15 років після встановлення діагнозу, тоді як інші помирають протягом 5–10 років [3]. Хворі на CLL з агресивною формою захворювання живуть не більше 3 років після діагностування CLL [4]. За клінічною поведінкою CLL можна розділити на два основні типи: індолентне – повільно прогресуюче (низький ризик) та агресивне – швидко прогресуюче (високий ризик) захворювання. Лікування хворих на CLL сьогодні включає хіміотерапію, поєднання хіміотерапії та імунотерапії (зазвичай моноклональні антитіла проти CD20) і агенти, які націлені на сигнальні шляхи, як BCR і BCL-2-контрольовані [5, 6]. Пацієнтам з повільною прогресуючою (на ранній або середній стадії) CLL часто лікування не рекомендоване, натомість проводиться лише постійний моніторинг стану, а для лікування пацієнтів з агресивною швидко

прогресуючою CLL використовується традиційна хіміотерапія. На жаль, схеми на основі хіміотерапії можуть викликати ускладнення: збільшення ризику інфекцій і міелосупресії; мієлодисплазія після терапії і вторинні ракові захворювання, такі як гострий мієлоїдний лейкоз (5%) або синдром Ріхтера (2-7%) - трансформація CLL в агресивнішу лімфому [1].

Для визначення стадій та планування лікування широко використовуються дві системи клінічного визначення стадії: класифікація Rai та Binet [7,8]. Однак, традиційні системи визначення стадії не можуть точно передбачити клінічний перебіг CLL пацієнтів із ранньою стадією захворювання [9]. Вище описані агресивна та помірні форми, як правило, розрізняються за тим, експресують лейкозні клітини мутований або немутований гени варіабельної області важкого ланцюга імуноглобуліну. Пацієнти з CLL, у організмі яких експресуються немутовані IGHV (genes of the variable region of the immunoglobulin heavy chain), зазвичай мають агресивну форму CLL, в той час як пацієнти з клітинами, які експресують мутований IGHV мають індолентну форму [10]. Дотепер, найбільш цінними прогностичними показниками захворювання високого ризику та предикторами рефрактерного лікування CLL є немутовані гени IGHV і дисфункція гена TP53 (делеція та/або мутація) [1]. Європейська дослідницька ініціатива з CLL рекомендує включати аналіз мутації генів IGHV для більш точної класифікації прогнозу пацієнтів [11]. Крім того, мутаційний статус IGHV є параметром, який наразі визначає вибір терапії [12].

Три комплексні дослідження з використанням одно- та багатофакторного аналізів у 2015 р. показали, що високе навантаження ДНК вірусу Епштейна-Барр у мононуклеарних клітинах периферійної крові при діагностиці CLL корелювало з відповіддю на лікування [1], коротшим часом до прогресування захворювання [13;14] і часом до початку терапії. Крім того, деякими дослідженнями було встановлено зв'язок між EBV та переходом CLL у синдром Ріхтера [15]. Отже, постає питання важливості включення

визначення рівня вірусного навантаження клітин, до загального переліку тестів, як маркера для визначення напрямку терапії для хворих на CLL.

РОЗДІЛ 1

ВІРУС ЕПШТЕЙНА-БАРР

1.1. EBV – загальна інформація про вірус

Герпесвірус 4-го типу, або вірус Епштейна-Барр, має дволанцюгову лінійну монопартитну ДНК довжиною приблизно 180 т.п.н. і відноситься до роду *Lymphocryptovirus* підродини *Gammaherpesvirinae* родини *Herpesviridae* порядку *Herpesvirales* [16].

За будовою вірус складний, отже має суперкапсид та нуклеокапсид. Ікосаедричний капсид складається з 162 капсомерів (12 пентонів, 150 гексонів). Між суперкапсидом і нуклеокапсидом знаходиться шар тегументу. Суперкапсид містить вірусні трансмембранні глікопротеїни, які опосередковують проникнення до клітини-хазяя хазяя шляхом ендцитозу [19]. EBV, як і інші герпесвіруси, має глікопротеїни проникнення: BLLF1 (gP350), BZLF2 (gP42), BMRF2m, BXLF2 (gH), BKRF2 (gL), BALF4 (gP110), BLRF1 (gN), BHFL1, BDLF2, які опосередковують злиття мембран вірусу і клітини. Білки gH і gL асоціюють і утворюють гетеродимерний комплекс, який необхідний для ефективного злиття мембран, а також бере участь у зв'язуванні з рецепторами епітеліальних клітин, необхідному для проникнення вірусу. Тропність новоутворених віріонів EBV визначається gP оболонки, яка, у свою чергу, дещо змінюється залежно від клітини-хазяя [15, 18].

Зараження EBV зазвичай відбувається в ранньому дитинстві, що призводить до безсимптомного перебігу інфекції. Вірус поширюється через слину. Спочатку інфікуються епітеліальні клітини, після реплікації в яких вірус потрапляє до В-клітин. Після первинного зараження більшість індивідів будуть пожиттєвими носіями вірусу та розвиватимуть клітинний імунітет проти різноманітних як літичних, так і латентних білків. Більшість дорослого населення (понад 90%) інфіковані EBV. Періодично вірус виділяється від латентно інфікованих осіб шляхом індукції літичної інфекції в В-лімфоцитах [19].

Літична інфекція починається з проникнення вірусу шляхом прямого злиття оболонки, отриманої з плазматичної мембрани вірусу, з мембраною клітини-мішені, або шляхом ендцитозу вірусу з наступним злиттям оболонки вірусу та мембрани ендосоми. Результатом обох процесів є вивільнення нуклеокапсиду в цитоплазму. Вивільнені віріони транспортуються до ядерної мембрани, вірусний геном проникає до ядра разом зі зв'язаними білками. Це ініціює транскрипцію спочатку ранніх генів, що кодують регуляторні альфа-білки, потім ранніх генів, що кодують каталітичні бета-білки, а потім і пізніх генів, що кодують структурні гамма-білки. Трансляція вірусних матричних РНК відбувається РНК-полімеразою II хазяїна на рибосомах у цитоплазмі та в ЕПС, а вірусні білки направляються в різні місця для подальшого складання вірусу. Успішна реплікація вірусних геномів і транспорт капсидних білків до ядра призводить до збирання віріонів, які переміщуються до плазматичної мембрани шляхом серії подій обгортання/злиття за участю внутрішньоклітинних мембран, що закінчується відбруньковуванням зрілого вірусу з плазматичної мембрани [16, 18, 20].

За роки сумісної еволюції людини та EBV вірус набув достатньо багато способів уникнення імунного нагляду організму. Більшість білків, що синтезуються вірусом, беруть участь саме в уникненні від імунного нагляду і синтезуються під час літичної фази. Латентна інфекція (в більшості випадків

відбувається саме в В-клітинах) відбувається шляхом реплікації кільцевої вірусної епісоми в тандемі з ДНК клітини-хазяя за допомогою механізму реплікації клітини-хазяя. У стані «глибокої» латентності експресується лише ядерний антиген EBV - EBNA1 (Epstein–Barr virus nuclear antigen 1), який забезпечує підтримку та реплікацію геному EBV разом із хромосомами клітини-хазяя. Щоб уникнути представлення пептидів, отриманих з EBNA1, на МНС-I, білок EBNA1 містить характерну послідовність повторів AG, яка перешкоджає процесингу МНС-I. Крім того, EBNA1 також містить характерні послідовності повторів RG, які можуть відігравати роль в уникненні від імунного нагляду. З латентного стану EBV може іноді реактивуватися, наприклад у відповідь на антигенну стимуляцію В-клітин пам'яті, що призводить до літичної інфекції [16, 18]. Під час літичної фази вірус має багато різних пристосувань для уникнення імунного нагляду. Для запобігання презентації власних антигенів на поверхні клітини, EBV набув стратегії модуляції сигнальних шляхів (зменшення експресії Toll-подібних рецепторів; модуляція передачі IRF сигналів; втручання в NF-κB та вплив запальні шляхи; вплив на синтез інтерферонів) зводячи до мінімуму їх противірусну активність, водночас використовуючи їх переваги для стимулювання клітинного поділу. Первинна інфекція EBV індукує сильну вірусспецифічну Т-клітинну відповідь, націлену як на літичні, так і на латентні епітопи EBV. EBV компрометує активацію як CD8+, так і CD4+ Т-клітин, впливаючи на різні етапи шляхів презентації антигену МНС класу I та класу II, особливо під час продуктивної фази інфекції. Також EBV кодує різні форми некодуючих РНК, включаючи малі РНК і понад сорок мікроРНК, функції яких остаточно не з'ясовані, але деякі з них причетні до стратегії уникнення від імунітету, наприклад шляхом РНК-сайленсингу [21]. Після переходу до літичного циклу з продукуванням вірусних білків EBV знижує регуляцію МНС-I і перешкоджає презентації вірусних пептидів на МНС-I через убіквітування МНС-I. Подібним чином у В-клітинах EBV також може знижувати регуляцію МНС-II, що пригнічує взаємодію між МНС-II та TCR Т-хелперів. Інші білки

EBV беруть участь у мінімізації експресії МНС-I, включаючи BNLF2a, BILF1, BGLF5. Екзонуклеаза BGLF5 руйнує клітинні мРНК, включаючи мРНК МНС-I та BILF1, асоційовані з МНС-I клітинної поверхні, і посилює його деградацію, тоді як BNLF2a запобігає навантаженню пептиду МНС-I шляхом інгібування транспортера, пов'язаного з навантаженням пептиду. Для уникнення розпізнавання НК-клітинами, під час синтезу вірусних білків, EBV підвищує регуляцію неklasичного МНС. Вірус має складний набір білків для пригнічення внутрішньоклітинних механізмів апоптозу, включаючи зниження регуляції та пригнічення toll-подібних рецепторів [22]. Також варто згадати значущість вірусної оболонки, отриманої від клітини-хазяїна, яка забезпечує суттєвий захист вірусної частки, імітуючи позаклітинну везикулу хазяїна. Вірусна оболонка може містити всі мембранні білки хазяїна, які мають значення для «маскування» та імунного уникнення (наприклад, молекули МНС, регулятори комплементу, Fc-рецептори, молекули, що інгібують фагоцитоз тощо) [16].

У нормі імунна відповідь проти EBV все одно посилюється, нейтралізуючи інфіковані клітини та змушуючи вірус знову перейти до латентного стану. Повторна активація також може відбутися після «ослаблення» клітинного імунітету до вірусу, і інфіковані особи протягом усього життя змушені «боротися» з EBV [16, 18].

1.2. EBV-асоційовані типи раку

EBV індукує щонайменше декілька типів раку, зокрема В-клітинних лімфом і назофарингеальних епітеліальних карцином, які вважають основними типами клітин, на які спрямований вірус. Це можна пояснити здатністю EBV уникати клітинних противірусних механізмів і негативно

регулювати шляхи апоптозу клітин, а також його здатністю уникати імунної відповіді. Однак, відомо кілька інших захворювань, що відбуваються в інших типах клітин, які можуть бути інфіковані EBV, включаючи Т-клітинні лімфоми, NK (Natural killer cells) -клітинні лейкемії та інші Т-клітини [18].

Захворюваність на злоякісні пухлини, пов'язані з EBV, зросла на 14,6% за останні 20 років і становить приблизно 1,5% усіх випадків раку в світі, та 1,8% усіх смертей, пов'язаних із раком. Проте потенційна участь білків літичної фази вірусу у патофізіології раку, асоційованого з EBV, вивчена недостатньо [22].

До типових ракових захворювань, спричинених EBV, можна віднести: назофарингеальну карциному, карциному шлунку, лімфому Ходжкіна, неходжкінську лімфому (лімфому Беркітта, дифузну великоклітинну В-клітинну лімфому, екстранодальну NK/Т-клітинну лімфому та ін.).

NPC (nasopharyngeal carcinoma) виникає в бічних стінках носоглотки і характеризується розгалуженою підслизовою лімфатичною мережею, що призводить до розвитку метастазів на ранніх етапах хвороби у шийних лімфатичних вузлах. Загальна середня виживаність пацієнтів становить від 7 до 22 місяців. У Східній, Південно-Східній Азії та деякі райони Близького Сходу, EBV пов'язаний з більш ніж 95% випадків NPC, тоді як лише 75% випадків NPC пов'язані з EBV в інших регіонах світу [23,24].

GC (gastric carcinoma) посідає п'яте місце за рівнем захворюваності та четверте за рівнем смертності в світі. Усі випадки можна розділити на 4 типи за молекулярними особливостями: перший тип має мікросателітні нестабільності з високою частотою мутацій та гіперметилуванням промотора MutL гомолога 1 (MLH1); другий тип характеризується геномною стабільністю, але мутаціями та/або злиттям білків, пов'язаних із родиною Rho GTP-аз; третій тип має хромосомні нестабільності з соматичними абераціями числа копій; и лише четвертий тип асоціюють з EBV і пов'язаний з

гіперметилуванням промотору CDKN2A [23]. Також було показано, що наявність EBV збільшує вірогідність захворювання на GC у 18,5 разів, тому в окремих випадках є сенс додати до боротьби з GC також і курс лікування EBV [25].

HL (Hodgkin's lymphoma) – це рак В-клітинного походження, який охоплює п'ять різних гістологічних підтипів: з великою кількістю лімфоцитів; з невеликою кількістю лімфоцитів; нодулярний склероз і змішані клітинні підтипи, які разом можна назвати класичним HL; а також підтип HL з переважанням вузликкових лімфоцитів – NLPHL [24]. Визначальною рисою HL є те, що ці злоякісні клітини становлять лише 0,1–2% клітин у пухлині. У 2020 році було зареєстровано 78 800–87 600 нових випадків HL і 20 100–27 000 смертельних випадків [27, 22]. Частка HL, пов'язана з EBV, за оцінками, становила 74% в Африці, 60% у Латинській Америці, 56% в Азії, 36% у Європі, 32% у Північній Америці та 29% в Океанії [24, 26].

NHL (non-Hodgkin's lymphoma) - це велика різноманітна група новоутворень, які походять з лімфоїдних клітин. На частку NHL припадає понад 75% усіх лімфом, а на HL – інші 10–25%. У 2020 році NHL були причиною понад 254 400–265 200 смертей і 536 000–552 800 нових випадків лімфоми [27, 28]. Розглянемо нижче основні з них, пов'язані з EBV.

BL (Burkitt's lymphoma) була вперше описана Деннісом Беркіттом у 1958 році як саркома, яка уражує щелепу у африканських дітей [23]. BL поділяють на дві групи: та, що поширена у ендемічних районах, де поширений *Plasmodium falciparum* – збудник малярії; поширена поза цими районами та пов'язана з імунодефіцитом. Для першого типу більшість випадків показують зв'язок з EBV. У даному контексті також цікавим є зв'язок BL з *Plasmodium falciparum*, оскільки внутрішньоклітинний паразит може індукувати транслокації MYC через toll-подібний рецептор 9 та індуковану активацією цитидиндезаміназу в В-клітинах. Крім того після ураження *P. falciparum*

відбувається проліферація В-клітин з EBV. Для другого типу близько половини випадків пов'язані з вірусом [23, 29].

DLBCL (diffuse large B-cell lymphoma) є однією з найпоширеніших груп NHL. Мета-аналіз, проведений у огляді 2022 року [23], виявив, що загальна частка DLBCL серед випадків NHL становила 42,1% у Східній та Східній Європі. Південно-Східна Азія, 39,9% у Латинській Америці та 25,6% для решти світу. На сьогоднішній день причина DLBCL в більшості випадків залишається невідомою. Факторами ризику можна назвати іонізуюче випромінювання, пригнічення імунітету та хімічні речовини, такі як фарби для волосся, добрива та пестициди. До 2008 року не визнавали ролі EBV у даному захворювань, але потім ВООЗ ввели термін «EBV-позитивний DLBCL у людей похилого віку», який потім був замінений на «EBV-позитивний DLBCL, не специфікований інакше», оскільки дослідження вказували на зв'язок DLBCL з EBV і у людей молодшого віку [23, 29]. Статистика 2021 року встановлює частку EBV-позитивних DLBCL 9,2% для населення Азії та Південної Америки та 4,7% [30].

ENKTL-NT (extranodal NK/T-cell lymphoma of the nasal type) є відносно рідкісним раком, який відноситься до підгрупи NHL, відомий як зрілі Т- та НК-новоутворення. Хоча консенсусу щодо його причинно-наслідкового зв'язку з EBV ще не досягнуто, геном EBV зазвичай знаходять в змінених клітинах ENKTL-NT. Мета-аналіз, проведений у огляді 2022 року [23], показує, що сукупна частка ENKTL-NT серед випадків NHL становила 6,5%, у Східній та Південно-Східній Азії, 2,9% у Латинській Америці та 0,2% для решти світу. Також було виявлено кореляцію між ідентифікацією ДНК EBV у плазмі крові пацієнтів та прогнозами щодо ефективності їх хіміотерапевтичного лікування: визначення в крові підвищеного рівню ДНК вірус після лікування свідчить про погану чутливість пухлини до ліків і навпаки, низький рівень або відсутність ДНК вірусу Епштейна-Барр в плазмі

може свідчити про ефективність лікування та давати надію на позитивний прогноз [31].

Також варто зазначити інші, більш рідкісні типи раку, зв'язок з якими був також виявлений для EBV: EBV-позитивна вузлова Т-клітинна та НК-клітинна лімфоми, EBV-позитивна Т-клітинна та НК-клітинна лімфопроліферативна хвороба у дітей, EBV-позитивна виразка слизової оболонки та EBV-асоційована лімфома у ВІЛ-інфікованих осіб [23].

1.3. Діагностика та антитіла до EBV

Наявність нуклеїнової кислоти EBV в інфікованих людей можна визначити за допомогою багатьох методів, наприклад, шляхом прямого секвенування, гібридизації *in situ* і полімеразної ланцюгової реакції. Для аналізу можуть бути використані зразки крові та слина. Тестування біоптатів тканин на наявність EBV-кодованих РНК-транскриптів можливе за допомогою FISH (флуоресцентної гібридизації *in situ*) [32].

Традиційно серологія є найпростішим способом тестування на інфекцію EBV і навіть для оцінки гострої та перенесеної інфекції. Високі серологічні титри слугують також пухлинним маркером для деяких злоякісних новоутворень, пов'язаних з EBV [32].

Висновок про гостру інфекцію можна зробити на підставі аналізу IgM до вірусних антигенів, тоді як попередню інфекцію можна встановити на основі наявності IgG до антигенів EBV, а IgA можна використовувати як маркер епітеліального інфекційного навантаження [32]. Також варто зазначити значущість IgA EBV-CA (antibodies to EBV capsid antigen) для діагностики та спостереження прогресу під час лікування. До терапії до 93 %

пацієнтів з NPC мають високі титри IgA EBV-CA, і ці титри зростають від стадій I до IV стадій. І навпаки, багато обстежених NPC-пацієнтів після 2–6 років після початку терапії мали низькі рівні IgA EBV-CA, і у більшості пацієнтів із високими титрами було відомо, що вони мали залишкове або рецидивне захворювання [33].

Антитіла до капсидного антигену вірусу були першими використані для діагностики EBV. Однак імуноферментний аналіз з використанням антитіл має діагностичні обмеження у зв'язку з низькими титрами при деяких захворюваннях (наприклад, інфекційний мононуклеоз) та інколи високими титрами у здорових осіб [33]. Використовуючи три типи антитіл до EBV: IgG до EBV-CA, IgM до EBV-CA та IgG до EBNA1, зазвичай можна відрізнити гостру інфекцію від вже перенесеної. У той час як наявність EBV-CA IgM та EBV-CA IgG без EBNA1 IgG вказує на поточну гостру інфекцію, наявність EBV-CA IgG та EBNA1 IgG без EBV-CA IgM зазвичай свідчить про перенесену давно інфекцію [32].

Однак, виявлення цих антитіл часто є ненадійним і проблематичним, зважаючи на ряд факторів, таких як стійкість відповіді IgM. Часто вона надто слабка, або ж вироблення IgM може бути сповільненим. В останні роки додаткове визначення авідності антитіл стало важливим методом ідентифікації первинних інфекцій. Авідність антитіл – це характеристика міцності зв'язку відповідних антитіл з антигеном. Первинною відповіддю організму на інфекцію є утворення низькоавідних антитіл, а при тривалому перебігу захворювання виробляються антитіла з високою авідністю. Якщо в сироватці виявлені високоавідні IgG, можна припустити, що інфекція знаходиться на пізній стадії [32].

Оскільки індукція антитіл відбувається у відповідь на утворення вірусного антигену, серопозитивність залежатиме від здатності людини контролювати EBV та баланс між його латентною та літичною інфекцією. Крім того, будь-який аналіз має характерну чутливість і специфічність для

виявлення EBV, і деякі особи можуть бути визнані хибно негативними або хибно позитивними. Таким чином, щоб вірно встановити наявність вірусу слід використовувати кілька тестів .

1.4. EBV та автоімунні захворювання

Системні автоімунні захворювання - це ціла група синдромів, основна причина яких полягає у порушенні роботи імунної системи організму, в зв'язку з яким імунна система бореться не з патогенами чи власними зміненими клітинами, а з нормальними, здоровими клітинами. Дуже часто дослідники вбачають зв'язок таких порушень та вірусних захворювань. До SAD (systemic autoimmune disease), можливими причинами яких може бути EBV належать: ревматоїдний артрит, синдром Шегрена, системний червоний вовчак, системна склеродермія та інші [19].

Клінічними характеристиками ревматоїдного артриту є набряклі та болючі суглоби, спричинені синовіальним запаленням, що зрештою призводить до надмірного відкладення сполучної тканини (утворення паннусу) та ерозії кісток, що призводить до втрати працездатності. Крім того, RA часто супроводжується системними ускладненнями, такими як судинні захворювання, остеопороз та інші. Відомо, що основну роль у виникненні RA (rheumatoid arthritis) відіграють генетичні порушення, зокрема алелі HLA-DRB1 [18]. Щодо ролі EBV у науковій спільноті точаться дискусії - ймовірно може відігравати роль молекулярна мімікрія між білками EBV та власними антигенами організму. Генетична схильність і Т-клітинна дисфункція індукує вищі навантаження EBV у пацієнтів з RA. Також, EBV може зберігатися в периферичних В-клітинах і в суглобах. Крім того, порушення контролю EBV, що спостерігається при RA, може призвести до розвитку EBV-асоційованих лімфопроліферативних захворювань [15, 34, 35].

Синдром Шегрена (SS) - це захворювання, що призводить до прогресуючого руйнування екзокринної тканини слинних і слізних залоз. Вважається, що етіологія пов'язана з кількома екологічними та генетичними факторами, молекулярною мімікрією. Фактори навколишнього середовища включають дефіцит вітаміну D, куріння, вплив кремнеземного пилу та вірусні інфекції [18]. В багатьох дослідженнях прослідковувався зв'язок між EBV та SS [36, 37]. Однак, точні механізми впливу EBV на SS точно не з'ясовані, є припущення щодо схожості їх з RA-EBV механізмами [20, 37].

Системний червоний вовчак – це захворювання, яке клінічно проявляється гетерогенним набором симптомів, включаючи лейкопенію, тромбоцитемію, лихоманку, втомлюваність, шкірний висип, чутливість до УФ-променів, виразки слизової оболонки, алопеція, плеврит або перикардит, протеїнурія, гематурія, нефрит, міозит, артрит, васкуліт, головний біль, інсульт і, рідше, нейропсихіатричні симптоми. Захворювання може мати рецидивуючий перебіг, залежно від ефективності лікування. SLE (systemic lupus erythematosus) описується як захворювання імунного комплексу, оскільки воно часто пов'язане зі зниженням рівня компонентів комплементу. Основними факторами схильності є, перш за все, певні алелі HLA-DRB1, але виявлено, що численні гени імунної системи, включаючи інші алелі MHC-II і деякі алелі MHC-I, а також гени, що впливають на видалення клітинних відходів, впливають на розвиток захворювання. Також впливають фактори навколишнього середовища, що сприяють розвитку SLE, серед яких EBV є основним, знову ж таки, завдяки молекулярній мімікрії. Також є вплив саме вплив кремнеземного пилу, сонячні опіки, куріння, дефіцит вітаміну D [20, 38]

1.5. EBV та хронічний лімфлейкоз

Хоча й досі точаться дискусії, щодо ролі EBV у CLL, чисельні дослідження намагаються встановити зв'язок між вірусом та захворюванням. Нижче розглянемо можливі механізми впливу EBV.

У дослідженні в Техаському університеті імені М. Д. Андерсона 2006 року матеріал пацієнтів з CLL (парафінові блоки кісткового мозку), досліджували на зв'язок з інфекцією EBV за допомогою високо специфічного аналізу гібридизації *in situ* для виявлення РНК, кодованої EBV. З обстежених 32 зразків хворих, EBER (RNAs encoded by EBV) були виявлені в кістковому мозку 12 з 32 (38%) CLL кісткового мозку проти 0 з 20 нормальних кісткового мозку ($p = 0,002$). 10-річна виживаність становила 22% проти 58% для пацієнтів з помітними EBER та без них ($p = 0,08$). Незважаючи на невелику кількість протестованих пацієнтів, виявлення EBER було значно більш поширеними серед осіб із останніми стадіями CLL, і спостерігалася тенденція до коротшого виживання пацієнтів, у яких були виявлені EBV EBER [39].

У дослідженні 2015 року намагалися встановити зв'язок між мікроРНК EBV та сприяння прогресування CLL у залитих парафіном біоптатах кісткового мозку та в плазмі пацієнтів із CLL за допомогою трьох різних методів: секвенування мікроРНК, q-RT-PCR і мікроРНК *in situ* гібридизації. Було встановлено, що рівні експресії мікроРНК EBV були значно вищими в плазмі пацієнтів із CLL порівняно зі здоровими особами ($p < 0,0001$), а також встановлено, що рівні експресії мікроРНК EBV у плазмі були позитивно пов'язані з підвищеними рівнями бета-2-мікроглобуліну та прогресуючими стадіями CLL, і спостерігали кореляцію між вищими рівнями експресії мікроРНК та коротшим виживанням у двох незалежних групах пацієнтів [40].

Синдром Ріхтера або трансформація у великоклітинну лімфому рідко зустрічається при CLL, приблизно з частотою 3%. У іншому дослідженні 2005 року спостерігали позитивну кореляцію між CLL та перехожем хвороби на цю, важчу стадію [41].

У дослідженні 2020 року встановили зв'язок мутації p53 з вищим рівнем експресії мікроРНК EBV 1 ($p < 0,001$), який також був незалежним прогностичним маркером загального виживання ($p=0,028$); коефіцієнт ризику 5,335; 95% довірчий інтервал від 1,193 до 23,846) у 97 пацієнтів із нещодавно діагностованим CLL. Інгібування мікроРНК EBV посилювало експресію білка p53, індукувало зупинку клітинного циклу та апоптозу, а також знижувало проліферацію клітин у клітинних лініях. МікроРНК імітує знижену експресію білка p53, знижену зупинку клітинного циклу та апоптоз, а також індуковану клітинну проліферацію в клітинних лініях [42].

Також хотілося б зазначити щодо експресії білків CTLA-4 і CD86 і реактивації вірусу Епштейна-Барр. CTLA-4 це імуноглобулін, що контролює процес активації в CD4+ і CD8+ Т-клітинах. У незначних кількостях його можна виявити на поверхні не активних Т-лімфоцитів. Лігування CTLA-4, призводить до стану анергії лімфоцитів. Лімфоцит, який переходить у стан анергії, не активується після розпізнавання специфічного антигену, навіть якщо він отримує достатні коstimулюючі сигнали для активації незайманого лімфоцита. 54% пацієнтів мали ДНК EBV. У пацієнтів з EBV сироваткові концентрації CTLA-4 і CD86 та їх експресія на досліджуваних популяціях клітин були значно вищими, ніж у пацієнтів без ДНК EBV. Навантаження EBV позитивно корелювало з несприятливими прогностичними маркерами CLL та експресією CTLA-4 [43].

РОЗДІЛ 2

ХРОНІЧНИЙ ЛІМФОЛЕЙКОЗ

2.1. CLL – загальна інформація про захворювання

Хронічний лімфолейкоз є найпоширенішим типом лейкозу, на який припадає від 22 до 30% випадків у західному світі. Він характеризується як зріла В-клітинна злоякісна пухлина, пов'язана з клональною проліферацією В-клітин. Етіологія та патогенез CLL включають багатоетапний шлях, який призводить до проліферації аномальних або злоякісних зрілих В-лімфоцитів. Злоякісні В-клітин можуть поширюватися на кістковий мозок, кров і лімфатичні вузли. Численні фактори впливу можуть призвести до виникнення захворювання, включаючи антигенні тригери, цитогенетичні аномалії та молекулярні аномалії, такі як дисрегуляція мРНК і мутації рецепторів В-клітин [44].

У латвійській базі даних статистики охорони здоров'я CLL був зафіксований на рівні 3,2 на 100 тис. населення у 2019 році [1]. CLL є хворобою літніх людей із середнім віком на момент встановлення діагнозу 72 роки та середнім віком смерті від CLL 79 років. Майже 70% пацієнтів з CLL віком більше 65 років на момент встановлення діагнозу; менше 2%, у віці до 45 років; 9,1%, від 45 до 54; 19,3%, від 55 до 64; 26,5%, від 65 до 74; 30,0%, від 75 до 84; і 13,2%, 85+ років. Рівень захворюваності з поправкою на вік становить

4,1 випадку на 100 тис. чоловіків і жінок на рік [14; 46; 47]. Захворювання вдвічі частіше зустрічається у чоловіків, ніж у жінок, частіше у білих, ніж у чорношкірих, рідше серед латиноамериканців та корінних американців і набагато рідше серед азіатів [48].

Хронічний лімфолейкоз — це новоутворення В-клітин, якому майже завжди передує моноклональний В-клітинний лімфоцитоз, що означає підвищення лімфоцитозу периферичної крові не менше 5000/мкл навіть без будь-яких проявів захворювання. Коли моноклональний В-клітинний лімфоцитоз погіршується, стають очевидними клінічні прояви, пов'язані з аномальним накопиченням В-клітин і подальшим порушенням їх функціонування. Наприклад, змінені В-клітини перешкоджають здатності організму генерувати імуноглобуліни, що призводить до гіпогаммаглобулінемії та, зрештою, до порушення функціонування імунної системи, що часто спостерігається при прогресуванні захворювання. Аномальні клональні В-клітини не піддаються апоптозу і можуть продовжувати проліферацію в лімфатичних вузлах, що призводить до лімфаденопатії – збільшення розмірів та порушення функцій лімфовузлів. [44, 49]. За допомогою технології FISH було виявлено, що близько 80% пухлин CLL мають принаймні одну з чотирьох поширених хромосомних аномалій. Ці цитогенетичні аномалії включають $del(13q14)$, трисомію 12, $del(11q22-23)$ і $del(17p12)$, усі з яких обмежені В-клітинами.

Найпоширеніша хромосомна аберація, $del(13q14)$, спостерігається приблизно у 50-60% пухлин CLL і відноситься до $miR15A$ і $miR16A$, ділянок мікроРНК. Ці ділянки мікроРНК, регулюють експресію білків, необхідних для апоптозу клітин і, як наслідок, нормальний клітинний цикл. Тому без цих ділянок мікроРНК клітини не можуть належним чином реагувати на сигнали стресу, тим самим сприяючи процесу захворювання [44].

Друга за поширеністю хромосомна аномалія, трисомія 12, виявляється приблизно в 10-20% пухлин CLL і бере участь у активації гена $RUNX3$. Наразі

участь гена RUNX3 і загальний вплив трисомії 12 на CLL залишається неясним і є темою подальших досліджень [44].

Del(11q22-23) також виявлено приблизно в 10-20% пухлин CLL [29]. Ця видалена область має ген атаксії-телеангіектазії, який відповідає за виявлення пошкодженої ДНК, що відіграє вирішальну функцію в нормальному клітинному циклі та, зрештою, в клітинному апоптозі. Розуміння цієї цитогенетичної аномалії відіграє важливу роль у лікуванні. Клітини CLL без або з аномальною функцією гена не можуть правильно реагувати на пошкодження ДНК, спричинене хіміотерапією, і в кінцевому підсумку не піддаються апоптозу [44].

Del(17p12) виявляється приблизно в 4-10% пухлин CLL. Del(17p12) призводить до втрати гена TP53, який відіграє важливу роль в апоптозі клітин і відновленні пошкоджень ДНК. Наявність мутацій Del(17p12) або TP53 має значення для лікування; наприклад, хіміотерапевтичні засоби, які діють шляхом індукції пошкодження ДНК, неефективні за наявності цих мутацій [44].

Ще одна генетична аномалія, важлива в патогенезі CLL, включає аберантну експресію мікроРНК (міРНК), які є малими некодуючими РНК, які працюють на посттранскрипційному рівні. Дослідження, що включають експресію мікроРНК у CLL, виявили прямий зв'язок із прогнозом захворювання. Наприклад, дослідження 56 пацієнтів з CLL показало, що miR21 і miR155 були надмірно експресовані майже в усіх проаналізованих зразках [41]. Експресія мікроРНК контролюється за допомогою епігенетичних модифікацій із залученням ферментів і генів-супресорів пухлин, таких як гістондеацетилази та TP53 [44].

2.2. Методи діагностики та лікування CLL

Діагностика хронічного лімфолейкозу ґрунтується на визначенні кількості лімфоцитів, тромбоцитів та лейкоцитів. Також до уваги беруться стан лімфовузлів, селезінки та печінки. Необхідні тести для початкової оцінки та діагностики CLL складаються з повного аналізу крові з диференціальними показниками (CBC w/Diff), периферичного мазка та проточної цитометрії. CLL діагностується відповідно до оновлених рекомендацій Національного інституту раку Міжнародного семінару з хронічного лімфолейкозу (iwCLL) 2018 року. Відповідно до критеріїв, CLL діагностується при моноклональному В-клітинному лімфоцитозі периферичної крові, що перевищує або дорівнює 5000/мкл [$\geq 5 \times 10^9$ /л], що зберігається протягом принаймні трьох місяців [44, 50].

У мазку периферичної крові спостерігаються плямисті клітини, лейкозні клітини з вузькою межею цитоплазми та щільним ядром з нерозрізненими ядерцями. Клональність В-лімфоцитів підтверджується проточною цитометрією периферичної крові або аспірату кісткового мозку, де буде виявлено обмеження легкого ланцюга імуноглобуліну [44].

Гібридизація *in situ* за флуоресценцією периферичної крові і секвенування наступного покоління або аналіз секвенування Сенгера є корисними інструментами прогнозування та можуть впливати на варіанти лікування. Наприклад, втрата гена ATM або ідентифікація Del(11q22-23) і втрата TP53 або ідентифікація Del(17p12), що призводить до втрати TP53, пов'язана з поганою реакцією на препарати, механізм дії яких включає пошкодження ДНК [44,50]. Секвенування також може виявити мутацію гена варіабельної області важкого ланцюга імуноглобуліну (IGHV) як різницю в нуклеотидній послідовності на 2% або більше порівняно з ДНК зародкової лінії. CLL із мутованим IGHV є клінічно менш агресивним і має низьку частоту мутацій [44].

Існує два основні підходи у визначенні стадій CLL: Райа та Бінет. Перший частіше використовується у США, а другий у Європі. У сучасній практиці досить часто застосовують комбінацію з обох підходів. Однак для даного дослідження використовувався саме Райа підхід.

Для визначення стадії за підходом Райа пацієнт повинен мати велику кількість лімфоцитів у крові та кістковому мозку, що не пов'язано з жодною іншою причиною. Для діагностики CLL загальна кількість лімфоцитів не обов'язково повинна бути високою, але пацієнт повинен мати принаймні $5000/\text{мм}^3$ моноклональних лімфоцитів [51]. Ця система поділяє CLL на 5 стадій на основі результатів аналізів крові та фізичного обстеження:

Стадія 0: лімфоцитоз; відсутність збільшення лімфатичних вузлів, селезінки або печінки; кількість еритроцитів і тромбоцитів майже нормальна.

Стадія I: лімфоцитоз; збільшені лімфовузли; селезінка і печінка не збільшені; кількість еритроцитів і тромбоцитів майже нормальна.

Стадія II: лімфоцитоз; збільшена селезінка (і, можливо, збільшена печінка); лімфатичні вузли можуть збільшуватися або не збільшуватися; кількість еритроцитів і тромбоцитів майже нормальна.

Стадія III: лімфоцитоз; лімфатичні вузли, селезінка або печінка можуть бути або не збільшені; кількість еритроцитів низька (анемія); кількість тромбоцитів близька до норми.

Стадія IV: лімфоцитоз; збільшені лімфатичні вузли, селезінка або печінка; кількість еритроцитів може бути низькою або майже нормальною; низький рівень тромбоцитів (тромбоцитопенія).

Під час визначення варіантів лікування лікарі поділяють стадії на групи низького, середнього та високого ризику. Стадія 0 – низький ризик; I і II стадії є проміжним ризиком. Пацієнти на III і IV стадіях мають захворювання високого ризику [51].

У системі визначення стадії Бінет CLL класифікується за кількістю уражених груп лімфоїдної тканини (лімфатичні вузли шиї, пахові лімфатичні вузли, пахові лімфатичні вузли, селезінка та печінка) і за тим, чи є у пацієнта анемія або тромбоцитопенія [51].

Стадія А: збільшено менше 3 ділянок лімфоїдної тканини, без анемії чи тромбоцитопенії.

Стадія В: 3 або більше ділянок лімфоїдної тканини збільшено, без анемії або тромбоцитопенії.

Стадія С: присутні анемія та/або тромбоцитопенія. Будь-яка кількість ділянок лімфоїдної тканини може бути збільшена [51].

Молекулярні дослідження ДНК CLL клітин показали, що делеція короткого плеча хромосоми 17 або мутації гена супресора пухлини TP53 прогнозують, як агресивний перебіг захворювання та стійкість до хіміоімунотерапія. Мутаційний статус генів важкого ланцюга імуноглобуліну IGHV також пов'язані з виживанням, так у пацієнтів з немутованими IGHV захворювання проходить у агресивнішій формі, в порівнянні з пацієнтами з мутованими IGHV.

Інші прогностичні параметри включають експресію ZAP-70,10,11 і CD38,11 та біохімічні параметри (наприклад, лактат дегідрогенази та $\beta 2$ -мікроглобуліну). Використання секвенування наступного покоління виявило новий ген мутації або делеції, включаючи мутації або делеції у NOTCH1 і SF3B1,3,13,14, що може бути пов'язано зі зниженою виживаністю [52].

Для більшості пацієнтів з безсимптомним перебігом хвороби найкращою стратегією лікування є утримання від лікування та постійний моніторинг перебігу хвороби. Стратифікація ризику за міжнародною прогностичною оцінкою (IPS-E), заснована на трьох факторах ризику: абсолютна кількість лімфоцитів понад 15000/мікл, наявність збільшених лімфатичних вузлів і немутований IGHV. Пацієнти без факторів ризику

вважаються групою низького ризику та мають менш ніж один відсоток ймовірності потреби в лікуванні через рік і вісім відсотків через п'ять років. Ті, у кого є один із трьох факторів ризику, вважаються пацієнтами з проміжним ризиком, і потребують постійного нагляду. Три відсотки, як очікується, потребуватимуть лікування через рік і двадцять вісім відсотків через п'ять років. Люди з двома або трьома факторами ризику вважаються пацієнтами з високим ризиком. Очікується, що чотирнадцять відсотків потребуватимуть лікування через рік і шістдесят один відсоток через п'ять років. Терапія є досить шкідливою, тому без нагальної потреби токсичний вплив від препаратів буде мати набагато більший вплив на організм, ніж хвороба [53].

Лікування CLL показане пацієнтам із вираженими клінічними симптомами CLL або за наявності лабораторних аномалій, таких як значна цитопенія та симптоматична гіпогамаглобулінемія. Міжнародний семінар з хронічного лімфолейкозу вимагає наявності принаймні одного критерію для діагностики активного захворювання: тромбоцитопенія, анемія, спленомегалія або лімфаденопатія, яка є симптоматичною або прогресуючою, анемія або тромбоцитопенія, що не реагують на стероїди, екстранодальні ураження та конституційні симптоми, такі як втрата ваги, сильна втома, лихоманка або нічна пітливість [53].

Для лікування застосовуються величезна кількість препаратів та їх комбінації; постійно доводяться обмежена ефективність одних та відкриваються нові. До найдієвіших та найуживаніших відносяться: інгібітори ВТК (тирозинкінази Брутона), включаючи ібрутиніб і акалабрутиніб, інгібітор BCL2 венетоклакс, анти-CD-20 моноклональні антитіла ритуксимаб, офатумумаб, обінутузумаб, алкілюючі агенти, такі як хлорамбуцил, циклофосфамід, бендамустин і аналоги пурину, такі як флударабін і пентостатин [44, 50].

Фактори, що впливають на вибір лікування, включають стадію, молекулярні та цитогенетичні характеристики захворювання, готовність організму пацієнта та цілі лікування. Наявність мутацій del 17p або TP53 пов'язана зі слабкою відповіддю на цитотоксичні хімотерапевтичні схеми, включаючи схеми на основі аналогів пурину. Однак існують клінічні докази, що підтверджують ефективність інгібіторів ВТК, таких як ібрутиніб і акалабрутиніб, а також інгібітор BCL-2 венетоклакс як монотерапії або в комбінації з моноклональними антитілами проти CD 20. Іншим молекулярним фактором, що визначає відповідь на лікування, є статус мутації IGHV. Немутований IGHV є маркером агресивного захворювання, і, подібно до мутацій TP53 або del 17p, інгібітори BCL-2 та інгібітори ВТК є ефективними за наявності немутованого IGHV порівняно зі схемами лікування на основі аналогів пурину [44, 50].

РОЗДІЛ 3

РЕЦЕПТОРИ В-КЛІТИН

3.1. Соматичні гіпермутації варіабельної ділянки імуноглобуліну

Імуноглобуліни, які продукують В-лімфоцити, здатні розпізнавати майже всі типи антигенів завдяки надзвичайному різноманіттю їхніх антигензв'язувальних ділянок, відомих як варіабельні (V) ділянки. Екзони, що кодують V-області, це гени V (варіабельні), D (різноманітності) або J (з'єднання). Сегменти V, D, J існують у вигляді безлічі копій на хромосомі. Рекомбінація гена V(D)J є ключовим механізмом утворення різноманітності антитіл. Процес рекомбінації, включаючи випадковий вибір пари сегментів V, D, J, введення дволанцюгових розривів поруч із кожним сегментом, видалення (або інвертування в деяких випадках) проміжної ДНК та лігування сегментів разом, відома як V(D)J рекомбінація, яка сприяє різноманіттю імуноглобулінів імунної системи хребетних. Щоб посилити здатність імуноглобулінів розпізнавати чужорідні антигени та зв'язуватися з ними наївні В-клітини зазнають рекомбінації з перемиканням класів і соматичної гіпермутації [54].

Рекомбінацію V(D)J можна розділити на два послідовні процеси: розщеплення та відновлення ДНК. Для ефективного розщеплення ДНК потрібні лише білки RAG1, RAG2, іон двовалентного металу та білки групи

високої мобільності (HMGB1 або HMGB2). Спочатку ДНК зв'язується RAG, разом з HMGB1 або HMGB2. Далі комплекс RAG каталізує дві реакції, розрив і утворення шпильки, без дисоціації. Це відбувається на стику між сегментом кодування та сигнальною послідовністю рекомбінації. Інший тип сигнальних послідовностей рекомбінації захоплюється з утворенням парного комплексу, і також відбувається розрив. Після утворення парного комплексу вільний 3'-гідроксил, що вивільняється на етапі розриву, атакує протилежний ланцюг шляхом переетерифікації в присутності Mg^{2+} для створення сегмента, що кодує шпильку, і відщеплених кінців сигнальної послідовності рекомбінації. Далі відбуватиметься відновлення: кодуючі кінці відкриваються факторами репарації ДНК NHEJ, а потім з'єднуються, утворюючи нечіткі кодуючі з'єднання, які містять додані нуклеотиди. Після рекомбінації V(D)J генів ланцюга IgH (immunoglobulin heavy chains) та IgL (immunoglobulin light chains) отримані незрілі наївні В-клітини транскрибують гени IgH та IgL, а транскрипти піддаються альтернативному сплайсингу для отримання IgD та IgM шляхом злиття екзонів μ та δ з екзоном J [54, 55].

Імуноглобулін складається з двох важких ланцюгів імуноглобуліну, кодованих локусом важкого ланцюга (хромосома 14 у людини), і двох легких ланцюгів імуноглобуліну, кодованих Igk (хромосома 2 у людини та хромосома 6 у людини) та Igl (хромосома 22 у людини). Ланцюги IgH мають п'ять основних ізотипів (Ig μ , Ig α , Ig γ , Ig δ та Ig ϵ), з чотирма підтипами IgG (Ig γ 1, Ig γ 2, Ig γ 3 та Ig γ 4) та двома підтипами IgA (Ig α 1 та Ig α 2). Ланцюг IgL має два типи (Igk та Igl). Ланцюги IgH мають чотири (Ig γ , Ig α та Ig δ) або п'ять (Ig μ та Ig ϵ) доменів, тоді як ланцюги IgL мають два домени. N-кінцеві ділянки важкого та легкого ланцюгів і саме вони є варіабельними частинами [54].

У фолікулах вторинних лімфоїдних органів формуються тимчасові мікроструктури – зародкові центри. Вони складаються з двох зон: темної та світлої. Саме у темній зоні В-клітини піддаються швидкому клональному розширенню, під час якого гени їхніх антитіл модифікуються гіпермутацією

гена IgV (immunoglobulin variable region), спричиненою активацією цитидиндезамінази, для створення репертуару мутантів антитіл із різною афінністю до антигену. За допомогою інших імунних клітин, включаючи Т-хелпери і фолікулярні дендритні клітини, В-клітини з покращеною афінністю до антигену селективно розмножуються і, нарешті, диференціюються в В-клітини пам'яті і плазмоцити, що продукують антитіла. Реакція зародкового центру залучає кілька імунних клітин і жорстко контролюється транскрипційними факторами, специфічними для певних клітинних ліній [55].

3.2. Статус мутацій у регіоні генів важкого ланцюга імуноглобуліну у діагностиці CLL

Один з найбільш значущих прогностичних факторів при CLL є мутаційний статус варіабельної області генів важкого ланцюга імуноглобуліну, який розрізняється за допомогою порівняння ідентичності з найближчими генами зародкової лінії IGHV: у разі подібності на 98% і більше відсотків надається мутований статус, у той час як за подібності менше 98% надається немутований статус. Численні дослідження підтвердили покращення без прогресування та загальною високою виживаністю для пацієнтів з мутованими IGHV порівняно з пацієнтами з немутованим IGHV. Мутаційний статус генів IGHV був включений до п'яти незалежних факторів, негативно пов'язаних із виживаністю пацієнтів з CLL відповідно до даних міжнародного прогностичний індексу CLL [56, 57]

Вважається, що клітини CLL з немутованим IGHV походять від наївних В-лімфоцитів, тоді як клітини CLL з мутованим IGHV походять від В-клітин, які зазнали SHM (somatic hypermutations). Але також є дослідження, яке показало, що всі клітини CLL, незалежно від статусу мутації IGHV, мають

походження з постгермінального центру. За таких умов усі клітини CLL проходили SHM, і швидкість їх проліферації визначає статус мутації IGHV. Розриви ДНК, накопичені під час SHM, відновлюються різними механізмами репарації ДНК. У клітинах, що швидко діляться, розриви ДНК відновлюються з а допомогою ефективного високоточного апарату репарації ДНК, спрямованого на гомологію, тоді як у клітинах, що повільно діляться, вони відновлюються за допомогою неефективного низькоточного механізму негомологічного відновлення з'єднання кінців. Відповідно, низький рівень мутації IGHV виявляється в клітинах, що швидко діляться, тоді як високий рівень мутації зазвичай спостерігається в клітинах, що повільно діляться. Таким чином, швидкість проліферації клітин CLL визначає статус мутації IGHV і клінічний результат пацієнтів [58].

РОЗДІЛ 4

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

4.1. Виділення мононуклеарних клітин з периферійної крові пацієнтів методом градієнтного центрифугування

Для виконання цього етапу було використано комерційний набір Ficoll®-Paque Premium (Sigma-Aldrich™, USA) [59].

На початку готують сольовий розчин. Для цього змішують один об'єм основного розчину А з дев'ятьма об'ємами основного розчину В і стерилізують. Розчин має бути свіжим. Перед використанням нагрівають середовище з градієнтом щільності набору Ficoll-Paque до 18–20 °С. Зразки крові мають бути свіжими. У центрифужну пробірку об'ємом 10 мл додають 2 мл крові, обробленої антикоагулянтном, і рівний об'єм збалансованого розчину солі (кінцевий об'єм має бути 4 мл). Кілька разів обережно перемішують пляшку з середовищем. Після цього шприцом відбирають потрібну кількість. Додають середовище Ficoll-Paque (3 мл) у центрифужну пробірку. Обережно наносять розведений зразок крові (4 мл) на розчин Ficoll-Paque (під час шарування зразок середовище та зразок не мають змішуватися). Центрифугують при 400 g протягом 30-40 хвилин при 18 °С - 20 °С (гальмо має бути вимкненим). Відбирають верхній шар, що містить плазму та

тромбоцити, за допомогою стерильної піпетки, залишаючи шар мононуклеарних клітин непорушним на межі розділу. Переносять шар мононуклеарних клітин у стерильну центрифужну пробірку за допомогою стерильної піпетки. Після цього промивають клітинний ізолят. Додають 3 об'єми розчину солі до мононуклеарних клітин у центрифужній пробірці. Обережно піпетують так, щоб утворився однорідний завис клітин. Центрифугують при 400–500g протягом 10–15 хвилин при 18–20 °С. Видаляють супернатант. Ресуспендують мононуклеарні клітини в 6–8 мл розчині солі. Центрифугують при 60–100g протягом 10 хвилин при 18–20 °С. Видаляють супернатант. Ресуспендують клітинний осад. Далі клітини підраховують у камері Горяєва та зберігають за температури -80°C [59].

4.2. Виділення ДНК з мононуклеарних клітин периферійної крові пацієнтів, використовуючи фенол-хлороформну екстракцію

Клітинна і ядерна мембрани руйнуються спільною дією SDS (додецилсульфат натрію) буферу і протеїнази К. Клітинні залишки від лізису, головним чином білкової природи, захоплюються органічними розчинниками, такими як фенол і хлороформ. ДНК, яка є нерозчинною в органічній фазі, присутня у незмішуваній водній фазі. ДНК осаджують, промивають, сушать і знову розчиняють у розчині у водному буфері [60].

Спочатку готують ряд розчинів: TRIS 2M pH 7.6 (242,2 г Tris Base + 800 мл дистильованої води, доводять pH до 7,6 за допомогою HCl і потім доводять до 1000 мл дистильованою водою до 1000 мл); MgCl₂ 1M (203,3 г MgCl₂ + дистильованою водою доводять до 1000 мл); NaCl 3M (175,32 г NaCl + дистильована вода до 1000 мл); EDTA 0,4 M pH 8 (Зважте 148,96 г EDTA + Вода 800 мл + після розчинення доводять pH до 8, додаючи Na OH приблизно

18 г). Після приготування розчинів їх зберігають за температури +4°C, під час приготування використовують стерильний посуд та стерильну дистильовану воду.

Далі готують робочі розчини: SLR (TRIS 2M pH 7.6 10 мл + MgCl₂ 1M 10 мл + NaCl 3M 6,6 мл + Вода дистильована до 2000 мл); SLB (TRIS 2M pH 7.6 10 мл + ЕДТА 0,4 M pH 8 50 мл 5 мл + NaCl 3M 34 мл 3,4 мл + 500 мл води + SDS 20% 20 мл 2 мл + води дистильованої до 2000 мл 200 мл); Розчин SLB / Протеїназа К (на цьому етапі важливо бути у рукавичках), 500 мг порошку протеїнази К (зберігається при +4°C) + 10 мл SLB + у великий градуйований циліндр з 500 мл SLB додаємо розчин і доводять до 1250; розчин розливають у маленькі ємності та заморожують при -20); (TRIS 2M pH 7.6 5 мл + ЕДТА 0,4 M pH 8 2,5 мл + вода дистильована до 1000 мл); фізіологічний розчин (NaCl 3M 50 мл + вода дистильована до 1000 мл); розчин етанолу 70 % (TE 10⁻¹ 600 мл + Етанол абсолютний до 2000 мл). Далі безпосередньо виділення ДНК.

1. Лізис еритроцитів крові. 1.1. Відкидання плазми (збирають пробірки з кров'ю в пробірку GREINER об'ємом 50 мл; центрифугують протягом 10 хвилин при 2000 об/хв; аспірують плазму, не торкаючись шару лейкоцитів; змішують еритроцити та лейкоцити). 1.2. Лізис еритроцитів (лізують 3 мл клітин крові в кінцевому об'ємі 10-15 мл розчином SLR; обережно збовтують 5 хв; центрифугують протягом 5 хвилин при 2000 об/хв; аспірують лізовані еритроцити, залишивши приблизно 0,5-1 мл; повторно суспендують осад за допомогою стерильної піпетки та доводять до 10 мл SLR; центрифугують 5 хв при 2000 об/хв; видаляють супернатант, залишивши приблизно 0,5-1 мл; якщо еритроцити все ще залишаються, ресуспендують клітинний осад у 5 мл SLR; третє центрифугування та видаляють супернатант (якщо робили третє ресуспендування); промивають PBS – 15 мл, обережно перемішуючи; центрифугують протягом 5 хвилин при 2000 об/хв; додають PBS до осаду клітин до 3,0 мл і розділяють на три пробірки по 1,0 мл; до 1 пробірки - 0,25 мл PBS+ 0,75 мл TriReagent – вортекс, зберігати на льоду -80°C (PHK); 2

пробірка - заморозити клітинний осад -80°C (ДНК); 3 пробірка - заморозити клітинний осад -80°C (ДНК).

2. Виділення ДНК та лізис лейкоцитів. 2.1. Після розморожування клітин на водяній бані при 50°C протягом однієї хвилини лізують лейкоцити/лімфоцити в 0,5 мл SLB + протеїнази К 25 мкл; гомогенізують пробірку обережним обертанням; інкубують протягом ночі при 50°C , перемішуючи. 2.2. Видалення білків: додають 1:1 об'єм фенолу та SLB-протеїнази К; перемішують 10-30 хв; відбирають верхню фазу після центрифугування протягом 5-10 хвилин при 2000 об/хв або 2-5 хвилин при 10000 g; повторюють крок 1 ще два рази, спочатку з сумішшю 1:1 фенол+хлороформ, а потім хлороформом.

3. Осадження ДНК за допомогою EtOH і NaCl. Спочатку додають 1:10 загального об'єму 5M NaCl; далі додають 2,5 об'єму (від загального об'єму) 96% охолодженого EtOH; після цього витримують суміш при -20°C мінімум 60 хвилин; потім відкидають осад після центрифугування протягом 30 хвилин при 14000 об/хв (10000-12000g) при $+4^{\circ}\text{C}$; наступним етапом промивають осад 75% охолодженим EtOH до $+4^{\circ}\text{C}$; відбирають осад і повторюють попередній етап ще два рази, після чого видаляють EtOH, висушуючи осад при $+20^{\circ}\text{C}$ (швидше при $+50^{\circ}\text{C}$), але важливо не пересушити; для розчинення осаду додають TE буфер (від 0,1 мл до 0,5 мл), після чого залишають при $+4^{\circ}\text{C}$ на ніч, а потім розчиняють осад у TE-буфері обережним піпетуванням; для перевірки якості і кількості виділеної та очищеної ДНК використовують NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific™, США). Зберігати зразок слід при -20°C .

4.3. Ампліфікація генів методом мультиплексної ПЛР

Вибір праймерів для ПЛР IGН. Проводили мультиплексну ПЛР з 5'-праймерами, специфічними для підгрупи IGНV, і 3'-праймерами, специфічними для гена IGНJ. 5'-праймери, були підібрані до лідерної області, розташованої безпосередньо перед перегрупуванням IG гена IGНV. Для 3'-кінця були використані консенсусні праймери, націлені на гени IGНJ [11,12].

ПЛР-ампліфікація. Спочатку готують суміші розведень праймерів, у окремих пробірках та заморожують їх для подальшого застосування. Для мастерміксу для ПЛР використовувалися суміш праймерів IGНV3: 10xNH₄ буфер (5 мкл на 1 зразок), суміш dNTP (4 мкл), MgCl₂ буфер (5 мкл), праймери (по 1 мкл кожного з трьох), DН₂O (вода без ДНКаз для ПЛР) (22,5 мкл) та рекомбінантна Таq ДНК полімераза (5 U/μL) (Thermo Scientific™, USA) (0,5 мкл) (мусить завжди перебувати та переноситися у холоді) або для іншої суміші праймерів IGНV-Leader-mix: 10xNH₄ буфер (5 мкл на 1 зразок), суміш dNTP (8 мкл), MgCl₂ буфер (6 мкл), праймери (по 3 мкл кожного з двох), DН₂O (ДНК вода для ПЛР) (14,5 мкл) та рекомбінантна Таq ДНК полімераза (5 U/μL) (Thermo Scientific™, США) (0,5 мкл). Полімеразу завжди слід додавати в останню чергу. Температурний режим для праймерів IGНV3 - 94°C (5 хв), 94°C (60 с) + 59°C (60с) + 72°C (90 с) – 35 циклів, 72°C (10хв) та 18°C (∞) та для IGНV-Leader-mix - 94°C (5 хв), 94°C (60 с) + 59°C (60с) + 72°C (90 с) – 39 циклів, 72°C (10хв) та 18°C (∞) [11, 12].

Продукти ПЛР перевіряють шляхом електрофорезу у 2% агарозному гелі UltraPure™ (Invitrogen, США). Для приготування гелю та електрофорезу використовують буфер 1xTAE (Трис-ацетатний буфер), а як барвник для забарвлення ДНК використовують 6X GelRed® Prestain Loading Buffer with Orange Tracking Dye (Biotium™, США), який є менш токсичним за звичний бромід етідію. Очікуваний розмір продукту: 500-550 п.н.. У окремих випадках (за відсутності чи недостатньої кількості продукту 500-550 п.н.) також беруть до уваги продукт розміром 1000 п.н. [11, 12].

4.4. Виділення продуктів ПЛР IGHV з агарозного гелю після електрофорезу ДНК

Для виділення ПЛР-продукту початковим етапом є електрофоретичне розділення якомога більшої кількості продукту кожного зразка у 3% агарозному гелі NuSieve™ GTG™ (Lonza™, Швейцарія). Для приготування гелю та електрофорезу використовують виключно свіжий, приготований на тричі дистильованій воді та бажано холодний буфер 1xTAE (Трис-ацетатний буфер), а як барвник для забарвлення ДНК використовували 6X GelRed® (Biotium™, USA). Далі скальпелем вирізають шматки гелю з відповідним продуктом (500, 550 та/чи 1000 п.н.) та заморожують при -20°C для подальшого виділення ДНК [12].

Наступним кроком було виділення ДНК для секвенування. Виділення проводили за допомогою комерційного набору MinElute PCR Purification Kit (Qiagen™, Німеччина). Після розморожування зважують вирізані шматки гелю. Додають 6 об'ємів буфера QG до 1 об'єму гелю. Інкують при 50°C протягом 10 хвилин (або до повного розчинення гелю). Для швидшого розчинення гелю обережно струшують під час інкубації у пробірці кожні 2-3 хвилини. Після повного розчинення шматочків гелю варто переконатися, що колір суміші жовтий. Якщо колір суміші оранжевий або фіолетовий, слід додати 10 мкл 3М ацетату натрію, рН 5,0, і перемішати. Далі додають 1 об'єм ізопропанолу до зразка та перемішують кілька разів перевертаючи пробірку. Потім переливають вміст пробірки у комерційні колонки MinElute (не більше 800 мкл). Після цього центрифугують протягом 1 хв. Надосад зливають, а колонки MinElute ставлять назад у ємність для збору. Додають 500 мкл буфера QG і центрифугують протягом 1 хв. Надосад зливають, а колонки MinElute ставлять знову у ємність для збору. Для промивання додають 750 мкл буфера PE в колонку MinElute, інкують 2–5 хв після додавання буфера і центрифугують протягом 1 хв. Надосад зливають, а колонки центрифугують

ще 1 хвилину при $\geq 10\ 000g$. Після цього колонки MinElute варто поставити у чисту мікроцентрифужну пробірку на 1,5 мл. Для елюції ДНК додають 10 мкл буфера EB (10 mM Tris·Cl, pH 8,5) по центру мембрани колонки. Від отриманої очищеної ДНК відбирають 5 мкл для аналізу концентрації та чистоти ДНК методом електрофорезу, а залишок заморожують при -20°C для секвенування [61].

Наступним кроком є перевірка якості і кількості виділеної ДНК за допомогою NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific™, США) та електрофорез у 2% агарозному гелі UltraPure™ (Invitrogen, США) з 6X GelRed® Prestain Loading Buffer with Orange Tracking Dye (Biotium™, США) у якості барвника. Задовільна концентрація ДНК повинна бути більше 20 нг/мкл з одним чітким бендом виділеної довжини у гелі без домішок.

4.5. Секвенування очищених продуктів ПЛР та аналіз послідовностей генів з використанням бази даних NCBI

Першим етапом було приготування суміші для секвенування. Повністю розморожують вміст кіту BigDye™ Terminator (NimaGen™, Нідерланди) та праймери на льоду. Далі збовтують пробірки протягом 2-3 секунд, після чого центрифугують 2-3 секунди. Чотири мікроцентрифужні пробірки позначають «прямий праймер», «зворотній праймер» та два «контролі». Далі додають BigDye™ Terminator (по 8 мкл до кожної пробірки); 1 мкл прямого праймеру у концентрації 3.2 мкМ до пробірок «прямий праймер» та «контроль»; зворотній праймер 3.2 мкМ — 1 мкл до пробірки «зворотній праймер» та іншого контролю; D_2O по 9 мкл; та попередньо розведений зразок або контроль по 2 мкл. Загальний об'єм має бути 20 мкл. Далі розносять суміш по лунках планшету і вкривають плівкою

MicroAmp™ (Invitrogen, США). Вміст лунок обережно перемішують 2-3 секунди і потім центрифугують 5-10 при 1000g секунд на центрифугу з поворотним ковшем для збору вмісту в донній частині лунки. Секвенування ДНК проводилося за Сенгером. Метод секвенування за Сенгером складається з 6 етапів: двохланцюгова ДНК денатурується на дві одноланцюгові ДНК; додається праймер, який відповідає одному кінцю послідовності; додаються чотири розчини полімерази з чотирма типами dNTP, але лише одним типом ddNTP; починається реакція синтезу ДНК, і ланцюг подовжується, доки випадковим чином не буде включений термінуючий нуклеотид; отримані фрагменти ДНК денатуруються на одноланцюгові ДНК; денатуровані фрагменти відокремлюють електрофорезом у гелі та визначають послідовність [12].

4.6. ПЛР в реальному часі для кількісного виявлення ДНК EBV

Було використано Real Time Amplification kit test for the quantitative detection of EBV (Sacace Biotechnologies™, Німеччина). Для реакції загальний об'єм має бути 25 мкл, об'єм зразка ДНК – 10 мкл. Спочатку у реакційні пробірки додають по 10 мкл попередньо розведених зразків (концентрація ДНК мусить бути не більше 20 нг/мкл). Кожний зразок варто робити мінімум у трьох повторях. Потім готують суміш праймерів та полімерази (мастермікс), розраховуючи їх кількість – 10 мкл на зразок, PCR-mix-2-FRT 5 мкл і TaqF 0,5 мкл. PCR-mix-1-FRT EBV/CMV7HHV-6/Glob (не варто піддавати дії світла, аби уникнути руйнуванню флуоресцентних міток). Суміш ретельно піпетують. Додають 15 мкл реакційної суміші до 10 мкл зразку у відповідну пробірку, піпетуючи. Пробірки переносять у прилад у такій послідовності: зразки, негативні контролю, позитивні контролю, калібратори. Програмують

приладз використанням наступних температурних режимів: 95°C, 15 хвилин - 1 цикл; 95°C, 5 секунд, 60°C, 20 секунд, 72°C, 15 секунд - 5 циклів; 95°C, 5 секунд, 60°C, 30 секунд, 72°C, 15 секунд – 40 циклів. Надалі проводять підрахунок результатів [62].

4.7. Імуноферментний аналіз

Імуноферментний аналіз було проведено для кількісної оцінки рівня імуноглобулінів класу М та G до EBV-CA та IgG до EBNA-1. Перевірка зразків на імуноглобулін класу М проводилася з метою встановлення перебігу гострого інфекційного процесу, а на IgG – для додаткового підтвердження наявності вірусу та перенесеної інфекції. Крім цього проводився тест на авідність IgG.

Для аналізу рівня антитіл М та G було використано комерційні набори: Anti-EBV-CA ELISA (IgM); Anti-EBV-CA ELISA (IgG); Anti-EBNA-1 ELISA (IgG) (EUROIMMUN™, Німеччина). Кожен набір вміщував 96-лункові планшети з адсорбованим відповідним антигеном, ряд контролів (позитивний та негативний), 3 калібратори, для подальшої кількісної оцінки, мічені пероксидазою хрому анти-людські тваринні (кролячі чи козячі) антитіла, буфер для розведення зразків та контролів, десятикратний концентрат миючого буферу, субстрат (хромоген) та стоп-розчин, а у якості зразків використовувалася плазма крові пацієнтів [63].

Перед проведенням аналізу зразків їх розбавляють буфером для зразків у співвідношенні 1:100, а також готують миючий буфер з наявного концентрату шляхом додавання дистильованої води у співвідношенні 1:10. Перед проведенням аналізу набір витримують не менше 30 хвилин при

кімнатній температурі після зберігання при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ для повного розчинення осаду, утвореного деякими буферними розчинами.

Спершу переносять 100 мкл калібраторів, позитивних і негативних контролів або розведених зразків пацієнтів в окремі лунки мікропланшета згідно з визначеною попередньо послідовністю. Інкують 30 хвилин при кімнатній температурі (від $+18^{\circ}\text{C}$ до $+25^{\circ}\text{C}$).

Після кожного кроку лунки промивають миючим розчином таким чином: спорожнюють лунки (для цього краще обрати окрему ємність, оскільки відпрацьовані рідини утилізують лише після дезінфікування), а потім промивають кожну лунку тричі, додаючи по 300 мкл миючого розчину, добре струшуючи після кожного відмивання та постукуючи поверхнею планшета на адсорбуючій поверхні, наприклад, чистій одноразовій серветці. Після додавання миючого розчину до лунок, його витримують 60 секунд, і лише після цього зливають.

Надалі вносять 100 мкл кон'югату ферменту (анти-людські IgG мічені пероксидазою хрому) у кожну лунку мікропланшета та інкують 30 хвилин при кімнатній температурі, краще попередньо встановивши планшети на шейкер, для постійного рівномірного перемішування рідини у планшетах.

Після інкубації планшет знову промивають і потім вносять по 100 мкл розчину субстрату в кожну лунку мікропланшета, інкують 15 хвилин при кімнатній температурі, встановивши на шейкер і накривши планшет для запобігання проникненню світла.

Потім рівно за 15 хвилин вносять по 100 мкл стоп-розчину в кожну лунку мікропланшета у тому ж порядку та з тією ж швидкістю, що й розчин субстрату.

Протягом 30 хвилин після зупинки реакції стоп-розчином проводять фотометричне вимірювання інтенсивності забарвлення при довжині хвилі 450 нм і контрольній довжині хвилі у діапазоні 620-650 нм. Перед вимірюванням

вміст мікропланшету додатково перемішують для однорідного розподілу розчину.

Для вимірювання інтенсивності забарвлення використовувався мікропланшетний спектрофотометр Varioskan™ LUX (Thermo Scientific™, США).

Для оцінки авідності імуноглобулінів класу G було використано комерційний набір: Epstein-Barr virus capsid antigen (EBV-CA) avidity determination (EUROIMMUN™, Німеччина). Кожен набір вміщував 96-лункові планшети з адсорбованим відповідним антигеном, ряд контролів (2 позитивних: висока авідність, низька авідність та негативний), розчин сечовини (для дисоціації антитіл), фосфатний буфер, 3 калібратори для подальшої кількісної оцінки, мічені пероксидазою хрому анти-людські тваринні (кролячі чи козячі) антитіла, буфер для розведення зразків та контролів, десятикратний концентрат миючого буферу, субстрат (хромоген) та стоп-розчин, а у якості зразків використовувалася плазма крові пацієнтів.

Попередньо підготовлюють набір так само, як і для попереднього аналізу.

Спочатку переносять 100 мкл контролів та розведених зразків пацієнтів у повторах (кожен контроль або зразок у двох повторах). Далі інкубують 30 хвилин при кімнатній температурі (від +18°C до +25°C) на шейкері.

Далі зливають вміст лунок, після чого промивають один раз.

Надалі вносять 200 мкл розчину сечовини в кожен першу лунку з «пари» мікропланшета та 200 мкл фосфатного буфера в кожен другу лунку з «пари». Інкубують 10 хвилин за тих самих умов, що описані вище. Після цього лунки промивають тричі.

Надалі вносять по 100 мкл кон'югату (анти-людські IgG мічені пероксидазою хрому) у кожен лунку мікропланшета та інкубують 30 хвилин. Після цього лунки промивають тричі.

Далі вносять 100 мкл розчину субстрату в кожен лунку мікропланшета та інкубують 15 хвилин при кімнатній температурі, встановивши на шейкер, і накривши планшет для запобігання проникнення світла.

Потім рівно через 15 хвилин, вносять по 100 мкл стоп-розчину в кожен лунку мікропланшета в тому ж порядку та з тією ж швидкістю, що й розчин субстрату.

Далі впродовж 30 хвилин після зупинки реакції стоп-розчином проводять фотометричне вимірювання інтенсивності забарвлення при довжині хвилі 450 нм і контрольній довжині хвилі у діапазоні 620-650 нм. Перед вимірюванням вміст мікропланшета додатково перемішують для однорідного розподілу розчину [63].

4.8. Статистичний аналіз результатів

Для статистичного аналізу результатів використовували програму Microsoft Excel та алгоритми, представлені на веб-сайті Statistics Kingdom. Розраховували U-критерій Манна-Вітні, критерій Краскела-Уолліса та критерій Фішера.

4.9. Етичні аспекти проведення досліджень

Дослідження проводилось відповідно до законодавства Ради Європи та Європейського Союзу, Гельсінської декларації, Тайбейської декларації [64] та Конвенції про захист прав людини та людської гідності в галузі біології та медицини, а також Рекомендацій з належної клінічної практики [65]. Було забезпечено конфіденційне зберігання даних, отриманих під час дослідження. Такі дані доступні лише для закритої дослідницької групи. Пацієнтам, які погодились взяти участь у дослідженні, були присвоєні ідентифікаційні коди, за якими їх дані зберігаються в журналі реєстрації даних, спеціально створеному для дослідження. Статистичний аналіз результатів здійснювався лише з використанням таких закодованих персональних даних. Після публікації результатів дослідження закодовані дані учасників дослідження будуть видалені. Персональні дані пацієнтів можуть передаватися за межі країн ЄС лише в анонімній статистичній формі у наукових публікаціях. Усі дослідники дотримувалися захисту та конфіденційності даних пацієнтів відповідно до чинних норм і нормативних актів у сфері загальних прав людини, захисту даних фізичних осіб.

РОЗДІЛ 5

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що форма високого ризику CLL характеризується немутованими IGHV генами. Тобто статус мутації IGHV генів є важливим прогностичними маркерами при CLL і впливатиме на вибір лікування та подальший розвиток захворювання. EBV інфекцію пов'язують з багатьма аутоімунними та раковими захворюваннями, через шляхи його впливу на уражені клітини. Отже, можна припустити, що інфекція EBV може бути пов'язана з формою високого ризику CLL з немутованими IGHV, таким чином сприяючи агресивності та тяжкості перебігу захворювання.

Щоб перевірити цю гіпотезу, метою цього дослідження було проаналізувати наявність EBV у мононуклеарних клітинах, отриманих з периферійної крові нелікованих пацієнтів із CLL і пов'язати його з двома формами CLL, індолентна (помірна) форма низького ризику та агресивна форма захворювання CLL високого ризику.

У дослідження були наступні завдання: 1) проаналізувати IGHV на мутацію у нелікованих пацієнтів із CLL; 2) проаналізувати кількість копій ДНК EBV у мононуклеарних клітинах периферійної крові у пацієнтів із CLL; 3) дослідити зразки на рівні імуноглобулінів класу G до капсидного білка та білка латентної фази EBV; 4) дослідити зразки на рівні імуноглобулінів класу M до капсидного білка EBV; 5) визначити авідність для імуноглобулінів класу G до капсидного білка EBV у отриманих зразках; 6) проаналізувати та об'єднати результати виконання завдань.

У дослідженні брали участь 113 нелікованих пацієнтів з CLL у віковій групі від 41 до 88 років (середній вік 70 років). З них 57 жінок та 56 чоловіків. 55 пацієнтів були з немутованими та 52 з мутованими IGHV. 50 пацієнтів знаходилися на початковій стадії CLL, 38 на проміжній та 16 на останній.

Для подальшого аналізу пацієнтів було розділено за трьома ознаками для порівняння. Перша: дві групи з мутованими IGHV (<98%) та немуваними IGHV (98-100%); друга: позитивні (≥ 5 копій ДНК EBV на 100 000 клітин) та негативні (< 5 копій ДНК EBV на 100 000 клітин) на ДНК EBV; третя: для порівняння по стадіях пацієнтів розділили на три групи з початковою стадією (0-I стадії за класифікацією), проміжною (II стадія) та останньою (III-IV стадії)

За кожною з ознак групи порівнювали за наступними показниками: рівень IgG до капсидного антигену EBV; авідність IgG до капсидного антигену EBV; рівень IgG до білка латентної фази EBV; а також середній вік та статтю. Для IGHV групи також порівнювали стадії та кількість копій EBV. Для ДНК EBV груп порівнювали стадії та мутації. Стадії порівнювали також за мутаціями та кількістю ДНК копій вірусу. Також, для порівняння вікових особливостей та захворюваності в залежності від статі було використано такий показник, як рівень CD38+ лімфоцитів.

Після проведення аналізу на рівень імуноглобулінів класу M жоден зі зразків не виявився позитивним, отже цей показник не було описано.

5.1. CLL та стаття

Деякі дослідження в інших країнах показали, що CLL частіше зустрічається у чоловіків, ніж у жінок - ризик розвитку CLL у чоловіків майже вдвічі вищий, ніж у жінок, і це збільшується з віком [66].

У даному дослідженні не виявлено статистично значущої різниці між кількістю лімфоцитів у крові та статтю ($p > 0,05$). Для жінок медіана становить 15,5, а для чоловіків медіана 12,9. Також не було статистичної різниці між віком та статтю ($p > 0,05$) (табл. 5.1 та рис. 5.1).

Таблиця 5.1

Залежність між кількістю лімфоцитів та статтю у хворих на CLL

Стать та кількість пацієнтів	Кількість лімфоцитів в крові, медіана (Q1-Q3)	Вік, медіана (Q1-Q3)	CD38+ B-кількість лімфоцитів в крові, медіана (Q1-Q3)
Жінки (57)*	15,5 (8,14 – 20,7)	67 (62,0-76)	11,7 (2,19 – 20,8)
Чоловіки (55)*	12,9 (8,73 – 26,8)	69 (63,3-76,8)	3,4 (1,22 – 15,65)
Значення P	0,95	0,92	0,22

*- у дужках наведена кількість пацієнтів кожної статті

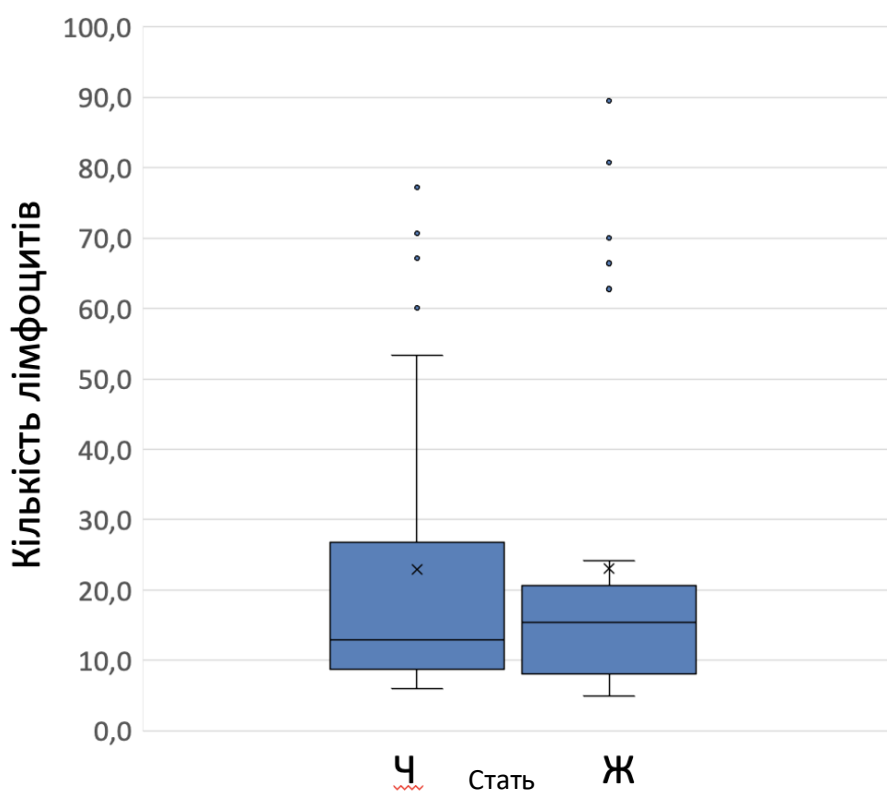


Рис. 5.1. Зв'язок між кількістю лімфоцитів і статтю: вісь Y- кількість лімфоцитів ($\cdot 10^9/\text{мкл}$), вісь X – стать

5.2. CLL та стадії захворювання

Кількість лімфоцитів у крові на стадіях 0 і II ($p = 0,004$) та стадіях 0 і III-IV ($p = 0,002$) статистично відрізняється (рис. 5.2), тоді як статистично значущої різниці між показниками інших стадій не було виявлено. Тобто у початковій стадії та стадії II, а також у початковій стадії та стадіях III-IV кількість лімфоцитів в крові була різною (табл. 5.2.), оскільки разом зі збільшенням кількості лімфоцитів збільшуються та змінюються і стадія, що свідчить про зміни стану здоров'я людини [7, 8].

Таблиця 5.2

Зв'язок між стадіями та кількістю лімфоцитів у крові, у дужках загальна кількість пацієнтів з відповідною стадією

Стадії, кількість пацієнтів	Кількість лімфоцитів в крові, медіана (Q1-Q3)
0 (41)*	8,7 (7,12 – 10,9)
I (9)*	17,1 (12,9 – 21,0)
II (38)*	17,7 (10,9 – 32,8)
III-IV (16)*	42,1 (12,9 – 75,4)

*- у дужках кількість пацієнтів на кожній стадії CLL

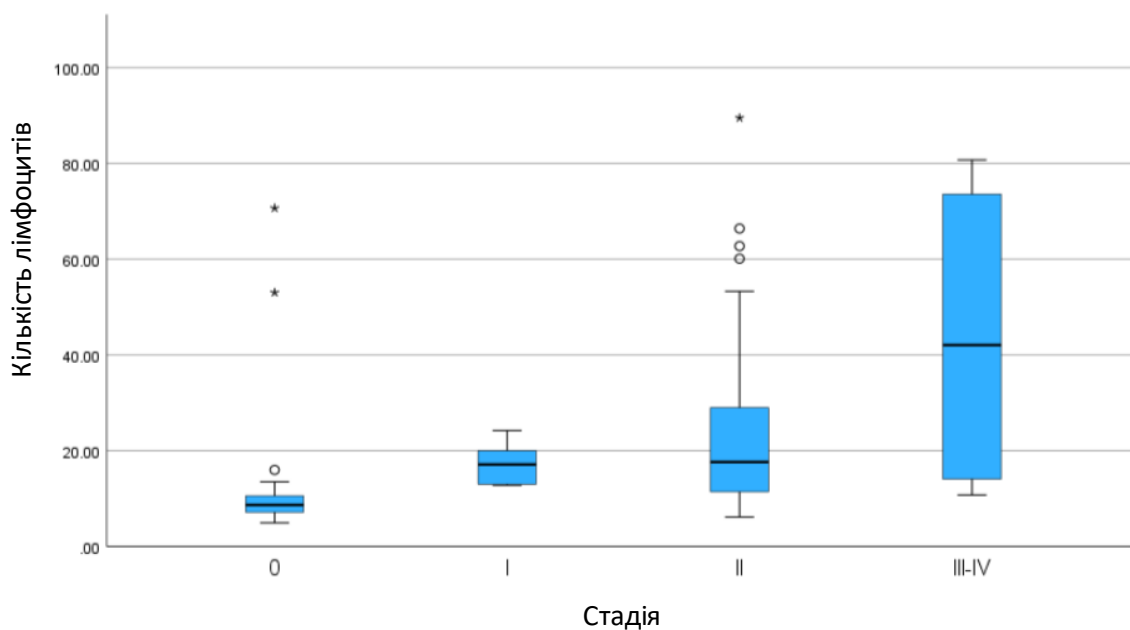


Рис. 5.2. Порівняння середньої кількості лімфоцитів у пацієнтів на різних стадіях CLL: вісь Y- кількість лімфоцитів ($\cdot 10^9/\text{мкл}$); вісь X – клінічна стадія пацієнта

На рисунку 5.3. представлено кількість CD38+ В-лімфоцитів крові та стадії. Відмінності в рівні експресії маркера CLL CD38 на В-лімфоцитах на різних стадіях не були статистично достовірними ($p>0,05$). Ймовірно, рівні експресії CD38+ змінюються протягом хвороби. Крім того, не було статистичної різниці між віком і стадіями ($p>0,05$).

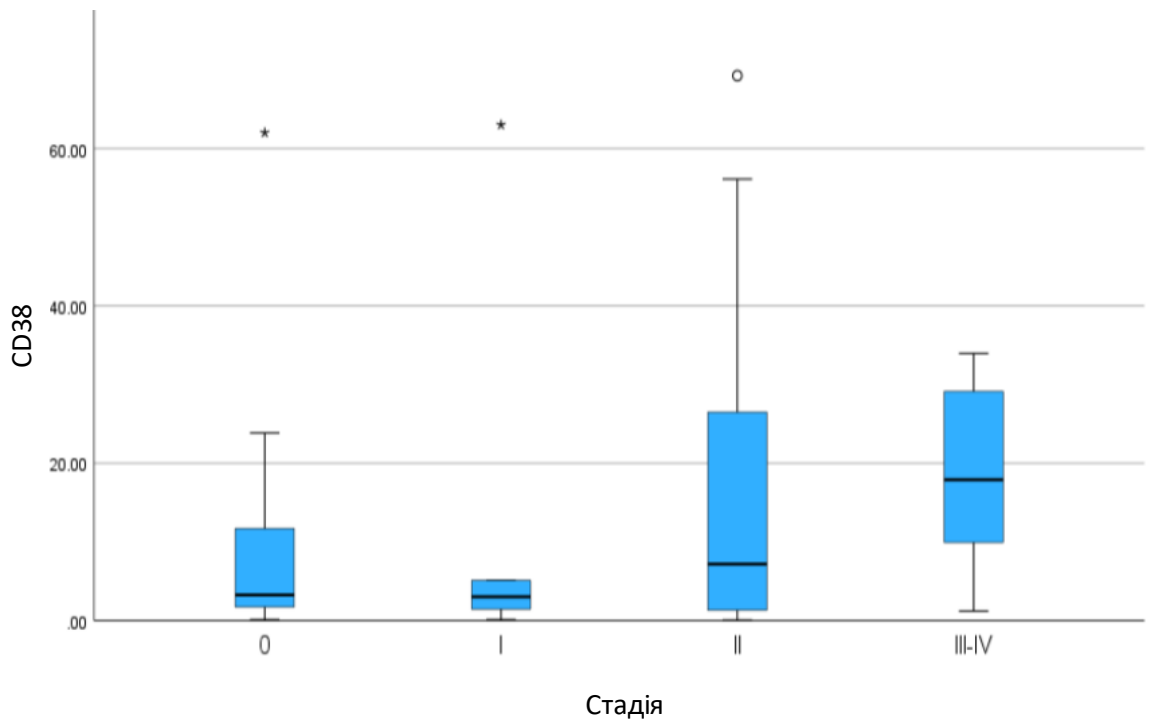


Рис. 5.3. Порівняння середньої кількості CD38+ В-лімфоцитів у крові пацієнтів на різних стадіях: вісь Y – кількість CD38+ В-лімфоцитів у крові ($\cdot 10^9/\text{мкл}$), вісь X – клінічна стадія пацієнта

5.3. CLL та EBV

Серед хворих на CLL ДНК EBV виявлено більше у жінок – 54,17%, тоді як відсоток чоловіків, позитивних на ДНК EBV, становив 45,83% (рис. 5.4).

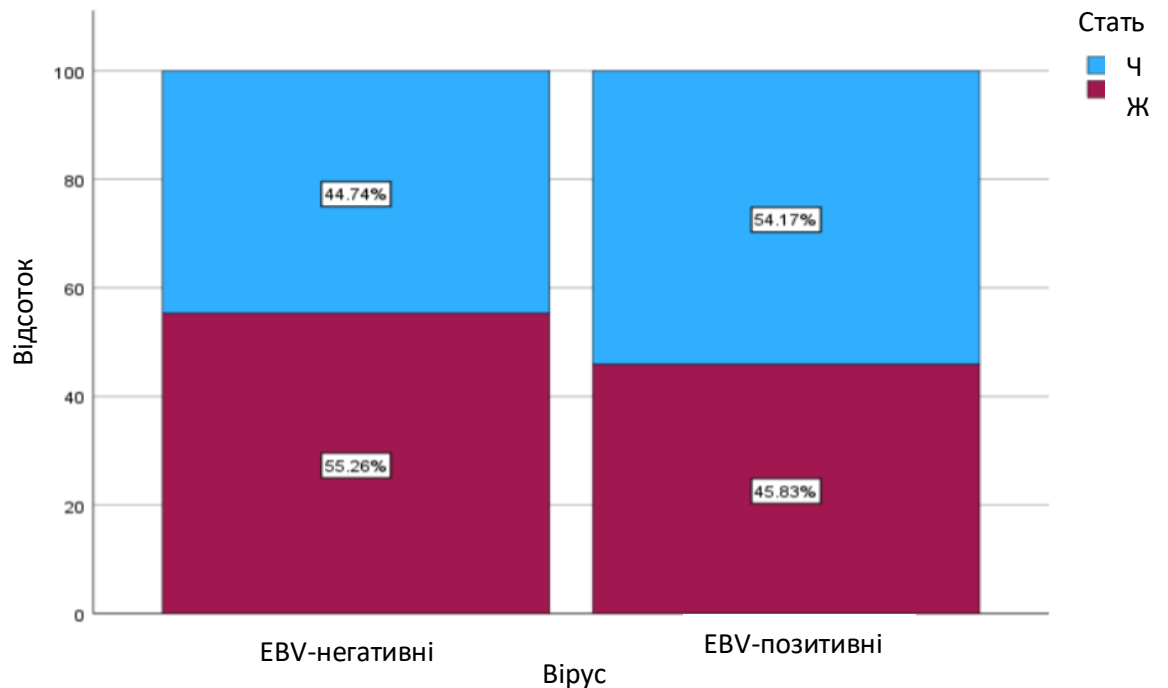


Рис. 5.4. Зв'язок статі пацієнтів та EBV: вісь Y – відсоток пацієнтів жіночої або чоловічої статі у групі з виявленою або не виявленою ДНК EBV, вісь X – групи EBV-позитивні або EBV-негативні пацієнти

У табл. 5.3 зазначено, що на всіх стадіях переважають особи, негативні на ДНК EBV - 61 порівняно з 42 людини, які мають позитивний результат на ДНК EBV (40,7% позитивних), що є спільним для цього дослідження та, наприклад, корелює з результатами іншого дослідження [66], де серед 243 пацієнтів, було виявлено лише 10% EBV-позитивних.

Як у EBV-позитивній, так і у EBV-негативній групі більша кількість осіб відповідала стадіям 0 і II. На основі цього можна припустити, що кількість людей з діагностованою CLL та негативним результатом активації інфекції EBV переважає над кількістю хворих на CLL із наявністю ДНК EBV. Отже, ґрунтуючись на отриманих результатах, існує низька ймовірність ($p > 0,05$), що EBV впливає на вірогідність захворіти на CLL, а також не впливає на прогресування захворювання. Такі дані не співпадають з результатами

більшості інших досліджень, де була встановлена кореляція між стадіями захворювання та наявністю ДНК EBV: ДНК вірусу частіше виявляли у пацієнтів на останніх стадіях захворювання [40, 66]. Оскільки вибірка на стадіях III-IV була невеликою, щоб зробити висновки про вплив EBV на прогресування та агресивність пізніх стадій CLL, необхідні подальші дослідження із залученням більшої кількості пацієнтів.

Таблиця 5.3

Зв'язок між стадіями та наявністю ДНК EBV

		EBV ДНК		Загалом
		Негативні зразки, кількість, %	Позитивні зразки, кількість, %	
Стадія	0-I (50)	34 (68,0)	16 (32,0)	50 (100%)
	II (37)	18 (48,6)	19 (51,4)	37 (100%)
	III-IV (16)	9 (56,25)	7 (43,75)	16 (100%)
Загалом		61 (59,2)	42 (40,8)	103 (100%)

*у дужках наведена абсолютна кількість пацієнтів з відповідною стадією захворювання

На основі аналізу отриманих результатів припускаємо, що людина, уражена EBV ще до початку CLL на початковій стадії може зазнати тимчасової реактивації EBV з прогресуванням захворювання, оскільки зі збільшенням стадії збільшується і кількість лімфоцитів. Цим можна пояснити найбільший відсоток EBV-позитивних пацієнтів на стадії II. На стадії II спостерігається проміжний стан ризику, коли ще є шанс на одужання (рис. 5.5).

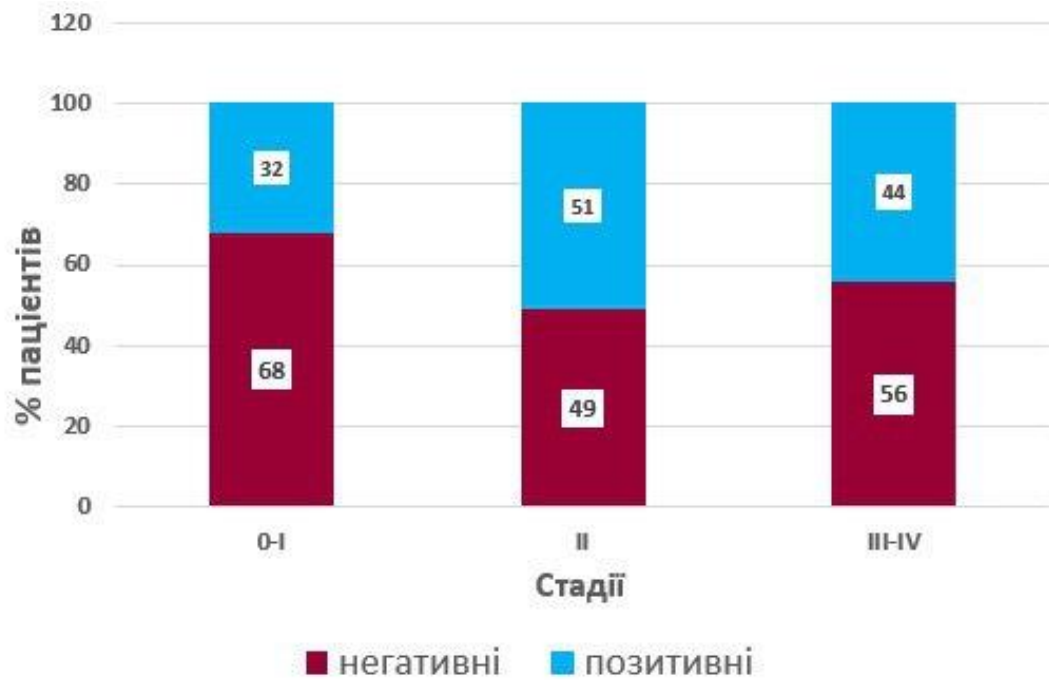


Рис. 5.5. Зв'язок між стадіями CLL та кількістю EBV-позитивних пацієнтів: вісь Y – відсоток пацієнтів з виявленою або не виявленою ДНК EBV, вісь X – клінічна стадія пацієнтів

5.4. Мутаційний статус В-клітинного рецептора IGHV

Кількість пацієнтів з мутованим IGHV (<98% подібності з послідовностями наївних В-лімфоцитів) становила 52, а з немуваним (98-100% подібності) – 55.

Статистично значущої різниці середнього віку для пацієнтів з CLL (рис. 5.6) з немуваним (98-100%) IGHV та мутованими (<98%) IGHV не виявлено (медіани становили 70 та 69 років відповідно), що не підтверджує висновок попередніх досліджень [66] щодо кореляції віку та агресивності захворювання.

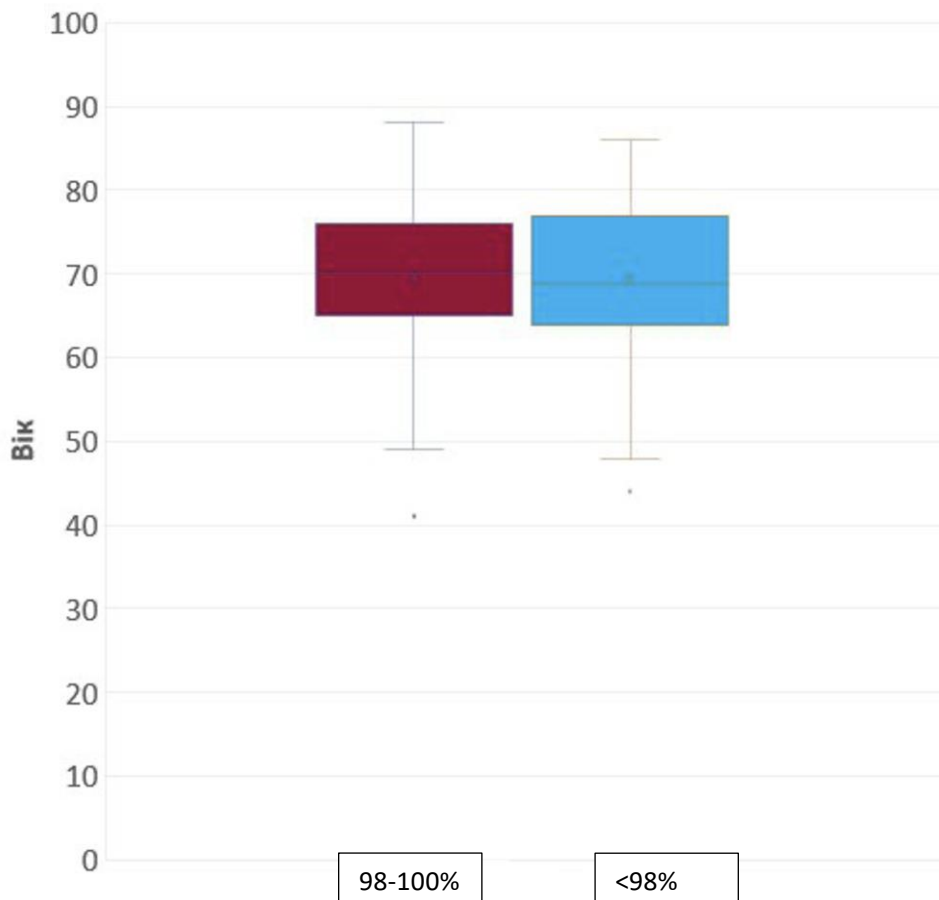


Рис. 5.6. Середній вік пацієнтів із різним статусом мутації IGHV генів: вісь Y- вік пацієнтів, вісь X – ступінь відмінності від IGHV до селективної мутації

На рис. 5.7 зображено розподіл мутаційного статусу IGHV по стадіях захворювання CLL. Мутаційний статус IGHV має важливе прогностичне значення при CLL [1, 11, 12, 57]. Захворювання пацієнтів зі злякисними В-клітинами, що експресують немутовані гени IGHV, зазвичай є більш агресивним, ніж у пацієнтів з клітинами, що експресують мутовані IGHV. Зі збільшенням стадії захворювання збільшується і кількість хворих з немутованим IGHV. Незважаючи на значну кількість пацієнтів із високим рівнем немутованого IGHV, статистично значущою виявилася різниця лише між початковою та останньою стадіями ($p=0,04$).

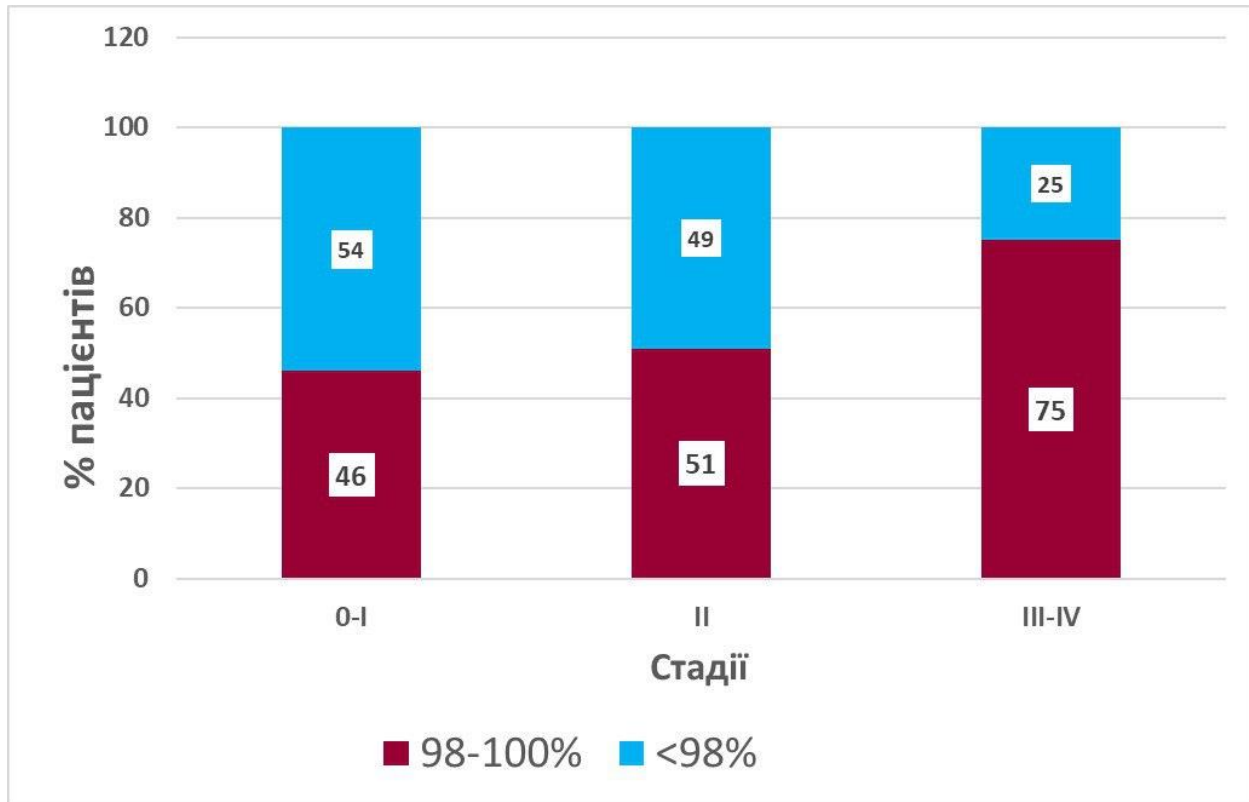


Рис. 5.7. Залежність мутацій IGHV від стадії CLL: вісь Y- пацієнтів з мутованими або немутуваними IGHV, %, вісь X – клінічна стадія пацієнтів

5.5. Мутаційний статус В-клітинного рецептора IGHV та EBV

Як видно з рисунку 5.8. та таблиці 5.4. різниця між групою EBV-негативних пацієнтів з немутуваними IGHV (98-100%) та групою EBV-позитивних пацієнтів з немутуваними IGHV (98-100%) не є статистично значущою ($p > 0,05$). Отже, не спостерігалася кореляція між наявністю EBV та агресивністю захворювання, хоча про таку кореляцію і зазначали в інших дослідженнях [39, 40, 43].

Таблиця 5.4

**Розподіл пацієнтів на групи з мутованим або немуваним IGHV,
та зв'язок з EBV**

Пацієнти		Наявність ДНК EBV		Загалом:
		EBV- позитивні	EBV- негативні	
IGHV	Не мутований IGHV 98-100% (подібності з зародковою лінією)	20	34	54
	Мутований IGHV <98% (подібності з зародковою лінією)	22	30	52
Загалом:		42	64	106

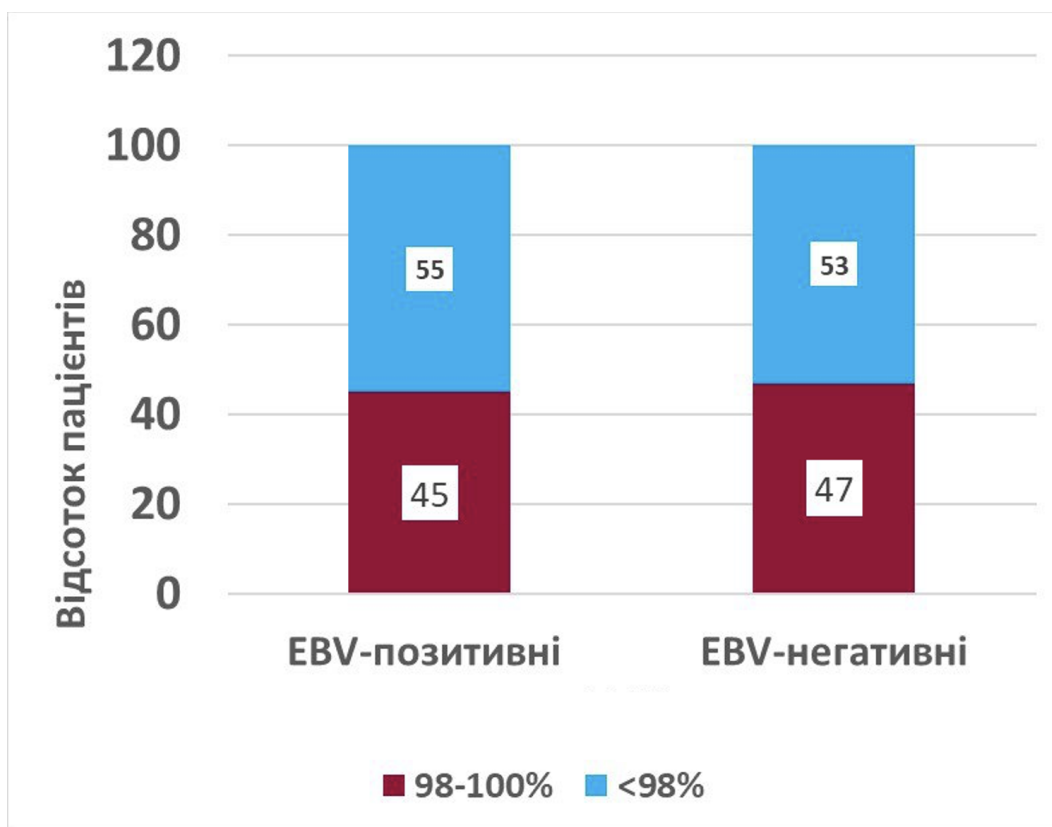


Рис. 5.8. Статус мутації IGHV у EBV-позитивній або EBV-негативній групах пацієнтів: вісь Y – відсоток пацієнтів з мутованими або немутуваними IGHV, вісь X – групи EBV-позитивні або EBV-негативні

5.6. Мутаційний статус В-клітинного рецептора IGHV та рівні імуноглобулінів

У даній роботі рівень антитіл визначався у відносних одиницях на мл (RU/ml). Позитивним вважався результат ≥ 16 RU/ml. Як видно з рис. 5.9, не спостерігалось статистично значущої різниці ($p > 0,05$) між статусом мутації IGHV та рівнем IgG до капсидного білка EBV. А отже можна ще раз зробити висновок, що агресивність захворювання, зумовлена мутаційним статусом, не пов'язана з активністю EBV (медіани 225,1 та 211,9).

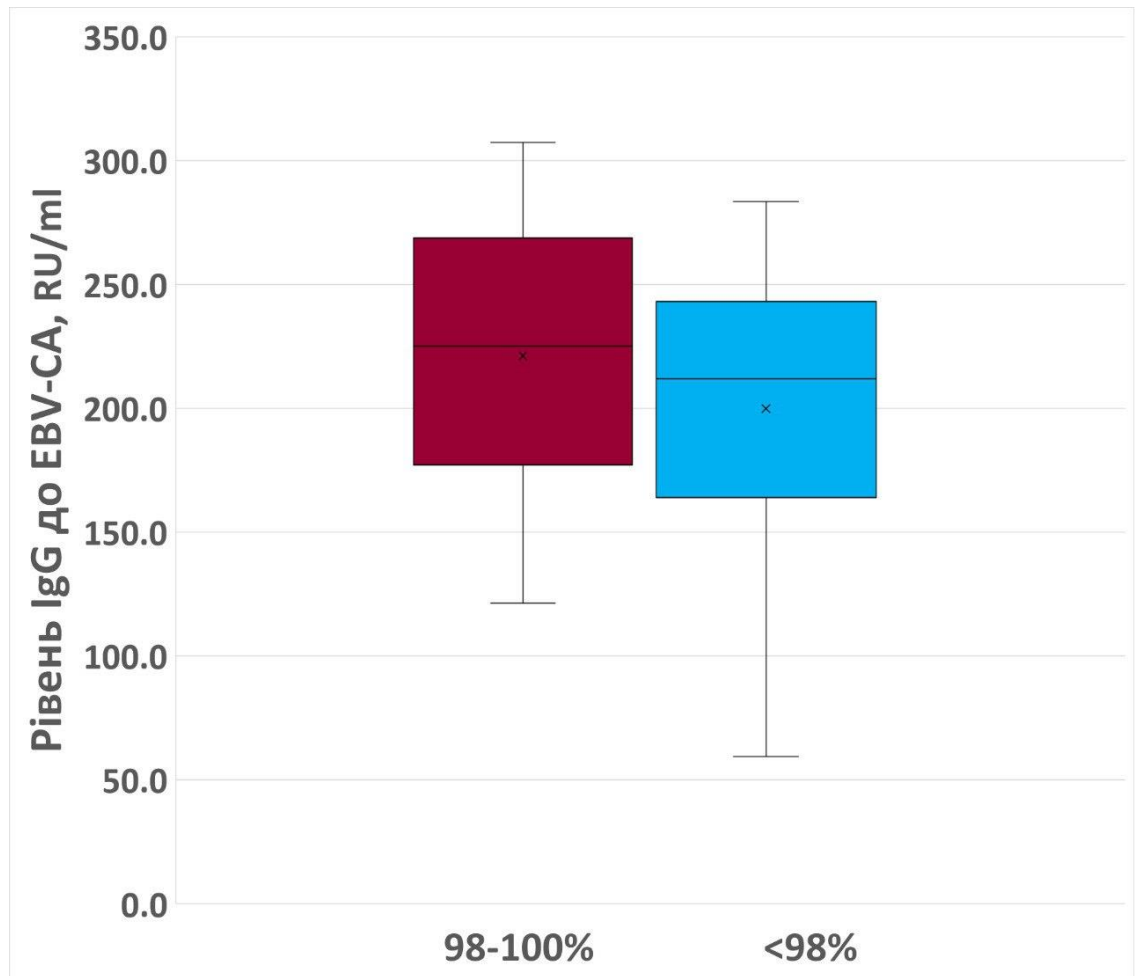


Рис. 5.9. Середні рівні IgG до капсидного білка EBV у групах з мутованими та немутуваними IGHV: вісь Y – рівень IgG до капсидного білка EBV, вісь X – групи пацієнтів немутуваними та з мутованими IGHV. Медіани 225,1 та 211,9

Аналогічно, не спостерігався достовірний зв'язок ($p > 0,05$) між статусом мутації IGHV та рівнем IgG до EBNA1 (рис. 5.10). Отже, EBV навіть впродовж латентної фази не мав впливу на статус мутації IGHV (медіани 225,1 та 211,9).

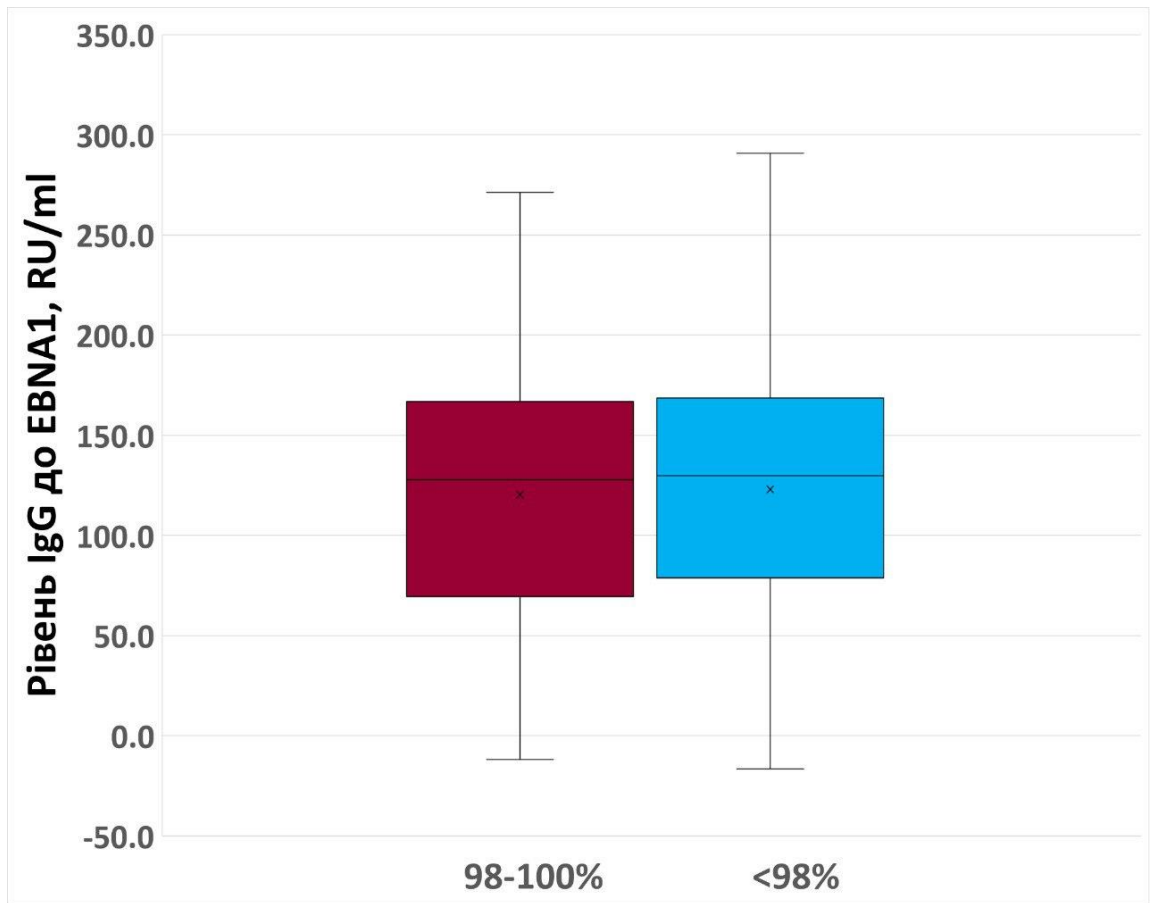


Рис. 5.10. Середні рівні IgG до EBNA1 у пацієнтів з мутованими та немутуваними IGHV: вісь Y – рівень IgG до EBNA1, вісь X – групи пацієнтів немутуваними та з мутованими IGHV. Медіани 127,7 та 129,7

Авідність – це показник сили зв'язку антитіла з антигеном. При виконанні даного дослідження високою вважалась авідність $>40\%$. Висока авідність вказуватиме на перенесену тривалий час назад EBV-інфекцію, тоді як недавня реактивація визначатиме гострий інфекційний процес або нещодавній його перебіг (низька авідність). Впродовж дослідження не було виявлено статистично значущої різниці між авідністю IgG до капсидного білка EBV та статусом мутації, як видно з рис. 5.11 ($p>0,05$).

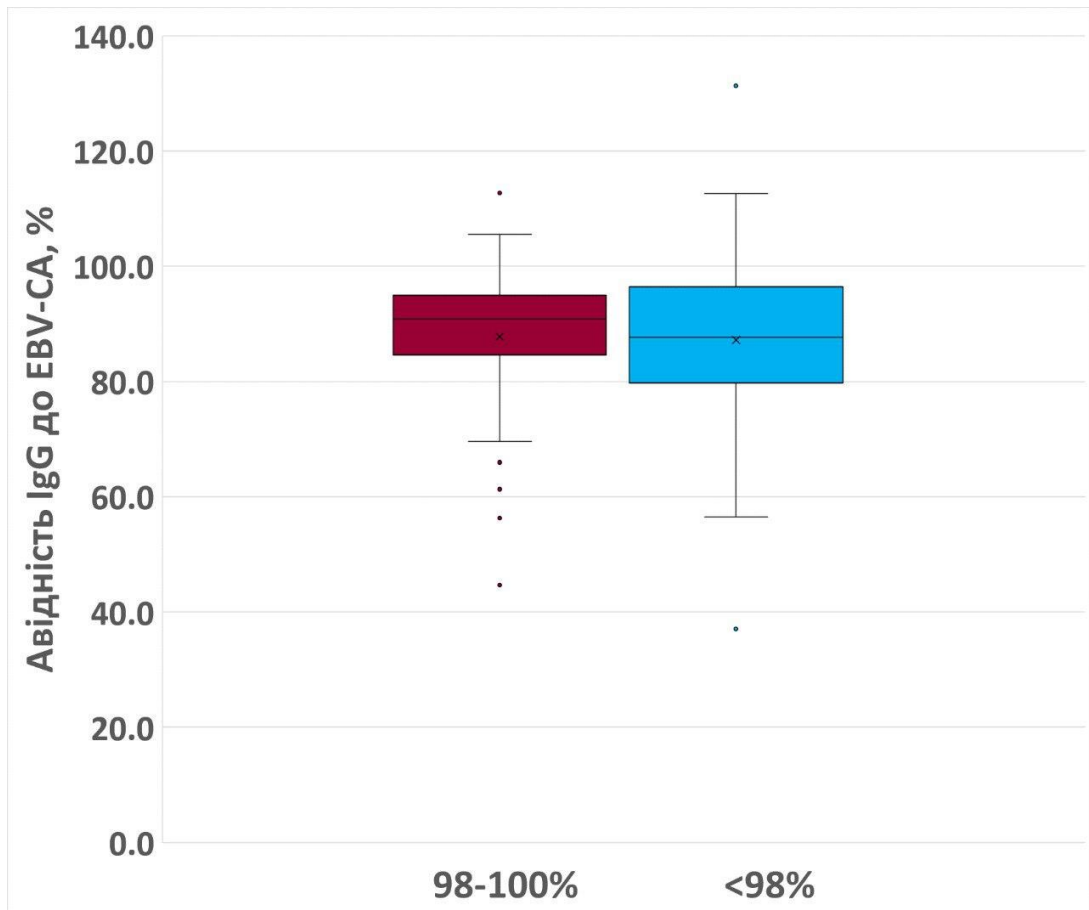


Рис. 5.11. Середні показника авідності IgG до капсидного білка EBV у пацієнтів з мутованими та немутуваними IGHV: вісь Y – авідність IgG до капсидного білка EBV, вісь X – групи пацієнтів немутуваними та з мутованими IGHV. Медіани 90,8 та 87,7

5.7. Клінічні стадії пацієнтів з CLL та рівні імуноглобулінів

Спираючись на отримані результати, не спостерігається жодного статистично значущого зв'язку ($p > 0,05$) між стадією захворювання та рівнем IgG як до капсидного білка EBV (рис. 5.12), так і до EBNA1 (рис. 5.13.) . Отже, EBV під час своєї літичної та латентної фаз життєвого циклу не впливатиме на перехід CLL на більшу стадію.

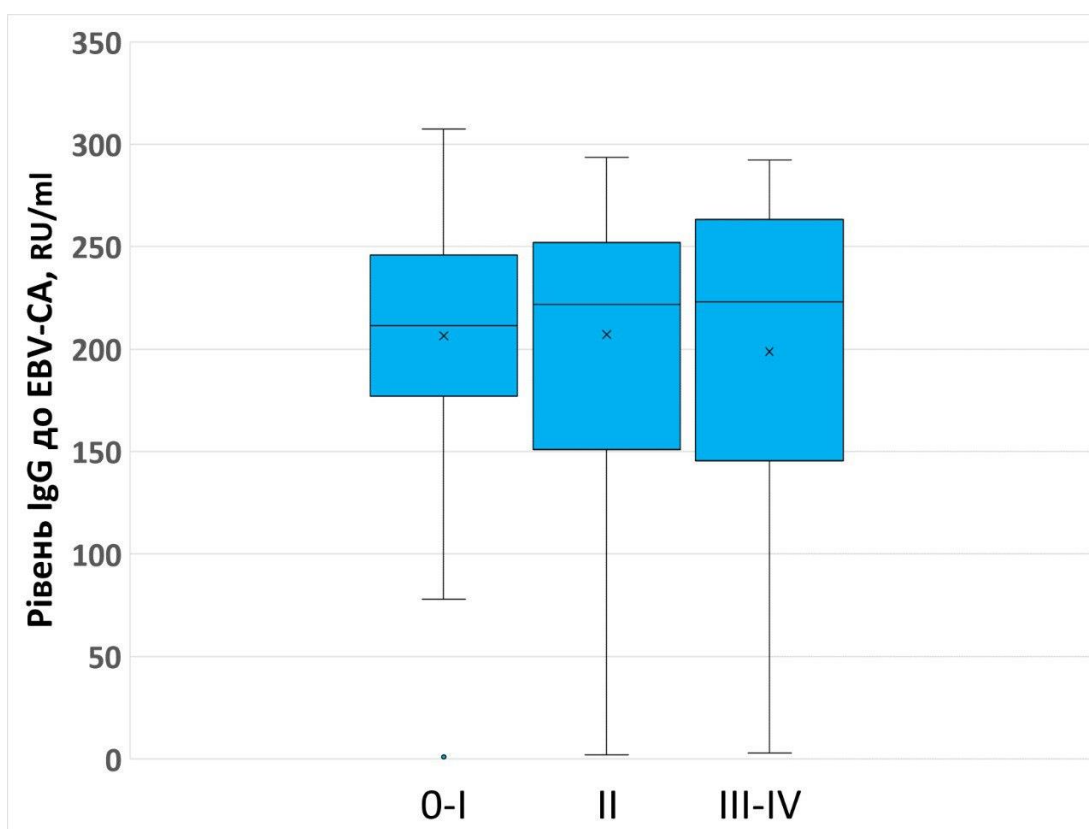


Рис. 5.12. Середні рівні IgG до капсидного білка EBV на різних стадіях CLL: вісь Y – рівень IgG до капсидного білка EBV, вісь X – клінічна стадія пацієнтів. Медіани 212,8, 222,7 та 223,0

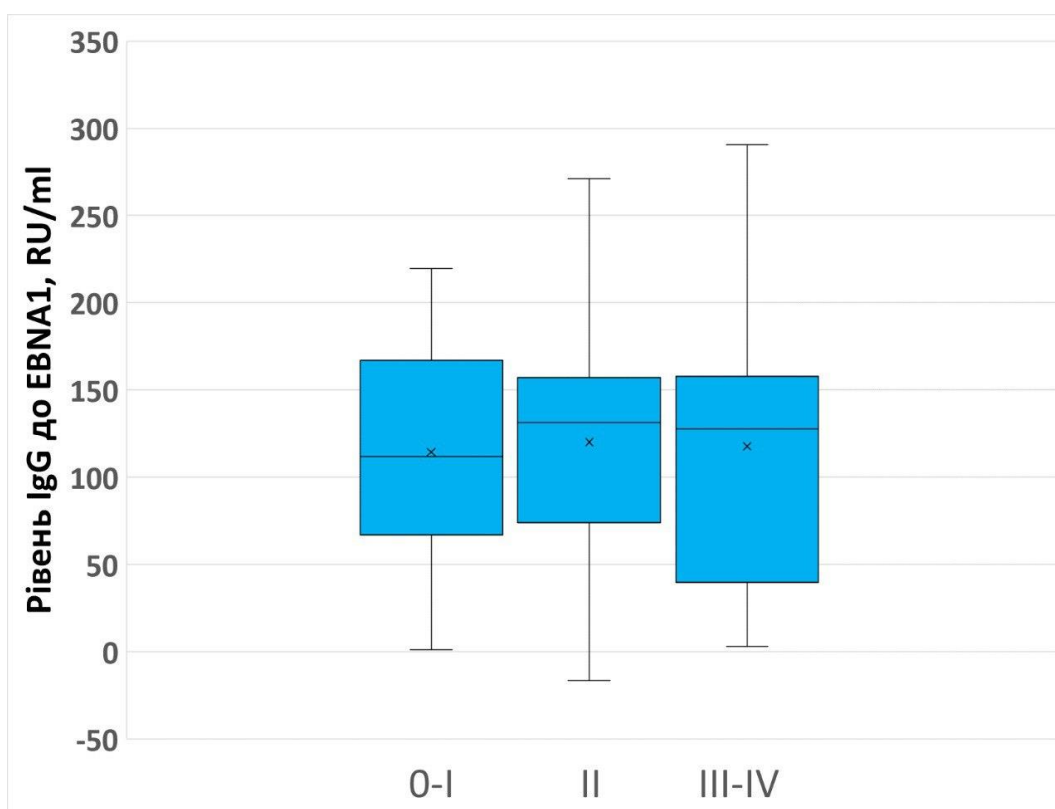


Рис. 5.13. рівень IgG до EBNA1 на різних стадіях CLL: вісь Y – рівень IgG до EBNA1, вісь X – клінічна стадія пацієнтів. Медіани 114,1, 131,7 та 127,7

Як видно з рис. 5.14, статистично значущої різниці між середніми значеннями авідності та стадіями пацієнтів не встановлено ($p > 0,05$), а отже зв'язку між недавньою реактивацією EBV-інфекції та агресивністю захворювання не виявлено – авідність на всіх стадіях була однаково високою.

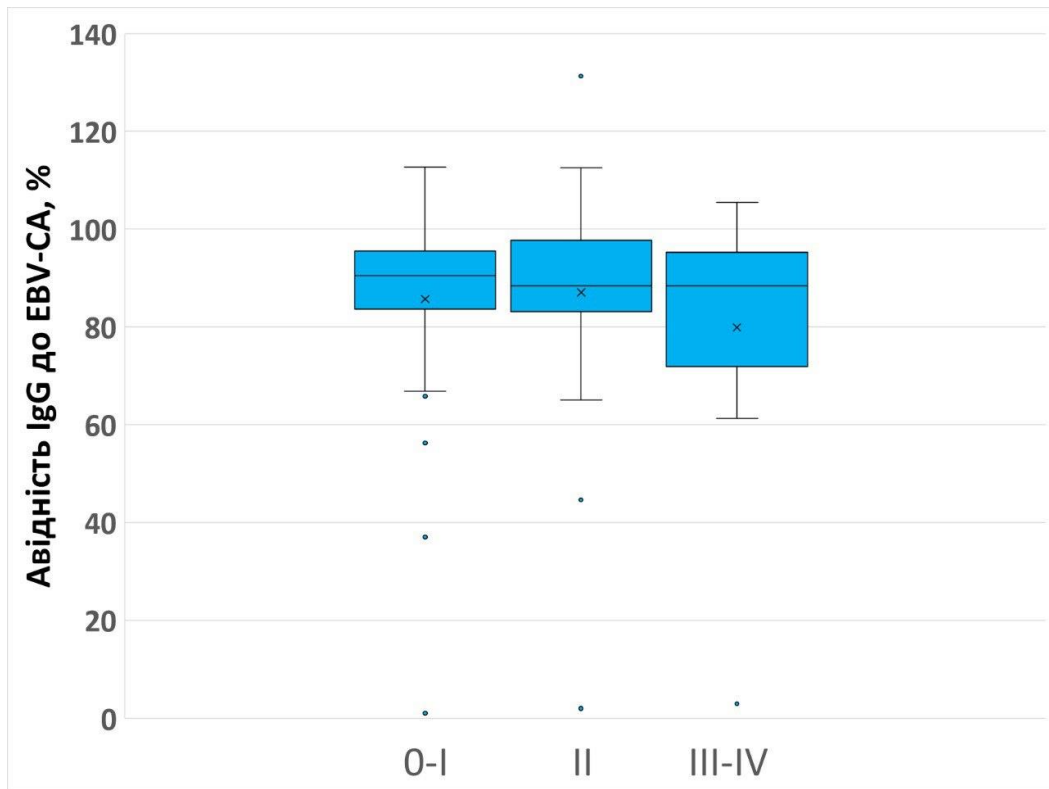


Рис. 5.14. Середні показники авідності IgG до капсидного білка EBV на різних стадіях CLL: вісь Y – авідність IgG до капсидного білка EBV, вісь X – клінічна стадія пацієнтів. Медіани 90,6, 89,0 та 88,5

5.8. EBV та рівні імуноглобулінів

Незважаючи на те, що у групі з виявленою ДНК EBV кількість пацієнтів була меншою ($n = 45$), між у групі без ДНК EBV ($n = 67$), була встановлена статистично значуща різниця ($p = 0,0001$): медіана для EBV-позитивних пацієнтів становила 241,9, а для EBV-негативних - 201,6 (рис. 5.15). Отже, середній рівень IgG до капсидного білка EBV у групі EBV-позитивних пацієнтів був більшим за середній рівень IgG до капсидного білка EBV у EBV-негативній групі, що є очікуваним результатом, оскільки наявність високого

рівня ДНК EBV свідчить про реактивацію вірусу, що матиме відповідний імунний контроль – підвищення рівня антитіл до EBV-CA.

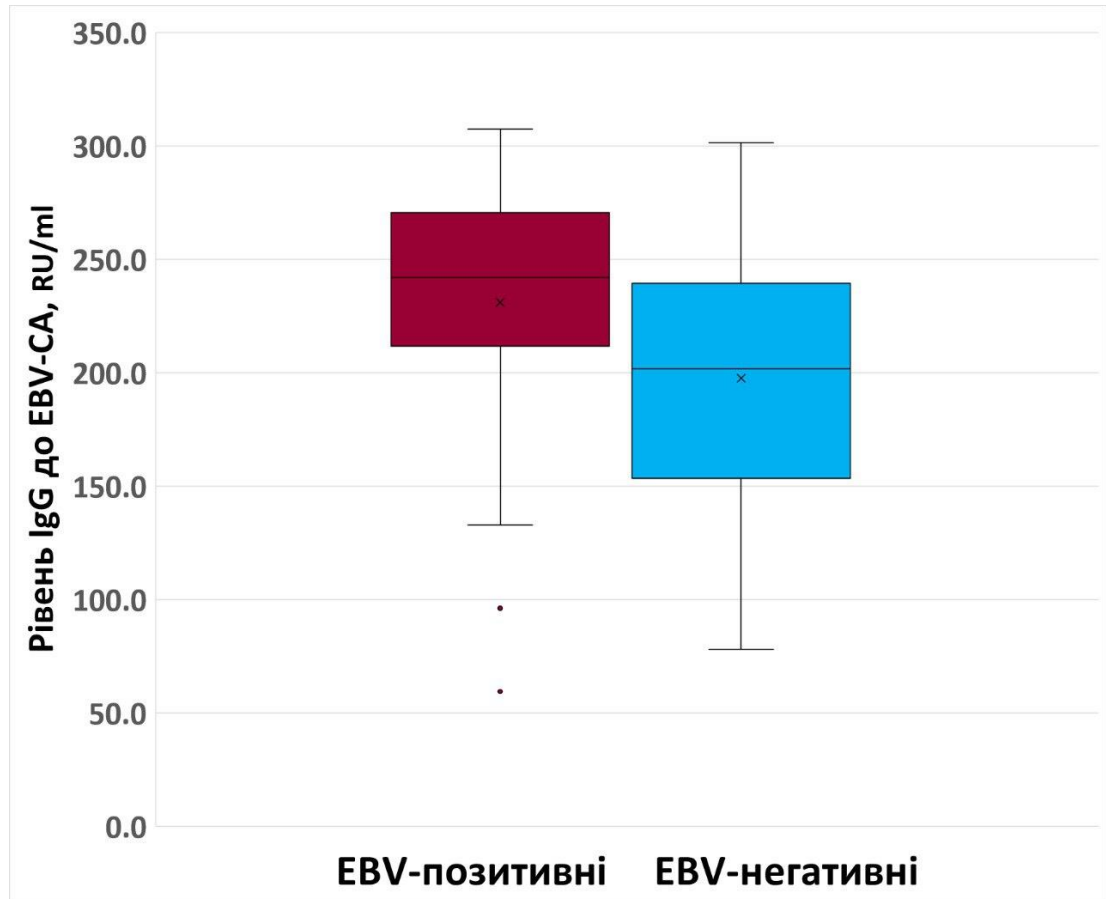


Рис. 5.15. Порівняння рівнів IgG до EBV-CA у EBV-позитивній та EBV-негативній групах: вісь Y- рівень IgG до EBV-CA (RU/мл), вісь X – EBV-позитивні та EBV-негативні групи пацієнтів. Медіани 241,9 та 201,6

На рис. 5.16 представлено рівні IgG до EBNA1 у EBV-позитивній та EBV-негативній групах пацієнтів. Статистично значущої відмінності у рівні імуноглобулінів до EBNA1 не спостерігалось ($p > 0,05$). Отже, рівень латентності EBV для обох груп пацієнтів був однаковим.

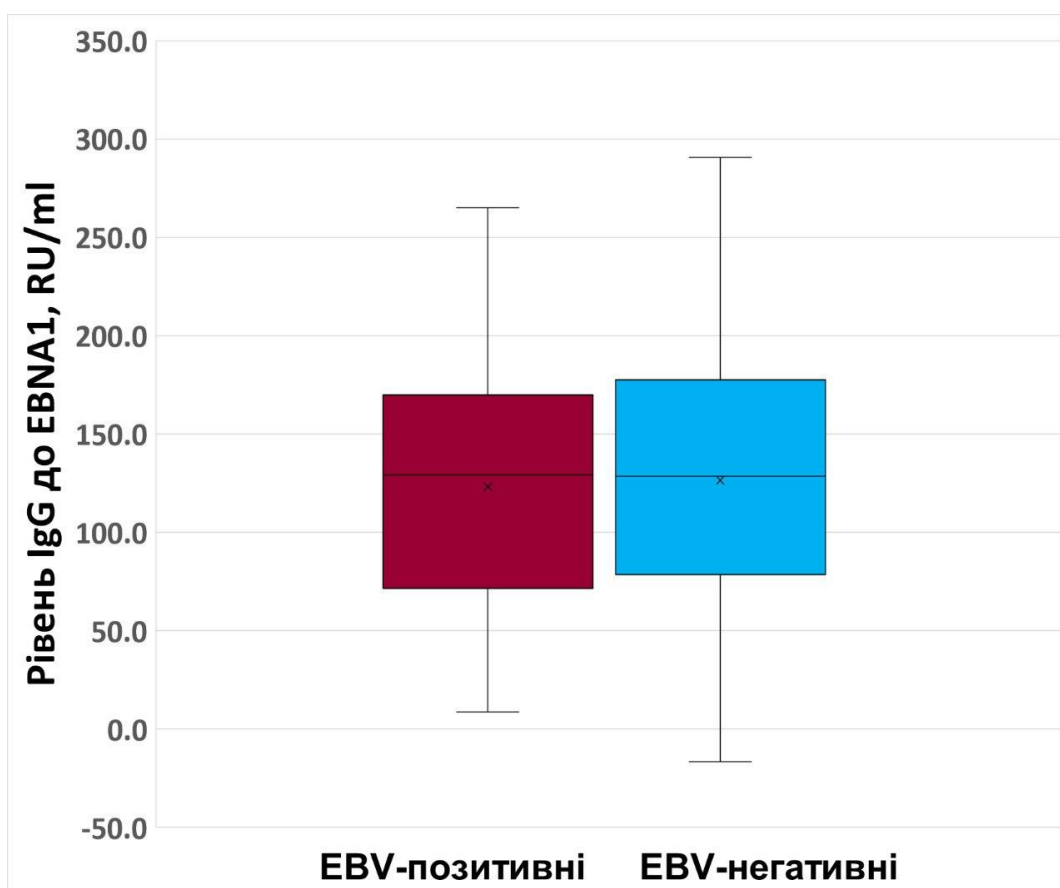


Рис. 5.16. Середні рівні IgG до EBNA1 у EBV-позитивній та EBV-негативній групах пацієнтів: вісь Y – рівень IgG до EBNA1, вісь X – EBV-позитивні та EBV-негативні групи пацієнтів. Медіани 129,0 та 128,4

Для авідності у EBV-позитивної та EBV-негативної груп було виявлено статистично вагому різницю ($p=0,01$): авідність у групі з виявленою ДНК EBV була вищою (92,8), ніж у EBV-негативній групі (87,7). Це додатково підтверджує раніше зроблений висновок, щодо недавньої реактивації вірусу у EBV-позитивній групі.

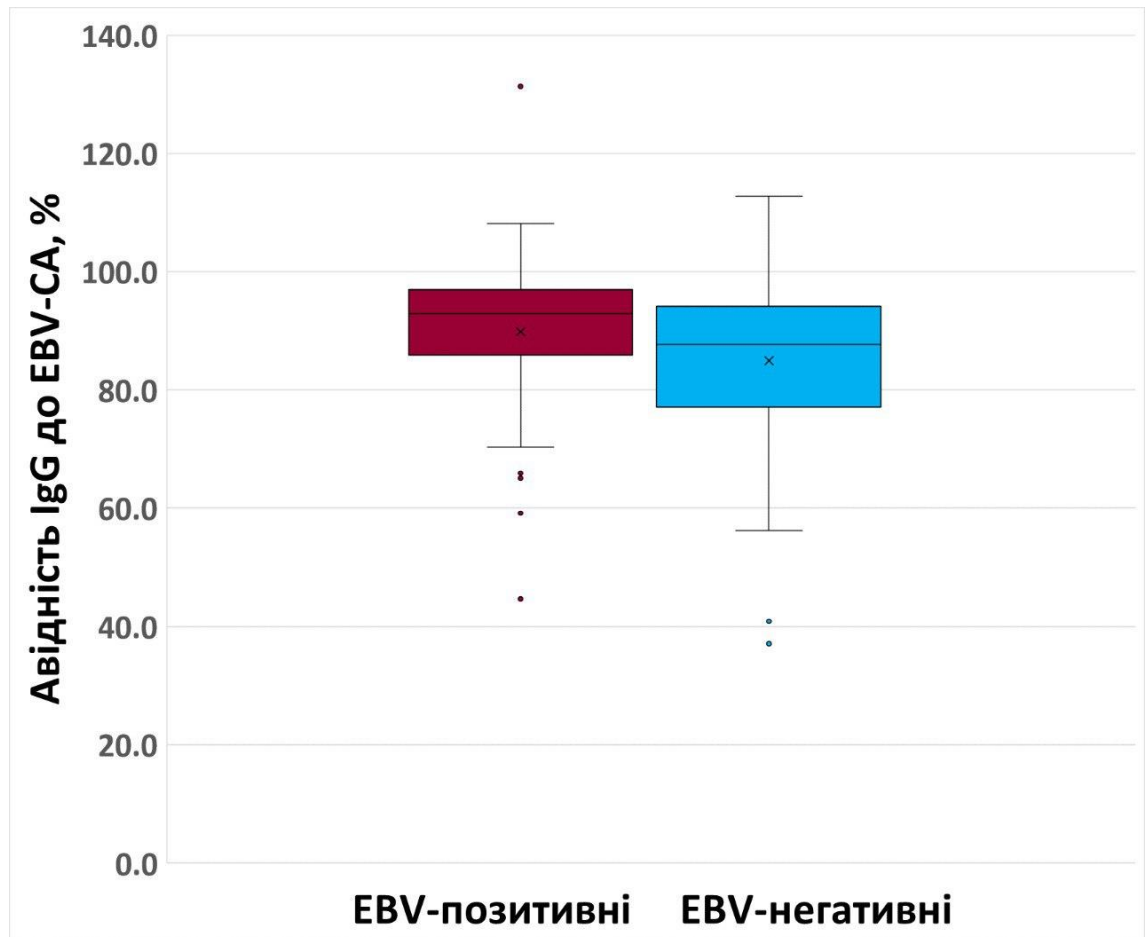


Рис. 5.17. Порівняння авідності IgG до EBV-CA у EBV-позитивній та EBV-негативній групах: вісь Y- авідність IgG до EBV-CA (RU/мл), вісь X – EBV-позитивні та EBV-негативні групи пацієнтів. Медіани 92,8 та 87,7

Великою кількістю досліджень [1, 5, 66] було продемонстровано залежність між захворюваністю на CLL та статтю – чоловіки хворіють частіше за жінок. Однак, такої кореляції у даному дослідженні не було виявлено, що може бути пов'язане з особливістю вибірки пацієнтів, отже необхідні подальші дослідження зі збільшенням числа пацієнтів.

Як у EBV-позитивній, так і в EBV-негативній групі більшість пацієнтів перебували на стадіях 0 та II. Отже, серед пацієнтів із CLL більша частка має негативний результат на активацію інфекції EBV. Отримані дані вказують на низьку ймовірність впливу EBV ризик прогресування захворювання. Ці результати відрізняються від більшості інших досліджень, які виявляли зв'язок

між стадіями CLL і наявністю ДНК EBV, за яким ДНК вірусу частіше знаходили у пацієнтів на пізніших стадіях [40, 66]. Оскільки вибірка на стадіях III-IV була невеликою, необхідні подальші дослідження з більшою кількістю пацієнтів, щоб краще зрозуміти вплив EBV на прогресування та агресивність пізніх стадій CLL. Крім цього, результатами даного дослідження не було виявлено зв'язку між агресивністю CLL та наявністю EBV, хоча інші дослідження повідомляють про можливу взаємозалежність [39, 40, 43].

Статус мутації IGHV генів має ключове прогностичне значення для CLL [1, 11, 12, 57]. Захворювання у пацієнтів із немутованими генами зазвичай агресивніше, ніж у пацієнтів із мутованими генами. І це було доведено даним дослідженням: із просуванням захворювання збільшується і кількість пацієнтів з немутованим IGHV. Однак, незважаючи на загальне зростання частки хворих з немутованим IGHV, статистично значущою є лише різниця між початковою та останньою стадіями ($p=0,04$).

Високі титри антитіл до EBV часто слугуватимуть пухлинним маркером для деяких злоякісних новоутворень [1]. У даному дослідженні середній рівень IgG та авідність IgG до капсидного білка вірусу Епштейна-Барру групі пацієнтів із позитивним результатом на EBV був вищим, ніж у групі пацієнтів із негативним результатом на EBV. Високий рівень ДНК EBV вказує на реактивацію вірусу, що спричинятиме й збільшення рівня антитіл до капсидного білка EBV.

ВИСНОВКИ

1. У нелікованих пацієнтів з хронічним лімфолейкозом не встановлено взаємозв'язку між діагностованою хворобою та наявністю інфекції, викликаної вірусом Епштейна-Барр.
2. Не підтверджено зв'язок між розвитком хронічного лімфолейкозу та статтю або віком нелікованих пацієнтів – жінки та чоловіки хворіють на CLL однаково часто (50,4% та 49,6%), незалежно від віку.
3. Підтверджена позитивна кореляція між кількістю лімфоцитів у крові та стадією хронічного лімфолейкозу, що обумовлено прогресуванням захворювання.
4. Пацієнтів з немутованими генами IGHV було більше на останній стадії захворювання (75%) порівняно з початковою стадією (46%), що підтверджує важливість оцінки мутаційного статусу гена IGHV для прогнозування ходу CLL.
5. Група пацієнтів із виявленою ДНК EBV характеризувалася значно вищими середнім рівнем імуноглобулінів класу G до капсидного білка EBV (241,9 до 201,6) та їх авідністю (92,8 до 87,7) порівняно з групою пацієнтів, у яких ДНК EBV не детектувалася, що вказує на активну реакцію імунної системи на реактивацію вірусу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kipps, T.J., Stevenson, F.K., Wu, C.J., Croce, C.M., Packham, G., Wierda, W.G., Brien, S., Gribben, J. and Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*, 5(3), p. 16096.
2. Alaggio, R., Amador, C., Anagnostopoulos, I., Attygalle, A. D., Araujo, I. B. O., Berti, E., Bhagat, G., Borges, A. M., Boyer, D., Calaminici, M., Chadburn, A., Chan, J. K. C., Cheuk, W., Chng, W. J., Choi, J. K., Chuang, S. S., Coupland, S. E., Czader, M., Dave, S. S., de Jong, D. and Xiao, W. (2022). The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*, 36(7), pp. 1720-1748.
3. Herth, I., Dietrich, S., Benner, A., Hegenbart, U., Rieger, M. and Stadtherr, P. (2014). The impact of allogeneic stem cell transplantation on the natural course of poor-risk chronic lymphocytic leukemia as defined by the EBMT consensus criteria: a retrospective donor versus no donor comparison. *Annals of Oncology*, 25, pp. 200-206.
4. Nakhla, P. S., Butera, J. N., Treaba, D. O., Castillo, J. J. and Quesenberry, P. J. (2013). Spontaneous regression of chronic lymphocytic leukemia to a monoclonal B-lymphocytosis or to a normal phenotype. *Leukemia & Lymphoma*, 54(8), pp. 1647-1651.
5. Eichhorst, B., Robak, T., Montserrat, E., Ghia, P., Hillmen, P., Hallek, M. and Buske, C. (2016). Chronic lymphocytic leukaemia. *Annals of Oncology*, 27(5).
6. Eichhorst, B., Robak, T., Montserrat, E., Ghia, P., Niemann, C. U., Kater, A. P. and Mey, U. (2021). Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment, and follow-up. *Annals of Oncology*, 32(1), pp. 23-33.

7. Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.P., Chanana, A.D., Levy, R.N. and Pasternack, B.S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46(2), pp. 219-234.
8. Binet, J. L., Leparrier, M., Dighiero, G., Charron, D., Vaugier, G., Beral, H. M. and Follezou, J. Y. (1977). A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia. *Prognostic significance. Cancer*, 40(2), pp. 855-864.
9. Binet, J.-L. (2005). Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 107(3), pp. 859-861.
10. Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L. and Chiorazzi, N. (1999). Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, 94(6), pp. 1840-1847.
11. Agathangelidis, A., Chatzidimitriou, A. and Chatzikonstantinou, T. (2022). Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: the 2022 update of the recommendations by ERIC, the European Research Initiative on CLL. *Leukemia*, 36, pp. 1961-1968.
12. Agathangelidis, A., Sutton, L. A., Hadzidimitriou, A., Tresoldi, C., Langerak, A. W., Belessi, C., Davi, F., Rosenquist, R., Stamatopoulos, K. and Ghia, P. (2018). Immunoglobulin Gene Sequence Analysis In Chronic Lymphocytic Leukemia: From Patient Material To Sequence Interpretation. *Journal of visualized experiments*, (141), pp. 354-362.
13. Statistika.spkc.gov.lv [Електронний ресурс]. Латвійська версія. Доступно за посиланням:
https://statistika.spkc.gov.lv/pxweb/lv/Health/Health__Saslimstiba_Slimibu_Izplatiba__Onkologija/ONKO030.px/table/tableViewLayout2 (дата звернення: 26.03.2024).
14. Bott, P., et al. Co-Occurrence of EBV-Positive Mucocutaneous Ulcer (EBV-MCU) and CLL/SLL in the Head and Neck Region. *Current Oncology*, vol. 29, no. 4, 2022, pp. 2749-2767.

15. Thornton, P. D., Bellas, C., Santon, A., Shah, G., Pocock, C., Wotherspoon, A. C. and Catovsky, D. (2005). *Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia. Leukemia Research*, 29(4), pp. 389-395.
16. Viralzone (2011). Lymphocryptovirus. [online] Available at: <https://viralzone.expasy.org/185> [Accessed 30 Feb. 2011].
17. Matsuura, H., Kirschner, A. N., Longnecker, R. and Jardetzky, T. S. (2010). Crystal structure of the Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein H/glycoprotein L (gH/gL) complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(52), pp. 22641-22646.
18. Houen, G. and Trier, N. H. (2021). Epstein-Barr Virus and Systemic Autoimmune Diseases. *Front Immunol*, 7(11), pp. 245-257.
19. Longnecker, R. and Neipel, F. (2007). Introduction to the human α -herpesviruses. In A. Arvin, Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. *Cambridge University Press*, 22, pp. 2456-2471.
20. Möhl, B.S., Chen, J., Sathiyamoorthy, K., Jardetzky, T.S. and Longnecker, R. (2016). Structural and Mechanistic Insights into the Tropism of Epstein-Barr Virus. *Mol Cells*, 39(4), pp. 286-91.
21. Rensing, M. E., van Gent, M., Gram, A. M., Hooykaas, M. J. G., Piersma, S. J. and Wiertz, E. J. H. J. (2015). Immune Evasion by Epstein-Barr Virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, pp. 355-381.
22. Williams, M. and Ariza, M. E. (2018). EBV Positive Diffuse Large B Cell Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia Patients Exhibit Increased Anti-dUTPase Antibodies. *Cancers*, 10, 129.
23. Wong, Y., Meehan, M.T., Burrows, S.R., Doolan, D.L. and Miles, J.J. (2022). Estimating the global burden of Epstein-Barr virus-related cancers. *J Cancer Res Clin Oncol*, 148(1), pp. 31-46.

24. de Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J. and Clifford, G. M. (2020). Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet Global Health*, 8(2), pp. 180-190.
25. Tavakoli, A., Monavari, S.H., Solaymani, Mohammadi, F., Kiani, S.J., Armat, S. and Farahmand, M. (2020). Association between Epstein-Barr virus infection and gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, 20(1), p. 493.
26. Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F. and Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health*, 4(9), pp. 609-16.
27. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor, A. and Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*, 124(1), pp. 356-59.
28. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3), pp. 209-249.
29. Randall, C. and Fedorin, Y. (2020). Pathology and diagnosis of follicular lymphoma and related entities. *Pathology*, 52(1), pp. 30-39.
30. Hwang, J., Suh, C.H., Won Kim, K., Kim, H.S., Armand, P., Huang, R.Y. and Guenette, J.P. (2021). The Incidence of Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*, 13(8), p. 1785.
31. Kwong, Y.-L., Pang, A. W. K., Leung, A. Y. H., Chim, C.-S. and Tse, E. (2013). Quantification of circulating Epstein-Barr virus DNA in NK/T-cell lymphoma treated with the SMILE protocol: diagnostic and prognostic significance. *Leukemia*, 28(4), pp. 865-870.
32. Balandraud, N. and Roudier, J. Epstein-Barr Virus and Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in Immunology*. Available at:

- <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.587380/full> (Accessed 2020).
33. Moss, D. J. and Lutzky, V. P. (2015). EBV-Specific Immune Response: Early Research and Personal Reminiscences. *Epstein Barr Virus*, pp. 23-42.
 34. Fugl, A. and Andersen, C. L. (2019). Epstein-Barr virus and its association with disease - a review of relevance to general practice. *BMC Family Practice*, 20(1), pp. 57-64.
 35. Balandraud, N. and Roudier, J. (2018). Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, 85(2), pp. 165-170.
 36. Xuan, J., Ji, Z., Wang, B., Zeng, X., Chen, R., He, Y. and Shi, G. (2020). Serological Evidence for the Association Between Epstein-Barr Virus Infection and Sjögren's Syndrome. *Frontiers in Immunology*, 11(2), pp. 145-60.
 37. Liu, Z. and Chu, A. (2021). Sjögren's Syndrome and Viral Infections. *Rheumatology and Therapy*, 8(3), pp. 1051-1059.
 38. Quaglia, M., Merlotti, G., De Andrea, M., Borgogna, C. and Cantaluppi, V. (2021). Viral Infections and Systemic Lupus Erythematosus: New Players in an Old Story. *Viruses*, 13(2), p. 277.
 39. Tsimberidou, A.-M., Keating, M. J., Bueso-Ramos, C. E. and Kurzrock, R. (2006). Epstein-Barr virus in patients with chronic lymphocytic leukemia: A pilot study. *Leukemia & Lymphoma*, 47(5), pp. 827-836.
 40. Ferrajoli, A., Ivan, C., Ciccone, M., Shimizu, M., Kita, Y., Ohtsuka, M. and Calin, G. A. (2015). Epstein-Barr Virus MicroRNAs are Expressed in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia and Correlate with Overall Survival. *EBioMedicine*, 2(6), pp. 572-582.
 41. Fulci, V., Chiaretti, S., Goldoni, M., Azzalin, G., Carucci, N., Tavolaro, S. and Macino, G. (2007). Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 109(11), 4944-4951.

42. Xu, D. M., Kong, Y. L., Wang, L., Zhu, H. Y., Wu, J. Z., Xia, Y., Li, Y., Qin, S. C., Fan, L., Li, J. Y., Liang, J. H. and Xu, W. (2020). EBV-miR-BHRF1-1 Targets p53 Gene: Potential Role in Epstein-Barr Virus Associated Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Res Treat*, 52(2), pp. 492-504.
43. Grywalska, E., Mielnik, M., Podgajna, M., Hymos, A., Ludian, J., Rolińska, A., Gosik, K., Kwaśniewski, W., Sosnowska-Pasiarska, B., Smok-Kalwat, J., Pasiarski, M., Stelmach-Gołdyś, A., Gózdź, S. and Roliński, J. (2022). Expression of CTLA-4 and CD86 Antigens and Epstein-Barr Virus Reactivation in Chronic Lymphocytic Leukemia - Any Link with Known Prognostic Factors? *Cancers*, 14(3), p. 672.
44. Montague, A. M. and Pathak, S. (2022). Chronic Lymphocytic Leukemia With Variant Genetics. A source of information. In: StatPearls. Treasure Island (FL): *StatPearls Publishing*. 4, pp. 186-201.
45. Hallek, M., Al-Sawaf, O., & Chiaretti, S. (2021). Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *American Journal of Hematology*, 96(12), 1679–1705.
46. Damle, R.N., Tembhare, P.R., & Calissano, C. (2007). CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood*, 110(10), 3352-3359.
47. Bassig, B.A., & Menard, C. (2016). Subtype-specific incidence rates of lymphoid malignancies in Hong Kong compared to the United States, 2001-2010. *Cancer Epidemiology*, 42, 15–23.
48. Mukkamalla, S. K. R., Taneja, A., Malipeddi, D. and Master, S. R. (2023). Chronic Lymphocytic Leukemia. A source of information. In: StatPearls. Treasure Island (FL): *StatPearls Publishing*. 9, pp. 267-279.
49. Hallek, M. and Al-Sawaf, O. (2021). Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *American Journal of Hematology*, 96(12), 1679-1705.
50. Cancer.org. (2023). How Is Chronic Lymphocytic Leukemia Staged? [online] Available at: <https://www.cancer.org/cancer/chronic-lymphocytic-leukemia/detection-diagnosis-staging/staging.html> [Accessed 12 Jan 2023].

51. International CLL-IPI working group (2016). An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *The Lancet. Oncology*, 17(6), 779-790.
52. Condoluci, A., Terzi di Bergamo, L., Langerbeins, P., Hoehstetter, M. A., Herling, C. D., De Paoli, L., Delgado, J., Rabe, K. G., Gentile, M., Doubek, M., Mauro, F. R., Chiodin, G., Mattsson, M., Bahlo, J., Cutrona, G., Kotaskova, J., Deambrogi, C., Smedby, K. E., Spina, V., Brusca, A. and Rossi, D. (2020). International prognostic score for asymptomatic early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 135(21), 1859-1869.
53. Chi, X., Li, Y. and Qiu, X. (2020). V(D)J recombination, somatic hypermutation, and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. *Immunology*, 160(3), 233-247.
54. Huang, C. (2020). Germinal Center Reaction. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1254, 47-53.
55. Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M., Montserrat, E., Chiorazzi, N., Stilgenbauer, S., Rai, K. R., Byrd, J. C., Eichhorst, B., O'Brien, S., Robak, T., Seymour, J. F. and Kipps, T. J. (2018). iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*, 131(25), 2745-2760.
56. Karan-Djurasevic, T., Palibrk, V., Kostic, T., Spasovski, V., Nikcevic, G., Srzentic, S., Colovic, M., Colovic, N., Vidovic, A., Antic, D., Mihaljevic, B., Pavlovic, S. and Tosic, N. (2012). Mutational status and gene repertoire of IGHV-IGHD-IGHJ rearrangements in Serbian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, 12(4), 252-260.
57. Rozovski, U., Keating, M. J. and Estrov, Z. (2018). Why is the immunoglobulin heavy chain gene mutation status a prognostic indicator in chronic lymphocytic leukemia? *Acta Haematologica*, 140(1), 51-54.

58. Merck KGaA. (2023). Recommended Standard Method for Isolating Mononuclear Cells. [online] Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/LV/en/technical-documents/protocol/clinical-testing-and-diagnostics-manufacturing/hematology/recommended-standard-method> [Accessed Feb 2023].
59. Butler, J. M. (2012). Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. *Cambridge: Academic Press*, 134(3), 68-72.
60. MinElute® Handbook. (2020). [online] Available at: <https://www.qiagen.com/cn/resources/download.aspx?id=8f6b09b2-6dcd-4b55-bb4a-255ede40ca3b&lang=en> [Accessed Jan 2020].
61. Maxanim. (2016). CMV/EBV/HHV6 Quant Real-TM Handbook. [online] Available at: <https://maxanim.com/content/sacace/V48-100FRT.pdf> [Accessed 6 Aug 2016].
62. Euroimmun. [Электронный ресурс]: Режим доступа: https://www.euroimmun.com/documents/Indications/Infections/Epstein-Barr-virus/EI_2791_D_UK_A.pdf (дата звернення: 19.02.2024).
63. European Medicines Agency. (2021). ICH E6 (R2) Good Clinical Practice - Scientific guideline. [online] Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-e6-r2-good-clinical-practice-scientific-guideline#current-version--section> [Accessed 1 Jan 2021].
64. World Medical Association. (2020). WMA Declaration of Taipei on Ethical Considerations Regarding Health Databases and Biobanks. [online] Available at: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-taipei-on-ethical-considerations-regarding-health-databases-and-biobanks/> [Accessed 4 June 2020].
65. Yao, Y., Lin, X., Li, F., Jin, J. and Wang, H. (2022). The global burden and attributable risk factors of chronic lymphocytic leukemia in 204 countries and territories from 1990 to 2019: analysis based on the global burden of disease study 2019. *Biomedical Engineering*, 21(1), 4.

66. Liang, J. H., Gao, R., Xia, Y., Gale, R. P., Chen, R. Z., Yang, Y. Q., Wang, L., Qu, X. Y., Qiu, H. R., Cao, L., Hong, M., Wang, R., Wang, Y., Fan, L., Chen, Y. Y., Hu, Z. B., Li, J. Y. and Xu, W. (2016). Prognostic impact of Epstein-Barr virus (EBV)-DNA copy number at diagnosis in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*, 7(2), 2135-2142.