

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»  
Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № \_\_\_\_ засідання кафедри

від “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**ЕКСПРЕСІЯ ХЕМОКІНІВ ТА ЇХ РЕЦЕПТОРІВ ПРИ ХРОНІЧНІЙ  
ЛІМФОЦИТАРНІЙ ЛЕЙКЕМІЇ**

Випускна кваліфікаційна робота  
студента денної форми навчання  
за спеціальністю Біологія та біохімія  
Мончаківської Анни Володимирівни

Науковий керівник від кафедри  
канд. біол. наук, доц. Скопенко О.В.

Робота виконана в лабораторії молекулярних механізмів трансформації клітин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького під керівництвом канд. біол. наук, старшого наук. співроб. Ковалевської Лариси Миколаївни

Оцінка захисту роботи

\_\_\_\_\_

**Київ – 2026 р.**

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВООЗ	– Всесвітня організація охорони здоров'я;
кДНК	– комплементарна ДНК;
к-ПЛР	– кількісна полімеразна ланцюгова реакція;
МБЛ	– моноклональний В-клітинний лімфоцитоз;
ХЛЛ	– хронічна лімфоцитарна лейкемія;
BCR	– B-cell antigen receptor (В-клітинний рецептор);
cCKR	– cholecystokinin receptors (рецептори холецистокініну);
PBS	– phosphate-Buffered Saline (фосфатно-сольовий буфер).

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	4
<b>РОЗДІЛ 1.</b> Хронічна лімфоцитарна лейкемія та хемокіновий профіль.....	6
1.1. Етіологія та патогенез хронічної лімфоцитарної лейкемії.....	6
1.2. Супутні паталогії при хронічній лімфоцитарній лейкемії.....	8
1.3. Система хемокінів та їхніх рецепторів: загальна характеристика .....	11
1.4. Класифікація хемокінів (CCL3, CCL4, CCL5).....	12
1.5. Механізм функціонування хемокінової мережі.....	16
1.6. Хемокіновий профіль при лімфопроліферативних захворюваннях.....	20
<b>РОЗДІЛ 2.</b> Матеріали та методи досліджень.....	24
2.1. Характеристика клінічного матеріалу та вибірки хворих на В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію .....	24
2.2. Виділення В-лімфоцитів з периферичної крові.....	25
2.3. Виділення рибонуклеїнової кислоти.....	28
2.4. Аналіз клітинних популяцій методом проточної цитофлуориметрії.....	30
2.5. Синтез кДНК.....	31
2.6. Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі.....	31
2.7. Оцінка рівня експресії білків шляхом імунофлуоресцентного мікроскопічного аналізу.....	33
2.8. Статистична обробка даних.....	34
<b>РОЗДІЛ 3.</b> Результати та обговорення.....	36
3.1. Загальна характеристика експресії транскрипційних факторів.....	36
3.2. Порівняльна характеристика транскрипційних факторів і хемокінів...	42
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	51
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....	52

## ВСТУП

Хронічна лімфоцитарна лейкемія (ХЛЛ) залишається одним із найпоширеніших видів лейкозів серед дорослого населення в країнах Європи та Північної Америки.

ХЛЛ характеризується акумуляцією лейкемічних В-ліфоцитів, які експресують на поверхні маркер Т-лімфоцитів CD5, а також маркери В-клітин - CD19 та CD23.

Однією з ключових особливостей ХЛЛ є те, що виживання пухлинних клітин критично залежить від сигналів мікрооточення в лімфоїдних органах та кістковому мозку. Вирішальну роль у цьому процесі відіграє хемокінова мережа — складна система лігандів та їхніх рецепторів, що регулюють міграцію, хомінг та утримання лейкемічних клітин у «захищених» нішах, де вони уникають дії хіміопрепаратів та імунного нагляду [1].

Особливу увагу привертають хемокіни сімейства CC, зокрема CCL3, CCL4 та CCL5, які відіграють важливу роль у формуванні пухлинного мікрооточення. Їх експресія жорстко контролюється на рівні транскрипції за участю специфічних транскрипційних факторів, серед яких провідне місце займають IRF4, IRF8, BLIMP1 та PU1.

Порушення функції цих факторів може призводити до дизрегуляції імунної відповіді та сприяти прогресуванню пухлинного процесу.

Тому краще розуміння профілю експресії таких рецепторів, як CCL3, CCL4, CCL5 та їхніх лігандів, є критично важливим для встановлення агресивності перебігу хвороби та може відкрити нові перспективи для розробки більш ефективних лікувальних стратегій. Адже порушення балансу в цій системі не лише сприяє поширенню пухлини, а й може слугувати прогностичним маркером для стратифікації пацієнтів на групи ризику.

Мета роботи — порівняти експресію транскрипційних факторів *IRF4*, *IRF8*, *BLIMP1*, *PUI* та хемокінів *CCL3*, *CCL4* і *CCL5* у пацієнтів із хронічною лімфоцитарною лейкемією.

Для досягнення поставленої мети були поставлені завдання: 1) Проаналізувати рівень експресії хемокінових рецепторів *CCL3*, *CCL4*, *CCL5* у здорових донорів та пацієнтів з ХЛЛ; 2) Оцінити рівень експресії транскрипційних факторів *BLIMP1*, *IRF4*, *IRF8*, *PUI* у здорових донорів та пацієнтів із ХЛЛ; 3) Провести порівняльний аналіз експресії зазначених факторів між здоровими донорами та пацієнтами з ХЛЛ.

## РОЗДІЛ 1

### ВИЗНАЧЕННЯ ХРОНІЧНОЇ ЛІМФОЦИТАРНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ ТА ХЕМОКІНОВИЙ ПРОФІЛЬ

#### 1.1. Етіологія та патогенез хронічної лімфоцитарної лейкемії

Хронічна лімфоцитарна лейкемія посідає провідне місце серед усіх гематологічних новоутворень у популяціях України та європейських країн. Щорічно фіксується приблизно 10 000 нових випадків цього захворювання. Патологія здебільшого діагностується у пацієнтів старшої вікової групи: понад 70% хворих переступили 60-річний рубіж, тоді як на осіб віком до 55 років припадає лише кожний десятий випадок. Також спостерігається гендерна схильність — чоловіки хворіють частіше за жінок [2].

Розвиток хвороби супроводжується поступовою інфільтрацією кісткового мозку та системного кровотоку пухлинними клітинами. З прогресуванням патологічного процесу лейкемічні клони поширюються на лімфовузли, паренхіму печінки та тканини селезінки [1]. Субстратом ХЛЛ є морфологічно зрілі, проте функціонально неповноцінні В-лімфоцити. Попри численні дослідження, точні механізми та час ініціації хвороби залишаються предметом дискусій [3].

Окрім класичних генетичних поломок (мутацій та аберацій), вагому роль відіграють епігенетичні модифікації, зокрема аномальне метилювання ДНК, що суттєво відрізняє клітини ХЛЛ від здорових В-лімфоцитів [2]. Високий рівень гетерогенності метилювання корелює з варіабельністю транскрипції, що може вказувати на генетичну лабільність пухлини. Життєздатність та проліферація цих клітин критично залежать від сигналіngu В-клітинного рецептора (BCR) [4].

Етіологія ХЛЛ до кінця не вивчена, але виділяють низку чинників, що підвищують імовірність захворювання: генетична схильність (хвороба

частіше вражає представників європеоїдної раси. Наявність ХЛЛ у родичів першої лінії (особливо по чоловічій лінії) суттєво підвищує індивідуальний ризик); екологічний вплив (існують дані про можливий зв'язок між розвитком лейкемії та професійним контактом із пестицидами чи гербіцидами (зокрема у працівників сільського господарства та перукарів). Проте роль зовнішніх токсинів залишається дискусійним питанням на фоні доведеного генетичного впливу) [2, 4].

Для ХЛЛ характерні наступні ознаки:

1. Стійкий лімфоцитоз: значне перевищення норми лімфоцитів, що легко фіксується при рутинному аналізі крові.
2. Латентний перебіг: на ранніх етапах хвороба зазвичай не має суб'єктивних симптомів і виявляється випадково.
3. Лімфаденопатія: збільшення груп лімфатичних вузлів (шийних, аксиллярних, пахових), які іноді можуть бути чутливими.
4. Спленомегалія: збільшення селезінки, що зустрічається у більшій частини пацієнтів.
5. Вторинний імунодефіцит: через домінування атипових клітин імунний захист послаблюється, що провокує часті інфекції.
6. Гетерогенність прогресії: темпи розвитку хвороби індивідуальні — від стабільного багаторічного спостереження без терапії до стрімкого переходу в агресивну форму, що потребує негайного втручання [5].

Згідно з міжнародними стандартами (iwCLL/BOO3), діагноз базується на таких показниках, як кількість клональних В-клітин у крові, що має становити  $\geq 5 \times 10^9/\text{л}$  протягом щонайменше 3 місяців. Типовий імунофенотип: позитивність за маркерами CD5, CD19, CD23, CD200 при слабкій експресії CD20 (dim) та відсутності CD10. Також визначається клональність за легкими ланцюгами імуноглобулінів (каппа або лямбда) [4].

Цікаво, що дослідження кісткового мозку не є обов'язковим для встановлення діагнозу, проте воно є вкрай важливим перед вибором схеми лікування [6].

Диференційну діагностику проводять із іншими лімфопроліферативними захворюваннями, як-от лімфома із клітин мантийної зони чи маргінальної зони селезінки [2]. Якщо кількість клональних В-клітин менша за  $5 \times 10^9/\text{л}$  за відсутності органних уражень (збільшення вузлів чи селезінки), стан класифікують як моноклональний В-клітинний лімфоцитоз (МБЛ). Останній вважається передвісником ХЛЛ, особливо у випадках із високим вмістом клональних клітин ( $>0.5 \times 10^9/\text{л}$ ). МБЛ проявляється як ураження одного або кількох лімфатичних вузлів, або селезінки та клінічно лікується так само, як ХЛЛ. МБЛ далі поділяється на МБЛ з низьким і високим числом, що визначається моноклональним В-клітинним лімфоцитозом  $<0.5 \times 10^9/\text{л}$  або  $>0.5 \times 10^9/\text{л}$  відповідно. Майже всім випадкам ХЛЛ передуює високий рівень МБЛ [7].

## 1.2. Супутні паталогії при хронічній лімфоцитарній лейкемії

Як зазначалося раніше, ХЛЛ переважно вражає осіб похилого віку, для яких характерна наявність численних супутніх захворювань — коморбідність [8]. Поєднання кількох діагнозів суттєво обтяжує клінічний стан пацієнта, що часто призводить до вимушеного подовження курсу хіміотерапії та підвищує ймовірність виникнення серйозних посттерапевтичних ускладнень [9].

У пацієнтів із ХЛЛ спостерігається висока кореляція з різноманітними патологічними станами [10]. Серед найбільш поширених:

1. Кардіоваскулярні розлади: артеріальна гіпертензія, ішемічна хвороба серця та атеросклеротичні зміни.

2. Ендокринні та інфекційні порушення: цукровий діабет, рецидивуючі пневмонії.
3. Онкологічні процеси: новоутворення легень, шлунку та шкіри.
4. Аутоімунні феномени: системний червоний вовчак та ревматоїдний артрит [9].

Етіологія коморбідності Розвиток супутніх патологій може бути зумовлений єдиними патофізіологічними механізмами, спільними факторами ризику або ж агресивним впливом специфічного лікування ХЛЛ. Зокрема, персистенція лейкомічних клонів спричиняє глибоку деструкцію імунної системи, що стає підґрунтям для інших хвороб. З іншого боку, застосування імуно- та хіміотерапії нерідко супроводжується побічними ефектами, які формують складний коморбідний фон [11].

Нефрологічні аспекти: патології нирок є одними з найбільш критичних супутніх станів. Гематологічні неоплазії можуть провокувати широкий спектр ниркових порушень — від імуноопосередкованого гломерулонефриту до тубулярної обструкції та специфічної інфільтрації паренхіми моноклональними клітинами [7].

Пульмонологічні ускладнення: у пацієнтів часто діагностують легеневі інфільтрати (скупчення гною, крові чи білка). Хоча найчастіше вони мають інфекційну природу (пневмонії), у ряді випадків причиною є пряма інвазія злоякісних лімфоцитів у тканини легень [12].

Цукровий діабет: ця патологія виявляється у 8–21% хворих уже на момент встановлення діагнозу ХЛЛ. Прогнозується, що через загальносвітові тенденції частота такого поєднання подвоїться в найближчі два десятиліття [13].

Для хворих на ХЛЛ характерна підвищена схильність до виникнення вторинних пухлин, які можуть розвиватися як паралельно з лейкомією, так і послідовно [4, 5]. Найбільшу загрозу становлять меланома, саркома Капоші, а також рак нирок, легень та товстої кишки. Зокрема, підвищена частота

карциноми шлунку у жінок може пояснюватися імунодефіцитом, що сприяє хронічній інфекції *Helicobacter pylori* [6].

Важливо підкреслити, що за відсутності вираженої симптоматики пацієнти з ХЛЛ не потребують негайної хіміотерапії. Основними критеріями для старту лікування є: стрімка втрата ваги (понад 10% за пів року); тривала виснажлива лихоманка та нічна пітливість; прогресуюча цитопенія (анемія чи тромбоцитопенія) внаслідок виснаження кісткового мозку; аутоімунні стани, що не піддаються корекції глюкокортикоїдами.

Іншою важливою групою є інфекційні ускладнення та хронічні інфекційні захворювання. У пацієнтів із ХЛЛ спостерігається вторинний імунодефіцит, який проявляється гіпогаммаглобулінемією, порушенням функції Т-лімфоцитів і дефектами фагоцитозу. Це призводить до підвищеної сприйнятливості до бактеріальних, вірусних та грибкових інфекцій, зокрема пневмоній, інфекцій сечовивідних шляхів та опортуністичних інфекцій. Частота інфекційних ускладнень є однією з основних причин захворюваності та смертності у даної категорії пацієнтів [9].

Пацієнти з хронічною лімфоцитарною лейкемією виділяються в особливу групу ризику через глибокі порушення в роботі імунної системи. Наявність імунодефіциту зумовлює високу ймовірність тяжкого перебігу коронавірусної хвороби, що супроводжується значними показниками летальності та розвитком критичних ускладнень [14]. Характерною рисою цієї популяції є слабка гуморальна та клітинна імунна відповідь на щеплення проти Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2, особливо у пацієнтів, які проходять активне лікування. Через це терапевтична стратегія при ХЛЛ має враховувати не лише стадію раку, а й потребу у постійному інфекційному моніторингу та миттєвому реагуванні у разі зараження вірусом [15, 16].

Глобальна пандемія суттєво вплинула на алгоритми лікування ХЛЛ. При виборі тактики ведення хворого ключовими факторами стали:

оптимальний час початку терапії, спосіб введення препаратів (пероральний чи внутрішньовенний), необхідність частого лабораторного контролю та загальний ризик приєднання супутніх інфекцій [17].

Аналіз результатів вакцинації свідчить, що пацієнти з ХЛЛ демонструють значно гірші показники вироблення антитіл порівняно зі здоровими людьми. Рівень сероконверсії у цій групі варіює в межах 39–67%, що підтверджено більшістю досліджень, зосереджених на оцінці гуморального імунітету [16, 18].

Зниження результативності вакцин зумовлене низкою факторів, безпосередньо пов'язаних із біологією пухлини та методами її контролю: віковий фактор: пацієнти старшої групи мають слабший імунний потенціал; гіпогаммаглобулінемія: низька концентрація власних імуноглобулінів перешкоджає формуванню захисту; терапевтичне навантаження: будь-яка активна схема лікування, включаючи сучасні методи таргетної терапії, стабільно корелює з пригніченням імунної реакції на введення вакцини [19].

Оцінка коморбідності у пацієнтів із ХЛЛ має важливе практичне значення та здійснюється за допомогою спеціалізованих шкал (наприклад, Cumulative Illness Rating Scale), що дозволяє стратифікувати ризики, індивідуалізувати терапію та прогнозувати виживаність. Таким чином супутні захворювання при ХЛЛ вимагають уваги та особливого підходу до лікування, тому що можуть швидко прогресувати та ускладнювати перебіг захворювання [9].

### **1.3. Система хемокінів та їхніх рецепторів: загальна характеристика**

Хемокіни, або хемотаксичні цитокіни, являють собою розгалужену групу низькомолекулярних секреторних протеїнів. Їхня біологічна дія

реалізується через взаємодію з гептаспіральними рецепторами, спряженими з G-білками, що локалізовані на плазматичній мембрані клітин-мішеней [20]. Найбільш вивченою функцією цих молекул є ініціація клітинного трафіку, зокрема спрямованого руху лейкоцитів. Завдяки цьому хемокіни виступають ключовими регуляторами формування та підтримання імунного гомеостазу, а також беруть участь у координації захисних та патологічних запальних процесів [21].

Традиційно хемокіни розглядалися лише як медіатори хемотаксису (руху вздовж градієнта концентрації). Проте сучасні дані вказують на їхню здатність індукувати складніші форми міграційної поведінки, як-от: гаптотаксис (рух за градієнтом адгезивних молекул), хемокінез та гаптокінез (зміна інтенсивності ненаправленої рухливості клітин), адгезія (активація зупинки та закріплення клітин на ендотелії) [22].

Сфера впливу хемокінових рецепторів виходить за межі простої локомоції лейкоцитів [20]. Ці протеїни експресуються багатьма типами негемопоетичних клітин, модулюючи їхні специфічні біологічні властивості. Функціональна активність хемокінів тонко регулюється на декількох рівнях: посттрансляційні модифікації, взаємодія з позаклітинним матриксом, атипові рецептори [23, 24].

#### **1.4. Класифікація хемокінів та структурні особливості рецепторів**

Ідентифікація хемокінів базується на аналізі їхньої первинної структури, зокрема на специфічному розміщенні залишків цистеїну в амінокислотному ланцюзі зрілого протеїну [25]. Стабільність мономерної конфігурації забезпечується дисульфідними містками, які формують характерну просторову організацію: центральний антипаралельний триланцюговий  $\beta$ -лист, над яким розташована C-кінцева  $\alpha$ -спіраль.

Важливим функціональним елементом є неструктурований N-кінцевий фрагмент, який відіграє ключову роль у взаємодії з рецепторами та їх подальшій активації [26].

Залежно від конфігурації двох цистеїнових залишків, що розташовані найближче до N-кінця, хемокіни поділяють на чотири основні родини [27]:

1. CC-підродина: характеризується безпосереднім сусідством двох молекул цистеїну.
2. CXC-підродина: містить одну довільну амінокислоту між першими двома цистеїнами.
3. CX<sub>3</sub>C-підродина: представлена єдиним білком, у якого між двома цистеїнами розташована вставка з трьох амінокислотних залишків.
4. XC-підродина: відрізняється відсутністю першого та третього цистеїнових залишків у структурі мотиву (у людини ідентифіковано дві форми таких білків, у мишей — одну) [28, 29].

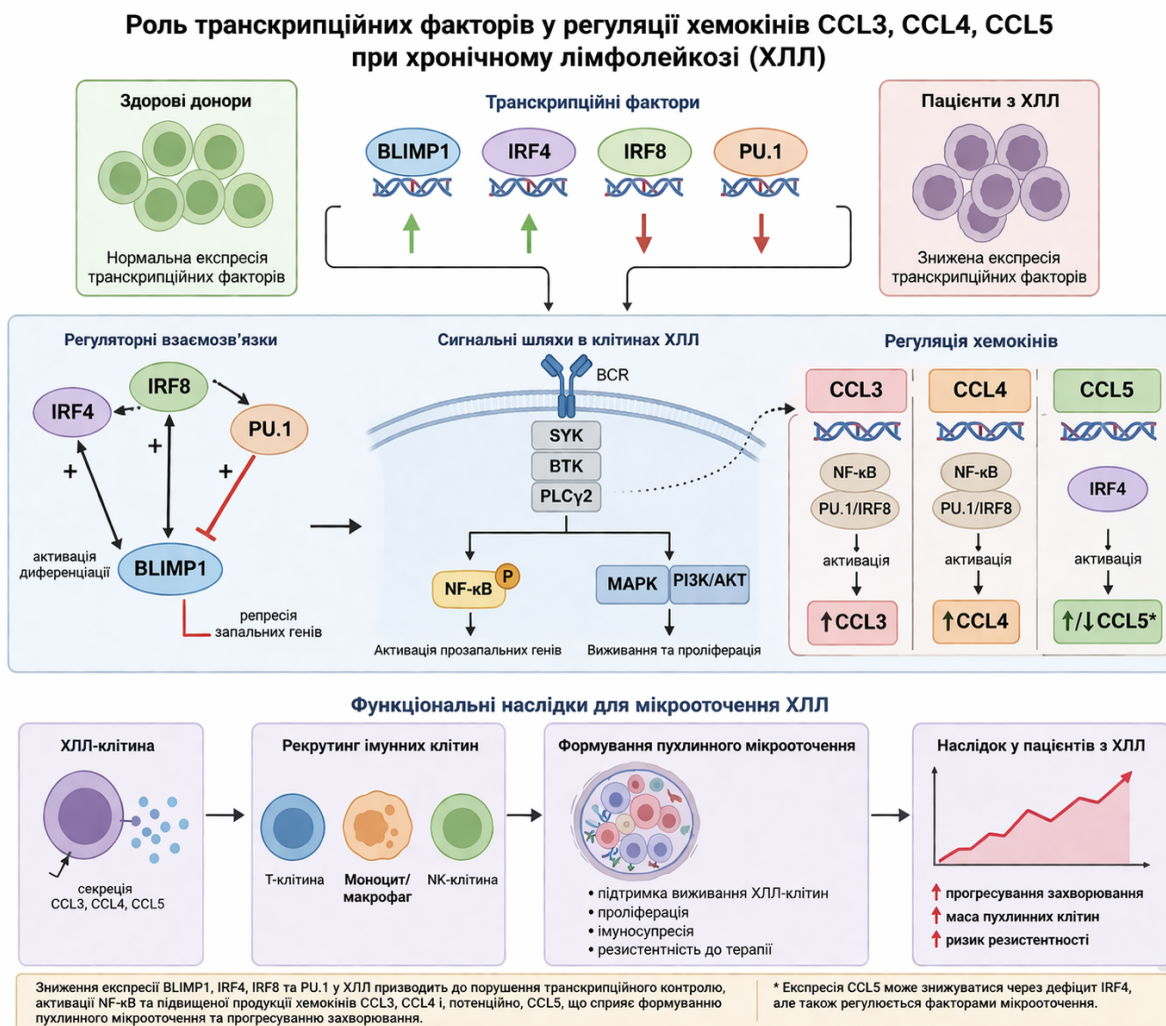
Генетичний локус хемокінів типів CC та CXC вирізняється значною кількістю генів, склад яких варіює залежно від біологічного виду [30]. Крім того, спостерігається явище неалельної ізоформії (наприклад, людські гени CCL3L1 та CCL3 або мишачі Ccl21a/b/c). Значна генетична гетерогенність, зумовлена алельними варіаціями та зміною кількості копій генів (CNV), є критичним фактором, що визначає індивідуальну схильність до патологій та впливає на тяжкість перебігу імунозалежних захворювань [28].

Особливу увагу привертають хемокіни сімейства CC, зокрема CCL3, CCL4 та CCL5, які відіграють важливу роль у формуванні пухлинного мікрооточення. Їх експресія жорстко контролюється на рівні транскрипції за участю специфічних транскрипційних факторів, серед яких провідне місце займають IRF4, IRF8, BLIMP1 та PU1 [29].

Порушення функції цих факторів може призводити до дизрегуляції імунної відповіді та сприяти прогресуванню пухлинного процесу.

Хемокини CCL3, CCL4 та CCL5 виконують функції:

1. Рекрутування імунних клітин
2. Регуляції запалення
3. Формування клітинного мікрооточення [27].



**Рис. 1.1.** Схематичне зображення ролі транскрипційних факторів регуляції хемокинів CCL3, CCL4, CCL5 при ХЛЛ (згенеровано разом з ШІ [23,26])

CCL3 і CCL4 є потужними хемоатрактантами для Т-лімфоцитів, моноцитів, макрофагів. CCL5 додатково впливає на НК-клітини та дендритні клітини.

У ХЛЛ хемокіни виконують не лише захисну, а й патологічну функцію. Особливо важливо, що CCL3 та CCL4 активно секретуються самими ХЛЛ-клітинами. CCL3 та CCL4 є прозапальними хемокінами, що активно секретуються клітинами ХЛЛ у відповідь на стимуляцію рецептора В-клітин (BCR), а також при взаємодії з клітинами мікрооточення, зокрема Т-лімфоцитами та стромальними клітинами. Підвищена експресія цих хемокінів корелює з активацією сигнальних шляхів, асоційованих із виживанням клітин, зокрема NF-κB та PI3K/АКТ. Важливо, що рівні CCL3 і CCL4 у плазмі крові пацієнтів із ХЛЛ розглядаються як біомаркери активності захворювання та можуть відображати ступінь активації пухлинного клону.

Функціонально CCL3 і CCL4 сприяють рекрутуванню до пухлинного мікрооточення допоміжних клітин, таких як CD4<sup>+</sup> Т-лімфоцити, моноцити та макрофаги, які, у свою чергу, продукують цитокіни та фактори росту, що підтримують проліферацію і резистентність до апоптозу лейкемічних клітин. Таким чином, формується позитивний зворотний зв'язок між пухлинними клітинами та їх мікрооточенням, який є критичним для прогресування ХЛЛ.

CCL5 також відіграє значущу роль у регуляції клітинної міграції та міжклітинних взаємодій у контексті ХЛЛ. Цей хемокін здатний взаємодіяти з рецепторами CCR1, CCR3 та CCR5, експресованими як на пухлинних, так і на імунокомпетентних клітинах. У пацієнтів із ХЛЛ підвищений рівень CCL5 асоціюється з посиленням інфільтрації тканин імунними клітинами та ремоделюванням пухлинного мікрооточення. Крім того, CCL5 може впливати на адгезивні властивості клітин та їх здатність до гомінгу в лімфоїдні органи, що є важливим аспектом патофізіології захворювання.

Слід зазначити, що хемокіни CCL3, CCL4 та CCL5 не лише виконують роль медіаторів міжклітинної комунікації, але й беруть участь у формуванні імунної відповіді, яка, однак, у випадку ХЛЛ часто є дисфункціональною.

Порушення регуляції їх експресії може сприяти імуносупресії, що додатково підтримує виживання пухлинних клітин

Потрапляючи до лімфатичних вузлів або кісткового мозку під дією хемокінових сигналів, клітини ХЛЛ опиняються у так званих «нішах виживання». Тут вони взаємодіють зі стромальними клітинами та медсестринськими клітинами (NLC), які секретують хемокіни CXCL12, CCL19 та CCL21. Це не лише забезпечує фізичне утримання пухлинних клітин у тканинах, а й активує антиапоптотичні шляхи, роблячи лейкомічні лімфоцити стійкими до стандартної хіміотерапії [32].

Сучасні стратегії лікування ХЛЛ (наприклад, із застосуванням інгібіторів ібрутинібу) спрямовані на розрив цього зв'язку. Блокування сигнальних шляхів призводить до «вимивання» клітин ХЛЛ із захисних ніш у периферичну кров, де вони втрачають підтримку мікрооточення і стають вразливими до апоптозу [29].

### **1.5. Механізм функціонування хемокінової мережі**

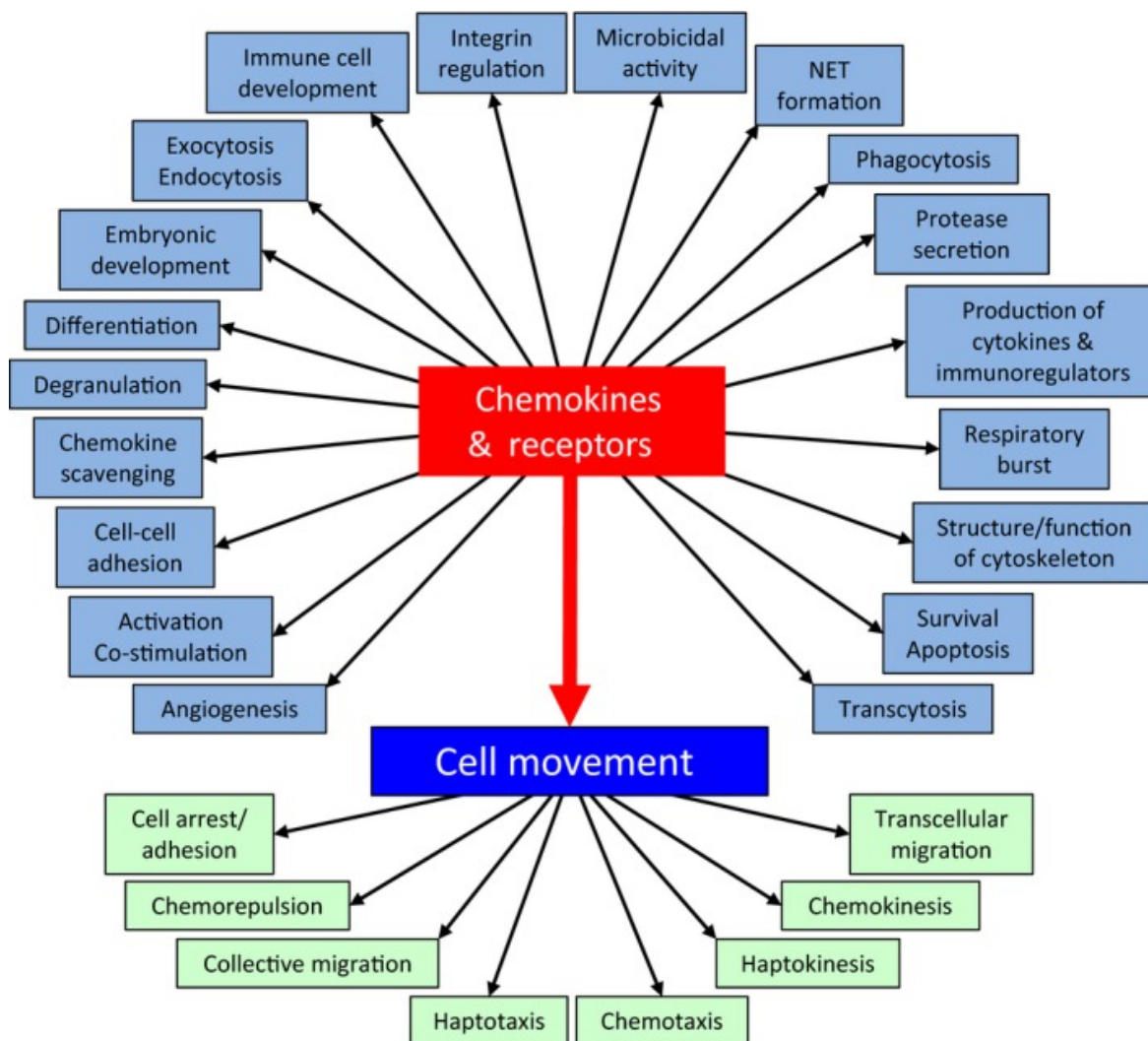
Найбільш дослідженою функцією хемокінової системи є забезпечення міграції клітин, передусім лейкоцитів. Проте біологічна роль хемокінів не обмежується лише цим процесом або лише імунними клітинами. Активація рецепторів cCKR (рецептори холецистокініну) на лейкоцитах здатна запускати різноманітні клітинні відповіді, зокрема стимулювати проліферацію, підтримувати виживання клітин, сприяти їх диференціації, індукувати синтез цитокінів, викликати дегрануляцію та респіраторний вибух. Деякі хемокіни також проявляють безпосередню антимікробну дію [33].

Крім імунних клітин, рецептори cCKR можуть експресувати й інші типи клітин — нейрони, астроцити, епітеліальні, мезенхімальні та

ендотеліальні клітини, які здатні по-різному реагувати на хемокінові сигнали. Наприклад, значна частина хемокінів бере участь у регуляції ангіогенезу: окремі з них стимулюють утворення нових судин, тоді як інші, навпаки, пригнічують цей процес [34].

Встановлено також, що пухлинні клітини неімуного походження можуть набувати здатності експресувати рецептори cCKR і відповідати на дію хемокінів. Це може сприяти локальному інвазивному росту пухлини, її поширенню до регіонарних лімфатичних вузлів та формуванню метастазів у віддалених тканинах [35].

Рух клітин залишається основним біологічним процесом, який контролюється хемокінами та їхніми рецепторами. Під їхнім впливом відбуваються різні типи клітинної міграції: класичний хемотаксис, а також гаптотаксис, хемокінез, гаптокінез і трансклітинна міграція. У певних умовах хемокіни можуть координувати переміщення цілих груп клітин (колективна міграція) або, навпаки, підсилювати клітинну адгезію, що призводить до зупинки руху [36]. Описано також явище переміщення клітин у напрямку зменшення концентрації хемокінів — від їхнього джерела; цей процес відомий як хеморепульсія або хемофугетаксис [20].



**Рис. 1.2.** Функції хемокинів та їх рецепторів. Біологічні процеси, які, як повідомляється, регулюються хемокінами та їх рецепторами, наведені у світло-синіх рамках, розташованих за годинниковою стрілкою в алфавітному порядку (починаючи знизу ліворуч), навколо центрального поля «Хемокіни та рецептори». «Рух клітин» зображено як домінуючий біологічний процес, що регулюється хемокінами та їх рецепторами: зупинка/адгезія клітин, опосередкована хемокінами, та різні типи міграційної поведінки, що, як відомо, підпадають під контроль хемокинів, показані у світло-зелених рамках [20]

Міграція лейкоцитів відіграє ключову роль у функціонуванні імунної системи. Для ефективного виконання своїх захисних функцій ці клітини

повинні своєчасно потрапляти саме в ті ділянки організму, де вони необхідні. Імунний нагляд забезпечується постійним переміщенням лейкоцитів із кісткового мозку до різних тканин, а також їх циркуляцією між кров'ю, лімфатичною системою та тканинами [37].

У разі пошкодження або інфікування тканин швидке залучення клітин вродженого імунітету є вирішальним для знищення патогенів, обмеження поширення мікроорганізмів, запуску запальної реакції та стимулювання процесів відновлення. Формування ефективної адаптивної імунної відповіді та розвиток імунологічної пам'яті також залежать від чітко координованих процесів переміщення лейкоцитів [33].

Важливу роль у регуляції цих процесів відіграють хемокіни. Вони спрямовують рух лейкоцитів у кровоносні та лімфатичні судини і з них, а також визначають їх переміщення та локалізацію в міжклітинному просторі тканин. За відсутності керованої хемокінами міграції порушуються механізми імунної толерантності, ефективність імунного нагляду знижується, а захисні реакції організму стають недостатніми [37].

Разом з тим надмірна або неконтрольована міграція лейкоцитів, опосередкована хемокінами, може сприяти розвитку різних патологічних станів із імунним або запальним компонентом. До них належать аутоімунні захворювання, алергічні реакції, хронічні запальні процеси, атеросклероз, онкологічні хвороби та інші патології. У зв'язку з цим регуляція або блокування хемокін-залежної міграції лейкоцитів розглядається як перспективний напрямок терапевтичного втручання [36].

## 1.6. Хемокіновий профіль при лімфопроліферативних захворюваннях

Хемокінові рецептори утворюють велику родину рецепторів, пов'язаних з G-білком, які опосередковують хемотаксис клітин до градієнта хемокінів. Хемокіни складають зростаючу родину хемотаксичних цитокінів, які зазвичай беруть участь у міграції лейкоцитів. Згідно з сучасною класифікацією, що ґрунтується на їхній функції, вони поділяються на три різні групи: гомеостатичні хемокіни, що регулюють міграцію та процеси хомінгу лімфоцитів за фізіологічних умов, індукцибельні хемокіни, що експресуються під час запалення, та перекриваюча група, що бере участь в обох процесах [38]. Їх експресія може бути індукована різними стимулами, включаючи фактори росту та запальні цитокіни. Окрім цих загальних аспектів, хемокіни також пов'язані з різноманітними патологічними процесами. Відомо, що під час онкогенезу вони відіграють вирішальну роль у формуванні та модифікації стромы пухлини, індукуючи інфільтрацію різних гемопоетичних клітин (наприклад, макрофагів, природних кілерів, еозинофілів, В- та Т-лімфоцитів), а також фібробластів та ендотеліальних клітин. Вони також сприяють неоваскуляризації, росту та поширенню пухлин. Через їхню вирішальну роль як у гемопоезі, так і в міграції гемопоетичних клітин, протягом останніх років докладаються зусилля для виявлення їхньої ролі в гематологічних неоплазіях [39].

Окрім підтримки проліферації та міграції цих неопластичних клітин до природних кілерів та вторинних лімфоїдних тканин, було продемонстровано, що хемокіни можуть запобігати спонтанному апоптозу клітин В-ХЛЛ, таким чином підтримуючи їх виживання *in vitro*. З цієї причини терапевтичне таргетування активності хемокінів стало предметом широких фармацевтичних досліджень. Клітини В-ХЛЛ мають характерний

профіль рецепторів хемокінів, отже, інгібування рецепторів може функціонувати як перспективний інструмент для лікування [40].

Окрім хемокінів, у мікросередовищі В-CLL є й інші компоненти, які, як відомо, відіграють вирішальну роль у патогенезі В-CLL та впливають на експресію хемокінів. CD40 є членом надродини факторів некрозу пухлини та експресується на всіх зрілих В-клітинах, моноцитах та дендритних клітинах, а також на ендотеліальних клітинах кровоносних судин. Його ліганд CD40L (CD154) – це трансмембранний білок, що експресується різними типами клітин і тканин, і може бути виявлений як розчинний білок плазми (sCD40L). Після стимуляції CD40L було виявлено, що В-CLL-клітини продукують хемокіни, що приваблюють Т-клітини, CCL17 та CCL22 (виявляються на рівні мРНК та як розчинний білок плазми у випадку CCL22). Притягнуті Т-клітини потім індукують сильне вироблення хемокінів, ініційоване лейкомічним клоном, що призводить до прогресуючого накопичення неопластичних клітин [36]. Активація, опосередкована Т-клітинами, необхідна для проліферації та продукування хемокінів, що приваблюють Т-клітини, які братимуть участь у довгостроковій підтримці клітин В-CLL стромальними клітинами. Більше того, нещодавні дослідження підкреслюють особливу роль хемокінів, що приваблюють Т-клітини, в контексті В-CLL. Наприклад, активація рецептора В-клітин (BCR) індукували високий рівень експресії антигену дозрівання В-клітин та двох специфічних для Т-клітин хемокінів CCL3 та CCL4. Було виявлено, що це корелює з експресією ZAP70, тирозинкінази, яка відіграє важливу роль у сигналізації BCR. Таким чином, секреція згаданих хемокінів може створювати динамічне мікросередовище в лімфатичних вузлах, ініціюючи взаємодію клітин ХЛЛ з Т-клітинами, що зрештою призводить до розмноження клону ХЛЛ [41].

CD38 – це одноланцюгова трансмембранна молекула типу II, яка існує як у розчинній, так і в мембранозв'язаній формі. Вважається, що експресія

CD38 на клітинах В-CLL є незалежним та надійним маркером несприятливого клінічного перебігу. Вона функціонально пов'язана з тирозинкіназою ZAP70. Взаємодія CD38 з клітинним лігандом CD31 виявилася вирішальною для ініціювання CD38-залежних сигналів. Як наслідок, рецептор CD100, задіяний у рості та виживанні CLL, регулюється підвищено. Вважається, що хемокіни відіграють вирішальну роль у цьому механізмі, будучи тими, хто спрямовує CD38+ клітини у напрямку CD31+ стромальних клітин [42].

У цьому контексті важливим є також розуміння просторово-функціональної організації хемокінових сигналів у межах лімфоїдних тканин, яка визначає не лише міграцію клітин, але й формування спеціалізованих мікроанатомічних ніш, критично важливих для виживання та проліферації пухлинного клону. Хемокіни CCL3, CCL4 та CCL5 виступають ключовими медіаторами формування таких ніш, оскільки здатні створювати локальні градієнти, що координують направлений рух як неопластичних В-клітин, так і допоміжних клітин мікрооточення. У результаті формується динамічна система клітинних взаємодій, у якій пухлинні клітини не лише реагують на зовнішні сигнали, але й активно модифікують власне мікрооточення через секрецію хемокінів [41]. Це забезпечує позитивний зворотний зв'язок між активацією сигнальних шляхів, продукцією хемокінів і рекрутуванням клітин-партнерів, що підтримують пухлинний процес. Додатково слід зазначити, що локальна концентрація хемокінів може істотно відрізнятись між різними анатомічними компартментами (периферична кров, кістковий мозок, лімфатичні вузли), що зумовлює різні функціональні стани ХЛЛ-клітин залежно від їх локалізації [39]. Саме в лімфатичних вузлах, де відбувається інтенсивна взаємодія з клітинами мікрооточення, рівні CCL3, CCL4 та CCL5, як правило, є вищими, що корелює з більш активним клітинним обміном сигналами та проліферацією. Таким чином, хемокінова система

виконує не лише роль регулятора клітинної міграції, але й функцію організатора пухлинного мікрооточення, визначаючи архітектуру клітинних взаємодій та підтримуючи умови, необхідні для тривалого існування та клональної експансії ХЛЛ-клітин [40].

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Характеристика клінічного матеріалу та вибірки хворих на В-клітинну хронічну лімфоцитарну лейкемію

Зразки периферичної крові мешканців міста Києва і областей України, хворих на ХЛЛ, отримано у Національному Інституті раку та в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук (НАН) України.

З метою забезпечення високої точності та достовірності діагностики, клітинні зразки периферичної крові та кісткового мозку підлягали попередній підготовці з подальшим фарбуванням за класичним методом Май-Грюнвальда — Гімзи. Зазначений підхід дозволяє здійснити детальний морфологічний аналіз клітинних елементів, включаючи оцінку їхньої форми, розмірів, ядерно-цитоплазматичного співвідношення, а також особливостей структурної організації хроматину. Такий аналіз є важливим етапом первинної діагностики гематологічних захворювань і створює підґрунтя для подальших більш специфічних досліджень.

Верифікацію В-клітинної хронічної лімфоцитарної лейкемії (В-ХЛЛ) здійснювали із застосуванням сучасних ензимоцитохімічних та імуноцитохімічних методів, що забезпечують високу специфічність та чутливість при ідентифікації клітинних популяцій. Зокрема, використовували методи із залученням антитіл до лужної фосфатази за схемою АРААР (alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase), а також систему міченого стрептавідину-біотину з подальшою візуалізацією за допомогою лужної фосфатази (LSAB-AP). Застосування зазначених методичних підходів дозволяє значно підвищити точність типування клітин за рахунок специфічного зв'язування антитіл із відповідними антигенами.

Додатково для імунофенотипування патологічних клітин

використовували широку панель моноклональних антитіл, спрямованих проти поверхневих та внутрішньоклітинних маркерів. Такий підхід забезпечує можливість комплексної характеристики клітинних популяцій, визначення їхнього походження, ступеня диференціювання та функціонального стану, що має ключове значення для встановлення остаточного діагнозу, а також для вибору оптимальної терапевтичної стратегії.

У межах проведеного дослідження було проаналізовано зразки лімфоцитів периферичної крові 15 пацієнтів із встановленим діагнозом хронічної лімфоцитарної лейкемії. Формування контрольної групи здійснювали з урахуванням необхідності порівняльного аналізу з умовно нормальною картиною крові. Зокрема, для формування умовно здорового контролю було залучено зразки семи донорів без ознак гематологічної патології.

Включення різнорідних контрольних груп дозволило підвищити наукову обґрунтованість отриманих результатів, забезпечити більш коректну інтерпретацію даних, а також оцінити специфічність застосованих методів дослідження у контексті диференційної діагностики.

Усі етапи дослідження проводилися з дотриманням сучасних етичних норм та принципів біомедичних досліджень. Протокол експерименту був попередньо розглянутий і схвалений Комітетом з біоетики при ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького Національної академії наук України, що підтверджує відповідність проведеної роботи міжнародним стандартам біоетики та забезпечує захист прав і безпеки учасників дослідження.

## **2.2. Виділення В-лімфоцитів з периферичної крові**

Ізоляцію лімфоцитів із периферичної крові пацієнтів здійснювали із

застосуванням методу градієнтного центрифугування в середовищі фікол-верографіну зі щільністю  $\rho = 1,077$  г/мл, що є загальноприйнятим підходом для виділення мононуклеарних клітин крові. Використання даного методу базується на відмінностях у щільності різних популяцій клітин крові, що забезпечує ефективне розділення формених елементів.

На першому етапі дослідження зразки периферичної крові, стабілізовані гепарином для запобігання коагуляції, піддавали розведенню стерильним фізіологічним розчином у співвідношенні 1:1. Така процедура сприяє зменшенню в'язкості крові та покращує умови для подальшого розшарування клітин у градієнті щільності. Після ретельного перемішування отриману суспензію обережно нашаровували на попередньо підготовлений розчин фікол-верографіну (15 мл) у стерильних конічних центрифужних пробірках об'ємом 50 мл, уникаючи змішування фаз.

Центрифугування проводили у декілька етапів із чітким дотриманням швидкісних і часових параметрів. Початковий етап тривав 15 хвилин при швидкості 500 об/хв, що забезпечувало поступове осідання більш щільних клітинних елементів. Надалі швидкість обертання збільшували до 1500 об/хв і продовжували центрифугування до загальної тривалості 46 хвилин без застосування гальмування ротора, що дозволяло уникнути порушення сформованих міжфазних шарів.

У результаті проведеної процедури спостерігалось чітке розділення зразка на три основні фракції. Нижній шар складався переважно з еритроцитів та гранулоцитів, що мають більшу щільність. Верхній шар був представлений плазмою крові з наявними тромбоцитами. Між зазначеними шарами формувалась інтерфейсна прошарок (buffy coat), який містив мононуклеарні клітини, зокрема лімфоцити та моноцити, і мав характерне світло-жовте забарвлення.

Інтерфейсний шар лімфоцитів обережно відбирали стерильною піпеткою по всій площі контакту фаз, після чого переносили до чистих

центрифужних пробірок. З метою очищення клітин від залишків плазми, тромбоцитів та компонентів градієнтного середовища проводили дворазове відмивання у фосфатно-сольовому буфері (PBS), доповненому 2% ембріональної сироватки теляти. Кожен цикл відмивання супроводжувався центрифугуванням із подальшим видаленням надосадової рідини. На завершальному етапі отриманий клітинний осад ресуспендували у відповідному об'ємі PBS до досягнення необхідної концентрації клітин, придатної для подальших експериментальних процедур.

Для формування контрольних зразків В-лімфоцити ізолювали з периферичної крові здорових донорів із використанням аналогічного методу градієнтного центрифугування у фікол-верографіні, що забезпечувало уніфікованість експериментальних умов та підвищувало коректність порівняльного аналізу.

Додатково для отримання очищеної популяції В-лімфоцитів із тканини мигдаликів застосовували метод селективного видалення Т-лімфоцитів, заснований на явищі розеткоутворення з еритроцитами барана. Даний підхід ґрунтується на здатності Т-лімфоцитів специфічно зв'язуватися з еритроцитами барана з утворенням розеткоподібних структур, що дозволяє ефективно відокремити їх від інших клітинних популяцій.

Для реалізації методу до суспензії мононуклеарних клітин із концентрацією  $1 \times 10^7$  клітин/мл додавали еритроцити барана у співвідношенні 0,02 мл осаду еритроцитів на 1 мл клітинної суспензії. Після інкубації отриману клітинну суміш у об'ємі 25 мл обережно нашаровували на 15 мл градієнтного середовища Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Осло, Норвегія).

Подальше центрифугування здійснювали за багатоступеневим режимом: початково при швидкості 500 об/хв протягом 15 хвилин, далі при 2500 об/хв, із завершальним етапом центрифугування протягом 30 хвилин при температурі 4 °С, що сприяло стабілізації клітинних структур і

підвищенню ефективності розділення. У результаті В-лімфоцити локалізувалися на межі між шаром Lymphoprep та фізіологічним розчином.

Отриману фракцію обережно відбирали, після чого проводили багаторазове відмивання у поживному середовищі RPMI-1640 з метою видалення залишкових домішок та реагентів. Очищені клітини використовували для подальших експериментальних досліджень, включаючи імунофенотипування та функціональний аналіз.

### **2.3. Виділення рибонуклеїнової кислоти**

В-лімфоцити, ізольовані з периферичної крові методом градієнтного центрифугування з використанням фіколу, після отримання піддавали ресуспендуванню у реагенті TRIzol (GibcoBRL, США) з метою ефективного лізису клітин та стабілізації нуклеїнових кислот. Підготовлені зразки зберігали при температурі  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  до моменту подальшого аналізу, що дозволяло запобігти деградації РНК.

На наступному етапі до клітинного лізату додавали хлороформ у кількості, що становила 50% від об'єму вихідної суміші, після чого зразки ретельно, але обережно перемішували для забезпечення ефективного фазового розділення. Центрифугування проводили при швидкості 12000 об/хв за температури  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 20 хвилин. У результаті цього процесу відбувалося розділення суміші на окремі фази, серед яких водна фаза містила розчинену РНК.

Для осадження РНК до відібраної водної фази додавали рівний об'єм 2-пропанолу, після чого суміш інкубували при температурі  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  не менше 60 хвилин з метою підвищення ефективності преципітації нуклеїнових кислот. Після інкубації проводили повторне центрифугування за

аналогічних умов (12000 об/хв, +4 °С, 20 хвилин), у результаті чого формувалася осада РНК.

Надосадову рідину обережно видаляли, а отриманий осади піддавали дворазовому промиванню 75% етанолом для видалення залишкових домішок та реагентів. Кожен етап промивання супроводжувався центрифугуванням при швидкості 12000 об/хв за температури +4 °С протягом 10 хвилин. Після повного видалення етанолу осади РНК підсушували на льоду протягом 5–10 хвилин, уникаючи пересушування, що може ускладнити подальше розчинення.

Остаточні РНК розчиняли у воді, обробленій діетилпірокарбонатом (DEPC), яка не містить рибонуклеаз, що забезпечує стабільність отриманих зразків. Кількісну оцінку РНК здійснювали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США) із використанням програмного забезпечення NanoDrop 1000 v. 3.7, визначаючи співвідношення оптичної густини при довжинах хвиль 260 та 280 нм, що дозволяє оцінити як концентрацію, так і ступінь чистоти нуклеїнових кислот.

Отримані зразки РНК зберігали при температурі –80 °С до подальшого використання в експериментальних дослідженнях. Оцінку якості та інтактності РНК проводили методом електрофорезу в агарозному гелі. Для цього використовували 1% агарозний гель із додаванням етидію броміду як інтеркалюючого барвника. Електрофоретичне розділення здійснювали при постійній напрузі 100 В протягом 40 хвилин. Візуалізацію отриманих результатів проводили за допомогою ультрафіолетового випромінювання з використанням флуоресцентного освітлення, що дозволяло оцінити ступінь деградації РНК та наявність характерних рибосомальних смуг.

## 2.4. Аналіз клітинних популяцій методом проточної цитофлуориметрії

Аналіз експресії поверхневих антигенів на плазматичній мембрані клітин периферичної крові здійснювали методом імунофлуоресценції із використанням проточної цитофлуориметрії на приладі Beckman Coulter EPICS XL (США). Даний підхід дозволяє проводити кількісну та якісну оцінку експресії клітинних маркерів на індивідуальному рівні.

Оцінювання рівня експресії здійснювали шляхом визначення співвідношення середньої геометричної інтенсивності флуоресценції (GeoMFI) клітин після інкубації зі специфічними антитілами до відповідного показника GeoMFI клітин, оброблених ізотиповими контрольними антитілами. Отриманий показник виражали у вигляді коефіцієнта GeoMean ratio, що дозволяє коректно враховувати неспецифічне зв'язування антитіл і підвищує достовірність результатів.

Для мічення клітин використовували антитіла, кон'юговані з флуорохромом флуоресцеїн ізотіоціанатом (FITC), який забезпечує реєстрацію сигналу у відповідному спектральному діапазоні під час аналізу. Використання FITC дозволяє ефективно детектувати клітини, що експресують відповідні поверхневі антигени, завдяки високій чутливості та специфічності флуоресцентного сигналу.

Експресію відповідних поверхневих маркерів вважали позитивною за умови, якщо значення GeoMean ratio дорівнювало або перевищувало 1,3, що свідчило про наявність специфічного зв'язування антитіл із клітинними антигенами.

## 2.5. Синтез кДНК

Для синтезу комплементарної ДНК (кДНК) використовували 2 мкг тотальної РНК як матрицю. Реакцію зворотної транскрипції проводили із застосуванням ферменту M-MLV Reverse Transcriptase та інгібітора рибонуклеаз RNaseOUT™ (Invitrogen, США) відповідно до рекомендацій виробника. Процес здійснювали у два послідовні етапи з використанням термоциклера GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, США).

На початковому етапі реакційну суміш, що містила праймер Oligo(dT), суміш дезоксирибонуклеотидів (10X dNTP), стерильну бідистильовану воду (biH<sub>2</sub>O) та 2 мкг тотальної РНК, інкубували при температурі 65 °C протягом 5 хвилин з метою денатурації вторинних структур РНК. Після цього до суміші додавали зворотну транскриптазу, інгібітор РНКаз та 5× реакційний буфер для забезпечення оптимальних умов синтезу кДНК. Подальшу інкубацію проводили при температурі 42 °C протягом 60 хвилин, що забезпечувало ефективне утворення комплементарної ДНК.

Отриману кДНК, комплементарну до вихідної РНК, надалі використовували як матрицю для проведення аналізу експресії генів із застосуванням платформи RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (SABioscience, Qiagen, Німеччина), а також у реакціях кількісної полімеразної ланцюгової реакції (к-ПЛР).

## 2.6. Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі

У межах дослідження було здійснено профілювання експресії 84 генів, що кодують фактори транскрипції, разом із 12 внутрішніми позитивними та негативними контролями (загалом 96 генів), із використанням двох ідентичних зразків РНК, отриманих із клітин пацієнтів. Кожен зразок

представляв собою суміш, що містила 25 мкл РНК відповідного пацієнта, що забезпечувало достатню кількість матриці для проведення аналізу.

Як контрольну групу використовували РНК, ізольовану з В-лімфоцитів периферичної крові здорових донорів, а також із їхніх В- та Т-клітин, що дозволяло провести коректне порівняння рівнів експресії досліджуваних генів у нормі та при патології.

Кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (qPCR) виконували із застосуванням 2 мкг попередньо синтезованої комплементарної ДНК (кДНК) як матриці. Для ампліфікації використовували флуоресцентний барвник SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., США), який дозволяє реєструвати накопичення продуктів ампліфікації у режимі реального часу. Реакції проводили на приладі 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) відповідно до стандартних умов.

Порогове значення циклу ампліфікації (Ct) визначали для кожного зразка, при цьому значення, що перевищували 35 циклів, не враховувалися як достовірні, що відповідає загальноприйнятим критеріям оцінки експресії генів із низьким рівнем транскрипції.

Отримані значення Ct експортували та обробляли за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення, доступного на веб-ресурсі виробника (Thermo Fisher Scientific Inc., США), що забезпечувало автоматизований аналіз даних, включаючи нормалізацію та розрахунок відносних рівнів експресії факторів транскрипції.

Застосування даного підходу дозволило отримати комплексну характеристику транскрипційного профілю клітин та виявити потенційні зміни експресії генів, асоційовані з патологічним процесом.

## 2.7. Оцінка рівня експресії білків шляхом імунофлуоресцентного мікроскопічного аналізу

Для дослідження субклітинного розподілу білків у клітинах ХЛЛ використовували метод імунофлуоресценції. Клітини, виділені з периферичної крові за допомогою градієнтного центрифугування на фіколі, осаджували на предметні скельця центрифугуванням при 1500 об/хв протягом 5 хвилин, із розрахунку 50 000 клітин на одне скельце. Після цього клітини фіксували сумішшю метанолу та ацетону у співвідношенні 1:1 при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$  протягом 20 хвилин. Підготовлені слайди зберігалися при тій же температурі до подальшої обробки.

Для відновлення клітинної структури проводили регідратацію у фосфатному буфері (PBS) протягом 1 години при кімнатній температурі. Щоб зменшити неспецифічне зв'язування антитіл, проводили блокування сайтів з використанням нормальної сироватки тварин, відповідно до джерела вторинних антитіл, у концентрації 20 мкг/мл протягом 20 хвилин. Далі на препарати наносили первинні антитіла у концентрації 10 мкг/мл та інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Після цього здійснювали тричі промивання PBS для видалення залишків антитіл.

На наступному етапі проводили інкубацію з флуоресцентно міченими вторинними антитілами протягом 30 хвилин у вологій камері в темряві, після чого також здійснювали тричі промивання PBS. Всі стадії роботи з антитілами та забарвленням ДНК виконувалися у вологій камері для запобігання висиханню препаратів.

Для візуалізації імунофлуоресценції використовували електронний мікроскоп Zeiss (Німеччина) із цифровою камерою CD4400 (Hamamatsu, Японія). Під час аналізу застосовували подвійне забарвлення: кролячі антитіла проти SMAD4 (Cell Signaling, США) як первинні та вторинні анти-

кролячі антитіла, отримані у свині і кон'юговані з FITC (флуоресцеїн-5-ізотіоціанат, ДАКО, Данія).

Для контрастування ядер ДНК застосовували барвник Hoechst (біс-бензimid 3223, Invitrogen, США) у концентрації 0,5 мкг/мл, додаючи його безпосередньо до розчину вторинних антитіл. Після завершення забарвлення препарати покривали покривними скельцями у 80 % розчині гліцерину у PBS, що містив 2,5 % 1,4-діаза-біцикло-(2.2.2)-октану (Sigma, США), для збереження флуоресценції та запобігання фотобліченню.

Зображення отримували за допомогою камери CCD (Hamamatsu, Японія) і зберігали як некомпресовані TIFF-файли 8 та 24-bit. Подальший аналіз і обробку зображень виконували з використанням програми Adobe Photoshop C2S, що дозволяло коригувати контраст, яскравість та проводити кількісний аналіз сигналу.

## 2.8. Статистична обробка даних

Первинну обробку даних проводили із використанням описової статистики, визначали медіану, міжквартильний інтервал (IQR: 25–75%), середнє значення та стандартне відхилення, що дозволяло оцінити загальний розподіл показників у досліджуваних групах. Перевірку нормальності розподілу здійснювали за допомогою критерію Шапіро–Уїлка, що дало можливість обґрунтовано обрати параметричні або непараметричні методи подальшого аналізу. З огляду на те, що більшість отриманих даних не відповідала нормальному розподілу, для порівняння незалежних вибірок (група ХЛЛ та контрольна група) використовували непараметричний критерій Манна–Уїтні. У випадках аналізу більше ніж двох груп застосовували критерій Краскела–Уолліса з подальшою пост-хок корекцією множинних порівнянь. Різницю між показниками вважали статистично

значущою при значенні  $p < 0,05$ . Для оцінки взаємозв'язків між показниками використовували кореляційний аналіз за Спірменом із визначенням коефіцієнта рангової кореляції ( $r$ ), що дозволяло оцінити силу та напрямок асоціацій між досліджуваними параметрами. Візуалізацію результатів здійснювали за допомогою графічних методів, що забезпечувало наочне представлення варіабельності даних, розподілу значень та міжгрупових відмінностей. Усі розрахунки виконували із використанням стандартних статистичних програм.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Загальна характеристика експресії транскрипційних факторів

ХЛЛ характеризується не лише накопиченням пухлинних В-лімфоцитів, але й глибокими порушеннями їх функціонального стану, зокрема змінами у транскрипційній регуляції та міжклітинній взаємодії. Важливу роль у патогенезі ХЛЛ відіграє формування специфічного пухлинного мікрооточення, яке підтримує виживання, проліферацію та резистентність лейкемічних клітин до апоптозу.

Одним із ключових механізмів формування такого мікрооточення є секреція хемокинів, зокрема CCL3, CCL4 та CCL5, які забезпечують рекрутування імунних клітин та сприяють створенню сприятливого для пухлини мікроклімату. Відомо, що рівень експресії генів цих хемокинів значною мірою залежить від активності транскрипційних факторів, які регулюють імунну відповідь та диференціацію В-клітин.

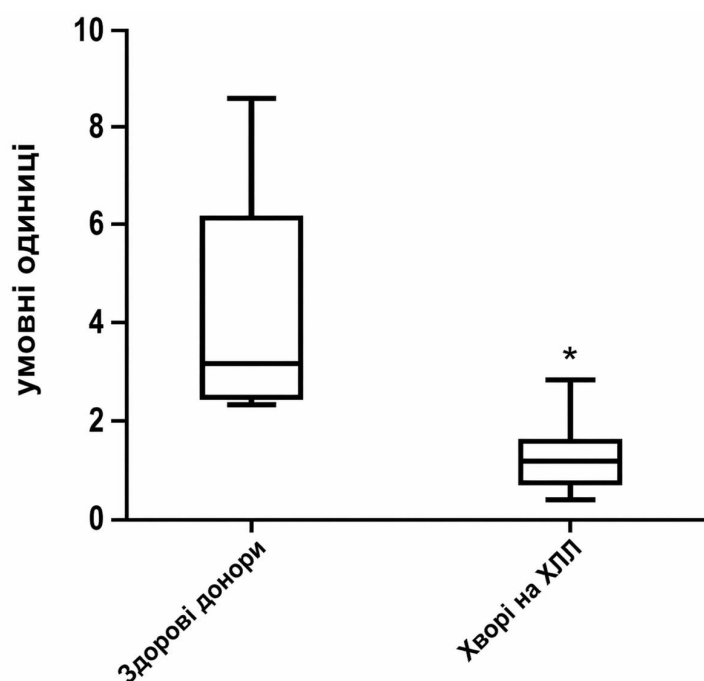
Зокрема, транскрипційні фактори IRF4, IRF8, BLIMP1 та PU1 є ключовими регуляторами розвитку та функціонування В-лімфоцитів. Вони беруть участь у контролі експресії генів, пов'язаних як із диференціацією клітин, так і з продукцією цитокінів та хемокинів. Порушення їх експресії може призводити до дизрегуляції імунної відповіді та сприяти прогресуванню ХЛЛ.

Враховуючи, що хемокини CCL3, CCL4, CCL5 відіграють важливу роль у формуванні пухлинного мікрооточення, дослідження регуляції експресії їх генів на рівні транскрипції є важливим для розуміння патогенезу захворювання.

Активація сигнальних шляхів у клітинах ХЛЛ, таких як В-клітинний рецептор (BCR), супроводжується активацією транскрипційного фактора NF- $\kappa$ B, який є одним із основних індукторів експресії CCL3 та CCL4. У той же час

транскрипційні фактори сімейства *IRF* та *PUI* можуть модулювати цю експресію як безпосередньо, так і через взаємодію з іншими регуляторними білками.

Отримані в даному дослідженні результати щодо зниження експресії *BLIMP1*, *IRF4*, *IRF8* та *PUI* у пацієнтів із ХЛЛ дозволяють припустити наявність порушень у механізмах регуляції хемокінів, що може сприяти підвищенню рівнів *CCL3* та *CCL4* та зміні експресії *CCL5*. Це, у свою чергу, створює умови для підтримки пухлинного мікрооточення та прогресування захворювання.



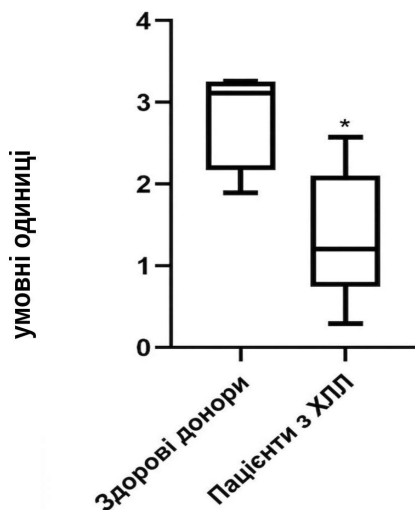
**Рис. 3.1.** Експресія транскрипційного фактора *BLIMP1* у клітинах периферичної крові здорових донорів (n=7) та пацієнтів із хронічною лімфоцитарною лейкемією (n=15). \* - статистично значуща різниця між групами ( $p < 0.05$ )

*BLIMP1* є ключовим транскрипційним репресором, який індукує плазматичну диференціацію, пригнічує *BCL6* та *PAX5*, зменшує експресію прозапальних генів, що включає деякі хемокіни. У пацієнтів із ХЛЛ спостерігається значне зниження рівня експресії транскрипційного фактора

*BLIMP1* порівняно зі здоровими донорами. Медіанне значення експресії у групі ХЛЛ є приблизно у 3–4 рази нижчим ( $p < 0,05$ ), що свідчить про суттєве пригнічення транскрипційної активності даного фактора. Зниження рівня *BLIMP1* може призводити до зняття репресії з генів запалення, що потенційно сприяє підвищенню експресії *CCL3* та *CCL4*. Крім того, зниження *BLIMP1* вказує на блок диференціації В-клітин. Це означає, що клітини залишаються у стані, який сприяє їх виживанню та накопиченню. Підвищується продукція прозапальних хемокинів *CCL3*, *CCL4*, *CCL5* у ХЛЛ-клітинах.

Подібний зв'язок було виявлено для *IRF4* (рис. 3.2.). Встановлено, що у групі здорових донорів рівень експресії *IRF4* характеризується відносно високими значеннями, близько 3,0–3,2, що відповідає фізіологічному рівню активності даного транскрипційного фактора у В-лімфоцитах.

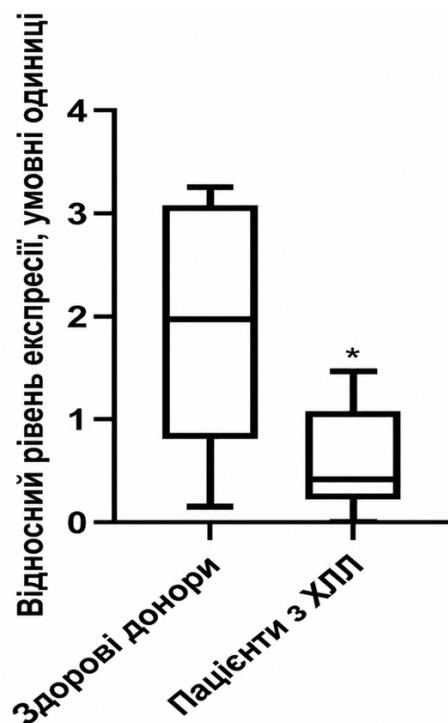
У пацієнтів із ХЛЛ спостерігається виражене зниження експресії *IRF4*, ( $p < 0,05$ ). Таким чином, рівень експресії даного фактора знижується орієнтовно у 2–3 рази порівняно з контрольною групою.



**Рис. 3.2.** Експресія транскрипційного фактора *IRF4* у клітинах периферичної крові здорових донорів ( $n=7$ ) та пацієнтів із хронічною лімфоцитарною лейкемією ( $n=15$ ). \* - статистично значуща різниця між групами ( $p < 0.05$ )

Зниження експресії *IRF4* може призвести до порушення регуляції *CCL5*, оскільки *IRF4* бере участь у контролі його транскрипції. Також через зниження гальмівного впливу на запальні сигнальні шляхи зниження хемокіну впливає на непряму активацію *CCL3* та *CCL4*, через це підвищується продукування хемокінів

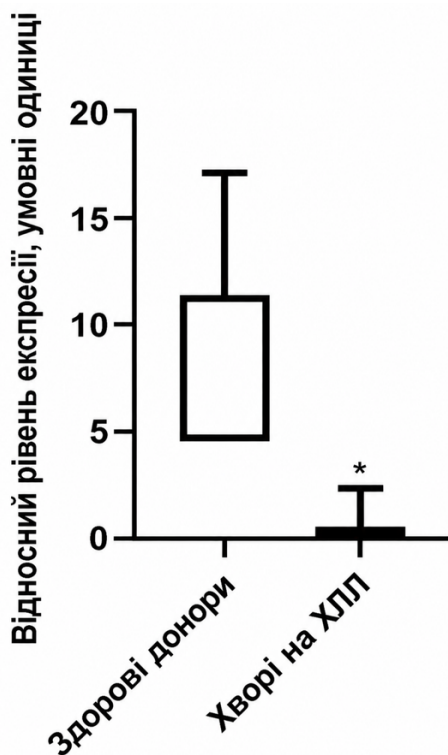
*IRF8* є важливим транскрипційним фактором, який відіграє ключову роль у розвитку та функціонуванні клітин імунної системи, зокрема В-лімфоцитів, моноцитів і дендритних клітин. Він бере участь у регуляції генів, пов'язаних із протипухлинною імунною відповіддю, а також у контролі проліферації та диференціації клітин. Ми показали зниження рівня експресії *IRF8* у пацієнтів із ХЛЛ приблизно у 3–4 рази порівняно з контрольною групою (Рис. 3.3.).



**Рис. 3.3.** Експресія транскрипційного фактора *IRF8* у клітинах периферичної крові здорових донорів ( $n=7$ ) та пацієнтів із хронічною лімфоцитарною лейкемією ( $n=15$ ). \* - статистично значуща різниця між групами ( $p < 0.05$ )

Зниження експресії *IRF8* у пацієнтів із ХЛЛ може свідчити про втрату контролю над нормальними процесами імунної регуляції, що створює умови для виживання пухлинних клітин. Відомо, що *IRF8* взаємодіє з іншими транскрипційними факторами, зокрема *PU1*, формуючи регуляторні комплекси, які контролюють транскрипцію генів імунної відповіді.

Зниження рівня *IRF8* може порушувати регуляцію *CCL3* та *CCL4*, оскільки *IRF8* у комплексі з *PU1* може контролювати їх транскрипцію. Також може посилювати активацію *NF-κB*-залежних генів, що призводить до підвищеної продукції прозапальних хемокинів та змінює експресію *CCL5*, яка може бути опосередковано пов'язана з дисбалансом *IRF*-сигналіngu.



**Рис. 3.4.** Експресія транскрипційного фактора *PU1* у клітинах периферичної крові здорових донорів (n=7) та пацієнтів із хронічною лімфоцитарною лейкемією (n=15). \* - статистично значуща різниця між групами (p < 0.05)

Якщо ж брати до уваги *PU1* (рис. 3.4.), було показано, що у здорових донорів експресія характеризується високими значеннями, приблизно 9–11 умовних одиниць, що відповідає активному функціонуванню даного транскрипційного фактора у нормальних В-лімфоцитах.

Натомість у пацієнтів із ХЛЛ спостерігається різке та виражене зниження експресії *PU1*, де значення наближається до 0–0,5 умовних одиниць. Таким чином, рівень експресії знижується більш ніж у 10–15 разів порівняно з контрольною групою ( $p < 0,05$ ).

*PU1* є ключовим транскрипційним фактором, що належить до родини ETS і відіграє фундаментальну роль у розвитку та функціонуванні клітин гемопоетичної системи. Він регулює експресію великої кількості генів, пов'язаних із диференціацією В-лімфоцитів, активацією імунної відповіді та підтримкою нормального клітинного гомеостазу. Критичне зниження рівня *PU1* у пацієнтів із ХЛЛ свідчить про глибоке порушення транскрипційного контролю в клітинах. Особливо важливим є те, що *PU1* функціонує у тісній взаємодії з транскрипційними факторами IRF4 та IRF8, формуючи регуляторні комплекси, які контролюють транскрипцію генів імунної відповіді. Тому його зниження має системний вплив на клітинні процеси.

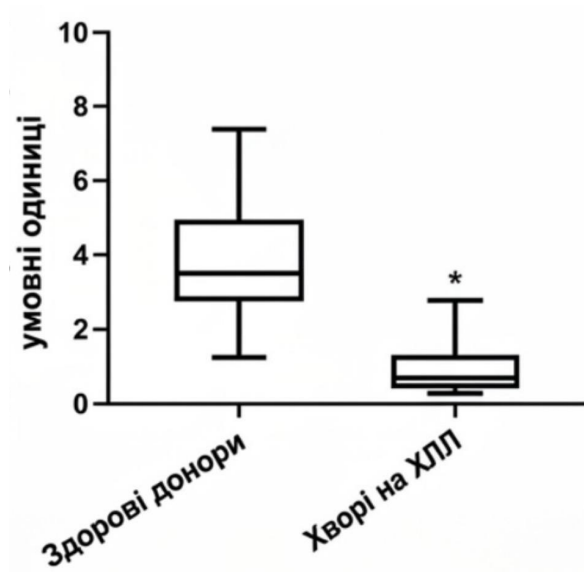
Якщо ж брати до уваги вплив *PU1* на регуляцію хемокинів: порушується контроль транскрипції *CCL3* та *CCL4*, оскільки *PU1* разом з IRF-факторами бере участь у регуляції їх генів, посилюється NF-κB-залежна активація, що може призводити до надмірної продукції *CCL3* і *CCL4*, відбувається дисбаланс у регуляції *CCL5*, що залежить від координації кількох транскрипційних факторів.

*PU1* не функціонує ізольовано. Він взаємодіє з іншими транскрипційними факторами, зокрема: IRF4, IRF8, BLIMP1. Тому можна зробити висновок, що таке значне зниження *PU1* може свідчити не лише про функціональні зміни, але й про ключову роль цього фактора в патогенезі ХЛЛ,

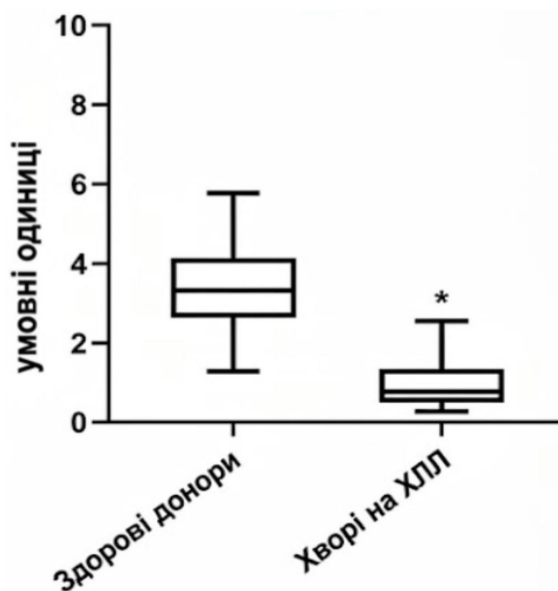
зокрема як одного з центральних регуляторів транскрипційної мережі, його пригнічення має каскадний ефект.

### 3.2. Порівняльна характеристика експресії транскрипційних факторів

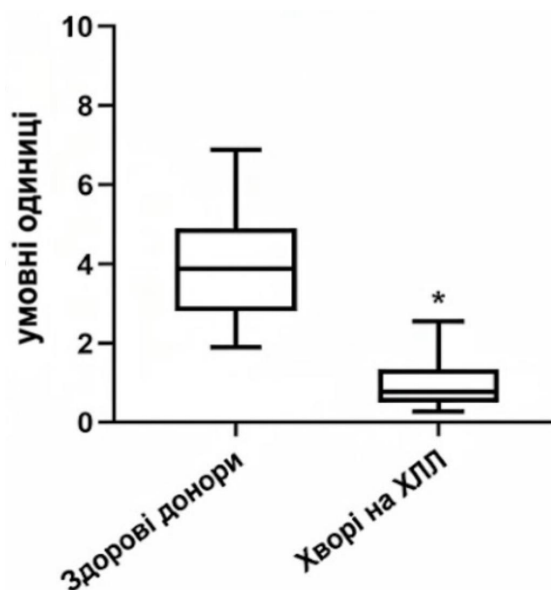
Незважаючи на відомі дані про можливе підвищення експресії *CCL3*, *CCL4* та *CCL5* при зниженні *BLIMP1*, у даному дослідженні спостерігається протилежна тенденція (рис. 3.5., 3.6., 3.7.). Це може пояснюватись тим, що одночасне зниження інших транскрипційних факторів, зокрема *IRF4*, *IRF8* та *PUI*, має домінуючий ефект і призводить до загального пригнічення експресії хемокінів.



**Рис. 3.5.** Експресія гена *CCL3* у клітинах периферичної крові здорових донорів (n=7) та пацієнтів із хронічною лімфоцитарною лейкемією (n=15). \* - статистично значуща різниця між групами (p < 0.05)



**Рис. 3.6.** Експресія гена *CCL4* у клітинах периферичної крові здорових донорів (n=7) та пацієнтів із хронічною лімфоцитарною лейкемією (n=15). \* - статистично значуща різниця між групами ( $p < 0.05$ )



**Рис. 3.7.** Експресія гена *CCL5* у клітинах периферичної крові здорових донорів (n=7) та пацієнтів із хронічною лімфоцитарною лейкемією (n=15). \* - статистично значуща різниця між групами ( $p < 0.05$ )

Отримані результати свідчать про достовірне зниження рівня експресії хемокінів *CCL3*, *CCL4* та *CCL5* у пацієнтів із ХЛЛ порівняно зі здоровими донорами ( $p < 0,05$ ). Незважаючи на загальну тенденцію до зниження, спостерігається міжзразкова варіабельність, що може відображати гетерогенність пухлинних клітин та різний ступінь їх активації. Зниження експресії *CCL3* та *CCL4* може свідчити про порушення сигналіngu через В-клітинний рецептор або зміну регуляції транскрипційних факторів, залучених до їх індукції. У випадку *CCL5*, більш варіабельний рівень експресії, ймовірно, пов'язаний із складнішою мережею його регуляції, що включає декілька сигнальних шляхів. Виявлене зниження коекспресії цих хемокінів може вказувати на зміну механізмів формування пухлинного мікрооточення при ХЛЛ. Підвищена продукція цих хемокінів характерна для активованих ХЛЛ-клітин і асоціюється з посиленням рекрутування допоміжних клітин мікрооточення, таких як Т-лімфоцити та моноцити. Це створює умови для формування сприятливого мікрооточення, яке підтримує проліферацію та виживання пухлинного клону через секрецію цитокінів і активацію антиапоптозних механізмів.

*CCL5*, у свою чергу, характеризується більш варіабельним рівнем експресії, що може пояснюватися складнішою регуляцією його транскрипції. На відміну від *CCL3* та *CCL4*, експресія *CCL5* контролюється ширшим спектром сигнальних шляхів і транскрипційних механізмів, що включають NF- $\kappa$ B-, STAT- та IRF-залежну регуляцію. Це забезпечує можливість як конститутивної, так і індукованої експресії даного хемокіну залежно від стану клітини та сигналів мікрооточення.

Наявна гетерогенність експресії *CCL3*, *CCL4* та *CCL5* може відображати різні функціональні стани ХЛЛ-клітин — від відносно спокійних до активованих субпопуляцій. Високий рівень експресії цих хемокінів асоціюється з більш активною взаємодією з мікрооточенням та потенційно більш агресивним перебігом захворювання, тоді як знижена експресія може

відповідати менш активному стану клітин або недостатній стимуляції відповідних сигнальних шляхів.

Крім того, узгоджена експресія *CCL3*, *CCL4* та *CCL5* свідчить про координацію їх регуляції в межах єдиної транскрипційної мережі, що активується у відповідь на зовнішні стимули, зокрема через BCR-сигналінг. Така коекспресія підсилює ефекти залучення клітин мікрооточення, що сприяє формуванню «пухлинних ніш» і підтримує виживання злоякісних В-лімфоцитів.

Таким чином, отримані результати демонструють, що *CCL3*, *CCL4* та *CCL5* відіграють важливу роль у формуванні хемокінового профілю при ХЛЛ. Виявлена варіабельність їх експресії може бути пов'язана з різними рівнями активації клітин та особливостями мікрооточення, що, у свою чергу, може впливати на перебіг захворювання та інтенсивність пухлинно-мікрооточинних взаємодій. Отримані дані підкреслюють значення хемокінової системи як одного з ключових компонентів патогенезу ХЛЛ та створюють підґрунтя для подальшого дослідження механізмів її регуляції.

Додатково слід відзначити, що отримані результати щодо експресії *CCL3*, *CCL4* та *CCL5* можуть мати не лише діагностичне, але й потенційне прогностичне значення у контексті ХЛЛ. Відомо, що рівень хемокінів відображає ступінь функціональної активності пухлинних В-лімфоцитів, зокрема їх здатність до взаємодії з мікрооточенням та формування захисних ніш у лімфоїдних органах. Підвищена експресія *CCL3* і *CCL4* асоціюється з більш активною рекрутацією клітин мікрооточення, що може сприяти підсиленню сигналів виживання через контакт-залежні механізми та паракринну секрецію факторів росту. У цьому контексті варіабельність рівнів експресії між зразками може відображати різні біологічні підтипи ХЛЛ, які відрізняються за інтенсивністю клітинної взаємодії та залежністю від мікрооточення.

Окрім цього, зміни у профілі експресії *CCL5* можуть свідчити про залучення додаткових регуляторних контурів, що виходять за межі класичної BCR-сигнальної осі. Оскільки *CCL5* може індукуватися під впливом кількох сигнальних шляхів, його експресія потенційно відображає інтегральний стан клітини, включаючи рівень активації, відповідь на цитокіни та вплив стромального оточення. Таким чином, одночасний аналіз експресії *CCL3*, *CCL4* та *CCL5* дозволяє оцінити не лише окремі аспекти хемокінової відповіді, але й загальну спрямованість регуляторних процесів у пухлинних клітинах.

Також результати підтверджують, що ХЛЛ є не лише захворюванням, пов'язаним із проліферацією клітин, але й патологією транскрипційної регуляції. Порушення експресії *IRF4*, *IRF8*, *BLIMP1* та *PUI* призводить до втрати контролю над імунною відповіддю, зміни експресії хемокінів, формування пухлинного мікрооточення.

Окремої уваги заслуговує інтегративна роль транскрипційних факторів як центральних «вузлів» регуляції, що поєднують сигнали від мікрооточення з програмами експресії хемокінів у клітинах ХЛЛ. В умовах пухлинної трансформації відбувається не просто зміна рівня окремих факторів, а перебудова всієї транскрипційної мережі, в якій ключову роль відіграють IRF, STAT та PU1. Активація цих факторів може відбуватися під впливом сигналів від BCR, CD40, цитокінів та контактів зі стромальними клітинами, що призводить до індукції експресії *CCL3*, *CCL4* та *CCL5*. Важливо, що ці транскрипційні фактори часто діють не ізольовано, а у вигляді кооперативних комплексів, підсилюючи або модулюючи дію один одного. Наприклад, одночасна активація IRF та STAT може призводити до більш стійкої та тривалої експресії хемокінів, ніж активація кожного з них окремо. Крім того, порушення балансу між активаторами та репресорами транскрипції створює умови для «хронічної активації» генів запалення, що є характерною ознакою ХЛЛ. Такий стан підтримує постійний рівень секреції хемокінів навіть за відсутності сильних зовнішніх стимулів. Таким чином, транскрипційні

фактори виступають не лише як регулятори окремих генів, але як системні координатори клітинної відповіді, що визначають інтенсивність та тривалість хемокінової сигналізації, а отже — і характер взаємодії пухлинних клітин із мікрооточенням.

Вивчення біологічних механізмів ХЛЛ протягом останніх десятиліть суттєво розширило розуміння ролі мікрооточення пухлини, сигналінгових шляхів та взаємодії клітин імунної системи. Якщо раніше основна увага приділялась морфологічним та клінічним аспектам захворювання, то нині все більшого значення набувають молекулярні та імунофенотипові характеристики пухлинних клітин, зокрема експресія рецепторів, що визначають їх міграцію, виживання та взаємодію з мікрооточенням. У цьому контексті важливу роль відіграють хемокіни та їх рецептори, які забезпечують хомінг, адгезію та тканинну локалізацію В-лімфоцитів, включаючи злоякісні клони при ХЛЛ [27, 29]. Серед них ключову роль відіграють хемокіни CCL3, CCL4 та CCL5, які активно продукуються клітинами ХЛЛ у відповідь на сигнали мікрооточення та активацію В-клітинного рецептора [24].

Слід зазначити, що профіль експресії хемокінових рецепторів у пацієнтів з ХЛЛ є гетерогенним і може змінюватися залежно від стадії захворювання, генетичних особливостей пухлинних клітин та попереднього лікування. Відомо, що підвищена експресія CXCR4 асоціюється з більш активною міграцією клітин у кістковий мозок та лімфатичні вузли, тоді як зміни в експресії CCR7 та CXCR5 впливають на здатність клітин до рециркуляції та утримання в лімфоїдних органах [27]. Аналіз таких змін дозволяє краще зрозуміти механізми прогресування захворювання та формування резистентності до терапії.

На сучасному етапі розвитку гематології важливим напрямом є пошук молекулярних маркерів, які можуть використовуватися для прогнозування перебігу ХЛЛ та вибору оптимальної терапевтичної стратегії. Профіль експресії хемокінових рецепторів розглядається як один із перспективних

інструментів стратифікації пацієнтів, оскільки він може відображати функціональний стан пухлинних клітин та їх взаємодію з мікрооточенням. Крім того, зміни у хемокінових осях потенційно можуть бути мішенями для таргетної терапії.

Відомо, що *CCL3* та *CCL4* є важливими медіаторами запальної відповіді та беруть участь у рекрутуванні імунних клітин до пухлинного мікрооточення. Клітини ХЛЛ здатні секретувати ці хемокіни після стимуляції через BCR або взаємодії зі стромальними клітинами, що сприяє залученню Т-лімфоцитів та інших клітин мікрооточення, які, у свою чергу, підтримують виживання злоякісного клону [26]. Таким чином, *CCL3* і *CCL4* виконують не лише сигнальну, але й регуляторну функцію, формуючи сприятливі умови для прогресії захворювання.

*CCL5* також є одним із ключових хемокінів, асоційованих із ХЛЛ. Його знижена експресія пов'язана з активацією пухлинних клітин та взаємодією з мікрооточенням, зокрема з Т-клітинами та стромальними елементами. *CCL5* бере участь у посиленні клітинної адгезії, міграції та активації сигнальних шляхів, що підтримують проліферацію та виживання клітин ХЛЛ [27]. Взаємодія *CCL5* із відповідними рецепторами (*CCR1*, *CCR3*, *CCR5*) створює додаткові умови для утримання пухлинних клітин у лімфоїдних тканинах.

Показано, що рівні експресії *CCL3*, *CCL4* і *CCL5* можуть корелювати з активністю захворювання та клінічним перебігом ХЛЛ. Їх знижена експресія часто асоціюється з більш агресивними формами хвороби, високою проліферативною активністю клітин та несприятливим прогнозом. Крім того, ці хемокіни можуть відображати ступінь взаємодії пухлинних клітин із мікрооточенням, що є критичним фактором у патогенезі ХЛЛ.

Додатково до отриманих результатів доцільно розглянути функціональні наслідки виявлених змін експресії *CCL3*, *CCL4* та *CCL5* у контексті формування резистентності до терапії при ХЛЛ. Відомо, що взаємодія пухлинних клітин із мікрооточенням значною мірою визначає їхню

чутливість до лікування, а хемокіни відіграють ключову роль у підтриманні цієї взаємодії. Знижена експресія *CCL3* та *CCL4* може сприяти формуванню так званих «захисних ніш», у яких клітини ХЛЛ отримують сигнали виживання від Т-лімфоцитів, фолікулярних дендритних клітин та стромальних елементів. У таких умовах активуються антиапоптотичні шляхи, зокрема через BCL2-залежні механізми, що знижує ефективність цитотоксичної терапії. Крім того, хемокін-опосередкована міграція клітин у лімфатичні вузли та кістковий мозок може сприяти їх «ухиленню» від дії лікарських засобів, концентрація яких у цих компартментах може бути нижчою. У випадку *CCL5* його варіабельна експресія може відображати різний ступінь залучення альтернативних сигнальних шляхів, що також впливає на формування лікарської стійкості. Зокрема, через взаємодію з рецепторами CCR5 та іншими молекулами адгезії *CCL5* може посилювати клітинну адгезію та утримання пухлинних клітин у мікрооточенні, що додатково ускладнює їх елімінацію. Важливо також, що зміни у хемокіновому профілі можуть супроводжуватися перебудовою імунного мікрооточення, включаючи зміну функціональної активності Т-клітин та моноцитів, що потенційно сприяє формуванню імуносупресивного середовища. Таким чином, аналіз експресії *CCL3*, *CCL4* та *CCL5* дозволяє не лише оцінити стан пухлинних клітин, але й зробити висновки щодо їх потенційної відповіді на терапію, що відкриває перспективи для індивідуалізації лікування та розробки нових таргетних підходів, спрямованих на порушення критичних взаємодій між клітинами ХЛЛ та їх мікрооточенням.

Мікрооточення пухлини відіграє центральну роль у підтримці життєздатності клітин ХЛЛ, а хемокінові сигнали *CCL3/CCL4/CCL5* є одним із ключових механізмів цієї взаємодії. Через залучення Т-лімфоцитів, моноцитів та інших клітин імунної системи формується складна мережа клітинних контактів і сигнальних шляхів, які сприяють уникненню імунного нагляду та підтримують проліферацію злоякісного клону [27].

У цьому контексті встановлення профілю експресії хемокінів *CCL3*, *CCL4* та *CCL5* та транскрипційних факторів *IRF4*, *IRF8*, *BLIMP1* та *PUI1* при ХЛЛ є важливим як для розуміння патогенезу захворювання, так і для розробки нових підходів до стратифікації пацієнтів. Аналіз рівнів цих хемокінів може бути використаний як потенційний прогностичний маркер, що відображає активність пухлинного процесу та взаємодію клітин ХЛЛ із мікрооточенням.

## ВИСНОВКИ

Встановлено зниження експресії хемокинів *CCL3*, *CCL4*, *CCL5* та транскрипційних факторів *BLIMP1*, *IRF4*, *IRF8*, *PUI* у пацієнтів з ХЛЛ порівняно із здоровими донорами.

1. Було визначено, що у пацієнтів із ХЛЛ спостерігається зниження експресії хемокинів *CCL3*, *CCL4*, *CCL5*.
2. Встановлено зниження транскрипційних факторів *BLIMP1*, *IRF4*, *IRF8* та *PUI* у пацієнтів із ХЛЛ, що може свідчити про порушення транскрипційної регуляції у В-клітинах.
3. Було визначено, що зниження *BLIMP1* не сприяло підвищенню рівня хемокинів *CCL3*, *CCL4* та *CCL5*, що свідчить про те, що *PUI* може виступати як центральний регулятор транскрипційної мережі при хронічному лімфолейкозі, а його значне зниження є важливим патогенетичним фактором, що визначає порушення експресії генів імунної відповіді, зокрема хемокинів *CCL3*, *CCL4* та *CCL5*.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Gaiti, F., Chaligne, R. and Gu, H. (2019). Epigenetic evolution and lineage histories of chronic lymphocytic leukaemia. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/31092926/> [Accessed 15 May 2019].
2. Hallek, M. (2019). Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.25595> [Accessed 30 July 2019].
3. Hampel, P. and Parikh, S. (2022). Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36446777/> [Accessed 29 Nov. 2022].
4. Mattsson, M., Sandin, F. and Kimby, E. (2020). Increasing prevalence of chronic lymphocytic leukemia with an estimated future rise: A nationwide population- based study. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.25681> [Accessed 14 Nov. 2019].
5. Perutelli, F., Coscia, M. and Griggio, V. (2022). Immunotherapeutic strategies in CLL: advances and challenges. *PMC free article*, [online]. Available at: [https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2022.837531/full?utm\\_source=chatgpt.com](https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2022.837531/full?utm_source=chatgpt.com) [Accessed 21 Feb. 2022].
6. Owen, C., Moreno, C. and Baeten, K. (2022). Fixed-Duration Ibrutinib-Venetoclax in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia and Comorbidities. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38319255/> [Accessed 13 May 2022].
7. Niemann, C., Brieghel, C. and Helleberg, M. (2022). Patients with CLL have a lower risk of death from COVID-19 in the Omicron era. *PMC free article*,

- [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35588468/> [Accessed 4 Aug. 2022].
8. Wang, K., Shah, P. and Chi, J. (2022). Vaccination efficacy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36270021/> [Accessed 21 Oct. 2022].
  9. Стругов, В., Стадник, Є., Вірц, Ю. та Зарицький А. (2016). Значення віку та супутніх захворювань у терапії хронічного лімфолейкозу. *Клінічна онкогематологія*, 22(1), сс. 162-168.
  10. Bosch, F. and Dalla-Favera, R. (2019). Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16, сс. 684–701.
  11. Baliakas, P., Jeromin, S. and Iskas, M. (2019). Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://ashpublications.org/blood/article/133/11/1205/260491/Cytogenetic-complexity-in-chronic-lymphocytic> [Accessed 14 Mar. 2019].
  12. Robak, T. (2019). Chronic lymphocytic leukemia. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8925670/> [Accessed 30 Jun. 2019].
  13. Shadman, M. (2023). Diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review. *JAMA*, 329(11), сс. 918–932.
  14. Arcari, A., Morello, L. and Vallisa, D. (2024). Recent advances in the molecular biology of chronic lymphocytic leukemia: how to define prognosis and guide treatment. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://www.mdpi.com/2072-6694/16/20/3483> [Accessed 9 Sep. 2024].
  15. Shibebe, S., Ajaj, I. and Al-Jighefee, H. (2022). Effectiveness of convalescent plasma therapy in COVID-19 patients with hematological malignancies: a systematic review. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://www.mdpi.com/2038-8330/14/4/52> [Accessed 12 Dec. 2022].

16. Senefeld, J.W., Casadevall, A. and Joyner, M.J. (2023). COVID-19 convalescent plasma for the treatment of immunocompromised patients: a systematic review and meta-analysis. *PMC free article*, [online]. Available at: [https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/fullarticle/2800275?utm\\_source=chatgpt.com](https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/fullarticle/2800275?utm_source=chatgpt.com) [Accessed 7 Jan. 2023].
17. Jorda, A., Kussmann, M. and Gelbenegger, G. (2022). Convalescent plasma treatment in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8859444/> [Accessed 7 Feb. 2022].
18. Mouliou, DS. and Gourgoulianis, KI. (2021). False-positive and false-negative COVID-19 cases: respiratory prevention and management strategies, vaccination, and further perspectives. . *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/33896332/> [Accessed 25 Apr. 2021].
19. Lee, H.-J., Lee, J.-H. and Lee, C. (2022). Efficacy and safety of COVID-19 treatment using convalescent plasma transfusion: updated systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(17), cc. 10622.
20. Hughes, C. and Nibbs, R. (2018). A guide to chemokines and their receptors. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29637711/> [Accessed 7 Aug. 2018].
21. Palomina, D. and Marti, L. (2015). Chemokines and immunity. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26466066/> [Accessed 13 Sep. 2015].
22. Maghees, M., Sharma, G. and Siddiqui, J. (2022). Chemokines and cytokines: Axis and allies in prostate cancer pathogenesis. *PMC free article*, [online]. Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35181473/> [Accessed 16 Feb. 2022].

23. Liu, H., Yang, Z. and Cai, Y. (2020). Chemokines and chemokine receptors: A new strategy for breast cancer therapy. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32253815/> [Accessed 9 Jun. 2020].
24. Horuk, R. (2007). Chemokines. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17334613/> [Accessed 19 Feb. 2007].
25. Jiang, B., Liu, T. and Gao, Y. (2020). Chemokines in chronic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32450191/> [Accessed 20 May 2020].
26. Braoudaki, M., Ahmad, M. and Siddiqui, S. (2022). Chemokines and chemokine receptors in colorectal cancer; multifarious roles and clinical impact. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35700938/> [Accessed 11 Jun. 2022].
27. Roh, Y. and Seki, E. (2018). Chemokines and Chemokine Receptors in the Development of NAFLD. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29956205/> [Accessed 18 Feb. 2018].
28. Jafarzadeh, A., Seyedmoalemi, S. and Mirzaei, H. (2022). Interplays between non-coding RNAs and chemokines in digestive system cancers. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35716438/> [Accessed 15 Jun. 2022].
29. Oliveira, V., Proost, P. and Struyf, S. (2025). Chemokines in the resolution of inflammation: key players and targets for therapeutic modulation. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41346591/> [Accessed 19 Nov. 2025].
30. Sebastian-delaCruz, M. (2025). Chemokines and their receptors: The importance of their expression for an appropriate regulation of the immune response in health and disease. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41577409/> [Accessed 1 Dec. 2025].

31. Kiefer F. and Siekmann, A. (2011). The role of chemokines and their receptors in angiogenesis. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21479594/> [Accessed 11 Apr. 2011].
32. Le Bris, Y., Struski, S. and Guèze, R. (2017). Major prognostic value of complex karyotype in addition to TP53 and IGHV mutational status in first-line chronic lymphocytic leukemia. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27678008/> [Accessed 28 Sep. 2016].
33. Sowa, J. and Tokarski, K. (2021). Cellular, synaptic, and network effects of chemokines in the central nervous system and their implications to behavior. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8599319/> [Accessed 26 Aug. 2021].
34. Mughees, M. and Siddique, J. (2023). Chemokines and cytokines: Axis and allies in prostate cancer pathogenesis. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9793433/> [Accessed 1 Nov. 2023].
35. Oliveira, V., Proost, P. and Struyf, S. (2025). Chemokines in the resolution of inflammation: key players and targets for therapeutic modulation. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12672354/> [Accessed 19 Nov. 2025].
36. Bacon, K. and Harrison, J. (2000). Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis. *PMC free article*, [online]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10683519/> [Accessed 3 Apr. 2000].
37. Huang, Q., Liu, F. and Shen, J. (2019). The significance of chemokines in diffuse large B-cell lymphoma: a systematic review and future insights. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30880459/> [Accessed 15 Apr. 2019].

38. Geller, S., Hollmann, T.J., Horwitz, P. and Pulitzer, M. (2020). C-C chemokine receptor 4 expression in CD8<sup>+</sup> cutaneous T-cell lymphomas and lymphoproliferative disorders, and its implications for diagnosis and treatment. *Histopathology, PMC free article*, [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31355940/> [Accessed 9 Mar. 2020].
39. Zamanian, M., Albano, D. and Abedi, I. (2024). The clinical role of CXCR4-targeted PET on lymphoproliferative disorders: a systematic review. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://www.mdpi.com/2077-0383/13/10/2945> [Accessed 11 May. 2024].
40. Kadin, M.E., Fuschiotti, P. and Sernicola, A. (2025). Editorial: Cytokines and chemokines in lymphoma. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2025.1749323> [Accessed 14 Nov. 2025].
41. Patil, K., Kuttikrishnan, S. and Uddin, S. (2022). Molecular pathogenesis of cutaneous T-cell lymphoma: role of chemokines, cytokines, and dysregulated signaling pathways. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34906723/> [Accessed 12 Jun. 2022].
42. Du, J., Lin, Z. and Hou, J. (2024). Research progress of the chemokine/chemokine receptor axes in the oncobiology of multiple myeloma. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-024-01544-7> [Accessed 7 Sep. 2026].
43. Pinero, J., Sauch, J., Sanz, F. and Furlong, L. (2021). The DisGeNET cytoscape app: Exploring and visualizing disease genomics data. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/34136095/> [Accessed 11 May 2021].
44. Cunha-Bang, C., Simonsen, J. and Rostgaard, K. (2016). Improved survival for patients diagnosed with chronic lymphocytic leukemia in the era of

- chemo-immunotherapy: a Danish population-based study of 10455 patients. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/27834937/> [Accessed 11 Nov. 2016].
45. Mahlich, J., Okamoto, S. and Tsubota, A. (2017). Cost of Illness of Japanese Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL), and Budget Impact of the Market Introduction of Ibrutinib. *Pharmacoecon Open. PMC free article*, [online]. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s41669-017-0024-5> [Accessed 1 Sep. 2017].
46. Decker, T., Bogner, C. and Oelsner, M. (2010). Antiapoptotic effect of interleukin-2 (IL-2) in B-CLL cells with low and high affinity IL-2 receptors. *PMC free article*, [online]. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00277-010-0994-1> [Accessed 11 Jun. 2017].