

## АНОТАЦІЯ

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

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

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

маркерів імунотипового та цитокінового профілю В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ, які визначають чутливість до цитотоксичної дії цитостатиків.

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

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

асоційована із статусом експресії CD5, CD20, CD37, CD38 або CD40, однак є достовірно вищою у випадку одночасної експресії на В-лімфоцитах CD150 і CD180 ( $p=0,04$ ). Слід відмітити, що за наявності CD150<sup>+</sup> фенотипу та незалежно від статусу експресії CD180 спостерігається підсилення цитотоксичного ефекту за умов одночасної дії ФЛ та ЦФ на В-лімфоцити порівняно із аналогічними показниками за умов дії названих хіміопрепаратів у монорежимі ( $p<0,05$ ). Статус експресії CD22 не визначає чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до дії БН, ФЛ або ЦФ *ex vivo*.

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

Крім того, вперше досліджено чутливість В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до ФЛ, ЦФ та БН з урахуванням рівня експресії ізоформ CD150 – mCD150, nCD150 та sCD150. Встановлено, що рівень експресії мРНК жодної з ізоформ CD150 не корелює із чутливістю В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичної дії ФЛ, ЦФ та БН, тому надалі досліджувані зразки В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ було розподілено на групи відповідно до медіани (М) експресії мРНК ізоформ CD150, яка для даної вибірки становила 0,44 ум.од. для mCD150, 0,01 ум.од. – для nCD150 та 0,05 ум.од. – для sCD150. Показано, що чутливість В-лімфоцитів до ФЛ є вищою за умов високого рівня експресії мРНК mCD150 ( $>M$ ), а також низького рівня nCD150 ( $<M$ ), ( $p=0,03$ ). Натомість низький рівень експресії мРНК mCD150 асоційований із кращою чутливістю В-лімфоцитів при ХЛЛ до дії ЦФ ( $p=0,02$ ).

Однією з основних складових схем протипухлинної терапії першої лінії хворих на ХЛЛ є Ритуксімаб – МКАТ проти CD20. Для клітин патологічного

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## SUMMARY

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

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

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

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

detected in 82.1% patients with CLL, CD38 in 50.0%, CD150 in 51.6%. 38.7% of CLL cases were characterized by the presence of CD180 on the plasma membrane of B-lymphocytes. At the same time, the expression of CD5, CD20, CD37 and CD40 was detected in 100% of the studied cases. To establish associative relationships between the expression level of target antigens and the sensitivity of B lymphocytes of CLL patients to the components of chemotherapy regimens, the studied cases were divided into groups based on the presence or absence of antigen expression (for CD22, CD38, CD150 and CD180) or median (M) of antigen expression on B-lymphocytes (according to the geometric mean fluorescence intensity value of antigen normalized to such value for mAb isotype control – GeoMean ratio), which for CD5 was 6.29; for CD20 – 2.64; for CD37 – 10.71 and 5.08 for CD40.

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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