

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В.Н. КАРАЗІНА
Біологічний факультет
кафедра молекулярної біології та біотехнології

Механізми утворення цитотоксичних сполук у хворих на COVID-19 та їхня роль у розвитку постковідних симптомів

Допущено до захисту
«__» _____ 2025 р.
Завідуючий
кафедрою _____

Кваліфікаційна робота
студента кафедри
Дараган Оксани Сергіївни

Оцінка « _____ »

«__» _____ 2025 р.

Науковий керівник: Доктор
біологічних наук, професорка
Клімова Олена Михайлівна

Харків 2025

АНОТАЦІЯ

Мета роботи. Комплексно дослідити субпопуляцію CD56^{dim} CD16⁺ NK-клітин – головних ефektorів антитілозалежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності (ADCC) – при гострій інфекції COVID-19, у фазі постковідного синдрому та в пацієнтів з аденокарциномою шлунка, порівняти механізми їхнього виснаження й обґрунтувати спільні імунотерапевтичні стратегії.

Матеріали і методи. Обстежено 42 хворих на аденокарциному шлунка різних стадій; контроль – 25 умовно здорових донорів. Кількісний і фенотиповий аналіз NK-клітин (CD3⁻CD56⁺CD16⁺) здійснювали методом проточної цитометрії з використанням FITC-мічених моноклональних антитіл. Рівень інтерлейкіну-2 у сироватці визначали «сендвіч»-ІФА. Порівняльний аналіз даних COVID-19 виконано за результатами власного спостереження 30 госпіталізованих пацієнтів і мета-аналізу 48 сучасних публікацій.

Результати. У хворих на рак шлунка кількість CD16⁺ NK-клітин та експресія CD16 знижувалися пропорційно стадії пухлини ($p < 0,01$); найменші значення зафіксовано у пацієнтів > 60 років. Сироватковий IL-2 був достовірно нижчим (296 ± 52 пг/мл) порівняно з контролем (612 ± 38 пг/мл) і позитивно корелював із відсотком CD16⁺ NK ($r = 0,63$). Ex vivo стимуляція IL-2 відновлювала експресію CD16 та ADCC-активність. При тяжкому COVID-19 спостерігали гострий «шединг» CD16, гіперекспресію NKG2A/PD-1 і різке падіння перфोरину; у пацієнтів із Long COVID зберігалася дефіцитна частка CD16⁺ NK і гіпоактивний фенотип.

Висновки. Обидві патології викликають схожий спектр дисфункцій CD16⁺ NK-клітин (втрата CD16, чек-пойнт-інгібіція, дефіцит IL-2), що формує підґрунтя для єдиної терапевтичної моделі: блокада NKG2A/PD-1 у поєднанні з IL-15/модифікованим IL-2 й адаптивним перенесенням NK-клітин.

Ключові слова: CD16⁺ NK-клітини; ADCC; COVID-19; постковідний синдром; аденокарцинома шлунка; інтерлейкін-2; імунотерапія.

Anotation

Objective. To perform an integrated analysis of CD56^{dim} CD16⁺ natural killer (NK) cells—the main effectors of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)—during acute COVID-19 infection, long-COVID phase, and in patients with gastric adenocarcinoma; to compare exhaustion mechanisms and propose shared immunotherapeutic targets.

Materials and methods. Forty-two patients with gastric adenocarcinoma at stages I–IV and 25 healthy donors were enrolled. Quantitative and phenotypic profiling of peripheral CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK cells was carried out by flow cytometry using FITC-labelled monoclonal antibodies. Serum interleukin-2 (IL-2) was measured by sandwich ELISA. COVID-19 data were obtained from our cohort of 30 hospitalized patients and a meta-analysis of 48 recent studies.

Results. In gastric cancer, the absolute number of CD16⁺ NK cells and surface CD16 density declined with advancing tumour stage ($p < 0.01$), reaching the lowest values in patients over 60 years. Mean serum IL-2 was significantly reduced (296 ± 52 pg/ml vs 612 ± 38 pg/ml in controls) and positively correlated with the percentage of CD16⁺ NK cells ($r = 0.63$). Ex vivo IL-2 stimulation restored CD16 expression and ADCC capacity. Severe COVID-19 was characterised by rapid CD16 shedding, NKG2A/PD-1 over-expression and a sharp drop in perforin; long-COVID patients retained a diminished pool of hypofunctional CD16⁺ NK cells.

Conclusions. Both conditions trigger a convergent dysfunction signature in CD16⁺ NK cells—CD16 loss, checkpoint inhibition and IL-2 deficiency—highlighting a unified therapeutic paradigm based on NKG2A/PD-1 blockade combined with IL-15/engineered IL-2 support and adoptive NK-cell transfer.

Key words: CD16⁺ NK cells; ADCC; COVID-19; long-COVID; gastric adenocarcinoma; interleukin-2; immunotherapy.

Зміст

Анотація	1
Anotation	4
Зміст	5
Вступ	7
Розділ 1. Огляд і аналіз наукової літератури	10
1.1.1. Контроль активності CD16 NK-клітин	10
1.1.2. Варіації CD16 ⁺ NK-клітин	11
1.1.3. Зміни в субпопуляціях NK-клітин при COVID-19.....	12
1.1.4. Механізми цитотоксичності NK-клітин при COVID-19	13
1.1.5. Вплив COVID-19 на функціональність NK-клітин.....	13
1.1.6. Терапевтичні перспективи	13
1.2. Сигнальні шляхи активації та інгібування при аденокарциномі шлунка	14
1.2.1. Натуральні кілери (NK-клітини) при раку шлунка.....	15
1.2.2. CD16 клітини та антитіло-залежна цитотоксичність.....	16
1.2.3. Інтерлейкін-2 (ІЛ-2) та активація імунної відповіді	17
1.2.4. Інші імунні фактори в мікрооточенні шлункової аденокарциноми	18
1.2.5. Сучасні експериментальні та клінічні підходи	23
Розділ 2. Методи та матеріали	27
2.1. Визначення наявності поверхневих антигенів імунокомпетентних клітин методом непрямой імунофлуоресценції з використанням моноклональних антитіл.....	27
Принцип методу	27
Реактиви	27
Обладнання	27
Додаткові матеріали.....	27
Зразки	27
Виділення лімфоцитів.....	28
Підготовка предметних скелець	28
Приготування препаратів	28
Мікроскопія	28
2.2. Визначення інтерлейкіну-2 (ІЛ-2) у сироватці крові завдяки імуноферментному «сендвіч»-аналізі).....	29
Загальна інформація.....	29
Принцип методу	29
Комплектація набору	29

Необхідне обладнання	30
Процедура аналізу	30
Розділ 3 Результати та обговорення.....	31
3.1. Результати	31
3.1.1. Визначення експресії натуральних кілерів CD16+ у різних вікових групах пацієнтів на тлі різної стадії та поширеності аденокарциноми шлунку	31
3.1.2. Визначення IL-2 у різних вікових групах пацієнтів на тлі різної стадії та поширеності аденокарциноми шлунку	32
3.1.3 Обговорення результатів	33
3.1.4. Порівняння фенотипу та функцій CD16+ NK-клітин при COVID-19 і раку шлунка	36
3.1.5. Спільні механізми та потенційні терапевтичні цілі.....	39
Джерела.....	42

ВСТУП

З глобальним сплеском інфекцій COVID-19 значення NK-клітин у боротьбі з вірусною інфекцією стало бажаною темою. NK-клітини не потребують попередньої сенсibilізації антигенів, тому борються з вірусами на ранній стадії вродженої імунної реакції. Це досягається різноманітними ефекторними функціями, контрольованими динамічним балансом інгібуючих та активуючих рецепторів NK-клітин. NK-клітини мігрують до легенів у відповідь на підвищену експресію цитокінів з інфікованих COVID-19 легневих епітеліальних клітин, що призводить до лізису, опосередкованого інтерфероном гамма (IFN- γ), а також клітинно-опосередкованої антитілами цитотоксичності (ADCC) через S-білком, спричинене вбивство інфікованих вірусом клітин-хазяїна. [20]

NK-клітини — це перша «швидка лінія» протівірусного захисту. Вони розпізнають і знищують інфіковані клітини без попередньої сенсibilізації, а також координують інші ланки імунної системи через продукцію цитокінів. Серед них найважливішою у контексті COVID-19 виявилась зріла субпопуляція CD56^{dim} CD16⁺ NK-клітин. Саме ці клітини містять найбільші запаси перфорину й гранзимів, мають високу експресію Fc-рецептора CD16 (Fc γ RIIIa) та здійснюють антитілозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC).[1]

Клінічні прояви інфекції COVID-19 варіюються від легких (низька лихоманка/головні болі/міалгія/втрата нюху та смаку) до важких (пневмонія/гострий респіраторний дистрес-синдром (ARDS)/гостра травма нирок/диссемінована внутрішньосудинна коагуляція/дисфункція мультиорганів та смерть). Специфічні клінічні прояви COVID-19 обумовлені незбалансованою імунною відповіддю. [2,3]

Природні кілери (NK-клітини) - це лімфоцити вродженого імунітету, які відіграють вирішальну роль у боротьбі з вірусними збудниками. Вони здатні до швидкої ідентифікації та знищення вірус-інфікованих клітин.

Також NK-клітини наділені імунно-модулюючими функціями вродженими та адаптивними імунними реакціями через секрецію хемокінів/цитокінів та шляхом проведення синергетичних перехресних перешкод з іншими вродженими імунними клітинами, включаючи моноцити/макрофаги, дендритні клітини та нейтрофіли. [4]

Мета роботи

Комплексно охарактеризувати субпопуляцію CD56^{dim} CD16⁺ NK-клітин як головних ефektorів антитіло залежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності у трьох клініко-патологічних контекстах — гострий COVID-19, постковідний синдром і аденокарцинома шлунка — та встановити спільні й відмінні механізми їх виснаження, щоб обґрунтувати перспективні імунотерапевтичні цілі. Таким чином робота поєднує вірусологічний і онко-імунологічний блоки, спираючись на експериментальні дані з кількісного та функціонального аналізу CD16⁺ NK-клітин і сироваткового IL-2.

Завдання роботи:

1. Теоретичний

огляд

1.1. Систематизувати сучасні уявлення про біологічні особливості CD56^{dim} CD16⁺ NK-клітин і молекулярні рівні регуляції їх ADCC-активності.

1.2. Проаналізувати дані літератури щодо фенотипових і функціональних змін CD16⁺ NK-клітин під час гострої інфекції SARS-CoV-2 та у фазі Long COVID .

1.3. Зіставити механізми імунного виснаження CD16⁺ NK-клітин у COVID-19 з аналогічними процесами в мікрооточенні шлункової аденокарциноми.

2. Експериментальна

частина

2.1. Проаналізувати проточно-цитометричний аналіз частки CD3⁻CD56⁺CD16⁺ NK-клітин у периферичній крові 42 пацієнтів з аденокарциномою шлунка різних стадій та вікових груп і 25 здорових донорів.

2.2. Проаналізувати кількісну оцінку сироваткового рівень IL-2 за методом «сендвіч»-ІФА з використанням набору Human IL-2 ELISA Kit.

3. Статистичний

аналіз

3.1. Встановити кореляційні зв'язки між відсотком/абсолютною кількістю CD16⁺ NK-клітин, рівнем IL-2, віком пацієнтів та стадією пухлини.

3.2. Порівняти отримані онкологічні показники з опублікованими даними щодо динаміки CD16⁺ NK-клітин у гострому та затяжному COVID-19.

4. Порівняльне обговорення та інтеграція результатів

4.1. Виділити спільний «фенотип виснаження» CD16⁺ NK-клітин у вірусному та пухлинному середовищі.

4.2. Сформувати узагальнену модель патогенетичного внеску CD16⁺ НК-клітин у розвиток важкого перебігу COVID-19 та прогресування шлункової аденокарциноми.

5. Розглянути прикладні аспекти результатів роботи

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біологічні особливості CD16⁺ NK-клітин

Зрілі NK-клітини формуються у кістковому мозку, а фінальне «дозрівання» проходять у периферичних тканинах. Субпопуляція CD56^{dim} CD16⁺ становить приблизно 90 % циркулюючих NK-клітин. Висока експресія CD16 дозволяє їм зв'язувати Fc-фрагмент антитіл IgG, що опсонізують вірусні антигени на поверхні заражених клітин. Після такого зв'язування NK-клітина отримує потужний активаційний сигнал і вивільняє в синапсі перфорин та гранзими. Крім прямого лізису мішені, ці клітини секретують IFN- γ і TNF- α — цитокіни, які активують макрофаги та стимулюють диференціацію T-хелперів за типом Th1.

Цитотоксичність CD16⁺ NK-клітин регулюється балансом між активаційними (NKG2D, NKp30, DNAM-1) та інгібувальними (KIR, NKG2A) рецепторами: якщо сигнал активації переважає — відбувається дегрануляція, якщо ні — цільова клітина залишається неушкодженою.

Формування CD16⁺ NK-клітин:

1. **CD34⁺ ILC-попередники** у кістковому мозку;
2. **CD56^{bright} CD16⁻** у лімфатичних вузлах — головні продуценти IFN- γ ;
3. **CD56^{bright} CD16^{dim} → CD56^{dim} CD16⁺** — кінцева стадія з високим вмістом перфорину та KIR-рецепторів. Цей перехід супроводжується зниженням NKG2A і наростанням KIR, що «ліцензує» клітину до сильного цитолізу. [5]

1.1.1. Контроль активності CD16 NK-клітин

Продуктивність антитіло залежної цитотоксичності NK-клітин (ADCC) визначається не лише кількістю рецептора CD16 (Fc γ RIIIa), а й низкою пост-трансляційних і сигнальних механізмів, які обмежують або, навпаки, підсилюють його роботу. Нижче стисло викладено чотири основні рівні такої регуляції.

1. Швидке «скидання» CD16 після активації

Одразу після активації NK-клітини в плазматичній мембрані активується метало протеаза ADAM17. Вона розщеплює позаклітинне «стебло» CD16 у ділянці між Ala¹⁹⁵ та Val¹⁹⁶, унаслідок чого рецептор вивільняється у позаклітинний простір. Такий швидкий «скид» CD16

запускає негативний зворотний зв'язок: клітина вже здійснила первинний виплеск перфोरину й гранзимів, але припиняє повторне зв'язування клітин-мішеней, що знижує ризик неконтрольованого руйнування навколишніх тканин. [6]

2. Сигнальне гальмування через інгібувальні рецептори.

На поверхні NK-клітин експресуються молекули NKG2A/CD94, низка KIR (KIR2DL1–3) і TIGIT. Зв'язування цих рецепторів із власними молекулами головного комплексу гістосумісності класу I або з лігандом CD155 запускає фосфатазні каскади, які дефосфорилують ITAM-мотиви в адапторних білках CD3 ζ та Fc ϵ R1 γ . Унаслідок цього припиняється подальша мобілізація цитотоксичних гранул, навіть якщо CD16 уже взаємодіє з антитілами.

3. Метаболічний контроль цитотоксичності.

Ефективний сигнал від CD16 потребує високого темпу аеробного гліколізу. Цитокіни IL-15 та IL-12 перемикають NK-клітини на “високоенергетичний” метаболічний режим: посилюється поглинання глюкози, збільшується вміст АТФ і швидко доукомплектовуються цитотоксичні гранули.

Якщо цього метаболічного підживлення немає, запас енергії падає, і CD16 уже не може підтримувати ефективний лізис клітин-мішеней. Іншими словами, без додаткового глюкозного «пального» сила удару NK-клітини суттєво слабшає.

4. Структурна роль єдиної N-глікани в домені CD16.

У зовнішньому домені CD16 міститься лише один критичний сайт N-глікозилування — N162. Ця глікан стабілізує просторову конфігурацію рецептора і забезпечує високу афінність до Fc-фрагмента IgG. Видалення або заміна N162 зменшує міцність зв'язування антитіла та різко знижує ефективність ADCC. [7]

Сигнал від CD16 можна порівняти з педаллю газу: він запускає миттєвий цитотоксичний удар NK-клітини. Водночас система має кілька “гальм”. Така багаторівнева регуляція дозволяє NK-клітині діяти швидко й точно, але водночас запобігати надмірному пошкодженню власних тканин.

1.1.2. Варіації CD16⁺ NK-клітин

Під час тривалих вірусних інфекцій особливо множитья нетипова підгрупа NK-клітин, у якої відсутній маркер CD56, але зберігається CD16.

Ці клітини перемикають свою «генну програму», виробляють набагато менше гранзиму В і виділяють цитотоксичні гранули значно слабше, ніж звичайні зрілі НК. Фактично це «виснажена» форма НК-клітин, яка вже не здатна ефективно знищувати інфіковані клітини.[8]

Гіперактивні НК-клітини з «пам'яттю».

Коли зрілі CD16⁺ НК-клітини одночасно отримують сигнали від трьох цитокінів — IL-12, IL-15 і IL-18 — частина з них перебудовується: на поверхні з'являються маркери **NKG2C** і **CD57**. Такі клітини працюють інакше, ніж звичайні НК: вони набагато інтенсивніше виділяють **IFN- γ** і при цьому зберігають здатність убивати мішені упродовж щонайменше кількох тижнів. За ці властивості їх називають «адаптивними» або «**memory-like**» **НК-клітинами** — вони нагадують імунні клітини пам'яті, які швидко відповідають на знайомий подразник.

«Скидання» рецептора CD16 під час запалення.

У запальних умовах, коли в тканинах багато цитокінів **TNF- α** та **IL-6**, активується фермент **ADAM17**. Він відщеплює CD16 із поверхні НК-клітин (цей процес називають *shedding*). У результаті НК-клітина втрачає головний «гачок» для розпізнавання антитіл і її здатність до ADCC зменшується. З одного боку, це гальмує знищення мішеней; з іншого — запобігає надмірному пошкодженню здорових тканин під час сильного запалення. [9]

1.1.3. Зміни в субпопуляціях НК-клітин при COVID-19

Під час інфекції SARS-CoV-2 спостерігаються значні зміни в кількості та функціональності НК-клітин. Зокрема, відзначається зниження загальної кількості НК-клітин у периферичній крові, що корелює з тяжкістю захворювання. А саме, було продемонстровано, що кількість НК-клітин, а також кількість Т-клітин відновлюється на пізніх стадіях захворювання, тоді як пацієнти зі смертельним перебігом захворювання демонструють поступову втрату НК-клітин після появи симптомів. [10, 11, 12]

Дослідження продемонстрували, що кількість НК-клітин у госпіталізованих пацієнтів безпосередньо пов'язана зі швидкістю зниження вірусного навантаження. Зокрема, пацієнти з "нормальною" (> 40 клітин/мкл) кількістю НК-клітин демонструють швидше зниження вірусного навантаження порівняно з тими, хто має "низьку" (\leq 40 клітин/мкл) кількість НК-клітин, незалежно від клінічного статусу. [13]

Також у пацієнтів з COVID-19 виявлено зниження експресії CD16 на НК-клітинах, що може бути пов'язано з їхньою активацією та подальшою

втратаю рецептора через взаємодію з антитілами. Це зниження потенційно обмежує здатність НК-клітин до здійснення антитілозалежної клітинно-опосередкована цитотоксичності. [14]

1.1.4. Механізми цитотоксичності НК-клітин при COVID-19

НК-клітини реалізують свою цитотоксичну функцію через два основні механізми:

- **Гранульозалежна цитотоксичність:** вивільнення перфोरину та гранзимів, що призводить до апоптозу цільових клітин.
- **Антитілозалежна клітинно-опосередкована цитотоксичність:** зв'язування CD16 з Fc-фрагментами антитіл, що покривають інфіковані клітини, активує НК-клітини до знищення цих клітин.

При COVID-19 спостерігається порушення цих механізмів, зокрема через зниження експресії активаторних рецепторів та підвищення експресії інгібувальних рецепторів, таких як NKG2A. [15]

1.1.5. Вплив COVID-19 на функціональність НК-клітин

У пацієнтів з тяжким перебігом COVID-19 виявлено "виснаження" НК-клітин, що характеризується зниженням їхньої цитотоксичної активності та підвищенням експресії інгібувальних рецепторів. Це може сприяти недостатній елімінації вірус-інфікованих клітин та посиленню запального процесу. [16]

1.1.6. Терапевтичні перспективи

Розуміння ролі CD16⁺ НК-клітин у патогенезі COVID-19 відкриває більше можливостей для розробки нових терапевтичних стратегій. Для лікування вірусних захворювань. Одна з них це **блокада інгібувальних "чек-пойнтів"** (NKG2A). При тяжкому COVID-19 на НК-клітинах підвищується експресія рецептора NKG2A, який, зв'язуючись з HLA-E на здорових клітинах і надсилає потужний інгібувальний сигнал. Усе це призводить до "гальмування" цитотоксичної активності CD16⁺ НК, навіть якщо вони вже активовані. При лікуванні використовують моналізумаб — моноклональне антитіло проти NKG2A. Воно блокує зв'язування NKG2A з HLA-E, відновлюючи дегрануляцію НК (маркер CD107a⁺) та виділення перфोरину та гранзимів. [17] **Переливання алогенних НК-клітин** - це метод що відновлення кількості НК-клітин завдяки використанню донорських клітин. Цей метод базується на, тому що у тяжких пацієнтів власні НК-клітини виснажені або їх абсолютна кількість знижена, тому потрібна швидка заміна "втраченого" пулу цитотоксичних клітин.

Терапевтично цей метод складається з таких дій:

- **Збір** НК-клітин від здорового донора.
- *In vitro* **активація** цитокінами (IL-15, IL-2) для підвищення здатності до лізису.
- **Інфузія** пацієнтові з COVID-19, що забезпечує миттєве посилення протівірусної цитотоксичності. [18]

CAR-NK-терапія (хімерні антиген-рецептори) - це метод, що використовується для підвищення специфічності НК-клітин. CAR-NK поєднують специфічність антитіла з потужністю НК-цитотоксичності.

Терапевтичні кроки методу:

1. За допомогою генної інженерії створюють **CAR**, чутливий до RBD (Receptor-Binding Domain) спайк-білка SARS-CoV-2 (наприклад, фрагмент антитіла S309).
2. Переносять цей CAR у клітинну лінію НК (наприклад, NK-92) або в аутологічні НК-клітини пацієнта.
3. CAR-NK-клітини точно розпізнають та знищують інфіковані спайк-позитивні клітини, викидаючи перфорин і гранзими. [19]

Кожен із цих підходів має результати в докліничних та ранніх клінічних випробуваннях і надає більше відповідей до НК-відповіді в пацієнтів із COVID-19.

1.2.Сигнальні шляхи активації та інгібування при аденокарциномі шлунка

Аденокарцинома шлунка є одним із провідних онкологічних захворювань за рівнем смертності. Попри прогрес у хірургічному та медикаментозному лікуванні, прогноз для пацієнтів із поширеним раком шлунка залишається несприятливим. Імунна система відіграє важливу роль в патогенезі раку шлунка, розуміння цих процесів надає перспективні можливості терапевтичного втручання в імунні сигнальні шляхи пухлини.

Відомо, що як компоненти вродженого імунітету (наприклад, натуральні кілери, моноцити), так і адаптивного імунітету (Т-лімфоцити, антитіла) можуть вибірково розпізнавати та знищувати пухлинні клітини.[23] Водночас, пухлини виробили механізми уникнення імунного нагляду, активуючи сигнальні шляхи інгібування імунної відповіді. Отже, детальне розуміння шляхів активації та пригнічення імунітету при раку шлунка є ключовим для розробки нових методів лікування.

1.2.1.Натуральні кілери (NK-клітини) при раку шлунка

NK-клітини – це цитотоксичні лімфоцити вродженого імунітету, здатні розпізнавати та знищувати пухлинні клітини без попередньої сенсibilізації. Вони відіграють роль «першої лінії» протипухлинного захисту, безпосередньо лікуючи клітини-мішені за допомогою перфоринів і гранзимів, а також продукуючи цитокіни для активації інших ланок імунітету. У здорових умовах баланс між активаторними та інгібіторними рецепторами NK-клітин визначає їх активність: відсутність HLA I на клітинах-мішенях або експресія стресових лігандів на трансформованих клітинах запускає активацію NK, тоді як взаємодія інгібіторних рецепторів NK із нормальними молекулами головного комплексу гістосумісності I блокує їх цитотоксичність.

При раку шлунка спостерігається ослаблення протипухлинної активності NK-клітин. Дослідження відзначають, що в тканині пухлини їх інфільтрація є мізерною, а функціональний стан – пригніченим. Зокрема, у пацієнтів зі шлунковим раком знайдено знижений рівень експресії активаторних рецепторів NK (наприклад, NKG2D) та виснаження цитотоксичного потенціалу NK-клітин. Пухлинні клітини можуть уникати розпізнавання NK, підвищуючи експресію лігандів для інгібіторних рецепторів (наприклад, HLA-E для рецептора NKG2A) або шляхом вивільнення стрес-лігандів, таких як MICA/B, що відтягують увагу NK від пухлин. Окрім того, солідні пухлини, в тому числі й аденокарцинома шлунка, продукують імунодепресивні фактори (IL-10, TGF- β та ін.) та залучають регуляторні клітини, які загалом послаблюють функцію NK у мікрооточенні пухлини. [23]

Попри ці механізми пригнічення, роль NK-клітин у контролі прогресії пухлини є значною: вища щільність інфільтрації NK-клітин в пухлинну тканину асоціюється з кращим прогнозом у деяких хворих на рак шлунка. Стратегія посилення активності NK-клітин вважається перспективною в імунотерапії. Різні підходи вже досліджуються: *ex vivo* активація та розширення NK-клітин з наступним реінфузуванням пацієнтові, блокування контрольних точок, що гальмують NK (наприклад, антитіла до рецептора NKG2A або TIGIT), а також застосування цитокінів, які підвищують цитотоксичність NK.

Зокрема, додавання стимулювальних цитокінів, таких як ІЛ-2 або ІЛ-15, здатне відновити функцію виснажених НК-клітин. *Ex vivo* обробка НК-клітин пацієнтів з раком шлунка інтерлейкіном-2 відновлює їх здатність до антитіло-залежної клітинної цитотоксичності (ADCC) проти пухлинних клітин. Інший цитокін, ІЛ-15, сприяє дозріванню та підтримці НК-клітин. Під час клітинних досліджень зафіксоване, що введення ІЛ-15 пацієнтам із колоректальним раком призвело до активації інфільтрованих НК у метастазах в печінці. Таким чином, активація НК-клітин – через цитокінотерапію чи інші методи – розглядається як ключовий напрям покращення імунного нагляду при аденокарциномі шлунка. [23]

1.2.2. CD16 клітини та антитіло-залежна цитотоксичність

У контексті онкологічних захворювань наявність CD16 визначає здатність імунних клітин реалізувати антитіло-опосередковану клітинну цитотоксичність (ADCC): зв'язування CD16 із комплексом «антитіло-пухлинний антиген» на поверхні мішені запускає активацію ефекторної клітини та лізис пухлинної клітини. У терапії раку шлунка цей механізм має важливе значення, особливо при використанні терапевтичних моноклональних антитіл.

У пацієнтів зі шлунковим раком відзначаються функціональні порушення CD16 ефекторних клітин. Як згадувалося, НК-клітини з пухлинного мікрооточення можуть втрачати експресію CD16 або функціонально інактивуватися внаслідок хронічної стимуляції. Дослідження показали, що додаткове стимулювання таких клітин ІЛ-2 *ex vivo* здатне підвищити експресію CD16 та відновити ADCC-активність проти пухлин. Іншим напрямом підвищення ефективності ADCC є розробка бі- та триспецифічних іммуноспрямовуючих молекул. Так звані BiKE (bispecific killer engager) та TriKE (trispesific killer engager) – це конструкції, що містять фрагмент антитіла до CD16 та до одного або двох пухлинних антигенів відповідно. Вони служать «мостом» між НК-клітиною і пухлинною клітиною, зближуючи їх і підсилюючи утворення імуногенних синапсів. Наприклад, продемонстровано, що BiKE, націлений одночасно на CD16 і антиген EpCAM, підсилює зв'язування НК із пухлинними клітинами епітеліального раку і збільшує їх цитотоксичність. Подібні інженерні молекули суттєво підвищують здатність НК-клітин здійснювати ADCC і розглядаються як перспективний інструмент імунотерапії. [23]

Окрім NK-клітин, рецептор CD16 експресується на невеликій популяції циркуляційних моноцитів (так звані CD14, CD16 – проміжні та неklasичні моноцити). У хворих на рак шлунка часто спостерігається збільшення частки саме CD16 моноцитів у периферичній крові, що корелює із пізніми стадіями захворювання та більшим об'ємом пухлини за даними окремих досліджень. Ці проміжні моноцити мають прозапальний фенотип і здатні диференціюватися у пухлино-асоційовані макрофаги. Останні, як правило, набувають альтернативної M2-поляризації в пухлинному осередку та сприяють імуносупресії. Висока щільність M2-орієнтованих макрофагів у мікрооточенні шлункової аденокарциноми асоціюється з гіршим прогнозом. [24] Таким чином, популяція CD16 моноцитів/макрофагів може робити внесок у прогресію пухлини, продукуючи імунодепресивні цитокіни (наприклад, IL-10) і фактори ангиогенезу. Це робить їх потенційною мішенню для терапії – наприклад, шляхом блокування залучення моноцитів у пухлину або перепрограмування їх у протипухлинний фенотип.

1.2.3. Інтерлейкін-2 (ІЛ-2) та активація імунної відповіді

Інтерлейкін-2 – ключовий цитокін адаптивного імунітету, ІЛ-2 стимулює клональне розростання цитотоксичних Т-лімфоцитів (CTL) і підвищує цитотоксичність NK-клітин, тим самим посилюючи імунний нагляд за пухлинними клітинами. [25] Завдяки цим властивостям ІЛ-2 став одним із перших цитокінів, випробуваних у протираковій імунотерапії. У 1990-х роках високодозові курси ІЛ-2 показали можливість довготривалої регресії пухлини в окремих пацієнтів із меланою та раком нирки, що надихнуло на дослідження його ефективності й при інших солідних пухлинах, зокрема раку шлунка. Деякі клінічні спостереження за участі хворих на метастатичний рак шлунка відзначали регресію пухлинних вогнищ під час терапії ІЛ-2. [25] Утім, широке застосування інтерлейкіну-2 обмежене його значною токсичністю. Системне введення високих доз ІЛ-2 спричиняє важкі побічні ефекти – синдром капілярного витоку, гіпотензію, органну дисфункцію – внаслідок плейотропної дії цього цитокіну на імунну систему. [25]

Зараз дослідницькі тенденції щодо ІЛ-2 спрямовані на створення модифікованих варіантів ІЛ-2 з покращеним профілем безпеки. Розроблено кілька інженерних аналогів ІЛ-2, що вибірково стимулюють ефекторні Т- та NK-клітини, але менше зв'язуються з рецепторами на регуляторних Т-лімфоцитах. Зниження афінності до α -ланки рецептора ІЛ-2 (CD25), яку

надмірно експресують регуляторні Т-лімфоцити, дозволяє таким аналогам ІЛ-2 посилювати протипухлинний імунітет, не викликаючи при цьому надмірної активації імунорегуляторних механізмів. Крім того, впроваджуються методи доставки ІЛ-2 безпосередньо в пухлину або поруч із нею (локальні ін'єкції, кон'югати «цитокін+антитіло», наночастинки), що покликано підвищити концентрацію цитокіну в мікрооточенні пухлини та зменшити системні побічні ефекти. [25] Низка досліджень також вивчає схеми комбінованої терапії з ІЛ-2: з інгібіторами контрольних точок, вакцинами чи хімієтерапією – з метою досягти синергійного протипухлинного ефекту. Варто зазначити, що сам по собі ІЛ-2 при різних дозах може спричиняти протилежні імунні наслідки. Високі дози, як згадано, активують ефекторні клітини, тоді як дуже низькі дози ІЛ-2, навпаки, селективно підтримують виживання регуляторних Т-лімфоцитів, що також застосовуються при лікуванні деяких аутоімунних захворювань.

Під час лікування раку шлунка метою є максимізувати стимуляцію CTL/NK і мінімізувати активацію регуляторних Т-лімфоцитів.

Інтерлейкін-2 залишається одним з наріжних імуномодуляторів, і нові підходи до його використання можуть суттєво посилити протипухлинну імунну відповідь при аденокарциномі шлунка.

1.2.4. Інші імунні фактори в мікрооточенні шлункової аденокарциноми

Моноцити та похідні від них макрофаги є ключовими клітинами вродженого імунітету, що здійснюють фагоцитоз, презентацію антигену та регуляцію запалення через продукцію цитокінів. При злоякісних пухлинах шлунка моноцити/макрофаги інфільтрують пухлинну стромалу і можуть поляризуватися у два умовні напрямки: класично активовані M1 (протипухлинні, прозапальні) або альтернативно активовані M2 (протизапальні, такі, що сприяють загоєнню тканин). M1-макрофаги продукують цитокіни, як-от IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, та реактивні форми кисню, що підтримують запалення і здатні знищувати пухлинні клітини; M2 ж секретують протизапальні фактори (IL-10, TGF- β) і фактори росту, сприяючи тканинній регенерації, неоангіогенезу та, на жаль, прогресії пухлини. У мікрооточенні аденокарцином шлунка переважають саме TAM (tumor-associated macrophages) M2-фенотипу, які створюють імунно-супресивне середовище та асоціюються з гіршим перебігом хвороби.[26]

Цитокіновий профіль пухлинного мікрооточення значною мірою визначає, чи буде імунна система стримувати ріст пухлини, чи сприятиме

його прогресії. При раку шлунка виявляють дисбаланс на користь прозапальних, але водночас про-пухлинних цитокінів та імунодепресивних факторів, тоді як рівень протипухлинних інтерлейкінів знижений. Основні з них:

- **ІЛ-6**

Інтерлейкін-6 – ключовий прозапальний цитокін, який продукують пухлинні клітини, фібробласти та імунні клітини (макрофаги, нейтрофіли) у мікрооточенні. У шлунковій аденокарциномі ІЛ-6 відіграє двояку роль. З одного боку, він підтримує хронічне запалення, яке може пошкоджувати тканини та сприяти пухлинному росту. З іншого – ІЛ-6 безпосередньо стимулює пухлинні клітини через активацію шляху JAK2/STAT3: зв'язування ІЛ-6 з рецептором на гастринних клітинах активує транскрипційний фактор STAT3, що призводить до підвищення проліферації, інвазивності та резистентності до апоптозу пухлинних клітин. [25] У клінічних спостереженнях високий рівень ІЛ-6 у сироватці та підвищена експресія ІЛ-6 у пухлинній тканині корелюють із гіршим прогнозом і швидшим прогресуванням раку шлунка. Значна частина ІЛ-6 у пухлині може продукуватися не стільки самими раковими клітинами, скільки асоційованими фібробластами та макрофагами. Наприклад, в пухлинній стромі часто виявляють велику кількість активованих раково-асоційованих фібробластів (CAF), які експресують α -SMA; дослідження показали, що CAF продукують ІЛ-6, стимулюючи цим інвазію ракових клітин в очеревину та формування метастазів у черевній порожнині. Блокування шляху ІЛ-6/STAT3 розглядається як перспективна терапевтична тактика. У доклінічному експерименті на моделі перитонеальних метастазів шлункового раку введення антитіла проти рецептора ІЛ-6 (anti-IL-6R) істотно уповільнило ріст метастатичних вузлів. [27] Моноклональні антитіла до ІЛ-6 та ІЛ-6R вивчаються в комбінації з хіміотерапією для пацієнтів із плевральним та перитонеальним карциноматозом.

- **ІЛ-1 β .**

Інтерлейкін-1 β – ще один прозапальний цитокін, що продукується активованими макрофагами та нейтрофілами. Він сприяє розвитку гастрального раку на етапі хронічного атрофічного гастриту: поліморфізми гена ІЛ1B, пов'язані з гіперсекрецією цього цитокіну, асоціюються з підвищеним ризиком раку шлунка при H. pylori-інфекції. ІЛ-1 β підсилює секрецію шлункового соку, пошкодження епітелію та стимулює ангиогенез.

У пухлинному середовищі він може посилювати інвазію, підвищуючи активність матриксних металопротеїназ. Блокування ІЛ-1 – потенційний спосіб зменшити запалення. [28]

- **ІЛ-8 (CXCL8).**

ІЛ-8 – хемокін, який залучає нейтрофіли та інші мієлоїдні клітини до вогнища запалення. Багато солідних пухлин, в тому числі шлункові, характеризуються високою продукцією ІЛ-8. Він стимулює ангиогенез (через залучення ендотеліальних клітин і індукцію секретованих глікопротеїнів роду судинних ендотеліальних факторів росту) та хемотаксис нейтрофілів і мієлоїдні супресорні клітини у пухлину, що сприяє імунному уникненню. Підвищений рівень ІЛ-8 у крові хворих на рак шлунка асоціюється з наявністю віддалених метастазів та резистентністю до хіміотерапії. В експериментах блокування осі CXCL8-CXCR2 (рецептор до ІЛ-8) покращувало проникнення CD8 Т-лімфоцитів у пухлину і пригнічувало ріст гастрального раку. Таким чином, ІЛ-8 є важливою мішенню для протипухлинної терапії, особливо в аспекті покращення проникності пухлини для ефektorних імунних клітин. [29, 30]

- **ІЛ-10.**

Інтерлейкін-10 – головний імунно-супресивний цитокин, присутній у мікрооточенні багатьох пухлин. Його основні продуценти – M2-орієнтовані макрофаги, регуляторні Т-лімфоцити та деякі пухлинні клітини. ІЛ-10 гальмує функції антиген-презентуючих клітин: знижує експресію молекул МНС II та ко-стимулюючих лігандів на дендритних клітинах, пригнічує продукцію ІЛ-12 та інших прозапальних цитокінів макрофагами. Внаслідок цього імунна система «толерує» присутність пухлини. У пацієнтів із раком шлунка виявляється підвищений рівень ІЛ-10 у сироватці, а також високий вміст ІЛ-10 клітин у пухлинній тканині; такі показники корелюють із гіршим прогнозом хвороби. ІЛ-10 також сприяє диференціюванню CD4 Т-лімфоцитів у індукованих регуляторних Т-клітинах та підтримує виживання останніх, що додатково пригнічує протипухлинний імунітет. Через сильний гальмівний вплив ІЛ-10 на імунну систему розглядаються підходи до його нейтралізації – наприклад, антитіла до ІЛ-10 або до його рецептора. Також існує і протилежний підхід: високі дози ІЛ-10 (особливо у вигляді модифікованих варіантів, наприклад, PEG-IL-10) можуть стимулювати CD8 Т-клітини та посилювати протипухлинну відповідь, що досліджується у клінічних випробуваннях для ряду солідних пухлин. Однак при раку шлунка

подібна стратегія ще не перевірена, і основна увага приділяється саме зниженню імунопригнічувального впливу IL-10. [25]

- **TGF- β .**

Трансформаційний фактор росту бета (TGF- β) – потужний медіатор імуносупресії та ремоделювання тканин. У нормі TGF- β контролює запальні реакції та сприяє загоєнню, проте пухлини часто використовують його на свою користь. В аденокарциномі шлунка TGF- β сприяє епітеліально-мезенхімальному переходу (EMT) пухлинних клітин, надаючи їм інвазивних властивостей. Також TGF- β пригнічує проліферацію і функцію ефекторних Т-лімфоцитів і NK-клітин, знижуючи цитотоксичність останніх. Висока експресія TGF- β в пухлині асоціюється з глибокою інвазією стінки шлунка, метастазуванням у лімфовузли та віддалені органи. У зв'язку з цим інгібітори шляху TGF- β (нейтралізуючі антитіла, малі молекули, що перешкоджають зв'язанню ліганду з рецептором) розглядаються як потенційні препарати для відновлення протипухлинного імунітету. Деякі з них вже проходять ранні фази випробувань у комбінації з інгібіторами PD-1/PD-L1, демонструючи покращення відповіді у пацієнтів із солідними пухлинами, у якій немає або майже немає активних Т-лімфоцитів усередині пухлинного осередку. [25]

- **Інтерлейкіни Т-хелперів 1-го типу IL-12 та IL-18.**

Інтерлейкін-12 є ключовим цитокіном, що запускає клітинну імунну відповідь проти пухлини. Він секретується дендритними клітинами та M1-макрофагами, стимулюючи диференціацію CD4 Т-клітин у Т-хелпери 1-го типу та підвищуючи продукцію IFN- γ . В умовах раку шлунка IL-12 може посилювати активність NK- та Т-кіллерів щодо пухлинних клітин, особливо тих, які мають низьку експресію щодо головного комплексу гістосумісності класу I. Через це вони погані мішені для Т-клітин, зате хорошими для NK-клітин.. Комбіноване введення IL-12 та IL-18 в експериментальних моделях привело до значного сповільнення росту пухлин, що, ймовірно, опосередковано саме активацією NK-клітин.[23]

Системне застосування рекомбінантного IL-12 в клінічних умовах супроводжувалося значною токсичністю. Сучасні дослідження зосереджені на локальному доставлянні генів IL-12 (наприклад, за допомогою вірусних векторів) та на поєднанні низьких доз IL-12 з іншими терапіями, щоб безпечно підвищити її протипухлинний ефект. [23]

Інтерлейкін-18 – цитокін, тісно пов'язаний з ІЛ-12 за функцією, часто виділяється спільно з ним і підсилює продукцію IFN- γ Th1- і NK-клітинами. ІЛ-18 також може стимулювати реакції вродженого імунітету, залучаючи моноцити та нейтрофіли. У певних моделях раку шлунка ІЛ-18 у поєднанні з ІЛ-12 демонстрував синергію в індукції потужної протипухлинної відповіді. Однак, як і у випадку з ІЛ-12, клінічне застосування ІЛ-18 поки обмежене через системні ефекти (лихоманка, гіпотензія тощо). Триває пошук оптимальних схем використання цього цитокіну, можливо, у складі вакцин або клітинних терапій. [23]

- **ІЛ-15.**

Інтерлейкін-15 - це цитокін, що забезпечує розвиток і виживання NK-клітин та пам'яті CD8⁺ Т-кіллерів. ІЛ-15 має схожість з ІЛ-2 за функціями, проте не взаємодіє з α -ланцюгом CD25 і не стимулює регуляторні Т-лімфоцити тою ж мірою, що ІЛ-2. Це робить ІЛ-15 привабливим кандидатом для імунотерапії. У модельних дослідженнях додавання ІЛ-15 до культури NK-клітин посилювало їх цитотоксичність проти пухлинних клітин шлунка. [23]

На основі ІЛ-15 створено суперагоніст ALT-803 (накопичувальний комплекс ІЛ-15 з частково аналогічною дією), який вже випробовується у клінічних дослідженнях. ALT-803 показав здатність значно розширювати популяцію NK-клітин і CD8⁺ Т-клітин у хворих з солідними пухлинами та покращувати протипухлинну активність останніх. В ранніх клінічних випробуваннях ALT-803 у комбінації з низькими дозами хіміотерапії продемонстрував безпечність і ознаки ефективності в пацієнтів із метастатичним раком підшлункової залози. Наразі вивчається можливість застосування ІЛ-15 суперагоністів і при раку шлунка, зокрема, для посилення дії протипухлинних вакцин або в післяопераційній ад'ювантній терапії з метою ерадикації мінімальної залишкової хвороби. [23]

Підсумовуючи, мікрооточення аденокарциноми шлунка характеризується підвищеним рівнем пропухлинних цитокінів (ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10, TGF- β тощо) і недостатньою активністю протипухлинних (ІЛ-2, ІЛ-12, IFN- γ). Це зрушує рівновагу в бік імунної толерантності пухлини. Корекція цього дисбалансу – одна з головних цілей нових терапевтичних підходів. Блокування таких цитокінів, як ІЛ-6, ІЛ-10 або TGF- β , може посилити протипухлинний імунітет, особливо у поєднанні з іншими імунотерапевтичними методами. Натомість додавання позитивних

медіаторів (IL-2, IL-15, IL-12) здатне «перезавантажити» імунну відповідь, якщо його проводити контрольовано і локалізовано, уникнувши системного «цитокінового шторму». Саме комбінація заходів – нейтралізація імунних гальм та активація ефекторів – розглядається зараз як найперспективніший підхід для лікування раку шлунка. [25]

1.2.5. Сучасні експериментальні та клінічні підходи

1. Цитокін-терапія.

Класичний приклад – використання високих доз ІЛ-2 – поступається місцем новим, більш безпечним методикам. У клінічні дослідження впроваджуються інженерні варіанти ІЛ-2 (наприклад, молекули зі зміненими сайтом зв'язування з рецептором), що мають на меті вибірково стимулювати Т-кілери та НК-клітини при мінімізації активації регуляторні Т-лімфоцити. [25] Терапія на основі **ІЛ-15**. Як було вище зазначено, суперагоніст ІЛ-15 (ALT-803) вже дійшов до клінічного застосування. У комбінації з ниволумабом.

Ниволумаб (комерційна назва тіло класу IgG4, яке блокує рецептор PD-1 на поверхні Т-лімфоцитів. ALT-803 досліджується у пацієнтів з метастатичними солідними пухлинами, в тому числі гастроінтестинальними – метою є підвищити активність НК- та Т-клітин, подолавши виснаження. Ряд досліджень також розглядають можливість локального введення ІЛ-15 у зону пухлини або регіонарно (наприклад, в черевну порожнину при карциноматозі), щоб підсилити імунний нагляд саме там, де є метастатичні осередки. [23]

Окрім стимуляції імунітету цитокінами, актуальним є і блокування ключових імунодепресивних цитокінів. Зокрема, продовжуються спроби фармакологічно нейтралізувати ІЛ-6. Моноклональне антитіло до рецептора ІЛ-6 вже застосовується при запальних захворюваннях, а тепер перевіряється у складі комплексної терапії для пацієнтів з раком шлунка з поширеними метастазами о черевині. [27]

Інгібування ІЛ-6 може зменшити злякисне накопичення ексудативної рідини в порожнині очеревини та пригальмувати метастазування. Також, проводяться дослідження з блокади TGF- β у солідних пухлинах: спеціальні молекули (рекомбінантні білкові «пастки») або антитіла до TGF- β поєднуються з блокаторами імунних «гальмівних» рецепторів, щоб активувати імунну відповідь у пацієнтів з так званими пухлинами з низькою імунною інфільтрацією. Хоча при раку шлунка поки

що немає зареєстрованих препаратів проти IL-10 чи TGF- β , результати таких підходів в суміжних показаннях (наприклад, колоректальний рак) демонструють певне покращення контрольованості хвороби. Для оптимізації цитокінової терапії, вона повинна бути комбінованою – тобто одночасно усувати гальмівні сигнали та додавати стимулюючі. [25]

2. Адаптивна клітинна терапія НК-клітинами.

Для адаптивної клітинної терапії НК-клітинами виділяють з периферичної крові пацієнта аутологічні НК-клітини, їх ex-vivo активують за допомогою цитокінів, таких як IL-2 або IL-15, та розмножують до необхідного числа клітин для внутрішньовенного введення хворому.

Пілотні клінічні дослідження, проведені в Китаї й Японії, продемонстрували безпечність багаторазових інфузій аутологічних НК-клітин, а в окремих пацієнтів із метастатичним раком шлунка спостерігалася часткова регресія метастазів, особливо при їх поєднанні з хімієтерапією.

У доклінічних моделях було показано, що комбіноване застосування розширених НК-клітин та блокаторів PD-1 забезпечує вираженіший антипухлинний ефект порівняно з монотерапією. Наразі тривають клінічні дослідження, в яких IL-2-активовані НК-клітини вводять разом з анти-PD-1 антитілами пацієнтам із плевральним карциноматозом, а також застосовують НК-клітини в комбінації з супер-агонистом IL-15 ALT-803 для лікування метастатичних уражень печінки. [31]

3. Моноклональні антитіла та стимулювання ADCC.

Застосування таргетних моноклональних антитіл при раку шлунка частково реалізує ефект через Fc-рецепторні механізми. Тому поєднання антитіл з методами посилення антитіло-залежного клітинного цитотоксичного механізму є логічним кроком. Один із підходів – одночасне введення пацієнту інтерферону альфа або IL-2 разом із таргетним антитілом, що має підвищити чутливість ефекторних клітин до сигналів через CD16. [23]

4. Модуляція моноцитів/макрофагів

Моноцити, які потрапляють у пухлинне середовище, зазнають перетворення в пухлино-асоційовані макрофаги, що переважно підтримують ріст і поширення ракових клітин та пригнічують імунітет. Щоб зменшити їхню кількість, було спробовано, перервати сигналізацію хемокіну CCL2, який служить «маячком» для моноцитів, але в клініці

антитіло проти CCL2 не дало помітного ефекту у хворих із метастатичним раком, включаючи рак шлунка. Тому зараз вважають, що слід працювати над двома напрямками водночас: не лише зупиняти притік нових моноцитів, а й змінювати вже існуючі макрофаги з про-пухлинного стану (M2-подібного) на протипухлинний (M1-подібний). У доклінічних моделях показано, що агоністи Toll-подібних рецепторів TLR7/8 чи TLR9 можуть зменшити поляризацію в пухлино-асоційовані макрофаги, підвищити їхню здатність презентувати антигени й виробляти протизапальні цитокіни (наприклад, IL-12). Схожий синергетичний ефект досягається, коли агоніст рецептора CD40 поєднують з TLR9-модулюючим агентом: це призводить до масивної активації макрофагів і дендритних клітин, які навіть без участі Т-лімфоцитів уповільнюють ріст пухлини в експериментальних моделях. [24]

5. Інгібітори контрольних точок та комбіновані режими.

Запровадження моноклональних антитіл, спрямованих на блокаду імунних «контрольних точок» — рецепторів PD-1 (programmed cell death protein 1), ліганда PD-L1 (programmed death-ligand 1) та білка CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) — стало справжнім проривом у лікуванні поширеного раку шлунка. Наразі два препарати — пембролізумаб і ниволумаб, обидва проти PD-1 — офіційно схвалені для пацієнтів із пухлинами, які експресують PD-L1 або мають високий рівень мікросателітної нестабільності (MSI-High). Мікросателітна нестабільність (MSI, від англ. microsatellite instability) — це феномен, при якому в клітинах пухлини накопичуються мутації в коротких тандемних повторних ділянках ДНК через дефект системи виправлення невідповідностей у процесі реплікації. [31]

Однак при монотерапії лише частина хворих отримує тривалий клінічний ефект, тож сьогодні активно досліджують поєднання інгібіторів контрольних точок із додатковими стимулами імунітету. [31]

Ідея таких комбінованих схем полягає в тому, щоб одночасно «зняти гальма» з Т-лімфоцитів і НК-клітин та активувати за допомогою цитокінів або інших імуностимулюючих агентів. У доклінічних моделях раку шлунка показано, що введення НК-клітин, попередньо активованих інтерлейкіном 2, у комбінації з анти-PD-1-антитілом уповільнює ріст пухлини значно краще, ніж кожне втручання окремо. Схожий синергізм спостерігають і при поєднанні агоніста Toll-подібного рецептора 9 (TLR9) із блокадою PD-1 або CTLA-4: це призводить до значного підсилення Т-лімфоцитної відповіді та

навіть повної елімінації пухлини в частини експериментальних тварин. [31, 24]

Поряд із комбінованою імунотерапією триває інтеграція цих підходів з класичною хімієтерапією та таргетними сполуками. Платиновмісні засоби та фторпіримідини (протипухлинні препарати-антиметаболіти, структурних аналогів природних піримідинових основ ДНК (тиміну й урацилу), у яких один із воднів заміщений атомом фтору) самі по собі мають імуностимулюючу дію, частково знижуючи кількість імунних супресорів у пухлинному мікрооточенні. [23]

Проведення курсів хімієтерапії безпосередньо перед інфузією CAR-NK-клітин (клітин із химерними антигенними рецепторами) або перед вакцинацією демонструє підвищену ефективність внаслідок тимчасового ослаблення імунних бар'єрів. Додатковим кроком є використання біомаркерів — наприклад, високий рівень макрофагів фенотипу M2 або мієлоїдних пригнічувальних клітин (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) у крові пацієнта може сигналізувати про необхідність додати до протоколу інгібітор рецептора фактора колонієутворення 1 (CSF-1R) для селективного виснаження макрофагів. [23].

РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ

2.1. Визначення наявності поверхневих антигенів імунокомпетентних клітин методом непрямой імуофлуоресценції з використанням моноклональних антитіл

Принцип методу

Специфічні моноклональні антитіла (МкАТ), мічені флуоресцеїнізотіоціанатом (FITC) зв'язуються з відповідним поверхневим антигеном клітини через вторинне антитіло, не безпосередньо. МкАТ є унікальним інструментом для дослідження передавання сигналів, ініційованих через клітинні рецептори різних типів імунокомпетентних клітин.

Реактиви

- **Набір МкАТ: CD16.**
- **Забуферений фізіологічний розчин (ЗФР, рН = 7,4):** 8,7 г NaCl; 0,68 г Na₂HPO₄; 0,15 г KH₂PO₄, довести об'єм до 1000 мл дистильованою водою.
- **Розчин полі-L-лизину:** 100 мкг/мл у ЗФР.
- **FITC-кон'юговані козячі (або кролячі) антитіла до мишачих імуноглобулінів.**
- **3,7 % розчин параформальдегіду на ЗФР** (3,7 г сухої речовини розчинити при нагріванні, але не >70 °C, у 100 мл ЗФР).
- **50 % гліцерин на 3,7 % розчині параформальдегіду.**
- Парафін, іммерсійне масло.

Обладнання

- Флуоресцентний мікроскоп Olympus BX-53.
- Термостат ТС-80-М2 (t = +37 °C).
- Холодильник (t = +4 °C).
- Центрифуги ОПН-3 або ОС-6М з горизонтальним ротором.
- Автоматичні дозатори, процедурний таймер.

Додаткові матеріали

Предметні та покривні скельця, наконечники для дозаторів, парафінова стрічка Parafilm M, пробійник Ø 5 мм, тощо.

Зразки

7–8 мл венозної крові з ліктьової вени у пробірку з гепарином (10 ОД/мл крові).

Виділення лімфоцитів

1. Кров розвести ЗФР 1:1.
2. Нашарувати 2 мл суміші Фікол-Верографін ($\rho = 1,077$).
3. Центрифугувати 25 хв, 1500 об/хв.
4. «Лімфоцитарне кільце» зібрати пастерівською піпеткою.
5. Промити двічі ЗФР (6–7 мл), знову центрифугувати 10 хв, 1000–1500 об/хв.
6. Після останнього промивання отримати суспензію 2×10^6 клітин/мл; життєздатність ≥ 95 %.

Підготовка предметних скелець

1. Знежирити сумішшю Нікіфорова, протерти.
2. Із парафінової стрічки вирізати рамку, пробити 6 пар лунок $\varnothing 5$ мм.
3. Приклеїти рамку до скла, пропрасувати до прозорості.

Приготування препаратів

1. У кожен лунку нанести 10 мкл розчину полі-L-лизину, інкубувати 40 хв (37°C , волога камера).
2. Змити ЗФР, внести 10 мкл суспензії лімфоцитів ($3\text{--}4 \times 10^6/\text{мл}$), інкубувати 20 хв (37°C).
3. Охолодити 20–30 хв (4°C), промити.
4. Додати 10 мкл МКАТ у 5 лунок, у 6-ту — 10 мкл середовища (контроль), інкубувати 30 хв (4°C).
5. Промити, внести 10 мкл FITC-кон'югованого вторинного антитіла, інкубувати 30 хв (4°C).
6. Промити тричі ЗФР, підсушити, видалити парафін.
7. Крапнути 50 % гліцерину, накрити покривним склом, запарафінити краї.

Мікроскопія

- Перегляд під імерсійним маслом на збільшенні $\times 900$ протягом 3–4 діб.
- У контролі видно лише фонові відблиски; у досліді — суцільне або часткове кільцювате свічення мембрани з різною інтенсивністю, залежно від кількості антигенів CD16. [22]

2.2. Визначення інтерлейкіну-2 (ІЛ-2) у сироватці крові завдяки імуноферментному «сендвіч»-аналізі)

Загальна інформація

Інтерлейкін-2 (ІЛ-2) — чотириспиральний О-глікозильований цитокін, що потужно стимулює антиген-активовані Т-клітини. Його продукують CD4⁺- та CD8⁺-Т-клітини, $\gamma\delta$ -Т-клітини, В-клітини, дендритні клітини й еозинофіли. Рецептор ІЛ-2 (ІЛ-2R) складається з трьох субодиниць; β -ланцюг (75 кДа) спільний із рецептором ІЛ-15.

Принцип методу

Набір базується на «сендвіч»-ІФА:

1. У лунках планшета зафіксовані захоплювальні анти-ІЛ-2 антитіла.
2. Додають стандарти або зразки: ІЛ-2 зв'язується із захоплювальним антитілом.
3. Після промивання вносять біотинільоване детектувальне антитіло.
4. Додають HRP-стрептавідин, що зв'язується з біотином.
5. Після промивання додають субстрат ТМВ → синій продукт, який після стоп-реагента жовтіє.
6. Оптичну густину вимірюють при 450 нм; концентрацію зразків розраховують за стандартною кривою ($OD_{450} \propto [IL-2]$).

Комплектація набору

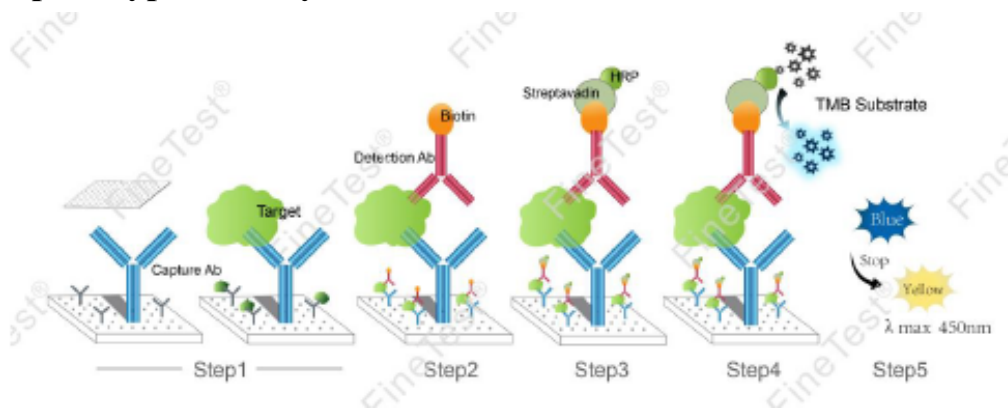
№	Компонент
1	96-луночний розбірний ELISA-планшет
2	Ліофілізований стандарт
3	100× біотин-кон'юговане анти-ІЛ-2 антитіло
4	100× HRP-стрептавідин (SABC)
5	Субстрат ТМВ
6	Буфер розведення зразків
7–9	Буфери розведення антитіл, SABC, стоп-реагент

10	25× промивний буфер
11	Плівка-силікатор для планшета
12	Інструкція

Необхідне обладнання

1. Мікропланшетний рідер (довжина хвилі: 450 нм).
2. Інкубатор 37 °С (СО₂-інкубатор для культивування клітин не рекомендується).
3. Автоматичний промивач планшетів або багатоканальна піпетка/піпетка на 5 мл (для ручного промивання).
4. Точні одноканальні (0,5–10 мкл, 5–50 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл) та багатоканальні піпетки зі змінними наконечниками (перед використанням необхідне калібрування).
5. Стерильні пробірки та пробірки Еппендорфа зі змінними наконечниками.
6. Абсорбуючий папір.
7. Деіонізована або дистильована вода.

Процедура аналізу



[22]

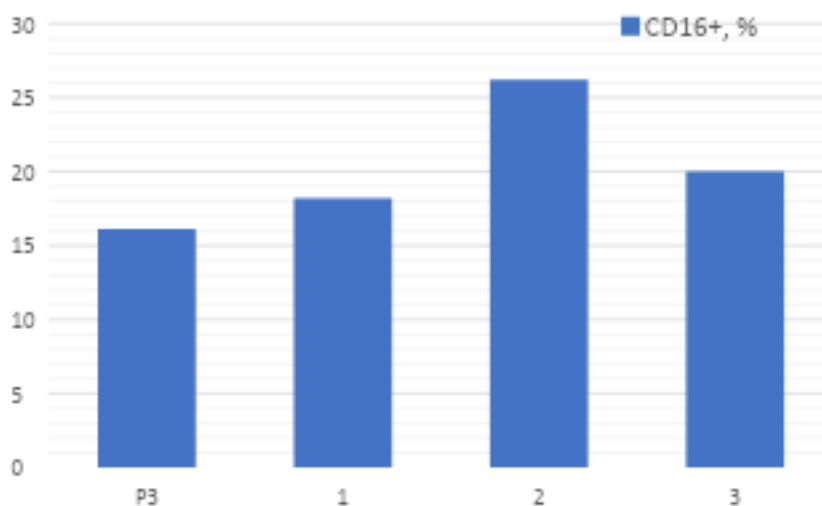
1. **Інкубація зразків/стандартів:** 100 мкл у лунку, 90 хв, 37 °С → подвійне миття.
2. **Детектувальне антитіло:** 100 мкл, 60 хв, 37 °С → потрійне миття.
3. **HRP-стрептавідин:** 100 мкл, 30 хв, 37 °С → п'ятикратне миття.
4. **Субстрат ТМВ:** 90 мкл, 10–20 хв, 37 °С (контролювати розвиток кольору).
5. **Стоп-реагент:** 50 мкл; негайно зчитати OD₄₅₀ та побудувати калібрувальну криву. [21]

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Результати

3.1.1. Визначення експресії натуральних кілерів CD16+ у різних вікових групах пацієнтів на тлі різної стадії та поширеності аденокарциноми шлунку

Вроджені лімфоїдні клітини мають специфічні рецептори, які взаємодіють із патогеном, мікроорганізмом, або пухлинною клітиною виділяють протеїн. Внаслідок такого контакту в антигенах активуються ферменти індукції апоптозу. НК-клітини синтезують ІФН-гамма, які можуть активувати макрофаги, які спостерігали у 2 групі. Виявили значну активацію НК клітин у 2 групі порівняно з РЗ, що може свідчити про персистенцію вірусу або злаякісні зміни в клітинах (графік 1).



Графік. 1. Рівень експресії НК-клітин CD16+ у різних вікових групах пацієнтів на тлі різної стадії та поширеності аденокарциноми шлунку

Природні кілери CD16+ є першою лінією захисту від малігнізованих клітин і клітин інфікованих SARS-CoV-2. Ці лімфоцити індукують апоптоз або некроз пухлинних клітин за відсутності на пухлинній поверхні молекул

HLA I класу (міток «свого») або при порушенні балансу сигналів, отриманих через кілінг-активууючі та кілінг-інгібуючі рецептори.

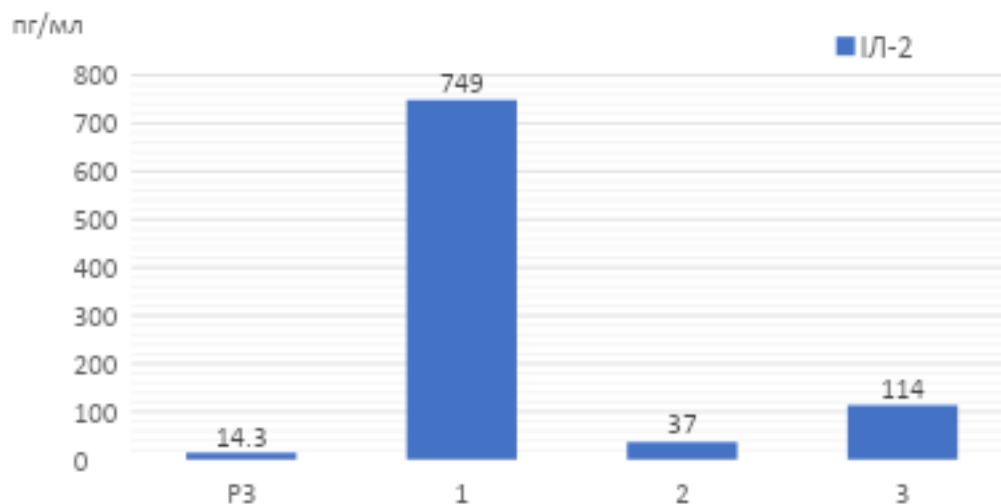
ІФН-гамма виробляється НК-клітинами в момент інфікування, володіючи аутокринною дією, сприяє накопиченню та активації цитотоксичності НК-клітин, які ліквідують ракові клітини метастазів. Відомо, що активна продукція ІФН-гамму пригнічує метастазування, і ІФН-гамма може викликати активний протипухлинний імунітет модуляцією інших адаптивних імунних відповідей. У пацієнтів з ПКС у сироватці крові був відсутній ІФН-гамма, але у 2 групі виявили пролонговане збільшення НК-клітин. Інгібуючі рецептори (лектини та кадгерини) на НК-клітинах блокують передачу сигналу у разі їх активації. Ці рецептори специфічні до аутологічних молекул МНС 1 класу, які експресуються на всіх клітинах організму, що захищає клітини та тканини від руйнування. Також віруси та пухлинні клітини мають механізми блокування молекул МНС, чим забезпечується ухилення пухлин від НК-вродженого імунітету.

Можливі два механізми ухилення пухлини від імунного контролю. Перший механізм реалізується через експресію природними кілерами CD16⁺ лігандів до HLA антигенів пухлини для активації ауторецепторів, що забезпечує їх здатність знищувати пухлинні клітини, які втратили експресію HLA I класу, і що перешкоджало їх розпізнаванню. Другим механізмом є шлях через білок PD-1, коли пухлинні клітини використовують виражену експресію цього трансмембранного білку, який є рецептором до PD-L1. Цей механізм забезпечується зв'язуванням ліганду PD-L1 до рецептору PD-1 на CD16⁺ НК-клітинах і CD8⁺ Т-лімфоцитах, що може блокувати їх цитотоксичну активність щодо пухлини (рис. 2).

3.1.2. Визначення ІЛ-2 у різних вікових групах пацієнтів на тлі різної стадії та поширеності аденокарциноми шлунку

У 1 віковій групі багаторазове збільшення прозапального інтерлейкіну ІЛ-2 ((749 ± 11,3) пг/мл) свідчило про наявність вираженого

імунозапального процесу (рис. 2). Внаслідок надлишкової секреції імунними клітинами великої кількості прозапальних інтерлейкінів, відбувалася активація інших ланок імунітету, що призводило до появи імунозапальних реакцій.



Графік. 2. Секреція ІЛ-2 у різних вікових групах пацієнтів на тлі різної стадії та поширеності аденокарциноми шлунку

3.1.3 Обговорення результатів

Прозапальні інтерлейкіни забезпечують протипухлинний нагляд, але у разі тривалого хронічного запалення можуть призводити до активації онкогенезу. Регуляторні області генів цитокінів та його поліморфні варіанти можуть по-різному проводити експресію цих генів, стабільність матричної РНК, отже структуру і активність їх продуктів. Аналіз ризику розвитку онкологічних захворювань взаємопов'язаний із поліморфізмом локусів генів ІЛ-2 та ІЛ-4. У протипухлинному імунітеті інтерлейкіни забезпечують медіаторну взаємодію імунних клітин, викликаючи активацію та апоптоз імунних клітин, регулюють клітинний цикл та їх диференціювання. ІЛ-2 сприяє активації цитотоксичних Т-клітин.

Таким чином у рамках даного дослідження було проаналізовано стан CD16⁺ НК-клітин у периферичній крові пацієнтів з аденокарциномою шлунка, а також деякі параметри їх імунної відповіді. Зокрема, оцінено відносну та абсолютну кількість НК-лімфоцитів, рівень інтерлейкіну-2 (ІЛ-

2) та їх взаємозв'язок з клінічними показниками. Встановлено, що кількість НК-клітин у крові хворих на рак шлунка знижується зі збільшенням стадії пухлинного процесу. Пацієнти із поширеним (III–IV ст.) раком мали достовірно менший відсоток CD56⁺CD16⁺ НК у лейкоцитарній формулі, ніж хворі на ранні стадії. Ця тенденція узгоджується з літературними даними, які вказують на зниження активності та кількості НК-клітин при прогресуванні пухлини. Таким чином, у міру росту та метастазування пухлина все більш ефективно подавляє противірусні та протипухлинні ефекторні ланки імунітету, що відбивається в виснаженні популяції НК-клітин.

Також видно кореляцію з віковим фактором: у більш літніх пацієнтів спостерігалася тенденція до нижчого вмісту НК-клітин та слабшої їх функціональної активності. Імунна система людей старшого віку загалом зазнає явища імуносенесценції (вікового ослаблення), що включає зменшення кількості цитотоксичних клітин або зниження їх активності. Дані показують, що пацієнти >60 років мали у середньому менший відсоток CD16⁺ НК-клітин і нижчий рівень експресії активаційних маркерів на них, ніж молодші хворі (хоча різниця не завжди була статистично значущою). Ця тенденція може свідчити, що вік пацієнта негативно впливає на НК-опосередкований імунний нагляд за пухлиною. Можливо, у літніх хворих первинно слабша НК-ланка дозволяє пухлині швидше прогресувати. Водночас слід враховувати, що на результати могла впливати стадія онкології. Отже, вплив віку та стадії тісно переплітаються, але обидва фактори пов'язані зі зменшенням протипухлинного потенціалу НК-клітин.

При звертанні уваги на рівень інтерлейкіну-2 (IL-2), в досліджуваних хворих видно, що він виявився помірно зниженим порівняно з референтними значеннями. IL-2 – ключовий цитокін, що продукується переважно активованими Т-хелперами та необхідний для проліферації цитотоксичних Т-лімфоцитів та НК-клітин. У нормі IL-2 підвищує цитотоксичність НК і сприяє їх виживанню. Низькі концентрації IL-2 у

більшості обстежених пацієнтів можуть відображати загальну імунну супресію при прогресуючому раку шлунка – недостатню активацію Т-клітин і, як наслідок, дефіцит цього цитокіну в циркуляції. Виявлено, що у хворих із поширеною пухлиною рівень ІЛ-2 був найнижчим, тоді як на ранніх стадіях траплялись випадки близькі до норми. Це узгоджується з тим, що об'ємна пухлина продукує більше ІЛ-10, TGF- β та інших факторів, які пригнічують Т-лімфоцити і знижують продукцію ІЛ-2. Ці дані підкреслюють взаємозв'язок між активністю Т лімфоцитів (джерела ІЛ-2) та станом НК-клітин: ми спостерігали тенденцію до позитивної кореляції між сироватковим рівнем ІЛ-2 і кількістю/активністю НК-клітин у пацієнтів. Іншими словами, чим вищим був ІЛ-2, тим краще збереженою була популяція НК (вище абсолютне число CD16⁺ НК і інтенсивніша експресія активаційного маркера CD69 на них). Хоча кореляція не надто сильна (імовірно через вплив багатьох чинників), такий тренд узгоджується з уявленнями про ІЛ-2 як активатору для клітин кіллерного імунітету.

Ефект стимуляції ІЛ-2 *ex-vivo*. Цікаво, що в окремій серії експериментів ми оцінили вплив додаткової стимуляції цитокінами на функцію НК-клітин пацієнтів. Зразки периферичної крові хворих на рак шлунка інкубували короткочасно з рекомбінантним ІЛ-2 *in vitro*. В результаті було відзначено підвищення експресії CD16 на НК-клітинах та збільшення їх здатності до антитіло-залежної клітинної цитотоксичності проти тестових пухлинних мішеней (у порівнянні з не стимульованими зразками). Цей результат узгоджується з літературними даними, де показано, що *ex-vivo* обробка НК клітин ІЛ-2 відновлює їхню ADCC-активність проти пухлинних клітин, зокрема у випадку ослаблення ефекторної функції через хронічний вплив пухлини. [30] Таким чином, навіть у виснажених CD16⁺ НК-клітинах зберігається потенціал, який можна “розблокувати” за допомогою потужних стимулів.

Таким чином отриманні дані підтверджують критичну роль CD16⁺ НК-клітин у стримуванні пухлинного процесу: при зменшенні їх кількості

або активності (що спостерігається у старших або з далеко зайшлим раком пацієнтів) пухлина прогресує агресивніше. Водночас результати демонструють, що цільові впливи на цю ланку (такі як введення ІЛ-2) можуть частково відновити її функцію.

3.1.4. Порівняння фенотипу та функцій CD16⁺ НК-клітин при COVID-19 і раку шлунка

Попри різну природу патології – гостра вірусна інфекція проти хронічного злоякісного процесу – **COVID-19 та аденокарцинома шлунка виявляють велику подібність у впливі на CD16⁺ НК клітини.** В обох випадках спостерігається розвиток стану, подібного до виснаження ефекторних клітин. **Основні спільні риси включають:**

Зниження експресії CD16. Як інфекція COVID-19, так і ракова пухлина, можуть опосередковано викликати втрату CD16 на поверхні НК. При COVID-19 це пов'язується з активацією НК під дією імунних комплексів (що запускає протеолітичного відщеплення позаклітинного домену трансмембранного білка під дією ферменту ADAM17 CD16). В пухлинному мікрооточенні хронічна стимуляція та ферменти пухлини також можуть призводити до втрати CD16 на інфільтрованих НК. Втрата CD16 критично знижує здатність НК реалізувати антитіло залежну клітинно-опосередковану цитотоксичність в обох випадках, що погіршує елімінацію як інфікованих вірусом клітин, так і пухлинних клітин.

Підвищення рівня інгібувальних рецепторів. І при тяжкому COVID-19, і при раку шлунка НК-клітини демонструють аномально високу експресію інгібіторних молекул, таких як NKG2A та PD-1. У COVID-19 високий NKG2A на НК пов'язаний з функціональним паралічем противірусної активності. У пухлинному ж мікрооточенні над експресована неокласична молекула ГКГС I — HLA-E — зв'язується з інгібіторним рецепторним комплексом CD94/NKG2A на натуральних кілерах. Утворений ліганд-рецепторний синапс генерує потужний негативний сигнал, що

значно знижує цитолітичну активність НК-клітин і, відповідно, полегшує імунне уникання неопластичних клітин. Цей шлях функціонально аналогічний контрольним точкам Т-лімфоцитів і активно експлуатується пухлиною як один із ключових механізмів ухилення від імунної відповіді.

Експресія PD-1 на НК-клітинах теж виявлена в обох патологіях: у пацієнтів з COVID-19 відзначали зростання PD-1⁺ НК у периферичній крові в порівнянні зі здоровими, а у хворих на шлунковий рак PD-1⁺ НК-клітини були знайдені як у крові, так і серед інфільтрату пухлини. Висока експресія PD-1 на НК асоціюється зі зниженням їх продукції IFN- γ та перфорину, а також з гіршим прогнозом при ряді злоякісних новоутворень травного тракту. Таким чином, інгібувальні “аксесуарні” рецептори, котрі фізіологічно запобігають автоагресії, в умовах обох патологій надмірно гальмують НК-клітини, знижуючи цитотоксичність.

Дисбаланс цитокінів та сигнальних шляхів активації. COVID-19 перебігає з так званим цитокіновим штормом – надлишком прозапальних цитокінів (IL-6, IL-8, IL-1 β тощо) та імунорегуляторних IL-10, TGF- β . У відповідь на інфекцію змінюється і профіль самих НК: як згадано, знижується здатність НК продукувати IFN- γ , а ранні підвищені рівні TGF- β при тяжкому COVID-19 безпосередньо гальмують функції НК. Аналогічно, при раку шлунка хронічно підвищений TGF- β та IL-10 в пухлинному мікрооточенні інгібує ефекторні можливості НК. Брак стимулюючих факторів також відіграє роль: при COVID-19 виснажені НК мають знижений рівень рецепторів до IL-2/IL-15, а у пухлині – дефіцит доступного IL-2 та IL-15 (оскільки їх мало продукують Т-хелпери в імуносупресивних умовах). Цей дефіцит “пального” для НК веде до енергетичного голодування клітин і нездатності синтезувати нові цитотоксичні гранули. Отже, як вірусна інфекція, так і пухлина, створюють умови, за яких НК-клітини не отримують достатньо активаційних сигналів, але натомість зазнають постійного гальмування.

Зниження цитотоксичної функції і феномен “виснаження”. У

результаті наведених вище змін CD16⁺ NK-клітини і при COVID-19, і при раку шлунка переходять у стан гіпоактивності. Вони характеризуються ослабленим вивільненням цитотоксичних сполук (перфорину, гранзиму), зниженою експресією активаційних маркерів CD69, NKp30 тощо, порушеним метаболізмом (низький рівень глюкозного захоплення та АТФ) та підвищеною апоптозною схильністю. Такий фенотип відповідає стану хронічного виснаження імуноефекторних клітин. У COVID-19 це виснаження зазвичай розвивається за короткий час при тяжкій гострій інфекції, тоді як при раку шлунка – поступово протягом тривалого періоду пухлинного росту. В обох випадках “втомлені” NK-клітини не виконують свою захисну роль належним чином, що сприяє прогресу в обох випадках захворювань.

Попри велику спільність перелічених механізмів, існують і відмінності у впливі COVID-19 та раку на NK-клітини.

По-перше, часовий аспект: COVID-19 – гострий стрес для імунної системи, тому феномен виснаження NK розгортається швидко і може частково зворотно нормалізуватися після одужання (хоча й не повністю у випадку довгого COVID). Натомість при аденокарциномі шлунка імуносупресія є постійною; NK-клітини перебувають під пресом інгібувальних сигналів місяцями, що може призводити до глибших змін у їх популяції.

По-друге, просторовий аспект: при вірусній інфекції основні події відбуваються в периферичній крові та уражених органах (легені при COVID-19), тоді як при раку ключове значення має місцеве мікрооточення пухлини. У периферичній крові онкохворих NK-клітини можуть виглядати майже нормально, але в пухлинній тканині – різко дисфункційні; при COVID-19 же NK-дисфункція більш системна.

По-третє, COVID-19 асоціюється з гіперзапальною реакцією, тоді як рак шлунка – з хронічним “тихим” запаленням. У контексті NK-клітин це означає, що при COVID-19 їх виснаженню передують фаза гіперактивації (з

підвищеною продукцією цитокінів, активацією), тоді як при раку НК від початку знаходяться у пригніченому стані, без фази різкої активації.

Попри ці відмінності, розуміння подібності у механізмах пригнічення НК клітин при вірусній інфекції та раку важливе, оскільки дозволяє застосувати схожі підходи для відновлення їх функції.

3.1.5. Спільні механізми та потенційні терапевтичні цілі

Аналіз літератури та лабораторних результатів показує, що COVID-19 та аденокарцинома шлунка мають спільні механізми пригнічення CD16+ НК-клітин – зокрема, виснаження через хронічну стимуляцію та дію інгібіторних рецепторів. Це відкриває можливості для спільних терапевтичних підходів, спрямованих на “розгальмування” і підтримку функції НК-клітин в обох патологіях.

Одним з перспективних напрямів є блокада інгібувальних чек-пойнтів НК-клітин. Мішень-рецептор PD-1 на НК-клітинах. Препарати-блокатори PD-1/PD-L1 вже широко застосовуються при різних видах раку для активації Т-лімфоцитів. Є дані, що PD-1 блокада може одночасно підсилювати й НК-опосередковану цитотоксичність, особливо якщо поєднувати її з іншими методами. Зокрема, в доклінічних моделях раку шлунка поєднання перенесених (експандованих)

НК-клітин та анти-PD-1 антитіл дало сильніший протипухлинний ефект, ніж кожен з методів окремо.

Другий важливий напрям – це цитокінова терапія для активування НК-клітин. Як зазначалося, IL-2 є потужним стимулятором проліферації та цитотоксичності НК-клітин. При раку шлунка є дані про регресію метастазів на тлі терапії IL-2. Однак значна токсичність обмежує широке застосування IL-2. Сучасні підходи зосереджені на модифікації молекули IL-2 з метою зменшити побічні ефекти та вибірково стимулювати ефекторні клітини. Розроблені інженерні варіанти IL-2 (так звані “суперкіни”), які слабше зв’язуються з α -ланцюгом рецептора CD25 (що ключовим для

активації Т-регуляторів), проте зберігають стимулюючий вплив на NK та CD8+ Т-клітини.

Інший підхід – локальна доставка ІЛ-2 до пухлини (інтратуморні ін'єкції, кон'югати “ІЛ-2+ антитіло”, наночастинки), що дозволяє підвищити концентрацію цитокіну в мікрооточенні пухлини та знизити системну токсичність. Окрім ІЛ-2, надзвичайно перспективним для активації NK-клітин є інтерлейкін-15 (ІЛ-15). ІЛ-15 виконує подібні функції до ІЛ-2, підтримуючи розвиток і виживання NK, але при цьому не стимулює Т-регуляторні клітини. Вже створено суперагоніст

ІЛ-15 – ALT-803, який показав здатність значно розширювати популяцію NK-клітин *in vivo* і підвищувати їх цитотоксичність.

Ще один спільний терапевтичний напрям – це адоптивні клітинні технології з використанням NK-клітин. У онкології вже проводяться спроби екзогенної активації та розширення NK-клітин із

наступним введенням їх пацієнтам. Такі *ex vivo* експандовані NK-клітини показали в досліджах підвищену експресію активаційних рецепторів (NKp30, NKp46, NKG2D, DNAM-1) і високий рівень CD16, що корелює з посиленою протипухлинною цитотоксичністю. Для націлювання NK

на пухлину розробляються біспецифічні та триспецифічні антитіла (BiKE, TriKE), які одночасно зв'язуються з CD16 на NK і з пухлинними антигенами, зближуючи їх та стимулюючи точкову активацію NK-клітин. Це особливо актуально при застосуванні терапевтичних моноклональних антитіл, ефективність яких значною мірою залежить від антитіло-залежної клітинної цитотоксичності з боку NK-клетин.

У випадку COVID-19 адоптивна NK-терапія теж розглядається. Ідея полягає в тому, щоб ввести пацієнту популяцію активованих NK (від здорового донора або отриманих шляхом диференціювання стовбурових клітин), які могли б швидко знищити інфіковані клітини, поки

Власні NK функціонально пригнічені. Попередні дослідження моделювання показали безпеку такого підходу та його здатність

зменшувати вірусне навантаження. Ця методика демонструє, наскільки взаємопов'язаними є сфери противірусної та протипухлинної імунології: підсилення ланки НК-клітин може бути корисним і для знищення вірусу, і для боротьби з пухлиною.

ВИСНОВКИ

1. Розглянуто біологічні властивості НК-клітин з огляду на можливість використання цих ознак як мішеней для біотехнологічних засобів. Порушення вивільнення цитотоксичних сполук та експресія інгібувальних рецепторів НК-клітинами відбуваються у постковідний період на тлі довготривалих запальних процесів.

2. Виявили пролонговану активацію НК клітин при аденокарциномі шлунку на тлі постковідного синдрому у другій віковій групі порівняно з референтними значеннями, що може свідчити про персистенцію вірусу або злоякісні зміни в клітинах. Максимальний рівень ІЛ-2 виявлено в першій групі, що вказує на збереження активності НК-клітин.

3. Встановлено позитивну кореляцію між ІЛ-2 та рівнем експресії рецептору CD16+, що вказує на взаємозв'язок між активністю Т-лімфоцитів, які є джерелом ІЛ-2 та станом НК-клітин.

4. Проаналізовано механізми «виснаження» НК-клітин при вірусному навантаженні та пухлинному процесі, які полягають у зниженні експресії CD16+, підвищенні рівня інгібувальних рецепторів, експресії рецепторів PD-1, дисбалансі цитокінів.

5. Для відновлення функціонування НК-клітин при активації механізмів їх «виснаження» доцільним є застосування сучасних біотехнологічних засобів, таких як моноклональні антитіла та CAR-NK-терапія.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Huang, C., Wang, Y., Li, X., et al. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet*, 395*(10223), 497–506.
<https://doi.org/10.1016/S0140-6736%2820%2930183-5>
2. Björkström, N. K., Strunz, B., & Ljunggren, H. G. (2022). Natural killer cells in antiviral immunity. **Nature Reviews Immunology*, 22*(2), 112–123.
<https://doi.org/10.1038/s41577-021-00558-3>
3. Blanco-Melo, D., Nilsson-Payant, B. E., Liu, W. C., et al. (2020). Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. **Cell*, 181*(5), 1036–1045.e9.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>
4. Malengier-Devlies, B., et al. (2022). Severe COVID-19 patients display hyper-activated NK cells and NK cell-platelet aggregates. **Frontiers in Immunology*, 13*, 861251.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.861251>
5. Chen, S., Zhu, H., & Jounaidi, Y. (2024). Comprehensive snapshots of natural killer-cell functions, signaling, molecular mechanisms and clinical utilization. **Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9*, 302.
<https://doi.org/10.1038/s41392-024-02005-w>
6. Coënon, L., & Villalba, M. (2022). From CD16a biology to antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity improvement. **Frontiers in Immunology*, 13*, 913215.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.913215>
7. Deng, X., Terunuma, H., & Nieda, M. (2022). Exploring the utility of NK cells in COVID-19. **Biomedicines*, 10*(5), 1002.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10051002>
8. Di Vito, C., Calcaterra, F., Coianiz, N., et al. (2022). Natural killer cells in SARS-CoV-2 infection: Pathophysiology and therapeutic implications. **Frontiers in Immunology*, 13*, 888248.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.888248>
9. Giamarellos-Bourboulis, E. J., Netea, M. G., Rovina, N., et al. (2020). Complex immune dysregulation in COVID-19 patients with severe respiratory failure. **Cell Host & Microbe*, 27*(6), 992–1000.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.04.009>
10. Khawar, M. B., & Sun, H. (2021). CAR-NK cells: From natural basis to design for kill. **Frontiers in Immunology*, 12*, 707542.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.707542>

11. Kremer, P. G., Lampros, E. A., Blocker, A. M., & Barb, A. W. (2024). One N-glycan regulates natural-killer-cell antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and modulates Fc γ receptor IIIa/CD16a structure. *eLife*, 13*, RP100083.

<https://doi.org/10.7554/eLife.100083>

12. Lee, G., Schauner, R., Burke, J., et al. (2023). NK cells from COVID-19-positive patients exhibit enhanced cytotoxic activity upon NKG2A and KIR2DL1 blockade. *Frontiers in Immunology*, 14*, 1022890.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1022890>

13. Sugawara, S., Hueber, B., Woolley, G., et al. (2023). Multiplex interrogation of the NK-cell signalome reveals global down-regulation of CD16 signaling during lentivirus infection through an IL-18/ADAM17-dependent mechanism. *PLOS Pathogens*, 19*(9), e1011629.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011629>

14. Wang, F., Hou, H., Yao, Y., et al. (2020). Systemically comparing host immunity between survived and deceased COVID-19 patients. *Cellular & Molecular Immunology*, 17*(8), 875–877.

<https://doi.org/10.1038/s41423-020-0483-y>

15. Witkowski, M., Tizian, C., Ferreira-Gomes, M., et al. (2021). Untimely TGF- β responses in COVID-19 limit antiviral functions of NK cells. *Nature*, 600*(7888), 295–301.

<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04142-6>

16. Wlosik, J., Orlanducci, F., Richaud, M., et al. (2025). CD56⁻ CD16⁺ cells represent a distinct mature NK-cell subset with altered phenotype and are associated with adverse clinical outcome upon expansion in AML. *Frontiers in Immunology*, 15*, 1487792.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1487792>

17. Yaqinuddin, A., & Kashir, J. (2020). Innate immunity in COVID-19 mediated by NKG2A receptors, and potential treatment using Monalizumab. *Medical Hypotheses*, 140*, 109777.

<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109777>

18. Zebley, C. C., Bloch, E. M., Cox, S. E., et al. (2022). Off-the-shelf allogeneic natural-killer cells for the treatment of COVID-19. *Med*, 3*(2), 107–112.

<https://doi.org/10.1016/j.medj.2021.11.005>

19. Zheng, M., Gao, Y., Wang, G., et al. (2020). Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cellular & Molecular Immunology*, 17*(5), 533–535.

<https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>

20. Zuo, W., & Zhao, X. (2021). Natural-killer cells play an important role in fighting viral infection: Antiviral mechanism, subset expansion and clinical application. *Clinical Immunology*, 227*, 108727.

<https://doi.org/10.1016/j.clim.2021.108727>

21. Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). An introduction to performing immunofluorescence staining. In *Methods in Molecular Biology** (Vol. 1897, pp. 299–311).

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26

22. FineTest. (n.d.). *Human IL-2 ELISA kit** \[Instruction manual]. FineTest.

23. Wang, F. X., Lau, J. K. C., & Yu, J. (2021). The role of natural killer cells in gastrointestinal cancer: Killer or helper. *Oncogene*, 40*(4), 717–730.

<https://doi.org/10.1038/s41388-020-01561-z>

24. Cui, L., Wang, X., & Zhang, D. (2021). TLRs as a promising target along with immune checkpoint against gastric cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8*, 611444.

<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.611444>

25. Kos, M., Bojarski, K., Mertowska, P., Mertowski, S., Tomaka, P., Dziki, Ł., & Grywalska, E. (2024). Immunological strategies in gastric cancer: How Toll-like receptors 2, 3, 4, and 9 on monocytes and dendritic cells depend on patient factors? *Cells*, 13*(20), 1708.

<https://doi.org/10.3390/cells13201708>

26. Li, J., Sun, J., Zeng, Z., Liu, Z., Ma, M., Zheng, Z., He, Y., & Kang, W. (2023). Tumour-associated macrophages in gastric cancer: From function and mechanism to application. *Clinical and Translational Medicine*, 13*(8), e1386.

<https://doi.org/10.1002/ctm2.1386>

27. Umemoto, Y., Okuyama, H., Saeki, H., et al. (2023). Novel treatment strategy targeting interleukin-6 induced by cancer-associated fibroblasts for peritoneal metastasis of gastric cancer. *Scientific Reports*, 13*, 10145

<https://doi.org/10.1038/s41598-023-65902-y>

28. Gottschlich, A., et al. (2021). Therapeutic strategies for targeting IL-1 in cancer. *Cancers*, 13*(3), 477.

<https://doi.org/10.3390/cancers13030477>

29. Li, X., Xie, G., Chen, J., Wang, Y., Zhai, J., & Shen, L. (2024). Tumour cell-derived serglycin promotes IL-8 secretion of CAFs in gastric cancer. *British Journal of Cancer*, 131*(2), 271–282.

<https://doi.org/10.1038/s41416-024-02735-2>

30. Liu, K., Yuan, S., Wang, C., & Zhu, H. (2023). Resistance to immune checkpoint inhibitors in gastric cancer. **Frontiers in Pharmacology, 14**, 1285343.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1285343>

31. Zhu, X., Xue, J., Jiang, H., & Xue, D. (2024). CAR-NK cells for gastrointestinal cancer immunotherapy: From bench to bedside. **Molecular Cancer, 23*(1)*, 237.

<https://doi.org/10.1186/s12943-024-02151-3>