

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

імені В.Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет

кафедра молекулярної біології та біотехнології

**Стратегія регулювання експресії коінгібуючих рецепторів імунних
клітин при різних стадіях онкогенеза**

Допущено до захисту

«__»_____2025 р.

Завідуючий

кафедрою _____

Кваліфікаційна робота

студента кафедри

Олейнікова Михайла Сергійовича

Оцінка «_____»

Голова ЕК

«__»_____2025 р.

Науковий керівник:

Доктор біологічних наук,

професорка Клімова Олена

Михайлівна

Харків

2025

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота на тему: «Стратегія регулювання експресії коінгібуючих рецепторів імунних клітин при різних стадіях онкогенеза».

Робота включає 82 сторінок, використаних джерел – 38.

Актуальність роботи пов'язана із тим, що вірусна інфекція COVID-19 з гострим та безсимптомним перебігом може результуватись стійкими порушеннями імунної резистентності організму, а також пошкодженням багатьох органів та тканин, що у поєднанні з персистенцією вірусу у організмі може спричинити виникнення онкопатологій через мутагенне навантаження. Індукція малегнізації після COVID-19 відбувається через мутагенну дію вірусу Sars-CoV-2 що, у свою чергу, приводить до високого ризику летальності. Беручи до уваги нещодавню пандемію COVID-19, дана проблема набула значної поширеності. Для створення біотехнологічних: імунологічних препаратів і розробки методів лікування, в онкології, необхідно розуміти клітинні та молекулярні механізми імунного дисбалансу при патологічних станах, розкриваючи механізми контрольних імунних точок, на які можна впливати в рамках більш ефективного лікування. Тому доцільно ретельно досліджувати індивідуальні механізми порушень імунної резистентності для розробки стратегії персоніфікованого лікування, усуваючи дію механізмів, що порушують імунну відповідь, дозволяючи таким чином імунній системі організму ефективно ліквідувати малегнізовані клітини.

Метою роботи є виявлення порушення імунологічних показників у пацієнтів з коморбідним перебігом різних стадій аденокарциноми шлунку та симптомокомплексу постковідного синдрому для вибору персоніфікованої неоадьювантної терапії.

Ключові слова: *молекулярні механізми імунного дисбалансу, постковідний синдром, коморбідний перебіг раку та симптомокомплексу постковідного синдрому, SARS-CoV-2.*

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1 Ракова пухлина та причини її виникнення.....	7
1.2 Процес активації Т-клітин імунної системи, роль коstimуляції CD28:B7 в активації Т-клітин.....	9
1.2.1 Процес активації Т-клітин імунної системи.....	9
1.2.2 Проблема нестачі коstimуляції B7:CD28.....	12
1.3 Молекули імунних контрольних точок; роль PD1 та CTLA-4 у імунній системі.....	13
1.3.1 Роль PD1 у нормальному стані.....	13
1.3.2. Роль CTLA-4 у нормальному стані.....	18
1.4 Взаємодія імунної системи і пухлини: зміни імунорезистентності в онкогенезі.....	20
1.4.1 Взаємодія імунної системи і пухлини.....	20
1.4.2 Фагоцитоз при виникненні ракової пухлини.....	24
1.4.3 Порухення експресії мол. ГКГС на малегнізованих клітинах.....	25
1.4.4 Роль шляху PD-1/PD-L1 у інгібуванні CD8+ Т-клітин та формуванні ефекту ухилення пухлини від імунної відповіді. Роль CTLA-4 у придушенні протиракового імунітету.....	26
1.5 Розробка нових біотехнологічних методів боротьби з раковими пухлинами.....	31
1.5.1 Персоніфікована імунотерапія.....	31
1.5.2. CAR Т-клітинна терапія.....	35
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	40
2.1 Загальні відомості.....	40
2.2 Проточна цитофлуориметрія.....	40
2.2.1 Загальні відомості.....	41
2.2.2 Цитофлуориметр - загальна будова.....	42

2.2.3 Опис методу проточної цитофлуориметрії, класифікація барвників та області їх застосування.....	46
2.2.4 Приготування зразку для проточної цитофлуориметрії; гейтування.....	50
2.2.4.1 Приготування зразку для проточної цитофлуориметрії.....	50
2.2.4.2 Процес аналізу результатів – гейтування.....	52
2.2.5 Застосування методу проточної цитофлуориметрії у поточному дослідженні.....	55
2.3 Спектрофотометричний метод.....	58
2.3.1 Загальні відомості.....	58
2.3.2 Опис методу, будова абсорбційного спектрофотометра.....	58
2.3.3 Застосування методу абсорбційної спектрофотометрії у поточному дослідженні.....	60
2.4 Імуноферментний метод.....	60
2.4.1 Загальні відомості.....	61
2.4.2 Опис методу ІФА.....	62
2.4.3 Застосування методу ІФА у поточному дослідженні.....	64
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ.....	66
3.1 Результати оцінки експресії рецепторів субпопуляцій лімфоцитів.....	66
3.2 Результати визначення вмісту олігонуклеотидної фракції DAMP... ..	67
3.3 Результати визначення вмісту цитокінів (ІЛ-2, ІЛ-4).....	68
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ.....	70
4.1 Загальне обговорення.....	70
4.2 Стратегії імунотерапії в залежності від стадії та виду раку.....	75
ВИСНОВКИ.....	76
ЛІТЕРАТУРА.....	78

ВСТУП

Для створення біотехнологічних: імунологічних препаратів і розробки методів лікування, в онкології, необхідно розуміти клітинні та молекулярні механізми імунного дисбалансу при патологічних станах, розкриваючи механізми контрольних імунних точок, на які можна впливати в рамках більш ефективного лікування. Останні дані науки і медицини показують, що при розробці методів боротьби з метастазуванням і розвитком малегнізованої пухлини вкрай важливо враховувати природні шляхи порушень імунної відповіді при боротьбі імунної системи людини з малегнізованими клітинами, які утворюються внаслідок спонтанного та індукованого мутагенезу. Одним з випадків індукованого мутагенезу, який веде до малегнізації клітин є персистенція вірусу SARS-CoV-2, що веде до постковідного синдрому, на тлі якого збільшується кількість онкологічних випадків. З оглядом на те, що поширені методи, хірургічного втручання, хіміотерапії та променевої терапії, часто не враховують індивідуальні особливості пацієнтів, такі як молекулярний профіль пухлини та імунологічний статус і шляхи ухилення пухлин від імуно-генетичного нагляду, вони в даний момент демонструють недостатньо високий рівень ефективності, у вигляді частих рецидивів вже протягом декількох років після лікування. Тому доцільно ретельно досліджувати індивідуальні механізми порушень імунної резистентності для розробки стратегії персоніфікованого лікування, усуваючи дію механізмів, що порушують імунну відповідь, дозволяючи таким чином імунній системі організму ефективно ліквідувати малегнізовані клітини. Важливим є оцінка адитивного ефекту різних факторів, які впливають на малігнізацію, є первинними порушеннями імунорезистентності, або володіють мутагенним ефектом. Важливі зміни імунного ландшафту, адаптивного імунітету в прогресуванні онкологічного процесу. Імунотерапія може поєднуватись з традиційними методами лікування раку такими як хірургічне втручання/хіміотерапії, для досягнення максимальної ефективності.

Актуальність. За останні 5 років фіксується збільшення частоти онкозахворювань у всьому світі. Багато вчених вважають, що це пов'язано з пандемією вірусу Sars-CoV-2, який є унікальним вірусом з імуносупресивною дією, мутагенною дією і властивістю персистуватися в організмі. Сьогодні широко використовуються методи ад'ювантної терапії, які показують високі результати ефективності більш ніж у 60% пацієнтів. Показано, що це більш ефективно, ніж хіміо- та променева терапія. Однак, досі не вивчені всі можливі види та комбінації імуносупресивних станів при онкозахворюванні. Необхідне подальше вивчення індивідуальних особливостей порушень імунної резистентності для вибору тактики індивідуальної імунотерапії. Показано, що термін виживання від раку завдяки таргетній терапії подовжується на десятиліття, але сучасні лікувальні протоколи все ще потребують постійної корекції для досягнення максимальної ефективності. Важливо зазначити, що тільки у 60% пацієнтів методи імунотерапії викликають позитивний результат, тому потрібно ретельно досліджувати механізми ухилення пухлини імунного нагляду та реакцію імунної системи на злоякісні новоутворення, щоб розробляти нові методи активації імунної відповіді для кожного випадку.

Мета. Виявити індивідуальні порушення імунологічних показників у пацієнтів з коморбідним перебігом різних стадій аденокарциноми шлунку та симптомокомплексу постковідного синдрому для обґрунтування та вибору персоналізованої неоад'ювантної імунотерапії.

Предметом дослідження є зміна факторів імунного ландшафту і оцінка наявності контрольних точок імунітету при аденокарциномі шлунку.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Ракова пухлина та причини її виникнення.

Малегнизация — перетворення клітин нормальної чи патологічно зміненої тканини на клітини злоякісної пухлини (мутовані клітини) під дією канцерогенних або мутагенних факторів, які можуть бути виражені: як фізичними (іонізуюче випромінювання, тощо) і хімічними (азбест, бензол, вінілхлорид, тощо), так і біологічними (віруси і бактерії *Helicobacter pylori*, тощо). В результаті дії цих факторів розвивається процес канцерогенезу, тобто патофізіологічний процес виникнення і розвитку пухлини, що характеризується прогресуванням змін на клітинному, генному та транскрипційному рівні. В результаті даного процесу формується пухлина і розпочинається процес онкогенезу.

Персистенція онкогенних вірусів (Sars-CoV-2) сприяє підвищенню мутаційного навантаження. Механізм, за допомогою якого вірусна інфекція перероджується в рак, може змінюватись від стійкої запальної реакції до придушення імунної системи та активного перепрограмування клітини-господаря. Загалом вірус може безпосередньо викликати трансформацію клітин такими способами: інтегруючи зовнішній онкоген, надмірно активуючи людські онкогени та/або інгібуючи супресори пухлин [38]. Ці процеси в результаті призводять до малегнізації клітин.

Активація онкогенів відбувається внаслідок генетичних змін у клітинних протоонкогенах. У патогенезі новоутворень у людини встановлено три основні механізми активації онкогенів: (1) мутації, (2) ампліфікація генів, та (3) хромосомні перебудови. (рис 1.1.1).

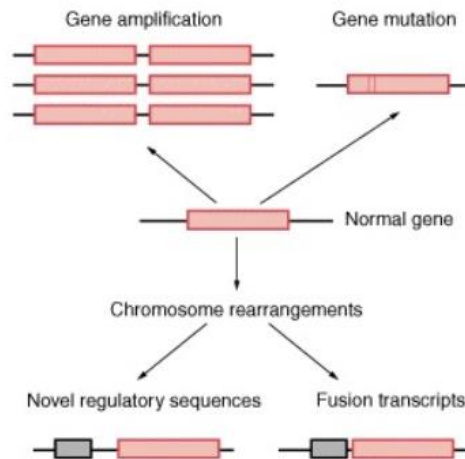


Рис.1.1.1. Генетичні механізми активації онкогенів. Схематичне зображення [37].

Активація протоонкогенів шляхом мутацій результується структурними змінами в білках, що ними кодуються. Такі зміни, як правило, зачіпають критичні регуляторні області білкових молекул, що призводить до неконтрольованої, безперервної активності мутованого білка. Активація протоонкогенів може зумовлюватися різними типами мутацій, зокрема точковими нуклеотидними замінами, делеціями та інсерціями.

Ампліфікація гена — це процес збільшення кількості копій даного гена в геномі клітини. Механізм ампліфікації генів вперше був ідентифікований як спосіб, за допомогою якого деякі пухлинні клітинні лінії набувають резистентності до антипроліферативних препаратів. Ампліфікація результується підвищеною експресією генів, зростання якої може забезпечити клітинам проліферативну перевагу.

Хромосомні перебудови часто виявляються при гематологічних злоякісних новоутвореннях і деяких типів солідних пухлин. Найчастіше ці перебудови представлені хромосомними транслокаціями, рідше — інверсіями. Механізми, через які такі перебудови призводять до онкогенезу, включають: (1) транскрипційну активацію протоонкогенів, та (2) утворення химерних (злитих) генів, що кодують білки з онкогенними властивостями. Активацію транскрипції, що іноді називають активацією гена, є наслідком хромосомних

перебудов, що переміщують протоонкоген у безпосередню близькість до генів імуноглобуліну або Т-клітинного рецептора. В результаті, транскрипція протоонкогену здійснюється під контролем регуляторних елементів, цих локусів, що веде до порушення нормальної регуляції експресії протоонкогена. Така дисрегуляція може спричинити малегнізацію клітини. Гени злиття формуються внаслідок хромосомних перебудов, коли точки хромосомних розривів потрапляють у локуси двох різних генів. Така реорганізація генетичного матеріалу призводить до утворення химерного гену, що складається з голови одного гена та хвоста іншого. Гени злиття кодують химерні білки з трансформуючою активністю.

Внутрішні чинники, такі як спадкова схильність та імуносупресія, суттєво підвищують ризик розвитку злоякісних новоутворень. Малегнізації можуть піддаватись як непухлинні тканини, так і доброякісні пухлини. Ознаками малегнізації є порушення механізмів клітинного поділу, порушення диференціювання, зміни клітинної морфології з порушеннями функціональної активності, прогресуючим зростанням новоутворення та формуванням метастазів. Малигнізація також є прикладом пухлинної прогресії — переходу доброякісної пухлини у злоякісну форму, що супроводжується незворотною якісною зміною однієї або кількох властивостей клітин. Злоякісні пухлини зазвичай характеризуються високим рівнем генетичної нестабільності. Малегнізовані клітини можуть втрачати експресію молекул через втрату генів або епігенетичне заглушення.

1.2 Процес активації Т-клітин імунної системи, роль коstimуляції CD28:B7 в активації Т-клітин.

1.2.1 Процес активації Т-клітин імунної системи.

У контексті активації T0 клітини розглядаються такі взаємодії:

- ГКГС 2 класу асоційований з антигенним пептидом та TCR у комплексі з CD4 корецептором – базова взаємодія, що забезпечує розпізнавання антигену та активацію CD4⁺ Т-клітини. ГКГС 1 класу та TCR у комплексі з CD8 корецептором – відіграють аналогічну роль, але вже для Т-цитотоксичних клітин. Ця взаємодія формує перший сигнал. Пептиди, представлені Т-клітин CD8 + молекулами МНС класу I, мають довжину 8–13 амінокислот; пептиди, представлені клітинам CD4 + молекулами МНС класу II, довші, зазвичай 12–25 амінокислот у довжину, оскільки кінці зв'язувальної щілини молекули МНС класу II відкриті. Більш детально механізм розпізнавання комплексу ГКГС-пептид Th0 клітиною буде представлений пізніше.
- CD80/CD86 і CD28, де CD28 (кластер диференціації 28) — це експресований білок на Т-клітинах, який забезпечує важливі костимулюючі сигнали, необхідні для активації Т-клітин. Коли Т-клітини стимулюються через CD28 у поєднанні з Т-клітинним рецептором (TCR), це посилює виробництво різних інтерлейкінів, зокрема ІЛ-6. CD28 служить рецептором для CD80 (B7.1) та CD86 (B7.2), білків, знайдених на антигенпрезентуючих клітинах (APC). CD28:B7 надсилає другий внутрішньоклітинний сигнал, який ліцензує Т-клітину для відповіді на антиген. Без нього Т-клітина стає анергічною. Цей механізм запобігає неадекватним відповідям на себе, оскільки самопептиди зазвичай не будуть представлені з відповідною костимуляцією. Активація CD28 стимулює поглинання глюкози та прогресування клітинного циклу в Т-клітинах за рахунок збільшення експресії антиапоптотичних білків Bcl-X (Bcl-xL) та інтерлейкіну-2 (ІЛ-2) для зниження апоптозу та збільшення проліферації Т-клітин.
- Після зв'язування з поверхнею антигенпрезентуючої клітини, Т-клітина збільшує міцність зв'язування, активуючи білок адгезії інтегрину, званий лімфоцит-функціонально-асоційованим білком 1 (LFA-1). Активованій LFA-1 тепер сильніше зв'язується зі своїм Іg-подібним

лігандом, внутрішньоклітинною молекулою адгезії 1 (ICAM-1), на поверхні АПК. Ця підвищена адгезія дозволяє Т-клітині залишатися пов'язаною з антигенпрезентуючою клітиною досить довго для того, щоб Т-клітина активувалась [6].

- Взаємодія рецепторів CD-25 та ІЛ-2. Одним із важливих факторів, необхідних для успішної активації Т-клітини, є взаємодія ІЛ-2 та відповідного рецептора – CD25 (IL2R). ІЛ-2 є обов'язковою умовою для активації як CD4⁺ клітин, так і CD8⁺, і посиляє третій сигнал, провокуючи запуск клітинного циклу Т-клітини через активацію mTOR.
- Інтенсивність костимулюючого сигналу при активації Т-клітини контролюється негативним зворотним зв'язком. У процесі активації клітина починає експресувати CTLA-4, який діє для інгібування внутрішньоклітинної сигналізації. За структурою він нагадує CD28, але він зв'язується з білками В7 на поверхні антигенпрезентуючої клітини з набагато більш високою афінністю ніж CD28, і, коли це відбувається, він контролює процес активації, оберігаючи клітину від надмірної стимуляції [6].

Ефекторні дії Т-лімфоцитів CD8⁺ настільки руйнівні, що неімунним Т-клітин CD8⁺, на відміну від CD4⁺, часто потрібно більше костимулюючої активності в процесі активації, яка залежить, у свою чергу, від рівня активації дендритних клітин. При деяких вірусних інфекціях рівень активації дендритних клітин досягає достатньо високого рівня, щоб безпосередньо забезпечити сигнал необхідно високого рівня, який запускає продукування ІЛ-2 у CD8⁺ Т-лімфоцитів, що веде до їх диференціювання в ефекторні клітини. Однак, при більшості вірусних інфекцій для активації Т-лімфоцитів CD8⁺ необхідна допомога CD4⁺ Т-клітин, які розпізнають антигени, презентовані антигенпредставляючою клітиною. В7, що експресується дендритною клітиною, спочатку активує Т-лімфоцити CD4 для експресії ІЛ-2 та CD40L. CD40L зв'язує CD40 на дендритній клітині, передаючи додатковий сигнал, що

збільшує експресію B7 та 4-1BBL дендритною клітиною, що, у свою чергу, забезпечує додаткову костимуляцію для неімунного Т-лімфоциту CD8+. IL-2, що продукується активованими Т-лімфоцитами CD4+, також сприяє стимулюванню проліферації ефektorних Т-лімфоцитів CD8+ [5].

1.2.2 Проблема нестачі костимуляції B7:CD28.

При недостатній експресії B7 на АПК (наприклад в результаті гіперактивної супресуючої дії iTregs через CTLA-4 у разі окнопатологій, цей механізм буде розглянуто далі) костимулюючий сигнал буде недостатній для повноцінної активації клітин. У деяких випадках це є частиною регулювання інтенсивності імунної відповіді, проте це явище може мати і завищений патологічний характер, що буде унеможливлювати нормальну активацію клітин імунної системи. У разі недостатньої експресії CD28 на Т-клітинах нормальна активація адаптивної імунної відповіді, у тому числі протипухлинної, проходить важко, але є деякі альтернативні шляхи підтримування костимулюючої активності CD28-дефіцитні Т-клітин. Більшість костимуляторних молекул мають низьку здатність активувати CD28-дефіцитні Т-клітини. Такі Т-клітини характеризуються ослабленими відповідями на антигенний виклик. CD28 діє як первинний костимулюючий Т-клітинний рецептор, але існують додаткові рецептори, які можуть костимулювати активацію Т-клітин. Залучення молекули CD2 її лігандом CD58 явно костимулювало проліферацію, продукцію цитокінів і ефektorну функцію в цій підмножині Т-клітин. CD58 (раніше відомий як LFA-3) експресується на антигенпредставляючій клітині. CD2 експресується на поверхні практично всіх зрілих периферичних Т-клітин, тимоцитів, NK-клітин та тимічних В-клітин. Залучення молекули CD2 її лігандом CD58 явно костимулювало проліферацію, продукцію цитокінів і ефektorну функцію CD28-дефіцитних клітин. Блокування CD58 значно знизило реакцію людських CD28-дефіцитних Т-клітин на алогенні дендритні клітини, а також на вірусні

антигени [17]. У разі відсутності експресії CD28 превалюватиме інгібуючий PD1/PD-L1 сигнал, що призведе до анергії, а потім до апоптозу такої клітини.

1.3 Молекули імунних контрольних точок; роль PD1 та CTLA-4 у імунній системі.

Білки імунних контрольних точок представляють собою молекулярні регулятори з активуючою або інгібуючою дією, що відіграють ключову роль у підтримці імунного гомеостазу та запобіганні розвитку автоімунних реакцій. Активуючі молекули контрольних точок, наприклад, CD28, OX40, CD137(4-1BB) та CD27 посилюють функції Т-клітин. Натомість інгібаторні молекули, такі як CTLA-4, PD-1, TIM-3, VISTA виконують супресорну функцію, пригнічуючи Т-клітинну відповідь з метою уникнення надмірної імунної активності (гіперактивації) та розвитку аутоімунних реакцій. Білки імунних контрольних точок забезпечують динамічну регуляцію рівноваги між ко-стимулювальними та ко-інгібаторними сигналами, що контролюють активність Т-клітин. При раку часто активуються сверхекспресія інгібаторних імунних контрольних точок, які захищають пухлинні клітини від імунного нагляду.

Таким чином, вплив на білки імунних контрольних точок є однією з найактивніших галузей досліджень раку. Зокрема, інгібатори контрольних точок, спрямовані на вісь PD-1/PD-L1 та CTLA-4, були схвалені для лікування різних типів раку [10].

1.3.1 Роль PD1 у нормальному стані.

Активация Т-клітини контролюється негативним зворотним зв'язком, який виражається у двох контрольних точках – через білок CTLA-4 та шлях PD1.

Шлях PD1 посиляє всередину клітини основний інгібуючий сигнал, який призводить до пригнічення активності Т-лімфоциту і зрештою призводить до апоптозу. Рівень експресії білків B7 на активованій АПК вищий, ніж PD-L1, тому сумарний активуючий сигнал має набагато більшу інтенсивність, ніж інгібуючий, що результує нормальну активацію Т-клітини. За відсутності взаємодії CD28:B7 клітина отримує переважно інгібуючий сигнал, не отримуючи костимулюючого, що веде до анергії та згодом до апоптозу. Костимулюючі молекули, що експресуються на АПК, такі як CD80 та CD86, зв'язуються з CD28 на Т-клітинах, забезпечуючи костимулюючі сигнали, повністю активуючи Т-клітини для специфічного націлювання та знищення клітин, інфікованих патогенами. Негативні костимулюючі молекули, такі як CTLA4 та PD-1, відіграють важливу роль у профілактиці запалення тканин та аутоімунних захворювань у нормальних фізіологічних умовах, уникаючи надмірної активації Т-клітин.

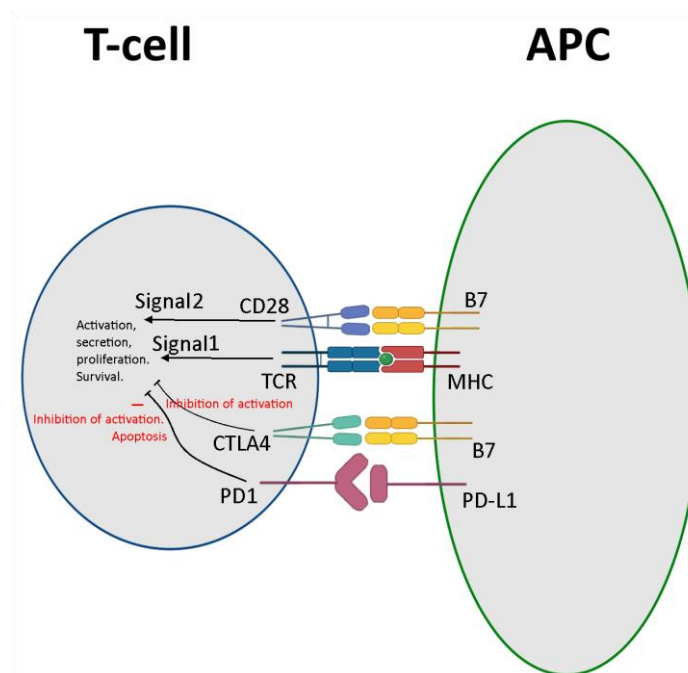


Рис. 1.3.1.1. Загальна дія системи подвійного сигналу та контролюючих її інгібуючих сигналів.

Більш детально механізм імунної регуляції осі PD-1/PD-L1 представлений на зображенні нижче.

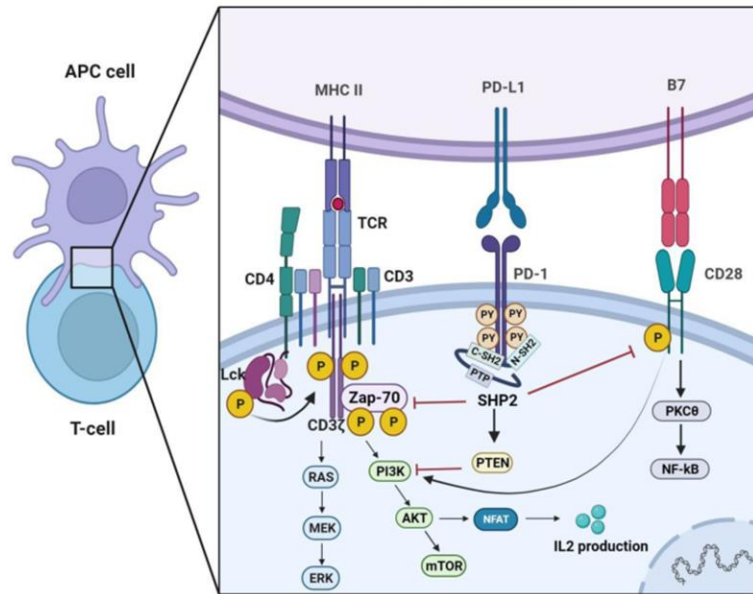


Рис. 1.3.1.2. Докладніше про уявлення механізму імунної регуляції осі PD-1/PD-L1 [28].

Антигенпрезентуючі клітини (APC) доставляють для розпізнавання антигени до Т-клітинного рецептора (TCR) через головний комплекс гістосумісності (МНС). Коли комплекс МНС-антиген специфічно зв'язується з TCR, він запускає серію сигнальних трансдукцій, включаючи сигнальні шляхи фосфатидилінозиту і мітоген-активованих протеїнкіназ, тим самим активуючи імунні відповіді ефektorних Т-клітин. Поряд із цим запускається костимулюючий сигнал CD28/B7 що призводить до підвищення активності Т-клітин, продукції запальних цитокінів, прогресування клітинного циклу та факторів транскрипції ядерного фактора В (NF-κB), активаторного білка 1 (AP-1) та NF-AT. При зв'язуванні PD-1 з PD-L1 відбувається фосфорилювання залишків тирозину в доменах ITSM та ITIM цитоплазматичної області PD-1, рекрутуючи та активуючи SHP2. Згодом рекрутований SHP-2 опосередковує дефосфорилювання пов'язаних із TCR-сигналом CD3 та ZAP70, одночасно інгібуючи костимулюючі сигнали CD28. Це послаблює силу сигналу TCR та секрецію цитокінів, таких як IL-2. При нормальному контакті АПК/Т-клітина рівень експресії костимулюючих молекул, значно вищий, ніж ігнібуючих, що результує активацію Т-клітини в результаті. Шлях PD1/PD-L1 та CTLA-4 (експресується при отриманні костимулюючого сигналу від CD28:B7 і

конкурентно зв'язує B7) мають регулювати активуючий сигнал, оберігаючи клітину від надмірної активації та аутоіmunітету.

Сигнал PD1 працює завжди, тому якщо ефекторна клітина імунної відповіді отримує переважаючий сигнал від взаємодії PD1:PD-L1/PD-L2 це провокує пригнічення її дії, і, зрештою, апоптоз. Цей механізм використовується для формування імунотолерантності до певних важливих ділянок. Прикладом застосування такого механізму може бути експресія ліганду PD-1 – PD-L1, вона відбувається в імунопривілейованих ділянках, таких як рогівка, сітківка та райдужно-циліарне тіло. Ліганди до молекули PD-1 слабо експресуються на більшості клітин організму, що стримує ефекторні Т-лімфоцити від надмірної активації через стимуляцію взаємодії TCR/МНС-пептид під час імунної відповіді.

Ще один приклад – протягом всієї вагітності в плаценті людини PD-L1 та PD-L2 експресуються у різних популяціях клітин плода та матері, включаючи синцитіотрофобласти, цитотрофобласти та децидуальні стромальні клітини. Таким чином, ці молекули імунних контрольних точок сприяють – разом з іншими імунними регуляторними механізмами – активної імунотолерантності вагітності та захищають плід від імунологічного відторгнення [14].

При нормальному фізіологічному стані сигнальний шлях PD-1/PD-L1 може ефективно пригнічувати надмірну активацію імунних клітин, тим самим уникаючи серйозного стійкого пошкодження тканин та беручи участь у підтримці імунної толерантності до власних антигенів [8]. Порушення балансу реалізації PD-1 може призвести до виникнення імуного дисбалансу вираженому у надмірної супресії імунної відповіді як локально так і на рівні усього організму. Зокрема, клітини ракової пухлини можуть реалізувати інгібуючий шлях PD1/PD-L1 в результаті мутацій пов'язаних з активністю експресії лігандів до PD1, щоб уникнути імуного нагляду господаря шляхом надекспресії PD-L1. У нормальних умовах PD-L1 слабо експресується

більшості клітин, але він високо експресується на поверхні ракових клітин людини.

Регуляція експресії білка PD-L1 на поверхні клітин була досліджена за допомогою двох незалежних скринінгів із застосуванням CRISPR-Cas9 у клітинах раку підшлункової залози та гаплоїдних людських клітинах HAP1. В обох дослідженнях білок SMTM6 був ідентифікований як ключовий стабілізатор PD-L1 у широкому спектрі злоякісних новоутворень, включаючи меланому, рак підшлункової залози, щитоподібної залози, молочної залози, недрібноклітинний рак легень (НДРЛ) та колоректальний рак. Було встановлено, що SMTM6 зв'язується з PD-L1 і колокалізується з ним на плазматичній мембрані та у рециркулюючих ендосомах, що запобігає деградації PD-L1, яка залежить від лізосом під час рециркуляції. У відсутності SMTM6 пухлинні клітини демонструють значне зниження рівня PD-L1 на поверхні, яка могла бути частково відновлена шляхом видалення убіквітинлігази STUB1 E3 — ферменту, який відповідає за деградацію PD-L1 та, як наслідок, пригнічення експресії PD-L1. Модифікований геномний скринінг у клітинах із дефіцитом SMTM6 виявив SMTM4, але не інші представники сімейства SMTM як додатковий регулятор експресії PD-L1. Важливо зазначити, що дефіцит SMTM6 призводив до пригнічення конститутивної та індукованої інтерфероном- γ (IFN- γ) експресії PD-L1 на пухлинних клітинах без впливу на рівень транскрипції PD-L1. Таким чином, дестабілізуючи PD-L1 на пухлинних клітинах, шляхом виснаження SMTM6 значно знижувало інгібіторний вплив PD-L1 на пухлино-специфічні Т-лімфоцити як *in vitro*, так і *in vivo*. Отримані дані підкреслюють SMTM6 як перспективну молекулярну мішень для імунотерапевтичних стратегій, спрямованих на подолання імунної супресії в пухлинному мікрооточенні (TME).

1.3.2. Роль CTLA-4 у нормальному стані.

Для підтримки імунного гомеостазу організму та придушення аутоімунітету імунна система повинна строго регулюватися, особливо активність Т-клітин, оскільки вони відіграють важливу роль в аутоімунній регуляції. Після того, як Т-клітини отримують перший активуючий сигнал, зв'язування CD28 з B7 активованих АПК посилює сигналізацію Т-клітин і запобігає несприйнятливості або анергії Т-клітин. Після активації Т-клітин CTLA-4 мотивується переміщатися до клітинної мембрани і конкурувати з CD28 за зв'язування з CD80/86 активованих АПК. Сигнал CTLA-4, безпосередньо і через ДК, інгібує активацію Т-клітин, проліферацію та вироблення цитокінів, тим самим знижуючи активність Т-клітин, оберігаючи клітину від надмірної стимуляції, гіперактивації та формування аутоімунних реакцій. CTLA-4 порушують сигналізацію TCR/CD3 і CD28/B7 і призводять до зниження активності Т-клітин, імунної відповіді та продукції запальних цитокінів, прогресування клітинного циклу та інгібують вироблення факторів транскрипції ядерного фактора В (NF-κB), активаторного білка 1 (AP-1) та NF-AT [12]. Регуляція експресії CTLA-4 є здійснюється численними факторами, включаючи індукцію експресії після взаємодії Т-клітинного рецептора (TCR) з антигеном (ліганд-індукуюча експресія), швидку інтерналізацію, рециркуляцію та деградацію. Після активації TCR, CTLA-4 транспортується до клітинної поверхні завдяки утворенню комплексу з молекулою TRIM у транс-мережі апарата Гольджі (TGN).

Дослідження показали, що цитотоксичний Т-лімфоцит-асоційований білок 4 (CTLA-4) виступає ключовим негативним регулятором імунної відповіді, також відіграючи важливу роль у патогенезі аутоімунних захворювань. Поліморфізми в локусі гена CTLA4, зокрема +49 G/A, CT60, -1661A/G та інші, вже тривалий час асоціюються з аутоімунітетом.

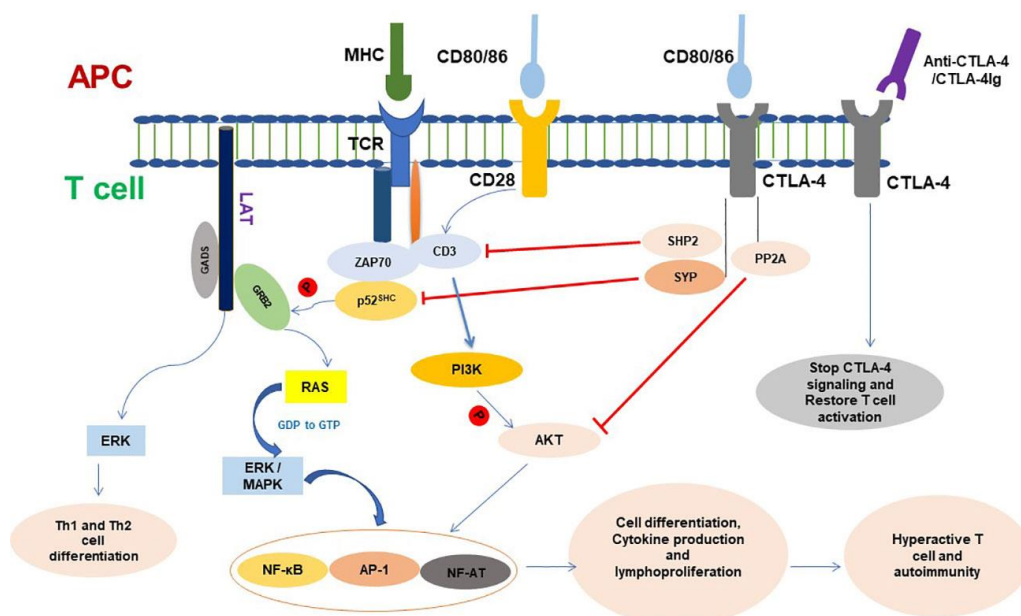


Рис. 1.3.2.1. Дія інгібуючої молекули CTLA-4 [12]. У випадках порушення балансу експресованих костимулюючих та інгібуючих молекул на поверхні клітин або надмірної експресії CTLA-4 у Tregs, можна застосувати блокатори CTLA-4 для того, щоб змінити баланс сигналу у бік стимулюючого та спровокувати активацію імунної відповіді.

У регуляторних Т-лімфоцитах (Treg) білок CTLA-4 експресується конститутивно і є ключовим інструментом їх імуносупресивної активності. Він взаємодіє з костимулювальними молекулами CD80 та CD86 (субодиниці B7) на поверхні антигенпрезентувальних клітин, індукуючи інгібуючий сигнал, що призводить до зниження експресії CD80/CD86 на АПК. Одночасно підвищується експресія ферменту індоламін-2,3-діоксигенази (IDO) у дендритних клітинах, наділяючи ДК властивостями імунологічної толерантності. Фермент IDO, що вивільняється з ДК, діє як імуnoreгулятор для Т-клітин, виснажуючи триптофан, чим спричиняє зниження їх активності. Втрата або недостатність експресії CTLA-4 у Treg-клітинах призводить до порушення їх супресорної функції *in vivo*, що зумовлює аномально високу активацію і проліферацію ефektorних Т-лімфоцитів, сприяючи розвитку аутоімунних процесів.

Було виявлено, що CTLA-4 сприяє утворенню регуляторних Т-клітин CD4⁺CD25⁺ за рахунок збільшення експресії FoxP3, яка індукується трансформуючим фактором росту (TGF- β) [12].

Таким чином, CTLA-4 регулює сигналізацію Т-клітин, модулює активність Т-клітин, запобігаючи їх гіперактивації, підтримує баланс імунітету та захищає організм від аутоімунних захворювань.

1.4 Взаємодія імунної системи і пухлини: зміни імунорезистентності в онкогенезі.

1.4.1 Взаємодія імунної системи і пухлини.

Однією з ключових функцій імунної системи є розпізнавання та елімінація клітин, що експресують чужорідні або змінені поверхневі антигени, незалежно від їхнього походження – чи походять вони від інфекційного патогену, чи внаслідок мутації чи зміни нормальних клітинних білків. Таким чином, ріст та метастазування пухлини є результатом не лише трансформації клітин у чужорідні до організму у результаті дії канцерогенних факторів та мутагенних факторів, але й стійкості до захисних механізмів хазяїна або ухилення від них. Схема, представлена на рисунку 1.4.1, ілюструє взаємодію між пухлиною та хазяїном, що бере участь в індукції та імунній відповіді.

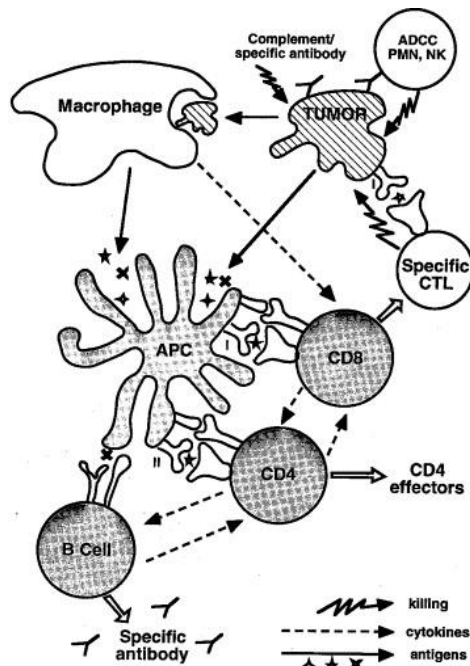


Рис. 1.4.1. Взаємодія між пухлиною та імунною системою організму [1].

Дослідження взаємодії раку та імунної системи показали, що кожен відомий ефекторний механізм вродженого та адаптивного імунітету бере участь у розпізнаванні та контролі пухлини. В нормі, перші трансформовані клітини виявляються NK-клітинами на основі сигналів від кількох активуючих та інгібуючих рецепторів, в результаті їхньої взаємодії зі специфічними лігандами на пухлинних клітинах. Після успішної ідентифікації трансформованої клітини, NK-кілери вивільнюють білки-ферменти (перфорини та гранзими), які містяться в гранулах клітин. Саме ці ферменти знищують пухлинні клітини – призводять до руйнування. Після поглинання та обробки їхніх фрагментів макрофагами та дендритними клітинами, ці макрофаги та дендритні клітини активуються для секреції багатьох запальних цитокінів та презентації молекул, що походять з пухлинних клітин, Т- та В-клітинам. Активація Т- та В-клітин результується продукуванням додаткових цитокінів, які ще більше сприяють активації вродженого імунітету та підтримують розширення та продукцію пухлиноспецифічних Т-клітин CD8⁺ та антитіл відповідно. Повна потужність адаптивної імунної системи задіюється саме з формуванням популяції Т-клітин CD8⁺, специфічних до

клітин конкретної пухлини. Це призводить до активного знищення пухлинних клітин і, що важливо, до формування імунної пам'яті до специфічних компонентів пухлини, що слугуватиме для запобігання рецидиву пухлини .

Ефекторні компоненти адаптивної імунної системи, зокрема CD4+ Т-хелпери, CD8+ цитотоксичні Т-лімфоцити та антитіла, специфічно націлені на пухлинні антигени, тобто молекули, що експресуються в самі пухлинних клітинах. Пухлинні антигени – це нормальні клітинні білки, які аномально експресуються в результаті генетичних мутацій, кількісних відмінностей в експресії або відмінностей у посттрансляційних модифікаціях. У типах пухлин, що мають добре задокументоване вірусне походження, таких як рак шийки матки, спричинений вірусом папіломи людини, або гепатоцелюлярна карцинома, спричинена вірусом гепатиту В, вірусні білки також можуть служити пухлинними антигенами та мішенями для протипухлинної імунної відповіді [3].

Зараз визнано, що у різних людей та з різними видами раку цей процес може мати щонайменше три різні, але пов'язані результати: ліквідацію, рівновагу та втечу. Високоімуногенна пухлина у високоімунокомпетентної особи призведе до оптимальної стимуляції вродженої імунної системи, що спричинить вироблення високоімуностимулюючих цитокінів, гострого запалення, активації великої кількості Т- та В-клітин та швидкої ліквідації пухлини, що виникає. Однак у менш імунокомпетентної особи та/або менш імуногенної пухлини повної ліквідації може не бути, що призведе до виживання деяких ракових клітин, які, тим не менш, залишаються під імунним спостереженням. Протягом тривалого періоду часу повільний ріст пухлини супроводжуватиметься багаторазовою активацією імунної системи та елімінацією деяких пухлинних клітин, після чого відбуватимуться подальші цикли повторного росту пухлини та її імуноопосередкованого руйнування. Цей період, коли пухлина присутня, але ще не є клінічним захворюванням, відомий як рівноважний. Рівноважна фаза може тривати довічно, імітуючи

елімінацію, або бути порушеною змінами в пухлині, які дозволяють їй уникати імунного нагляду, або змінами в імунній системі, які послаблюють її здатність до нагляду за пухлиною. Будь-яка з цих змін зрештою призводить до втечі пухлини [3].

Більшість досліджень взаємодії пухлини та імунної системи проводилися після діагностики раку, тобто у фазі виходу з імунного спостереження. Ця конкретна фаза характеризується збільшенням кількості імуносупресивних клітин (iT-regs, накопичуються в пухлинах та периферичній крові пацієнтів з раком і шляхом пригнічення протипухлинної імунної відповіді сприяють росту пухлини, шлях PD1 сприяє їх розвитку) та мієлоїдні супресорні клітини (MDSC), імуносупресивних цитокіни, що походять від T-reg, MDSC та пухлинних клітин, а також підгрупи Т-клітин, які перебувають у стані зниженої реактивності, відомому як виснаження Т-клітин (Тех-клітини). Тех-клітини характеризуються підвищеною експресією високоінгібіторних рецепторів, включаючи PD-1, LAG3 та TIGIT, зниженою продукцією цитокінів, таких як TNF, IL-2 та IFN- γ , метаболічними змінами та погіршенням проліферативної здатності та виживання.

Пухлинні клітини здатні вивільняти різні цитокіни, включаючи IL-1, IL-6, IL-10, простагландин E2 (PGE2), трансформуючий фактор росту бета (TGF- β), фактор росту судинного ендотелію (VEGF), фактор, що стимулює колонії макрофагів (M-CSF), фактор інгібування міграції макрофагів (MIF). Крім того, пухлинні клітини також можуть виділяти сигнальні білки, такі як послідовність A (MICA) або B7-H6, пов'язана з головним комплексом гістосумісності (MHC) класу I, тим самим пригнічуючи активацію Т-клітин та НК-клітин. Крім того, пухлинні клітини можуть вивільняти розчинні фактори, за допомогою яких вони можуть пригнічувати імунні відповіді. Всі ці пухлинні фактори можуть діяти локально в межах пухлинного мікрооточення (ТМО), але також поширюватися системно через кров'яний компартмент, опосередковуючи віддалені ефекти (наприклад, на кістковий мозок,

лімфатичні вузли та селезінку) і таким чином опосередковуючи системне пригнічення імунітету. Багато з цих факторів можна виміряти в плазмі крові та/або сироватці крові, і тому їх вивчають на предмет їх використання як біомаркерів прогресування пухлини або ефективності лікування, але вони також можуть бути використані для отримання показань до пригнічення імунітету. Так, рівні цитокінів, хемокинів та ММР вимірюються за допомогою ELISA [2].

1.4.2 Фагоцитоз при виникненні ракової пухлини.

Клітини вродженої імунної системи, що представлені NK-кілерами, нейтрофілами, моноцитами, макрофагами, дендритними клітинами (останні 2 виконують функції антигенпрезентувальних клітин), формують першу лінію імунологічної системи захисту організму. Ці клітини ініціюють прозапальні сигнальні каскади у відповідь на патогенну інвазію а також інфільтрують патоген. Фагоцитоз, як правило, стимулюється внаслідок взаємодії фагоцитарних рецепторів із відповідними лігандами, що діють як сигнали до поглинання клітинної мішені. Злоякісні клітини здатні уникати очищення макрофагами шляхом гіперекспресії мембранних білків з антифагоцитарними властивостями, таких як кластер диференціації 47 (CD47), CD24, білок програмованої клітинної смерті-ліганд 1 (PD-L1), β 2-мікроглобулін (β 2M) — складова молекул головного комплексу гістосумісності класу I (MHC-I), станіокальцин-1 (STC-1) і гангліозид GD2. Антифагоцитарні та фагоцитарні мембранні білки представлені на схемі 1.4.2.1.

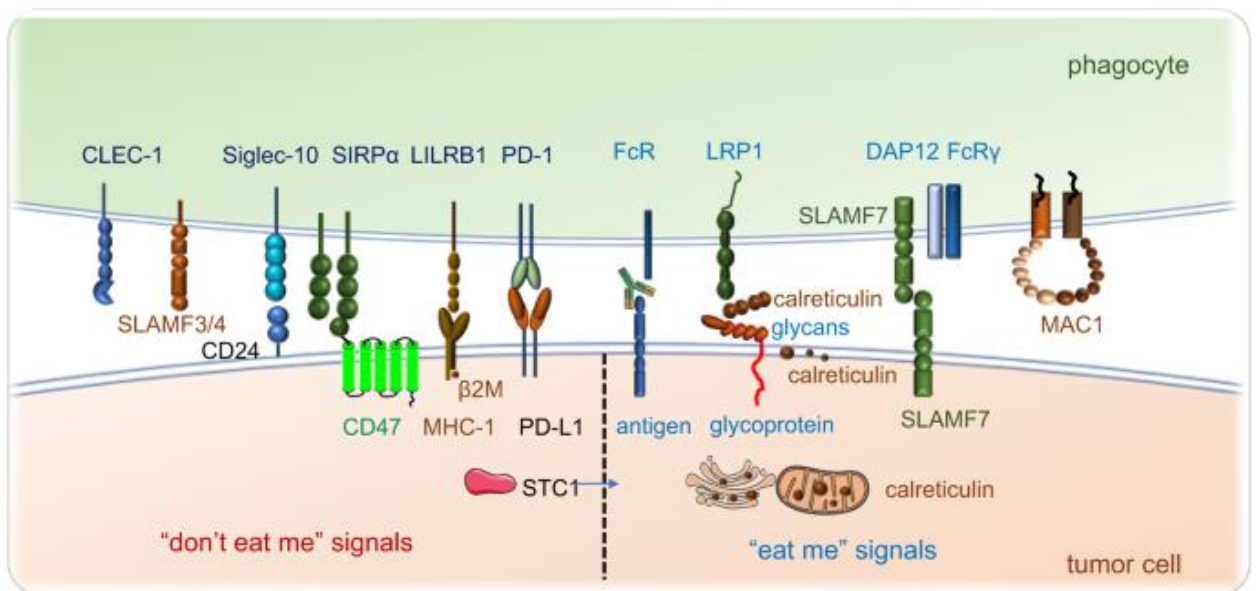


Рис. 1.4.2.1 Антифагоцитарні та фагоцитарні мембранні білки [11].

Серед усіх контрольних точок фагоцитозу найбільш докладно досліджено сигнальну вісь білка CD47 та його рецептором SIRPα (signal regulatory protein alpha, експресується макрофагами), що стала першою контрольною точкою, як терапевтична мішень у лікуванні злоякісних новоутворень.

1.4.3 Порухення експресії молекул ГКГС на малегнізованих клітинах.

Молекули головного комплексу гістосумісності класу I (МНС-I) це елемент розпізнавання на поверхні клітин, який експресується на всіх соматичних клітинах, включаючи всі імунні клітини. Вони беруть участь в основному в адаптивних імунних реакціях, опосередкованих Т-клітинами, але МНС-I також бере участь у механізмах вродженого імунітету. МНС-I присутній на поверхні антигенних клітин (АРС), включаючи дендритні клітини (DC) та макрофаги. Антигенпрезентувальні клітини (АРС), зокрема дендритні клітини та макрофаги, здійснюють презентацію ендогенних антигенних пептидів завантажуючи їх у молекули МНС-I в ендоплазматичному ретикулумі. Там формується функціонально активний тримерний комплекс, що включає пептид, МНС-I та β2m. Після проходження посттрансляційних модифікацій у апарату Гольджі, комплекс транспортується до плазматичної мембрани, де

відбувається його презентація для розпізнавання CD8⁺ Т-клітинами. Таким чином, МНС-I з'єднує вроджений та адаптивний імунітет через антигенпрезентуючі клітини.

Ракові новоутворення генетично нестабільні та можуть втрачати експресію молекул через втрату генів або епігенетичне заглушення. Молекули МНС I та більшість інших молекул шляху презентації антигену МНС I не є необхідними для життєздатності або росту клітин. Отже, ракові захворювання можуть знижувати регуляцію або втрачати презентацію антигену МНС I, і тим самим ставати менш стимулюючими або навіть невидимими для CD8 Т-клітин, не погіршуючи їхню здатність до росту та метастазування [28]. Природні кілери CD56⁺CD16⁺, які є першою лінією захисту від малігнізованих клітин все ще можуть інфільтрувати пухлину, так як вони індукують апоптоз або некроз пухлинних клітин за відсутності на пухлинній поверхні молекул МНС I класу, які забезпечують сигнал «свого» (конститутивна область МНС I класу забезпечує кілінг-інгібуючий сигнал).

1.4.4 Роль шляху PD-1/PD-L1 у інгібуванні CD8⁺ Т-клітин та формуванні ефекту ухилення пухлини від імунної відповіді. Роль CTLA-4 у придушенні протиракового імунітету.

Інвазія пухлини, метастазування та рецидив є складними процесами за участю багатьох генів та багатоетапним розвитком, які формуються взаємодією внутрішніх факторів та зовнішніх факторів та являють собою динамічну взаємодію кліренсу, балансу та ухилення між імунною системою та пухлиною. Взаємодія між PD-1 та PD-L1 може передавати інгібуючі сигнали всередині клітин, пригнічуючи проліферацію та активацію лімфоцитів, тим самим знижуючи імунний потенціал. Отже, пухлинні клітини часто сприяють власному виникненню та зростанню, «захоплюючи» цю вісь у результаті мутацій. Коли лімфоцити розпізнають пухлинні антигени, вони ініціюють «адаптивну резистентність», опосередковану шляхом PD-1/PD-L1, щоб

сприяти імунному ухиленню пухлини та віддаленому метастазуванню. Зокрема, це проявляється таким чином: взаємодія PD-1/PD-L1 пригнічує активацію та проліферацію Т-клітин, сприяючи дисфункції Т-клітин та апоптозу. Взаємодія PD-1/PD-L1 посилює функцію регуляторних Т-клітин (Tregs) та індукує ненормативну імунну толерантність. Цитотоксичний білок 4 імунних контрольних точок (CTLA-4) і регуляторні Т-клітини (Treg) відіграють ключову роль у придушенні протиракового імунітету. Молекули CTLA-4 зв'язуються з CD80 та CD86 з більш високою афінністю, ніж CD28, і діють як конкурентні інгібітори CD28. Клітини Treg пригнічують антигенпрезентуючі клітини (АПК), інгібуючи виробництво імуностимулюючих цитокінів, продукуючи імуносупресивні цитокіни та конститутивно експресуючи CTLA-4. Взаємодія PD-1/PD-L1 сприяє поляризації TAM (пухлиноасоційовані макрофаги (TAM) - це імунні клітини, які у великих кількостях знаходяться в мікросередовищі солідних пухлин і беруть участь у раковому запаленні. Ці клітини походять або з моноцитів крові, отриманих з кісткового мозку (моноцитарні макрофаги), або попередників жовткового мішка (тканинні резидентні макрофаги)), проте їхнє точне походження в пухлинах людини поки не до кінця вивчене. Хоча існують деякі розбіжності, більшість даних свідчать про те, що TAM мають пропухлинний фенотип. Ці клітини впливають на різні процеси в пухлині, сприяючи зростанню пухлинних клітин, утворенню нових судин, інвазії, метастазування, придушенню імунної відповіді та розвитку лікарської стійкості, сприяючи розвитку пухлини, сприяючи імунному ухилянню та прогресуванню раку. Сигналізація PD-L1 всередині ракових клітин може запобігти апоптозу самих пухлинних клітин [8, 9].

Т-клітини відіграють важливу роль в імунітеті пухлин, а також є важливим медіатором сигналів активації або інгібування, що передаються молекулами корецепторів Т-клітин. PD-1, рецептор контрольної точки, що експресується на Т-клітинах, зазвичай запобігає надмірній імунній стимуляції ефektorних Т-

клітин, коли він отримує сигнали від свого ліганду PD-L1; однак при високому рівні стимуляції (що виникає при підвищеній експресії клітинами PD-L1) він викликає виснаження Т-клітин. Тобто, у нормальних умовах PD-L1 слабо експресується на більшості клітин, але він високо експресується на поверхні ракових клітин людини. Тривалий вплив може призвести до порушення регуляції або дисфункції підгрупи Т-клітин, які перебувають у стані зниженої реактивності, відомому як виснаження Т-клітин (Тех-клітини). Тех-клітини мають порушені ефекти знищення та піддаються різним моделям диференціації. Вони характеризуються підвищеною коекспресією інгібуючих рецепторів (PD-1, LAG3 і TIGIT тощо), зниженою продукцією цитокінів (IL-2, TNF та IFN- γ тощо), метаболічними змінами, а також погіршенням здатності до проліферації та виживання. Нарешті, Т-клітини повністю виснажуються і піддаються апоптозу, багато механізмів можуть пояснити цей процес [8].

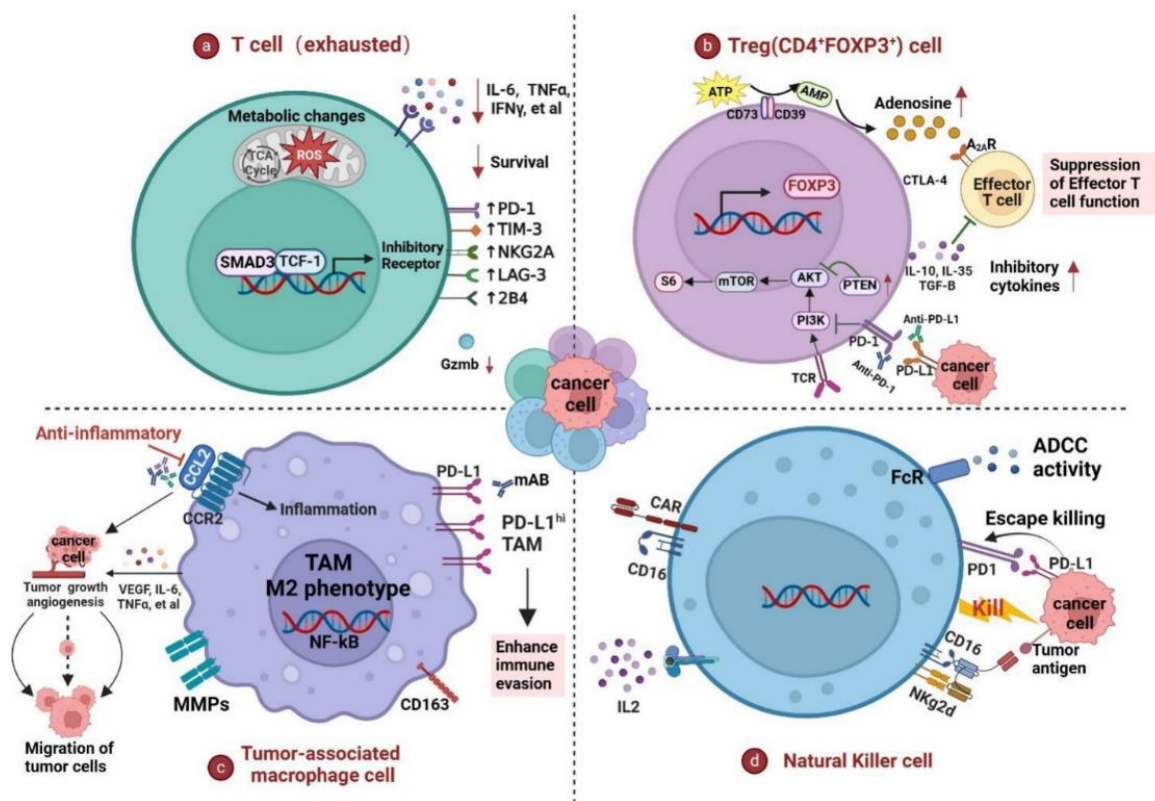


Рис. 1.4.4.1. Регуляція сигналізації PD-1/PD-L1 на імунних клітинах [27].

На малюнку вище показані різну дію сигналізації PD-1/PD-L1 на імунних клітинах.

А. Шлях PD-1/PD-L1 сприяє виснаженню та апоптозу ефektorних Т-клітин. Тех-клітини характеризуються підвищеною експресією високоінгібіторних рецепторів, включаючи PD-1, LAG3 та TIGIT, зниженою продукцією цитокінів, таких як TNF, IL-2 та IFN- γ , метаболічними змінами та погіршенням проліферативної здатності та виживання [8].

В. Існує 2 основних підмножини Tregs: nTreg походять з тимуса та виконують свою функцію опосередковування імунної толерантності через транскрипційні фактори, такі як ядерний фактор κB (NF- κB). iTreg розвиваються на периферії та стимулюються цитокінами в мікрооточенні пухлини (TME), такими як IL-2 та інгібіторний цитокін трансформуючий фактор росту β (TGF- β), що додатково допомагає уникнути імунного нагляду. Хоча Treg-клітини можна класично розділити на nTregs та iTregs, їхній фенотип змінюється залежно від типу пухлин [36]. Індуковані в мікросередовищі пухлини, iTreg набувають властивостей, необхідних для інгібування імунних реакцій, що відбуваються локально. Treg, присутні у онкологічних хворих, загалом є адаптивними або індукцибельними Treg (iTreg, Tr1, образуються на периферії). Вони відрізняються від природних nTreg, що отримуються з тимуса (nTreg), відповідальних за підтримку периферичної толерантності у здорових донорів. iTreg, виділених з пухлин людини, опосередковують сильніше пригнічення та можуть використовувати ширший спектр супресорних механізмів, ніж nTreg [34]. PD-L1 може перетворювати циркулюючі наївні CD4 + Т-клітини на Treg шляхом зниження регуляції Akt, mTOR та ERK2 та одночасного підвищення регуляції PTEN. PD-1/PD-L1 посилює функції імуносупресії Treg-клітин: по-перше, Treg-клітини споживають IL-2 з TME через свій високоафінний ланцюг рецептора IL-2 α (CD25) для пригнічення проліферації та активації Т-клітин; по-друге, Treg-клітини, що експресують CTLA-4, зв'язуються з костимуляторними

молекулами (CD80 та CD86) на APC та зменшують їх кількість з більшою авідністю порівняно з CD28, позбавляючи стимуляційного сигналу Т-клітини; крім того, Трег-клітини секретують інгібіторні цитокіни (TGF- β , IL-10 та IL-35), створюючи імуносупресивне середовище, спрямоване на CD4 + Т-клітини, CD8 + Т-клітини та NK-клітини [35]. В результаті популяції Tregs виходять з стану балансу та кількісної норми, який забезпечує нормальну супресію, у кількісний перевищення у сторону iTreg, що результується потужними супресивними діями у бік ефektorних клітин імунної системи.

С. Сигнальна вісь PD-1/PD-L1 сприяє функціональній поляризації пухлиноасоційованих макрофагів (TAM) у бік фенотипу M2, вивільняючи велику кількість фактора росту фібробластів (FGF), VEGF, TNF- α та інших цитокінів для стимуляції ангіогенезу та підтримки пригнічення імунітету та метастазування ракових клітин, прискорюючи прогресування раку.

D. PD-1 на NK-клітинах зв'язується з PD-L1 на ракових клітинах, інгібуючи дегрануляцію та цитотоксичну функцію NK-клітин, знижуючи їхню здатність вбивати пухлинні клітини та сприяючи ухиленню пухлини від імунної відповіді. Використання інгібіторів PD-1 та PD-L1 може реактивувати протипухлинну імунну відповідь зазначених вище імунних клітин [8].

Зв'язування рецептора PD-1, експресованого на Т-лімфоцитах, з його лігандом PD-L1, представленим на поверхні пухлинних клітин, ініціює передачу інгібувального сигналу, який пригнічує TCR-опосередковану сигналізацію. Це призводить до функціонального порушення Т-клітин, і при подальшій взаємодії виснаження ефektorних Т-клітин. PD-1 блокує експресію антиапоптотичного гена Bcl-xL, інгібуючи активацію Akt, що знижує клітинну виживаність Т-лімфоцитів.

1.5 Розробка нових біотехнологічних методів боротьби з раковими пухлинами.

1.5.1 Персоніфікована імунотерапія.

Поширеними методами лікування раку або зменшення пухлинного навантаження є хірургічне втручання, хіміотерапія та променева терапія. Але вищевказані методи часто не враховують індивідуальні особливості пацієнтів, такі як молекулярний профіль пухлини та імунологічний статус і шляхи ухилення пухлин від імуно-генетичного нагляду, вони в даний момент демонструють недостатньо високий рівень ефективності, у вигляді частих рецидивів вже протягом декількох років після лікування. Тому на початку минулого десятиріччя був розроблений новий біотехнологічний метод боротьби з раковими пухлинами (та був зафіксований його клінічний успіх), який називається імунотерапією. Імунотерапія демонструє багатообіцяючі клінічні результати у пацієнтів із різними формами злоякісних новоутворень, однак її повний терапевтичний потенціал ще має бути розкритий через активне вивчення механізмів порушень імунної резистентності при боротьбі імунної системи людини з малегнізованими клітинами, які утворюються внаслідок спонтанного та індукованого мутагенезу.

Метою імунотерапії є модуляція протипухлинного імунітету для зміни поточної імунної відповіді на активну пухлино-відторгаючу, забезпечуючи таким чином стійкий та адаптивний контроль над раком. Імунотерапія може поєднуватись з традиційними методами лікування раку такими як хірургічне втручання/хіміотерапії, для досягнення максимальної ефективності.

В імунотерапії раку імунна система посилюється для боротьби з раком шляхом: (1) збільшення кількості цитотоксичних лімфоцитів (наприклад, шляхом вакцинації, шляхом адоптивного перенесення аутологічних пухлинно-специфічних Т-клітин, Т-клітин з модифікованими рецепторами або

NK-клітин, активованих *ex vivo*); (2) активації ендогенних пухлинно-специфічних Т-клітин агоністичними антитілами проти костимуляторних молекул (наприклад, CD28, CD137, CD154, член суперродини 4 рецептора фактора некрозу пухлини (OX40) та костимулятор індукцибельних Т-клітин (ICOS)); (3) блокування контрольних шляхів, що діють на протипухлинні Т-клітини, шляхом введення антитіл проти коінгібіторних молекул (наприклад, цитотоксичного Т-лімфоцитарного антигену 4 (CTLA-4), білка програмованої клітинної смерті 1 (PD-1), Т-клітинного імуноглобуліну та муцинового білка 3 (TIM3), V-доменного імуноглобуліну, супресора активації Т-клітин (VISTA)); (4) полегшення пригнічення, індукованого регуляторними Т-клітинами (Tregs), мієлоїдними супресорними клітинами (MDSC), пухлинно-стимулюючими макрофагами (так званими макрофагами 2 типу (M2) або TAM) або пухлиноасоційованими нейтрофілами 2 типу (N2 або TAN); та/або (5) шляхом використання моноклональних антитіл (mAb), безпосередньо спрямованих на пухлинні клітини (наприклад, CD20, HER-2, CD52 та рецептора епідермального фактора росту (EGFR)) [2].

Біотехнологічні методи імунотерапії раку, що включає головним чином терапію, спрямовану на імунні контрольні точки (таргетні терапії), та метод адоптивного переносу сконструйованих імунних клітин (Car T-клітинна терапія, буде розглянута нижче), здійснили революцію в онкомедицині, оскільки вона використовує власну імунну систему пацієнтів у боротьбі з раковими клітинами.

Терапевтичні заходи, спрямовані на протидію ефекту ухилення пухлин від імунної відповіді які виражені таргетними терапіями за допомогою моноклональних антитіл реалізують блокування контрольних шляхів, що діють на протипухлинні Т-клітини, шляхом введення антитіл проти коінгібіторних молекул. Цей тип терапії націлений на зниження сверхекспресії специфічних мутантних генів, які активно продукують інгібіторні рецептори, тобто ракові клітини уникають імунного нагляду, захоплюючи відповідні

інгібіторні шляхи через надмірну експресію генів контрольних точок. На сьогодні відомі різні типи мутацій генів рецепторів імунних клітин. Для таргетної терапії за допомогою моноклональних антитіл найбільш часто використовують інгібітори рецептору CTLA-4, експресія якого здійснює конкурентну супресорну дію на Т-лімфоцити (більш детально розглядалося в розділах 1.3, 1.4), EGFR (epidermal growth factor receptor, мутації, пов'язані з EGFR, призводять до постійної активації, що призводить до неконтрольованого поділу клітин), та PD-1, вплив якого викликає виснаження Т-клітин, інгібуючи їх активність, що дозволяє пухлині ухилятися від імунного нагляду (більш детально розглянуто у розділі 1.4). За наявності мутацій генів-кандидатів використовують препарати моноклональних антитіл для інгібування сверхекспресії мутантних генів. Було доведено, що це більш ефективно, ніж хіміотерапія. Ін'єкції моноклональних антитіл зв'язуються з антигенами на поверхні пухлинних клітин, що в результаті дозволяє активувати такі ефекторні механізми господаря як фагоцитоз та CD8+клітини з NK-клітинами, які руйнують клітини.

У онкохворих спостерігають неефективну Т-клітинну відповідь на пухлину, що спричиняється активацією інгібіторних рецепторів на пухлиноспецифічних Т-клітинах. Високоєфективними методами лікування є блокування рецепторів CTLA4 та PD1 антитілами. Моноклональні антитіла до CTLA4 блокують взаємодію рецептора CTLA4 з лігандами CD80/CD86 на антигенпрезентуючих клітинах («блокада імунних контрольних точок»). Ця таргетна терапія приводить до активації CD8 Т-лімфоцитів-кілерів [18].

Сучасні лікувальні протоколи піддаються постійній корекції та змінюються декілька разів на рік, але вже показано, що термін виживання від раку завдяки таргетній терапії подовжується на десятиліття [18].

Для відновлення функції імунокомпетентних NK-клітин CD16+, Т-лімфоцитів-кілерів CD8+ та фагоцитарної активності у пацієнтів із

злаякісними новоутвореннями доцільним є використання біологічних субстанцій, створених біотехнологічними способами, які можуть бути доповненням до таргетного лікування. Сьогодні застосовують комбінації модулюючих препаратів з метою активації стимулюючих рецепторів, і блокуючі моноклональні антитіла до косупресорних рецепторів та їх лігандів [18]. Оскільки блокада PD-1/PD-L1 ініціює неповне відновлення виснажених Т-клітин, а висока частка внутрішньопухлинних Treg пов'язана з поганою відповіддю при різних видах раку, таргетний вплив на iTreg може значно посилити терапевтичний ефект терапії блокади PD-1/PD-L1. Блокада CTLA-4 пригнічує дію інгібіторного сигналу на стадії активації Т-клітин у лімфатичних вузлах, коли Treg видаляють B7 з поверхні APC, тоді як антагоністи PD-1 переважно впливають на ефекторну стадію імунітету [35].

Слід зазначити, що ракові клітини уникають імунного нагляду не тільки опосередкованого Т-клітинами. Захоплюючи відповідні антифагоцитуючі інгібіторні шляхи через надмірну експресію генів контрольних точок, малегнізовані клітини можуть уникнути дії фагоцитуючих клітин вродженого імунітету. Контрольні точки фагоцитозу, а саме CD47, CD24, β 2M-МНС-I, PD-L1, STC-1 та GD2, стали важливими точками для імунотерапії раку, функціонуючи як сигнали, які можна охарактеризувати як «не їж мене» або взаємодіючи з сигналами «з'їж мене» придушуючи імунні відповіді. Контрольні точки фагоцитозу пов'язують вроджений імунітет та адаптивний імунітет, так як саме після фагоцитування АПК направляється у лімфатичні вузли, де і презентує епітопи, пов'язані з МНС, наївним Т-клітинам. Генетичне регулювання контрольних точок фагоцитозу, а також блокування їхніх сигнальних шляхів, значно посилює фагоцитоз та, як наслідок, зменшує розмір пухлини.

Серед усіх контрольних точок фагоцитозу вісь регуляторного білка CD47-сигналу альфа ($SIRP\alpha$), є найбільш ретельно вивченим і стала першою контрольною точкою серед мішеней для лікування раку. CD47, який служить

сигналом «не їж мене» на пухлинних клітинах, пригнічує фагоцитоз макрофагами в імунній системі. Антитіла та інгібітори, спрямовані на CD47, досліджувалися в різних доклінічних та клінічних випробуваннях. Однак, анемія та тромбоцитопенія видаються серйозними проблемами, оскільки CD47 повсюдно експресується на еритроцитах [11].

1.5.2. CAR T-клітинна терапія.

Протягом останніх років неодноразово повідомлялось про клінічний успіх ще одного новітнього методу лікування онкологічних захворювань – CAR T-клітинна терапія. CAR T-клітинна терапія представляє собою принципово новий напрям у лікуванні злоякісних новоутворень. Ця стратегія базується на застосуванні аутологічних Т-лімфоцитів самого пацієнта, які після ізоляції з організму, генетично модифікуються для експресії химерних антигенних рецепторів (CAR). Тобто, CAR T-клітинна терапія ґрунтується на направленні імунної відповіді на патологічні клітини шляхом прямого перепрограмування власних Т-клітин пацієнта для селективного розпізнавання та знищення цих патологічних клітин, що спричиняють розвиток захворювання.

Т-клітини пацієнта під час CAR T-клітинної терапії модифікують, щоб вони могли розпізнавати й знищувати ракові клітини. Перед початком лікування проводиться ретельна діагностика, мета якої полягає в визначенні, чи є пацієнт відповідним кандидатом для такої терапії. Лікар може запропонувати CAR T-клітинну терапію як альтернативу, якщо стандартне лікування не дало результатів. Схема проведення CAR T-клітинної терапії представлена на рис 1.5.2.1.

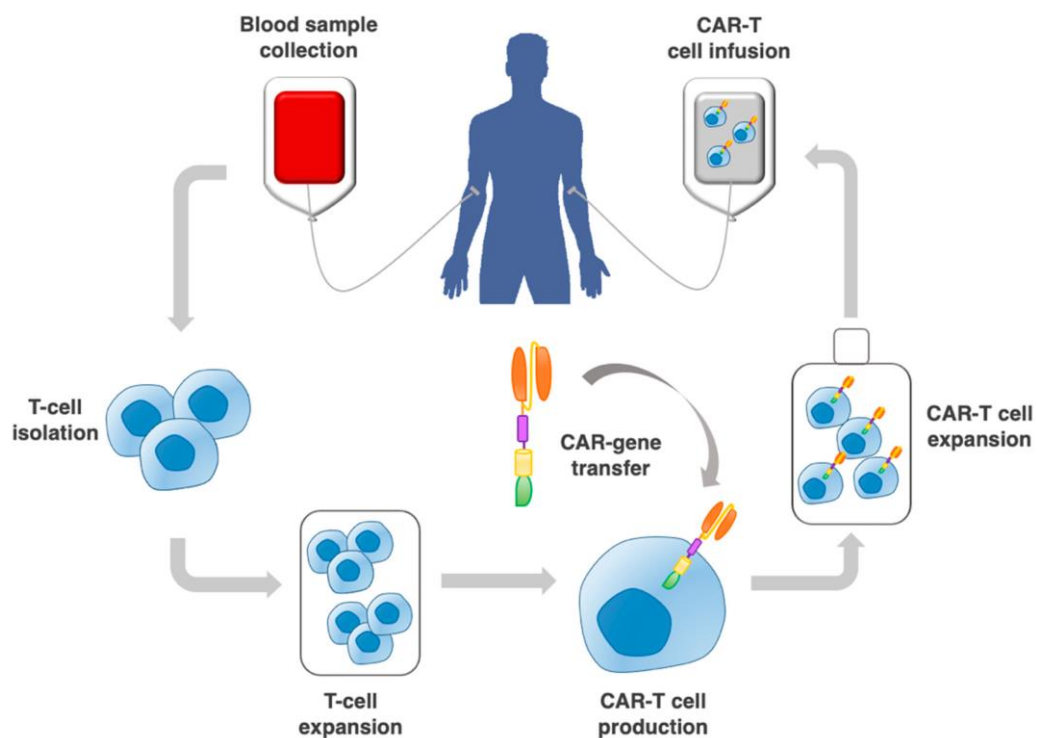


Рис. 1.5.2.1. Процедура впровадження адаптивної CAR-T-клітинної терапії. Вона включає збір зразка крові пацієнта; відбір Т-клітин за допомогою лейкофезу з периферичної крові; перенесення CAR-гена за допомогою вектора; розмноження CAR-T-клітин *in vitro* та повторну інфузію пацієнту [25].

В перший етап у пацієнта забирають кров, з якої методом лейкофарезу відокремлюють Т-клітини, популяція яких потім розширюється. Другим етапом в Т-клітини вводиться ген, що кодує химерний антигенний рецептор (CAR), структура якого наведена на схемі 1.5.2.2.

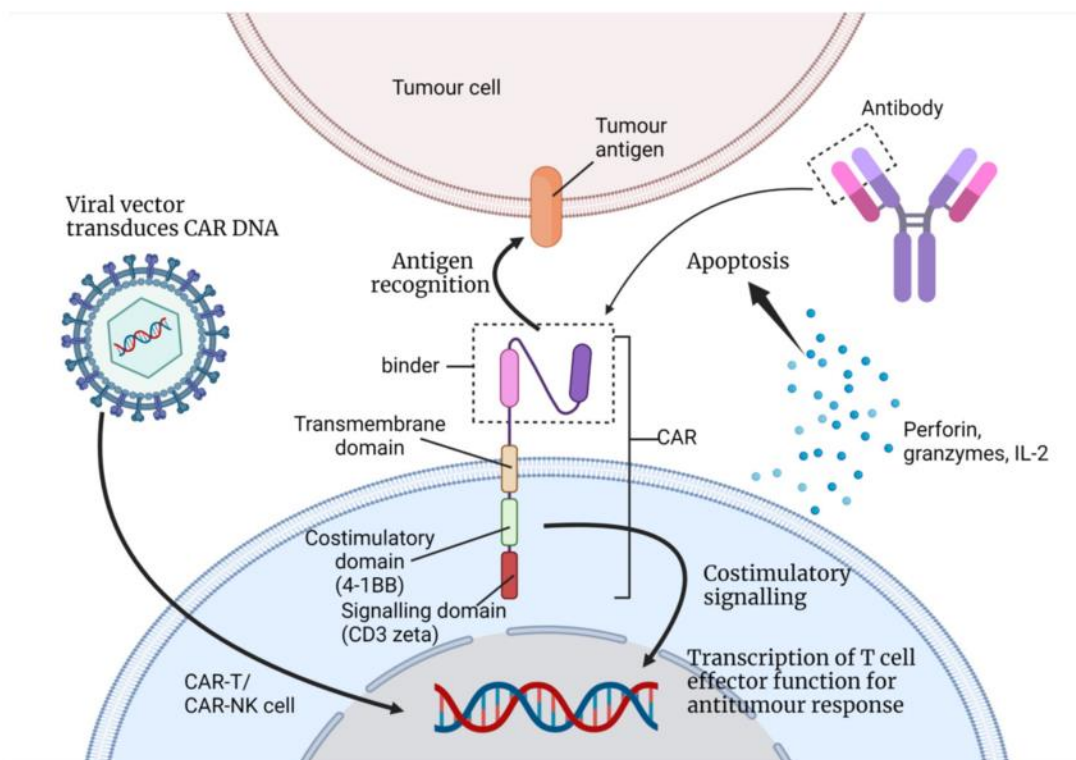


Рис. 1.5.2.2. Структура химерного антигенного рецептора (CAR), та механізм конструювання CAR Т-клітини/NK-клітини для експресії CAR. Зв'язуючий компонент з моноклональних антитіл (одноланцюговий варіабельний фрагмент на рисунку) діє як антигензв'язуючим рецептором. Представлена структура CAR другого покоління з одним коstimуляторним доменом (4-1BB або CD28) та сигнальним доменом (CD3zeta). Вірусний вектор використовується для перенесення ДНК, що кодує CAR, у ядро імунної клітини. Коли рецептор CAR розпізнає пухлинний антиген, сигнал посилюється та передається до ядра. Це ініціює серію протипухлинних реакцій; імунна клітина може проліферувати та секретувати цитокіни, перфोरини тощо [26].

Перші рецептори включали лише CD3-zeta домен (I покоління), а наступні модифікації додали коstimулюючі домени, такі як CD28 і 4-1BB (II покоління), що значно підвищило ефективність лікування. CAR III покоління поєднують кілька коstimулюючих доменів, таких як CD28-41BB або CD28-OX40, для посилення активності Т-клітин. Завдяки модифікації клітини отримують здатність розпізнавати і зв'язуватися зі специфічними білками на поверхні ракових або патологічно змінених клітин і, як наслідок, знищувати їх. Після внесення гену, що кодує химерний антигенний рецептор (CAR), проходить експансія популяції модифікованих Т-клітин. Специфічність CAR

T-клітин дозволяє їм інфільтрувати тканини, знищуючи не тільки циркулюючі, але й тканиннорезидентні пухлинні клітини, що є важливим для уникнення рецидиву хвороби. Перед інфузією CAR T-клітин пацієнтам зазвичай проводять хіміотерапію для виснаження лімфоцитів (зазвичай використовуються циклофосамід і флударабін), що сприяє їхній експансії і тривалому збереженню в організмі [16]. Однак більшість режимів лімфоцитарного виснаження призводять до широкого та неспецифічного пригнічення T-клітин та інших гемопоетичних клітин, що може зумовити цитопенію та, як наслідок, підвищений ризик інфекцій на короткий час. Наступний етап – інфузія, тобто внутрішньовенне введення модифікованих T-клітин, подібно до переливання крові. Після інфузії пацієнт залишається під наглядом лікарів у стаціонарі, оскільки можливі побічні реакції, які будуть вказані далі. Подальший моніторинг CAR-T терапії включає використання прямих (проточна цитометрія, ПЛР) та непрямих методів, таких як вимірювання рівня лімфоцитів (ALC) та рівень імуноглобулінів. Ці методи дозволяють оцінити активність CAR-T клітин, що має велике значення для прогнозу та контролю лікування. Незважаючи на складність і вартість, CAR-T терапія відкриває нові перспективи для боротьби з раком. Тривають дослідження її ефективності проти форм раку виражених солідними пухлинами.

Потрібно зазначити, що CAR-T-клітинна терапія супроводжується токсичними ефектами. Синдром вивільнення цитокінів є значною проблемою як токсичний ефект CAR T-терапії. Легкі форми синдрому вивільнення цитокінів проявляються лихоманкою, головним болем, артралгією та міалгією. У тяжких випадках він може призвести до гіпотензії і навіть цитотоксичного шоку. Частота виникнення синдрому вивільнення цитокінів, включно з легкими формами, коливається у діапазоні 42–93% для всіх терапевтичних клітинних продуктів. У деяких випадках це може бути життєзагрозливим станом або навіть призводити до летальних наслідків.

Іншим типовим побічним ефектом є нейротоксичний синдром, пов'язаний з ефекторними імунними клітинами, який може проявлятися порушенням дрібної моторики, дисграфією та змінами мовлення. Лікування цього синдрому базується на застосуванні антипіретиків, глюкокортикоїдів та блокаторів рецепторів IL-6, таких як тоцилізумаб [16].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Загальні відомості.

Було обстежено сироватку крові та цільну кров пацієнтів різних вікових груп з ускладненим перебігом аденокарциноми шлунку. Досліджувався рівень прозапальних цитокінів (ІЛ-2, ІЛ-4) використовуючи прямий метод ІФА; вміст олігонуклеотидної фракції DAMP використовуючи метод абсорбційної спектрофотометрії; експресію кластерів диференціювання на лімфоцитах, використовуючи метод проточної цитофлуориметрії.

Для аналізу були створені дві групи: перша група складалась з пацієнтів віком до 60 років ($n = 22$), друга група – з пацієнтів старше 60 років ($n = 29$). Розподіл за статтю в першій віковій групі становив 54% чоловіків і 46% жінок, середній вік – $50,4 \pm 6,7$ років. У другій віковій групі частка чоловіків становила 62%, жінок – 38%, середній вік – $64,1 \pm 3,6$ років.

Стадія і ступінь поширеності злоякісного процесу у обстежених пацієнтів з аденокарциномою шлунку коливалась від помірної до тяжкої. У пацієнтів першої групи спостерігалася локалізована форма захворювання з класифікацією TNM T2-3N0-1M0, що вказує на ураження стінки шлунку та регіонарних лімфатичних вузлів без віддалених метастазів. У пацієнтів другої групи захворювання характеризувалося більш агресивним перебігом з відповідною класифікацією TNM T3-4N0-1M1, що свідчить про глибоке проростання пухлини в стінку шлунку, залучення лімфатичних вузлів та наявністю віддалених метастазів.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми Statistica 6.1 (StatSoft Inc., USA) Для порівняння середніх значень використовували ANOVA. Отримані дані виражали як ($\bar{x} \pm SE$). Різницю вважали достовірною при $P < 0,05$.

2.2 Проточна цитофлуориметрія.

2.2.1 Загальні відомості.

Оцінювались наступні субпопуляції:

- натуральних кілерних клітин (CD56+CD16+); функція кілерних НК-клітин вродженого імунітету полягає у зв'язуванні з пухлинними клітинами та знищенню їх. НК-клітини забезпечують швидку відповідь на пухлинні клітини, інфіковані вірусом клітини на основі сигналів від кількох активуючих та інгібуючих рецепторів. Механізмом їх дії є вивільнення білків-ферментів (перфорини та гранзими), які містяться в гранулах клітин. Саме ці ферменти знищують пухлинні клітини.
- Т-цитотоксичні клітини (CD3+CD8+); цитотоксичні Т-лімфоцити CD8+ адаптивного імунітету, як і НК-клітини CD16+ вродженого імунітету мають функцію знищення патогенних вірусів та злоякісних пухлин. Цитотоксичні Т-лімфоцити CD8+ адаптивного імунітету мають значну більшу специфічність до конкретного антигену і силу дії проти нього; тобто саме вони є основною відповіддю, яка забезпечує саме кінцеве знищення патогену. Вони розпізнають злоякісні антигени та застосовують саме ті механізми активації ферментів (перфоринів), які використовують НК-клітини CD16+, але вихідний клон Т-лімфоцитів CD8+ повинен бути активованим і мати специфічність до антигену.
- Т-супресорні клітини (CD4+, CD3+, CD25+, CD127-); регуляторні Т-клітини, також відомі як супресорні Т-клітини, являють собою субпопуляцію Т-клітин, які модулюють імунну систему, підтримують толерантність до аутоантигенів та запобігають гіперактивації імунної системи що є причиною аутоімунних захворювань. Т-reg клітини є імуносупресорними та зазвичай пригнічують або знижують індукцію та проліферацію ефektorних Т-клітин, підтримуючи інтенсивність дії імунної системи у нормованому проміжку.

- Т-хелперів (CD3+CD4+); функція Т-хелперних клітин полягає у модулюванні напрямку відповіді та стимуляції імунної системи шляхом підтримування відповідного цитокінового середовища.
- Загальних Т-лімфоцитів (CD3+).

2.2.2 Цитофлуориметр - загальна будова.

Традиційний проточний цитофлуориметр складається з трьох систем:

- Флюїдична система – складається з рідини-оболонки (зазвичай буферного розчину), яка знаходиться під тиском, для транспортування та фокусування зразка в область лазерного опромінювання.
- Оптична – включає компоненти оптики збудження (лазери) та оптики збору (фотоелектронні помножувачі або ФЕУ та фотодіоди), які формують сигнали прямого розсіювання, бокового розсіювання та флуоресцентного випромінювання, що застосовуються для аналізу зразка.
- Система збору та обробки даних(електроніка) – підсистема збору здійснює підсилення та конверсію оптичних сигналів в електричні. Підсистема обробки даних представлена персональним комп'ютером із встановленим відповідним програмним забезпеченням. Оцифровані сигнали, отримані від аналізованих клітин, надходять до комп'ютера, де виконується побудова схем розподілу клітин за визначеними характеристиками.

Flow Cytometry

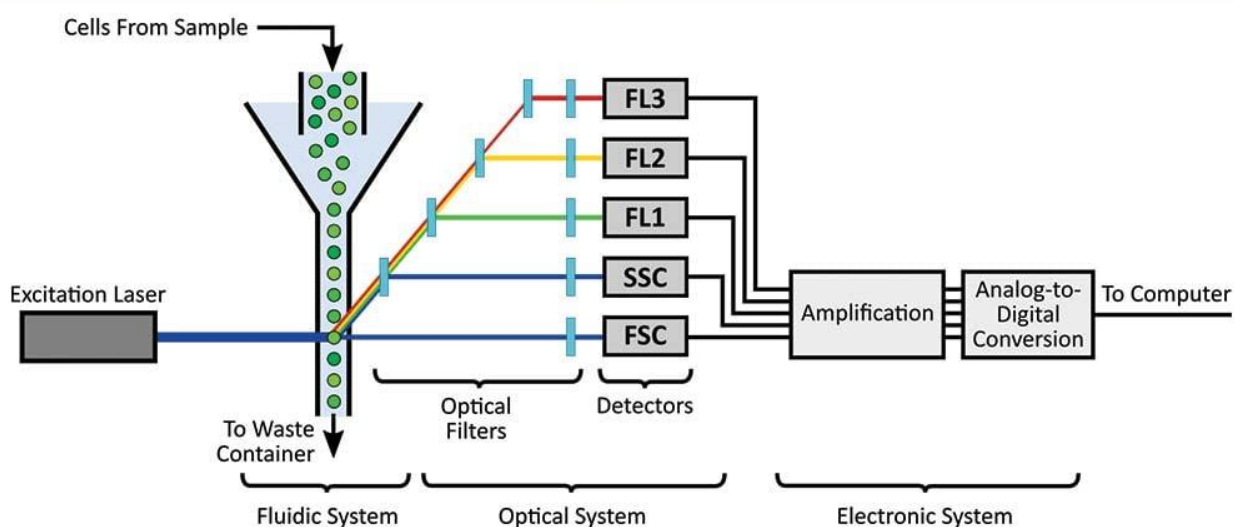


Рис. 2.2.2.1. Схематично проточний цитометр складається з трьох ключових систем: рідинної, оптичної та електронної системи. Джерело зображення: AAT Bioquest, Inc. (<https://www.aatbio.com/resources/assaywise/2019-8-1/fundamentals-of-flow-cytometry>)

Оптичні характеристики клітин визначаються в зоні вимірювання, що розміщена в проточній кюветі — ключовому елементі проточного цитофлуориметра. У цій системі зразок транспортується за допомогою ламінарного потоку рідини через вузький канал, виготовлений з оптично прозорого матеріалу (наприклад, кварцу). В центральній частині каналу сфокусований лазерний промінь, який опромінює клітини в момент їх проходження через зону перетину. При цьому реєструється світло, яке розсіюється клітиною, а також флуоресцентне випромінювання, що генерується під дією лазерного збудження, за допомогою спеціалізованої оптичної системи приладу.

У проточній цитометрії розсіяне клітинами світло реєструється двома оптичними детекторами: детектором прямого розсіювання (FSC), що фіксує розсіювання уздовж осі лазерного променя, та детектором бокового розсіювання (SSC), який вимірює розсіювання під кутом 90° відносно напрямку лазера.

Інтенсивність сигналу FSC є пропорційною до розміру клітини та зумовлена переважно дифракцією світла на її поверхні; таким чином, показники FSC дозволяють диференціювати клітини за їх діаметром. Сигнал SSC формується внаслідок заломлення або відбиття світла на межах між лазерним променем і внутрішньоклітинними структурами, такими як ядра або гранули, що забезпечує отримання інформації про внутрішню складність (гранулярність) клітини.

Ряд дихроїчних фільтрів спрямовує флуоресцентне світло до певних детекторів, а смугові фільтри визначають довжину хвилі світла, яке зчитується, щоб можна було виявити та виміряти кожен окремий флуорохром [19].

Більш конкретно, дихроїчний (інтерференційний) фільтр являє собою оптичний елемент, що відбиває одну або кілька спектральних смуг чи ліній, одночасно пропускаючи хвилі, що становлять дослідницький інтерес, з мінімальним коефіцієнтом поглинання. Залежно від характеристик пропускання, інтерференційні фільтри поділяються на довгохвильові, короткохвильові, смугові та смуго-пригнічуючі. Наприклад, довгопрохідний фільтр 450 Dichroic (DLP) пропускає світло з довжиною хвилі, більше ніж 450 нм, через фільтр і відбиває світло з коротшою довжиною хвилі під кутом, щоб відправити його на інший детектор [19]. Смугові фільтри виявляють невелике вікно певної довжини хвилі світла. Наприклад, смуговий фільтр 450/50 пропускає флуоресцентне світло з довжиною хвилі 450 нм $\pm$ 25 нм через фільтр, яке зчитується детектором [19]. Електронна система здійснює перетворення сигналів, отриманих від детекторів, у цифрову форму, придатну для зчитування та подальшої обробки комп'ютерними засобами.

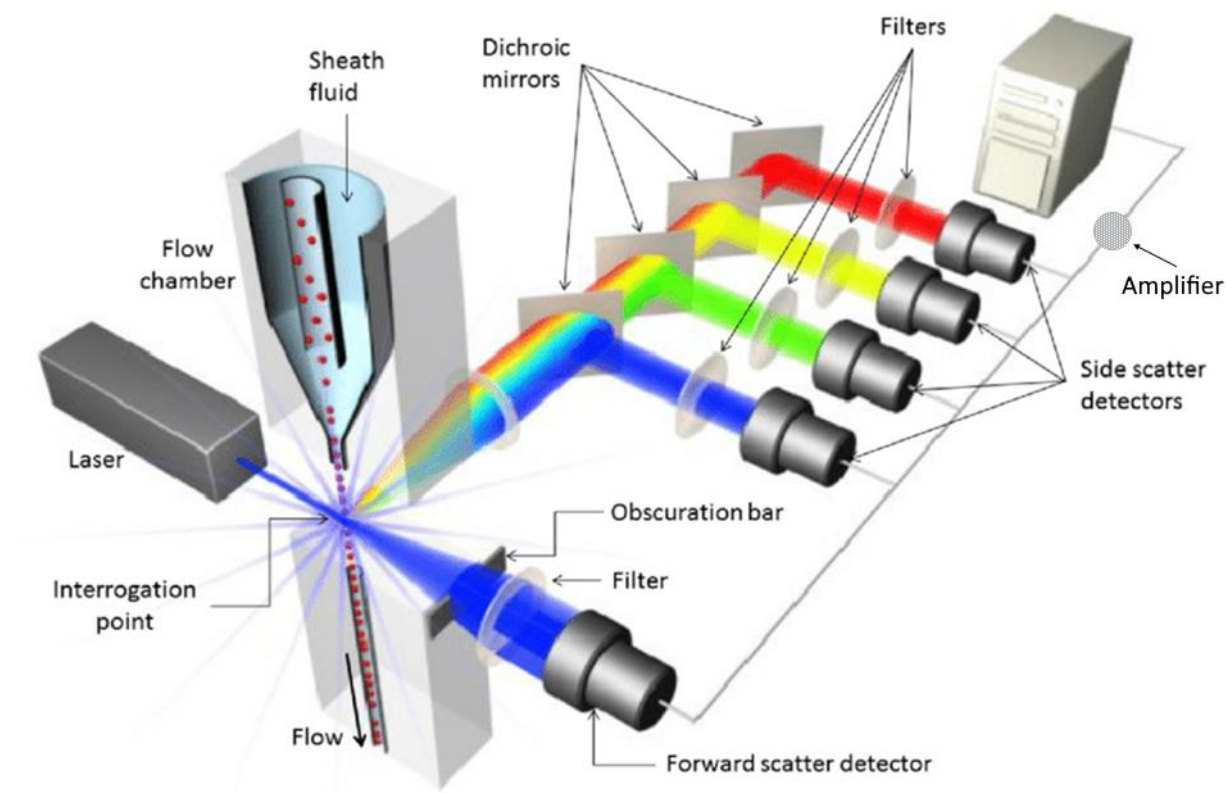


Рис. 2.2.2.2. Тривимірна модель проточного цитометра. Завдяки гідродинамічному фокусуванню клітини одна за одною потрапляють до точки вимірювання, де їх освітлює лазер. Пряме світло від лазера блокується затемнювальною планкою. Розсіяне вперед світло фільтрується, перш ніж потрапити на детектор розсіювання вперед. Частина флуоресценції клітин та розсіяного вбік світла фокусується лінзою, а потім проходить через серію дихроїчних дзеркал. Кожне дзеркало відбиває частину світла до фільтра та фотосенсора [22, модифіковано автором].

У сучасних проточних цитометрах зазвичай використовуються кілька лазерних систем, що забезпечують аналіз за приблизно 20 параметрами (FSC, SSC та 18 флуоресцентними каналами). Наразі впроваджуються інструментальні платформи, оснащені п'ятьма і більше лазерами, які дозволяють здійснювати реєстрацію за 30–50 параметрами, однак їх застосування наразі обмежене. У традиційних системах найбільш поширеними є лазери із довжинами хвиль 488 нм (синій спектр), 405 нм (фіолетовий), 532 нм (зелений), 552 нм (зелений), 565 нм (зелено-жовтий), 640 нм (червоний) та 355 нм (ультрафіолетовий). Для особих випадків також

доступні лазери з іншими довжинами хвиль. Окрім того, окремі прилади замість фотоелектронних помножувачів (ФЕУ) використовують лавинні фотодіоди (APD) для підвищення чутливості детектування флуоресценції.

2.2.3 Опис методу проточної цитофлуориметрії, класифікація барвників та області їх застосування.

Проточна цитометрія є технологією швидкого аналізу окремих клітин або частинок у потоці буферного сольового розчину при їх проходженні крізь один або кілька лазерних променів. Кожна частинка піддається аналізу за показниками розсіювання видимого світла та параметрами флуоресценції. Розсіювання видимого світла вимірюється у двох напрямках: у прямому напрямку (Forward Scatter, FSC), що корелює з розміром клітини, та під кутом 90° (Side Scatter, SSC), що відображає внутрішню складність або зернистість (гранулярність) клітини. Розсіювання світла є процесом, незалежним від флуоресценції.

Для проведення флуоресцентного аналізу зразки попередньо готуються шляхом трансфекції із експресією флуоресцентних білків (наприклад, зеленого флуоресцентного білка, GFP), забарвлення флуоресцентними барвниками (наприклад, пропідій йодид для ДНК) або міченням флуоресцентно кон'югованими антитілами (наприклад, CD3, мічений флуоресцеїн ізотіоціанатом, FITC).

Стосовно реактивів, які використовуються при міченні клітин для флуоресцентного аналізу їх можна поділити на наступні категорії:

- Малі органічні молекули, такі як Alexa Fluor 488, Texas Red (325 D), Alexa Fluor 647 (1464 D), Pacific Blue, Cy5 (762 D). Вони мають узгоджені спектри випромінювання, але малий зсув Стокса (різниця між довжиною хвилі збудження та довжиною хвилі випромінювання,

розрізняння яких вкрай важливо у процесі флуоресцентного аналізу) – приблизно 50–100 нм.

- Фікобіліпротеїни є великомолекулярними білковими комплексами, отриманими з ціанобактерій, динофлагелатів та водоростей. Це великі молекули – наприклад, фікоеритрин (PE) має молекулярну масу близько 240 000 Да. Ці білки характеризуються великими зсувами Стокса (у межах 75–200 нм), високою стабільністю та добре відтворюваними спектрами випромінювання. Завдяки великому розміру співвідношення білок:флуорохром при кон'югації зазвичай становить 1:1, фікобіліпротеїни є особливо придатними для кількісних аналізів у проточній цитометрії. Водночас вони є вразливими до процесів фотовідбілювання, що обмежує їх використання у застосуваннях, які передбачають тривалий або багаторазовий вплив збуджувального світла. До основних представників фікобіліпротеїнів належать фікоеритрин (PE), алофікоціанін (APC) та перидинин-хлорофіловий білковий комплекс (PerCP).
- Полімерні барвники представляють собою комплекси, з полімерних ланцюгів, здатних ефективно збирати світлові сигнали. Їх можна модифікувати для поглинання та випромінювання світла на визначених довжинах хвиль шляхом варіації довжини полімерного ланцюга та складу приєднаних молекулярних субодиниць. Ці барвники відзначаються високою стабільністю, демонструють квантову ефективність, співставну з фікобіліпротеїнами, але суттєво перевершують їх за показниками фотостабільності. Завдяки вибіркового поглинання світла на специфічних довжинах хвиль полімерні барвники мінімізують ефект багаторазового збудження лазерами. Прикладами полімерних барвників є реагенти Brilliant Violet (BV), Brilliant Ultraviolet (BUV) та Brilliant Blue (BB).
- Тандемні барвники являють собою конструкції, в яких фікобіліпротеїни (наприклад, PE, APC, PerCP) або полімерні барвники (зокрема, BV421,

BUV395) хімічно зв'язані з низькомолекулярними органічними флуорохромами (такими як Cy3, Cy5, Cy7). Це дозволяє реалізувати механізм флуоресцентної резонансної передачі енергії (FRET), розширюючи спектр флуорохромів, які можуть бути збуджені одним лазерним джерелом. Наприклад, флуорохром Texas Red має максимум збудження при 589 нм, а PE має випромінювання 585 нм; таким чином, шляхом створення кон'югата PE-Texas Red можливо ініціювати випромінювання Texas Red через енергію, передану від збудженого PE під впливом лазерного випромінювання 488 або 532 нм. Антитіла до полімерних ланцюгів також використовуються для створення тандемних конструкцій за аналогічним принципом, що дозволяє збільшити кількість флуорохромів, доступних для збудження одним лазером. Тандемні барвники характеризуються високою яскравістю та великим стоксовим зсувом (150–300 нм), що є особливо корисним при аналізі антигенів із низькою експресією. Водночас, вони є менш стабільними порівняно з донорними флуорохромами, і можуть відрізнятися від партії до партії за ефективністю передачі енергії, що ускладнює компенсацію.

- Флуоресцентні білки широко застосовуються як репортерні системи для моніторингу експресії генів.

Репортерна система складається з двох компонентів: репортерні гени і цільові гени. Репортерні гени є молекулярними інструментами, які широко застосовуються в молекулярній біології, генетиці та біотехнології для дослідження функцій генів, закономірностей їх експресії та механізмів регуляції. Вони кодують білки, що забезпечують легко виявлювані сигнали, такі як флуоресценція або люмінесценція, що дозволяє здійснювати моніторинг клітинних процесів у реальному часі. Зазвичай репортерні гени об'єднують із регуляторними елементами

цільових генів, що дає змогу досліджувати активність промоторів, регуляцію транскрипції та молекулярні механізми передачі сигналів.

Найбільш поширеним є зелений флуоресцентний білок (GFP), вперше ідентифікований у медузи *Aequorea victoria* у 1998 році (Roger Y. Tsien). Генетична модифікація GFP дозволила отримати його варіанти з іншими спектральними характеристиками, зокрема блакитний флуоресцентний білок (CFP) і жовтий флуоресцентний білок (YFP). В даний час у проточній цитометрії особливо активно використовуються флуоресцентні білки з максимумами збудження у фіолетовій та зелено-жовтій областях спектру. Сьогодні відкрито та синтезовано кілька сотень флуоресцентних білків із характеристиками збудження та випромінювання в діапазоні від ультрафіолетового до ближнього інфрачервоного. Розширення кількості лазерних довжин хвиль у сучасних проточних цитометрах значно розширило можливості застосування флуоресцентних білків у багатопараметричних аналізах.

- Барвники нуклеїнових кислот – взаємодіють з ДНК та РНК, застосовуються для кількісного аналізу вмісту ДНК/РНК. Прикладом їх застосування може слугувати дослідження клітинного циклу (використовується барвник йодид пропідію), або диференціювання хромосом при сортуванні клітин (Chromomycin A3).
- Проліфераційні барвники. Сукцинімідний ефір карбоксифлуоросцеїну (CFSE) та інші споріднені барвники можуть використовуватись для моніторингу проліферації клітин. Кожна клітина постійно мічена барвником, і наступні покоління клітин успадковують меншу кількість барвника через розведення барвника [19]. Такі барвники не чинять негативного впливу на життєздатність або морфологічні характеристики клітин, що робить їх придатними для тривалих досліджень проліферації.
- Барвники для визначення життєздатності. Приклади. 7-AAD (7-аміноактиноміцин D): проникає лише в мертві клітини, демонструючи

флуоресценцію в популяціях мертвих клітин. Пропідій йодид (PI): інтеркалює з ДНК пошкоджених клітин, випромінюючи флуоресценцію в мертвих клітинах.

2.2.4 Приготування зразку для проточної цитофлуориметрії; гейтування.

2.2.4.1 Приготування зразку для проточної цитофлуориметрії.

Приготування суспензії окремих клітин

Зразки для проточної цитометрії слід готувати у вигляді суспензії окремих клітин. Концентрація клітин може коливатися від 10^4 до 10^5 . Найпоширенішим суспензійним буфером є фосфатно-буферний фізіологічний розчин (PBS) [31].

Клітини, які вже присутні в одній формі, як клітини крові, більш легко приготувати. Кров поміщають у спеціальну пробірку, додають моноклональні антитіла, мічені флуорохромами. Для дослідження використовують кілька флуоресцентних міток, які дозволяють проводити одночасний дво-, трикольоровий та більше аналіз, оскільки кожен флуорохром при проходженні через промінь лазера випромінює світло різної довжини хвилі. Далі проводять інкубацію, під час якої відбувається зв'язування МКАТ із поверхневими маркерами клітин. Потім додають лізуючий розчин для виключення з аналізу численної популяції еритроцитів. Після фільтрують перед зчитуванням (також використовується PBS без кальцію та магнію).

Для отримання суспензії окремих клітин із адгезивних культур або щільних (твердих) тканин необхідна попередня дезагрегація клітинної маси. Тобто, перед послідовністю, яка описана вище, потрібна дезагрегація, яку можна провести двома способами – механічним або ферментативним:

- 1) Механічна дезагрегація підходить для слабо зв'язаних структур, таких як прикріплені клітини з культури, кісткового мозку та лімфоїдної тканини. Вона передбачає кількаразове пропускання суспензії подрібненої тканини через тонку голку, а потім подрібнення та обробку ультразвуком за необхідності [31].
- 2) Ферменти використовуються для порушення білок-білкових взаємодій та позаклітинного матриксу, який утримує клітини разом. Їхня дія залежить від таких факторів, як рН, температура та кофактори, тому слід бути обережним при виборі ферменту. Деякі методи лікування можуть пошкодити клітини, якщо їх залишити ненейтралізованими занадто довго, і це може призвести до втрати антигенів клітинної поверхні, що цікавлять [31].

У цьому дослідженні використовувався зразок крові, який складається з розрізнених клітин, які не потрібно дезагрегувати, тож у даному випадку, цей крок пропускається.

Тож, клітини, що підлягають сортуванню, суспендують у PBS, вільному від кальцію та магнію. Сортувальним середовищем також є PBS без кальцію та магнію. Для експериментів, що потребують культивування або функціонального аналізу відсортованих клітин, PBS має бути стерильним [31].

Фільтрація зразків

Перед проведенням самого аналізу необхідно здійснювати фільтрацію зразків для усунення механічних домішок. Під час процесу аналізу клітини проходять через сопло 70мкм і різні включення можуть засмітити систему, спотворюючи вимірювання або повністю перешкоджаючи проведенню аналізу. Тобто, завершальний етап підготовки зразків перед сортуванням повинен включати фільтрацію через нейлонові сита з розміром отворів 40–50 мкм, безпосередньо перед завантаженням у прилад.

Фільтрація можлива за двома методами: фільтрація за допомогою багаторазового шприца, подовжувальної трубки та нейлонової сітки 50 мкм, або фільтрація за допомогою готового фільтра.

Фільтрація за допомогою багаторазового шприца, подовжувальної трубки та нейлонової сітки 50 мкм.

- 1) Підготовка: використовуйте шприц, подовжувальну трубку та нейлонову сітку. Вийміть голку зі шприца, знайдіть нейлонову серветку на краю шприца та під'єднайте праву сторону подовжувальної трубки до шприца з сіткою між ними. Відріжте подовжувальну трубку приблизно на 1 см від роз'єму [31].
- 2) Фільтрування: вийміть шток поршня, вилийте зразок з пробірки в шприц і поверніть шток поршня назад у шприц, обережно вставте поршень у нову порожню та чисту пробірку. Промийте фільтр шприца PBS після кожного відбору зразка [31].

Фільтрація за допомогою готового фільтра.

- 1) Використовуйте піпетку, щоб проштовхнути клітини через фільтр у пробірку.

2.2.4.2. Процес аналізу результатів – гейтування.

Сам цитометричний аналіз проводиться за кількома параметрами – характеристики світлорозсіювання: FSC (forward side scatter), SSC (side scatter) – показник бічного світлорозсіювання та характеристики флуоресценції – FL, які були детально розглянуті вище.

Гейтінг – це процес встановлення критеріїв для ідентифікації популяцій клітин, що цікавлять, на основі певних параметрів у проточній цитометрії. Гейтінг допомагає фільтрувати мертві клітини, залишки та дублети; виділяє окремі, життєздатні клітини для точного аналізу даних. Також функцією

гейтування є визначення специфічних популяцій клітин – диференціація на основі флуоресцентних маркерів, розміру та гранулярності.

За характеристиками прямого світлорозсіювання FSC (вісь абсцис, Ox) клітини розподіляються за розміром, а бічного світлорозсіювання SSC (вісь ординат, Oy) – по гранулярності, тобто по наявності різних внутрішньоклітинних структур. Таким чином, за FSC та SSC-параметрами лейкоцити крові поділяються на три популяції: лімфоцити, моноцити, гранулоцити. За характеристиками флуоресценції клітини поділяються на популяції позитивних та негативних за цим параметром, тобто мають на своїй поверхні даний антиген чи ні. На графіку кожна точка відповідає виміряному об'єкту (клітині). Час аналізу – 120 сек.

Процес гейтування зазвичай реалізується у вигляді ієрархічної логічної послідовності з метою послідовного звуження аналізованої популяції до клітин, що становлять дослідницький інтерес. Первий етап передбачає виключення клітинного дебрису та нежиттєздатних клітин на підставі низьких значень FSC/SSC або високої інтенсивності флуоресценції доданих життєздатнісних барвників. Це дозволяє зосередитися виключно на інтактних життєздатних клітинах.

Другим кроком є видалення дублетів або агрегованих клітин, оскільки вони можуть спотворювати дані. Для їх ідентифікації застосовують співвідношення сигналів FSC-A (площа) до FSC-W (ширина), поодинокі клітини характеризуються лінійною залежністю між цими параметрами, на відміну від дублетів, залежність яких відхиляється (приклад показано на рис. 2.2.4.1).

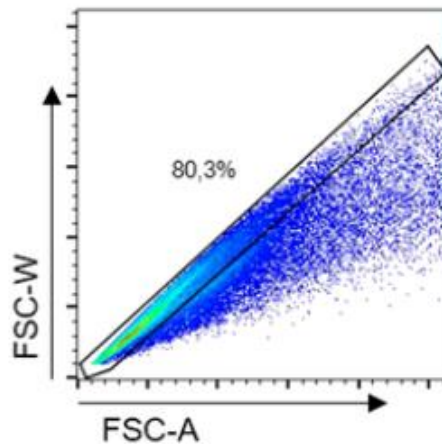


Рис. 2.2.4.1. [33]

Зрештою, уточнену популяцію додатково аналізують за допомогою флуоресцентних маркерів для визначення цільових фенотипів. Встановлюючи порогові значення на основі позитивних та негативних контролів, дослідники можуть точно розділяти субпопуляції, наприклад, ідентифікуючи специфічні підмножини Т-клітин (наприклад, CD4+CD28+ клітини) серед ширшої популяції (приклад показано на рис. 2.2.4.2). Послідовний підхід до гейтування забезпечує точний та інтерпретований аналіз гетерогенних клітинних популяцій у проточній цитометрії.

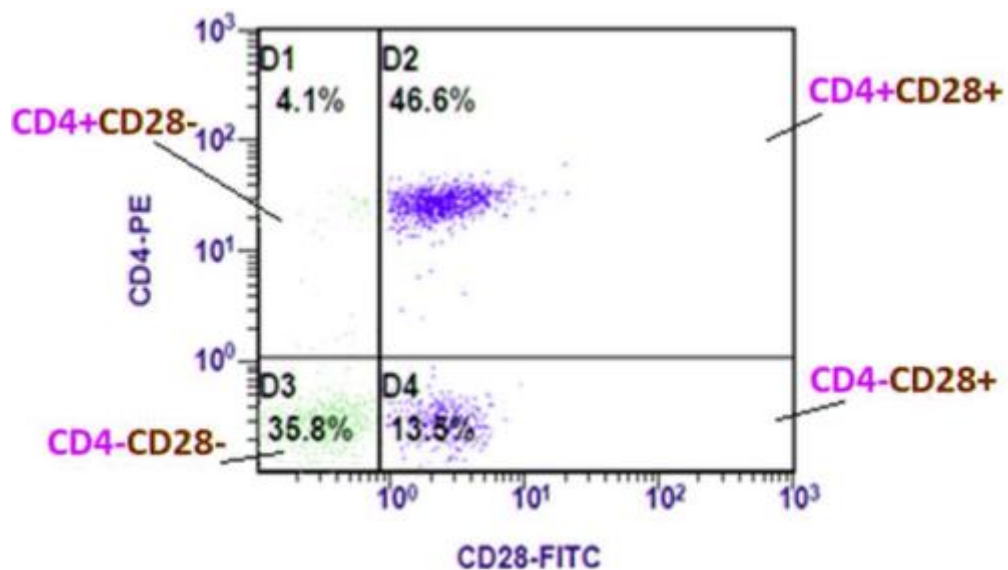


Рис. 2.2.4.2

2.2.5 Застосування методу проточної цитофлуометрії у поточному дослідженні.

У поточному дослідженні метод проточної цитофлуометрії застосовувався для реалізації імунофенотипування що є найбільш використовуваним застосуванням у проточній цитометрії.

Імунофенотипування використовує можливості проточної цитометрії для багатопараметричного, одночасного аналізу змішаних популяцій клітин. У цьому методі клітини інкубують з моноклональними антитілами, міченими флуорохромами, які специфічно зв'язуються з певними антигенами на поверхні клітини. Ці поверхневі антигени класифікуються як кластери диференціювання (CD), щоб використовувати загальну номенклатуру для визначення моноклональних антитіл, спрямованих проти специфічних клітинних антигенів.

Імунні клітини мають специфічні маркери, які визначають їх як популяцію клітин. CD клітинні маркери називають лінійними маркерами і використовуються для визначення специфічних клітинних популяцій для додаткового аналізу в кожному експерименті з імунофенотипування. Крім лінійних маркерів, які визначають популяції клітин, інші маркери використовуються для характеристики кожної популяції клітин. Ці маркери включають маркери активації (CD69, CD25, CD62L), маркери клітин пам'яті (CD45RO, CD27), маркери хемокінових рецепторів (CCR7, CCR5, CXCR4, CCR6). Експерименти імунофенотипування також включають детекцію внутрішньоклітинних маркерів, таких як FoxP3 (визначає клітини Treg), цитокіни (IFN- γ , TNF- α , IL-2 визначають клітини Th1), маркери проліферації (Ki67, CFSE) [19].

Для визначення фенотипу імунних клітин їх фарбують специфічними моноклональними антитілами CD, кон'югованими з флуоресцентними

барвниками. У назві такого барвнику спочатку йде кластер диференціації, до якого розроблено антитіло, потім назва самого флуоресцентного барвника; наприклад, CD8-FITC означає моноклональні антитіла проти CD8, кон'юговані з флуоресцентним барвником FITC. Зв'язування маркованих антитіл із клітиною визначається тим, які саме CD вона експресує. Після такого фарбування проводиться сам аналіз флуоресценції клітин.

У дослідженні використовувались наступні маркери для визначення відповідних субпопуляцій: CD16 для натуральних кілерних клітин (CD56+CD16+); CD8 для Т-цитотоксичних клітин (CD3+CD8+); CD127- для Т-regs клітин (CD4+, CD3+, CD25+, CD127-); CD4 для Т-хелперів (CD3+CD4+); вищезгаданий CD3 для загальних Т-лімфоцитів (CD3+).

CD3 є «кластером диференціювання номер 3» і є Т-клітинним корецептором, який присутній на всіх Т-клітинах. Його маркування дає змогу визначити наявність Т-клітин в процесі аналізу, проте для більш детальної диференціації загальної популяції Т-клітин по субпопуляціях таких як CD8+ або CD4+, потрібне додаткове маркування кон'югованими з флуорохромом антитілами комплементарними CD8/CD4 молекулам, що експресуються на поверхні відповідної субпопуляції клітин. Важливо зазначити, що кольори флуоресценції повинні бути різними та контрастними. В такому разі буде доречно використовувати для маркування антитіл до CD8 – флуорохром зеленого кольору(FITC, лазер для збудження 488нм, довжина піку хвилі випромінювання 517 нм), а для маркування антитіл до CD4 – флуорохром красного кольору(PerCP, лазер для збудження 488нм, довжина піку хвилі випромінювання 675 нм). Тобто, пікові довжини хвиль спектру випромінювання барвників не мають співпадати – чим далі один від одного вони розташовані на спектральній смузі, тим краще. Для відокремлення піку хвилі випромінювання використовують смугові фільтри. Відповідність довжини хвилі колірної частини спектра та загалом спектральні

характеристики сучасних флуоресцентних барвників для проточної цитометрії наочні показано нижче (рис 2.2.5.1).

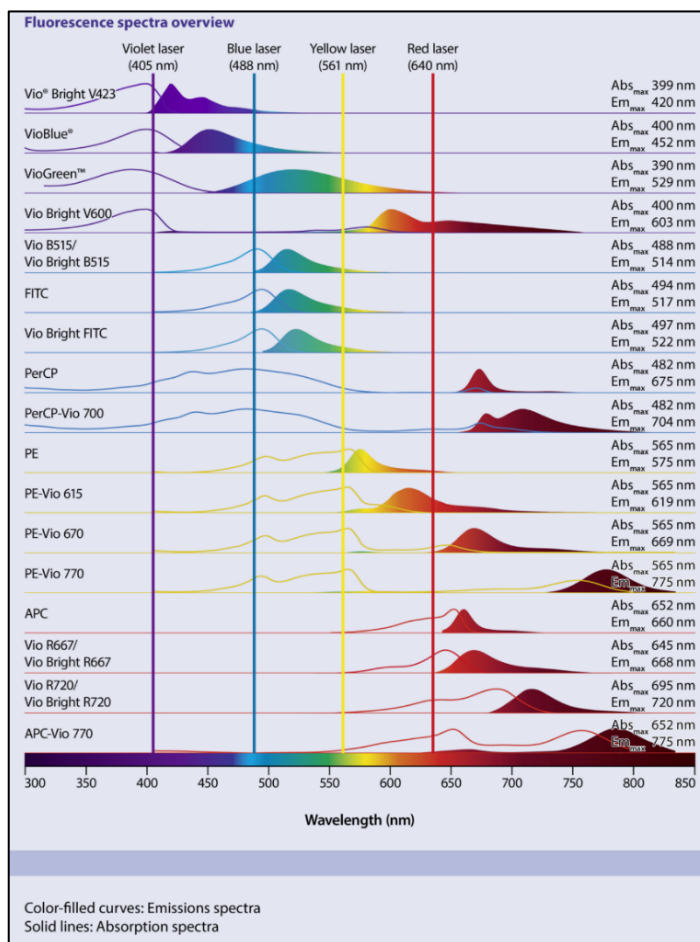


Рис 2.2.5.1. Відповідність довжини хвилі до колірної частини спектру. Спектральні характеристики сучасних флуоресцентних барвників для проточної цитометрії. Джерело зображення:

https://static.miltenyibiotec.com/image/150655405641/image_ji6i096299067adlp9e5r63l0t/-S2400x2400-FWEBP

Тоді барвники CD3-PE(PE: лазер для збудження 565нм, довжина піку хвилі випромінювання 578 нм), CD8-FITC, CD4-PerCP, CD16-Vio Bright V423(Vio Bright V423: лазер для збудження 405нм, довжина піку хвилі випромінювання 420 нм), CD25-PE-Vio770(PE-Vio770: лазер для збудження 565нм, довжина піку хвилі випромінювання 775 нм) – будуть оптимальним рішенням для проведення аналізу. Також додання барвнику CD127-PE-Vio615 (лазер для збудження 565нм, довжина піку хвилі випромінювання 619 нм) потрібно для

ідентифікації T-regs за сигналом відсутності (CD127–). Максимуми спектрів флуоресценції майже не перетинаються із загальними спектрами флуоресценції інших флуорохромів.

У дослідженні проводились вимірювання зразків двох груп пацієнтів та кров здорової людини – референтні значення. Кількість клітин, що аналізувалась: 5000. Результати наведені у розділі 3.1.

2.3 Спектрофотометричний метод.

2.3.1 Загальні відомості.

Оцінювання вмісту DAMP у крові проводилася за допомогою методу абсорбційної спектрофотометрії.

Молекулярні патерни, пов'язані з пошкодженням (DAMP), – це ендogenous молекули небезпечних речовин, що вивільняються з пошкоджених або вмираючих клітин; або клітинному стресі. Вони активують вроджену імунну систему, взаємодіючи з рецепторами розпізнавання патернів (PRR). Хоча DAMP сприяють захисту організму, вони також сприяють патологічним запальним реакціям [23].

2.3.2 Опис методу, будова абсорбційного спектрофотометра.

Абсорбційна спектрофотометрія є високоточним та чутливим аналітичним методом, який широко застосовується для кількісного та якісного аналізу в хімії, біології та суміжних наукових галузях. Метод дозволяє оцінити залежність інтенсивності поглинання падаючого світла (певної довжини хвилі) від концентрації речовини, та залежить від світлопоглинальних властивостей аналіту. Інтенсивність пропущеного світла, що проходить через розчин, що містить поглинаючу речовину (хромоген), зменшується на певне значення(залежить від концентрації речовини). Згідно із законом Бугера—Ламберта—Бера, зниження інтенсивності пропущеного світла прямо

пропорційне концентрації речовини, яке вимірюють та використовують для співвіднесення поглиненого світла з концентрацією аналіту, що розглядається за допомогою калібровальних кривих.

Базовий принцип демонструється нижче:

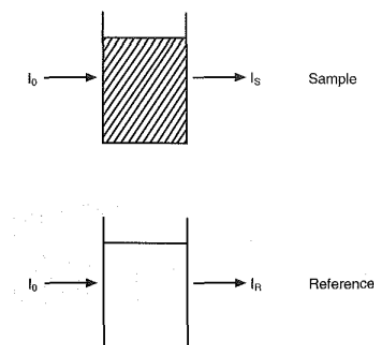


Рис. 2.3.2.1. Співвіднесення пропускання світла через зразок та контрольну комірку [15].

$I(S)/I(R)$ використовується для визначення концентрації аналіту. $I(S)$ інтенсивність пропущеного світла для розчину з аналітом; $I(R)$ референсна інтенсивність пропущеного світла (чистий розчинник).

Основні компоненти спектрофотометра включають джерело світла (1); засіб для виділення світла потрібної довжини хвилі (2); кювети (3); фотодетектор (4); електроніку для обробки даних (5).

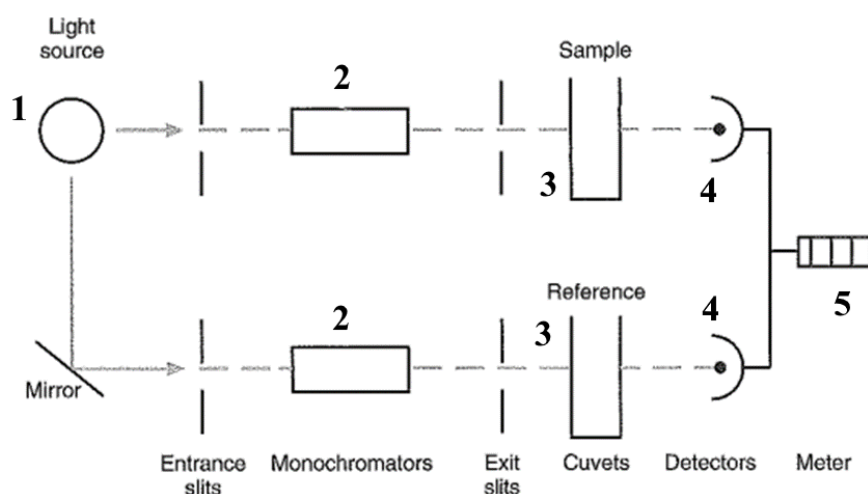


Рис. 2.3.2.2. Схема двопроменевого спектрофотометру [15].

Для абсорбційної спектрофотометрії використовуються випромінювання в ультрафіолетовій (200–400 нм), видимій (400–760 нм) та інфрачервоній (>760 нм) ділянках спектра.

Кроки для приготування зразку для абсорбційної спектрофотометрії наведено на схемі 2.3.2.3.

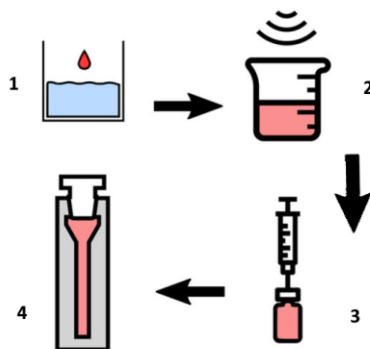


Рис. 2.3.2.3. Підготовка крові з вени до спектрофотометра [30, модифіковано автором].

Кроки для приготування зразку крові для абсорбційної спектрофотометрії: розведення у буферному розчині зразку крові; ультразвуковий лізис для розриву клітин крові (застосовуються ультразвукові хвилі високої інтенсивності, які руйнують клітинні мембрани); обережний забір та перенос в герметичні скляні кювети для спектрофотометричних вимірювань.

2.3.3 Застосування методу абсорбційної спектрофотометрії у поточному дослідженні.

У поточному дослідженні визначався вміст олігонуклеотидної фракції DAMP. Вміст визначали за допомогою метода абсорбційної спектрофотометрії за довжини хвилі 260 нм (олігонуклеотидна фракція).

Результати наведені у розділі 3.2.

2.4 Імуноферментний метод.

2.4.1 Загальні відомості.

Оцінювання рівня прозапальних цитокінів (ІЛ-2, ІЛ-4) у крові проводилася за допомогою прямого метода імуноферментного аналізу.

Загалом у крові оцінювався вміст:

- Інтерлейкін-2; ІЛ-2 є обов'язковою умовою для активації як CD4+ клітин, так і CD8+. У процесі активації Т-клітини її рецепторна взаємодія з АПК провокує виділення інтерлейкіну-2, який взаємодіє з ІЛ-2R, провокуючи запуск клітинного циклу Т-клітини через активацію mTOR, що веде до клонального розширення – тобто взаємодія ІЛ-2 з Т-клітиною має аутокринний характер. Активована Т-клітина як CD8+ популяції, так і CD4+, продовжує виробляти ІЛ-2 у великій кількості, що впливає на інші Т-клітини, що активуються в Т-клітинній зоні лімфатичного вузла, а також сприяє подальшій диференціації активованих клітин [5]. Диференціювання Т-хелперних клітин CD4+ значною мірою регулюється ІЛ-2, який активує Т-лімфоцити і сприяє реалізації функцій. ІЛ-2 є прозапальним цитокіном, що ініціює низку сигнальних каскадів. Також підтримує виживаність і функціональну активність регуляторних Т-клітин (Treg). Надмірна продукція ІЛ-2 може призводити до розвитку синдрому капілярної втрати. Нестача ІЛ-2 асоціюється з порушенням функціональної активності Treg-клітин. У зв'язку з важливістю ІЛ-2 для диференціювання Т-лімфоцитів, рекомбінантний ІЛ-2 використовується в клінічній імунотерапії з метою стимуляції генерації цитотоксичних Т-лімфоцитів та NK-клітин. Нестача ІЛ-2 призводить до дефіциту Т-кілерів/супресорів, та розвитку аутоімунних реакцій.
- Інтерлейкін-4; хоча цитокін ІЛ-4 виробляється переважно активованими CD4+ клітинами, він може вироблятись макрофагами, еозинофілами, базофілами, тучними клітинами та вродженими лімфоїдними клітинами

2 типу (ILC2), хоча кількість IL-4, що виробляється цими типами клітин, не є однорідною [29]. IL-4 є фактором росту В-клітин та промотор перемикання класу Ig (IgG4), також він необхідний для вироблення IgE. IL-4 діє як фактор росту Т-клітин та індукує диференціацію наївних Т-хелперних клітин у Th2 - клітини. Відомо, що експресія CD8⁺ може бути інгібована через активацію IL-4. IL-4 інтерлейкін зменшує активацію CD8⁺ та синтез цими клітинами ферментів перфоринів. а Також біохімія IL-4 сприяє розвитку толерантності.

2.4.2 Опис методу ІФА.

Прямий ІФА є базовим варіантом імуноферментного аналізу, який забезпечує якісне та кількісне визначення специфічних антигенів (в даному випадку IL-2 або IL-4) у біологічних зразках. У методі прямого ІФА використовується одне антитіло, мічене ферментом (як приклад, лужна фосфатаза або пероксидаза хрому), яке безпосередньо зв'язується з мішенню — антигеном, що аналізується.

Використовуючи планшет для проведення ІФА, додають буферний розчин зразку сироватки 1-канальним дозатором у лунки. Молекули іммобілізуються на поверхні або завдяки сорбенту у лунці (проходить адсорбція), або використанням моноклональних антитіл, адсорбованих на полістиролових планшетах, утворюючи комплекс «антиген-антитіло». Йде перше промивання (найчастіше 3 рази) від різних компонентів сироватки крові по типу еритроцитів, тощо автоматичним дозатором. Потім фільтрувальний папір використовується для остаточного висушування лунок, легким постукуванням. Потім додаємо розчин із міченими ферментом антитілами (пероксидаза) автоматичним дозатором, йде інкубація. Її тривалість залежить від набору (як приклад 1 годину при температурі 37 градусів за Цельсієм). Потім триває друга промивка (може знадобитись більше 3 разів в залежності від набору ІФА) автоматичним дозатором від незв'язаних антитіл, які можуть

давати шуми, якщо їх не вимити. Далі фільтрувальний папір використовується для остаточного висушування лунок. Наступний крок включає додавання розчину субстрату, після чого йде ферментативна реакція (пероксидаза каталізує розщеплення субстрату (перекису водню), викликаючи зміну забарвлення, тривалість становить 15-20хв). Хоча температура може впливати на кінетику реакції, її безконтрольне підвищення також може призвести до денатурації білка або зниження специфічності в аналізах ELISA. Вкрай важливо дотримуватися рекомендацій щодо температури, зазначених у протоколі, які залежать від системи фермент субстрат, які використовуються, щоб уникнути погіршення якості аналізу. Далі використовується стоп розчин, який є блокатором ферменту. Лунки з розчином після проходження ферментативної реакції забарвлюються у характерний для продукту цієї реакції колір. Тіж самі дії проводяться з контрольними зразками (позитивні та негативні), які поставляються з набором для ІФА і є специфічними для нього. В залежності від набору ІФА, кількість контрольних зразків, на які виділяються лунки з планшету, може бути різною. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна кількості зв'язаного антигену та реєструється спектрофотометрично. Для інтерпретації результатів використовується спеціальний спектрофотометр розрахований на зчитування та вимірювання результатів з усіх лунок (у дослідженні вимірювання оптичної щільності проводили за довжини хвилі 450 нм). Перед зчитуванням важливо енергійно струсити, щоб рівномірно розподілити продукт у лунці після додавання субстрату. Вважається, що перемішування сприяє належному змішуванню молекул, викликаючи ефективні зіткнення між молекулами в лунках ІФА. Багато рідерів мають вбудовану регуліровку інтенсивності і швидкості струшування (шейкування). Показники контрольних зразків використовуються для формування опорних результатів; відносно позитивних та негативних результатів контрольних зразків будується валідація та інтерпретація результатів.

Додаткові пояснення: буфери забезпечують стабільні умови щодо рН під час реакції. Кожен білок і ферменти потребують певного рН та буферних умов для їхньої нормальної структури та оптимального функціонування. Ці стабільні умови є критично важливими для ELISA, оскільки зв'язування антитіл з цільовим білком чутливе до рН; кров людини складається з 45% клітин крові і 55% плазми. Плазма — це водний розчин, що складається з 92% води, 7% білків та 1% інших розчинених речовин (неорганічні іони, тощо). Сироватка — це розчин, що залишається після видалення факторів згортання крові з плазми. Найчастіше сироватки отримують осадженням фібриногену іонами кальцію.

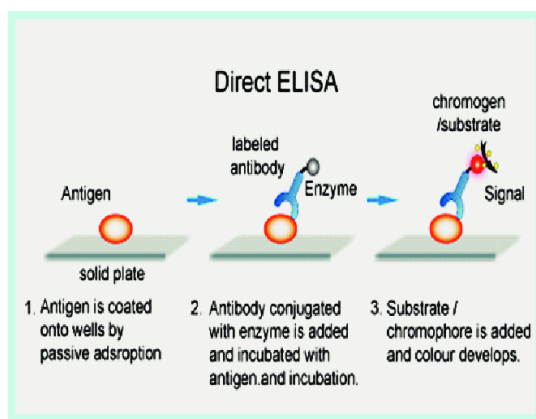


Рис. 2.4.2.1. Спрощена схема етапів проведення прямого ІФА [24].

Основними перевагами прямого ІФА є висока специфічність, обумовлена відсутністю вторинних антитіл, та зменшення часу аналізу завдяки меншій кількості експериментальних етапів.

2.4.3 Застосування методу ІФА у поточному дослідженні.

Визначення вмісту цитокінів (ІЛ-2, ІЛ-4), за допомогою тест-систем твердофазного імуоферментного аналізу з використанням моноклональних антитіл, адсорбованих на полістиролових планшетах. Утворений комплекс «антиген-антитіло» виявляли за допомогою кон'юганту з ферментом пероксидаза що каталізує розщеплення субстрату (перекис водню),

викликаючи зміну забарвлення індикатору. Вимірювання оптичної щільності проводили за довжини хвилі 450 нм. Результати наведені у розділі 3.3.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ

3.1 Результати оцінки експресії рецепторів субпопуляцій лімфоцитів.

Для ідентифікації субпопуляції лімфоцитів у дослідженні використовувались маркери: CD16 для натуральних кілерних клітин (CD56+CD16+); CD8 для Т-цитотоксичних клітин (CD3+CD8+); CD25+ для Т-супресорних клітин (CD4+, CD3+, CD25+, CD127-); CD4 для Т-хелперів (CD3+CD4+). Кількість клітин, що аналізувалась: 5000. Результати наведені на рис 3.1.1.

За рахунок компенсаторних механізмів організму відбувається активна продукція IL-2 та IL-4 (рис 3.3.1). У першій групі CD3+, CD4+ і CD3+, CD8+ лімфоцити знижені від референтних через імунну супресію, під час якої проходить компенсаторна активація, однак функціонально ці клітини пригнічені, а повна популяція не поповнюється. CD16+ NK-кілери присутні в околореферентних значеннях, навіть трохи вище. CD127- присутні в зниженому стані що може бути пояснено тим, що цей тип клітин мігрує у пухлину, де формує супресивне мікрооточення.

У другій групі CD3+, CD4+ лімфоцити трохи знижені від референтних і вище ніж у першій групі, а CD3+, CD8+ навіть трохи вище, через накопичення виснажених клітин у комбінації з інтенсивною супресію активації імунної системи. Компенсаторні механізми вже не діють, через велике супресивне навантаження, продукція активаторних інтерлейкінів знижена (рис 3.3.1). CD16+ NK-кілери були підвищені, що може пояснюватися накопиченням виснажених клітин. CD127- присутні в значно зниженому стані що може бути пояснено тим, що цей тип клітин мігрує у пухлину, де формує супресивне мікрооточення. У даному випадку спостерігається більш інтенсивне залучення у пухлинне мікрооточення через більш розвинену фазу розвитку пухлини. Сам факт низького вмісту iT-regs CD127- у крові є досить позитивним позитивним

показником в перспективі виживання та лікування онкозахворювання у обох випадках.

Виходячи з даних можна дійти до висновку, що з першої групи пацієнтів стан імунної системи менш пригнічений, ніж у другий, що дає більш позитивний прогноз у виживанні та лікуванні.

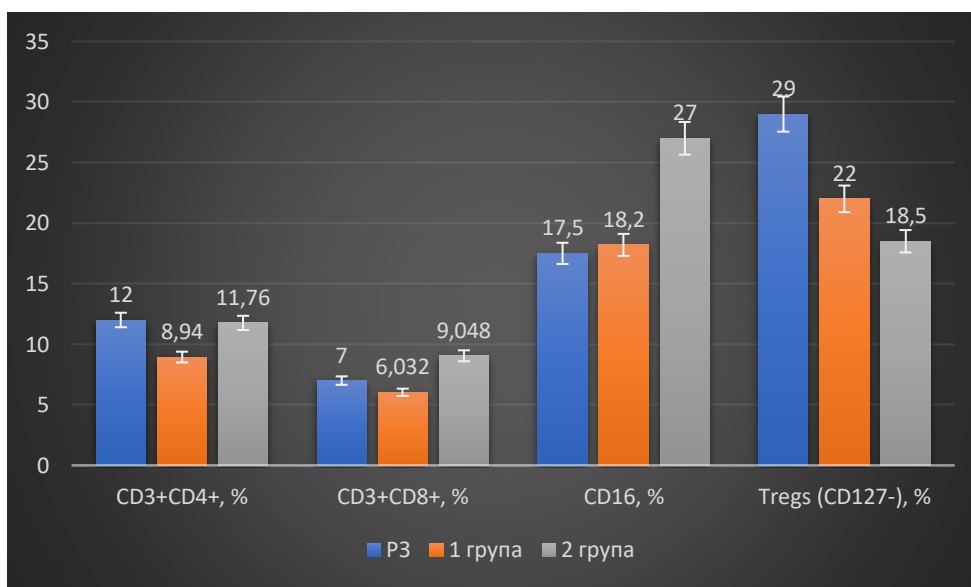


Рис. 3.1.1. Співвідношення субпопуляцій лімфоцитів у пацієнтів з з аденокарциномною шлунку.

3.2 Результати визначення вмісту олігонуклеотидної фракції DAMP.

У поточному дослідженні визначався вміст олігонуклеотидної фракції DAMP. Вміст визначали за допомогою метода абсорбційної спектрофотометрії за довжини хвилі 260 нм (олігонуклеотидна фракція).

Результати демонструють накопичення цитотоксичних олігонуклеотидних факторів DAMP, які були підвищені у всіх обстежених пацієнтів, але їх роль у перебігу онкозахворювання може бути різна. (рис 3.1.2). Пухлинні клітини, що піддаються стресу, вивільняють DAMPs, які потім можуть активувати імунну систему(наймовірніше у першої групи). Або вивільнення DAMPs може

викликати хронічне запалення, яке сприяє зростанню пухлини (наймовірніше у другої групи).

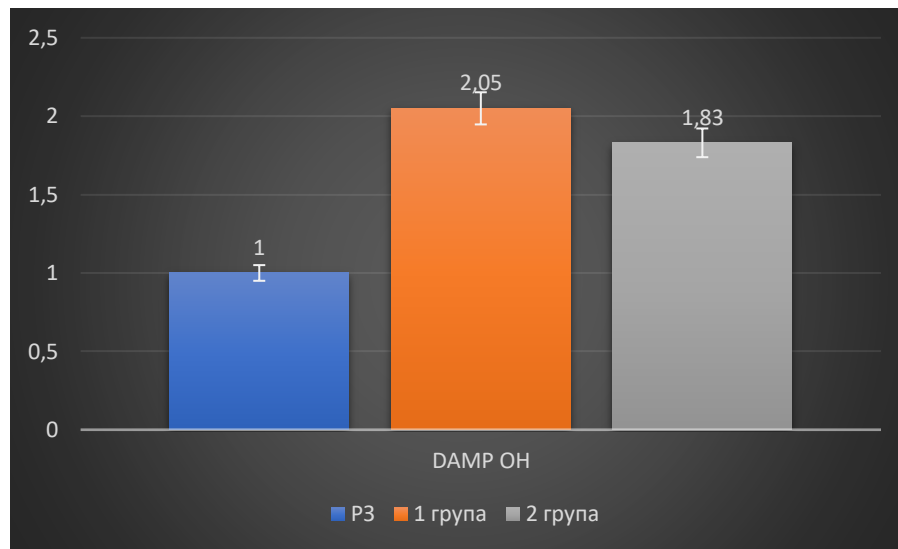


Рис. 3.2.1. Концентрація цитотоксичних олігонуклеотидних факторів DAMP (референтний рівень прийнятий за одиницю, значення наведені відносно до референтного рівня)

3.3 Результати визначення вмісту цитокінів (ІЛ-2, ІЛ-4).

Оцінювання рівня прозапальних цитокінів (ІЛ-2, ІЛ-4) у крові проводилася за допомогою прямого метода імуноферментного аналізу, результати наведені на рис 3.3.1. Видно значне підвищення інтерлейкінів у першої групи та незначне – у другої. Тож, у першої групи спостерігається підвищений рівень активації імунної системи, що може бути підставою для більш позитивного прогнозу виживання та успішного лікування. У другої групи компенсаторні механізми вже не діють, через велике супресивне навантаження, продукція активаторних інтерлейкінів знижена. Потрібно ретельно досліджувати механізми ухилення пухлини імунного нагляду та реакцію імунної системи на злоякісні новоутворення, щоб розробляти нові методи активації клітин імунної відповіді для кожного випадку.

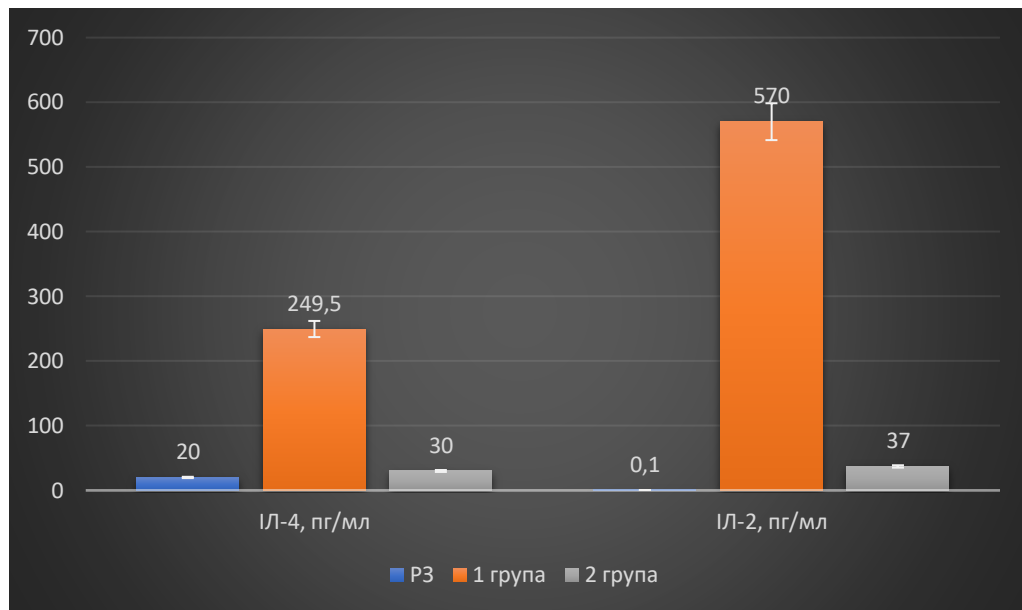


Рис. 3.3.1. Концентрації ІЛ-2 та ІЛ-4 у пацієнтів з аденокарциномою шлунку.

РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ

4.1 Обговорення результатів.

У нормі імунна система розпізнає та знищує атипові клітини, але хронічне запалення, імунодепресивні стани та поліморфізм генів імунних факторів сприяють утворенню злоякісних пухлин. Спадкова схильність за рахунок поліморфізму генів імунної відповіді може збільшувати ймовірність розвитку злоякісних новоутворень.

Тривала вірусна персистенція може викликати незворотні зміни геному. Відомо, що при вірусному зараженні після проникнення вірусу в клітинну ДНК можуть розвиватися мутації. Також ДНК нормальних клітин має ділянки, які за нуклеотидним складом відповідають вірусним антигенам і може відбутися їхня активація. У разі їх активації може відбутися малігнізація клітин.

Пухлинні захворювання посідають друге місце у структурі загальної захворюваності по всьому світу (на першому місці – серцево-судинні захворювання). Донедавна лікування онкологічних захворювань обмежувалося традиційними методами: хіміотерапією. Хіміотерапія - застосування цитостатиків, які впливають на всі клітини, як пухлинні, так і здорові, знищуючи їх. Необхідно зауважити, що при хіміотерапії високий ризик побічних ефектів. У деяких випадках необхідно переривати лікування, зупиняючись на певному етапі: терапію проводити нескінченно неможливо.

Виходячи із цієї ситуації, необхідно було шукати інші методи лікування. Вчені намагалися використовувати імунну систему для боротьби зі злоякісними захворюваннями.

Завдяки розвитку генетики, молекулярної біології в онкології розробляються та впроваджуються нові методи лікування, які допомагають боротися з

різними видами та стадіями раку, навіть із випадками при яких раніше прогноз був не дуже позитивним. Імунотерапія відноситься до таких сучасних методів. Метою імунотерапії є модуляція протипухлинного імунітету для зміни поточної імунної відповіді на активну пухлино-відторгаючу, забезпечуючи таким чином стійкий та адаптивний контроль над раком. Імунотерапія може поєднуватись з традиційними методами лікування раку такими як хірургічне втручання/хіміотерапії, для досягнення максимальної ефективності. Біотехнологічні методи імунотерапії раку стали проривом в онкології. Імунотерапія – це протипухлинне лікування, яке є методом не прямого впливу на пухлину, а опосередкованого, тобто через певні ланки імунітету людини.

Відповідь імунної системи на пухлину є послідовністю реакцій, де дефект одного з етапів блокує весь цикл. Клітини пухлини експресують антигени, які різною мірою відрізняють пухлину від нормальної тканини; далі ці антигени захоплюються і обробляються антигенпрезентуючими клітинами (такими як дендритні клітини), потім антиген представляється клітинам імунної системи. Таким чином, вроджена ланка імунної системи передає інформацію про антиген до адаптивної ланки. Імунна система дізнається та відповідає на ці антигени, особливо за рахунок вироблення цитотоксичних Т-клітинних антигенспецифічних реакцій та розвитку імунологічної пам'яті (завдяки цій функції при повторній зустрічі з антигеном, імунні клітини знищують цей антиген). Цитотоксичні ефекторні Т-клітини переміщуються до пухлини та атакують клітини, що експресують антиген. Однак пухлинні клітини адаптуються та змінюються шляхом свого природного розвитку, щоб вислизнути від імунної відповіді. Це проблема, яка активно вивчається.

Імунні контрольні точки є спеціальними білками, які діють на імунну систему як ігібітор, дозволяючи імунітету працювати, коли потрібно і скільки потрібно, запобігаючи гіперактивності і аутоімунним реакціям. Клітини пухлини можуть захоплювати ці осі; в результаті епігенетичних мутацій вони

можуть почати гіперекспресувати ліганди до інгібіторних рецепторів на поверхні імунних клітин, вислизаючи з під імунного нагляду.

Антитіла до молекул-інгібіторів PD-1, PD-L1, CTLA-4 (часто через які пухлина вислизає від імунного нагляду) – це група імуноонкологічних препаратів, представлена моноклональними антитілами, що специфічно зв'язуються та блокують вищевказані рецептори. Це забезпечує стійкість ефекторних імунокомпетентних клітин до імуносупресивної дії злоякісних клітин. Передача сигналу, що пригнічує активність Т-лімфоцитів, припиняється. Імунна система знову починає розпізнавати та атакувати пухлину. Таким чином, ці препарати усувають пухлино-індукований вибіркового клітинний імунодефіцит та знижують імуносупресивну дію від Tregs. Це сприяє відновленню ефективної протипухлинної цитотоксичної імунної відповіді.

Лікування з використанням інгібіторів імунних контрольних точок дозволяє імунній системі боротися з раковими клітинами. З того моменту, як у 2011 році інгібітори імунних контрольних точок показали клінічну ефективність, дослідження в цій галузі почали розвиватися надзвичайно швидко, і на сьогоднішній день імуноterapia показала свою ефективність у лікуванні злоякісних захворювань.

На сьогоднішній день в арсеналі онкологів є кілька імуноонкологічних препаратів: пембролізумаб, іпілімумаб, ніволумаб, атезолізумаб, дурвалумаб. Дані препарати впливають на ланки імунної системи, дозволяючи відновити ефекторну діяльність клітин, що інфільтрують.

Препарати пембролізумаб/ніволумаб діють через блок PD-1 – рецептор запрограмованої клітинної загибелі. Пухлинна клітина експресує ліганд PD-L1 (рідше PD-L2). Взаємодія рецептора PD-1, експресованим на поверхні цитотоксичних Т-лімфоцитів, які інфільтрують пухлинну тканину, і

пухлинного PD-L1 призводить до «вислизання» ракової клітини від Т-лімфоциту та його інгібування з подальшим виснаженням. Шляхом введення анти-PD-1 або анти-PD-L1 препаратів відбувається блокування цього рецептора на поверхні Т-лімфоциту/блокування ліганду пухлинної клітини. Цей зв'язок більше не діє і лімфоцит «розпізнає» чужорідну клітину та інфільтрує її. Блокада за допомогою пембролізумабу/ніволумабу забезпечує стійкість ефекторних імункомпетентних клітин до імуносупресивної дії злоякісних клітин. Таким чином, препарат усуває пухлино-індукований клітинний імунодефіцит і сприяє відновленню ефективної протипухлинної цитотоксичної імунної відповіді.

Препарат іпілііумаб інактивує інгібуючий сигнальний шлях CTLA-4 і активує лімфоцити. Оскільки блокада осі PD-1/PD-L1 забезпечує неповне відновлення активності виснажених Т-клітин, а високий рівень внутрішньопухлинних регуляторних Т-клітин пов'язано з слабкою імунною відповіддю при різних видах раку, таргетний вплив на Tregs здатний суттєво підвищити ефективність терапії блокади PD-1/PD-L1. Блокада CTLA-4 перешкоджає передачі інгібіторного сигналу на етапі активації Т-клітин у лімфатичних вузлах, коли Treg видаляють B7 (які необхідні для активації Т-лімфоцитів через CD28) з поверхні АПК зв'язуючись з ними експресуючимися рецепторами CTLA-4. Також блок CTLA-4 на самих Т-лімфоцитах, полегшує їх активацію.

Вищевказані типи препаратів можуть застосовуватися одночасно: це подвійна імунна блокада (іпілііумаб+ніволумаб). Застосування цієї схеми є однією з найбільш перспективних стратегій імунотерапії, забезпечує дуже високоефективну дію на імуну систему, де блок шляху PD1/PD-L1 відновлює ефекторну дію цитотоксичних клітин, а блок шляху CTLA-4 забезпечує коректну активацію клітин імунної системи.

Розвиток молекулярно-генетичних досліджень дозволяє сьогодні виявляти ще одну причину розвитку пухлин - накопичення мутаційного вантажу у вигляді

мікросателітної нестабільності (MSI). Мікросателітна нестабільність (MSI) – це стан генетичної гіпермутабельності (схильності до мутації), який виникає через порушення репарації невідповідностей ДНК (MMR). Наявність MSI є фенотиповим доказом того, що MMR не функціонує нормально. Суть у тому, що в системі ДНК щодня відбувається понад 10 млн. мутацій. Під дією екзогенних та ендогенних факторів відбувається збій репараційної системи, і в геномі починають накопичуватися мутації. Це і є мікросателіти – ділянки ДНК, які повторюються у надмірній кількості. Високий рівень MSI асоціюється зі зростанням кількості неоантигенів — змінених пептидів, які презентуються на молекулах ГКГС 1 імунокомпетентним клітинам, що запускає імунну відповідь. Цим пояснюється рівень мутаційного навантаження – що вища мікросателітна нестабільність (MSI-High), то вища ймовірність відповіді пухлинного процесу на імунотерапію.

Найчастіше мікросателітна нестабільність зустрічається при раку шлунка.

На сьогоднішній день одним з показанням до імунотерапії є експресія важливих маркерів відповіді на імунотерапію PD-L1 та наявність мікросателітної нестабільності (MSI-H).

На даний момент немає лабораторних та молекулярно-генетичних методів визначення чутливості до якогось конкретного препарату. При призначенні слід керуватись клінічними рекомендаціями, в яких прописано, в якому разі який препарат призначати.

Важливо зазначити, що тільки у 60% пацієнтів методи імунотерапії викликають позитивний результат, тому потрібно ретельно досліджувати механізми ухилення пухлини імунного нагляду та реакцію імунної системи на злоякісні новоутворення, щоб розробляти нові методи активації імунної відповіді для кожного випадку.

4.2 Стратегії імунотерапії в залежності від стадії та виду раку.

Імунотерапія при меланомі проводиться за наступною схемою. Потрібно визначення трьох предикторних маркерів. Імунотерапія призначається у післяопераційному періоді, коли є уражені лімфовузли.

Якщо пацієнт приходить на прийом, процес поширений, є метастази, лікування ніякого не було, у тому числі хірургічного – слід призначити 1 лінію терапії. Це перша схема, яку він у принципі одержує.

Переважно призначати комбінацію іпілімумаб + ніволумаб, тому що ефективність цієї комбінації препаратів значно вища, ніж ніволумабу у монорежимі.

Імунотерапія при колоректальному раку (прямої кишки, ободової кишки, сигмовидної кишки) слід спочатку визначити рівень MSI. За наявності високого рівня мікросателітної нестабільності пацієнту показана імунотерапія. Комбінація препаратів має вищу ефективність, ніж монотерапія, проте призначається за потребою.

При раку легень визначення експресії PD-L1 необхідно для того, щоб вибрати тактику.

Якщо пацієнт ослаблений, він має невеликий обсяг ураження інших органів і тканин, можна призначити препарат пембролізумаб в монорежимі.

Якщо пацієнт у задовільному стані та/або є велика пухлинна маса, можливе проведення комбінованої імунно-хіміотерапії, незалежно від рівня PD-L1.

При раку шийки матки, захворюваність якої невпинно зростає з кожним роком, стандартом була хіміотерапія або хіміопроменева терапія. Зараз ми можемо використовувати імунонкологічний препарат (пембролізумаб) у другій лінії хіміотерапії за наявності експресії PD-L1.

ВИСНОВКИ

1. При персистенції в організмі Sars-CoV-2 може служити індуктором малегнізації клітин через свою мутагенну дію. Персистенція онкогенних вірусів (Sars-CoV-2) сприяє підвищенню мутаційного навантаження; вірус може безпосередньо викликати трансформацію клітин інтегруючи зовнішній онкоген, надмірно активуючи людські онкогени та/або інгібуючи супресори пухлин, результуючи коморбідний перебіг раку та симптомокомплексу постковідного синдрому.
2. Темпи розвитку пухлини можуть відрізнятися залежно від віку та стану імунної системи в цілому.
3. Комплекс ознак, що набувають малегнізовані клітини у кожному окремому випадку, унікальний, через генетичну нестабільність клітин злоякісного новоутворення.
4. Мікрооточення пухлини складне і його елементи взаємопов'язані. Механізми ухилення пухлини від імунної відповіді різноманітні та часто активують нові або взаємопідсилюють один одного. Для ефективної боротьби з раковим новоутворенням та його метастазуванням необхідно застосовувати комплексні методи, що включають декілька механізмів імунотерапії. Комбінація препаратів націлених на блок осі PD1/PD-L1 та блокаторів CTLA-4 показує значно вищу ефективність ніж препарати націлених на блок осі PD1/PD-L1 у монорежимі.
5. Так як комплекс ознак, що набувають малегнізовані клітини на різних стадіях у кожному окремому випадку унікальний, потрібно застосовувати різні стратегії лікування відповідно до кожного випадку.
6. Імунотерапія це відносно новий комплекс методів. Так як тільки у 60% пацієнтів методи імунотерапії викликають позитивний результат, потрібно ретельно досліджувати механізми ухилення пухлини імунного нагляду та реакцію імунної системи на злоякісні новоутворення, щоб

розробляти нові методи активації клітин імунної відповіді для кожного випадку.

1. IMMUNOLOGIC DYSFUNCTION IN CANCER. Kavanaugh, Denise Yardley et al. Hematology/Oncology Clinics, Volume 10, Issue 4, 927 - 952
2. By Saskia J. A. M. Santegoets; Marij J. P. Welters; and Sjoerd H. Van der Burg. Monitoring of the Immune Dysfunction in Cancer Patients. 2016. DOI:<https://doi.org/10.3390/vaccines4030029>
3. O.J. Finn, Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer, Annals of Oncology, Volume 23, Supplement 8,2012, ISSN 0923-7534, <https://doi.org/10.1093/annonc/mds256>.
4. Koya AI, Ibrahim SA. Carcinogenesis; 2024. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK604463/>
5. Murphy K., Weaver C. Janeway's Immunobiology 9th ed. (2020).
6. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Helper T Cells and Lymphocyte Activation. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26827/>
7. Nikolaos Patsoukis et al. Revisiting the PD-1 pathway. Sci.Adv.6,eabd2712(2020). DOI:10.1126/sciadv.abd2712
8. Lin, X., Kang, K., Chen, P. et al. Regulatory mechanisms of PD-1/PD-L1 in cancers. Mol Cancer 23, 108 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12943-024-02023-w>
9. Sobhani N, Tardiel-Cyril DR, Davtyan A, Generali D, Roudi R, Li Y. CTLA-4 in Regulatory T Cells for Cancer Immunotherapy. Cancers (Basel). 2021 Mar 22;13(6):1440. doi: 10.3390/cancers13061440. PMID: 33809974; PMCID: PMC8005092
10. Kandel S, Adhikary P, Li G, Cheng K. The TIM3/Gal9 signaling pathway: An emerging target for cancer immunotherapy. Cancer Lett. 2021 Jul 10;510:67-78. doi: 10.1016/j.canlet.2021.04.011. Epub 2021 Apr 22. PMID: 33895262; PMCID: PMC8168453.

11. Liu, Y., Wang, Y., Yang, Y. et al. Emerging phagocytosis checkpoints in cancer immunotherapy. *Sig Transduct Target Ther* 8, 104 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01365-z>
12. *Front. Immunol.*, 11 July 2023. Sec. Autoimmune and Autoinflammatory Disorders. *Autoimmune Disorders*. Volume 14 - 2023 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1198365>
13. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*. 2020 Mar 1;10(3):727-742. PMID: 32266087; PMCID: PMC7136921.
14. *Front. Immunol.*, 18 April 2019. Sec. Immunological Tolerance and Regulation. Volume 10 - 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00846>
15. Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, David E. Bruns. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4th edition, 2006. 2412c
16. Kovalenko, V. M., A.M. Гнилорибов. (2024). CAR T-клітинна терапія — нова технологія у лікуванні аутоімунних захворювань: Огляд технології, принципів застосування, перших результатів та перспективи. *Ukrainian Journal of Rheumatology*, №97 (3) 2024. <https://doi.org/10.32471/rheumatology.2707-6970.97.18953>.
17. Leitner J, Herndler-Brandstetter D, Zlabinger GJ, Grubeck-Loebenstein B, Steinberger P. CD58/CD2 Is the Primary Costimulatory Pathway in Human CD28-CD8+ T Cells. *J Immunol*. 2015 Jul 15;195(2):477-87. doi: 10.4049/jimmunol.1401917. Epub 2015 Jun 3. PMID: 26041540.
18. Klimova, O. M., Boyko, V. V., Lavinska O. V., Agarkova, A. M., Hashina V. O., & Kritsak, V. V. (2024). SARS-COV-2 VIRAL INFECTION AND THE POST-COVID-19 SYNDROME DEVELOPMENT DISRUPTS IMMUNO-RESISTANCE AND PROMOTES ONCOGENESIS. *Kharkiv Surgical School*, (5), 62-69. <https://doi.org/10.37699/2308-7005.5.2024.12>

19. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018 Feb 21;120:5.1.1-5.1.11. doi: 10.1002/cpim.40. PMID: 29512141; PMCID: PMC5939936.
20. Michael Bass, Eric W. Van Stryland, David R. Williams, William L. Wolfe. *Handbook of optics*, vol. II, second edition, 1995. 1495c.
21. Tsien RY. Green Fluorescent Protein. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:509–544. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>
22. Collective Behaviour - From Cells to Humans - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Simplified-model-of-a-flow-cytometer-Through-hydrodynamic-focusing-cells-arrive-one-by-one-by_fig9_333825066 [accessed 30 Apr 2025].
23. Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw*. 2018 Aug 13;18(4):e27. doi: 10.4110/in.2018.18.e27. PMID: 30181915; PMCID: PMC6117512.
24. Serological and immunological test - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Direct-ELISA-and-its-procedure_fig2_356329893 [accessed 12 May 2025]
25. Cancer-Homing CAR-T Cells and Endogenous Immune Population Dynamics - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Procedure-to-implement-adoptive-CAR-T-cell-therapy-This-includes-the-collection-of-a_fig1_357450547 [accessed 10 May 2025]
26. CAR-T Cells/-NK Cells in Cancer Immunotherapy and the Potential of MSC to Enhance Its Efficacy: A Review - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/This-figure-illustrates-how-a-T-cell-NK-cell-can-be-engineered-to-express-CAR-with-its_fig1_359624695 [accessed 10 May 2025]
27. Regulatory mechanisms of PD-1/PD-L1 in cancers - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: <https://www.researchgate.net/figure/The->

- regulation-of-PD-1-PD-L1-signaling-on-immune-cells-a-The-PD-1-PD-L1-pathway_fig3_380697239 [accessed 10 May 2025]
28. Dhatchinamoorthy K, Colbert JD, Rock KL. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. *Front Immunol*. 2021 Mar 9;12:636568. doi: 10.3389/fimmu.2021.636568. PMID: 33767702; PMCID: PMC7986854.
29. Keegan AD, Leonard WJ, Zhu J. Recent advances in understanding the role of IL-4 signaling. *Fac Rev*. 2021 Sep 7;10:71. doi: 10.12703/r/10-71. PMID: 34557875; PMCID: PMC8442009.
30. Measuring hemoglobin spectra: searching for carbamino-hemoglobin - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Preparation-of-blood-from-the-vein-to-the-spectrophotometer-The-different-steps-are_fig1_344832061 [accessed 13 May 2025]
31. Weizmann Institute of Science: Flow Cytometry Sample Preparation. Available from: https://www.weizmann.ac.il/LS_CoreFacilities/flow-cytometry/sample-preparation
32. О. М. Клімова, С. В. Сушков, О. В. Лавінська, Л. А. Дроздова. Застосування імунологічних предикторів для вибору тактики комплексного лікування аденокарциноми шлунку. ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В. Т. Зайцева НАМН України», м. Харків, 2025.
33. Adaptive immunity and IL-17A are not involved in the progression of chronic kidney disease after 5/6 nephrectomy in mice - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Detection-of-IL-17A-expressing-lymphocytes-in-the-kidney-Flow-cytometry-gating-strategy_fig1_327986413 [accessed 16 May 2025]
34. Whiteside TL. What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? *Semin Cancer Biol*. 2012 Aug;22(4):327-34. doi:

- 10.1016/j.semcancer.2012.03.004. Epub 2012 Mar 28. PMID: 22465232; PMCID: PMC3385925.
35. Cai J, Wang D, Zhang G, Guo X. The Role Of PD-1/PD-L1 Axis In Treg Development And Function: Implications For Cancer Immunotherapy. *Onco Targets Ther.* 2019 Oct 15;12:8437-8445. doi: 10.2147/OTT.S221340. PMID: 31686860; PMCID: PMC6800566.
36. Bingyu Wang, Zaibo Zhang, Wenbo Liu, Bibo Tan, Targeting regulatory T cells in gastric cancer: Pathogenesis, immunotherapy, and prognosis, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 158, 2023, 114180, ISSN 0753-3322, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114180>.
37. Pierotti MA, Sozzi G, Croce CM. Mechanisms of oncogene activation. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12538/>
38. Stingi A, Cirillo L. SARS-CoV-2 infection and cancer: Evidence for and against a role of SARS-CoV-2 in cancer onset. *Bioessays*. 2021 Aug;43(8):e2000289. doi: 10.1002/bies.202000289. Epub 2021 Jun 3. PMID: 34081334; PMCID: PMC8209829.