

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

**Оцінка зміни експресії рецепторів
NK-CD16+ та цитотоксичних CD8+ лімфоцитів при патологіях
печінки та селезінки**

Допущено до захисту
«__»_____2024 р.
Завідуючий
кафедрою _____

Кваліфікаційна робота
студентки кафедри
Іванової Олени Олександрівни

Оцінка «_____»
Голова ЕК

«__»_____2024 р.

Науковий керівник:
Доктор біологічних наук,
професорка Клімова Олена
Михайлівна

Харків

2024

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота на тему: «Оцінка зміни експресії рецепторів NK-CD16+ та цитотоксичних CD8+ лімфоцитів при патологіях печінки та селезінки».

Робота включає 72 сторінки, використаних джерел – 116.

При тривалій персистенції вірусів та виснаженні вродженої та адаптивної імунної системи інфіковані клітини стають джерелом аутоінфікування. Порушення імуногенетичного контролю може призводити до реінфікування та повторної реплікації вірусів, у зв'язку з чим постає потреба у розробці засобів, що впливають на активацію рецепторів імунокомпетентних клітин та стимуляцію афферентної ланки імунітету. Для виявлення таргетних мішеней та розробки новітніх лікувально-діагностичних протоколів необхідне фундаментальне дослідження найважливішої ланки механізму імунної відповіді – лімфоцитів вродженого та адаптивного імунітету, що відіграють роль у розпізнаванні та знищенні інфікованих клітин.

Метою роботи є дослідження вмісту і співвідношення натуральних кілерних NK-CD16+ клітин вродженого імунітету та цитотоксичних кілерних Т-лімфоцитів CD8+ адаптивного імунітету при ураженні печінки та селезінки на тлі персистенції вірусних інфекцій (ЦМВ, ВЕБ, SARS-CoV-2). У роботі проаналізовано зміну експресії поверхневих маркерів на натуральних кілерних NK-CD16+ клітинах та цитотоксичних Т-лімфоцитах CD8+ при гепатоспленомегалії на тлі персистенції герпетичних вірусів та абдомінальної патології на тлі Covid-19.

Ключові слова: *натуральні кілери NK-CD16+, цитотоксичні CD8+ лімфоцити, герпетичні віруси, SARS-CoV-2.*

ANNOTATION

Qualification work on the topic: "The evaluation of changes in the expression of NK-CD16+ receptors and cytotoxic CD8+ lymphocytes in liver and spleen pathologies."

The research consists of 72 pages, 116 sources are referenced.

With the long-term viral persistence and the innate and adaptive immune system exhaustion, infected cells become a source of autoinfection. Violation of immunogenetic control can lead to re-infection and repeated replication of viruses, in connection with which there is a need to develop means that affect the activation of receptors of immunocompetent cells and stimulation of the afferent link of immunity. In order to identify targets and develop the latest treatment and diagnostic protocols, fundamental research of the most important link of the immune response mechanism is necessary - lymphocytes of the innate and adaptive immunity, which play a role in recognizing and destroying infected cells.

The research purpose is to study the content and ratio of innate immunity natural killer NK-CD16+ cells and adaptive immunity cytotoxic killer T-lymphocytes CD8+ cells in liver and spleen damage against the background of viral infections persistence (CMV, EBV, SARS-CoV-2). The work analyses the change of the surface markers expression on natural killer NK-CD16+ cells and cytotoxic T-lymphocytes CD8+ in case of hepatosplenomegaly in view of the persistence of herpes viruses and abdominal pathology due to Covid-19.

Key words: *natural killer NK-CD16+, cytotoxic CD8+ lymphocytes, herpes viruses, SARS-CoV-2.*

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ANNOTATION.....	3
ЗМІСТ.....	4
ВСТУП.....	7
Розділ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	9
1.1. Імунокомпетентні клітини: історія, класифікація, їх функції.....	9
1.2. CD16+ NK-клітини.....	12
1.3. порушення експресії рецепторів CD16 NK-кілерів.....	17
1.4. CD8-цитотоксичні лімфоцити.....	18
1.5. Механізми зниження експресії CD8 рецепторів цитотоксичних Т-лімфоцитів.....	22
1.6 Роль HLA I класу у зв'язуванні з антигенними пептидами.....	23
1.7. Можливі механізми інгібування зв'язувальної функції HLA I класу....	25
1.8. Патологічні стани, пов'язані із зменшенням зв'язування антигенних пептидів та їх наслідки.....	27
1.9. Характеристика поверхневого маркера CD3+HLA-DR+.....	28
1.10. Зв'язок маркера с із патологічними станами.....	29
1.11. Активація білків системи комплементу C3 і C4 у пацієнтів з цирозом печінки на тлі гепатоспленомегалії, спричиненої персистенцією герпетичних вірусів.....	31
1.12. Пошук таргетних мішеней для розробки біотехнологічних продуктів при гепатоспленомегалії.....	33

Розділ 2. МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ.....	35
2.1. Виявлення вмісту антитіл класу IgG до цитомегаловірусу людини та вірусу Епштейна-Барр методом імуноферментного аналізу.....	35
2.2. Виділення фракції лімфоцитів в градієнті щільності.....	37
2.3. Виявлення субпопуляції лімфоцитів методом асоціації із моноклональними антитілами.....	37
2.4. Виявлення наявності поверхневих антигенів імунокомпетентних клітин за допомогою МКАТ методом непрямой імунофлуоресценції.....	38
2.5. Визначення експресії поверхневих антигенів імунокомпетентних клітин із використанням МКАТ методом проточної цитофлуориметрії.....	39
2.6. Статистична обробка результатів.....	40
Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	41
3.1. Оцінка вмісту антитіл класу IgG до цитомегаловірусу людини та вірусу Епштейна-Барр методом імуноферментного аналізу.....	41
3.2. Оцінка зміни експресії поверхневих рецепторів CD16 методом асоціації з антитілами.....	41
3.3. Оцінка зміни експресії поверхневих рецепторів CD8 методом асоціації з антитілами.....	42
3.4. Оцінка зміни експресії поверхневих рецепторів CD16 методом реакції імунофлуоресценції.....	43
3.5. Оцінка зміни експресії поверхневих рецепторів CD8 методом реакції імунофлуоресценції.....	45
3.6. Оцінка зміни експресії поверхневих рецепторів CD16 методом проточної цитофлуориметрії.....	47

3.7. Оцінка зміни експресії поверхневих рецепторів CD8 методом проточної цитофлуориметрії.....	48
3.8. Обговорення.....	50
ВИСНОВКИ.....	54
СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....	55

ВСТУП

Сьогодні широкого поширення набули патології, пов'язані із печінкою та селезінкою, що у деяких проявляються у формі гепатоспленомегалії – одночасного збільшення у розмірах обидвох органів. Гепатоспленомегалія часто ускладнюється портальною гіпертензією, рецидивуючими кровотечами варикозно розширених вен стравоходу, порушенням основної функції селезінки із видалення дефектних старих клітин та процесів детоксикації печінки[1].

У той час як більшість досліджень цієї патології присвячено метаболічним порушенням, є свідчення зв'язку гепатоспленомегалії із імунологічними порушеннями, що впливають на загальну резистентність організму. Імунна відповідь являє собою багатофункціональну реакцію і її важливою ланкою є лімфоцити вродженого та адаптивного імунітету - натуральні кілерні NK-CD16+ клітини та цитотоксичні кілерні Т-лімфоцити CD8+ відповідно – що здатні елімінувати старі, пошкоджені та інфіковані клітини із зміненим фенотипом. Відомо, що тригерними факторами та предикторами, що індукують патологічні стани печінки та селезінки, можуть бути інфекційні агенти, в тому числі герпетичні віруси - цитомегаловірус, вірус Епштейна-Барр[1]. При розвитку захворювань печінки та селезінки порушується функція лімфоцитів та виникають диспропорції у їх концентрації в крові.

Для виявлення таргетних мішеней та розробки препаратів для корекції імунологічних порушень необхідне детальне дослідження змін поверхневих рецепторів кілерних клітин та цитотоксичних лімфоцитів, оскільки саме ці структури є засобом міжклітинної комунікації та реалізації їх функцій. Таким чином, метою цієї роботи є дослідження вмісту і співвідношення натуральних кілерних NK-CD16+ клітин вродженого імунітету та

цитотоксичних кілерних Т-лімфоцитів CD8⁺ адаптивного імунітету при ураженні печінки та селезінки на тлі персистенції вірусних інфекцій(цитомегаловірусу людини, вірусу Епштейна-Барр, вірусу SARS-CoV-2).

Для досягнення мети були поставлені наступні задачі:

1. Виявлення вмісту антитіл до ЦМВ та ВЕБ
2. Виявлення вмісту натуральних кілерних NK- CD16⁺ клітин та цитотоксичних кілерних CD8⁺ клітин за допомогою МКАТ методом світлової мікроскопії
3. Виявлення вмісту натуральних кілерних NK CD16⁺ клітин та цитотоксичних кілерних CD8⁺ клітин за допомогою МКАТ методом флуоресцентної мікроскопії
4. Оцінка співвідношення субпопуляцій NK-CD16⁺ та CD8⁺ методом проточної цитофлуориметрії.

Розділ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Імунокомпетентні клітини: історія, класифікація, їх функції

Очевидно, що еволюція імунітету в контексті формування захисних реакцій проти природних ворогів починається із моменту появи перших організмів, що утворили відносини типу «хижак-жертва». Основою їх захисних реакцій були системи рестрикції-модифікації та РНК-інтерференції, що використовувалися для розпізнавання та елімінації чужорідних нуклеїнових кислот[2]. Появу цих механізмів можна порівняти із прообразом того, що сучасні науковці кличуть вродженим імунітетом. Перші ознаки набуття адаптивних механізмів захисту прослідковуються у появі системи CRISPR/Cas: геном бактерій та архей зберігає та постійно редагує інформацію про зустрічі із патогенами у вигляді коротких спейсерних послідовностей, завдяки чому повторні зіткнення викликають більш швидкі специфічні захисні реакції[3]. Прогресуючи та набуваючи нових форм, живі організми набувають здатності до синтезу білків-дефензинів, розпізнавання молекулярних структур, пов'язаних з патогенами(PAMP); у випадку незворотної поразки вдаються до запрограмованої смерті клітини, альтруїстично обмінюючи власне життя на безпеку власного оточення[2]. Поява багатоклітинних форм призвела до ускладнення імунних відповідей, формування спеціалізованих клітин, що здатні розпізнавати та знищувати як чужорідні організми, так і власні мутовані елементи, що становлять загрозу цілісності та коректному функціонуванню. На цьому етапі формуються три основні шляхи захисту: поява фагоцитів, цитотоксичних клітин та системи комплементу.

Довгий час до появи хребетних життя на нашій планеті покладалося на описані вище механізми вродженого імунітету, із покоління до покоління ускладнюючи та вдосконалюючи різноманіття своїх реакцій в

залежності від збудника та умов середовища. Злам системи стався на межі ордовицько-силурійського вимирання близько 450 мільйонів років тому, коли у морях панували предки міксин, міног та примітивних щелепних риб, що розвили перші механізми адаптивного імунітету для більш швидкої та специфічної відповіді на патогени, з якими мала місце зустріч у минулому[4]. В той час як міксини та міноги набули здатності виробляти велику кількість специфічних молекул, так званих варіабельних рецепторів лімфоцитів(VLR), що за своєю функцією подібні до антитіл, щелепні пережили «імунологічний великий вибух» - різку появу типових адаптивних складових – імуноглобулінів, Т- та В-клітинних рецепторів, головного комплексу гістосумісності(МНС)[5]. Ключовою подією, що призвела до такого стрімкого процесу, стала доместикація транспозону, отриманого від вірусів, і перетворення його на фермент RAG1/RAG2 – центральний регулятор рекомбінації генів імуноглобулінів та Т-В-клітинних рецепторів[6]. Отримані внаслідок низки випадковостей можливості допомогли щелепним швидко зайняти домінуюче положення на планеті, а механізм, що їх забезпечував, виявився надзвичайно консервативним: з ходом часу структура складових адаптивного імунітету не зазнавала серйозних змін, основний фокус був на розширенні меж варіабельності ділянок відповідних генів, тобто розпізнаванні більшої кількості патогенів та швидкій відповіді на них.

Фундаментальну роль у функціонуванні вродженої та адаптивної імунної системи відіграє відносно невелика група клітин, що відома під назвою лімфоцитів. Ця група клітин походить від спільного лімфоїдного попередника, включає в себе Т-лімфоцити, В-лімфоцити, що є основними гравцями в адаптивному імунітеті, та природні кілери(НК-клітини), що є частиною вродженого. Ця група складає від 18% до 42% циркулюючих лейкоцитів у крові, але значно вирізняється на їх фоні за декількома ознаками: походять із кісткового мозку, проте дозрівають поза ним у тимусі,

селезінці та периферичних органах імунної системи; зазвичай є клітинами, що спочивають, та не є кінцевою формою – при стимуляції піддаються мітозу та утворюють ефекторні клітин та клітини пам'яті; Т- та В-лімфоцити здатні до перебудови генів задля продукції антитіл та поверхневих рецепторів[7].

Т-лімфоцити є групою клітин, що під час розвитку піддаються диференціації у тимусі та експресують на своїй поверхні Т-клітинний рецептор, здатний до розпізнавання коротких пептидних послідовностей (8-12 амінокислот), які походять від білкових антигенів[8]. Залежно від експресії поверхневих маркерів, клітини класифікують на цитотоксичні Т-лімфоцити (CD8+), що відповідальні за власне знищення інфікованих патогенами або ж злоякісно трансформованих клітин[8], Т-хелперні (CD4+), що синтезують та секретують сигнальні молекули та регулюють інтенсивність імунної відповіді, впливаючи на активацію В-клітин та макрофагів[9]. Окремо також виділяють Т-клітини пам'яті, що здатні зберігатися протягом тривалого періоду та забезпечувати імунологічну «пам'ять», та Т-супресори – популяцію Т-лімфоцитів, що відповідальні за підтримку толерантності до власних антигенів[10]. В-лімфоцити є популяцією лімфоцитів, що забезпечують гуморальний імунітет шляхом продукції антитіл, презентації антигенів, виділення цитокінів та екзосом[11]. Диференціація В-клітин умовно поділяється на дві стадії: антиген-незалежну в кістковому мозку та печінці ембріонів (на якій відбувається перебудова генів імуноглобулінів та їх експресія) та антиген-залежну у селезінці та периферичних органах (під час якої відбувається активація, проліферація та диференціація в плазматичні клітини)[12]. Після контакту із антигеном трансформуються у зрілі фолікулярні або В-клітини маргінальної зони, що здатні до синтезу високоафінних антитіл та перетворення у В-клітини пам'яті[9]. НК-клітини є великими зернистими лімфоцитами, що були відкриті в середині 70-х років ХХ століття[13]. Ці

лімфоцити дозрівають та диференціюються у кістковому мозку та вторинних лімфоїдних органах. На відміну від Т- і В-клітин, природні клітини-кілери не мають клонотипових рецепторів і активуються після розпізнавання своєї мішені за допомогою рецепторів, кодованих зародковою лінією, стимуляцію цитокінами та АТ-залежну клітинну цитотоксичність. Згодом вони використовують цитотоксичні гранули із білками-перфоринами та гранзимами, ліганди рецепторів смерті та цитокіни для виконання своїх ефекторних функцій, тобто знищення інфікованих чи будь-яких інших клітин, що становлять небезпеку для організму, шляхом апоптозу[10,14].

1.2. CD16+ NK-клітини

Отже, природні кілери є групою лімфоцитів, що відіграють ключову роль у противірусному та протипухлинному імунітеті і необхідні для контролю гострих і стійких вірусних інфекцій, таких як герпесвіруси, а при раку сприяють прямому лізису багатьох типів пухлин і патрулюють різні ділянки для запобігання метастазам[15]. На відміну від інших лімфоцитів, що активуються після розпізнавання антигену, ці клітини використовують стратегію, відому як «негативне розпізнавання»: рецептори NK-клітин є «гальмівними рецепторами» за своєю природою через те, що вони утримують літичну активність пригніченою, коли виявляють присутність антигенів МНС. Ці клітини виявляють інфіковані клітини (в основному вірусами) або злоякісні клітини, в яких експресія молекул МНС знижена, змінена або відсутня[11]. Не зважаючи на їх відносне поширення (до 5% загальної кількості лімфоцитів у крові) та значення для організму, NK-клітини довгий час залишалися поза увагою вчених з огляду на складність виявлення та гетерогенність між видами та всередині організму[16]. Варто відзначити, що деталі про етапи та місця диференціації цих клітин досі є предметом наукових дискусій.

НК-клітини беруть свій початок від гемопоетичних стовбурових клітин із маркером CD34+. Під впливом таких факторів мікрооточення як фактор стовбурових клітин SCF, ліганд *fms*-подібної тирозинкінази 3 (FLT3L) та IL-7 клітина-попередник набуває здатності експресувати маркер CD45RA, що визначає її прихильність до лімфоїдної лінії розвитку[17]. Подальша експресія маркеру CD122, що є загальною субодиницею рецептора IL-2 β , спільної для сигнальних шляхів IL-2 та IL15, вказує на незворотнє диференціювання у напрямку НК-клітин[18]. Подальший розвиток характеризується початком експресії специфічних трансмембранних білків NKG2D, NKp30 і NKp46, що детермінують здатність до розпізнавання білків, що присутні на клітинах у стресовому стані, та регуляцію цитотоксичності[19]. Перехід до зрілих НК-клітин пов'язаний із набутою експресією CD56, CD94\NKG2 та кілерного лектинового рецептора С-типу (Killer C-type lectin receptor) CD161, пізніше CD16[18]. CD94\NKG2 представляє собою сімейство лектинових рецепторів, що стимулюють або пригнічують активність шляхом розпізнавання неklasичних глікопротеїнів МНС класу I[20]. Рецептор CD161 залучений до інгібування секреції цитокінів, проте його функціональна роль все ще активно досліджується[18,21]. Відповідно до експресії молекули адгезії CD56 та CD16 зрілі НК-клітини можна розділити на 2 субпопуляції: CD56_{bright} (від англ. bright — «яскравий»), які мають фенотип CD34-/CD117_{low}/CD94+/CD16- та CD56_{dim} (від англ. dim — «тьмянний, туманний»), що є термінальною стадією розвитку. Перехід від CD56_{br} до CD56_{dim} НК-клітин є прогресивним, популяція поступово набуває експресії CD16, KIR(Killer-cell immunoglobulin-like receptors) та цитотоксичних гранул шляхом генерації тимчасової популяції CD56_{br}/CD16+ НК-клітин. Під час цього переходу CD56_{br}-клітини втрачають експресію рецепторів CD117, CD127 і CD94/NKG2A, одночасно набуваючи CD94/NKG2C і знижуючи регуляцію CD56[22].

Різні популяції кілерних клітин нерівномірно розподілені організмом. CD56_{br} становлять лише ~10% NK-клітин у периферичній крові[15], але вони переважають у вторинних лімфоїдних органах, кістковому мозку, печінці, кишково-шлунковому тракту[23]. Ця субпопуляція має слабку цитолітичну дію, високий проліферативний потенціал, здатна до інтенсивного синтезу цитокінів – що головним чином представлені інтерфероном-гамма IFN- γ , гранулоцитарно-макрофагальним колонієстимулюючим фактором (GM-CSF) та фактором некрозу пухлин TNF- α – у відповідь на стимуляцію IL-2 та IL-15[13,24]. CD56_{dim} становлять близько 90% NK-клітин у периферичній крові, селезінці та легенях, експресують маркери CD16 та KIR, є потужними цитолітичними ефекторними клітинами, які швидко секретують прозапальні цитокіни і цитотоксичні медіатори (гранзими та перфорин) після опосередкованої рецепторами активації[16].

Функція кілерних клітин регулюється точним балансом між гальмівними та активуючими сигналами, що надходять від відповідних рецепторів[24]. Лігандами гальмівних рецепторів є переважно MHC класу I, сигнал передається через мотиви інгібування імунорецепторів на основі тирозину (ITIM) із залученням фосфатаз для придушення функції NK-клітин; ці рецептори беруть участь у аутоімунній толерантності в фізіологічних умовах, щоб уникнути вбивства нормальних клітин[16,26]. Головними представниками цього класу є KIR2DL і KIR3DL, що містять Ig-подібні домени та поєднуються із HLA-A або HLA-B, лектиноподібні рецептори клітин-кілерів, зокрема CD94/NKG2A та CD94/NKG2C, що є спорідненими до неklasичних MHC (HLA-E). CD94/NKG2A додатково може пригнічувати CD16-залежну активацію кіназ Syk і ERK[26]. До інгібіторних рецепторів також належать LIR(лейкоцитарні імуноглобуліноподібні рецептори), лігандами яких є HLA-A, HLA-B та HLA-G та глікопротеїни цитомегаловірусу людини та TIGIT, незалежний від MHC-I рецептор, що може розпізнавати CD112 та CD155 для контролю

аутоімунної толерантності, особливо при рості пухлин[13,25,26]. Лігандами рецепторів активації є вірусні молекули та стрес-білки. Ці рецептори використовують мотиви активації на основі тирозину (ITAM) для трансдукції стимулюючих сигналів. Залучення рецептора, що містить ITAM, призводить до фосфорилування тирозину та залучення адапторних молекул, включаючи FcεR1γ, CD3ζ або DAP12/DAP10[16]. Основними активуючими рецепторами є природні рецептори цитотоксичності (NCR) і NKG2D. NCR включають NKp46, NKp30 і NKp44, які є Ig-подібними трансмембранними білками[25]. Після зв'язування із вірусними лігандами, такими як гемаглютинін чи білок pp65, або при розпізнаванні білків, асоційованих з пухлинами, ці рецептори виявляють синергічну дію та запускають синтез IFN-γ, TNF-α та прозапальних цитокінів[26]. Рецептор NKG2D відрізняється високою консервативністю та розпізнає широкий спектр лігандів, структурно подібних до MHC класу I, забезпечуючи своєчасне виявлення інфікованих або злоякісно змінених клітин, посилюючи цитотоксичність [16,25]. Найбільш повно охарактеризованим рецептором активації є CD16, або ж FcγRIIIa, продукт гена FCGR3A, який розташований на довгому плечі хромосоми 1, в локусі 1q23[27]. CD16 є рецептором для Fc-частини IgG і відповідає за ініціювання ADCC – антитілозалежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності. Афінність та ефективність зв'язування рецептора залежить від фенотипу, що визначається за сукупністю одонуклеотидних замін у гені[28]. За структурою CD16 є трансмембранним білком, що складається із α-спіралі, що у мембрані зв'язана із гомо- або гетеродимером FcεRI-γ та CD3ζ, а у позаклітинному домені містить дві Ig-подібні субодиниці, які зв'язуються з Fc-частиною молекул імуноглобуліну-G (IgG) із середньою або низькою афінністю[16,29]. Унікальною особливістю цитоплазматичного хвоста CD16a, порівняно з іншими FcγR, є можливість фосфорилуватися протеїнкіназами типу C(PKC), що сприяє продукції цитокінів[30].

Після зв'язування CD16 із лігандом послідовності ITAM у адапторних молекулах фосфорилуються, що призводить до активації тирозинкінази Syk, яка запускає каскад реакцій ADCC трьома шляхами: через фосфоліпазу C-гамма (PLC- γ), що веде до утворення інозитол-1,4,5 трифосфату (IP3) і діацилгліцерину (DAG) та підвищення концентрації кальцію в клітині для мобілізації цитотоксичних гранул та їх екзоцитозу; шляхом фосфатидилінозитол-3-кінази (PI-3K), який рекрутує білки із доменом гомології плекстрину(PH) на мембрану клітини, тим самим підсилюючи передачу сигналу; із залученням G-білків родини Vav/Rho, що опосередковано переорієнтовують центр організації мікротрубочок[31]. Синергічна дія цих сигнальних шляхів забезпечує транспорт літичних гранул до плазматичної мембрани, де після злиття вміст (перфорин та гранзими) опиняється у безпосередній близькості до мішені, і завдяки зміні рН із кислого на нейтральний, активується. Активованний перфорин у присутності Ca^{2+} агрегує на мембрані клітини-мішені та утворює пори у вигляді кільцеподібних структур діаметром 13-20 нм, через які у клітину проникають гранзими – білки сімейства серинових протеаз, що індукують апоптоз шляхом активації каспаз, розщеплюють вірусні білки та активують виробництво активних форм кисню у мітохондріях[32]. Паралельно незалежні від гранул механізми також можуть бути залучені до знищення клітин-мішеней. Наприклад, перехресне зшивання Fc γ RIIIA на NK-клітинах індукує транскрипційну регуляцію лігандів FAS(FAS-L) [31], таким чином дозволяючи NK-клітинам можуть вбивати клітини-мішені, що експресують рецептор FAS (CD95) шляхом індукції зовнішньоклітинного шляху апоптозу[32].

Не менш важливою функцією NK-клітин є продукція прозапальних хемокинів та цитокінів. Серед цитокінів найбільш розповсюдженими є IFN- γ і TNF- α , і в меншій мірі прозапальні інтерлейкін IL-5, серед хемокинів відповідно CCL2/MCP-1, що викликає хемотаксис моноцитів, та CXCL8/IL-

8, що залучає нейтрофіли. Цікаво, що вивільнення цих факторів є послідовним, причому хемокіни передують прозапальним цитокинам[14]. Цей комплекс хімічних сигналів відіграє провідну роль у рекрутуванні антиген-презентуючих клітин, стимулює проліферацію Т- та В-клітин, підсилює опсонізацію позаклітинних патогенів, опосередковує виробництво молекул адгезії, що необхідно для ефективної елімінації клітин, що несуть загрозу для організму.

1.3. порушення експресії рецепторів CD16 NK-кілерів

Провідна роль рецептору активації CD16 у ініціюванні ADCC є важливим предметом дослідження для біологів, фармацевтів та медиків. Недостатня або надмірна його експресія викликають серйозні порушення гомеостазу та часто пов'язані із імунodefіцитами та рецидивуючими вірусними інфекціями. Так, мутація у гені FCGR3A, що призводить до амінокислотної заміни L66H, призводить до зниження цитотоксичності NK-клітин через погіршення ефективності передачі сигналу до ефекторних молекул. Як наслідок, у пацієнтів, що мали таку мутацію, спостерігалися рецидиви вірусів герпесу та папіломи, прояви хвороби Калсмена, що викликана вірусом Епштейна-Барр[33]. Інший механізм зниження експресії може бути пов'язаний із високою активністю мембранної металопептидази ADAM17, що відщеплює CD16 від мембрани[34]. До відсутності експресії рецептора також може привести стан, що відомий як анергія – внутрішня функціональна активація. Анергія спостерігається при тривалих контактах NK-клітин із мікрооточенням клітин МНС класу I – негативних пухлин, коли сигнали цитокінів IL-2 та/або IL-15 не супроводжуються зв'язуванням CD137, що міститься на антиген-презентуючих клітинах. За такої ситуації зв'язування CD16 зазвичай характеризується його подальшою втратою зі збільшенням здатності клітини до секреції цитокінів. Такий тип анергії називають «розщепленим», і характеризують як одночасну втрату певної функції із одночасним посиленням іншої[35].

Підвищена експресія також може бути пов'язаною із наявністю амінокислотних замін. Заміна фенілаланіну на валін у положенні 158 призводить до вищих рівнів експресії CD16 та посиленій цитотоксичності порівняно із іншими варіантами замін у цій позиції, поширена серед голандців, норвежців, японців та британців[36]. Інший шлях підвищення експресії включає зниження рівня мікроРНК-218[37], що є негативним регулятором транскрипції гену FCGR3A та спостерігається при пласкоклітинній карциномі ротової порожнини та злоякісних пухлинах молочної залози та сечового міхура[38]. Основною ж причиною підвищення експресії рецепторів активації є наявність прогресуючої вірусної інфекції чи злоякісних змін у клітинах. Прикладом може слугувати дослідження Zhao NQ et al., в якому було продемонстровано тенденцію до підвищення активності ADCC шляхом підвищеної експресії CD16 у жінок, що були серонегативними до ВІЛ (тобто у яких зараження відбулося нещодавно)[39].

1.4. CD8-цитотоксичні лімфоцити

Т-лімфоцити є клітинами, що грають важливу роль у адаптивному імунітеті шляхом розпізнавання генетично чужорідних антигенів, що презентовані білками МНС за допомогою відповідного рецептора. Свою назву ця популяція клітин отримала від головного місця свого дозрівання та селекції – тимуса, або виличкової залози. Ці клітини відіграють життєво важливу роль у початковому контролі багатьох внутрішньоклітинних патогенів, а також допомагають забезпечити довготривалий імунологічний захист від наступних повторних інфекцій, є «наріжним каменем» адаптивної імунної відповіді.

Початковий шлях розвитку Т-лімфоцитів із гемопоетичних стовбурових клітин подібний на описаний вище для кілерних клітин, проте після диференціації до загального лімфоїдного попередника незрілі тимоцити покидають кістковий мозок та через кров мігрують до тимуса, оскільки лише первинний лімфоїдний орган здатний забезпечити

специфічне мікрооточення, необхідне для подальшого розвитку[40]. У тимусі клітини проходять чотири стадії селекції, під час якої набувають експресії поверхневих маркерів та створюють функціональний рецептор Т-клітин. Перша стадія має назву подвійно негативної(DN) та характеризується остаточним переходом до Т-клітинної лінії шляхом індукції фактору транскрипції Bcl11b, а також збіркою сегментів V і DJ у β -ланцюзі TCR-рецептора шляхом активації генів рекомбінації RAG1 і RAG2[41,42]. Утворення пре-TCR комплекси на основі β -ланцюга активує гени Cd4 і Cd8, приводячи тимоцити DN до наступної стадії розвитку, яка називається подвійно позитивною (DP)[42]. Під час цієї стадії передача сигналів через пре-TCR комплекси активує перебудову сегментів V і J у α -ланцюзі і пригнічує додаткову перебудову β -ланцюга шляхом алельного виключення[41]. Таким чином, тимоцити CD4+CD8+ вперше під час розвитку Т-клітин експресують повний рецептор антигену, мігруючи глибоко в кору тимуса, де їм презентують власні антигени. Лише невелика частина тимоцитів на цій стадії проходить позитивний відбір, і цим клітинам дозволяється диференціюватися далі, щоб стати зрілими тимоцитами[42]. У кінці стадії експресія CD8 дещо пригнічується, але в подальшому може відновитися в залежності від подальшої стадії диференціації. Стадія негативного відбору відбувається на межі корового та медулярного шару тимуса та видаляє клітини, які занадто сильно зв'язуються із власними антигенами. В залежності від сигналів від мікрооточення, клітини диференціюються на МНС-I- і МНС-II-відібрані тимоцити, що набувають відповідно однопозитивного CD4-CD8+ чи CD4+CD8- фенотипу[43]. Ті клітини, що успішно пройшли селекцію у тимусі, виходять у кровоносну та лімфатичну систему, і до першого контакту з антигеном мають назву наївних лімфоцитів.

Після активації антигеном, що презентований на МНС класу I, CD8+ Т-клітини проліферують та диференціюються у ефektorні клітини, відомі як

цитотоксичні Т-лімфоцити(CTL)[44]. Ця високоспецифічна взаємодія ініціює утворення імунологічного синапсу (IS) між двома клітинами та активує сигнальний каскад, що призводить до серії клітинних подій, які в кінцевому підсумку призводять до загибелі цільової клітини. Молекулярний тригер для утворення IS включає взаємодію між молекулою адгезії CTL LFA-1 (антиген 1, пов'язаний з функцією лімфоцитів) і білком мембрани клітини-мішені ICAM-1 (молекула міжклітинної адгезії 1), що призводить до перебудови цитоскелету та вивільненню гранзимів та перфоринів подібно тому, як описано в пункті 1.2[45]. На відміну від НК-клітин, які для активації потребують одного сигналу, CTL використовують механізм подвійного розпізнавання. Перший сигнал походить від специфічної взаємодії між TCR і антиген-презентуючою клітиною, наприклад дендритною клітиною, яка презентує антигенні епітопи на МНС класу I, а другий сигнал включає взаємодію між костимулюючими молекулами – CD80/86, присутніх на APC і CD28 на Т-клітинах[46]. Активація Т-клітин супроводжується фенотиповими змінами, перш за все початком експресії поверхневих маркерів CD44 і CD69, молекули клітинної адгезії та раннього антигену активації відповідно. Ефекторні клітини, що диференціюються, набувають високої експресії лектиноподібного рецептора G1 (KLRG1) і субодиниці рецептора IL-2 (CD25), тоді як експресія L-селектинц (CD62L), субодиниці рецептора IL-7 (CD127) і CD27 знижується порівняно з найвими клітинами[47]. Після активації Т-клітинну відповідь CD8+ можна розділити на три окремі фази: фаза розширення, під час якої клітини активно проліферують та набувають здатності секретувати цитолітичні гранули у відповідь на антиген, фаза скорочення, де 90–95% ефекторних клітин гинуть через апоптоз після виснаження, та фаза формування пам'яті, де невелика кількість клітин зазнає диференціації у клітини пам'яті для забезпечення посиленого захисту від вторинного впливу патогенів у майбутньому[46].

Особливе місце у посиленні відповіді CD8⁺ Т-клітин посідають сигнали, отримані від цитокінів. Цитокінове середовище керує напрямком диференціації, силою та характером ефекторної відповіді CD8⁺ Т-клітин і генерацією CD8⁺ Т-клітин пам'яті. Головну роль тут грають інтерлейкіни, а саме IL-2, IL-7 та IL-15. IL-2 є ключовим цитокіном, який регулює клональну експансію та диференціювання Т-клітин під час гострих інфекцій. IL-2 переважно виробляється CD4⁺ Т-клітинами після стимуляції антигеном і, меншою мірою, іншими типами клітин, такими як інші CTL, природні кілери (NK) та активовані дендритні клітини[48]. Рецептор до IL-2 з'являється на перших етапах формування Т-клітин та складається із трьох субодиниць CD25, CD122 та CD132[46]. Ця молекула активує транскрипційний фактор Bcl-6 через кіназу Akt, що стимулює проліферацію шляхом посилення регуляції циклінів і антиапоптотичної молекули В-клітинної лімфоми 2 (Bcl-2) із одночасною зміною експресії білків, що залучені до поляризації CTL у напрямку запалення[49]. IL-7 продукується стромальними клітинами у лімфоїдних тканинах та посідає центральну роль під час дозрівання Т-клітин у тимусі[48]. У Т-клітинах IL-7 є головним чинником важливим для проліферації незрілих тимоцитів на подвійно негативній (DN) стадії. Тимоцити DN експресують велику кількість рецепторів до цієї сполуки, завдяки чому вони реагують на інтратимічний IL-7, який виробляється епітеліальними клітинами тимуса та дендритними клітинами у кортико-медулярному шарі. У зв'язку з цим генетичні дефіцити IL-7 або його рецептора проявляються у серйозному порушенні тимопоезу та різкому зниженні клітин тимуса[50]. На фінальній стадії диференціації у тимусі IL-7 індукує експресію фактору транскрипції Runx3d, який сприяє експресії корецептора CD8 і визначає прихильність тимоциту до цитотоксичної лінії на протидію головному регулятору лінії CD4 ThPOK[51]. На наївні та активовані Т-лімфоцити IL-7 впливає в залежності від концентрації: висока концентрація IL-7 стимулює проліферацію Т-лімфоцитів, тоді як нижча концентрація підтримує їх виживання, що

необхідно для перетворення ефекторних клітин на клітини пам'яті[52]. Унікальна особливість IL-15 полягає в тому, що він функціонує одночасно як гомеостатичний цитокін (активний у стаціонарних незапальних станах), а також як запальний цитокін, оскільки рівні IL-15, виявлені в кровообігу, значно зростають після інфікування вірусами[53]. Білок в основному продукується моноцитами, дендритними та епітеліальними клітинами під час інфекцій та клітинному стресі[54]. IL-15 у нормі активує проліферацію Т-клітин пам'яті, що сприяє швидкій відповіді на порушення гомеостазу, однак його нерегульована продукція може викликати TCR-незалежну, NK-подібну активацію Т-клітин, що призводить до імунопатологічного пошкодження тканин, як було показано для гніздової алопеції, гепатиту А та неалкогольного стеатогепатиту[53,54].

1.5. Механізми зниження експресії CD8 рецепторів цитотоксичних Т-лімфоцитів

CD8 є корецептором TCR та одним із головних маркерів, за яким визначають субпопуляцію цитотоксичних Т-лімфоцитів. Щоб ефективно функціонувати, CD8 утворює димер, що складається з двох ланцюгів (α - та β -), які взаємодіють із $\alpha 3$ -доменом МНС класу I, запускаючи процес трансдукції сигналу, що призводить до підвищення чутливості Т-клітин до антигену у сотні тисяч разів[55]. Ланцюги CD8 кодуються генами Cd8a і Cd8b, які у людини тісно з'єднані у на відстані 15 КВ на другій хромосомі[56]. Розуміння механізмів зниження експресії корецептору під час гострих та хронічних інфекцій є необхідним для глибинного розуміння функціонування елементів адаптивного імунітету та розробки методів маніпулювання ними при лікуванні захворювань.

Низький\відсутній рівень експресії CD8 може бути пов'язаний із дефектами у генах Cd8a та\або Cd8b. За даними OMIM, міссенс-мутація у Cd8a призводить до повної відсутності експресії CD8, що проявляється як аутосомно-рецесивний імунологічний розлад, що характеризується появою

рецидивуючих інфекцій верхніх і нижніх дихальних шляхів[57]. Інша причина включає вроджений дефіцит кінази ZAP-70, що призводить до рецидивуючих респіраторних інфекцій та ураження шкіри[58].

Експресія CD8 може бути інгібована цитокінами, включаючи надмірні кількості IL-2, IL-15 та IL-4, який через пригнічення синтезу інтерферону-гамма зменшує цитотоксичність[59]. При хронічних та аутоімунних захворюваннях, у мікрооточенні пухлин також може спостерігатися зниження експресії маркера CD8 внаслідок зміни балансу між CD4⁺ та CD8⁺ Т-лімфоцитами та виснаження останніх, а також надмірної цитотоксичної дії NK-клітин[56]. Прикладом таких станів може слугувати дослідження Klimova et al. [1], що виявило зниження експресії CD8 у 45% пацієнтів із різними фенотипами міастенії на фоні збільшення CD3-CD56⁺CD16⁺ природних кілерів, а у 18% пацієнтів із тимомою відзначали одночасне зниження CD8⁺ і CD4⁺CD28⁺. Іншим прикладом є дослідження Pascual-García et al., де було продемонстровано зниження CD8 у CTL при прогресуванні ендометріальної карциноми[60].

1.6 Роль HLA I класу у зв'язуванні з антигенними пептидами

Розпізнавання інфікованих або злоякісних клітин імунною системою ґрунтується на презентації імуногенних власних і чужорідних пептидів на поверхні клітини. Система людського лейкоцитарного антигену (HLA) являє собою комплекс генів, що у людини розташовані на короткому плечі 6-ї хромосоми та кодують білки, відповідальні за реалізацію цього процесу[61]. Ці гени експресуються на усіх ядерних клітинах організму та мають найвищий рівень поліморфізму серед усіх білків - станом на 2020 рік було відомо про понад 19000 алелів, а групи спільно успадкованих алелів часто зустрічаються у літературі як гаплотипи, що часто пов'язані із виникненням чи прогресуванням різних патологічних станів[62]. Різноманітність молекул HLA, що експресуються в організмі людини на популяційному рівні, ймовірно, максимізує ймовірність того, що принаймні

деякі особи в популяції зможуть здійснити імунну атаку проти нової інфекції та вижити[63].

Білки HLA I класу головним чином кодуються трьома генами (HLA-A, HLA-B і HLA-C), які мають назву «класичних», крім того, спеціалізовані типи клітин можуть експресувати «некласичні» гени HLA-E, HLA-F або HLA-G, що мають низький рівень поліморфізму та необхідні для залучення активації або інгібування імунних рецепторів[61]. Ці молекули з'явилися в геномі близько 500 мільйонів років тому разом із появою адаптивного імунітету і мають структуру, подібну до складової з двох доменів важкого α -ланцюга імуноглобуліну, які утворюють вигнутий β -лист як основу та дві α -спіралі на вершині, які достатньо віддалені одна від одної, щоб між ними розміщувався пептидний ланцюг. На поверхні клітини комплекс утримується трансмембранним доменом, який нековалентно зв'язаний із інваріантним легким ланцюгом $\beta 2m$ [64]. HLA I класу первинно збираються у просвіті ендоплазматичного ретикулуму(ER)[63], після чого частково згорнутий гетеродимер включається в пептидний завантажувальний комплекс (PLC) для зв'язування із пептидом довжиною 8-12 амінокислотних залишків, що був отриманий в результаті протеолізу ендогенних білків, власних або чужорідних, за присутності білка тапазину[64]. Після збірки комплекси білок-пептид переміщуються до апарату Гольджі, де проходять контроль якості, а з нього виходять на поверхню клітини для презентації Т-клітинам та NK-кілерам[65].

Білки HLA є фактично унікальними молекулами для кожної людини, що презентують імунній системі своєрідний «молекулярний паспорт», за інформацією з якого Т-клітини та природні кілери приймають рішення про продовження життя клітині чи її негайну ліквідацію. Таким чином саме ці структури відіграють ключову роль у сигналізації про появу в організмі патологічних змін, викликаних вірусами, бактеріями і раковими клітинами – у такому випадку презентуються пептиди, що походять від змінених

власних білків. Будь-яка клітина, що демонструє інший тип HLA, є «невласною» і сприймається імунною системою організму як загарбник, що призводить до відторгнення тканини, що містить ці клітини. Це особливо важливо у випадку трансплантованої тканини, оскільки це може призвести до відторгнення трансплантата[66]. Гаплотипи HLA успадковуються, і деякі з них пов'язані з аутоімунними порушеннями та іншими захворюваннями. Люди із певними гаплотипами мають більшу ймовірність розвитку аутоімунних захворювань, таких як діабет I типу, анкілозуючий спондиліт, ревматоїдний артрит, целиакія, СЧВ (системний червоний вовчак), міастенія та нарколепсія[67].

1.7. Можливі механізми інгібування зв'язувальної функції HLA I класу

Одним із механізмів, за допомогою якого інфіковані та змінені клітини можуть уникати імунного нагляду, є зниження регуляції основного комплексу гістосумісності класу I. Зміни в поверхневих антигенах МНС класу I представляють один із механізмів уникнення пухлинними клітинами та деякими вірусами природної або індукованої імунної відповіді. Інгібування зв'язувальної функції може бути пов'язане із структурними аномаліями, а саме мутаціями та делеціями на ділянках хромосом, що несуть в собі гени HLA, проте частіше опосередковується змінами на епігенетичному, транскрипційному та/або посттранскрипційному рівнях.

Перший механізм інгібування зв'язувальної функції HLA I класу включає в себе відносно рідкісні мутації у генах, що кодують важкі ланцюги, що були описані при меланомі, колоректальній карциномі, пухлинах передміхурової залози[68]. Wei-Yi Lei et al. [69] було охарактеризовано зниження експресії молекул HLA внаслідок делеції $\beta 2m$ та відсутності експресії білків TAP1 і LMP7, що залучені до збірки та транспорту комплексу, при саркоматоїдній гепатоцелюлярній карциномі, асоційованій із вірусами гепатиту В та С. Втрата гену JAK2, продукт якого

залучений до переносу сигналів від цитокінів, також призводить до зниження регуляції або втрати HLA класу I [68].

Втрата експресії білків ER є альтернативним шляхом ігнорування: шаперони калнексин, кальретикулін, білок ERp57 і тапазин мають дефектну експресію принаймні у 40% найбільш розповсюджених типів пухлин[70]. Ці зміни насамперед пов'язані із епігенетичними змінами, такими як гіперметилування промоторних областей відповідних генів та дерегуляція гістондеацетилаз. (HDAC) Зазвичай, ці зміни є оборотними та піддаються корекції при лікуванні інгібіторами ДНК-метилтрансферази та HDAC[71]. Крім того, некодуючі мікроРНК(125a-5p і 148-3p) можуть негативно регулювати HLA класу I через посттранскрипційну модифікацію, як показано для аденокарциноми стравоходу та меланоми[70,71].

При вірусних інфекціях експресія HLA класу I може бути придушена через наявність специфічних білків, що блокують активність ферментів, залучених до шляху презентації антигену. Білки герпесвірусів можуть запобігати транспорту пептидів, утримувати MHC класу I в ендоплазматичному ретикулумі або направляти ендоцитоз з плазматичної мембрани в середину клітини з подальшою деградацією[72]. UL49.5, притаманний варицеловірусам(збудникам віспи та оперізуючого герпесу) діє як потужний інгібітор транспортера TAP, викликаючи його деградацію; аналогічним чином діє білок ICP47, а US6 запобігає зв'язуванню з АТФ, таким чином позбавляючи енергії для виходу комплексу HLA-пептид із ER[68,73]. Експресія протеїнкінази ORF66 призводить до деградації MHC класу I під час дозрівання у комплексі Гольджі, в той час як убіквітин-лігази kK3 та kK5, притаманні вірусу Епштейна-Барр, взаємодіють із трансмембранними доменами зрілих молекул та індуюють ендоцитоз та подальше розщеплення лізосомами[68,74,75].

Таким чином, механізми ігнорування включають в себе пряме втручання у активність генів HLA та пов'язаних із ними білків, блокування

транспорту молекул під час їх збірки та дозрівання та\або ендоцитоз зібраних молекул за допомогою вірусних білків.

1.8. Патологічні стани, пов'язані із зменшенням зв'язування антигенних пептидів та їх наслідки

Зменшення або відсутність презентації антигенів на поверхні клітин може мати негативний вплив на розпізнавання аномально змінених клітин Т-лімфоцитами та NK-кілерами . Крім того, аномалії HLA класу I мають клінічне значення, оскільки вони пов'язані з поганим прогнозом при захворюваннях і можуть відігравати роль у резистентності пацієнтів до імунотерапії.

Злоякісні перетворення тканин при різних видах раку часто супроводжуються хромосомними аномаліями і призводять до часткових чи повних делецій генів, що відповідають за презентацію антигенів на поверхні клітин. Необоротна втрата важких ланцюгів HLA класу I та ділянки $\beta 2m$ описана при гліобластомі, карциномі гортані та сечового міхура, колоректальному раку та меланомі з частотою щонайменше 16%, а при раку щитоподібної залози - 87,9%[70]. Відсутність презентації антигенних пептидів та як наслідок, «невидимість» злоякісних клітин для імунної системи призводить до меншої виживаності та тривалості життя пацієнтів із меланою та недрібноклітинним раком легень[76]. Дослідження Park HS et al. [77] виявило що у 18,1% пацієнтів із раком молочної залози спостерігається інгібування зв'язування антигенів, що є несприятливим прогностичним фактором та корелює не лише із більш інтенсивним ростом первинної пухлини, але і швидшим поширенням метастазів. Присутність мікроРНК BART7(кодується вірусом Епштейна-Барр) у клітинах назофарингеальної карциноми призводить до зниження цитотоксичної активності NK-клітин через зменшення не лише презентації антигенів на поверхні клітини, але і пов'язаного із ним пептиду MICA[78]. Активна продукція цитомегаловірусних білків, що порушують шлях

протеасомної деградації та транспортування комплексу HLA-пептид, у людей із ослабленим імунітетом асоційована із вищим ризиком розвитку печінкової недостатності, цитомегаловірусного гепатиту та прогресуванням злоякісних новоутворень[79].

Окремо варто відзначити відсутність презентації антигенних пептидів при апластичній анемії – розладі гемопоезу, для якого характерною ознакою є недостатнє утворення еритроцитів, лейкоцитів та тромбоцитів на фоні ураження клітин-попередників токсинами або ж аутоімунної природи. Втрата HLA пов'язана з більш тяжким перебігом захворювання, проте після трансплантації кісткового мозку відсутність алелів HLA-A*02:06 або HLA-B*40:02 корелює із вищими показниками виживаності, що додатково підтверджує факт зв'язку певних гаплотипів із розвитком широкого спектру захворювань[80].

Останнім, проте не менш вражаючим прикладом патологічних станів, що пов'язані із інгібуванням HLA є зараження вірусом ВІЛ-1. Цей вірус має приголомшливу здатність уникати уваги як вродженого, так і адаптивного імунітету завдяки наявності білків Nef та Vpr, що знижують регуляцію HLA-A і -B та HLA-C відповідно, призводячи до повної втрати організмом можливості захисту від інфекцій[81].

1.9. Характеристика поверхневого маркера CD3+HLA-DR+

HLA-DR — це поверхневий рецептор клітини, що належить до МНС класу II, який кодується комплексом лейкоцитарного антигену людини в області 6p21.31 шостої хромосоми. HLA-DR зв'язує пептиди довжиною 9-30 амінокислот, переважно вірусного походження. Основною функцією HLA-DR є представлення пептидних антигенів імунній системі з метою виклику або пригнічення відповідей Т-хелперів, які відповідальні за вироблення антитіл проти того самого пептидного антигену[82]. Поверхневий маркер зазвичай виявляють на макрофагах, В-клітинах,

дендритних клітинах, однак спостерігають і на Т-лімфоцитах та НК-клітинах[83]. Кластер диференціювання CD3 представляє собою мультипротеїновий комплекс, що виступає у якості корецептора, провідника сигналу та стабілізатора TCR. CD3 є пан-Т-клітинним маркером і експресується тимоцитами та всіма зрілими Т-клітинами периферичної крові та лімфоїдних тканин[84].

У лімфоцитах, а саме в CTL, це маркер пізньої активації, який експресується через 24-48 годин після активації цих клітин, і це пов'язано зі збільшенням продукції IFN- γ . Цьому передують збільшення експресії CD69 та CD25, які посилюються через 4 години та 12 годин після активації Т-клітин відповідно[85]. Транскрипція HLA-DR є складним та гетерогенним процесом, що опосередкований низкою консервативних регуляторних промоторних елементів і факторів транскрипції. Серед них трансактиватор класу II (СПТА) є основним регулятором транскрипції; крім цього, експресія HLA-DR може посттрансляційно регулюватися подібно до описаної вище для HLA класу I[82].

Таким чином, суворо регульований рівень експресії HLA-DR на поверхні Т-клітин вважається індикатором стану імунної відповіді, причому високі рівні CD3+HLA-DR+ пов'язані з підвищеною антигенпрезентувальною здатністю та імунною активацією, і низькі рівні, навпаки, пов'язані з пригніченням імунітету[83].

1.10. Зв'язок маркера с із патологічними станами

Експресія CD3+HLA-DR+ є важливою для специфіки адаптивної імунної системи. Висока експресія HLA-DR на ефекторних Т-лімфоцитах після їх активації була описана при деяких аутоімунних захворюваннях та вірусних інфекціях[82,86]. Проте, для тих самих станів характерне і зниження експресії, що часто пов'язане із летальністю та несприятливими прогнозами для пацієнтів, і саме це буде розглянуто у цьому розділі.

Сепсис, радше синдром, ніж самостійна хвороба, виникає за наявності інфекційних збудників в організмі і стає причиною смерті понад 215 тисяч людей щорічно. Вважається, що імунна відповідь господаря на сепсис характеризується двома послідовними періодами, перший з яких представляє собою гіперзапальну реакцію, під час якої елементи вродженого імунітету вивільняють цитокіни та активують каскади системи комплементу[87]. Вважається, що ця початкова відповідь супроводжується синдромом компенсаторної протизапальної відповіді(CARS), який визначається як системна дезактивація імунної системи з метою відновлення гомеостазу після запального стану. Протизапальні медіатори можуть вивільнятися протягом цього другого періоду в спробі протидіяти постійному запаленню, однак процес може бути порушений, і вилитися у пригнічення імунітету та ризик повторних інфекцій[88]. Втрата маркера HLA-DR є ранньою подією при сепсисі. Зниження рівня поверхневої експресії HLA-DR, вважається загальним біомаркером імуносупресії, викликаной сепсисом, та імунного паралічу – стану нездатності імунної системи вивільняти прозапальні медіатори у відповідь на стимуляцію генетично чужорідними антигенами[89].

Як про-, так і протизапальні цитокіни, включаючи TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 та IL-1RA1, можуть знижувати експресію CD3+HLA-DR+ і корелювати з нею. TNF- α посилює виробництво IL-10 моноцитами *in vitro* та знижує рівень HLA-DR, навіть у присутності моноклональних антитіл проти IL-10 і часто спостерігається у пацієнтів із важким перебігом COVID-19[83]. Дослідження, проведене Spinetti[86], демонструє зниження регуляції цитокінами HLA-DR+ та його кореляцію із гострою дихальною недостатністю та імуносупресією у 89% критично хворих пацієнтів: у критично хворих пацієнтів середня кількість маркеру 9280 антитіл/клітину, в той час як у некритично хворих цей показник складав 30 900 антитіл/клітину. Подібна ситуація спостерігається також у хворих на

мультирезистентну бактеріальну інфекцію, що є поширеним ускладненням тяжкого гострого панкреатиту і розвивається у 55,6% пацієнтів. Рівень маркера CD3+HLA-DR+ у пацієнтів без інфекції підтримується на високому рівні, в той час як у пацієнтів з – залишається значно нижче норми[90].

Крім сепсису, CD3+HLA-DR+ поступово стає популярним інструментом імуномоніторингу в інших контекстах інтенсивної терапії(травми, опіки, хірургія) та деяких клінічних напрямках(гастроентерологія, онкологія, гематологія, трансплантація), де він також визначає пацієнтів із ризиком погіршення стану: смертність, вторинні інфекції, рецидив раку[91]. Таким чином моніторинг цього маркера є значущим показником при лікуванні гострих та хронічних інфекційних станів та потребує уваги не тільки з боку медиків, але й фармацевтів та біотехнологів, які можуть запропонувати новітні рішення щодо розробки препаратів, які будуть прямо чи опосередковано впливати на його експресію.

1.11. Активація білків системи комплементу C3 і C4 у пацієнтів з цирозом печінки на тлі гепатоспленомегалії, спричиненої персистенцією герпетичних вірусів

Система комплементу включає в себе групу білків сироватки крові, що є частиною гуморального імунітету хребетних. Активація комплементу є складним процесом, який в основному відбувається класичним, альтернативним і лектиновим шляхами та призводить до утворення комплексу, що атакує мембрану та загибелі клітини-патогена[92]. Активація шляху комплементу призводить до збільшення виробництва ендотеліальних цитокінів, включаючи MCP-1, IL-8 та IL-1, і додатково посилює регуляцію експресії ендотеліальних молекул адгезії, однак аномальна активація та виробництво компонентів комплементу, таких як C3, C3b, iC3b, CR3, C5, C5a та MAC/C5b-9, може сприяти пошкодженню тканин внутрішніх органів та ЦНС[93].

Цироз печінки є широко поширеним у світі захворюванням та може бути наслідком різних причин, зокрема ожиріння, споживання алкоголю, отруєння міддю, а також гепатитів В та С. Цироз розвивається після тривалого періоду запалення, що призводить до заміщення здорової паренхіми печінки фіброзною тканиною, і часто супроводжується ускладненнями – асцитом, внутрішніми кровотечами, вірусними та бактеріальними інфекціями, серцевою та нирковою недостатністю[94]. Причини формування ускладнень неоднорідні та є наслідком метаболічних порушень та дисрегуляції імунних відповідей у печінці та селезінці, що виконує функцію фільтрації крові та часто залучається до патологічного процесу. Порушення функції селезінки призводить до спленомегалії, і пусковими факторами тут часто є віруси, що мають тропність до клітин печінки[95].

У численних дослідженнях впливу вірусів, зокрема герпетичних, відзначають помітні зміни у концентраціях двох активаторів класичного та альтернативного шляху системи комплементу – С3 та С4. Так, Klimova et al. відзначають підвищення С3 у 1,5 рази від референтного рівня у пацієнтів із гепатоспленомегалією, що спричинена персистенцією герпесвірусів та пов'язують це із недостатнім його споживанням імунними комплексами, в той час як компонент С4 в тій же групі знижував концентрацію на 20% від референтного рівня, що каже про його недостатню опсонізуювальну дію[96]. Підвищення вмісту компонента С3 призводить до підвищення хемотаксису фагоцитуючих клітин та активації усіх етапів киснево-незалежного фагоцитозу, що призводить до більш сильного запального процесу, пов'язаного із пошкодженням тканин, та як наслідок, погіршення стану хворого[95]. На додаток до цього, високі концентрації компоненту С3 слугують передумовою до посилення процесу фібринолізу, а саме підвищення концентрації активатора плазміногену, в той час як зниження

C4 призводить до підвищення антикоагулятивної активності крові та може бути причиною кровотеч[96].

1.12. Пошук таргетних мішеней для розробки біотехнологічних продуктів при гепатоспленомегалії

Основним методом лікування гепатоспленомегалії на фоні рецидивуючих кровотеч та портальної гіпертензії(що є часто поширеними ускладненнями) вважається спленектомія – хірургічне видалення селезінки. Проте, ефективність цього процесу не завжди є адекватним, оскільки видалення важливого імунокомпетентного органу призводить до зникнення в організмі пацієнта великої кількості спеціалізованих імунних клітин та зниження функції елімінації антигенів[59]. В такій ситуації гостро постає питання про необхідність розробки альтернативних методів корекції стану пацієнтів з урахуванням їх поточної активності елементів вродженого та адаптивного імунітету. На основі виявлених імунологічних маркерів бачиться доцільним розробка персоналізованого діагностичного та лікувального алгоритму із застосуванням специфічних противірусних антитіл, амінокислот, трансфузії стовбурових клітин різного походження, протизапальних цитокінів та інгібіторів їх рецепторів, ферментозамісної терапії, що є можливим завдяки розвитку біотехнологічних методів отримання цих продуктів[59].

Однією із новітніх мішеней для лікування гепатоспленомегалії, що асоційована із вірусним гепатитами, є метіоніновий цикл, оскільки у таких пацієнтів відзначається зменшення вмісту цистеїну, що є його кінцевим продуктом. Для корекції цього стану використовують кофермент s-аденозилметіонін, що слугує донором у процесах транс-метилування та сприяє нормалізації реакції перетворення метіоніну. Сьогодні для виробництва цієї речовини використовують мікробний синтез за участі генетично модифікованих штамів *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Candida utilis*, та *Escherichia coli*[97,98].

Інший підхід заснований на зниженні вірусної активності, де використовуються інтерферони – сполуки білкової природи, що мають противірусну активність. Для герпесвірусів перспективно застосовувати білок МхВ, що охарактеризований як потужний пангерпесвірусний фактор рестрикції[99]. Дослідження продемонстрували його ефективність з пригнічення активності вірусу гепатиту С[100] та цитомегаловірусів[101] у морських організмів, що каже про необхідність більш детального аналізу цього білка та застосування методів біоінформатики та білкової інженерії для створення нових мутантних форм білка, що будуть застосовуватися в терапії людини.

Для стимуляції адгезивної функції та ендоцитозу фагоцитів використовуються препарати, що розроблені на основі грибних ензимів, як наприклад композитний препарат «Мікс-фактор»[102]. На додаток до нього доцільно застосовувати терапію протизапальними цитокінами для запобігання надмірним запальним реакціям та відновленню гомеостазу. Так, завдяки розвитку методів фітобіотехнології все більше виробництв застосовують синтез рекомбінантного ІЛ-10 у суспензійних культурах тютюну, що поєднують у собі простоту культивування, притаманну бактеріальним культурам із можливістю посттрансляційних модифікацій, притаманним тваринним клітинам[103].

Для контролю активності білків системи комплементу у пацієнтів із гепатоспленомегалією в якості таргетної мішені може бути обрана С3-конвертаза – серинова протеаза, що каталізує розщеплення білку С3 на С3а та С3b[59]. Інгібування її активності може відбуватися за допомогою фактору Н – глікопротеїну плазми, що регулює альтернативний шлях комплементу та може бути рекомбінантно продукований у клітинах дріжджів *Pichia pastoris*[104]. Серед інших перспективних препаратів, що можуть стати терапевтичними засобами виділяються білки сімейства Sez6,

що залучені до інгібування лізису клітин як класичним, так і альтернативним шляхом системи комплементу[105].

Як відмічають дослідники, для підтримки пацієнтів із персистенцією герпетичних вірусів доцільно застосовувати протизапальні засоби, зокрема гормони, моноклональні антитіла, стимулятори факторів вродженого імунітету із одночасним прийомом стабілізаторів клітинних мембран(інозин, бурштинова кислота, вітаміни групи В), антиоксидантів для зниження ступеню пошкодження тканин внаслідок вивільнення АФК, стимуляторів диференціювання кілерних субпопуляцій Т-клітин та CD16+ природні кілерів[59]. Різноманіття можливих шляхів впливу на стан пацієнтів дають змогу не тільки обирати індивідуальну тактику для лікування, але і спонукають вчених-біотехнологів до розробки комплексних препаратів, які будуть одночасно коригувати різні аспекти метаболічних порушень та ефективно відновлювати гомеостаз. Таким чином, процес пошуку таргетних мішеней та створення новітніх препаратів при гепатоспленоспленомегалії є процесом актуальним і перспективним з точки зору створення альтернативних протоколів лікування цього стану, що мають на меті зменшити кількість оперативних втручань та боротися не з наслідками, а з першопричинами метаболічних порушень організму.

Розділ 2. МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ

2.1. Виявлення вмісту антитіл класу IgG до цитомегаловірусу людини та вірусу Епштейна-Барр методом імуноферментного аналізу

Методику виконували згідно описаній в [106]. Досліджувану сироватку крові зберігали у холодильнику за температури 2-8°C, перед проведенням аналізу витримували 30 хв за кімнатної температури та перемішували задля досягнення однорідності.

Перед початком аналізу відокремлювали необхідну кількість лунок для аналізу(по дві лунки для кожного зразка та контролів) та вставляли в рамку ІФА-планшета, заповнювали бланк внесення проб. Готували розчин для промивання, розчиняючи концентрат у пропорції 1:20 дистильованою водою. В лунки вносили по 90 мкл розчину для розведення сироваток. Вносили в паралельні лунки ІФА-планшета контролі та зразки у наступному порядку: у лунки А1, А2 – по 10 мкл високоавідного позитивного контролю, В1 та В2 – по 10 мкл низькоавідного контролю, С1, С2 – по 10 мкл негативного контролю, далі попарно по 10 мкл зразка, що досліджується. Заклеювали стрипи клейкою плівкою та інкубували при 37°C 15 хв, після чого знімали плівку та видаляли вміст лунок аспірацією. Вносили по 100 мкл розчину порівняння в лунки непарних стрипів та по 100 мкл буферу для дисоціації в лунки парних стрипів, інкубували при кімнатній температурі 15 хв.

Після інкубації видаляли вміст лунок аспірацією та промивали наступним чином: наповнювали лунки не менш ніж 300 мкл розчину для промивання, залишали не менш ніж на 30 с, аспірували, повторювали процедуру чотири рази, після останньої аспірації позбавлялися зайвої вологи постукуванням планшета по фільтрувальному паперу. В лунки вносили по 100 мкл кон'югату, накривали новою клейкою плівкою та

інкубували при 37°C 30 хв, після чого видаляли плівку та повторювали промивання, як описано вище.

Після промивання вносили по 100 мкл розчину ТМБ у лунки та інкубували планшет при кімнатній температурі 30 хв у темному місці. Для зупинки ферментативної реакції вносили в лунки по 100 мкл стоп-реагенту у тій же послідовності, як було при внесенні розчину ТМБ. Проводили вимірювання оптичної густини в кожній лунці при довжині хвилі 450\620 нм протягом 5 хв після зупинки реакції.

2.2. Виділення фракції лімфоцитів в градієнті щільності

Фракцію лімфоцитів виділяли згідно методики, описаній в [107]. 3-5 мл венозної крові змішували у пробірці із гепарином, розведеним фізіологічним розчином до концентрації 20-25 Од/мл, у співвідношенні 1:1. Гепаринізовану кров розводили в 2 рази фосфатно-сольовим буфером із рН 7.2-7.4. У пробірки для центрифугування вносили 2-3 мл градієнта щільності 1.077 та обережно нашаровували 4-6 мл підготовленої крові, уникаючи змішування шарів. Зразки центрифугували 40 хв при 400g. Після центрифугування видаляли шар плазми та збирали кільце, в якому містяться лімфоцити, переносили в чисту центрифужну пробірку. Відмивали клітини 2-3 рази фізіологічним розчином та отримували препарат лімфозависі.

2.3. Виявлення субпопуляції лімфоцитів методом асоціації із моноклональними антитілами

Аналіз проводили із використанням комерційного діагностичного еритроцитарного для виявлення субпопуляцій лімфоцитів «Анти-CD8» та «Анти-CD16», закупленого у ТОВ «Лабораторія Гранум». У пробірки вносили 50 мкл CD-діагностичного та додавали 50 мкл лімфозависі, після чого суміш інкубували при 37°C 40 хв та центрифугували при 1000 об\хв протягом 5 хв. Інкубували при 4°C протягом 60 хв, відбирали надосадову рідину. Додавали до осаду 50 мкл 0.125% розчину глютарового альдегіду,

ресуспендували, витримували 5-7 хв та знову ресуспендували. Робили мазок на приблизно 1 см² площі знежиреного предметного скла, висушували, фіксували спиртом, забарвлювали за Романовським-Гімзою[108]. За допомогою світлового мікроскопу з імерсійною системою ведуть підрахунок відсотку лімфоцитів, що утворили із CD-діагностикумами розетки (зв'язали не менше 3 носіїв моноклональних антитіл – еритроцитів) на 100-200 лімфоцитів.

2.4. Виявлення наявності поверхневих антигенів імунокомпетентних клітин за допомогою МКАТ методом непрямой імуофлуоресценції

Методику виконували відповідно до [109]. Предметні скельця знежирювали у суміші Нікіфорова (96% етиловий спирт та диетиловий ефір у співвідношенні 1:1) та протирали. Із парафінової стрічки Parafilm M® вірізували шматок відповідно до розміру предметного скла та робили попарно 6 отворів діаметром 5 мм. Парафіновий шар відділяли від паперу, притискали внутрішньою стороною до предметного скла, після чого прогрівали праскою до моменту, поки матова стрічка парафіну не ставала прозорою.

У кожен лунку підготованого предметного скла вносили по 10 мкл розчину полі-L-лізину для фіксації моноклеарних клітин, після чого переміщували скло у вологу камеру, що являла собою чашку Петрі із вологим фільтрувальним папером, та інкубували при 37°C 40 хв у термостаті ТС-80-M2. Після інкубації перевіряли препарат на відсутність висихання та струшували надлишки полі-L-лізину, після чого промивали скло в забуференому фізіологічному розчині(ЗФР) із рН 7.4 (складається з 8,7 г NaCl; 0,68 г; 0,15 г KН₂РO₄, що розчинені в 1000 мл дистильованої води). У кожен лунку наносили клітини, віділені у градієнті щільності та інкубували у вологій камері при 37°C 20 хв, після чого переміщували скло у холодильник при 4°C на 20-30 хв. Скло струшували та та промивали у двох

склянках із ЗФР за кімнатної температури шляхом десятикратних кругових рухів. Після промивання у 5 лунок наносили по 10 мкл МКАТ, у 6 лунку – контрольну – наносили 10 мкл середовища. Поміщували скло у холодильник при 4°C на 30 хв, після чого промивали у двох склянках із ЗФР за кімнатної температури. У кожен лунку вносили по 10 мкл FITC-кон'югованих козячих(або кролячих) антитіл до мишачих імуноглобулінів, після чого переміщували у холодильник при 4°C на 30 хв. Скло виймали, струшували, промивали у трьох стаканах із ЗФР. Скло підсушували та обмальовували лунки на склі зі зворотнього боку, після чого знімали парафінову стрічку. Для фіксації наносили на препарати 50% розчин гліцерину, приготований на 3,75% розчині параформальдегіду, після чого зверху поміщували покривне скло, за необхідності видаляли надлишок гліцерину. Краї покривного скла обробляли парафіном.

Мікроскопування проводили із використанням імерсійної олії на мікроскопі Olympus BX-53 при збільшенні X900.

2.5. Визначення експресії поверхневих антигенів імунокомпетентних клітин із використанням МКАТ методом проточної цитофлуориметрії

Методику виконували згідно з [110]. Венозну кров збирали у стерильні пробірки із сіллю ЕДТА в якості антикоагулянта. Зразки зберігали за кімнатної температури без струшування до 24 годин. Перед забором аліквоти для дослідження зразок перемішували шляхом легкого струшування для забезпечення рівномірного розподілу клітин.

У кожен тест-пробірку вносили 85 мкл зразка та додавали по 10 мкл специфічного кон'югованого антитіла ІОТест. У тест-пробірку вносили по 100 мкл зразка та обережно струшували на приладі Vortex. Інкубують при кімнатній температурі 15-20 хв у захищеному від сонячних променів місці. Після інкубації проводили лізис еритроцитів: додавали 500 мкл розчину

Optilyse C, негайно струшували на Vortex протягом секунди та інкубували при кімнатній температурі 10 хв у захищеному від сонячних променів місці. Центрифугували при 150g протягом 5 хв, після чого видаляли супернатант аспірацією. До пробірок додавали 500 мкл розчину Isotone, ресуспендували клітинний осад у 3 мл ФСБ. Аналіз проводили протягом 2 годин із використанням приладу Cytomics FC500 (Beckmen Coulter, США).

2.6. Статистична обробка результатів

Статистична обробка результатів, побудова графіків, таблиць та обчислення довірчих інтервалів проводилася із використанням MS Excel.

Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Оцінка вмісту антитіл класу IgG до цитомегаловірусу людини та вірусу Епштейна-Барр методом імуноферментного аналізу

Виявлено достовірні кількості антитіл класу IgG до цитомегаловірусу людини та вірусу Епштейна-Барр, що свідчить про наявність персистуючої інфекції в організмі донорів.

3.2. Оцінка зміни експресії поверхневих рецепторів CD16 методом асоціації з антитілами

Для визначення закономірностей зміни експресії поверхневих маркерів імунокомпетентних клітин було проаналізовано середні значення рівня експресії у двох груп донорів. До групи А (n=16) увійшли донори із гепатоспленомегалією на тлі герпетичної інфекції, а до групи В (n=19) – донори із абдомінальною патологією на тлі Covid-19. В якості контролю було взято референтний рівень, визначений в лабораторії. За результатами дослідження виявлено достовірне ($P \leq 0,01$) підвищення експресії CD16 в обох групах (табл.3.1, рис.3.1).

Табл.3.1

Зміна експресії CD16 (Mean $\pm$ SD) методом асоціації з антитілами

Група	CD16,%
Референтний рівень	16,1 $\pm$ 2,8
Група А - Гепатоспленомегалія на тлі герпетичної інфекції	19,8 $\pm$ 3,4
Група В - Абдомінальна патологія на тлі Covid-19	21,3 $\pm$ 2,7

Виявлено порушення співвідношення нормальних NK-клітин у групі А та В на фоні персистенції герпетичних вірусів та SARS-CoV-2 відповідно. У групі А відсоток лімфоцитів, що мають поверхневий маркер CD16, підвищився на 23%, в той час у групі В – на 32,3% порівняно із референтним рівнем.

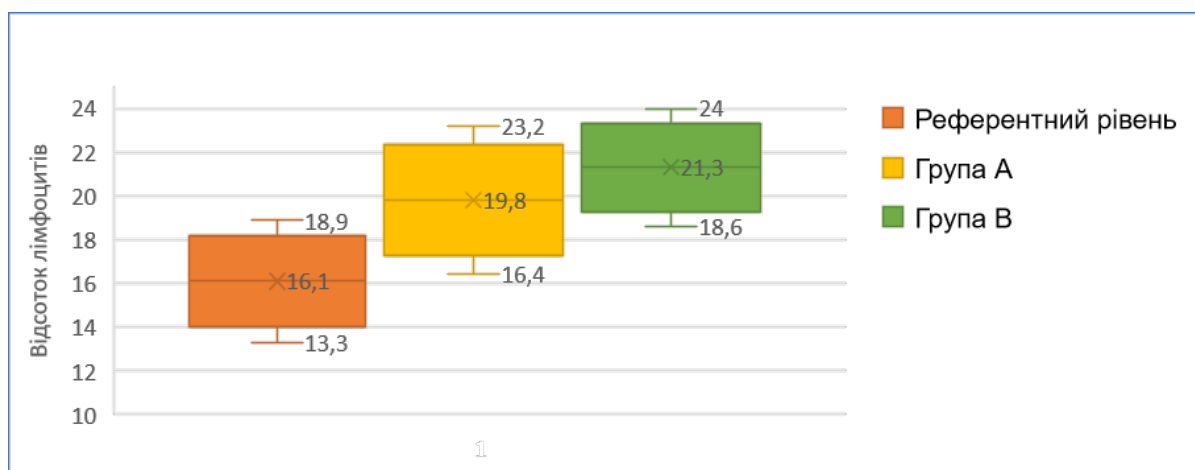


Рис.3.1. Зміна експресії рецептора CD16, оцінка методом асоціації із антитілами

Отримані результати підтверджують дані, наявні у літературі, та свідчать про посилення цитотоксичної ефекторної функції NK-клітин при герпетичних інфекціях та SARS-CoV-2[111,112].

3.3. Оцінка зміни експресії поверхневих рецепторів CD8 методом асоціації з антитілами

Результати аналізу зразків донорів групи А та групи В представлено у табл.3.2 та на рисунку 3.2.

Табл.3.2

Зміна експресії CD8 (Mean±SD) методом асоціації з антитілами

Група	CD8,%
Референтний рівень	21,1± 4,3

Група А - Гепатосленомегалія на тлі герпетичної інфекції	15,9± 7,1
Група В - Абдомінальна патологія на тлі Covid-19	13,2± 4,8

Отримані дані демонструють яскраво виражене зниження експресії маркера CD8 на цитотоксичних Т-лімфоцитах. У групі А спостерігається зниження експресії на 24,6%, в той час у групі В експресія втрачена більш ніж на третину – 37,4%.

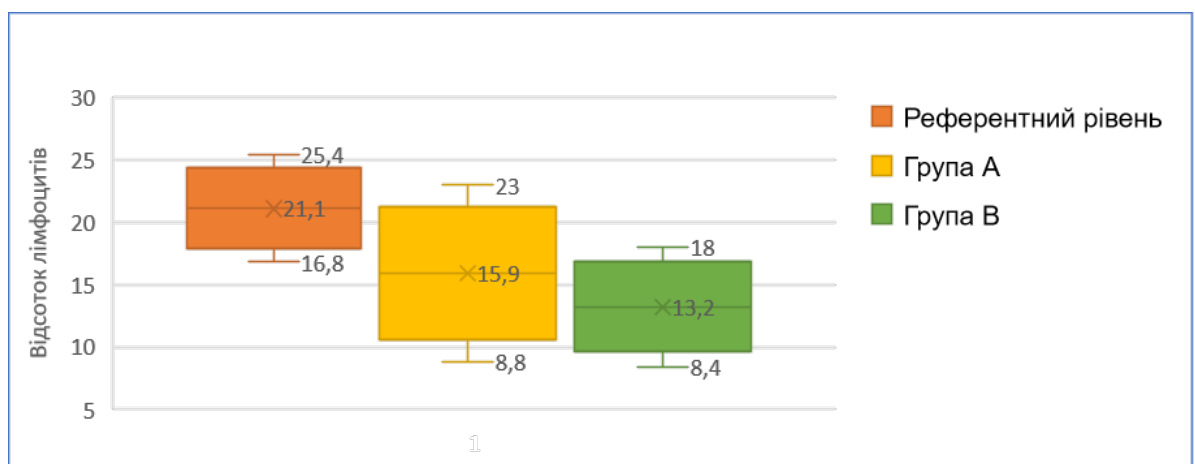


Рис.3.2. Зміна експресії рецептора CD8, оцінка методом асоціації із антитілами

Результати демонструють різке зниження експресії поверхневого маркера цитотоксичних Т-лімфоцитів, що свідчить про виснаження адаптивної ланки імунітету при довготривалих вірусних персистенціях.

3.4. Оцінка зміни експресії поверхневих рецепторів CD16 методом реакції імунофлуоресценції

Відмінною особливістю імунофлуоресцентного аналізу була можливість провести не тільки кількісну оцінку функціонального стану

субпопуляцій лімфоцитів, але і візуалізувати щільність експресії поверхневих маркерів на поверхні клітин шляхом спостереження світіння різної інтенсивності.

У обох досліджуваних групах спостерігали яскраве та чітке світіння флуоресцентних міток, що свідчило про підвищення експресії порівняно з референтним рівнем(рис. 3.3.)

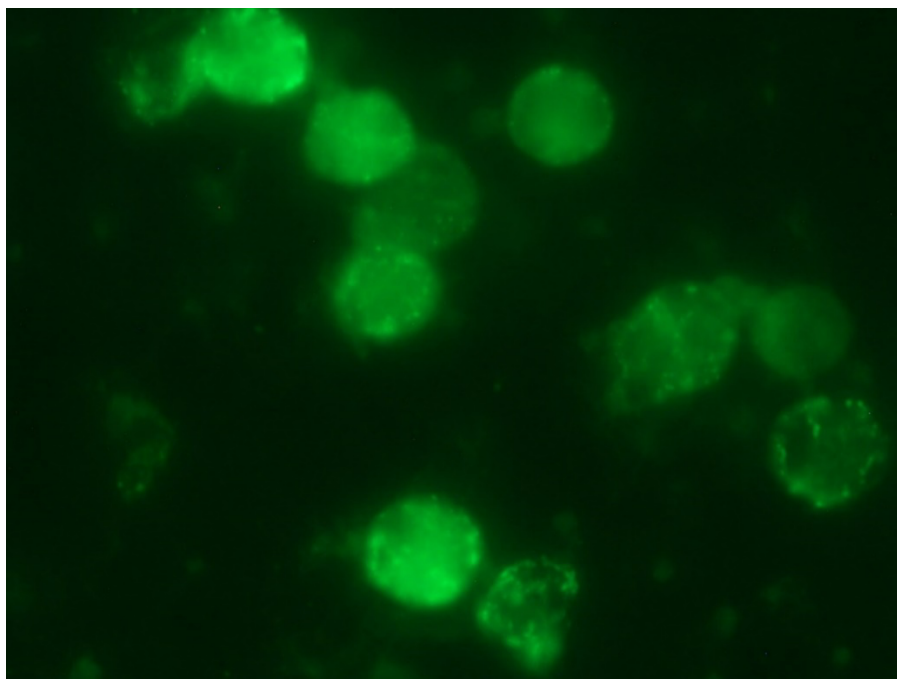


Рис.3.3. Світіння зв'язаних флуоресцентних міток на поверхні НК-клітин. Флуоресцентна мікроскопія, фарбування FITC, збільшення X900.

Результати аналізу зразків донорів групи А та групи В представлено у табл.3.3 та на рисунку 3.4.

Табл.3.3

Зміна експресії CD16 (Mean±SD) методом реакції імунофлуоресценції

Група	CD16,%
Референтний рівень	8,3± 2,1
Група А - Гепатосленомегалія на тлі герпетичної інфекції	20,3± 4,6

Група В - Абдомінальна патологія на тлі Covid-19	22,2± 3,7
--	-----------

Метод продемонстрував схожу тенденцію до підвищення рівня експресії маркера CD16 як при гепатоспленомегалії на фоні персистенції ЦМВ та ВЕБ, так і при абдомінальній патології, що пов'язана із персистенцією вірусу SARS-CoV-2.

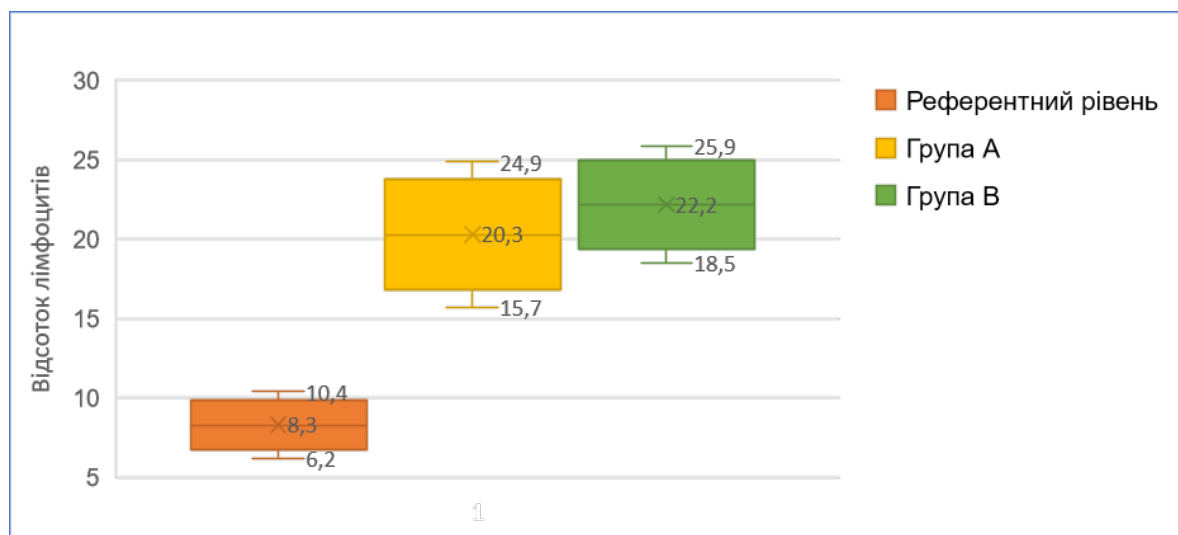


Рис.3.4. Рис.4 Зміна експресії рецептора CD16, оцінка методом реакції імунофлуоресценції

У групі А спостерігається підвищення експресії порівняно із референтним рівнем на 144,6%, у групі В - підвищення на 167,5%.

3.5. Оцінка зміни експресії поверхневих рецепторів CD8 методом реакції імунофлуоресценції

Результати флуоресцентної мікроскопії продемонстрували тьмяне та неінтенсивне світіння флуоресцентних міток, що свідчило про низький рівень експресії поверхневого маркера CD8(рис.3.5).

Кількісні дані аналізу зразків представлені у табл.4 та на рисунку 3.6.

Табл.3.4

Зміна експресії CD8 (Mean $\pm$ SD) методом реакції імунофлуоресценції

Група	CD8,%
Референтний рівень	28,1 $\pm$ 2,6
Група А - Гепатосленомегалія на тлі герпетичної інфекції	12,8 $\pm$ 1,2
Група В - Абдомінальна патологія на тлі Covid-19	22,2 $\pm$ 3,7

Отримані результати свідчать про помітне зниження експресії CD8 на поверхні цитотоксичних Т-лімфоцитів, що корелює із даними, описаними у пункті 3.2. та свідчить про виснаження адаптивної ланки імунітету в обох досліджуваних групах.

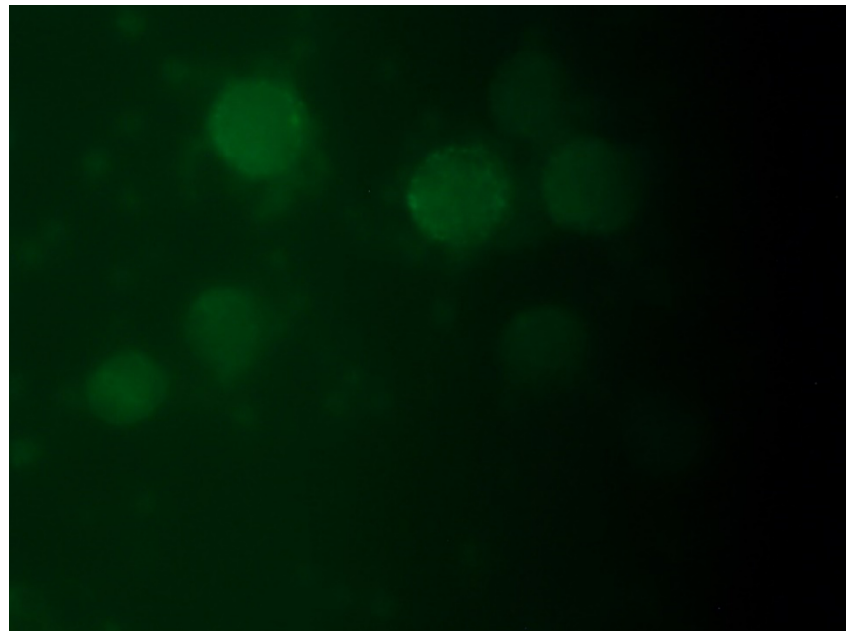


Рис.3.5. Світіння зв'язаних флуоресцентних міток на поверхні цитотоксичних Т-лімфоцитів. Флуоресцентна мікроскопія, фарбування FITC, збільшення X900.



Рис.3.6 Зміна експресії рецептора CD8, оцінка методом реакції імунофлуоресценції

У групі А та В експресія поверхневого маркера CD8 знижується більш ніж у два рази, на 54,5% та 49,5% відповідно. На відміну від попереднього методу, що продемонстрував більш виражене зменшення експресії у групі із абдомінальною патологією на фоні персистенції SARS-CoV-2, за результатами реакції імунофлуоресценції сильніше зниження CD8 спостерігається у групі із гепатоспленомегалією на тлі персистенції герпетичних вірусів.

3.6. Оцінка зміни експресії поверхневих рецепторів CD16 методом проточної цитофлуориметрії

Особливість методу проточної цитофлуориметрії полягала у високому рівні автоматизації аналізу, що дозволяє звести до мінімуму похибки, пов'язані із людським фактором. Метод дозволяє провести швидку оцінку до 5000 клітин з урахуванням їх морфологічних особливостей, що особливо актуально при лейкопенії та лімфоцитозі.

Результати аналізу наведено у табл.5 та на рис. 3.7.

Табл.3.5

Зміна експресії CD16 (Mean±SD) методом реакції імунофлуоресценції

Група	CD16,%
Референтний рівень	14,5± 1,2
Група А - Гепатосленомегалія на тлі герпетичної інфекції	21,2± 3,8
Група В - Абдомінальна патологія на тлі Covid-19	23,7± 1,6

Отримані результати підтверджують тенденцію до підвищення експресії поверхневого маркера CD16, як було продемонстровано у двох попередніх аналізах.

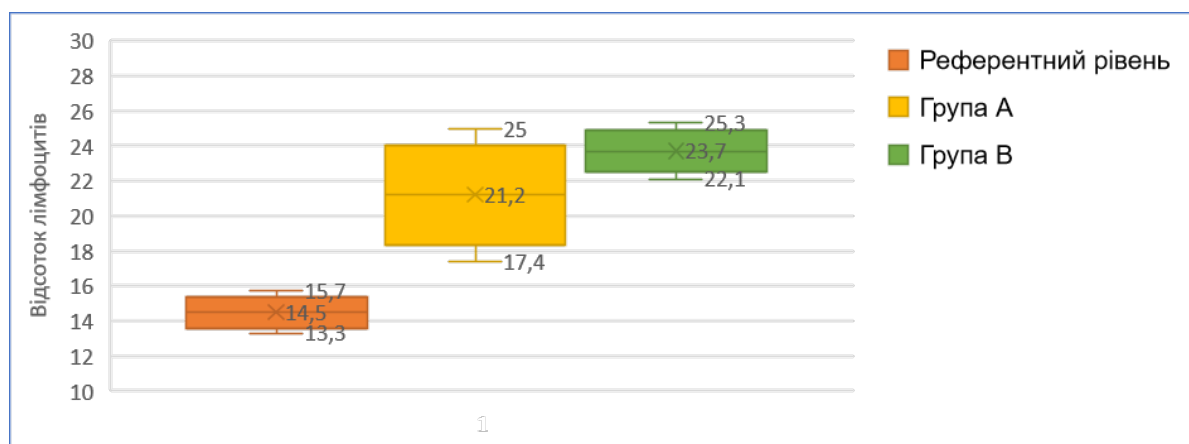


Рис.3.7. Зміна експресії рецептора CD16, оцінка методом проточної цитофлуориметрії

У групі А спостерігається підвищення експресії CD16 порівняно із референтним рівнем на 45,5%, у групі В аналогічний показник становить 63,4%.

3.7. Оцінка зміни експресії поверхневих рецепторів CD8 методом проточної цитофлуориметрії

Результати аналізу зразків донорів групи А та групи В представлено у табл.6 та на рисунку 3.8.

Табл.3.6

Зміна експресії CD8 (Mean $\pm$ SD) методом реакції імунофлуоресценції

Група	CD8,%
Референтний рівень	21,5 $\pm$ 3,1
Група А - Гепатосленомегалія на тлі герпетичної інфекції	18,7 $\pm$ 4,2
Група В - Абдомінальна патологія на тлі Covid-19	19,3 $\pm$ 3,6

Результати продемонстрували аналогічні до вимірюваних попередніми методами патерни зміни експресії та підтвердили зниження CD8 на поверхні цитотоксичних Т-лімфоцитів в обох досліджуваних групах.

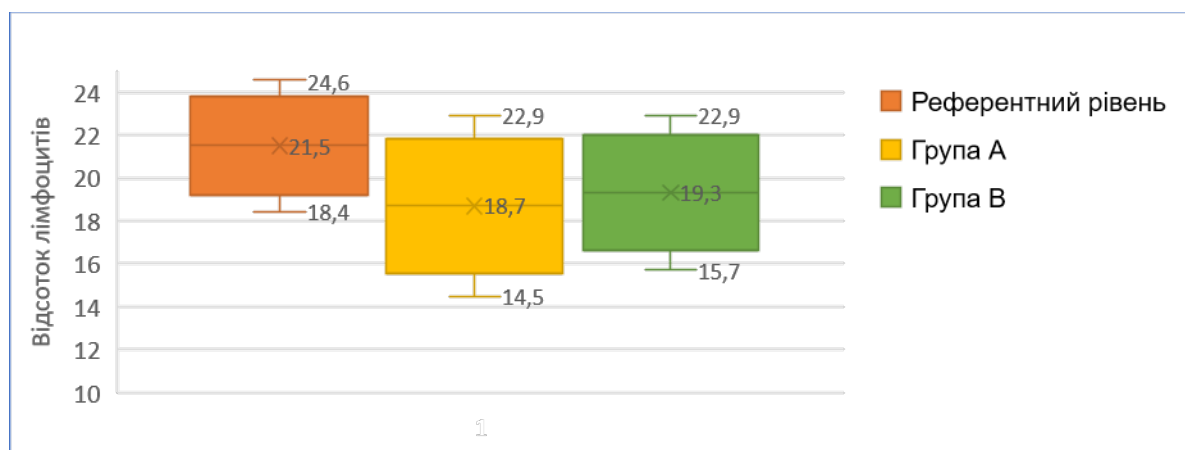


Рис.3.8. Зміна експресії рецептора CD8, оцінка методом проточної цитофлуориметрії

У групі А спостерігалася більш помітне зниження експресії на 13,1%. У групі В експресія знижувалася на 10,3% порівняно із референтним рівнем.

Як і у випадку використання попереднього методу виявлено, що більш сильне зниження експресії спостерігалось у групі із гепатоспленомегалією.

3.8. Обговорення

За підсумками аналізу виявлено вміст антитіл класу IgG до цитомегаловірусу людини та вірусу Епштейна-Барр, і це є доказом персистуючої вірусної інфекції, що призводить до формування гепатоспленомегалії та супутніх ускладнень.

Усі три методи виявили достовірну активацію експресії рецепторів CD16 на нормальних кілерних клітинах, що є свідченням їх деструктивної лізуючої дії на клітини та тканини організму із наступним утворенням клітинного дебрису та низькомолекулярних цитотоксичних фракцій DAMP. Підвищення експресії CD16 на нормальних кілерних клітинах найімовірніше пов'язане із взаємодією NK-клітин із вірусними білками, які перешкоджають функціонуванню цих клітин шляхом регуляції сигналів рецепторів та модуляції секреції цитокінів. За повідомленням Kim H. et al. [113] герпесвіруси та SARS-CoV-2 потенційно використовують взаємодію із рецепторами NKG2D, що призводить до активації клітин та посилення секреції IFN- γ . Проте, посилена активація нормальних кілерних CD16+ клітин призводить до надмірної цитотоксичності та, як наслідок, руйнування мітохондрій та зменшення їх енергетичного потенціалу, що є суттєвим патогенетичним фактором. Цей процес активує утворення аутоантитіл до цього органоїду, оскільки компоненти зруйнованих мітохондрій структурно подібні до елементів бактеріальних клітин (мтДНК та формілпептиди) і викликають відповідь імунної системи[95].

У випадку цитотоксичних кілерних Т-лімфоцитів CD8+ спостерігали різке зниження експресії поверхневого маркера, що вказує на імунну недостатність цитотоксичних клітин адаптивної ланки імунітету на фоні тривалої вірусної персистенції герпетичних вірусів (ЦМВ, ВЕВ) та вірусу

SARS-CoV-2. Виснаження CD8⁺-клітин характеризується втратою ефекторних функцій, зниженням продукції цитокінів та хемокінів, експресією інгібуючих рецепторів[114].

За результатами вимірювання виявили, що використання методу асоціації із антитілами виявляє більш низьку експресію поверхневого маркера CD8 у групі із абдомінальною патологією на тлі Covid-19, в той час як методи реакції імунофлуоресценції та проточної цитофлуориметрії демонструють більш низьку експресію у групі із гепатоспленомегалією на тлі герпетичних інфекцій. Подібному спостереженню є декілька причин, перша з яких пов'язана із різними підходами до оцінки результатів аналізу. Використання методу асоціації із антитілами передбачає візуальну оцінку невеликої кількості лімфоцитів (100, рідше до 200) безпосередньо дослідником; тобто людина, що проводить оцінку, свідомо рахує тільки ті лімфоцити, які вона може визначити як зв'язані із великою кількістю антитіл. Аналогічна ситуація меншою мірою стосується і методу реакції імунофлуоресценції, оскільки оцінка результатів також проводиться візуально, і підраховуються лише ті лімфоцити, що можна чітко визначити як ті, що мають достатньо інтенсивне світіння або його відсутність. У той же час метод проточної цитофлуориметрії оперує в рази більшою вибіркою (5000 клітин) та базується на автоматизованому процесі із використанням лазера, що виключає можливість похибки при підрахунку дослідником. Друга причина полягає у існуванні в периферичній крові невеликої субпопуляції незрілих лімфоцитів, що мають подвійну експресію поверхневих маркерів CD4 та CD8 та притаманні тимусу[42]. Концентрація маркера CD8 на поверхні цих клітин є невеликою та часто не виявляється методом асоціації із антитілами, оскільки такі клітини будуть зв'язувати значно меншу кількість антитіл порівняно із зрілими клітинами та можуть бути хибно інтерпретовані дослідником. Проте, використання проточної цитофлуориметрії дозволяє врахувати цю субпопуляцію Т-лімфоцитів та

провести більш точну оцінку результатів. Цей процес також пояснює найменші рівні зниження експресії CD8 порівняно із референтним рівнем серед усіх трьох методів, проаналізованих у цій роботі. Третя причина полягає у тривалості контактів людської популяції із різними групами вірусів. Герпетичні віруси, зокрема віруси Епштейна-Барр та цитомегаловірус людини мають більш ніж 5 мільйонів років коєволюції із представниками роду *Homo*[115] та зустрічаються у понад 95% населення, для них притаманна тривала персистенція та поступове виснаження імунної системи господаря впродовж багатьох років та десятиліть. Перші повідомлення про інфікування вірусом SARS-CoV-2 датуються кінцем 2019 року[116], а отже людська популяція станом на травень 2024 року перебуває у контакті із цим вірусом близько 5 років, і для цього вірусу більш характерним є гострий перебіг хвороби після інфікування. Колосальна різниця у тривалості співіснування популяцій пояснює більш пізню активацію ланки адаптивного імунітету, що представлена цитотоксичними CD8⁺ Т-лімфоцитами у випадку інфікування SARS-CoV-2, і, як наслідок, більш сильне зниження експресії у групи із гепатоспленомегалією на фоні персистенції герпетичних вірусів внаслідок більш тривалої дії цих вірусів на організм. Як результат, комбінація трьох причин і формує відмінності між рівнями експресії маркера CD8, які були виміряні методами, що досліджуються.

Таким чином, ця робота наголошує на необхідності проведення вимірювань рівнів експресії поверхневих маркерів імунокомпетентних клітин різними методами для отримання більш повної інформації про поточний стан людського організму при патологіях печінки та селезінки, що асоційовані із вірусними персистенціями. Результати вимірювань фіксують факт дисрегуляції імунної відповіді при патологічних процесах, що досліджувалися, з чого постає необхідність розробки таргетних препаратів, що регулюють співвідношення субпопуляцій лімфоцитів, які будуть здатні

чинити супресію маніфестації запальної реакції, викликаної NK-CD16+ клітинами, із одночасною активацією експресії рецепторів та синтезом ферментів цитотоксичних кілерних Т-лімфоцитів CD8+.

ВИСНОВКИ

1. Виявлено вміст антитіл до ЦМВ та ВЕБ
2. Виявлено вміст натуральних кілерних NK- CD16+ клітин та цитотоксичних кілерних CD8+ клітин за допомогою МКАТ методом світлової мікроскопії.
3. Виявлено вміст натуральних кілерних NK CD16+ клітин та цитотоксичних кілерних CD8+ клітин за допомогою МКАТ методом флуоресцентної мікроскопії.
4. Проведена оцінка співвідношення субпопуляцій NK-CD16+ та CD8+ методом проточної цитофлуориметрії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. E. Klimova et al. Perspective Chapter: Specific predictors of the autoimmune reactions formation in case of immunocompetent organs damage in patients with myasthenia gravis and hepatosplenomegaly // Causes and Diagnosis of Autoimmune Diseases. – 2023. URL: <https://doi.org/10.5772/intechopen.1002972> (дата звернення: 20.05.2024).
2. Danilova N. The evolution of immune mechanisms // Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution. – 2006. – Т. 306В. – № 6. – С. 496–520. URL: <https://doi.org/10.1002/jez.b.21102> (дата звернення: 20.05.2024).
3. Nussenzweig P. M., Marraffini L. A. Molecular Mechanisms of CRISPR-Cas Immunity in Bacteria // Annual Review of Genetics. – 2020. – Т. 54. № 1. – С. 93–120. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-022120-112523> (дата звернення: 20.05.2024).
4. Martins Y. C., Ribeiro-Gomes F. L., Daniel-Ribeiro C. T. A short history of innate immunity // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. – 2023. – Т. 118. URL: <https://doi.org/10.1590/0074-02760230023> (дата звернення: 20.05.2024).
5. Sirisinha, S. Evolutionary insights into the origin of innate and adaptive immune systems: different shades of grey // Asian Pacific journal of allergy and immunology. – 2014. – Т. 32. – № 1. – С. 3. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24641285/> (дата звернення: 20.05.2024).
6. Y. Zhang et al. Transposon molecular domestication and the evolution of the RAG recombinase // Nature. – 2019. – Т. 569. – № 7754. – С. 79–84. URL: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1093-7> (дата звернення: 20.05.2024).

7. Keohane EM, Otto CM, Walenga JM, Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications. 6th edn. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 117-135.
URL: [https://books.google.com/books?hl=uk&lr=&id=IoGJDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA117&dq=6.%09Omman,+R.+A.,+%26+Kini,+A.+R.+\(2019\).](https://books.google.com/books?hl=uk&lr=&id=IoGJDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA117&dq=6.%09Omman,+R.+A.,+%26+Kini,+A.+R.+(2019).) (дата звернення: 20.05.2024).
8. Moticka, Edward J. A historical perspective on evidence-based immunology. Newnes, 2015. URL: <https://www.google.com/books?hl=uk&lr=&id=2TMwAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Activation+of+T+Lymphocytes+and+MHC+Restriction> (дата звернення: 20.05.2024).
9. Romagnani S. T Cell Subpopulations // History of Allergy. Basel, 2014. – С. 155–164. URL: <https://doi.org/10.1159/000358622> (дата звернення: 20.05.2024).
10. Orakpoghenor O., Avazi D.O., Markus T.P., Olaolu O.S. Lymphocytes: A Brief Review // Sci J Immunol Immunother. - 2019. - Т. 3. - №.1. - С.4-8. URL: <https://www.sciresliterature.org/Immunology/SJII-ID17.pdf> (дата звернення: 20.05.2024).
11. Introduction to T and B lymphocytes - Autoimmunity - NCBI Bookshelf. National Center for Biotechnology Information. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459471/> (дата звернення: 20.05.2024).
12. Sigvardsson M. Molecular Regulation of Differentiation in Early B-Lymphocyte Development // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – Т. 19. – №. 7. – С. 1928. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms19071928> (дата звернення: 20.05.2024).
13. S. Sivori et al. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications // Cellular & Molecular Immunology. – 2019.

- Т. 16. – №. 5. – С. 430–441. URL: <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0206-4> (дата звернення: 20.05.2024).
14. Perera Molligoda Arachchige A. S. Human NK cells: From development to effector functions // *Innate Immunity*. – 2021. – Т. 27. – №. 3. – Р. 212–229. URL: <https://doi.org/10.1177/17534259211001512> (дата звернення: 20.05.2024).
15. P. Dogra et al. Tissue Determinants of Human NK Cell Development, Function, and Residence // *Cell*. – 2020. – Т. 180. – №. 4. – С. 749–763. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.022> (дата звернення: 20.05.2024).
16. Nutt S. L., Huntington N. D. Cytotoxic T Lymphocytes and Natural Killer Cells // *Clinical Immunology*. – 2019. – С. 247–259. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-6896-6.00017-x> (дата звернення: 20.05.2024).
17. Scoville S. D., Freud A. G., Caligiuri M. A. Cellular pathways in the development of human and murine innate lymphoid cells // *Current Opinion in Immunology*. – 2019. – Т. 56. С. 100–106. URL: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.11.003> (дата звернення: 20.05.2024).
18. Di Vito C., Mikulak J., Mavilio D. On the Way to Become a Natural Killer Cell // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Т. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01812> (дата звернення: 20.05.2024).
19. V. M. Renoux et al. Identification of a Human Natural Killer Cell Lineage-Restricted Progenitor in Fetal and Adult Tissues // *Immunity*. – 2015. – Т. 43. – №. 2. С. 394–407. URL: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.011> (дата звернення: 20.05.2024).
20. J. Yu et al. CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets // *Blood*. –

- 2010. – Т. 115. – № 2. – Р. 274–281.
URL: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-215491> (дата звернення: 20.05.2024).
21. A. Kurioka et al. CD161 Defines a Functionally Distinct Subset of Pro-Inflammatory Natural Killer Cells // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Т. 9. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00486> (дата звернення: 20.05.2024).
22. S. Pesce et al. New miRNA Signature Heralds Human NK Cell Subsets at Different Maturation Steps: Involvement of miR-146a-5p in the Regulation of KIR Expression // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Т. 9. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02360> (дата звернення: 20.05.2024).
23. A. Pfefferle et al. Deciphering Natural Killer Cell Homeostasis // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Т. 11. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00812> (дата звернення: 20.05.2024).
24. P. L. Collins et al. Gene Regulatory Programs Conferring Phenotypic Identities to Human NK Cells // *Cell*. – 2019. – Т. 176. – №. 1-2. С. 348–360. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.045> (дата звернення: 20.05.2024).
25. L. Quatrini et al. Human NK cells, their receptors and function // *European Journal of Immunology*. – 2021. – Т. 51. – №. 7. С. 1566–1579. URL: <https://doi.org/10.1002/eji.202049028> (дата звернення: 20.05.2024).
26. Y. Chen et al. Research Progress on NK Cell Receptors and Their Signaling Pathways // *Mediators of Inflammation*. – 2020. – Т. 2020. С. 1–14. URL: <https://doi.org/10.1155/2020/6437057> (дата звернення: 20.05.2024).
27. Coënon L., Villalba M. From CD16a Biology to Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity Improvement // *Frontiers in Immunology*. –

2022. – Т. 13. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.913215> (дата звернення: 20.05.2024).
- 28.C. A. Pérez-Romero et al. Frequency analysis of the g.7081T>G/A and g.10872T>G polymorphisms in the FCGR3A gene (CD16A) using nested PCR and their functional specific effects // *Genes & Immunity*. – 2018. – Т. 20. – №. 1. – С. 39–45. URL: <https://doi.org/10.1038/s41435-017-0001-0> (дата звернення: 20.05.2024).
- 29.R. Aicheler et al. Potential for Natural Killer Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity for Control of Human Cytomegalovirus // *Antibodies*. – 2013. – Т. 2. – №. 4. – С. 617–635. URL: <https://doi.org/10.3390/antib2040617> (дата звернення: 20.05.2024).
- 30.X. Li et al. The Unique Cytoplasmic Domain of Human FcγRIIIA Regulates Receptor-Mediated Function // *The Journal of Immunology*. – 2012. – Т. 189. – №. 9. – С. 4284–4294. URL: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200704> (дата звернення: 20.05.2024).
- 31.Gómez Román V. R., Murray J. C., Weiner L. M. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) // *Antibody Fc*. – 2014. – С. 1–27. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394802-1.00001-7> (дата звернення: 20.05.2024).
- 32.Prager I., Watzl C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2019. –Т. 105. – №. 6. – С. 1319–1329. URL: <https://doi.org/10.1002/jlb.mr0718-269r> (дата звернення: 20.05.2024).
- 33.Mace E. M., Orange J. S. Emerging insights into human health and NK cell biology from the study of NK cell deficiencies // *Immunological Reviews*. – 2018. – Т. 287. – №. 1. – С. 202–225. URL: <https://doi.org/10.1111/imr.12725> (дата звернення: 20.05.2024).
- 34.Wu J., Mishra H. K., Walcheck B. Role of ADAM17 as a regulatory checkpoint of CD16A in NK cells and as a potential target for cancer

- immunotherapy // Journal of Leukocyte Biology. – 2019. – Т. 105. – №. 6. С. 1297–1303. URL: <https://doi.org/10.1002/jlb.2mr1218-501r> (дата звернення: 20.05.2024).
35. Judge S. J., Murphy W. J., Canter R. J. Characterizing the Dysfunctional NK Cell: Assessing the Clinical Relevance of Exhaustion, Anergy, and Senescence // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2020. – Т. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00049> (дата звернення: 20.05.2024).
 36. S. P. Talathi et al. FcγRIIIa receptor polymorphism influences NK cell mediated ADCC activity against HIV // BMC Infectious Diseases. – 2019. – Т. 19. – №. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4674-z> (дата звернення: 20.05.2024).
 37. L. Zhu et al. MiR-218 produces anti-tumor effects on cervical cancer cells in vitro // World Journal of Surgical Oncology. – 2018. – Т. 16. – №. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12957-018-1506-3> (дата звернення: 20.05.2024).
 38. A. R. Victor et al. Epigenetic and Posttranscriptional Regulation of CD16 Expression during Human NK Cell Development // The Journal of Immunology. – 2017. – Т. 200. – №. 2. – С. 565–572. URL: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701128> (дата звернення: 20.05.2024).
 39. N. Q. Zhao et al. Natural killer cell phenotype is altered in HIV-exposed seronegative women // PLOS ONE. – 2020. – Т. 15. – №. 9. – С. e0238347. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238347> (дата звернення: 20.05.2024).
 40. Kumar B. V., Connors T. J., Farber D. L. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life // Immunity. – 2018. – Т. 48, №. 2. – С. 202–213. URL: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007> (дата звернення: 20.05.2024).

41. H. Y. Kueh et al. Asynchronous combinatorial action of four regulatory factors activates Bcl11b for T cell commitment // *Nature Immunology*. – 2016. – Т. 17. – №. 8. – С. 956–965.
URL: <https://doi.org/10.1038/ni.3514> (дата звернення: 20.05.2024).
42. Taniuchi I. CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation // *Annual Review of Immunology*. – 2018. – Т. 36. – №. 1. – С. 579–601.
URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053411> (дата звернення: 20.05.2024).
43. N. R. J. Gascoigne et al. TCR Signal Strength and T Cell Development // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 2016. – Т. 32. – №. 1. – С. 327–348.
URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315C125324> (дата звернення: 20.05.2024).
44. Xie Q., Ding J., Chen Y. Role of CD8⁺ T lymphocyte cells: Interplay with stromal cells in tumor microenvironment // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2021. – Т. 11. – №. 6. – С. 1365–1378.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.03.027> (дата звернення: 20.05.2024).
45. H.-F. Chang et al. Preparing the lethal hit: interplay between exo- and endocytic pathways in cytotoxic T lymphocytes // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2016. – Т. 74. – №. 3. – С. 399–408.
URL: <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2350-7> (дата звернення: 20.05.2024).
46. Valbon S. F., Condotta S. A., Richer M. J. Regulation of effector and memory CD8⁺ T cell function by inflammatory cytokines // *Cytokine*. – 2016. – Т. 82. – С. 16–23.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.11.013> (дата звернення: 20.05.2024).
47. Mittrücker H.-W., Visekruna A., Huber M. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8⁺ T Cells // *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. – 2014. – Т. 62. – №. 6. – С. 449–458.

- URL: <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0293-y> (дата звернення: 20.05.2024).
48. Hashimoto M. et al. Cytokine-Mediated Regulation of CD8 T-Cell Responses During Acute and Chronic Viral Infection // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. URL: <https://cshperspectives.cshlp.org/content/early/2017/11/03/cshperspect.a028464> (дата звернення: 20.05.2024).
49. Kalia V., Sarkar S. Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation by IL-2—A Balancing Act // Frontiers in Immunology. – 2018. – Т. 9. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02987> (дата звернення: 20.05.2024).
50. J.-H. Park et al. Harnessing the Power of IL-7 to Boost T Cell Immunity in Experimental and Clinical Immunotherapies // Immune Network. – 2024. – Т. 24. – №. 1. URL: <https://doi.org/10.4110/in.2024.24.e9> (дата звернення: 20.05.2024).
51. M. A. Luckey et al. The transcription factor ThPOK suppresses Runx3 and imposes CD4⁺ lineage fate by inducing the SOCS suppressors of cytokine signaling // Nature Immunology. – 2014. – Т. 15. – №. 7. – С. 638–645. URL: <https://doi.org/10.1038/ni.2917> (дата звернення: 20.05.2024).
52. Y. Zhao et al. IL-7: A promising adjuvant ensuring effective T cell responses and memory in combination with cancer vaccines? // Frontiers in Immunology. – 2022. – Т. 13. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1022808> (дата звернення: 20.05.2024).
53. Nolz J. C., Richer M. J. Control of memory CD8⁺ T cell longevity and effector functions by IL-15 // Molecular Immunology. – 2020. – Т. 117. – С. 180–188. URL: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.11.011> (дата звернення: 20.05.2024).
54. Lee H., Park S.-H., Shin E.-C. IL-15 in T-Cell Responses and Immunopathogenesis // Immune Network. – 2024. – Т. 24. – №. 1.

- URL: <https://doi.org/10.4110/in.2024.24.e11> (дата звернення: 20.05.2024).
- 55.. C. Chukwuanukwu et al. Immunology and the concept of vaccination // Vaccinology and Methods in Vaccine Research. – 2022. –С. 1–30. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91146-7.00005-6> (дата звернення: 20.05.2024).
- 56.Ellmeier W., Haust L., Tschismarov R. Transcriptional control of CD4 and CD8 coreceptor expression during T cell development // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2013. – Т. 70. – №. 23. – С. 4537–4553. URL: <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1393-2> (дата звернення: 20.05.2024).
- 57.IMMUNODEFICIENCY 116; IMD116. *OMIM*® An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. URL: <https://www.omim.org/entry/608957> (дата звернення:20.05.2024).
- 58.S. G. Tangye et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee // Journal of Clinical Immunology. – 2020. – Т. 40. – №. 1. –С. 24–64. URL: <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00737-x> (дата звернення: 20.05.2024).
- 59.Xiao Z., Mescher M. F., Jameson S. C. Detuning CD8 T cells: down-regulation of CD8 expression, tetramer binding, and response during CTL activation // Journal of Experimental Medicine. – 2007. – Т. 204, – №. 11. – С. 2667–2677. URL: <https://doi.org/10.1084/jem.20062376> (дата звернення: 20.05.2024).
- 60.M. Pascual-García et al. CD8 down-regulation on cytotoxic T lymphocytes of patients with endometrioid endometrial carcinomas // Human Pathology. – 2016. – Т. 56. – С. 180–188. URL: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.05.025> (дата звернення: 20.05.2024).

61. Gfeller D., Bassani-Sternberg M. Predicting Antigen Presentation—What Could We Learn From a Million Peptides? // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Т. 9. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01716> (дата звернення: 20.05.2024).
62. Zaitouna A. J., Kaur A., Raghavan M. Variations in MHC class I antigen presentation and immunopeptidome selection pathways // *F1000Research*. – 2020. – Т. 9. – С. 1177. URL: <https://doi.org/10.12688/f1000research.26935.1> (дата звернення: 20.05.2024).
63. C. A. Dendrou et al. HLA variation and disease // *Nature Reviews Immunology*. – 2018. – Т. 18. – №. 5. – С. 325–339. URL: <https://doi.org/10.1038/nri.2017.143> (дата звернення: 20.05.2024).
64. M. Wiczorek et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Т. 8. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00292> (дата звернення: 20.05.2024).
65. L. Maggs et al. HLA class I antigen processing machinery defects in antitumor immunity and immunotherapy // *Trends in Cancer*. – 2021. URL: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2021.07.006> (дата звернення: 20.05.2024).
66. Rock K. L., Reits E., Neefjes J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules // *Trends in Immunology*. – 2016. – Т. 37. – №. 11. – С. 724–737. URL: <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.08.010> (дата звернення: 20.05.2024).
67. Goldberg A. C., Rizzo L. V. MHC structure and function – antigen presentation. Part 1 // *Einstein (São Paulo)*. – 2015. – Т. 13. – №. 1. – С. 153–156. URL: <https://doi.org/10.1590/s1679-45082015rb3122> (дата звернення: 20.05.2024).

68. Seliger B. Novel insights into the molecular mechanisms of HLA class I abnormalities // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2011. – Т. 61. – №. 2. – С. 249–254. URL: <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1153-9> (дата звернення: 20.05.2024).
69. W.-Y. Lei et al. Total HLA Class I Antigen Loss with the Downregulation of Antigen-Processing Machinery Components in Two Newly Established Sarcomatoid Hepatocellular Carcinoma Cell Lines // *Journal of Immunology Research*. – 2018. – Т. 2018. – С. 1–12. URL: <https://doi.org/10.1155/2018/8363265> (дата звернення: 20.05.2024).
70. L. Cai et al. Defective HLA class I antigen processing machinery in cancer // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2018. – Т. 67. – №. 6. – С. 999–1009. URL: <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2131-2> (дата звернення: 20.05.2024).
71. Taylor B. C., Balko J. M. Mechanisms of MHC-I Downregulation and Role in Immunotherapy Response // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Т. 13. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.844866> (дата звернення: 20.05.2024).
72. Griffin B. D., Verweij M. C., Wiertz E. J. H. J. Herpesviruses and immunity: The art of evasion // *Veterinary Microbiology*. – 2010. – Т. 143. – №. 1. – С. 89–100. URL: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.017> (дата звернення: 20.05.2024).
73. M. Graul et al. The N-terminal proline hinge motif controls the structure of bovine herpesvirus 1-encoded inhibitor of the transporter associated with antigen processing required for its immunomodulatory function // *Journal of Molecular Biology*. – 2023. – С. 167964. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.167964> (дата звернення: 20.05.2024).

74. S. K. Purohit et al. Varicella Zoster Virus Impairs Expression of the Nonclassical Major Histocompatibility Complex Class I–Related Gene Protein (MR1) // The Journal of Infectious Diseases. – 2021. URL: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab526> (дата звернення: 20.05.2024).
75. M. Padariya et al. Viruses, cancer and non-self recognition // Open Biology. – 2021. – Т. 11. – №. 3. URL: <https://doi.org/10.1098/rsob.200348> (дата звернення: 20.05.2024).
76. M. Sade-Feldman et al. Resistance to checkpoint blockade therapy through inactivation of antigen presentation // Nature Communications. – 2017. – Т. 8. – №. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01062-w> (дата звернення: 20.05.2024).
77. H. S. Park et al. Loss of Human Leukocyte Antigen Class I Expression Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Advanced Breast Cancer // Journal of Pathology and Translational Medicine. – 2019. – Т. 53. – №. 2. – С. 75–85. URL: <https://doi.org/10.4132/jptm.2018.10.11> (дата звернення: 20.05.2024).
78. T. Wong et al. Epstein-Barr virus-encoded microRNA BART7 downregulates major histocompatibility complex class I chain-related peptide A and reduces the cytotoxicity of natural killer cells to nasopharyngeal carcinoma // Oncology Letters. – 2018. URL: <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9041> (дата звернення: 20.05.2024).
79. Mosaad Y. M. Clinical Role of Human Leukocyte Antigen in Health and Disease // Scandinavian Journal of Immunology. – 2015. – Т. 82. – №. 4. – С. 283–306. URL: <https://doi.org/10.1111/sji.12329> (дата звернення: 20.05.2024).
80. Y. Zaimoku et al. HLA class I allele loss and bone marrow transplantation outcomes in immune aplastic anemia // Transplantation and Cellular Therapy. – 2023. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jtct.2023.11.013> (дата звернення: 20.05.2024).

- 81.N. D. Bachtel et al. HLA-C downregulation by HIV-1 adapts to host HLA genotype // PLOS Pathogens. – 2018. – Т. 14. – №. 9. – С. e1007257. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007257> (дата звернення: 20.05.2024).
- 82.S. Liu et al. Monocytic HLA-DR Expression in Immune Responses of Acute Pancreatitis and COVID-19 // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24. – №. 4. – С. 3246. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms24043246> (дата звернення: 20.05.2024).
- 83.A. L. S. Revenfeld et al. Induction of a Regulatory Phenotype in CD3+ CD4+ HLA-DR+ T Cells after Allogeneic Mixed Lymphocyte Culture; Indications of Both Contact-Dependent and -Independent Activation // International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – Т. 18, – №. 7. – С. 1603. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms18071603> (дата звернення: 20.05.2024).
- 84.F. Naeim et al. Principles of Immunophenotyping // Atlas of Hematopathology. – 2018. – С. 29–56. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809843-1.00002-4> (дата звернення: 20.05.2024).
- 85.D. P. Saraiva et al Expression of HLA-DR in Cytotoxic T Lymphocytes: A Validated Predictive Biomarker and a Potential Therapeutic Strategy in Breast Cancer // Cancers. – 2021. – Т. 13. – №. 15. – С. 3841. URL: <https://doi.org/10.3390/cancers13153841> (дата звернення: 20.05.2024).
- 86.T. Spinetti et al. Reduced Monocytic Human Leukocyte Antigen-DR Expression Indicates Immunosuppression in Critically Ill COVID-19 Patients // Anesthesia & Analgesia. – 2020. – Т. 131. – №. 4. – С. 993–999. URL: <https://doi.org/10.1213/ane.0000000000005044> (дата звернення: 20.05.2024).
- 87.L. Chen et al. Cardiac steroid ouabain transcriptionally increases human leukocyte antigen DR expression on monocytes // Steroids. – 2021. – Т. 175.

- С. 108915. URL: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2021.108915> (дата
звернення: 20.05.2024).
88. Chen Y. Dynamic monitoring of monocyte HLA-DR expression for the
diagnosis prognosis and prediction of sepsis // *Frontiers in Bioscience*. –
2017. – Т. 22. – №. 8. – С. 1344–1354.
URL: <https://doi.org/10.2741/4547> (дата звернення: 20.05.2024).
89. M. Elayashy et al. Role of dexmedetomidine in modifying immune
paralysis in patients with septic shock: randomized controlled
trial // *Intensive Care Medicine Experimental*. – 2023. – Т. 11. – №. 1.
URL: <https://doi.org/10.1186/s40635-023-00542-2> (дата
звернення: 20.05.2024).
90. Z.-x. Yu et al. Association between HLA-DR Expression and Multidrug-
resistant Infection in Patients with Severe Acute Pancreatitis // *Current
Medical Science*. – 2018. – Т. 38. – №. 3. – С. 449–454.
URL: <https://doi.org/10.1007/s11596-018-1899-9> (дата
звернення: 20.05.2024).
91. I. Benlyamani et al. Monocyte HLA-DR Measurement by Flow Cytometry
in COVID -19 Patients: An Interim Review // *Cytometry Part A*. – 2020. –
Т. 97. – №. 12. – С. 1217–1221.
URL: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24249> (дата звернення: 20.05.2024).
92. V. S. Trivedi et al. Targeting the Complement–Sphingolipid System in
COVID-19 and Gaucher Diseases: Evidence for a New Treatment
Strategy // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Т. 23. –
№. 22. – С. 14340. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms232214340> (дата
звернення: 20.05.2024).
93. N. Zerangian et al. Venous thromboembolism in viral diseases: A
comprehensive literature review // *Health Science Reports*. – 2023. – Т. 6. –
№. 2. URL: <https://doi.org/10.1002/hsr2.1085> (дата
звернення: 20.05.2024).

94. P. Ginès et al. Liver cirrhosis // The Lancet. – 2021.
URL: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)01374-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)01374-x) (дата звернення: 20.05.2024).
95. E. M. Klimova et al. Hepatosplenomegaly in liver cirrhosis is caused by reactive oxygen species formation, an increase in apoptosis and autophagy, and pronounced autoimmune reactions // Regulatory Mechanisms in Biosystems. – 2021. – Т. 12. – №. 3. – С. 408–418.
URL: <https://doi.org/10.15421/022156> (дата звернення: 20.05.2024).
96. E. M. Klimova et al. PREDICTORS OF HEMORRHAGIC AND THROMBOTIC COMPLICATIONS OF HEPATOSPLENOMEGALY SYNDROME // Kharkiv Surgical School. – 2020. – №. 1. – С. 148–154.
URL: <https://doi.org/10.37699/2308-7005.1.2020.25> (дата звернення: 20.05.2024).
97. W. Liu et al. Efficient production of S -adenosyl- l -methionine from dl -methionine in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae* // Biotechnology and Bioengineering. – 2019. – Т. 116. – №. 12. – С. 3312–3323. URL: <https://doi.org/10.1002/bit.27157> (дата звернення: 20.05.2024).
98. X. Qin et al. Engineering *Pichia pastoris* to improve S-adenosyl- l -methionine production using systems metabolic strategies // Biotechnology and Bioengineering. – 2020. – Т. 117. – №. 5. – С. 1436–1445.
URL: <https://doi.org/10.1002/bit.27300> (дата звернення: 20.05.2024).
99. M. Cramer et al. MxB is an interferon-induced restriction factor of human herpesviruses // Nature Communications. – 2018. – Т. 9. – №. 1.
URL: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04379-2> (дата звернення: 20.05.2024).
100. D.-R. Yi et al. Human MxB Inhibits the Replication of Hepatitis C Virus // Journal of Virology. – 2018. – Т. 93. – №. 1.
URL: <https://doi.org/10.1128/jvi.01285-18> (дата звернення: 20.05.2024).

101. A. A. Jaguva Vasudevan et al. MXB inhibits murine cytomegalovirus // *Virology*. – 2018. – Т. 522. – С. 158–167. URL: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.07.017> (дата звернення: 20.05.2024).
102. A. Bozhkov et al. The “Mix-Factor” is involved in the regulation of the organism's redox systems in the late stages of ontogenesis and affects the lifespan of animals // *Ageing & Longevity*. – 2021. – №. 2. – С. 24–36. URL: <https://doi.org/10.47855/jal9020-2021-2-4> (дата звернення: 20.05.2024).
103. K.-B. Moon et al. Development of Systems for the Production of Plant-Derived Biopharmaceuticals // *Plants*. – 2019. – Т. 9. – №. 1. – С. 30. URL: <https://doi.org/10.3390/plants9010030> (дата звернення: 20.05.2024).
104. Yang Z., Zhang Z. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review // *Biotechnology Advances*. – 2018. – Т. 36. – №. 1. – С. 182–195. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.11.002> (дата звернення: 20.05.2024).
105. Qiu et al. The Sez6 family inhibits complement at the level of the C3 convertase. *bioRxiv*. URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.09.11.292623v1.full> (дата звернення: 20.05.2024).
106. R. Vornhagen et al. Early serodiagnosis of acute human cytomegalovirus infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1994. – Т. 32. – №. 4. – С. 981–986. URL: <https://doi.org/10.1128/jcm.32.4.981-986.1994> (дата звернення: 20.05.2024).
107. Lauer F. T., Denson J. L., Burchiel S. W. Isolation, Cryopreservation, and Immunophenotyping of Human Peripheral Blood

- Mononuclear Cells // Current Protocols in Toxicology. – 2017. – Т. 74. – №. 1. URL: <https://doi.org/10.1002/cptx.31> (дата звернення: 20.05.2024).
108. Giemsa, G. Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erieling der Romanowsky-Nocht'schen Chromatinfärbung. Centralblatt für Bakteriologie. – 1904. Т. 32, –№. 1. – С.307-313.
109. K. Im et al. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining // Methods in Molecular Biology. New York, NY, 2018. – С. 299–311. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26 (дата звернення: 20.05.2024).
110. Parcs D.R., Lanier L., Herrengerg L.A. Flow cytometry and fluorescence activated cell sortins (Facs) // Handbook of Experimental Immunology. – 1986. – С.302–324.
111. A. Schuch et al. NK-cell responses are biased towards CD16-mediated effector functions in chronic hepatitis B virus infection // Journal of Hepatology. – 2019. – Т. 70, – №. 3. – С. 351–360. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.10.006> (дата звернення: 20.05.2024).
112. D. Zhang et al. Frontline Science: COVID-19 infection induces readily detectable morphologic and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes // Journal of Leukocyte Biology. – 2020. – Т. 109, – №. 1. – С. 13–22. URL: <https://doi.org/10.1002/jlb.4hi0720-470r> (дата звернення: 20.05.2024).
113. H. Kim et al. SARS-CoV-2 peptides bind to NKG2D and increase NK cell activity // Cellular Immunology. – 2022. – Т. 371. – С. 104454. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104454> (дата звернення: 20.05.2024).
114. McLane L. M., Abdel-Hakeem M. S., Wherry E. J. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer // Annual Review

- of Immunology. – 2019. – Т. 37, – №. 1. – С. 457–495.
URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055318> (дата
звернення: 20.05.2024).
115. Bowden R. J., McGeoch D. J. Evolution of Herpes Simplex Viruses
// Herpes Simplex Viruses. – 2017. – С. 1–34.
URL: <https://doi.org/10.1201/9780203711828-1> (дата
звернення: 20.05.2024).
116. P. Zhou et al. A pneumonia outbreak associated with a new
coronavirus of probable bat origin // Nature. – 2020. – Т. 579, – №. 7798. –
С. 270–273. URL: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7> (дата
звернення: 20.05.2024).