

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ ХАРКІВСЬКИЙ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**Оцінка проліферативної активності лімфоцитів в культурі при
автоімунному ураженні печінки та селезінки**

Допущена до захисту
«__»_____2024 р.

Кваліфікаційна робота студентки
кафедри молекулярної біології
та біотехнології

Косарева Тетяна Іванівна

Завідувач кафедри

Науковий керівник:

д.б.н., професор Клімова О.М.

Оцінка «_____»

Голова ЕК _____

«__»_____20 р.

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота на тему «Оцінка проліферативної активності лімфоцитів в культурі при аутоімунному ураженні печінки та селезінки».

Робота включає: - 55 сторінок, 3 таблиці, 19 рисунків, 36 використаних джерел.

Актуальність вивчення проліферативної активності лімфоцитів при аутоімунному ураженні печінки та селезінки визначається великим потенціалом дослідження різноманітних механізмів регуляції та дизрегуляції імунної відповіді. Розуміння цих механізмів є ключовим для розробки ефективних терапевтичних стратегій і біотехнологічних продуктів.

Біотехнологія активно займається виробництвом біологічно активних речовин, таких як імуносупресивні препарати, вакцини та інші терапевтичні агенти. Для успішного розвитку цих продуктів необхідно глибоке розуміння механізмів, що діють в імунній, ендокринній та нервовій системах. Вивчення проліферативної активності лімфоцитів дає змогу оцінити їх фізіологічний потенціал і функціональну активність.

Методи оцінки проліферативної активності лімфоцитів, включаючи дослідження їх інгібування та стимуляції, дозволяють краще зрозуміти вплив як ендогенних факторів (наприклад, механічних пошкоджень – DAMP), так і екзогенних тригерів (наприклад, вірусів) на імунну відповідь. Це знання є критично важливим для розробки біологічних субстанцій, які можуть нормалізувати проліферативні функції лімфоцитів при аутоімунних захворюваннях.

DAMP можуть впливати на функціональну активність лімфоцитів та експресію кластерів диференціації CD. Цей вплив напряму залежить від природи DAMP.

Мета роботи: визначити проліферативну активність лімфоцитів в культурі клітин, зміну експресії кластерів диференціювання та вміст

цитотоксичних фракцій DAMP при аутоімунних ураженнях печінки та селезінки.

Для досягнення зазначеної мети було проведено ряд досліджень по визначенню проліферативної активності лімфоцитів в культурі *in vitro* при гепатоспленомегалії, з використанням методу оцінки за допомогою внесення мітогену (фітогемагглютиніну) у зразки. Також було проведено дослід на визначення кластерів диференціації CD25 на регуляторних Т-лімфоцитах за допомогою проточної цитофлуориметрії. І було проведено дослідження по визначенню концентрації різних фракцій DAMP за допомогою спектрофотометричного методу - у діагностичній лабораторії з імуноферментним і імунофлюоресцентним аналізом ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В.Т. Зайцева НАМН України». Отримані результати порівнювали з референтними значеннями.

Дані дослідження у біотехнології можуть мати значення для розробки нових лікарських засобів, адресної доставки ліків, встановлення біомаркерів для встановлення аутоімунних захворювань печінки та селезінки. Развиваются новые лечебно-диагностические протоколы сегодня. Этому предшествуют препараты для таргетного лечения нарушения иммунного ответа.

Ключові слова: проліферація лімфоцитів, гепатоспленомегалія, DAMP, CD25+

ABSTRACT

Qualification Work on the Topic "Assessment of Lymphocyte Proliferative Activity in Culture in Autoimmune Liver and Spleen Damage"

The work includes: - 55 pages, 36 sources.

The study of lymphocyte proliferative activity in autoimmune liver and spleen damage is highly relevant due to the significant potential for investigating various mechanisms of immune response regulation and dysregulation. Understanding these mechanisms is crucial for developing effective therapeutic strategies and biotechnological products.

Biotechnology actively engages in the production of biologically active substances such as immunosuppressive drugs, vaccines, and other therapeutic agents. Successful development of these products requires a deep understanding of the mechanisms operating within the immune, endocrine, and nervous systems. Studying lymphocyte proliferative activity allows for the assessment of their physiological potential and functional activity.

Methods for assessing lymphocyte proliferative activity, including studies of their inhibition and stimulation, help better understand the impact of both endogenous factors (e.g., mechanical damage - DAMP) and exogenous triggers (e.g., viruses) on the immune response. This knowledge is critical for developing biological substances that can normalize lymphocyte proliferative functions in autoimmune diseases.

DAMPs can influence the functional activity of lymphocytes and the expression of differentiation clusters (CD). This effect directly depends on the nature of the DAMPs.

Objective: To determine the proliferative activity of lymphocytes in cell culture, changes in differentiation cluster expression, and the content of cytotoxic DAMP fractions in autoimmune liver and spleen damage.

To achieve this objective, a series of studies were conducted to determine lymphocyte proliferative activity in vitro in hepatosplenomegaly, using a method of evaluation with the addition of a mitogen (phytohemagglutinin) to the samples. Additionally, a study was conducted to determine the differentiation cluster CD25 on regulatory T-lymphocytes using flow cytometry. A study was also conducted to determine the concentration of various DAMP fractions using a spectrophotometric method in the diagnostic laboratory with enzyme-linked immunosorbent and immunofluorescent assays at the "Institute of General and Emergency Surgery named after V.T. Zaitsev, NAMS of Ukraine." The obtained results were compared with reference values.

These studies in biotechnology can be significant for the development of new drugs, targeted drug delivery, and establishing biomarkers for diagnosing autoimmune diseases of the liver and spleen. New therapeutic and diagnostic protocols are being developed today. These precede the development of drugs for targeted treatment of immune response disorders.

Keywords: *lymphocyte proliferation, hepatosplenomegaly, DAMP, CD25+*

ЗМІСТ

ЗМІСТ.....	6
ВСТУП	9
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	10
1.1 Аутоімунні захворювання печінки та селезінки	11
1.1.1 Тригерні фактори розвитку гепатоспленомегалії та аутоімунного гепатиту	14
1.1.2 Структурно-функціональні особливості печінки та селезінки до тригерних факторів.	17
1.2 Роль лімфоцитів у розвитку аутоімунних захворювань печінки та селезінки	18
1.2.1 Роль Т-лімфоцитів у патогенезі аутоімунних захворювань печінки та селезінки	19
1.2.2 Роль В-лімфоцитів у патогенезі аутоімунних захворювань печінки та селезінки	21
1.3 Роль DAMP при аутоімунних захворюваннях печінки та селезінки.....	23
1.3.1 Вплив HMGB1 на перебіг аутоімунних захворювань	24
1.3.2 Вплив АТФ на перебіг аутоімунних захворювань.....	25
1.3.3 Вплив білків теплового шоку на перебіг аутоімунних захворювань	26
1.3.4 Вплив мітохондріальної ДНК та формілпептидів на перебіг аутоімунних захворювань	27
1.4 Роль кластеру диференціації CD25 при аутоімунних ураженнях печінки та селезінки.....	29
1.5 Біотехнологічні перспективи в дослідженні аутоімунних захворювань печінки та селезінки	30

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	32
2.1 Об'єкти дослідження	32
2.2 Матеріали дослідження	33
2.3 Методи досліджень	33
2.3.1 Проліферативна активність лімфоцитів в культурі <i>in vitro</i>	33
2.3.2 Визначення поверхневих антигенів (CD) лімфоцитів	35
2.3.3 Визначення концентрації різних фракцій DAMP.....	37
2.3.4 Статистичні методи.....	38
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ.....	39
3.1 Визначення проліферативної активності лімфоцитів в культурі <i>in vitro</i>	39
3.2 Визначення поверхневих антигенів (CD) лімфоцитів	41
3.3 Визначення цитотоксичних фракцій DAMP.....	44
3.4 Оцінка кореляційної взаємодії змінами концентрації різних фракцій DAMP та проліферативною активністю лімфоцитів	47
ВИСНОВКИ.....	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	51

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- APC – антиген презентуючі клітини
- АТФ – аденозинтрифосфат
- BAFF – фактор активації В-клітин
- BCR – В-клітинні рецептори
- CTL – цитотоксичні Т-лімфоцити
- DAMP – молекулярні патерни, пов’язані з пошкодженням
- FPR – формілпептидні рецептори
- HMGB1 – білок блоку 1 групи високої мобільності
- HSP – білок теплового шоку
- IL - інтерлейкін
- INF - інтерферон
- PAMP – молекулярні патерни, пов’язані з патогенами
- PPR – рецептори розпізнавання патернів
- STING - стимулятор генів інтерферону
- TCR – Т-клітинні рецептори
- Th – Т-хелпери
- TLR – Toll-like рецептори
- TNF – фактор некрозу пухлини
- Tregs – регуляторні Т-клітини
- АГ – антиген
- АІГ – аутоімунний гепатит
- АФК – активні форми кисню
- ВЕБ – вірус Епштейна-Барр
- МНС – головний комплекс гістосумістності
- мтДНК – мітохондріальна ДНК
- ФГА – фітогемогглютинін
- ЦМВ - цитомегаловірус

ВСТУП

Імунобіотехнології – одна з галузей біотехнології, яка зараз інтенсивно розвивається. Особливе значення в імунній відповіді відіграють лімфоцити, які забезпечують реакції адаптивного імунітету.

Лімфоцити підрозділяються на В та Т-лімфоцити, і завдяки унікальній можливості клітин, в них відбувається редагування генів імуноглобулінів та редагування генів TCR рецепторів. Завдяки цій здатності збільшується різноманітність лімфоцитів, які можуть спеціалізовано зв'язуватися з різноманітними антигенами за принципом комплементарності. За наявності антигенів відбувається селекція спеціалізованих клонів, які мають експресувати, щоб утворити TCR-рецептор.

Таким чином проліферативний потенціал Т-клітин є надважливим для напрацювання утворення клонів лімфоцитів.

Проліферативна активність лімфоцитів характеризує їх фізіологічний потенціал. Методи оцінки їх функції та дослідження їх фактичного інгібування та проліферації, а також з'ясування впливу на проліферацію ендогенних механічних пошкоджень (DAMP) та екзогенних – віруси-тригери, дозволяють з'ясувати підходи при розробці біологічних субстанцій та нормалізувати їх проліферативні функції.

Аутоімунні ураження печінки та селезінки пов'язані з дефіцитом рецепторних шляхів клітинної взаємодії, а також з негативною дією ендогенних цитотоксичних факторів, а також експресії кластерів диференціації CD25 – маркерів ранішньої диференціації.

Актуальність теми: Вивчення активності проліферації лімфоцитів в біотехнологічному контексті має велике значення для розробки нових лікарських засобів, адресної доставки ліків, встановлення біомаркерів, розуміння патогенезу та розвитку нових терапевтичних стратегій для встановлення аутоімунних захворювань печінки та селезінки.

Мета роботи: Визначити проліферативну активність лімфоцитів в культурі клітин, зміну експресії кластерів диференціювання та вміст цитотоксичних фракцій DAMP при аутоімунних ураженнях печінки та селезінки.

Завдання роботи:

- Оцінити зміну проліферативного потенціалу лімфоцитів в культурі в присутності мітогену фітогемагглютиніну (ФГА) та без ФГА;
- Дослідити зміну експресії кластера диференціювання CD25 – маркера ранішньої активації лімфоцитів при аутоімунній гепатоспленомегалії;
- Визначити в сироватці крові цитотоксичні олігопептидні та олігонуклеотидні фракції DAMP;
- Оцінка кореляції між вмістом різних фракцій DAMP та проліферативним потенціалом лімфоцитів при аутоімунній гепатоспленомегалії.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Аутоімунні захворювання печінки та селезінки

Аутоімунні захворювання печінки та селезінки – хвороби, при яких імунітет організму бореться не проти сторонньої сполуки (антигену), а проти клітин власного організму, в даному випадку проти клітин селезінки та печінки. Найпоширеніше захворювання – аутоімунний гепатит та гепатоспленомегалія, як симптом аутоімунного гепатиту.

Гепатоспленомегалія – симптом аутоімунного гепатиту, при якому відбувається одночасне збільшення печінки та селезінки.

Причинами збільшення селезінки дуже часто є бактеріальні інфекції, протозойні інфекції, гельмінтози, спленогенна нейтропія і ряд інших факторів [1].

Надходження інфекційних антигенів, а також клітинного дебрису через ворітну вену в печінку з травного тракту провокує негайну реакцію імунних клітин печінки – макрофагів ретикулоендотеліальної системи. Вони виступають першою лінією захисту від чужорідних антигенів [2].

Взаємозв'язок між печінкою та селезінкою пояснюється тим, що ці два органи є надважливими у портальному кровообігу. Гістологічно селезінка та печінка мають спільні ретикулоендотеліальні структури, які беруть участь в обміні речовин та клітинному переміщенні. Якщо дивитись з боку імунології, то ці два органи грають важливу роль в імунному гомеостазі, а також в елімінації різноманітних патогенів. Тому, можна стверджувати, що печінка та селезінка безпосередньо взаємопов'язані

імуниними реакціями, кліренсом патогенів, а також обміном речовин при хронічних захворюваннях печінки (рис. 1.1).

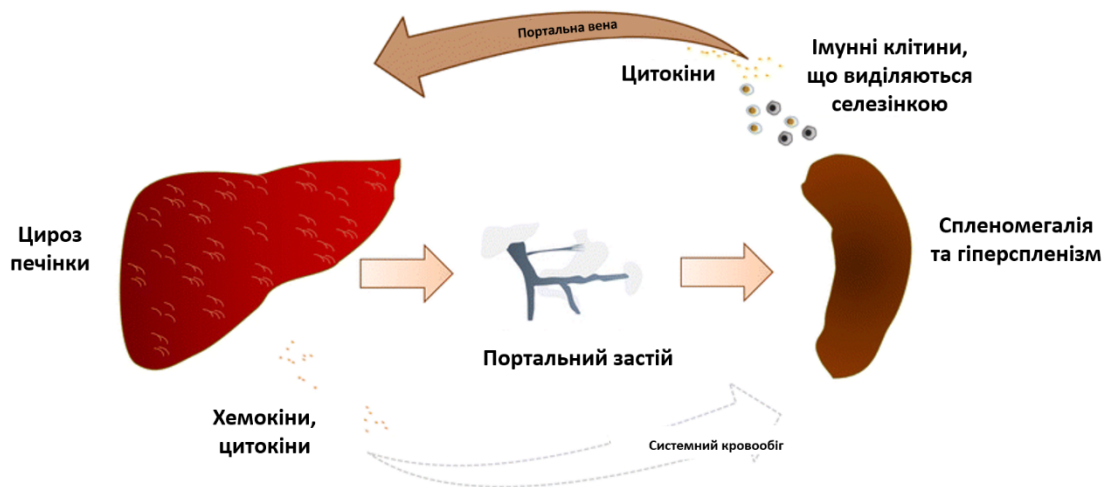


Рис. 1.1 Взаємозв'язок між печінкою та селезінкою. Під час прогресування цирозу печінки імунні клітини селезінки та цитокіни можуть потрапити в ушкоджену печінку через портальний кровотік. У той же час цироз печінки також сприяє портальній гіпертензії, яка призводить до перевантаження портальної системи та може призвести до спленомегалії та гіперспленізму. Циротична печінка також може вивільняти в кровообіг хемокіни, DAMP, такі як HMGB1, або екзосоми, які викликають активацію та/або міграцію спленоцитів.

Гепатоспленомегалія порушує головну функцію селезінки – усунення дефектних старіючих клітин, які змінили свій фенотип. Також це захворювання порушує усунення селезінкою PAMP (молекулярні патерни, пов'язані з патогеном). Загалом печінка опосередковує реакції детоксикації на молекулярному рівні. І таким чином, під час інфекції відбуваються патологічні молекулярні процеси з утворенням DAMP (молекулярні патерни, пов'язані з пошкодженнями) [2].

В селезінці та печінці відбувається фільтрація крові, яка в свою чергу забезпечує видалення токсичних речовин та інфекційних антигенів. Вони активують toll-like receptor 4 (TLR-4) імунокомпетентних клітин, а

також експресію кластера диференціювання 14 (CD14) на клітинах печінки – клітинах Купфера. Далі відбувається транскрипція генів цитокінів – інтерлейкіну 1 (IL-1) та фактору некрозу пухлини альфа (TNF- α), таким чином вмикаючи каскад імунних реакцій. Тому основним патогенетичним фактором захворювання є порушення функцій імунних клітин.

Аутоімунний гепатит (АІГ) – це запальне захворювання печінки внаслідок аутоімунної атаки на гепатоцити. Біохімічно АІГ характеризується високим рівнем трансаміназ у сироватці крові, а серологічно – підвищеним рівнем імуноглобуліну G (IgG) та позитивними циркулюючими аутоантитілами. Аутоімунний гепатит підрозділяється на два типи за серологічними характеристиками. АІГ-1 характеризується антинуклеарними антитілами (ANA) та/або антитілами до гладких м'язів (SMA). АІГ-2 характеризується в свою чергу мікросомальними антитілами проти печінки та нирок 1 типу (анти-LKM1) та/або антитілами до цитозолу печінки 1 типу (анти-LC1)

Аутоімунний гепатит вважається Т-клітинним захворюванням, оскільки активація В-клітин напряму залежить від Т-клітин. Вважається, що імунна відповідь при АІГ ініціюється презентацією власних антигенних пептидів Т-клітинним рецептору (TCR) на закріплених наївних CD-14 Т-хелперних (Th0) лімфоцитів у межах молекули HLA-II антигенпрезентуючої клітини (APC), або в лімфатичних вузлах, або в печінці. Далі активовані Th0 диференціюються в клітини Th1 та Th2 під дією інтерлейкінів – IL-12 або IL-4 відповідно до природи антигену. Це запускає каскад імунних реакцій, що визначаються цитокінами, які вони продукують. Th1 секретують INF- γ та IL-2, цитокіни, які в свою чергу стимулюють цитотоксичні Т-лімфоцити (CTL), посилюють експресію молекул HLA-I, індукують експресію молекул HLA-II на клітинах печінки та активують макрофаги (МФ). Клітини Th2 виробляють IL-4, IL-13 та IL-21 та стимулюють секрецію аутоантитіл В-лімфоцитами. Регуляторні Т-

клітини (Tregs) походять від Th0 у присутності трансформуючого фактору росту (TGF)- β . Якщо регуляторні T-клітини є дефектними за кількістю та/або функціями, відбувається руйнування гепатоцитів, що є наслідком залучення пошкоджуючих ефektorних механізмів, в тому числі цитотоксичні T-лімфоцити, цитокіни, які вивільняються T-хелпером-1 та активованим макрофагом. Також відбувається активація комплементу або прикріплення NK-клітин до вкритих аутоантитілами гепатоцитів через їх спеціальні Fc-рецептори. Далі клітини Th17 виробляють IL-17, IL-22 і TNF і походять від клітин Th0 під дією TGF- β та IL-6. Гепатоцит вивільняє IL-6, який додатково стимулює Th17 (рис. 1.2) [3]

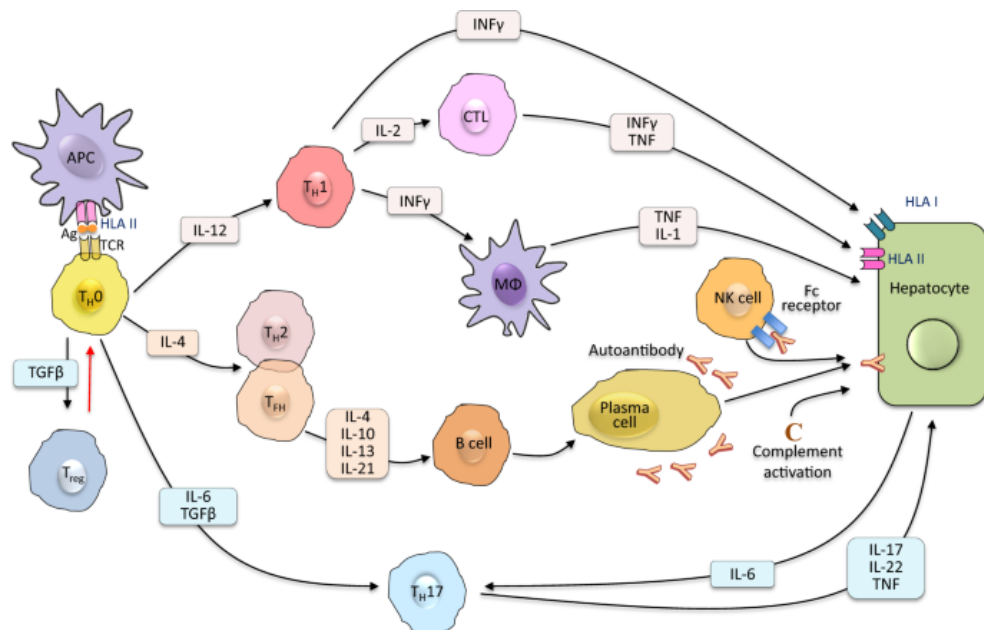


Рис. 1.2 Аутоімунна атака на клітину печінки

1.1.1 Тригерні фактори розвитку гепатоспленомегалії та аутоімунного гепатиту

Збільшення селезінки часто поєднується з різними патологіями печінки. На печінку можуть впливати безліч як гепатотропних, так і негепатотропних інфекційних агентів. Ці патогени впливають на морфологію та функції печінки, залежно від збудника. Найпоширенішими гепатотропними вірусами вважаються – вірус гепатиту А та Е, але інші

віруси – герпетичні, також можуть викликати гостре пошкодження печінки.

Герпетичні віруси – вірус Епштейна-Бара (ВЕБ) або цитомегаловірус (ЦМВ), можуть викликати патологію і печінки, і селезінки.

Вірус Епштейна-Бара (ВЕБ) – є етіологією інфекційного мононуклеозу з позитивними гетерофільними антитілами та пов'язаний з розвитком різних нововтворень – лімфома Беркітта, лімфопрліферативне захворювання після трансплантації і тд [4].

Синдром мононуклеозу супроводжується болем у горлі та лихоманкою. Гепатит є частим проявом інфекційного мононуклеозу, він вражає до 90% пацієнтів. Такий гепатит характеризується поірним підвищенням гепатоцеллюлярних ферментіву 2-3 рази, а іноді спостерігається і підвищення білірубину [4].

Більшість вчених вважають, що ВЕБ є рідкісним розладом, і визначають його як хронічне важке захворювання. Загалом, ця інфекція згодом переростає в інфекційний мононуклеоз, як порушення балансу вірусу-господаря, а також дисбалансу Т-хелперів 1 та 2 типу (Th1, Th2).

Також ряд досліджень показали, що ВЕБ пов'язаний з наявністю В-лімфоцитів. Тому що, у дітей з захворюванням Брутона (генетично зумовлений імунодефіцит В-лімфоцитів) розвиток ВЕБ інфекції, яка призводить до інфекційного мононуклеозу – неможливий. Таким чином, в Життєвому циклі ВЕБ В-лімфоцити мають велике значення. Але, треба зазначити, що ВЕБ пов'язаний не тільки з В-лімфоцитами. Вірус Епштейна-Бара може уражати епітеліальні клітини, НК-клітини та макрофаги, які також є незамінними клітинами в імунній системі людини [5].

Не дивлячись на те, що ВЕБ реплікується в основному в епітеліальних клітинах та В-лімфоцитах, але у пацієнтів з посттрансплантаційним лімфопрліферативним синдромом спостерігають

інфікування гепатоцитів ВЕБ. Цей синдром спричинений неконтрольованою проліферацією В-лімфоцитів. Було показано, що спленомегалія пристує у 88% пацієнтів [4].

Цитомегаловірус як і вірус Епштейна-Бара може викликати інфекційний мононуклеоз, який супроводжується гепатитом і спленомегалією.

Цитомегаловірус (ЦМВ) – член сімейства герпетичних вірусів. ЦМВ інфекція людини зазвичай протікає безсимптомно у здорових людей, але може становити серйозну загрозу для пацієнтів з ослабленим імунітетом. Вроджена цитомегаловірусна інфекція може спричинити захворюваність і навіть смерть. Після зараження ЦМВ часто залишається латентним, але може реактивувати в будь-який момент. Це може викликати розвиток патологічного процесу в організмі людини, і зрештою цитомегаловірусна інфекція може викликати фульмінантну печінкову недостатність [6].

ЦМВ може бути реактивованим у пацієнтів із цирозом. Дослідники показали, що ЦМВ сприяє декомпенсації печінки або гострій чи хронічній печінковій недостатності.

У реципієнтів трансплантованої печінки гепатит є найпоширенішим проявом ЦМВ-інфекції. Захворюваність на гепатит без профілактики становить 2,1%. ЦМВ-гепатит проявляється в перші 2-3 місяці після трансплантації печінки і характеризується високою температурою і підвищенням білірубіну і трансаміназ, що без лікування може призвести до печінкової недостатності.

Відомо, що цитомегаловірус здатен викликати важкі порушення регуляції імунної відповіді – імуносупресію. ЦМВ пригнічує здатність інфікованих імунокомпетентних клітин виробляти інтерлейкіни. Це відбувається за рахунок надлишкової продукції простагландинів. Також вірус змінює реакцію клітин-мішеней на ІЛ-1 та ІЛ-2. При цьому відзначається суттєве підвищення синтезу протизапальних цитокінів. В

результаті розвивається вірусіндукована імуносупресія з пригніченням функцій природних кіллерів. Разом з цим може пригнічуватись функціональна активність імунокомпетентних клітин та підвищується чисельність Т-супресорів. Ці процеси і можуть бути наслідком вибіркової дії ЦМВ на імунокомпетентні клітини.

При інфікуванні ЦМВ змінюється вміст цитокінів, які беруть участь в основних імунологічних реакціях. Через такі зміни імунного статусу відбувається формування імунодефіцитного стану у пацієнтів і обтяжують перебіг ЦМВ інфекції. Тому, ЦМВ інфекція відіграє важливу роль в перебігу захворювання і пригніченні переважно клітинного імунітету. У пацієнтів спостерігаються порушення Т-клітин, основних цитокінів, фагоцитів, які відповідальні за міжклітинні взаємозв'язки та клітинний кілінг [4].

1.1.2 Структурно-функціональні особливості печінки та селезінки до тригерних факторів.

Коли відбувається формування імунної відповіді на антигени в селезінці та печінці активуються та перерозподіляються клітинні структури, що має вплив на їх масу, розмір та функції.

Морфологічні зміни в селезінці напряду залежать від можливості імунокомпетентних клітин переміщуватись у відділах селезінки. Відомо, що інфекційні агенти мають здатність змінювати профіль імунокомпетентних клітин. У селезінці відбувається накопичення активованих макрофагів, які експресують рецептори кластера диференціації CD68, також Т-лімфоцити CD-4 та CD-8, В-лімфоцити, NK-клітини. Всі ці клітини в нормі повинні залишати селезінку. Але імунні клітини змінюють свій фенотип і мігрують до селезінки. Селезінка бере участь в утворенні антитіл, активує макрофаги, впливає на диференціацію лімфоїдних клітин, руйнує еритроцити і тромбоцити і тд. Гіперсплазія

розвивається при підвищенні фагоцитарної активності селезінки на базі аутоімунних розладів. Тому селезінка збільшується на основі запалення, яке пов'язане з порушенням роботи імунної системи. Збільшення селезінки може бути причиною гіперспленізму – секвестрація та високе руйнування клітин в клітинній лінії селезінковими макрофагами.

Печінка в свою чергу містить спеціалізовані імунокомпетентні клітини Іто (зірчасті печінкові клітини) та резидентні макрофаги (клітини Купфера). Клітини Іто можуть індукувати розвиток фіброзу печінки, під дією різноманітних зовнішніх факторів. Фібробласти, які активовані, виробляють колаген у надлишку, а клітини Іто, які накопичують ліпіди, перетворюються на міобласти та синтезують колаген. Клітини Купфера виробляють прозапальні цитокіни, які представляють собою чинник апоптозу та аутофагії гепатоцитів на фоні продукування великої кількості активних форм кисню (АФК), у відповідь на пошкодження антигенами [1].

Таким чином, говорячи про аутоімунні захворювання можна виділити – аутоімунний гепатит та гепатоспленомегалію, як симптом гепатиту. Слід зазначити, що на виникнення хвороб та протікання впливають такі тригерні фактори, як інфекції – вірус Епштейна-Бара та цитомегаловірус. Ці два інфекційні агенти впливають на імунну систему подавляючи її, і тим самим можуть стати причинами виникнення аутоімунних захворювань печінки та селезінки.

1.2 Роль лімфоцитів у розвитку аутоімунних захворювань печінки та селезінки

Лімфоцити грають основну роль в імунній системі людини, завдяки тому, що вони можуть впливати на імунні реакції на інфекційні організми або інші антигени [7].

T- і B-лімфоцити беруть участь у набутій або антиген-специфічній імунній відповіді, тому що ці клітини є єдиними в організмі, здатними

розпізнавати всі антигенні епітопи і відповідати на них. В-клітини можуть трансформуватись у плазмоцити і відповідати за вироблення антитіл (АТ). Тому можна стверджувати, що гуморальний імунітет залежить саме від В-лімфоцитів, тоді як клітинний імунітет залежить від Т-лімфоцитів.

Дивлячись на морфологію В- і Т-лімфоцитів їх майже не можливо відрізнити, оскільки обидва типи клітин мають однаковий розмір (діаметр 8-10 мікрон). Кожна з клітин має велике ядро з цільним гетерохроматином, а також цитоплазматичну межу, яка містить достатньо мало мітохондрій, рибосом та лізосом. Коли клітини активуються, вони збільшують в розмірі, збільшуючи кількість цитоплазми та органел. Лімфоцити мають на поверхні рецептори для розпізнавання антигену (АГ) – TCR (рецептор Т-клітин) та BCR (рецептор В-клітин) [8].

1.2.1 Роль Т-лімфоцитів у патогенезі аутоімунних захворювань печінки та селезінки

Як і самі аутоантитіла Т-клітини можуть опосередковувати аутоімунні захворювання печінки та селезінки. Самі Т-клітини можна класифікувати з точки зору їх фенотипових маркерів, транскрипційного контролю та функціональних властивостей. При аутоімунному захворюванні антиген-специфічні клітини – CD4⁺Т-хелпери стимулюють вироблення аутоантитіл В-клітинами. Клітини CD8⁺Т – цитотоксичні та здатні пошкоджувати або приводити до смерті інші клітини. Т-клітини також здатні виробляти фактори циркулюючої проникності, які можуть викликати аутоімунні захворювання.

Загалом, дослідження аутореактивності Т-клітин є досить складним процесом, тому що Т-лімфоцити розпізнають антиген певним способом, а також через різномайття молекул, які закодовані в головному комплексі гістосумісності (МНС) [9].

Також, деякі дослідження вказують, що при аутоімунних захворюваннях печінки та селезінки відбувається порушення компартменту Т-клітин. Т-клітинна лімфопенія дуже часто зустрічається при аутоімунному гепатиті та уражає Т-хелпери разом з цитотоксичними Т-клітинами. Зменшення об'єму компартменту Т-клітини може виникати в результаті: порушення виробництва наївних Т-клітин, через пришвидшене старіння та атрофії тимуса, також через зниженої підмножини пам'яті Т-клітин через секвестрацію та споживання клітин селезінки, що пов'язано з бактеріальною транслокацією, яка виникає як наслідок активації та посилення апоптозу. Крім того, циркулюючі Т-лімфоцити в природніх умовах активуються та показують зменшену проліферативну активність [10].

Tregs (регуляторні Т-клітини) грають визначну роль у підтримці імунної толерантності. Вони здатні пригнічувати ефекторні імунні відповіді. Tregs активно пригнічують проліферацію та активацію потенційно аутореактивних $CD4^+$ Т-клітин і цитотоксичних $CD8^+$ Т-клітин. Такий процес є дуже важливим до самотерпимості. Також клональна делеція аутореактивних лімфоцитів є досить важливим механізмом для підтримування толерантності, але слід сказати, що толерантність не є непероборною, оскільки аутоімунітет можна стимулювати шляхом імунізації організму власними антигенами та ад'ювантами.

При захворюванні печінки Tregs експресують CTLA-4 (глікопротеїн цитотоксичних Т-лімфоцитів), який виступає цільовим геном Foxp3 (регулятор розвитку та функціонування регуляторних Т-лімфоцитів) і екто-АТФази CD39 та CD37. Також Tregs індукуються в середовищах з низькими концентраціями інтерлейкіну 2 (IL-2), який виробляється активованими $CD4^+$ Т- і $CD8^+$ Т-клітинами в запалених тканинах. Через велику експресію афінного IL-2R α (CD25), ці клітини можуть швидко ізолювати IL-2, що призводить до порушення проліферації ефекторних Т-клітин, а також НК-клітин [11].

1.2.2 Роль В-лімфоцитів у патогенезі аутоімунних захворювань печінки та селезінки

Розвиток В-клітин з гемопоетичних стовбурових клітин ініціюється в печінці плоду та підтримується у вигляді регенеративного процесу в кістковому мозку протягом всього життя. Імунні реакції, опосередковані В-клітинами ініціюються за допомогою взаємодії антигену (АГ) з BCR рецептором В-клітин та прямим контактом клітин $CD4^+T$. Зв'язок BCR з АГ та костимулюючими молекулами призводить до активації і проліферації АГ-специфічних клонів В-лімфоцитів, які диференціюються або в плазмобласти, або в В-клітини зародкового центру, які далі дають початок плазматичним клітинам або В-клітинам пам'яті (рис. 1.2.1) [11]

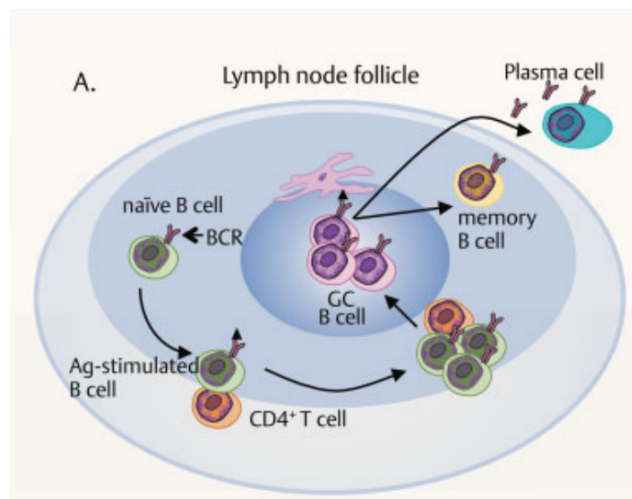


Рис. 1.2.1 Трансформація В-клітин при зв'язуванні BCR з антигеном.

Аутореактивні В-клітини, які генеруються при взаємодії з аутоантигенами можуть сприяти аутоімунітету наступними методами: презентація АГ аутореактивним Т-лімфоцитам, продукція аутоантитіл з утворення комплексу АГ/АТ та подальшою активацією комплементу або фагоцитозом, інгібування регуляторних Т- та В-клітин. Аутоантитіла створюються при більшості аутоімунних захворюваннях та можуть

виконувати функцію біомаркерів захворювання, або навіть безпосередньо сприяти патогенності шляхом антитіло-опосередкованої цитотоксичності або активації комплементу (рис. 1.2.2) [11].

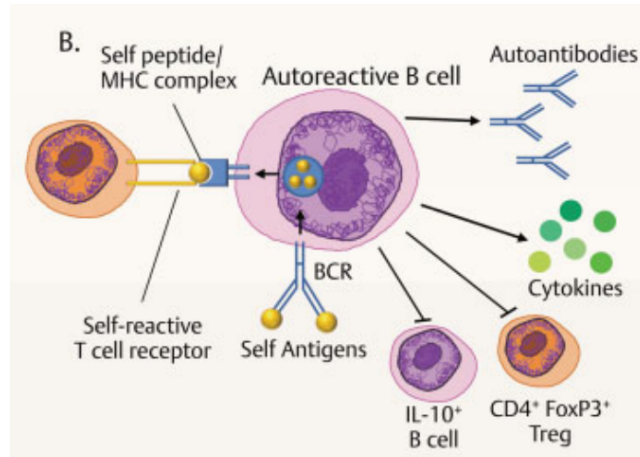


Рис. 1.2.2 Механізми аутореактивності В-клітин.

Недавні результати досліджень продемонстрували, що В-клітини грають ключову роль при аутоімунному гепатиті. Виснаження В-клітин анти-CD20 в мишачій моделі АІГ виконало дві функції: запобігло початок захворювання та покращило перебіг захворювання після його початку. Це може свідчити про вирішальну роль В-лімфоцитів як в індукції, так і в прогресуванні захворювання [3]. При цьому виснаження В-клітин супроводжувалось значним зниженням рівня CD4⁺ та CD8⁺ Т-клітин селезінки.

В-клітини при аутоімунному гепатиті регулюють імунну відповідь шляхом прямого вироблення прозапальних цитокінів. В селезінці та печінці мишиної моделі АІГ було продемонстровано підвищення кількості поліфункціональних В-клітин, які продукують прозапальні цитокіни, такі як інтерферон (IFN- γ) та фактор некрозу пухлини (TNF- α). При цьому відбувається зниження кількості В-клітин, які секретують ІЛ-10. Підвищений рівень фактору активації В-клітин (BAFF) може призвести до розвитку аутореактивних В-лімфоцитів, тим самим стимулюючи

адаптивний імунітет, внаслідок чого виникають аутоімунні захворювання [13].

Отже, проаналізувавши різні літературні джерела та дослідження можна сказати, що лімфоцити відіграють ключову роль у розвитку аутоімунних захворювань печінки та селезінки. Імунологічні аспекти цих захворювань вказують на активну взаємодію між різними підтипами лімфоцитів, що призводить до порушення імунної толерантності та запалення в тканинах органів.

1.3 Роль DAMP при аутоімунних захворюваннях печінки та селезінки

DAMP (молекулярні патерни, пов'язані з пошкодженням) – це ендогенні молекули, які вивільняються в результаті загибелі клітини. Іншими словами, це ендогенні сигнали небезпеки, які походять від імунних клітин, що активовані пошкодженою або некротичною тканиною. Крім активації і реакції вродженого імунітету, DAMP можуть прямо або опосередковано впливати на адаптивні імунні реакції.

Недавні дослідження показали, що деякі DAMP, такі як HMGB1, білок S100 та мітохондральна ДНК (мтДНК) опосередковують запалення і грають надважливу роль в загостренні захворювань [14].

Polly Matzinger була першою, хто запропонував ідею, що окрім PAMP (молекулярні патерни, пов'язані з патогеном), антиген презентуючі клітини (APC) розпізнають і ендогенні молекули, які пов'язані з пошкодженням [15].

Деякі DAMP також можна називати аларміни, цей термін вперше ввів Joost J Oppenheim, для описання групи медіаторів, які вивільняються некротичними клітинами у відповідь на інфекцію або пошкодження, які взаємодіють з поверхневими клітинними рецепторами, тим самим

активує клітини вродженого імунітету, в тому числі і дендритні клітини [16].

1.3.1 Вплив HMGB1 на перебіг аутоімунних захворювань

HMGB1 (білок блоку 1 групи високої мобільності) – є дуже поширеним і консервативним білком, який має важливу біологічну активність як усередині, так і поза клітиною [17]. Загалом цей білок виступає у ролі ферменту, який пов'язується з ДНК і грає ключову роль в реплікації, рекомбінантній транскрипції та трансляції [14].

Але, після активної секреції та пасивного вивільнення позаклітинний HMGB1 зазвичай діє як DAMP. Через відсутність сигнального пептиду білок згортається та не модифікується в плазматичному ретикулумі. HMGB1 може вивільнятися після пошкодження або некрозу клітин, але не після апоптозу. Як наслідок, HMGB1 взаємодіє з декількома імунними рецепторами, зокрема RAGE, TLR2, TLR4 и TLR9. Таким чином, він руйнує патофізіологічний процес різноманітних аутоімунних захворювань, в тому числі і гепатоспленомегалію (рис. 1.3.1) [18].

При аутоімунному ураженні печінки та селезінки, HMGB1 викликає противірусну відповідь інтерферону через TLR4-залежний шлях. І рівні HMGB1 у сироватці крові значно вищі у пацієнтів з аутоімунними захворюваннями, ніж у здорових людей. Крім того, HMGB1 відіграє важливу роль у патогенезі печінкової недостатності у пацієнтів шляхом зниження регуляції експресії Foxp3 та інгібування імунної активності регуляторних Т-клітин [19].

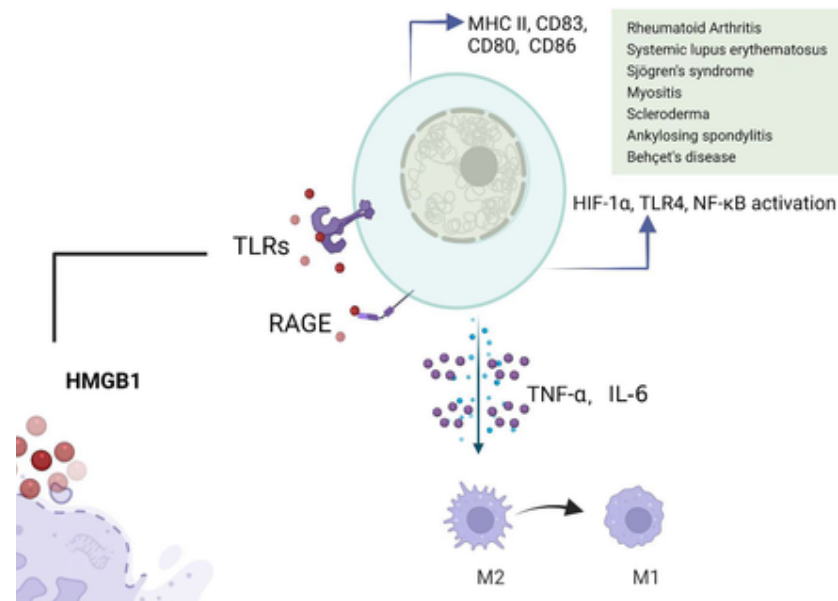


Рис. 1.3.1 Репрезентативні молекулярні структури, пов'язані з HMGB1 при аутоімунних захворюваннях [14]

1.3.2 Вплив АТФ на перебіг аутоімунних захворювань

Аденозинтрифосфат (АТФ) є універсальною молекулою енергії, яка зазвичай знаходиться всередині клітин і виконує важливі метаболічні функції. Однак при клітинному ушкодженні або стресі АТФ може вивільнятися у позаклітинний простір, де вона діє як DAMP і тим самим активує імунну систему, сприяючи розвитку запальних процесів.

При ушкодженні або некрозі клітин печінки або селезінки АТФ вивільняється у позаклітинний простір. Далі відбувається активація P2X7 – рецептори, які виступають іонними каналами. Вони експресуються на імунних клітинах, такі як макрофаги, дендритні клітини та Т-лімфоцити. Зв'язування АТФ з P2X7 рецепторами призводить до активації іонного каналу та надходження іонів кальцію та натрію всередину клітини, при цьому відбувається вихід іонів калію. В результаті утворюється пора, яка веде до секреції прозапальних цитокінів, наприклад інтерлейкін-1β (IL-1β) [20].

Також активація цих рецепторів може стимулювати утворення NLRP3 інфланосом. Інфланосоми – це великі цитозольні мультибілкові комплекси, які збираються у відповідь на певні стимули, які можуть бути пов'язані з інфекцією або стресом, і таким чином призводять до активації запальних реакцій, які опосередковані каспазою-1, в тому числі розщеплення та нетрадиційну секрецію прозапальних цитокінів IL-1 β та IL-18, і початок запальної форми клітин – піроптоз [21].

Загалом, АТФ, яке вивільняється з ушкоджених гепатоцитів, активує P2X7 рецептори на клітинах Купфера та інших імунних клітинах печінки. Це може призвести до секреції прозапальних цитокінів, а значить – до хронічного запалення. Прозапальні цитокіни, вивільнені у відповідь на АТФ, можуть стимулювати презентацію антигенів дендритними клітинами і активацію Т-лімфоцитів, що сприяє аутоімунній відповіді проти гепатоцитів [22].

1.3.3 Вплив білків теплового шоку на перебіг аутоімунних захворювань

Білки теплового шоку (HSP) – родина білків, які виконують багато функцій у клітинах, наприклад, забезпечення правильної конформації білків, запобігання агрегації неправильно згорнутих білків. HSP бере участь у процесах розкладення та відновлення білків. HSP отримали свою назву через те, що їх експресія значно підвищується у відповідь на стресові умови, такі як підвищена температура (тепловий шок) [23].

У відповідь на клітинне ушкодження або стрес, білки теплового шоку вивільняються у позаклітинний простір, і там уже представляють себе як DAMP. Позаклітинні HSP зв'язуються з рецепторами розпізнавання патернів (PPR), в основному з toll-like рецептором 4 (TLR4). При зв'язуванні відбувається активація імунних клітин. Також білки теплового шоку беруть участь у презентації антигенів. Вони допомагають

дентритним клітинам представляти антигени Т-лімфоцитам, що може призвести до аутоімунної відповіді. HSP можуть бути розпізнані як аутоантигени, стимулюючи продукцію аутоантитіл і розвиток аутоімунного гепатиту [24].

1.3.4 Вплив мітохондріальної ДНК та формілпептидів на перебіг аутоімунних захворювань

Мітохондрії мають власну ДНК та білки, які за своєю структурою та функціями нагадують бактеріальні. Через це мітохондріальна ДНК (мтДНК) та формілпептиди можуть виконувати роль DAMP і викликати імунну відповідь, яка схожа на відповідь до патоген-асоційованих молекулярних патернів (PAMP).

Мітохондріальна ДНК є кільцевою, схожою та бактеріальні плазмиди. Вона так само не має гістонів та в неї наявні неметильовані CpG мотиви – це робить її дуже імуногенною.

Коли клітина або мітохондрія зазнає ушкоджень, мтДНК вивільняється у позаклітинний простір. Там вона активує STING – стимулятор генів інтерферону, що призводить в подальшому до продукції інтерферонів 1 типу. Також мтДНК здатна взаємодіяти з toll-like рецепторами, в основному з TLR9, що також призводить до активації імунних клітин та запальної відповіді. Мітохондріальна ДНК активно бере участь у розвитку запальних реакцій шляхом стимуляції продукції прозапальних цитокінів - IL-1 β , TNF- α та IL-6 (рис. 1.3.2) [25].

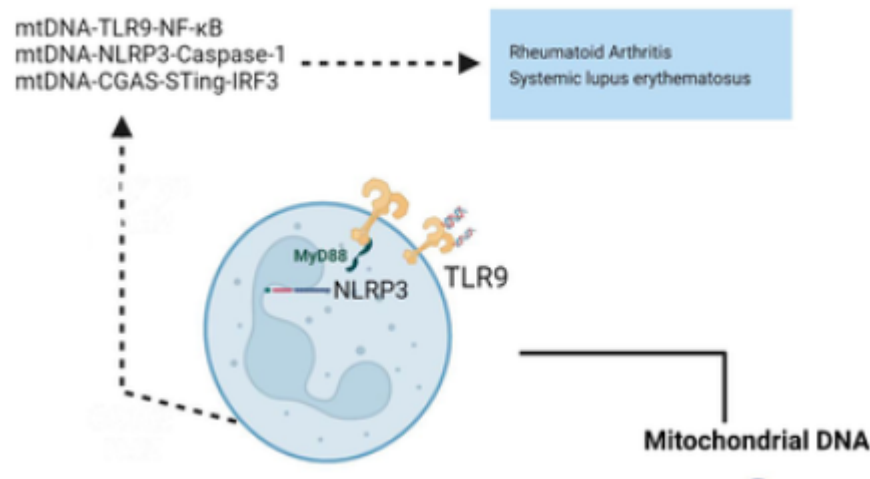


Рис. 1.3.2 Репрезентативні молекулярні структури, пов'язані з мтДНК при аутоімунних захворюваннях [14]

У випадку ушкодження гепатоцитів, вивільнення mtDNA може призводити до активації TLR9 на імунних клітинах, таких як дендритні клітини та макрофаги. Це може спричиняти продукцію цитокінів та активацію адаптивної імунної системи, що веде до аутоімунної атаки на гепатоцити.

Хронічне запалення, викликане мітохондріальними DAMP, може призводити до збільшення селезінки через активацію та проліферацію імунних клітин. Це може сприяти розвитку гіперспленізму, що впливає на кількість тромбоцитів та інших клітин крові [26].

Формілпептиди – короткі пептиди, у яких присутня формільна група на N-кінці молекули. Вони утворюються під час синтезу білків у мітохондріях.

Формілпептиди у позаклітинному просторі розпізнаються спеціальними формілпептидними рецепторами (FPR) на поверхні імунних клітин. Таким чином формілпептиди сприяють активації фагоцитів, посилюючи їх здатність до фагоцитозу та продукції реактивних форм кисню (АФК), що в свою чергу підсилює запалення [27].

Отже, молекулярні патерни, які асоційовані з ушкодженням (DAMP) грають ключову роль у розвитку аутоімунних захворювань печінки та селезінки. Насамперед, ці молекули є сигналами тривоги, які вивільняються з ушкоджених або стресованих клітин, і тому можуть запускати і підтримувати запальні реакції.

Такі DAMP як АТФ, HSP та мітохондральні компоненти мають можливість взаємодіяти з спеціалізованими рецепторами імунної системи (TLR та NLR), сприяючи активації запальних каскадів. Загалом, це сприяє рекрутуванню та активації імунних клітин – макрофаги та дендритні клітини, які активують Т-клітини та сприяють аутоімунній відповіді.

1.4 Роль кластеру диференціації CD25 при аутоімунних ураженнях печінки та селезінки

Кластер диференціації 25 (CD25) – це альфа-ланцюг рецептора інтерлейкіну-2 (IL-2R α). Інтерлейкін-2 (IL-2) є одним з ключових цитокінів, що регулюють ріст, проліферацію та виживання Т-лімфоцитів. IL-2R складається з трьох субодиниць: альфа (CD25), бета (CD122) та гамма (CD132), причому CD25 є визначальним для високої афінності рецептора до IL-2. CD25 грає ключову роль у регуляції імунній відповіді. Цей кластер експресується на поверхні вже активованих Т-лімфоцитів, в тому числі регуляторні Т-клітини (Treg), і є маркером ранішньої активації імунних клітин – лімфоцитів [28].

Treg-клітини грають ключову роль у підтримці імунологічної толерантності, пригнічуючи надмірні та аутоагресивні імунні реакції. Саме висока експресія CD25 на цих клітинах забезпечує їм перевагу в конкуренції за IL-2, який необхідний для їх виживання та функціональної активності. При цьому, недостатність Treg-клітин, які не можуть використовувати IL-2 через знижену експресію CD25 може призвести до недостатнього контролю за аутоагресивними Т-клітинами [29].

Отже, CD25 має велике значення у регуляції імунної відповіді та підтримці імунологічної толерантності. Зниження експресії кластеру диференціації 25 на регуляторних Т-лімфоцитах цілком може бути пов'язане з розвитком аутоімунних захворювань печінки та селезінки.

1.5 Біотехнологічні перспективи в дослідженні аутоімунних захворювань печінки та селезінки

З біотехнологічної точки зору, дослідження проліферативної активності лімфоцитів в культурі, визначення концентрації різних фракцій DAMP та оцінка експресії CD25 при аутоімунних ураженнях печінки та селезінки відкривають багато перспектив та можливостей для біотехнологічних застосувань.

Таргетна терапія – сучасний, основний метод лікування, який спрямований на конкретні молекулярні мішені або шляхи, які можуть бути залучені до патогенезу захворювання. При аутоімунних ураженнях печінки та селезінки таргетна терапія може виступати основним методом лікування патологій, але для цього треба проводити багато досліджень з метою покращення якості проведення даної процедури.

- Дослідження експресії CD25 може допомогти обрати оптимальні молекулярні мішені для розробки моноклональних антитіл або біологічних препаратів. Наприклад, якщо є характерне підвищення експресії кластеру диференціації CD25 на регуляторних Т-лімфоцитах, то необхідно розробити антитіла або препарати, які б блокували спеціалізований рецептор, з метою зниження активності імунної системи [30].
- Дослідження концентрації різних фракцій DAMP може допомогти з'ясувати ключові молекулярні шляхи, які можуть бути залучені до патогенезу аутоімунних захворювань. На основі цього можна розробити терапевтичні малі молекули,

які будуть спрямовані на інгібування та модуляцію цих шляхів, з метою зменшення запалення та активності імунної відповіді [31]

- В свою чергу дослідження молекулярних механізмів, в основі яких лежить вираження CD25 та різноманітних фракцій DAMP, може відкрити шлях до генної терапії. Наприклад, введення генів, які здатні кодувати регуляторні білки або анти-запальні молекули. І це може бути використано для модуляції імунної відповіді та підтримки імунологічної толерантності організму в цілому [32]

Таким чином, таргетна терапія, що базується на впливі на конкретні молекулярні мішені або шляхи, відіграє ключову роль у персоналізованому лікуванні аутоімунних захворювань печінки та селезінки. Ідентифікація нових молекулярних мішеней за допомогою досліджень проліферації лімфоцитів та виявлення різних фракцій DAMP може відкрити нові перспективи для розробки ефективних методів таргетної терапії, які спрямовані на мішені специфічно для певних хвороб.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Проліферативна активність лімфоцитів – важливий показник при аутоімунних ураженнях печінки та селезінки. Вірусні антигени можуть викликати зміну функції Т-лімфоцитів, які здатні через це переміщатись з селезінки в печінку по порталному протоку. Таким чином, можна сказати, що імунні клітини можуть бути основними ланками патологічного процесу при гепатомпленомегалії [33].

Результат руйнування клітин представлений у вигляді різних ендогенних цитотоксичних DAMP на фоні недостатності клітинних факторів вродженого імунітету, а також є причиною зміни функцій імунокомпетентних клітин і тригерним фактором розвитку аутоімунного стану [1].

Кластер диференціації CD25 – є маркером ранньої активації лімфоцитів, тому дослідження експресії CD25 при аутоімунних захворюваннях печінки та селезінки відіграє ключову роль при встановленні патології.

У роботі використовували методи: оцінки проліферативної активності лімфоцитів у культурі *in vitro* за допомогою стимулювання бластної трансформації лімфоцитів з додаванням в культуру мітогену; визначення кластерів диференціювання CD25 на лімфоцитах методом проточної цитофлуориметрії; визначення цитотоксичних фракцій DAMP спектрофотометричним методом.

2.1 Об'єкти дослідження

При дослідженні використовували імунокомпетентні клітини Т-лімфоцитів периферичної крові, сироваткові компоненти крові у пацієнтів із гепатомпленомегалією, тригерними факторами якої були герпетичні віруси – вірус Епштейна-Бар та цитомегаловірус.

2.2 Матеріали дослідження

Гепаринізована кров та сироватка крові пацієнтів з абдомінальною патологією (гепатоспленомегалія) на тлі герпетичної інфекції (вірус Епштейна-Бар ВЕБ та цитомегаловірус ЦМВ) – кількість пацієнтів в групі (n=21).

В якості контрольної групи було взято референтний рівень, який було визначено у лабораторії.

2.3 Методи досліджень

2.3.1 Проліферативна активність лімфоцитів в культурі *in vitro*

При культивування лімфоцитів *in vitro*, було доведено, що в певних умовах нормальні лімфоцити периферичної крові можуть входити в S-період клітинного циклу і перетворюватись на нормобласти. Процес перетворення лімфоцитів на штучному поживному середовищі в різноманітні проміжні форми має назву – реакція бласттрансформації лімфоцитів. Трансформація лімфоцитів з G1-періоду в S-період клітинного циклу може бути індукована специфічним та неспецифічним стимулом.

Стимульована бластна трансформація лімфоцитів з мітогенами (ФГА) характеризує функціональну здатність Т-лімфоцитів до розмноження під дією мітогену. Таким чином, під дією мітогену Т-клітини перетворюються в бласти і діляться, тому можна сказати, що у відповідь на мітогени збільшується кількість Т-клітин.

Для визначення проліферативної активності лімфоцитів в культурі *in vitro*:

1. У стерильні флакони вносили по 4 мл середовища 199 Ігла (солі, амінокислоти, глюкоза, вітаміни групи В,С,Е, бікарбонатний буфер).
2. Далі додавали 0,5 мл інактивованої ембріональної телячої сироватки (джерело факторів росту). Після цього вносили 200 ОД бензилпеніциліну та 100 ОД стрептоміцину з урахуванням на 1 мл середовища 199 Ігла.
3. Потім в обидва флакони додавали зразки досліджуваної периферичної крові, що містить клітини по 0,3-0,5 мл. У контрольний флакон додавали 0,1 мл стерильного 0,9% розчину NaCl.
4. У перший дослідний флакон внесли 100 мкл ФГА (фітогемагглютинін - мітоген) – ФГА+. У другий дослідний флакон ФГА не вносили – ФГА- (рис. 2.1).



Рис. 2.1 Приготування контрольних та досліджуваних (додавання мітогену) зразків

5. Після чого флакони помістили на 72 години в CO₂ інкубатор при температурі 37°C.
6. Потім зняли 3 мл надосадової рідини, осад ресуспендували та перенесли в центрифужні пробірки. Центрифугували 10 хв при 1000 об/хв, після видалили надосадову рідину.

7. В пробірки додали по 5 мл 20% оцтової кислоти, витримали 5 хв та центрифугували 10 хв при 1000 об/хв.
8. Потім надосадову рідину видалили, а осад перенесли на знежирені в суміші Нікіфорова (3:1/етанол:ефір) предметні скельця (рис. 2.2).

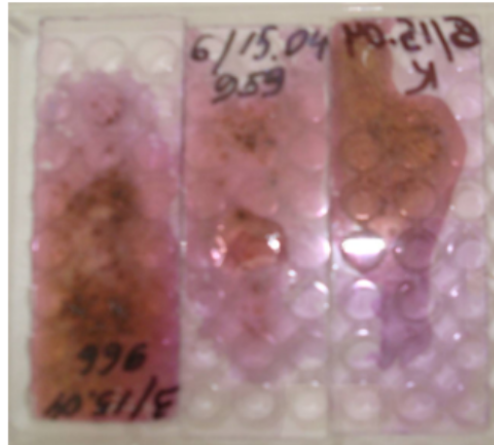


Рис. 2.2 Приготування препаратів для підрахунку трансформованих клітин

9. Після висихання фарбували мазок розчином азур-еозіном по Романовському-Гімза. Після висихання під мікроскопом рахували окремо кількість лімфоцитів та кількість бластів.

2.3.2 Визначення поверхневих антигенів (CD) лімфоцитів

Оцінку експресії кластерів CD25⁺ - маркеру ранньої активації лімфоцитів проводили методом проточної цитофлуориметрії з використанням відповідних моноклональних антитіл та барвника FITC («Beckman Coulter», США).

Основа механізму полягає у поєднанні маркування спецефічних біомаркерів за допомогою моноклональних антитіл, з подальшим аналізом їхньої флуоресценції за допомогою проточної цитофлуориметрії [18].

1. До клітинної суспензії дадали моноклональні антитіла, які здатні специфічно зв'язуватись з CD25, утворюючи комплекс антитіло-антиген.
2. Марковані антитілами клітини проходять через проточний цитофлуориметр. Він використовує лазерний промінь, який спрямовується на кожну клітину в суспензії. Коли клітина проходить через лезер, антитіла, які приєднались до CD25, випромінюють флуоресценцію. Саме її вимірює детектор проточного цитофлуориметра (рис. 2.3).

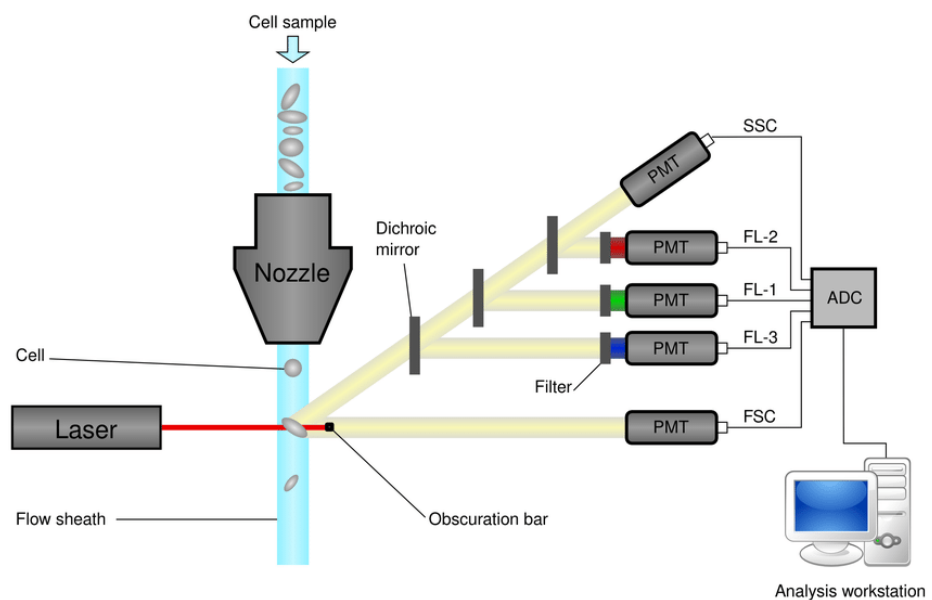


Рис. 2.3 Принцип роботи проточного цитофлуориметра

3. Отримані данні аналізували за допомогою програмного забезпечення **Software Version: CXP 2.2** – програмне забезпечення для аналізу результатів проточної цитофлуориметрії, і відобразили у вигляді діаграм.

2.3.3 Визначення концентрації різних фракцій DAMP

Визначення концентрації різних фракцій DAMP проводили спектрофотометричним методом за допомогою спектрофотометру СФ-46 (рис. 2.4).



Рис. 2.4 Спектрофотометр СФ-46

Суть методу полягає в тому, що молекули DAMP поглинають світло на певних довжинах хвиль, і ця здатність до поглинання пропорційна їх концентрації в зразку. Спектрофотометр дозволяє точно виміряти інтенсивність поглинання і, таким чином, визначити кількісний склад різних фракцій DAMP.

1. У досліджуваній флакон до 1 мл сироватки крові додали 500 мкл 10%-го розчину трихлороцтової кислоти (ТХО).
2. Перенесли в центрифужні пробірки та центрифугували впродовж 30 хвилин при 3000 об/хв.
3. Після центрифугування з проб відібрали по 500 мкл супернатанту та перенесли в окрему пробірку.
4. Додали 4,5 мл дистильованої води і визначали оптичну густину отриманих зразків.
5. За довжини хвилі 238 нм визначали олігопептидну фракцію, за довжини хвилі 260 нм – олігонуклеотидну. Результати оцінювали в умовних одиницях оптичної густини (од. Е).

2.3.4 Статистичні методи

Результати експерименту обробляли в програмі **MS Excel**, в якій будували графіки з урахуванням довірчого інтервалу для характеристики оцінки проліферативної активності, експресії кластера диференціації CD25 та концентрації різних фракцій DAMP порівняно з референтними значеннями. Розраховували середні значення досліджуваних показників, стандартне відхилення та похибку середнього. Достовірність отриманих даних оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

Для з'ясування зв'язку між досліджуваними показниками визначали коефіцієнт кореляції Пірсона за допомогою **MS Excel** побудували графіки кореляції між різними характеристиками.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Визначення проліферативної активності лімфоцитів в культурі *in vitro*

У захисті від вірусних інфекцій формується цитотоксична імунна відповідь. Антигени, у Т-зоні периартеріальних муфт селезінки, мають здатність одночасно презентуватися CD8⁺ та CD4⁺ - клітинам. У цій ділянці селезінки також відбувається проліферативна експансія клонів та диференціювання цитотоксичних Т-лімфоцитів.

Як зазначалось вище, контакт лімфоцитів з чужорідним антигеном або неспецифічним мітогеном супроводжується реакцією бластної трансформації (проліферація клітин, при якій відбувається перехід малих лімфоцитів у бласти, які здатні до поділу та диференціювання).

У результаті проведеної експериментальної роботи, було виявлено, що спонтанна проліферація при наявності тригерного вірусного фактору (ВЕБ/ЦМВ) патологічно перевищує референтні значення. А в присутності мітогенів (ФГА) реакція на індуктор проліферації відсутня.

У групі пацієнтів з гепатоспленомегалією, тригерними факторами якої є герпетичні віруси (ВЕБ/ЦМВ), спонтанна здатність лімфоцитів до проліферації була $17,7 \pm 2,2^*$, при референтних значеннях (РЗ) $9,5 \pm 3,5$, тобто була підвищена щодо РЗ на 86% (рис.3.1), а стимульована складала $30,3 \pm 4,6$, при РЗ $32,5 \pm 2,5$ (рис.3.2), що майже не відрізнялось від контролю (табл. 3.1)

Таблиця 3.1

**Показники проліферативної активності лімфоцитів в культурі
*in vitro***

Досліджувана група	Показники проліферативної активності лімфоцитів в культурі <i>in vitro</i>		
	Спонтанна проліферативна активність, (ФГА-) кількість нормобластів, %	Стимульована проліферативна активність, (ФГА+) кількість нормобластів, %	Індекс стимуляції
Референтні значення	9,5±3,5	32,5±2,5	2,2±0,8
Аутоімунна гепатоспленомегалія	17,7±2,2*	30,3±4,6	0,7±0,04*

Примітка: * - відмінності є достовірними щодо референтних значень ($p \leq 0,05$)

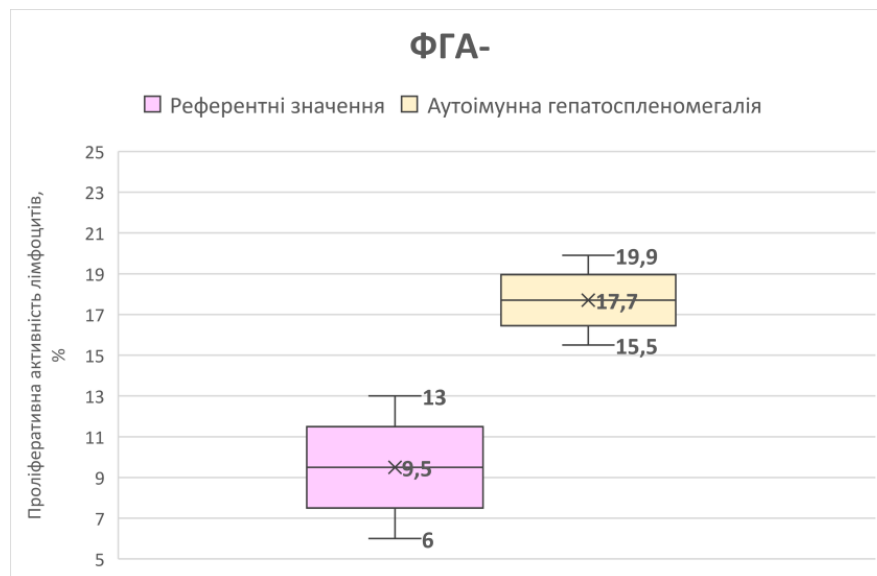


Рис. 3.1 Порівняння активності лімфоцитів у сироватках крові між контрольною групою (референтні значення) та групою пацієнтів з аутоімунною гепатоспленомегалією без додавання до сироватки мітогену (ФГА-). Дані представлені у вигляді діаграми розмахів, де маркер «x» позначає середнє значення, а горизонтальні лінії охоплюють діапазон довірчого інтервалу.



Рис. 3.2 Порівняння активності лімфоцитів у сироватках крові між контрольною групою (референтні значення) та групою пацієнтів з аутоімунною гепатоспленомегалією при додаванні до сироватки мітогену (ФГА+). Дані представлені у вигляді діаграми розмахів, де маркер «х» позначає середнє значення, а горизонтальні лінії охоплюють діапазон довірчого інтервалу.

Таким чином, виявили, що спонтанна проліферація при наявності тригерного вірусного фактору патологічно перевищує референтні значення. А в присутності мітогенів (ФГА) реакція на індуктор проліферації відсутня. Можливо, це пов'язано з тим, що немає нормальної експресії поверхневих рецепторів, які можуть відповідати на зовнішні індуктори проліферації.

3.2 Визначення поверхневих антигенів (CD) лімфоцитів

CD25 кластер диференціювання – важливий маркер ранньої активації лімфоцитів, зокрема Т-лімфоцитів. Загалом, високий рівень експресії CD25 вказує, що відбувається активація імунної відповіді та

відіграє головну роль у регуляції проліферації та диференціації лімфоцитів.

При дослідженні було виявлено, що рівень маркеру ранньої активації Т-лімфоцитів CD25+ становив $2,6 \pm 0,75$ при референтних значеннях $3,5 \pm 0,5$ (табл. 3.2), що знижено порівняно з РЗ на 26% (рис. 3.3).

Таблиця 3.2

Рівень маркеру ранньої активації Т- лімфоцитів CD25+

Досліджувана група	Рівень маркеру ранньої активації Т- лімфоцитів CD25+
Референтні значення	$3,5 \pm 0,5$
Аутоімунна гепатоспленомегалія	$2,6 \pm 0,75$

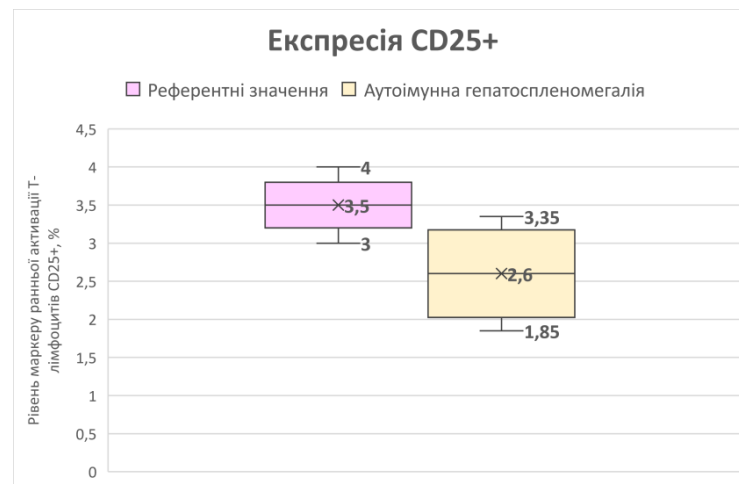


Рис. 3.3 Порівняння експресії CD25 у сироватках крові між контрольною групою (референтні значення) та групою пацієнтів з аутоімунною гепатоспленомегалією.

На отриманих графіках показано гітування – відбір з усіх лімфоцитів в сироватці крові, тільки тих, які мають на своїй поверхні маркер ранньої активації лімфоцитів CD25+. Таким чином, проточний цитофлуориметр зреагував на 4% від всіх лімфоцитів у групі референтних значень, які мають CD25+ (рис. 3.4).

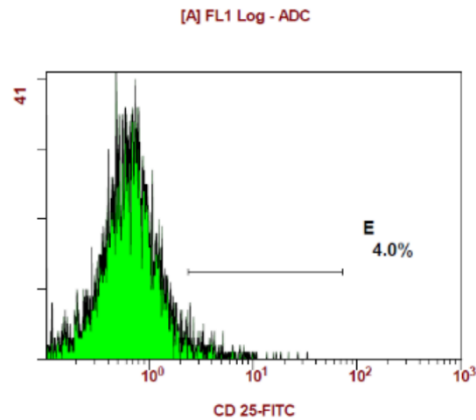


Рис. 3.4 Рівень експресії маркера ранньої активації Т-лімфоцитів CD25+ (референтні значення).

При гепатоспленомегалії на тлі герпетичних вірусів, ми отримали значення 1,6% лімфоцитів, які мають на своїй поверхні маркери ранньої активації лімфоцитів CD25+ (рис. 3.5).

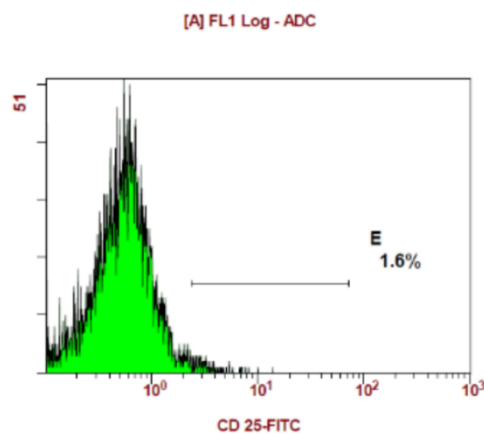


Рис. 3.5 Рівень експресії маркера ранньої активації Т-лімфоцитів CD25+ на тлі герпетичної інфекції.

Регуляторні Т-лімфоцити відповідають за підтримку імунологічної толерантності та запобіганні надмірної імунної відповіді на антигени. Зниження експресії CD25+ може призвести до порушення функцій регуляторних Т-клітин, що може впливати на розвиток аутоімунних патологій [34].

Таким чином, можна зазначити, що зниження експресії кластера диференціювання CD25+ на регуляторних Т-лімфоцитах свідчить про відсутність активності лімфоцитів, тому що CD25+ - маркер ранньої активації лімфоцитів.

3.3 Визначення цитотоксичних фракцій DAMP

Як зазначалось раніше, DAMP – патерни, які вивільняються під час пошкодження або гибелі клітини. Роль цих молекул полягає у їх взаємодії з рецепторами імунної системи – toll-like receptors (TLR) та рецептори типу С-лектину (CLR). Коли DAMP вивільняються, вони активують ці рецептори, в результаті чого спричиняють запалення, проникнення та активацію імунних клітин [35].

У результаті визначення концентрації цитотоксичних фракцій DAMP, було виявлено, що відбувається одночасне достовірне зниження вмісту олігопептидної фракції – $0,52 \pm 0,04$ од. Е при референтних значеннях $0,62 \pm 0,01$ (табл. 3.3), і в цей же час підвищення олігонуклеотидної фракції DAMP - $0,28 \pm 0,01$ од. Е при референтних значеннях $0,24 \pm 0,01$ од. Е (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Цитотоксичні фракції DAMP, од. Е

Досліджувана група	Цитотоксичні фракції DAMP, од. Е	
	Олігопептидна $\lambda=238$	Олігонуклеотидна $\lambda=260$
Референтні значення	$0,62 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,01$
Аутоімунна гепатоспленомегалія	$0,52 \pm 0,04$	$0,28 \pm 0,01$

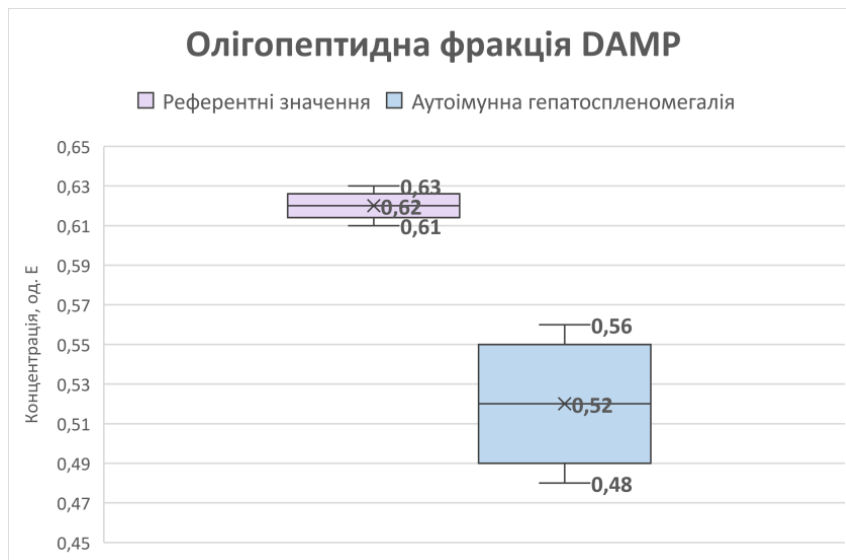


Рис. 3.6 Порівняння концентрації олігопептидної фракції DAMP у сироватках крові між контрольною групою (референтні значення) та групою пацієнтів з аутоімунною гепатоспленомегалією. Дані представлені у вигляді діаграми розмахів, де маркер «x» позначає середнє значення, а горизонтальні лінії охоплюють діапазон довірчого інтервалу.

Тобто, ми спостерігаємо, що при аутоімунній гепатоспленомегалії відбувається достовірне зниження концентрації олігопептидної фракції DAMP на 16% порівняно з референтними значеннями (рис. 3.6).

При аутоімунній гепатоспленомегалії ми виявили достовірне збільшення олігонуклеотидної фракції DAMP порівняно з референтними значеннями на 17% (рис. 3.7).

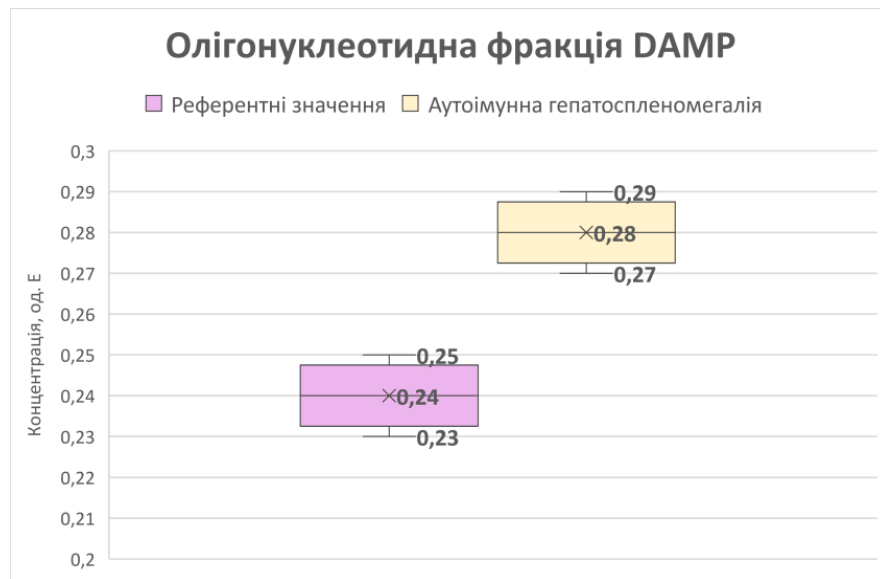


Рис. 3.7 Порівняння концентрації олігонуклеотидної фракції DAMP у сироватках крові між контрольною групою (референтні значення) та групою пацієнтів з аутоімунною гепатоспленомегалією.

Наявність зниження вмісту олігопептидної фракції DAMP та одночасне достовірне підвищення олігонуклеотидної фракції у пацієнтів з аутоімунною гепатоспленомегалією може вказувати на комплексний дисбаланс в системі сигналізації запалення.

Зниження рівня олігопептидної фракції DAMP цілком може бути пов'язане з послабленням впливу молекулярних сигналів, які розпізнаються імунною системою. Це може говорити про певні відхилення у механізмах розпізнавання та передачі сигналів запалення при гепатоспленомегалії.

Тоді як підвищений рівень олігонуклеотидної фракції DAMP може свідчити про активність нуклеїнових кислот, які в свою чергу можуть викликати запалення та аутоімунну відповідь організму. Це може бути наслідком пошкодження тканин або випадкового вивільнення клітинними елементами внаслідок патологічних процесів, які відбуваються при аутоімунній гепатоспленомегалії [36].

Таким чином, одночасне достовірне зниження олігопептидних фракцій DAMP та підвищення олігонуклеотидних фракцій, можуть бути сигналами про важливі функціональні порушення у системі сигналізації запалення, які в свою чергу, можуть мати великий вплив на розвиток аутоімунної гепатоспленомегалії.

3.4 Оцінка кореляційної взаємодії змінами концентрації різних фракцій DAMP та проліферативною активністю лімфоцитів

Дослідження взаємозв'язку між різними показниками сироватки крові у пацієнтів з гепатоспленомегалією на фоні герпетичної інфекції привело до важливого висновку щодо кореляції між проліферативною активністю лімфоцитів та DAMP (олігонуклеотидної фракції при $\lambda=260$ нм) (рис. 3.8).

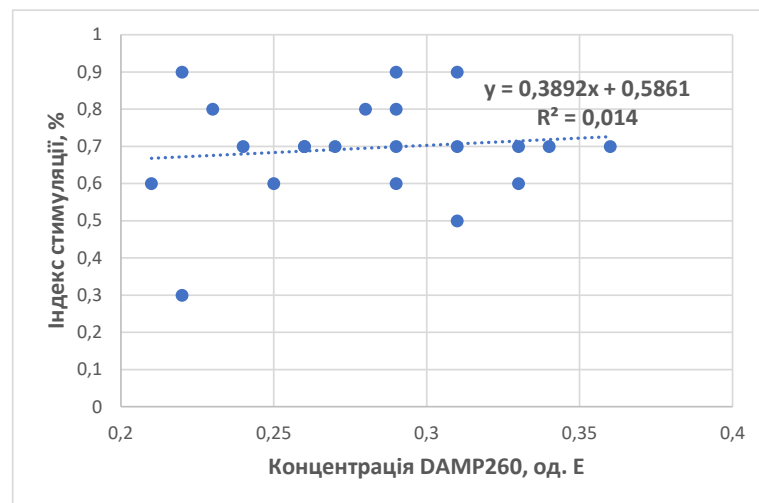


Рис. 3.8 Графік демонструє лінійну залежність проліферативної активності лімфоцитів від концентрації олігонуклеотидної фракції DAMP.

За результатами аналізу було виявлено, що коефіцієнт кореляції Пірсона становить лише 0,12. Це свідчить про те, що немає достатньої емпіричної підстави вважати цю взаємозв'язок статистично значущим. Такі результати вказують на те, що проліферативна активність лімфоцитів

не є значущим показником для визначення концентрації DAMP ($\lambda=260$) у даній групі пацієнтів.

При дослідженні кореляційної оцінки між проліферативною активністю лімфоцитів та концентрацією олігопептидної фракції DAMP (при $\lambda=238$ нм). Було отримано коефіцієнт кореляції Пірсона = 0,11 (рис. 3.9).

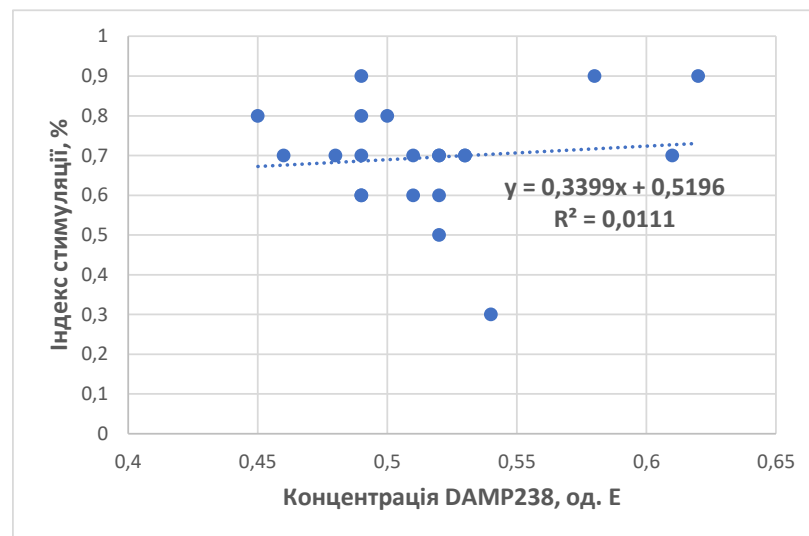


Рис. 3.9 Графік демонструє лінійну залежність проліферативної активності лімфоцитів від концентрації олігопептидної фракції DAMP

Таким чином, між даними характеристиками не існує статистично значущого зв'язку. Це може бути пов'язано з тим, що ми не володіємо достовірною інформацією щодо походження фракцій. Тому є надважливим вивчення даного питання для встановлення зв'язку між цими характеристиками для подальшого використання для встановлення більш точного діагнозу.

Отже, отримані результати свідчать про те, що методи, використані для цих досліджень грають неабияку роль в розумінні патогенезу аутоімунного ураження печінки та селезінки. Саме за допомогою біотехнології, в тому числі культивуванні лімфоцитів, можна більше дізнатися про причини даних захворювань на молекулярному та

клітинному рівні. Біотехнологічні методи, такі як культура клітин, дозволяють вивчати проліфераційну активність лімфоцитів в контрольованих умовах та досліджувати вплив різних стимулів, таких як антигени, цитокіни або лікарські засоби. Дані методи та результати мають велику перспективу на подальше дослідження задля розробки ефективних та інноваційних методів діагностики та лікування цього захворювання.

ВИСНОВКИ

Таким чином, імунобіотехнології – одна з галузей біотехнології, яка зараз інтенсивно розвивається. Особливе значення в імунній відповіді відіграють лімфоцити, які забезпечують реакції адаптивного імунітету. Саме за допомогою біотехнологічних методів оцінки проліферації лімфоцитів в культурі, визначення поверхневих антигенів (CD) лімфоцитів та визначення концентрації різних фракцій DAMP, можна оцінити стан імунної системи та взаємодію цих факторів при аутоімунних ураженнях печінки та селезінки. Ця тема має подальші перспективи для глибшого розуміння молекулярних механізмів при аутоімунних захворюваннях та розвитку нових біомаркерів.

1. Виявили, що спонтанна проліферація при наявності тригерного вірусного фактору патологічно перевищує референтні значення. А в присутності мітогенів (ФГА) реакція на індуктор проліферації відсутня.
2. Виявили, достовірне пониження експресії кластера CD25 на регуляторних Т-лімфоцитах, що може вказувати на відсутність активності лімфоцитів, тому що CD25 – маркер ранньої активації лімфоцитів.
3. Виявили знижений вміст олігопептидної фракції DAMP и достовірне підвищення вмісту олігонуклеотидної фракції DAMP у пацієнтів з аутоімунною гепатоспленомегалією. Цитотоксична олігонуклеотидна фракція DAMP є основним патогенетичним фактором, який корелює з пригніченням.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Klimova EM, Drozdova LA, Lavinska OV, Sushkov SV, Boyko VV. Causes and Diagnosis of Autoimmune Diseases. IntechOpen. Ed. M. Aribi, 2023. Perspective Chapter: Specific Predictors of the Autoimmune Reactions Formation in Case of Immunocompetent Organs Damage in Patients with Myasthenia Gravis and Hepatosplenomegaly. InTech, London, UK. P. 1-35. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.1002972/> (дата звернення: 6.05.2024).
2. Horst, A. K., Kumashie, K. G., Neumann, K., Diehl, L., & Tiegs, G. Antigen presentation, autoantibody production, and therapeutic targets in autoimmune liver disease //Cellular & molecular immunology. – 2021. – Т. 18. – №. 1. – С. 92-111. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00568-6> (дата звернення: 6.05.2024).
3. Cisneros-Herreros J. M., Herrero-Romero M. Hepatitis por virus del grupo herpes //Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica. – 2006. – Т. 24. – №. 6. – С. 392-398. DOI: <https://doi.org/10.1157/13089695> (дата звернення: 6.05.2024).
4. Leonardsson, H., Hreinsson, J. P., Löve, A., & Björnsson, E. S. Hepatitis due to Epstein–Barr virus and cytomegalovirus: clinical features and outcomes //Scandinavian Journal of Gastroenterology. – 2017. – Т. 52. – №. 8. – С. 893-897. DOI: <https://doi.org/10.1080/00365521.2017.1319972> (дата звернення: 8.05.2024).
5. Gupta M., Shorman M. Cytomegalovirus. – 2017. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459185/> (дата звернення: 8.05.2024).
6. Orakpoghenor, O., Avazi, D. O., Markus, T. P., & Olaolu, O. Lymphocytes: a brief review //SCIRES Lit. – 2019. – Т. 3. – №. 1. – С. 5-8. (дата звернення: 09.05.2024).
7. Cano R. L. E., Lopera H. D. E. Introduction to T and B lymphocytes //Autoimmunity: from bench to bedside [Internet]. – El Rosario University Press, 2013. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459471/> (дата звернення: 09.05.2024).
8. Pisetsky, D.S. Pathogenesis of autoimmune disease. Nat Rev Nephrol 19, 509–524 (2023). URL: <https://doi.org/10.1038/s41581-023-00720-1> (дата звернення: 10.05.2024)

9. Albillos A., Lario M., Álvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance //Journal of hepatology. – 2014. – Т. 61. – №. 6. – С. 1385-1396. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.08.010> (дата звернення: 10.05.2024).
10. Taylor S. A., Assis D. N., Mack C. L. The contribution of B cells in autoimmune liver diseases //Seminars in liver disease. – Thieme Medical Publishers, 2019. – Т. 39. – №. 04. – С. 422-431. DOI: <https://doi.org/10.1055/s.0039.1688751> (дата звернення: 12.05.2024).
11. Béland, K., Marceau, G., Labardy, A., Bourbonnais, S., & Alvarez, F. Depletion of B cells induces remission of autoimmune hepatitis in mice through reduced antigen presentation and help to T cells //Hepatology. – 2015. – Т. 62. – №. 5. – С. 1511-1523. DOI 10.1002/hep.27991 (дата звернення: 12.05.2024).
12. Moisini I., Davidson A. BAFF: a local and systemic target in autoimmune diseases //Clinical & Experimental Immunology. – 2009. – Т. 158. – №. 2. – С. 155-163. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.04007.x> (дата звернення: 13.05.2024).
13. Klimova, O., Kordon, T., Smachylo, R., Belozorov, I., Vychenko, E., Merezhko, O., & Kudrevych, O. Диференціальна діагностика і корекція метаболічних та імунологічних порушень у хворих з цирозом печінки, ускладненим гепатосленомегалією та портальною гіпертензією //Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2019. – №. 4. DOI: <https://doi.org/10.26565/2617-409X-2019-4-04> (дата звернення: 13.05.2024).
14. Kang, N., Liu, X., Haneef, K., & Liu, W. Old and new damage-associated molecular patterns (DAMPs) in autoimmune diseases //Rheumatology & Autoimmunity. – 2022. – Т. 2. – №. 4. – С. 185-197. DOI: <https://doi.org/10.1002/rai2.12046> (дата звернення: 14.05.2024).
15. Seong S. Y., Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses //Nature Reviews Immunology. – 2004. – Т. 4. – №. 6. – С. 469-478. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri1372> (дата звернення: 15.05.2024).

16. Oppenheim J. J., Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses //Current opinion in immunology. – 2005. – Т. 17. – №. 4. – С. 359-365. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.06.002>
17. Magna M., Pisetsky D. S. The role of HMGB1 in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases //Molecular medicine. – 2014. – Т. 20. – С. 138-146. DOI: <https://doi.org/10.2119/molmed.2013.00164> (дата звернення: 16.05.2024).
18. Pilzweger C., Holdenrieder S. Circulating HMGB1 and RAGE as clinical biomarkers in malignant and autoimmune diseases //Diagnostics. – 2015. – Т. 5. – №. 2. – С. 219-253. DOI: <https://doi.org/10.3390/diagnostics5020219> (дата звернення: 17.05.2024).
19. Chen R, W Hou, Q Zhang, R Kang, XG Fan, D Tang. Emerging role of high-mobility group box 1 (HMGB1) in liver diseases //Molecular medicine. – 2013. – Т. 19. – С. 357-366. DOI: <https://doi.org/10.2119/molmed.2013.00099> (дата звернення: 17.05.2024).
20. S Jiang, Y Zhang, JH Zheng, X Li, YL Yao. Potentiation of hepatic stellate cell activation by extracellular ATP is dependent on P2X7R-mediated NLRP3 inflammasome activation //Pharmacological research. – 2017. – Т. 117. – С. 82-93. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.11.040> (дата звернення: 18.05.2024).
21. Marcel R. de Zoete, Noah W. Palm, Shu Zhu and Richard A. Flavell. Inflammasomes //Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2014. – Т. 6. – №. 12. – С. a016287 DOI: 10.1101/cshperspect.a016287 (дата звернення: 18.05.2024).
22. Wang P., Jia J., Zhang D. Purinergic signalling in liver diseases: Pathological functions and therapeutic opportunities //JHEP Reports. – 2020. – Т. 2. – №. 6. – С. 100165. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100165> (дата звернення: 20.05.2024).
23. Murshid A., Gong J., Calderwood S. K. The role of heat shock proteins in antigen cross presentation //Frontiers in immunology. – 2012. – Т. 3. – С. 20610. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00063> (дата звернення: 20.05.2024).
24. Lang, B. J., Guerrero, M. E., Prince, T. L., Okusha, Y., Bonorino, C., & Calderwood, S. K. The functions and regulation of heat shock proteins; key orchestrators of

- proteostasis and the heat shock response //Archives of toxicology. – 2021. – Т. 95. – №. 6. – С. 1943-1970. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03070-8> (дата звернення: 20.05.2024).
25. Xuan, W., Song, D., Yan, Y., Yang, M., & Sun, Y. A potential role for mitochondrial DNA in the activation of oxidative stress and inflammation in liver disease //Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2020. – Т. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/5835910> (дата звернення: 20.05.2024).
26. Koenig A., Buskiewicz-Koenig I. A. Redox activation of mitochondrial DAMPs and the metabolic consequences for development of autoimmunity //Antioxidants & Redox Signaling. – 2022. – Т. 36. – №. 7-9. – С. 441-461. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2021.0073> (дата звернення: 21.05.2024).
27. Grazioli S., Pugin J. Mitochondrial damage-associated molecular patterns: from inflammatory signaling to human diseases //Frontiers in immunology. – 2018. – Т. 9. – С. 342896. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00832> (дата звернення: 21.05.2024).
28. Bayati, F., Mohammadi, M., Valadi, M., Jamshidi, S., Foma, A. M., & Sharif-Paghaleh, E. The therapeutic potential of regulatory T cells: challenges and opportunities //Frontiers in immunology. – 2021. – Т. 11. – С. 585819. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585819> (дата звернення: 21.05.2024).
29. von Spee-Mayer, C., Siegert, E., Abdirama, D., Rose, A., Klaus, A., Alexander, T., ... & Humrich, J. Y. Low-dose interleukin-2 selectively corrects regulatory T cell defects in patients with systemic lupus erythematosus //Annals of the rheumatic diseases. – 2016. – Т. 75. – №. 7. – С. 1407-1415. DOI: 10.1136/annrheumdis-2015-207776 (дата звернення: 21.05.2024).
30. Zammarchi, F., Havenith, K., Bertelli, F., Vijayakrishnan, B., Chivers, S., & van Berkel, P. H. CD25-targeted antibody–drug conjugate depletes regulatory T cells and eliminates established syngeneic tumors via antitumor immunity //Journal for ImmunoTherapy of Cancer. – 2020. – Т. 8. – №. 2. DOI: 10.1136/jitc-2020-000860 (дата звернення: 22.05.2024).

31. Edner, N. M., Carlesso, G., Rush, J. S., & Walker, L. S. Targeting co-stimulatory molecules in autoimmune disease //Nature Reviews Drug Discovery. – 2020. – Т. 19. – №. 12. – С. 860-883. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0081-9> (дата звернення: 22.05.2024).
32. Cring M. R., Sheffield V. C. Gene therapy and gene correction: targets, progress, and challenges for treating human diseases //Gene therapy. – 2022. – Т. 29. – №. 1. – С. 3-12. DOI: 10.1038/s41434-020-00197-8 (дата звернення: 22.05.2024).
33. Zhang X., Olsen N., Zheng S. G. The progress and prospect of regulatory T cells in autoimmune diseases //Journal of Autoimmunity. – 2020. – Т. 111. – С. 102461. DOI: 10.1016/j.jaut.2020.102461 (дата звернення: 22.05.2024).
34. Land W. G. DAMPs in Organ-Specific Autoimmune Diseases //Damage-Associated Molecular Patterns in Human Diseases: Volume 3: Antigen-Related Disorders. – Cham : Springer International Publishing, 2023. – С. 569-656. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-031-21776-0_8 (дата звернення: 23.05.2024).
35. Ma M., Jiang W., Zhou R. DAMPs and DAMP-sensing receptors in inflammation and diseases //Immunity. – 2024. – Т. 57. – №. 4. – С. 752-771. DOI: 10.1016/j.immuni.2024.03.002 (дата звернення: 23.05.2024).
36. Malek TR, Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. Immunity. 2010 Apr 23;33(2):153-65. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.004. PMID: 20732638; PMCID: PMC2978800. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.08.004 (дата звернення: 23.05.2024).