

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

**Порушення співвідношення субпопуляцій ефекторних імунних клітин
та зміна їх проліферативної активності в культурі *in vitro* при раку
шлунку**

Допущено до захисту
«__»_____2025 р.
Завідуючий
кафедрою _____

Кваліфікаційна робота
студента кафедри
Жукової Катерини Іванівни

Оцінка «_____»
Голова ЕК

«__»_____2025 р.

Науковий керівник:
Доктор біологічних наук,
професорка Клімова Олена
Михайлівна

Харків

2025

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота на тему: «Порушення співвідношення субпопуляцій ефекторних імунних клітин та зміна їх проліферативної активності в культурі ін вітро при раку шлунку».

Робота включає 62 сторінки, використаних джерел – .41

Актуальність роботи полягає у зростанні кількості онкологічних захворювань серед людей похилого віку та в наявних недоліках стандартних методів лікування, які часто не підходять для ослабленого організму. Стандартна хіміо- та променева терапія можуть викликати значні побічні ефекти, знижуючи якість життя пацієнтів та не завжди забезпечуючи стійкий результат.

У зв'язку з цим особливої уваги потребує розробка нових, більш м'яких і водночас ефективних підходів, які активують імунну відповідь без шкоди для здорових тканин. Для підвищення ефективності лікування необхідно вивчити механізми розвитку онкологічних клітин, зокрема: імунну евакуацію, імуносупресію, гетерогенність пухлинного мікросередовища, а також порушення апоптозу та регуляції клітинного циклу.

Дослідження порушень імунорезистентності є ключовим етапом у розробці персоніфікованих методів ад'ювантної та неoad'ювантної імункорекції, оскільки саме ці порушення визначають характер взаємодії між пухлиною та імунною системою. Ад'ювантна терапія дозволяє враховувати індивідуальні особливості пацієнта, його імунний статус та тип пухлини, що сприяє підвищенню ефективності лікування і зменшенню побічних ефектів.

Персоналізований підхід може значно підвищити шанси на повне одужання, а також знизити ризик рецидиву захворювання. У контексті цього особливо перспективним є застосування біотехнологічних препаратів, які можуть модулювати імунну відповідь залежно від індивідуальних особливостей пацієнта: моноклональних антитіл та цитокінів.

Такий підхід відповідає сучасним тенденціям медицини, спрямованим на розвиток персоналізованих методів лікування, які забезпечують максимальний терапевтичний ефект і покращують прогноз пацієнтів.

Метою роботи є оцінити групи пацієнтів, в яких є різноспрямовані зміни співвідношення субпопуляцій CD4⁺ і CD8⁺ та виявити активацію проліферації імунних клітин в культурі для вибору персоналізованої корекції за допомогою інгібіторів та активаторів імунокомпетентних клітин.

Ключові слова: адьювантна терапія, CD4⁺ Т-хелпери, CD8⁺ Т-кілери, моноклональні антитіла, інгібітори контрольних точок, інгібітори циклінзалежних кіназ.

ANNOTATION

Qualification Thesis on the Topic: "Disruption of the Subpopulation Ratio of Effector Immune Cells and Changes in Their Proliferative Activity in In Vitro Culture in Gastric Cancer"

The thesis comprises 62 pages and references 41 sources.

The relevance of this study lies in the increasing incidence of oncological diseases among the elderly and the limitations of standard treatment methods, which are often unsuitable for weakened patients. Conventional chemotherapy and radiotherapy may cause significant side effects, reducing patients' quality of life and not always ensuring a lasting therapeutic outcome.

In this regard, the development of new, milder yet effective therapeutic strategies that stimulate immune responses without harming healthy tissues requires particular attention. To improve treatment outcomes, it is crucial to investigate the mechanisms of cancer cell progression, including immune evasion, immunosuppression, tumor microenvironment heterogeneity, and disruptions in apoptosis and cell cycle regulation.

Research into immune resistance disorders is a key step in developing personalized approaches to adjuvant and neoadjuvant immunocorrection, as these disorders determine the nature of interaction between the tumor and the immune system. Adjuvant therapy enables the consideration of individual patient characteristics, their immune status, and tumor type, which increases the effectiveness of treatment and reduces side effects.

A personalized approach can significantly enhance the chances of full recovery and reduce the risk of disease recurrence. In this context, the use of biotechnological agents, such as monoclonal antibodies and cytokines, capable of

modulating the immune response based on the individual patient's characteristics, appears especially promising.

This approach aligns with modern medical trends focused on the development of personalized therapies that provide maximum therapeutic benefit and improve patient outcomes.

The aim of this study is to assess patient groups with divergent shifts in the CD4⁺ to CD8⁺ T-cell subpopulation ratio and to identify immune cell proliferation activation in culture, with the goal of selecting a personalized correction strategy using inhibitors and activators of immunocompetent cells.

Keywords: adjuvant therapy, CD4⁺ T-helpers, CD8⁺ T-killers, monoclonal antibodies, immune checkpoint inhibitors, cyclin-dependent kinase inhibitors.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ANNOTATION.....	4
ЗМІСТ.....	6
ВСТУП.....	9
Розділ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	11
1.1 Виникнення онкологічних клітин в організмі.....	11
1.1.1 Активація проонкогенів	13
1.1.2 Інактивація генів-супресорів пухлин.....	14
1.1.3 Транскрипційні фактори та епігенетичні механізми у розвитку раку....	16
1.2 Порухення функції Т лімфоцитів.....	18
1.2.1 Взаємодія PD-1 та PD-L1.....	19
1.2.2 Підтримання пухлиною стану виснаження Т клітин через сигналізацію ПД1.....	21
1.2.3 Сигналізація CTLA-4 у Т-клітинах.....	22
1.3 Методи адьювантної терапії при онкології.....	24
1.4 Механізми впливу моноклональних антитіл на ракові клітини.....	27
1.4.1 Блокування сигнальних шляхів в клітині.....	31
1.4.2 Активування системи комплементу.....	32
1.4.3 Дія антитілозалежної клітинної цитотоксичності.....	32
1.4.4 Антитілозалежний клітинний фагоцитоз	33
1.4.5 кон'югат антитіло-ліки (ADC).....	34

1.4.6 Використання моноклональних антитіл для контролю імунних точок....	35
1.5 Роль циклічно-залежних кіназ у регуляції клітинного циклу та їх порушення при онкологічних захворюваннях.....	38
1.5.1 Інгібітори циклін-залежних кіназ.....	39
Розділ 2. МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ.....	42
2.1. Визначення проліферативної активності лейкоцитів <i>in vitro</i>	42
2.2 Мікроскопічний аналіз лімфоцитів та визначення мітотичного індексу....	43
2.3. Градієнтна сепарація мононуклеарних клітин периферичної крові.....	44
2.4. Визначення субпопуляцій Т-лімфоцитів методом проточної цитофлуориметрії.....	45
2.5. Статистична обробка результатів.....	46
Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	47
3.1. Визначення проліферативної активності лімфоцитів <i>in vitro</i>	47
3.1.1. Визначення проліферативної активності лімфоцитів <i>in vitro</i> без додавання мітогену.....	48
3.1.2. Визначення проліферативної активності лімфоцитів <i>in vitro</i> під дією мітогену фітогемаглютиніну.....	50
3.2. Визначення субпопуляцій Т-лімфоцитів методом проточної цитофлуориметрії.....	51
3.3 Обговорення.....	53

ВИСНОВКИ.....	56
СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....	57

ВСТУП

Виникнення раку суттєво варіюється залежно від віку, статі, соціально-економічного статусу (СЕС), раси/етнічної приналежності, географічного розташування та періоду часу. Ці варіації надають вагомі докази того, що значна частина раку спричинена факторами навколишнього середовища та потенційно її можна уникнути [1].

Захворюваність та смертність – це два часто використовувані показники поширеності раку. Сьогодні рак є однією з найпоширеніших і найбільш відомих хвороб у світі. Особливо часто він вражає людей похилого віку та осіб зі зниженим імунітетом. Незважаючи на значний прогрес у сфері онкології за останні десятиліття, лікування раку досі залишається складним і не завжди ефективним. Це пов'язано з високою гетерогенністю пухлин, складністю їх повного знищення, а також із тим, що не всі пацієнти здатні витримати тривале та агресивне лікування. [1] Крім того, існуючі методи не завжди гарантують повне усунення всіх онкологічних клітин.

Ад'ювантна терапія — це вид додаткового лікування, який застосовується після основного втручання, такого як хірургічне видалення пухлини, хіміо- або променева терапія. Її метою є знищення залишкових ракових клітин і зниження ризику рецидиву захворювання. Цей метод є менш токсичним для організму, що особливо важливо для пацієнтів зі слабким імунітетом.

Одним із перспективних підходів в ад'ювантному лікуванні є використання моноклональних антитіл, які здатні активувати імунну відповідь організму, спрямовану на знищення ракових клітин. Вони можуть не лише усунути пухлинні клітини, що залишилися після основного лікування, але й запобігти повторному розвитку хвороби.

Крім того, ад'ювантна терапія має персоналізований характер: вона підбирається індивідуально, з урахуванням імунного статусу пацієнта, типу пухлини та інших біологічних особливостей. Сучасна онкологія активно переходить до персоналізованої медицини, що враховує генетичні мутації, рівень PD-L1, кількість TILs (tumor-infiltrating lymphocytes) тощо.

Завдяки цьому вона є більш ефективною та безпечною, ніж універсальні схеми лікування. Таким чином, використання ад'ювантної терапії з включенням моноклональних антитіл відкриває нові перспективи в онкологічному лікуванні,

Розділ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Виникнення онкологічних клітин в організмі

Протягом останнього десятиліття завдяки секвенуванню всього геному здорових та пухлинних тканин стало можливим детально вивчити, як клітини нашого організму поступово накопичують мутації під впливом різноманітних мутагенних процесів. Аналіз профілів мутацій, заснований на типах змінених основ і їхньому контексті, виявив численні сигнатури, які відображають минулий вплив зовнішніх та внутрішніх факторів.

Серед найпоширеніших мутагенів — хімічні речовини, що здатні викликати пошкодження ДНК, такі як поліциклічні ароматичні вуглеводні, нітрозаміни, алкілюючі агенти, а також радіаційне випромінювання (ультрафіолетове, рентгенівське). Хіміотерапевтичні препарати, які використовуються для лікування раку, хоч і спрямовані на знищення пухлинних клітин, також можуть викликати додаткові мутації, що підвищує ризик розвитку вторинних неоплазій[2]. Крім того, генотоксичні кишкові бактерії, наприклад, деякі штами *Escherichia coli*, продукують токсини, що викликають подвійні розриви в ДНК, що може сприяти канцерогенезу в кишечнику. Також останнім часом є актуальним вивчення впливу вірусів на процес онкогенезу, в тому числі SARS-CoV-2.

Ендогенні фактори, такі як реактивні форми кисню, помилки реплікації ДНК, а також дефекти систем репарації, також сприяють накопиченню мутацій. Ці процеси можуть комбінуватися з впливом зовнішніх мутагенів, формуючи складні сигнатури, що характерні для певних типів пухлин.

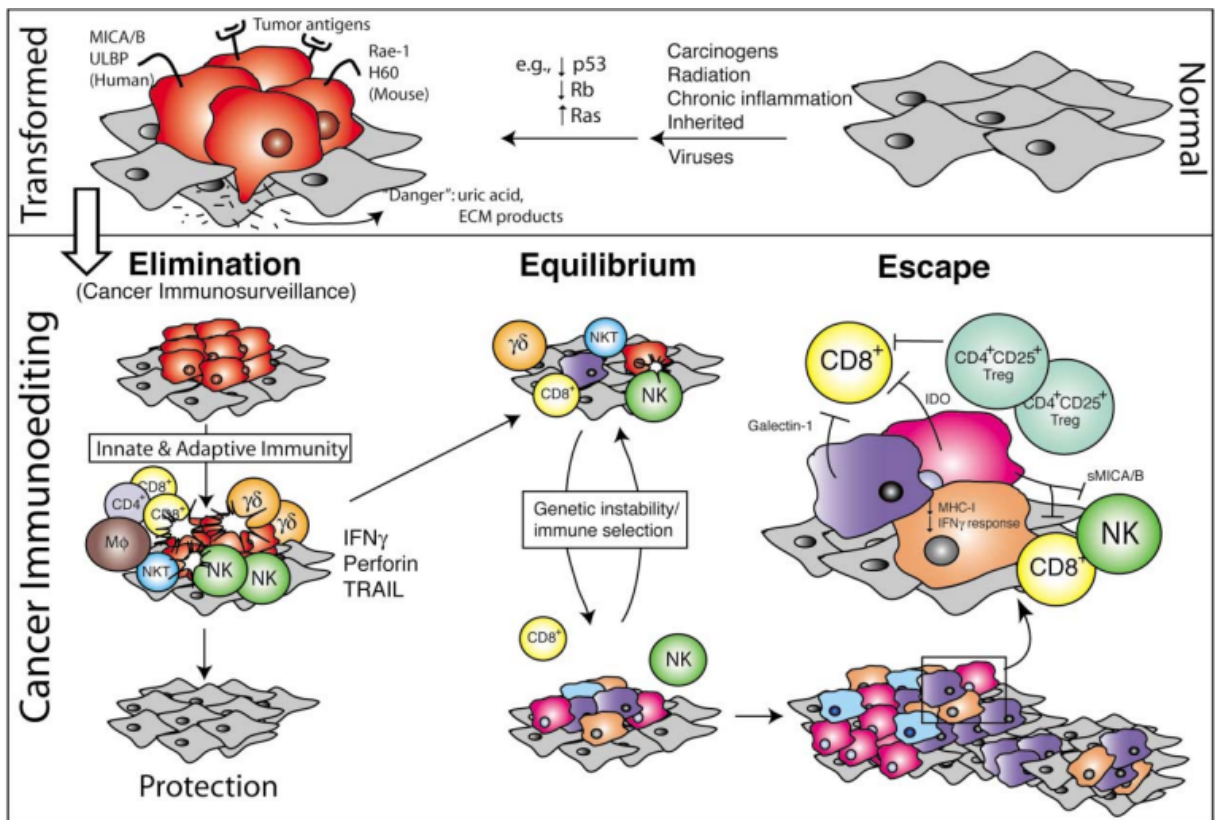


Рис. 1. Три фази процесу імуномодування раку. Нормальні клітини (сірі), що піддаються впливу звичайних онкогенних стимулів, зрештою зазнають трансформації та стають пухлинними клітинами (червоні) (угорі). Навіть на ранніх стадіях онкогенезу ці клітини можуть експресувати різні пухлиноспецифічні маркери та генерувати прозапальні сигнали «небезпеки», що ініціюють процес імуномодування раку (вниз). У першій фазі елімінації клітини та молекули вродженого та адаптивного імунітету, які складають мережу імунонагляду за раком, можуть знищити пухлину, що розвивається, та захистити хазяїна від утворення пухлини. Однак, якщо цей процес не є успішним, пухлинні клітини можуть увійти у фазу рівноваги, де вони можуть або хронічно підтримуватися, або імунологічно формуватися імунними «редакторами» для створення нових популяцій варіантів пухлини. Ці варіанти можуть зрештою уникати імунної системи за допомогою різних механізмів та стати клінічно виявленими у фазі втечі[2].

Пухлини часто складаються з різних цитогенетичних клонів, що виникають через вторинні чи третинні генетичні зміни, що призводить до гетерогенності і впливає на клінічну поведінку та реакції на лікування [3]. Наприклад, хронічний мієлолейкоз ініціюється транслокацією t(9;22), що утворює фузійний білок ABL-BCR з підвищеною тирозинкіназною активністю, стимулюючи клітинний ріст і поділ. Пригнічення цієї активності імаїнібом призводить до ремісії, хоча рецидиви пов'язані з мутаціями в ABL, що викликають стійкість до препарату [3].

Генетичні зміни в онкології поділяють на мутації з посиленням функції протоонкогенів та мутації з втратою функції генів-супресорів пухлин, що контролюють ріст клітин і репарацію ДНК [4]. Епігенетична дерегуляція також впливає на аномальну експресію генів, наприклад, мутації ферментів, що модифікують гістонів, спостерігаються у первинній нирково-клітинній карциномі, а некодуючі РНК можуть виступати як онкогени або гени-супресори залежно від контексту [4].

1.1.1 Активація проонкогенів

У нормальній клітині існують протоонкогени — нормальні гени, що контролюють ріст і поділ клітин. Вони можуть перетворюватися на онкогени при мутаціях або порушеннях регуляції. Протоонкогени можуть функціонувати як фактори росту, перетворювачі клітинних сигналів та ядерні фактори транскрипції, беручи участь у передачі сигналів, які запускають ріст клітини або змінюють експресію інших генів у ядрі [5]. Зміни в цих генах, що впливають на контроль їхньої поведінки або структуру білків, проявляються в ракових клітинах як активовані онкогени, які стимулюють розмноження клітин і відіграють ключову роль у патогенезі раку [5]. Фізичні мутації, що призводять до активації протоонкогенів, поділяються на:

- ті, що змінюють структуру білка (наприклад, точкові мутації),
- ті, що викликають порушення регуляції експресії білка.

Приклади: точкові мутації RAS; хромосомні транслокації, що утворюють гібридні гени, як Філадельфійська транслокація BCR-ABL, що виникає при обміні ділянками між 9-ю та 22-ю хромосомами і викликає хронічний мієлолейкоз. Ампліфікація або транслокації, наприклад підсилення експресії MYC під контролем енхансерів імуноглобулінів, сприяють надмірній продукції MYC і стимуляції росту клітин [5].

Конститутивна активація генів факторів росту, наприклад тромбоцитарного фактора росту (PDGF), також сприяє злоякісній трансформації. Онкоген *sis* вірусу саркоми мавп структурно подібний до PDGF- β ланцюга. Надмірна експресія PDGF індукує проліферацію фібробластів із рецепторами PDGF, створюючи аутокринну петлю надмірної стимуляції росту. Блокування PDGF або його рецепторів пригнічує ріст трансформованих клітин [6].

Окрім стимуляції росту, генетичні зміни можуть також призвести до призупинення смерті клітини. Відомо, що при фолікулярних лімфомах та деяких дифузних великоклітинних В-клітинних лімфомах онкоген BCL2 поєднується з ехансерними елементами важкого ланцюга імуноглобуліну, що порушує регуляцію BCL2, гена, який пригнічує апоптоз і дозволяє пухлинним клітинам виживати довше [7].

1.1.2 Інактивація генів-супресорів пухлин

Гени-супресори пухлин — це ключові елементи клітинного механізму контролю, які у нормальних умовах стримують надмірний поділ клітин, ініціюють апоптоз і відповідають за збереження геномної стабільності. Їхня втрата або функціональна інактивація призводить до зниження здатності клітини до саморегуляції, що створює передумови для трансформації нормальної клітини в пухлинну. Гени-супресори пухлин умовно поділяють на дві групи: "Gatekeepers" (сторожі) — регулюють проходження клітин крізь клітинний цикл, і "Caretakers" (доглядачі) — відповідають за підтримання цілісності геному. [8].

На відміну від онкогенів, активація яких посилює проліферацію, порушення функцій генів-супресорів часто зумовлює втрату функції, що призводить до дерегуляції клітинного циклу, зменшення апоптозу, сприяння ангиогенезу та метастазування[9]. Така дисфункція може бути

зумовлена точковими мутаціями, делеціями, а також епігенетичними змінами, зокрема метилуванням промоторів. Ці молекулярні порушення формують аберантні сигнальні шляхи, які підтримують злоякісний фенотип. Зокрема, при різних видах пухлин інактивація таких генів, як TP53, RB1, PTEN, BRCA1/2, чітко асоціюється з агресивним клінічним перебігом, поганим прогнозом та зниженою чутливістю до стандартної терапії[9].

Таблиця 1

Найбільш вивчені гени-супресори пухлин[8].

Ген	Функція	Асоційований рак	Контрольований процес
TP53 (p53)	Транскрипційний фактор	Синдром Лі-Фраумені, >50% всіх пухлин	Відповідь на ушкодження ДНК, апоптоз, зупинка клітинного циклу
RB1 (Rb)	Репресія транскрипції	Ретинобластома	Контроль переходу з G1 у S фазу клітинного циклу
PTEN	Фосфатаза	Синдром Каудена, гліобластома, рак простати	Інгібування PI3K/AKT шляху, контроль росту та виживання клітин
APC	Сигнальний шлях Wnt	Аденоматозний поліпоз кишечника	Деградація β-катеніну, регуляція проліферації
ATM	Сенсор ушкоджень ДНК (протеїнкіназа)	Атаксія-телеангіектазія	Ремонт ДНК, зупинка клітинного циклу при пошкодженні ДНК
BRCA1/2	Репарація ДНК	Рак грудей і яєчників	Гомологічна репарація дволанцюгових розривів ДНК

Ранні методи їх виявлення базувалися на генетичних дослідженнях біалельної інактивації — одна мутація успадковується, інша виникає соматично. Це визначає три основні властивості класичних TSG: вони рецесивні, мутація в одному алелі підвищує ризик пухлини, оскільки для

повної втрати функції потрібна лише одна додаткова мутація, ті самі гени часто втрачають активність у спорадичних пухлинах.

Сьогодні до TSG також належать гени, що інактивуються не шляхом мутацій або делецій, а через епігенетичну тишу, наприклад, метилювання промоторів, або порушення процесів деградації білка, локалізації або транскрипції[8].

1.1.3 Транскрипційні фактори та епігенетичні механізми у розвитку раку

Епігенетика стосується вивчення механізмів, які змінюють експресію генів без зміни послідовності ДНК. Ці механізми є спадковими та оборотними, включають метилювання ДНК, модифікації гістонів та малі некодуючі мікроРНК (міРНК). Їх порушення може призвести до зміненої функції генів та злоякісної трансформації клітин. Аберації епігенетичних модифікацій зазвичай виникають на ранніх стадіях розвитку пухлини й відіграють ключову роль у прогресуванні раку.

De novo метилювання ДНК у CpG-острівцях, пов'язаних з промоторами, відбувається при раку та старінні, спричиняючи заглушення генів. Це метилювання не випадкове — воно торкається промоторів, зазвичай позначених полікомб-комплексами. Хоча механізми цього процесу ще не до кінця зрозумілі, доведено, що зв'язування РНК-полімерази II з промоторами може захищати CpG-острівці від метилювання, незалежно від активності транскрипції. У багатьох пухлинах супресори пухлин виявляються метильованими, що має діагностичне значення. Профілювання метилювання ДНК активно впроваджується для ранньої діагностики та стадіювання раку. Кількість генів з гіперметилюваними промоторами зростає в процесі онкогенезу, навіть якщо багато з них не є активними у нормальних тканинах [10].

Модифікації гістонів впливають на структуру хроматину — комплексу ДНК з білками, що формує нуклеосоми. Посттрансляційні модифікації (ацетилювання, метилювання, фосфорилування тощо) змінюють доступність генів до транскрипції. Ці процеси регулюються ферментами (ацетилтрансферази, деацетилази, метилтрансферази). Порушення в роботі цих ферментів часто спостерігається в раку, викликаючи аномальну експресію генів — активацію онкогенів або пригнічення генів-супресорів. Наприклад, активні гени мають H3K4me3 і H3K27ac, а неактивні — H3K9me3 та H3K27me3. Зміщення балансу між еухроматином і гетерохроматином сприяє розвитку пухлин [11].

Дисрегуляція miRNA асоціюється з багатьма захворюваннями, зокрема раком. Профілі експресії miRNA використовуються для класифікації пухлин, оскільки вони можуть регулювати понад 60% білок-кодуючих генів і беруть участь у багатьох клітинних процесах [12].

Транскрипційні фактори також задіяні в онкогенезі. У лімфоїдних раках і деяких солідних пухлинах транслокації активують гени транскрипційних факторів. Наприклад, у саркомі Юінга утворення злитих білків EWS із партнерами стимулює транскрипцію пухлинних генів. У раку простати транслокації TMPRSS2 з ETS-факторами (ERG1, ETV1) формують білки, що активують проліферацію і пригнічують апоптоз клітин [7]. Структура хроматину контролюється епігенетичними ферментами, зокрема АТФ-залежними ремоделерами та ферментами, що модифікують N-кінці гістонів — це формує «епігенетичний код», що визначає транскрипційний потенціал [7].

Розуміння ролі факторів росту і сигнальних шляхів у злоякісній трансформації стало основою для розробки цілеспрямованих терапій, зокрема моноклональних антитіл, що інгібують ключові білки патологічних процесів.

1.2 Порушення функції Т лімфоцитів

У гетерогенній пухлинній мікросередовищі Т-клітини становлять значну частину імунного інфільтрату. Вони відіграють ключову роль у розпізнаванні та знищенні пухлинних клітин, беручи участь у формуванні антипухлинної імунної відповіді. Їх можна поділити на аферентні та ефektorні Т-клітини, які виконують дещо різні функції[13].

Аферентні Т-клітини – термін, що зазвичай стосується Т-клітин, які отримують сигнали через Т-клітинний рецептор від антиген-презентуючих клітин (АПК). Аферентні Т-клітини включають наївні та ранні активовані Т-клітини, які перебувають у процесі розпізнавання антигену. Вони відповідають за початкову активацію і ініціювання імунної відповіді. Цей процес полягає у взаємодії між Т-клітинами і АПК, що призводить до клонального розмноження Т-клітин і їх подальшої диференціації у різні функціональні підтипи, включаючи ефektorні та пам'ятні клітини[13].

Ефektorні Т-клітини є основними виконавцями імунної відповіді, вони безпосередньо знищують інфіковані або трансформовані клітини. Ці клітини виділяють цитотоксичні молекули, такі як перфорин і гранзими, які викликають загибель цільових клітин. Після досягнення піку їхнього розмноження і усунення антигену більшість ефektorних Т-клітин гине, однак частина з них переходить у стан пам'ятних клітин, які забезпечують швидку і потужну відповідь при повторній зустрічі з тим самим антигеном[13].

Якщо Т-клітини, які вже мали контакт з антигеном, піддаються хронічній експозиції того самого антигену, можуть відбуватися суттєві зміни в їх активації та диференціації, що призводить до дисфункції або виснаження Т-клітин. Такі дисфункціональні Т-клітини втрачають здатність ефективно виконувати свої захисні функції, зокрема цитотоксичність і

проліферацію, і демонструють підвищену експресію імунних контрольних точок, що є характерною ознакою їх виснаження. Пухлини активно продукують речовини, що призводять до зниження активності Т-клітин і значно зменшує імунну відповідь [14].

Порушення функцій Т-лімфоцитів часто зумовлене активацією специфічних імунних контрольних точок — молекул, які регулюють інтенсивність і тривалість імунної відповіді. У разі хронічної експозиції антигену, наприклад у пухлинному середовищі, ці молекули надмірно експресуються, що веде до функціонального виснаження Т-клітин і зниження їх здатності ефективно боротися з пухлиною.

Контрольні точки не тільки перешкоджають ефективному знищенню пухлинних клітин, але й створюють імуносупресивне середовище, що сприяє прогресуванню раку[14].

1.2.1 Взаємодія PD-1 та PD-L1

Білок запрограмованої смерті 1 (PD-1) та його ліганди PD-L1 і PD-L2 є ключовими молекулами імунних контрольних точок. Взаємодія PD-1 із PD-L1 призводить до пригнічення ефекторних Т-клітин та одночасного посилення функції імуносупресивних регуляторних Т-клітин (Treg), підтримуючи імунний гомеостаз і запобігаючи надмірним імунним реакціям [36]. Проте пухлинні клітини експлуатують вісь PD-1/PD-L1 для уникнення імунного контролю, що сприяє росту та прогресуванню раку(рис. 2). Висока експресія PD-L1 виявлена в різних злоякісних пухлинах, таких як рак легенів, меланома, гліома, рак молочної залози, що формує імуносупресивне мікрооточення пухлини [15].

PD-1 високо експресується на активованих Т- і В-лімфоцитах, НК-клітинах та пухлиноінфільтруючих лімфоцитах. Його експресія динамічно регулюється антигенною стимуляцією, запальними факторами та складом

пухлинного мікрооточення (ТМЕ) [35]. Під час гострої імунної відповіді сигналізація TCR активує енхансери PD-1 (CR-B та CR-C), що веде до тимчасового підвищення експресії PD-1 через дію транскрипційних факторів NF-κB, NFATc1, STAT3/4. При виведенні антигену метилювання енхансерів відновлюється, пригнічуючи транскрипцію PD-1, що забезпечує нормальну імунну пам'ять [16](Рис 2).

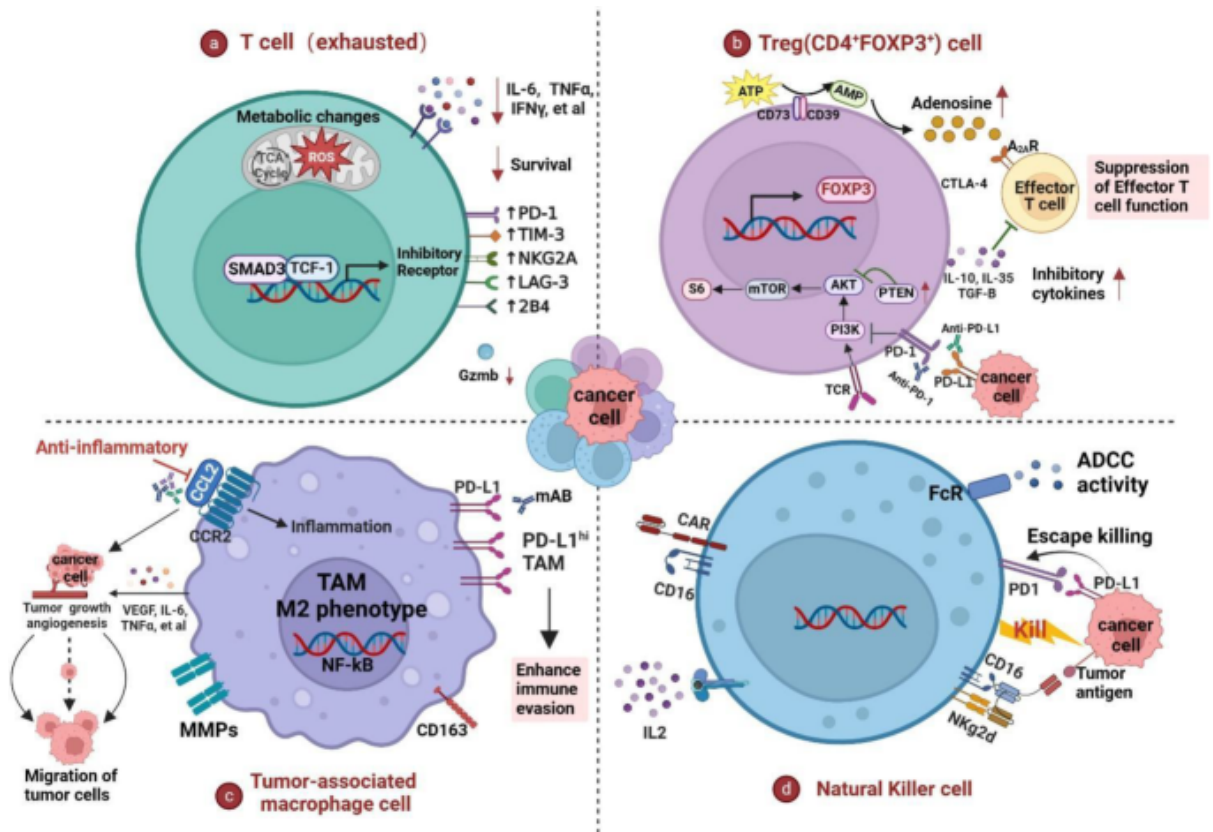


Рис 2: Регуляція сигналізації PD-1/PD-L1 на імунних клітинах. а. Шлях PD-1/PD-L1 сприяє виснаженню та апоптозу ефektorних Т-клітин. Текс-клітини характеризуються підвищеною експресією сильно інгібуючих рецепторів, включаючи PD-1, LAG3 та TIGIT, зниженим виробництвом цитокінів, таких як TNF, IL-2 та IFN-γ, метаболічними змінами та порушенням проліферативної здатності та виживання. б. PD-1/PD-L1 сприяє генерації та розвитку індукованих Treg (iTregs) шляхом зменшення фосфорилування PI3K/Akt/mTOR та S6, одночасно посилюючи PTEN, таким чином посилюючи імуносупресивні функції Treg-клітин та індуюючи імунну толерантність. с. PD-1/PD-L1 може сприяти поляризації пухлинно-асоційованих макрофагів (TAM) у напрямку фенотипу M2, вивільняючи велику кількість фактора росту фібробластів, VEGF, TNF-α та інших цитокінів для стимулювання ангиогенезу та підтримки імуносупресії, інвазії та метастазування ракових клітин, прискорюючи прогресування раку. д. PD-1 на NK-клітинах зв'язується з PD-L1 на ракових клітинах, пригнічуючи дегрануляцію та цитотоксичну функцію NK-клітин, зменшуючи їхню здатність знищувати пухлинні клітини та сприяючи виходу пухлинного імунітету з організму.

Використання інгібіторів PD-1 та PD-L1 може реактивувати протипухлинну імунну відповідь вищезгаданих імунних клітин[15].

У хронічних станах, таких як рак, під впливом мікрооточення імунна регуляція порушується: транскрипційний фактор FoxO1 підтримує високий рівень PD-1, створюючи негативний зворотний зв'язок, а IFN- α через шлях JAK/STAT активує комплекс ISGF3, що підсилює експресію PD-1. Запальний фактор TGF- β 1 підвищує експресію PD-1 і CTLA-4 через кальцій-залежний шлях CaN/NFATc1, індукуючи імунний вихід [15].

Регуляція експресії PD-L1 складна і включає геномні, посттранскрипційні та посттрансляційні механізми, а також вплив канцерогенних сигналів і цитокінів. Підвищена експресія PD-L1 у TME сприяє імуносупресії та пов'язана з поганим прогнозом при раку, що робить PD-L1 важливою терапевтичною мішенню і прогностичним біомаркером.

1.2.2 Підтримання пухлиною стану виснаження Т клітин через сигналізацію PD-1.

Зростаюча кількість досліджень виявила, що пухлини підтримують стан виснаження Т-клітин через сигналізацію PD-1, блокування сигнального шляху PD-1 певною мірою відновлює або змінює активність та імунну функцію виснажених Т-клітин, підвищуючи ефективність імунотерапії раку[16].

при хронічній стимуляції та персистуючій антигенній інфекції цитотоксичні Т-лімфоцити можуть стати дисфункціональними, з порушенням секреції цитокінів, включаючи TNF- α , IFN- γ та IL-2, що призводить до значного збільшення експресії PD-1 на Т-клітинах. Постійно висока експресія PD-1 передаватиме гальмівні сигнали, індукуючи імунну толерантність. Наприклад, підвищена регуляція експресії PD-1 у меланомі сприяє уникненню пухлиною імунного нагляду, захищаючи ріст ракових клітин. У цей час регуляція експресії PD-1 відбувається наступним чином:

стійка сигналізація TCR призводить до незворотного деметилування енансерів PD-1, знімаючи обмеження сигналізації TCR та переводячи PD-1 у стан «неконтрольованої» транскрипційної активації, що ще більше посилює функціональне виснаження Т-клітин та призводить до важкого пригнічення імунітету[16].

Наразі терапія блокування PD-1 застосовується в імунотерапії різних запущених видів раку, включаючи меланому, недрібноклітинний рак легенів та колоректальний рак[15].

Таким чином, PD-L1 широко розглядається як ключовий імунний контрольний пункт, пов'язаний з прогресуванням раку та поганим прогнозом для пацієнтів, і він має широкі клінічні перспективи застосування як прогностичний біомаркер та терапевтична мішень в галузі онкології.

1.2.3 Сигналізація CTLA-4 у Т-клітинах

CTLA-4 – це корецептор Т-клітин, також відомий як CD152. Порівняно з CD28, CTLA-4 має вищу спорідненість зв'язування з молекулами родини B7, включаючи CD80 та CD86, на антигенпрезентуючих клітинах (APC). Хоча CTLA-4 зв'язується з коstimуляторними рецепторами B7, він відіграє негативну роль в активації Т-клітин[17]. CTLA-4 має до них вищу афінність, тому перемагає у цій «конкуренції» й надсилає гальмівний сигнал, який знижує активацію Т-клітин. Окрім цього, CTLA-4 може зменшувати кількість молекул CD80/CD86 на поверхні APC шляхом транс-ендоцитозу — процесу, коли ці молекули буквально «витягуються» з поверхні APC, що ще більше знижує здатність імунної системи активуватись[18]. Після того, як Т-клітинний рецептор (TCR) розпізнає антиген, представлений головним комплексом гістосумісності (МНС) APC, CD28 Т-клітин зв'язується з B7 APC, що ініціює каскад сигналів та призводить до активації Т-клітин. CTLA-4 експресуються та переміщуються до клітинних мембран після активації Т-

клітин, переймають B7 від CD28 та пригнічують активність Т-клітин. Координація CTLA-4 та CD28 підтримує баланс Т-клітинного імунітету в організмі, особливо після інфекції та початку та прогресування аутоімунного захворювання. Однак точний імунорегуляторний механізм CTLA-4 у Т-клітинах є дискусійним[17].

У контексті онкології, пухлини використовують цей механізм для уникнення атаки з боку імунної системи. Щоб подолати це, у клінічній практиці застосовуються моноклональні антитіла, які блокують CTLA-4, наприклад іпілімумаб. Це дозволяє ефektorним Т-клітинам активуватись повноцінно та атакувати пухлинні клітини. Такий підхід використовується при лікуванні меланоми, раку нирки та деяких інших солідних пухлин.

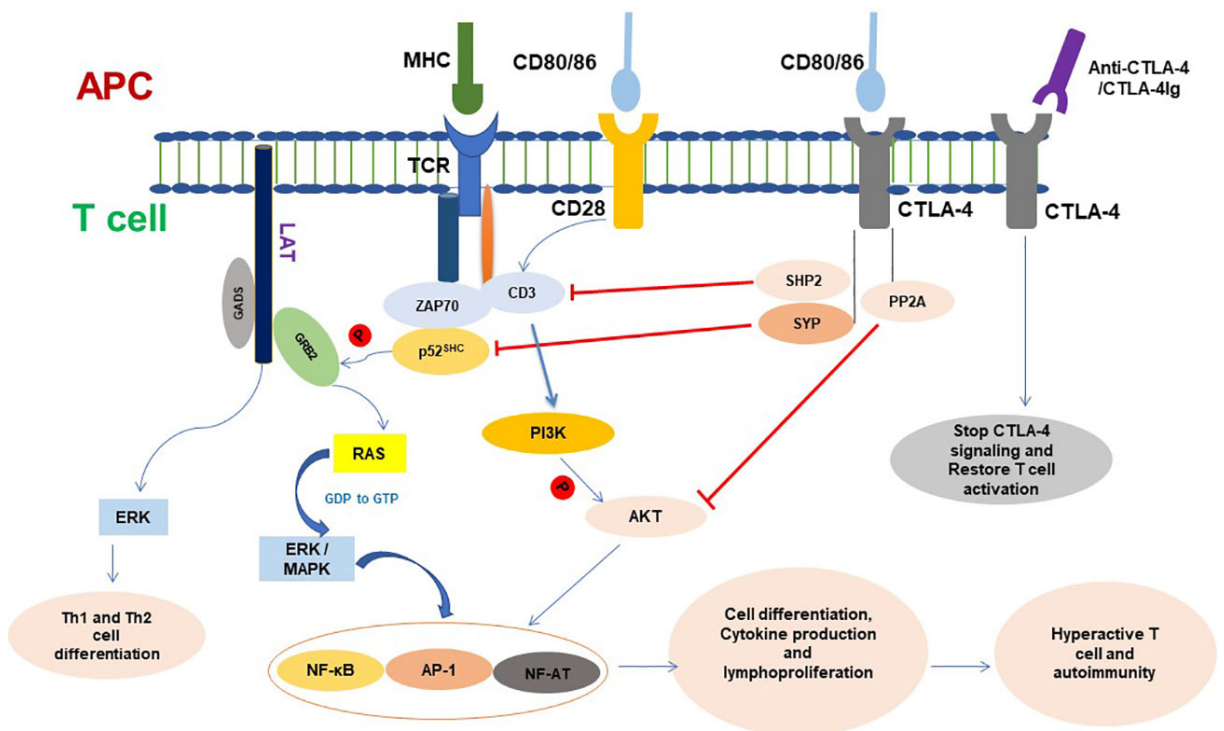


Рис. 3: Сигналізація CTLA-4 у Т-клітинах та її функціонування. CTLA-4 спрямована на різні молекули, щоб пригнічувати активацію та функціонування Т-клітин. Після кон'югації Т-клітина з APC ініціює різну сигналізацію та проліферацію Т-клітин, а також продукує цитокіни. CTLA-4 експресується на поверхні клітин активних Т-клітин та зв'язується з CD80/86. Сигналізація CTLA-4 дефосфорилує сигналізацію TCR та пригнічує сигнальні молекули CD3 та ZAP70, і зрештою пригнічує фосфорилування шляху GRB2 до RAS. CTLA-4 пригнічує фосфорилування та активацію Akt, відіграє негативну роль у регуляції клітинного циклу та пригнічує активацію транскрипційних

факторів ядерного фактора κВ (NF-κB), AP-1 та NF-AT. Лігування CTLA-4-CTLA-4Ig відновлює сигналізацію та функціонування Т-клітин. APC – антигенпрезентуюча клітина; AP-1 – активаторний білок 1; TCR – Т-клітинний рецептор; MHC – головний комплекс гістосумісності; CTLA-4 – цитотоксичний Т-лімфоцитарний антиген 4; SYR, синаптофізин тирозинфосфатази; GRB2, зв'язаний з рецептором фактора росту 2; ZAP70, протеїнкіназа 70, пов'язана з дзета-ланцюгом; NF-AT, ядерний фактор активованих Т-клітин; ERK, позаклітинна сигнально-регульована кіназа; MAPK, мітоген-активована протеїнкіназа; PI3K, фосфатидилінозитол-3-кіназа; PP2A, протеїнфосфатаза 2A[17].

У багатьох випадках інгібітори CTLA-4 комбінуються з інгібіторами PD-1 або PD-L1, що дає потужніший імунний ефект і покращує виживаність пацієнтів. Проте така комбінація підвищує ризик розвитку імуноопосередкованих побічних ефектів, таких як коліт, запалення гіпофіза або шкіряні реакції. Ці побічні ефекти зазвичай є керованими, але потребують регулярного медичного нагляду[18].

1.3 Методи ад'ювантної терапії при онкології

Ад'ювантна терапія використовується для лікування пацієнтів з високим ризиком рецидиву раку після радикального лікування, спрямованого на видалення всіх видимих ознак захворювання. Вважається, що більшість рецидивів зумовлені прихованою мікроскопічною хворобою на момент звернення. Метою лікування є або покращення місцевого контролю пухлини (наприклад, за допомогою променевої терапії), або вплив на мікрометастази за допомогою системної терапії[19]. Як правило, пацієнти проходять операцію з видалення первинної пухлини з подальшою хіміотерапією. Інші форми ад'ювантного лікування включають гормональну терапію, променеву терапію, цільову терапію, та, останнім часом, імунотерапію. Обґрунтуванням раннього системного лікування є його потенціал для лікування мікрометастатичного захворювання. На ранній стадії ракові клітини, ймовірно, більш чутливі до хіміотерапії, оскільки вони містять більшу частку клітин, що діляться. Покращується судинна система для доставки ліків та нижча ймовірність розвитку лікарської резистентності. Після рецидиву більшість пацієнтів із захворюванням солідних органів не

піддаються лікуванню, і метою лікування на цій стадії є паліативне лікування[19].

Існують потенційні переваги у якомога ранньому призначенні ад'ювантної терапії. Коли її призначають перед первинним лікуванням, її називають «неoad'ювантною». Раннє лікування піддає впливу терапії як пухлину, так і потенційні мікрометастази, тим самим уникаючи затримки, спричиненої хірургічним втручанням та одужанням. Чутливість первинної пухлини до препаратів легко оцінити, а зменшення її об'єму може допомогти хірургічному втручання[20]. Наприклад, при лікуванні низького раку прямої кишки передопераційна хіміопроменева терапія допомагає зменшити зачеплену пухлиною частини, що підвищує шанси на успішне хірургічного втручання зі збереженням сфінктера. Місцево-поширені пухлини, які спочатку є неоперабельними, можуть стати резектабельними, тим самим збільшуючи ймовірністьвилікування та зменшуючи ризик місцевого рецидиву[20].

Безліч генетичних та епігенетичних змін, характерних для всіх видів раку, забезпечують різноманітний набір антигенів, які імунна система може використовувати для відмінності пухлинних клітин від їхніх нормальних аналогів. У випадку Т-клітин, кінцева амплітуда та якість відповіді, яка ініціюється через розпізнавання антигену Т-клітинним рецептором (TCR), регулюється балансом між костимуляторними та інгібуючими сигналами (тобто імунними контрольними точками). За нормальних фізіологічних умов імунні контрольні точки мають вирішальне значення для підтримки ауто толерантності (тобто запобігання аутоімунітету), а також для захисту тканин від пошкодження, коли імунна система реагує на патогенну інфекцію[21]. Експресія білків імунних контрольних точок може бути порушена пухлинами як важливий механізм імунної резистентності. Т-клітини були основним фокусом зусиль для терапевтичної маніпуляції ендогенним протипухлинним імунітетом завдяки: їхній здатності до

селективного розпізнавання пептидів, отриманих з білків у всіх клітинних компартментах; їхній здатності безпосередньо розпізнавати та знищувати клітини, що експресують антиген (ефекторними Т-клітинами CD8⁺; також відомими як цитотоксичні Т-лімфоцити (CTL)); та їхню здатність керувати різноманітними імунними реакціями (за допомогою CD4⁺ хелперних Т-клітин), що інтегрує адаптивні та вроджені ефекторні механізми[21]. Таким чином, агоністи костимуляторних рецепторів або антагоністи інгібіторних сигналів (предмет цього огляду), обидва з яких призводять до посилення антигенспецифічних Т-клітинних відповідей, є основними агентами в сучасних клінічних випробуваннях. Т-клітинний імунітет включає кілька послідовних етапів, що включають: клональний відбір антигенспецифічних клітин, їх активацію та проліферацію у вторинних лімфоїдних тканинах, їх транспортування до місць антигену та запалення, виконання прямих ефекторних функцій та надання допомоги (через цитокіни та мембранні ліганди) для безлічі ефекторних імунних клітин. Кожен з цих етапів регулюється врівноваженими стимулюючими та інгібіторними сигналами, які точно налаштовують відповідь. Хоча практично всі інгібіторні сигнали в імунній відповіді зрештою впливають на внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, багато з них ініціюються через мембранні рецептори, ліганди яких є або мембранозв'язаними, або розчинними (цитокіни) [21]. Тому, на відміну від більшості схвалених наразі антитіл для терапії раку, антитіла, що блокують імунні контрольні точки, не спрямовані безпосередньо на пухлинні клітини, а на рецептори лімфоцитів або їх ліганди, щоб посилити ендогенну протипухлинну активність.

Серед найперспективніших підходів до активації терапевтичного протипухлинного імунітету є блокування імунних контрольних точок. Імунні контрольні точки стосуються безлічі гальмівних шляхів, вбудованих в імунну систему, які мають вирішальне значення для підтримки самотолерантності та модуляції тривалості та амплітуди фізіологічних

імунних відповідей у периферичних тканинах з метою мінімізації пошкодження колатеральних тканин. Оскільки багато імунних контрольних точок ініціюються взаємодією ліганд-рецептор, їх можна легко заблокувати антитілами або модулювати рекомбінантними формами лігандів або рецепторів[15].

1.4 Механізми впливу моноклональних антитіл на ракові клітини

За останні три десятиліття моноклональні антитіла (МАТ) вражаюче перетворилися з наукових інструментів на потужні терапевтичні засоби для людини. Після схвалення органами ліцензування химерних, гуманізованих, а потім і повністю людських моноклональних антитіл, кількість антитіл, доступних на ринку для лікування різних захворювань, різко зросла. Станом на березень 2017 року FDA схвалило приблизно 60 терапевтичних МАТ, які наразі оцінюються на різних етапах клінічних випробувань[22]. На даний момент існує декілька методів їх виробництва, серед яких є гібридомна технологія.

Гібридомна технологія — один із найпоширеніших методів виробництва моноклональних антитіл. У процесі В-лімфоцити, що продукують антитіла, виділяють із селезінки мишей після імунізації специфічним антигеном і зливають з безсмертними мієломними клітинами. У результаті утворюються гібридами — клітинні лінії, що поєднують властивості обох клітин: продукцію специфічних антитіл і здатність до необмеженого поділу[23].

Початком процесу утворення гібридом є імунізація тварини (миші) обраним антигеном через серію ін'єкцій. Це стимулює диференціацію В-клітин у плазматичні. Після формування достатнього титру антитіл мишу жертвують, а з селезінки ізолюють активовані В-лімфоцити. Ці клітини зливають із мієломними, попередньо обробленими 8-азагуаніном для деактивації ферменту HGPRT. Злиття відбувається з використанням PEG

або електрозлиттям, утворюючи гібридні клітини — гібридами. Суміш клітин поміщають у НАТ-середовище, де: аміноптерин блокує синтез нуклеотидів *de novo*; виживають лише клітини з активним HGPRT, тобто гібридами. Скринінг проводять за допомогою ELISA або проточної цитометрії для виявлення продукції антитіл[23].

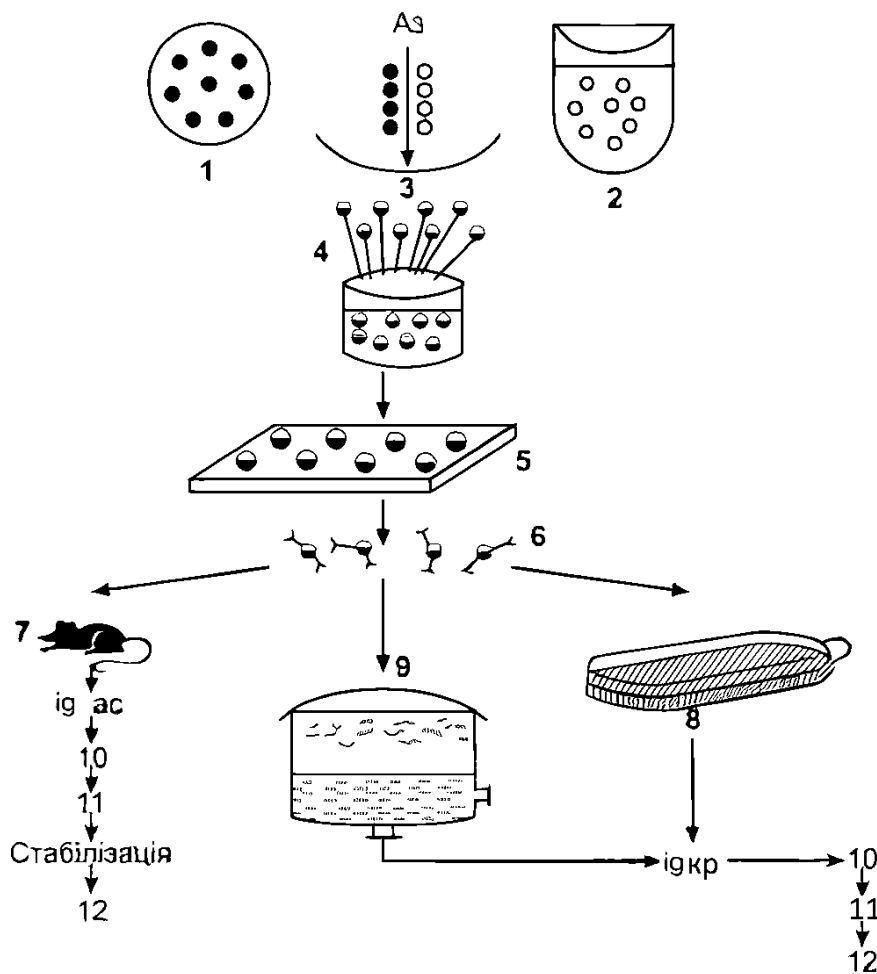


Рис. 4: отримання моноклональних антитіл гібридомним методом. Етапи утворення гібридом: АЗ - агент злиття клітин; 1 - В-клітини із селезінки імунної миші; 2 - культура мієломних клітин миші; 3 - гібридизація; 4 - гібридами; 5 - селекція і клонування гібридом; 6 - гібридами, які утворюють моноклональні антитіла; 7 - введення гібридом, які утворюють моноклональні антитіла, в організм сингенної миші; 8 - клітини гібридом, що утворюють моноклональні антитіла, які культивуються в культурі тканини; 9 - вирощування гібридомних клітин, що утворюють моноклональні антитіла, у ферментері; Igкр - імуноглобуліни в культуральній рідині; ig ac - імуноглобуліни в асцитній рідині; 10 - висолювання Ig-ів сульфатом амонію; 11 - стандартизація Ig-ів; 12 - ліофілізація Ig-ів[24].

Гібридна технологія є ефективною, зручною та економічною. Вона дозволяє отримувати стабільні лінії клітин, що постійно продукують моноклональні антитіла для широкого спектра застосувань у медицині та біотехнологіях. Їх можна заморожувати для довготривалого зберігання. Ці клітини культивують у лабораторії *in vitro* або *in vivo* для отримання антитіл високої чистоти, специфічності й чутливості.

Концепція того, що антитіла можуть служити в діагностиці та лікуванні раку, сягає їхнього відкриття наприкінці 19 століття. Значні зусилля протягом наступних десятиліть включали імунізацію різних видів тварин з раком людини в надії створити антисироватки з певним ступенем специфічності до раку. На жаль, цей підхід мав обмежений ранній успіх, за винятком відкриття карциноембріонального антигену (CEA), маркера раку товстої кишки та інших видів, та α -фетопротеїну, маркера гепатоцелюлярного раку[25].

Розвиток інбредних мишей започаткував нову еру серологічних досліджень раку з появою цитотоксичного тесту як потужного інструменту для аналізу реактивності алоантитіл на поверхні клітин. Це згодом призвело до визнання того, що поверхня клітини є високодиференційованою структурою. Ці дослідження стали основою для точної та системної ідентифікації поверхневих антигенів, що відрізняють нормальні клітини від злоякісних, і заклали підґрунтя для створення класифікації кластерів диференціації (CD) [26]. Враховуючи ймовірність нижчої токсичної дії антитіл, що спрямовані на пухлинні клітини та мають обмежений вплив на незлоякісні органи-свідки порівняно з малими молекулами, потенційно підвищену ефективність шляхом кон'югації з радіоізотопами та іншими клітинними токсинами, а також можливість характеризувати мішені за допомогою клінічної лабораторної діагностики для покращення клінічної ефективності препарату, сучасні та майбутні антитілотерапія, ймовірно,

знайдуть значну роль як окремо, так і в комбінованих терапевтичних стратегіях лікування пацієнтів з раком[27].

Цільові моноклональні антитіла проти антигенів, унікальних для пухлинних клітин або надмірно експресованих ними, можуть спричиняти загибель пухлинних клітин за допомогою різних механізмів[28] (Рис. 3).

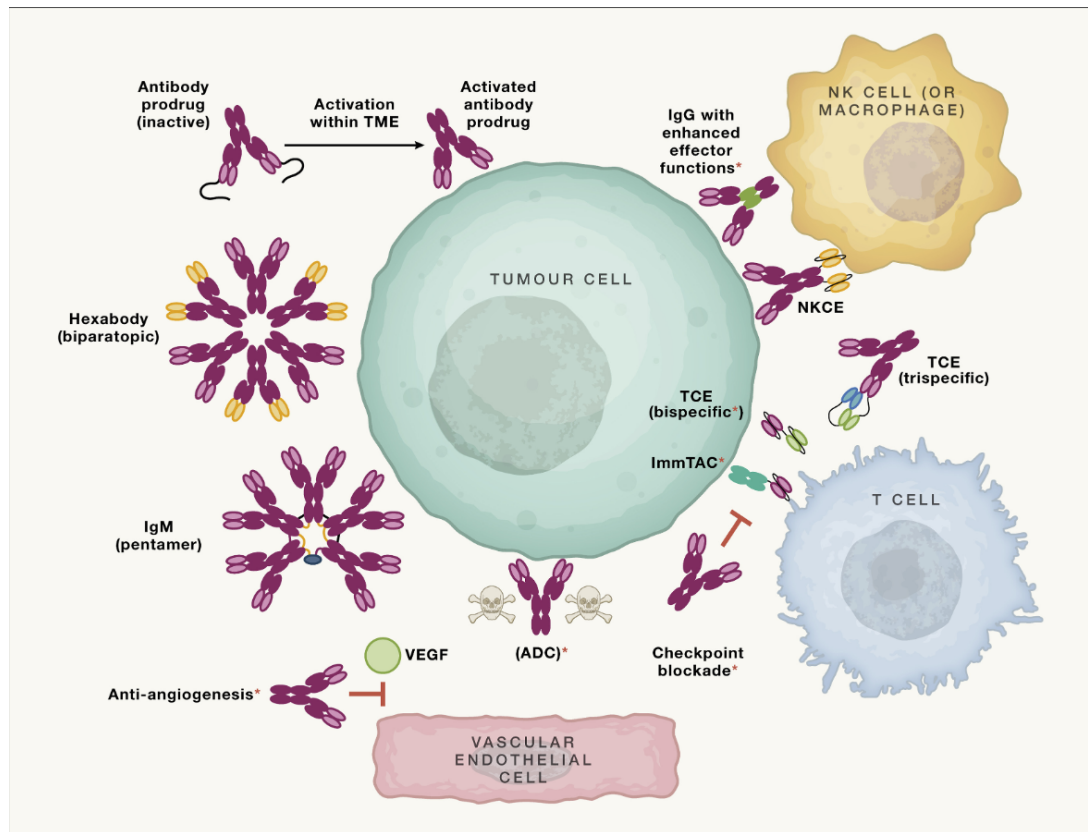


Рис. 5: варіації антитіл, що використовують проти ракових клітин, та їх дія: Antibody prodrug (інактивний → activated)- Інактивоване антитіло (проліки), що активується в пухлинному мікросередовищі (ТМЕ – tumour microenvironment). Hexabody (biparatopic)— Антитіло із шестикутною структурою, здатне розпізнавати два різні епітопи (біпаратопічне), посилює агрегацію рецепторів. IgM (pentamer)- П'ятивалентне антитіло, природна форма імуноглобуліну М з високою авідністю. IgG with enhanced effector функцій Імуноглобулін G з посиленими ефектами (наприклад, через мутації Fc-області) TCE (T-cell engager) Bispecific – зв'язує пухлинний антиген та Т-клітинний рецептор. Trispecific – пов'язує три цілі, як правило: пухлину, Т-клітину та додатковий рецептор-коактиватор. ImmTAC Кон'югат TCR (рецептора Т-клітини) та анти-CD3, активує Т-клітини для знищення пухлини. NKCE (NK cell engager) Антитіло, що направляє природні кілери (НК-клітини) або макрофаги на пухлинні клітини. Checkpoint blockade Антитіла, які блокують інгібіторні сигнали (наприклад, PD-1, CTLA-4), відновлюють активність Т-клітин. Anti-angiogenesis Блокують ангиогенез, наприклад шляхом інгібування VEGF (фактора зростання судин). ADC (antibody-drug conjugate)

Антитіло, пов'язане з цитотоксичним препаратом, спрямованим на знищення пухлини. [29]

Основним прямим механізмом, за допомогою якого багато антитіл індукують загибель пухлинних клітин, є блокування сигналізації рецепторів факторів росту. Непрямі механізми дії моноклональних антитіл вимагають залучення компонентів імунної системи хазяїна та включають CDC, антитілозалежний клітинний фагоцитоз (ADCP) та ADCC[28].

1.4.1 Блокування сигнальних шляхів в клітині

Моноклональні антитіла (МАТ) можуть індукувати загибель пухлинних клітин, блокуючи сигнальні шляхи, пов'язані з рецепторами факторів росту. Сигналізація росту та виживання пухлини можуть бути перервані, коли МАТ розпізнає Fab-ділянку рецепторів факторів росту та інактивує сигнальні шляхи або блокує ліганд. Наприклад, однією з найбільш використовуваних мішеней з цим механізмом був рецептор епідермального фактора росту (EGFR), який може бути надмірно експресований при різних типах раку, таких як рак товстої кишки, шиї та голови, яєчників та легень, серед інших. Повідомлялося, що активація EGFR сприяла збільшенню швидкості проліферації, міграції та клітинної інвазії шляхом стимуляції сигнальних шляхів фосфоінозитол-3-кінази (PI3K) та гуанозинтрифосфатази (GTPase) Ras[30].

Деякі МАТ, схвалені FDA, діють шляхом блокування сигнальних шляхів, такі як цетуксимаб та панітумумаб. Цетуксимаб здатний зв'язуватися з EGFR та конкурентно пригнічувати зв'язування з епідермальним фактором росту (EGF) та іншими лігандами, що блокувало фосфорилування EGFR, індуковане лігандами, та пом'якшувало активацію сигнальних шляхів, пов'язаних з розвитком раку. Панітумумаб є антагоністом та індукує інтерналізацію EGFR. Внутрішньоклітинні процеси, що запускаються активацією EGFR (наприклад, димеризація, аутофосфорилування та передача сигналу), були запобігані за допомогою

цього моноклонального антитіла, що сприяло збільшенню швидкості апоптозу та зменшенню проліферації та ангиогенезу пухлинних клітин[30].

1.4.2 Активування системи комплементу

Більшість цільових моноклональних антитіл здатні активувати систему комплементу (CDC). Наприклад, ефективність ритуксимабу *in vivo* частково залежить від CDC. У доклінічній моделі протипухлинні ефекти ритуксимабу були повністю усунені шляхом нокауту компонента каскаду комплементу C1q. Важливість CDC у терапії моноклональними антитілами додатково підтверджується тим фактом, що генетичні поліморфізми в гені C1qA корелюють з клінічною відповіддю на ритуксимаб у пацієнтів з фолікулярною лімфомою[31]. Аналогічно, оптимізація CDC за допомогою інженерії антитіл може посилити протипухлинну активність. Наприклад, моноклональне антитіло офатумумабу проти CD20, яке опосередковує ампліфіковану CDC, продемонструвало більшу ефективність, ніж ритуксимаб, у клінічному дослідженні пацієнтів із хронічним лімфолейкозом (ХЛЛ) [31].

1.4.3 Дія антитілозалежної клітинної цитотоксичності

Антитілозалежна клітинна цитотоксичність (ADCC) — це ефекторна імунна відповідь, що виникає внаслідок взаємодії антитіл із пухлинними клітинами та імунними ефекторними клітинами. Варіабельні (антиген-зв'язувальні) ділянки антитіла специфічно розпізнають антигени на поверхні пухлинної клітини, тоді як Fc-фрагмент антитіла зв'язується з Fcγ-рецепторами (FcγR), експресованими на імунних клітинах, таких як лейкоцити[31]. Наприклад, FcγRIIIA, що експресується на природних кілерах (NK-клітинах), ініціює знищення мішені шляхом вивільнення цитолітичних гранул. Антитіла діють як містки між ними, зв'язуючись з антигенами на поверхні клітини-мішені через свої Fab-частини та пов'язуючи ефекторні клітини через свої Fc-частини. Хоча IgG, IgA та IgE

можуть опосередковувати ADCC, IgG1 є найважливішим підкласом для протипухлинних терапевтичних антитіл[31]. Тафасітамаб — одне з новітніх терапевтичних моноклональних антитіл, схвалених FDA. Його мішенню є CD19 — кластер диференціації, який часто використовується як таргет для імунотерапії, зокрема в препаратах лонкастуксимаб та блінатумомаб. Експресія CD19 обмежена В-клітинною лінією під час дозрівання, але значно підвищена в багатьох В-клітинних злоякісних новоутвореннях. Тафасітамаб містить дві амінокислотні заміни у Fc-ділянці (S239D та I332E), які підсилюють зв'язування з Fc γ -рецепторами та значно покращують індукцію ADCC. Окрім посилення ADCC, ці модифікації також сприяють ефективнішій активації антитілозалежного клітинного фагоцитозу (ADCP) [31]. NK-клітини є основним типом ефекторів, що опосередковують ADCC; однак інші мієлоїдні типи, такі як моноцити, макрофаги, нейтрофіли, еозинофіли та дендритні клітини, також здатні до цього[28].

1.4.4 Антитілозалежний клітинний фагоцитоз

Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis(ADCP) – це біологічна функція, опосередкована зв'язуванням Fc з рецептором Fc γ RI, що експресується в макрофагах, нейтрофілах та еозинофілах. ADCP – це механізм, за допомогою якого антитіла опсонізують пухлинну клітину для її інтерналізації та деградації у фагосомі. Загалом, було відзначено, що антитіла, що індукують ADCC (наприклад, Тафасітамаб), можуть сприяти ADCP, що пов'язано з продукцією гамма-інтерферону (IFN- γ) NK-клітинами, що індукує експресію Fc γ RI в поліморфонуклеарних клітинах, таким чином сприяючи фагоцитозу[32]. Антитіла, такі як Даратумумаб, можуть сприяти кільком ефекторним механізмам у ракових клітинах, таким як ADCC, ADCP, CDC, апоптоз та модуляція активності ферменту CD38. Даратумумаб був першим повністю людським IgG1-к проти C-кінцевої петлі в залишках 189–202 та 223–236 CD38. Це антитіло було схвалено для лікування множинної мієломи, і воно експресується на низьких рівнях у

нормальних лімфоїдних клітинах, мієлоїдних клітинах та деяких негемопоетичних тканинах . антитілами[32].

1.4.5 кон'югат антитіло-ліки (ADC).

Одним із найшвидше зростаючих застосувань моноклональних антитіл у лікуванні раку є їх кон'югація з різними цитотоксичними корисними навантаженнями, які називаються кон'югатами антитіло-ліки (ADC). У цьому підході цитотоксичний препарат кон'югується з доменом важкого або легкого ланцюга mAb за допомогою різних типів хімічних лінкерів (рисунок 6). Здатність mAb до інтерналізації дозволяє більш специфічну доставку цитотоксичного агента до пухлинних клітин, одночасно знижуючи системну токсичність[33].

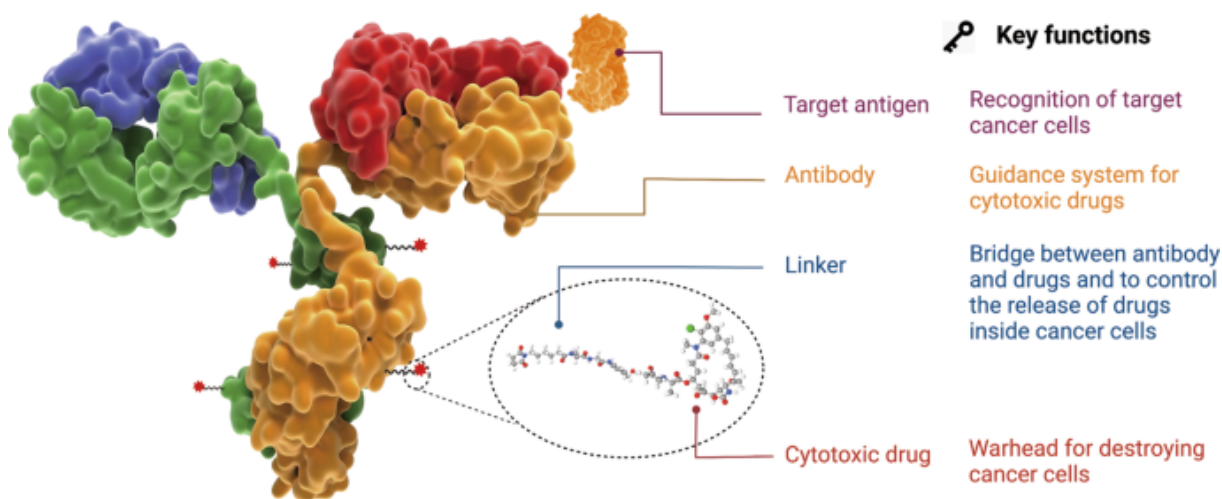


Рис 6: кон'югат антитіло-ліки і його складові. На зображенні зазначено: Target Antigen (цільовий антиген) Розташований на поверхні пухлинної клітини та розпізнається антитілом. Antibody (Антитіло) Призначення: Зв'язується з антигеном, спрямовуючи токсичне навантаження точно до пухлинної клітини. Linker (Лінкер) Зв'язує антитіло та токсичну речовину, при розчепленні всередині клітини дозволяє контролювано звільняти ліки всередині пухлинної клітини. Cytotoxic Drug (Цитотоксична речовина / Warhead) Знищує ракову клітину після потрапляння всередину[33].

Для кон'югованих підходів передбачуваний механізм дії простий: посилити доставку кон'югованого препарату до пухлини. Однак існує багато параметрів, які впливають на ефективність цієї стратегії, включаючи тип лінкера, тип кон'югованого корисного навантаження, співвідношення

корисного навантаження до mAb, розподіл антигенної мішені, здатність mAb зв'язуватися та інтерналізуватися, а також стабільність та профіль біорозподілу ADC[34]. Хоча це складно, досягнуто значних успіхів в оптимізації специфічних ADC із загальною простішою MOA, що призвело до того, що вони складають більшість нещодавніх схвалень FDA моноклональних антитіл (7 з 12 з 2017 року). Таким чином, ADC можуть забезпечити більш прямий спосіб викликання терапевтичних відповідей проти різних видів раку[34].

1.4.6 Використання моноклональних антитіл для контролю імунних точок

Інгібітори імунних контрольних точок (ИКТ), спрямовані на CTLA-4 та вісь PD-1/PD-L1, продемонстрували безпрецедентну клінічну активність при кількох типах раку та швидко змінюють практику медичної онкології. У той час як цитотоксична хімотерапія та інгібітори малих молекул («таргетні терапії») значною мірою діють безпосередньо на ракові клітини, інгібітори імунних контрольних точок активізують протипухлинні імунні відповіді, порушуючи коінгібіторну сигналізацію Т-клітин[35].

Моноклональні антитіла, спрямовані на коінгібіторні імунні контрольні точки (наприклад, PD-1 та CTLA-4), продемонстрували клінічну активність при кількох злоякісних новоутвореннях, включаючи меланому, недрібноклітинний рак легенів, нирково-клітинну карциному, рак сечового міхура, плоскоклітинну карциному голови та шиї, колоректальну карциному з високим MSI, карциному клітин Меркеля та лімфому Ходжкіна, і змінили практику медичної онкології. Терапія інгібіторами імунних контрольних точок була особливо успішною при меланомі, для якої затверджені методи лікування зараз включають анти-PD-1 (ніволумаб та пембролізумаб), анти-CTLA-4 (іпіліумаб) та комбіновані схеми анти-PD-1/CTLA-4 (ніволумаб-іпіліумаб). Дані про довгострокову виживаність

пацієнтів з меланою, які отримували іпілімумаб (анти-CTLA-4), вказують на те, що 20% пацієнтів демонструють ознаки тривалого стійкого контролю захворювання або відповіді через 5-10 років після початку терапії[36].

Таблиця 2

Зведена таблиця антитіл, що блокують контрольні точки, в імунотерапії раку[25]

Target	Drug Name	Source	Stage of Clinical Development
CTLA-4	Ipilimumab	Bristol-Myers Squibb	Approved for melanoma in the United States (2011), phase II-III for other indications
PD-1	Tremelimumab	Pfizer, MedImmune	Phase III
	Nivolumab	Bristol-Myers Squibb, Ono Pharmaceuticals	Approved for treatment-refractory unresectable melanoma in Japan and the United States (2016) Approved for NSCLC in the United States (2016)
	Pembrolizumab (MK-3475)	Merck	Approved for treatment-refractory unresectable melanoma in the United States (2016)
PD-L1	Pidilizumab MEDI0680	Cure Tech MedImmune/ AstraZeneca	Phase I-II Phase I-II
	PDR001	Novartis	Phase I
	Atezolizumab (MPDL33280A)	Genentech/ Roch	Approved for NSCLC and urothelial carcinoma in the United States (2016)
	Durvalumab (MEDI4736)	MedImmune/ AstraZeneca	Phase I-III
LAG3	Avelumab BMS986016	Merck/Pfizer Bristol-Myers Squibb	Phase II Phase I-II
	LAG525	Novartis	Phase I
KIR – KIR2DL-1,-2,-3	Iirilumab	Bristol-Myers Squibb	Phase I-II
KIR- NKG2A	Monalizumab	Innate pharma	Phase II
KIR – KIR3DL2	IPH4102	Innate pharma	Phase I
TIM3	TSR-022	Tesaro	Phase I
CEACAM1	CM-24 (MK-6018)	Misgav	Phase I
CD73	MEDI9447	MedImmune/ AstraZeneca	Phase I

Антитіла проти CTLA-4 показали здатність зменшувати кількість внутрішньопухлинних Т-регуляторних клітин, які надмірно експресують CTLA-4, що пояснюється їхнім ізотипом IgG2.

Клінічна розробка іпілімумабу, як першого моноклонального антитіла, спрямованого на імунні контрольні точки, надала важливі знання та досвід, які підкреслили відмінності між інгібіторами імунних контрольних точок та традиційними методами лікування раку. Була визнана та охарактеризована нова категорія побічних ефектів, названа «імунозалежні побічні явища». Ці побічні ефекти є унікальною особливістю препаратів, що модулюють імунітет. Крім того, були визначені нові критерії

оцінки імуноопосередкованої відповіді[36]. Оскільки імунотерапія раку впливає не безпосередньо на пухлину, як хіміотерапія чи більшість протиракових антитіл, а на імунну систему, виникають нові типи відповідей, які не враховуються традиційними критеріями оцінки ефективності лікування пухлин. Найбільш помітною відмінністю є час відповіді — якщо на хіміотерапію відповідь з'являється протягом кількох тижнів, то при застосуванні інгібіторів імунних контрольних точок вона може значно затримуватись і в деяких пацієнтів виникати аж через 6 місяців після початку лікування[37].

Кілька моноклональних антитіл, спрямованих на шлях PD-1/PD-L1, наразі проходять клінічну оцінку. Два з них, що націлені на рецептор PD-1, були схвалені FDA у 2016 році: ніволумаб — повністю людське антитіло класу IgG4, схвалене для лікування меланоми та недрібноклітинного раку легень, та пембролізумаб — гуманізоване антитіло IgG4, схвалене для лікування меланоми. У клінічних дослідженнях ніволумаб продемонстрував 31% об'єктивної відповіді, медіана тривалості відповіді становила 24 місяці, а медіана загальної виживаності — 17 місяців, при цьому 43% пацієнтів були живими через два роки. Лише 14% пацієнтів мали токсичність 3–4 ступеня. Пембролізумаб вивчався у пацієнтів, які раніше отримували іпілімуаб. У дослідженні фази I рівень відповіді становив 38%, а медіана безпрогресійної виживаності серед 135 пацієнтів перевищувала 7 місяців. Побічні ефекти 3–4 ступеня спостерігались у 13% пацієнтів[37].

Інші моноклональні антитіла, що націлені або на PD-1, або на PD-L1, знаходяться на більш ранніх стадіях клінічної оцінки. Препарати проти PD-1 показали позитивні результати при різних епітеліальних пухлинах, таких як рак легенів, голови та шиї, сечового міхура, а також при меланомі, раку нирки та товстої кишки. Це значно ширший спектр дії, ніж у лікування, спрямованого на CTLA-4, тому ведеться багато клінічних досліджень за різними показаннями. Нещодавні випробування продемонстрували

ефективність у лікуванні поширеного раку сечового міхура, резистентного до хіміотерапії, лімфоми Ходжкіна, раку голови та шиї, шлунка, тричі негативного раку молочної залози та яєчників[37].

1.5 Роль циклічно-залежних кіназ у регуляції клітинного циклу та їх порушення при онкологічних захворюваннях

Клітинний цикл — це послідовність стадій поділу клітини, що включає фази G1 (підготовка до синтезу ДНК), S (синтез ДНК), G2 (підготовка до мітозу) та M (мітотична сегрегація). Під час фази G1 клітина збільшується у розмірі та проходить так звану «точку обмеження», після якої вона зобов'язана завершити цикл. Вступ клітини у клітинний цикл залежить від внутрішніх факторів (наприклад, синтезу білків) та зовнішніх (факторів росту). У разі їх відсутності клітина може перейти у стан спокою - фазу G0 [38].

Регуляція клітинного циклу здійснюється через три основні контрольні точки: G1/S, G2/M та мітотичне веретено. Центральним механізмом контролю є циклічно-залежні кінази (CDK), які активуються шляхом зв'язування з цикліном. Комплекси Cyclin-CDK фосфорилують специфічні білки, що забезпечує прогресування клітини через фази циклу.

У нормальних клітинах активність CDK суворо регулюється білками-інгібіторами, наприклад, p16^{INK4a}. Проте в пухлинних клітинах часто спостерігається порушення цих механізмів: гіперактивація CDK4/6 через надмірну експресію або мутації циклінів, втрата функції p16^{INK4a}, а також порушення роботи білка ретинобластоми (Rb), який у нормі блокує перехід клітини з фази G1 у фазу S шляхом інгібування транскрипційних факторів[38]. Ці порушення призводять до неконтрольованого поділу клітин, що є характерною рисою пухлинного росту. Встановлення контролю

над продукуванням раковими клітинами циклін-залежних кіназ може бути ефективним для боротьби з пухлинами.

1.5.1 Інгібітори циклін-залежних кіназ

Серед перших інгібіторів CDK (циклічно-залежних кіназ), які просунулися до клінічних випробувань, були алвоцидиб (flavopiridol) та селіцикліб (roscovitine/CYC202). Вони є пан-CDK інгібіторами: алвоцидиб інгібує CDK 1, 2, 4, 6, 7 і 9, а селіцикліб — CDK 1, 2, 5, 7 і 9. Ці агенти викликають зупинку клітинного циклу в фазах G1 і G2 та апоптоз — ефект, який спочатку пов'язували з їх здатністю інгібувати CDK, що контролюють клітинний цикл[40]. Однак подальші дослідження показали, що багато клітинних ефектів цих інгібіторів, ймовірно, пов'язані з інгібуванням CDK7 або CDK9, зокрема пригніченням транскрипції генів, що беруть участь у клітинному циклі та апоптозі (Рис. 7). Алвоцидиб продемонстрував певну клінічну ефективність при гематологічних злоякісних захворюваннях, таких як хронічний лімфолейкоз (CLL), але відповіді були обмежені через токсичність[39].

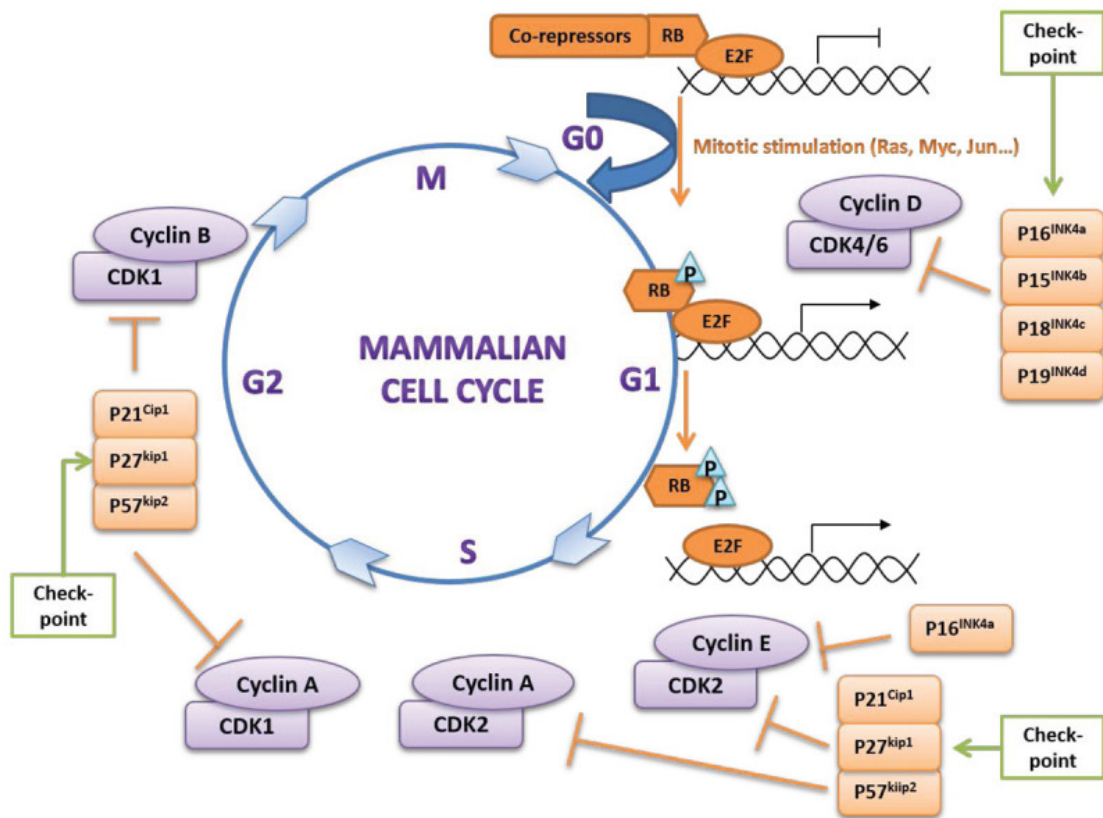


Рис. 7: Основні функції CDK у клітинному циклі: Клітинний цикл еукаріотів є точним і впорядкованим процесом, який регулюється циклін-залежними кіназами (CDK), цикліном і інгібіторами CDK (CDKI). Комплекс CDK-цикліна може фосфорилувати білок RB (ретинобластома) і позитивно регулювати клітинний цикл, тоді як CDKI пригнічують частину цього процесу, виконуючи роль негативних регуляторів[41].. Після стимуляції клітини мітогенними сигналами вона переходить у фазу G1. Перш ніж увійти до наступної фази, білок RB має бути фосфорильований комплексами CDK4/6-цикліна D та CDK2-цикліна E. Це призводить до вивільнення білка E2F, який активує експресію генів, пов'язаних із факторами клітинного циклу та транскрипцією. P16^{INK4a}, P21^{Cip1}, P27^{Kip1} та P57^{Kip2} — це CDKI, серед яких: P16^{INK4a} специфічно пригнічує активність CDK4, запобігає фосфорилуванню RB і вивільненню E2F, тим самим зупиняючи клітинний цикл у фазі G1; P21^{Cip1}, P27^{Kip1} та P57^{Kip2}, у свою чергу, можуть ширше пригнічувати активність різних CDK-циклінових комплексів, блокуючи клітини на різних стадіях клітинного циклу[38].

Нижче наведено огляд найпопулярніших і найважливіших інгібіторів циклін-залежних кіназ (CDK), які відіграють ключову роль у регуляції клітинної проліферації та є перспективними препаратами для лікування різних видів раку:

Flavopiridol (алвосидиб) — природний флавоноїдний інгібітор CDK, походить від рослини rohitukine. Інгібує CDK1 (IC50: 30 нМ), CDK2 (100

нМ), CDK4 (20 нМ), CDK6 (60 нМ), CDK7 (10 нМ) і CDK9 (10 нМ), зупиняючи клітинний цикл у фазах G1 та G2/M. Проходив фазу II клінічних випробувань при гострому мієлоїдному та хронічному лімфоїдному лейкозі. Показав синергічну дію з іншими протипухлинними препаратами[40].

(R)-Roscovitine (селіцикліб) — інгібітор CDK1 (2.7 μ M), CDK2 (0.1 μ M), CDK7 (0.5 μ M), CDK9 (0.8 μ M), але слабкий щодо CDK4 і CDK6 (>100 μ M). Інгібує фосфорилування білка ретинобластоми (pRb) і РНК-полімерази II. Проходить фазу II клінічних випробувань при немелкоклітинному раку легень, у комбінації з іншими препаратами, а також як монотерапія при назофарингеальному раку.

Dinaciclib — потужний інгібітор CDK1 (3 нМ), CDK2 і CDK5 (1 нМ), CDK9 (4 нМ). Краща селективність щодо CDK і кращий профіль токсичності, ніж у flavopiridol. У фазі III клінічних випробувань для лікування хронічного лімфоцитарного лейкозу[40].

Palbociclib — селективний інгібітор CDK4 (11 нМ) і CDK6 (16 нМ). Пригнічує фосфорилування pRb, зупиняючи клітинний цикл на фазі G1. Вже затверджений для лікування HR+ HER2– раку молочної залози, проходить фазу III клінічних досліджень.

Abemaciclib— також селективний інгібітор CDK4/6, блокує клітинний цикл у фазі G1, у фазі I та III клінічних випробувань при раку молочної залози і немелкоклітинному раку легень.

Ribociclib — селективний інгібітор CDK4/6 у 2014 році увійшов у фазу III клінічних досліджень для лікування раку молочної залози. Структурно схожий на palbociclib, також пероральний препарат[40].

Інгібітори циклічно-залежних кіназ часто комбінують з іншими варіантами ад'ювантної терапії, зокрема з класичними цитотоксичними

препаратами, такими як доксетаксел або цисплатин. Такий підхід дозволяє підвищити загальну ефективність лікування, зменшуючи при цьому токсичність, адже комбінована терапія дає змогу використовувати менші дози інгібіторів.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Визначення проліферативної активності лейкоцитів *in vitro*

Методику виконували згідно описаній в [41]. Для оцінки проліферативної активності лейкоцитів проводили культивування клітин периферичної крові людини *in vitro* без і з застосуванням фітогемоглютиніну як можливого біологічного стимулятора. Дослідження виконували у стерильних умовах. У кожен стерильний флакон вносили по 4 мл культурального середовища 199, збагаченого 0,5 мл інактивованої ембріональної телячої сироватки, що сприяє підтриманню життєздатності клітин упродовж інкубаційного періоду. До кожної культури додавали по 40 мкл гепаринізованої крові, яка містила мононуклеарні клітини (переважно лімфоцити). Для постановки експерименту формували три варіанти культур:

- Культура «А» (контроль негативний): додавали 100 мкл стерильного 0,9% розчину NaCl.
- Культура «В» (контроль позитивний): додавали 100 мкл мітогену — фітогемагглютиніну (ФГА), що стимулює проліферацію лімфоцитів.
- Культура «С» (дослідна): додавали 100 мкл культурального середовища, збагаченого екзосомами, отриманими із супернатанту культивованих мезенхімальних стовбурових клітин (МСК).

Культивування клітин здійснювали протягом 72 годин при температурі 37 °С в умовах вологого термостату з 5% CO₂. Після завершення інкубації вміст флаконів піддавали центрифугуванню при 1500 об/хв протягом 10 хвилин для осадження клітин. Надосадову рідину акуратно видаляли, а осад фіксували сумішшю 96% етилового спирту та

крижаної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1. Після 10-хвилинної експозиції фіксовані проби повторно центрифугували та тричі промивали для видалення клітинного дебрису.

З одержаного осаду готували мікроскопічні препарати, наносячи клітинну суспензію на предметне скло. Препарати висушували при кімнатній температурі впродовж 24 годин, після чого проводили фарбування за методом Романовського–Гімзи протягом 30 хвилин. Аналіз мікропрепаратів здійснювали за допомогою світлового мікроскопа при збільшенні $\times 1000$. У полі зору підраховували кількість малих та великих лімфоцитів, а частку великих лімфоцитів виражали у відсотках від загального числа виявлених лімфоцитів.

2.2 Мікроскопічний аналіз лімфоцитів та визначення мітотичного індексу

Мікроскопічний аналіз здійснювали з використанням світлового мікроскопа з імерсійною системою при збільшенні $\times 1000$. Підрахунок клітин проводили за допомогою механічного лічильника, застосовуючи попередньо підготовлені та пофарбовані за методом Романовського–Гімзи мазки. Для реєстрації результатів використовували спеціальну таблицю-журнал. Під час аналізу в полі зору визначали як загальну кількість клітин, так і кількість клітин, що перебували у фазах мітозу. Морфологічно мітотичні клітини ідентифікували за характерними ознаками, серед яких: втрата чіткої округлої форми ядра, його поділ або повне зникнення, нерівномірне фарбування хроматину, характерна конденсація хромосом.

проліферативної активності між референтними зразками та дослідними зразками без стимуляції і тих, до яких додавали фітогемаглютинін (ФГА) як мітоген для стимуляції поділу лімфоцитів.

2.3. Градієнтна сепарація моноклеарних клітин периферичної крові

Отримання лімфоцитів з периферичної крові здійснювали за допомогою методу центрифугування в градієнті щільності, модифікованого відповідно до [41]. Венозну кров об'ємом 3–5 мл стабілізували гепарином (кінцева концентрація 20–25 ОД/мл). Гепаринізовану кров (з концентрацією 5000 ОД/мл) змішували з фосфатно-сольовим буфером (рН 7,4; NaCl, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, NaH_2PO_4) у співвідношенні 1:1.

Підготовлений зразок обережно нашаровували на 2 мл фікол-верографінового розчину (щільність 1,077 г/см³), поміщеного в поліпропіленову центрифужну пробірку, що запобігає адгезії клітин до скла. Центрифугування проводили протягом 25 хв при 1500 об/хв без гальмування. Після цього акуратно видаляли плазму, а з інтерфазної зони відбирали моноклеарну фракцію (лімфоцитарне кільце), яку переносили в окрему стерильну пробірку.

Для видалення залишків фікол-верографіну до клітин додавали 6 мл буферного розчину (рН 7,4), ретельно перемішували та центрифугували 10 хв при 1500 об/хв. Процедуру повторювали ще один раз із новою порцією буфера. Після завершення промивань клітини ресуспендували у відповідному об'ємі буфера до кінцевої концентрації 2×10^6 клітин/мл. Життєздатність клітин, визначена за допомогою стандартного тесту (наприклад, з трипановим синім), становила не менше 95–98 %.

2.4. Визначення субпопуляцій Т-лімфоцитів методом проточної цитофлуориметрії

Методику було отримано з [42]. Для визначення частки активованих субпопуляцій Т-лімфоцитів ($CD4^+$, $CD8^+$) у досліджуваних зразках

периферичної крові застосовували метод проточної цитофлуориметрії з використанням специфічних моноклональних антитіл, кон'югованих із флуоресцентними фарбниками.

Під час аналізу клітини, підготовлені у вигляді однорідної суспензії, подаються у проточну камеру цитофлуориметра. Завдяки гідродинамічному фокусуванню клітини впорядковуються в один ряд і послідовно проходять через лазерний промінь. Під час перетину лазерного променя відбувається реєстрація кількох параметрів:

- Розсіяння світла під малим кутом (FSC, forward scatter), що корелює з розміром клітини;
- Розсіяння світла під кутом 90° (SSC, side scatter), яке відображає гранулярність та внутрішню структуру цитоплазми;
- Інтенсивність флуоресценції, що виникає внаслідок збудження флуорохромів, пов'язаних із моноклональними антитілами, які специфічно зв'язуються з поверхневими антигенами клітин (CD-маркерами).

Для маркування використовували комбінацію флуоресцентних кон'югатів: CD3-PerCP (перитидин-хлорофіл-протеїн), який визначає всі Т-лімфоцити; CD4-FITC (флуоресцеїн ізотіоціанат), що ідентифікує Т-хелпери (CD4⁺); та CD8-PE (фітоеритрин), який мітить цитотоксичні Т-клітини (CD8⁺).

Клітинну суспензію з попереднього етапу інкубували з флуоресцентно міченими моноклональними антитілами відповідно до рекомендацій виробника, при температурі 4 °C протягом 30 хвилин у темряві для запобігання фотодеградації фарбників. Після інкубації клітини повторно промивали буфером для видалення надлишку антитіл та

фіксували у 2% розчині параформальдегіду для стабілізації мембран та збереження цілісності клітин перед аналізом.

Перед початком аналізу проводили процедуру компенсації сигналів між каналами, особливо між FL1 (FITC) та FL2 (PE). Для збудження флуорохромів застосовували лазери з довжинами хвиль: 488 нм (синій лазер), який збуджує FITC та PE, а також 633/640 нм (червоний лазер) для PerCP. Відповідні фільтри забезпечували селективний відбір флуоресцентного сигналу: FL1 (~530 нм) для FITC, FL2 (~575 нм) для PE, FL3 (~670 нм) для PerCP. Напруги детекторів налаштовували експериментально для досягнення оптимального співвідношення сигнал/шум: для FSC – 300–400 В, SSC – 350–450 В, флуоресценції – 450–600 В.

Отримані дані обробляли за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення, що дозволяє провести багатоаспектний аналіз клітинної популяції, визначити відсотковий вміст CD3⁺, CD4⁺ та CD8⁺ Т-лімфоцитів, а також оцінити їх функціональний стан.

2.5. Статистична обробка результатів

Обробка отриманих даних проводилася із застосуванням програмного забезпечення MS Excel. Для візуалізації результатів використовували побудову графіків та таблиць. Для оцінки варіабельності та достовірності даних обчислювали довірчі інтервали з рівнем значущості 95%.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Визначення проліферативної активності лімфоцитів *in vitro*

Для визначення проліферативної активності лімфоцитів *in vitro* було проведене дослідження, в яке було включено 49 пацієнтів із аденокарциномою шлунка (АШ) різної стадії та ступеня розповсюдженості. Середній вік становив 61,3 року, серед них 52 % чоловіків та 48 % жінок.

Усі пацієнти були розподілені на три клінічні групи відповідно до стадії захворювання:

- 1-ша група (n = 17) – пацієнти з локалізованою формою АШ, яка відповідала стадії T1–T2N0M0. У цих хворих пухлина була обмежена слизовим або підслизовим шаром стінки шлунка без залучення лімфатичних вузлів і без віддалених метастазів.
- 2-га група (n = 12) – пацієнти з місцево-поширеною формою АШ, що характеризувалась стадією T4N1M0. У цій групі спостерігалось глибоке інфільтративне проростання пухлини в стінку шлунка із залученням регіонарних лімфатичних вузлів, але без віддалених метастазів.
- 3-тя група (n = 22) – пацієнти з поширеною формою АШ, що відповідала стадії T3–T4N2M1. Пухлина проростала всю товщу стінки шлунка, супроводжувалась значним ураженням лімфатичних вузлів та наявністю віддалених метастазів.

Також було використане референтне значення, визначене в лабораторії. За результатами дослідження виявлено достовірні ($P \leq 0,01$) зміни в проліферації малих лімфоцитів (таблиця 3):

**Результати дослідження зміни проліферативної активності
лімфоцитів in vitro**

Група	Спонтанна культура (%)	Культура з мітогеном (%)
Референтне значення	62,5 ± 1,5	67,5 ± 1,5
1	78,1 ± 4,3	66,4 ± 3,9
2	85,6 ± 3,5	69,3 ± 4,8
3	76,2 ± 2,1	73,5 ± 3,9

Зміни інтенсивності проліферації лімфоцитів у різних групах пацієнтів з аденокарциномою шлунка (АШ) свідчать про особливості імунної відповіді при різних стадіях і ступенях поширення захворювання.

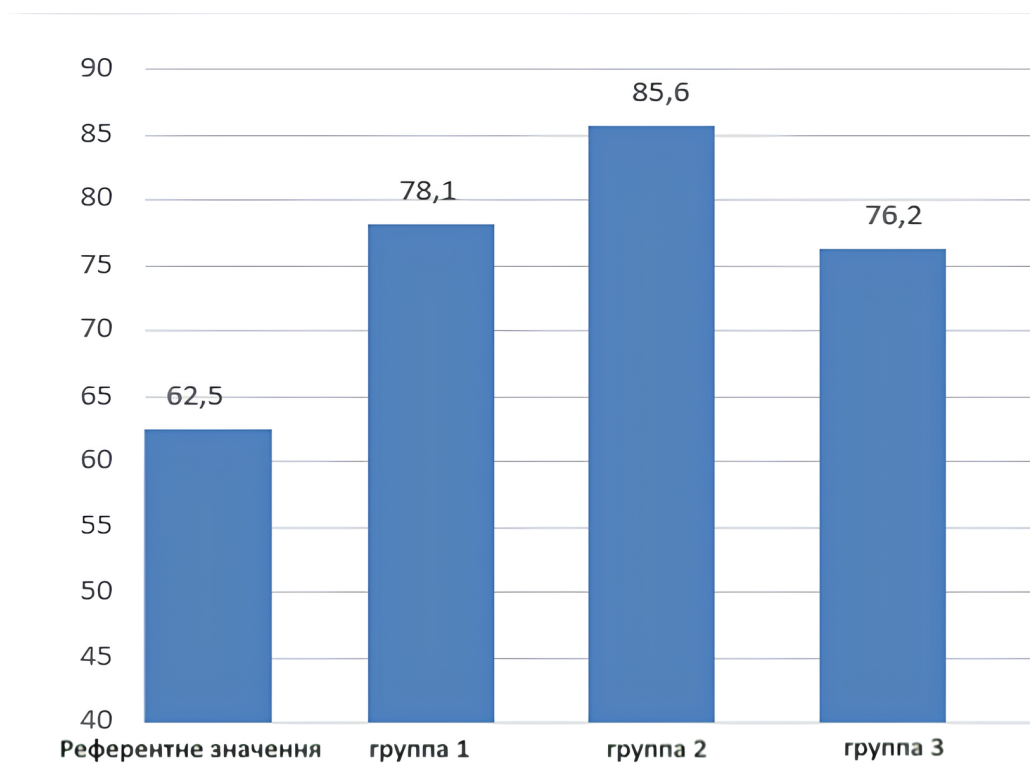
**3.1.1. Визначення проліферативної активності
лімфоцитів in vitro без додавання мітогену**

За результатами дослідження було побудовану таблицю з визначеним співвідношенням кількості малих лімфоцитів до загальної кількості лімфоцитів:

**Результати дослідження зміни проліферативної активності
лімфоцитів в спонтанній культурі**

Група	Спонтанна культура (%)
Референтне значення	62,5 ± 1,5
1	78,1 ± 4,3
2	85,6 ± 3,5
3	76,2 ± 2,1

Також за даними с таблиці було побудовано наглядний графік для порівняння результатів дослідження:



Графік 1: зміна проліферативної активності лейкоцитів *in vitro* в досліджуваних групах у порівнянні з референтним значенням.

За результатами дослідження було визначено співвідношення кількості малих лімфоцитів до імунобластів, де малі лімфоцити - це клітини, що пройшли стадію мітозу, імунобласти- великі лімфоцити, що готуються до поділу. Визначення кількості малих лімфоцитів дозволяє оцінити ступінь проліферативної активності лімфоцитів у крові.

Результати показали, що у всіх досліджуваних групах кількість малих лімфоцитів перевищувала референтні значення. Це свідчить про те, що імунна система пацієнтів активно намагається боротися з онкологічним захворюванням шляхом підвищення кількості імунних клітин, незважаючи на відсутність змін у ефективності імунної відповіді.

3.1.2. Визначення проліферативної активності лімфоцитів *in vitro* під дією мітогену фітогемаглютиніну.

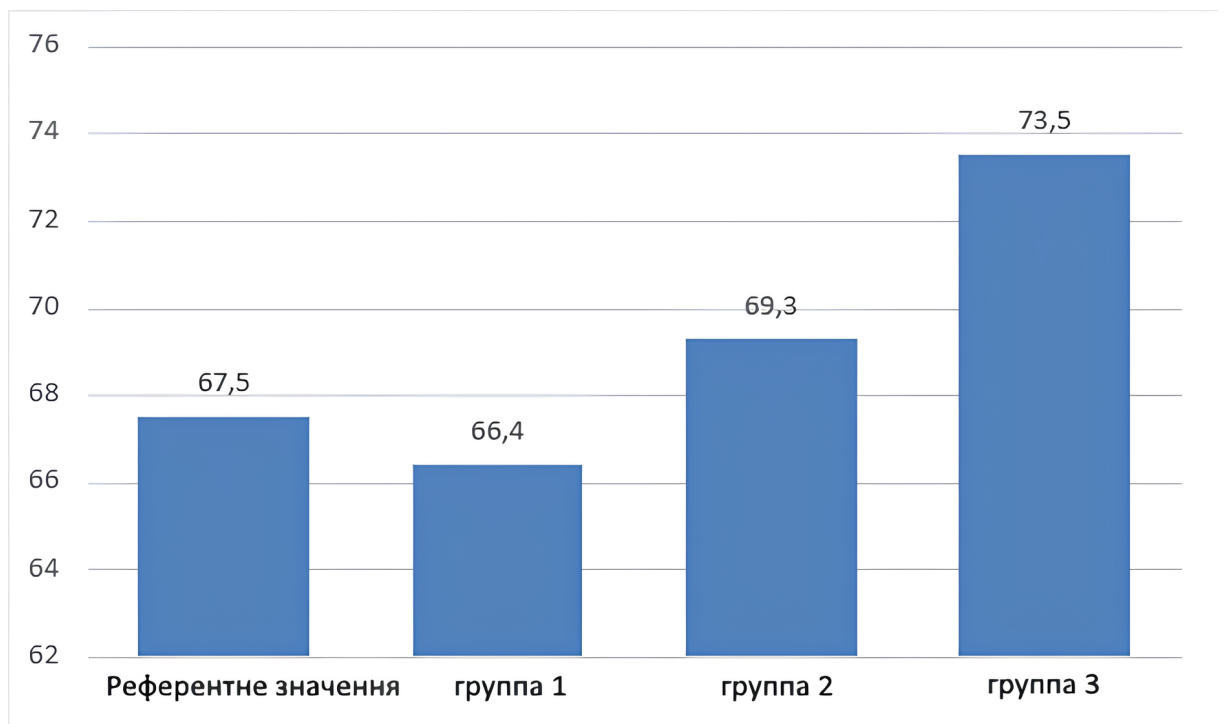
За результатами дослідження було побудовану таблицю з визначеним співвідношенням кількості малих лімфоцитів до загальної кількості лімфоцитів у культурі з додаванням фітогемаглютиніну:

Таблиця 5

Результати дослідження зміни проліферативної активності лімфоцитів з додаванням мітогену

Група	Культура з мітогеном (%)
Референтне значення	67,5 ± 1,5
1	66,4 ± 3,9
2	69,3 ± 4,8
3	73,5 ± 3,9

Також за даними с таблиці було побудовано наглядний графік для порівняння результатів дослідження:



Графік 2: зміна проліферативної активності лейкоцитів *in vitro* в досліджуваних групах з додаванням мітогену у порівнянні з референтним значенням.

Згідно з отриманими результатами, у культурі клітин, стимульованих мітогеном, рівень проліферації малих лімфоцитів не демонструє суттєвих відмінностей порівняно з референтною групою. У першій досліджуваній групі цей показник навіть нижчий за контрольний, що свідчить про знижену чутливість клітин до мітогенної стимуляції. Такий результат може бути обумовлений порушенням експресії рецепторів на поверхні лімфоцитів, що, у свою чергу, перешкоджає ефективному сприйняттю мітогену. Внаслідок цього мітогенна стимуляція не запускає очікувану проліферативну відповідь, що свідчить про порушення імунної реактивності на клітинному рівні.

Аналіз графічних даних дозволяє зробити висновок, що найбільш пригніченою виявилася саме перша група, попри те, що захворювання на цій стадії ще не набуло агресивного перебігу. Це вказує на раннє виснаження або функціональну неспроможність лімфоцитів. Разом із тим, особливу увагу заслуговує третя група, в якій рівень проліферації

перевищує референтні значення. Така динаміка може свідчити про часткове відновлення функціональної активності лімфоцитів на пізніх стадіях захворювання, що, ймовірно, зумовлене компенсаторним посиленням імунної відповіді або виходом клітин із виснаженого стану.

3.2. Визначення субпопуляцій Т-лімфоцитів методом проточної цитофлуориметрії

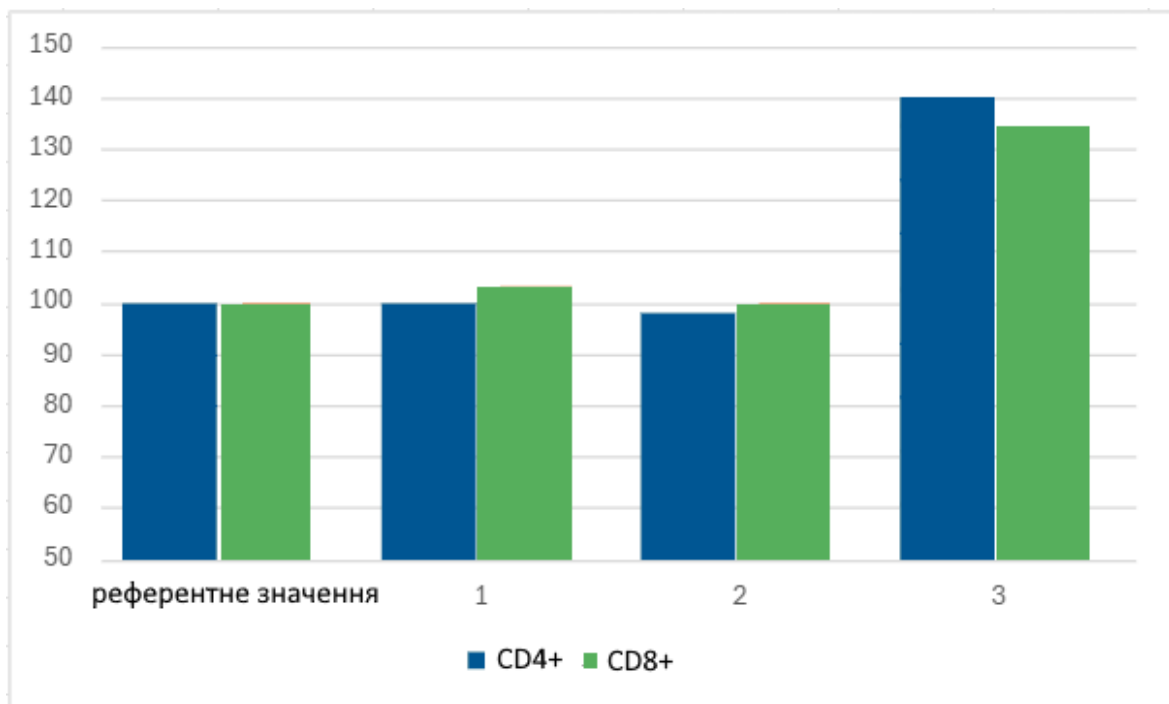
За результатами дослідження було побудовану таблицю з визначенням співвідношенням CD4+ і CD8+ у порівнянні з референтною групою:

Таблиця 6

Зміна кількості CD4+ і CD8+ у порівнянні з референтною групою

Група	CD4+ і CD8+ рівні
1	Не відрізнялись від норми
2	Не відрізнялись від норми
3	Підвищені: CD4+ ↑ на 40%, CD8+ ↑ на 35%

За отриманими результатами для наглядного зображення було побудовано графік:



Графік 3: порівняння кількості і співвідношення CD4⁺ та CD8⁺ Т-клітин.

За результатами оцінки співвідношення та кількості CD4⁺ і CD8⁺ Т-лімфоцитів було встановлено, що в першій і другій групах досліджуваних пацієнтів не виявлено достовірних відмінностей у вмісті Т-хелперів (CD4⁺) та Т-цитотоксичних клітин (CD8⁺) порівняно з референтними значеннями.

Водночас особливу увагу привертає третя група, в якій зафіксовано підвищення кількості CD4⁺-лімфоцитів на 100%, а CD8⁺ — на 35%. Це супроводжувалося активацією проліферації малих лімфоцитів як у спонтанних умовах, так і після індукції мітогеном.

Збільшення кількості CD4⁺ і CD8⁺ клітин свідчить про зростання їх проліферативного потенціалу *in vitro*. На підставі цього можна зробити висновок, що посилення проліферації цих клітин є компенсаторною відповіддю, ймовірно зумовленою порушенням регуляції циклічно-залежних кіназ.

Зміна швидкості мітозу вказує на активацію функціональної активності циклічно-залежних кіназ як *in vitro*, так і в малих гніздових популяціях

клітин. Це, у свою чергу, може бути використано як тестовий показник для оцінки проліферативного потенціалу не лише Т-лімфоцитів, але й пухлинних клітин.

Крім того, варто звернути увагу на те, що у третій групі, попри незначну різницю (близько 5%), кількість CD4⁺-клітин була вищою, ніж CD8⁺. Це свідчить про переважання Т-хелперів над Т-кілерами, незважаючи на наявність активної імунної відповіді. Такий дисбаланс може вказувати на виснаження імунної системи та прогресування патологічного процесу.

3.3 Обговорення

На основі отриманих результатів було виявлено загальну тенденцію до підвищення проліферативної активності лімфоцитів у культурі без додавання мітогену (спонтанна проліферація). Збільшення кількості малих лімфоцитів свідчить про посилену проліферацію, що може розглядатися як компенсаторна реакція імунної системи на зниження її ефективності. Організм намагається компенсувати недостатність імунної відповіді шляхом активації клітинного поділу і збільшення кількості імунокомпетентних клітин.

Особливо виражене підвищення кількості проліферативних клітин спостерігалось у другій групі пацієнтів, що відповідає локально поширеній формі захворювання. Це може свідчити про найбільш інтенсивну активацію імунної системи на даному етапі патологічного процесу.

У культурі з додаванням мітогену проліферативна активність у всіх групах практично не відрізнялася від референтних значень. Така відсутність адекватної відповіді на мітогенну стимуляцію може бути зумовлена зниженим рівнем експресії рецепторів на поверхні Т-лімфоцитів, що унеможлиблює розпізнавання та відповідь на мітоген. Це вказує на те, що незважаючи на збільшення кількості проліферативно активних клітин у

спонтанних умовах, їх функціональна ефективність залишається зниженою, зокрема через порушення цитотоксичної активності.

Окрему увагу заслуговує третя група пацієнтів, у яких спостерігається поширена форма захворювання з наявністю метастазів. Порівняння результатів першого (спонтанна проліферація) та другого (індукована проліферація) досліджень дозволяє зробити висновок, що на відміну від інших груп, де спостерігалось переважне збільшення кількісних показників, у третій групі відбувається поступовий перехід до якісної активації — тобто імунна система повертається до більш ефективного функціонального стану. Замість подальшого нарощування кількості імунних клітин, організм фокусується на підвищенні їхньої функціональної активності.

Додатковий аналіз субпопуляцій Т-лімфоцитів ($CD4^+$ та $CD8^+$) підтверджує ці спостереження. У першій та другій групах кількісні показники $CD4^+$ - і $CD8^+$ -клітин не демонстрували суттєвих відхилень від референтних значень. Натомість у третій групі було зафіксовано зростання кількості $CD4^+$ -лімфоцитів на 40%, а $CD8^+$ — на 35%. Така динаміка може вказувати на спробу імунної системи покращити ефективність протипухлинної відповіді шляхом активації обох основних субпопуляцій Т-лімфоцитів. Водночас переважання $CD4^+$ -клітин над $CD8^+$ може свідчити про дисбаланс, характерний для виснаження імунної відповіді, коли організм вже не здатен сформувати повноцінну цитотоксичну реакцію.

З огляду на підвищену кількість та активність проліферації лімфоцитів в усіх досліджуваних групах, можна зробити висновок, що під впливом пухлинних клітин у пацієнтів активуються циклін-залежні кінази, що призводить до прискореного проходження клітинами фаз клітинного циклу.

Це явище відкриває можливість використання рівня проліферації лімфоцитів та характеристик їх субпопуляцій як потенційного біомаркера

для діагностики злоякісних новоутворень. Крім того, динаміка проліферативної активності може бути корисним критерієм для моніторингу ефективності проведеної протипухлинної терапії.

З огляду на виявлені зміни, доцільним є застосування комплексних підходів до терапії, зокрема — поєднання імунотерапії та інгібіторів циклін-залежних кіназ. Одним із перспективних напрямів є використання моноклональних антитіл проти інгібіторних контрольних точок імунної відповіді (наприклад, PD-1/PD-L1 або CTLA-4), що дозволяє реактивувати Т-лімфоцити та посилити протипухлинну імунну відповідь.

Хоча інгібітори циклін-залежних кіназ здатні зменшувати загальну кількість проліферативно активних Т-клітин, водночас вони пригнічують проліферацію пухлинних клітин, що є критично важливим для стримування росту новоутворення. При цьому комбіноване застосування імуномодуляторів та інгібіторів циклін-залежних кіназ дозволяє компенсувати зниження кількісних характеристик Т-лімфоцитів завдяки підвищенню якості їх функціональної активності.

Таким чином, комбінована терапевтична стратегія, що включає реактивацію імунної відповіді за допомогою моноклональних антитіл та таргетне пригнічення клітинного поділу через інгібіцію циклін-залежних кіназ, може стати ефективним підходом для посилення імунного контролю над пухлинним процесом та покращення прогнозу захворювання.

ВИСНОВКИ

1. Проведені дослідження зміни проліферації імунокомпетентних клітин в культурі *in vitro* виявили активацію проліферативного потенціалу малих лімфоцитів в групах пацієнтів з аденокарциномою шлунку, що було найбільш виражено в 3 групі- у пацієнтів з великою стадією і розповсюдженістю онкопроцесу. Це пов'язано з інтенсивністю функції циклін-залежних кіназ, що регулюють швидкість клітинного циклу, а саме мітотичну активність і накопичення малих лімфоцитів по відношенню з кількістю нормобластів.
2. Різниця співвідношення субпопуляцій Т-лімфоцитів свідчить про збільшення клонів CD4⁺ CD8⁺ лімфоцитів за рахунок компенсаторної проліферації на тлі зниження їх здатності до імуно-генетичного контролю за рахунок недостатності експресії ко-стимулюючих рецепторів і надмірної експресії супресорних рецепторів, що активуються білками-лігандами пухлинних клітин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Cancer Occurrence Ahmedin Jemal , Melissa M. Center , Elizabeth Ward , and Michael J. Thun methods in Molecular Biology, Cancer Epidemiology, vol. 471 © 2009 Book doi: 10.1007/978-1-59745-416-2
2. Whittaker SR, Mallinger A, Workman P, Clarke PA. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. *Pharmacol Ther.* 2017 May;173:83-105. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.008>
3. Oncogenes and tumor suppressor genes: functions and roles in cancers Tikam Chand Dakal, Bhanupriya Dhabhai, Anuja Pant, Kareena Moar, Kanika Chaudhary, Vikas Yadav, Vipin Ranga, Narendra Kumar Sharma, Abhishek Kumar, Pawan Kumar Maurya 2024 <https://doi.org/10.1002/mco2.582>
4. Chen, L., Liu, S. & Tao, Y. Regulating tumor suppressor genes: post-translational modifications. *Sig Transduct Target Ther* 5, 90 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0196-9>
5. Golub TR, Lu J, Getz G, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435:834–838. doi: 10.1038/nature03702.
6. Dehan, P., Kustermans, G., Guenin, S., Horion, J., Boniver, J., & Delvenne, P. (2009). DNA methylation and cancer diagnosis: new methods and applications. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 9(7), 651–657. doi:10.1586/erm.09.53
7. Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet.* 2012 Apr;81(4):303-11. doi: 10.1111/j.1399-0004.2011.01809.
8. Rosendahl Huber A, Van Hoeck A, Van Boxtel R. The Mutagenic Impact of Environmental Exposures in Human Cells and Cancer: Imprints Through Time. *Front Genet.* 2021 Oct 20;12:760039. doi: 10.3389/fgene.2021.760039

9. T Cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer Zhen Zhang^{1†}, Shasha Liu^{1†}, Bin Zhang², Liang Qiao³, Yi Zhang⁴, Yi Zhang 2020 | <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00017>
10. Jiang, Y., Li, Y. & Zhu, B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis* 6, e1792 (2015). <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.162>
11. Zhang M, Zhang L, Hei R, Li X, Cai H, Wu X, Zheng Q, Cai C. CDK inhibitors in cancer therapy, an overview of recent development. *Am J Cancer Res.* 2021 May 15;11(5):1913-1935. PMID: 34094661; PMCID: PMC8167670.
12. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Mastoraki A, Garmpis N, Diakosavvas M, Angelou K, Tsatsaris G, Pagkalos A, Ntounis T, Fasoulakis Z. *Anticancer Research* Nov 2020, 40 (11) 6009-6015; DOI: 10.21873/anticanres.14622
13. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting (Shankaran et al., 2001; Dunn et al., 2002, 2004). Gavin P. Dunn,¹ Lloyd J. Old,² and Robert D. Schreiber^{1,*} *Immunity*, Vol. 21, 137–148, August, 2004 doi:10.1016/j.immuni.2004.07.017
14. Oncogenes and Cancer Author: Carlo M. Croce, M.D 2008 VOL. 358 NO. 5 DOI: 10.1056/NEJMra072367
15. The Epigenomics of Cancer Peter A. Jones^{1, *} and Stephen B. Baylin DOI 10.1016/j.cell.2007.01.029
16. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes Eva Y.H.P. Lee and William J. Muller *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; *Cell* 128, 683–692, 2007 doi: 10.1101/cshperspect.a003236 2010
17. Oncogenic fusion protein EWS-FLI1 is a network hub that regulates alternative splicing, S.P. Selvanathan, G.T. Graham, H.V. Erkizan, U. Dirksen, T.G.

Natarajan,A. Dakic,S. Yu,X. Liu,M.T. Paulsen,M.E. Ljungman,C.H. Wu,E.R. Lawlor,A. Üren,& J.A. Toretsky, 2015, <https://doi.org/10.1073/pnas.1500536112>.

18. ALL-1/MLL1, a homologue of *Drosophila* TRITHORAX, modifies chromatin and is directly involved in infant acute leukaemia Canaani E, Nakamura T, Rozovskaia T, Smith ST, Mori T, Croce CM, Mazo A.. *Br J Cancer*. 2004 . doi: 10.1038/sj.bjc.6601639.

19. Malignant transformation of human cells by constitutive expression of platelet-derived growth factor-BB Govindarajan B, Shah A, Cohen C, Arnold RS, Schechner J, Chung J, Mercurio AM, Alani R, Ryu B, Fan CY, Cuezva JM, Martinez M, Arbiser JL.. *J Biol Chem*. 2005. doi: 10.1074/jbc.M500411200.

20. IMMUNOGENETICS OF HUMAN CELL SURFACE DIFFERENTIATION Wolfgang J. Rettig and Lloyd J. Old *Ann. Rev. Immunol.* 1989. 7:481-511 doi:10.1146/annurev.iy.07.040189.002405

21. Monoclonal antibodies in cancer therapy Andrew M. Scott James P. Allison Jedd D. Wolchok *Cancer Immun* (2012) 12 (1): 14. <https://doi.org/10.1158/1424-9634.DCL-14.12.1>

22. Anticancer Antibodies Jeffrey S. Ross, MD , Karen Gray, PhD , Gary S. Gray, PhD , Peter J. Worland, PhD , Mark Rolfe, PhD 2003 doi.org/10.1309/Y6LPC0LR726L9DX9

23. Designing antibodies as therapeutics Paul J. Carter^{1,*} and Arvind Rajpa 2019 doi:10.1016/j.soncn.2019.08.006

24. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy David Zahavi, Louis Weiner 2020 doi:10.3390/antib9030034

25. Experimentally induced liver metastases from colorectal cancer can be prevented by mononuclear phagocyte-mediated monoclonal antibody therapy. *J*

- Hepatol, van der Bij GJ, et al. 2010; 53(4):677–685. doi: 10.1016/j.jhep.2010.04.023.
26. . A view on EGFR-targeted therapies from the oncogene-addiction perspective. Perez R, Crombet T, de LJ, Moreno E *Front Pharmacol.* 2013;4:53. doi: 10.3389/fphar.2013.00053.
27. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. Fu, Z., Li, S., Han, S. et al. *Sig Transduct Target Ther* 7, 93 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00947-7>
28. Mechanisms of Therapeutic Antitumor Monoclonal Antibodies. Tsao LC, Force J, Hartman ZC. *Cancer Res.* 2021 15;81(18):4641-4651. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-1109.
29. Method for Determining Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis Kamen L., Myneni S., Langsdorf C., Kho E., Ordonia B., Thakurta T., Zheng K., Song A., Chung S. A Novel. *J. Immunol. Methods.* 2019; 468:55–60. doi: 10.1016/j.jim.2019.03.001.
30. A Comprehensive Review About the Use of Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. Justiz-Vaillant, A.; Pandit, B.R.; Unakal, C.; Vuma, S.; Akpaka, P.E *Antibodies* 2025, 14, 35. <https://doi.org/10.3390/antib14020035>
31. Adjuvant therapy. *Medicine* Caley, A., Kanji, A., & Tanguay, J. (2012), 40(1), 1–4. doi:10.1016/j.mpmed.2011.09.011
32. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, et al.. *N Engl J Med* 2004; 351: 1731e40. DOI: 10.1056/NEJMoa040694
33. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy Pardoll, D.. *Nat Rev Cancer* 12, 252–264 (2012). <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
34. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors Jenkins, R., Barbie, D. & Flaherty, K. (2018). <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.434>

35. Conserved region C functions to regulate PD-1 expression and subsequent CD8 T cell memory Bally APR, Tang Y, Lee JT, Barwick BG, Martinez R, Evavold BD et al. 2017;198:205–17. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601464>
36. Regulatory mechanisms of PD-1/PD-L1 in cancers Lin, X., Kang, K., Chen, P. et al. . Mol Cancer 23, 108 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12943-024-02023-w>
37. Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, Patt D, Chen TT, Berman DM, Wolchok JD (2015). Volume 33 Number 17 <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.2736>
38. Novel immune check point inhibiting antibodies in cancer therapy—Opportunities and challenges. Diesendruck, Y., & Benhar, I. (2017). Drug Resistance Updates, 30, 39–47. doi:10.1016/j.drug.2017.02.001
39. Current understanding of CTLA4: from mechanism to autoimmune diseases Md Munnaf Hossen^{1,2,3†}, Yanmei Ma^{1,2,3†}, Zhihua Yin^{1,3}, Yuhao Xia^{2,4}, Jing Du⁴, Jim Yi Huang⁵, Jennifer Jin Huang⁶, Linghua Zou^{1,7}, Zhizhong Ye^{1,3*} and Zhong Huang 2023 DOI 10.3389/fimmu.2023.1198365
40. CTLA-4-Mediated Inhibition in Regulation of T Cell Responses: Mechanisms and Manipulation in Tumor Immunotherapy Cynthia A. Chambers, Michael S. Kuhns, Jackson G. Egen, and James P. Allison Vol. 19:565-594 2001 <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.565>
41. Mariaule, G.; Belmont, P. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors as Marketed Anticancer Drugs: Where Are We Now? A Short Survey. *Molecules* 2014, 19, 14366-14382. <https://doi.org/10.3390/molecules190914366>

42. Ocklind, G. (1986). Stimulation of human lymphocytes by phytohemagglutinin (PHA) in a new ultra-microtest plate. *Immunobiology*, 171(4-5), 339–344. doi:10.1016/S0171-2985(86)80066-3
43. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Investig.* 1968. № 21(97). P. 1-9.
44. Parcs DR, Lanier L, Herrengerg LA (1986) Flow cytometry and fluorescence activated cell sortins (Facs). *Handbook of Experimental Immunology*: 302–324.
45. Monoclonal Antibodies: A Review Surjit Singh^{1,*}, Nitish K. Tank¹ , Pradeep Dwiwedi¹ , Jaykaran Charan¹ , Rimplejeet Kaur¹ , Preeti Sidhu² and Vinay K. Chugh³ *Current Clinical Pharmacology*, 2018, 13, 85-99 doi:<https://doi.org/10.2174/1574884712666170809124728>
46. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects Sanchita Mitra and Pushpa Chaudhary Tomar *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* Volume 19, article number 159 2021 <https://link.springer.com/article/10.1186/s43141-021-00264-6>
47. Біотехнологія - В. Г. Герасименко – 2006 Частина II. Спеціальні біотехнології Розділ 14. Біотехнологія одержання моноклональних антитіл (антитіл одного епітопу) https://lifelib.info/microbiology/biotechnology_1/99.html