МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ПОХІДНІ ПІРОЛУ В БІОЛОГІЇ І МЕДИЦИНІ

СИНТЕЗ, ПРОТИЗАПАЛЬНА І ПРОТИПУХЛИННА ДІЯ

Монографія

За науковою редакцією заслуженого діяча науки і техніки України, професора В. К. Рибальченка і члена-кореспондента НАН України Р. С. Стойки

КИЇВСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ 2023

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
Версія не для друку

УДК 615.276/.277.3:547.74:606+57
П64

Автори:
В. К. Рибальченко (передмова, вступ, розд. 1.1, 1.2, 2.4),
Р. С. Стойка (розд. 1.4, 3.1),
Г. М. Кузнєцова (розд. 1.2, 1.3, 3.2, 3.4, 3.5, узагальнення),
І. В. Бєлінська (розд. 2.4, 3.3, узагальнення),
А. В. Бичко (розд. 2.4), Н. В. Дзюбенко (розд. 3.2, 3.4, 3.5),
О. Ю. Ключівська (розд. 3.1), М. Д. Луцик (розд. 1.4),
Д. С. Мілохов (розд. 2.1, 2.2, 2.3), Т. В. Рибальченко (розд. 3.3),
Н. С. Фінюк (розд. 3.1), О. В. Хиля (розд. 2.1, 2.2, 2.3)

Рецензенти:
д-р мед. наук, проф. І. С. Дягіль,
д-р біол. наук, ст. наук. співроб. І. І. Ганусевич

Рекомендовано до друку вченою радою ННІ високих технологій (протокол 8 від 21 березня 2023 року)

П64 Похідні піролу в біології і медицині: синтез, протизапальна і протипухлинна дія : монографія / В. К. Рибальченко, Р. С. Стойка, Г. М. Кузнєцова та ін. ; за наук. ред. В. К. Рибальченка, Р. С. Стойки. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2023. – 279 с.

ISBN 978-966-933-224-0

Викладено найновіші результати розробок і досліджень, отриманих біологами, хіміками та фізиками у сфері створення нових синтетичних сполук, зокрема й похідних піролу, для протидії запальним процесам і злоякісному росту пухлин, а також використання наноматеріалів для підвищення ефективності біологічної дії цих сполук у різних галузях біології, біомедицини й біотехнології. У логічно взаємопов'язаних розділах висвітлено питання молекулярного дизайну, синтезу, біологічної активності та безпечності для організму похідних піролу, що мають протизапальну та протипухлинну активність щодо колоректального раку.

Для дослідників, які розробляють нові препарати для протидії запальним процесам і злоякісному росту пухлин, та студентів і викладачів медико-біологічних спеціальностей.

УДК 615.276/.277.3:547.74:606+57

ISBN 978-966-933-224-0

© Рибальченко В. К., Стойка Р. С., Кузнєцова Г. М. та ін., 2023
© Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ВПЦ "Київський університет", 2023

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет" Зображення для друку

21. Souglakos J., Androulakis N., Syrigos K. et al. FOLFOXIRI (folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) vs FOLFIRI (folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan) as first-line treatment in metastatic colorectal cancer (MCC): amulticentre randomised phase III trial from the Hellenic Oncology Research Group (HORG). Br J Cancer 2006; 94:798-805.

22. Tveit K. M., Guren T., Glimelius B. et al. Phase III trial of cetuximab withcontinuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX) versus FLOX alone in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: the NORDIC-VII study. J Clin Oncol 2012; 30:1755-62.

23. Xie Y. H., Chen Y. X., Fang J. Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. Signal Transduct Target Ther. 2020 20;5(1):22.

24. YuI S., Cheung W. Y. "Metastatic Colorectal Cancer in the Era of Personalized Medicine: A More Tailored Approach to Systemic Therapy", Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology, vol. 2018, Article ID 9450754, 11 pages, 2018.

25. Телетаева Г. М. Профилактика и лечение желудочно-кишечных осложнений лекарственной терапии (тошнота и рвота, мукозиты, диарея) / Г. М. Телетаева // Практическая онкология. – 2009. – Т. 10, № 3. – С. 158–167.

1.4. Імунна система і канцерогенез

Імунна система відіграє центральну (провідну) роль у захисті організму від чужорідних агентів і контролює сталість клітинного й гуморального складу організму. Її завдання – знищувати усе, що є *генетично чужорідним* – молекули інших організмів, молекули, до яких утворюються антитіла, мікроорганізми, а також пошкоджені клітини власного організму і злоякісно трансформовані клітини. Розрізняють центральні (кістковий мозок і тимус) і периферійні (селезінка, лімфатичні вузли та інші лімфоїдні тканини) органи імунної системи. До клітин імунної системи належать:

- лейкоцити (спеціальні клітини імунної системи);
- лімфоцити (Т-лімфоцити, В-лімфоцити, природні кілери або NK-клітини);

Вилучено-Київський політехнічний інститут
Версія не для друку

- фагоцити (макрофаги, еозинофіли, нейтрофіли, базофіли, дендритні клітини, клітини мікроглії, купферівські клітини);
- допоміжні клітини (тучні клітини, тромбоцити).

Імунітет класифікують на вроджений і набутий. Для першого імунна реакція є неспецифічною, тоді як для другого спостерігаємо специфічну реакцію на дію чужорідного антигена. У випадку вродженого імунітету зіткнення з інфекційним чинником приводить до негайної максимальної імунної реакції, тоді як за набутого імунітету існує латентний період між контактом з інфекційним чинником і максимальною реакцією на нього. Крім того, у вродженого імунітету немає імунологічної пам'яті, тоді як за набутого імунітету зіткнення із чужорідним агентом приводить до виникнення імунологічної пам'яті. Система набутого імунітету з'явилася в ході тривалої еволюції нижчих хребетних і забезпечує інтенсивнішу імунну відповідь й імунологічну пам'ять, коли кожний чужорідний мікроорганізм або чужорідна молекула "запам'ятовується" за властивостями їхніх унікальних антигенів.

За добу в організмі людини виникає від трьох до кількох сотень змінених (трансформованих) клітин. Залежно від стану імунної системи індивідуума, деякі з них утворюють злоякісні пухлини, усе ж у більшості випадків імунна система їх руйнує.

1.4.1. Антиканцерогенна і проканцерогенна дія імунних клітин

1.4.1.1. Імунна чекпойнт-блокада: роль рецептора PD-1 і його ліганда

Ураховуючи особливості функціонування імунної системи із захисту організму від патологічних чинників, зокрема й патологічних клітин, було багато спроб запрограмувати імунні клітини на специфічне розпізнавання та знищення патологічних, насамперед пухлинних, клітин. Імунологи **Джеймс Еллісон** і **Тасуку Хондзьо**, яким 2018 р. було присуджено Нобелівську премію із фізіології і медицини, розробили новий підхід до терапії раку [1]. У його основі – посилення активності імунної системи людини для долання онкологічних захворювань без використання радіо- або хіміотерапії, яким властиві серйозні негативні побічні

Видавництво Київського університету
Версія не для друку

ефекти. Відомо, що клітини імунної системи здатні виявляти та знищувати змінені клітини, зокрема й клітини, у яких відбулися мутації. Клітини-мутанти щоденно виникають у нормальному організмі, але імунні клітини перешкоджають їхньому розмноженню. Водночас у пухлинних клітин з'явився механізм для пригнічення імунного захисту організму. Згадані вчені розробили ефективні методи, застосування яких протидіє захисній реакції пухлинних клітин на дію імунних клітин. Вони встановили, як саме імунні клітини втрачають протипухлинну активність і як можна запобігати такій втраті.

Дж. Еллісон з'ясував, що блокування **білка CTLA-4**, залученого у функціонування імунної системи в організмі тварин зі злоякісними пухлинами, приводить до активування протипухлинної відповіді організму й регресії пухлин. Т. Хондзе ідентифікував **рецептор PD-1** (*programmed cell death protein-1*) на поверхні лімфоцитів і показав, що саме його активування призводить до пригнічення дії лімфоцитів на пухлинні клітини. З огляду на це блокування PD-1 посилює протипухлинну активність імунної системи. Отже, дослідження цих науковців лягли в основу нового підходу терапії раку (*"імунна чекпойнт-блокада")* без використання хіміо- і радіотерапії, шкідливих для організму. Створено препарат "Іпілімумаб", дієвою субстанцією якого є антитіла – блокатори білка CTLA-4, ефективні у протидії меланомі. Інший препарат – "Ніволумаб" – містить антитіла до білка PD-1 і рекомендований для лікування пацієнтів із меланомою, раком легенів, нирок і деяких інших видів раку. Дослідження, пов'язані з білком **CTLA-4 і** рецептором **PD-1**, належать до найактуальніших щодо проблем лікування раку і тому їм присвячено багато свіжих оглядів у провідних журналах медико-біологічного спрямування [2–15].

1.4.1.2. Роль молекули MR1 у маскуванні пухлинних клітин

2020 р. у відомому журналі Nature Immunology були опубліковані результати дослідження групи науковців з Університету Кардіфа (Велика Британія) [16]. Ці вчені зуміли "налаштовувати" імунну систему людини протидіяти пухлинним клітинам, що

вказує на можливість створення універсальних ліків проти раку. Відомо, що саме Т-лімфоцити відрізняють ракові клітини від здорових, але поки-що до кінця незрозуміло, як це відбувається. Встановлено, що рецептор лімфоцита взаємодіє з молекулою MR1, що міститься на поверхні кожної клітини організму людини. Є підстави вважати, що ракові клітини "використовують" MR1 для свого маскування від розпізнавання імунною системою.

Популяцію Т-клітин, що проліферують у відповідь на присутність клітин лінії A549 карциноми легені людини, ізолювали з мононуклеарів периферійної крові клінічно здорового донора. Одержаний клон Т-клітин, який отримав назву MC.7.G5, мав здатність убивати пухлинні клітини різного походження, незалежно від аломорфної експресії системи HLA (*human leukocyte antigen*), представленої групою споріднених білків, структура яких кодується генами основного комплексу гістосумісності *(major histocompatibility complex*, MHC) людини. Зазначені білки локалізовані на поверхні клітини і задіяні в регулюванні функціонування імунної системи, зокрема й у здатності вбивати пухлинні клітини, незалежно від аломорфної експресії їхніх HLA. Важливо наголосити, що вони не вбивають здорові клітини організму.

Було використано цікавий підхід "повногеномного скринінгу CRISPR–Cas9" ("*a genome-wide CRISPR–Cas9 screening*"), що дав змогу ідентифікувати гени, білкові продукти яких важливі для розпізнавання пухлинних клітин-мішеней Т-клітинами MC.7.G5 [16]. Зазначений підхід допоміг виявити клітини-мішені, які пережили кілерну дію Т-клітин MC.7.G5 через те, що в них були усунені ключові гени, необхідні для розпізнавання пухлинних клітин. У резистентних пухлинних клітинах ідентифіковано шість генів, а саме: гени *B2M*, *MR1*, *STAT6* і три гени, асоційовані із трансактивуванням β_2M і промоторами класу I і II MHC (*RFX*, *RFXANK* і *RFXAP*). Отже, Т-клітини MC.7.G5 розпізнають пухлинні клітини-мішені за допомогою білка MR1, що утворює гетеродимери з білком β_2M. Саме тому антитіла анти-MR1, але не антитіла до MHC I чи II типу, здатні блокувати розпізнавання пухлинних клітин-мішеней Т-клітинами MC.7.G5. З огляду на це твердження встановлено, що повернення гена білка MR1 у пухлинні клітини лінії A549 із нокаутом *MR1,* здійсненим за допомогою технології

CRISPR–Cas9, відновлювало їхню здатність розпізнаватися Т-клітинами МС.7.G5. Водночас нормальні клітини з різних тканин залишалися нечутливими до Т-клітин МС.7.G5 навіть тоді, коли рівень MR1 на їхній поверхні був суттєво підвищений за допомогою активування клітин чи дії стресових чинників.

Щоб підтвердити ефективність зазначеної системи розпізнавання пухлинних клітин-мішеней Т-клітинами МС.7.G5 *in vivo*, ці імунні клітини були імплантовані мишам із прищепленими їм лейкозними клітинами. Встановлено, що через 18 діб у мишей з імплантованими Т-клітинами МС.7.G5 відбувалося значне пригнічення росту пухлини й поліпшувалося їхнє виживання, порівняно з тваринами, яким не вводили Т-клітини МС.7.G5. Така дія *in vivo* залежала саме від експресії MR1 лейкозними клітинами, що було видно під час порівняння наслідків імплантації лейкозних клітин дикого типу і клітин $MR1^{-/-}$. Високий терапевтичний потенціал Т-клітин МС.7.G5 був підтверджений в експерименті, у якому Т-клітини були одержані від пацієнтів з меланомою на четвертій стадії і трансдуковані геном рецептора Т-клітин МС.7.G5. З'ясовано, що такі генетично модифіковані Т-клітини не лише розпізнавали, але й убивали автологічні і неавтологічні меланоми, не впливаючи на здорові клітини чи на меланоми $MR1^{-/-}$.

Отже, популяція Т-клітин МС.7.G5 здатна розпізнавати молекули MR1, специфічні для пухлинних клітин різного походження, що дає змогу вважати ці клітини потенційним засобом для панпухлинної імунотерапії. Автори розпочали роботу зі встановлення природи ліганда пухлинних клітин, що розпізнається Т-клітинами МС.7.G5. Існує припущення, що особливий вид Т-лімфоцитів може отримувати від білка MR1 сигнал про стан метаболізму клітини, зокрема і про його порушення у клітинах пухлини, але це ще необхідно довести.

1.4.1.3. Роль системи CAR-T у націлюванні імунних клітин на клітини пухлин

Серед інших механізмів, що використовує імунна система для дії на пухлинні клітини, найвідомішою є система **CAR-T**, яка націлює імунні клітини на лейкозні. Для вивчення її функціонування ізолюють Т-лімфоцити онкопацієнта, генетично перепрограмо-

Видавничо-поліграфічний центр Київського університету Вірсія не для друку

вують їх *in vitro*, щоб вони знаходили і знищували лейкозні клітини, після чого модифіковані лімфоцити повертають в організм пацієнта, де їхня кількість зростає з кожним контактом із раковими клітинами. Ураховуючи широке розповсюдження MR1 і незначну відмінність за його вмістом між окремими людьми, можна очікувати створення універсальної протипухлинної імунотерапії [16].

Сучасна протипухлинна імунотерапія, зокрема й використання інгібіторів імунних контрольних точок (*immune checkpoint inhibitors*, ICI) і терапія Т-клітинними рецепторами химерних антигенів (*chimeric antigen receptor*, CAR), відкрила нові перспективи в лікуванні пацієнтів з різними злоякісними захворюваннями, особливо тих, що мали поганий прогноз. Проте застосування інгібіторів імунних контрольних точок і терапії Т-клітинами CAR пов'язані із серйозними побічними ефектами, зокрема і впливом на серцево-судинну систему [17–18]. Оскільки імунотерапію планують використовувати для пацієнтів із високим ризиком чи вже наявними серцево-судинними захворюваннями, то загрози кардіотоксичності є ще вищими. У понад 40 % пацієнтів, яких піддавали терапії Т-клітинами CAR, спостерігали вияви нейротоксичності [19]. Хоча їхня клінічна картина була неоднорідною, але когнітивні розлади не обмежувалися мовними розладами, спостерігалися й непірамідні рухові розлади, що вказує на важку нейротоксичність. Зважаючи на це, упровадження методів імунотерапії онкохворих не є таким безапеляційним, як це здавалося на початку розвитку клітинної терапії [20].

1.4.1.4. Протуморогенні регуляторні Т-клітини (Treg)

Значний інтерес у дії імунної системи в канцерогенезі викликають регуляторні Т-клітини (Treg-клітини), що пригнічують аномально надмірну імунну реакцію на власні та несамостійні антигени, що виникає для підтримання імунного гомеостазу [21]. Встановлено, що Т-клітини беруть безпосередню участь у розвитку і прогресуванні пухлини, пригнічуючи протипухлинний імунітет. У пухлинному імунітеті існує кілька механізмів пригнічення імунітету клітинами Treg, а саме:

- інгібування костимулювальних сигналів CD80 і CD86, виражених дендритними клітинами;

Видавництво-поліграфічний центр Київського університету

- через цитотоксичний антиген Т-лімфоцитів-4;
- через поглинання інтерлейкіну (IL)-2 високоафінними рецепторами IL-2 з високим рівнем CD25;
- через секрецію інгібувальних цитокінів;
- через метаболічну модуляцію триптофану й аденозину;
- через безпосереднє знищення ефекторних Т-клітин.

Виявлено інфільтрацію Т-клітин у мікросередовище пухлини (*tumor microenvironment*, TME) у множинних пухлинах миші й людини. Хімічними механізмами притягування регуляторних Т-клітин до TME слугують градієнти різних хемокінів, таких як CCR4-CCL17 / 22, CCR8-CCL1, CCR10-CCL28 та CXCR3-CCL9 / 10/11. Потім регуляторні Т-клітини активуються і пригнічують протипухлинні імунні реакції. В імунотерапії раку активно розвиваються стратегії, скеровані на виснаження Т-клітин і контроль за їхніми функціями для підвищення протипухлинної імунної відповіді. Молекулярними мішенями є різні молекули, що активно експресуються Т-клітинами, такі як молекули імунних контрольних точок, рецептори хемокінів і метаболіти, на які націлюють антитіла і малі молекули, але необхідні й інші стратегії для посилення протипухлинних ефектів, обмежених у TME, щоб уникнути системних автоімуннних реакцій.

Ідентифікація пухлинних антигенів дала змогу розпочати різні маніпуляції з імунною системою господаря для лікування раку [22, 23]. Однак лише в обмеженої кількості пацієнтів після багаторазових щеплень були виявлені протипухлинні ефекти, такі як регресія пухлини, незважаючи на вимірювання гуморальних і клітинних імунних відповідей протипухлинних антигенів. Імуносупресивне мікросередовище пухлини тут є критичним бар'єром для розвитку й посилення ефективних протипухлинних імунних відповідей. Це середовище наповнене імунодепресивними клітинами, як-от регуляторні Т-клітини, супресорні клітини, що походять із мієлоїдної тканини (*myeloid-derived suppressor cells,* MDSC), асоційовані з пухлиною макрофаги. Крім того, тут спостерігаємо підвищену експресію імунодепресивних молекул, таких як PD-1 (молекула запрограмованої клітинної смерті-1 та її ліганд (PD-L1). Зважаючи на це, дедалі більшу увагу під

Вимірювально-лабораторний центр
Київський дендрологічний парк
Зразок не для продажу

час розроблення ефективних імунотерапій раку приділяють з'ясуванню контролю складних імуносупресивних мереж у ТМЕ.

Регуляторні Т-клітини відіграють центральну роль у підтриманні самотолерантності, захищаючи організм господаря від розвитку автоімунних захворювань й алергії. Водночас у злоякісних пухлинах вони перешкоджають імунному нагляду проти раку, властивому здоровим людям, і запобігають виробленню ефективного протипухлинного імунітету у хворих із пухлинами. Установлено, що протипухлинний імунітет пригнічується Т-клітинами, оскільки у мишей, яким давали моноклональні анти-CD25 антитіла для виснаження Т-клітин, виявлено відторгнення пухлини і зниження інтенсивності її росту. Застосування такої імунотерапії дає змогу зменшити кількість Т-клітин та/або пригнітити їхній вплив на імунітет.

Спочатку регуляторні Т-клітини визначали як CD4 + Т-клітини з високим рівнем експресії CD25 (α-ланцюг рецептора інтерлейкіну [IL]-2). Потім ген *FOXP3*, що є членом родини транскрипційних регуляторів Forkhead / winged-helix, був визначений як головний регулятор Т-клітин. Аргументи на користь цього висновку такі:

- миші-скарфі (*scurfy mice*) з мутацією рамкового зсуву гена *FOXP3* мають запалення у множинних органах, детерміноване Т-клітинами, що є летальним автоімунним захворюванням, зумовленим активуванням ефекторних Т-клітин і посиленим виробленням цитокінів, спричиненим відсутністю зазначених клітин;
- мутація гена *FOXP3* у людини призводить до синдрому IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked* – спадкове Х-зчеплене захворювання, що належить до первинних імунодефіцитів);
- примусова експресія *FOXP*3 у наївних Т-клітинах призводить до імуносупресивної функції. CD4+ CD25+ – наївні Т-клітини, трансфіковані *FOXP*3, можуть перетворюватися на CD4+CD25+Treg-подібні клітини, які продукують інгібувальні цитокіни й експресують типові молекули Т-клітин, такі як CD25, цитотоксичний антиген

Видавництво поліграфічний центр Київський університет Вересневе АЛЬМАРУМ

Т-лімфоцитів-4 (CTLA-4), і глюкокортикоїд-індукований фактор некрозу пухлини (*tumor necrosis factor*, TNF), пов'язаний із рецептором білок (GITR).

Отже, саме *FOXP*3 можна вважати специфічним маркером лінії Т-клітин і головним регуляторним геном у генерації, підтриманні та пригніченні імунної функції цих клітин [24, 25].

Регуляторні Т-клітини класифікують на природні/тимусні та периферійно індуковані, залежно від того, де вони розвиваються. Деякі клітини утворюються зі звичайних Т-клітин (периферійно індуковані клітини Treg) після стимулювання рецептора зазначених клітин (*T-cell receptor*, TCR) *in vitro* трансформуючим фактором росту (*transforming growth factor-beta,*TGF)-β або ретиноєвою кислотою [26–27].

Функції *in vivo* і стабільність периферійно індукованих Т-клітин, зокрема й TGF-β-індукованих клітин Treg, у людини залишаються мало зрозумілими. У моделі TCR-трансгенних тварин антиген-специфічні Т-клітини демонструють вищу імуносупресивну функцію порівняно з антиген-неспецифічними Т-клітинами, хоча останні також мають імунодепресивну активність.

Проаналізовано репертуар TCR Т-клітин, що інфільтрують пухлину в пацієнтів з метастатичною меланомою, раком шлунково-кишкового тракту та яєчників. Регуляторні Т-клітини в ТМЕ мали унікальний репертуар TCR, відмінний від інших звичайних CD4+ Т-клітин. TCR були специфічними для пухлинно-специфічних антигенів, тобто Т-клітини в ТМЕ розпізнавали специфічні для пухлини антигени. Ці Т-клітини з пухлинно-специфічними TCR також були виявлені на периферії пухлини. Отже, специфічне для пухлини активування і клональне поширення Т-клітин стимулюються локально і системно [28].

Виникає питання щодо значення накопичення Т-клітин у ТМЕ. Показано, що зазначені клітини хімічно притягуються градієнтами хемокінів. CCR4, CCR8, CCR10 і CXCR3 є рецепторами хемокінів, відповідальними за міграцію Т-клітин до ТМЕ у відповідь на хемокіни CC і CXC: CCR4 пов'язаний із CCL17, а CCL22,28 і CCR8 пов'язані із CCL1 [29].

Видавничо-поліграфічний центр
Київського університету
Перевірено ДЦ друку

Виведені з тимусу Т-клітини переважно розпізнають власні антигени за високоафінним TCR і клонально поширюються в ТМЕ, де міститься багато асоційованих із пухлиною автоантигенів з відмираючих пухлинних клітин, що розпізнаються клітинами Treg, а не ефекторними і Т-клітинами пам'яті. З огляду на це можна передбачити, що Т-клітини хімічно притягуються і розпізнають споріднені антигени, що містяться в ТМЕ, який призводить до активування та проліферації клітин Treg, сприяючи розвитку імунодепресивного ТМЕ. Імунодепресивні цитокіни, такі як TGF-β і IL-10, що продукуються пухлинними клітинами й імунними клітинами в ТМЕ, також збільшують кількість Т-клітин [30].

Виснаження Т-клітин збільшує протипухлинні імунні реакції та сприяє знищенню експериментальних пухлин у мишей. Важливо підкреслити, що таке виснаження викликало регресію одних типів пухлин, таких як MethA і RL-самець 1, але не впливало на інші типи пухлин, такі як AKSL2 і RL-самка 8. Це ставить під сумнів високу ефективність терапії, спрямованої на Т-клітини, проти всіх пухлин. Дійсно, клінічне випробування (фаза I) виснаження зазначених клітин шляхом уведення моноклональних анти-CCR4 антитіл пацієнтам із солідними пухлинами привело до посилення протипухлинної імунної відповіді лише у кількох пацієнтів, тоді як у більшості пацієнтів клінічних реакцій не спостерігали. Крім того, виснаження Т-клітин може збільшити ризик побічних імунних явищ (*immune-related adverse events,* irAE), таких як токсичність, що пов'язана з автоімунністю. Зважаючи на це, для кращої безпеки терапії, спрямованої на Т-клітини, слід застосовувати селективне виснаження клітин eTreg у ТМЕ, а не системне виснаження усіх Т-клітин, щоб посилити протипухлинні ефекти, не викликаючи шкідливого irAE. Отже, необхідно виявити біомаркери, що розрізняють пухлини, у яких Т-клітини є важливими для росту пухлини, зважаючи на імуносупресивну мережу в ТМЕ.

Іншим підходом для дії на Т-клітини є модуляція їхніх функції та інфільтрації. Цього можна досягти маніпулюванням віссю хемокінів та/або цитокінів, внутрішньою сигналізацією цих клітин або їхніми метаболітами. Наявність специфічних метаболітів у ТМЕ, таких як індолеамін 2,3-діоксигеназа (*indoleamine 2,3-dioxygenase*, IDO)

й аденозин, помітно впливає на функцію Т-клітин і стабільність лінії. Цьому сприяє обмін жирних кислот, прискорений гліколітичний метаболізм у ракових клітинах, що приводить до споживання глюкози та збільшення вмісту молочної та жирних кислот у ТМЕ. *FOXP*3 сприяє окисному фосфорилюванню та збільшенню окиснення нікотинаміду аденін-динуклеотиду шляхом зменшення гліколізу за рахунок пригнічення експресії білка Myc. Крім того, модуляція PI3K змінює характер експресії *FOXP*3 [31].

Клінічне значення цих сигнальних шляхів і метаболітів у Т-клітинах до кінця не з'ясоване, але регулювання їхньої внутрішньої сигналізації та метаболізму, а також сигналізації транскрипції залишається перспективною терапевтичною ціллю в імунотерапії раку.

1.4.1.5. Протуморогенний регуляторний потенціал γδ Т-клітин

Дослідження взаємовідносин компонентів імунної системи з пухлиною розкриває їхню складність і неоднозначність. Яскравим прикладом тут є незвичні функції γδ Т-клітин, які в контексті раку виявилися на боці пухлини, а не організму [32]. Певні різновиди γδ Т-клітин були обрані як потенційні мішені для імунотерапії, оскільки вони мають великий регуляторний потенціал щодо пухлинних клітин. Дослідження регуляції γδ Т-клітин у мікросередовищі пухлини, зокрема й під час її прогресування, виявило динамічну та складну природу інфільтрувальних γδ Т-клітин [33–34].

Різні популяції γδ Т-клітин, які виявляють у мікросередовищі пухлини, називають системою Хейлінга. У мишей ці популяції складаються з Vγ6, Vγ4 та Vγ1 [35–36]. Клітини Vγ6 є основними прозапальними Т-клітинами в пухлині і переважно продукують IL-17 разом з іншими запальними цитокінами, зокрема й IL-22, GM-CSF та IL-8 [37–40].

Клітини Vγ4 відіграють важливу роль як у запаленні, так і в нагляді за пухлиною, і здатні продукувати IL-17 та IFN-γ [36, 40], тоді як клітини Vγ1 виявляють супресивний фенотип завдяки продукуванню TGF-β та IL-10 [36, 41, 42].

Видавничо-поліграфічний центр
"Київський університет"
Зверення до Автору

У людини наявні клітини Vγ9Vδ2 та Vδ1+, причому залежно від типу пухлини одна підгрупа цих клітин може переважати над іншою [39, 43, 44]. *In vivo*, Vγ9Vδ2-клітини беруть більшу участь в імунологічному нагляді та регуляції розвитку пухлини, однак *in vitro* вони мають надзвичайну пластичність, що дає змогу диференціюватись на багато пропухлинних фенотипів, серед яких Treg-подібні та Th2-подібні [45, 46].

Клітини Vδ1+, особливо в епітеліальних тканинах молочної залози і товстої кишки, можуть бути або потужними прозапальними клітинами завдяки виробленню ними IL-17 й інших цитокінів, або пов'язаними з ними супресивними клітинами, здатними різко зменшити здатність імунної системи вбивати пухлинні клітини [39, 43]. Загалом регуляція γδ Т-клітин здійснюється або через контакт між клітинами, або за допомогою розчинних факторів, таких як цитокіни.

Ураховуючи, що γδ Т-клітини перетинаються на лінії між уродженою й адаптивною імунною системою, важливо з'ясувати механізми їхньої регуляції в пухлинах. Виникає питання, чи регулюються ці клітини за допомогою розпізнавання антигену в їхніх TCR, чи шляхом стимулювання цитокінів, або обома цими механізмами? Раніше вважали, що велика частина γδ Т-клітин миші попередньо запрограмована в тимусі ембріона до продукції IL-17 або IFN-γ [47]. Однак незабаром виявили, що деякі популяції мишачих γδ Т-клітин можуть також бути індуковані на периферії [47].

Показано, що лікування нейтралізувальними антитілами до IL-1β знижує рівень IL-17 у селезінці, крові, LN та легенях. Отже, клітини γδT17, що інфільтрують пухлину, є основними продуцентами IL-17 у цих тканинах [38].

Є підстави вважати, що існують чотири незалежні механізми, залучені до стимулювання γδ Т-клітини, а саме:

- продукування IL-17a,
- γδ Treg-подібна і γδTh-2-подібна активність,
- інгібування ефекторної функції дендритних клітин,
- PD-1/PDL-1-опосередковане пригнічення імунної контрольної точки.

Молекули контрольної точки імунного контролю, PD-1 та його ліганд PDL-1/2 є одними з основних регуляторних механізмів пропухлинного імунітету зі здатністю інгібувати ефекторну функцію Т-клітин і продовжувати їхній розвиток. Оскільки відповідь на терапію PD-1/PDL-1 все ще коливається на рівні приблизно 40 %, то необхідне подальше дослідження механізмів модуляції осі PD-1/PDL-1.

Отже, мікросередовище пухлини містить γδ Т-клітини, що є функціонально багатогранними і композиційно неоднорідними. Ці пропухлинні γδ Т-клітини регулюються і виявляють свою активовану пропухлину активність за допомогою різних механізмів. Багато з того, що ми нині знаємо про поляризацію і пластичність γδ Т-клітин, базується на результатах досліджень, проведених *in vitro*, що не дають повного уявлення про те, як γδ Т-клітини регулюються в надзвичайно складному мікросередовищі пухлини *in vivo*. Водночас встановлено, що γδ Т-клітини стимулюють ріст пухлини, що дає змогу виявити потенційні молекулярні та клітинні мішені дії нових препаратів для імунотерапії раку. Такими корисними мішенями можуть бути цитокіни IL-1β, IL-23, IL-17 і GM-CSF, що відіграють важливу роль за високосупресивної інфільтрації MDSC й ангіогенезу, оскільки вони є важливими гравцями у прогресуванні пухлини. Для ракових захворювань, де клітини γδ T17 не є первинною ланкою γδ Т-клітин, слід орієнтуватися на такі молекули, як PD-L1, галектин-1 та IL-4, що можуть виявитися важливими для надання допомоги адаптивним протипухлинним імунним ефектам, щоб ухилитися від дії імунітету. Також імовірно, що пухлинні γδ Т-клітини можуть бути використані як біомаркери для індивідуального відбору пацієнтів та моніторингу їхньої реакції на лікування.

Видавничо-поліграфічний центр
"Київський університет"
Версія нефільтрує

1.4.2. Дослідження механізмів резистентності лабораторних мишей до прищеплення їм експериментальних пухлин

Відомо, що розвиток резистентності пухлинних клітин до медикаментозних чинників є серйозною проблемою, що впливає на ефективність хіміотерапії. За 6–12 місяців така резистентність виникає у значної кількості лікованих онкохворих [48]. Водночас учені спостерігають, хоч і значно рідше, природне несприйняття лабораторними тваринами прищеплення їм злоякісних пухлин. Причини такого феномена досліджені мало, хоч й викликають значний інтерес. Є підстави вважати, що в основі цього феномена лежать особливості функціонування імунної системи в окремих організмів.

Під час роботи із мишачими пухлинами, такими як лімфома NK/Ly (одержані з банку пухлинних клітин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України, Київ), нами встановлено, що приблизно 5 % тварин виживають після прищеплення їм клітин зазначених пухлин. Ба більше, у цих тварин розвивається несприйнятливість до прищеплення їм пухлини за повторного введення пухлинних клітин. Показано, що асцит у цих тварин або не утворюється, або після нетривалого росту повністю резорбується.

Для з'ясування механізмів виникнення резистентності мишей лінії C57BL/7 до прищеплення їм лімфоми NK/Ly вивчали стан клітин імунної системи у тварин. На рис. 1.6 представлено динаміку ваги тіла мишей із лімфомою NK/Ly, визначену зважуванням тварин. Мишам було інокульовано 2,5 млн пухлинних клітин на особину. Резистентність тварин до росту лімфоми NK/Ly викликали 3-кратним уведенням їм вінбластину в дозі 2,5 мг/кг маси тварин на 6, 9, 14 добу росту асцитної пухлини з одночасним наступним видаленням утвореного асциту із черевної порожнини. У деяких мишей це приводило до повного припинення росту пухлини асциту, а після повторних інокуляцій пухлинних клітин таким мишам наростання асциту (пухлини) у них не спостерігали. Через 2–3 доби після інокуляції пухлинних клітин проводили пункцію черевної порожнини і вимивали фізіологічним розчином невелику кількість клітин для подальшого цитоморфологічного дослідження.

Видавничо-поліграфічний центр
Київського університету
Видання не для продажу

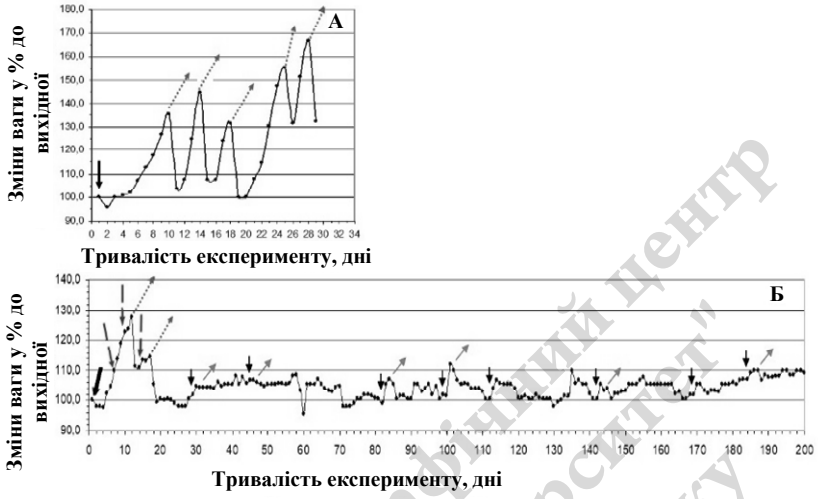


Рис. 1.6. Динаміка ваги тіла мишей лінії C57BL/7, як показник індукованої у них резистентності до прищеплення лімфоми NK/Ly; А – контроль (миша 281009 в); Б – миша 281009 б із резистентністю до прищеплення пухлини, індукованої лікуванням вінбластином (тривалість життя миші становила 406 діб). Чорними довгими потовщеними стрілками позначено початкову інокуляцію пухлинних клітин; чорними короткими прямими стрілками – повторні інокуляції пухлинних клітин; довгими сірими штрихованими стрілками – уведення вінбластину; довгими сірими стрілками з крапками – видалення асциту у піддослідних мишей за допомогою дренажу; короткими сірими стрілками, нахиленими вгору праворуч – вимивання клітин із черевної порожнини фізіологічним розчином після повторних інокуляцій пухлинних клітин

Нами здійснено цитологічне дослідження популяції асцитних клітин мишей-реконвалесцентів після проведеного лікування лімфоми NK/Ly з повторною інокуляцією клітин цієї пухлини. Було виявлено утворення пухлинних клітин гігантських розмірів (макроцитоз), деструкцію ядер цих гігантських клітин, а також масивну інфільтрацію асциту мононуклеарами (клітини малого розміру) і деструкцію ними пухлинних клітин NK/Ly (рис. 1.7).

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
Вересень 2014 року

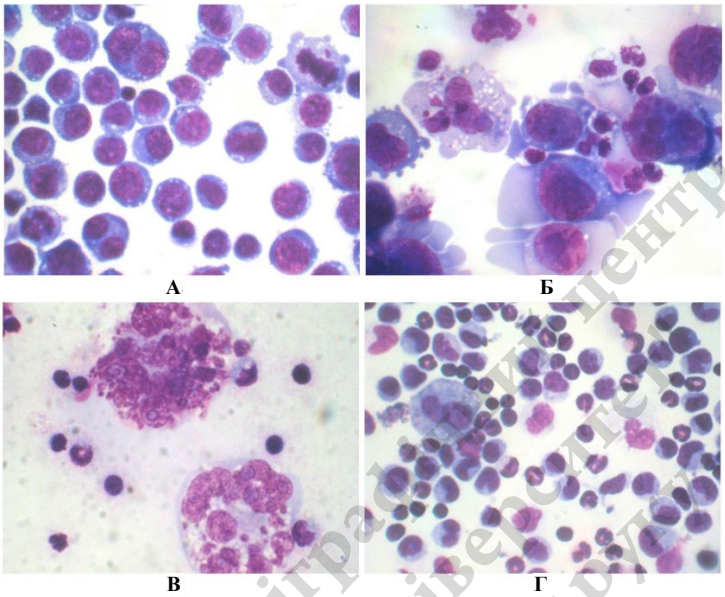


Рис. 1.7. Клітини асциту лімфоми NK/Ly мишей лінії C57BL/7 на сьому добу росту пухлини (А) та у мишей з індукованою резистентністю до росту пухлини через три доби (Б, В) і дві доби (Г) після повторної інокуляції пухлинних клітин; забарвлення клітин асциту азур-еозином у модифікації Р. Ліллі (об'єктив × 40, окуляр – ×15); Б – утворення пухлинних клітин гігантських розмірів (макроцитоз); В – деструкція ядра гігантських клітин; Г – масивна інфільтрація асциту мононуклеарами (клітини малого розміру) і деструкція ними пухлинних клітин NK/Ly

На рис. 1.8 видно, що пошкодження клітин призводить до зменшення у них умісту білка, що відображається ослабленням інтенсивності забарвлення цитоплазми клітин бромфеноловим синім. Крім того, відмерлі клітини містять сліди білка в цитоплазмі і їх видно лише за слабко вираженим контуром плазматичної мембрани. Лімфоцити представлені найменшими клітинами з інтенсивним синім контуром цитоплазми. На наведеному рисунку кількість лімфоцитів становить 34,7 %, а пошкоджених пухлинних клітин – 45 % (лімфоцити не враховані).

Видавничий поліграфічний центр «Київський університет» Берсенєв А.Ю. ДЛЯ ДРУКУ

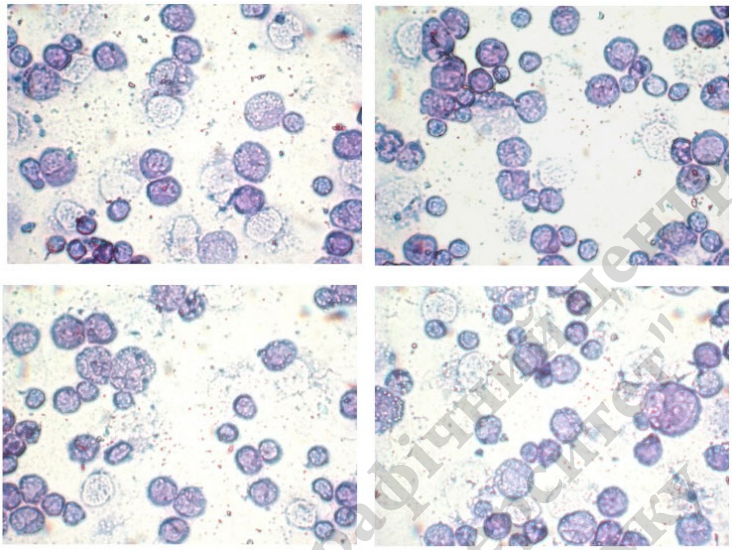


Рис. 1.8. Клітини асциту мишей лінії C57BL/7 із прищепленою їм лімфомою NK/Ly;
забарвлення клітин бромфеноловим синім на наявність білка в цитоплазмі; збільшення 40 × 15

З'ясовано, що вміст мононуклеарних лейкоцитів в асциті мишей, резистентних до росту пухлини, приблизно в чотири рази вищий, ніж в асциті контрольних (нерезистентних) тварин (табл. 1.1). Найбільший відсоток мононуклеарів спостерігали за відбору асциту через дві доби після реінокуляції пухлинних клітин, тоді як через три доби і пізніше відсоток мононуклеарів поступово зменшувався. Паралельно знижувалася загальна кількість пухлинних клітин і спостерігали більш виражене пошкодження їхньої морфології. З огляду на ці дані можна зробити висновок, що для ізолювання лейкоцитів з асциту резистентних тварин для дослідження біологічної активності й ідентифікації лімфоцитів асцит доцільно забирати саме через дві доби після повторної інокуляції пухлинних клітин.

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
Не для друку

Таблиця **1.1**

Відсоток лейкоцитів у внутрішньочеревній рідині мишей лінії C57Bl/7, резистентних до росту лімфоми NK/Ly, після повторних інокуляцій їм пухлинних клітин

Умови одержання внутрішньочеревної рідини	Відсоток лейкоцитів у клітинній популяції внутрішньочеревної рідини ($M \pm m$)
Внутрішньочеревна рідина після інокуляції пухлинних клітин інтактним мишам (контроль, $n = 11$)	10,9 ± 1,2
Внутрішньочеревна рідина після інокуляції пухлинних клітин мишам з індукованою резистентністю до росту пухлини ($n = 8$)	46,5 ± 4,9

Нами ізольовані лейкоцити з асцитної рідини тварин шляхом центрифугування клітин асциту у градієнті густини фікол-верографінової суміші (густина 1,080 г/см^3). Унаслідок цього одержано фракцію клітин із типовою морфологією лімфоцитів (рис. 1.9) і проведено поглиблений аналіз асциту, що продукується у мишей, резистентних до прищеплення пухлини.

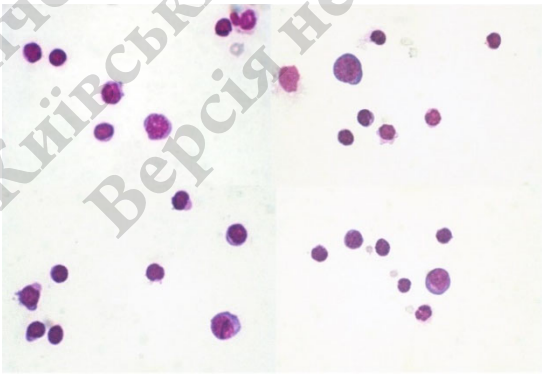


Рис. 1.9. Мононуклеарні клітини лімфоїдного ряду із внутрішньочеревної рідини мишей лінії C57BL/7, резистентних до прищеплення їм лімфоми NK/Ly, одержані через 2 доби після реінокуляції пухлинних клітин. Збільшення 40 × 15

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет" Версія не для друку

Зважаючи на те, що тривалу ремісію після лікування прищепленої пухлини у мишей спостерігали відносно рідко і непередбачувано, були зроблені спроби викликати резистентність до пухлини NK/Ly шляхом внутрішньочеревної інокуляції мишам підпорогової кількості пухлинних клітин, що б не викликала росту пухлини. Встановлено, що така кількість становила 10–15 тис. клітин, однак зі значними відхиленнями залежно від індивідуальних особливостей миші. Проте за повторної інокуляції таким мишам пухлинних клітин спостерігали ріст пухлини, хоч і суттєво сповільнений. Цитологічне дослідження асциту загиблих тварин виявило значне підвищення популяції мононуклеарів (рис. 1.10), а також появу морфологічно змінених (пошкоджених) пухлинних клітин. З огляду на це зроблено висновок, що імунізація мишей мінімальними (підпороговими) кількостями живих пухлинних клітин NK/Ly не забезпечує виникнення стабільної і відтворної резистентності до цієї пухлини.

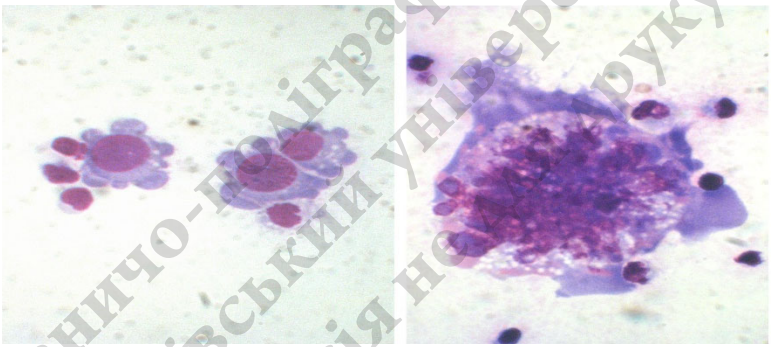


Рис. 1.10. Адгезія лімфоїдних і мононуклеарних клітин до пухлинних клітин NK/Ly за їхньої повторної інокуляції резистентним мишам лінії C57BL/7;
об'єктив 40, окуляр 15; А – миша 180809; Б – миша 220809

У наступних дослідженнях резистентність до прищеплення лімфоми NK/Ly у мишей вдалося індукувати шляхом їхньої імунізації (вакцинації) суспензією неживих клітин NK/Ly, отриманих після їхньої пермеабілізації сапоніном із каштана. Оброблення клітин сапоніном здійснювали так: свіжоотриманий асцит розводили стерильним розчином 0,9 % хлориду натрію до концентрації клітин у межах 500–800 тис./мл (підрахунок проводили в гемоцитометричній камері) і додавали 1/10 об'єму стерильного 2-відсоткового розчину сапоніну (кінцева концентрація 2 мг/мл). Суспензію витримували

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет" Копія не для продажу

30 хв за 37° С і періодично струшували. Після охолодження до кімнатної температури мишам уводили внутрішньочеревно суспензію, що містила певну кількість клітин. Спочатку вводили 150–200 тис. клітин, через 18–20 днів повторно вводили 400–500 тис. клітин. Через 2–3 тижні інокулювали внутрішньочеревно 150–200 тис. інтактних (живих) асцитних клітин NK/Ly інтактним (контрольним) і вакцинованим мишам. Зазначена кількість живих клітин забезпечувала звичний ріст пухлини в контрольних мишей. Приклад такого експерименту наведено на рис. 1.11.

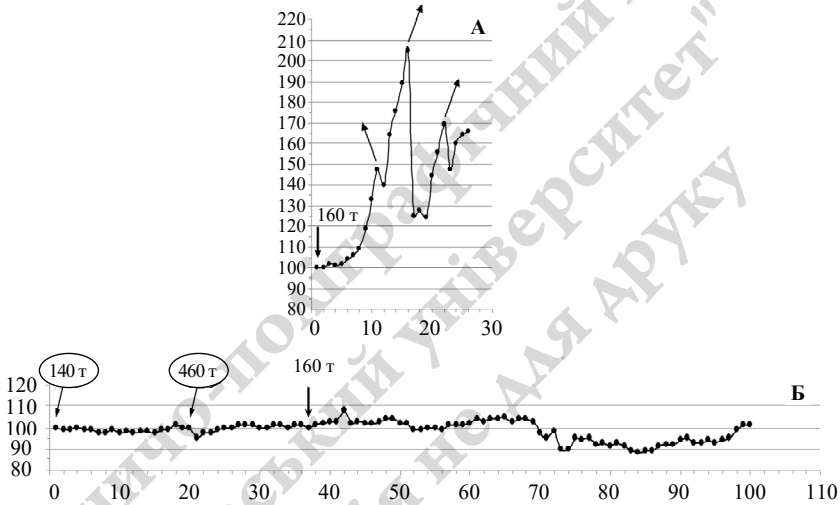


Рис. 1.11. Результати вивчення індукування резистентності до лімфоми NK/Ly у миші лінії C57BL/7 шляхом її вакцинування пухлинними клітинами, пермеабілізованими сапоніном; А – нелікована миша, Б – миша, вакцинована попереднім уведенням пермеабілізованих клітин NK/Ly. На осі абсцис – доби експерименту, на осі ординат – зміна ваги тіла мишей у відсотках щодо початкового значення, прийнятого за 100 %. Для А: чорна стрілка із потовщеною лінією – прищеплення пухлини введенням життєздатних асцитних клітин NK/Ly (кількість клітин у тисячах – вказано над стрілкою); стрілки із непотовщеною лінією, спрямовані вгору – дренаж асциту (у контрольної миші, у вакцинованої миші ріст пухлини відсутній, асцит не утворюється). Для Б: перша і друга чорні стрілки, спрямовані вниз і ліворуч – внутрішньочеревне введення суспензії пермеабілізованих клітин NK/Ly (1-й і 20-й день, кількість клітин у тисячах вказано над стрілкою); чорна третя стрілка із потовщеною лінією – прищеплення пухлини введенням життєздатних асцитних клітин NK/Ly (кількість клітин у тисячах – вказано над стрілкою)

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет" Копія не для друку

Отже, можна припустити, що виникнення резистентності експериментальних тварин (миші) до прищеплення їм лімфоми NK/Ly, головним чином, зумовлене клітинними механізмами, зокрема й появою у тварин цитотоксичних лімфоцитів зі специфічною дією на клітини цієї пухлини. Крім того, клітини лімфоми можуть різнитися за своїми властивостями, які в підсумку визначають ступінь їхньої злоякісності. З огляду на це, у розд. 1.4.3 досліджено гетерогенність популяції клітин лімфоми NK/Ly, зокрема за їхнім розміром і рівнем експонування вуглеводних детермінант на їх поверхні.

1.4.3. Гетерогенність клітин асциту мишачої лімфоми NK/Ly за розміром і вмістом поверхневих рецепторів до галактозоспецифічного лектину арахісу

У дослідженні використовували клітини мишачої лімфоми NK/Ly після їхньої префіксації глутаровим альдегідом у низькій концентрації (0,2 %), що дає змогу краще зберігати клітини. Префіксовані клітини стійкі до перепадів осмотичного тиску, тому їх можна фракціонувати у градієнті густини сахарози, тоді як для нативних клітин необхідно застосовувати градієнт густини фіколу або іншого полімеру. Після дії хіміотерапевтичних препаратів пухлинні клітини, особливо збільшених розмірів, поступово руйнуються від механічних чинників і навіть від кількагодинного перебування за кімнатної температури або 4° С. Водночас ізольовані субпопуляції префіксованих клітин придатні як для морфологічних досліджень, так і для дослідження біохімічного складу клітин.

Застосована нами методика префіксації асцитних клітин лімфоми миші полягала в такому: 100–300 млн асцитних клітин, що містяться в 1–3 мл асциту, промивали двічі п'ятьма об'ємами охолодженого до 4° С забуференого сольового розчину (*phosphate buffered saline*, PBS), збираючи клітини центрифугуванням за 1500 хв$^{-1}$. Осад клітин суспендували у п'яти об'ємах 0, 2 % розчину глутарового альдегіду в PBS і витримували 20–30 хв за 4° С, після чого клітини двічі промивали холодним трис-сольовим розчином, pH 7,4 (*tris-buffered saline*, TBS). Для блокування залишкових альдегідних груп клітини додатково витримували в 0,1 М

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
Бібліотека ім. А.М. Лук'яненка

розчині гліцину в буфері TBS протягом 30 хв за кімнатної температури, після чого промивали їх TBS. Клітини суспендували у 2-3 об'ємах буферу TBS і зберігали за 4° С.

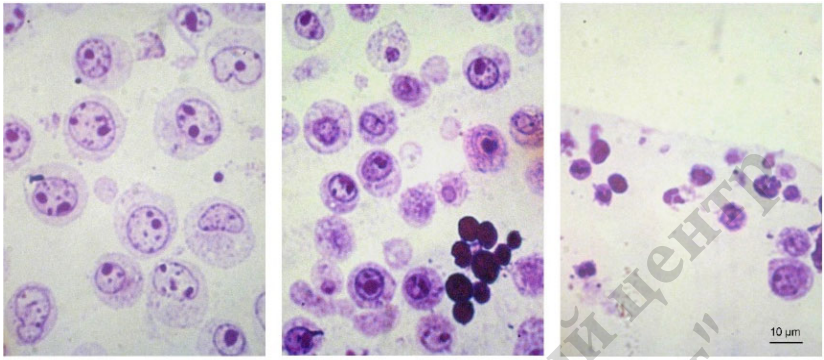
Фракціонування популяції лімфомних клітин за розмірами здійснювали у градієнті густини сахарози, що готували із двох розчинів:

- 20 % сахароза у 0,01 М трис, pH 7,4;
- TBS.

У пластиковій колонці, виготовленій із пробірки на 50 мл, створювали градієнт густини сахарози із 10 шарів, висота стовпчика градієнта становила 5 см. На шар агарози наносили 2,5–3 мл 25 % суспензії клітин у TBS (один об'єм клітинного осаду суспендовано у трьох об'ємах TBS) і залишали на 2 год за кімнатної температури. Після цього рідину з колонки збирали фракціями по 1 мл, а розміри клітин у фракціях визначали у гемоцитометричній камері. Одержані фракції клітин об'єднували у три фракції залежно від розмірів клітин – гігантські клітини (діаметр 30–40 мкм), клітини середньої величини (діаметр 12–15 мкм) і малі клітини (діаметр 8–10 мкм), представлені лімфоцитами та близькими за розміром пухлинними клітинами.

На рис. 1.12 показано морфологію клітин в одержаних фракціях. Після забарвлення цитологічних мазків азур-еозином за методом Романовського – Гімза виявляється структура малих клітин NK/Ly і лейкоцитів, тоді як префіксовані великі клітини NK/Ly погано розпластуються на склі і мають вигляд забарвлених куль із слабко вираженою внутрішньоклітинною структурою. Для виявлення внутрішньоклітинної структури великих клітин застосували технологію напівтонких зрізів клітин, залитих в епоксидну смолу, як це роблять під час електронної мікроскопії. Товщина напівтонких зрізів досліджуваних клітин становила 1–1,5 мкм. Після забарвлення клітин кристалічним фіолетовим (генціанвіолет) в них добре проявляється внутрішня структура, особливо чітко забарвлюються ядра і ядерця.

Видавничий центр «Київський університет»
Версія не для друку



А Б В

Рис. 1.12. Морфологія різних за розмірами субпопуляцій клітин лімфоми NK/Ly; зрізи (1,5 мкм) клітин забарвлювали кристалічним фіолетовим; А – гігантські клітини (діаметр 30–40 мкм); Б – клітини середньої величини (діаметр 12–15 мкм) з інтенсивно забарвленою групою агрегованих лімфоцитів; В – малі клітини (діаметр 8–10 мкм). Масштаб – 10 мкм, спільний для усіх зразків

Отже, поява лімфомних клітин гігантських розмірів відбувається за дії цитотоксичних чинників, наприклад, протипухлинних препаратів, і це може призводити до розвитку резистентності злоякісних клітин до таких препаратів. Водночас гігантські форми пухлинних клітин є менш стабільними за їхнього культивування *in vitro* [49–50].

Фракціонування клітин мишачої лімфоми NK/Ly за вмістом поверхневих рецепторів до галактозоспецифічного лектину арахісу проводили за допомогою методу пенінгу, принцип якого полягає в адсорбції клітин зі спорідненістю до лектину арахісу в чашках Петрі на поверхні гелю з іммобізованим лектином [51–52]. Після видалення неадсорбованих клітин промиванням поверхні гелю адсорбовані клітини десорбували розчином галактози з одночасним змиванням струменем сольового розчину. Етапи процесу контролювали за допомогою стереомікроскопа МБС-9.

Для фракціонування клітин лімфоми NK/Ly свіжоотриману асцитну рідину розводили сольовим розчином TBS до концентрації клітин 4 млн/мл. 5 мл такої суспензії (20 млн клітин) вносили у пластикові чашки Петрі (діаметр 85 мм), у яких містився гель з іммобілізованим лектином арахісу (*peanut agglutinin*, PNA).

Видавничо-поліграфічний центр
Вітебський державний університет
імені П.М. Машерова

Чашки витримували горизонтально 60 хв за кімнатної температури. Зазначена кількість клітин осідає моношаром на поверхні гелю. Розчин видаляли відсмоктуванням шприцом із пластиковим капіляром замість голки, поверхню гелю промивали 5 мл TBS, адсорбовані на поверхні гелю клітини змивали струменем суміші TBS і 5 % галактози 1:1, що подавали з піпетки. Повноту десорбції клітин контролювали під мікроскопом. Одержані фракції клітин (не адсорбовані й адсорбовані на гелі) промивали розчином TBS із додатком безклітинної асцитної рідини у співвідношенні 3:1. Для цитохімічного виявлення зв'язування лектину арахісу аліквоту суспензії, що містила 3–5 млн клітин, фіксували глутаровим альдегідом, як зазначено вище.

Нами оптимізовано описаний раніше метод непрямого імуноцитохімічного визначення зв'язування лектину арахісу з клітинами. Для цього усі стадії оброблення клітин у кількості 1 млн здійснювали в об'ємі 0,1 мл в одній пробірці типу Еппендорф. Інкубацію проводили на внутрішній стороні кришки пробірки Еппендорф, останню фіксували догори дном і витримували за 4°С. Зміну розчинів і промивання клітин проводили центрифугуванням у тій самій пробірці. Така модифікація методу суттєво полегшує і прискорює процес, а також дає змогу економніше використовувати реагенти.

На рис. 1.13 наведено результати зв'язування лектину арахісу одержаними фракціями клітин лімфоми NK/Ly, завдяки чому вдалося досягнути чіткого розділення лімфомних клітин на фракції PNA^+ (зв'язують лектин арахісу) і PNA^- (не зв'язують лектин арахісу).

Унаслідок проведених досліджень нами встановлено, що після введення протипухлинних препаратів мишам у їхньому асциті помітно зростає кількість злоякісних клітин зі збільшеними розмірами [49–50]. Характер розподілу клітин більшого діаметру суттєво залежить від типу хіміопрепарату, що вводили мишам (рис. 1.14). Встановлено залежне від дози доданого алкалоїду зростання кількості пухлинних клітин збільшеного розміру [50]. Воно корелює зі зростанням питомого вмісту лактатдегідрогенази і кислої фосфатази в асцитній рідині, що вказує на руйнування пухлинних клітин із витіканням з них згаданих ензимів.

Видавничо-поліграфічний центр Київського університету Верстка для друку

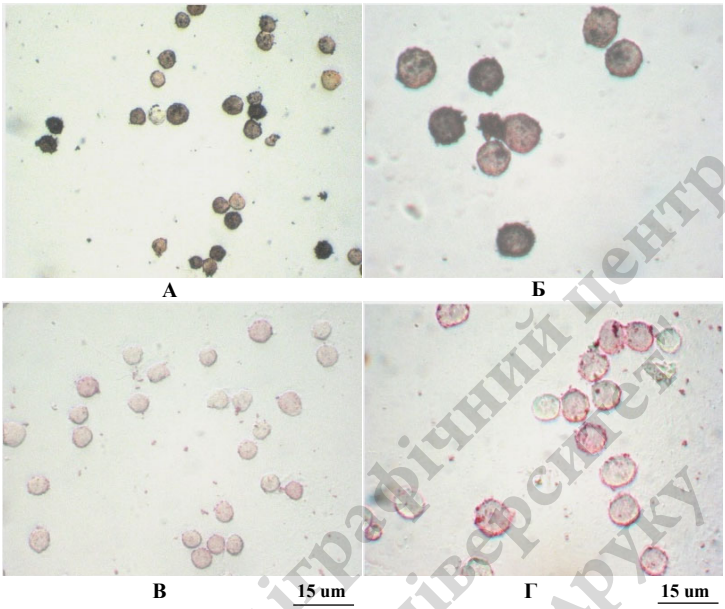


Рис. 1.13. Субпопуляції клітин мишачої лімфоми NK/Ly- PNA⁺ (А, Б) і PNA⁻ (В, Г), які, відповідно, зв'язують і не зв'язують лектин арахісу.
Зв'язування лектину арахісу з клітинами виявляли за допомогою непрямого імуноцитохімічного методу, у якому другим реагентом слугували антилектинові антитіла, мічені колоїдним золотом. Візуалізацію колоїдного золота для світлової мікроскопії виконували за допомогою методу фізичного виявлення ацетатом срібла. Зображення А і В одержані з використанням окуляра × 20 й об'єктиву × 15; зображення Б і Г – окуляр × 40, об'єктив × 15

Старіння пухлинних клітин також призводить до зростання частки клітин зі збільшеними розмірами [49]. Крім того, виявлено позитивну кореляцію цих змін зі зростанням частки лактат-дегідрогенази та кислої фосфатази, що виявляється в асцитній рідині. Незважаючи на значні статистичні коливання між результатами вимірів у різних мишей-пухлиноносіїв, відмінність між першим і третім із наступними дренажами асциту є достовірною. Наведені результати дають змогу припускати, що на пізніших стадіях росту пухлини має місце руйнування клітин і можливе ослаблення їхньої туморогенності. З огляду на це для успішного підтримання штаму пухлинних клітин їхнє перещеп-

Видавничо-поліграфічний центр
Київського університету
Версія для друку

лювання необхідно злійснювати на ранніх стадіях росту пухлини, наприклад, через 7–10 днів після інокуляції клітин тварині.

Слід зауважити, що терапевтичний ефект, викликаний уведенням вінбластину й рубоміцину, виявлявся у 2-3-кратному продовженні життя тварин порівняно з контролем, а також у повільнішому наростанні кількості асциту та зменшенні кількості клітин у ньому. Серед досліджених препаратів алкалоїдів певну протипухлинну активність мав лише хелеритрин, тоді як хелідонін й омаїн не гальмували росту лімфоми NK/Ly. Ці дані відрізняються від результатів, отриманих нами раніше на клітинах лейкозу L1210 *in vitro*, де спостерігали виражений цитотоксичний ефект алкалоїдів сангвінарину і хелеритрину, а також цитостатичний ефект алкалоїдів омаїну й хелідоніну [53].

Розроблену нами тест-систему оцінювання протипухлинної активності речовин плануємо розширити стосовно до аналізу білкового складу асцитної рідини, а також застосувати її для пошуку і перевірки ефективності дії нових протипухлинних чинників природного походження.

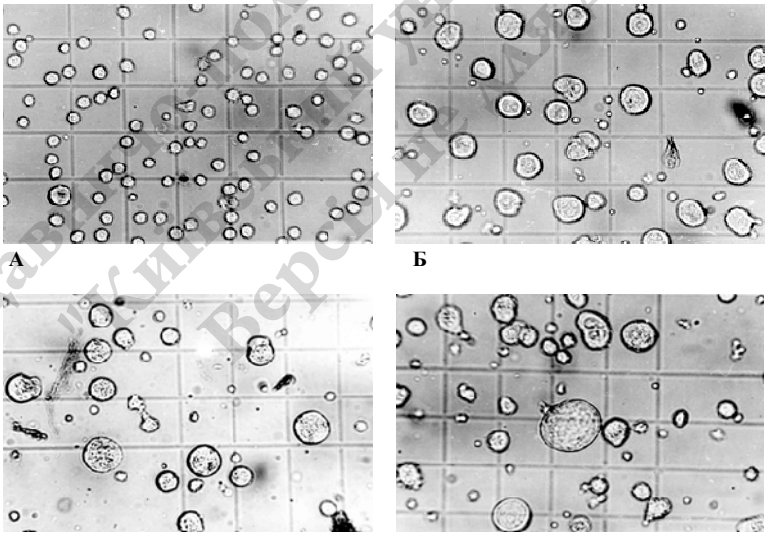


Рис. 1.14. Клітини мишачої лімфоми NK/Ly у контролі (А) та після дії протипухлинних препаратів: рубоміцину (Б), вінбластину (В) (I дренаж) і рубоміцину (III дренаж) (Г)

Видавництво Одеського національного університету імені І.І. Мечникова
Електронний архів

1.4.4. Макрофаги, асоційовані з пухлиною, та їхня роль у канцерогенезі

У підрозділі коротко описані механізми взаємодії пухлинних клітин з іншими клітинами, зокрема з макрофагами. Встановлено, що злоякісно трансформовані клітини здатні адаптуватися до негативної дії на них імунних клітин. Крім того, підтверджено, що клітини імунної системи можна запрограмувати на адресне знешкодження пухлинних клітин, що лягло в основу нового підходу в лікуванні раку засобами імунотерапії.

1.4.4.1. Роль макрофагів у мікросередовищі пухлини

Макрофаги поширені практично в усіх тканинах організму, реагуючи тут на зміни у клітинному мікрооточенні. Ці імунні клітини неоднорідні і можуть діяти як прозапальні, так і протизапальні, як імуногенні, так і толерогенні, як деструктивні, так і репаративні [54]. Макрофаги є елементами вродженого імунітету, що характеризується відносно невеликою кількістю специфічних рецепторів, порівняно із клітинними елементами набутого імунітету. Рецептори клітин системи вродженого імунітету розпізнають обмежену кількість (сотні) консервативних структур, притаманних мікроорганізмам, а також певні структури злоякісно трансформованих клітин, чи клітин, які відмирають.

Встановлено, що за певних обставин макрофаги здатні стимулювати ріст пухлинних клітин [55], що, зокрема, може бути обумовлене значною гетерогенністю пухлинних клітин. Крім того, макрофаги взаємодіють із так званими клітинами-сусідами, через які може опосередковуватися їхній вплив на пухлинні клітини. Під час росту пухлини циркулюючі моноцити та макрофаги активно рекрутуються в пухлини, де змінюють мікросередовище пухлини для прискорення прогресування пухлини. Макрофаги адаптують свої функціональні фенотипи у відповідь на різні сигнали мікросередовища, що генеруються з пухлинних і стромальних клітин. За своїми функціями макрофаги поділяють на дві категорії: класичні макрофаги (М1) й альтернативні макрофаги (М2). Головна роль макрофага М1 – брати участь у запальній реакції, кліренсі збудника та протипухлинному імунітеті. На відміну від цього, макрофаг М2 впливає на протизапальну реакцію, загоєння

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"

ран і пропухлинні властивості. Асоційовані з пухлиною макрофаги (*tumor-associated macrophages*, TAM) нагадують поляризовані макрофаги M2 і є критичними модуляторами мікросередовища пухлини. Клініко-патологічні дослідження показали, що накопичення TAM у пухлинах корелює з поганим клінічним результатом. Експериментальні дослідження на лабораторних тваринах підтверджують думку, що TAM можуть забезпечити сприятливе мікросередовище для розвитку і прогресування пухлини. У цьому задіяні механізми, пов'язані з регуляцією пухлинного ангіогенезу, інвазії, метастазування, імуносупресії та хіміотерапевтичної резистентності. Завдяки цьому терапію TAM можна вважати перспективною стратегією непрямої терапії раку.

Мікросередовище пухлини формується на кожному етапі прогресування раку і тому має різні можливості викликати як несприятливі, так і сприятливі наслідки для пухлини [56]. Відомо, що імунні клітини можуть активуватися, сприяючи росту та прогресуванню пухлини, на що, найімовірніше, впливає мікросередовище пухлини. Асоційовані з пухлиною макрофаги й асоційовані з пухлиною нейтрофіли можуть виконувати протуморальні функції, посилюючи інвазію та метастазування пухлинних клітин, ангіогенез і ремоделювання позаклітинного матриксу, одночасно гальмуючи протипухлинний імунний нагляд. Ураховуючи, що у прозапальних мікросередовищах нейтрофіли діють спільно з макрофагами, а макрофаги впливають на функції нейтрофілів, між асоційованими з пухлиною макрофагами й асоційованими з пухлиною нейтрофілами можуть існувати різні взаємодії. Тромбоцити також відіграють важливу роль у залученні та регулюванні моноцитарних і гранулоцитарних клітин у тканинах пухлини, вказуючи на те, що функція тромбоцитів може мати важливе значення для генерування асоційованих із пухлиною макрофагів і нейтрофілів, пов'язаних з пухлиною. Усе це сприяє активуванню пухлиноасоційованих клітин і підтриманню дії мікросередовища пухлини для прогресування пухлини.

Мікросередовище пухлини – *це складна система, що сформована із клітин і позаклітинного матриксу, здатна еволюціонувати й забезпечувати підтримання клітин пухлини під час її трансформації у злоякісну* [57]. Серед уроджених й адаптивних

Видається в ознайомлювальних цілях. Версія для друку

імунних клітин, завербованих до місця розвитку пухлини, особливо багато є макрофагів, що наявні на всіх стадіях прогресування пухлини. Клінічні дослідження й експериментальні моделі пухлини у мишей показують, що в більшості випадків макрофаги відіграють протуморальну роль. У первинній пухлині макрофаги можуть стимулювати ангіогенез і посилювати інвазію, рухливість й інтравазацію пухлинних клітин. Макрофаги формують преметастатичну зону і сприяють екстравазації пухлинних клітин, їхньому виживанню та стійкому росту. Макрофаги є імунодепресивними і запобігають атаці пухлинних клітин природними кілерами й Т-клітинами під час прогресування пухлини та коли відбувається відновлення після хіміо- чи імунотерапії. Протуморальна роль макрофагів у доклінічних моделях і на ранніх стадіях клінічних випробувань доводить, що макрофаги є привабливими мішенями за комбінованої терапії під час лікування раку.

У моноядерних фагоцитах можуть діяти різні програми у відповідь на регуляторні сигнали мікросередовища [58]. Їхніми найбільш поширеними функціональними станами є повністю поляризовані (активовані) макрофаги М1 і М2. Макрофаги, які інфільтрують пухлинні тканини, керуються цитокінами, отриманими з пухлини і Т-клітин, що сприяють набуттю поляризованого фенотипу М2. Ці функціонально поляризовані клітини та незрілі дендритні клітини, присутні в пухлинах, відіграють ключову роль у порушенні адаптивного імунітету й запальних процесах, що сприяють росту і прогресуванню пухлини.

Важливою є роль запальних процесів, як стимулів розвитку пухлини макрофагами. ТАМ сприяють прогресуванню пухлини, підтримуючи генетичну нестабільність, сприяючи росту ракових стовбурових клітин, підтримуючи метастазування та приборкуючи захисний адаптаційний імунітет [59]. ТАМ можуть:

- протидіяти хіміотерапії і променевій терапії;
- перешкоджати протипухлинній дії цих методів лікування;
- ініціювати процеси, що сприяють відновленню тканин пухлини;
- посилювати загальний протипухлинний стимул.

ТАМ експресують білки-тригери контрольних точок, що регулюють активування Т-клітин і є мішенями в дії певних

імунотерапій. Інші підходи до протипухлинної терапії, орієнтовані на макрофаги, передбачають гальмування залучення макрофагів та/або їхнє виживання в пухлинах, а також функціональне трансформування ТАМ у протипухлинний режим, подібний до М1. ТАМ можуть надати інструменти для циторедукційної терапії та імунотерапії в межах персоналізованої медицини. Терапевтичні стратегії, орієнтовані на ТАМ, можуть доповнювати й поєднувати як хіміо-, так й імунотерапію.

Дослідження з використанням зразків пухлин людини продемонстрували, що вища щільність макрофагів, особливо макрофагів із фенотипом М2, тісно пов'язана з гіршим клінічним прогнозом для багатьох видів злоякісних пухлин [60–61]. З огляду на це інфільтруючі ТАМ та/або шляхи їхньої поляризації можуть бути новими терапевтичними мішенями для дії на злоякісні пухлини.

Розпочато клінічні випробування хіміотерапевтичних препаратів, що сприяють фагоцитозу або пригнічують виживання, проліферацію, міграцію чи поляризацію ТАМ [62]. Значну увагу приділено розробленню імунопрепаратів, здатних виснажувати ТАМ у пухлині, блокувати їхні пропухлинні функції або відновлювати імуностимулювальні властивості.

Проведено дослідження ТАМ із мікросередовища пухлини молочної залози. Показано, що вони стимулюють прогресування пухлини молочної залози, зокрема й ріст пухлинних клітин, інвазію та метастазування [63]. Вони також викликають стійкість до багатьох видів лікування в експериментальних моделях раку молочної залози. До основних механізмів тут належить індукування та підтримання пропухлинного фенотипу ТАМ, а також пригнічення ними функцій CD8+ Т-клітин, руйнування позаклітинного матриксу, стимулювання ангіогенезу і пригнічення фагоцитозу. Потужна інфільтрація ТАМ пухлин молочної залози корелює з гіршим прогнозом для пацієнток. Запропоновані стратегії лікування полягають у пригніченні залучення макрофагів, реполяризації ТАМ до протипухлинного фенотипу і посиленні опосередкованого макрофагами знищення пухлинних клітин або у їхньому фагоцитозі.

Видавничо-поліграфічний центр
Київського університету
Версія не для друку

1.4.4.2. Взаємодія макрофагів з пухлинними клітинами та клітинами-свідками

Нами досліджено, як здатність макрофагів розпізнавати й убивати злоякісно трансформовані клітини *in vitro* залежить від присутності "клітин-свідків", якими слугували нормальні клітини сполучної тканини, а саме фібробласти. Для цього було створено трикомпонентну клітинну систему, що складалася із мишачих макрофагів, як представника імунних клітин, трансформованих мишачих клітин і нормальних мишачих фібробластів. Встановлено, що мишачі макрофаги лінії J774.2 викликають загибель і руйнування трансформованих мишачих фібробластів лінії L929, не впливаючи токсично на нормальні мишачі фібробласти лінії NIH 3T3. Крім того, доведено, що за наявності нормальних мишачих фібробластів втрачається цитотоксична дія макрофагів на трансформовані фібробласти [64–66].

Щоб ізолювати макрофаги з їхніх змішаних культур із трансформованими клітинами-мішенями чи нормальними фібробластами, були використані імуномагнітні кульки із селективною афінністю до специфічного поверхневого маркера (CD11b) макрофагів. Життєздатність клітин визначали за проникністю плазматичної мембрани і транслокацією фосфатидилсерину на її зовнішній бік, а також за падінням мітохондріального потенціалу, фрагментацією ДНК й активуванням проапоптичних каспаз.

Встановлено, що через 24 год культивування макрофагів спільно із трансформованими фібробластами, приблизно 83 % клітин-мішеней (лінія L929) зв'язували лише анексин V, а 11 % таких клітин мали ушкоджену плазматичну мембрану, що свідчить про проникнення в ці клітин барвника DAPI. Зв'язування з анексином V без зміни проникності мембрани свідчить про екстерналізацію фосфатидилсерину, що є характерною ознакою апоптозу. У фібробластів лінії NIH-3T3, культивованих із макрофагами, не виявлено транслокації фосфатидилсерину на зовнішній бік плазматичної мембрани, як і зміни її проникності. Таких змін у кількості анексин V- та DAPI-позитивних клітин не було також у спільній культурі нормальних і трансформованих фібробластів із макрофагами.

Видавничо-поліграфічний центр Київський університет

Досліджено молекулярні механізми, що використовують макрофаги для токсичної дії на чутливі до них клітини-мішені. Для цього макрофаги кокультивували із трансформованими мишачими фібробластами лінії L929 і нормальними мишачими фібробластами лінії NIH-3T3 протягом 24 год, після чого клітини фракціонували за допомогою імуномагнітних кульок, функціоналізованих антитілами до специфічного поверхневого антигена (CD11b) макрофагів. Дослідження характеру експресії мРНК проводили у фракції клітин, що зв'язалися з імуномагнітними кульками.

Встановлено, що в цих імунних клітинах зростає ДНК-зв'язувальна активність транскрипційного фактора NF-κB, тоді як за присутності NIH-3T3 ця активність не змінюється. Крім того, у макрофагів, які виявляють цитотоксичну дію на трансформовані клітини, зростає рівень експресії мРНК інтерлейкіну-1β, а також попередника NF-κB p105, антигена CD5, GADD45 і фактора, що індукується у разі зупинки клітинного циклу чи пошкодженні ДНК. Водночас у таких макрофагів знижується рівень експресії мРНК α-ланцюга інгібіторного білка I-κB. За вирощування згаданих клітин у змішаній культурі трьох типів клітин, присутність нормальних фібробластів блокує зміни в рівні експресії мРНК згаданих генів у макрофагів.

Ученими також було проаналізовано рівень експресії генів мРНК, що змінювався у два і більше разів [64]. Серед генів цитокінів найпомітніші зміни відбувалися в експресії мРНК інтерлейкіну-1β (IL-1β). Кокультивування із трансформованими мишачими фібробластами лінії L929 призводило до значного зростання експресії мРНК IL-1β у макрофагів J774.2, тоді як у культивованих окремо макрофагів мРНК IL-1β не виявили. У макрофагів, виділених із кокультури з нормальними мишачими фібробластами лінії NIH-3T3, рівень експресії мРНК IL-1β був нижчим у два рази порівняно з макрофагами, культивованими з фібробластами лінії L929. У кокультурі з обома типами клітин-мішеней рівень експресії мРНК IL-1β у макрофагів був у 2,6 раза нижчий, ніж у кокультурі макрофагів лише із фібробластами лінії L929.

IL-1β – це прозапальний цитокін, що продукується активованими макрофагами, і для якого була показана цитотоксична та цитостатична дії. Він також діє синергічно й адитивно із факто-

ром некрозу пухлин-α, убиваючи пухлинні клітини. Відомо, що експресія гена цього цитокіна є зниженою в пухлиноасоційованих макрофагів, які сприяють пухлинному росту. Вплив IL-1β на ріст пухлин *in vivo* є неоднозначним. Залежно від концентрації та мікрооточення він може сприяти васкуляризації пухлин і їхньому метастазуванню, проте з іншого боку, він має високу цитотоксичну активність. Імовірно, що цитотоксична дія макрофагів на клітини лінії L929 опосередковується й іншими цитокінами. Отже, хоча цитотоксична дія макрофагів щодо трансформованих клітин лінії L929 індукується під час безпосереднього контакту клітин-мішеней із клітинами-ефекторами, усе ж цей цитотоксичний ефект реалізується через розчинні медіатори, зокрема й цитокін IL-1β.

На молекулярному рівні цитотоксичний сигнал макрофагів щодо трансформованих клітин може реалізуватися через транскрипційний фактор NF-κB, оскільки встановлено, у макрофагів, культивованих із клітинами-мішенями, чутливими до їхньої цитотоксичної дії, зростає ДНК-зв'язувальна активність транскрипційного фактора NF-κB. Крім того, у макрофагах, культивованих із трансформованими фібробластами, рівень мРНК *p105* – попередника транскрипційного фактора NF-κB – зростав у 2,6 раза, порівняно з контролем і збільшувався в 1,6 раза за їхнього культивування з нормальними фібробластами, проте практично не змінювався в макрофагах, культивованих з обома типами клітин-мішеней.

Отже, нормальні клітини сполучної тканини (фібробласти), хоч і не беруть безпосередньої участі в пухлинному рості, проте здатні суттєво впливати (пригнічувати) на цитотоксичну дію імунних клітин (макрофагів) щодо трансформованих (пухлинних) клітин.

Видано за авторською редакцією
Київський університет
Відповідальний за випуск

Джерела

1. Hiroyuki Nishimura, Taku Okazaki, Yoshimasa Tanaka, Kazuki Nakatani, Masatake Hara, Akira Matsumori, Shigetake Sasayama, Akira Mizoguchi, Hiroshi Hiai, Nagahiro Minato, Tasuku Honjo. Autoimmune Dilated Cardiomyopathy in PD-1 Receptor-Deficient Mice. Science. 2001:Vol. 291, Issue 5502, pp. 319-322. DOI: 10.1126/science.291.5502.319.

2. Gou Q., Dong C., Xu H., Khan B., Jin J., Liu Q., Shi J., Hou Y. PD-L1 degradation pathway and immunotherapy for cancer. Cell Death Dis. 2020 Nov 6;11(11):955. DOI: 10.1038/s41419-020-03140-2.

3. Nimmagadda S. Quantifying PD-L1 Expression to Monitor Immune Checkpoint Therapy: Opportunities and Challenges. Cancers (Basel). 2020. Oct 29;12(11):E3173. DOI: 10.3390/cancers12113173.

4. Wang Y., Kong D., Wang C., Chen J., Li J., Liu Z., Li X, Wang Z., Yao G., Wang X. A Systematic Review and Meta-Analysis of Immune-Related Adverse Events of Anti-PD-1 Drugs in Randomized Controlled Trials. Technol Cancer Res Treat. 2020 Jan-Dec;19:1533033820967454. DOI: 10.1177/1533033820967454.

5. Huang P. W, Chang J. W. Immune checkpoint inhibitors win the 2018 Nobel Prize. Biomed J. 2019 Oct;42(5):299-306. DOI: 10.1016/ j.bj.2019.09.002. Epub 2019 Nov 5.

6. Sharma P., Allison J. P. Dissecting the mechanisms of immune checkpoint therapy. Nat Rev Immunol. 2020 Feb;20(2):75-76. DOI: 10.1038/s41577-020-0275-8.

7. Wei S. C., Anang N. A. S., Sharma R., Andrews M. C., Reuben A., Levine J. H., Cogdill A. P., Mancuso J. J., Wargo J. A., Pe'er D., Allison J. P. Combination anti-CTLA-4 plus anti-PD-1 checkpoint blockade utilizes cellular mechanisms partially distinct from monotherapies. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019. Nov 5;116(45):22699-22709. DOI: 10.1073/pnas.1821218116. Epub 2019 Oct 21.

8. Franzin R., Netti G. S., Spadaccino F., Porta C., Gesualdo L., Stallone G., Castellano G., Ranieri E. The Use of Immune Checkpoint Inhibitors in Oncology and the Occurrence of AKI: Where Do We Stand?Front Immunol. 2020 Oct 8;11:574271. DOI: 10.3389/fimmu./ 2020.574271. eCollection 2020.

9. Finck A., Gill S. I., June C. H. Cancer immunotherapy comes of age and looks for maturity. Nature Commun. 2020 Jul 3;11(1):3325. DOI: 10.1038/s41467-020-17140-5.

10. Vaddepally R. K., Kharel P., Pandey R., Garje R., Chandra A. B. Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. Cancers (Basel). 2020 Mar 20;12(3):738. DOI: 10.3390/ cancers12030738.

11. Sakaguchi S., Mikami N., Wing J. B., Tanaka A., Ichiyama K., Ohkura N. Regulatory T Cells and Human Disease. Annu Rev Immunol. 2020 Apr 26;38:541-566. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042718-041717. Epub 2020 Feb 4.

Видавництво «Інформаційні системи» (Копія друкованої версії)

12. Sun H., Sun C. The Rise of NK Cell Checkpoints as Promising Therapeutic Targets in Cancer Immunotherapy. Front Immunol. 2019 Oct 17;10:2354. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02354. eCollection 2019.

13. Hall T. van, André P., Horowitz A., Ruan D. F., Borst L., Zerbib R., Narni-Mancinelli E, van der Burg SH, Vivier E. Monalizumab: inhibiting the novel immune checkpoint NKG2A. J Immunother Cancer. 2019 Oct 17;7(1):263. DOI: 10.1186/s40425-019-0761-3.

14. Sanseviero E. NK Cell-Fc Receptors Advance Tumor Immunotherapy. J Clin Med. 2019 Oct 12;8(10):1667. DOI: 10.3390/jcm8101667.

15. Ouwerkerk W., Berg M. van den, Niet S. van der, Limpens J., Luiten R. M. Biomarkers, measured during therapy, for response of melanoma patients to immune checkpoint inhibitors: a systematic review. Melanoma Res. 2019 Oct;29(5):453-464. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000589.

16. Crowther M. D., Dolton G., Legut M., Caillaud M. E., Lloyd A., Attaf M., Galloway S. A. E., Rius C., Farrell C. P., Szomolay B., Ager A., Parker A. L., Fuller A., Donia M., McCluskey J., Rossjohn J., Svane I. M., Phillips J. D., Sewell A. K. Genome-wide CRISPR–Cas9 screening reveals ubiquitous T cell cancer targeting via the monomorphic MHC class I-related protein MR1. Nat. Immunol. 21(2):178-185. DOI: 10.1038/s41590-019-0578-8. Epub 2020 Jan 20.

17. Poorebrahim M., Melief J., Pico de Coaña Y., L Wickström S., Cid-Arregui A., Kiessling R.. Counteracting CAR T cell dysfunction. Oncogene. 2020 Nov 9. DOI: 10.1038/s41388-020-01501-x

18. Dal'bo N., Patel R., Parikh R., Shah S. P, Guha A., Dani S. S., Ganatra S. Cardiotoxicity of Contemporary Anticancer Immunotherapy. Curr Treat Options Cardiovasc Med. 2020;22(12):62. DOI: 10.1007/s11936-020-00867-1. Epub 2020 Nov 3.

19. Belin C., Devic P., Ayrignac X., Dos Santos A., Paix A., Sirven-Villaros L., Simard C., Lamure S., Gastinne T., Ursu R., Berger C., Platon L., Tessoulin B., Azoulay E., Wallet F., Thieblemont C., Bachy E., Cartron G., Laplaud D. A., Carpentier A. F. Description of neurotoxicity in a series of patients treated with CAR T-cell therapy. Sci Rep. 2020 Nov 4;10(1):18997. DOI: 10.1038/s41598-020-76055-9.

20. El-Khazragy N., Ghozy S., Emad P., Mourad M., Razza D., Farouk Y. K., Mohamed N. A., Ahmed M. K., Youssef T., Bahnasawy Y. M., Elmasery S. Chimeric antigen receptor T cells immunotherapy: challenges and opportunities in hematological malignancies. Immunotherapy. 2020 Nov 5. DOI: 10.2217/imt-2020-0181.

Видавництво "Медична книга" Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова

21. Yoshihiro Ohue, Hiroyoshi Nishikawa Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? Cancer Sci. 2019 Jul; 110(7): 2080–2089. Published online 2019 Jun 18. DOI: 10.1111/cas.14069 PMCID: PMC6609813

22. Carey T. E., Takahashi T., Resnick L. A., Oettgen H. F., Old L. J. Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1976;73:3278-3282.

23. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. Cell. 2000;101:455-458.

24. Bennett C. L., Christie J., Ramsdell F. et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. Nature Genet. 2001;27:20-21.

25. Shimizu J., Yamazaki S., Takahashi T., Ishida Y., Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. Nature Immunol. 2002;3:135-142.

26. Chen W., Jin W., Hardegen N. et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor *FOXP*3. J Exp Med. 2003;198:1875-1886.

27. Mucida D., Park Y., Kim G. et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. Science. 2007;317:256-260.

28. Ahmadzadeh M., Pasetto A., Jia L. et al. Tumor-infiltrating human CD4(+) regulatory T cells display a distinct TCR repertoire and exhibit tumor and neoantigen reactivity. Sci Immunol. 2019;4:pii: eaao4310.

29. Bromley S. K., Mempel T. R., Luster A. D. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. Nature Immunol. 2008;9:970-980.

30. Chen Y., Kuchroo V. K., Inobe J., Hafler D. A., Weiner H. L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. Science. 1994;265:1237-1240.

31 Sauer S., Bruno L., Hertweck A. et al. T cell receptor signaling controls *FOXP*3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105:7797-7802.

32. Christopher Fleming, Samantha Morrissey, Yihua Cai, Jun Yan. γδ T Cells: Unexpected Regulators of Cancer Development and Progression. Trends Cancer. 2017 Aug;3(8):561-570. DOI: 10.1016/ j.trecan.2017.06.003. Epub 2017 Jul 17.

Видавництво "Київський університет" Версія для друку

33. Silva-Santos B., Serre K., Norell H. gammadelta T cells in cancer. Nat Rev Immunol. 2015;15(11):683–91. DOI: 10.1038/nri3904.

34. Adams E. J., Gu S., Luoma A. M. Human gamma delta T cells: Evolution and ligand recognition. Cell Immunol. 2015; 296(1):31–40.

35. Rei M., Goncalves-Sousa N., Lanca T., Thompson R. G., Mensurado S., Balkwill F. R. et al. Murine CD27(−) Vgamma 6(+) gammadelta T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2014;111(34):E3562–70. DOI: 10.1073/pnas.1403424111.

36. Hao J., Dong S., Xia S., He W., Jia H., Zhang S. et al. Regulatory role of V gamma1 gammadelta T cells in tumor immunity through IL-4 production. J Immunol. 2011;187(10):4979–86. DOI: 10.4049/jimmunol.1101389.

37. Rei M., Pennington D. J., Silva-Santos B. The emerging Protumor role of gammadelta T lymphocytes: implications for cancer immunotherapy. Cancer Res. 2015;75(5):798–802. DOI: 10.1158/0008-5472.can-14-3228.

38. Coffelt S. B., Kersten K., Doornebal C. W., Weiden J., Vrijland K., Hau C. S. et al. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. Nature. 2015;522(7556):345–8. DOI: 10.1038/nature14282.

39. Wu P., Wu D., Ni C., Ye J., Chen W., Hu G. et al. gammadeltaT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. Immunity. 2014;40(5):785–800. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.03.013.

40. Ma S., Cheng Q., Cai Y., Gong H., Wu Y., Yu X. et al. IL-17A produced by gammadelta T cells promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma. Cancer research. 2014;74(7):1969–1682. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2534.

41. Ramstead A. G., Jutila M. A. Complex role of gammadelta T-cell-derived cytokines and growth factors in cancer. J Interferon Cytokine Res. 2012;32(12):563–9. DOI: 10.1089/jir.2012.0073.

42. Rhodes K. A., Andrew E. M., Newton D. J., Tramonti D., Carding S. R. A subset of IL-10-producing gammadelta T cells protect the liver from Listeria-elicited, CD8(+) T cell-mediated injury. Eur J Immunol. 2008;38(8):2274–83. DOI: 10.1002/eji.200838354.

43. Peng G., Wang H. Y., Peng W., Kiniwa Y., Seo K. H., Wang R. F. Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. Immunity. 2007;27(2):334–48. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.05.020.

Видавництво Державного університету «Житомирська політехніка»

44. Ye J., Ma C., Wang F., Hsueh E. C., Toth K., Huang Y. et al. Specific recruitment of gammadelta regulatory T cells in human breast cancer. Cancer research. 2013;73(20):6137–48. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0348.

45. Bonneville M, Scotet E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. Curr Opin Immunol. 2006;18(5):539–46. DOI: 10.1016/j.coi.2006.07.002.

46. Carding S. R., Egan P. J. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. Nature Rev Immunol. 2002;2(5):336–45. DOI: 10.1038/nri797.

47. Schmolka N., Serre K., Grosso A. R., Rei M., Pennington D. J., Gomes A. Q. et al. Epigenetic and transcriptional signatures of stable versus plastic differentiation of proinflammatory gammadelta T cell subsets. Nat. Immunol. 2013;14(10):1093–100. DOI: 10.1038/ni.2702.

48. Michael M. Gottesman. Mechanisms of cancer drug resistance. Annu. Rev. Med. 2002. 53:615–627. DOI: 10.1146/ annurev.med.53.082901.103929

49. Horbay R., Stoika R. Giant cell formation: way to cell death or cell survival? Central European Journal of Biology. 2011; 6(5): 675–684. DOI: 10.2478/s11535-011-0058-0

50. Horbay R. O., Kashchak N. I., Stoika R. S. A comparison of paclitaxel and vinblastine induced giant cell formation in murine NK/Ly lymphoma. Studia Biologica. 2011; 5(1): 69–76. DOI:10.30970/sbi.0501.129

51. Гетерогенность популяции клеток лимфомы NK/Ly и лейкоза L 1210 по углеводной структуре клеточной поверхности: иммуноцитохимический анализ связывания лектинов / М. М. Луцик и др. // Цитология и генетика. – 2011. – № 45(2). – С. 3–9. DOI: 10.3103/S0095452711020071.

52. Фракціонування клітинних популяцій супер-парамагнітними частинками із заданими функціональними властивостями поверхні / М. М. Луцик та ін. // Biotechnologia Acta. – 2014. – № 7(1). – С. 80–86. DOI: 10.15407/biotech7.01.080.

53. Панчук Р. Р. Молекулярні механізми індукції апоптозу в клітинах мишачої лімфоми NK/Ly за умов хіміотерапії in vivo / Р. Р. Панчук, Н. М. Бойко, Р. С. Стойка // Біологічні студії. – 2009. – № 3(1). – С. 35-44.

Видавництво Львівський національний університет імені Івана Франка

54. Aderem A., Underhill D. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu. Rev. Immunol. 1999; 17: 593-623. DOI: 10.1146/annurev.immunol.17.1.593

55. Chanmee T., Ontong P., Konno K., Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. Cancers (Basel). 2014; 6(3): 1670-1690. DOI: 10.3390/cancers6031670.PMID: 25125485.

56. Kim J., Bae J. S. Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. Mediators Inflamm. 2016; 2016:6058147. DOI: 10.1155/2016/6058147. Epub 2016 Feb 4.PMID: 26966341.

57. Petty A. J., Yang Y. Tumor-associated macrophages: implications in cancer immunotherapy.Immunotherapy. 2017; 9(3): 289-302. DOI: 10.2217/imt-2016-0135.PMID: 28231720.

58. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica A.. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends Immunol. 2002; 23(11): 549-555. DOI: 10.1016/s1471-4906(02)02302-5.PMID: 12401408.

59. Mantovani A., Marchesi F., Malesci A., Laghi L., Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. Nature Rev Clin Oncol. 2017; 14(7): 399-416. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.217. Epub 2017 Jan 24.PMID: 28117416.

60. Komohara Y., Fujiwara Y., Ohnishi K., Takeya M. Tumor-associated macrophages: Potential therapeutic targets for anti-cancer therapy. Adv Drug Deliv Rev. 2016; 99(Pt B): 180-185. DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.009. Epub 2015 Nov 24.PMID: 26621196.

61. Pathria P., Louis T. L., Varner J. A. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. Trends Immunol. 2019; 40(4): 310-327. DOI: 10.1016/j.it.2019.02.003. Epub 2019 Mar 17.PMID: 30890304.

62. Ngambenjawong C., Gustafson H. H., Pun S. H. Progress in tumor-associated macrophage (TAM)-targeted therapeutics. Adv Drug Deliv Rev. 2017; 114: 206-221. DOI: 10.1016/j.addr.2017.04.010. Epub 2017 Apr 25.PMID: 28449873.

63. Qiu S. Q., Waaijer S. J. H, Zwager M. C., de Vries E. G. E., Vegt B. van der, Schröder C. P. Tumor-associated macrophages in breast cancer: Innocent bystander or important player? Cancer Treat Rev. 2018; 70: 178-189. DOI: 10.1016/j.ctrv.2018.08.010. Epub 2018 Aug 28.PMID: 30227299.

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
Видано за авторською редакцією

64. Kashchak N., Tsaryk R., Stoika R. Bystander effect of normal fibroblasts for macrophages co-cultured with susceptible transformed target cells. Cell Biol. Int. 2005; 29(1): 41-50. DOI: 10.1016/ j.cellbi.2004.11.009.

65. Кащак Н. І. Дослідження міжклітинних взаємодій у змішаних культурах макрофагів лінії J774.2 та фібробластів ліній L929 та NIH3T3: оцінка життєздатності клітин *in situ* за допомогою флуоресцентної мікроскопії / Н. І. Кащак, Р. С. Стойка // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2007. – № 43. – С. 106–110.

66. Кащак Н. І. ДНК-зв'язувальна активність транскрипційного фактора NF-κB у макрофагів лінії J774.2, культивованих з клітинами-мішенями, чутливими та нечутливими до їх цитотоксичної дії / Н. І. Кащак, Р. С. Стойка // Клінічна та експериментальна патологія. – 2007. – № 6 (1). – С. 143–145.

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет" Версія не для друку

ЗМІСТ

Список скорочень 3

Передмова 7

Вступ 11

Розділ 1. Молекулярно-генетичні механізми канцерогенезу 17
1.1. Коротка історія дослідження канцерогенезу 17
1.2. Механізми канцерогенезу. Колоректальний рак 24
1.2.1. Генетичні механізми канцерогенезу 24
1.2.2. Епігенетичні механізми канцерогенезу 34
1.2.3. Концепція ракової стовбурової клітини 42
1.2.4. Колоректальний канцерогенез: сучасні уявлення 43
1.3. Підходи в лікуванні раку. Хіміотерапія 55
1.3.1. Класична хіміотерапія 56
1.3.2. Таргетна терапія 58
1.3.3. Персоналізована терапія – новітній підхід у лікуванні 62
1.3.4. Медикаментозна резистентність 64
1.4. Імунна система і канцерогенез 70
1.4.1. Антиканцерогенна і проканцерогенна дія імунних клітин 71
1.4.1.1. Імунна чекпойнт-блокада: роль рецептора PD-1 і його ліганда 71
1.4.1.2. Роль молекули MR1 у маскуванні пухлинних клітин 72
1.4.1.3. Роль системи CAR-T у націлюванні імунних клітин на клітини пухлин 74
1.4.1.4. Протуморогенні регуляторні Т-клітини (Treg) 75
1.4.1.5. Протуморогенний регуляторний потенціал γδ Т-клітин 80

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет" Версія не для друку

1.4.2. Дослідження механізмів резистентності лабораторних мишей до прищеплення їм експериментальних пухлин 83
1.4.3. Гетерогенність клітин асциту мишачої лімфоми NK/Ly за розміром і вмістом поверхневих рецепторів до галактозоспецифічного лектину арахісу 90
1.4.4. Макрофаги, асоційовані з пухлиною, та їхня роль у канцерогенезі 96
1.4.4.1. Роль макрофагів у мікросередовищі пухлини 96
1.4.4.2. Взаємодія макрофагів з пухлинними клітинами та клітинами-свідками 100

Розділ 2. Протипухлинні препарати на основі похідних піролу 110
2.1. Молекулярний дизайн і синтез похідного піролу МІ-1 110
2.1.1. Методи синтезу 3,4-дихлоромалеїнімідів та їхня взаємодія з нуклеофільними агентами 112
2.2. Взаємодія 3,4-дихлоромалеїнімідів з амінами, амінокислотами, нуклеофілами й іншими сполуками 127
2.3. Синтез нанокомплексів фулерену С60 з похідним піролу МІ-3ОН 137
2.4. Мембранотропна активність похідних піролу 142

Розділ 3. Біологічна активність похідних піролу 159
3.1. Антипроліферативна дія МІ-1 й індукування ним апоптозу в пухлинних клітинах *in vitro* 159
3.1.1. Цитотоксична дія МІ-1 160
3.1.2. Взаємодія МІ-1 із ДНК 167
3.2. Токсичність похідних піролу *in vivo* 175
3.2.1. Підгостра дія похідних піролу на органи шлунково-кишкового тракту 175
3.2.2. Субхронічна дія похідних піролу 178
3.2.3. Хронічна дія похідних піролу 179
3.3. Вплив похідних піролу на гемопоез 184
3.3.1. Роль протеїнкіназ у проліферуванні і диференціюванні гемопоетичних клітин 185
3.3.2. Пухлиноасоційовані зміни гемопоезу за розвитку неопластичного процесу в організмі на прикладі раку товстої кишки 190

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет" Видання для друку

3.3.3. Гематологічні ефекти похідних піролу
на тлі пухлиноасоційованих змін гемопоезу
на моделі ДМГ-індукованого канцерогенезу
товстої кишки у щурів 193
3.3.4. Вплив похідних піролу
на нормальний гемопоез щурів у дозах,
що пригнічують колоректальний канцерогенез 199
3.3.5. Морфофункціональний стан клітин
крові та кісткового мозку за впливу 5- і 10-кратних
від ефективної доз похідного піролу МІ-1 порівняно
із цитостатиком 5-фторурацилом.....203
3.3.6. Інгібітори протеїнкіназ
як протипухлинні препарати 207
3.3.7. Клітини лейкозів як мішень
для протипухлинної дії похідних піролу.....210
3.3.8. Неопластичні клітини гемопоетичного
походження ліній U-937, K562, L1210 як модель
для дослідження лейкозів 212
3.3.9. Вплив похідного піролу
на неопластичні клітини гемопоетичного походження
різних напрямів диференціювання 214
3.3.10. Вплив похідного піролу (МІ-1)
на морфофункціональний стан
неопластичних монобластних клітин лінії U-937.....216
3.3.11. Вплив похідного піролу (МІ-1)
на морфофункціональний стан
мишачих лейкозних В-клітин лінії L1210.....220
3.3.12. Вплив похідного піролу (МІ-1)
на морфофункціональний стан неопластичних мієлоїдних,
еритробластних і мегакаріобластних клітин.....222
3.4. Вплив похідних піролу на процеси запалення 243
3.4.1. Інгібітори протеїнкіназ як засоби
для терапії запальних захворювань кишечника.....246
3.4.2. Протизапальна активність похідних піролу
за гострого та хронічного виразкового коліту
й механізми її реалізації.....249
3.5. Вплив похідних піролу на злоякісний ріст
(на прикладі колоректального раку) 256

Узагальнення.....271

Видавничо-поліграфічний центр
"Київський університет"
Версія не для друку

Наукове видання

РИБАЛЬЧЕНКО Володимир Корнійович
СТОЙКА Ростислав Степанович
КУЗНЄЦОВА Галина Миколаївна
та ін.

ПОХІДНІ ПІРОЛУ В БІОЛОГІЇ І МЕДИЦИНІ

СИНТЕЗ, ПРОТИЗАПАЛЬНА І ПРОТИПУХЛИННА ДІЯ

Монографія

Редактор *Т. Гуз*

Оригінал-макет виготовлено ВПЦ "Київський університет"

**Формат 60x84$^{1/16}$. Ум. друк. арк. 16,27. Наклад 100. Зам. № 223-10637.
Гарнітура Times New Roman. Папір офсетний. Друк офсетний. Вид. № ВТ6.
Підписано до друку 15.09.23**

**Видавець і виготовлювач
ВПЦ "Київський університет"
Б-р Тараса Шевченка, 14, м. Київ, 01601, Україна
☎ (044) 239 32 22; (044) 239 31 72; тел./факс (044) 239 31 28
e-mail: vpc@knu.ua; vpc_div.chief@univ.net.ua; redaktor@univ.net.ua
http: vpc.knu.ua
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1103 від 31.10.02**

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
Версія не для друку