

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
на тему:
«Оптимізація дозрівання генерованих дендритних клітин
за допомогою біоактивних медіаторів»

Рівень вищої освіти перший (бакалаврський)
Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія
Освітня програма Біотехнологія

Виконав: студент групи ББТ-20
Луцій О.О.
Науковий керівник: к.т.н., доц. Волошина І.М.
Рецензент: к.б.н., доц. Юнгін О.С.

Київ 2024

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Рівень вищої освіти	<u>перший (бакалаврський)</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія</u>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри БШХ

_____ Олена МОКРОУСОВА
« ____ » _____ 20__ р.

**ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ
Луцію Олексію Олександровичу**

1. Тема кваліфікаційної роботи: «Оптимізація дозрівання генерованих дендритних клітин за допомогою біоактивних медіаторів»
Науковий керівник роботи Волошина Ірина Миколаївна, к.т.н., доц.
затверджені наказом КНУТД від «01» березня 2024 року № 49-уч
2. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: завдання на кваліфікаційну роботу; наукова література щодо дозрівання дендритних клітин *in vitro*, результати досліджень оптимізації генерованих дендритних клітин за допомогою біоактивних медіаторів; матеріали переддипломної практики.
3. Зміст кваліфікаційної роботи: огляд літератури, об'єкт, мета та методи дослідження, експериментальна частина, висновки, список використаних джерел, додатки.
4. Дата видачі завдання 01.03.2024 р

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапу кваліфікаційної роботи	Орієнтовний терміни виконання	Примітка про виконання
1	Вступ	05.04.2024	
2	Розділ 1 Огляд літератури	26.04.2024	
3	Розділ 2 Об'єкт, мета та методи дослідження	10.05.2024	
4	Розділ 3 Експериментальна частина	30.05.2024	
5	Висновки	31.05.2024	
6	Оформлення кваліфікаційної роботи (чистовий варіант)	07.06.2024	
7	Подача кваліфікаційної роботи науковому керівнику для відгуку	10.06.2024	
8	Подача кваліфікаційної роботи для рецензування (за 14 днів до захисту)		
9	Перевірка кваліфікаційної роботи на наявність ознак плагіату (за 10 днів до захисту)		
10	Подання кваліфікаційної роботи на підпис завідувачу кафедри (за 7 днів до захисту)		

З завданням ознайомлений:

Студент _____ Олексій ЛУЦІЙ

Науковий керівник _____ Ірина ВОЛОШИНА

АНОТАЦІЯ

Луцій О.О. Оптимізація дозрівання генерованих дендритних клітин за допомогою біоактивних медіаторів. – Рукопис.

Кваліфікаційна робота за спеціальністю 162 Біотехнологія та біоінженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2024 рік.

В кваліфікаційній роботі проведено дослідження з оптимізації генерованих дендритних клітин за допомогою біоактивних медіаторів. Традиційні методи лікування в онкології мають недостатню ефективність, тому дослідники та лікарі проводять пошук нових підходів до лікування, з метою підвищення ефективності. Все більше дослідників звертають увагу на методи біотерапії, що є перспективним напрямком у терапії злоякісних новоутворень. Одним з таких методів біотерапії є створення вакцин на основі генерованих дендритних клітин вирощених *in vitro*. Дендритні клітини є основними антигенпрезентуючими клітинами у імунній системі організму. Результати показали, що дозрівання дендритних клітин *in vitro* полегшує їх виживання, після введення в організм пацієнта, тобто дендритні клітини мають антиапоптичну дію. Також отримані результати вказують на те, що при раку легень з кожним наступним введенням ДК-вакцини у організм збільшується ступінь зрілості дендритних клітин.

Ключові слова: дендритні клітини, онкологія, протипухлинна вакцина, біоактивні медіатори, імунна система.

ABSTRACT

Lutsii O.O. Optimizing the maturation of generated dendritic cells with the help of bioactive mediators. – Manuscript.

Qualification work on specialty 162 Biotechnology and bioengineering. – Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2024.

In the qualifying work, research was conducted on the optimization of generated dendritic cells with the help of bioactive mediators. Traditional methods of treatment in oncology are insufficiently effective, so researchers and doctors are searching for new approaches to treatment in order to increase efficiency. More and more researchers are paying attention to methods of biotherapy, which is a promising direction in the therapy of malignant neoplasms. One of these methods of biotherapy is the creation of vaccines based on generated dendritic cells grown in vitro. Dendritic cells are the main antigen-presenting cells in the body's immune system. The results showed that maturation of dendritic cells in vitro facilitates their survival, after introduction into the patient's body, that is, dendritic cells have an anti-apoptotic effect. Also, the obtained results indicate that in case of lung cancer, the degree of maturity of dendritic cells increases with each subsequent injection of DC vaccine into the body.

Key words: dendritic cells, oncology, antitumor vaccine, bioactive mediators, immune system.

ЗМІСТ

ЗМІСТ	6
ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧОК ТА ТЕРМІНІВ.....	8
ВСТУП	9
РОЗДІЛ 1	12
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	12
1.1 Загальна характеристика злоякісних новоутворень	12
1.2 Методи лікування онкологічних захворювань	19
1.3 Загальна характеристика дендритних клітин	22
1.4 Механізм процесингу і презентації антигену дендритними клітинами	26
1.5 Індукція імунітету.....	28
1.6 Дендритні клітини в імунотерапії онкологічних захворювань	30
Висновок до розділу 1.	32
РОЗДІЛ 2	33
ОБ'ЄКТ, МЕТА ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	33
2.1 Характеристика хворих на злоякісні новоутворення та схема застосування специфічної активної імунотерапії на основі дендритних клітин.....	33
2.2 Культуральні методи	34
2.3 Імуноцитохімічне фарбування ДК	34
2.4 Імунологічні методи дослідження.....	35
2.5 Молекулярно-генетичні методи дослідження	36
2.5.1 Виділення тотальної РНК та проведення реакції зворотної транскрипції.....	36
2.5.2 Визначення рівня експресії гена IL-12 методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням TaqMan зондів.....	36
2.5.3 Визначення рівня експресії генів цитокінів та хемокінів методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням флюорохрома SYBRGreen.....	38
Висновки до розділу 2.	40

РОЗДІЛ 3	41
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	41
3.1 Характеристика дендритних клітин моноцитарного походження у хворих з різними формами злоякісних новоутворень.....	41
3.1.1 Метод ідентифікації дендритних клітин, одержаних з моноцитів периферичної крові хворих на злоякісні новоутворення, за їх цитоморфологічними ознаками.....	41
3.1.2 Функціональні властивості генерованих моноцитарних дендритних клітин у хворих на злоякісні новоутворення	42
3.2 Оптимізація підходів до одержання зрілих дендритних клітин моноцитарного походження <i>in vitro</i>	47
3.2.1 Визначення фенотипових змін при оптимізації методу одержання зрілих дендритних клітин моноцитарного походження <i>in vitro</i> за допомогою інтерферону- α	49
3.2.2. Визначення рівня експресії внутрішньоклітинних цитокінів у дендритних клітинах активованих ліпополісахаридом та інтерфероном- α	52
3.3. Технологія отримання Тх-1 – поляризуючих ДК моноцитарного походження із використанням різних біоактивних медіаторів.....	56
Висновки до розділу 3.	60
ВИСНОВКИ.....	61
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	62
ДОДАТКИ.....	71

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧОК ТА ТЕРМІНІВ

АПК – антигенпрезентуючі клітини

ГМ-КСФ – гранулоцит-макрофаг колонієстимулюючий фактор

ДК – дендритні клітини

ЗФР – забуферений фізіологічний розчин

ІС – імунологічний синапс

ІФН – інтерферон

ЛПС – ліпополісахарид

МО – міжнародна одиниця

ПКК – природні кілерні клітини

ПКТ – природні кілерні Т-клітини

ПРР – патерн-розпізнавальний рецептор

РЛ – рак легені

Тх – Т-хелперні клітини

ФА – фагоцитарна активність

ФІТЦ – флюоресцеїнаізотіоціанат

ФНП – фактор некрозу пухлини

ЦТЛ – цитотоксичні Т-лімфоцити

CD – кластер диференціювання

ІЛ – інтерлейкін

HLA-DR – лейкоцитарні антигени людини

L-Gly – L-глутамін

MHC – головний комплекс гістосумісності

RPMI – марка поживного середовища

TGF- β – трансформівний ростовий фактор

ВСТУП

Актуальність теми. Збільшення кількості хворих на онкологічні захворювання, низький рівень виживаності на III-IV стадіях, недостатня ефективність традиційних методів лікування у цієї категорії хворих обумовлюють соціальну значимість для цієї проблеми. Стандартні протоколи лікування для пацієнтів стають малоефективними, відповідно, кількість смертей від злоякісних новоутворень збільшується з кожним роком. Імуноterapia на основі ДК-вакцини – це сучасний напрямок розвитку лікування злоякісних пухлин.

Мета дослідження. Розробити ефективну технологію отримання Тх-1 – поляризованих ДК моноцитарного походження із використанням різних біоактивних медіаторів.

Завдання дослідження.

1. Дослідити фенотипові характеристики генерованих моноцитарних дендритних клітин у хворих на рак легені.
2. Дослідити функціональні особливості генерованих моноцитарних дендритних клітин у хворих на рак легені.
3. Визначити вплив біоактивних медіаторів на дозрівання дендритних клітин отриманих від хворих на рак легені.
4. Обґрунтувати застосування біоактивних медіаторів для отримання Тх-1 – поляризованих ДК моноцитарного походження.

Об'єкт дослідження. ДК моноцитарного походження.

Предмет дослідження. Рівень експресії поверхневих CD маркерів та мРНК генів цитокінів і хемокинів у ДК.

Методи дослідження – огляд та аналіз наукових статей, використання культуральних та імунологічних методів дослідження, обробка даних статистичними методами.

Експериментальну частину кваліфікаційної роботи виконано на базі Науково-дослідного відділення експериментальної онкології ДНП

«Національний інститут раку», а саме: дослідження оптимізації дозрівання генерованих дендритних клітин за допомогою біоактивних медіаторів.

Наукова новизна. Вперше встановлено залежність зрілості ДК, генерованих із периферичної крові хворих на РЛ, від різних концентрацій біоактивних медіаторів, таких як ІФНа та ЛПС.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено ефективну схему дозрівання ДК, генерованих із периферичної крові хворих на РЛ, з метою підвищення їх протипухлинної ефективності. Отримані результати сприятимуть подальшому розвитку імунотерапії у лікуванні злоякісних пухлин.

Апробацію наукових результатів проведено через їх оприлюднення на конференції міжнародного рівня: VI МІЖНАРОДНА НАУКОВО-ПРАКТИЧНА КОНФЕРЕНЦІЯ «KyivLvivPharma-2023. Фармацевтична технологія та фармакологія в забезпеченні активності довголіття» (Додаток А).

Публікації:

1. Луцій О.О., Шидловська О.А., Горбач О.І., Скачкова О.В., Храновська Н.М. Оптимізація дозрівання генерованих дендритних клітин за допомогою біоактивних медіаторів. Chemical and Biopharmaceutical technologies: collection of scientific papers / by general ed. V. Bessarabov, V. Lubenets. Tallinn: Nordic Sci Publisher, 2023. P. 88-90. (Додаток А).

2. Lutsii O., Denysenko V. The warburg effect in Oncological diseases. IX Всеукраїнської науково-практичної конференції «Інноваційні тенденції підготовки фахівців в умовах полікультурного та мультлінгвального глобалізованого світу» 11 квітня 2024р. Київ. С. 196-198 (Додаток Б).

3. Луцій О.О., Макаренко М.В., Морін В.В., Грецкий І.О., Шидловська О.А. Дослідження можливостей використання дріжджів для синтезу наночасток металів. Освіта для сталого майбутнього: екологічні, технологічні, економічні і соціокультурні питання: колективна монографія за

матеріалами Всеукраїнської наукової конференції / за ред. В. П. Плаван, А. О. Касич, О. О. Бутенко. Київ: КНУТД, 2024. 3 (Додаток В).

Структура і обсяг роботи. Кваліфікаційна робота викладена на 61 сторінці, складається зі вступу, трьох розділів: огляд літератури, об'єкт, мета та методи дослідження, експериментальна частина та висновків. Список використаних джерел містить 80 посилань та 3 додатки.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальна характеристика злоякісних новоутворень

Злоякісне новоутворення – це захворювання, при якому клітини організму починають неконтрольно ділитися і поширюватися на інші частини тіла.

Початок розвитку злоякісного новоутворення може відбутися в майже будь-якій частині людського тіла. Нормальні клітини організму ростуть і розмножуються, утворюючи нові клітини, коли це потрібно. На зміну старим або пошкодженим клітинам, які в результаті гинуть, утворюються нові. Інколи цей процес може дати збій і тоді клітини які пошкоджені або старі починають розмножуватися неконтрольовано, утворюючи пухлини. Пухлини є злоякісними та доброякісними.

Злоякісні пухлини поширюються в сусідні тканини, вражають їх і можуть переміщатися у віддалені місця в організмі, утворюючи нові пухлини (процес, який називається метастазуванням). Багато видів злоякісних пухлин утворюють великі пухлини, але рак крові, такий як лейкоз, як правило, цього не робить.

Доброякісні пухлини не поширюються в прилеглі тканини і не вражають їх. При видаленні доброякісні пухлини зазвичай не відростають, тоді як злоякісні пухлини локально рецидивують. Однак доброякісні пухлини іноді можуть вирости до великих розмірів. Деякі з них здатні викликати серйозні симптоми або бути небезпечними для життя, наприклад, доброякісні пухлини в головному мозку [1].

Клітини злоякісного новоутворення демонструють кілька ключових відмінностей від нормальних клітин, зокрема:

1. Неконтрольований ріст: ракові клітини ростуть без потреби в сигналах росту, на відміну від нормальних клітин, яким такі сигнали потрібні для проліферації.

2. Ігнорування стоп-сигналів: вони ігнорують сигнали, які зазвичай повідомляють клітинам про припинення поділу або запрограмовану клітинну смерть (апоптоз).

3. Інвазія та метастази: клітини злоякісного новоутворення проникають у сусідні тканини та поширюються по всьому тілу, тоді як нормальні клітини припиняють ріст після контакту з іншими клітинами та зазвичай не мігрують.

4. Ангіогенез: клітини злоякісної пухлини стимулюють ріст кровоносних судин у напрямку до пухлини, постачаючи її киснем і поживними речовинами та видаляючи відходи.

5. Імунне ухилення: вони уникають імунної системи, яка зазвичай видаляє пошкоджені або аномальні клітини.

6. Імунна маніпуляція: деякі ракові клітини маніпулюють імунною системою, щоб підтримувати своє виживання та ріст, переконуючи імунні клітини захищати, а не атакувати пухлину.

7. Хромосомні аномалії: ракові клітини накопичують численні хромосомні зміни, включаючи дуплікації та делеції, причому кількість хромосом у деяких вдвічі перевищує норму.

8. Змінений метаболізм: вони залежать від інших поживних речовин і часто виробляють енергію інакше, ніж звичайні клітини, сприяючи швидшому росту [2].

Злоякісне новоутворення — це генетичне захворювання, спричинене змінами в генах, які регулюють функцію клітин, зокрема ріст і поділ клітин.

Ці генетичні зміни виникають через:

- Помилки під час поділу клітин.
- Пошкодження ДНК факторами навколишнього середовища, такими як хімічні речовини в тютюновому димі та ультрафіолетові промені сонця.
- Генетична спадковість.

Зазвичай організм елімінує клітини з пошкодженою ДНК, перш ніж вони стануть злоякісними. Однак ця здатність зменшується з віком,

сприяючи підвищеному ризику злоякісних новоутворень в подальшому житті.

Злоякісна пухлина кожної людини має унікальну комбінацію генетичних змін. По мірі росту новоутворення накопичуються додаткові генетичні зміни, що призводить до генетичної різноманітності навіть в одній пухлині.

Генетичні зміни, які сприяють злоякісному новоутворенню, зазвичай впливають на три основні типи генів: протоонкогени, гени-супресори пухлин і гени репарації ДНК. Ці зміни часто називають «рушіями» раку.

1. Протоонкогени: гени беруть участь у нормальному зростанні та діленні клітин. Однак, коли вони змінюються або стають надмірно активними, вони можуть трансформуватися в онкогени, які дозволяють клітинам рости та виживати неналежним чином.

2. Гени-супресори пухлин: ці гени допомагають регулювати ріст і поділ клітин. Коли вони змінюються, клітини можуть почати неконтрольовано ділитися.

3. Гени репарації ДНК: ці гени відповідають за відновлення пошкодженої ДНК. Мутації в генах репарації ДНК призводять до додаткових мутацій в інших генах і хромосомних змін, таких як дуплікації та делеції, що сприяє розвитку новоутворень.

За останні десятиліття вчені виявили загальні мутації характерні для різних типів злоякісних пухлин. Отже, численні методи лікування новоутворень зараз спрямовані на ці специфічні генні мутації. Деякі з цих методів лікування ефективні незалежно від походження пухлини, якщо присутня драйверна мутація [3].

Коли злоякісне новоутворення поширюється з початкового місця на іншу частину тіла, це називається метастатичним раком. Це поширення відбувається через процес, відомий як метастазування. Метастатичні пухлини мають назву та тип клітин первинного злоякісного новоутворення. Наприклад, якщо злоякісна пухлина молочної залози поширюється на легені,

це називається метастатичною пухлиною молочної залози, а не злоякісним новоутворенням у легенях. Під мікроскопом метастатичні ракові клітини зазвичай нагадують клітини первинного раку. Крім того, ці клітини часто мають спільні молекулярні характеристики, такі як специфічні аберації хромосом, з первинними раковими клітинами.

Лікування метастатичного раку іноді продовжує життя пацієнтів. Однак основними цілями лікування часто є контроль за ростом злоякісного новоутворення або полегшення симптомів. Метастатичні пухлини можуть серйозно порушити функції організму, і більшість смертей від злоякісних пухлин є результатом метастатичного захворювання [4].

Не кожна зміна тканини в організмі є злоякісною трансформацією. Однак деякі зміни можуть перерости в злоякісні пухлини, якщо їх не лікувати. Ось приклади змін тканин, які не є злоякісними, але можуть спостерігатися через їх потенціал стати раковими:

1. Гіперплазія: клітини всередині тканини розмножуються швидше, ніж зазвичай, що призводить до накопичення додаткових клітин. Незважаючи на збільшення кількості клітин, під мікроскопом вони та структура тканин виглядають нормальними. Гіперплазія виникає від різних факторів, включаючи хронічне подразнення [5].

2. Дисплазія: це більш запущений стан, ніж гіперплазія, що включає накопичення додаткових клітин, які виглядають атиповими та демонструють зміни в організації тканин. Чим аномальніші клітини та тканини виглядають, тим вища ймовірність розвитку злоякісних пухлин. Деякі типи дисплазії вимагають моніторингу або лікування, а інші – ні. Прикладом є диспластичний невус (ненормальна родимка) на шкірі, який перетворитися на меланому, хоча в більшості випадків це не так [6].

3. Карцинома *in situ*: це ще більш запущений стан. Іноді його називають злоякісним новоутворенням 0 стадії, але це не справжня пухлина, оскільки аномальні клітини не вторгаються в сусідні тканини, як це роблять клітини

злоякісного новоутворення. Однак, оскільки деякі карциноми *in situ* можуть стати раковими, їх зазвичай лікують [7].

Існує понад 100 різних типів злоякісних новоутворень, які зазвичай називаються відповідно до органів або тканин, з яких вони виникають. Наприклад, злоякісна пухлина легенів виникає в легенях, а злоякісна пухлина мозку розвивається в мозку. Крім того, пухлини можна класифікувати на основі типу клітин, з яких вони виникають, наприклад, епітеліальних клітин або плоскої клітини.

Ось кілька категорій злоякісних новоутворень, які походять із певних типів клітин:

1. Карцинома:

Карциноми є найпоширенішим типом злоякісних пухлин і походять з епітеліальних клітин, які покривають внутрішню та зовнішню поверхні тіла. Під мікроскопом ці клітини часто виглядають схожими на стовпчики.

а) Аденокарцинома утворюється в епітеліальних клітинах, які виробляють рідину або слиз, відомих як секреторні тканини. Більшість злоякісних пухлин молочної залози, товстої кишки та простати є аденокарциномами.

б) Базальноклітинна злоякісна пухлина починається в базальному (основному) шарі епідермісу, зовнішньому шарі шкіри.

в) Плоскоклітинна карцинома виникає в сквамозних клітинах, які є плоскими, схожими на лусочки епітеліальними клітинами, розташованими безпосередньо під поверхнею шкіри. Плоскі клітини також вистилають багато органів, включаючи шлунок, кишечник, легені, сечовий міхур і нирки. Плоскоклітинний рак іноді називають епідермоїдним раком.

г) Перехідно-клітинна карцинома виникає в перехідному епітелії або уротелії, типі епітеліальної тканини, яка може розширюватися та скорочуватися. Він міститься в слизовій оболонці сечового міхура, сечоводів, ниркової миски (частини нирок) і деяких інших органів. Деякі види

злоякісних новоутворень сечового міхура, сечоводів і нирок є перехідно-клітинними карциномами [8].

2. Саркоми:

Саркоми — це пухлини, які розвиваються в кістках і м'яких тканинах, включаючи м'язи, жир, кровоносні судини, лімфатичні судини та фіброзні тканини, такі як сухожилля та зв'язки. Остеосаркома є найпоширенішим видом злоякісних пухлин кісток. Поширені саркоми м'яких тканин включають лейоміосаркому, саркому Капоші, злоякісну фіброзну гістіоцитому, ліпосаркому та дерматофібросаркому [9].

3. Лейкемія:

Лейкемії - це злоякісні захворювання, які виникають у кровотворних тканинах кісткового мозку і не утворюють солідних пухлин. Натомість вони призводять до накопичення аномальних лейкоцитів (клітин лейкемії та лейкозних бластних клітин) у крові та кістковому мозку, які витісняють нормальні клітини крові. Це зміщення може погіршити здатність організму транспортувати кисень, контролювати кровотечу та боротися з інфекціями. Лейкемію поділяють на чотири основні типи залежно від прогресування хвороби (гостра або хронічна) і типу уражених клітин крові (лімфобластні або мієлоїдні). Гострий лейкоз прогресує швидко, тоді як хронічний лейкоз прогресує повільніше.

4. Лімфома:

Лімфома – це тип злоякісної пухлини, який починається в лімфоцитах, які є білими кров'яними клітинами (Т-клітинами або В-клітинами), які відіграють певну роль в імунній системі. При лімфомі аномальні лімфоцити накопичуються в лімфатичних вузлах, лімфатичних судинах та інших органах.

Існує два основних типи лімфом:

- Лімфома Ходжкіна: характеризується наявністю клітин Ріда-Штернберга, які зазвичай походять з В-клітин.

- Неходжкінська лімфома: різноманітна група ракових захворювань, які починаються в лімфоцитах і далі розвиваються з В-клітин або Т-клітин. Ці види злоякісних новоутворень відрізняються за швидкістю росту від повільного до швидкого [10].

5. Множинна мієлома:

Множинна мієлома – це тип неоплізії, який починається в плазматичних клітинах, свого роду імунних клітинах. Аномальні плазматичні клітини, відомі як клітини мієломи, накопичуються в кістковому мозку та утворюють пухлини в кістках. Цей стан також називають плазмоцитарною мієломою або хворобою Келера [11].

6. Меланома:

Меланома – це злоякісна пухлина, яка починається в меланоцитах, клітинах, відповідальних за вироблення меланіну, який надає шкірі колір. Хоча більшість меланом розвивається на шкірі, вони також виникають в інших пігментованих тканинах, таких як око [12].

7. Пухлини головного та спинного мозку:

Існують різні типи пухлин головного та спинного мозку, названі відповідно до типу клітин, з яких вони походять, і їх розташування в центральній нервовій системі. Наприклад, астроцитарна пухлина починається в зіркоподібних клітинах мозку, які називаються астроцитами, які підтримують здоров'я нервових клітин. Ці пухлини є доброякісними (нераковими) або злоякісними (раковими) [13].

Інші типи пухлин:

- *Пухлини зародкових клітин:* ці пухлини походять із клітин, які розвиваються в сперматозоїди або яйцеклітини. Вони утворюються майже в будь-якій частині тіла і бути як доброякісними, так і злоякісними.

- *Нейроендокринні пухлини:* ці пухлини розвиваються з клітин, які вивільняють гормони в кров у відповідь на сигнали нервової системи. Нейроендокринні пухлини можуть виробляти надлишок гормонів, що призводить до різних симптомів, і є доброякісними або злоякісними.

- *Карциноїдні пухлини*: підтип нейроендокринних пухлин, карциноїдні пухлини ростуть повільно і зазвичай виявляються в шлунково-кишковій системі, найчастіше в прямій і тонкій кишці. Вони мають властивість метастазувати в печінку або інші частини тіла і можуть виділяти такі речовини, як серотонін або простагландини, викликаючи карциноїдний синдром [8].

1.2 Методи лікування онкологічних захворювань

У медичній практиці використовується широкий спектр методів лікування онкологічних захворювань. Для пацієнтів назначається, зазвичай, комплекс методів. Це дає ефективніші результати у лікуванні хворих. Найбільш поширеними методами лікування онкологічних захворювань є: хірургічне втручання, хіміотерапія та променева терапія.

Хірургічне втручання – це процедура, під час якої лікарі під анестезією видаляють ракові тканини. Існує кілька видів хірургічного втручання: малоінвазивне та відкрите. При малоінвазивній хірургії лікар робить кілька маленьких розрізів замість одного великого. Через один із цих маленьких розрізів вставляється довга тонка трубка з крихітною камерою, яка називається лапароскопом. Камера проектує зображення зсередини тіла на монітор, дозволяючи хірургу візуалізувати об'єкт. Потім через інші невеликі розрізи вводять спеціальні хірургічні інструменти для видалення пухлини та деяких навколишніх здорових тканин. Під час відкритої операції хірург робить один великий розріз, щоб видалити пухлину, деякі навколишні здорові тканини та, можливо, сусідні лімфатичні вузли.

Хірурги є висококваліфікованими професіоналами, які вживають усіх заходів, щоб запобігти ускладненням під час операції. Однак проблеми однаково можуть виникнути. Після хірургічного втручання біль у зоні операції є нормальним явищем. Інтенсивність болю залежить від обсягу хірургічного втручання, конкретної задіяної частини тіла та індивідуальної переносимості болю. Іншим потенційним ускладненням після операції є інфекція. Щоб мінімізувати ризик інфікування, потрібно дотримуватися

вказівок лікаря щодо догляду за місцем операції. Якщо виникає інфекція, лікар призначає антибіотики для її лікування. До хірургічних ризиків ще відносяться: кровотеча, пошкодження сусідніх тканин і побічні реакції на анестезію [14].

Хіміотерапія – це використання лікарських препаратів для боротьби з онкологічними захворюваннями. Хіміотерапія діє шляхом пригнічення або уповільнення швидкого росту ракових клітин. Вона використовується для двох основних цілей: лікування злоякісних новоутворень (хіміотерапія може вилікувати рак, зменшити ймовірність його рецидиву, або зупинити, або уповільнити його прогресування), полегшити симптоми злоякісних пухлин (хіміотерапія може зменшити пухлини, які викликають біль та інші симптоми).

Хіміотерапія націлена на ракові клітини, що швидко ростуть, але вона також впливає на здорові клітини, які швидко ростуть і діляться, наприклад у роті, кишечнику та волосяних фолікулах. Це пошкодження здорових клітин може призвести до побічних ефектів, таких як виразки в роті, нудота та випадіння волосся. Ці побічні ефекти зазвичай покращуються або зникають після закінчення хіміотерапії. Найпоширенішим побічним ефектом є втома, через яку пацієнти відчують себе надзвичайно втомленими та виснаженими [15].

Радіотерапія — це лікування раку, яке передбачає використання високих доз радіації для знищення ракових клітин і зменшення розміру пухлини.

У високих дозах променева терапія знищує ракові клітини або пригнічує їх ріст, пошкоджуючи їх ДНК. Ракові клітини з непоправним пошкодженням ДНК перестають ділитися і відмирають. Променева терапія не відразу вбиває ракові клітини. Потрібні дні або тижні лікування, перш ніж ДНК буде пошкоджено настільки, що ракові клітини загинуть. Згодом ракові клітини продовжують гинути протягом тижнів або навіть місяців після закінчення променевої терапії.

Існує два основних типи променевої терапії: зовнішня і внутрішня.

Зовнішня променева терапія використовує апарат для спрямування випромінювання на рак. Він не торкається вас, але рухається навколо вас, надаючи випромінювання до певної частини вашого тіла під різними кутами. Цей метод є локалізованим лікуванням, тобто він спрямований на певну область.

Внутрішня променева терапія передбачає розміщення джерела випромінювання всередині вашого тіла, яке є твердим або рідким. Коли використовується тверде джерело, це називається брахітерапією. У брахітерапії капсули, що містять джерело випромінювання, поміщають у пухлину або поблизу неї. Подібно до зовнішньої променевої терапії, брахітерапія є локалізованим лікуванням, спрямованим лише на певну частину вашого тіла. Ця капсула випромінює рентгенівські промені протягом певного часу [16].

Традиційні методи лікування залишаються все ще не ефективними. Тому для боротьби з раком розробляється ряд нових методик. Вони показують високу ефективність у комбінації з іншими методами лікування. На даний час стрімко розвивається таргетна терапія та імунотерапія.

Таргетна терапія — це форма лікування раку, яка зосереджується на білках, відповідальних за ріст, поділ і поширення ракових клітин. Маломолекулярні препарати досить маленькі, щоб легко проникати в клітини, що робить їх придатними для мішеней, розташованих усередині клітин. Моноклональні антитіла — це білки, виготовлені в лабораторії, створені для зв'язування зі специфічними мішенями ракових клітин. Деякі моноклональні антитіла допомагають імунній системі розпізнавати та знищувати ракові клітини. Інші безпосередньо пригнічують ріст ракових клітин або викликають їх самознищення. Крім того, деякі моноклональні антитіла доставляють токсини до ракових клітин [17].

Імунотерапія — це лікування раку, яке підвищує здатність вашої імунної системи боротися з раком.

Для лікування раку використовується кілька типів імунотерапії, зокрема:

1. Інгібітори імунних контрольних точок: моноклональні антитіла блокують імунні контрольні точки, які зазвичай регулюють імунну відповідь, щоб запобігти її надмірній активності. Блокуючи ці контрольні точки, препарати дозволяють імунним клітинам ефективніше атакувати рак.

2. Т-клітинна трансферна терапія: основана на посиленні природної здатності Т-клітин боротися зі злоякісними новоутвореннями. Імунні клітини виділяються з пухлини, а ті, які є найбільш ефективними проти раку, відбираються або модифікуються в лабораторії. Потім ці клітини розмножуються і знову вводяться в організм через вену. Дана терапія також відома як адоптивна клітинна терапія, адоптивна імунотерапія або імуноклітинна терапія.

3. Моноклональні антитіла: створені в лабораторії білки імунної системи призначені для зв'язування з конкретними мішенями на ракових клітинах. Деякі моноклональні антитіла маркують ракові клітини для легшого виявлення та знищення імунною системою, що робить їх різновидом імунотерапії.

4. Лікувальні вакцини: підсилюють реакцію імунної системи на ракові клітини, відрізняючись від профілактичних вакцин тим, що націлені на наявну пухлину.

5. Модулятори імунної системи посилюють загальну імунну відповідь організму проти злоякісного новоутворення. Деякі спеціально націлені на частини імунної системи, а інші мають ширший ефект [18].

1.3 Загальна характеристика дендритних клітин

Дендритні клітини (ДК) – це професійні антигенпрезентуючі клітини. Вони являють собою різні гетерогенні популяції, які відрізняються фенотипово і функціональними властивостями. Їх основа функція – це стимуляція, регуляція і підтримка імунної відповіді, підтримка гомеостазу

організму і запобігання розвитку аутоімунних захворювань у людському організмі.

Відкриття ДК і подальша ідентифікація патерн-розпізнавальних рецепторів (ПРР), дало поштовх до розуміння взаємозв'язків між вродженою та адаптивною імунною системами, запропоновані Іллею Мечніковим і Пауль Ерліхом відповідно. До того, як були охарактеризовані ДК, вважалося, що лімфоцити можуть самотійно ініціювати імунну відповідь. Проте експерименти Дональда Е. Мозьєра з використанням системи, розробленої Робертом Мішеллом і Річардом Даттоном, показали, що в той час як суспензії цілих мишачих спленоцитів можуть виробляти антитіла до гетерологічних еритроцитів, очищені лімфоцити цього робити не можуть, що свідчить про те, що додаткові клітини в селезінці необхідні для ініціації адаптивної імунної відповіді. Спочатку ці додаткові клітини вважалися макрофагами. Коли Ральф Стейнман приєднався до лабораторії Занвіла Кона, він виявив серед клітин селезінки миші напівадгезивний тип клітин із чіткою морфологією, які пізніше ідентифіковані як ДК через їхню деревоподібну форму та низький вміст лізосом порівняно з макрофагами. Подальші дослідження Стейнмана та його колег встановили, що ДК відокремлені від макрофагів і є найпотужнішими стимуляторами Т-клітинних відповідей серед додаткових клітин селезінки. ДК вперше виявлені Ральфом Стейнманом у 1973 році.

Крім стимуляції Т-клітин, ДК також здатні захоплювати антигени та транспортувати їх до сусідніх лімфоїдних тканин. Ранні дослідження показали, що клітини Лангерганса (КЛ) можуть мігрувати зі шкіри до дренуючих лімфоїдних органів, несучи антигени. КЛ вважають типом периферичних ДК і, як виявлено, у культурі клітин вони при взаємодії з антигеном стають морфологічно схожими до ДК, які виділені із селезінки миші. На основі цих факторів, розроблено концепцію дозрівання ДК, яка передбачає, що КЛ периферичної тканини поглинають зразки антигенів і

дозрівають до імуностимулюючого стану, в процесі міграції до вторинних лімфоїдних органів для представлення антигенів, наївним Т-лімфоцитам

На даний час виділяють велику кількість підтипів ДК, які виконують широкий спектр функцій. Умовно можна поділити їх за такою класифікацією: звичайні ДК і плазмоцитоїдні ДК, а також, за стадією розвитку: незрілі та зрілі [19-22].

В ряді досліджень використали стромальні клітини кісткового мозку миші, які містять гемопоетичні стовбурові клітини, з додаванням різних біоактивних медіаторів для отримання певної популяції попередників ДК, яка дає початок різним підмножинам дендритних клітин, виявлених у крові. На основі отриманих даних встановлено, що ДК і моноцити походять від одного і того ж попередника (моноцитарний та ДК попередник) (МДП). Для ДК виділяють головний ДК попередник (ГДП). ГДП є початковою формою для пре-ДК, потім ці клітини мігрують з кісткового мозку, утворюючи дві основні популяції ДК. Попередники гранулоцитарно-моноцитарних ДК людини послідовно розвиваються в попередники моноцитарних ДК, які згодом дають початок звичайним попередникам ДК, які обмежені утворенням трьох основних підмножин ДК: ДК CD1c+ і CD141+ ДК (разом вважаються звичайними ДК або кДК) і плазмоцитоїдні ДК (пДК) [23].

За фенотипом дендритні клітини людини не мають лінійних маркерів (CD3, CD19, CD14, CD20, CD56 і глікофорин А), але вони експресують головний комплекс гістосумісності II типу. кДК і пДК представляють основні типи ДК у крові та лімфоїдній тканині. кДК — це МНС- II+, CD11c+ і далі поділяються на підгрупи CD1c+ і CD141+. Три популяції ДК також можна розрізнити за молекулярними ознаками: CD1c+ ДК експресують IRF4, Notch2, Rbpj і Klf4 (білки-активатори/репресори та фосфопротейни, які задіяні у таких біологічних процесах, як транскрипція, регуляція транскрипції, альтернативний сплайсинг); CD141+ ДК експресують IRF8, batf3, Bcl6 і Flt3 (білки-активатори/репресори, трансферази, кінази, фосфопротейни, які залучені у таких біологічних процесах, як

альтернативний сплайсинг та регуляція транскрипції); і пДК експресують IRF8, Bcl11a, Spi-B, E2-2, Runx1 та IL-3RA (білки-активатори/репресори, які задіяні у таких біологічних процесах, як транскрипція, регуляція транскрипції, ацетилювання, альтернативний сплайсинг). CD1c⁺ ДК є підгрупою, тоді як CD141⁺ ДК є незначною популяцією, принаймні в крові. Вважається, що CD141⁺ дендритні клітини є людським еквівалентом мишачих CD8⁺ дендритних клітин, які здатні презентувати клітинно-асоційовані антигени CD8⁺ Т-клітинам. CD1c⁺ ДК експресують toll-подібний рецептор (TLR) 1-8 і при стимуляції можуть секретувати інтерлейкін-12 (ІЛ-12), фактор некрозу пухлини (ФНП- α), ІЛ-8 та ІЛ-10. CD141⁺ ДК експресують TLR 3 і TLR 8 і секретують високі рівні інтерферону І типу після стимуляції синтетичною дволанцюговою РНК полі-ICLC. Ця підгрупа ДК також відома тим, що виробляє високі рівні ІЛ-29 або інтерферону ІІІ типу у відповідь на активацію TLR 3. CD141⁺ ДК виключно експресують Clec9A (рецептор 1 лектинової групи ДК, ПКК), ендоцитний рецептор, який робить клітини більш здатними сприймати та презентувати антигени, отримані з некротичних клітин, а також хемокіновий рецептор XCR1. Хоча і CD1c⁺, і CD141⁺ ДК можуть перехресно презентувати антигени CD4⁺ і CD8⁺ Т-клітинам, CD141⁺ ДК можуть бути більш ефективними, хоча це може залежати від типу та форми антигенів і способу доступу до них [23-25].

Плазмоцитоїдні ДК є головними ефекторними клітинами в імунній відповіді. Вони мають здатність виробляти більше інтерферону типу І (ІФН- α/β) ніж інші типи клітин, у відповідь на вірусну інфекцію. Ці клітини отримують антиген через опосередкований рецепторами ендоцитоз, або коли поглинають вмираючі клітини, проте роблять це не так ефективно, як кДК. пДК швидко презентують антигени CD8⁺ Т-клітинам, за допомогою перехресного шляху. Такі клітини експресують високі рівні TLR 7 і TLR 9 [23, 26-28].

Плазмоцитоїдні ДК є майже у всіх тканинах, але найбільша їх кількість знаходиться у лімфатичних вузлах, мигдаликах, селезінці, тимусі, крові та

деяких інших периферичних тканинах, таких як печінка та слизова оболонка носа [22]. Також дендритні клітини містяться у шкірі. Виділяють п'ять типів: клітини Лангерганса (КЛ); CD14⁺ ДК; CD1a⁺ ДК; CD1c⁺ ДК; CD141⁺ ДК. Клітини Лангерганса вважаються основними антиген презентуючими клітинами (АПК), які містяться в епідермісі. Ці клітини отримують та переносять антиген до лімфатичних вузлів, де презентують його Т-клітинам, щоб викликати імунну відповідь [29].

1.4 Механізм процесингу і презентації антигену дендритними клітинами

До того, як дендритна клітина зустріне з патогеном і презентує антиген на поверхні вона відноситься до незрілих ДК. За допомогою «активуючих подразників» відбувається серія складних фенотипічних та функціональних змін. Цей процес «активації» чітко контролюється і регулюється організмом. Такі клітини характеризуються підвищенням рівня регуляції хемокінових рецепторів (наприклад, CCR 7), костимуляторних молекул (CD54, CD80 і CD86), молекул адгезії та молекул МНС I та II типу. Цитокіни, що виробляються під час диференціації ДК впливають на імунну відповідь, що формується за допомогою CD4⁺ Т-клітинними підтипами, такими як Т-хелпери 1 (Тх-1), Т-хелпери 2 (Тх-2) і регуляторними Т-клітинами. ДК регулюють імунні відповіді, які розгортаються шляхом активації В-клітин та В-клітин пам'яті, природні кілерні клітини (ПКК) і природні кілерні Т-клітини (ПКТ). Дозрівання ДК призводить до того, що фагоцитарна активність знижується, натомість посилюється процесинг та презентація антигену, також покращується міграція до лімфоїдних та збільшується здатність стимулювати В- і Т-клітини. Дозрівання може бути спровоковане мікробними продуктами, які викликають активацію рецепторів, таких як TLRs34, або внутрішньоклітинних адапторних білків, таких як RIG-I35. Також, можливе активування через запальні молекули, такі як ФНПа, ІЛ-1, ІЛ-6 та ІФНа, які виробляються клітинами імунної системи або ураженими

тканинами. Мертві клітини також виділяють фактори, що активують ДК, такі як білки теплового шоку, РНК і ДНК [30-38].

ДК захоплюють антигени за допомогою різних механізмів, таких як фагоцитоз, мікро- або макропіноцитоз та ендоцитоз, цьому сприяють такі рецептори, як Fc-рецептори (такі як рецептори Fc γ I типу або CD64 та рецептори Fc γ II типу або CD32), інтегрини (наприклад, $\alpha\beta3$ або $\alpha\beta5$), рецептори лектину С-типу (ЦЛР, включаючи рецептор манози та DEC205), рецептори апоптотичних клітин і рецептори фагоцитозу. Захоплені антигени піддаються процесингу або через ендогенний шлях, що призводить до презентації на молекулах МНС I класу до CD8 $^{+}$ Т-клітин, або через екзогенний шлях, що призводить до презентації на молекулах МНС II класу до CD4 $^{+}$ Т-клітин. Крім того, ДК здатні обробляти антигени за допомогою двох шляхів перехресної презентації: цитозольного шляху та вакуолярного шляху. У цитозольному шляху антигени транспортуються до цитоплазми, обробляються в протеасомі та завантажуються на новостворені молекули МНС I класу, можливо, за участю механізму ендоплазматичного ретикулуму. Вважається, що вакуолярний шлях, менш вивчений, відбувається в ендоцитних компартментах, будучи стійким до інгібіторів протеасом, але чутливим до інгібіторів лізосомального протеолізу, і залежить від катепсину S.

Нещодавні дослідження вказують на те, що сигналізація TLR впливає на дозрівання фагосом і призводить до накопичення молекул МНС I класу у фагосомах для ефективної перехресної презентації. Незважаючи на триваюче дослідження механізмів, що лежать в основі крос-презентації, здатність ДК використовувати цей процес для активації CD8 $^{+}$ Т-клітин добре встановлена. ДК можуть представляти антигени в нетрадиційних формах, крім пептидів, таких як фосфопептиди та цитруліновані антигени, які розпізнаються Т-клітинами та є потенційними мішенями для імунотерапії. Крім того, ДК обробляють ліпідні антигени та презентувати їх на молекулах CD1d для активації клітин ПКТ. Вони також розпізнають антигени, що містять

вуглеводні структури, за допомогою CLR, таких як MMR, DEC205 і ДК-SIGN, які функціонують як ендоцитні рецептори для інтерналізації та обробки антигену, хоча деякі С-лектиноподібні рецептори (ЦЛР), такі як MICL і DICR, можуть мати інгібіторну роль [39-47].

1.5 Індукція імунітету

Після дозрівання ДК переміщуються до вторинних лімфоїдних тканин, таких як лімфатичні вузли (де вони захоплюють антигени зі шкіри та твердих органів), селезінка (де вони захоплюють антигени з крові) або Пейєрові бляшки (де вони захоплюють антигени з просвіту кишечника). Тут вони взаємодіють з Т- і В-клітинами. кДК проходять через аферентну лімфу від нелімфоїдних тканин до багатих Т-клітинами зон лімфатичних вузлів. пДК також мігрують до Т-клітинних ділянок вторинних лімфоїдних тканин, але вони роблять це через високі ендотеліальні венули лімфатичних вузлів і маргінальну зону селезінки, ймовірно, за допомогою CCR 7 і CD62-L. Як активовані кДК, так і пДК крові можуть рухатися у відповідь на хемокіни (CC L19 і CCL 21), які направляють їх до лімфатичних вузлів через експресію CCR7. Наявність CCR7 та інфільтрація CD141+ ДК пов'язані зі збільшенням інфільтрації Т-клітин у пухлинах і покращенням клінічних результатів при меланомі. Нещодавно дослідження на мишах показали, що стратегічно розташовані ДК в лімфатичних вузлах можуть викликати Т-клітинні відповіді набагато швидше і незалежно від мігруючих ДК. Ці ДК, розташовані в ендотелії лімфатичних синусів, можуть «сканувати» лімфу, щоб захопити розчинні антигени та швидко ініціювати імунну відповідь. Можна розробити специфічні антигенні ад'ювантні платформи для націлювання на ці підмножини ДК [48-51].

Т-клітини специфічно розпізнають антигени, представлені на молекулах МНС на поверхні дендритних клітин через їхні Т-клітинні рецептори (ТКР). Т-клітини CD8 розпізнають пептиди, зв'язані з молекулами МНС I класу, тоді як Т-клітини CD4 розпізнають пептиди, зв'язані з молекулами МНС II класу. Активація Т-клітин залежить від інтенсивності та

тривалості їх взаємодії з ДК, що відбувається через утворення імунологічного синапсу (ІС). ІС виникає в результаті реорганізації цитоскелета всередині Т-клітини, що призводить до динамічного кластеризації поверхневих рецепторів і сигнальних молекул у супрамолекулярні кластери активації. Далі ці кластери створюють оптимальне середовище для сигналізації TCR. Під час дозрівання ДК посилення коstimуючих молекул (CD40, CD86) і молекул МНС має важливе значення для встановлення стабільних і тривалих контактів з Т-клітинами через ІС, що необхідно для експансії Т-клітин і диференціювання в Т-клітини пам'яті та ефекторні Т-клітини.

ДК також активують наївні В-клітини та В-клітини пам'яті, головним чином шляхом стимуляції CD4 Т-клітин, таких як Т-фолікулярні хелперні клітини, які сприяють росту В-клітин і виробленню антитіл. Такі фактори, як В-Lys і APRIL, що виробляються ДК, впливають на перемикання класів антитіл і проліферацію В-клітин. Фолікулярні ДК у зародкових центрах лімфатичних вузлів підтримують В-клітини пам'яті шляхом утворення комплексів антиген-антитіло та постійної стимуляції В-клітин. Крім того, ДК активують ПКК через ІЛ-12, ІЛ-15 та інтерферони І типу (ІФН). ІЛ-12 з ДК посилює цитолітичну активність ПКК, тоді як взаємодія ПКК додатково сприяє дозріванню ДК. ПКК і Т-клітини CD8 продукують XCL1 і XCL2, рекрутуючи та активуючи ДК, що експресують рецептор XCR1. Нарешті, ДК активують ПКК і Т-клітини через інваріантні молекули CD1 та презентацію гліколіпідів. Отже, ДК відіграють вирішальну роль у мобілізації багатьох компонентів як вроджених, так і адаптивних імунних відповідей [52-54].

Окрім запуску імунної відповіді, дендритні клітини відіграють вирішальну роль у підтримці периферичної толерантності та запобіганні аутоімунітету. Незрілі ДК не здатні ефективно активувати Т-клітини, оскільки вони експресують низькі рівні МНС і коstimуляторних молекул. ДК можуть також виробляти індоламін-2,3-діоксигеназу (IDO) у відповідь на специфічні стимули, що призводить до зупинки Т-клітинного циклу або

апоптозу, можливо, через контррегуляторний ефект. Метаболіти катаболізму триптофану, що виробляються IDO, безпосередньо надають цитотоксичну дію на Т-клітини. Крім того, через виробництво IDO ДК можуть сприяти диференціації регуляторних Т-клітин (Т-рег.), які можуть проникати в різні типи пухлин і пригнічувати проліферацію Т-клітин за допомогою механізмів, що включають TGF β , IL-10 і CTLA-4.

Міграційні ДК мають спеціалізовану функцію периферичної толерантності, індукуючи генерацію Т-рег. У рамках своєї функції імунного нагляду незрілі ДК захоплюють власні антигени та, без сигналів дозрівання, індукують толерантність до цих власних антигенів. ДК також полегшують толерантність до власних антигенів шляхом фагоцитозу апоптотичних клітин через такі рецептори, як LOX-1, CD36, інтегрини ($\alpha\beta 3$ і $\alpha\beta 5$) і рецептори комплементу (CR3 і CR4). Зв'язування апоптотичних клітин з CR3 на ДК призводить до зниження дозрівання у відповідь на ліпополісахарид (ЛПС) і зниження праймування та активації відповідей Т-клітин пам'яті. Крім того, зв'язування апоптичних мікрочастинок із CD44 може пригнічувати функцію ДК людини. Ці можливості роблять ДК дуже ефективними інструментами для індукції толерантності в таких контекстах, як трансплантація та аутоімунні захворювання [55-59].

1.6 Дендритні клітини в імунотерапії онкологічних захворювань

Кілька наукових досліджень встановили, що під час лікування онкологічних захворювань роль імунної системи є дуже важливою. По-перше, було припущено, що деякі випадки спонтанної регресії були викликані саме імунною відповіддю. По-друге, доведено, що існують у людському організмі імуногенні пухлиноасоційовані або пухлиноспецифічні антигени, які розпізнаються В- і Т-клітинами. По-третє, миші з нокаутом, у яких відсутні елементи сигнального шляху ІФН і перфорин мають значно вищий ризик розвитку пухлини. Нарешті, адоптивне перенесення лімфоцитів, що інфільтрують пухлину, або сконструйованих Т-клітин, специфічних для пухлинного антигену, призвело до регресії пухлини

у пацієнтів з меланою. У сукупності ці дослідження демонструють захисну роль імунної системи в ліквідації пухлини [60-62].

Взаємозв'язок між імунною системою та пухлинами тепер описується трьома фазами імуноредагування раку: елімінація, рівновага та втеча. Під час фази елімінації активуються як вроджені, так і адаптивні імунні реакції для знищення пухлин. У фазі рівноваги імунна система чинить селекційний тиск на пухлину. Пухлинні клітини, які протистоять цьому тиску, прогресують до фази виходу, де вони неконтрольовано ростуть і стають злоякісними.

Враховуючи вирішальну роль дендритних клітин у ініціації імунної відповіді та спостереження, дослідники припустили, що ДК можуть бути ефективним інструментом для посилення ендогенної протипухлинної відповіді і ліквідації пухлини. Як доказ принципу, контрольоване дослідження за участю здорових суб'єктів показало, що одноразова ін'єкція ДК-вакцини, що містить ДК з імпульсним антигеном, може індукувати антиген-специфічні імунні відповіді *in vivo*, тоді як сам по собі розчинний антиген не може. Цей результат вказує на те, що ДК можуть бути успішно завантажені антигенами та після ін'єкції мігрувати до лімфоїдних тканин для активації антиген-специфічних Т-клітин. Підтримуючи цю ідею, ранні клінічні випробування з використанням генерованих *ex vivo* ДК, імпульсованих пухлинними антигенами, продемонстрували індукцію імунної відповіді, відкриваючи шлях для подальших маніпуляцій з ДК для посилення імунної відповіді *in vivo* [63-65].

Не зважаючи на численні дослідження дендритних клітин їх оптимізація дозрівання ще вивчається. Хоча найбільш популярний метод у клінічних випробуваннях є використання генерованих моноцитарних ДК *ex vivo*, але наразі не відомо, яка первинна підгрупа ДК є найкращою для того, щоб використовувати її як ад'ювант або мішень для вакцинації. Це важливо, тому що ДК отримані з моноклеарів не можна порівняти з підмножинами ДК у стаціонарному стані, які присутні в організмі.

Висновок до розділу 1

Отже проаналізувавши літературні джерела ми виклали інформацію про злоякісне новоутворення та його види. Також у цьому розділі описано методи лікування та пошук нових, більш дієвих методів. Подається загальна характеристика дендритних клітин, починаючи від їх відкриття, процесом презентації антигену, індукції імунітету і до використання їх у імунотерапії онкологічних захворювань.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МЕТА ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальну частину кваліфікаційної роботи виконано на базі Науково-дослідного відділення експериментальної онкології ДНП «Національний інститут раку», а саме: дослідження оптимізації дозрівання генерованих дендритних клітин за допомогою біоактивних медіаторів.

Об'єкт дослідження. ДК моноцитарного походження.

Предмет дослідження. Рівень експресії поверхневих CD маркерів та мРНК генів цитоків і хемокінів у ДК.

Мета дослідження. Розробити ефективну технологію отримання Тх-1 – поляризованих ДК моноцитарного походження із використанням різних біоактивних медіаторів.

2.1 Характеристика хворих на злоякісні новоутворення та схема застосування специфічної активної імунотерапії на основі дендритних клітин

В процесі виконання роботи нами було використано біологічний матеріал 40 пацієнтів з діагнозом рак легені (РЛ) та 25 практично здорових людей віком від 23 до 45 років без онкологічної патології в анамнезі. Всі хворі були сповіщені про проведення досліджень і дали інформовану згоду на їх виконання. Дослідження проводились згідно етичних норм, прийнятих українським законодавством.

Імунотерапію на основі ДК призначали в ад'ювантному режимі, після основного лікування. Кількість ДК, «навантажених» аутологічними механохімічно активованими ліофілізованими пухлинними клітинами на одне введення складала $(3,0-10,0) \times 10^6$. ДК вводили внутрішньовенно хворим на РЛ. Усім хворим проводили 4 ін'єкції (етапи) з періодичністю 1 раз на місяць.

2.2 Культуральні методи

ДК генерували із моноцитів периферичної крові (всі маніпуляції проводили з дотриманням правил асептики). Лейкоцити сепаративно розділяли у градієнті щільності фіколу ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) після чого клітини ресуспендували в середовищі RPMI-1640 («Sigma», США) з додаванням 2 мМ/л L-Gly, 100 мкг/мл стрептомицину та 100 од/мл пеніциліну та інкубували у пластиковому флаконі при температурі 37 °C, 5 % CO₂ протягом 2-3 годин. Після чого клітини злегка струшували та видаляли ті, що не прикріпилися, шляхом їх змивання. Концентрацію клітин доводили до $0,5 \times 10^6$ /мл середовищем культивування та додавали 1 % аутологічної плазми та 100 нг/мл рекомбінантного гранулоцито-макрофагально-колонієстимулюючого фактору (ГМ-КСФ) людини («Leucamax Novartis», Індія / «Schering-Plough», США або «ICN», США), 20 нг/мл інтерлейкіну-4 (ІЛ-4) («Sigma», США). Ростові фактори також додавали до ДК на 3-тю добу культивування. На 7-му добу дозрівання до ДК додавали 100 нг/мл ЛПС («Sigma», США) або інші біоактивні медіатори.

З метою визначення оптимальної концентрації ІФНа для дослідження використовували рекомбінантний 2 α b-ІФН («Лаферобіон», «Біофарма», Україна) використовувався в концентраціях 10 тис.МО/мл або 100 тис.МО/мл.

2.3 Імуноцитохімічне фарбування ДК

ДК культивувались на покривних скельцях в стерильних чашках Петрі («Хімлаборреактив», Україна). На 8-му добу культивування відбирали надосадову рідину та відмивали клітини 1 мл ЗФР. Потім фіксували ДК в 1 мл 4% параформальдегіда протягом 10 хвилин при кімнатній температурі та пермобілізували мембрани в 1 мл 0,3 % Triton X 100 («Sigma», США) при кімнатній температурі протягом 5 хвилин. Відмивали клітини спочатку розчином ЗФР двічі, а потім 1 мл 1 % розчина бичачого сироваткового альбуміну та інкубували 1 год. при кімнатній температурі постійно

струшуючи. Відбирали над осадову рідину і відмивали розчином 2 мл ЗФР. Потім на скло наносили фалоїдин («Abbot», США) в розведенні 1:500 та інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі постійно струшуючи та відмивали ЗФР тричі. Покривні скельця виймали з чашок Петрі, наносили DAPI Counterstain II («Abbot», США) для фарбування хроматину і поміщали покривні скельця стороною з ДК на предметне скло.

2.4 Імунологічні методи дослідження

Аналіз функціональних та фенотипових характеристик ДК проводили методом проточної цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл до маркерів CD83, CD86, CD11c мічених флюоресцеїнаізотіоціанатом (ФІТЦ), та антитіл до HLA-DR, мічених фікоеритрином (PE) («Becton Coulter», США). Показник фагоцитарної активності (ФА) ДК визначали за допомогою проточної цитометрії на основі кількісної оцінки поглинутих ними бактерій *St. aureus*, мічених ФІТЦ. Для цього 90 мкл *St. aureus*, міченого ФІТЦ, в концентрації 10^9 /мл, вносили в пробірки для проточної цитометрії, додавали рівний об'єм клітин в культуральному середовищі RPMI-1640, в концентрації 2×10^6 /мл. В якості контролю використовували суспензію клітин в середовищі 199 або RPMI-1640, в концентрації 2×10^6 /мл. Проби інкубували 30 хв при 37 °C. Далі до кожного зразку додавали по 2 мл охолодженого ЗФР і центрифугували при 1500 об/хв 5 хв. Отриманий осад ресуспендували в 400 мкл 0,4 % розчину формаліну. Визначали відносну кількість фагоцитуючих клітин.

Всі проточноцитометричні дослідження виконувалися на приладі FACS Calibur («Becton Dickinson», США), що оснащений двома лазерами (довжиною хвилі 488 та 625 нм), з використанням програми CellQuest-PRO для комп'ютерів Макінтош для придбання та аналізу даних. Для виміру флюоресценції фікоеритрину та РІ використовували вузькополосний фільтр 585/42 нм, флюоресценції ФІТЦ - 642/75 нм.

2.5 Молекулярно-генетичні методи дослідження

2.5.1 Виділення тотальної РНК та проведення реакції зворотної транскрипції

Для виділення тотальної РНК з ДК методом екстракції на силікатних колонках для виділення РНК із тканини та суспензії клітин (Macherey-Magel, Німеччина). Для роботи з РНК використовували тільки одноразові стерильні пластикові матеріали, які мають спеціальні маркування “Rnase-free”, “Dnase-free”. Отриманий зразок РНК готовий до обробки ДНКазою та постановки реакції зворотної транскрипції. Обробка виділеної РНК ДНКазою необхідна для позбавлення від геномної ДНК, яка може бути джерелом хибних результатів. Для обробки виділеної РНК ДНКазою використовували реактиви DNase, DNase-buffer (“Ambion”, США), та RNase-inhibitor (“Applied Biosystems”, США) проводили за протоколом виробника. Концентрацію РНК визначали методом спектрофотометрії за допомогою спектрофотометра Nano Drop 1000 (“Thermo Fisher Scientific” США) та доводили зразок РНК до концентрації 200 нг/мкл. Після цього РНК готова до реакції зворотної транскрипції.

Для проведення реакції зворотної транскрипції використовували High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США). Отриману в результаті реакції зворотної транскрипції кДНК для наступної постановки ПЛР розводили в 2 рази ДНК-буфером (до 20 мкл розчину кДНК додають 20 мкл ДНК-буфера), кДНК може зберігатися протягом 2-3 тижнів при температурі 4 °C, до 1 року при температурі -20 °C та довготривало при температурі -70 °C. Використаний пластиковий посуд (пробірки, накінечники) знезаражували в спеціальному контейнері, який містить дезинфікуючий 5 %-ний розчин хлораміну або 1N розчин соляної кислоти.

2.5.2 Визначення рівня експресії гена IL-12 методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням TaqMan зондів

Послідовності праймерів та TaqMan зондів для визначення рівня експресії гена IL-12, що складається з двох субодиниць IL-12p35 та IL-12p40

були підібрані з використанням програми Primer Express® Software v3.0 (“Applied Biosystems”, США) та синтезовані фірмою “Applied Biosystems” (США):

Прямий праймер (GAPDH): 5'TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA3

Зворотний праймер (GAPDH):3'CAGCGGAACCGCTCATTTGCCAATGA5'

TaqMan зонд (GAPDH): 6-VIC-ATGCCCTCCCCCATGCCATCCTGCGT-TAMRA

Прямий праймер (ІЛ-12p35): 5 CTCCTGGACCACCTCAGTTTG3'

Зворотний праймер (ІЛ-12p35): 3' GGTGAAGGCATGGGAACATT5'

TaqMan зонд (ІЛ-12p35): 6-FAM- CCAGAAACCTCCCCGTGGCCA – TAMRA

Прямий праймер (ІЛ-12p40): 5 CGGTCATCTGCCGCAAA3'

Зворотний праймер (ІЛ-12p40): 3' TGCCCATTCGCTCCAAGA5'

TaqMan зонд (ІЛ-12p40): 6-FAM- CGGGCCCAGGACCGCTACTATAGC TAMRA

Праймери використовували в концентрації 0,3 μ М, та зонди в концентрації 0,2 μ М. Реакційну суміш для проведення реакції ампліфікації готували безпосередньо перед використанням. Реакційна суміш містила: 1 мкл прямого праймеру, 1 мкл зворотного праймеру , 1 мкл TaqMan зонду 4,5 мкл ПЛР-води, 12,5 мкл TaqMan Universal PCR Master Mix (“Applied Biosystems”, США). До суміші додавали 5 мкл розчину кДНК. Використовуючи наступний температурний режим: початок ампліфікації при 95 °С – 5 хв, накопичення ампліфікаційного продукту протягом 50 циклів 94 °С – 15 с, 60 °С – 1 хв.

Для контролю рівня експресії мРНК гена ІЛ-12 вимірювали експресію мРНК гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH). Після закінчення реакції ампліфікації проводили облік одержаних результатів згідно рекомендацій фірми-виробника приладу. Рівень експресії гена ІЛ-12 оцінювали за допомогою методу $\Delta\Delta C_t$ з нормуванням щодо рівня експресії контрольного гена.

2.5.3 Визначення рівня експресії генів цитокінів та хемокинів методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням флюорохрома SYBRGreen

Рівень експресії генів цитокінів та хемокинів визначали за допомогою методу кількісної ПЛР з детекцією результатів в режимі реального часу на приладі 7500 Real-Time PCR Systems (“Applied Biosystems”, США) з використанням специфічних праймерів та асиметричного ціанінового катіонного флюорохрома SYBRGreen (C₃₂H₃₇N₄S⁺) з піком поглинання $\lambda_{\text{max}}=488$ нм та флюоресценції $\lambda_{\text{max}}=522$ нм, який має високу афінність до дволанцюгової ДНК. SYBRGreen, що знаходиться у розчині ПЛР зв’язується з дволанцюговою ДНК, тим самим збільшуючи рівень флюоресценції пропорційно до накопичення продукту ПЛР.

Послідовності праймерів були підібрані з використанням програми Primer Express® Software v3.0 фірми “Applied Biosystems” (США) та синтезовані фірмою “Applied Biosystems” (США) (див. табл. 2.1).

Таблиця 2.1 – Послідовність праймерів та умови проведення ПЛР

Предмет дослідження	Послідовність праймерів	Температура відпалу праймерів (T _m), °C	Концентрація праймерів
1	2	3	4
TGF- β	Прямий праймер – GGACATCAACGGGTTCACТА Зворотний праймер – CCGGTTCATGCCATGAATGG	60	0,25
IL-10	Прямий праймер – AGGTGATGCCCCAAGCTGA Зворотний праймер – TCTCCCCCAGGGAGTTCACA	60	0,25
INF- γ	Прямий праймер – CCAACGCAAAGCAATACATGA Зворотний праймер – TTTTCGCTTCCCTGTTTТAGCT	60	0,25

Продовження таблиці 2.1

1	2	3	4
ФНП-α	Прямий праймер – CCCAGGCAGTCAGATCATCTTC Зворотний праймер – AGCTGCCCCCTCAGCTTGA	60	0,25
CCL3	Прямий праймер – CATCATTTGCTGCTGACACG Зворотний праймер – TGTGGAATCTGCCGGGAG	60	0,25
CCL5	Прямий праймер – ACCACACCSTGCTGCTTTG Зворотний праймер – GCGGTTCTTTCGGGTGACA	60	0,25
IDO	Прямий праймер – TCAATGCCCCATACAACAAA Зворотний праймер – TGGCAAGACCTTACGGACATCTC	60	0,25
CCR7	Прямий праймер – CTCCAGGCACGCAACTTTGA Зворотний праймер – CACAGGTGCTACTGGTGATGTTGA	60	0,25
ІЛТ-3	Прямий праймер – CTGTGTCAGTCACGGAGCC Зворотний праймер – GCAGGTAGTGGGAGAAGCC	60	0,25
GAPDH	Прямий праймер – GCCAAGGTCATCCATGACAACCTTTGG Зворотний праймер – GCCTGCTTCACCACCTTCTTGATGTC	57	0,25

Для проведення ПЛР використовували такий температурний режим:

- 2 хвилини при температурі 50 °C ;
- ампліфікація: початок ампліфікації при температурі 94 °C – 8 хвилин, і накопичення ампліфікаційного продукту на протязі 45 циклів при температурі 94 °C – 15 секунд, 55 °C – 15 секунд, 72 °C – 30 секунд.
- дисоціація (розділення отриманих продуктів за температурою плавлення): при температурі 95 °C – 15 секунд, 60 °C – 30 секунд, 95 °C – 15 секунд.

Для контролю рівня експресії мРНК досліджуваних цитокінів та хемокінів вимірювали експресію мРНК (GAPDH). Після закінчення реакції ампліфікації проводили облік одержаних результатів згідно рекомендацій фірми-виробника приладу. Рівень експресії генів цитокінів оцінювали за допомогою методу $\Delta\Delta C_t$ з нормуванням щодо експресії контрольного гену.

Одержані результати обробляли статистично з використанням t -критерія Стюдента. Вірогідними вважали значення при рівнях $p \geq 0,05$. Закон нормального розподілу виборок перевіряли за допомогою статистичних тестів Колмогорова-Смирнова.

Висновки до розділу 2

У другому розділі прописані методи дослідження оптимізації генерованих дендритних клітин за допомогою біоактивних медіаторів. Відповідно поставленої задачі ми виклали методики дослідження генерованих ДК моноцитарного походження. Представлено методику вирощування ДК *in vitro* культуральним методом з додаванням різних факторів росту. Використано імунологічний метод для аналізу функціональних та фенотипових характеристик ДК, який проводили методом проточної цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл. Також використані молекулярно-генетичні методи дослідження, для того щоб визначити регуляцію експресії генів, цитокінів та хемокінів у ДК.

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Характеристика дендритних клітин моноцитарного походження у хворих з різними формами злоякісних новоутворень

3.1.1 Метод ідентифікації дендритних клітин, одержаних з моноцитів периферичної крові хворих на злоякісні новоутворення, за їх цитоморфологічними ознаками

ДК є найбільш ефективними із відомих АПК імунної системи. Вони характеризуються наявністю багаточисельних довгих (до 10 мкм) рухомих цитоплазматичних відростків, які утворюються в процесі їх активації, диференціювання і дозрівання. У культурі вони мають так звану “вуалевидну” форму. Така особлива форма та рухомість ДК допомагають їм здійснювати основну функцію – захвату та затримки антигену і взаємодії з Т-клітинами. Унікальні морфологічні властивості були виявлені лише в нативних препаратах при фазово-контрастній мікроскопії, однак зрілі ДК не характеризуються адгезивними властивостями і тому при стандартних методах гістологічного фарбування ДК практично не виявляються. В той же час дані про можливість приготування цитологічних препаратів ДК, що дозволяють детально характеризувати їхні морфологічні особливості, в сучасній літературі практично відсутні. В ході виконання роботи нами був розроблений протокол імуноцитотокхімічного фарбування ДК генерованих з моноцитів периферичної крові. На рис. 3.1 зображені культури ДК, пофарбовані DAPI (хроматин) та фалоїдином (цитоплазма).

Даний метод дозволяє розширити можливості методів візуалізації ДК при їх генерації *in vitro*.

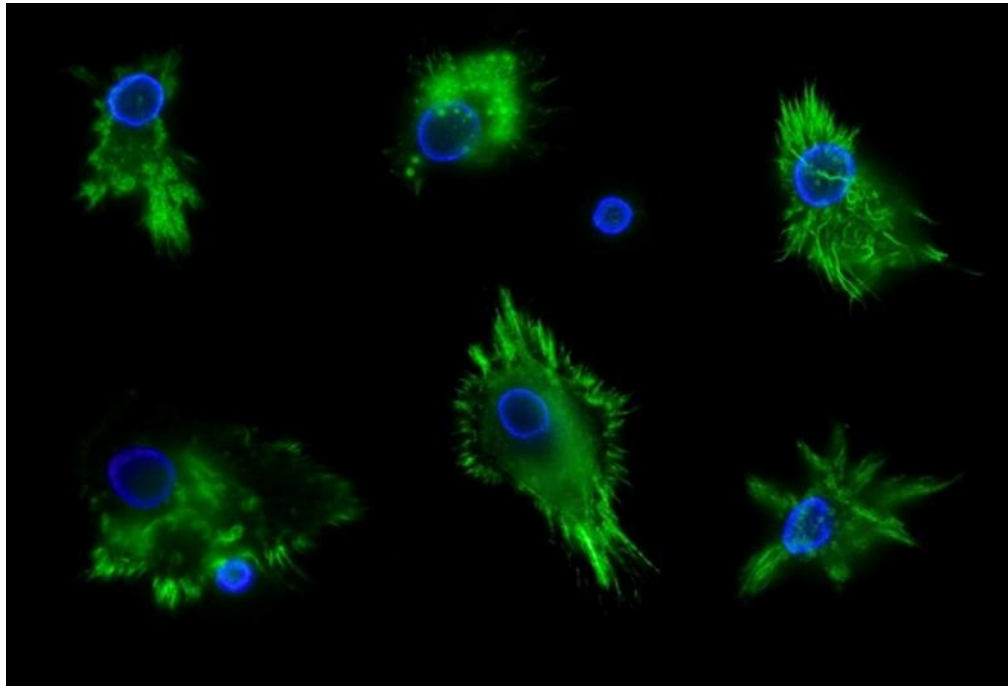


Рисунок 3.1 – Флуоресцентна мікроскопія, х 1000. Дендритні клітини, генеровані з моноцитів периферичної крові хворих на злоякісні новоутворення. Цитологічний препарат ДК моноцитарного походження генерованих *in vitro*. Хроматин пофарбований DAPI, цитоскелет пофарбований фалоїдином.

3.1.2 Функціональні властивості генерованих моноцитарних дендритних клітин у хворих на злоякісні новоутворення

Після культивування *ex vivo* ДК повинні бути життєздатними, оскільки можуть достатньо довго не зустріти антигенспецифічні Т-клітини в лімфатичних вузлах. Є дані, що при внутрішньо шкірному введенні ДК розвиток імунної відповіді у лімфатичних вузлах займає від 24 до 48 годин. Тому клінічна ефективність ДК, застосованих в якості клітинної основи для протипухлинної вакцини, залежить від їх потенційного виживання в організмі реципієнта.

Встановлено, що дозрівання ДК полегшує їх виживання і, таким чином, має антиапоптотичну дію і що це відбувається переважно при посиленні експресії Bcl-XL та Bcl-2 [66]. Крім того, доведено, що дозрівання ДК захищає їх від елімінації ПКК-клітинами. Це є важливим компонентом

характеристики ДК, оскільки вони достатньо довго можуть не зустріти унікальні, ті що рідко зустрічаються антиген специфічні Т-клітини у лімфатичних вузлах.

Встановлено, що популяції ДК хворих РЛ, характеризуються збільшенням долі незрілих/частково зрілих клітин, що свідчить про порушення їхнього диференціювання/дозрівання, в тому числі після попередніх курсів платиновмісної хіміотерапії. При цьому характеристики ДК, генеровані з попередників, що були одержані з різних джерел, практично не відрізнялися. За рівнем експресії молекул, що беруть участь у презентації антигена – CD86 та HLA-DR, маркеру зрілості CD83, а також за цитоморфологічними властивостями, ДК онкологічних хворих відносяться до клітин середнього ступеня зрілості, тобто є частково зрілими.

Слід зазначити, що ступінь зрілості ДК у хворих на РЛ зростає з кожним наступним введенням ДК-вакцини (див. рис. 3.2).

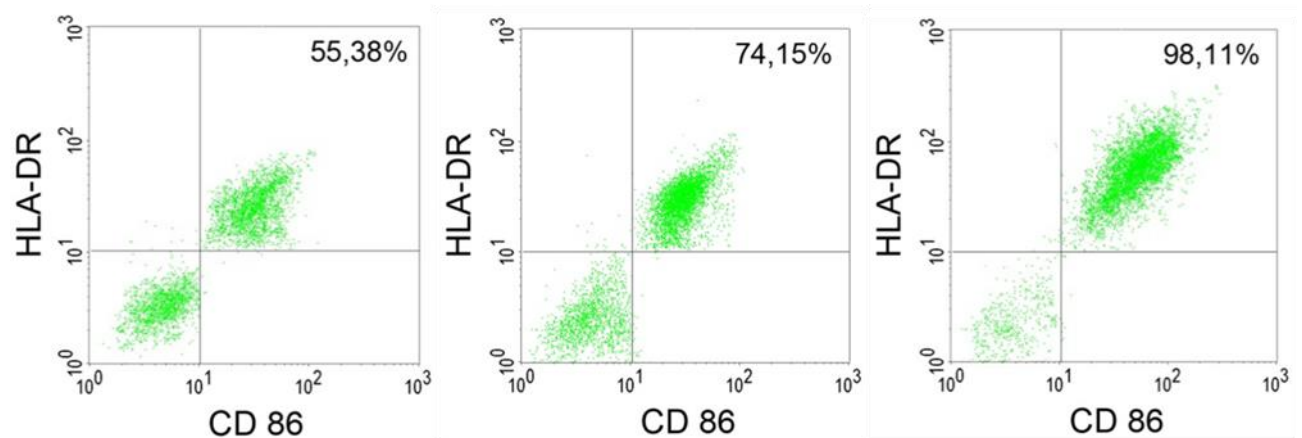


Рисунок 3.2 – Дендритні клітини, генеровані з моноцитів периферичної крові хворого на рак легені на етапах проведення імунотерапії.

Реалізація функцій ДК багато в чому визначається їх локалізацією в організмі та здатністю до міграції. Процес міграції ДК регулюється взаємодією хемокинів з їхніми рецепторами та різноманітними протеазами та відповідними рецепторами, наприклад, урокіназний плазміногенний активатор – система (uPA)/uPAR. Основним хемокиновим рецептором, що відповідає за міграцію ДК, є CCR7. Міграцію до Т-зон лімфатичних вузлів

забезпечують хемокіни CCL19 (ELC) і CCR21 (SLC), що розпізнаються рецептором CCR7. Ці хемокіни секретуються стромальними клітинами Т-зон лімфатичного вузла [67].

Як показали результати досліджень, активність гена CCR7 в ДК онкологічних хворих практично не порушена, рівень експресії мРНК гена навіть дещо перевищує рівень у ДК практично здорових людей (див. рис. 3.3). Слід зазначити, що після III-IV етапів ДК-вакцинотерапії різниці у рівнях експресії мРНК CCR7 в ДК онкологічних хворих та практично здорових людей стають статистично достовірними.

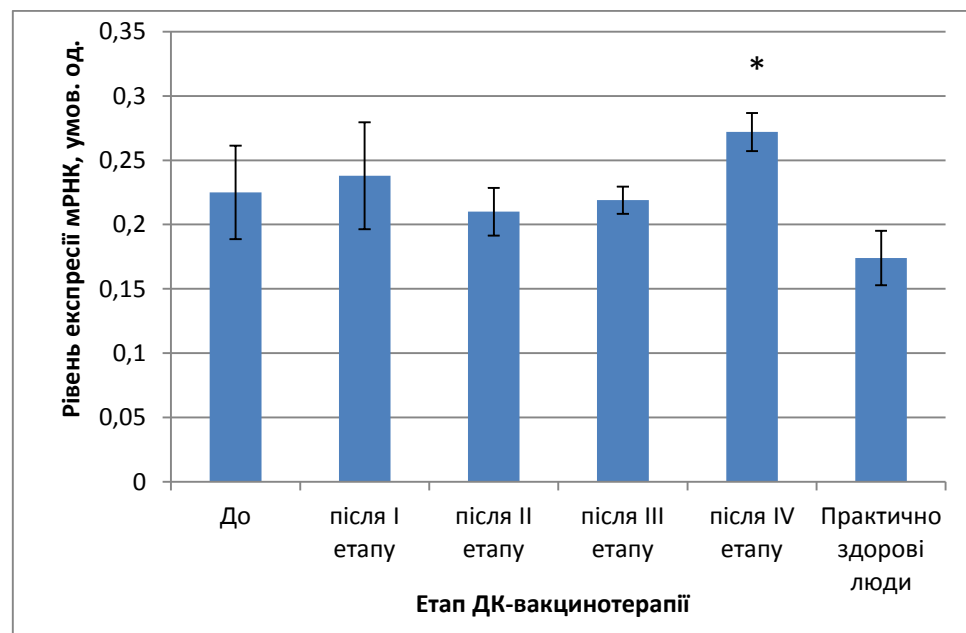


Рисунок 3.3 – Рівень експресії мРНК CCR7 в генерованих дендритних клітинах хворих на недрібноклітинний РЛ.

Примітка.* – $p < 0,05$ в порівнянні зі значенням у практично здорових людей.

Наряду зі здатністю індукувати активацію імунокомпетентних клітин, ДК можуть і пригнічувати імунну відповідь. Толерогенні/супресорні властивості ДК обумовлені різними механізмами, в тому числі здатністю ДК експресувати коінгібіторні молекули і рецептори (B7-H1, ІЛТ-2, ІЛТ-3, ІЛТ-4, CD209, CD200R і HLA-G), продукувати імуносупресивні цитокіни (ІЛ-10, IDO, TGF- β) і індукувати генерацію Т-рег. (CD4+CD25+) [68].

Толерогенні властивості ДК супроводжуються набуттям або посиленням експресії певних молекул, для чого необхідна активація генів (мРНК). Як показали результати досліджень, рівень експресії мРНК імуносупресивних молекул в ДК, генерованих у хворих на злоякісні новоутворення, підвищена у порівнянні із ДК практично здорових людей (для TGF- β $p < 0,05$) (див. рис. 3.4).

На етапах проведення вакцинотерапії рівень експресії мРНК TGF- β знижується до рівня у ДК практично здорових людей. Рівень експресії мРНК фермента IDO також суттєво знижується на IV етапі вакцинотерапії, при чому її рівень є значно нижчим порівняно з таким у ДК до початку вакцинотерапії і рівнем у ДК практично здорових людей.

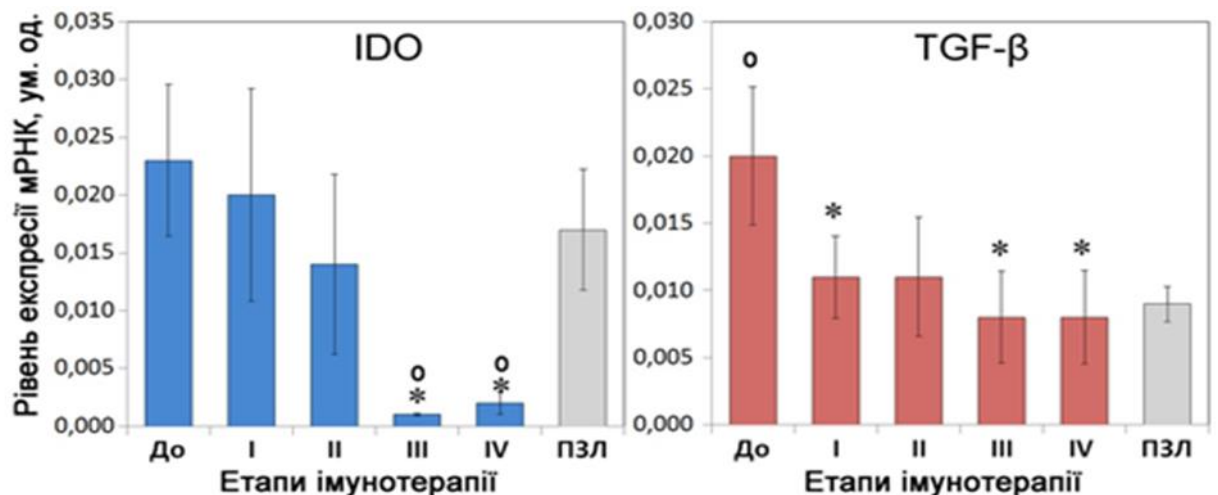


Рисунок 3.4 – Рівень експресії мРНК TGF- β та IDO в генерованих дендритних клітинах хворих на злоякісні новоутворення.

Примітки:

* - $p < 0,05$ в порівнянні із значенням у практично здорових людей;

o - в порівнянні із значенням до початку вакцинотерапії).

Як вже зазначалося, основним цитокіном, що детермінує Tх1-поляризуючі властивості ДК є ІЛ-12. Біоактивний ІЛ-12p70 – це гетеродимер, який складається з двох субодиниць р35 та р40. Наші дослідження показали, що стимуляція генерованих ДК за допомогою механо-активованих ліофілізованих пухлинних клітин, ІФН- α та ЛПС майже не вплинула на

рівень експресії мРНК цитокінів та кількість білка ІЛ-12 в культуральному середовищі ДК онкологічних хворих та практично здорових людей (див. рис. 3.5).

Характерним було те, що у ДК онкологічно хворих спостерігалася тенденція до зменшення продукції цитокіну, а у ДК практично здорових людей – тенденція до збільшення його продукції.

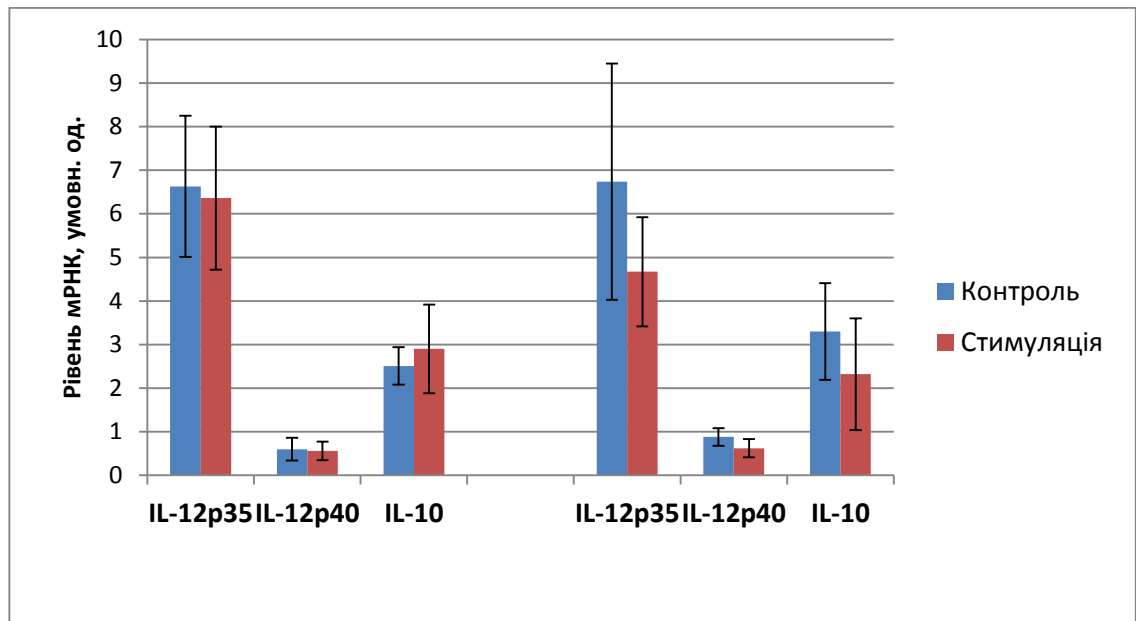


Рисунок 3.5 – Рівень експресії мРНК цитокінів в генерованих дендритних клітинах хворих на злоякісні новоутворення (стимуляція пухлинним матеріалом, ІФН- α , ЛПС).

Відсутність стимулюючого впливу (або навіть наявність пригнічуючого) на ДК комбінації цитокінів ІФН- α з ЛПС щодо продукції біоактивного ІЛ-12 підтверджується деякими іншими дослідниками. При цьому констатується, що такі ДК здатні продукувати цитокін у високій кількості після додаткової активації CD40L або після контакту з Т-лімфоцитами. Така здатність генерованих ДК зберігається до 48 годин. Припускається, що це має біологічний сенс, оскільки не відбувається виснаження цитокін-продукуючої активності ДК на етапі їх генерації, а цитокін-продукуючі потенції реалізуються під час контакту з Т-лімфоцитами під час презентації антигену та активації імунної відповіді. Додатковим

чинником на користь застосування ІФН- α в комбінації з лігандами TLR, є його здатність посилювати перехресну презентацію антигенів ДК.

Щодо рівня експресії імуносупресорного цитокіна ІЛ-10 мала місце інша картина. У хворих на злоякісні новоутворення активність гена майже не змінювалася, а у практично здорових людей спостерігалася тенденція до зниження його експресії.

Таким чином, ДК генеровані з моноцитів хворих на злоякісні новоутворення, характеризуються наступними властивостями: за фенотиповими та цитоморфологічними властивостями відносяться до клітин середнього ступеня зрілості, що свідчить про їх життєздатність; експресують мРНК CCR7 на рівні ДК, одержаних у практично здорових людей; рівні цитокіну TGF- β та ферменту IDO, що обумовлюють регуляторну активність, значно вищі в ДК онкологічних хворих порівняно з ДК практично здорових людей, рівень експресії якого суттєво знижується на етапах проведення ДК-вакцинотерапії; рівень продукції Th1-поляризуючого цитокіну ІЛ-12 ДК онкологічних хворих, в тому числі у відповідь на стимуляцію пухлинним матеріалом, ІФН- α та ЛПС, несуттєво знижений порівняно з ДК практично здорових людей; а рівень експресії імуносупресорного цитокіну ІЛ-10 дещо підвищений.

Паліативна хіміотерапія (ПХТ) з мієлосупресивною дією сприяє суттєвому зниженню ступеня зрілості та кількості генерованих ДК, що свідчить про необхідність 2-3 місячної перерви між проведенням ПХТ та вакцинотерапії на основі ДК у хворих на злоякісні новоутворення.

3.2 Оптимізація підходів до одержання зрілих дендритних клітин моноцитарного походження *in vitro*

Найбільш перспективним підходом до розробки імунотерапевтичних стратегій у хворих на злоякісні новоутворення з використанням ДК є конструювання на їх основі протипухлинних вакцин *in vitro*, ніж створення штучного “дендритоцитоза” після “мобілізації” *in vivo*. Такий підхід дозволяє

усунути проблему, пов'язану з негативним впливом імуносупресивних речовин (ІЛ-10, TGF- β , фактор росту ендотелію судин), що продукуються пухлинними клітинами, і негативно впливають на процеси диференціювання та дозрівання ДК [69].

ДК відрізняються високою пластичністю, та, в залежності від умов мікрооточення, можуть досягати функціонального дозрівання та набувати імуногенності. Функціональна активність ДК залежить від різних факторів. Так, залежно від складу середовища, умов культивування клітин-попередників, факторів дозрівання та ін. можна отримати ДК з різними властивостями. Одні з них будуть індукувати імунну відповідь по Th1 / Th2 типу, інші, навпаки, активувати Т-рег клітини і призводити до імуносупресії (толерогенні ДК). Відомо, що фактори дозрівання, які додають до ДК при інкубації з антигеном, істотно впливають на їх здатність до міграції в лімфатичні вузли та презентації антигенів Т-лімфоцитам [70].

Разом з тим, відомо, що у хворих онкологічного профілю функціональна активність і генерація ДК з попередників, як правило, ускладнена, а взаємодія пухлинних клітин і ДК може зумовити загибель останніх внаслідок апоптозу. Проведена протипухлинна хіміо- та променева терапія також можуть бути причиною зниження ефективності генерації та ступеня зрілості ДК, що може лімітувати застосування ДК-імунотерапії у онкологічних хворих. Тому одним з основних вимог, які висуваються до ДК при клінічному використанні, слід вважати їх зрілість, а головним технологічним моментом генерації - оптимізація процесу дозрівання. Показано, що зрілі ДК активують в основному CD4⁺ Т-хелпери і CD8⁺ цитотоксичні лімфоцити (ЦТЛ) і «поляризують» розвиток імунної відповіді щодо антигенів пухлин в напрямку створення Th1. Саме Th1 опосередковують розвиток реакцій клітинно-опосередкованого протипухлинного імунітету, вони секретують ряд цитокінів – стимуляторів імунного запалення і активують ряд інших ефекторних клітин (CD8⁺ Т-клітин, ПКК, макрофаги, нейтрофіли).

Вищевикладене обґрунтовує важливість отримання ДК, що поляризують імунну відповідь за Th1 - типом («тип 1 поляризуючі» ДК, ДК1), які індукують протипухлинні ЦТЛ і активують ПКК, та мають високу цитокінсекретуючу активність [71].

3.2.1 Визначення фенотипових змін при оптимізації методу одержання зрілих дендритних клітин моноцитарного походження *in vitro* за допомогою інтерферону- α

Варіюючи умови *in vitro*, можна одержувати ДК з визначеними функціональними властивостями, зокрема, із здатністю активувати імунологічні реакції з залученням переважно клітинної ланки імунної системи. Для цього до набору цитокінів, які використовуються при культивуванні ДК, вводять такі фактори, які здатні стимулювати їхнє дозрівання. Дозрівання ДК індукують різноманітні стимули, наприклад, прозапальні цитокіни, c-KitL та FLT3L (ліганди тирозин-кіназного рецептора), зв'язування рецептора CD40, взаємодія певних макромолекул вірусів та бактерій (двуспіральна РНК, ДНК, ЛПС, простагландин E2 та CpG послідовності ДНК бактерій з певними рецепторами сімейства TLR [72].

На сьогоднішній день цитокіновий «коктейль» ФНП- α , ІЛ-1- β , ІЛ-6 і PGE2 прийнятий в якості «золотого стандарту» для стимуляції дозрівання ДК. Він характеризується істотним недоліком – нездатністю посилювати продукцію ІЛ-12p70 ДК – цитокіну, який має важливе значення для індукції ефективної протипухлинної імунної відповіді, опосередкованої Th1 і ЦТЛ [73]. Тому подальший пошук полягає у використанні альтернативних цитокінових коктейлів, що включають замість PGE2 ліганди TLR, зокрема, ЛПС і PolyI: C.

Відносно недавно, в ряді досліджень була показана значимість ІФН- α для отримання функціонально активних ДК. Разом з тим, при використанні ІФН- α в якості додаткового стимулу дозрівання ДК як у поєднанні із загальноприйнятими «коктейлями» цитокінів, так і в якості моно-фактора, були отримані суперечливі результати. Зокрема, в одних дослідженнях було

показано, що екзогенний ІФН 1 типу підсилює продукцію ІЛ-12, а в інших, навпаки, блокує або призводить до посилення продукції ІЛ-10. Така суперечливість отриманих результатів може бути обумовлена відмінностями в протоколах генерації ДК, різним часом їх експозиції з ІФН- α , а також підтипом використовуваного ІФН- α [74].

Виходячи з цього, відправною точкою нашого дослідження стало порівняльне вивчення фенотипових і функціональних властивостей ЛПС – активованих і ЛПС + ІФН- α - активованих ДК моноцитарного походження практично здорових людей (рис. 3.6).

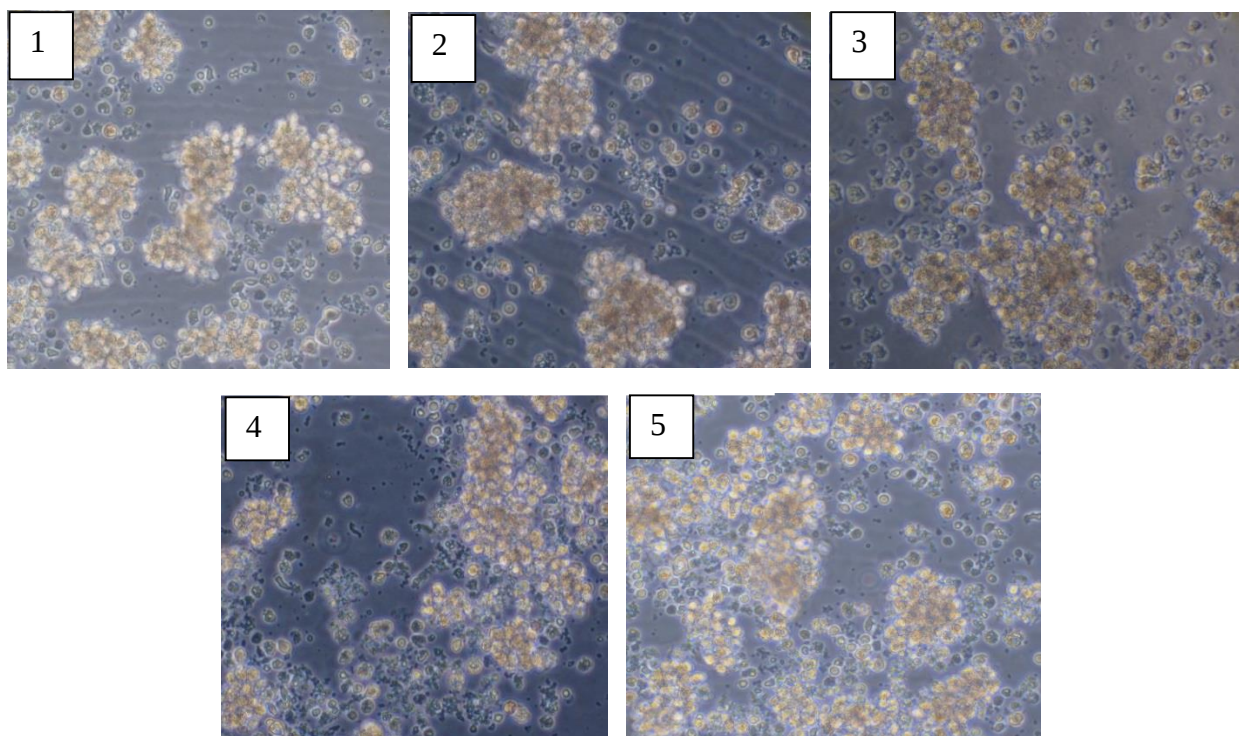


Рисунок 3.6 – Мікрофотографії. Нативні дендритні клітини генеровані у присутності стимулів дозрівання – ЛПС та/або ІФН- α : 1 – без стимулів дозрівання (контроль), 2 – ІФН- α 10 тис. МО/мл, 3 – ІФН- α 100 тис. МО/мл, 4 – ІФН- α 10 тис. МО/мл + ЛПС, 5 – ЛПС

Як показали результати наших досліджень, в результаті 7-добового культивування в присутності ГМ-КСФ моноцити набували типові морфологічні риси ДК. Життєздатність ДК у всіх експериментах на кінець культивування становила близько 90%, при цьому клітинний вихід при всіх

варіантах дозрівання істотно не відрізнявся. На рис. 3.6 представлені нативні ДК, генеровані у присутності стимулів дозрівання – ЛПС та/або ІФН- α .

Оскільки дозрівання ДК асоційоване з експресією молекули CD83, а також посиленням експресії молекул HLA-DR, CD86 і CD38 [75], оцінка зазначених маркерів послужила основою фенотипового аналізу (див. табл.2.1).

Результати аналізу показали, що всі популяції активованих ДК відрізнялися від інтактних більш високим вмістом клітин зі зрілим фенотипом. Найбільш значуще посилення експресії костимуляторних молекули CD86, маркера зрілості CD83 і активаційного маркера зрілих ДК CD38, який функціонально залучений в експресію CD83 і індукцію ІЛ-12 та диференціювання Th1, відзначено при варіантах дозрівання, що включають ЛПС або ЛПС + ІФН- α 100 МО / мл. Слід зазначити, рівні експресії молекули CD86 і антигенів гістосумісності II класу (HLA-DR) практично не розрізнялися в популяціях активованих ДК, що може опосередковано свідчити про порівняну антигенпрезентуючу активність досліджуваних клітин.

Таблиця 3.1 – Фенотипова характеристика ДК, генерованих в різних умовах індукції дозрівання.

Умови індукції дозрівання ДК	Рівень експресії , %			
	CD86	HLA-DR	CD83	CD38
Без стимулів дозрівання (контроль)	76,74 $\pm$ 3,13	79,84 $\pm$ 4,72	67,76 $\pm$ 4,13	76,88 $\pm$ 4,27
ІФН- α 10 тис. МО/мл	83,66 $\pm$ 4,13	83,29 $\pm$ 6,07	76,25 $\pm$ 6,50	84,96 $\pm$ 3,99
ІФН- α 100 тис. МО/мл	83,27 $\pm$ 6,15	82,38 $\pm$ 6,78	82,74 $\pm$ 6,72	87,03 $\pm$ 4,64
ІФН- α 10 тис. МО/мл +ЛПС	84,53 $\pm$ 4,57	83,39 $\pm$ 4,91	76,07 $\pm$ 5,67	89,07 $\pm$ 2,40*
ІФН- α 100 тис. МО/мл +ЛПС	88,13 $\pm$ 3,37*	86,72 $\pm$ 3,71	81,38 $\pm$ 4,99*	88,53 $\pm$ 3,62*
ЛПС	88,87 $\pm$ 3,69*	87,62 $\pm$ 3,98	79,25 $\pm$ 4,77*	88,78 $\pm$ 3,94*

Примітка. * - $p=0,015$ в порівнянні зі значенням у контролі

Додавання ІФН до ЛПС не викликало істотного підвищення рівня експресії досліджуваних маркерів. Це може свідчити про майже максимальний рівень їх експресії після активації ЛПС, що підтверджує дані, отримані іншими дослідниками [76].

3.2.2. Визначення рівня експресії внутрішньоклітинних цитокінів у дендритних клітинах активованих ліпополісахаридом та інтерфероном- α

Відомо, що ДК є джерелом ключових цитокінів, які у великій мірі визначають тип розвитку імунної відповіді Т-клітинами. Активація TLR4 на ДК супроводжується активацією сигнальних шляхів, зокрема ядерного фактора NF- κ B і мітоген-активованої протеїнкінази (MAPKs), що призводить до їх дозрівання, продукції цілого ряду прозапальних цитокінів, хемокинів та запуску адаптивної імунної відповіді. ІФН α , володіючи плейотропною активністю, активують безліч сигнальних шляхів, при цьому не тільки стимулюють клітини, що відносяться до ефекторної ланки імунної системи, але й істотно впливають на систему презентації антигенів – сприяють підвищенню експресії поверхневих молекул на АПК, стимулюють механізм перехресної презентації антигенів в ДК. Під впливом ІФН в ДК посилюється продукція цілого ряду цитокінів ІЛ-12, ІЛ-10, ФНП- α , ІФН- γ , ІЛ-1, ІЛ-15, ІЛ-18 і хемокинів CXCL9, CXCL10, CXCL11, MIP-1 α / CCL3, MIP-1 β , RANTES / CCL5. ІФН α приймає активну участь у підготовці та регуляції механізмів специфічної імунної відповіді, сприяючи його Th1 - поляризації. Тому на наступному етапі роботи ми провели порівняльний аналіз рівня експресії мРНК цитокінів в культурах інтактних, ІФН- α -, ЛПС - і ІФН- α + ЛПС - активованих ДК.

Ключовим регулятором клітинного імунної відповіді є ІЛ-12. Цей цитокін стимулює диференціювання Т-лімфоцитів в Th1, посилює синтез ІФН- γ Т-клітинами. Біоактивний ІЛ-12 є гетеродімерним цитокіном, що складається з двох субодиниць p35 і p40, синтез яких кодується різними генами. Субодиниця ІЛ-12p35 конститутивно експресується у ДК, а ІЛ-12p40 є індукцибельною. Рядом авторів показано, що ЛПС індукує у

мононуклеарних клітин підвищення рівня експресії обох субодиниць ІЛ-12 [77]. У наших дослідженнях встановлено, що ІФН- α , застосований як у якості моно-фактора для індукції дозрівання ДК, так і в поєднанні з ЛПС, майже не стимулює експресію мРНК ІЛ-12p35 в ДК, за виключенням комбінації ЛПС+ІФН- α (10 тис. МО/мл), при застосуванні якої рівень експресії мРНК ІЛ-12p35 зростає на рівні тенденції (див. рис. 3.7). Рівень експресії мРНК іншої субодиниці - ІЛ-12p40 також майже не змінювався, тенденцію до зростання експресії гена відмічено лише після активації ДК за допомогою поєднання ЛПС+ІФН- α (100 тис. МО/мл). Відомо, що кількість гетеродимера ІЛ-12, що секретується клітиною, обмежено субодиницею p35. ІЛ-12p40 синтезується в надлишку і може димеризуватися з утворенням гомодимеру, що виступає в якості антагоніста ІЛ-12, а також хемоатрактанта.

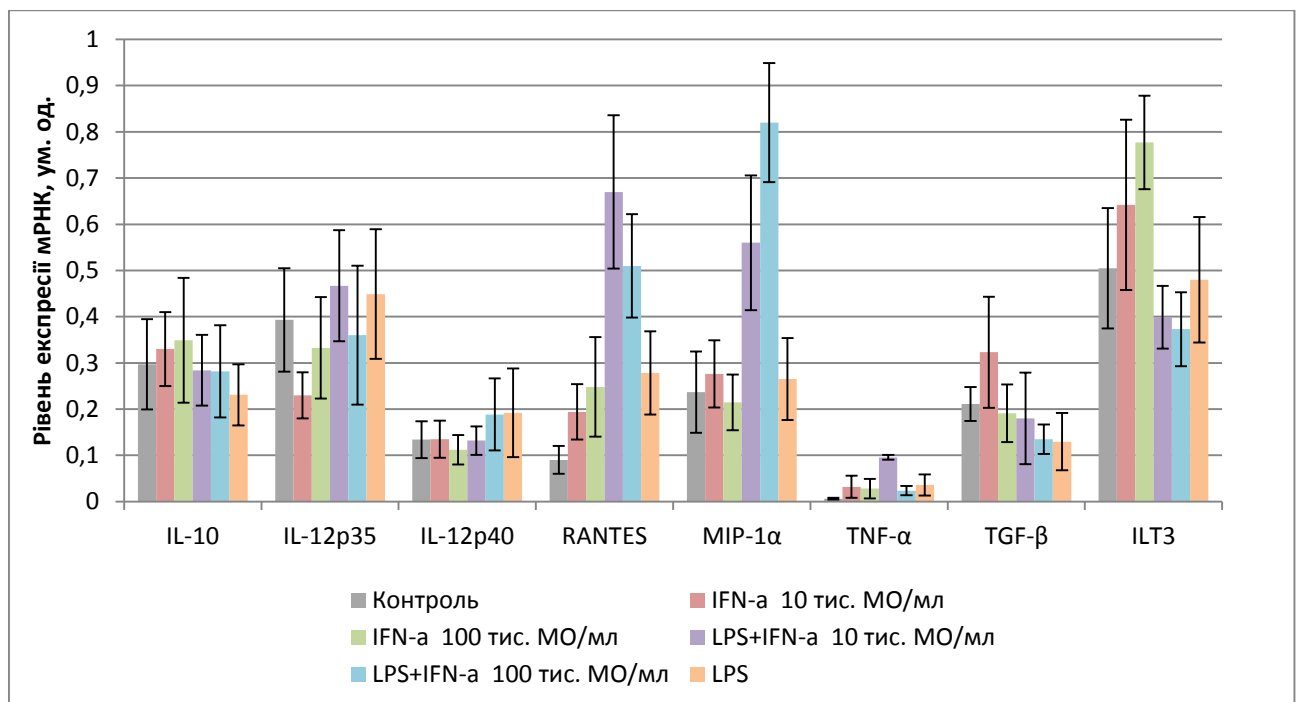


Рисунок 3.7 – Рівень експресії мРНК цитокінів та хемокінів в дендритних клітинах моноцитарного походження, активованих за допомогою ЛПС та ІФН- α .

Популяція активованих за допомогою ЛПС+ІФН- α (10 тис. МО/мл) ДК характеризується більш високим рівнем експресії мРНК деяких інших Тх1 - прозапальних цитокінів - ІФН- γ і ФНП- α . Ці цитокіни є одними з найважливіших регуляторів всіх аспектів функціонування імунної системи,

включаючи диференціювання лімфоїдних клітин, запалення, розвиток адаптивної імунної відповіді, імунологічної пам'яті, імунологічної толерантності і т.д.

Баланс між прозапальними і протизапальними цитокінами, що продукуються ДК, багато в чому визначає подальшу форму імунної відповіді, чи буде це переважно клітинна або гуморальна імунна відповідь. За допомогою продукції інгібіторних цитокінів, у великій мірі, толерогенні ДК опосередковують свій потенціал [78].

У результаті нашого дослідження було отримано, що в популяціях ЛПС+ІФН- α активованих ДК відзначено деяке зниження рівня експресії ІЛ-10 та TGF- β . Слід зазначити, що в цих популяціях ДК співвідношення рівнів мРНК ІЛ-12p35/ІЛ-10 також було вищим порівняно з контрольною популяцією, що свідчить про більш високий прозапальний потенціал таких ДК порівняно з іншими популяціями. Співвідношення рівнів мРНК ІЛ-12p35/ІЛ-10 у ДК, активованих за допомогою ЛПС+ІФН- α (10 тис. МО/мл), перевищувало таке у контрольних ДК та ДК, активованих за допомогою лише ЛПС.

Прозапальні хемокіни - ліганди CCR5, RANTES і MIP-1 α (CCL5, CCL3) є потужними хемоатрактантами для клітин багатьох типів, регулюють комунікацію між CD4+, АПК і CD8+ клітинами в лімфатичних вузлах, сприяють інфільтрації пухлини Т-лімфоцитами і НКК, підвищенню активності ефektorних клітин, що призводить до елімінації пухлини. У наших дослідженнях комбінації ЛПС+ ІФН- α сприяли значному, в 2-7 разів, посиленню експресії обох хемокінів активованими ДК порівняно з інтактними. При використанні ЛПС в якості моно-фактора експресія MIP-1 α ДК не змінювалася, а експресія мРНК RANTES зростала у 3 рази. Слід зазначити, що ІФН- α сприяв лише деякій активації гена RANTES.

У популяціях ДК, активованих ІФН- α , було відмічено деяке посилення рівня експресії мРНК ІЛТ3, експресія яких є характерною для толерогенних

ДК. Разом з тим, в культурах ДК, що дозрівають під дією ІФН- α в поєднанні з ЛПС, було відзначено пригнічення його експресії на рівні тенденції.

Згідно з даними літератури, ІФН- α є важливим фактором для генерації ДК з попередників, але його ефективність в індукції кінцевого фенотипового і функціонального дозрівання ДК моноцитарного походження обмежена. IMSvane і співавт., 2006, показали, що використання ІФН- α в якості стимулюючого моно-фактора призводить до генерації ДК, що характеризуються фенотипом напівзрілих клітин з недостатньою міграційною, цитокінсекретуючою та стимулюючою активністю. При цьому констатується необхідність не менше двох активуючих сигналів для індукції функціонального дозрівання ДК.

У наших дослідженнях поєднання двох активуючих сигналів - ІФН- α і ЛПС не мало переваги в індукції фенотипової зрілості ДК порівняно з активацією тільки за допомогою ЛПС, однак істотно вплинуло на цитокін - і хемокінсекреторну активність ДК, обумовлюючи домінування прозапального потенціалу. Істотне посилення експресії ФНП- α в ІФН- α + ЛПС - активованих ДК порівняно з ЛПС - активованими ДК не тільки додатково забезпечує превалювання Тх1- цитокінів в цій популяції ДК, але, як показано деякими дослідниками, посилює їх потенціал до виживання, сприяючи регуляції експресії ВАК, BCL-2 і FLIPL [79, 80].

Таким чином, комбінація факторів - ІФН- α і ЛПС дозволяє отримувати зрілі, Th1 - поляризуючі ДК. Застосування Th1 - поляризуючих ДК дозволяє уникнути переважної взаємодії з Т-рег. клітинами і обмежити небажану їх експансію, посилюючи функції таких клітин як ЦТЛ і ПКК. Ця властивість зрілих ДК є винятково важливою при створенні клітинних вакцин, спрямованих на лікування онкологічних захворювань.

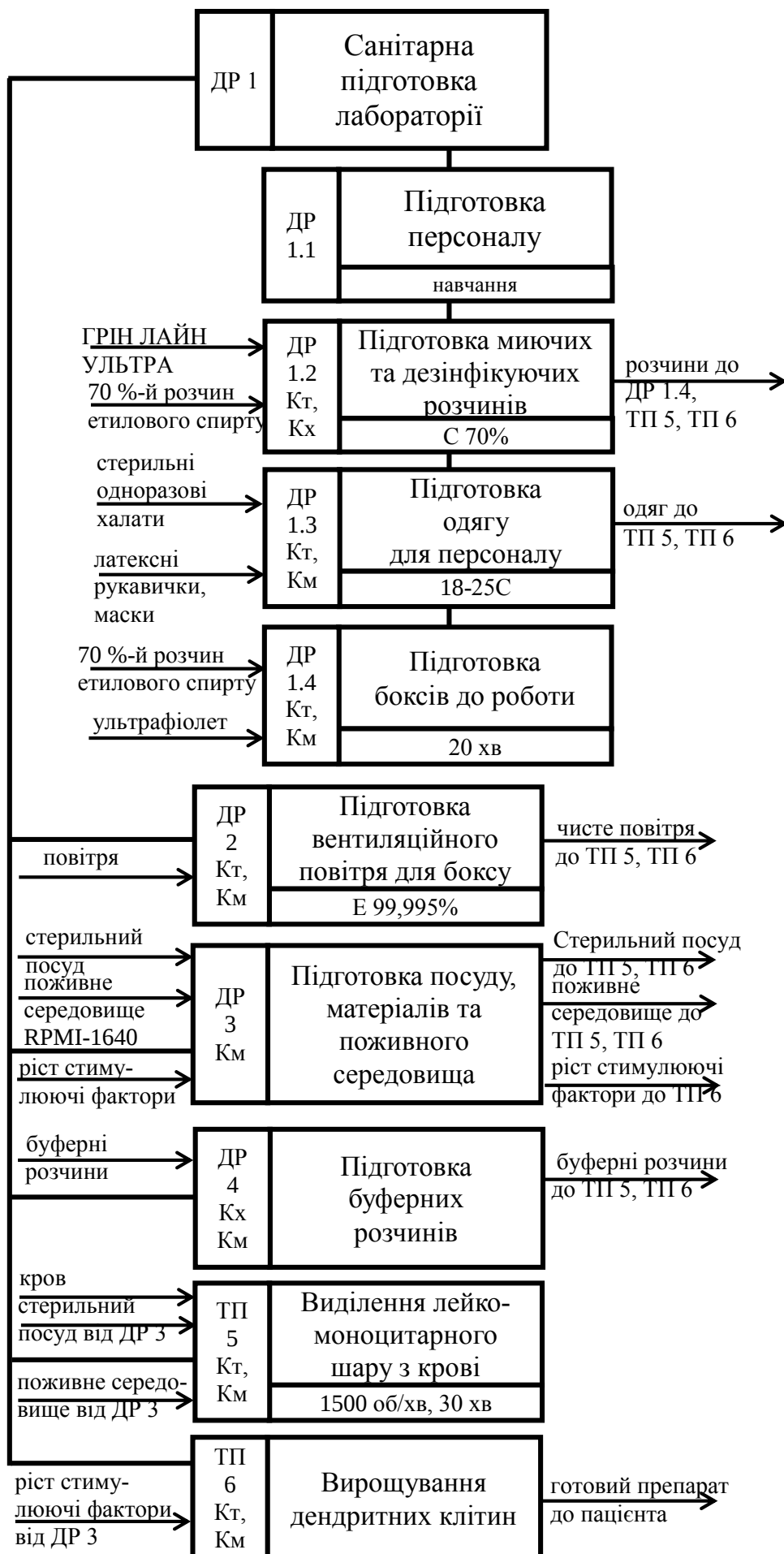
Отримані нами результати обґрунтовують можливість і перспективність використання комбінації чинників ІФН- α і ЛПС для оптимізації методів отримання зрілих ДК, придатних для застосування в

якості клітинної основи при створенні індивідуальних лікувальних протипухлинних вакцин.

3.3. Технологія отримання Тх-1 – поляризуючих ДК моноцитарного походження із використанням різних біоактивних медіаторів

У даному розділі наведена поетапна технологічна схема, яка складається з допоміжних робіт та основного технологічного процесу, що включає отримання клітин Т-хелперів-1 – поляризуючих дендритних клітин. В якості біоактивних медіаторів використовували інтерферон- α та ліпополісахарид.

ТЕХНОЛОГІЧНА СХЕМА



ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР. 1 Санітарна підготовка лабораторії

ДР 1.1 Підготовка персоналу.

Вона включає в себе навчання та здобування практичних навичок для роботи з тваринними культурами клітин. Перевірка компетентності персоналу задля уникнення проблем пов'язаних у роботі з дендритними клітинами.

ДР. 1.2 Підготовка миючих та дезінфікуючих розчинів для персоналу, боксів, лабораторії.

Всі поверхні лабораторного приміщення, окрім боксів всередині, обробляється дезінфекційним засобом «ГРІН ЛАЙН УЛЬТРА».

ДР. 1.3 Підготовка одягу для персоналу.

Для роботи у боксі закупаються стерильні одноразові халати, латексні рукавички та маски для обличчя. Одяг після використання передається відповідним представникам компанії для їх знезараження та утилізації.

ДР. 1.4 Підготовка боксів до роботи.

Цей етап включає в себе обробку боксу та його поверхонь 70%-м розчином етилового спирту. Після обробки спиртом проводимо обов'язкову обробку ультрафіолетовими променями протягом 20 хв. Це забезпечує стерильні умови для роботи з ДК.

ДР. 2 Підготовка вентиляційного повітря для боксу.

Для того, щоб повітря потрапило у бокс, воно проходить декілька ступенів очищення. Найвищий ступінь очищення проходить через фільтр EU14 або ж H14. Ефективність цього фільтру становить 99,995%. Якість повітря становить: 353 частина $\geq 0,5$ мкм/м³; 10000 частина $\geq 0,1$ мкм/м³.

ДР. 3 Підготовка посуду, матеріалів та поживного середовища.

Для вирощування ДК закупається одноразовий стерильний посуд, а саме чашки Петрі. Так само, закупаємо поживне середовище RPMI-1640 ("Sigma" США) та ріст стимулюючі фактори: ГМ-КСФ, ІЛ-4, ЛПС, ІФН- α .

ДР. 4 Підготовка буферних розчинів.

Для чистоти дослідження усі буферні розчини закупаємо у комерційної компанії «Dulbecco's phosphate-buffered saline» (D3ФР) (Gibco™) (США).

ТП. 5 Виділення лейко-моноцитарного шару з крові.

Під час цього етапу з крові виділяється лейко-моноцитарний шар, з якого вирощуються ДК. Відбувається декілька етапів центрифугування (1500 об/хв, 30 хв) з додаванням фіколу. Процес очистки від фіколу проводимо за допомогою центрифугування нашого розчину з додаванням розчину D3ФР у декілька етапів.

ТП. 6 Вирощування дендритних клітин.

Це основний етап під час якого у поживному середовищі з додаванням факторів росту дозрівають ДК.

Очищений лейко-моноцитарного шару з крові ресуспендують у середовищі RPMI-1640 (12 мл). Після чого в стерильних умовах вносимо стрептоміцин та пеніцилін по 100 мкг/мл. Вирощуємо в анаеробному термостаті за температури 37°C упродовж 2-3 год. Після чого струшували клітини з чашки Петрі, щоб позбавитись клітин, що не прикріпилися шляхом їх змивання. Потім в чашку Петрі з прикріпленими клітинами додавали 12 мл свіжого середовища RPMI-1640, 100 нг/мл ГМ-КСФ та 20 нг/мл ІЛ-4. Вирощуємо в анаеробному термостаті за температури 37°C упродовж 3 діб. На 3 добу вносимо ростові фактори у тих же пропорціях, що наведено вище. На 7 добу дозрівання до ДК додавали 100 нг/мл ЛПС і інтерферон-α в концентраціях 10 тис МО/мл або 100 тис МО/мл. Вирощуємо в анаеробному термостаті за температури 37°C упродовж 24 год. Після отримання ДК вводять пацієнтам.

Висновки до розділу 3

У цьому розділі проаналізовані отримані експериментальні результати, що входять до кваліфікаційної роботи. Оброблені результати подані у вигляді рисунків та таблиць.

ДК виділені з хворих мають вищий рівень експресії мРНК CCR7 і мРНК імуносупресивних цитокінів TGF- β , IL-10 та ферменту IDO, ніж ДК одержані у практично здорових людей. Проте рівень експресії мРНК IL-12 дещо знижений. Комбінація факторів - ІФН- α і ЛПС дозволяє отримувати зрілі, Th1 - поляризуючі ДК. Отримані нами результати обґрунтовують можливість і перспективність використання комбінації чинників ІФН- α і ЛПС для оптимізації методів отримання зрілих ДК, придатних для застосування в якості клітинної основи при створенні індивідуальних лікувальних протипухлинних вакцин.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що ДК, генеровані з моноцитів хворих на злоякісні новоутворення, за фенотиповими та цитоморфологічними властивостями відносяться до клітин середнього ступеня зрілості, експресують вищий рівень мРНК CCR7 ніж ДК, одержані у практично здорових людей;

2. Встановлено, що рівень експресії мРНК імуносупресивних цитокінів TGF- β , IL-10 та ферменту IDO в ДК, генерованих у хворих на РЛ, підвищена у порівнянні із ДК практично здорових людей ($p > 0.05$), а рівень експресії мРНК IL-12 дещо знижений.

3. Встановлено, що комбінації ЛПС+ ІФН- α сприяє Th1 – поляризації генерованих ДК, не індукуючи при цьому їхні толерогенні властивості. При використанні комбінації ЛПС та ІФН- α (10 тис. МО/мл) спостерігалось збільшення рівня експресії мРНК ФНП- α ($p > 0.05$) та незначне зменшення рівня експресії мРНК IL-10, також відмічено посилення експресії мРНК хемокинів RANTES та MIP 1- α в 2 рази ($p < 0.05$) у порівнянні із ЛПС.

4. Отримані нами результати обґрунтовують доцільність і перспективність використання комбінації ІФН- α і ЛПС для оптимізації методів отримання зрілих ДК, що використовуються в якості ад'юванту при конструюванні протипухлинних вакцин.

Вдячні за допомогу виконання експериментальної частини кваліфікаційної роботи завідуючій Науково-дослідного відділення експериментальної онкології ДНП «Національний інститут раку», проф.б.н. Храмовській Н.М., с.н.с., к.б.н. Скачковій О.В., с.н.с., к.б.н. Горбачу О.І.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Almeida C. A., Barry S. A. Cancer: Basic Science and Clinical Aspects. Wiley & Sons, Incorporated, John, 2009. P. 14-20.
2. Jason Fung. The Cancer Code. Anew Paradigm for Understanding Cancer. New Yor: Harper Wave. 2020. P. 34-42.
3. The genetic basis of disease / M. Jackson et al. Essays in Biochemistry. 2018. Vol. 62, no. 5. P. 643–723. URL: <https://doi.org/10.1042/ebc20170053>
4. Ganesh K., Massagué J. Targeting metastatic cancer. Nature Medicine. 2021. Vol. 27, no. 1. P. 34–44. URL: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01195-4>.
5. Endometrial hyperplasia as a risk factor of endometrial cancer / L. K. Nees et al. Archives of Gynecology and Obstetrics. 2022. URL: <https://doi.org/10.1007/s00404-021-06380-5>.
6. Maria Teresa Timoney, Jessica M. Atrio, Joseph P. McGowan, Steven M. Fine, Rona Vail, Samuel T. Merrick, Asa Radix, Christopher J. Hoffmann, Charles J. Gonzalez. Screening for Cervical Dysplasia and Cancer in Adults with HIV - NCBI Bookshelf. National Center for Biotechnology Information. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579640/>
7. Wen H. Y., Brogi E. Lobular Carcinoma in Situ. Surgical Pathology Clinics. 2018. Vol. 11, no. 1. P. 123–145. URL: <https://doi.org/10.1016/j.path.2017.09.009>.
8. Jung C. K., Bychkov A., Kakudo K. Update from the 2022 World Health Organization Classification of Thyroid Tumors: A Standardized Diagnostic Approach. Endocrinology and Metabolism. 2022. URL: <https://doi.org/10.3803/enm.2022.1553>.
9. Synovial Sarcoma: A Clinical Review / A. M. Gazendam et al. Current Oncology. 2021. Vol. 28, no. 3. P. 1909–1920. URL: <https://doi.org/10.3390/curroncol28030177>.
10. Duffield A. S., Mullighan C. G., Borowitz M. J. International Consensus Classification of acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. Virchows Archiv. 2022. URL: <https://doi.org/10.1007/s00428-022-03448-8>.

11. Rodriguez-Otero P., Paiva B., San-Miguel J. F. Roadmap to cure multiple myeloma. *Cancer Treatment Reviews*. 2021. P. 102-284. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102284>.
12. Molecular Markers and Targets in Melanoma / C. Teixido et al. *Cells*. 2021. Vol. 10, no. 9. P. 2320. URL: <https://doi.org/10.3390/cells10092320>.
13. The complexities of treating brain and spinal cord tumors: a review of current approaches / A. Mansour et al. *Annals of Medicine & Surgery*. 2023. URL: <https://doi.org/10.1097/ms9.0000000000001213>.
14. Axillary surgery in breast cancer: An updated historical perspective / F. Magnoni et al. *Seminars in Oncology*. 2020. Vol. 47, no. 6. P. 341–352. URL: <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2020.09.001>.
15. Wang H., Mao X. Evaluation of the Efficacy of Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. *Drug Design, Development and Therapy*. 2020. Volume 14. P. 2423–2433. URL: <https://doi.org/10.2147/dddt.s253961>.
16. Vinod S. K., Hau E. Radiotherapy treatment for lung cancer: Current status and future directions. *Respirology*. 2020. Vol. 25, S2. P. 61–71. URL: <https://doi.org/10.1111/resp.13870>.
17. Wang C., Yuan X., Xue J. Targeted Therapy for Rare Lung Cancers: Status, Challenges, and Prospects. *Molecular Therapy*. 2023. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.05.007>.
18. Kennedy L. B., Salama A. K. S. A review of cancer immunotherapy toxicity. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2020. Vol. 70, no. 2. P. 86–104. URL: <https://doi.org/10.3322/caac.21596>.
19. High-Dimensional Phenotypic Mapping of Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization / M. Alcántara-Hernández et al. *Immunity*. 2017. Vol. 47, no. 6. P. 1037–1050.e6. URL: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.001>.
20. Dendritic cell biology and its role in tumor immunotherapy / Y. Wang et al. *Journal of Hematology & Oncology*. 2020. Vol. 13, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00939-6>.

21. Bordon Y. Sorting, sorted! *Nature Reviews Immunology*. 2016. Vol. 16, no. 11. P. 657. URL: <https://doi.org/10.1038/nri.2016.115>.
22. Dendritic Cells Revisited / M. Cabeza-Cabrerizo et al. *Annual Review of Immunology*. 2021. Vol. 39, no. 1. P. 131–166. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-061020-053707>.
23. Sabado R. L., Balan S., Bhardwaj N. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Research*. 2016. Vol. 27, no. 1. P. 74–95. URL: <https://doi.org/10.1038/cr.2016.157>.
24. Oncogenic Flt3 receptors display different specificity and kinetics of autophosphorylation / E. Razumovskaya et al. *Experimental Hematology*. 2009. Vol. 37, no. 8. P. 979–989. URL: <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.05.008>.
25. Expression of the human acute myeloid leukemia gene AML1 is regulated by two promoter regions. / M. C. Ghози et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996. Vol. 93, no. 5. P. 1935–1940. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.5.1935>.
26. McKenna K., Beignon A.-S., Bhardwaj N. Plasmacytoid Dendritic Cells: Linking Innate and Adaptive Immunity. *Journal of Virology*. 2005. Vol. 79, no. 1. P. 17–27. URL: <https://doi.org/10.1128/jvi.79.1.17-27.2005>.
27. Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8⁺ T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets / J. Tel et al. *Blood*. 2013. Vol. 121, no. 3. P. 459–467. URL: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-435644>.
28. Plasmacytoid Dendritic Cells Capture and Cross-Present Viral Antigens from Influenza-Virus Exposed Cells / G. Lui et al. *PLoS ONE*. 2009. Vol. 4, no. 9. P. e7111. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007111>.
29. Segura E., Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends in Immunology*. 2013. Vol. 34, no. 9. P. 440–445. URL: <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.06.001>.

30. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nature Reviews Immunology*. 2006. Vol. 6, no. 6. P. 476–483. URL: <https://doi.org/10.1038/nri1845>.

31. Distinct roles of dendritic cell-derived iNOS in the control of effective and regulative dendritic cell differentiation. / C. Si et al. *The Journal of Immunology*. 2016. Vol. 196, no. 1_Supplement. P. 59.2. URL: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.196.supp.59.2>.

32. Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation and viability of circulating human natural killer cells / C. Münz et al. *Blood*. 2005. Vol. 105, no. 1. P. 266–273. URL: <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2492>.

33. Prolonged IFN- γ -producing NKT response induced with α -galactosylceramide-loaded DCs / S.-i. Fujii та ін. *Nature Immunology*. 2002. T. 3, № 9. C. 867–874. URL: <https://doi.org/10.1038/ni827>.

34. Akira S., Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nature Reviews Immunology*. 2004. Vol. 4, no. 7. P. 499–511. URL: <https://doi.org/10.1038/nri1391>.

35. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses / H. Kato et al. *Nature*. 2006. Vol. 441, no. 7089. P. 101–105. URL: <https://doi.org/10.1038/nature04734>.

36. Pedra J. H., Cassel S. L., Sutterwala F. S. Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. *Current Opinion in Immunology*. 2009. Vol. 21, no. 1. P. 10–16. URL: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.01.006>.

37. Škoberne M., Beignon A.-S., Bhardwaj N. Danger signals: a time and space continuum. *Trends in Molecular Medicine*. 2004. Vol. 10, no. 6. P. 251–257. URL: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.04.001>.

38. Gallo P. M., Gallucci S. The Dendritic Cell Response to Classic, Emerging, and Homeostatic Danger Signals. Implications for Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*. 2013. Vol. 4. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00138>.

39. Blum J. S., Wearsch P. A., Cresswell P. Pathways of Antigen Processing. *Annual Review of Immunology*. 2013. Vol. 31, no. 1. P. 443–473. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095910>.
40. Segura E. Cross presentation: exotic pathwaysCross presentation pathways in human dendritic cells. *Molecular Immunology*. 2022. Vol. 150. P. 15. URL: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2022.05.057>.
41. TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation / P. Nair-Gupta et al. *Cell*. 2014. Vol. 158, no. 3. P. 506–521. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.054>.
42. Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells / G. Penna et al. *Human Immunology*. 2002. Vol. 63, no. 12. P. 1164–1171. URL: [https://doi.org/10.1016/s0198-8859\(02\)00755-3](https://doi.org/10.1016/s0198-8859(02)00755-3).
43. Critical Role for CD103 + /CD141 + Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma / E. W. Roberts et al. *Cancer Cell*. 2016. Vol. 30, no. 2. P. 324–336. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.003>.
44. Gerner M. Y., Torabi-Parizi P., Germain R. N. Strategically Localized Dendritic Cells Promote Rapid T Cell Responses to Lymph-Borne Particulate Antigens. *Immunity*. 2015. Vol. 42, no. 1. P. 172–185. URL: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.024>.
45. Colino J., Shen Y., Snapper C. M. Dendritic Cells Pulsed with Intact *Streptococcus pneumoniae* Elicit both Protein- and Polysaccharide-specific Immunoglobulin Isotype Responses In Vivo through Distinct Mechanisms. *Journal of Experimental Medicine*. 2001. Vol. 195, no. 1. P. 1–14. URL: <https://doi.org/10.1084/jem.20011432>.
46. Conservation of a chemokine system, XCR1 and its ligand, XCL1, between human and mice / C. Yamazaki et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010. Vol. 397, no. 4. P. 756–761. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.029>.

47. Structural and agonist properties of XCL2, the other member of the C-chemokine subfamily / J. C. Fox et al. *Cytokine*. 2015. Vol. 71, no. 2. P. 302–311. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.11.010>.

48. Lee H.-G., Cho M.-Z., Choi J.-M. Bystander CD4⁺ T cells: crossroads between innate and adaptive immunity. *Experimental & Molecular Medicine*. 2020. Vol. 52, no. 8. P. 1255–1263. URL: <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00486-7>.

49. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells / N. Cools et al. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007. Vol. 82, no. 6. P. 1365–1374. URL: <https://doi.org/10.1189/jlb.0307166>.

50. Mellor A. L., Munn D. H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature Reviews Immunology*. 2004. Vol. 4, no. 10. P. 762–774. URL: <https://doi.org/10.1038/nri1457>.

51. Munn D. H., Mellor A. L. IDO and tolerance to tumors. *Trends in Molecular Medicine*. 2004. Vol. 10, no. 1. P. 15–18. URL: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2003.11.003>.

52. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25⁺CD4⁺ Tr cells / M. K. Levings et al. *Blood*. 2005. Vol. 105, no. 3. P. 1162–1169. URL: <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1211>.

53. Induction of Interleukin 10–Producing, Nonproliferating Cd4⁺ T Cells with Regulatory Properties by Repetitive Stimulation with Allogeneic Immature Human Dendritic Cells / H. Jonuleit et al. *Journal of Experimental Medicine*. 2000. Vol. 192, no. 9. P. 1213–1222. URL: <https://doi.org/10.1084/jem.192.9.1213>.

54. 1277P HRD status of patients with early-stage non-small cell lung cancer / A. Klinakis et al. *Annals of Oncology*. 2023. Vol. 34. P. S737–S738. URL: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2023.09.755>.

55. Increased Regulatory T Cells in Peripheral Blood of Acute Myeloid Leukemia Patients Rely on Tumor Necrosis Factor (TNF)- α –TNF Receptor-2

Pathway / M. Wang та ін. *Frontiers in Immunology*. 2018. Т. 9. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01274>.

56. Tang Q., Bluestone J. A. The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature Immunology*. 2008. Vol. 9, no. 3. P. 239–244. URL: <https://doi.org/10.1038/ni1572>.

57. Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction / J. Idoyaga et al. *Journal of Clinical Investigation*. 2013. URL: <https://doi.org/10.1172/jci65260>.

58. The apoptotic-cell receptor CR3, but not $\alpha\text{v}\beta 5$, is a regulator of human dendritic-cell immunostimulatory function / M. Škoberne та ін. *Blood*. 2006. Т. 108, № 3. С. 947–955. URL: <https://doi.org/10.1182/blood-2005-12-4812>.

59. HIV-1 infection–induced apoptotic microparticles inhibit human DCs via CD44 / D. Frleta et al. *Journal of Clinical Investigation*. 2012. Vol. 122, no. 12. P. 4685–4697. URL: <https://doi.org/10.1172/jci64439>.

60. Kalialis L. V., Drzewiecki K. T., Klyver H. Spontaneous regression of metastases from melanoma: review of the literature. *Melanoma Research*. 2009. Vol. 19, no. 5. P. 275–282. URL: <https://doi.org/10.1097/cmr.0b013e32832eabd5>.

61. Li L., He L., Zhu Y. Dissecting tumor antigens and immune subtypes for mRNA vaccine development in breast cancer. *Journal of Big Data*. 2023. Vol. 10, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s40537-023-00826-0>.

62. Kim R., Emi M., Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007. Vol. 121, no. 1. P. 1–14. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x>.

63. Varanasi S. K., Kaeche S. M., Bui J. D. SnapShot: Cancer immunoediting. *Cell*. 2022. Vol. 185, no. 21. P. 4038–4038.e1. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.027>.

64. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells / M. V. Dhodapkar et al. *Journal of Clinical Investigation*. 1999. Vol. 104, no. 2. P. 173–180. URL: <https://doi.org/10.1172/jci6909>.

65. Antitumor dendritic cell–based vaccines: lessons from 20 years of clinical trials and future perspectives / J. Constantino et al. *Translational Research*. 2016. Vol. 168. P. 74–95. URL: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.07.008>.
66. Addition of interferon-alpha to a standard maturation cocktail induces CD38 up-regulation and increases dendritic cell function / R. Trepiaakas et al. *Vaccine*. 2009. Vol. 27, no. 16. P. 2213–2219. URL: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.02.015>.
67. Alvarez D., Vollmann E. H., von Andrian U. H. Mechanisms and Consequences of Dendritic Cell Migration. *Immunity*. 2008. Vol. 29, no. 3. P. 325–342. URL: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.08.006>.
68. Raker V. K., Domogalla M. P., Steinbrink K. Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man. *Frontiers in Immunology*. 2015. Vol. 6. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00569>.
69. Palucka K., Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer*. 2012. Vol. 12, no. 4. P. 265–277. URL: <https://doi.org/10.1038/nrc3258>.
70. Kalinski P., Muthuswamy R., Urban J. Dendritic cells in cancer immunotherapy: vaccines and combination immunotherapies. *Expert Review of Vaccines*. 2013. Vol. 12, no. 3. P. 285–295. URL: <https://doi.org/10.1586/erv.13.22>.
71. Park J., Gerber M. H., Babensee J. E. Phenotype and polarization of autologous T cells by biomaterial-treated dendritic cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2014. Vol. 103, no. 1. P. 170–184. URL: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35150>.
72. Dendritic Cells as Pharmacological Tools for Cancer Immunotherapy / S. Anguille et al. *Pharmacological Reviews*. 2015. Vol. 67, no. 4. P. 731–753. URL: <https://doi.org/10.1124/pr.114.009456>.
73. Kalinski P., Okada H. Polarized dendritic cells as cancer vaccines: Directing effector-type T cells to tumors. *Seminars in Immunology*. 2010. Vol. 22, no. 3. P. 173–182. URL: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2010.03.002>.

74. Lapenta C., Gabriele L., Santini S. M. IFN-Alpha-Mediated Differentiation of Dendritic Cells for Cancer Immunotherapy: Advances and Perspectives. *Vaccines*. 2020. Vol. 8, no. 4. P. 617. URL: <https://doi.org/10.3390/vaccines8040617>.

75. Differential effects of monophosphoryl lipid A and cytokine cocktail as maturation stimuli of immunogenic and tolerogenic dendritic cells for immunotherapy / D. Raïch-Regué et al. *Vaccine*. 2012. Vol. 30, no. 2. P. 378–387. URL: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.10.081>.

76. Evaluation of 3 Clinical Dendritic Cell Maturation Protocols Containing Lipopolysaccharide and Interferon- γ / T. H. Han та ін. *Journal of Immunotherapy*. 2009. T. 32, № 4. С. 399–407. URL: <https://doi.org/10.1097/cji.0b013e31819e1773>.

77. CD4⁺ Th2 cells function alike effector Tr1 and Th1 cells through the deletion of a single cytokine IL-6 and IL-10 gene / M. Ankathatti Munegowda et al. *Molecular Immunology*. 2012. Vol. 51, no. 2. P. 143–149. URL: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.02.120>.

78. Suppressors of Cytokine Signaling Proteins Are Differentially Expressed in Th1 and Th2 Cells: Implications for Th Cell Lineage Commitment and Maintenance / C. E. Egwuagu et al. *The Journal of Immunology*. 2002. Vol. 168, no. 7. P. 3181–3187. URL: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3181>.

79. Autocrine TNF Is Critical for the Survival of Human Dendritic Cells by Regulating BAK, BCL-2, and FLIPL / M. Lehner et al. *The Journal of Immunology*. 2012. Vol. 188, no. 10. P. 4810–4818. URL: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101610>.

80. Cancer- associated fibroblast- targeted strategy enhances antitumor immune responses in dendritic cell- based vaccine / Y. Ohshio et al. *Cancer Science*. 2015. Vol. 106, no. 2. P. 134–142. URL: <https://doi.org/10.1111/cas.12584>.

Ministry of Education and Science of Ukraine
Kyiv National University of Technologies and Design
Lviv Polytechnic National University
National Academy of Sciences of Ukraine
L.M. Lytvynenko Institute of Physical-Organic Chemistry and Coal Chemistry

CHEMICAL AND BIOPHARMACEUTICAL TECHNOLOGIES

Collection of scientific papers

Tallinn
Nordic Sci Publisher
2023

Продовження додатку А

природного, біосумісного та біорозкладного гідрогелевого матеріалу. Це відкриває перспективи для створення екологічно безпечних продуктів в галузі косметології, фармації та медицини, сприяючи сталому розвитку та забезпечуючи ефективний та безпечний догляд за шкірою на основі природних компонентів.

ОПТИМІЗАЦІЯ ДОЗРІВАННЯ ГЕНЕРОВАНИХ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН ЗА ДОПОМОГОЮ БІОАКТИВНИХ МЕДІАТОРІВ

Луцій О.О.^{1,2}, Шидловська О.А.¹, Горбач О.І.², Скачкова О.В.², Храновська Н.М.²

¹Київський національний університет технологій та дизайну, кафедра біотехнології шкіри та хутра

²Державне некомерційне підприємство «Національний інститут раку», науково-дослідний відділ експериментальної онкології

Дендритні клітини (ДК) відрізняються високою пластичністю, та, в залежності від умов мікрооточення, можуть досягати функціонального дозрівання та набувати імуногенності. Функціональна активність ДК залежить від різних факторів [1].

На сьогоднішній день цитокіновий «коктейль» з фактору некрозу пухлин- α (TNF- α), інтерлейкіну-1- β (IL-1- β), інтерлейкіну-6 (IL-6) і простагландину E2 (PGE2) прийнятий в якості «золотого стандарту» для стимуляції дозрівання ДК. Він характеризується істотним недоліком – нездатністю посилювати продукцію інтерлейкіну-12p70 (IL-12p70) ДК – цитокіна, який має важливе значення для індукції ефективної протипухлинної імунної відповіді, опосередкованої Т-хелперними клітинами-1 (Th1) і цитотоксичними Т-лімфоцитами (CTL) [2, 3]. Тому подальший пошук полягає у використанні альтернативних цитокінових коктейлів, що включають замість PGE2 ліганди Toll-подібних рецепторів (TLR), зокрема, ліпополісахарид (ЛПС) і PolyI:C.

Мета дослідження: розробити ефективну технологію отримання Th-1-поляризуючих ДК моноцитарного походження із використанням різних біоактивних медіаторів.

Матеріали і методи дослідження: ДК генерували з моноклеарів периферичної крові хворих на злоякісні новоутворення та навантажували механохімічно-модифікованими ліофілізованими аутологічними пухлинними клітинами. В процесі виконання роботи нами було використано біологічний матеріал пацієнтів з діагнозом недрібноклітинний рак легені (РЛ) ІВ-ІІІА стадій, віком від 35 до 75

Лейкоцити сепаративно розділяли у градієнті щільності фіколу ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$), після чого клітини ресуспендували в середовищі RPMI-1640 («Sigma», США) з додаванням 2 мМ/л L-глутаміну (L-Gly), 100 мкг/мл стрептомицину та 100 од/мл пеніциліну, та інкубували у пластиковому

Продовження додатку А

флакони при температурі 37°C, 5 % CO₂ протягом 2-3 годин. Після чого клітини злегка струшували та видаляли ті, що не прикріпилися, шляхом їх змивання. Концентрацію клітин доводили до $0,5 \times 10^6$ /мл середовищем культивування та додавали 1 % аутологічну плазму та 100 нг/мл рекомбінантного гранулоцито-макрофагально-колонієстимулюючого фактору (ГМ-КСФ) людини («Schering-Plough», США), 20 нг/мл інтерлейкіну-4 (IL-4) («Sigma», США). Ростові фактори також додавали до ДК на 3-тю добу культивування. На 6-ту добу ДК навантажували аутологічними ліофілізованими пухлинними антигенами. На 7-му добу дозрівання до ДК додавали 100 нг/мл LPS («Sigma», США) або інші біоактивні медіатори.

Виходячи з того, що у попередніх дослідженнях було доведено ефективність використання екстракту цитоплазматичної мембрани (ЕЦМ) *in vitro* у діапазоні концентрацій від 0,2 до 2 мкг/мл [4], для дослідження були обрані 4 концентрації препарату: 0,2 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 2 мкг/мл. Експресію поверхневих маркерів визначали за допомогою проточної цитометрії та використовували моноклональні антитіла анти-кластер диференціювання-86 флюоресцеїнаізотіоціанат (анти-CD83-FITC), анти-CD86-FITC анти-HLA-DR-PE (Beckman Coulter, США). Рівень експресії мРНК генів IL-12p35, IL-12p40, IFN- γ , TNF- α визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) з детекцією результатів в режимі реального часу на приладі 7500 Applied Biosystems (ThermoScientific, США).

Результати дослідження: Встановлено найбільш значуще посилення експресії костимуляторної молекули CD86, маркера зрілості CD83 і активаційного маркера зрілих ДК CD38, який функціонально залучений в експресію CD83 і індукцію IL-12 та диференціювання Th1, відмічено при варіантах дозрівання, що включають LPS або LPS + IFN- α 100 МО/мл. У дослідженні встановлено, що IFN- α , застосований як у якості монофактора для індукції дозрівання ДК, так і в поєднанні з LPS, майже не стимулює експресію мРНК IL-12p35 в ДК, за виключенням комбінації LPS+IFN- α (10 тис. МО/мл), при застосуванні якої рівень експресії мРНК IL-12p35 зростає. Популяція активованих за допомогою LPS+IFN- α (10 тис. МО/мл) ДК характеризується більш високим рівнем експресії мРНК деяких інших Th1-прозапальних цитокінів – IFN- γ і TNF- α .

Також були проведені досліді по оптимізації методу одержання зрілих дендритних клітин моноцитарного походження *in vitro* за допомогою екстракту цитоплазматичних мембран *Staphylococcus aureus* Wood 46. Як показали результати досліджень, ЕЦМ у найменшій із досліджуваних концентрацій (0,2 мкг/мл) сприяє достовірному посиленню експресії молекул CD86 та HLA-DR порівняно із контролем (не стимульованими ДК), $p=0,038$ та $p=0,037$ відповідно. Також, дослідження показали, що при застосуванні ЕЦМ ДК спостерігається достовірне збільшення рівня експресії мРНК IFN- γ порівняно із контролем та клітинами, генерованими в присутності LPS. Посилення продукції IFN- γ опосередковано може

Продовження додатку А

свідчити про переважну стимуляцію T_H1-шляху при взаємодії ДК з Т-лімфоцитами і активацію NK-клітин.

Отримані дані підтверджуються результатами з іншими авторами, які використовували LPS у концентрації 100 нг/мл [5]. Така концентрація ефективно впливає на дозрівання дендритних клітин.

Висновки.

1. Дендритні клітини відіграють визначальну роль в протипухлинному імунитеті, оскільки вони мають здатність активувати всі клітини імунної системи та надзвичайно чутливі до факторів стимуляції в процесі свого дозрівання.
2. Встановлено, що комбінації LPS+ IFN- α сприяє T_H1-поляризації генерованих ДК, не індукуючи при цьому їхні толерогенні властивості. При використанні IFN- α (10 тис. МО/мл) спостерігалось збільшення рівня експресії мРНК TNF- α ($p > 0.05$) та незначне зменшення рівня експресії мРНК IL-10.
3. Встановлено, що ЕЦМ *Staphylococcus aureus* Wood 46 суттєво впливає на фагоцитарну активність генерованих ДК, та має дозозалежний ефект: при збільшенні концентрації ЕЦМ спостерігається зменшення фагоцитарної активності ДК.
4. Отриманні дані дозволяють покращити ефективність дозрівання ДК та посилити їх протипухлинні властивості шляхом T_H1-поляризації.

Список літератури

1. Jacques Banchereau, Francine Briere, Christophe Caux, Jean Davoust, Serge Lebecque, Yong-Jun Liu, Bali Pulendran & Karolina Palucka. (2000). *Immunobiology of dendritic cells*. Vol. 18:767-811. P. 767–811. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.767>.
2. P. Kalinskia & H. Okada. (2010). Polarized dendritic cells as cancer vaccines: Directing effector-type T cells to tumors. *Seminars in immunology*. Vol. 22. P. 173–182. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2010.03.002>.
3. Robbie B. Mailliard, Anna Wankowicz-Kalinska, Quan Cai, Amy Wesa, Catharien M. Hilkens, Martien L. Kapsenberg, ... Pawel Kalinski. (2004). α -Type-1 Polarized Dendritic Cells: A Novel Immunization Tool with Optimized CTL-inducing Activity. *Cancer research*. Vol. 64. P. 5934–5937. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1261>.
4. Skivka, L.M., Shvets, Yu.V., Khranovska, N.M., Fedorchuk, O.G., Pozur, V.V & Senchilo, N.V. (2012). Synergistic effect of microbe-associated molecules on human monocyte-derived dendritic cell maturation in vitro. *Biopolymers & Cell*. N1. P. 50-55. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00002C>.
5. Yanlu Zhang, Xueping Zhou & Baohua Zhou. (2012). DC-derived TSLP promotes Th2 polarization in LPS-primed allergic airway inflammation. *European Journal of Immunology*. Vol. 42. P. 1735-1743. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.201142123>.



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Київський національний університет технологій та дизайну
Національний університет
«Чернігівський колегіум» імені Т. Г. Шевченка
Національний авіаційний університет
Університет Григорія Сковороди в Переяславі
Одеський державний аграрний університет
Донбаська державна машинобудівна академія (м. Тернопіль)
Академія прикладних наук
Вища школа управління та адміністрації в м. Опольє (Польща)



ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ

IX Всеукраїнської науково-практичної конференції
«Інноваційні тенденції підготовки фахівців в умовах полікультурного та
мультилінгвального глобалізованого світу»

11 квітня 2024р.

Київ

Продовження додатку Б

Збірник тез доповідей IX Всеукраїнської науково-практичної конференції «Інноваційні тенденції підготовки фахівців в умовах полікультурного та мультилінгвального глобалізованого світу»

2. *The Impact of Translation on Global News Reporting*. (2024, 11 січня). Anan Enterprises. <https://ananenterprises.com/the-impact-of-translation-on-global-news-reporting/>
3. Гудкова, Н. М. (2008). Культурна адаптація при перекладі текстів газетно-інформаційного стилю. С. 33-37.

Oleksii Lutsii

Kyiv National University of Technologies and Design (Kyiv)
Scientific supervisor – senior lecturer Vitalina Denysenko

THE WARBURG EFFECT IN ONCOLOGICAL DISEASES

Almost a century ago, Otto Warburg described that tumor cells undergo oxidation of glucose to lactic acid even in the presence of oxygen. When this discovery was made, it was thought that tumor metabolic reprogramming was the driving force behind tumor transformation. Then it was suggested that the metabolic ones that change are not the cause, but the effect of the tumorigenic process, while the current understanding states that there is a relationship between genes and metabolism [1].

The goal of our work was to find out why cancer cells accept the Warburg effect, despite its obvious energy disadvantage. The studied literature mentions Warburg's hypothesis, which states that "the metabolism of cancer cells, and indeed of all proliferating cells, is adapted to facilitate the absorption and incorporation of nutrients into the biomass necessary for the production of a new cell" [2].

During Warburg's research, he chemically analyzed cancer cells, and based on laboratory measurements and monitoring of glucose, acid, and bicarbonate levels, he experimentally compared oxygen consumption and acid production related to

Продовження додатку Б

Збірник тез доповідей IX Всеукраїнської науково-практичної конференції «Інноваційні тенденції підготовки фахівців в умовах полікультурного та мультимовного глобалізованого світу»

energy metabolism in normal cells and cancer cells. Warburg observed that the blood vessels leaving the tumor had higher levels of lactic acid than the arteries entering the tumor, indicating that cancerous tumors produce significant amounts of lactic acid [2].

Healthy cells under normal conditions use aerobic cellular respiration to obtain energy (ATP):

Glucose (1 C₆H₁₂O₆) + oxygen (6 O₂) → Energy (32 ATP) + Carbon dioxide (6 CO₂) + water (6 H₂O).

The metabolic switch occurs when cellular respiration is impaired, for example, during oxygen starvation or hypoxia. This is done in order to take advantage of anaerobic cellular respiration and fermentation processes, which can consume large amounts of glucose and produce significant amounts of lactic acid as a byproduct, leading to lactic acidosis as follows:

Glucose (16 C₆H₁₂O₆) → Energy (32 ATP) + lactic acid (32 C₃H₆O₃) [3].

The Warburg effect has not become a target of clinical practice, but the increased oxidation of glucose observed in many tumors has been useful in cancer detection and assessment of therapeutic response using positron emission tomography (PET) [2]. PET scanning, often in combination with computed tomography, is widely used in oncology and is invaluable for cancer staging, therapeutic planning, and response assessment [4].

Research and development by scientists show that many different small molecule inhibitors targeting glycolytic enzymes have emerged in recent years, showing promising results in both preclinical and clinical trials, highlighting the therapeutic interest of the Warburg effect. Acidification of the extracellular matrix and relative basification of the cell cytoplasm induces chemoresistance by

Продовження додатку Б

Збірник тез доповідей IX Всеукраїнської науково-практичної конференції «Інноваційні тенденції підготовки фахівців в умовах полікультурного та мультимілінгвального глобалізованого світу»

neutralizing weakly basic drugs, such as Paclitaxel, which makes it difficult for them to penetrate the membrane [2].

Based on the studied literature, it can be said that research and finding the latest methods in regulating the Warburg effect are relevant and necessary for the treatment of oncological diseases. With each new study, we understand the principle of action of this effect more and more deeply, thanks to which in the future we will be able to influence these processes and find treatment.

REFERENCES

1. Warburg, O. (1956). About the origin of cancer cells. *Science*. 123, 309–314.
2. Ignasi B., Laura Carrillo-Bosch and Joan S. (2024). Targeting the Warburg Effect in Cancer: Where Do We Stand? <https://doi.org/10.3390/ijms25063142>.
<https://www.mdpi.com/1422-0067/25/6/3142>.
3. Hassan Bahrami. (2024). On the Origin of the Warburg Effect in Cancer Cells: Controlling Cancer as a Metabolic Disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Biology*. Vol 9. Issue 1. DOI:10.31557/APJCB.2024.9.1.75.
<https://www.researchgate.net/publication/377300418>.
4. Autry, A.W.; Vaziri, S.; LaFontaine, M.; Gordon, J.W.; Chen, H.Y.; Kim, Y.; Villanueva-Meyer, J.E.; Molinaro, A.; et al. (2023). Multi-parametric hyperpolarized $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ imaging reveals Warburg-related metabolic dysfunction and associated regional heterogeneity in high-grade human gliomas. *NeuroImage Clin*. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2023.103501>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10470324>.

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

**Освіта для сталого майбутнього:
екологічні, технологічні, економічні
і соціокультурні питання**

Колективна монографія

Київ 2024

Продовження додатку В

Освіта для сталого майбутнього: екологічні, технологічні, економічні і соціокультурні питання

ДОСЛІДЖЕННЯ МОЖЛИВОСТЕЙ ВИКОРИСТАННЯ ДРІЖДЖІВ ДЛЯ СИНТЕЗУ НАНОЧАСТОК МЕТАЛІВ

О. О. ЛУЦІЙ, М. В. МАКАРЕНКО, В. В. МОРИН, І. О. ГРЕЦЬКИЙ,
О. А. ШИДЛОВСЬКА

*Київський національний університет технологій та дизайну, вул. Мала
Шияновська, 2, Київ, 01011, olgashydlovska@gmail.com*

Зелений синтез наночастинок металів є надзвичайно перспективним, оскільки є економічно-вигідним та безпечним способом отримання ефективних агентів з яскравою біологічною дією. В роботі було проведено підбір ресурсу для синтезу наночастинок та проведено експериментальний біогенний синтез наночастинок срібла для встановлення найкращого варіанту. Таким чином, найкращими властивостями для синтезу наночастинок срібла володіє штам дріжджів *S. cerevisiae* 530. Використання супернатанту або лізату дозволяє регулювати розмір наночастинок та біологічні властивості, що полягають в ефективній антибактеріальній дії проти *E. coli* та ефективній стимуляції росту бактерії *L. delbrueckii*. Отримані результати є перспективними для подальшого вивчення та розробки комплексних антибіотичних препаратів.

1 Вступ

Синтез наночастинок металів є ключовим аспектом наукових досліджень та промислового застосування у різних галузях, включаючи каталіз, медицину та електроніку. Останнім часом зелений синтез наночастинок металів став популярним напрямком досліджень, оскільки він відзначається низьким впливом на довкілля і пропонує кілька переваг порівняно з хімічним та фізичним синтезом.

Однією з найважливіших переваг зеленого синтезу наночастинок металів є його екологічна безпека. У порівнянні з традиційним хімічним синтезом, зелений синтез вимагає меншої кількості шкідливих хімічних речовин і забруднюючих викидів. Зелені методи використовують біоресурси або нейтральні речовини, що робить їх більш прийнятними для навколишнього середовища [1].

Зелений синтез наночастинок металів надає більшу вибірковість та можливість регулювання розміру частинок. В останні роки розроблено численні методи, які дозволяють контролювати розмір та розподіл наночастинок. Ця властивість є критично важливою для налаштування властивостей наночастинок з метою їх застосування в конкретних сферах.

Продовження додатку В

Освіта для сталого майбутнього: екологічні, технологічні, економічні і соціокультурні питання

Зелений синтез наночастинок металів може призводити до формування частинок з особливими функціональними властивостями, що дозволяють їх застосовувати в різних галузях, таких як каталіз, сенсорика, медицина і наноелектроніка [2].

Зелений синтез може бути ефективнішим та економічно вигіднішим в порівнянні з хімічним або фізичним синтезом, оскільки він може значно знизити витрати на сировину та енергію. Застосування біоресурсів та м'яких умов синтезу може зменшити витрати виробництва [3].

Наночастки срібла привертають значну увагу у наукових та медичних дослідженнях завдяки своїм унікальним властивостям та потенційному застосуванню в біологічних системах. Наночастки срібла відзначаються високою активністю проти бактерій, вірусів та грибків, що робить їх об'єктом досліджень у сферах антимікробних застосувань. Зелений синтез наночастинок срібла з біоресурсів може покращити їх біологічні властивості, зменшуючи токсичність та підвищуючи ефективність. Зелений синтез наночастинок срібла дозволяє знизити їхню токсичність шляхом оптимізації умов синтезу та використання біоресурсів. Це робить їх більш прийнятними для біологічних систем і підвищує їх безпеку в медичних застосуваннях [4].

Наночастки срібла можуть бути використані для доставки лікарських засобів в конкретні місця в організмі. Зелений синтез дозволяє контролювати розмір та форму наночастинок, що покращує їхню здатність до призначеної доставки лікарських препаратів [5]. Наночастки срібла можуть бути використані для покращення методів діагностики та зображення в медицині. Вони можуть функціонувати як контрастні агенти для позитронно-емісійної томографії (ПЕТ), магнітно-резонансної томографії (МРТ) та інших методів [6].

Зелений синтез наночастинок срібла відкриває широкий спектр перспектив для біологічних досліджень та медичних застосувань. Ці наночастки демонструють антимікробні властивості, можуть бути

Продовження додатку В

Освіта для сталого майбутнього: екологічні, технологічні, економічні і соціокультурні питання

використані для доставки лікарських засобів, покращити методи діагностики та зображення та знизити токсичність. Це робить їх важливим об'єктом досліджень і розвитку в галузі біології та медицини.

Враховуючи актуальність зеленого синтезу наночасток металів, метою нашої роботи було підібрати об'єкт та ресурс для синтезу наночасток металів.

2 Матеріали і методи

2.1 Дослідження цитотоксичності солей металів на культурі клітин дріжджів *Saccharomyces sp.*

Перед плануванням зеленого синтезу наночасток провели дослідження по толерантності можливих біологічних агентів для зеленого синтезу до вихідних солей металів. Для цього, на культурах дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* 530 та *Saccharomyces cerevisiae* 1995 проаналізували цитотоксичність солей AgNO_3 та CuSO_4 в концентраціях від 0,001мМ до 10мМ. Для цього, приготували серійні розведення солей в 96-лунковому планшеті, після чого внесли до них відповідну денну культуру дріжджів, вирощену на бульйоні Сабуро (ТОВ «Фармактив», Україна), в концентрації, що відповідає 0,1ОД. Після цього інкубували 24 год при 28°C. Далі, проводили аналіз життєздатності живих клітин дріжджів за допомогою тесту із резазурином. До культур дріжджових клітин вносили по 50 мкл розчину резазуринату натрію для досягнення кінцевої концентрації 0,01%. Планшети інкубували при 37°C протягом 20 хвилин. Після цього, проводили спектроскопічні дослідження на планшетному рідері з вертикальним променем (Thermo Labsystems, Вантаа, Фінляндія) при довжинах хвиль 570 нм та 620 нм. Для оцінки цитотоксичної дії металів приймали контроль дріжджових клітин (до відповідних лунок була внесена дистильована вода замість розчину солі) за 100%. Всі дослідження були проведені у трьох повторностях, дані усереднені за допомогою медіани, похибка представляє собою

Продовження додатку В

Освіта для сталого майбутнього: екологічні, технологічні, економічні і соціокультурні питання

інтерквартильний розкид. Для перевірки нульової гіпотези застосовували т-критерій Вілкоксона.

2.2 Зелений синтез наночасток металів срібла та міді

Для проведення зеленого синтезу наночасток використовували сіль AgNO_3 . Біологічний матеріал був підготовлений наступним чином. В колбах з бульйоном Сабуро вносили добову культуру дріжджів (*S. cerevisiae* 530 або *S. cerevisiae* 1995) в концентрації, що відповідає 0,1 ОД. При 28°C проводили вирощування бульйонних культур при постійному перемішуванні 180 об/хв протягом 4 діб. Після інкубації відділяли надосад від біомаси за допомогою центрифугування при 3 тис. об/хв протягом 30 хвилин. Отримані надосад і біомасу використовували в якості біологічного агенту для синтезу наночасток срібла та міді. До надосаду додавали суху сіль AgNO_3 та розчиняли її для досягнення кінцевої концентрації у 100 мМ. Для біомаси готували 100 мМ розчин солі AgNO_3 на дистильованій воді, до якого додавали біомасу відповідного штаму дріжджів для отримання лізату. Після цього інкубували зразки при 37° С та 180 об/хв протягом 4 діб. Утворення наночасток аналізували візуально по зміні кольору реакційної суміші: розчин з наночастками срібла змінювався на червонувато-коричневий, а розчин з наночастками міді – на зеленувато-блакитний.

Після проведення ферментації отримані розчини з наночастками очищували за допомогою центрифугування при 3 тис. об/хв протягом 30 хвилин та стерилізації через мікрофільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Отримані очищені розчини використовували для подальших досліджень.

2.3 Визначення розмірів синтезованих наночасток методом динамічного розсіювання світла

Отримані золі наночасток були проаналізовані з використанням Zetasizer Nano ZS (Malvern Pananalytical, Великобританія) для визначення розмірів методом динамічного розсіювання світла (DLS).

Продовження додатку В

Освіта для сталого майбутнього: екологічні, технологічні, економічні і соціокультурні питання

2.4 Дослідження антибактеріальної дії синтезованих наночастинок срібла

Для визначення антибактеріальної дії наночастинок срібла використовували референтний штам *Escherichia coli* K12 та штам нормофлори людини *Lactobacillus delbrueckii*. Визначення антибактеріальної дії наночастинок срібла проводили за наступною схемою. Для отриманих наночастинок проводили серійні 10-кратні розведення таким чином, щоб кінцева концентрація досліджуваних зразків становила від 0,1 до 10,0 мМ. Розведення наночастинок проводили в 96-лунковому планшеті на середовища NB (ТОВ «Фармактив», Україна). До отриманих розведень вносили відповідні бактеріальні культури в кінцевій концентрації, що відповідає 0,1 ОД. Планшети інкубували при 37°C протягом доби. Після цього визначали життєздатність бактеріальних клітин за допомогою тесту з резазуринатом. До культур бактеріальних клітин вносили по 50 мкл розчину резазуринату натрію для досягнення кінцевої концентрації 0,01%. Планшети інкубували при 37°C протягом 20 хвилин. Після цього, проводили спектроскопічні дослідження на планшетному рідері з вертикальним променем (Thermo Labsystems, Вантаа, Фінляндія) при довжинах хвиль 570 нм та 620 нм. Для оцінки антибактеріальної дії наночастинок приймали контроль відповідного штаму бактеріальної культури (до лунок була внесена дистильована вода замість розчину наночастинок) за 100%. Всі дослідження були проведені у трьох повторностях, дані усереднені за допомогою медіани, похибка представляє собою інтерквартильний розкид. Для перевірки нульової гіпотези застосовували t-критерій Вілкоксона.

3 Результати досліджень

Першим етапом дослідження було встановлення цитотоксичності солей металів срібла та міді на культурах дріжджів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995. Результати дослідження цитотоксичності солі AgNO_3 представлення на рисунку 1.

Продовження додатку В

Освіта для сталого майбутнього: екологічні, технологічні, економічні і соціокультурні питання

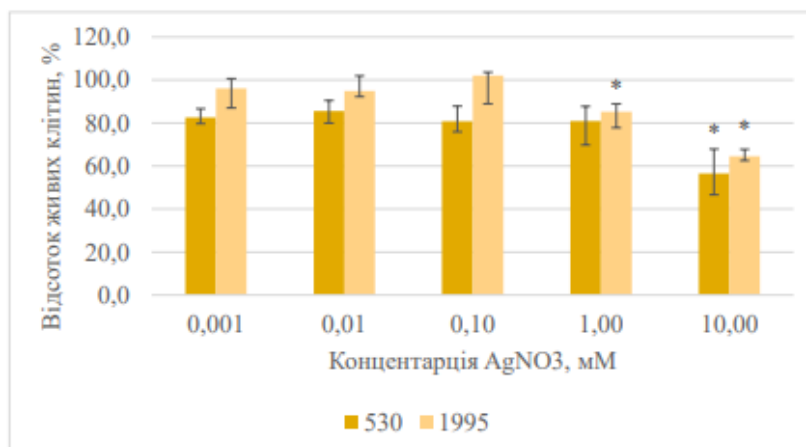


Рисунок 1 – Цитотоксичність AgNO₃ на культурах дріжджів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 (* $p \leq 0,05$)

Достовірне зниження показника відсотку живих клітин спостерігаємо в концентрації AgNO₃ 1,0 мМ для штаму *S. cerevisiae* 1995 – зниження на 19,1% ($p \leq 0,05$) в порівнянні з контролем, прийнятим за 100%. Також, в максимальній досліджуваній концентрації 10,0 мМ AgNO₃ викликає зниження життєздатності культур *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 на 44,4% та 35,5% відповідно ($p \leq 0,05$). Солі срібла, зокрема AgNO₃, відомі своєю високою токсичністю для мікроорганізмів та біологічних систем. Останні дослідження свідчать про те, що AgNO₃ може викликати відмирання дріжджів *S. cerevisiae* шляхом інгібування клітинного поділу та порушення генетичних процесів. Токсичність AgNO₃ може бути пов'язана зі змінами у структурі та функціях білків, а також іншими молекулярними подіями [7].

Сіль CuSO₄ проявила достовірне збільшення життєздатності клітин штаму *S. cerevisiae* 530 в концентраціях 0,001 мМ, 0,01 мМ та 1,0 мМ – на 2,7%, 7,3% та 4,9% відповідно (рис. 2). Даний аспект цікавий в ракурсі можливої оптимізації процесу отримання наночасток на основі біомаси дріжджових клітин.

Продовження додатку В

Освіта для сталого майбутнього: екологічні, технологічні, економічні і соціокультурні питання

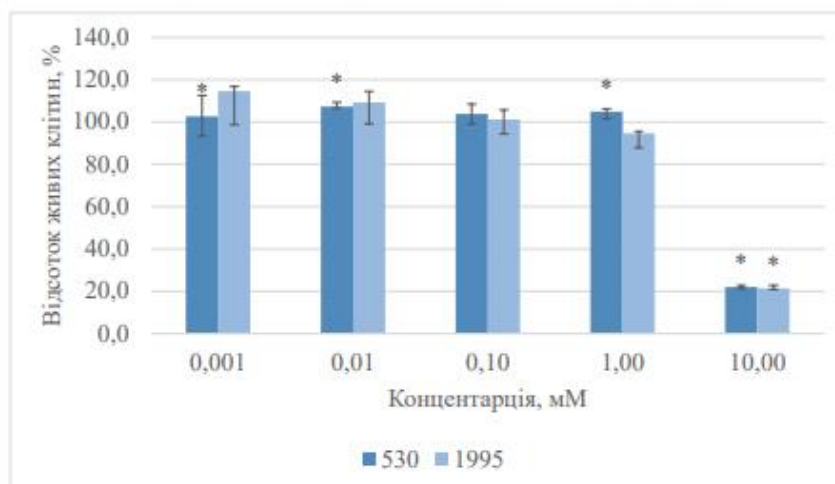


Рисунок 2 – Цитотоксичність CuSO_4 на культурах дріжджів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 (* $p \leq 0,05$)

Концентрація солі CuSO_4 10 мМ проявляє значну токсичність для обох досліджених штамів дріжджів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 – зниження показника відсотку живих клітин на 78,1% та 78,6 відповідно. Загалом, у всіх досліджених концентраціях солей AgNO_3 або CuSO_4 вони не викликають значної токсичної дії на дріжджові клітини, окрім концентрації AgNO_3 або CuSO_4 10,0 мМ. Солі міді, зокрема CuSO_4 , також виявляють токсичність для *S. cerevisiae*. Дослідження показали, що CuSO_4 може призводити до окислення та дисфункції білків у клітинах дріжджів [8]. Токсичність цієї солі також пов'язана з її здатністю до активної інтеракції з молекулами сірки та іншими біологічно активними сполуками [9]. Можна зробити висновок, що дані штами більше підходять для синтезу наночасток срібла. Тому подальший етап буде проводитися із використанням солі AgNO_3 .

За допомогою методу DLS було встановлено розміри отриманих наночасток. Результати вимірів представлені в таблиці 1. Найменший розмір наночастки мають у зразку, в якому для зеленого синтезу наночасток срібла використали біомасу дріжджів *S. cerevisiae* 530. Загалом,

Продовження додатку В

Освіта для сталого майбутнього: екологічні, технологічні, економічні і соціокультурні питання

синтезовані наночастки за допомогою *S. cerevisiae* 1995 мають більші розміри, ніж наночастки синтезовані за допомогою *S. cerevisiae* 530.

Таблиця 1 – Розміри синтезованих зеленим синтезом наночастинок

штам <i>S. cerevisiae</i>	супернатант		біомаса (лізат)	
	1995	530	1995	530
	277,5±98,73	353,2±106,2	174,85±63,72	168,55±55,03

При дослідженні антибактеріальної дії на бактеріальному штамі *E. coli* отриманих наночастинок було встановлено, що всі зразки володіють антибактеріальною дією на рівні контролю – розчину AgNO_3 відповідної концентрації (рис. 3). Проте, для зразків наночастинок срібла, отриманих з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 в концентрації 0,1 мМ, показана більша антибактеріальна дія, ніж для контролю AgNO_3 – значення на 16,7% та 36,7% менші, ніж у контролі AgNO_3 в концентрації 1 мМ.

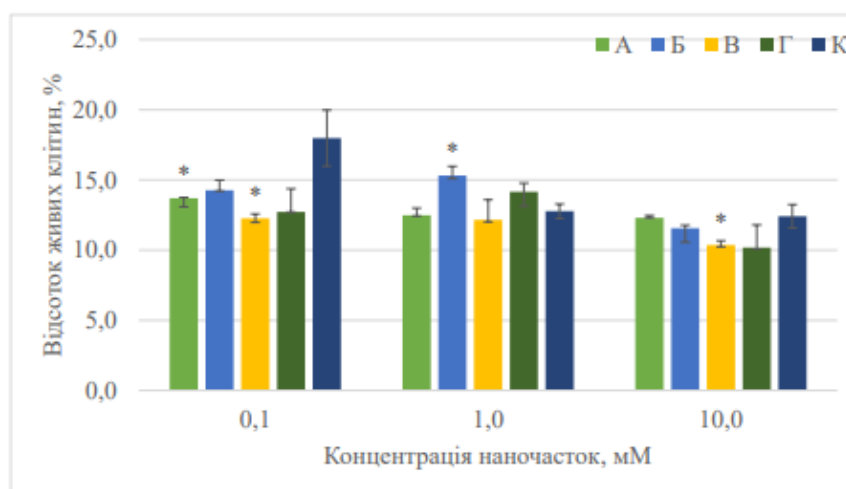


Рисунок 3 – Антибактеріальна дія наночастинок, отриманих з А – супернатанту *S. cerevisiae* 530, Б – супернатанту *S. cerevisiae* 1995, В – лізату *S. cerevisiae* 530, Г – лізату *S. cerevisiae* 530 на *E. coli*. К – розчин солі AgNO_3 (* $p \leq 0,05$)

Також, для зразку наночастинок, отриманих з лізату *S. cerevisiae* 530 показано зниження значення відсотку живих клітин на 16,1% в порівнянні з AgNO_3 в концентрації 10 мМ. AgNPs спричиняють зупинку клітинного

Продовження додатку В

Освіта для сталого майбутнього: екологічні, технологічні, економічні і соціокультурні питання

поділу у бактеріях шляхом впливу на структуру ДНК та мембранних білків [10]. AgNPs також взаємодіють з ферментами бактерій, порушуючи їхні молекулярні процеси та призводячи до інгібування росту та розмноження [11]. Генерування вільних радикалів кисню: AgNPs можуть генерувати вільні радикали кисню, які завдають пошкоджень бактеріальним мембранам та біологічним молекулам [12]. Останні дослідження вказують на ефективність AgNPs, отриманих зеленим синтезом на дріжджах *S. cerevisiae*, у боротьбі з різними видами бактерій, включаючи патогенні штами, що виявили стійкість до антибіотиків [13]. Ці дослідження відкривають перспективи використання AgNPs як антибактеріальних агентів у медицині та інших галузях.

При дослідженні антибактеріальної дії на *L. delbrueckii*, було встановлено, що всі досліджені наночастки не володіють цитотоксичною дією, навпаки, вони здатні інтенсифікувати життєздатність клітин *L. delbrueckii*. При порівнянні з контролем, AgNO₃ в концентрації 0,1 мМ, спостерігали підвищення показника живих клітин для зразків, отриманих з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 та з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 1995 на 23,4%, 12,5%, 14,4% та 19,1% відповідно (рис. 4).

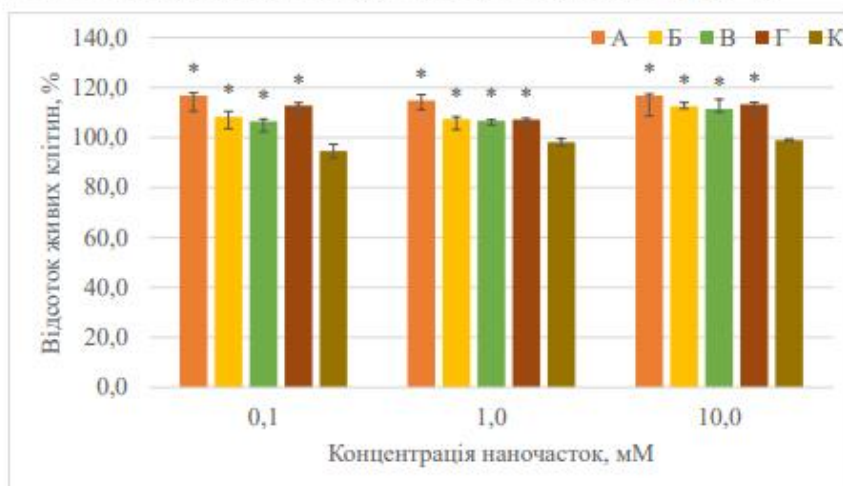


Рисунок 4 – Антибактеріальна дія наночасток, отриманих з А – супернатанту *S. cerevisiae* 530, Б – супернатанту *S. cerevisiae* 1995, В – лізату *S. cerevisiae* 530, Г – лізату *S. cerevisiae* 530 на *L. delbrueckii*. К – розчин солі AgNO₃ (* $p \leq 0,05$)

Продовження додатку В

Освіта для сталого майбутнього: екологічні, технологічні, економічні і соціокультурні питання

При порівнянні з контролем, AgNO_3 в концентрації 1,0 мМ, спостерігали підвищення показника живих клітин для зразків, отриманих з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 та з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 1995 на 17,1%, 8,7%, 9,4% та 9,2% відповідно. При порівнянні з контролем, AgNO_3 в концентрації 10,0 мМ, спостерігали підвищення показника живих клітин для зразків, отриманих з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 та з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 1995 на 17,9%, 12,6%, 13,7% та 14,5% відповідно. Загалом, найбільший позитивний вплив на життєздатність клітин *L. delbrueckii* мають наночастки срібла, отримані з супернатанту *S. cerevisiae* 530. Подібних досліджень в науковій літературі на даний момент не існує, а тому перспектива посилення життєдіяльності бактерій нормофлори людини є надзвичайно важливою та перспективною.

Висновки

В даній роботі було проведено дослідження витривалості дріжджових клітин штамів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 до різних концентрацій солей AgNO_3 або CuSO_4 . Встановлено, що найкраще всього дріжджі переносять вплив солі AgNO_3 . Саме тому, було проведено синтез наночасток срібла за допомогою двох штамів *S. cerevisiae* та в різних схемах, а саме з використанням лізату та супернатанту. Було встановлено, що найменші наночастки були отримані з використанням лізату *S. cerevisiae* 530, проте найефективнішу антибактеріальну дію проявили наночастки, отримані з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 в концентрації 0,1 мМ. Також, варто зазначити, що позитивніший ефект щодо посилення життєздатності клітин нормофлори людини *L. delbrueckii* має зразок наночасток, отриманий з супернатанту *S. cerevisiae* 530. Таким чином, нами було встановлено, що саме штам дріжджів *S. cerevisiae* 530 найкраще підходить для синтезу наночасток срібла, а умови проведення біогенного синтезу можуть регулювати розмір наночасток та їх біологічні властивості. Отримані результати можуть бути доповнені розширенням

Продовження додатку В

Освіта для сталого майбутнього: екологічні, технологічні, економічні і соціокультурні питання

спектром біологічним досліджень. Більше того, наночастки срібла, отримані зеленим синтезом, мають перспективи у застосування комплексної терапії бактеріальних захворювань.

Література

1. Ying, S., Guan, Z., Ofoegbu, P. C., Clubb, P., Rico, C., He, F., & Hong, J. Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations. *Environmental Technology & Innovation*. 2022, 26, 102336-102356.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352186422000359>
2. Pandit, C., Roy, A., Ghotekar, S., Khusro, A., Islam, M. N., Emran, T. B., Lam, S. E., Khandaker, M. U., Bradley, D. A. Biological agents for synthesis of nanoparticles and their applications. *Journal of King Saud University-Science*. 2022, 34(3), 101869-101882.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364722000507>
3. Vijayaram, S., Razafindralambo, H., Sun, Y. Z., Vasantharaj, S., Ghafarifarsani, H., Hoseinifar, S. H., Raeeszadeh, M. Applications of Green Synthesized Metal Nanoparticles—A Review. *Biological Trace Element Research*. 2023, 1-27. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12011-023-03645-9>
4. Vishwanath, R., Negi, B. Conventional and green methods of synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial properties. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*. 2021, 4, 100205-100217.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666086521001521>
5. Gomes, H. I., Martins, C. S., Prior, J. A. Silver nanoparticles as carriers of anticancer drugs for efficient target treatment of cancer cells. *Nanomaterials*. 2021, 11(4), 964-995. <https://www.mdpi.com/2079-4991/11/4/964>
6. Nadaf, S. J., Jadhav, N. R., Naikwadi, H. S., Savekar, P. L., Sapkal, I. D., Kambli, M. M., Desai, I. A. Green synthesis of gold and silver nanoparticles: Updates on research, patents, and future prospects. *OpenNano*. 2022, 100076-1000101.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S235295202200038X>