

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

Доцент Нипорко Олексій Юрійович

Протокол № _____ засідання кафедри

від “ _____ ” _____ 2024 р.

**ВПЛИВ ДИСФУНКЦІЇ КИШКОВОГО БАР'ЄРУ НА
СТЕАТОТИЧНУ ХВОРОБУ ПЕЧІНКИ ТА СТЕАТОГЕПАТИТ:
ДОСЛІДЖЕННЯ ПОТЕНЦІЙНИХ БІОМАРКЕРІВ ДЛЯ КЛІНІЧНОЇ
ДІАГНОСТИКИ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра
студентки спеціальності 091

Біологія

ОП «Біологія (високі технології)»

Шевченко Ярослави Ігорівни

Науковий керівник від кафедри
професор кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики

д.б.н. Цимбалюк О.В.

Робота виконана у відділі гепатології та
гастроентерології Charité –
Universitätsmedizin Berlin під
керівництвом д.б.н. **Лінди Хаммеріх**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

АНОТАЦІЯ

Шевченко Я. І. Вплив дисфункції кишкового бар'єру на стеатотичну хворобу печінки та стеатогепатит: дослідження потенційних біомаркерів для клінічної діагностики. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 «Біологія».

Випускна кваліфікаційна робота викладена на 60 сторінках, ілюстрована 16 рисунками, містить 3 формули. Список використаних джерел включає 53 роботи.

Жирова хвороба печінки, асоційована з метаболічними порушеннями (MASLD) становить найчастішу причину хронічних захворювань печінки на глобальному рівні, характеризується накопиченням ліпідів у печінці, ураженням гепатоцитів та порушенням метаболічних процесів. Прогресування MASLD до стадії стеатогепатиту, асоційованого з метаболічними порушеннями (MASH) супроводжується запальними процесами та фіброзом печінки, які є основними причинами цирозу та гепатоцелюлярної карциноми [44]. Наразі не існує ефективних методів лікування ані MASLD, ані MASH, що робить визначення основних механізмів, які лежать в основі цих патологій, особливо важливим для розробки інноваційних терапевтичних підходів. Ключовим елементом, який сприяє прогресуванню MASLD, є дисбіоз кишечника, що асоціюється з його підвищеною проникністю. Це призводить до транслокації кишкових патоген-асоційованих молекулярних патернів (ПАМП) через ворітну вену до печінки. ПАМП діють як ліганди для рецепторів розпізнавання патернів, таких як Toll-подібні рецептори, які експресуються на різноманітних резидентних та інфільтрованих імунних клітинах печінки. [5]

У даному дослідженні було застосовано метод повноспектральної проточної цитофлуориметрії для імунного фенотипування пацієнтів з

MASLD та MASH, що дозволило ідентифікувати нові потенційні молекулярні мішені.

Результати показали значне зниження регуляції Toll-подібного рецептора 9 у мієлоїдних імунних клітинах крові пацієнтів з MASLD із аналогічним спостереженням для пацієнтів з MASH, у порівнянні зі здоровим контролем. Ці висновки надають нове розуміння взаємозв'язків між кишечником та печінкою і пропонують новий діагностичний біомаркер, а також потенційні терапевтичні мішені для агоністичної терапії. Вони можуть бути застосовані в майбутньому для діагностики та лікування метаболічних захворювань печінки.

Науково-дослідницький проект «Вплив дисфункції кишкового бар'єру на стеатотичну хворобу печінки та стеатогепатит: дослідження потенційних біомаркерів для клінічної діагностики» було здійснено в лабораторії пухлинної імунології та імунотерапії шлунково-кишкового тракту на кафедрі гепатології та гастроентерології Медичного університету Шаріте в Берліні. Керівництво проектом здійснювали доктор біологічних наук **Алікс Бруно** та доктор біологічних наук **Лінда Хаммеріх**.

Ключові слова: MASLD, MASH, вісь кишечник-печінка, Toll-подібні рецептори, TLR9, вроджена імунна система, клінічні біомаркери.

ANNOTATION

Yaroslava Shevchenko study of the dysfunctions in gut barrier participate in the progression of the metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) and steatohepatitis (MASH).

The undergraduate qualification work is laid out on 63 pages, illustrated with 16 figures and 3 formulas. The list of used sources includes 53 works.

Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) is the most prevalent cause of chronic liver injury worldwide, characterized by lipid accumulation in the liver, hepatocytes injury and metabolic abnormalities. The advanced stage of the disease, metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH), is associated with liver inflammation and fibrosis and represents a significant cause of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) [44]. To date, there is no effective treatment for neither MASLD nor MASH. Therefore, it is crucial to identify the underlying mechanisms driving these pathologies to develop innovative treatments. A key factor associated with the progression of MASLD is intestinal dysbiosis, which is associated with increased intestinal permeability. This leads to the translocation of gut-derived pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) into the portal vein to the liver. PAMPs are ligands for pattern recognition receptors, such as Toll-like receptors, which are expressed on various liver-resident and infiltrating immune cells [5].

In this study, the immune phenotyping of MASLD and MASH patients was performed using the technique of full spectrum flow cytometry, and novel molecular targets were revealed. The data demonstrate the strong downregulation of Toll-like receptor 9 in myeloid immune cell populations in the blood of MASLD and MASH patients. The results provide new insights into the gut-liver axis research and offer a novel diagnostic biomarker and potential

agonistic therapeutic targets for future clinical implementation in the diagnosis of metabolic liver diseases.

The study was conducted in the laboratory of Tumor Immunology and Immunotherapy of GI-Tumors at the Department of Hepatology and Gastroenterology in the Charité Universitätsmedizin Berlin. The project was done under the supervision of Dr. rer. nat. Alix Bruneau and Dr. rer. nat. Linda Hammerich.

Key words: MASLD, MASH, gut-liver axis, Toll-like receptors, TLR9, innate immune system, clinical biomarkers.

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	8
ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1	11
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	11
1.1 Відсутність ефективних методів лікування та діагностики стеатичної хвороби печінки та стеатогепатиту.....	11
1.2 Вплив кишківника на прогресію паталогій печінки.....	12
1.3 Toll-подібні рецептори.....	13
1.4 Дектин-1 (Clec7a) та GRIg.....	17
1.5 G-білок-зв'язаний рецептор жовчних кислот TGR5	18
РОЗДІЛ 2	20
МЕТОДИ ТА РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	20
2.1 Застосування методу спектральної проточної цитометрії у трансляційних дослідженнях	20
2.2 Еталонні контролі для алгоритму спектрального розділення	21
2.3 Створенні еталонних контролів на компенсаційних кулях...22	
2.4 Підготовка зразка крові для проточної цитометрії.....	24
2.5 Аналіз даних, отриманих методом спектральної цитофлуориметрії.....	28
2.6 Статистичний аналіз цитофлуориметричних даних	29
РОЗДІЛ 3	31
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	31
3.1 Ідентифікація популяцій імунних клітин за допомогою стратегії гейтингу	31

3.2	Зниження кількості циркулюючих імунних клітин у крові пацієнтів з MASLD і MASH.....	35
3.3	Кореляційна матриця імунних маркерів.....	37
3.4	Рівень експресії PRR варіюється між когортами MASLD, MASH та здоровим контролем	39
3.4.1	Toll-подібні рецептори 2 та 5 демонструють підвищений рівень експресії в міелоїдних клітинних популяціях пацієнтів з MASLD та MASH.....	39
3.4.2	Патерн-розпізнавальний рецептор β -глюканів патогенних грибів Dectin-1 гіперекспресується в MASLD та MASH.....	41
3.4.3	Посилення регуляції GRIg та TGR5 у пацієнтів з MASLD супроводжується підвищеною експресією в пацієнтів з MASH	42
3.5	Toll-подібний рецептор 9.....	44
3.5.1	Дослідження внутрішньоклітинної або поверхневої експресії Toll-подібного рецептора 9 на всіх популяціях імунних клітин за умов метаболічних захворювань печінки	44
3.5.2	Toll-подібний рецептор 9 є потенційною новою діагностичною мішенню для MASLD та MASH.....	45
3.5.3	TLR9 демонструє значне зниження регуляції у крові пацієнтів з MASLD.....	47
3.5.4	У когорті пацієнтів з MASH виявлено консервативний патерн зниження регуляції TLR9 у міелоїдних популяціях.....	47
3.5.5	Перспективи подальших досліджень ролі TLR9 у прогресії захворювань печінки	48
	ВИСНОВКИ	50
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	51

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

MASLD – жирова хвороба печінки, асоційована з метаболічними порушеннями (Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease)

MASH – неалкогольний стеатогепатит, асоційований з метаболічними порушеннями (Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis)

TLR – Toll-подібні рецептори (Toll-like receptors)

ВСТУП

Порушення зв'язку між кишківником та печінкою відіграє ключову роль у прогресії жирової хвороби печінки, асоційованої з метаболічними порушеннями (MASLD) [5,45]. Це зумовлено складним двонаправленим механізмом, який охоплює транспортування мікробіотичних продуктів та жовчних кислот до печінки та зворотню секрецію жовчних кислот та антитіл у кишечник з боку печінки. Збереження цілісності слизової оболонки шлунково-кишкового тракту та васкулярних бар'єрів є критично важливим для захисту печінки від проникнення кишкових патоген-асоційованих молекулярних патернів (ПАМП), які можуть потрапляти до печінки через порталну циркуляцію. У здоровій печінці ПАМП зазвичай не є шкідливими, оскільки їх елімінують клітини Купфера [46]. Проте, при гострому чи хронічному запаленні печінки, ушкодження гепатоцитів може спричинити клітинну смерть, що веде до вивільнення прозапальних цитокінів та хемоатрактантів разом із молекулярними структурами, асоційованими з ушкодженням (DAMPs). Це підсилює хронічне запалення та сприяє мобілізації клітин вродженого імунітету. Додатково, підвищена проникність кишечника, яка часто асоціюється з дисбіозом, може викликати транслокацію бактерій, зростання рівнів ПАМП, токсичних жовчних кислот та жирних кислот у печінці. Виявлення цих імунних сигналів рецепторами розпізнавання патернів (PRR) впливає на диференціацію міелоїдних імунних клітин [47], відіграючи суттєву роль у розвитку захворювань печінки, таких як MASLD та MASH.

Це дослідження аналізує взаємодію між бактеріальними продуктами кишечника та їх впливом на розвиток захворювань печінки, акцентуючи увагу на рецепторах розпізнавання патернів (PRR), зокрема на Toll-подібних рецепторах (TLR) 2, 5 і 9, що є об'єктом дослідження та є

особливо значущими для прогресування зазначених патологій печінки [8, 9, 10].

Основна мета дослідження полягає у характеристиці імунного мікрооточення пацієнтів зі стеатогепатитом, асоційованим з метаболічною дисфункцією (MASH), на третій і четвертій стадіях фіброзу. Отримані дані будуть порівняні з результатами із попередньо сформованої когорти пацієнтів з жировою хворобою печінки, асоційованою з метаболічними порушеннями (MASLD) та здорової контрольної групи. Ціль полягає в аналізі змін експресії PRR в контексті прогресування захворювання від простого стеатозу до стеатогепатиту з фіброзом, а також у виявленні потенційних нових біомаркерів для клінічної діагностики та терапії цих патологій.

Відповідно до мети поставлено такі завдання:

1. Виконати імунне фенотипування осіб з метаболічними дисфункціями, пов'язаними із стеатогепатитом, за допомогою методу повноспектральної проточної цитофлуориметрії.
2. Провести аналіз і порівняння різних популяцій міелоїдних та лімфоїдних імунних клітин, а також вивчити патерн експресії імунних маркерів, що є ключовими, серед когорти пацієнтів з MASLD та MASH у порівнянні зі здоровими контрольними особами.
3. Ідентифікувати потенційні діагностичні та терапевтичні цілі для MASLD та MASH, що можуть бути інтегровані в клінічну практику.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Відсутність ефективних методів лікування та діагностики стеатичної хвороби печінки та стеатогепатиту

Жирова хвороба печінки (MASLD) та стеатогепатит (MASH), асоційовані з метаболічними порушеннями, вважаються одними з найпоширеніших захворювань печінки у світі, проте їх діагностика та лікування все ще залишаються серйозними викликами для медичної спільноти. За даними останніх епідеміологічних досліджень, на MASLD страждає близько 25% світового населення [2]. Основними проявами патології є накопичення тригліцеридів у гепатоцитах, що спричиняє ряд системних метаболічних порушень. Це стан, який часто супроводжується високою інсулінорезистентністю, цукровим діабетом 2 типу, серцево-судинними захворюваннями, абдомінальним ожирінням та хронічною нирковою недостатністю [1]. MASH, який є більш тяжкою формою MASLD, вражає від 3 до 5% світового населення і характеризується не тільки стеатозом, а й печінковим запаленням та подальшим фіброзом, що значно погіршує функції печінки [2].

Незважаючи на досягнення в розумінні цих захворювань, терапевтичні можливості все ще обмежені і зосереджені переважно на змінах способу життя та дієтичних рекомендаціях, спрямованих на зниженні вмісту жиру в печінці та поліпшенні метаболічних показників. Однак, основною проблемою є недостатнє дотримання цих рекомендацій пацієнтами [3]. Фармакологічне лікування рідко застосовується, оскільки лише мала кількість пацієнтів з MASLD розвивають клінічно значущі ускладнення, що дозволяють їм кваліфікуватися для такого лікування. 20% пацієнтів з MASLD прогресують до незворотного фіброзу та

гепатоцелюлярної карциноми до моменту постановки діагнозу через непомічені ураження при діагностиці [4].

Таким чином, рання та точна діагностика є ключовою для забезпечення своєчасного та ефективного лікування. Сучасні діагностичні протоколи включають аналіз крові на рівень печінкових ферментів, таких як аланінамінотрансфераза, та гістологічне підтвердження через біопсію печінки. А також методи візуалізації для оцінки ступеня стеатозу: ультразвукове дослідження черевної порожнини, транзиторну еластографію та МРТ. Втім, диференціація MASLD від інших печінкових захворювань, таких як вірусний гепатит, алкогольне ушкодження печінки та цироз, залишається серйозною клінічною проблемою. Визначення надійних біомаркерів для MASLD є критично важливим, адже розробка стабільних та відтворюваних діагностичних цілей може істотно покращити лікування цього поширеного захворювання.

1.2 Вплив кишківника на прогресію паталогій печінки

Транспортування кишкових бактерій та їхніх метаболічних продуктів через ворітну вену є вирішальним для патофізіології печінки. Зазвичай резидентні макрофаги печінки, відомі як клітини Купфера, ефективно видаляють надлишки бактеріальних продуктів. Однак порушення балансу кишкової мікробіоти, або дисбіоз, відіграє ключову роль у розвитку MASLD. Мікробіота кишківника та її метаболіти виступають у ролі посередників між кишечником і печінкою. Деякі компоненти, такі як коротколанцюгові жирні кислоти, жовчні кислоти та ліпополісахариди, були ідентифіковані як потенційні діагностичні маркери для оцінки тяжкості MASLD та стадії фіброзу [5].

Дисбіоз і збільшена проникність кишківника сприяють транслокації мікробів і їхніх метаболітів, включно з мікробно-асоційованими молекулярними патернами (MAMPs), такими як ліпополісахариди та β -глюкани, а також токсичних жовчних кислот до печінки через ворітну вену. Вони детектуються рецепторами вродженої імунної системи на гепатоцитах та імунних клітинах, що ініціює імунну відповідь та запальний процес. Патоген-асоційовані молекулярні патерни здатні впливати на диференціацію фенотипів мієлоїдних імунних клітин, що інфільтрують печінку, у бік збільшеної здатності до продукування фіброзу [9]. Відповідно, сигнали з кишківника посилюють вроджені імунні відповіді, характеризуючись значним залученням нейтрофілів і моноцитарних макрофагів, які є ключовими у координації запальних реакцій при гострих та хронічних захворюваннях печінки [10].

Глибоке розуміння молекулярних механізмів **залучення та активації імунних клітин** у печінці та кишечнику є необхідним для розробки ефективних терапевтичних стратегій даних патологій.

1.3 Toll-подібні рецептори

Toll-подібні рецептори (TLR) становлять основну групу рецепторів розпізнавання патернів, які відіграють ключову роль у ідентифікації патоген-асоційованих молекулярних патернів (PAMPs). Ці рецептори локалізовані в паренхіматозних клітинах печінки, таких як гепатоцити, холангіоцити і печінкові зірчасті клітини, а також в клітинах вродженого імунітету, включаючи моноцити, макрофаги, дендритні клітини і нейтрофіли [6].

Деякі Toll-подібні рецептори, такі як TLR2, TLR4 та TLR5, що розпізнають елементи зовнішньої структури бактерій та грибів,

розташовуються на поверхні клітин. Інші, що розпізнають бактеріальні та вірусні нуклеїнові кислоти, як TLR9 для неметильованої CpG-вмісної ssDNA, мають внутрішньоклітинне розташування в ендосомах. Активація цих рецепторів специфічними лігандами ініціює сигнальний шлях, залежний від MyD88, і лише TLR3 і TLR4 можуть запускати шлях TRIF. Обидва молекулярні шляхи призводять до активації транскрипційних факторів, таких як NF- κ B, AP-1 та IRF3. Ці фактори, в свою чергу, стимулюють секрецію прозапальних цитокінів, включаючи фактор некрозу пухлини α (TNF- α), що сприяє формуванню фіброзу печінки, а також інтерферони α і β (IFN- α , IFN- β) та інтерлейкін 6 (IL-6), які є невід'ємною частиною TH1 імунної відповіді [7].

Взаємодія між кишечником та печінкою, часто описана як вісь "кишечник-печінка", разом із дисбіозом кишечника, є основним чинником, що сприяє розвитку і прогресуванню MASLD. Зміни у складі кишкової мікробіоти зумовлюють варіації у кількості та різноманітності лігандів TLR, що досягають печінки, що посилює сигналізацію TLR та вивільнення прозапальних цитокінів. Механізми патогенезу MASLD є особливо асоційованими з TLR2, TLR4, TLR5 і TLR9 [8, 9, 10]. Таким чином, кишкова мікробіота та Toll-подібні рецептори становлять два ключових об'єкта для дослідження та лікування MASLD [10, 11].

1.3.1 Толл-подібний рецептор 9

Toll-подібний рецептор 9 (TLR9) ідентифікує неметильовану бактеріальну CpG ДНК, що ініціює прозапальну імунну відповідь при активації. Крім того, TLR9 активується ендогенною мітохондріальною ДНК (мтДНК), яка вивільняється після клітинного стресу, та рівень якої значно зростає при ожирінні, MASLD та MASH [12]. TLR9 експресується на імунних клітинах, включно з моноцитами, макрофагами, дендритними

клітинами та В-клітинами, ініціюючи сильну TH1 відповідь при активації. Роль TLR9 у патогенезі MASLD викликає дебати в науковому співтоваристві, з огляду на дані, які демонструють його потенційну захисну роль, хоча даний рецептор у більшості випадків асоціюється з прогресуванням патологій печінки [13].

1.3.2 TLR9 як рушійна сила прогресування MASLD

In vivo дослідження на мишиних моделях, що мімікують MASH, виявили збільшення експресії TLR9 [14], а клінічні спостереження показали збільшення вмісту ліганду – бактеріальної ДНК у зразках крові та асцитичній рідині пацієнтів з прогресуючим цирозом [15]. Результати дослідження *in vivo* моделі мишей з нокаутом TLR9 (tlr9^{-/-}), які отримували дієту з дефіцитом холінових амінокислот для індукції стеатогепатиту, показали менший рівень стеатозу, запалення та фіброзу печінки порівняно з контрольними мишами дикого типу, що свідчить про значну роль TLR9 у гепатоцелюлярному запаленні та прогресуванні MASH [10]. Виявлено, що TLR9 впливає на рекрутинг макрофагів і нейтрофілів у моделях MASH, зі зниженням запалення печінки при делеції рецептора [16].

У моделях з делецією TLR9 резидентні макрофаги печінки, або клітини Купфера, демонстрували пригнічену продукцію IL-1 β після активації TLR9 його лігандом CpG ДНК. Як наслідок, спостерігається зменшення запалення печінки, котре пов'язане з активацією інфламасоми [17]. Цитоплазматичний адаптерний білок MyD88, важливий у сигнальних шляхах TLR та інтерлейкіну-1, активує транскрипційні фактори NF-kB та AP-1, які ініціюють транскрипцію прозапальних цитокінів та інтерферон-індукованих генів, що підтверджує, – сигналінг через TLR9 є ключовим механізмом прогресування MASH, що робить рецептор потенційною

терапевтичною мішенню для таргетної терапії запальних і метаболічних аспектів стеатогепатиту.

1.3.3 Докази захисної ролі TLR9 у паталогії печінки

Дослідження *in vivo* на мишах з нокаутом TLR9 (tlr9^{-/-}), які отримували дієту з високим вмістом жирів (HFD), продемонстрували загострення інтолерантності до глюкози та інсулінорезистентності. Крім того, у цих мишей спостерігалось підвищене накопичення прозапальних макрофагів та CD4⁺ Т-клітин у жировій тканині порівняно з контрольними мишами дикого типу. У споріднених дослідженнях виявили підвищені рівні декількох прозапальних цитокінів і хемокінів у мишей з дефіцитом TLR9 [18]. Також, було проведено дослідження участі TLR9 в атеросклерозі, де було порівняно дві моделі мишей: одна з атеросклерозом та індукованою делецією аполіпопротеїну Е (apoE^{-/-}), та інша з подвійним нокаутом, що включав як apoE^{-/-}, так і tlr9^{-/-} [19]. Результати дослідження показали, що після восьми тижнів на дієті з високим вмістом жирів накопичення ліпідів було більш вираженим у мишей з подвійним нокаутом, ніж у мишей з одинарним нокаутом. Крім того, вони повідомили про збільшення кількості макрофагів, дендритних клітин і CD4⁺ Т-клітин за відсутності TLR9, що свідчить про захисну роль TLR9 у розвитку цього захворювання.

1.3.4 Toll-подібні рецептори 2 і 5

Toll-подібний рецептор 2 (TLR2) відіграє важливу роль в ідентифікації ключових компонентів клітинних стінок грампозитивних бактерій, таких як пептидоглікан і ліпотьохоева кислота, а також

ліпопротеїнів клітинної стінки грибів. Дослідження встановили кореляцію між поширеністю певних грампозитивних бактерій при ожирінні та зумовленим цим підвищенням рівня лігандів TLR2, які причетні до MASLD [13, 10, 20]. В експериментальних *in vivo* моделях, миші з делецією TLR2, які отримували дієту з дефіцитом холіну та метіоніну (CDAА diet), яка мімікує MASH, продемонстрували стійкість до розвитку стеатогепатиту, що пояснюється зниженням експресії прозапальних цитокінів, включаючи TNF α та IL-1 β [21].

Toll-подібний рецептор 5 (TLR5) є невід'ємною частиною вродженої імунної відповіді та розпізнає бактеріальний флагелін як грам-позитивних, так і грам-негативних бактерій [27]. *In vivo* дослідження за участю мишиних моделей з нокаутом TLR5 продемонстрували схильність до ожиріння та стеатозу, які є ознаками MASLD [28]. Це свідчить про захисну роль сигнального шляху TLR5 у розвитку стеатогепатиту, спричиненого дієтою з дефіцитом метіоніну та холіну (MASH модель) [29]. Дослідження показали, що дієта з високим вмістом жирів збільшує поширеність видів бактерій, що виробляють флагеліни в кишечнику, що призводить до підвищення рівня печінкового флагеліну [30]. Як наслідок, це спричиняє збільшення кількості лігандів TLR5, з послідуючою стимуляцією експресії TLR5 в адипоцитах та посилює накопичення тригліцеридів. Крім того, у пацієнтів з MASLD спостерігається пряма кореляція між підвищеною експресією TLR5 та стеатозом печінки [28].

1.4 Дектин-1 (Clec7a) та GRIg

Дектин-1, або Clec7a, – це член сімейства лектинових рецепторів С-типу та належить до складу рецепторів розпізнавання патернів (PRRs), що детектує β -глюкани клітинної стінки патогенних грибів [31]. Цей рецептор

переважно експресується на мієлоїдних клітинах, таких як моноцити, макрофаги, дендритні клітини, нейтрофіли та НК-клітини. Активація Dectin-1 призводить до секреції прозапальних цитокінів і хемокінів макрофагами, що посилює прогресування метаболічної хвороби печінки (MASLD) [32]. Хоча у пацієнтів з фіброзом спостерігається гіперекспресія цього рецептора, він також відіграє захисну роль, знижуючи регуляцію TLR4 на макрофагах [33]. Експериментальні дослідження на мишах, яких годували етанолом, показали, що підвищення рівня β -глюкану посилює секрецію IL-1 β клітинами Купфера через NLRP3 молекулярний шлях, сприяючи запаленню та фіброзу печінки. Однак було продемонстровано, що протигрибкове лікування зменшує тяжкість захворювання печінки, що ілюструє потенційний терапевтичний підхід на пізніх стадіях, де переважає грибовий дисбактеріоз і підвищений рівень дектину-1.

Рецептор комплементу суперсімейства імуноглобулінів CR1g – експресується на макрофагах печінки та зв'язується з компонентом комплементу C3b або грампозитивними бактеріями, опосередковуючи фагоцитоз [34]. Рецептор переважно експресується на макрофагах, включно з клітинами Купфера. [46]

1.5 G-білок-зв'язаний рецептор жовчних кислот TGR5

TGR5, G-білок-зв'язаний рецептор жовчних кислот, експресується на холангіоцитах, клітинах Купфера і печінкових зірчастих клітинах, та переважно активується гідрофобними жовчними кислотами [35]. Показано, що він інгібує секрецію прозапальних цитокінів через NF- κ B-залежний шлях у відповідь на ліпополісахариди (LPS). Таким чином, він модулює концентрації жовчних кислот у сироватці та печінці пацієнтів з MASH, впливаючи на прогресування фіброзу [36]. Дослідження *in vivo* показують, що TGR5 слугує негативним регулятором запалення печінки, а

індукована агоністами активація TGR5 значно знижує експресію медіаторів запалення у відповідь на активацію TLR4 за допомогою LPS у печінці мишей дикого типу, але не у групи з нокаутом рецептора (Tgr5-/-) [37]. Крім того, клінічні дослідження продемонстрували, що пацієнти з печінковою недостатністю мають специфічні профілі жовчних кислот у сироватці крові, які активують TGR5 в моноцитах, що корелює з підвищеною смертністю. *In vitro* дослідження підтвердили, що моноцити здорових осіб, оброблені жовчними кислотами, які активують TGR5, а потім стимульовані LPS, демонструють значно знижений прозапальний фенотип [38].

РОЗДІЛ 2

МЕТОДИ ТА РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Забір крові пацієнтів для дослідження був проведений під час рутинних візитів у клініці Шаріте в Берліні, у відділі Гепатології, Гастроентерології та Імунології. Дослідження було проведено з дотриманням принципів Гельсінської декларації та отримало схвалення від Локального етичного комітету Медичного університету Шаріте. Інформована згода була здобута від усіх учасників дослідження, документи про згоду належно зберігаються у відповідних архівах. 40 пацієнтів з MASLD і 34 здорових донорів було рекрутовано доктором біологічних наук Алікс Бруно для проекту про дослідження експресії патерн-розпізнавальних рецепторів при холангіопатіях, перед початком моєї практики.

2.1 Застосування методу спектральної проточної цитометрії у трансляційних дослідженнях

Проточна цитометрія є одним із методів, що має широке використання у вивченні та характеристиці патомеханізмів різних захворювань, а також перспективних стратегій їх діагностики та лікування. Імунний моніторинг пацієнтів на одноклітинному рівні – це метод швидкого та ефективного імунофлуоресцентного аналізу поверхневих та внутрішньоклітинних специфічних маркерів (антигенів) різних субпопуляцій клітин, котрий базується на фарбуванні суспензії клітин моноклональними антитілами, міченими флуоресцентними барвниками. Імунофенотипування дозволяє охарактеризувати фізичні та флуоресцентні властивості імунних клітин, визначити лінію походження

та стан диференціювання клітинних популяцій та отримати уявлення про популяційний склад досліджуваного зразка біоматеріалу.

На відміну від традиційної проточної цитометрії, яка використовує дискретні детектори, FSFC фіксує повний спектральний профіль випромінювання кожної флуоресцентної молекули у визначеному діапазоні довжин хвиль (360–830 нм) за допомогою напівпровідникових детекторів. Для обчислення внеску окремих спектрів флуорофора в загальний зібраний сигнал використовується математичний алгоритм спектрального розділення (spectral unmixing), який розрізняє множинні сигнатури флуорофорів у багатокольоровій пробірці та розподіляє кожну сигнатуру у власний параметр. Як наслідок, флуорофори з майже ідентичними піковими випромінюваннями, але різним позапіковим патерном, можуть бути розрізнені та використані разом у панелі [42].

2.2 Еталонні контролі для алгоритму спектрального розділення

Для створення еталонних контролів для спектрального розділення були проведені одноразові фарбування кожного антитіла на лейкоцитах периферичної крові людини або на компенсаційних бусинах Biolegend®, як зазначено в Таблиці 2.1. Для створення яскравих контрольних зразків для всіх маркерів, включаючи ті, що мають низьку частоту в крові (наприклад, TCR Va7.2 для MAIT клітин та TGR5 для детекції жовчних кислот), були використані компенсаційні кулі Biolegend® при створенні референтних зразків для всіх флуорохромів, що мають ідентичні спектри випромінювання на синтетичних кулях і клітинах. Слід зазначити, що імунні клітини були використані для флуорохромів PerCPy5.5 та Alexa Fluor™ 700, оскільки їхні спектри випромінювання значно відрізняються на клітинах порівняно з компенсаційними кулями (Рис. 2.1) [42]. Створення еталонних контролів для барвника клітинної загибелі Zombie

NIR™ та незабарвленого контролю було проведено з використанням лейкоцитів людини. Спектральне розділення було проведене в програмі SpectroFlo®3.0.3.

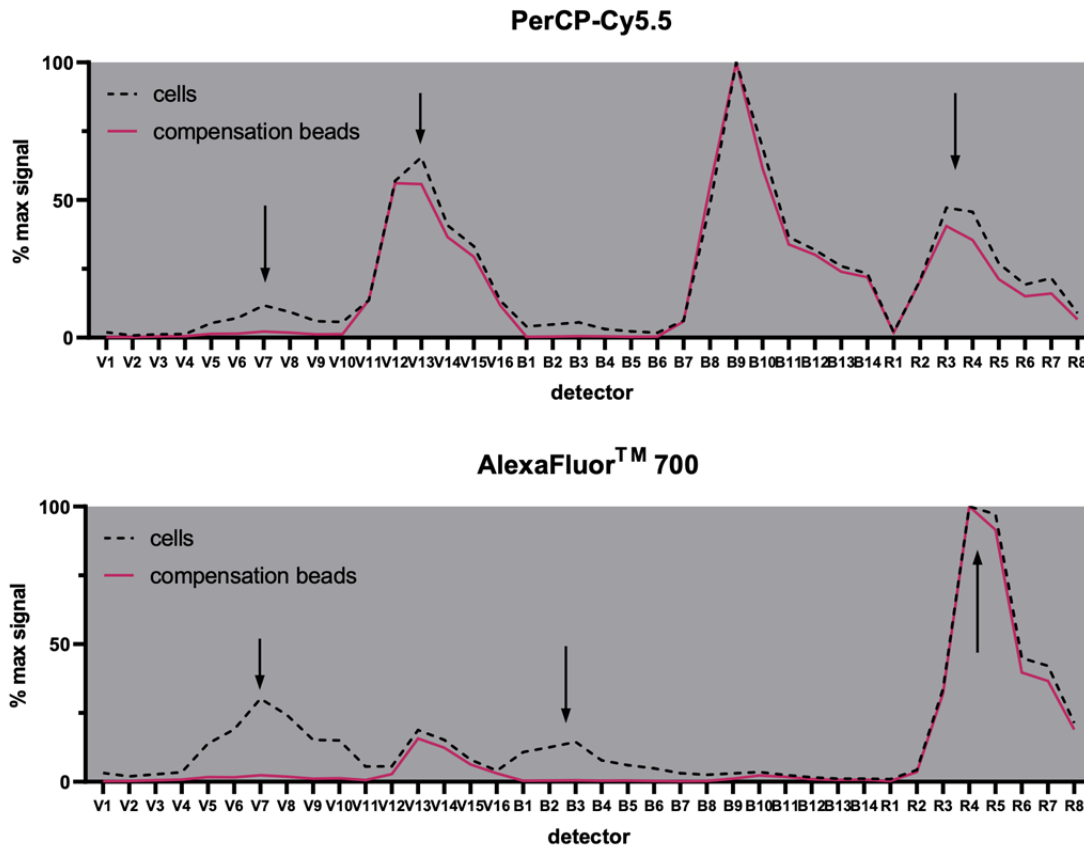


Рис. 2.1. Нормалізовані спектри випромінювання флуорохромів AlexaFluor 700 та PerCP-Cy5.5, що демонструють різні спектри випромінювання на клітинах та компенсаційних кулях. *Позначення:* лейкоцити людини = чорна пунктирна лінія, компенсаційні кулі = рожева лінія

2.3 Створенні еталонних контролів на компенсаційних кулях

По одній краплі позитивних і негативних компенсаційних кульок Biolegend (Biolegend, Inc., каталог №424601) було розведено в 1 мл буферного розчину (HBSS +2 mM EDTA). Після ретельного вортексування, для кожного референтного контролю було використано

100 мкл суспензії. Кон'юговані з флуорохромом антитіла були додані у вказаних концентраціях (Табл. 2.1) та інкубовані протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. На етапі промивання було додано 2 мл буферного розчину. Далі зразки було ресуспендовано в 200 мкл розчину та записано на спектральному проточному цитофлуориметрі Cytex® Aurora.

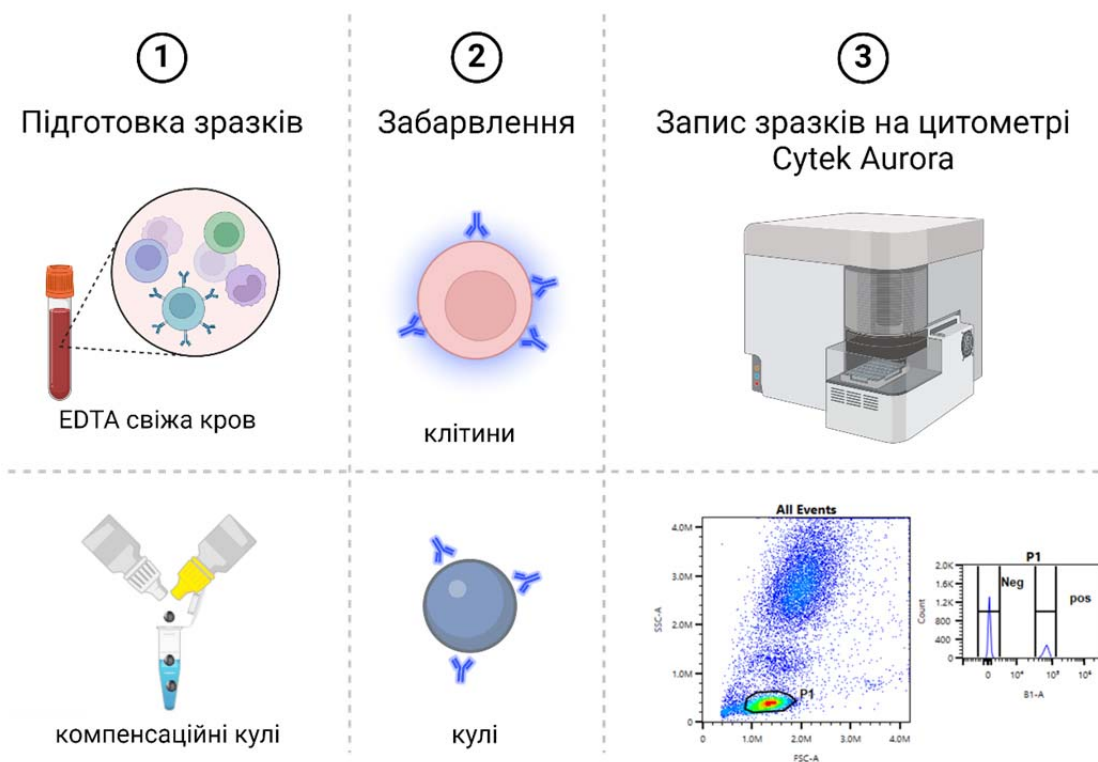


Рис. 2.2. Загальна схема генерації еталонних контролів для повноспектральної проточної цитометрії

Табл. 2.1. Список еталонних контролів, що були використані у дослідженні

Флуорофор	Маркер	Концентрація	Природа
BV421	CD19	1:100	Компенсаційні кулі
РасВ	CD66b	1:100	Компенсаційні кулі
BV480	CD4	1:100	Компенсаційні кулі
V500	CD16	1:100	Компенсаційні кулі
SV538	CD3	1:50	Компенсаційні кулі
BV570	CD11b	1:100	Компенсаційні кулі

BV605	CD38	1:100	Компенсаційні кулі
BV650	CD15	1:100	Компенсаційні кулі
BV711	CD3	1:100	Компенсаційні кулі
BV750	CD56	1:100	Компенсаційні кулі
BV785	TLR2	1:100	Компенсаційні кулі
BB515	CD8	1:400	Компенсаційні кулі
FITC	CD11b	1:100	Компенсаційні кулі
A1532	CD45	1:100	Компенсаційні кулі
PE	CXCR1	1:100	Компенсаційні кулі
PE-Dazzle594	CCR2	1:100	Компенсаційні кулі
Pe-Cy5	CD19	1:100	Компенсаційні кулі
PerCP-Cy5.5	CD14	1:200	Клітини крові
SB436	CD31	1:100	Компенсаційні кулі
PE-Cy7	CD161	1:100	Компенсаційні кулі
APC	CD14	1:100	Компенсаційні кулі
AL647	CD66b	1:100	Компенсаційні кулі
A1700	CD19	1:200	Клітини крові
Zombie NIR	Viability	1:5000	Клітини крові
APC-Cy7	CD33	1:100	Компенсаційні кулі
APC-fire810	CD25	1:100	Компенсаційні кулі

2.4 Підготовка зразка крові для проточної цитометрії

Антикоагульована цільна (EDTA) кров пацієнтів з стеатогепатитом, пов'язаним з метаболічною дисфункцією, була отримана з клініки та одразу процесована. 200 мкл цільної крові інкубувано протягом 20 хвилин при кімнатній температурі з міксом флуорохром-кон'югованих антитіл зі вказаними концентраціями (Табл. 2.2). Флуоресцентний контроль (FMO) був створений для кожного зразка крові шляхом видалення цільових флуорохром-кон'югованих антитіл (PD-1, PDL-1, TLR9, TLR4, Dectin-1, SttG) з міксу. Метою FMO-контролю є правильне визначення рівня експресії маркера в процесі аналізу, що є особливо важливим для маркерів з низькою або невідомою експресією (Рис. 2.3). Лізис еритроцитів було проведено шляхом додавання 2 мл 1x розчину для лізису BD Pharm Lyse™ та інкубації зразків протягом наступних 10 хвилин при кімнатній

температурі. Клітини було промито буферним розчином (HBSS +2мМ EDTA) і лізис був проведений вдруге протягом 5 хвилин. Клітини фіксовано у 100 мкл розчину для фіксації (Biolegend®, 420801) протягом 20 хв. Після останнього промивання клітини пермеабілізовано, додаванням 2 мл 1x внутрішньоклітинного фарбувального розчину для пермеабілізації (Biolegend®, 421002) та інкубовано протягом 5 хв при кімнатній температурі. Після центрифугування клітини було внутрішньоклітинно забарвлено флуорохром-кон'югованим антитілом до TLR9 протягом 20 хв, промито та ресуспендовано в 200 мкл буферного розчину.

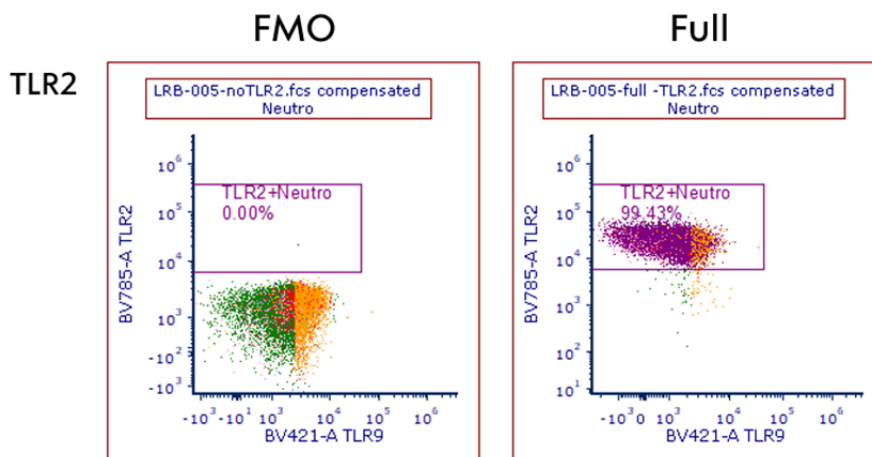


Рис. 2.3. Ілюстрація використання FMO контролю під час аналізу отриманих даних

Запис зразків був виконаний на стандартному цитометрі Cytek® Aurora, обладнаному 3 лазерами (фіолетовий 405 нм, синій 488 нм та червоний 635 нм) та 38 детекторами, з використанням програмного забезпечення Spectroflo® 3.0.3 (Cytek Biosciences, Inc.). Контроль якості проводився щодня. До кожного зразка було додано 10 мкл Precision Count Beads™ (Biolegend, 4249029). Зразки збиралися на низькій швидкості з використанням налаштувань Cytek Assay. Поріг зупинки був встановлений

на рівні 20 000 подій для гейту Т-клітин. Параметри FSC і SSC налаштовано індивідуально.

Табл. 2.5. Панель спектральної проточної цитофлуориметрії з 26 кольорів для фенотипування зразків крові пацієнтів. (МАІТ-клітини = інваріантні Т-клітини, асоційовані зі слизовими оболонками, PRR = рецептор розпізнавання патернів, ТКР = Т-клітинний рецептор, БКР = Б-клітинний рецептор). *Позначення:* синій колір = основні маркери, що представляють інтерес.

Флуорофор	Антиген	Тип клітини	Функція
BV421	TLR9	Міелоїдні клітини	PRR
РасВ	CD66b	Нейтрофіли	Клітинна адгезія
BV480	CD4	CD4+ Т клітини	Ко-рецептор для МНС-II
V500	CD16	Моноцити, нейтрофіли	Низькоафінний IgG гамма Fc-рецептор області III-A
SV538	CD3	Т клітини	Комплекс субодиниць, асоційованих з ТКР
BV570	HLA-DR	Антиген презентуючі клітини	Поверхневий рецептор МНС-II
BV605	TCR Va7.2	МАІТ клітини	Різновид ТКР
BV650	PDL1	Антиген презентуючі клітини	Імунний чекпойнт
BV711	CD127	Т регуляторні клітини	Рецептор IL-7
BV750	CD56	Натуральні кіллерні клітини	Клітинна адгезія
BV785	TLR2	Міелоїдні клітини	PRR
BB515	CD8	CD8+ Т клітини	Ко-рецептор для МНС-I
FITC	CD11b	Пан-міелоїдні клітини	αM-субодиниця інтегрину CR3
Al532	CD45	Пан-лімфоїдні клітини	Регулятор сигналу ТКР та БКР
PE	TLR5	Міелоїдні клітини	PRR
PE-Dazzle594	CCR2	Моноцити	C-C хемокіновий рецептор
Pe-Cy5	CD19	В клітини	Комплекс субодиниць, асоційованих з БКР

PerCP-Cy5.5	CD14	Моноцити	Рецептор LPS
SB436	TLR4	Міелоїдні клітини	PRR
PE-Cy7	CR1g/Vsig4	Макрофаги	Рецептор системи комплементу
APC	Dectin 1/Clec7a	Міелоїдні клітини	PRR
AL647	PD1	Активовані лімфоцити, NK клітини, дендритні клітини, моноцити	Імунний чекпойнт
AI700	TGR5	Моноцити	Рецептор жовчних кислот
Zombie NIR	Viability	Мертві клітини	Вилучення мертвих клітин
APC-Cy7	CD45RO	Т клітини пам'яті	Ізоформа CD45
APC-fire810	CD25	Т регуляторні клітини	Рецептор IL-2

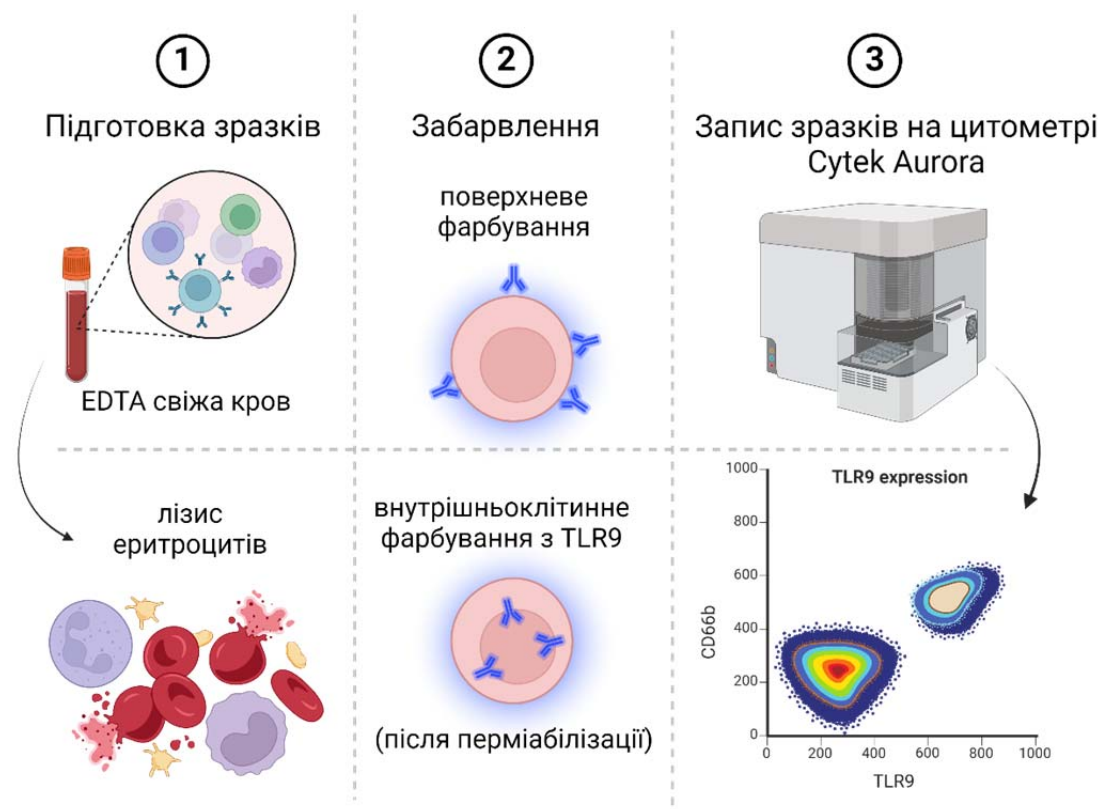


Рис.2.4. Загальна схема протоколу FACS

2.5 Аналіз даних, отриманих методом спектральної цитофлуориметрії

Попередній аналіз даних проводився за допомогою алгоритму спектрального розділення (spectral unmixing), з використанням спектральних референтних контролів (Табл. 2.1) як стандартів для математичного обчислення NxN графіки (кожен флуорофор проти іншого) були створені в програмному забезпеченні SpectroFlo® та була проведена мануальна корекція помилок перетікання спектрів індивідуальних флуорофорів в інші канали (Рис. 2.5), яка є важливою для усунення хибнопозитивних та хибнонегативних клітинних популяцій та точності подальшого аналізу.

FSC Express® – це спеціалізоване програмне забезпечення для аналізу даних, отриманих методом проточної цитофлуориметрії. Процес аналізу починається зі створення гейтів для розрізнення популяцій імунних клітин. Графік з прямим розсіюванням на осі x та бічним розсіюванням на осі y (FSC vs. SSC) використовується для ідентифікації клітин на основі їх розміру та гранулярності. Отже, лімфоцити, які мають малий розмір і не мають зернистості, розташовані в нижній частині графіка, тоді як гранулоцити (12-17 мкм) розташовуються вище за моноцити (20-25 мкм). Клітинний дебрис, що характеризується низькими значеннями прямого і бічного розсіювання, вилучено з аналізу для забезпечення точності. Графік залежності висоти прямого розсіювання (FSC-H) від площі прямого розсіювання (FSC-A) використовується для вилучення клітинних дублетів, які можуть призвести до помилкових висновків. Двопараметричні графіки щільності, де кожна вісь представляє певний маркер, використовуються для ідентифікації окремих клітинних популяцій. Мертві клітини, позитивні маркеру клітинної захибелі Zombie NIR™, і негативні до лейкоцитарного маркеру CD45, вилучаються з аналізу.

Стратегія гейтингу клітинних популяцій була ретельно розроблена для ідентифікації як мієлоїдних, так і лімфоїдних клітин, що полегшує всебічний аналіз експресії маркерів у кожній популяції клітин.

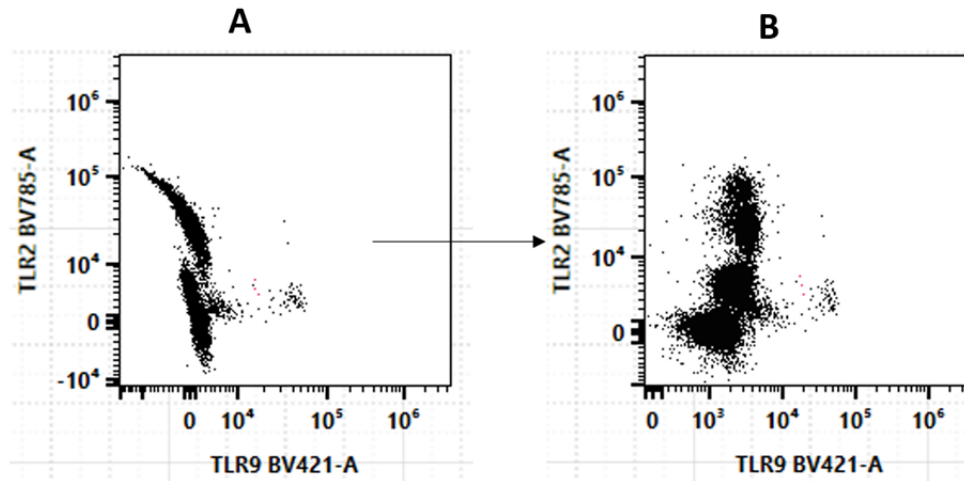


Рис.2.5. NxN точкова діаграма для двох флуорофорів BV785 і BV421, що продукують помилку спектрального розподілу. А: без корекції помилки спектрального розподілу. Б: після корекції

2.6 Статистичний аналіз цитофлуориметричних даних

Дані, що відображають кількість подій (клітин) у кожному гейті, були експортовані з FSC Express в Excel для проведення попередніх розрахунків. Відсоток CD45+ клітин для кожної популяції імунних клітин було розраховано за формулою А, тоді як відсоток клітинних субпопуляцій визначено за формулою В.

$$A: \% \text{ CD45 + (лімфоцити)} = \frac{\text{кількість подій (лімфоцити)}}{\text{загальна кількість CD45+клітин}} * 100.$$

$$B: \frac{\text{кількість подій в гейті}}{\text{кількість подій в популяції}} * 100.$$

Коефіцієнт нормалізації було розраховано за формулою: $\frac{1000}{\text{number of events (beads)}}$, де кількість лічильних кульок була визначена окремо для кожного зразку (10 мкл лічильних кульок на зразок відповідають ~10,000 подій). Кількість клітин у пробірці об'ємом 200 мкл розраховуємо шляхом множення на коефіцієнт нормалізації.

Нормалізовані дані були імпортовані в GraphPad Prism® 9.0 для проведення статистичного аналізу. Відмінності між трьома групами (контроль vs MASLD, контроль vs MASH, MASLD vs MASH) оцінювали за допомогою тесту множинного порівняння Краскела-Уолліса. Тест Краскела-Уолліса – це непараметричний метод, який використовується для порівняння двох або більше незалежних вибірок однакового або різного розміру [52]. У всіх випадках було встановлено значущість різниці за умови $p < 0.05$. Для побудови кореляційної матриці для встановлення кореляції між різними імунними маркерами (Рис. 3.4) було використано . Для підтвердження значущості отриманих даних були розраховані відповідні значення ймовірностей для кожного елемента кореляційної таблиці, зі значущістю різниці за умови $p < 0.05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Ідентифікація популяцій імунних клітин за допомогою стратегії гейтингу

Ключовим завданням проекту було охарактеризувати імунний профіль пацієнтів зі стеатогепатитом, асоційованим з метаболічною дисфункцією, за допомогою методу повноспектральної проточної цитофлуоресцентної спектрометрії. Для ідентифікації всіх основних імунних популяцій та субпопуляцій була розроблена 26-кольорова панель для проточної цитофлуориметрії [43]. Мієлоїдні маркери використані для ідентифікації нейтрофілів, класичних, некласичних та проміжних моноцитів, та антигенпрезентуючих клітин. За допомогою стратегії гейтингу для лімфоцитів були визначені наступні лімфоїдні популяції: В-клітини, CD4⁺ Т-клітини, CD8⁺ Т-клітини, NKT-клітини, NK-клітини, MAIT-клітини, наївні Т-клітини, активовані Т-клітини, Т-регуляторні клітини, Т-клітини пам'яті та інші.

3.1.1 Стратегія гейтингу для ідентифікації мієлоїдних клітинних популяцій

На Рис. 3.1. показана стратегія гейтингу для визначення підмножин мієлоїдних клітин. Відсотки вказують на відносні частоти серед усіх CD45⁺ клітин для визначення загальної кількості CD45⁺ клітин. Після вилучення дублетів і мертвих клітин (CD45-негативних) мієлоїдна популяція визначалася за вищими параметрами прямого (FSC) і бокового (SSC) розсіювання, що дорівнює більшому розміру і вищій гранулярності. Лімфоцити були вилучені з живих CD45⁺ лейкоцитів за допомогою

гейтингу на CD3- CD19-. Нейтрофіли були ідентифіковані як CD66b+ CD56-, а популяція негранулоцитів була визначена як CD66- CD56-. Решта популяції CD66b- включає різні підтипи моноцитів і дендритних клітин. Моноцити розділені на три підгрупи на основі рівня експресії CD14 і CD16. Класичні моноцити були визначені як CD14+ CD16+, неklasичні моноцити як CD14- CD16+ і проміжні моноцити як CD14+ CD16++. Антигенпрезентуючі клітини були відокремлені від CD14- CD16- клітин і визначені як HLA-DR+. HLA-DR+ клітини складаються з гетерогенних популяцій, включаючи дендритні клітини.

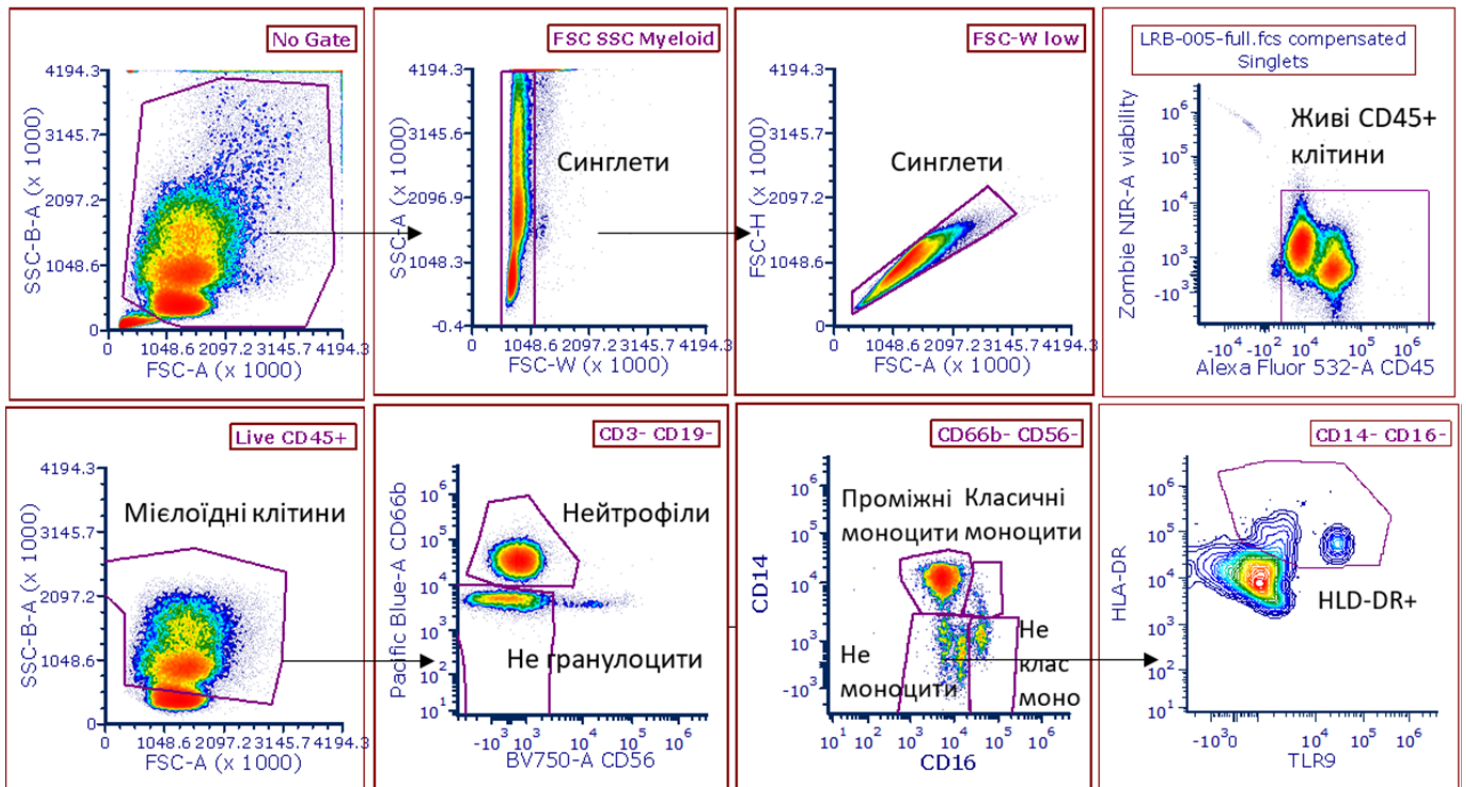


Рис. 3.1. Стратегія гейтингу для ідентифікації міелоїдних клітинних популяцій

3.1.2 Стратегія гейтингу для ідентифікації лімфоїдних клітинних популяцій

На Рис. 3.2. показана стратегія гейтингу для підмножин лімфоцитів. Відсотки вказують на відносну частоту серед усіх CD45+ клітин для стратегії гейтингу для визначення загальної кількості CD45+ клітин. Після гейтингу на клітинах з низьким рівнем SSC, вилучення дублетів і мертвих клітин та ідентифікації живих CD45+ клітин, В-клітини були ідентифіковані як CD19+, NK-клітини як CD56+ CD3-, NKT-клітини як CD56+ CD3+ і Т-клітини як CD56- CD3+. NK-клітини були надалі підрозділені на основі рівня експресії CD56 на CD56bright NK-клітини (CD56high CD16low) і CD56dim NK-клітини (CD56low CD16high). Серед усіх Т-клітин (CD3+, CD56-) були визначені дві популяції на основі експресії варіанту Т-клітинного рецептора: звичайні Т-клітини як CD3+ TCRVa7.2- і МАІТ-клітини як подвійно позитивні для CD3+ і TCR Va7.2. МАІТ-клітини або інваріантні Т-клітини, асоційовані зі слизовими оболонками, - це підгрупа Т-лімфоцитів, які проявляють вроджені ефекторні властивості і представляють незначну популяцію в крові людини. CD3+ Т-клітини поділяються на CD4+ Т-клітини та CD8+ Т-клітини. Серед CD4+ Т-клітин були виділені наступні субпопуляції на основі рівнів експресії рецепторів IL-7 CD127 та IL-2 CD25. Наївні CD4+ Т-клітини є CD127- CD25-, Т-регуляторні клітини є подвійно негативними за CD127 CD25, а активовані Т-клітини є подвійно позитивними за CD127 CD25. Крім того, CD4+ Т-клітини були проаналізовані на експресію CD45RO - ізоформи CD45, щоб розрізнити функціонально відмінну підгрупу CD4+ Т-клітин пам'яті, які мають високий рівень експресії CD45RO+.

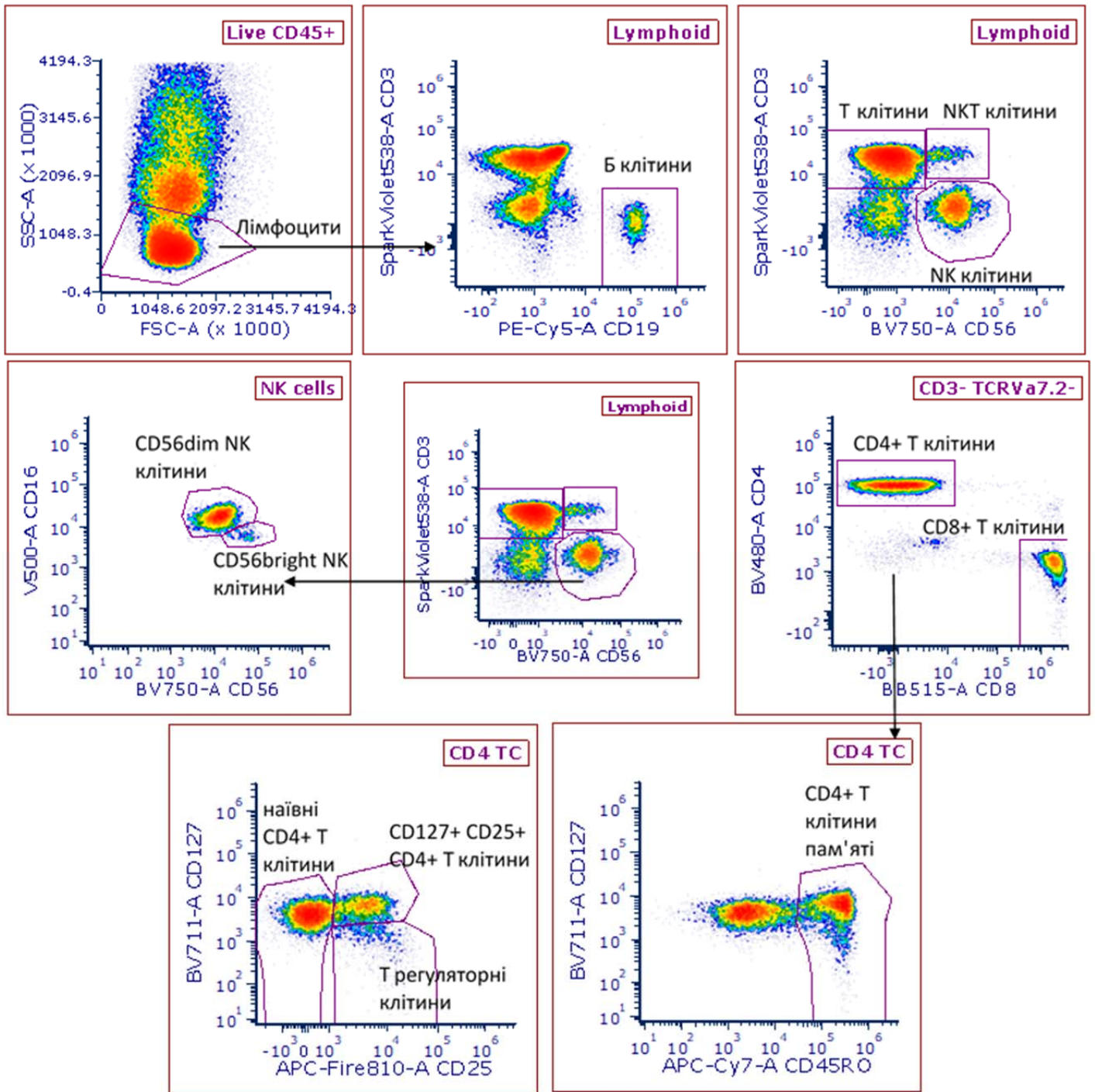


Рис. 3.2. Стратегія гейтингу для ідентифікації лімфоїдних клітинних популяцій

Після основної стратегії гейтингу кожен ідентифіковану популяцію імунних клітин було проаналізовано на рівень експресії імунних маркерів, що становлять найбільший інтерес, зокрема, Toll-подібні рецептори.

3.2 Зниження кількості циркулюючих імунних клітин у крові пацієнтів з MASLD і MASH

Стеатогепатит, асоційований з метаболічною дисфункцією (MASH) характеризується вираженим хронічним запальним процесом у печінці порівняно з простим стеатозом, що спостерігається при метаболічній жировій хворобі печінки (MASLD). Аналіз даних проточної цитометрії циркулюючих імунних клітин крові пацієнтів з MASLD та MASH показав зниження абсолютної кількості загальних лейкоцитів крові (CD45+) у пацієнтів з MASH. У когорті MASLD помітних змін не виявлено (Рис. 3.3). Одним із пояснень є залучення циркулюючих імунних клітин до печінки через різні прозапальні цитокіни та хемокіни, що виділяються при гепатоцитарному запаленні [53].

Порівняльний аналіз абсолютної кількості загальних циркулюючих імунних клітин (клітин/мл) та відсотку CD45+ клітин не виявив достовірних відмінностей для міелоїдних підгруп (Рис. 3.3), але показав диференційоване зниження лімфоїдних підгруп (Рис. 3.4) у когортах із захворюваннями печінки у порівнянні зі здоровим контролем. Кількість CD4+ і CD8+ Т-лімфоцитів знижена в обох когортах MASLD і MASH порівняно зі здоровими особами.

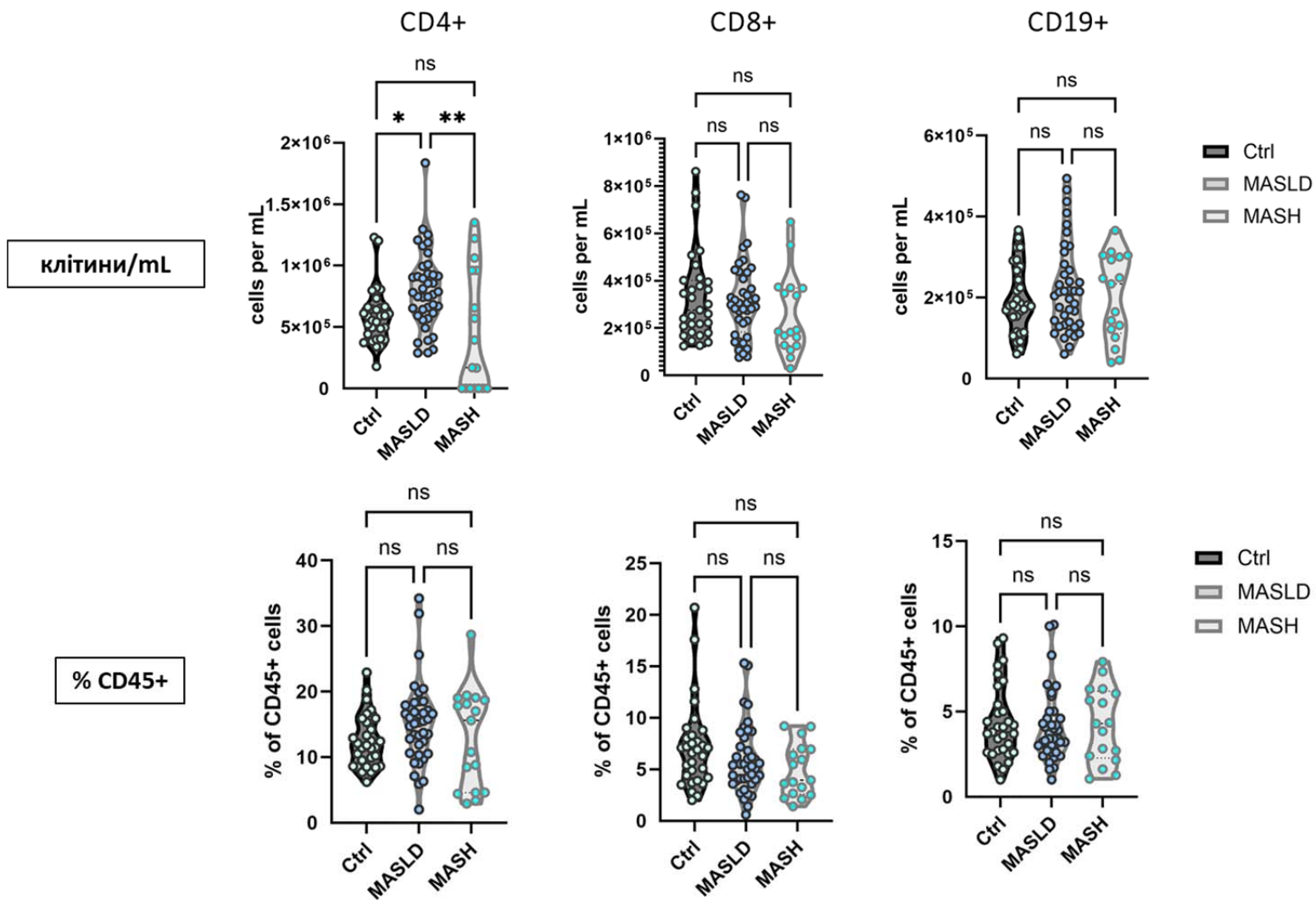


Рис.3.4. Абсолютна кількість та % CD45+ для лімфоїних клітин наведені для здорових осіб контрольної групи та когорт MASLD і MASH.

3.3 Кореляційна матриця імунних маркерів

Усі маркери, що представляють інтерес (Табл. 2.5), були проаналізовані за допомогою кореляційного тесту Спірмена r . Дані були представлені у вигляді теплової карти кореляційної матриці. Коефіцієнт кореляції Спірмена r вимірює, чи збільшується/зменшується одна змінна в залежності від іншої, в тому числі й тоді, коли зв'язок між двома змінними не є лінійним. Для того, щоб побачити, які результати є статистично

значущими, було створено таблицю р-значень. На рис. 3.4. показана зворотна кореляція між TLR5 і PD-1, а саме: коли експресія TLR5 підвищується, спостерігається зниження експресії PD-1. Аналіз показав, що TLR2 має прямий зв'язок з CrIg, Dectin з CrIg та TLR9 з Dectin – тобто підвищення або зниження їх експресії корелює між собою. Зокрема, дані свідчать про прямий зв'язок між TLR9 і PDL-1, що є відповідним до літератури, де TLR9 сприяє транскрипції PD-L1 шляхом збільшення фосфорилування STAT3 Tyr705 [48] та призводить до зниження експресії PD-L1 у наслідок зниження регуляції TLR9. Отже, зниження регуляції імунного чекпойнту PDL-1 і підвищення експресії PD-1 зі збільшенням відсотка CD8 Т-клітин призводить до активації ефektorних Т-клітин і їх можливого рекрутингу в печінку, де вони сприяють запальній реакції.

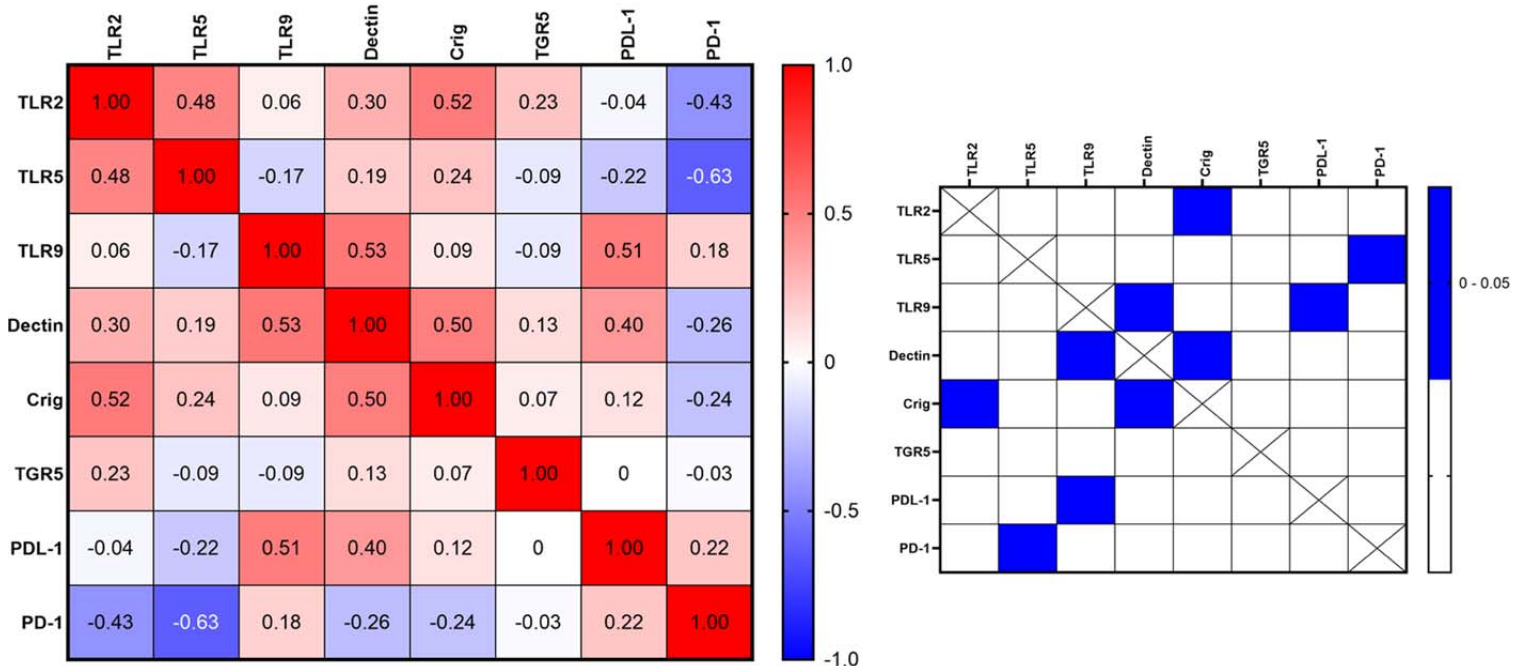


Рис. 3.4. Малюнок зліва: Теплова карта, що відображає експресію декількох маркерів, включаючи TLRs, імунні чекпойнти та рецептор жовчних кислот TGR5 у класичних моноцитах (CD14+, CD16-) з крові пацієнтів з MASH. Червоний колір = пряма кореляція, синій колір =

зворотня кореляція. *Малюнок праворуч*: матриця з р-значеннями з кореляційної матриці Спірмана. Синій колір вказує на статистичну значущість (р-значення <0,05)

3.1 Рівень експресії PRR варіюється між когортами MASLD, MASH та здоровим контролем

3.1.1 Toll-подібні рецептори 2 та 5 демонструють підвищений рівень експресії в мієлоїдних клітинних популяціях пацієнтів з MASLD та MASH

Отримані дані вказують на підвищену експресію TLR2 на класичних моноцитах, некласичних моноцитах і нейтрофілах як у когорті MASLD, так і MASH порівняно зі здоровими особами. Посилення регуляції більш виражене на некласичних моноцитах у пацієнтів з MASH (Рис. 3.6.). Це спостереження узгоджується з результатами попередніх досліджень наявних у літературі [10, 20]. TLR5 демонструє підвищену регуляцію на класичних моноцитах як в когорті MASLD, так і в когорті MASH порівняно зі здоровими особами. Однак для некласичних моноцитів спостерігається тенденція до зниження регуляції при MASLD порівняно зі здоровим контролем та підвищення регуляції на пізніх стадіях захворювання. Причиною цього може бути специфіка лікування пацієнта та стадія фіброзу.

Kruskal-Wallis & Dunn's multiple comparison test; * p < 0,05 ** p < 0.01 *** p < 0.001 **** p < 0.0001

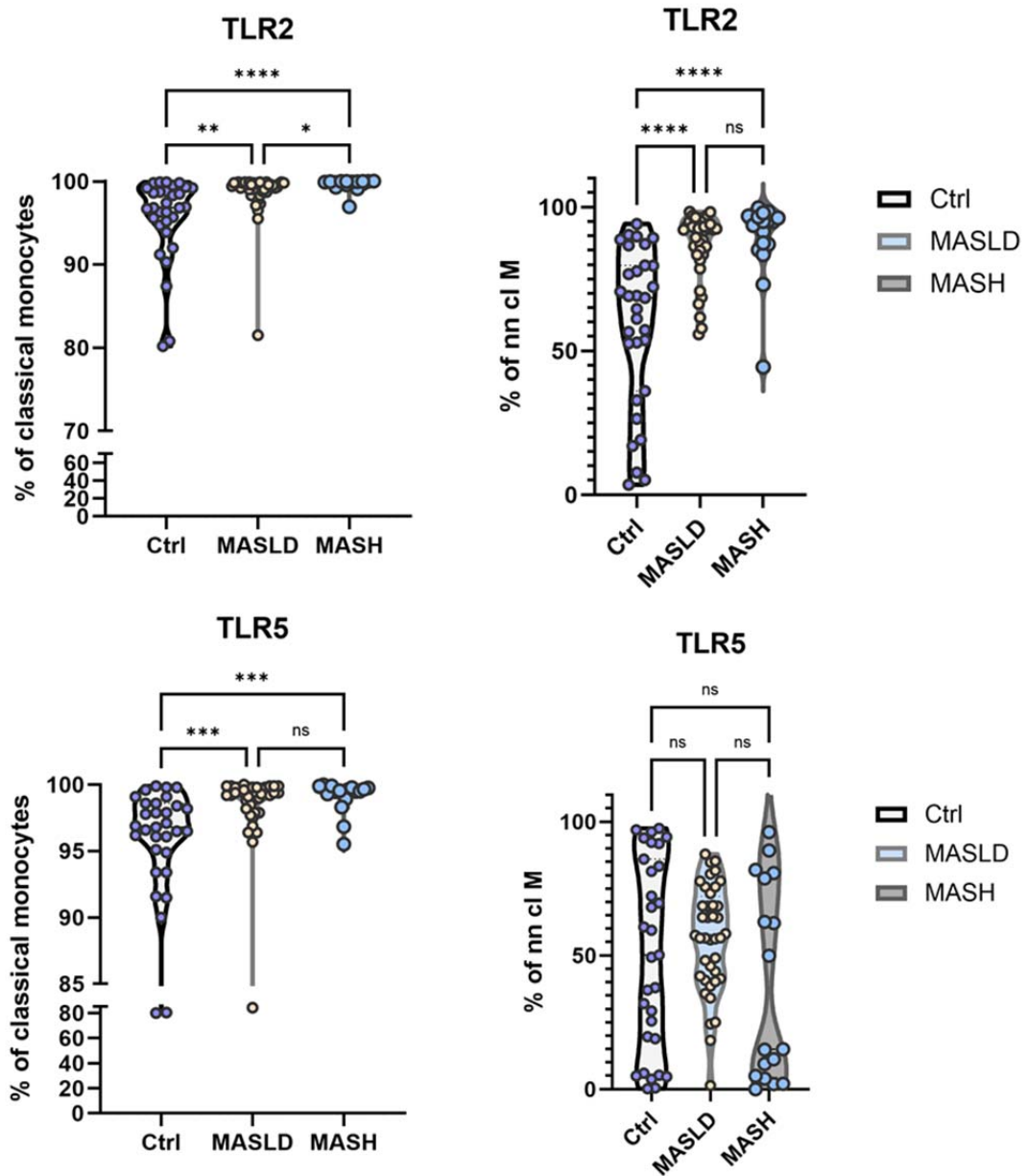


Рис.3.6. Відсоток експресії TLR2 та TLR5 на класичних (CD14+; CD16+) та некласичних (CD14-, CD16+) моноцитах для здорового контролю (Ctrl) та когорт MASLD та MASH

3.1.2 Патерн-розпізнавальний рецептор β -глюканів патогенних грибів Dectin-1 гіперекспресується в MASLD та MASH

Попередні клінічні дослідження показали кореляцію між посиленням регуляції Dectin-1 та прогресуванням MASLD [32]. Отримані дані підтверджують це і демонструють значне підвищення експресії Dectin-1 на класичних і некласичних підмножинах моноцитів як у пацієнтів з MASLD, так і з MASH у порівнянні зі здоровими особами.

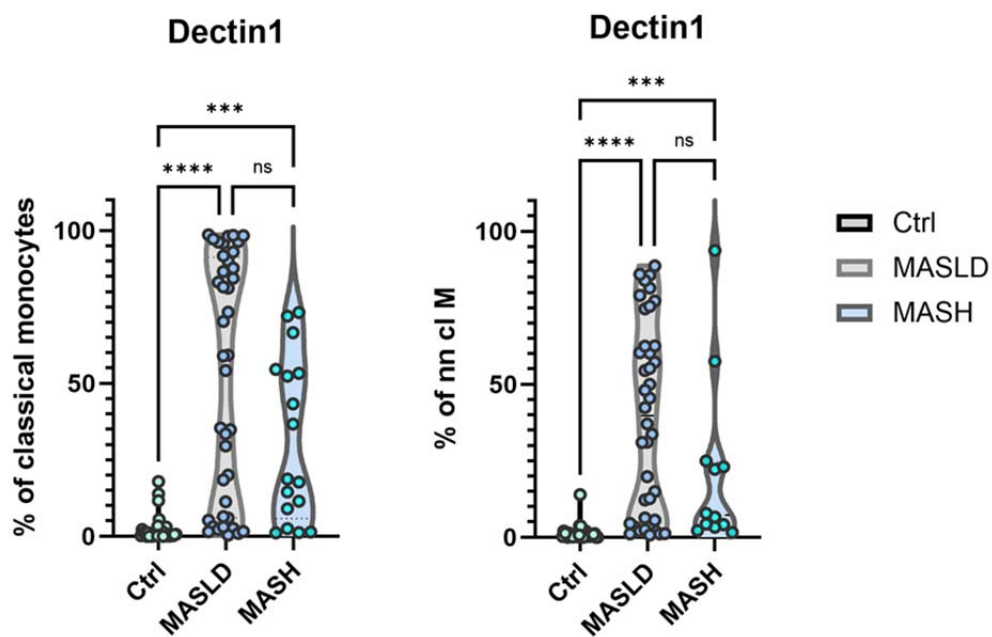


Рис. 3.7. Відсоток експресії Dectin1 на класичних (CD14+; CD16+) та некласичних (CD14-, CD16+) моноцитах для здорового контролю (Ctrl) та когорт MASLD та MASH.

3.1.3 Посилення регуляції GRIg та TGR5 у пацієнтів з MASLD супроводжується підвищеною експресією в пацієнтів з MASH

Рецептор комплементу суперсімейства імуноглобулінів, GRIg, демонструє підвищену експресію на класичних моноцитах, некласичних моноцитах і нейтрофілах у когортах хворих порівняно зі здоровими особами. На відміну від пацієнтів з MASLD, пацієнти з MASH демонструють більш виражену підвищену регуляцію CRIG, що можна пояснити попередньо спостереженою зворотною кореляцією між експресією TLR9 та Grig у когорті MASLD, яка посилюється з прогресуванням захворювання.

G-білок-зв'язаний рецептор жовчних кислот TGR5 демонструє значну підвищену регуляцію на нейтрофілах у когорті MASLD, що супроводжується збільшеною експресією у пацієнтів з MASH. У підгрупах моноцитів некласичні моноцити демонструють подібну закономірність, тоді як класичні моноцити не виявляють значних змін в експресії TGR5. Це може бути пов'язано зі зміною складу жовчних кислот на пізніх стадіях захворювання печінки [5].

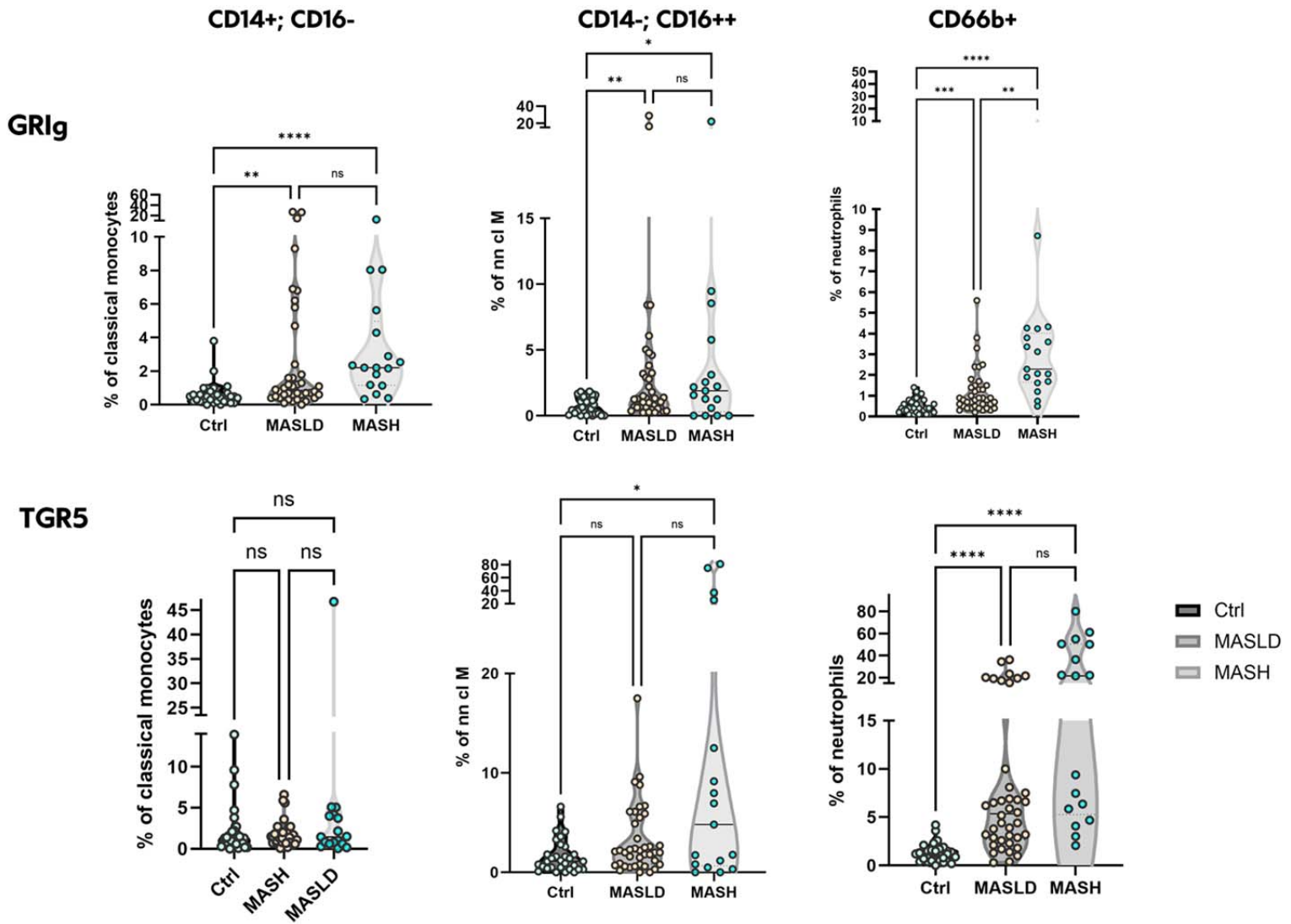


Рис.3.7. Відсоток експресії GRIg та TGR5 на класичних (CD14+; CD16+) та некласичних (CD14-, CD16+) моноцитах та нейтрофілах (CD56-, CD66b+) для здорового контролю (Ctrl) та когорт MASLD та MASH.

3.2 Toll-подібний рецептор 9

3.2.1 Дослідження внутрішньоклітинної або поверхневої експресії Toll-подібного рецептора 9 на всіх популяціях імунних клітин за умов метаболічних захворювань печінки

Toll-подібний рецептор 9 – це внутрішньоклітинний рецептор, який переважно експресується на мембрані ендоплазматичного ретикулуму, де він розпізнає CpG-ДНК або мікробні ДНК-вмісні структури. Раніше було встановлено, що клітини з поверхневою експресією становлять незначну частку від загальної кількості клітинних популяцій, яка варіює від 2% до 10% [50]. Транслокація на клітинну поверхню може відбуватися внаслідок активації клітин або у відповідь на запальні стимули. Оскільки MASH є метаболічним захворюванням печінки, що характеризується запальним профілем, було важливо підтвердити внутрішньоклітинну локалізацію TLR9 у підмножинах досліджуваних клітин. Локалізація TLR9 була визначена в інфільтруючих імунних клітинах пацієнтів з MASH. Результати демонструють превалювання внутрішньоклітинної експресії в основних імунних популяціях (Рис. 3.8.). Однак HLA-DR+ антигенпрезентуючі клітини виявили високу поверхневу експресію у 22%. Даний результат узгоджується з даними в літературі для мононуклеарних клітин периферичної крові (PBMC) здорових людей, де більшість поверхневих TLR9+ клітин становили MHC-II+ CD19-антигенпрезентуючі клітини [50].

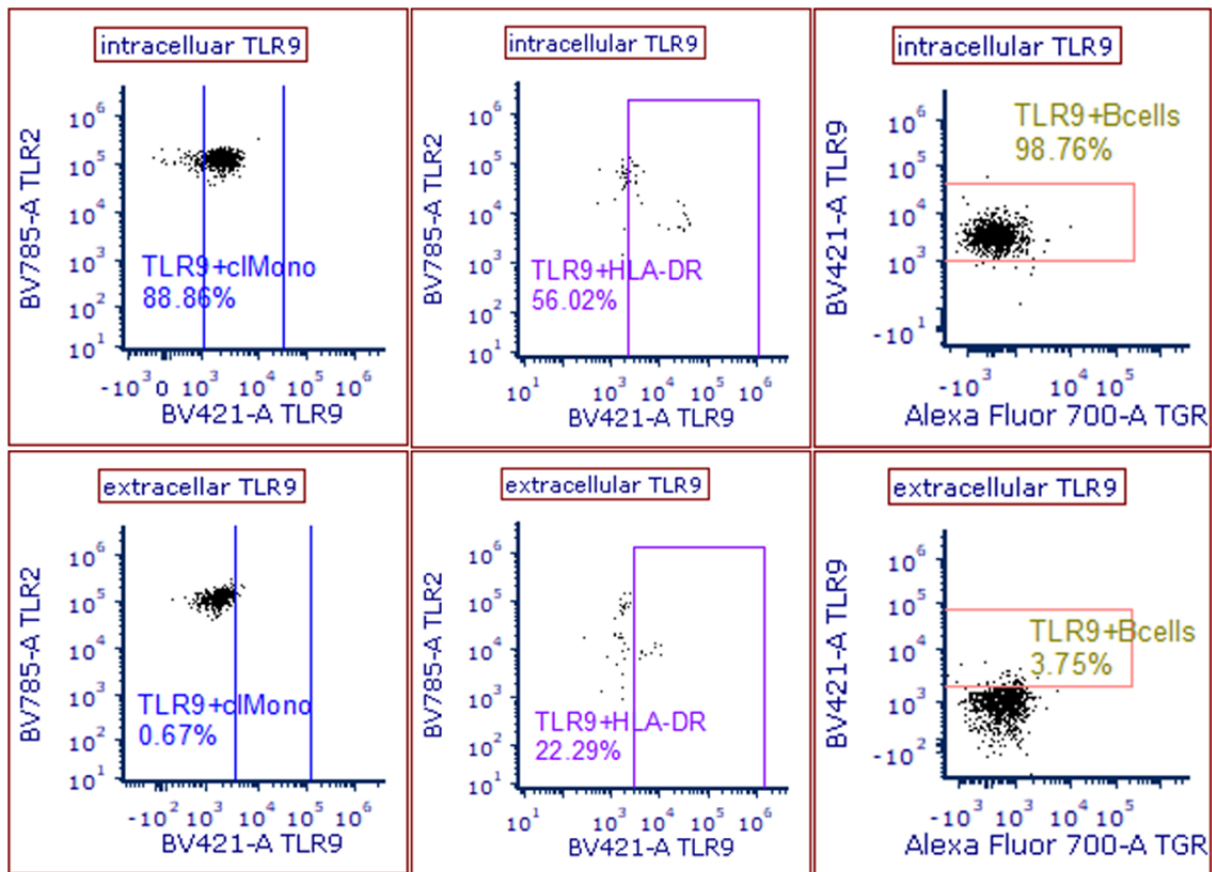
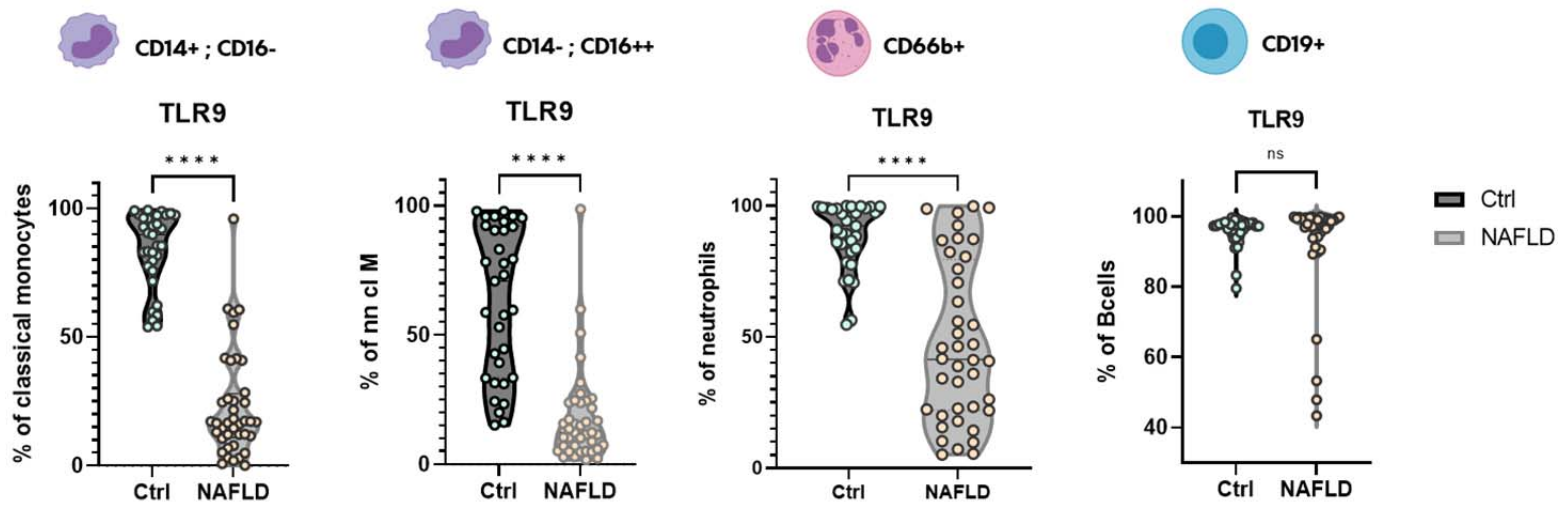


Рис.3.8. Аналіз внутрішньоклітинної та поверхневої експресії TLR9 на різних популяціях імунних клітин, виділених з крові пацієнта з MASH, методом проточної цитофлуориметрії. Цифри на графіках вказують на відсоток позитивного сигналу TLR9+ гейтах

3.2.2 Toll-подібний рецептор 9 є потенційною новою діагностичною мішенню для MASLD та MASH

До початку дисертаційної роботи було проведено рекрутування та аналіз когорти пацієнтів з MASLD та контрольної групи. Отримані дані вказують на зниження регуляції TLR9 на білковому рівні в крові пацієнтів з MASLD (n=40) порівняно зі здоровими донорами (n=34), що спостерігається лише в міелоїдних клітинних популяціях (Рис. 3.9). У рамках дисертаційного проекту було проведено рекрутинг та аналіз

пацієнтів з MASH з пізньою стадією фіброзу печінки (F=3-4), що визначалася за допомогою фіброскану (>15). Імунне фенотипування зразків пацієнтів було проведено з використанням 26-кольорової панелі проточної цитофлуориметрії (Табл. 2.5) для характеристики імунного профілю та визначення того, чи збігаються результати знижено регуляції TLR9 у пацієнтів з прогресуючою стадією захворювання. Гіпотеза полягає в тому, що активація TLR9 може відігравати превентивну роль у розвитку запалення та фіброзу печінки. Підтвердження цієї гіпотези відкриє перспективи використання TLR9 як новітнього діагностичного біомаркери для MASLD та MASH в клінічній практиці.



Mann Whitney; * p < 0,05 ** p < 0.01 *** p < 0.001 **** p < 0.0001

Рис.3.9. Відсоток експресії TLR9 у класичних моноцитах (CD14+; CD16-), некласичних моноцитах (CD14-; CD16+), нейтрофілах (CD56-; CD66b+) та В-клітинах (CD3-; CD19+) показано для пацієнтів з MASLD порівняно зі здоровим контролем (Ctrl).

3.2.3 TLR9 демонструє значне зниження регуляції у крові пацієнтів з MASLD

За допомогою проточної цитофлуориметрії було виявлено рівень експресії паттерн-розпізнавальних рецепторів на циркулюючих імунних клітинах, виділених з крові здорових осіб та пацієнтів з MASLD. Класичні моноцити (CD14+; CD16-), некласичні моноцити (CD14-; CD16+) та нейтрофіли (CD66b+) демонструють сильне зниження рівня експресії TLR9 у групі хворих на MASLD порівняно зі здоровими особами. В-лімфоцити як антигенпрезентуючі клітини лімфоїдної підгрупи не показали зниження експресії TLR9. Тому В-лімфоцити були використані як внутрішній контроль для оцінки змін в експресії рецептора.

3.2.4 У когорті пацієнтів з MASH виявлено консервативний патерн зниження регуляції TLR9 у мієлоїдних популяціях

Для перевірки гіпотези про те, що TLR9 може слугувати потенційною діагностичною мішенню для MASLD, було проаналізовано когорту пацієнтів з прогресуючою формою захворювання для дослідження рівня експресії TLR9. Гіпотеза була підтверджена спостереженням збереження патерну сильного зниження експресії TLR9 на мієлоїдних підмножинах пацієнтів з MASH (Рис. 3.10). Цікаво, що у деяких пацієнтів спостерігався зсув експресії TLR9 на В-лімфоцитах з тенденцією до зниження регуляції. Щоб дослідити, чи може це бути наслідком транслокації рецептора на клітинну поверхню при активації В-клітин у запальному середовищі стеатогепатиту, було проведено поверхневе забарвлення TLR9. Результати показали, що зсуву поверхневої експресії не відбулося (Рис. 3.8). Для подальшого дослідження цього питання можна провести експеримент *in vitro*, в якому В-клітини, виділені з мононуклеарних клітин периферичної крові пацієнта з MASH,

стимулюють агоністом TLR9, неметильованою бактеріальною CpG ДНК. Це дозволить визначити, чи В-клітини з меншою експресією TLR9 втрачають чи зберігають активність TLR9.

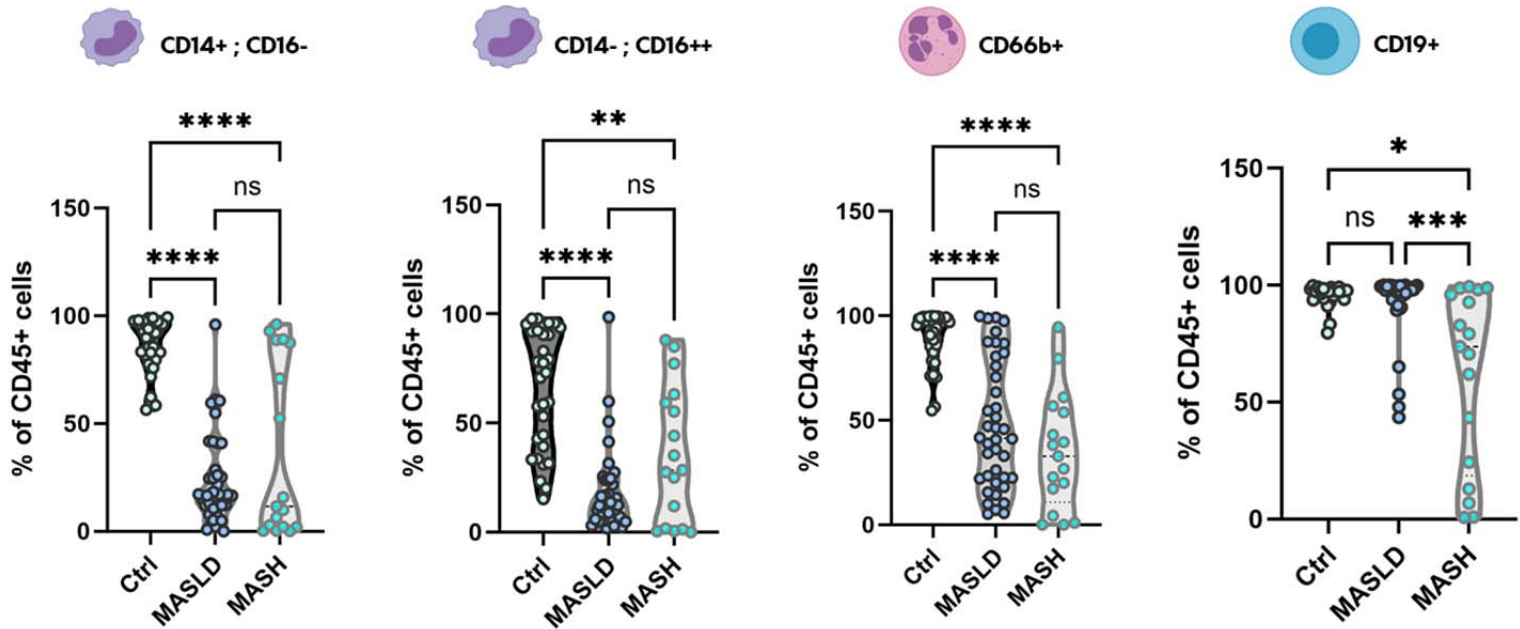


Рис.3.10. Збережена тенденція до сильної зниженої регуляції TLR9 у когорті пацієнтів з MASH у всіх міелоїдних популяціях, але не у В-клітинах.

3.2.5 Перспективи подальших досліджень ролі TLR9 у прогресії захворювань печінки

Подальший розвиток проекту передбачає детальну характеристику імунного мікрооточення та рівня гепатоцитарної експресії TLR9 у зразках печінки пацієнтів з MASLD після резекції за допомогою методу флуоресцентної мікроскопії. Метою є ідентифікація можливих змін у рівні експресії імунних маркерів, клітинної локалізації та типу імунних клітин, що рекрутовані до печінки. Також було зібрано та збережено сироватку крові пацієнтів для подальшого використання з метою визначення кореляції між наявністю мітохондріальної та неметильованої бактеріальної

або вірусної CpG ДНК і експресією TLR9 в імунних клітинах. *In vitro* експерименти будуть проведені з використанням імунних клітин, ізольованих зі зразків крові пацієнтів з MASLD та MASH, з додаванням ліганду TLR9 та LPS для активації імунної відповіді. Це дозволить визначити конкретні фактори активації та секретовані цитокіни, що відіграють ключову роль у патофізіологічному процесі.

ВИСНОВКИ

1. У цьому дослідженні імунне мікрооточення пацієнтів з жировою хворобою печінки (MASLD) та стеатогепатитом (MASH), асоційованими з метаболічним порушенням, було охарактеризовано за допомогою методу повноспектральної проточної цитофлуориметрії: ідентифіковано різні популяції мієлоїдних та лімфоїдних клітин та проаналізовано рівень експресії імунних маркерів, що відіграють ключову роль у взаємодії кишечника та печінки.
2. Отримані дані демонструють зміни в рівні експресії патерн-розпізнавальних рецепторів (PRR) між групами хворих на MASLD та MASH та здорових осіб. Виявлено, що Toll-подібні рецептори 2 і 5, а також Dectin-1 і CriG підвищені в популяціях мієлоїдних клітин у пацієнтів з MASLD і MASH, що пов'язано з впливом дисбактеріозу кишечника на прогресування захворювань печінки.
3. Результати демонструють сильне зниження регуляції Toll-подібного рецептора 9 когорті MASLD порівняно зі здоровим контролем, що зберігається на прогресуючій стадії захворювання. Тож, представлені результати є вагомим внеском у дослідження паталогій печінки, що потенційно може змінити уявлення про роль TLR9 у прогресуванні гепатоцитарних захворювань та запропонувати новий клінічний біомаркер для діагностики асоційованої з метаболічною дисфункцією стеатотичної хвороби печінки.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Geier A, Rinella ME, Balp MM, McKenna SJ, Brass CA, Przybysz R, Cai J, Knight A, Gavaghan M, Howe T, Rosen D, Ratziu V. Real-World Burden of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2021 May;19(5):1020-1029.e7. doi: 10.1016/j.cgh.2020.06.064. Epub 2020 Jul 4. PMID: 32634622.
2. Povsic M, Wong OY, Perry R, Bottomley J. A Structured Literature Review of the Epidemiology and Disease Burden of Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Adv Ther*. 2019 Jul;36(7):1574-1594. doi: 10.1007/s12325-019-00960-3. Epub 2019 May 7. PMID: 31065991; PMCID: PMC6824389.
3. Notarnicola M, Osella AR, Caruso MG, Pesole PL, Lippolis A, Tutino V, Bonfiglio C, De Nunzio V, Scavo MP, Mirizzi A, Franco I, Lippolis T, D'Alessandro R, Refolo MG, Messa C. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Focus on New Biomarkers and Lifestyle Interventions. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 9;22(8):3899. doi: 10.3390/ijms22083899. PMID: 33918878; PMCID: PMC8069944.
4. Leung H, Long X, Ni Y, Qian L, Nychas E, Siliceo SL, Pohl D, Hanhineva K, Liu Y, Xu A, Nielsen HB, Belda E, Clément K, Loomba R, Li H, Jia W, Panagiotou G. Risk assessment with gut microbiome and metabolite markers in NAFLD development. *Sci Transl Med*. 2022 Jun 8;14(648):eabk0855. doi: 10.1126/scitranslmed.abk0855. Epub 2022 Jun 8. PMID: 35675435; PMCID: PMC9746350.
5. Fang J, Yu CH, Li XJ, Yao JM, Fang ZY, Yoon SH, Yu WY. Gut dysbiosis in nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis, diagnosis, and therapeutic implications. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Nov

- 8;12:997018. doi: 10.3389/fcimb.2022.997018. PMID: 36425787; PMCID: PMC9679376.
6. Wu J, Meng Z, Jiang M, Zhang E, Trippler M, Broering R, Bucchi A, Krux F, Dittmer U, Yang D, Roggendorf M, Gerken G, Lu M, Schlaak JF. Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific. *Immunology*. 2010 Mar;129(3):363-74. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03179.x. Epub 2009 Nov 16. PMID: 19922426; PMCID: PMC2826681.
 7. Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*. 2020 Mar 19;180(6):1044-1066. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.041. Epub 2020 Mar 11. PMID: 32164908; PMCID: PMC9358771.
 8. Wu J, Meng Z, Jiang M, Zhang E, Trippler M, Broering R, Bucchi A, Krux F, Dittmer U, Yang D, Roggendorf M, Gerken G, Lu M, Schlaak JF. Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific. *Immunology*. 2010 Mar;129(3):363-74. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03179.x. Epub 2009 Nov 16. PMID: 19922426; PMCID: PMC2826681.
 9. Chiu CC, Ching YH, Li YP, Liu JY, Huang YT, Huang YW, Yang SS, Huang WC, Chuang HL. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Exacerbated in High-Fat Diet-Fed Gnotobiotic Mice by Colonization with the Gut Microbiota from Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Nutrients*. 2017 Nov 6;9(11):1220. doi: 10.3390/nu9111220. PMID: 29113135; PMCID: PMC5707692.
 10. Miura K, Ohnishi H. Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014 Jun

- 21;20(23):7381-91. doi: 10.3748/wjg.v20.i23.7381. PMID: 24966608; PMCID: PMC4064083.
11. Chiu CC, Ching YH, Li YP, Liu JY, Huang YT, Huang YW, Yang SS, Huang WC, Chuang HL. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Exacerbated in High-Fat Diet-Fed Gnotobiotic Mice by Colonization with the Gut Microbiota from Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Nutrients*. 2017 Nov 6;9(11):1220. doi: 10.3390/nu9111220. PMID: 29113135; PMCID: PMC5707692.
 12. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014 Oct 21;20(39):14205-18. doi: 10.3748/wjg.v20.i39.14205. PMID: 25339807; PMCID: PMC4202349.
 13. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010 May;11(5):373-84. doi: 10.1038/ni.1863. Epub 2010 Apr 20. PMID: 20404851.
 14. Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, Schnabl B, Aoyama T, Ohnishi H, Olefsky JM, Brenner DA, Seki E. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology*. 2010 Jul;139(1):323-34.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2010.03.052. Epub 2010 Mar 27. PMID: 20347818; PMCID: PMC4631262.
 15. Francés R, Zapater P, González-Navajas JM, Muñoz C, Caño R, Moreu R, Pascual S, Bellot P, Pérez-Mateo M, Such J. Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis.

- Hepatology. 2008 Mar;47(3):978-85. doi: 10.1002/hep.22083. PMID: 18306221.
16. Mridha AR, Haczeyni F, Yeh MM, Haigh WG, Ioannou GN, Barn V, Ajamieh H, Adams L, Hamdorf JM, Teoh NC, Farrell GC. TLR9 is up-regulated in human and murine NASH: pivotal role in inflammatory recruitment and cell survival. *Clin Sci (Lond)*. 2017 Jul 24;131(16):2145-2159. doi: 10.1042/CS20160838. PMID: 28687713.
 17. Imaeda AB, Watanabe A, Sohail MA, Mahmood S, Mohamadnejad M, Sutterwala FS, Flavell RA, Mehal WZ. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J Clin Invest*. 2009 Feb;119(2):305-14. doi: 10.1172/JCI35958. Epub 2009 Jan 26. PMID: 19164858; PMCID: PMC2631294.
 18. Hong CP, Yun CH, Lee GW, Park A, Kim YM, Jang MH. TLR9 regulates adipose tissue inflammation and obesity-related metabolic disorders. *Obesity (Silver Spring)*. 2015 Nov;23(11):2199-206. doi: 10.1002/oby.21215. Epub 2015 Aug 11. PMID: 26260403.
 19. Koulis C, Chen YC, Hausding C, Ahrens I, Kyaw TS, Tay C, Allen T, Jandeleit-Dahm K, Sweet MJ, Akira S, Bobik A, Peter K, Agrotis A. Protective role for Toll-like receptor-9 in the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Mar;34(3):516-25. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.302407. Epub 2014 Jan 16. PMID: 24436372.
 20. Bieghs V, Trautwein C. Innate immune signaling and gut-liver interactions in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2014 Dec;3(6):377-85. doi: 10.3978/j.issn.2304-3881.2014.12.04. PMID: 25568861; PMCID: PMC4273113.

21. Miura K, Yang L, van Rooijen N, Brenner DA, Ohnishi H, Seki E. Toll-like receptor 2 and palmitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation in mice. *Hepatology*. 2013 Feb;57(2):577-89. doi: 10.1002/hep.26081. PMID: 22987396; PMCID: PMC3566276.
22. Seki E, Brenner DA. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology*. 2008 Jul;48(1):322-35. doi: 10.1002/hep.22306. PMID: 18506843.
23. Pradere JP, Troeger JS, Dapito DH, Mencin AA, Schwabe RF. Toll-like receptor 4 and hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis*. 2010 Aug;30(3):232-44. doi: 10.1055/s-0030-1255353. Epub 2010 Jul 21. PMID: 20665376; PMCID: PMC4099360.
24. Cengiz M, Ozenirler S, Elbeg S. Role of serum toll-like receptors 2 and 4 in non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Jul;30(7):1190-6. doi: 10.1111/jgh.12924. PMID: 25684563.
25. Carpino G, Del Ben M, Pastori D, Carnevale R, Baratta F, Overi D, Francis H, Cardinale V, Onori P, Safarikia S, Cammisotto V, Alvaro D, Svegliati-Baroni G, Angelico F, Gaudio E, Violi F. Increased Liver Localization of Lipopolysaccharides in Human and Experimental NAFLD. *Hepatology*. 2020 Aug;72(2):470-485. doi: 10.1002/hep.31056. Epub 2020 May 22. PMID: 31808577.
26. Petrasek J, Mandrekar P, Szabo G. Toll-like receptors in the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Gastroenterol Res Pract*. 2010;2010:710381. doi: 10.1155/2010/710381. Epub 2010 Aug 17. PMID: 20827314; PMCID: PMC2933900.

27. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001 Apr 26;410(6832):1099-103. doi: 10.1038/35074106. PMID: 11323673.
28. Munukka E, Wiklund P, Partanen T, Välimäki S, Laakkonen EK, Lehti M, Fischer-Posovzsky P, Wabitsch M, Cheng S, Huovinen P, Pekkala S. Adipocytes as a Link Between Gut Microbiota-Derived Flagellin and Hepatocyte Fat Accumulation. *PLoS One*. 2016 Apr 1;11(4):e0152786. doi: 10.1371/journal.pone.0152786. Erratum in: *PLoS One*. 2016;11(6):e0157254. PMID: 27035341; PMCID: PMC4817958.
29. Singh V, Chassaing B, Zhang L, San Yeoh B, Xiao X, Kumar M, Baker MT, Cai J, Walker R, Borkowski K, Harvatine KJ, Singh N, Shearer GC, Ntambi JM, Joe B, Patterson AD, Gewirtz AT, Vijay-Kumar M. Microbiota-Dependent Hepatic Lipogenesis Mediated by Stearoyl CoA Desaturase 1 (SCD1) Promotes Metabolic Syndrome in TLR5-Deficient Mice. *Cell Metab*. 2015 Dec 1;22(6):983-96. doi: 10.1016/j.cmet.2015.09.028. Epub 2015 Oct 29. PMID: 26525535; PMCID: PMC4670569.
30. Etienne-Mesmin L, Vijay-Kumar M, Gewirtz AT, Chassaing B. Hepatocyte Toll-Like Receptor 5 Promotes Bacterial Clearance and Protects Mice Against High-Fat Diet-Induced Liver Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2016 May 5;2(5):584-604. doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.04.007. PMID: 28090564; PMCID: PMC5042709.
31. Brown GD. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jan;6(1):33-43. doi: 10.1038/nri1745. PMID: 16341139.

32. Wang MX, Luo W, Ye L, Jin LM, Yang B, Zhang QH, Qian JC, Wang Y, Zhang Y, Liang G. Dectin-1 plays a deleterious role in high fat diet-induced NAFLD of mice through enhancing macrophage activation. *Acta Pharmacol Sin.* 2023 Jan;44(1):120-132. doi: 10.1038/s41401-022-00926-2. Epub 2022 Jun 10. PMID: 35689091; PMCID: PMC9813252.
33. Seifert L, Deutsch M, Alothman S, Alqunaibit D, Werba G, Pansari M, Pergamo M, Ochi A, Torres-Hernandez A, Levie E, Tippens D, Greco SH, Tiwari S, Ly NNG, Eisenthal A, van Heerden E, Avanzi A, Barilla R, Zambirinis CP, Rendon M, Daley D, Pachter HL, Hajdu C, Miller G. Dectin-1 Regulates Hepatic Fibrosis and Hepatocarcinogenesis by Suppressing TLR4 Signaling Pathways. *Cell Rep.* 2015 Dec 1;13(9):1909-1921. doi: 10.1016/j.celrep.2015.10.058. Epub 2015 Nov 19. PMID: 26655905; PMCID: PMC4681001.
34. Duan Y, Chu H, Brandl K, Jiang L, Zeng S, Meshgin N, Papachristoforou E, Argemi J, Mendes BG, Wang Y, Su H, Sun W, Llorente C, Hendrikx T, Liu X, Hosseini M, Kisseleva T, Brenner DA, Bataller R, Ramachandran P, Karin M, Fu W, Schnabl B. CRIg on liver macrophages clears pathobionts and protects against alcoholic liver disease. *Nat Commun.* 2021 Dec 9;12(1):7172. doi: 10.1038/s41467-021-27385-3. PMID: 34887405; PMCID: PMC8660815.
35. de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab.* 2013 May 7;17(5):657-69. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.013. Epub 2013 Apr 18. PMID: 23602448; PMCID: PMC3654004.
36. Ferslew BC, Xie G, Johnston CK, Su M, Stewart PW, Jia W, Brouwer KL, Barritt AS 4th. Altered Bile Acid Metabolome in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Dig Dis Sci.* 2015 Nov;60(11):3318-28.

doi: 10.1007/s10620-015-3776-8. Epub 2015 Jul 3. PMID: 26138654; PMCID: PMC4864493.

37. Wang YD, Chen WD, Yu D, Forman BM, Huang W. The G-protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor κ light-chain enhancer of activated B cells (NF- κ B) in mice. *Hepatology*. 2011 Oct;54(4):1421-32. doi: 10.1002/hep.24525. Epub 2011 Aug 11. PMID: 21735468; PMCID: PMC3184183.
38. Leonhardt J, Haider RS, Sponholz C, Leonhardt S, Drube J, Spengler K, Mihaylov D, Neugebauer S, Kiehntopf M, Lambert NA, Kortgen A, Bruns T, Tacke F, Hoffmann C, Bauer M, Heller R. Circulating Bile Acids in Liver Failure Activate TGR5 and Induce Monocyte Dysfunction. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2021;12(1):25-40. doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.01.011. Epub 2021 Feb 2. PMID: 33545429; PMCID: PMC8082115.
39. Jiang Y, Chen M, Nie H, Yuan Y. PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations. *Hum Vaccin Immunother*. 2019;15(5):1111-1122. doi: 10.1080/21645515.2019.1571892. Epub 2019 Mar 19. PMID: 30888929; PMCID: PMC6605868.
40. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*. 2018 Mar;18(3):153-167. doi: 10.1038/nri.2017.108. Epub 2017 Nov 13. PMID: 28990585.
41. Kornepati AVR, Vadlamudi RK, Curiel TJ. Programmed death ligand 1 signals in cancer cells. *Nat Rev Cancer*. 2022 Mar;22(3):174-189. doi: 10.1038/s41568-021-00431-4. Epub 2022 Jan 14. Erratum in: *Nat Rev Cancer*. 2022 Jan 19;: PMID: 35031777; PMCID: PMC9989967.

42. Shevchenko Y, Lurje I, Tacke F, Hammerich L. Fluorochrome-dependent specific changes in spectral profiles using different compensation beads or primary cells in full spectrum cytometry. *Cytometry A*. 2024 Mar 21. doi: 10.1002/cyto.a.24836. Epub ahead of print. PMID: 38511720.
43. Hammerich L, Shevchenko Y, Knorr J, Werner W, Bruneau A, Tacke F. Resolving 31 colors on a standard 3-laser full spectrum flow cytometer for immune monitoring of human blood samples. *Cytometry B Clin Cytom*. 2023 Sep;104(5):367-373. doi: 10.1002/cyto.b.22126. Epub 2023 May 20. PMID: 37209003.
44. Massoud O, Charlton M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Clin Liver Dis*. 2018 Feb;22(1):201-211. doi: 10.1016/j.cld.2017.08.014. PMID: 29128057.
45. Song Q, Zhang X. The Role of Gut-Liver Axis in Gut Microbiome Dysbiosis Associated NAFLD and NAFLD-HCC. *Biomedicines*. 2022 Feb 23;10(3):524. doi: 10.3390/biomedicines10030524. PMID: 35327326; PMCID: PMC8945287.
46. van Lookeren Campagne M, Verschoor A. Pathogen clearance and immune adherence "revisited": Immuno-regulatory roles for CR1g. *Semin Immunol*. 2018 Jun;37:4-11. doi: 10.1016/j.smim.2018.02.007. Epub 2018 Mar 21. PMID: 29573978.
47. Wu HJ, Wu E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes*. 2012 Jan-Feb;3(1):4-14. doi: 10.4161/gmic.19320. Epub 2012 Jan 1. PMID: 22356853; PMCID: PMC3337124.
48. Zhou B, Yan J, Guo L, Zhang B, Liu S, Yu M, Chen Z, Zhang K, Zhang W, Li X, Xu Y, Xiao Y, Zhou J, Fan J, Hung MC, Li H, Ye Q. Hepatoma cell-intrinsic TLR9 activation induces immune escape through PD-L1

- upregulation in hepatocellular carcinoma. *Theranostics*. 2020 May 17;10(14):6530-6543. doi: 10.7150/thno.44417. PMID: 32483468; PMCID: PMC7255037.
49. Lombardi R, Piciotti R, Dongiovanni P, Meroni M, Fargion S, Fracanzani AL. PD-1/PD-L1 Immuno-Mediated Therapy in NAFLD: Advantages and Obstacles in the Treatment of Advanced Disease. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 28;23(5):2707. doi: 10.3390/ijms23052707. PMID: 35269846; PMCID: PMC8910930.
50. Eaton-Bassiri A, Dillon SB, Cunningham M, Ryczyn MA, Mills J, Sarisky RT, Mbow ML. Toll-Like Receptor 9 Can Be Expressed at the Cell Surface of Distinct Populations of Tonsils and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Infect Immun* 72: <https://doi.org/10.1128/iai.72.12.7202-7211.2004>
51. Gäbele E, Mühlbauer M, Dorn C, Weiss TS, Froh M, Schnabl B, Wiest R, Schölmerich J, Obermeier F, Hellerbrand C. Role of TLR9 in hepatic stellate cells and experimental liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Nov 14;376(2):271-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.08.096. Epub 2008 Aug 28. PMID: 18760996.
52. Chan Y, Walmsley RP. Learning and understanding the Kruskal-Wallis one-way analysis-of-variance-by-ranks test for differences among three or more independent groups. *Phys Ther*. 1997 Dec;77(12):1755-62. doi: 10.1093/ptj/77.12.1755. Erratum in: *Phys Ther* 1998 Mar;78(3):322. PMID: 9413454.
53. Guillot A, Kohlhepp MS, Bruneau A, Heymann F, Tacke F. Deciphering the Immune Microenvironment on A Single Archival Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Section by An Immediately Implementable Multiplex Fluorescence Immunostaining Protocol. *Cancers (Basel)*. 2020

Aug 28;12(9):2449. doi: 10.3390/cancers12092449. PMID: 32872334;
PMCID: PMC7565194.