

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

Інститут високих технологій

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

доц. Олексій Юрійович Нипорко

Протокол № _____ засідання кафедри

від “ _____ ” _____ 2021 р.

**ВАГОВІ ІНДЕКСИ ІМУННИХ ОРГАНІВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ
ТВАРИН З ПЕРЕЩЕПЛЕНОЮ КАРЦИНОМОЮ ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС ЗА
УМОВ ТЕРАПІЇ ФОТОЧУТЛИВИМИ ПЕПТИДОМІМЕТИКАМИ**

Випускна кваліфікаційна робота
студентки 4 курсу ОР «бакалавр»
Інституту високих технологій
спеціальності 091 «Біологія»

Володькіної Дарії Олександрівни

Науковий керівник, професор

Гарманчук Л.В.

Оцінка захисту роботи

РЕФЕРАТ

Обсяг роботи 45 сторінок, 10 рисунків, 73 використаних джерела.

Ключові слова: ВАГОВИЙ ІНДЕКС, ПУХЛИНА, КАРЦИНОМА ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС, ФОТОЧУТЛИВІ ПЕПТИДОМІМЕТИКИ, СЕЛЕЗІНКА, ТИМУС, ТЕРАПІЯ.

Перспектива ефективної імунотерапії для лікування раку стає клінічною реальністю. Фотодинамічна терапія на сьогодні широко використовується в різних схемах лікування. Гістофізіологічними, морфометричними, статистичними методами проаналізовано результати впливу фоточутливих пептидоміметиків на вагові показники імунних органів експериментальних тварин за різних умов терапії. Також визначено, за якої схеми терапії відбувається найбільший вплив на орган-мішень метастазування – легені.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ПК	–	пухлинні клітини;
NK	–	природні кілери;
MHC	–	головний комплекс гістосумісності;
ДК	–	дендритні клітини;
PAMPs	–	патоген-асоційовані молекулярні патерни;
TAM	–	асоційовані з пухлиною макрофаги;
МкП	–	мікрооточення пухлини;
IL	–	інтерлейкін;
M1,2	–	макрофаги першого і другого типів;
TNF	–	фактор некрозу пухлини;
IFN	–	інтерферон;
ПАА	–	пухлино-асоційовані агенти;
MMP	–	матричні металопротеїнази;
HMPЛ	–	форма раку легень;
АПК	–	антиген-презентуючі клітини;
Th	–	T-хелпери;
LLC	–	карцинома легені Льюїс;
ТК	–	тучні клітини.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1	8
ІМУННА СИСТЕМА ЗА ЗЛОЯКІСНОГО РОСТУ	8
1.1 Загальні риси злоякісних клітин.....	8
1.2 Карцинома легені Льюїс.....	9
1.3 Імунний нагляд.....	10
1.4 Механізми протипухлинного імунітету.....	11
1.4.1 Вроджений імунітет.....	11
1.4.2 Адаптивна імунна система.....	17
1.5 Вплив пухлинного росту на імунні органи	22
1.5.1 Тимус.....	22
1.5.2 Селезінка.....	23
РОЗДІЛ 2	24
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	24
2.1 Матеріали та обладнання	24
2.2 Фотоконтрольовані пептидоміметики	24
2.3 Перещеплена модель карциноми легені Льюїс.....	25
2.4 Експериментальні групи тварин, використані в дослідженнях	26
2.5 Визначення росту пухлин в динаміці та визначення ваги пухлин.....	27
2.6 Оцінка вагового індексу імунних органів	27
2.7 Статистичний аналіз	28
РОЗДІЛ 3	29
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ	29
3.1 Вагові показники первинної пухлини та легені мишей експериментальних груп	29
3.2 Порівняння вагового індексу імунних органів інтактних тварин та тварин-пухлиноносіїв	32
3.3 Дослідження впливу плацебо та препарату порівняння граміцидину С на імунні органи за пухлинного росту	33
3.3 Вагові індекси селезінки та тимусу у тварин з терапією LMB002	35
3.4 Вагові індекси селезінки та тимусу у тварин з терапією LMB033	36

ВИСНОВКИ.....	5
ВИКРИСТАНІ ДЖЕРЕЛА	38
ВИКРИСТАНІ ДЖЕРЕЛА	39

ВСТУП

Визначення механізмів патологічних станів полягає не лише в оцінці стану ушкодженого органу або системи, а й оцінці стану організму в цілому.

Неспроможність імунної системи відповідати на існуючу патологію залежить від багатьох факторів, в тому числі і змін в органах імунної системи. В експериментальних дослідженнях з використанням піддослідних тварин важливими є показники, які стосуються вагового індексу та клітинності таких потужних органів імунної системи як селезінка та тимус.

Саме тому за експериментально індукованих патологій оцінюють стан цих органів за їх системними показниками. Пухлинний ріст належить до найбільш прогресуючих патологій, і в першу чергу це залежить від імуносупресивного тиску на рівні організму та уникненні від імунного нагляду. Сучасна терапія новоутворень залежить від різних факторів, однак правильно підібрана схема основної та супровідної терапії може бути вирішальним фактором в лікуванні. Фотодинамічна терапія, яка модифікує лікарські засоби та поліпшує ефективність на сьогодні широко входить в різні схеми лікування. Важливими показниками, які оцінюються за даної патології, є визначення стану імунних органів.

Отже, **метою даного дослідження** було визначення вагових показників тимусу та селезінки у тварин з перещепленою карциномою легені Льюїс за умов фотодинамічної терапії чутливими пептидоміметиками – аналогами природного антибіотику грамїцидину С.

У завдання дослідження входило:

1. Оцінити ваговий індекс селезінки та тимусу в інтактних тварин та тварин з перещепленою карциномою легені Льюїс.
2. Визначити вагові показники імунних органів за терапії фоточутливими пептидоміметиками.

3. Провести порівняльний аналіз між показниками в контролі та дослідних групах.
4. Визначити співвідношення в показниках росту пухлини та організмів метастазування – легені – за умов терапії експериментальної пухлини фоточутливими пептидоміметиками.

РОЗДІЛ 1

ІМУННА СИСТЕМА ЗА ЗЛОЯКІСНОГО РОСТУ

1.1 Загальні риси злоякісних клітин

За злоякісного росту імунна система відіграє провідну роль в прогресі та регресі пухлин [1]. Злоякісні клітини зазвичай продукують антигени, які імунна система інтерпретує як «не свої». У більшості випадків це призводить до знищення злоякісних клітин, як і у випадку з будь-яким чужорідним агентом. Однак деякі злоякісні клітини мають здатність (або набувають її) уникати виявлення і/або руйнування імунною системою [2].

Родоначальником експериментальної онкології став М. Новінський, який в 1876 р. вперше перевив злоякісну пухлину від дорослих собак цуценятам [3], а перші дослідження в галузі імунології пухлин були проведені у 1943 р. на мишах [4].

Причиною появи злоякісних клітин є генетичні мутації, за яких змінюється кількість білкових структур або їх функції, які регулюють ріст і поділ клітин, а також репарацію ДНК [2]. Виявлено два типи генів: ті, які стимулюють клітинний ріст, – протоонкогени, і ті, які обмежують його, – гени-супресори (найпоширеніший – p53) [5]. Протоонкогени регулюють нормальну поведінку клітини, але можуть перетворюватися в онкогени, що призводить до аномальної стимуляції поділу клітин [6].

Онкогени можуть виникати в результаті:

- набутих точкових мутацій соматичних клітин (наприклад, викликаних хімічними канцерогенами);
- ампліфікації гена (наприклад, збільшення числа копій нормального гена);
- транслокації (в яких ділянки різних генів об'єднуються, утворюючи унікальну послідовність) [5, 7].

Дисплазія являється патологічним ненормальним ростом клітин, що розвивається протягом періоду від кількох місяців і навіть років, але цей процес не відноситься до неоплазії, тобто не є пухлиною. Процес утворення неопластичних клітин, подібних за типом до біологічного матеріалу, з якого вони створені, вважається раком. Злоякісні клітини здатні до інвазії, що дає можливість проникати через кровоносні та лімфатичні судини та розповсюджуватись по організму [8].

Відомо, що лікування є більш ефективним у випадку раннього виявлення новоутворення [9], проте виявити рак на ранніх стадіях складно, оскільки клітини більше схожі на нормальні [1].

У дослідженнях злоякісних новоутворень зазвичай використовують експериментальні моделі індукованих або перещеплених пухлин, серед яких обов'язковою моделлю є високометастазуюча карцинома легені Льюїс [10].

Отже, пухлини складаються з клітин, які володіють багатьма ознаками нормальних клітин, що є однією з причин, через які імунна система автоматично не знищує ПК [11].

1.2 Карцинома легені Льюїс

Карцинома легені Льюїс – це пухлина, яка спонтанно розвивалася як епідермоїдна карцинома в легенях миші C57BL. Вона була виявлена у 1951 р. Маргарет Льюїс і стала однією з перших перещеплюваних пухлин [10].

Як правило, карцинома легені Льюїс є високо метастатичною в імунокомпетентних мишей. Фактично, дослідження 1996 р. показало, що карцинома переважно метастазувала в легені після ін'єкцій у хвостову вену [12].

Прогресування пухлини спостерігалось після дорсальної підшкірної ін'єкції ПК у кількості 10^7 мишам дикого типу 129/Black Swiss, що характеризувалось виразкою шкіри з подальшим крововиливом. Клітини

були анапластичні, розрізнялися за розміром і формою. Вони мали невелику кількість цитоплазми, а ядра клітин виглядали сильно спотвореними. Пухлини були добре васкуляризованими і метастазували в різні ділянки, включаючи легеню, лімфатичні вузли, печінку, плевральну порожнину, діафрагму, перикард, серцевий м'яз, підшлункову залозу, жирову тканину і стравохід. У випадках метастазування в легеню, великі пухлинні маси піддавалися некрозу, при цьому у деяких з них відбувався крововилив та інколи виникали гострі запалення. Пухлинні вузли проникали у простір навколишніх тканин, що викликало дегенерацію останніх [13, 14].

Роль моделі раку легенів Льюїс полягає в тому, що вона використовувалася для дослідження властивостей метастазування пухлини й ангиогенезу. Модель також корисна для хіміотерапевтичного тестування *in vivo* [15].

1.3 Імунний нагляд

Імунна система грає провідну роль у знищенні злоякісних клітин. В кінці 60-х рр. ХХ ст. Ф. М. Барнет сформулював концепцію імунологічного нагляду організму над виникненням пухлин. Відповідно до цієї концепції основною функцією Т-клітинного імунітету є розпізнавання і відторгнення «чужого» (або «зміненого свого»). Він висловив припущення, що в організмі постійно з'являються мутантні клітини, які мають здатність до пухлинного росту, але переважна більшість з них розпізнається як «чуже» і елімінується ще до формування пухлини. Розпізнавання таких клітин, по Барнету, здійснюється Т-лімфоцитами і обумовлено антигенними відмінностями ПК від нормальних клітин господаря [16]. З концепції випливало, що зростання пухлин має сприяти розвитку специфічного Т-клітинного протипухлинного імунітету, а імуносупресія (наприклад, за допомогою тімектомії) – збільшенню частоти виникнення пухлин [3, 16].

Експериментальні дослідження частково підтверджували правильність концепції імунологічного нагляду Барнета. Так, було показано, що зростання багатьох типів експериментальних пухлин вірусного походження, а також пухлин, індукованих хімічними канцерогенами, дійсно супроводжується розвитком специфічного протипухлинного Т-клітинного імунітету [3, 16, 17].

1.4 Механізми протипухлинного імунітету

1.4.1 Вроджений імунітет

1.4.1.1 Участь НК-клітин

Натуральні кілери (НК) – великі гранулярні лімфоцити, що володіють цитотоксичністю проти ПК і клітин, заражених вірусами [18]. Основна функція НК – знищення дефектних клітин організму або клітин без МНС. Також НК-клітини виконують цитотоксичну і цитокін-продукуючу функції і є одним з найважливіших компонентів клітинного вродженого імунітету [19].

На відміну від ЦТЛ, НК-клітини не мають рецепторів до антигенів, тому механізм розпізнавання нормальних і дефектних клітин на даний час досліджується [20]. НК-клітини також задіяні в реалізації адаптивної імунної відповіді і в формуванні антиген-специфічної імунної пам'яті [19].

1.4.1.2 Участь дендритних клітин

ДК – це антиген-презентуючі клітини, які присутні в бар'єрних тканинах (наприклад, в шкірі та лімфовузлах). Вони відіграють основну роль в ініціації пухлино-специфічної імунної відповіді. Ці клітини поглинають пухлино-асоційовані білки і презентують Т-клітинам для стимуляції відповіді ЦТЛ

проти ПК [20]. Кілька класів ДК можуть сприяти зростанню або пригніченню пухлини [21].

Тканинні ДК стимулюються «сигналом небезпеки», який вони отримують при зв'язуванні специфічних власних Toll-подібних рецепторів (TLR) з PAMPs, присутніми на різних чужорідних агентах і мікроорганізмах, але відсутніми у «господаря». Після TLR-стимуляції ДК отримують сигнал до диференціювання. Вони втрачають фагоцитарну функцію і мігрують в лімфатичні вузли [19, 23].

Антиген-презентуючі клітини представляють Т-клітинам комплекс [МНС-патогенний пептид], що призводить до активації Т-лімфоцитів і запуску адаптивного імунітету [19, 22].

1.4.1.3 Участь нейтрофілів

Основною функцією нейтрофілів є фагоцитоз чужорідних об'єктів (бактерій і клітин) [25], але їх участь у пухлинному процесі не менш важлива.

Нейтрофіли, активовані в пухлинному мікросередовищі місцевими медіаторами запалення (TNF- α), можуть приєднуватися до ПК і посилювати їх міграцію крізь ендотеліальний бар'єр. Виділяючи тканинний інгібітор MMP, вони можуть гідролізувати компоненти матриксу ПК і сприяти рухливості пухлини [24].

Але все ж нейтрофіли мають здатність руйнувати ПК. Розглядається близько десяти нових терапевтичних стратегій для посилення протипухлинного потенціалу нейтрофілів, наприклад, активація нейтрофілів інтерфероном [26].

1.4.1.4 Участь тучних клітин

ТК традиційно розглядалися як клітини вродженого імунітету, діючі як первинні ефектори при багатьох бактеріальних інфекціях, і тривало вважалися ефективними учасниками алергічних реакцій [27].

Вперше ТК були описані П. Ерліхом у 1877 р. [28]. Вчений звернув увагу на те, що пухлина молочної залози мишей інтенсивно інфільтрована ТК. В подальшому було показано, що інфільтрація цими клітинами характерна для багатьох пухлин: меланоми, нейросаркоми, карциноми легені, яєчника і багатьох інших [29].

Проте значення інфільтрації пухлини ТК досі залишається предметом дискусій, тому що їх роль в пухлинному процесі до кінця не з'ясована. Існує твердження, що ТК можуть як гальмувати розвиток пухлини, так і сприяти йому [29, 30].

Виявлення складних взаємодій між тучними клітинами, мікрооточенням і пухлиною дасть розуміння патогенезу захворювання [30].

1.4.1.5 Участь еозинофілів

Основними функціями еозинофілів є знищення паразитів, участь в алергічних та запальних реакціях [31].

У МкП представлені і еозинофіли, роль яких в пухлинному процесі не зовсім з'ясована та може бути різносторонньою [32]. Еозинофіли служать джерелом продуктів, які володіють як протизапальною, так і прозапальною дією, а також виділяють субстанції з ангіогенною дією (деякі цитокіни, лейкотрієни та ін.), активно взаємодіють з іншими клітинами в ділянці запалення. Є дані про те, що в окремих випадках інфільтрація еозинофілів

поєднується з несприятливим прогнозом. Однак це питання потребує подальшого вивчення, так як поряд з еозинофілами мала місце й інфільтрація іншими клітинами, фенотип і роль яких не були з'ясовані [33].

Поряд з цим еозинофіли можуть і пригнічувати ріст пухлини, що відбувається за участю наступних механізмів:

- посилення дозрівання ДК;
- цитотоксична дія на ПК шляхом виділення гранул;
- індукція антитілозалежної цитотоксичності за участі IgE;
- індукція апоптозу;
- залежна від стимулу регуляція відповіді Th1 і Th2 [33, 34].

Отже, наведені факти свідчать про можливість еозинофілів брати участь в гальмуванні росту пухлини [29].

1.4.1.6 Участь макрофагів

Центральне місце в індукції запалення поряд з нейтрофілами належить макрофагам – джерелу багатьох цитокінів та інших біологічно активних молекул. Така здатність макрофагів поєднується з різноманітністю їх функцій: презентація антигенів спільно з МНС II та активація Т-клітинно-опосередкованої імунної відповіді [19], фагоцитоз, цитотоксичність, регуляція активності багатьох клітин та ін. [29, 35].

Макрофаги беруть участь у гомеостазі тканин, захисних механізмах і загоєнні ран. Вони також грають роль при різних захворюваннях, таких як аутоімунні порушення, атеросклероз і онкогенез [36, 37].

Макрофаги МкП – ТАМ відрізняються вираженою здатністю адаптуватися до гіпоксії – одного з найважливіших факторів пухлинної прогресії. Більшість прогресуючих пухлин активно інфільтровані

макрофагами. Міграція макрофагів в пухлинну тканину забезпечується відповідними хемоатрактантами, які продукуються клітинами запалення, в першу чергу нейтрофілами, власне макрофагами і ПК [29].

Макрофаги, активовані комбінацією різних факторів, включаючи лімфокіни (розчинні фактори, що синтезуються Т-лімфоцитами) і інтерферон, можуть знищувати специфічні ПК. При певних умовах вони можуть презентувати ПАА Т-клітинам і стимулювати пухлино-специфічну імунну відповідь [20, 37].

Існує 2 класи TAM:

- 1) клітини TAM-1 (M1) допомагають Т-клітинам знищувати пухлини;
- 2) клітини TAM-2 (M2) сприяють пухлинній толерантності [38].

Вважається, що M1 і M2 існують в недиференційованому стані до тих пір, поки не відбудеться поляризація на два фенотипи: M1 і M2. Такий поділ може змінюватися з часом і залежить від стадії і типу раку, а також від схеми лікування [20].

Зазначені субпопуляції розрізняються по ряду параметрів: по спектру продукованих цитокінів та інших субстанцій, функціях, експресії поверхневих структур, відповіді на різні стимули, за потребою в різних хемоатрактантах і деякими морфологічними особливостями [29].

За своїми біологічними властивостями M1 можуть бути охарактеризовані, як клітини з вираженими ефекторними властивостями, які здатні брати активну участь у захисті як проти мікроорганізмів, так і проти злоякісно трансформованих клітин. M1 відрізняються активною продукцією IL-12, IL-18, а також продукують NO, який в поєднанні з супероксидами може сприяти виділенню цитотоксичного пероксинітрида [29, 41].

M2 підтримують ангиогенез шляхом секреції аденомедуліна і фактора росту ендотелія судин (VEGF) та експресують імуносупресивні молекули,

такі як IL-10, запрограмований ліганд смерті 1 (PD-L1) і TGF β , сприяючи зростанню пухлини. Вони вважаються «друзями» ракових клітин [38-40]. M2 поділяють на підтипи: M2a, M2b і M2c. Прикладом M2a фенотипу макрофагів є клітини, які скупчуються навколо личинок гельмінтів і найпростіших, алергени яких індукують імунну Th2 відповідь, що супроводжується продукцією IL-4 і IL-13. M2b функціонально близькі до M1 макрофагів, вони продукують прозапальні медіатори і монооксид азоту (NO), але разом з тим для них характерний високий рівень синтезу IL-10 і знижена продукція IL-12. M2c макрофаги мають супресивні властивості – гальмують активацію і проліферацію CD4⁺, викликану антигенною стимуляцією, і сприяють елімінації активованих T-клітин [42].

Макрофаги регулюють МкП і їх активність багато в чому залежить від характеру стимулів, які можуть бути різними в окремих ділянках пухлини (такими стимулами найчастіше є різноманітні продукти пухлини): в ділянках інвазії TAM підсилюють рухливість ПК, а при відсутності судин і на перинекротичних ділянках – ангиогенез. Наведені дані показують, що подальше вивчення цього напрямку дасть можливість відповісти на питання: чи можна і якщо так, то яким чином запобігти поляризації TAM в M2 і створити умови для реалізації ефектів M1, що надасть нові можливості для терапії [29].

Було показано зростання LLC під час використання CD169 + макрофагів з метою пригнічення пухлини. Також спостерігалось виснаження кісток і кісткового мозку у мишей, яке порушувало гомеостаз кістки і викликало втрату її маси, а також зниження щільності кістки. Еритропоетична активність була серйозно порушена. Тому використання CD169+ макрофагів, призначених для лікування раку, вимагає ретельного вивчення для уникнення пасток [40].

Роль макрофагів при НМРЛ залишається спірною. Необхідні подальші дослідження, щоб вивчити функції макрофагів в різних умовах і пов'язати це з реакцією пацієнта на лікування та виживанням пацієнтів з НМРЛ [38].

1.4.2 Адаптивна імунна система

1.4.2.1 Участь В-клітин

Частиною адаптивного імунітету є гуморальна імунна відповідь, що реалізовується В-лімфоцитами.

Система адаптивного імунітету здатна розпізнавати мільйони окремих антигенних детермінант. Ця здатність заснована на величезній різноманітності антиген-специфічних рецепторів лімфоцитів – TCR і імуноглобулінів, які реалізуються завдяки V (D) J-рекомбінації [43] – механізму соматичної рекомбінації ДНК, що відбувається на ранніх етапах диференціювання лімфоцитів і приводить до формування антиген-розпізнаючих ділянок імуноглобулінів і Т-клітинного рецептора. Це дозволяє В-клітинам виробляти високоспецифічні імуноглобуліни. Антитіла мають широкий спектр ефекторних функцій: зв'язування з чужорідними патогенами для реалізації фагоцитозу («опсонізація»), лізис мішеней через систему комплементу, нейтралізація інфекційних частинок і зв'язування антитіл з антигеном для додання специфічності знищення патогенів за допомогою НК-клітин [19, 44].

Лізис ПК відбувається в процесі їх розведення білками комплементу, додаючи імуноглобулін IgM і IgG. Внаслідок лабораторних досліджень, які проводились на мишах, було виявлено, що імуноглобуліни в наявності комплементу спроможні знищувати злоякісні клітини, а також впливають на зменшення кількості метастаз окремих пухлин лейкозу та лімфом. У випадку утворення раковими клітинами твердої тканини – позитивної дії майже не

відбувається. Існує антитілозалежна клітинно-опосередкована цитотоксичність, що в свою чергу має послідовність таких дій:

1. Приєднання до плазмалеми ПК пухлиноспецифічних антитіл;
2. Взаємодія з імуноглобуліновим Fc-рецептором, який знаходиться на поверхні гранулоцитів та макрофагів;
3. Процес вивільнення гранулоцитами та макрофагами цитотоксичних чинників, внаслідок чого відбувається руйнування ПК [1].

В-клітини часто не беруть до уваги через їх роль в протипухлинному імунітеті. Тим не менш, вони представляють собою основних учасників МкП, де вони можуть або посилити ефективну імунну відповідь, активуючи відповідь цитотоксичних Т-клітин, продукуючи протипухлинні антитіла і цитокіни, або навпаки сприяти пухлинній толерантності [45].

Роль В-клітин в МкП різноманітна і, крім секреції антитіл і цитокінів, В-клітини здатні модулювати Т-клітинні і вроджені імунні відповіді, а також розпізнавати антигени, регулювати процесинг і презентацію антигену [46].

Отже, В-клітини мають як пропухлинну, так і протипухлинну функцію, що свідчить про поганий та хороший прогнози.

1.4.2.2 Участь Т-клітин

Т-лімфоцити є центральною ланкою адаптивного імунітету. Цитотоксичні Т-лімфоцити, які експресують CD8, і Т-хелпери, які експресують CD4, розвиваються з попередників кісткового мозку в тимусі [47, 49].

Цитотоксичні Т-клітини розпізнають інфіковані або трансформовані клітини через пептиди, асоційовані з молекулами МНС I класу. Стимульовані CD8⁺ Т-лімфоцити спричиняють лізис клітини-мішені за допомогою секреції цитотоксичних гранул (гранзим і перфорин) [50]. CD8⁺ Т-клітини є головними гравцями у формуванні протипухлинної відповіді [48].

Th-клітини, які експресують CD4, беруть участь в регуляції імунної відповіді. АПК, що представляють на поверхні чужорідні пептиди, асоційовані з молекулами МНС II класу, існують в невеликих кількостях. Якщо Т-хелпери реагують на комплекс «пептид + молекула МНС II класу з високим ступенем спорідненості », вони активуються і швидко розмножуються. У цей період Th-клітини отримують додаткові сигнали від АПК через цитокіни. Експресія цитокінів, контрольована TLR-стимуляцією і іншими факторами навколишнього середовища, визначає диференціацію Th-клітини в ефекторні лінії: Th1, Th2, Th17 і т.д. Ці клони Th-хелперів запрограмовані секретувати певні панелі цитокінів при подальшій стимуляції [19]. Наприклад, Th1-клітини секретують IFN- γ і TNF, що активують макрофаги і здійснюють противірусну і/або протипухлинну відповідь. Th2-клітини секретують IL-4 і IL-13, які активують В-клітини і клітини вродженого імунітету [19, 47, 51].

Цитокінова регуляція імунної відповіді спрямована на усунення патогенів. Крім того, зрілі CD4⁺ і CD8⁺ Т-клітини залишаються в лімфатичних судинах, лімфовузлах та кістковому мозку як Т-клітини пам'яті та здатні реагувати на конкретний патоген при повторному контакті [19, 52].

Дослідження показали, що Т-клітини при додаванні їх до пробірки із злоякісними клітинами (у вигляді суспензії або щільних новоутворень) спричиняють руйнівну протипухлинну дію [53].

Довгий час в імунотерапії пухлин головну роль відводили Т-кілерам, але було продемонстровано, що в ході імунотерапії Т-хелпери теж беруть

активну участь. Була розроблена програма для комп'ютерного аналізу неоантигенів, що дозволяє визначити, які з них будуть розпізнаватися Т-кілерами, а які Т-хелперами. Потім модифікували клітини пухлини так, щоб вони стали експресувати два неоантигени – mLAMA4 (розпізнається Т-кілерами) і mITGB1 (розпізнається Т-хелперами), після чого мишей з пухлиною такого типу піддали імунотерапії. Це дослідження довело, що найбільш ефективною виявилась терапія пухлиноспецифічною вакциною, яка активує як Т-кілери, так і Т-хелпери [54].

1.4.2.3 Участь цитокінів

Цитокіни – біологічно активні речовини пептидної природи, які регулюють широкий спектр процесів, що протікають в організмі. Виділяють такі групи цитокінів як інтерлейкіни, фактори некрозу пухлин, хемокіни та фактори росту [55].

Активно досліджується протипухлинна ефективність системної терапії цитокінами. Фактор некрозу пухлин – TNF – займає особливе місце серед цитокінів. Індукція апоптозу є основою для їх використання в лікуванні злоякісних пухлин [55, 62]. Однак серйозна токсичність TNF негативно впливає на його застосування в клінічних умовах [63].

Серед цитокінів в онкології найбільш успішно застосовується IFN- γ , який продукується Т-лімфоцитами (крім Th2) і NK. IFN- γ активує мононуклеарні фагоцити, підвищує експресію молекул МНС I і II класу, безпосередньо впливає на диференціювання Т і В-лімфоцитів [1, 55, 56]. Показником протипухлинної активності IFN є інгібування проліферації клітин та їх апоптоз [55, 56].

Інтерлейкіни складають значну частину цитокінів в мікросередовищі пухлини. Протизапальні цитокіни (ІЛ-2, ІЛ-21) зазвичай активують протипухлинний імунітет і перешкоджають розвитку пухлини [60].

ІЛ-2 є фактором росту антиген-стимульованих Т-лімфоцитів і відповідає за клональну експансію після розпізнавання антигену. ІЛ-2 також сприяє проліферації і диференціюванню інших імунних клітин, таких як НК-клітини і В-клітини [57]. Також було показано, що ІЛ-2 впливає на збільшення кількості ДК [58]. Повідомлялося про результати повної ремісії і тривалого періоду відсутності захворювань після введення різних доз пацієнтам з меланою і нирково-клітинною карциною [59].

ІЛ-21 має потужну протипухлинну дію завдяки своїй здатності розширювати пул цитотоксичних CD8+ Т-клітин і НК-клітин. Проте дослідження на моделях раку товстої кишки підтверджують ймовірність того, що ІЛ-21 може мати протилежні функції щодо зростання пухлин, в залежності від тканини і місцевої імунної активації [61].

Більшість прозапальних цитокінів (ІЛ-1, ІЛ-6), що продукуються або імунними клітинами господаря, або самими ПК, пов'язані із злоякісними новоутвореннями у пацієнтів і моделей раку у тварин [55, 60].

Отже, цитокіни здатні або підсилювати протипухлинну імунну відповідь або навпаки – пригнічувати. Роль цитокінів при НМРЛ залишається спірною, тому що ряд цитокінів грають подвійну роль. Необхідні подальші дослідження, щоб вивчити функції цитокінів при різних умовах.

1.5 Вплив пухлинного росту на імунні органи

1.5.1 Тимус

Тимус – первинний орган імунної системи, в якому відбувається антигеннезалежна проліферація і диференціювання Т-лімфоцитів з клітин-попередників, які заселяються з потоком крові з червоного кісткового мозку [64]. Вроджена відсутність тимусу у людей і його видалення у новонароджених тварин призводить до значних змін в імунній системі, тобто зменшення кількості Т-лімфоцитів та зниження захисних функцій імунної системи, оскільки тимус являється джерелом Т-лімфоцитів і коригує реактивність імунної системи протягом цілого життя [65].

Від морфофункціонального стану тимуса залежить підтримання гомеостазу в організмі і забезпечення стабільності його антигенних структур [29]. Вважається, що при розвитку пухлин інволюція тимуса і пов'язане з нею порушення поповнення периферичних Т-лімфоцитів лежить в основі розвитку Т-клітинного імунодефіциту, що призводить до погіршення протипухлинного захисту [66, 67].

Механізми розвитку акцидентальної інволюції тимуса на фоні розвитку пухлини досі залишаються до кінця не з'ясованими. Ймовірно, це може бути пов'язано з прямою індукцією апоптозу тимоцитів. Одним з провідних вважається недостатнє надходження клітин-попередників в тимус, які зберігаються в кістковому мозку в достатній кількості і функціонально повноцінні. Вважається також, що це може бути наслідком їх міграції в пухлину. Крім того, відомо, що акцидентальна інволюція тимуса виникає як адаптаційний механізм на стрес будь-якої етіології. Можна припустити, що потенційними індукторами інволюції тимуса можуть бути глюкокортикоїдні гормони і такі цитокіни, як TNF- α , IL-1, IL-4, TGF- β , VEGF [67].

1.5.2 Селезінка

Найбільшим вторинним лімфоїдним органом є селезінка, яка знаходиться в черевній порожнині у верхній частині лівої сторони. В ній проходять процеси лімфо-, еритро- і мієлопоезу в ембріогенезному процесі, де вона являється змішаним лімфомієлоїдним органом. Селезінка переходить функціонувати в режим лімфоїдного органу у випадку, коли процеси еритро- і мієлопоезу з часом пригнічуються. Це відбувається у багатьох видів ссавців, а також у людей у постнатальний період [65]. В селезінці забезпечується активний і досить тривалий контакт різноманітно детермінованих імунологічно компетентних клітин з антигенами, які знаходяться в крові, що проходить через селезінку [68].

Первинна і частоково вторинна гуморальна імунна відповідь пригнічена у імбредних тварин, які вроджено не мають селезінки, у зв'язку з чим у них менша кількість В-лімфоцитів. Внаслідок спленектомії у тварин, а також людей, знижується гуморальний імунітет, що сприяє посиленню клітинного. Якщо у людини видалити селезінку, то збільшується ризик захворювання на піроплазмоз, а наприклад, в шимпанзе при видаленні селезінки підвищується схильність захворіти малярією [65].

Деякі дослідження показали, що пухлинний ріст впливає на селезінку. Спостерігалось значне збільшення її ваги, а морфологічні дослідження внутрішніх органів виявили докази екстрамедулярного гемопоєзу в селезінці [69]. Розвиток пухлини також призводить до збільшення загальної активності матриксних металопротеаз в селезінці. При новоутвореннях в селезінці майже не розрізняються біла і червона пульпи, вся тканина заповнюється метастазованими інсуломами [70].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали та обладнання

Експериментальні дослідження проводили в лабораторії культивованих клітин ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Для визначення ефективності впливу синтезованих пептидоміметиків використовували ряд методів експериментальної онкології – визначення об'ємних і вагових індексів імунних органів та розмірів первинної пухлини й органу-мішені метастазування – легені.

2.2 Фотоконтрольовані пептидоміметики

В дослідженні використано фотоконтрольовані пептидоміметики – синтезований фоточутливий протипухлинний аналог грамїцидину С. Діарилетиленовий фрагмент з приєднаним до нього залишком проліну виділено червоним (Рис. 2.1).

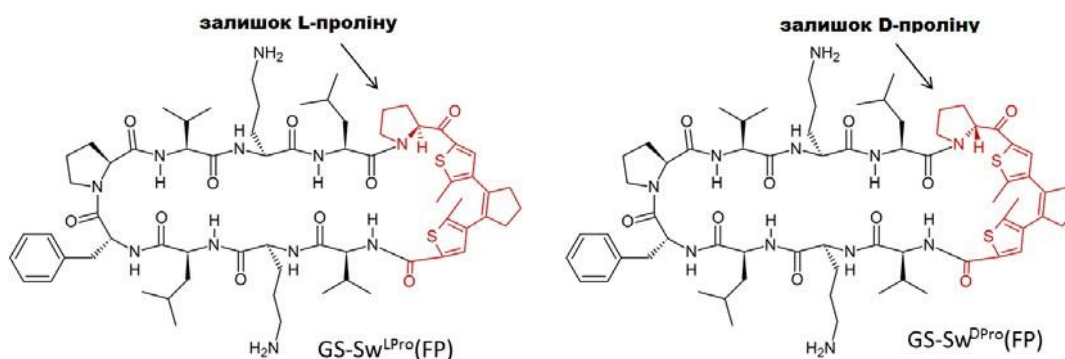


Рис. 2.1. Схематичне зображення фоточутливого пептидоміметика – аналога грамїцидину С.

2.3 Перещеплена модель карциноми легені Льюїс

Дослідження були проведені на перещеплюваній моделі LLC у мишей C57 Black [71]. Інокуляцію пухлинних клітин проводили в стегновий м'яз в концентрації $0,8 \times 10^6$ клітин первинної культури LLC, яку вирощували в системі *in vitro* в середовищі культивування DMEM (Sigma, США), що містило 10% FBS (Sigma, США) в стандартних умовах CO₂ інкубатора при 37⁰ С та 100% вологості. Після досягнення повного моношару (Рис. 2.2) клітини відмивали від середовища культивування, підраховували та розчиняли у фізіологічному буфері та інокулювали експериментальним тваринам.

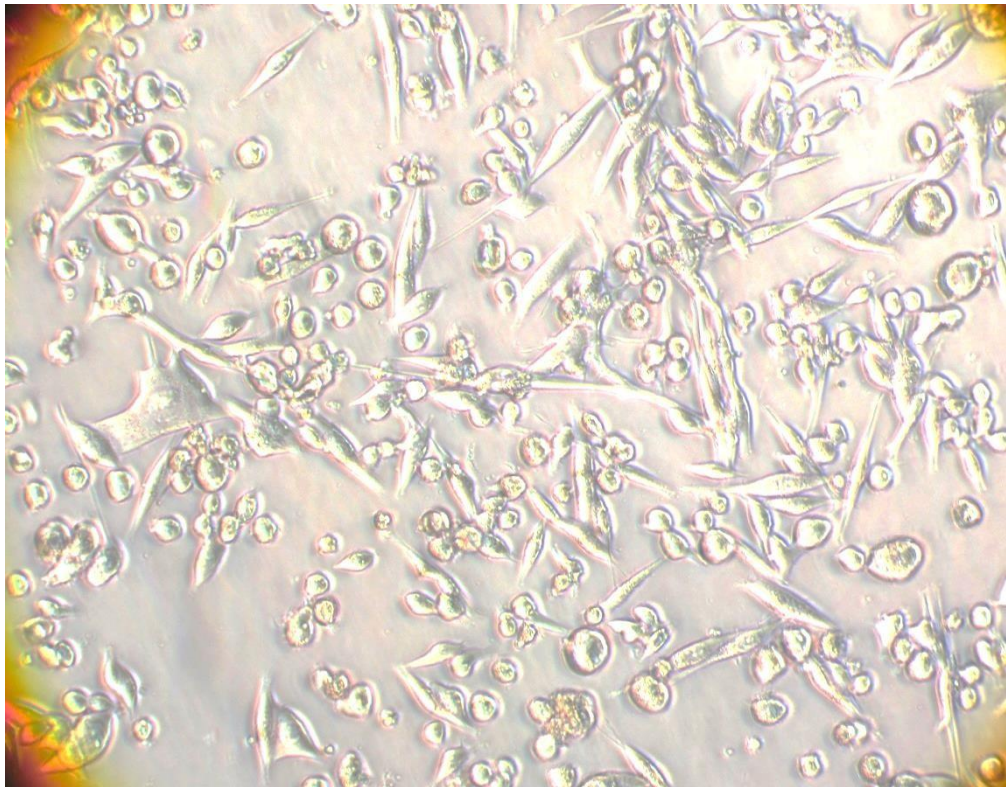


Рис. 2.2. Культура клітин перещеплюваної карциноми легені Льюїс.

Декапітацію тварин проводили на 28 добу після перещеплення пухлини. Після цього визначали вагові індекси досліджуваних органів.

2.4 Експериментальні групи тварин, використані в дослідженнях

В дослідженнях використано 10 груп тварин ($n = 5$). Всі маніпуляції з тваринами проводили в затемненому приміщенні.

1. Інтактна група тварин для порівняння.
2. Група тварин з перещепленою пухлиною (контроль без лікування), цих тварин утримували в режимі затемненого світла / темряви протягом експериментального періоду.
3. Контроль введення лікарського засобу (плацебо), дві процедури (внутрішньопухлинна ін'єкція сольового розчину з наступним опроміненням пухлин через 5 хв. після ін'єкції), дводенний інтервал між процедурами.
4. Граміцидин С (GS) – антибіотик дикого типу, дві процедури (внутрішньопухлинна ін'єкція GS, відсутність опромінення), інтервал у два дні між процедурами.
5. LMB002 закрита форма, дві процедури (внутрішньопухлинна ін'єкція розчину сполуки з подальшим опроміненням пухлин через 5 хв. після ін'єкції), інтервал між процедурами – два дні.
6. LMB002 закрита форма, дві внутрішньопухлинні ін'єкції сполуки, відсутність опромінення, інтервал між ін'єкціями два дні.
7. LMB033 закрита форма, дві процедури (внутрішньопухлинна ін'єкція розчину сполуки з подальшим опроміненням пухлин через 5 хв. після ін'єкції), інтервал між процедурами – два дні.
8. LMB033 закрита форма, дві внутрішньопухлинні ін'єкції сполуки, відсутність опромінення, інтервал у два дні між ін'єкціями.
9. LMB033 закрита форма, одна внутрішньопухлинна ін'єкція розчину сполуки з наступним опроміненням пухлин через 5 хв. після ін'єкції.
10. LMB033 закрита форма, одна внутрішньопухлинна ін'єкція, без опромінення.

2.5 Визначення росту пухлин в динаміці та визначення ваги пухлин

За динамікою росту пухлин спостерігали за допомогою заміру діаметрів стегна тварини в двох взаємно перпендикулярних площинах з періодичністю 1 раз в 3 дні, починаючи з 7 доби після перещеплення. Для визначення діаметру пухлини проводили заміри стегна, в яке не було інокульовано пухлинні клітини. Віднімаючи від значення діаметру стегна з пухлиною значення діаметру інтактного стегна визначали розмір пухлини. Ріст пухлин оцінювали за об'ємом згідно формули

$$V = \frac{4}{3} \pi R^3,$$

де **R** визначали за вимірами середнього діаметра (в трьох проекціях), розділеного на 2.

Вагу пухлин визначали на 28 добу після перещеплення пухлини та її видалення.

Метастазування в легені визначали на 28 добу за 2 параметрами – ваговим індексом, а також визначенням розміру та об'єму метастазів.

2.6 Оцінка вагового індексу імунних органів

Для визначення вагового індексу імунних органів селезінки та тимусу у тварин з пухлинами і тварин з пухлинами та терапією проводили зважування мишей, а після евтаназії видаляли імунні органи, зважували і діленням на вагу тварини та множенням на 100 (%), згідно наведеної формули, визначали вагові індекси імунних органів.

$$I_{\text{селезінки}} (\%) = \text{вага селезінки} / \text{вагу тварини} \times 100$$

$$I_{\text{тимусу}} (\%) = \text{вага тимусу} / \text{вагу тварини} \times 100$$

Отримані дані усереднювали по групах експериментальних тварин та представляли у вигляді гістограм.

2.7 Статистичний аналіз

Математичну обробку та аналіз експериментальних даних проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel та Origin 6.1. Вірогідність результатів визначали за t-критерієм Стьюдента, достовірно значимими вважали відмінності при $P < 0,05$. Морфометричні показники підраховували в програмах Axiovision та ImageJ. Всі дані приведені у вигляді середніх арифметичних та стандартних відхилень.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Основною метою представленого дослідження було визначення впливу терапії фоточутливими пептидоміметиками на стан імунних органів у тварин з перещепленою LLC. Зокрема, досліджували ваговий індекс селезінки та тимусу і порівнювали між групами. В дослідженнях щодо терапевтичного ефекту використовували 2 фоточутливих пептидоміметики LMB002 та LMB033 [72]. В якості порівняння використовували природний антибіотик граміцидин С (GS) [73]. Також одним із контролей є плацебо (введення фізіологічного розчину за схемою, якою проводили терапію LMB002 та LMB033 (2 рази в пухлину та світлотерапія 2 рази по 15 хвилин після введення засобів)).

Дослідження вагових індексів імунних органів і розмірів пухлини та органу-мішені метастазування – легені проводили на 28 добу після перещеплення пухлини.

3.1 Вагові показники первинної пухлини та легені мишей експериментальних груп

Визначення динаміки росту первинної пухлини у мишей експериментальних груп проводили за двома індексами – об'ємним та ваговим. Для цього, починаючи із 7 доби після перещеплення пухлини проводили виміри діаметру пухлини, перещепленої в стегновий м'яз.

Порівняння вагового показника у наведених в пункті 2.4 експериментальних групах проводили на 28 добу після перещеплення пухлини після гуманної евтаназії експериментальних тварин.

Згідно даних, наведених на Рис. 3.1, вага тварин в експериментальних групах залежала від схеми терапії.

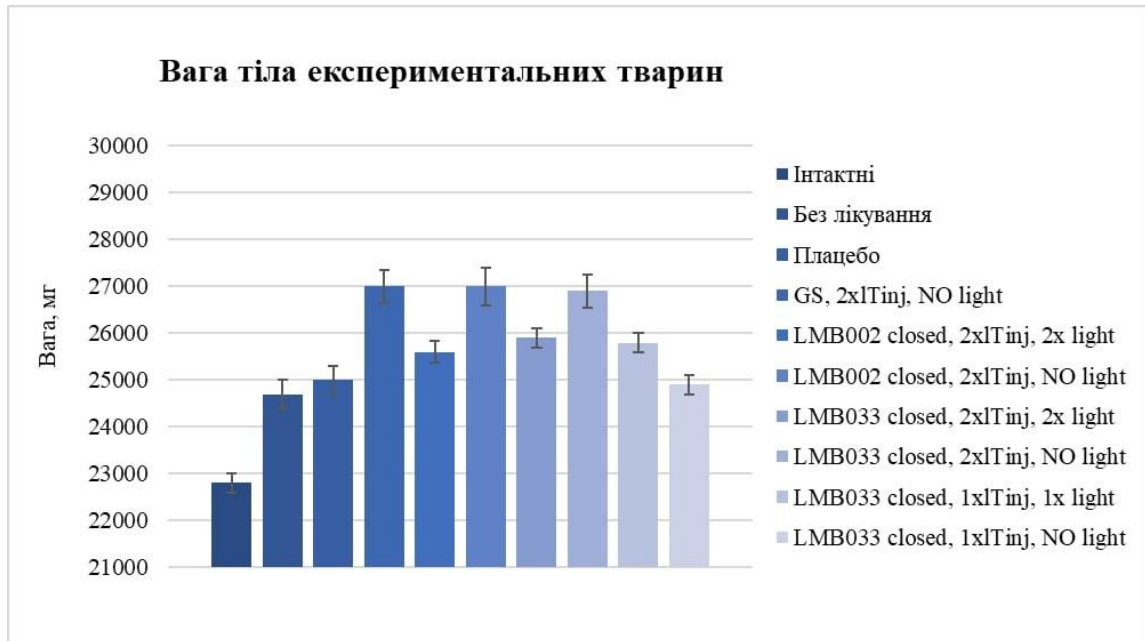


Рис. 3.1. Вага тварин в експериментальних групах на 28 добу після перещеплення пухлини.

Як свідчать результати, у всіх тварин з перещепленою пухлиною вага значно перевищувала даний показник інтактних тварин (без пухлин), хоча через розбіжності даних достовірна різниця була зафіксована в декількох із наведених груп.

Що стосується вагового індексу пухлини в групах, то також достовірні відмінності виявлено для деяких із них порівняно з групою без терапії (Рис. 3.2).

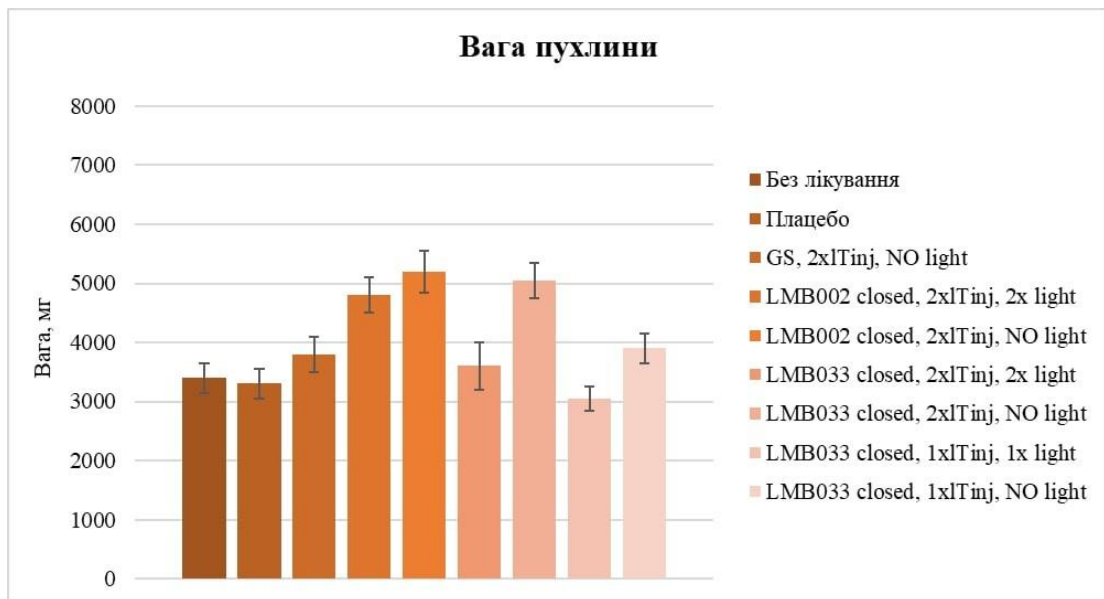


Рис. 3.2. Вага пухлин на 28 добу після перещеплення карциноми легені Льюїс експериментальним тваринам.

Найнижчий ваговий індекс пухлини зафіксовано в групі тварин з терапією LMB033 (однократне введення) та однократною активацією фоточутливого пептидоміметика видимим світлом протягом 15 хвилин (рис. 3.2).

Визначення вагового індексу легені в експериментальних групах виявило феномен – суттєве наростання ваги легені у тварин з двократним введенням пептидоміметика LMB002 та двократним свіченням первинної пухлини (Рис. 3.3), що вказує на інтенсифікацію метастазування в легені за такої схеми терапії .

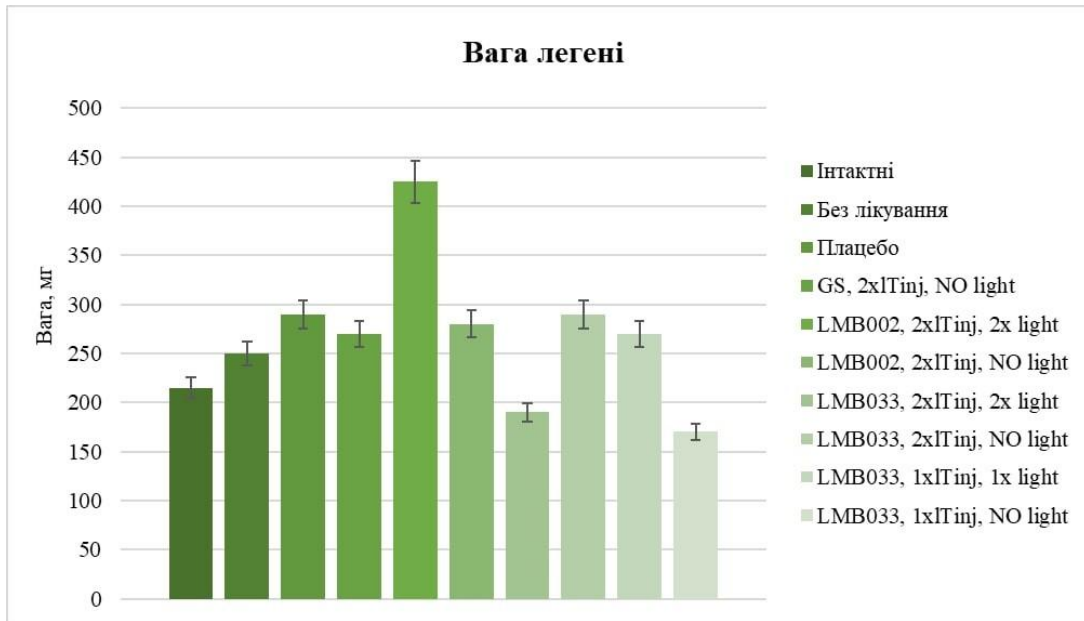


Рис. 3.3. Вага легені на 28 добу після перещеплення карциноми легені Льюїс експериментальним тваринам.

3.2 Порівняння вагового індексу імунних органів інтактних тварин та тварин-пухлиноносіїв

Визначення вагового індексу імунних органів експериментальних тварин використовують як початкову ланку імуномодуляторного впливу будь-яких досліджуваних компонентів з метою оцінки первинної ланки імунної системи. Порівняння вагового індексу селезінки інтактних тварин та тварин з пухлинами показало 2-х кратне ($P < 0,05$) збільшення такого у тварин з пухлинами (Рис. 3.4). Щодо тимусу, то спостерігається тенденція до збільшення у тварин з пухлинами, порівняно з інтактними, однак достовірної різниці не зафіксовано.

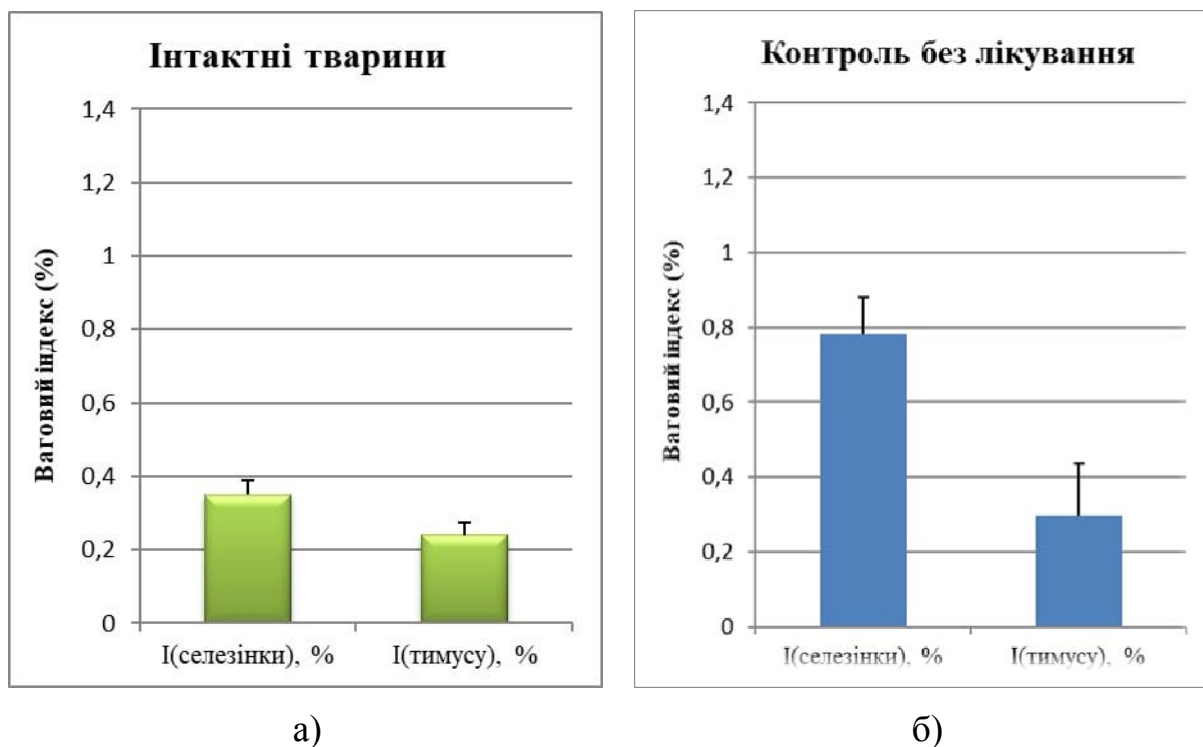


Рис. 3.4. Ваговий індекс селезінки та тимусу інтактних тварин (а) і тварин з перещепленою карциномою легені Льюїс (б).

Збільшення вагового індексу селезінки у тварин з пухлинами є наслідком імуносупресії та запалення.

3.3 Дослідження впливу плацебо та препарату порівняння грамїцидину С на імунні органи за пухлинного росту

Оскільки терапія фоточутливими пептидоміметиками проводилась в режимі введення в пухлину та подальшою активацією світлом, то режим плацебо був також проведений за тією схемою, як свідчать наведені дані (Рис. 3.5), з уведенням фізіологічного розчину.

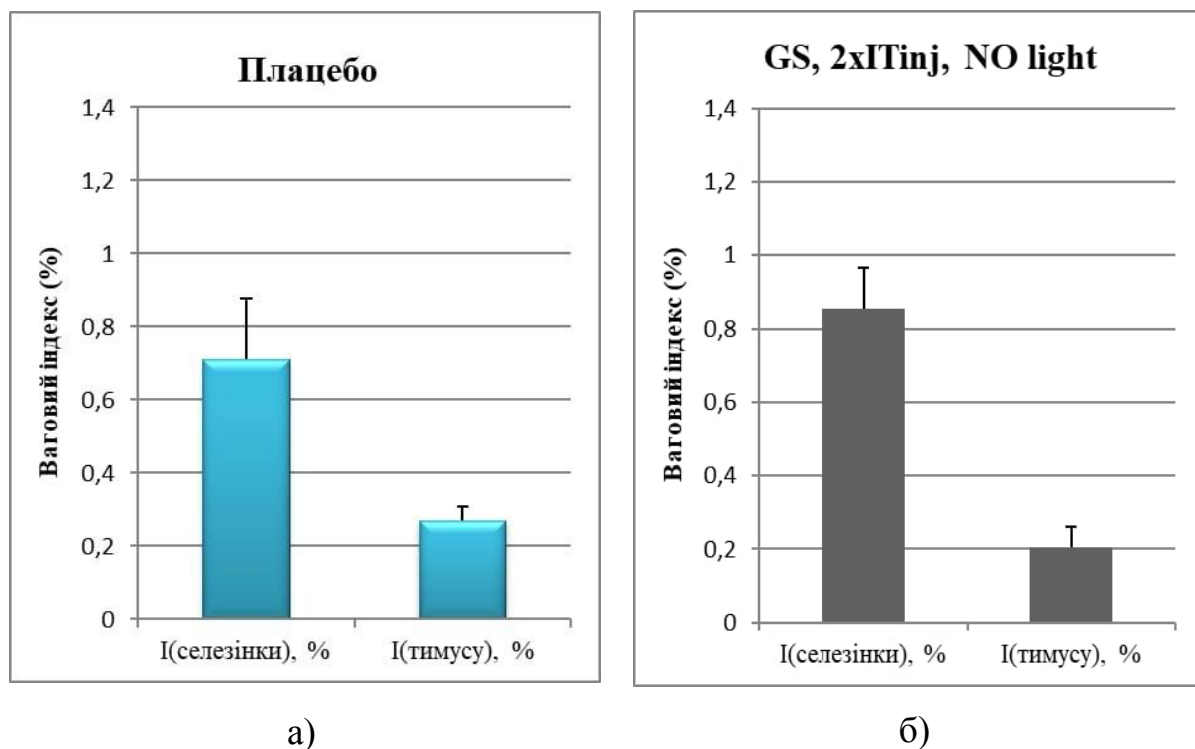


Рис. 3.5. Ваговий індекс селезінки та тимусу тварин з перещепленою карциною легені Льюїс і введенням плацебо (а) та терапією граміцидином С (б).

$P < 0,05$ в порівнянні з контролем

Як свідчать наведені дані, вагові показники селезінки та тимусу відрізнялись від таких в групі нелікованого контролю: у тварин з перещепленою карциною легені Льюїс і введенням плацебо спостерігається зменшення вагового індексу селезінки, а в тварин з терапією граміцидином С – збільшення вагового індексу селезінки та зменшення тимусу.

3.3 Вагові індекси селезінки та тимусу у тварин з терапією LMB002

Терапія пептидоміметиками за схемою двократного введення LMB002 закритої форми та з дією світла і без нього було зафіксовано наступне збільшення вагового індексу тимусу при фотовключенні та без змін селезінкового індексу (Рис. 3.6).

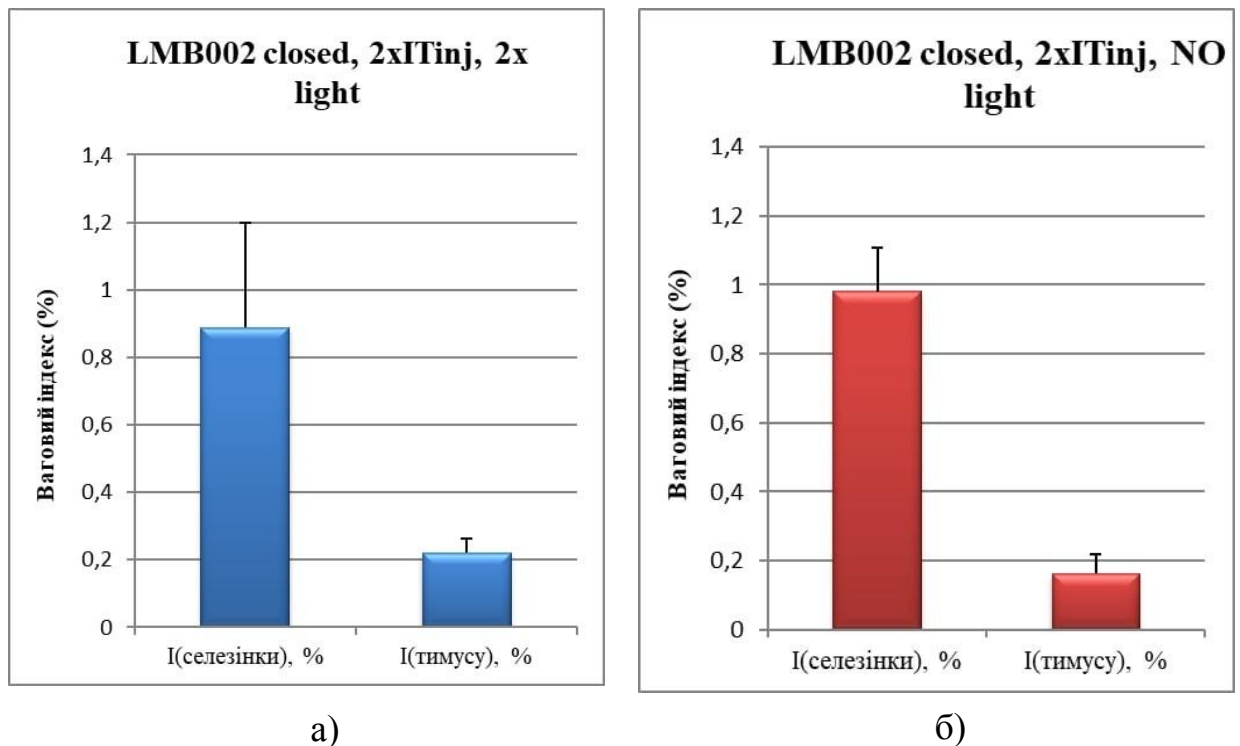


Рис. 3.6. Ваговий індекс селезінки та тимусу тварин за схемою двократного введення LMB002 закритої форми та двократним свіченням (а) і без дії світла (б).

$P < 0,05$ в порівнянні з контролем

3.4 Вагові індекси селезінки та тимусу у тварин з терапією LMB033

Як свідчать наведені дані, у тварин за схемою двократного введення LMB033 закритої форми та двократним свіченням ваговий індекс селезінки значно більший, ніж у нелікованих тварин, тоді як ваговий індекс тимусу не змінюється. У тварин за схемою двократного введення LMB033 закритої форми без дії світла порівняно з контролем змін вагового індексу селезінки та тимусу не спостерігається (Рис. 3.7).

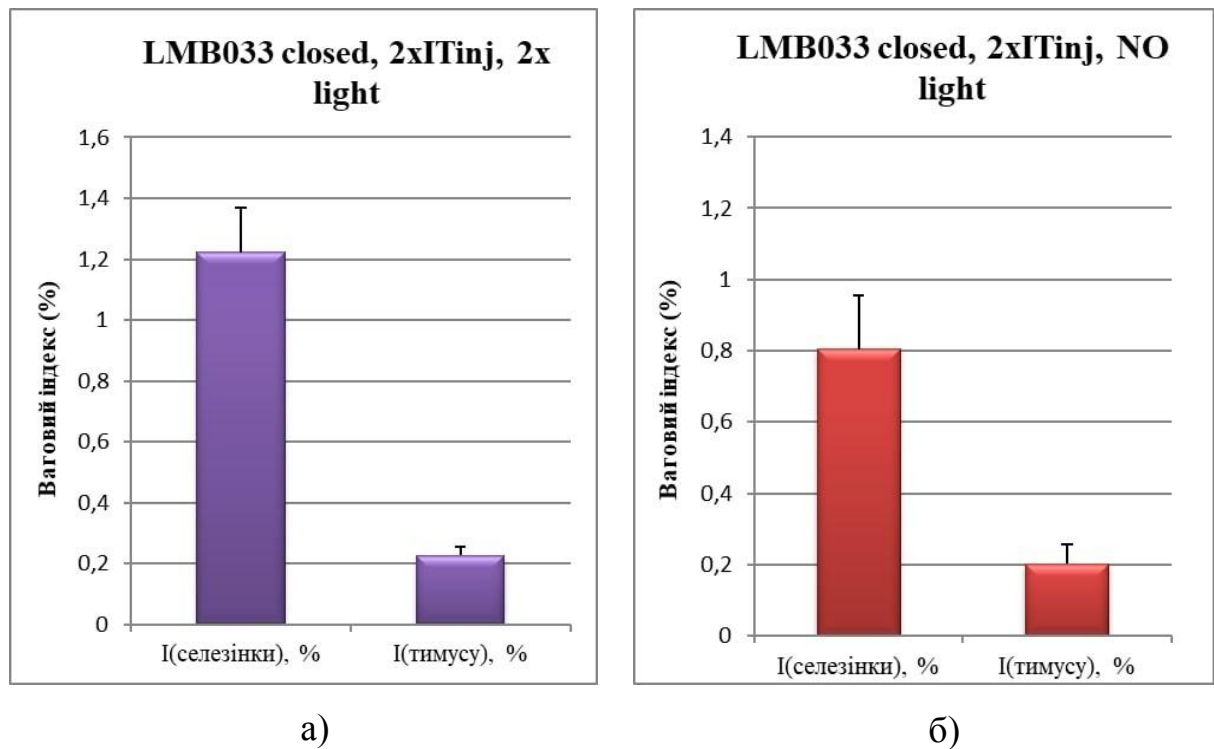


Рис. 3.7. Ваговий індекс селезінки та тимусу тварин за схемою двократного введення LMB033 закритої форми та двократним свіченням (а) і без дії світла (б).

$P < 0,05$ в порівнянні з контролем

Як свідчать наведені дані, у тварин за схемою однократного введення LMB033 закритої форми та однократним свіченням спостерігається збільшення вагового індексу селезінки та тимусу у порівнянні з нелікованим контролем. Те ж саме відбувається у тварин за схемою однократного введення LMB033 закритої форми без дії світла (Рис. 3.8).

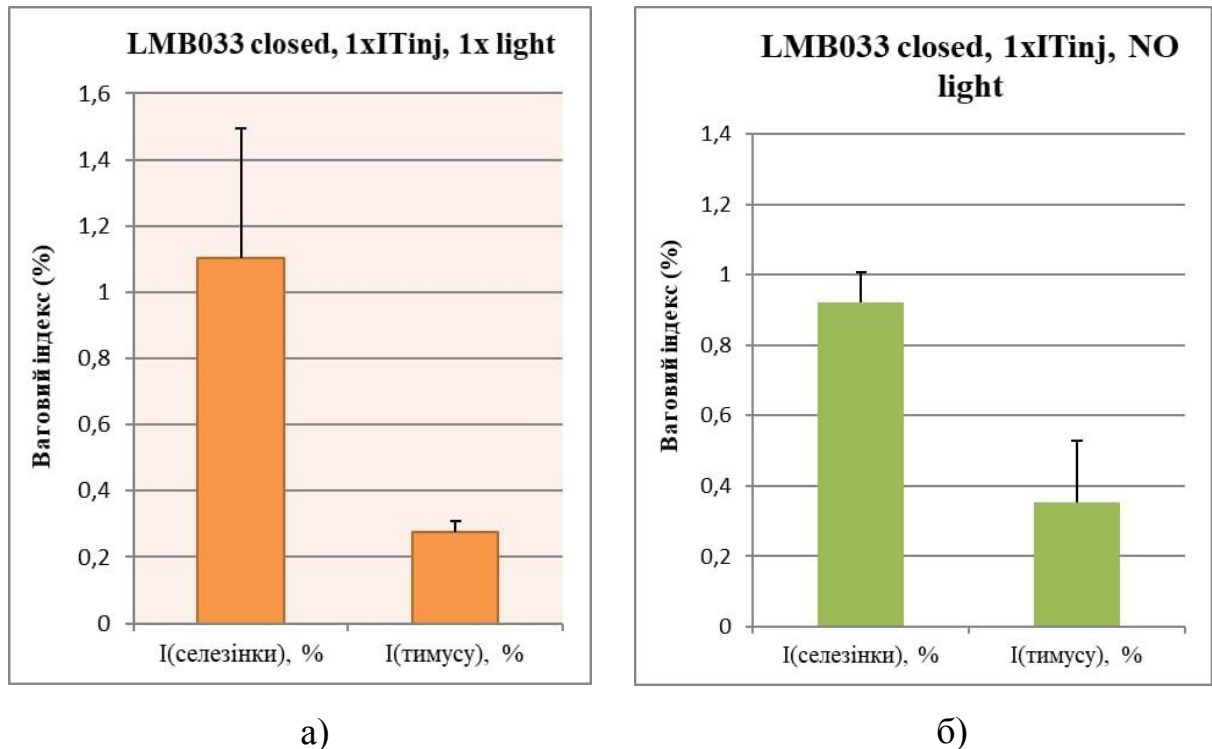


Рис. 3.8. Ваговий індекс селезінки та тимусу тварин за схемою однократного введення LMB033 закритої форми та однократним свіченням (а) і без дії світла (б).

$P < 0,05$ в порівнянні з контролем

ВИСНОВКИ

1. В результаті проведення комбінованої терапії з використанням фоточутливих пептидоміметиків на експериментальній моделі перещеплюваної карциноми легені Льюїс виявлено зміни в рості та метастазуванні та у вагових індексах імунних органів тварин.
2. Виявлено, що ваговий індекс селезінки за терапії фоточутливими пептидоміметиками LMB033 та LMB002 збільшений у всіх групах експериментальних тварин, порівняно з інтактними. Найбільший вплив на селезінковий індекс зафіксовано за схеми двократного введення LMB033 та двократною фототерапії.
3. Достовірних змін в показнику вагового індексу тимусу за терапії фоточутливими пептидоміметиками LMB033 та LMB002 не зафіксовано.
4. Ваговий індекс легені в експериментальних групах за двократною фототерапії LMB002 був найвищим, що вказує на інтенсифікацію метастазування в легені за такої схеми терапії.

ВИКОРИСТАНІ ДЖЕРЕЛА

1. Бесчасний С.П. та Гасюк О.М. / Імунологія: навч. посіб. // Херсон: ФОП Вишемирський, 2019. – 162 с.
2. MSD Manual: Gale R.P. / Cellular and Molecular Basis of Cancer. – 2020.
3. 3. Мельников В.Л., Митрофанова Н.Н., Мельников Л.В. / Противоопухолевый иммунитет: уч. пособ. // Пенза: Издательство ПГУ, 2015. – с. 9-43.
4. Koller P.C. / Origin of malignant tumour cells. // Nature – 1943. – P. 244-246.
5. Киселев Ф.Л. / О молекулярных механизмах возникновения опухолей // Природа №4 – 2014.
6. Майборода А.А. / Гены и белки онкогенеза // Сибирский медицинский журнал, 2013. – 134 с.
7. Абелев Г.И. / Основы онкогенетики, 1997 – с. 6-12.
8. Поліщук Л.З., Рябцева О.Д., Лук'янова Н.Ю., Чехун В.Ф. / Молекули адгезії та їх значення при розвитку злоякісних пухлин // Онкологія. – 2011. – с. 4-11.
9. A Broad-Spectrum Integrative Design for Cancer Prevention and Therapy. / K. Block [et al.]. // Semin Cancer Biol. – 2015. – P. 276-304.
10. A highly metastatic Lewis lung carcinoma orthotopic green fluorescent protein model. / B. Rashidi [et al.]. // Clinical & Experimental Metastasis – 2000. – P. 57–60.
11. Lewin B. Oncogenes and Cancer (Genes VIII) / Lewin B. – Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall. – 2004.
12. Combination therapy including a gelatinase inhibitor and cytotoxic agent reduces local invasion and metastasis of murine Lewis lung carcinoma. / I. C. Anderson [et al.]. // Cancer Research – 1996. – 715 p.
13. Mayo Y.Y. / Biological characterization of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor. // Cancer Chemother – 1972. – P. 325-330.

14. Growth and dissemination of Lewis lung carcinoma in plasminogen-deficient mice. / T.H. Bugge [et al.]. // *Blood* – 4522 p.
15. Preclinical Murine Models for Lung Cancer: Clinical Trial Applications. / A. Kellar [et al.]. // *BioMed Research International* – 2015.
16. Burnet M. / *Cancer: a biological approach*. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications // *Br Med J.* – 1957. – 841 p.
17. Барышников А.Ю. Взаимоотношение опухоли и иммунной системы организма. / А.Ю. Барышников // *Практическая онкология*. – 2003. – Т.4, №3. – С. 127-130.
18. Li Y. and Sun R. / Tumor immunotherapy: New aspects of natural killer cells. // *Chin J Cancer Res.* – 2018. – P. 173-196.
19. Иммунология: формирование иммунного ответа как ведущего фактора противоопухолевой защиты. / К.А. Саранцева [и др.]. // *Malignant tumours* – 2016. – С. 5-14.
20. Ответ организма на развитие опухоли. / Dmitry Gabrilovich // Department of Pathology and Laboratory Medicine, Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania – 2019.
21. Dendritic Cells in the Cancer Microenvironment / Yang Ma [et al.]. // *J Cancer.* – 2012. – P. 36–44.
22. Kang Liu, M.C. Nussenzweig / Origin and development of dendritic cells // *Immunological Reviews* – 2010. – P. 45-54.
23. Пожаров И. Дендритные клетки. «МЕД-инфо» – 2012.
24. Десятерик В.І. Гемостатичні механізми гематогенного метастазування пухлини / В.І. Десятерик, Є.С. Шевченко та О.В. Медведков // *Хірургія України*, 4 – 2015. – С. 96-104.
25. Новиков Д.К. Медицинская иммунология / Д.К. Новиков – Витебск, 2002. – 75 с.

26. Лисяный Н.И. Нейтрофилы и онкогенез / Н.И. Лисяный, А.А. Лисяный // ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины», Киев – 2018.
27. Баглай Е.О. Тучные клетки – ключевые участники патогенеза иммуновоспалительных заболеваний / Е. О. Баглай, А.И. Дубиков // Прогресс в ревматологии в XXI веке – 2014. – 182 с.
28. Гусельникова В.В. Морфофункциональная характеристика популяции тучных клеток тимуса мыши / В.В. Гусельникова, Санкт-Петербург – 2016. – 10 с.
29. Бережная Н.М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли / ОНКОЛОГИЯ – 2009. – С. 6-17.
30. The role of mast cells in cancers / Thiago T. Maciel [et al.]. // F1000Prime Rep. – 2015.
31. Павленко В.И. Клетки и органы иммунной системы: уч. пособ. / В.И. Павленко, И.Ю. Саяпина. – Благовещенск, 2018. – 44 с.
32. Pivotal Advance: eosinophil infiltration of solid tumors is an early and persistent inflammatory host response / S. Cormier [et al.]. // J Leukoc Biol. – 2006.
33. Бережная Н. М. Иммунология злокачественного роста. / Н.М. Бережная, В.Ф. Чехун – Киев: Наук думка, 2005. – 792 с.
34. Stenfeldt A. Danger signals derived from stressed and necrotic epithelial cells activate human eosinophils. / A. Stenfeldt, C. Wenneras // Immunology – 2004.
35. Hirayama D. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis / D. Hirayama, T. Lida, H. Nakase – Int J Mol Sci. – 2018.
36. Gonzalez H. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression / H. Gonzalez, C. Hagerling, Z. Werb // Genes Dev. – 2018. – P. 1267-1284.

37. Монастырская Е.А. М1 и М2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии / Е.А. Монастырская, С.В. Лямина, И.Ю. Малышев // Патогенез. – 2008. – С. 31-39.
38. Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice / S. Jayasingam [et al.]. // Front. Oncol. – 2020.
39. Distribution of M1 and M2 macrophages in tumor islets and stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer / J. Jackute [et al.]. // BMC Immunol. – 2018.
40. Федорчук О.Г. Зміни функціонального стану перитонеальних макрофагів у мишей в кінетиці росту високоангіогенного варіанта карциноми легені Льюїс / О.Г. Федорчук // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2011. – С. 106-111.
41. Лямина С.В. Поляризация макрофагов в современной концепции формирования иммунного ответа / С.В. Лямина, И.Ю. Малышев // Фундаментальные исследования. – 2014. – С. 930-935.
42. Сарбаева Н.Н. Макрофаги. Разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами / Н.Н. Сарбаева, Ю.В. Пономарева, М.Н. Милякова // Гены&Клетки. – 2016. – С. 9-17.
43. Иммунология / Д. Мейл, Д. Бростофф, Д. Рот, А. Ройтт // – 7 (оригинальное). – Москва: Логосфера – 2007. – 568 с.
44. Сківка Л.М. Імунологія репродукції: навч. посіб. / А.Ю. Вершигора, Є.У. Пастер, Д.В. Колибо та ін. / Київ. – 2009. – 152 с.
45. The B-Side of Cancer Immunity: The Underrated Tune / A. Largeot / Cells. – 2019. – P. 449.
46. The Emerging Role of B Cells in Tumor Immunity / P. Tsou [et al.]. / Cancer Res. – 2016.
47. Будчанов Ю.И. Клеточный иммунитет. Типы клеточной цитотоксичности. Рецепторы и маркеры, субпопуляции лимфоцитов: уч. пособ. / Ю.И. Будчанов, Тверь. – 2008. – С. 2-7.

48. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy / G. Dranoff // *Nat Rev Cancer*. – 2004. – P. 11-22.
49. Імунологія: підручник / Л.В. Кузнецова та ін. / ТОВ «Меркьюрі Поділля», Вінниця. – 2013. – С. 40-42.
50. Балдуева И.А. Иммунологические особенности взаимоотношения опухоли и организма при меланоме / И.А. Балдуева // *Практическая онкология*. – 2001. – №4(8) – С. 39.
51. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные) / С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка // *Медицинская иммунология*. – 2011. – Т.13, №1 – С. 7-16.
52. Реконструкция Т-клеточного звена иммунной системы у больных после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток / Н.Н. Попова, В.Г. Савченко // *Гематология и трансфузиология*. – 2020. – Т.65, № 1.
53. Ostrand-Rosenberg S. CD4+ T Lymphocytes: A critical component of Antitumor Immunity / S. Ostrand-Rosenberg // *Cancer Investigation*. – 2005. – P. 413-419.
54. MHC-II neoantigens shape tumour immunity and response to immunotherapy / E. Alspach [et al.]. // *Nature*. – 2019. – P. 696-701.
55. Цитокины и противоопухолевый иммунитет / Г.М. Телетаева // *Практическая онкология*. – 2007. – Т. 8, №4 – С. 211-218.
56. Кадагидзе З.Г. Интерферон-гамма в онкологии / З.Г. Кадагидзе, Е.Г. Славина, А.И. Черткова // *Фарматека*. – №17. – 2013. – С. 46-49.
57. Interleukins and cancer immunotherapy / T. Yoshimoto [et al.]. // *Immunotherapy*. – Vol. 1, No. 5. – 2009.
58. Interleukin-2 signals converge in a lymphoid–dendritic cell pathway that promotes anticancer immunity / M.E. Raeber [et al.]. // *Science Translational Medicine*. – Vol. 12. – 2020.
59. Rosenberg S.A. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer / S.A. Rosenberg // *J Immunol*. – 2014. – P. 5451-5458.

60. Tumor-related interleukins: old validated targets for new anti-cancer drug development / S. Setrerrahmane, H. Xu // *Molecular Cancer*. – 2017.
61. Interleukin-21 in cancer immunotherapy / C. Stolfi [et al.]. // *Oncoimmunology*. – 2012. – P. 351-354.
62. Кадагидзе З.Г. Цитокины / Кадагидзе З.Г. // *Практическая онкология*. – Т.4, №3. – 2003. – С. 131-138.
63. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? / X. Wang, Y. Lin // *Acta Pharmacol Sin*. – 2009. – P. 1275-1288.
64. Павленко В.И. Клетки и органы иммунной системы: уч. пособ. / В.И. Павленко, И.Ю. Саяпина. – Благовещенск. – 2018. – С. 13.
65. Вершигова А.Ю. Імунологія: підручник. / А.Ю. Вершигора, Є.У. Пастер, Д.В. Колибо // *Вища шк.* – 2005. – 599 с.
66. Кострова О.Ю. Акцидентальная инволюция тимуса крыс на фоне развития аденокарциномы толстой кишки, вызванной введением канцерогена в различной дозировке / О.Ю. Кострова // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – С. 321-324.
67. Котелкина А.А. Клеточный состав тимуса крыс при сочетанном воздействии канцерогена и стресса / А.А. Котелкина [и др.]. // *Журнал анатомии и гистопатологии*. – 2019. – С. 47-53.
68. Макалиш Т.П. Морфофункциональные особенности селезенки при воздействии на организм факторов различного генеза / Т.П. Макалиш // *Таврический медико-биологический вестник*. – Т.16, №1. – 2013. – С. 265-269.
69. Горбик Г.В. Високоангіогенний варіант карциноми легені Льюїс обумовлює ранні прояви паранеопластичного синдрому / Г.В. Горбик [та ін.]. // *Клінічна онкологія*. – 2011. – С. 212.
70. Дунаєвська О.Ф. Морфологічні зміни селезінки під впливом різноманітних чинників / *Біологія*. – 2016. – С. 106-124.
71. Mayo Y.Y. Biological characterization of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor / Y.Y. Mayo // *Cancer Chemother*. – 1972. – P. 325-330.

72. Babii O. Structure-Activity Relationships of Photoswitchable Diarylethene-Based β -Hairpin Peptides as Membranolytic Antimicrobial and Anticancer Agents / Babii O., Afonin S., Ischenko A., Schober T., Negelia A., Tolstanova G., Garmanchuk L., Ostapchenko L., Komarov I. and Ulrich A. // *J Med Chem.* – 2018.
73. Swierstra J. Structure, toxicity and antibiotic activity of gramicidin S and derivatives / Swierstra J., Kapoerchan V., Knijnenburg A., Belkum A. and Overhand M. // *J Clin Microbiol Infect Dis.* – 2016. – P. 763-769.