ЛАБОРАТОРНАЯ МЕДИЦИНА LABORATORY MEDICINE

УДК: 612.017.11;612.017.1:57.052;

Н. Абдолла1, 2, Ю.В. Перфильева1, Е.О. Остапчук1, Р. Тлеулиева1, В.К.Красноштанов3 Н.Н. Беляев1
1М.А.Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институты, Молекулалық иммунология және иммунобиотехнология лабораториясы,
2әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті,
3Онкологиия және радиология ғылыми-зерттеу институты, Қазақстан Республикасы, Алматы қ.

АДЪЮВАНТ-ИНДУКЦИЯЛАНҒАН АРТРИТТІҢ ТЫШҚАН ҮЛГІСІНДЕГІ МИЕЛОИДТЫ СУПРЕССОРЛЫҚ ЖАСУШАЛАРДЫҢ ФЕНОТИПТІК ЖӘНЕ ФУНКЦИОНАЛДЫҚ ЕРЕКШЕЛІГІ

Бұл жұмыс созылмалы қабыну процессі кезіндегі миелоидты супрессорлық жасушалардың (MDSCs) фенотиптік және функционалдық ерекшелігін зерттеуге арналған. Жүргізілген зерттеулер барысында созылмалы қабынудың адювант артрит үлгісінде, көкбауырда супрессорлық потенцияға ие гранулоцитарлы және моноцитарлы MDSC фракцияларының жалпы пулының айтарлықтай көбейетіні анықталды.
Түйінді сөздер: *Созылмалы қабыну, миелоидты супрессорлық жасушалар, адювант артрит,*

Кіріспе. Қазіргі уақытта созылмалы қабыну процессімен байланысты аурулар қатарының пайда болу жиілігінің өсуі байқалуда, олардың арасы жүрек-қантамырлар ауруы, қатерлі ісік, артрит, диабет, сияқтылармен ерекшелінеді [1]. Бұл аурулардың болуы адамдардың өмір сапасын төмендетеді және ең соңында олардың өлімінің басты себебі болып қалады. Жеке алғанда созылмалы қабыну, анық созылмалы аурудың алдында болады. Созылмалы қабынудың механизімі іс жүзінде жедел қабынудың механизімінен өзгешеленеді, оның морфологиялық көрінісінде мастоциттер, нейтрофилдер және макрофагтар орталық орынды иеленеді. Аяқталмаған жедел қабыну жағыдайында соңына дейін анықталмаған себебтер бойынша негізгі қатысушылары Т-лимфоциттер, макрофагтар және фибробластар болатын созылмалы қабыну дамиды. Бізше, иммунорегуляторлық жасушалар қатарының супрессорлық активтілігінің күшеюі болатын, созылмалы қабынудың дамуына алып келетін, жедел қабыну реакциясын аяқтауға мүмкіндік бермейтін бұл процесстегі маңызды рөлге миелоиды супрессорлық жасушалар (Myeloid Derived Suppressor Cells, MDSC) деп аталатын жасушалар қатысуы мүмкін деп жорамалдаймыз. MDSC тышқандарда CD11b және Gr-1 жасушалық маркерлерінің экспрессиясы бойынша идентификацияланған, миеломоноцитарлық бағыттағы гемопоэтикалық бастапқы өзіндік гетерогенді популяция [2]. MDSC кейбір қосымша маркерлерінің болуы және ядро формасы бойынша: моноцитарлы (M-MDSC) және гранулоцитарлы (G-MDSC) екі субпопуляцияға бөлінеді. Қалыпты кезде бұл жасушалар көп мөлшерде жілік кемігінде байқалғанымен, көкбаур мен шеткі аймақтық қанда негізінен анықталмаған. [3]. Жануарларды ісік процессін моделдеуде олардың лимфотүйіндері мен көкбауырдағы саны едәуір өседі, сонымен бірге ісіктің стромасында, ісікке қарсы иммунитеттің әлсіреуімен сәйкес келеді [4]. Біз MDSC онкогенезді белгілі деңгейде белсендендіретін созылмалы қабыну патогенезімен байланысты және осы процессте басты рөлді атқарады деп жорамалдаймыз.

Зерттеудің мақсаты: Созылмалы қабынудың адювант артрит үлгісінде MDSC фенотиптік және функционалдық ерекшелігін зерттеу болып табылады**.**

Зерттеу материалдары мен әдістері.

Қолданылған жануарлар

Адъювант артрит үлгілеу ҚР ДМ Онкологиия және радиология ғылыми-зерттеу конвенциялық вивариа жағыдайында ұсталған салмақтары 30-35г 63 аталық CD1 линиалы аутбред тышқандарда жүргізілді. Лабораториялық жануарлармен болған барлық зерттеу жұмыстары, жануарларды қорғау, зерттеу және ғылыми мақсаттар үшін қолдану бойынша Европалық конвенция қабылдаған ережелерге сәйкес стандартты процедураға негізделген көпшілік мақұлдаған жануарлармен жұмыс этикалық нормасына сәйкес істелді.

Адъювант артритті үлгілеу

Адъювант артрит сынақ тобындағы тышқандарға 0,1 мл толық адъювант Фрейндті (“Sigma-Aldrich”, АҚШ) артқы аяғының табан үлтаның астына 100 мкл ден бір рет енгізу арқылы тудырылды. Бақылау тобындағы тышқандарға адъювант Фрейндтің орнына физологиялық ертінді енгізілді. 2 және 4 аптадан кейін тышқандарың көкбауры хирургиялық жолмен алынып көкбауыр мононуклеар жасушаларын алу үшін қолданылды.

Көкбауыр мононуклеарлық жасушалар суспензиясын алу

Сынақ және бақылау тобындағы тышқандардан хирургиялық жолмен алынған көкбаур айнек гомогенизатор көмегімен гомогенизацияланды. Алынаған жасушалық суспензия 20°C -та 1450 g кезінде 1,083 г/мл гистопак тығыздық градиентінде 20 мин бойы центрифугаланды (3k-30, Sigma, Германия). Сақина түрінде бөлектелген мононуклеар жасушалар фракциясы 300 g кезінде 10 мин бойы центрифугаланды және натрий фосфатты буферде (phosphate-buffered saline-PBS) суспензияланды.

Ағынды иммуноцитофлуориметрия

Жасушалар фенотипі ағынды иммуноцитофлуориметрия көмегімен CD-маркерлерін анықтау жолымен бағаланды. Бұл үшін жасушалар суспензиясы фикоэритрин (PE), флуоресцеин-изотиоцианат (FITC) немесе Перидинин-хлорофилл белк (PerCP) таңбаларымен белгіленген CD-маркерлерге қарсы моноклональды антиденемен өндіруші фирмалар (BD Biosciences, АҚШ немесе Milenyi Biotec, Германия) хаттамасына сәйкес өңделді. Алынған жасуша препараттары ағынды цитометр (FACS Calibur, BD Biosciences, АҚШ) арқылы өткізілді және антиденемен байланысқан жасушалар үлесі сонымен бірге әр маркердің орташа интенсивті флуоресценциясы бағаланды.

Миелоидты жасушалардың супрессорлық потенциялын бағалау

G-MDSC және M-MDSC фракцияларын, бақылау және тәжірибелік тышқандардың көкбаурынан иммуномагниттік сепарциялау әдісімен бөліп алдық және алдын ала виталды бояғыш CFSE мен таңбаланған, ConA-мен стимулденген аллогенді мононуклеар жасушалармен 72 сағат бірге культивацияладық. Т-жасушалардың пролиферация деңгейі ағынды цитофлуориметр көмегімен жасыл каналы бойынша, алдын ала CFSE-мен таңбаланған жасушалардың жарқырау интенсивтілігінің төмендеуі негізінде бағаланды. ROS продукциясын бағалау үшін біз флуоресцетті бояғыш ди-хлорфлуоресцеин диацетат (DCFDA) қолдандық. Спленоциттер тәжірибелік жануарлардан алынып, 30 мин бойы DCFDA боялғаннан кейін бояғыштың флуоресценттік интенсивтілігі, жасыл канал бойынша ерекшеленген $CD11b^{+}Ly6G$ субпопуляцияларында бағаланды.

Мәліметтерді статистикалық өңдеу

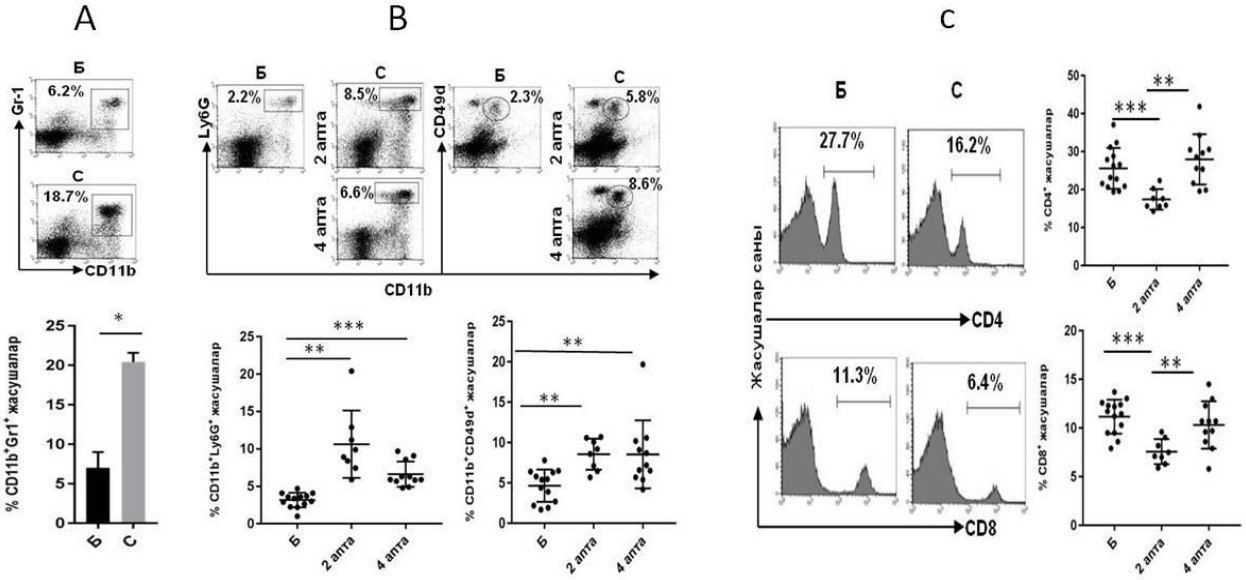
Алынған мәліметтер математикалық статистика әдістерімен қолданбалы программалар t-Стьюдент критериасы (Ттест), арифметикалық орташа мәнді есептеу

(M) және стандартты ауытқу (SD) Microsoft Excel қолданбалы программаларын қолданып компьютерде өңделді. Екі орташа шамалардың айырмашылығы P≤0,05 мәнділік деңгейінде анық есептеді.

Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

1. Бақылау динамикасындағы MDSC құрамы

Сынақ салмақтар 30-35г 63 аталық тышқанға жүргізіліп, олардың көкбаурдағы әртүлі MDSC субпопуляцияларының құрамын бақылау динамикасында (2 апта және 4 апта) зерттелді. Толық адъюант Фрейдті (ТАФ) енгізгеннен кейін артрит инъекция орнында қызару және өткір ісіну түрінде байқалды. Ісінудің шамасы, адъювант артрит кезіндегі қабыну процессінің деңгейін бағалау үшін жиі қолданылатын, инекция жасалған аяғының қалыңдығының өзгеріс көрсеткіштері арқылы бағаланды [5]. Жануарларға адъюват енгізгеннен кейін 2-аптаның соңына қарай сынақ тобының аяқтарының диаметры 3,8±0,1 мм, бақылау тобы 2,31±0,01 мм (p=0,0009) және 4-аптаның соңына қарай сынақ тобында 3,5±0,1 мм ал бақылау тобында 2,4±0,1 мм (p=0,0003) болды. Тәжірибе басталғаннан кейін 2 аптадан соң сынақ тобындағы тышқандардың көкбаурында $CD11b^+Gr\text{-}1^+$ фенотипті жасушалардың үлесі бақылау тобымен салыстырғанда үш есеге көбейді (сурет 1А). Сонымен қатар біз көкбауыр MDSC жалпы пулының жоғарлауындағы гранулоцитарлы ($CD11b^+Ly6G^{high}$) және моноцитарлы ($CD11b^+CD49d^+$) фракциясының үлесін анықтадық. Екінші аптаның соңына қарай $CD11b^+Ly6G^{high}$ фенотипті жасушалар популяциясының бақылау тобымен салыстрғанда сынақ тобында айтарлықтай көбейетіні анықталды және бұл көбею тәжірибе басталғаннан төртінші аптаның соңына дейін сақталды. Ал $CD11b^+CD49d^+$ фенотипті жасушалар проценттік үлесі, адъювант артрит даму динамикасының екі бақылау мерзімінде де анық жоғарлау байқалды (сурет 1В). Созылмалы қабыну бар тышқандарда $CD11b^+Ly6G^{high}$ және $CD11b^+CD49d^+$ миелоидтық жасушалар үлесі екінші аптаның соңына қарай кенет көбеюіне сәйкес, көкбауырдағы $CD8^+$ және $CD4^+$ Т-жасушалар деңгейінің төмендеуі байқалды (сурет 1С), бірақ NK және NKT-жасушалары деңгейінде өзгеріс болмады (мәліметтер көрсетілмеді). Сонымен қатар біз бақылау мерзімінде (2 және 4 апта) барлық топтағы жануарлардың (мәліметтер көрсетілмеді) көкбаурларының салмағымен оның жасушалығында (жасуша саны/көкбаур салмағы) өзгеріс байқамадық.

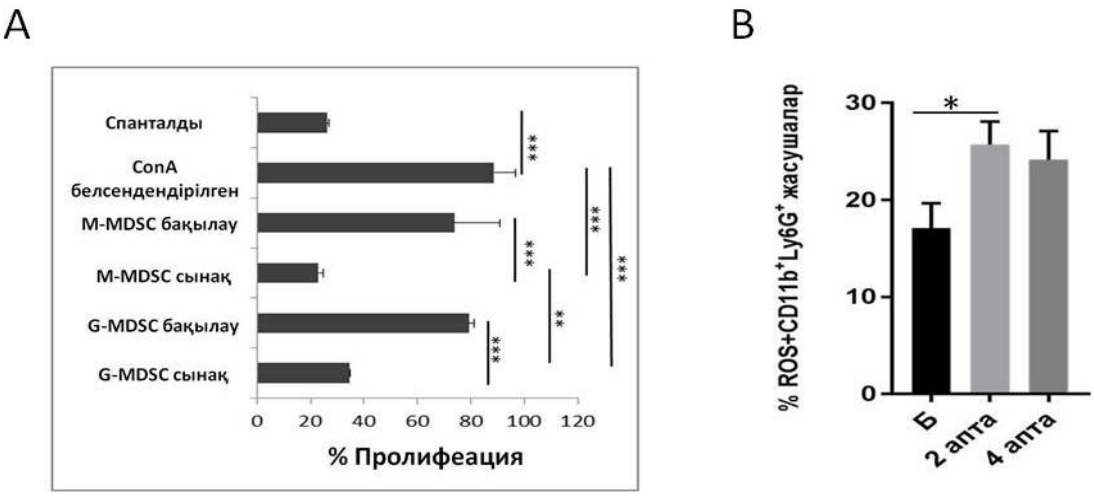


Сурет 1 – Бақылау (Б) және адъювант артриттің дамуының динамикасындағы (С) тышқандардың көкбаурындағы жасушалар құрамының өзгерісі. А) $CD11b^+Gr\text{-}1^+$ жасушалар В) $CD11b^+Ly6G^{high}$ және $CD11b^+CD49d^+$ жасушалар С) $CD4^+$ және $CD8^+$ жасушалар. M±SD түріндегі мәліметтер *P≤0,05*, *P≤0,005, ***P≤0,0005.

Бұл кезеңдегі зерттеуде адъюват артрит динаммикасында көкбаурда $CD11b^+Ly6G^{high}$ және $CD11b^+CD49d^+$ фенотипті миелоидты жасушалар жинақталуы $CD8^+$ цитотоксикалық лимфоциттер және $CD4^+$ жасушалар деңгейінің төмендеуімен сәйкес жүретінін көрсеттік.

2. Адъюват артритті үлгісіндегі MDSC супрессорлық активтілігін бағалау.

Қазіргі уақытқа дейін G-MDSC және M-MDSC -дің бірегей маркерлері табылмады және нейтрофилдер мен моноциттер ұқсас фенотипті сипаттамаға ие [6]. Бізге пайдаланылған созлмалы қабыну үлгіміздегі көбейген миелоидты популяциялардың супрессорлық сипаттамаға ие екенін көрсету керек болды. MDSC ді анықтаудың «алтын стандарты» Т-жасушаның активтілігі мен пролиферациясын басуға арналған тест болып табылады. Тәжірибелер нәтижесінде біз бақылау тышқандардан бөлініп алынған G-MDSC де және M-MDSC де спленоциттердің митоген-активтілік пролиферациясын тежемейтінін, ал сол уақытта сынақ тобындағы тышқандардан алынған G-MDSC және M-MDSC спленоциттер культурасының пролиферациясын айтарлықтай басатынын байқадық (сурет-2А), G-MDSC иммуносупрессорлық функциясы жанамалай, оттегінің активті формасы (ROS) негізінде жүреді. Жүргізілген фенотиптік талдаулар сынақ тобындағы (2 және 4 апта) жануарлардың ROS продукциясының деңгейі G-MDSC фракциясында, бақылау тобымен салыстырғанда нақтылы жоғары болғанын көрсетті (сурет 2В). Бірақ жалғасты цитофлуориметриялық талдауларда бақылау және сынақ тобындағы жануарлар арасында аргиназа-1 экспрессиясының M-MDSC де айрмашылығы анықталмады (мәліметтер көрсетілмеді).



Сурет 2 – А) Бақылау (Б) және сынақ (С) тышқандардың көкбаурынан алынған M-MDSC және G-MDSC қатысуындағы спленоциттердің пролиферациясының супрессиясы, В) G-MDSC дегі ROS экспрессиясы. M±SD түріндегі мәліметтер *P≤0,05 **P≤0,005, ***P≤0,0005.

Қортынды. Алынған нәтижелердегі талдау барысында толық адъюант Фрейдті ұзақ мерзімді тұрақты созылмалы қабыну процесін тудырды. Осы созылмалы қабыну фонында тышқандардың көкбауырында $CD11b^{+}Gr\text{-}1^{+}$ (MDSC) фенотипті жасушалардың мөлшері көбейді. Бұл созылмалы қабыну MDSC жілік кемігінен периферияялдық аймаққа шығуын белсендіретіндігін куәландырады. Сонымен қатар гранулоцитарлы ($CD11b^{+}Ly6G^{high}$) және моноцитарлы ($CD11b^{+}CD49d^{+}$) миелоидтық жасушалар фракциясының созылмалы қабыну бар тышқандардағы үлесі екінші аптаның соңына қарай кенет көбеюіне сәйкес, көкбауырдағы $CD8^{+}$ және $CD4^{+}$ Т-жасушалар деңгейінің төмендеуі, жасуша популяцияларының салыстрмалы санының өзгерісі, жасуша популяцияларының абсолютты санына сәйкес келеді деген қортындыға әкеледі. Ал осы көбейген MDSC субпопуляциялары Т-жасушаның активтілігі мен пролиферациясын басуға арналған тестте, M-MDSC Т жасушалардың пролиферациясын G-MDSC мен салыстырғанда жоғары деңгейде супрессиялады. Басқада лабораторияларда алынған нәтижелерде G-MDSC –ға қарағанда M-MDSC көбірек супрессорлы екендігін көрсеткен [7]. Бірақ бізде жүргізілген фенотиптік талдауларда сынақ тобындағы жануарлардың M-MDSC фракциясында супрессорлық молекула аргиназа продукциясы өзгермеді. Бұл адювант артрит кезінде M-MDSC иммуносупрессорлық әсері, басқа супрессорлық факторлар арқылы болуы мүмкін. Алайда ROS продукциясының деңгейі G-MDSC фракциясында, бақылау тобымен салыстырғанда 2-аптада нақтылы жоғары болуы, осы аптадағы CD8+ және CD4+ деңгейінің статистикалық мәнінің төмендеу мәліметтерімен сәйкес келеді. Бұл MDSC сурессорлық әсер нәтижесі болуы мүмін. Жүргізілген жұмыстар нәтижесінде біз адьюват артрит тышқандардың көкбаурында Т жасуша пролиферациясын супрессиялауға қабілетті MDSC субпопуляциялары жинақталатынын және олар иммундық жауапты реттеуге қабілетті болатынын анықтадық. Созылмалы қабынудың дамуындағы MDSC субпопуляцияларының рөлі және иммунологиялық өзгерісі туралы жалғасты зеттеулер қартаю мен созылмалы аурулардың алдын алу және емдеу мақсатындағы жаңа бағыттың дамуы үшін керек.

ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1 Prasad S., Sung B., Aggarwal B.B. Age-associated chronic diseases require age-old medicine: Role of chronic inflammation//Prev. Med.-2012.-Vol.54.- P.29–37
2 Gabrilovich D.I., Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system//Nature Rev. Immunol.-2009.-V.9.-P.162-174
3 Greten T.F., Manns M.P., Korangy F. Myeloid derived suppressor cells in human diseases// Intern. Immunopharm.-2011.-V.11.-P.802–807.
4 Ostrand-Rosenberg S., Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: Linking inflammation and cancer//J. Immunol.-2009.-V.182.-P.4499–4506.
5 Danna E.A., Sinha P., Gilbert M., Clements V.K., Pulaski B.A., Ostrand-Rosenberg S. Surgical removal of primary tumor reverses tumorinduced immunosuppression despite the presence of metastatic disease//Cancer Res.-2004.-V.64(6).-P.2205–2211.
6 Lina A., Mary-Ann F., Gary J. B., Alfredo R. Imaging Studies in Freund's Complete Adjuvant Model of Regional Polyarthritis, a Model Suitable for the Study of Pain Mechanisms, in the Rat//Arthritis & Rheumatism,-2011.-Vol. 63.-P1573–1581. doi 10.1002/art.30303
7 Bronte V., Brandau S., Chen S.H., Colombo M.P., Frey A.B., Greten T.F., et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards//Nat. Commun.-2016.-Vol.7:12150. doi:10.1038/ncomms12150.

Н. Абдолла[1, 2], Ю.В. Перфильева[1], Е.О. Остапчук[1], Р. Тлеулиева[1], В.К.Красноштанов[3], Н.Н. Беляев[1]
[1]Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, Лаборатория молекулярной иммунологии и иммунобиотехнологии, [2]Казахский Национальный Университет им. ал-Фараби, [3]Казахский научно-исследователский институт онкологии и радиологии, г.Алматы, Казахстан

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ АДЪЮВАНТНО-ИНДУЦИРОВАННОГО АРТРИТА

Резюме: В настоящей работе исследованы фенотипические и функциональные характеристики миелоидных супрессорных клеток (MDSCs) при хроническом воспалительном процессе. Исследование показало значительно увеличенный пул селезеночных гранулоцитарных и моноцитарных MDSC с супрессорным потенциалом в модели адъювантного артрита.
Ключевые слова*:* Хроническое воспаление, миелоидной супрессоры клетки, адъювант артрит