УДК 612.017.11;612.017.1:57.052;

Н. Абдолла[1,2], Ю.В. Перфильева[1], Р. Тлеулиева[1], Е.О. Остапчук[1] В.К.Красноштанов[3] С.Т. Тулеуханов[2], Н.Н. Беляев[4]
[1]М.А.Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институты,
Молекулалық иммунология және иммунобиотехнология лабораториясы,
[2]әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті,
[3]Онкология және радиология ғылыми-зерттеу институты, Алматы, Қзақстан,
[4]Санкт-Петербург Пастер Институты, Санкт-Петербург, Ресей

СОЗЫЛМАЛЫ ҚАБЫНУ БЕЛСЕНДЕНДІРГЕН МИЕЛОИДТЫ СУПРЕССОРЛЫҚ ЖАСУШАЛАР(MDSCs) ІСІКТІҢ ӨСУІН ЫНТАЛАНДЫРАДЫ

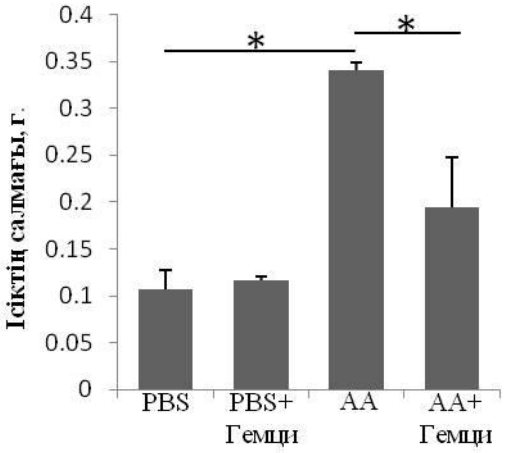
Бұл зерттеу жұмысы созылмалы қабынумен біріккен көшірілген ісіктің тәжірибелік үлгісіндегі MDSCs ді фармакологиялық түзетудің, ісікке қарсы иммунитетті белсендендіруге және ісікті элиминациялауға әсерін зеттеуге арналған. Алынған нәтижелер созылмалы қабынудың ісіктің өсуін, иммносупрессорлық MDSC белсенділігі арқылы ынталандыратынын көрсетті. MDSC жоюға бағытталған созылмалы қабыну процессін емдеу, қабынуға байланысты онкогенезді болдырмау үшін пайдаланылуы мүмкін.
Түйінді сөздер: *Созылмалы қабыну, миелоидты супрессорлық жасушалар, адъювант артриты, Эрлих карциномасы*

Кіріспе.
Қазіргі қоғамда халықтың өмір сапасын төмендететін, созылмалы қабыну процессімен байланысты аурулардың өсуі байқалуда. Қазіргі уақытта қатерлі ісіктер санның өсуі үшін морфологиялық негізі ұзаққа созылған созылмалы қабыну болып табылады [1]. Созылмалы қабыну процессі иммуносупрессорлы микроортаны қалыптастырады деп пайымдайды, ол қабындырғыш медиаторларды өндіру және иммуносупрессорлық жасушаларды белсендірілуі/жинақтау арқылы ісіктердің пайда болуына және прогрессиясына ықпал етеді [2]. Кейінгі онжылдықта супрессорлық жасушалар ішінде миелоидтық супрессорлық жасушалар MDSC (Myeloid Derived Suppressor Cells) деп аталатын жасушаларға ерекше назар аударлуда [3]. MDSC тышқандарда Gr-1^{+}/CD11b^{+} маркерлері бойынша анықталған, гранулацитарлы (G-MDSC) CD11b^{+}Ly6G^{+}Ly6C^{low} фенотипімен және моноцитарлы (M-MDSC) CD11b^{+}Ly6G^{-}Ly6C^{high} фенотипімен екі негізгі субпопуляциямен сипатталады [4]. MDSC онкологиялық патологияда ең көп зерттелді, ол ісікке қарсы иммунитетті әлсіретіп, иммунотерапияның өнімділігін төмендететіні жануарлар үлгісінде анықталды [4]. Қалыпты кезде бұл жасушалар көп мөлшерде жілік кемігінде байқалғанмен, көкбаур мен шеткі аймақтық қанда негізінен анықталмаған. Біздің алдыңғы зерттеулер созылмалы адъювант артриты MDSC жүйелік көбейін тудыратынын, бұл көбею митоген-белсендірілген Т-жасушалардың пролиферациясын тоқтататынын анықтадық [5]. Қазіргі уақытта MDSC ісікке қарсі терапияны жүргізу кезіндегі потенциялды нысана реттінде қолдану қарастырылуда. Гемцитабин танымал ісікке қарсы препарат, ол ісік жасушаларының апоптозын тудыратын және ісіктің өсуін басады, сондай-ақ қабынуға қарсы қасиетке ие. Соңғы тышқандардың ісік үлгісіндегі зерттеулер гемцитабин Gr-1^{+}/CD11b^{+} миелиодтық супрессорлық жасушаларды элиминациялайтыны және ісікке қарсы иммундық активтілікті жоғарлататынын көрсетілді [6]. Біз MDSC жинақталуының жоғарыдағы факторланына негізделіп, созылмалы қабыну үдерістерінде көбейетін MDSC, осы қабынумен байланысты ісік дамуын белсендеіреді деп тұжырымдаймыз. Бұл зерттеудің мақсаты тышқандардағы созылмалы қабынудың адьювант артриты үлгісіндегі MDSC субпопуляцияларын фармакологиялық түзетудің, ісіктің өсуіне әсерін зерттеу болып табылады.

Зерттеу материалдары мен әдістері.
Қолданылған жануарлар
Бұл зерттеу жұмыстарына ҚР ДМ Онкология және радиология ғылыми-зерттеу институтының конвенциялық вивариа жағыдайында ұсталған дене салмақтары 25-30 г аталық CD1 линиалы аутбред тышқандар қолданылды.
Жануарлар үлгісін алу
Адъювант артрит сынақ тобындағы тышқандарға толық адъювант Фрейндті (“Sigma-Aldrich”, АҚШ) артқы аяғының табан ұлтаның астына 100 мкл ден бір рет енгізу арқылы тудырылды. Сосын сынақ тобтары үшін ісікке қарсы гемцитабин (“Eli Lilly”, АҚШ) препаратын 75 мг/кг және бақылау тобтары үшін натрий-фосфатты буфер (PBS), құрсақ қуысына 7-, 10- күндері енгізілді. Ал 14- күні тышқандардың тері астына Эрлих ісік жасушалары, 500 мың /0,1 мл де инекция жасалды [7]. Жалпы бақылаудың 28-күні тышқандардың ісігі өлшенді және көкбауры хирургиялық жолмен алынып көкбауыр мононуклеар жасушаларын алу үшін қолданылды.
Көкбауыр мононуклеарлық жасушалар суспензиясын алу
Тышқандардан хирургиялық жолмен алынған көкбауыр, айнек гомогенизатор көмегімен гомогенизацияланды. Эритроциттер амони-хлориты буфермен лизіс жасалды. Көкбауыр мононуклеар жасушалары құрамы өзгерісіне ағынды цитометрялық талдау жасалды
Ағынды иммуноцитофлуориметрия
Жасушалар фенотипі ағынды иммуноцитофлуориметрия көмегімен CD-маркерлерін анықтау жолымен бағаланды. Бұл үшін көкбауыр жасушалар суспензиясы фикоэритрин (PE), флуоресцеин-изотиоцианат (FITC) немесе перидинин-хлорофилл протеин (PerCP) таңбаларымен белгіленген CD-маркерлерге қарсы CD11b-APC, Ly6G-PerCP Cy5.5, Ly6C-AF-488, CD4-PerCP, CD3-FITC, CD8-PE Arginase-1-PE 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 бағаланды. Ал ROS продукциясын бағалау үшін біз флуоресцентті 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 $P \leq 0,05$ мәнділік деңгейінде анық есептеді.

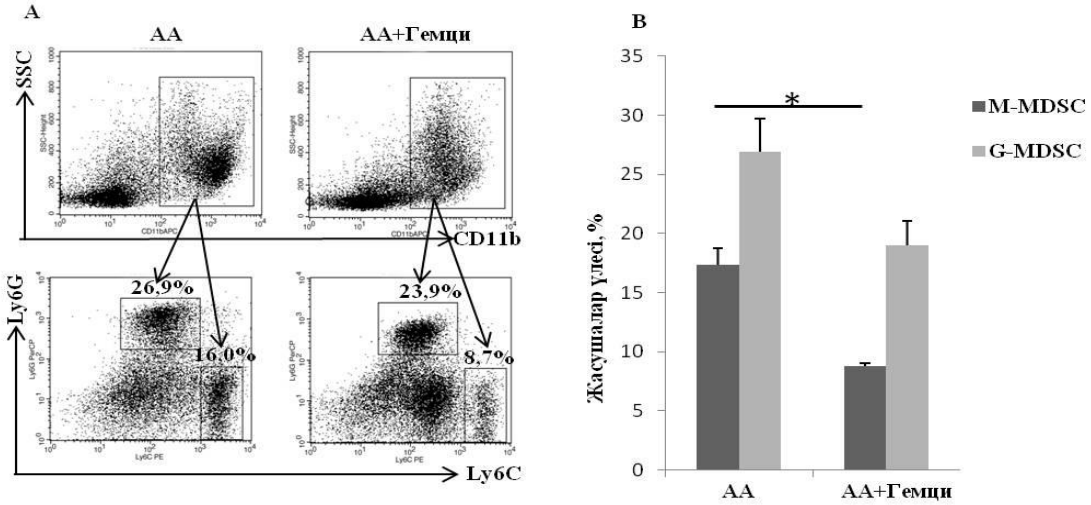
Зерттеу нәтижелері.
1.Созылмалы қабынудың ісіктің өсуіне әсері бағаланды
Созылмалы қабынудың ісіктің өсуіне әсерін зерттеу жұмысы интакті және адьювант артриты тышқандарда (АА) (әр топта 5 тышқан) жүргізілді. Ісіктің өсуіне созылмалы қабынудың әсері механизімін зерттеу үшін интакті (PBS енгізілді) және екі апталық созылмалы қабыуы бар тышқандарға қарцинома Эрлих ісік жасушаларын тері астына енгізілді.Сосын 2-аптаның соңына қарай екі тобтағы тышқандар эвтаназия жасалыды. Тері астына көшірілген карцинома Эрлих ісігі алынып және май ұлпаларынан тазаланып өлшенді. Зерттеулер көрсеткіштері созылмалы қабынудың адъювант артрит үлгісіндегі (АА) тышқандарға енгізілген ісіктің салмағы, созылмалы қабынусыз (PBS) енгізілген ісікке қарағанда айтарлықтай нақтылы жоғары екені анықталды (сурет-1). Созылмалы қабынудың нақтылы ісік өсуіне әсерін бағалау үшін біз АА және PBS тобындағы тышқандарың құрсақ қуысна тәжірибе басталғаннан

кейінгі 7- және 10-күндері гемцитабин (PBS+Гемци, АА+Гемци) препапатымен емдеу жүргіздік. ал бақылау тобтары (АА) үшін физолгиялық ерітінді енгізлді. Сосын 14-күні Эрлих жасушалары тері астына инекция жасалып 28- күні тышқандар эвтаназия жасалып ісіктері өлшенді. Алынған нәтижелерде созылмалы қабынуға гемцитабин препаратын инекциялау, емделмеген тобпен салыстырғанда қарцинома Эрлих ісігінің өсуін айтарлықтай нақты баяулайтыны, ал ісік алды енгізілген гемцитабин ісіктің дамуына әсері болмайтыны анықталды (сурет-1).

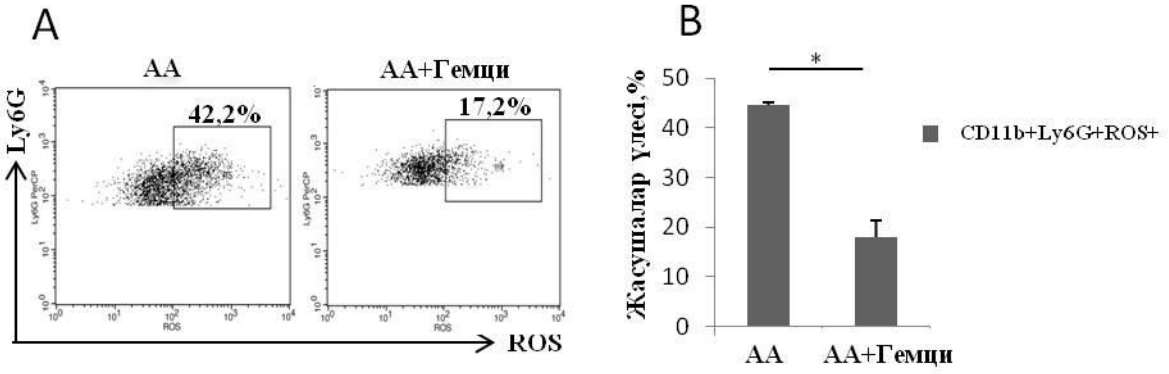


Сурет-1- Әр топтағы Эрлих карциномасы дамуының өзгерісі.
M±SD түріндегі мәліметтер. Тобтар арасындағы айрмашылықтың нақтылығы *P≤0,01.

2. Созылмалы қабынуға фармакологиялық әсер етудің көкбауыр жасушалар құрамына әсерін бағалау
Бұл үшін әр тобтағы тышқандар көкбауыры хируриялық жолмен алынып мононуклеар жасуша фракциясына салыстымалы цитофлуриметриялық талдау жасау арқылы гемцитабин әсері бағаланды. Зерттеу нәтижелері көрсеткендей шыныменде гемцитабин көкбауырдағы $CD11b^{+}Ly6G^{-}Ly6C^{high}$ M-MDSC үлесін бақылау тобымен салыстрғанда айтарлықтай нақтылы төмендетті, бірақ $CD11b^{+}Ly6G^{+}Ly6C^{low}$ G-MDSC- да айтарлықтай нақтылы өзгері болмады (сурет-2).
Сонымен қатар MDSC супрессорлық функция маркерлеріне талдау жалды. G-MDSC иммуносупрессорлық функциясы жанамалай, оттегінің активті формасы (ROS) негізінде жүреді. Жүргізілген фенотиптік талдаулар сынақ тобындағы жануарлардың ROS продукциясының деңгейі G-MDSC фракциясында, бақылау тобымен салыстырғанда нақтылы төмен болғанын көрсетті (сурет 3), керісінше M-MDSC де аргиназа-1 экспрессиясының айрмашылығы анықталмады (мәліметтер көрсетілмеді).

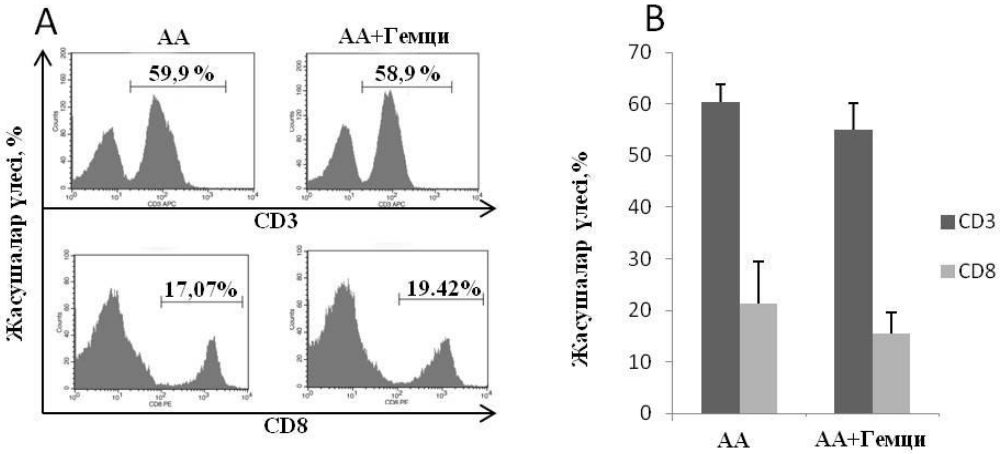


Сурет 2 – Бақылау (АА) және сынақ (АА+гемцитабин) тышқандардың көкбаурындағы $CD11b^{+}Ly6G^{-}Ly6C^{high}$ (M-MDSC) және $CD11b^{+}Ly6G^{+}Ly6C^{low}$(G-MDSC) жасушалар құрамының өзгерісі. А) Цитометриялық репрезентация мәліметтері. В) M±SD түріндегі мәліметтер. Тобтар арасындағы айрмашылық *P≤0,05.



Сурет 3 – Бақылау (АА) және сынақ (АА+гемцитабин) тышқандардың көкбаурындағы CD11b+Ly6G+Ly6C^{low}(G-MDSC) жасушалардың ROS продукциясының өзгерісі.А) Цитометриялық репрезентация мәліметтері В) M±SD түріндегі мәліметтер. Тобтар арасындағы айрмашылық *P≤0,05

Сондай–ақ гемцитабин иммунокомпетенті жасушалар CD3 CD8 және CD4 (мәліметтер көрсетілмеді) жасушалардың құрам өзгерісіне әсер етпеді (сурет-4). Бұл ісікке қарсы иммундық жасушаларға супрессорлық әсердің азаюуынан немесе гемцитабинің селективті әсері болуы мүмкін.



Сурет 4 – Бақылау (АА) және сынақ (АА+гемцитабин) тышқандардың көкбаурындағы CD3 және CD8 жасушалар құрамының өзгерісі.А) Цитометриялық репрезентация мәліметтері В) M±SD түріндегі мәліметтер

Алынған нәтижелерді талдау және қортынды.

Созылмалы қабыну көптеген механизмдер арқылы онкологиялық ауруларды дамытуға ықпал етеді [2]. Біздің нәтижелер созылмалы қабынудың жергілікті адъювант артрит фонда енгізілген карцинома Эрлих ісігінің өсуі, созылмалы қабынусызбен салыстырғанда айтарлықтай жоғары болатынын көрсетті. Бұл қатерлі ісіктердің бастамасы мен дамуына созылмалы қабыну ықпал етеді деген гипотезаға сәйкес. Яғни ол қабындырғыш медиаторларды өндіру және иммуносупрессорлық жасушаларды белсендірілуі/жинақтау арқылы ісіктердің пайда болуына және прогрессиясына ықпал етеді. Бұл процессте MDSC көбейетіні белгілі [5]. Созылмалы қабыну ісіктің қалыптасуына және прогрессиясына мүмкіндік беретін иммуносупрессивті микро ортаны қалыптастырып, ісікассоцирленген MDSC, ісікке қарсы жауабқа қатысушы жасушаларды тежейді [8]. Яғни бұл созылмалы қабыну кезінде пайда болған MDSC ісікке қарсы иммунитетті жаныштауының және ісіктің шектеусіз өсуіне оң әсер еткеннің нәтижесі болуы мүмкін. Гемцитабин MDSC қарсы цитотоксикалық әсер ететіне негізделіп [6], біз зерттеумізде созылмалы қабыну кезіндегі MDSC ді фармакологиялық кореккциясына ісікке қарсы антибиотик гемцитабинді қолдандық. Алынған мәлімет бойынша көкбауырдағы M-MDSC санының төмендеуіне ілесе, көшірілген карцинома Эрлих өсуінің төмендеуы байқалды. Бірақ G-MDSC санда айтарлықтай нақтылы өзгеріс болмауы, оның қысқа өміршең жасуша болғандығынан болуы мүмкін.Уйткені гемцитабин негізінен тез пролиферация жасайтын жасушаларға әсер ететіні белгілі. Сондай-ақ біздің алдынғы зерттеулерде созылмалы қабыну кезіндегі MDSC субпопуляциялары Т-жасушаның активтілігі мен пролиферациясын басуға арналған тестте, M-MDSC Т- жасушалардың пролиферациясын G-MDSC мен салыстырғанда жоғары деңгейде супрессиялады көрсеткен едік [5], ал басқада жұмыстарда G-MDSC –ға қарағанда M-MDSC көбірек супрессорлы екендігін көрсеткен [9]. Бұл қабыну процесінің ісіктің өсуін белсендедіруі M-MDSC есебінен жүретінін куаландырады. MDSC супрессорлық әсері олардан өндірілетін әртүрлі факторлармен байланысты. G-MDSC иммуносупрессорлық функциясы жанамалай, оттегінің активті формасы (ROS) негізінде жүреді, ол Т-жасушалармен тікелей байланысты талап ететін, қысқа өміршең молекула. Осылайша, G-MDSC негізінен антиген-спецификалық жауапты жаныштауға қатысады. M-MDSC өз кезегінде NO және аргиназаны синтездеп, антиген –тәуелсіз Т- жасушалық жауапты, жасушалармен тікелей байланыссыз-ақ эффективті басады [10]. MDSC супрессорлық активтілігіне жүргізілген фенотиптік талдаулардағы, гемцитабин қабылдаған жануарлардың көбауырындағы M-MDSC фрақциясында супрессорлық молекула аргиназа продукциясының өзгермеуі, адъювант артрит фондағы ісіктің дамуы кезіндегі M-MDSC иммуносупрессорлық әсері, басқа супрессорлық факторлар арқылы жүруі мүмкін. Алайда G-MDSC фракциясында ROS продукциясының деңгейі нақтылы төмен болуы, гемцитабин

препаратының антиоксидант әсерінен болуы мүмкін [11]. Созылмалы қабыну кезіндегі көшірілген ісіктің дауына қатысатын басқада иммундық жүйе жасушаларына (CD3, CD8, CD4) гемцитобиннің цитотокцикалық әсер етпеуі, оның селективті әсерінің нәтижесі екенін куаландырады. Сонымен қатар бұл ісіктің өсуінің өзгерісіне MDSC қатысатынын көрсетеді. Алынған нәтижелер созылмалы қабынудың ісіктің өсуін, иммносупрессорлық MDSC белсенділігі арқылы ынталандыратынын көрсетті. MDSC жоюға бағытталған созылмалы қабыну процессін емдеу, қабынуға байланысты онкогенезді болдырмау үшін пайдаланылуы мүмкін. Созылмалы қабыну кезінде олардың фармакологиялық түзету, сүйек кемігінен MDSC жасақталып қабыну ошағымен шеткі аймақтарға жылжыуын тосып, созылмалы қабынған мүшелер мен тіндердегі қатерлі ісіктерінің алдын алу немесе басқада локализацияланған ісіктерінің басталуы және прогрессиясын болдырмау үшін профилактикалық болуы мүмкін.

Бұл жұмыс ҚР ҒБМ ҒК AP05131710 «Тәжірибеде ісіктің өсуінің стимуляторы болатын созылмалы қабынуды болдырмау үшін миелоидтық супрессорлық жасушалардың (MDSC) коррекциясына фармакологиялық жолдарды әзірлеу» жобасы аясында жасалды.

ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1 Feghali C.A., Wright T.M. Cytokines in acute and chronic inflammation// Front Biosci. – 1997. – N1.- P.12-26
2 Wang D, DuBois R.N. Immunosuppression associated with chronic inflammation in the tumor microenvironment//Carcinogenesis. – 2015. - №10(36).- P.1085–1093.
3 Gabrilovich D.I., Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system // Nature Rev. Immunol. - 2009. - V.9. – P. 162-174
4 Wang Z., Liu Y., Zhang Y., Shang Y., Gao Q. MDSC-decreasing chemotherapy increases the efficacy of cytokine-induced killer cell immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma and pancreatic cancer // Oncotarget. – 2016. - №7(4). - P. 4760-4769. doi:10.18632/oncotarget.6734.
5 Perfilyeva Y.V., Abdolla N., Ostapchuk Y.O., Tleulieva R., Krasnoshtanov V.C., Belyaev N.N. Expansion of CD11b+Ly6Ghigh and CD11b+CD49d+ myeloid cells with suppressive potential in mice with chronic inflammation and light-at-night-induced circadian disruption // Inflammation Research. – 2017. - №66(8). - P.711-724
6 Suzuki E., Kapoor V., Jassar A.S., et al. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity // Clin Cancer Res. – 2005. - №11. - P.6713–6721.
7 Subiza J.L., Vinuela J.E., Rodriguez R., Gil J., Figueredo M.A., Dela Concha E.G. Development of splenic natural suppressor(NS) cells in Ehrlich tumor-bearing mice // Int J Cancer. - 1989. - №44. - P.307–314
8 Umansky V., Blattner C., Gebhardt C., Utikal J. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression // Vaccines. – 2016. - №4. – P. 36-41.
9 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. – P. 121-150. doi:10.1038/ncomms12150.
10 Je-In Youn and Dmitry I. Gabrilovich The biology of myeloid-derived suppressor cells: The blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity // Eur J Immunol. – 2010. - №40(11). - P.2969–2975.
11 Dağli A.F., Karataş A., Orhan C., Tuzcu M., Özgen M., Şahin K., Koca S.S. Antiinflammatory and antioxidant effects of gemcitabine in collagen-induced arthritis model // Turk J Med Sci. – 2017.- №47(3). - P.1037-1044. doi: 10.3906/sag-1606-80.

Н. Абдолла[1,2], Ю.В. Перфильева[1], Е.О. Остапчук[1], Р. Тлеулиева[1], В.К.Красноштанов[3], С:Т.Тулеуханов[2] Н.Н. Беляев[4]
[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-исследовательский институт онкологии и радиологии, Алматы, Казахстан
[4]Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

МИЕЛОИДНЫЕ СУПРЕССОРНЫЕ КЛЕТКИ (MDSC), АКТИВИРОВАННЫЕ ХРОНИЧЕСКИМ ВОСПАЛЕНИЕМ, СТИМУЛИРУЮТ РОСТ ОПУХОЛИ

Резюме: В настоящей работе исследовано влияние фармакологической коррекции MDSC в экспериментальной модели хронического воспаления, комбинированного с трансплантированной опухолью, для стимуляции противоопухолевого иммунитета и элиминации опухоли. Полученные результаты показывают, что хроническое воспаление способствует росту опухоли посредством активации иммуносупрессорных MDSC, а терапия хронических воспалительных процессов, направленных на элиминацию MDSC, может быть использована для предотвращения возможного онкогенеза.
Ключевые слова: Хроническое воспаление, миелоидные супрессорные клетки, адъювантный артрит, карциннома Эрлиха

N. Abdolla[1, 2], Y.V. Perfilyeva[1], Y.O. Ostapchuk[1], R. Tleulieva[1], V.K. Krasnoshtanov[3], S.T. Tuleuhanov[2], N.N. Belyaev[4]
[1]M.A.Aitkhozhin's Institute of Molecular Biology and Biochemistry
Laboratory of Molecular Immunology and Immunobiotechnology
[2]Al-Farabi Kazakh National University
[3]Kazakh Research Institute of Oncology and Radiology, Almaty, Kazakhstan
[4]Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia

MYELOID DERIVED SUPPRESSOR CELLS (MDSCS) ACTIVATED BY CHRONIC INFLAMMATION STIMULATE TUMOR GROWTH

Resume: The present work researched the effect of pharmacological correction of MDSCs in an experimental model of chronic inflammation combined with transplanted tumors for the stimulation of antitumor immunity and subsequent tumor elimination. The obtained results suggest

that chronic inflammation promotes tumor growth through activation of immunosuppressive MDSCs, and the therapy of chronic inflammatory processes directed at MDSC elimination may be used for the prevention of possible inflammation-related carcinogenesis.
Keywords: chronic inflammation, myeloid derived suppressor cells, adjuvant arthritis, Ehrlich carcinoma