

## **Абдолла Нұршаттың**

«6D060700 – Биология» мамандығы бойынша философия докторы (PhD)  
дәрежесін алу үшін дайындалған диссертациясына

### **АҢДАТПА**

#### **Созылмалы қабынудың әртүрлі тәжірибелік үлгілеріндегі миелоидтық супрессорлық жасушаларды зерттеу**

**Зерттеу жұмысының жалпы сипаттамасы.** Диссертациялық жұмыс созылмалы қабынудың тәжірибелік үлгілеріндегі және олардың бірігуіндегі, миелоидтық супрессорлық жасушалардың (MDSC) функциялық және фенотиптік ерекшелігін жан-жақты зерттеуге, сонымен бірге, MDSC-ді нысаналы элиминациялаудың мүмкін болатын жолын өңдеуге арналған.

**Зерттеу тақырыбының өзектілігі.** Осы уақытқа дейінгі клиникалық мәліметтерге сүйенсек, созылмалы қабыну көптеген аурулардың, оның ішінде басым көпшілік онкологиялық аурудың басталуы мен асқынуына қолайлы орта ретінде рөл атқаратыны сипатталған. Ол қабынуға қатысатын медиаторлардың көп мөлшерде өндірілуін индукциялау негізінде иммуносупрессорлық функциясы бар жасушаларды активтендіреді немесе олардың қабыну аймағы мен шеткі лимфоидық органдарда жинақталуын ынталандырады. Супрессорлық жасушалардың қалыптан тыс көбеюі, иммундық жүйенің эффекторлы жасушаларының өзіндік функцияларын толық атқаруына кедергілер келтіреді. Нәтижесінде, иммундық жүйеде ауытқулар пайда болып, бөгінде антигендердің толық жойылмауы, қабыну процесінің ұзаруы, ісік жасушаларына бағытталған иммундық қадағалаудың төмендеуі байқалады және ісік жасушаларының прогрессиясы мен метастаз жасауына қолайлы орталар қалыптасады. Сондай-ақ, қабыну процестерінің өзгеруіне әсер етіп, ісіктердің дамуын активтендіретін тағы бір фактор циркадиандық ырғақтардың реттелуінің бұзылуы (түнгі жарықтандыру, түнгі жұмыс, ұйқының бұзылуы т.б.). Ол қабыну сигналдары мен иммундық жауаптардың реттелуіне теріс әсер ете отырып, қатерлі ісік ауруларының пайда болу ықтималдығын арттыратын иммуносупрессорлы ортаның қалыптасуына қатысады.

MDSC иммуносупрессорлы ісік микроортасының маңызды жасушалық компоненттерінің бірі. Физиологиялық тұрғыда, MDSC жүктілік кезінде ұрықты аналық иммунитет жасушаларының шабуылынан қорғау үшін, сондай-ақ жарақаттан кейін ұлпалардың қалпына келуі кезінде, жіті қабыну процесін басу үшін табиғи түрде пайда болатын иммуносупрессорлы жасушалар болып табылады. Сондай-ақ, олар сау организмдегі гомеостазды сақтауға қатысады. Алайда қатерлі ісік сияқты кейбір созылмалы аурулар иммундық қадағалаудан өту

және өздерінің кедергісіз өсуі үшін MDSC-дің иммуносупрессорлы әлеуетін пайдаланады. MDSC рөлі қатерлі ісік биологиясында ең көп зерттелді. Олардың ісікке қарсы иммунитетті әлсіретіп, иммунотерапияның өнімділігін төмендететіні жануарлар үлгісінде және қатерлі ісік науқастарында анықталған. Ал осы жасушаның қатерлі ісікпен ауыратын науқастардың қанындағы жоғары деңгейі аурудың асқынуымен байланысты болды.

Қатерлі ісік биологиясында зерттелген MDSC-дің рөлі туралы айтарлықтай жетістіктерге қарамастан, онкологиялық аурулардың дамуына қолайлы жағдай жасайтын созылмалы қабыну процесіндегі MDSC-дің рөлі туралы зерттеулер жеткілікті емес. Көптеген MDSC зерттеулерінде жануарлардың қатерлі ісік үлгілері қолданылады, бұл созылмалы қабынудың алғашқы сатыларындағы MDSC-дің характеристикасы, рөлі және олардың қабыну процесіне қатысу-қатыспауы туралы мәліметтерді бере бермейді. Сонымен қатар, кейінгі зерттеулерде созылмалы циркадиандық ырғақтың ауытқулары қабыну факторларының (TNF $\alpha$  IL-6 және C-реактивті ақуыз) пайда болуын көбейтіп иммундық жүйенің эффекторлы жасушаларның дисфункциясын тудыратыны анықталған. Бірақ осы бұзылыстың иммуносупрессорлы жасушаларға, соның ішінде, MDSC-ге әсері зерттелмеген. Сондықтан, иммунологиялық гомеостаз бен қатерлі ісік қаупінің жоғарлауын өзгертуге қабілетті MDSC-ді зерттеу өзекті бағыт.

Кейінгі жылдары, қатерлі ісік ауруында MDSC-ді модуляциялау немесе элиминациялаудың тиімді стратегиялары зерттелуде. Бұл мәселені шешудің бүгінде кең таралған әдістерінің бірі клиникада пайдаланатын ісікке қарсы препараттарды қолдану. Осы саладағы MDSC-ді элиминациялаудың біршама жетістіктеріне қарамастан, фармакологиялық препараттардың потенциалды кері әсері, қатерлі ісікке шалдыққан науқастар үшін оларды қолдануда сенімсіздік тудырады. Сондықтан MDSC-спецификалық цитотоксикалық агенттерді әзірлеу және бағалау қажет.

Жоғарыда аталған мәселелерді ескере отырып, созылмалы қабыну кезіндегі MDSC-дің функциялық және фенотиптік сипаттамаларын және созылмалы қабыну индукциялаған MDSC-дің қатерлі ісіктің дамуындағы рөлін жан-жақты зерттеу, әртүрлі қабыну аурулардың механизмдері туралы іргелі білім алуға және оларды тиімді емдеудің жаңа жолдарын ашуға көмектесетін иммунологиялық зерттеулердің маңызды бағыты болып табылады.

**Зерттеу жұмысының мақсаты:** созылмалы қабынудың тәжірибелік үлгілерінде MDSC-дің фенотиптік және функциялық ерекшеліктерін жан-жақты зерттеу және MDSC-ге нысаналы цитотоксикалық әсер етудің тиімді фармакологиялық жолын өңдеу болып табылады.

Мақсатқа жету үшін келесі **міндеттер** қойылды:

1 Жануарлардағы созылмалы қабынудың адьювант артрит үлгісіндегі MDSC-дің фенотиптік және функциялық ерекшелігін зерттеу;

2 Созылмалы қабынудың жануарлар үлгісіндегі MDSC-дің фенотиптік және функциялық ерекшелігіне түнде жарықтандырудың әсерін зерттеу;

3 Созылмалы қабынумен индукцияланған MDSC-дің трансплантацияланған ісіктің өсуіне әсерін зерттеу;

4 MDSC-ді нысаналы элиминациялау үшін фармакологиялық жолды өңдеу.

**Зерттеу нысаны.** Тәжірибелік жануарлардың көкбауырындағы және сүйек кемігінен алынған MDSC.

**Зерттеу пәні.** Созылмалы қабыну кезіндегі MDSC-дің функциялық және фенотиптік сипаттамасы.

**Зерттеу әдістері.** Жануарлардың тәжірибелік үлгісін алу, перкол градиентінде изопикникалық центрифугалау, жасушаларды өсіру, CFSE пролиферация тесті, МТТ тесті, иммуномагниттік сепарация, ағынды цитофлуориметрия, иммунноферментті талдау, спектрофотометр, гелфилтрация.

**Зерттеудің ғылыми жаңалығы:**

- Алғаш рет созылмалы адьювантты артриттің тышқан үлгісінде супрессорлық потенциалға ие CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>high</sup> гранулоцитті және CD11b<sup>+</sup>CD49d<sup>+</sup> моноцитті MDSC субпопуляциялар үлесінің көбейетіні көрсетілді.

- Түнде жарықтандыру созылмалы қабыну тудырылған тышқандардағы CD11b<sup>+</sup>CD49d<sup>+</sup> және CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>high</sup> MDSC субпопуляцияларының жиналуын арттыратыны анықталды.

- Созылмалы қабыну активтендірген MDSC-дің трансплантацияланған ісіктің өсуін ынталандыратыны анықталды.

- Экзогенді ісік некроз факторы альфа (TNF $\alpha$ ), *in vitro* жағдайында, MDSC-дің Т жасушаларға қарсы супрессорлық активтілігін күшейтетіні және олардың CD62L экспрессиясын индукциялайтыны анықталды.

- Созылмалы қабыну жағдайында трансплантацияланған ісіктің өсуінің тездеуі, CD62L экспрессиялайтын MDSC үлесінің көбеюіне әкелетіні анықталды.

- Альфа-фетопротеин (AFP), тышқанның G-MDSC және M-MDSC субпопуляцияларымен селективті байланысатыны анықтады.

- Цитотоксикалық конъюгат AFP-Даунорубин (AFP-DR) трансплантацияланған ісіктері бар тышқандардағы MDSC-ді селективті элиминациялайтыны, ісіктің өсуін тежеуге және NK жасушаларының деңгейін арттыруға қабілетілігі *in vitro* және *in vivo* жағдайында көрсетіді.

**Жұмыстың теориялық маңызы.** Диссертацияда алынған нәтижелер, созылмалы қабынумен байланысты ісіктердің өсуі мен созылмалы қабынудың дамуына қатысатын жасушалық механизмдер туралы білімді тереңдетеді. Созылмалы қабыну кезіндегі MDSC популяциясының көбеюінің анықталуы, сондай-ақ созылмалы қабынумен байланысты ісіктердің өсуін ынталандырудағы MDSC рөлі, болашақта созылмалы қабыну ауруларымен және онымен байланысты қатерлі ісіктердің иммунотерапиясы үшін әдістерді жетілдіруге қолданылуы мүмкін. MDSC индукциясындағы жарық стресінің маңызы туралы алынған

мәліметтер, циркадиандық ырғақтары бұзылған (түнгі уақыттағы жұмыс істеу) адамдарда туындайтын созылмалы қабыну мен онкологиялық аурулардың жиілеу мәселесіне жаңа көзқараспен қарауға және созылмалы аурулардың алдын алу мен емдеуге жаңа бағыттар береді.

**Зерттеудің практикалық құндылығы.** Диссертация нәтижелері практикалық әлеуетке ие. AFP негізіндегі цитотоксикалық конъюгат иммуносупрессорлық MDSC-ді элиминациялауға қабілеті ісікке қарсы тиімді иммунотерапиялық әдіс екендігін көрсетті. Бұл нәтижелер клиникалық иммунологтар, сонымен қатар онкологиялық науқастар үшін жаңа терапия әдістерін жетілдірумен айналысатын онкологтар үшін де маңызы зор. Осы жұмыстың аясында AFP байланыстыратын MDSC-ді анықтау әдісіне патент алынды (№ 32074, 18.04.2017 ҚР патенті).

#### **Зерттеудің негізгі нәтижелері мен тұжырымдары:**

1 Тышқандарда жергілікті созылмалы қабыну (адьювант артрит) тудыру көкбауырдағы гранулоцитті ( $CD11b^{+}Ly6G^{high}$ ) және моноцитті ( $CD11b^{+}CD49d^{+}$ ) миелодтық супрессорлық жасушалар (MDSC) үлесінің көбеюіне алып келеді, бұл MDSC жасушаларының созылмалы қабынудың дамуындағы маңызды құрамдас бөлігі екендігін көрсетеді.

2 Түнгі жарықтандыру (жарықтық стресс) MDSC-дің көкбауырға және қабыну ошағына миграциялануына жауапты, CD62L және CD195 молекулаларын экспрессиялайтын, гранулоцитті және моноцитті MDSC үлесінің жоғарылауын тудырады. Бұл кезде, қанда қабынуды ынталандырушы (IL-6) және қабынуға қарсы (TGF- $\beta$ 1) цитокиндердің деңгейі жоғарылайды. Жарықтық стрестің адьювантты артритпен тіркесуі тышқандардағы MDSC деңгейінің айтарлықтай жоғарылауына әкеледі.

3 Жергілікті созылмалы қабыну активтендірген MDSC трансплантацияланған ісіктің өсуін ынталандырады, бұл кезде MDSC субпопуляциялар үлесі және қабынуды ынталандыратын цитокиндер S100 және TNF $\alpha$  деңгейі жоғарылайды. Сонымен қатар, MDSC субпопуляцияларының екеуі де CD62L экспрессиясының жоғарылауымен сипатталады. *In vitro* тәжірибелерде, TNF $\alpha$  сүйек кемігіндегі MDSC-дің CD62L экспрессиясын және олардың CD8<sup>+</sup> Т лимфоциттерге қарсы супрессорлық активтілігін күшейтетіні анықталды.

4 Алғаш рет онкофетальды ақуыз, AFP, MDSC субпопуляцияларымен таңдамалы байланысатыны анықталды. AFP-DR химиялық конъюгаты *in vitro* жағдайында моноцитті MDSC субпопуляциясына селективті цитотоксикалық әсер етеді. Ал, *in vivo* жағдайында инъекциялау MDSC деңгейін едәуір төмендетеді, ал NK жасушаларының деңгейін жоғарылатады, бұл тышқанның тері асты Эрлих ісігі өсуінің баяулауына және тірі қалуының жоғарлауына әкеледі.

Диссертацияда алға қойылған міндеттердің барлығы орындалды.

#### **Қорғауға ұсынылатын негізгі қағидалар:**

1 Созылмалы қабыну көкбауырда супрессорлық потенциалы бар MDSC жинақталуын тудырады.

2 Түнде жарықтандыру стресі CD62L және CD195 адгезиялық молекулалар экспрессиясын жоғарылату арқылы миграциялану қабілеті бар MDSC үлесін көбейтеді.

3 Созылмалы қабыну индукциялаған MDSC ісіктің өсуін ынталандырады.

4 Қабынуды ынталандыратын TNF $\alpha$  цитокині, *In vitro* жағдайында MDSC-дің адгезиялық молекуласы CD62L экспрессиясын және супрессорлық активтілігін жоғарылатады.

5 AFP ісік тудырылған тышқандардан алынған MDSC субпопуляцияларымен таңдамалы байланысады.

6 «*In vitro*» зерттеуінде AFP-DR M-MDSC субпопуляциясына селективті цитотоксикалық әсер көрсетеді.

7 AFP-DR конъюгатты ісік тудырылған тышқандардағы MDSC-ді нысаналы элиминациялайды, бұл NK жасушалар үлесінің жоғарылауымен байланысты ісік өсуінің баяулауына әкеледі.

**Тақырыптың зерттеу деңгейі.** Диссертациядағы зерттеу жұмыстары тәжірибелік үлгілерді қолданумен жасушалық және молекулалық деңгейде орындалды.

**Автордың жеке үлесі.** Зерттеу тақырыбы бойынша әдебиеттерге талдау жасау, тәжірибелер жүргізу, статистикалық өңдеу және алынған нәтижелерге талдау жасау, сонымен қатар диссертацияны жазу автордың жеке қатысуымен орындалды.

**Жұмыстың ғылыми зерттеу бағдарламасымен байланыстылығы.** Бұл диссертациялық жұмыс ҚР 244/ГФЗ «Цитотоксикалық заттармен конъюгацияланған альфа-фетопротеин көмегімен миелоидтық супрессорлық жасушалар элиминациясының, ісікке қарсы иммунитет пен ісіктің өсуіне әсерін тәжірибелік жануарларда зерттеу» жобасы аясында (2013-2015 жж), сонымен қатар AP05131710 «Тәжірибеде ісіктің өсуінің стимуляторы болатын созылмалы қабынуды болдырмау үшін миелоидтық супрессорлық жасушалардың (MDSC) коррекциясына фармакологиялық жолдарды әзірлеу» жобасы аясында (2018-2020 жж) орындалды.

**Жұмыстың сыннан өтуі.** Диссертациялық жұмыстың зерттеу нәтижелері төмендегі халықаралық ғылыми конференцияларға ұсынылды және талқыланды:

- «Фараби әлемі» студенттер мен жас ғалымдардың халықаралық ғылыми конференциясы, 14-16 сәуір 2015 ж., Алматы, Қазақстан;

- «Биотехнологияның заманауи мәселелері: зертханалық зерттеулерден өндіріске» атты халықаралық ғылыми-практикалық конференция, 5-6 сәуір 2016 ж., Алматы, Қазақстан;

- «Biomedical innovation for healthy longevity» халықаралық ғылыми конференциясы, 25-28 сәуір 2016 ж., Санкт-Петербург, Россия;

- Студенттер мен жас ғалымдардың «Фараби әлемі» IV халықаралық ғылыми конференциясы, 10-11 сәуір 2017 ж., Алматы, Қазақстан,

- Студенттер мен жас ғалымдардың «Фараби әлемі» V халықаралық ғылыми конференциясы, 10-11 сәуір 2018 ж., Алматы, Қазақстан;

- «Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine» халықаралық ғылыми конференциясы, 31 қазан- 2 қараша 2018 ж., Прага, Чехия;

- «Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий» халықаралық ғылыми конференциясы, 8-11 қазан 2019 ж., Санкт-Петербург, Россия;

- «Молекулалық биология, биотехнология, биохимия саласындағы іргелі зерттеулер мен инновациялар» халықаралық ғылыми конференция, 28-29 қараша 2019 ж., Алматы, Қазақстан;

**Басылымдар.** Диссертациялық жұмыстың негізгі нәтижелері баспадан шыққан 14 ғылыми еңбекте жарияланған, оның ішінде 4 мақала Қазақстан Республикасы Білім және Ғылым министрлігінің Білім және Ғылым саласындағы бақылау комитеті ұсынған ғылыми журналдарда; 3 мақала *Web of Science* және *Scopus* деректер қорына енетін импакт-факторы бар халықаралық ғылыми журналдарда; 3 тезис халықаралық және шетелдік конференция материалдарында; 4 тезис Қазақстандық халықаралық конференция материалдарында жарияланды. Сонымен қатар 1 өнертабысқа Қазақстандық патент алынды.

**Диссертацияның құрылымы.** Диссертациялық жұмыс 120 мәтіндік бетте жазылды. Оның құрамына нормативтік сілтемелер, белгілеулер мен қысқартулар, кіріспе, әдебиеттерге шолу, зерттеу материалдары мен әдістер, зерттеу нәтижелері және оларды талқылау, қорытынды және 267 пайдаланылған әдебиеттер тізімі кіреді. Диссертация құрамында 46 сурет, 1 кесте және 2 қосымша бар.