

әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті

ӘОЖ 612.017.1:577.27

Қолжазба құқығында

АБДОЛЛА НҰРШАТ

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

6D060700 – Биология

Философия докторы (PhD)
дәрежесін алу үшін дайындалған диссертация

Ғылыми кеңесшілері:
Биология ғылымдарының докторы,
профессор Беляев Н.Н.,
PhD, MD, профессор Gabilovich D.I.
(Вистар институты, АҚШ)

Қазақстан Республикасы
Алматы, 2020 жыл

МАЗМҰНЫ

НОРМАТИВТІК СІЛТЕМЕЛЕР	5
АНЫҚТАМАЛАР	6
БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР	7
КІРІСПЕ	9
1 ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ	15
1.1 Миелоидтық супрессорлық жасушалар (MDSC)	15
1.1.1 MDSC, шығу тегі, зерттелу тарихы және номенклатурасы	15
1.1.2 MDSC фенотиптік маркерлерінің сипаттамасы	16
1.1.3 MDSC субпопуляцияларының сипаттамасы	19
1.1.4 MDSC жинақталуы мен активтенуі	20
1.1.4.1 MDSC жинақталуы мен активтенуіне қабыну факторлар әсері	21
1.1.4.2 MDSC жинақталуы мен активтенуіне ісіктен бөлінетін факторлар әсері	23
1.1.4.3 MDSC жинақталуы мен активтенуіне хемокиндер әсері	24
1.1.5 MDSC супрессорлық әсерінің механизмдері	25
1.1.5.1 Arg-1 және iNOS ферменттеріне тәуелді тежеу механизмі	26
1.1.5.2 ROS молеуласына тәуелді тежеу механизмі	27
1.1.5.3 TGF- β цитокиніне тәуелді тежеу механизмі	28
1.1.5.4 MDSC супрессиясының қосымша механизмдері	29
1.2 Созылмалы қабыну және MDSC	30
1.2.1 Созылмалы қабыну	30
1.2.2 Созылмалы қабынудың дамуындағы MDSC рөлі	31
1.2.3 Созылмалы қабынумен байланысты онкологиялық процестегі MDSC рөлі	32
1.3 MDSC функциясын тоқтатуға арналған зерттеулер	33
2 ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ	36
2.1 Зерттеу материалдары	36
2.1.1 Жануарлар	36
2.2 Зерттеу әдістері	36
2.2.1 Перкол дайындау	36
2.2.2 Қоректік орталарды дайындау	37
2.2.3 Фосфаты-тұзды буферін (PBS) және колонка буферін дайындау	37
2.2.4 AFP конъюгаттарын дайындау	37
2.2.5 Жануарлардың тәжірибелік үлгілерін алу	38
2.2.5.1 Адьювант артрит үлгісін алу	38
2.2.5.2 Жарықтандыру үлгісін алу	38
2.2.5.3 Эрлих ісік үлгісін алу	38
2.2.6 Лимфоорганның жасушалылығын бағалау	38
2.2.7 Көкбауыр моноклеарлы жасушалар суспензиясын алу	39
2.2.8 Сүйек кемігі жасушаларының өміршеңдігін анықтау	39
2.2.9 Сүйек кемігінен MDSC алу	40
2.2.10 MDSC популяциясын иммуномагниттік сепарациялау әдісі	40

2.2.11	Жасушалардың пролиферациясын анықтауға арналған тесттер	41
2.2.12	Ісік ұлпаларының диссоциациясы	41
2.2.13	AFP-FITC конъюгатының MDSC субпопуляцияларымен байланысуын бағалау	42
2.2.14	AFP конъюгаттарының Эрлих асцит жасушаларымен байланысуын бағалау	42
2.2.15	<i>In vitro</i> жағдайында AFP-DR конъюгатының цитотоксикалық әсерін бағалау	42
2.2.16	<i>In vivo</i> жағдайында MDSC популяцияларын элиминациялау	42
2.2.17	Ағынды иммуноцитофлуориметрия	43
2.2.18	ELISA	44
2.2.19	NO өнімін анықтау	44
2.2.20	Статистикалық талдау	45
3	ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛҚЫЛАУ	46
3.1	Созылмалы қабынудың адьювант артрит жануар үлгісіндегі MDSC фенотиптік және функциялық ерекшеліктерін зерттеу	46
3.1.1	Адьювант артрит үлгісіндегі MDSC фенотипін анықтау	46
3.1.2	Адьювант артрит үлгісіндегі MDSC супрессорлық активтілігін зерттеу	50
3.1.3	Адьювант артрит үлгісіндегі MDSC супрессорлық медиаторларын анықтау	51
3.2	Созылмалы қабынудың жануарлар үлгісіндегі MDSC фенотиптік және функциялық ерекшелігіне түнде жарықтандырудың әсерін зерттеу	53
3.2.1	Түнде жарықтандыру және біріккен үлгілеріндегі көкбауырдағы MDSC ерекшелігін зерттеу	53
3.2.2	Түнде жарықтандыру және біріккен үлгілеріндегі қан сарысуындағы цитокиндер деңгейін талдау	59
3.3	Созылмалы қабыну индукциялаған MDSC популяциясының трансплантацияланған ісіктің өсуіне әсерін зерттеу	62
3.3.1	Созылмалы қабынудың ісіктің өсуін ынталандырудағы MDSC рөлін анықтау	62
3.3.2	Созылмалы қабынумен байланысты ісіктің өсуінде MDSC фенотиптік ерекшеліктерін зерттеу	66
3.3.3	Созылмалы қабыну мен трансплантацияланған ісіктің өсу үлгісінде қан сарысуындағы цитокиндер деңгейін талдау	71
3.3.4	MDSC генерациясына TNF α цитокинінің әсерін зерттеу	73
3.4	MDSC популяциясын нысаналы элиминациялаудың фармакологиялық жолын өңдеу	81
3.4.1	AFP активтілігін бағалау	82
3.4.2	AFP-FITC конъюгатының MDSC популяцияларымен байланысуын бағалау	83
3.4.3	AFP-FITC конъюгатының негізгі иммунокомпетент жасушаларымен байланысуын бағалау	85

3.4.4	<i>In vitro</i> жағдайында AFP-DR конъюгатының MDSC популяциясына әсерін бағалау	86
3.4.5	<i>In vivo</i> жағдайында AFP-DR конъюгатының MDSC популяциясына әсерін бағалау	88
	ҚОРЫТЫНДЫ	97
	ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ	98
	ҚОСЫМША А	119
	ҚОСЫМША Ә	120

НОРМАТИВТІК СІЛТЕМЕЛЕР

Диссертацияда келесі стандарттар мен ережелерге сілтеме жасалды:

МЕМСТ 7.32-2001. Ғылыми-зерттеу жұмысы туралы есеп. Құрылымы және дайындау ережелері.

МЕМСТ 7.1-2003. Библиографиялық жазба. Библиографиялық сипаттама. Жалпы талаптар және құрастыру ережелері.

МЕМСТ 1613-2006. Тисті зертханалық практика. Негізгі ережелер.

ҚР ДМ 2009 жылғы 12 қарашадағы № 697 бұйрығы «Медициналық – биологиялық эксперименттер, клиникаға дейінгі (клиникалық емес) және клиникалық зерттеулер жүргізу ережесін бекіту туралы».

АНЫҚТАМАЛАР

Қабыну (латын тілінен: *inflammatio*) – организм ұлпаларының патогендер мен зиянды қоздырғыштарға (зақымдалған жасушалар мен ұлпалар) кешенді биологиялық жауабы. Бұл қорғаныстық жауапқа иммундық жасушалар, қан тамырлар және молекулалық медиаторлар қатысаты.

Жіті қабыну – бұл ұлпалардың зақымдалуына жауап ретінде тез басталатын қысқа мерзімді қабыну процесі, ол әдетте бірнеше минут немесе бірнеше сағат ішінде пайда болады және симптомдары бірнеше күнге созылады. Жіті қабынудың морфологиялық көрінісінде мастоциттер, нейтрофилдер және макрофагтар негізгі орынды иеленеді.

Созылмалы қабыну - бұл симптомдары бірнеше аптадан бірнеше жылға дейін ұзаққа созылатын, баяу қабыну реакциясы. Созылмалы қабыну кезінде супрессорлық жасушалар, Т жасушалар, плазмалық жасушалар және фибробластар негізгі қатысушы болады.

Созылмалы аурулар - созылмалы қабынудан дамиды жыл немесе одан да көп уақытқа созылатын және тұрақты медициналық көмекті қажет ететін аурулар.

Иммуносупрессия – иммундық жүйенің активтілігінің немесе тиімділігінің төмендеуі.

Иммундық эффекторлы жасушалар - организмдегі патогендерді танитын және оларға бастапқы иммундық жауап қайтаратын және денені қорғайтын жасушалар түрі. Оларға негізінен В жасушалар, цитотоксикалық Т жасушалар, плазмалық жасушалар, Т хелперлер, активтендірілген Т жасушалар және НК жасушалар кіреді.

Миелоидты жасушалар - бұл сүйек кемігіндегі миелоидтық бағаналы жасушалардан дифференциацияланатын жасушалардың гетерогенді популяциялары.

Адьювантты артрит – бұл жануарлардың аяғына құрамында қыздырылып активтілі жойылған *Mycobacterium tuberculosis* бактерияларының майдағы суспензиясын инъекциялау арқылы алынған созылмалы буын қабынуының үлгісі.

Эрлих ісік жасушалары – тышқанның сүт безінің спонтанды аденокарциномасының жасушалары. Ісік биологиясында жақсы қалыптасқан үлгі болып табылады.

Репрезентативті мәліметтер – цитометриялық талдауда алынған нәтижелердің орташа көрсеткіштеріне жақын сандық мәліметі немесе гейттеу стратегиясы.

БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР

АЖ	адьювантты артрит үлгіленген жануарлар
АЖЖ	адьювантты артрит және жарықтандыру үлгіленген жануарлар
АІЖ	адьювант артрит және ісік біріктірілген жануарлар
БЖ	бақылау жануарлар
ДМСО	диметилсульфоксид
ЖЖ	жарықтандырылған жануарлар
ТАФ	толық адьювант Фрейдт
ТҚО	толық қоректік орта
ІЖ	ісігі бар жануарлар
AFP	(alpha-fetoprotein) алфа-фетопротеин
AFP-DR	(alpha-fetoprotein-daunorubicin) алфа-фетопротеин-даунорубицин
APC	(Allophycocyanin) аллофикосианин
Arg-1	(Arginase 1) аргиназа 1
АТРА	(All-trans retinoic acid) алл-транс ретин қышқылы
BM	(Bone marrow) сүйек кемігі
CCL2	(C-C chemokine ligand 2) C-C хемокинді лиганд 2
CCL5	(C-C chemokine ligand 5) C-C хемокинді лиганд 5
CCR2	(C-C chemokine receptor 2) C-C хемокинді рецептор 2
ConA	(Concanavalin A) конканавалин А
CXCR4	(C-X-C chemokine receptor 4) C-R-C хемокинді рецептор 4
DC	(Dendritic cells) дендриттік жасушалар
DMEM	(Dulbecco's modified eagle medium) Дульбеккос Игл ортасы
DR	(Daunorubicin) даунорубцин
DCFDA	(2',7'-dichlorofluorescein diacetate) диацетат 2'-7'- дихлорфлуоресцеин
EDTA	(Ethylenediaminetetraacetic acid) этилендиаминотетраацетат қышқылы
ELISA	(Enzyme-linked immunosorbent assay) иммуноферменттік әдіс
FBS	(Fetal Bovine Serum) бұзаудың феталды сарысуы
FITC	(Fluorescein isotiocyanate) флуоресцеинизотиоцианат
G-MDSC	(Granulocytic myeloid-derived suppressor cells) гранулоцитті миелоидтық супрессорлық жасушалар
Gr-1	(Granulocytic receptor 1) гранулоциттік рецептор 1
GM-CSF	(Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) гранулоцит - макрофаг колония-ынталандрушы фактор
HIV	(Human immunodeficient viruse) адамның иммунтапшылық вирусы
HIF-1 α	(Hypoxia-inducible factor-1 alpha) гипоксия тудырытын фактор альфа-1
IDO	(Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase) индоламин 2, 3- диоксигеназа
IFN- γ	(Interferon gamma) интерферон гамма

IL	(Interleukin) интерлейкин
IMC	(Immature myeloid cells) жетілмеген миелоидты жасушалар
iNOS	(Inducible Nitric oxide synthases) индуцибельді азот тотығы синтаза ферменті
LPS	(Lipopolysaccharide) липополисахарид
L-Arg	(L-Arginin) L-аргинин
MDSC	(Myeloid-derived suppressor cells) миелоидтық супрессорлық жасушалар
MHC	(Major histocompatibility complex) негізгі гистосәйкестік комплексі
M-MDSC	(Monocytic myeloid-derived suppressor cells) моноциттік миелоидтық супрессорлық жасушалар
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид
NK	(Natural killer) табиғи киллер
NO	(Nitric oxide) азот тотығы
NS	(Natural suppressor) табиғи супрессор
PBS	(Phosphate Buffer Saline) фосфатты-тұзды буфер
PGE2	(Prostaglandin E2) простагландин E2
ROS	(Reactive Oxygen Species) реактивті оттегі түрі
RPMI-1640	(Roswell Park Memorial Institute -1640) 1640 қоректік ортасы
SDF-1 α	(Stromal Cell-Derived Factor 1) стромалды фактор 1 альфа
SD	(Standard deviation) стандартты ауытқулар
TCR	(T cell receptor) T-жасушалық рецептор
TGF- β 1	(Transforming Growth Factor 1 beta) трансформациялайтын өсу факторы 1 бета
TLR2	(Toll-Like Receptor 2) толл-тәрізді рецептор 2
TNF α	(Tumor Necrosis Factor alpha) ісік некроз факторы альфа
Treg	(T regulatory) T реттеуші

КІРІСПЕ

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. Қазіргі уақытта созылмалы аурулар медицинаның өзекті мәселесіне айналды. 2005 жылғы дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымының («World health organization, WHO») статистикалық мәліметі бойынша, жүрек-қан тамыр аурулары, қатерлі ісік, тыныс алу жолдарының аурулары, диабет т.б. созылмалы аурулардың салдарынан 58 миллион адам өлімге ұшыраған [1]. Ал 2018 жылғы WHO мәліметі бойынша жыл сайын орта есеппен 41 миллион адам аталған төрт түрлі созылмалы аурудан өлімге ұшырайды екен. Бұл аурулар адамдардың өмір сапасын төмендетіп, әлеуметтік-экономикалық маңызы бар жаһандық мәселеге айналы. Осы аурулардың ішіндегі өлімге ұшырату көрсеткіші бойынша екінші орындағы онкологиялық аурулардың адамдарда анықталу жағдайы жыл сайын артуда (2017 жылы 14 миллион адам, ал 2018 жылы 18 миллион адам) және одан болатын өлім саны да жоғарылаған (2017 жылы 8,2 миллион адам, ал 2018 жылы 9,6 миллион адам) [2]. Қазақстан Республикасында да қатерлі ісік ауруларының санының өсуі анықталған, 2018 жылы 33941 адамнан қатерлі ісік жағдайы тіркелсе, олардың ішіндегі 21828 адам өлімге ұшыраған [3]. Қазақ онкология және радиология ғылыми-зерттеу институтының статистикалық мәліметіне сүйенсек, елімізде жыл сайын орта есеппен 17 мың адам қатерлі ісік аурулары себебінен өлімге ұшырайды және олардың 42 пайызы еңбекке қабілетті жастағы адамдар [4]. Қатерлі ісік этиологиясы және клиникалық көріністері әртүрлі болғанымен, олардың дамуы мен прогрессиясы созылмалы қабынумен байланысты екенін зерттеулер көрсетті [5].

Созылмалы қабыну жіті қабынудың толық аяқталмауынан, қабыну пайда болған жердегі ұлпалар мен органдардың қалпына келмейтіндей жарақаттануы салдарынан, органдардың бұзылуынан және патогендердің сәтті жойылмауынан дамиды. Қабыну процесінде хемокиндер және цитокиндер синтезі жүреді, нәтижесінде транскрипциялық факторлар активтенеді. Осы процесте бос радикалдар да бөлініп, гендердің мутацияларын және ақуыздардың құрлымындағы трансформациялық өзгерістердің пайда болуын ынталандырады. Бұлар созылмалы қабынудың ұзаруы мен тұрақтылығын сақтауға көмектеседі [6].

Осы уақытқа дейінгі клиникалық мәліметтерге сүйенсек, созылмалы қабыну онкологиялық аурулардың басталуы мен асқынуына қолайлы ортасы ретінде рөл атқаратыны сипатталған. Ол қабынуға қатысатын медиаторлардың (TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-6 және IL-8) үздіксіз өндірілуін индукциялау негізінде иммуносупрессорлық функциясы бар жасушаларды активтендіреді немесе олардың қабыну аймағында жинақталуын ынталандырады, әдетте бұл кезде

қабыну ошағына келетін жасушалар түрі прогрессивті өзгереді [7]. Жасушалық құрамдағы супрессорлық жасушалар үлесінің көбеюі бөгде антигендер мен мутацияға ұшыраған жасушаларды танитын, иммундық жүйенің эффекторлық жасушаларының функциясын супрессияға ұшыратады. Нәтижесінде, иммундық жүйеде ауытқулар, қабыну процесінің ұзаруы және ісік жасушаларына бағытталған иммундық қадағалау төмендейді де ісік жасушаларының прогрессиясы мен метастазына қолайлы орталар қалыптасады [8]. Қабыну процестерінің өзгеруіне әсер етіп, ісіктердің дамуын ынталандырушы тағы бір фактор циркадиандық ырғақтардың реттелуінің бұзылуы (түнгі жұмыс, ұйқының бұзылуы т.б.). Ол қабыну сигналдары мен иммундық жауаптардың реттелуіне теріс әсер ете отырып, ісіктердің дамуына қолайлы иммуносупрессорлық ортаның қалыптасуына қатысады [9].

Имуносупрессорлық ісік микроортасының маңызды жасушалық компоненттерінің бір бөлігін MDSC құрайды [10]. Бұл жасушалар тышқандарда $CD11b^{+}Gr1^{+}$ фенотипі негізінде анықталып, $CD11b^{+}Ly6G^{+}Ly6C^{low}$ грануцитті (G) және $CD11b^{+}Ly6G^{+}Ly6C^{high}$ моноцитті (M) субпопуляцияларына бөлінеді. Ал, адамдарда $CD11b^{+}CD14^{-}CD15^{+}$ немесе $CD11b^{+}CD14^{-}CD66b^{+}$ фенотипімен G-MDSC субпопуляциясын, $CD11b^{+}CD14^{+}HLA-DR^{-/low}CD15^{-}$ фенотипімен M-MDSC субпопуляциясын анықтауға болады [11]. MDSC популяциясының басқа миелоидты жасуша түрлерінен айырмашылығы ерекше иммуносупрессорлық функциясының болуы. Зерттеулерде көрсетілгендей, қалыпты миелопоэз кезінде MDSC сүйек кемігіндегі гранулоцит-миелоцит тектегі жасушалар арасында болады, бірақ, шеткі қан мен лимфоидты ұлпаларда өте аз кездеседі [12]. Алайла, MDSC иммуносупрессорлық жасушалар ретінде, жүктілік кезінде ұрықты аналық иммунитет жасушаларының шабуылынан қорғау үшін маңызды физиологиялық функцияны атқарады [13].

Ғылыми-зерттеу жұмыстарында, онкологиялық аурулардың дамуымен бірге көп мөлшерде MDSC шеткі қан мен ісіктің айналасына жиналатыны анықталған. Бұл кездегі MDSC патологиялық активтенуі, ісік тудырылған жануарлардың жүре пайда болған иммунитет жасушалары - T жасушалардың ісікке қарсы қауқарсыздық танытуына әкелумен қатар, ісік жасушаларының иммундық бақылаудан қалыс қалып, олардың басқарылмайтын пролиферация мен метастазға дейінгі дамуына көмектесетіні дәлелденген [14, 15]. Ал клиникалық зерттеу жұмыстарында алынған нәтижелер, қатерлі ісікке шалдыққан науқастардың қанында анықталған MDSC жоғары деңгейі, аурудың асқынуымен байланысты болатынын және иммуноterapiaның тиімділігін төмендететінін көрсетті [16].

MDSC популяциясының ісік микроортасындағы функциясы және фенотиптік ерекшелігі толықтай зерттелгенімен, қатерлі ісік ауруларының алғашқы сатысындағы және созылмалы қабынумен байланысты дамиды ісікке дейінгі процестегі MDSC рөлі туралы зерттеулер жеткіліксіз. Сондай-ақ, MDSC популяциясын зерттеген жануарлар үлгілерінде де, көп жағдайда қалыптасқан ісік үлгілері қолданылады, бұл MDSC популяциясының ісік дамуы кезіндегі қабыну процесіне қатысу-қатыспауы туралы мәліметтерді бермейді. Сонымен

қатар, кейінгі зерттеулерде циркадиандық ырғақтардың үнемі бұзылуы, қабынуды ынталандыратын медиаторлар (TNF α , IL-6 және С-реактивті ақуыз) өнімін көбейтіп, иммундық эффекторлы жасушалардың дисфункциясын тудыратыны және иммундық жүйе функциясында циркадиандық гомеостаздың жоғалуы қатерлі ісік ауруларының пайда болу ықтималдығын арттыратыны анықталған [17]. Осы жарық арқылы реттелінетін циркадиандық ырғақ өзгерісінің иммуносупрессорлы жасушалардың активтілігіне соның ішінде, ісіктің даму қаупін жоғарылататын MDSC популяциясының индукциясына әсері зерттелінбеген.

Кейінгі жылдары, MDSC-дің элиминациялаудың тиімді жолдары зерттелуде. Осыған байланысты MDSC-ді элиминациялау үшін ісікке қарсы химиялық препараттар қолданыла бастады [18]. Алайда осы бағыттағы кейбір жетістіктерге қарамастан, химиялық дәрілердің жасуша-спецификалық емес болуына байланысты организмге күтпеген жағымсыз әсері көп байқалды [19]. Сондықтан, онкологиялық аурулардан болған өлім-жітімді азайту үшін созылмалы қабыну кезіндегі MDSC-ді зерттеу және MDSC-ге спецификалық цитотоксикалық агенттерді іздеу және өңдеу өзекті болып табылады.

Диссертацияда қатерлі ісіктердің дамуында басты қатысушы болатын MDSC-дің әртүрлі созылмалы қабыну процесіне (адьювант артрит, жарықтық стресс, трансплантацияланған ісіктің өсуі және олардың тіркесуінде) қатысуын дәлелдеу, оның фенотиптік және функциялық ерекшеліктерін және созылмалы қабыну активтендіретін MDSC-дің ісіктің дамуындағы рөлін зерттеу, сондай ақ MDSC элиминациясы бойынша зерттеулер жүргізілді. Алынған нәтижелер, әртүрлі созылмалы аурулардың дамуының иммунологиялық механизмдері туралы іргелі білім алуға және оларды емдеудің тиімді жаңа жолдарын жетілдіруге көмектеседі. Сонымен бірге, қатерлі ісік дамуының себептеріне жаңа көзқараспен қарауға мүмкіндік береді.

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

Мақсатқа жету үшін келесі **міндеттер** қойылды:

1 Созылмалы қабынудың адьювант артрит жануар үлгісіндегі MDSC-дің фенотиптік және функциялық ерекшелігін зерттеу;

2 Созылмалы қабынудың жануар 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 кемігіндегі MDSC.

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

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 $CD11b^{+}Ly6G^{high}$ гранулоцитті және $CD11b^{+}CD49d^{+}$ моноцитті MDSC субпопуляциялар үлесінің көбейетіні көрсетілді.

- Түнде жарықтандыру созылмалы қабыну тудырылған тышқандардағы $CD11b^{+}CD49d^{+}$ және $CD11b^{+}Ly6G^{high}$ 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, сонымен қатар, олардың CD62L экспрессиясын индукциялайтыны анықталды.

- Созылмалы қабыну жағдайында трансплантацияланған ісіктің өсуінің тездеуі, CD62L экспрессиялайтын MDSC үлесінің көбеюін тудыратыны анықталды.

- Альфа-фетопротеин (AFP), ісігі бар тышқанның көкбауырынан бөлініп алынған MDSC субпопуляцияларымен селективті байланысатыны көрсетілді.

- AFP-Даунорубин (AFP-DR) цитотоксикалық конъюгаттың MDSC-ді селективті элиминациялайтыны *in vitro* және *in vivo* жағдайында ісік тудырылған тышқандарда көрсетілді.

Жұмыстың теориялық маңызы. Диссертацияда зерттелген созылмалы қабынудың үлгісі ретінде алынған адьювант артрит және онымен біріктірілген түнде жарықтандыру мен трансплантацияланған ісік кезіндегі супрессорлық потенциалға ие $CD11b^{+}Ly6G^{high}Ly6C^{low}$ немесе $CD11b^{+}Ly6G^{high}$ фенотипті G-MDSC және $CD11b^{+}Ly6G^{-}Ly6C^{high}$ немесе $CD11b^{+}CD49d^{+}$ фенотипті M-MDSC субпопуляциялардың қалыптан артық көбейетіні анықталды. Бұл созылмалы қабынудың ұзаруына және созылмалы қабынумен байланысқан ісіктердің дамуындағы жасушалық механизмдерін түсінуге бағытталған іргелі зерттеулер үшін маңызы зор. Созылмалы қабыну кезіндегі MDSC үлесінің көбеюі және қабынумен байланысты ісіктердің өсуін ынталандырудағы рөлі, болашақта созылмалы қабыну ауруларымен және онымен байланысты қатерлі ісіктердің иммунотерапиясы үшін қолданылатын әдістерді жетілдіруге пайдаланылуы мүмкін. MDSC индукциясындағы жарық стресінің маңызы туралы алынған мәліметтер, циркадиандық ырғақтары бұзылған (түнгі уақыттағы жұмыс істеу) адамдардағы созылмалы қабыну мен онкологиялық аурулардың жиілеу мәселесіне жаңа көзқараспен қарауға және созылмалы аурулардың алдын алу мен емдеуге жаңа бағыттар береді.

Зерттеудің практикалық құндылығы. Диссертациялық жұмыс нәтижелері практикалық әлеуетке ие. AFP негізіндегі цитотоксикалық конъюгат иммуносупрессорлы MDSC-ді элиминациялауға қабілетті, ісікке қарсы әсерлі иммунотерапиялық әдіс екендігін көрсетті. Бұл MDSC активтілігін тежеуге негізделген онкологиялық процестің алдын алу мақсатындағы созылмалы қабыну ауруларының иммунотерапиясына жаңа тәсілдерді дамытуға негіз болады, сонымен бірге клиникалық иммунологтар және онкологтар үшін маңызы зор. Осы жұмыстың аясында AFP байланыстыратын MDSC-ді анықтау әдісіне патент алынды (№ 32074,18.04.2017 ҚР патенті).

Қорғауға ұсынылатын негізгі қағидалар:

1 Созылмалы қабыну көкбауырда супрессорлық потенциалы бар MDSC жинақталуын индукциялайды.

2 Түнде жарықтандыру стресі CD62L және CD195 адгезиялық молекулаларды экспрессиялайтын MDSC үлесін көбейтеді.

3 Созылмалы қабыну индукциялаған MDSC ісіктің өсуін ынталандырады.

4 Қабынуды ынталандыратын TNF α цитокині, *in vitro* жағдайында MDSC-дің CD62L экспрессиясын және супрессорлық активтілігін жоғарылатады.

5 AFP ісік тудырылған тышқандардағы MDSC-мен таңдамалы байланысады.

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

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

Тақырыптың зерттеу деңгейі. Диссертациядағы зерттеу жұмыстары тәжірибелік жануарлар үлгілерін қолданумен жасушалық деңгейде орындалды.

Автордың жеке үлесі. Диссертацияны жазу және зерттеу тақырыбы бойынша тәжірибелерді жобалау және жүргізу автордың жеке қатысуымен орындалды.

Жұмыстың ғылыми зерттеу бағдарламаларымен байланыстылығы. Бұл диссертациялық жұмыс Қазақстан Республикасы 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 нәтижелері төмендегі халықаралық ғылыми конференцияларда баяндалды және талқыланды:

- Студенттер мен жас ғалымдардың «Фараби әлемі» 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 конференциясы, 28-29 қараша 2019 ж., Алматы, Қазақстан.

Басылымдар. Диссертацияның негізгі нәтижелері баспадан шыққан 14 ғылыми еңбекте жарияланды, оның ішінде, 4 мақала Қазақстан Республикасы Білім және ғылым саласындағы бақылау комитеті ұсынған отандық мерзімді журналдарда; 3 мақала *Web of Science* және *Scopus* деректер қорына енетін жоғары деңгейдегі ғылыми журналдарда; 4 тезис отандық халықаралық конференция материалдарында; 3 тезис халықаралық және шетелдік конференция материалдарында жарияланды. Сонымен қатар 1 өнертабысқа Қазақстандық патент алынды.

Диссертацияның құрылымы. Диссертациялық жұмыс 120 мәтіндік бетте жазылды. Оның құрамына нормативтік сілтемелер, анықтамалар, 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.

1 ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ

1.1 Миелоидтық супрессорлық жасушалар (MDSC)

1.1.1 MDSC, шығу тегі, зерттелу тарихы және номенклатурасы

MDSC жетілмеген миелоидты жасушалар ретінде сипатталған, гемопоэздегі миеломоноцит түзуші жасушалардың гетерогенді популяциясы [9, p. 425; 20]. Бұған дейінгі жүргізілген зерттеулер бойынша, MDSC ісікке қарсы иммунитеттің функциясын әлсіретуде ерекше орынға ие болып, тәжірибелік үлгілерде болсын [21], клиникада болсын қатерлі ісіктің дамуымен бірге жүретіндігі көрсетілген [22]. MDSC тарихы 1980-жылдардың соңында сүйек кемігіндегі супрессорлық жасушаларды зерттеуден басталып, алғаш рет «табиғи супрессорлық (Natural suppressor, NS)» жасушалар деп аталған [23]. Бұл кезде, NS жасушалар мембранасында, Т-жасушалар, В-жасушалар және моноциттер/макрофагтармен ортақ маркерлері болмайтын «нулл» фенотипі жасушалар ретінде сипатталды [24]. Функцияларының бірі қатерлі ісік және жұқпалы аурулар кезіндегі иммундық жүйенің қалыпты функциясын супрессиялаумен байланысты болды [25, 26].

1990-шы жылдарға дейін тәжірибелік және техникалық қиындықтарға байланысты, NS жасушалары төмен градиент тығыздықтағы жасушалар (1,063 – 1,075 г/мл) ретінде сипатталып, нақтылы иммуносупрессорлық механизмі және айқын фенотипі айқындалмады. Алайда, бұл жасушалардың адгезиялық қасиеті төмен болғанымен пластикалық ыдыстарда инкубациялағаннан кейін супрессорлық функциялары артатыны байқалды. *In vitro* жағдайында өсірілген NS жасушалары супрессорлық қасиеттерін өзгертпеді. Бірақ, интерлейкин-3 (IL-3) пен гранулоцит-макрофаг өсу факторы (GM-CSF) NS жасушаларының супрессорлық активтілігінің жоғарылауын ынталандыра алды [27]. *In vivo* жағдайында, Эрлих ісігі тудырылған тышқан үлгілерінде NS жасушалары эффекторлы иммундық жүйенің жасушаларының функцияларын супрессиялап, ісіктің өсуіне ынталандырушы рөл атқарды [24, p. 307]. Осы тышқандарды гранулоциттік рецептор 1 (Gr-1) антиденесімен емдегенде, гранулоциттер санының азаюымен қатарласқан ісіктің өсуінің тежелуіне әкелді [28]. Бұған дейінгі зерттеулерде Gr-1 негізінен сүйек кемігіндегі (BM) гранулоциттердің дифференциациясы/жетілуінің белгісі ретінде қарастырылған болатын [29]. NS жасушаларының GM-CSF және Gr-1 антиденесіне жауабының анықталуы, оның миелоидтық жасушалардан шыққан моноциттік және гранулоциттік гетерогенді популяция екенін көрсетті. Онкологиялық науқастардың шеткі аймақтық қанында да, бұл жасушалар көп мөлшерде байқалып, CD34 маркерін экспрессияйтыны анықталды [30]. Бұл процесс иммуносупрессорлық цитокиндер TGF- β , IL-10 және GM-CSF цитокиндерінің жоғары деңгейімен байланысты болды. GM-CSF пен CD34⁺ жасушалардың ісік ұлпасының ішінде анықталуы, ауру жағдайының асқынуымен немесе метастазбен корреляцияда болды [31].

1998 жылы, V. Bronte және біріккен авторлар эффекторлық CD8⁺ Т жасушалардың пролиферациясын тежеу қабілеті бар NS жасушалар, CD11b

(Mac-1) және Lyt-6G (Gr-1) маркерлерін экспрессиялайтынын анықтады [32]. Кейіннен, функциясы мен фенотипі жағынан Gr-1 фенотипті миелоидты жасушаларды сипаттаған, алайда аталуы: «жетілмеген миелоидты жасушалар (Immature Myeloid Cells, IMC)» [33], «тежегіш макрофагтар (inhibitor macrophages, iMacs)» [34], «миелоидты супрессор жасушалар (Myeloid suppressor cells, MSC)» [35] сияқты әртүрлі терминдер қолданған зерттеулер арта бастады. Бұл популяциялар ісік факторларына байланысты дифференциацияланатын гранулоциттердің, макрофагтардың, DC немесе ерте миелоидты прогениторлардың тегі ретінде қарастырылды. IMC болса иммунсупрессорлы жағдайды ұстап тұруға жауапты жасушалар ретінде көрінді [36]. Алайда, IMC сау тышқандардың сүйек кемігі мононуклеар жасушаларында байқалып, сүйек кемігіндегі гемопоэзде ереше рөлі болғанымен, қалыпты жағдайда, T жасушаларына қарсы ешқандай супрессорлық активтілігі жоқ екендігі анықталды [37]. «MSC» атауы жетілген миелоидты жасушалар (макрофагтар немесе DC) популяциясын қамтитыны сипатталды [38], дегенмен бұл иммунсупрессорлы жасушалар жетілген миелоидты жасушалар емес болатын. Сондай-ақ, «MSC» қысқартылуы көбінде «мезенхимал бағаналы жасушаларды (mesenchymal stem cells, MSC)» айқындау үшін қолданылды [39].

Осы супрессорлық жасушаларды сипаттаудағы жоғарыда айтылған қайшылықтарға және олардың нақты атауының болмауына байланысты, сондай-ақ, жасушалардың миелоидтық шығу тегі мен олардың негізгі функциялық ерекшелігі – жоғары иммунсупрессорлық активтілігін негізге алып Gabrilovich және біріккен авторлар, осы популяцияны өзіне тән термин «миелоидты супрессорлық жасушалар (Myeloid-derived suppressor cells, MDSC)» (2007 жылы) деп атауды ұсынды [10, p. 425]. Физиологиялық тұрғыдан MDSC-дің пайдалы жағы жүктілік кезінде аналық иммундық төзімділікті индукциялап аллогенді ұрықты қорғауда көрінеді [13, p. 1132]. Патологиялық жағдайларда MDSC үлесі өзгерген гемопоэздің нәтижесінде көбейеді. Қатерлі ісік ұлпаларында MDSC-дің жоғары инфильтрациясы аурудың асқынуымен байланысты болды және ісіктің дамуымен олардың шеткі аймақтағы үлесі жоғарылады, бұл иммундық жасушалардың функциясын және иммунотерапия тиімділігін төмендетеді [40].

1.1.2 MDSC фенотиптік маркерлерінің сипаттамасы

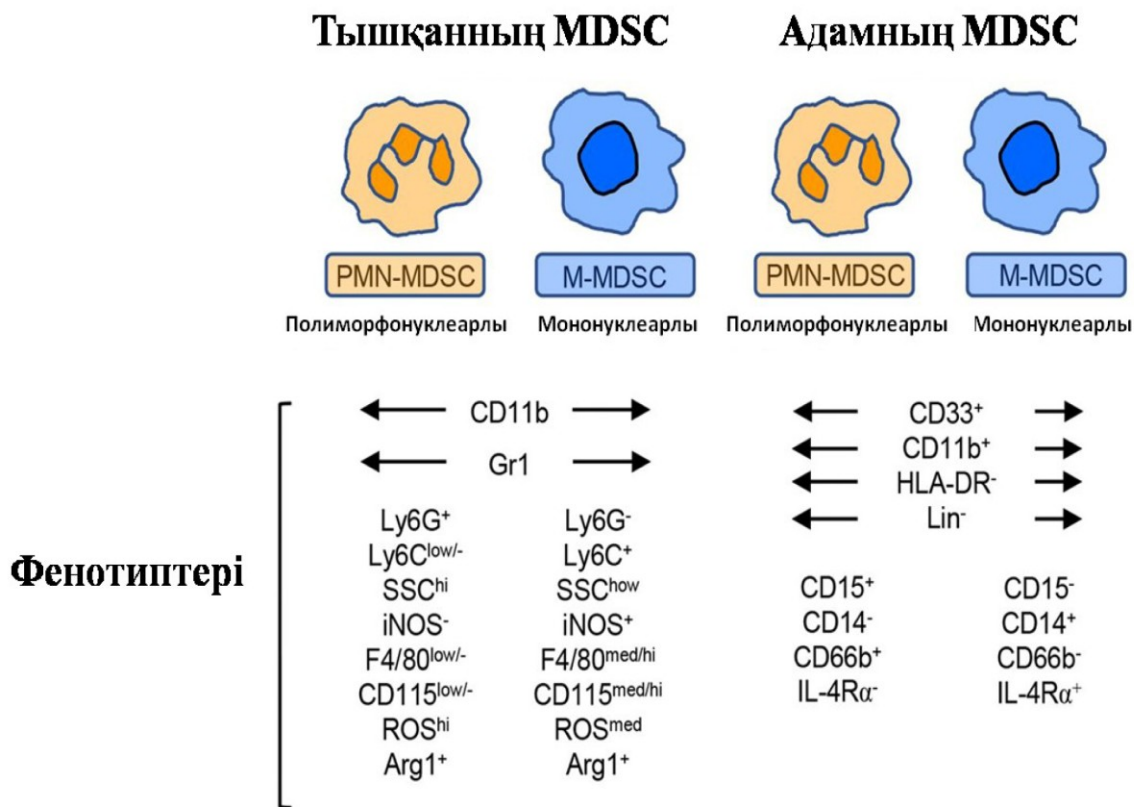
Клиникалық және тәжірибелік зерттеулер MDSC-дің адамдар мен тышқандардағы анықтау маркерлері әртүрлі екенін көрсетті. Тышқан үлгілерінде MDSC моноциттік және гранулоциттік популяцияларға тән маркерлер CD11b интегрин және гранулоцит рецептор 1 (Gr-1) молекулаларын экспрессиялайды [41]. CD11b ($\alpha M\beta_2$ -интегрин және комплемент рецепторлары 3 (CR3) деп те сипатталады) – молекулалық салмағы шамамен 127 кДа болып моноциттер, нейтрофилдер, гранулоциттер және макрофагтарды қамтыған көкбауыр құрамындағы жасушаларының 8 пайызында және сүйек кемігі жасушаларының 44 пайызында болады [42]. Gr1 - 21-25 кДа салмақтағы

гранулоциттердің (нейтрофилдер мен эозинофилдермен) және моноциттердің цитоплазмалық мембранасында экспрессияланатын анкерленген ақуыз болып [43], MDSC-дің цитоплазмалық мембранасында ол лимфоциттік антиген 6 күрделі локус С6D (Ly6C) және лимфоциттік антиген 6 күрделі локус G6D (Ly6G) екі ақуыз ретінде экспрессияланады. Ly6C кішкене ақуыз, сүйек кемігіндегі жасушалардың 50 пайызында және қандағы Т лимфоциттер мен нейтрофилдерде аз мөлшерде экспрессияланады. Екінші ақуыз Ly6G болса, сүйек кемігіндегі жасушаларда анықталумен қатар, шеткі аймақтағы нейтрофилдер мен гранулоциттердің пісіп жетілу және мамандану деңгейін көрсетеді [44, 45].

MDSC популяциясында жетілген макрофагтарға, моноциттерге немесе DC жасушаларына тән арнайы жасуша беттік маркерлері болмайды. Бірақ, *in vitro* және *in vivo* жағдайында, қажетті цитокиндер болған кезде 1–5% MDSC миелоидты жасушалардың ұрпақтарын қалыптастырады және жетілген макрофагтар мен DC популяциясына дифференциация жасай алады [41, р. 162].

Тышқандардағы MDSC-ді Ly6G and Ly6C маркерлерінің экспрессиялану деңгейіне, иммуносупрессорлық молекулаларына және ядросының формасына қарай екі субпопуляцияға бөлінеді: CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high} фенотипті моноциттік (monocytic, (M)) MDSC және CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low} фенотипті гранулоциттік (granulocytic, (G)) MDSC (бұл жасушалардың полиморфонуклеарлы (polymorphonuclear, (PMN)) морфологиясы бар болғандықтан PMN-MDSC деп те аталады) [11, р. 2]. MDSC популяциясындағы Gr1 маркерінің экспрессиялану көрсеткішімен де субпопуляцияны жіктейді. MDSC-ді жасушалық фракцияларға бөлу кезінде Gr1^{bright} негізінен G-MDSC жинтығынан, ал Gr1^{int} негізінен M-MDSC жиынтығынан тұратыны көрсетілген [46]. Қосымша маркер ретінде, CD49d (интегрин α -субунит) экспрессиясы CD11b маркерімен бірге фенотипі және функциялық жағынан ерекшеленетін CD11b/CD49d MDSC субпопуляцияларын анықтау үшін қолданылады. Бұл кезде, M-MDSC субпопуляциясын CD49d⁺ және CD49d⁻ маркерлері бойынша ішкі жиынтықтарына бөлуге болады [47]. Сонымен қатар, басқа бірнеше беттік молекулалар жиынтықтары: IL-4R alpha (CD124), F4/80, CD80, S100A9, CD31, CXCR2 және CD115 MDSC субпопуляцияларын қосымша сипаттау үшін де қолданылды [41, р. 163].

Адамдарда, MDSC фенотипіне әлі де жеткілікті зерттеу жүргізілмеген және тышқандардағы сияқты Gr1 молекуласын экспрессияламайды (сурет 1). Алғашқы кезде, адамның MDSC популяциясы HLA-DR⁻CD33⁺ немесе CD14⁻CD11b⁺ маркерлер жиынтығы арқылы анықталған. Кейіннен, жетілген имундық жасушаның линиялық маркерлерін (CD3, CD19, CD56, CD14, HLA-DR) алып жүрмейтін, бірақ миелоидтық CD31, CD33, CD11b және CD15 фенотиптік маркерлерді экспрессиялайтын жасушалар ретінде сипатталды [14, р. 423].



Сурет 1 – MDSC–дің адам мен тышқандағы фенотиптік профілі

Ескерту – Автормен дереккөз негізінде жасаған [15, p. 423].

Адамдардың шеткі аймақтық қанындағы CD15⁺ популяция ішінде де MDSC байқалады. Қазіргі уақытта адамдарда PMN-MDSC CD11b⁺CD14⁻CD15⁺ немесе CD11b⁺CD14⁻CD66b⁺ фенотипімен, M-MDSC CD11b⁺CD14⁺HLA-DR⁻/lowCD15⁻ фенотипімен анықталады [12, p. 109]. Әртүрлі типтегі ісік кезінде әртүрлі фенотипті MDSC субпопуляциялары индукциялануы мүмкін. MDSC популяциясы қуық асты безі ісігі мен меланома кезінде CD14⁺HLA-DR⁻/low фенотипімен сипатталды [48, 49]. Сау адамдардың шеткі қанда MDSC фенотипті жасушалар, жалпы қан мононуклеарлы жасушаларының (PBMC) өте аз бөлігін құрайды (0,5%) [36, p. 680].

Адамдарда M-MDSC субпопуляциясын MHC класс II-HLA-DR молекуласының экспрессиясы негізінде моноциттерден ажыратуға болады. Ал, PMN-MDSC төмен тығыздықты фракцияда, ал нейтрофилдер – жоғары тығыздықты жасушалар болғандықтан, соңғы уақытқа дейін адамдарда нейтрофилдерді PMN-MDSC субпопуляциясынан ажыратуға мүмкіндік беретін жалғыз әдіс, ол стандартты Ficoll градиентін қолданып центрифугалау болды [50]. Дегенмен, жақында анықталған лектин-сияқты тотыққан LDL рецептор 1 (LOX-1) адамның нейтрофилдерін PMN-MDSC субпопуляциясынан градиент қолданбай жақсырақ ажыратуға мүмкіндік береді [51]. MDSC популяциясының бірнеше маркерлерін біріктіріп қолдану, оларды нақты анықтауға мүмкіндік береді.

1.1.3 MDSC субпопуляцияларының сипаттамасы

MDSC субпопуляциялары, тышқандарда гетерогенділігі мен әртүрлі функциялық ерекшелігіне қарай: M-MDSC $CD11b^+Ly6G^-Ly6C^{high}$ фенотипімен қоса индуцибельді азот тотығы синтаза ферментін (iNOS) өндіруімен, ал G-MDSC $CD11b^+Ly6G^+Ly6C^{low}$ фенотипімен қоса жоғары аргиназа 1 (Arg 1) экспрессиясымен ерекшеленеді. M-MDSC морфологиялық және фенотиптік жағынан моноциттерге ұқсас, ал G-MDSC морфологиялық және фенотиптік жағынан терминалды дифференциацияланған нейтрофилдерге жақын, алайда, тышқандардың моноциттері мен полиморфонуклеарлы нейтрофилдердің сәйкесінше, иммуносупрессорлық активтілігі болмайды [11, р. 3]. Сондықтан жасушаларды MDSC ретінде анықтау үшін фенотиптік сипаттамасы жеткіліксіз. Оларды басқа жасушалардан ажырататын басты ерекшелігі, олардың активтенуіне қатысатын сигналдық жолдары, иммунитетте атқаратын функциясы, активтенуіне қатысатын медиаторлардың әсерінен экспрессияланатын маркерлерінің көрсеткіші болып саналады [52, 53].

Ісік тудырылған тышқандардың көкбауырында анықталған « $CD11b^+Ly6G^-Ly6C^{high}$ M-MDSC» жоғары иммуносупрессорлық қасиетке ие болып, өз әсерін көбінесе антиген-спецификалық емес жолдар арқылы жүргізеді. « $CD11b^+Ly6G^+Ly6C^{low}$ G-MDSC» орташа иммуносупрессорлық ерекшелікпен, өз әсерін антиген-спецификалық механизмдер арқылы жүргізеді [54].

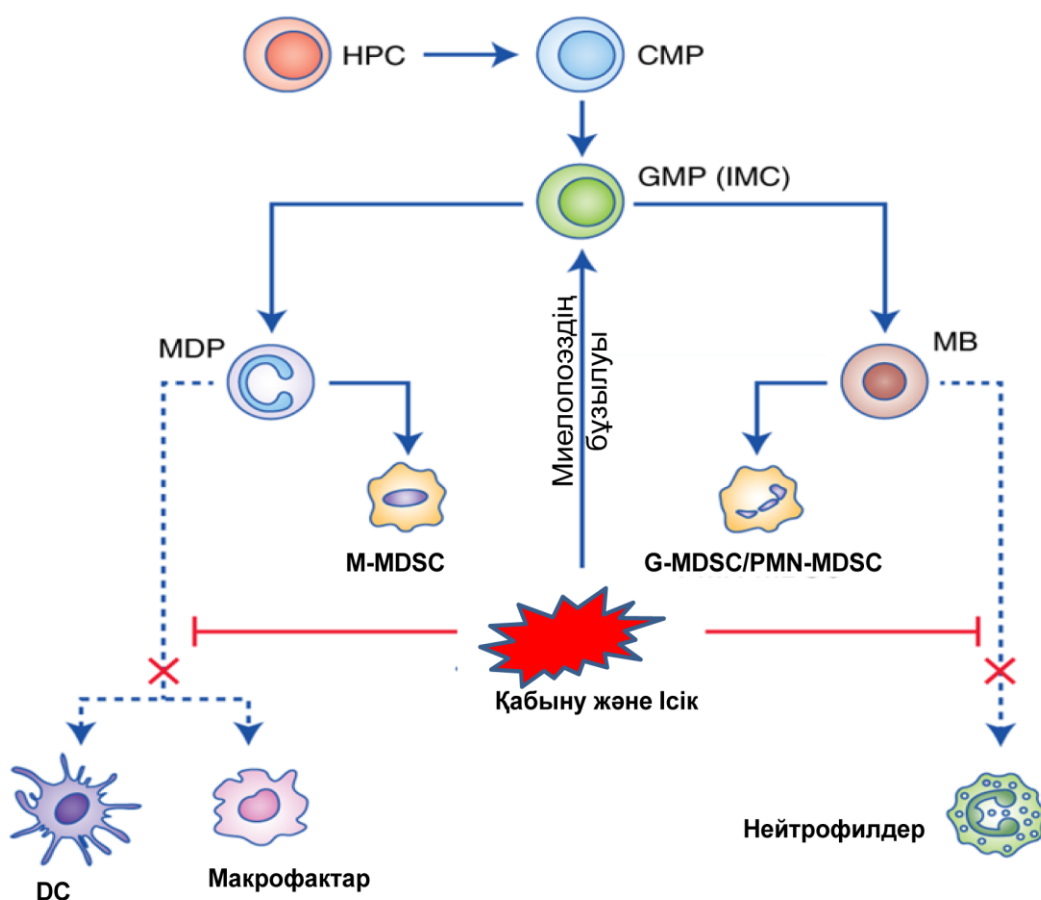
Патологиялық жағдайда, оның ішінде қатерлі ісікпен ауыратын науқастарда жинақталған MDSC популяциясында, M-MDSC субпопуляциясымен (20-30%) салыстырғанда, G-MDSC үлесі (70-80%) жоғары болып MDSC популяциясының басым бөлігін құрайды [55, 56]. M-MDSC және G-MDSC субпопуляцияларының иммуносупрессорлық механизмдері әртүрлі болады. G-MDSC болса, аргиназаны (Arg) экспрессиялайды және антиген спецификалық $CD8^+$ T жасушаларды негізінен реактивті оттегі түрімен (ROS) басқарылатын механизм арқылы басады. M-MDSC болса, $CD8^+$ T жасушаларды тежеуі негізінен азот тотығы синтаза 2 (NOS2) ферменті және Arg-1 ферменттерін өндіру және реактивті азот түрлерін секрециялау арқылы жүзеге асырады [57, 58]. Сонымен бірге, MDSC субпопуляциялары да PD-L1 (B7-H1), PD-L2 және CD80 молекулаларын экспрессиялайды [21, р. 5791], сондықтан иммундық супрессияның бірнеше механизмі бір уақытта активті бола алады.

M-MDSC және G-MDSC әртүрлі жолдармен моноциттер мен гранулоциттердің прогениторларынан дамиды. Осыған сәйкес ісігі бар тышқандардағы M-MDSC субпопуляциясының көп бөлігі, ретинобластома 1 ақуызының (Rb1) эпигенетикалық төмендеуін іске қосатын механизм арқылы G-MDSC субпопуляциясының фенотиптік, морфологиялық және функциялық ерекшеліктерін алатындығы нақты анықталды [57, р. 211]. Сондықтан, M-MDSC ісікке қарсы иммунитетті күшті модуляциялау қабілетіне ие болып қана қоймай, сонымен қатар, G-MDSC пулын сақтайтын «бағаналы жасуша тәрізді прекурсорлар» функциясын атқарады; іс жүзінде M-MDSC субпопуляциясы G-MDSC субпопуляциясына қарағанда тез пролиферация жасайды, қажетті цитокиндермен ынталандыру (GM-CSF, IL-6) болғанда M-MDSC миелоидты

жасушалардың кең спектрін бере алады. Ал, G-MDSC субпопуляциясының *in vitro* жағдайында өміршеңдігі төмен және жетілген миелоидты жасушаларға дифференциация жасай алмайды [59].

1.1.4 MDSC жинақталуы мен активтенуі

Қалыпты кезде, тышқанның сүйек кемігінде Gr1/CD11b фенотипті жасушалардың жалпы мөлшері 20-30%, көкбауырда 2–4%, ал лимфа түйінінде болмайды. Алайда, иммуносупрессияның жалпы процесінде шеткі қан мен көкбауырда MDSC үлесі басым болады [41, р. 162]. Оның жинақталуы мен миграциясы күрделі болып көптеген цитокиндер мен сигналдық ақуыздар қатысады. MDSC шығу тегі сүйек кемігіндегі гемопоэтикалық прогнитор жасушалардан (HPC) басталады (сурет 3).



Сурет 2 – MDSC-дің шығу тегі

Ескерту – Автормен дереккөз негізінде жасаған. CMP- жалпы миелоидты прогениторлық жасушалар; GMP - гранулоцит/макрофаг прогениторы жасушалар; IMC - жетілмеген миелоидты жасушалар; MDP моноцитарлы/дендриттік прогениторлық жасушалар; МБ - миелобласттар [60].

MDSC активтенуі екі түрлі сигналдық жолды қамтиды, бірақ ішінара бір-біріне сәйкес келетін сигнал түрлерін талап етеді: біріншісі, жетілмеген миелоидты жасушалардың дифференциациясының тежелуіне байланысты олардың кеңеюіне жауап береді, екіншісі, осы жасушалардың патологиялық активтенуіне қарай жетілмеген миелоидты жасушаларды MDSC-ге дейін өзгертуге жауап береді [52, p. 4].

Сигналдардың бірінші тобына негізінен ісік стромасы жағынан өндірілетін факторлар (қабыну цитокиндері) және NF-κB жолы, STAT1, STAT6, IL-1β, S100, PGE2 және COX2 кіреді [61]. Бұлар MDSC жинақталуына ғана емес, сонымен қатар, иммуносупрессорлы фенотиптің жетілуіне де әсер ете алады. Әсерлері жеке немесе біріккен түрде болады [62].

Сигналдардың екінші тобы көбінесе ісіктен пайда болатын және аурудың нашар болжамын көрсететін өсу факторлары (GM-CSF, IL-10, TGF-β, IL-6) және STAT3, IRF8, C/EBPβ, Notch, A2b сигналдың аденозин рецепторлары, NLRP3 сияқты транскрипциялық факторларды қамтиды [61, p. 913]. Ісіктің бұл факторларды бөлуі үнемі аурудың асқынуымен байланысты болған.

1.1.4.1 MDSC жинақталуы мен активтенуіне қабыну факторлар әсері

IL-1β - трансплантацияланған сүт безі ісігі немесе фибросаркома ісіктері бар тышқандарда MDSC-ді индукциялау қабілеті бар цитокин. IL-1β индукциялаған MDSC-дің жинақталуы иесінің Т, В және NK жасушаларынан тәуелсіз жүреді. Бұл MDSC, қабыну деңгейі төмен орта индукциялаған MDSC-ге қарағанда, *in vivo* жағдайында ұзағырақ өмір сүреді және ROS өндірілуінің артуы және эффекторлы CD4⁺ және CD8⁺ Т жасушаларына қарсы супрессорлық активтілігінің жоғарылауы байқалған [63]. Зерттеулерде, IL-1β секрециялайтын ісіктер, IL-1β секреция жасамайтын ісіктерге қарағанда анағұрлым тез таралатыны және қарқынды дамидыны, сонымен бірге бұл өзгеріс, MDSC-дің ісікке қарсы иммунитетті төмендетуге алып келетіні анықталды [64, 65]. Сондай-ақ, IL-1β рецепторын (IL-1R) экспрессия жасамайтын тышқандарда MDSC жинақталуы тосылады және ісіктің өсуі баяулайды. Бұл алынған мәліметтер IL-1β цитокинінің MDSC биологиясында маңызды рөлін дәлелдеп, қабынумен байланысты MDSC жинақталуы мен активтенуінде IL-1β цитокинінің ерекше орнын көрсетеді [66].

PGE2 - MDSC биологиясында маңызды болып, MDSC жинақталуында және функциясының тұрақтылығында, сондай-ақ ісіктің дамуында негізгі рөл атқарады. Ісіктердің өсуін, ангиогенезді ынталандыру, апоптоздан қорғау және ісік жасушаларының пролиферациясы мен метастазын ынталандыру сияқты иммундық емес әртүрлі жолдар арқылы жеделдетеді [67]. Тышқандарда индукцияланған MDSC цитоплазмалық мембранасында PGE2 қабыну факторының барлық төрт рецепторын (EP1–4) экспрессиялай алады. MDSC-дегі EP-4 рецепторымен байланысқан PGE2, оның Arg-1 экспрессиясы және супрессивті функциясын активтендіреді. Ал, PGE2 тежегіштерімен (SC58236) ісік тудырылған тышқандарды емдеу, шеткі аймақтағы MDSC үлесін төмендету мен ісіктің прогрессиясын баяулатуға әкелетіні анықталған [68]. Бүйрек ісігі

бар науқастарда анықталған PGE2 медиаторы, CD11b⁺CD14⁻CD15⁺ MDSC популяциясындағы аргиназа экспрессиясы мен супрессорлық активтілігін реттейтіні көрсетілген [69]. PGE2, моноциттік прекурсорлардағы COX2 және PGE2 арасындағы EP2/EP4 байланысы арқылы, DC дифференциациясын MDSC-ге бағыттайды. Ал COX2 немесе EP2/EP4 бұғатталуы MDSC функцияларын және олардың CXCR4-CXCL12 делдалдайтын жол арқылы ісік микроортасына миграциялануын тежеп, иммунотерапиялық мақсатқа қолайлылық жасайды [70]. Бұл, PGE2 супрессорлы MDSC жинақталуын индукциялау арқылы ісікке қарсы иммунитетті тежеуге қатыса алатынын көрсетеді.

S100 - MDSC-дің қабыну ошақтарына және ісік микроортасына қарай миграциялануында маңызды ақуыздар. Олардың ішінде, нейтрофилдермен активтендірілген моноциттерден бөлінетін, кальциймен байланысқан S100A8/S100A9 гетеродимерлік кешенінің рөлі елеулі [71]. Көптеген зерттеулерде S100A8/A9 ақуызы MDSC жинақталуы мен супрессорлық активтілігін реттейтіні анықталды. S100A8/A9 экспрессиялайтын MDSC, жарамен байланысты дамыған ішек қатерлі ісік үлгісінде дисплазия мен аденоманың барлық аймақтарында жинақталады [72]. Ал, онкологиялық науқастар қанындағы S100A9 өнімінің деңгейін бағалау арқылы MDSC экспанциясын қосымша анықтауға болатыны дәлелденген [73]. Кейбір ісік үлгілерінде MDSC S100A8/A9 ақуыздарына тән рецепторларды экспрессиялайды және S100A8/A9 ақуыздарын бөліп шығарады. Ісік тудырылған тышқандардағы S100A8/A9 рецепторларын антиденелермен бұғаттау, ісіктерінің ішіндегі және екінші лимфоидты мүшелердегі MDSC үлесінің азаюына әкелген [74]. Бұл S100 ақуыздарының MDSC активтенуіндегі маңызын көрсетеді.

Ostrand-Rosenberg және біріккен авторлар сипаттағандай: S100A8/A9 гетеродимерлерінің әсері екі механизм арқылы жүзеге асады: 1) Олар STAT3 сигналдық жолына тәуелді механизм арқылы миелоидты прекурсорлардың DC және макрофагтарға дифференциациялануын тежейді; 2) Олар NF-κB транскрипциялық факторына тәуелді сигналдық жол арқылы қабынған ісіктің микроортасына MDSC-дің жинақталуын ынталандырады. Сондай-ақ, IL-1β, IL-6 және PGE2 сияқты S100A8/A9 ақуыздары да MDSC жиналуын жеңілдетеді. Басқа медиаторлардан айырмашылығы, MDSC S100A8/A9 ақуыздарын синтездейді және бөліп шығарады, бұл MDSC жинақталуы мен шеті аймақтарда сақталуын қамтамасыз ететін автокринді кері байланыс циклын қамтамасыз етеді [75]. Жинақтай келгенде, S100A8/A9 ақуыздары қабыну медиаторларының желісін басқарады. Сондықтан, MDSC тек ісік кезінде емес, ісікке дейінгі қабыну кезінде де басты қатысушы болуы мүмкін.

1.1.4.2 MDSC жинақталуы мен активтенуіне ісіктен бөлінетін факторлар әсері

IL-6 - организмде әртүрлі жасушалардан (моноциттер, макрофагтар, фибробластар, эндотелиальды жасушалар, B-, T- лимфоциттер және

трансформацияланған жасушалар) секрецияланады [76]. Жіті қабыну кезінде моноциттер мен макрофагтар, ал созылмалы қабыну кезінде Т жасушалар ІІ-6 цитокинін өндіреді [77]. Осы цитокиннің пайда болуының жоғары пайызы лейкопения, лимфома, миелома, меланома, кеуде, өкпе, аналық без, бүйрек жасушасы және ұйқы безі ісіктерінде анықталып, аурудың асқынуымен корреляцияда болатыны көрсетілген [78]. ІІ-6 MDSC генерациясы және өміршеңдігі үшін өте маңызды цитокиндердің бірі, ол STAT3 транскрипциялық факторын активтендіру арқылы MDSC-дің дифференциациясы мен функциясын реттейді. GM-CSF цитокин болған кезде, ІІ-6 адам мен тышқанның гемопоэтикалық прекурсорларын MDSC-ге дифференциациялануға бағыттай алады [79]. Онкологиялық аурулар кезінде ІІ-6 цитокин мөлшерінің қандағы концентрациясының жоғарылауы, иммундық жасушалар арасындағы MDSC үлесінің және оның супрессорлық функциясының күшеюімен байланысты болатыны зерттеулерде айқындалды [80]. Басқада зерттеулерде, ісік кезінде MDSC-де ІІ-6 рецепторын экспрессиялайтыны анықталған [66, р. 10024]. ІІ-6 рецепторына қарсы антиденемен емдеу ісігі бар тышқандарда жинақталған MDSC санын азайтады. Осы өзгерістер иммундық жүйенің Т жасушалық жауабының активтенуіне және ісіктің өсуінің баяулауына әкеледі [81].

GM-CSF - моноцитті және гранулоцитті жасуша популяцияларының өсу факторы ретінде, бұрыннан бері иммундық адьювант болып саналғанына қарамастан, көптеген зерттеулер оның иммундық жүйені ынталандырумен қоса оны супрессиялау рөлі бар екенін көрсетті. Сонымен қатар, миелопоэзді индукциялайтын негізгі өсу факторы болып саналады [82]. Адамның ісік жасушаларының шамамен 31%, оның ішінде, сүт безі және жатыр мойны сияқты т.б. GM-CSF цитокинін секрециялайтыны көрсетілген [83].

Клиникалық зерттеулер көрсеткендей, метастаздық меланомасы бар науқастарға GM-CSF негізіндегі вакциналарды егу, шеткі аймақтық қандағы CD14⁺ HLA-DR^{-low} MDSC популяциясын жоғарылатқан [49, р. 2546]. Сонымен қоса, *in vivo* және *in vitro* жағдайындағы зерттеулерде, GM-CSF цитокин сүйек кемігі мононуклеар жасушаларынан MDSC-ді генерациялауда рөлі анықталған [84]. Соңғы жүргізілген тәжірибелер, GM-CSF пен ІІ-6 бірге ісік дамуының өте ерте кезеңдерінде MDSC функциясын реттеуге араласуы мүмкін екендігін көрсетті. Бұл цитокиннің болуы жетілмеген миелоидты жасушаларды толығымен супрессивті MDSC-ға айналдыру үшін қажет, бұл *in vivo* жағдайында SV40 Т антигенімен басқарылатын ісік үлгісінде анықталды [85]. GM-CSF цитокин ІІ-6, ІІ-1, PGE2, TNF- α немесе VEGF болған кезде, дені сау донорлардың шеткі аймақтық қанынан бөлінген CD33⁺ жасушалардан Т жасушаларды супрессиялау қабілеті жоғары, MDSC пайда болуына делдал бола алатыны дәлелденген [86].

ІІ-10 - иммундық реакциялар мен антиген көрсетуші жасушалардың антигендерді, Т жасушаларға әртүрлі жолмен көрсету қабілетін тежейтін иммуносупрессорлы цитокин. Оны өндірушілердің бірі болып ісік микроортасындағы MDSC популяциясы саналады [87, 88]. Осы мәліметтерге

дәлел ретінде, аналық без ісігінің асциттерінен MDSC-ді элиминациялау, қандағы IL-10 концентрациясының азаюына және ісік өсуінің тежелуіне әкелгенін айтуға болады [89]. IL-10 цитокинінің MDSC арқылы өндірілуі, осы жасушаның аутокринді және паракринді активтенуіне көмектеседі, осы арқылы MDSC өзінің супрессорлық активтілігін жоғарылатады [88, р. 1]. Басқада зерттеулерде, IL-10 цитокинінің ісіктің өсуіне және MDSC-дің дамуына теріс әсері фибросаркоманың жануарлар үлгісі мен химиялық индукциялаған ісік үлгілерінде көрсетілді, бұл үлгілерде IL-10 секрециясын генетикалық аяқталау ісіктің дамуын, өсуін және метастазын күшейтті [90, 91]. Осы мәліметтер, IL-10 цитокинінің әртүрлі ісік кезінде әртүрлі функцияны атқаратынын көрсетті. Ісік әртүрлі медиаторларды өзінің микроортасына секреция жасау арқылы иммуносупрессорлық фонды қалыптастыруға қатысатын MDSC активтенуі мен жинақталуын индукция жасай алады.

1.1.4.3 MDSC жинақталуы мен активтенуіне хемокиндер әсері

Хемокиндер (ағылш. Chemokines) – жасушалардан секрецияланатын кішкене (8 ден 10 кДа дейін) құрлымды цитокиндер немесе сигналдық ақуыздар, олар жасушалардың (лейкоциттерді қоса) мембранасындағы спецификалық трансмембраналық G ақуызбен байланысқан рецепторлармен әрекеттесу арқылы жасуша хемотаксисін тудыруға қабілетті [92]. Осыған дейінгі зерттеулерде көрсетілгендей, хемокиндер қабыну аурулары мен онкологиялық аурулардың дамуында басты көмекші рөл атқарады [93]. Ісікпен байланысты пайда болған цитокиндер мен хемокиндер нейтрофилдердің дифференциациясын MDSC бағытына бұрады, бұл MDSC-дің ісік микроортасында үлесін көбейтеді.

MDSC хемокиндік рецепторлардың бірнеше қатарын (CCR2, CXCR4, CXCR2 т.б.) экспрессиялайды, осылардың арасында MDSC-ге тән маркер ретінде C-C мотиві рецептор 2 (CCR2) жатады [94]. C-C лиганд 2 (CCL2) мен оның рецепторлары немесе хемокин рецепторлары (CCR) 2, 4 және 5 арасындағы өзара әрекеттесу нәтижесінде, M-MDSC жинақталуы пайда болатындығы тышқанның бірнеше ісік үлгісінде дәлелденген [95]. Жақындағы зерттеу жұмыстарында, CCL5 хемокин лигандты активті түрде гипоксия индукциялайтын фактор (HIF)-1 α сигнал беру каскадтын индукциялап VEGF факторына байланысты ангиогенезді индукциялайтыны анықталған. Осы HIF-1 α және VEGF екеуі де MDSC генерациясында және функциясында шешуші рөл атқарады деп саналады [96, 97]. Сондықтан, CCL5 MDSC миграциясына басты қатысушы бола алады. Қабыну аймағына MDSC субпопуляцияларының миграциясын, пайда болған хемокиндердің спектрімен анықтауға болады.

Жоғарыда сипатталған факторлар MDSC жинақталуына қатысатын негізгілері болып, олардың өндірілуі мен экспрессиясы арқылы патологиялық процеске MDSC қатысуын анықтауға болатынын көрсетеді. Осылайша, патологиялық жағдайда пайда болатын факторлар сүйек кемігіндегі жетілмеген миелоидты жасушалардан MDSC дифференциациясын индукциялап, оның

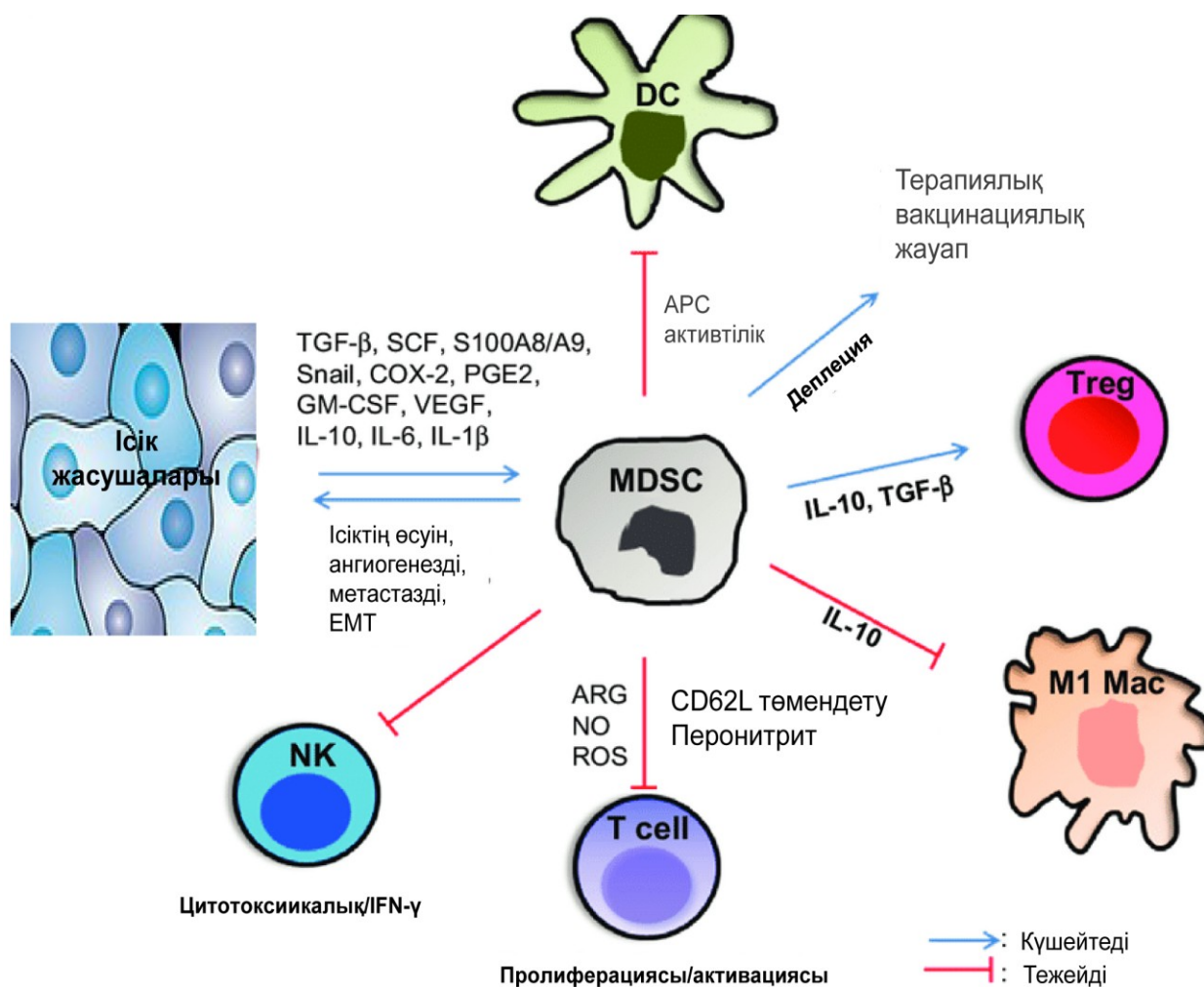
шеткі аймақтарға жинақталуын ынталандырады. Бұл кезде MDSC әртүрлі механизмдер арқылы эффекторлы жасушалар функциясын супрессиялайды.

1.1.5 MDSC супрессорлық әсерінің механизмдері

Ісік тудырылған жануарлардан бөлініп алынған MDSC-дің негізгі ерекшелігі, Т және NK жасушалардың цитолитикалық активтілігін тежеуі, бұл ерекшелік туа біткен және жүре пайда болған иммунитеттің әртүрлі функцияларына да өзіне тән ерекшеленген механизмдерімен әсер етеді және олардың ісікке қарсы активтілігі мен тиімділігін төмендетеді. Сонымен бірге ісік жасушаларының басқарылусыз өсуі мен метастаз жасауына ынталандырушы рөл атқарады [98].

Бұл механизмдер MDSC субпопуляциясына қарай әртүрлі болады. M-MDSC Т жасушалық жауапты антиген спецификалық және спецификалық емес жолдармен Arg-1, NO және цитокиндерге байланысты механизмдерді пайдалана отырып тежейді. Ал, PMN-MDSC (G-MDSC) иммундық реакцияны тікелей антиген спецификалық механизмдермен тежеуге қабілетті болады. Антиген спецификалық Т жасушалық төзімділікті индукциялау осы жасушалардың негізгі ерекшелігінің бірі болып осы қабілеті үшін ROS және NOX2 өндірілуін қажет етеді [79, p. 790].

Көптеген зерттеулерде анықталғандай, MDSC-дің иммуносупрессорлық функцияларының жүзеге асуы - жасуша бетінде экспрессияланған рецепторлар арқылы немесе қысқа өмір сүретін, еритін иммуносупрессорлық медиаторлардың әсері арқылы жүреді [99]. Олардың ішіндегі ең жақсы сипатталған механизмдер, жасушадан тыс ортадағы қажетті амин қышқылдарының концентрациясын төмендету (Arg-1 және iNOS арқылы), NO және ROS өндіру, TGF- β және IL-10 сияқты басқа қабынуға қарсы классикалық цитокиндерді жоғары деңгейде секреция жасау болып табылады. Азот пен оттегінің реактивті түрлері әртүрлі жолдар арқылы ісік микроортасына әсер етеді [100]. Олар тікелей немесе жанама түрде болуы мүмкін (сурет 3).



Сурет 3 – MDSC-дің иммундық жүйедегі жасушалармен әрекеттесуі

Ескерту – Автормен дереккөз негізінде жасаған [101].

1.1.5.1 Arg-1 және iNOS ферменттеріне тәуелді тежеу механизмі

MDSC функциясын ашуға арналған алғашқы зерттеулер, MDSC-дің супрессорлық активтілігі L-аргинин (L-Arg) амин қышқылының метаболизмімен байланысты жүзеге асатынын анықтады. L-Arg амин қышқылы MDSC экспрессиялайтын екі фермент үшін субстрат ретінде маңызды. Олар: iNOS және L-Arg амин қышқылын несеп пен L-орнитинге айналдыратын Arg-1 ферменттері. MDSC-дегі Arg-1 ферментінің активтілігі L-аргинин катаболизмінің жоғарылауына алып келеді, бұл микроортадағы алмаспайтын амин қышқылын ыдыратады. L-Arg амин қышқылының жетіспеушілігі түрлі механизмдер арқылы T жасушалардың пролиферациясын тежейді, соның ішінде олардың CD3 ζ молекуласының экспрессиясын төмендетеді және циклдік реттеуші циклин D3 мен циклге тәуелді киназа 4 (CDK4) экспрессиясының жоғарылауын тежеу арқылы жасушалық циклдің G0 фазадан G1 фазаға өтуін тоқтатады, нәтижесінде T жасушалардың пролиферациясы тежеледі [102].

L-Arg амин қышқыл деңгейінің төмендеуі, NK жасушалардың IFN- γ өніміне де әсер етеді. Бұл механизм MDSC-дегі Arg-1 ферментіне тәуелді

жүретін, сүт қоректілердің таргет рапамицинн (mTOR) сигналдық жолының активтену процесінің бұғатталуы арқылы жүргізіледі [103]. Arg-1 Th2-типті жасушалардың цитокиндерінің секрециялануын (IL-4, IL-13) индукциялап, T жасушалық рецептордың құрамы CD3 молекуласының экспрессиялануының жетіспеушілігіне алып келеді. CD3 T жасушалардың активтенуінің негізгі компоненті болып, осы молекула арқылы сигналдар T жасушалардың ядросына өтеді, олардың антигенге тәуелді активтенуін қамтамасыз етеді [104].

In vivo және *in vitro* жағдайында iNOS тежегіштерінің MDSC тудырған иммуносупрессияны кері қайтара алу қабілеті, NO өнімінің иммунореттеушілік функциясын растайды [105]. NO жасушаішілік-ақпараттық ақуыздардың функциясына теріс әсер етеді. Бұл әсер жасуша үшін маңызды цистеин қалдықтарының S-нитрозилденуімен немесе жанама түрде еритін гуанилат циклаза және протеинкиназа ферменттеріне тәуелді циклдік-гуанозиндік монофосфаттың (GMP) активтенуі арқылы жүзеге асырылады [106, 107]. Иммундық жүйедегі T жасушалардың активтенуіне қажетті ақуыздардың фосфорлануы және IL-2 рецепторларының сигналдық жолындағы маңызды ақуыздардың активтенуі (JAK1, JAK3, STAT5, жасушадан тыс сигналмен реттелетін киназа (ERK) және АКТ) NO әсерінен бұғатталады [107, р. 5731]. Бұл кезде, NO өнімі T жасушалық активтену мен пролиферацияны Jak 3 және STAT5 транскрипциялық жолдардың активтенуін бұғаттайды, нәтижесінде MHC II гендер экспрессиясы тежеліп және апоптоз тудырылады [108]. MDSC өндірген NO, B жасушаларға да әсер етеді, бұл STAT5a және STAT5b транскрипциялық факторлардың тежелуі арқылы жүреді [109, 110].

Arg-1 және iNOS екі фермент бірге экспрессияланған кезде Arg-1 жергілікті ортадағы L-Arg мөлшерін азайтып, iNOS2 ферменттінің активтілігін өзгертеді. iNOS2 ферментті, өз функциясын NO өндіруден O_2 (супертотық) өндіруге ауыстырады. Супертотық өз кезегінде сутегі асқын тотығының (H_2O_2) түзілуіне қатысады, ол NK жасушалардың активтену маркерлері NKG2D, NKp46 және NKp44 экспрессиясын және NK жасушасының цитолитикалық функциясы үшін керек перфориннің өндірілуін тежейді [111, 112]. Arg-1 және iNOS ферменттерінің біріккен активтілігі ісіктің ішіне инфильтрацияланған $CD11b^+$ миелоидты жасушалардың, сонымен қоса, көкбауырдағы $CD11b^+Gr-1^+$ жасушаларының супрессорлық активтілігі үшін маңызды рөл атқаратындығы жануарлар үлгілерінде нақтылы көрсетілді [113].

1.1.5.2 ROS молекуласына тәуелді тежеу механизмі

G-MDSC ROS молекулаларын жоғары деңгейде, ісік процесі кезінде өндіреді. Осы жоғары тотықты ROS арқылы T жасушаларының қалыпты функциясын өзгерте алады. Ал, ROS тежегіштері MDSC-дің T жасушаларға супрессорлық әсерін болдырмайды [114, 115]. Қалыпты жағдайда $Gr-1^+$ жасушаларында ROS бөліп шығару қабілеті төмен болып, $CD8^+$ T жасушалардың функциясын тежеу әсері болмайды [116].

MDSC бөлетін супертотық H_2O_2 , гидроксил радикалымен, гипохлор қышқылымен және пероксинитритпен тез әрекеттесуі ROS пайда болуына

әкеледі. Оның көбеюі нуклеин қышқылдарына, липидтерге және ақуыздарға зиян келтіреді, қабынуды күшейтеді және апоптозға ықпал етеді. MDSC-дің ROS молекулаларын өндіруінің қосымша механизмі, ісік микроортасындағы Arg-1 және NOS2 ферменттерінің бірлескен активтілігі арқылы жүреді [117]. Бұл ферменттер қажетті ортадағы ақуыздар мен ферменттердегі тирозин, цистеин, метионин және триптофанды нитраттау/нитросиллаттау арқылы бос радикалды пероксинитрит (PNT) (ONOO-) пайда болуына әкеледі, олар ақуыздардың биологиялық функцияларын өзгерте алады [118]. PNT T жасушалардың рецепторлары мен CD8 молекулаларын модификациялайды. Осы модификациядан кейін CD8⁺ T жасушалар фосфорланған MHC молекулаларын байланыстыру қабілетін жоғалтады және CD8⁺ T жасушалардың антигенге төзімділігі индукцияланады [119]. Сонымен қатар, PNT T жасушаларға тән CCL2 хемокиндердің посттрансляциялық модификациясын тудыру арқылы T жасушалардың қозғалысын тежеп, антиген спецификалық T жасушалардың ісікке енуіне кедергі келтіре алады [120]. AIDS үлгісінде (LP-BM5 реотровирустық инфекция) M-MDSC ROS молекуласымен жүзеге асатын супрессия арқылы B жасушалық жауапты тежеген [121]. Ал Адамдарда PMN-MDSC Arg, NO және ROS көмегімен B жасушалардың пролиферациясын және антиденелер өндіруін тоқтататындығы анықталды [122].

T жасушаларға тікелей әсер етуден басқа, ROS молекулалары да жанама түрде T жасушалардың иммундық жауабын модуляциялайды. Бұл кезде ісік жасушаларындағы антиген көрсетуші құрылымдарын (MHC молекуласын) өзгерту арқылы T жасушалардың активтенуіне кедергі келтіреді. Нәтижесінде, ісік жасушаларының T жасушалармен танылуы төмендейді, бұл антиген спецификалық цитотоксикалық T жасушалардың жауабына төзімді ісік жасушаларының пайда болуына әкеледі [123].

1.1.5.3 TGF- β цитокиніне тәуелді тежеу механизмі

TGF- β , тимустық T жасушалардың дамуының және иммундық жауапқа қатысатын T жасушалардың гомеостазының маңызды реттеушісі [124]. TGF- β және MDSC арасындағы байланысты алғаш рет Young және біріккен авторлар көрсетті. Олар ісігі бар тышқандардан алынған миелоидты прогенитор жасушалардан TGF- β , NO, IL-10 және PGE2 көп мөлшерде өндірілетінін анықтады [27, р. 1926]. MDSC нысана жасушалармен тікелей байланысы үшін мембранамен байланысқан TGF- β молекуласын экспрессиялайды, мембранасында экспрессияланған TGF- β арқылы NK жасушалардың активтену маркері NKG2D экспрессиясын, сонымен бірге NK жасушасының цитолитикалық функциясы үшін қажетті IFN- γ өндірілуін тежей алады [125, 126]. MDSC популяциясы IL-13 цитокинімен активтенген кезде TGF- β секреция жасайды. Ол жасушалық циклдің p27KIP1 және p21CIP1 сияқты тежегіштерінің экспрессиясын индукциялау немесе IL-2 секрециясын тежеу арқылы T жасушалардың жасушалық пролиферация циклін G1 фазасында тоқтатады, нәтижесінде T жасушалардың антигенге тәуелді пролиферациясы тежеледі

[127]. Маңыздысы, TGF- β сәйкесінше Th1 және Th2 типті жасушалардың конверсиясының негізгі реттеушісі T-bet және GATA-3 экспрессиясын тежеу арқылы CD4⁺ T жасушалардың Th1 немесе Th2 жасушаларына дифференциациялануын тежейтіндігі анықталды. Яғни, MDSC иммуносупрессорлық функцияларының бір бөлігін TGF- β цитокинін секреция жасау арқылы жүзеге асырады деуге болады [128].

1.1.5.4 MDSC супрессиясының қосымша механизмдері

MDSC иммундық жүйенің эффекторлы жасушаларына тікелей иммуносупрессорлық әсерінен басқада, иммуносупрессорлық жасушалардың тағы бір маңызды популяциясы CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T реттегіш («CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells (Treg cells)») жасушалардың генерациясын ісік кезде индукциялайды [129]. Treg жасушаларының бұл индукциясы, MDSC секреция жасайтын TGF- β және IL-10 цитокиндерінің қатысуы арқылы жүзеге асады [90, p. 1128]. TGF- β Treg жасушаларының наив T жасушалардан дифференциациялануын реттейтін негізгі цитокин ретінде маңызды. Treg жасушалары иммундық жасушалардың қалыпты функциясын жасуша-жасушалық байланыс арқылы төмендетеді, олардың қатерлі ісік ауруларындағы жинақталуы аурудың нашар болжамымен байланысы болады [130]. Сонымен бірге, MDSC индоламин 2, 3-диоксигеназа (IDO) ферментін экспрессиялау арқылы Treg жасушаларының пролиферациясын тездетеді [131].

MDSC-дің қосымша супрессорлық механизмдеріне T жасушалардың цитоплазмалық мембранасындағы, лимфа түйіндеріне және қабыну ошақтарына миграциясы үшін қажетті L-селектиндер экспрессиясын төмендету де кіреді [132]. Бұл төмендеу протеолитикалық бөліну және CD62L эктодоменінің түсіп қалуы арқылы жүреді. Бұл процеске дезинтегрин және металлопротеиназа домені 17 (ADAM17) қатысады. ADAM 17 көптеген жасушалардың, соның ішінде T жасушаларының цитоплазмасында болады, плазмалық мембранаға трансформацияланған кезде активті болып, мембранада экспрессияланған CD62L молекулаларымен байланысатыны анықталған [133].

MDSC иммундық жүйе жасушалар функциясын тежеуден басқа, оның ісік жасушаларының дамуын ынталандыру функциясы бар. Ісік-ассоцирленген MDSC қосымша өсу факторларын (VEGF, bFGF, Vv8 және MMP9) өндіру арқылы ісік микроортасының қалыптасуына, ісіктердің ангиогенезіне ынталандырушы әсер етеді. Яғни, MDSC метастазға дейінгі қабыну ошақтарының пайда болуына және бастапқы ісіктердің инфильтрация арқылы метастаз жасауына қолайлы жағдай жасайтынын зерттеулер көрсетті [134, 135]

MDSC үшін сипатталған әртүрлі иммуносупрессорлық механизмдердің көп болуы, бұл механизмдердің бір уақытта активті болатынын білдірмейді. Бұл механизмдер MDSC субпопуляция түріне, сондай-ақ аурудың кезеңі мен басталу орнына байланысты өзгеруі мүмкін. Сондықтан, MDSC жасушасының онкологиялық науқастардың шеткі қанда анықталуы диагноз нәтижесінің жаман болжамымен байланысты болады.

1.2 Созылмалы қабыну және MDSC

1.2.1 Созылмалы қабыну

MDSC онкологиялық процесс кезінде ең көп зерттелді. Дегенмен, соңғы зерттеулер бұл жасушалардың созылмалы ауруларға әкелетін созылмалы қабыну процестерінде маңызды рөл атқаратындығын көрсетті [136, 137]. Созылмалы қабыну процесі иммуносупрессорлы микроортаны қалыптастырады деп болжанады. Оның механизмі іс жүзінде жіті қабынудың механизмінен өзгеше, жіті қабынудың морфологиялық көрінісінде мастоциттер, нейтрофилдер және макрофагтар негізгі орынды иеленеді. Қабыну ұзақтығы бірнеше күнге жалғасады. Жіті қабыну кезінде бөгде антигенді сәтті жою қабынуды «шешеді» және ұлпалық гомеостазды қалпына келтіреді. Ал керісінше, бөгде антиген толығымен жойылмай, жіті қабыну сәтті аяқталмаған жағдайда анықталмаған салдарлары бойынша қатысушылары макрофагтар, T жасушалар, плазмалық жасушалар және фибробластар болатын, сонымен қоса ұсақ қан тамырларының көбеюінен созылмалы қабыну дамиды. Осы жасушалар бірлескен түрде әртүрлі органдарда клиникалық белгілері анық болмаған, созылмалы ауруларына әкелетін ұзаққа созылған қабынудың тұрақтылығын сақтауға қатысады [138]. Қабыну ұзақтығы бірнеше аптадан бірнеше жылға немесе өмір бойына жалғасады. Тиімділік тұрғысынан созылмалы қабыну, қабынуға қарсы цитокиндердің шамадан тыс бөлінуінен туындайтын «цитокиндік дауылдың» дамуына жол бермейді. Бұл кезде регуляторлық жасуша популяцияларының (T-реттеші жасушалар, NKT-жасушалар, толерогенді DC) активтілігінің жоғарылауын, нейтрофилдер, макрофагтар және DC жасушалар эффекторлы функциясының төмендеуін қамтыған, туа біткен иммундық жүйеде өзгерістер байқалады. Нәтижесінде, бұл жасушалар қабыну болған аймақта қабынуды ынталандыратын (TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 т.б.) және қабынуға қарсы (IL-10, IL-1RA, IL-27, TGF- β) цитокиндердің өндірілумен байланысты болатын ұзақ уақытқа созылған қабыну процесін ынталандырады [139]. Бұл процесс иммуносупрессорлы жасушаларының жинақталуымен және қабыну сигналдық жолдарының қатысуымен реттелінетін күрделі процесс болып саналады.

Созылмалы қабыну кезінде немесе созылмалы қабыну аймағында жойылған ұлпаларда пайда болған зақымдалу процестерін активтендіретін, хемокиндер, цитокиндер, арахид қышқыл метаболиттері және еркін радикалдар мен альдегидтер және қабыну медиаторлары (PGE2, iNOS, COX-2, VEGF) пайда болады [140]. Олар транскрипциялық факторлар активтенуін, гендердің мутацияларын және ақуыздардың құрлымындағы трансформациялық өзгерістерін индукциялай алады [141].

Созылмалы қабынудың дамуы қоздырғыштарға немесе кейбір эндогендік/экзогендік факторларға төмен дәрежелі, ұзаққа созылатын жауап ретінде басталады. Олардың ішінде циркадиандық ырғақтар реттелуінің бұзылуы (түнгі жұмыс, полярлық аймақтарда «ақ түндер», тұрақты жарықтандыру (түнде жарықтандыру)) созылмалы патологияны күшейтетіні зерттеулерде анықталды. Циркадиандық ырғақтар барлық түрлердің

метаболизмдік, физиологиялық және мінез-құлықтық функцияларында 24 сағаттық тербеліс үлгісін көрсетеді. Бұл үлгі жердің өз осі бойынша айналуына, организмдердің түбегейлі бейімделуіне байланысты жүреді [142]. Циркадиандық ырғақтардың пайда болуының молекулалық механизмдері, мидың супрахиазматикалық ядросында және шеткі ұлпаларда биохимиялық желіні ұйымдастырып, жасушалардың автономды сағат кардиореттегіштерін қалыптастырады. Бұл жасушалардың дифференциациясы және пролиферациясы сияқты әртүрлі қалыпты жасушалық функцияларды реттейді, сағаттық гендердің кең спектрін басқарады [143]. Сондай-ақ, созылмалы қабыну процестерін өзгертетін гормондардың секрециялануын (мелатонин) өзгерту арқылы созылмалы қабынудың дамуына әсер ете алады [144].

Тәжірибелік үлгілерді пайдаланған зерттеулерде, циркадиандық бұзылыстардан өткен жануарлардан алынған макрофагтарды, *ex vivo* жағдайында липополисахаридпен (LPS) ынталандырғанда қабыну цитокиндерінің секрециясы жоғарылаған [145]. Ал ұйқының бұзылуы қабыну цитокиндері IL-6, С-реактивті ақуыздар мен TNF- α деңгейінің жоғарылауына әкеледі [146]. Сондай-ақ, жануарларды жоғары майлы диеталармен азықтандыру сонымен бірге, түнде жарық астында ұстау, олардың салмағының артуы мен созылмалы төмен деңгейлі шеткі ұлпаларда қабынудың жоғарылауына әкелетінін көрсетті [147]. Ерте қартаю және онымен байланысты созылмалы қабыну, циркадиялық сағаттың гендік компоненті *Bmall* генінің нокаутына байланысты болатыны анықталып ырғақтық реттелудің маңыздылығын гендік деңгейде айқындалды [148]. Бұл мәліметтер, циркадиандық ырғақ бұзылысының созылмалы қабыну процесін модуляция жасай алатынын көрсетеді.

Созылмалы қабыну процесінің ұзаруы, Т- және В-лимфоциттер жиынтығының клонды әр түрлігі мен санының кемуінің, жүре пайда болған иммунитет қуаттылығының төмендеуінің көрсеткіші болады. Сонымен қатар, қабыну медиаторларының бірлескен әсері, иммуносупрессорлы жасушалардың миелоидты тармағына жататын күрделі популяциясы MDSC жинақталуына әсер етеді. Сондықтан, циркадиандық ырғақтар реттелуінің бұзылуы, MDSC индукциясын ынталандыру арқылы созылмалы қабыну процесін ұзартуға қатысатын фактордың бірі болуы мүмкін.

1.2.2 Созылмалы қабынудың дамуындағы MDSC рөлі

MDSC-дің рөлі созылмалы қабынудың басталуы мен өзгерісіне байланысты оң немесе теріс реттеуші болуы мүмкін. Оң әсерлері, тышқандардың семіруі кезінде макрофагтардың активтенген M2 макрофагтар жаққа поляризациясын қолдау арқылы қабыну гомеостазын бақылау және жергілікті қабынуды төмендетуде көрінді. Бұл кезде бауыр мен майлы ұлпада CD11b⁺Gr1⁺ жасушалар құрамының көбеюі CD8⁺ жасушалардың пролиферациясын тежеп, олардың апаптозын тудырады [149]. MDSC қорғаушы рөлі бауыр мен бүйрек фиброзы үлгілерінде де көрсетілді. Бұл кезде MDSC фиброз маркерлерін төмендету арқылы органды фиброздан қорғайды [137, p.

1]. Ал ресвератролмен индукцияланған MDSC, созылмалы колиті бар IL10⁻ тышқандардың көкбауырындағы CXCR3⁺ T жасушалар үлесін және қабыну цитокиндер деңгейін төмендетіп қабынуды жеңілдеткені анықталды [150]. MDSC-дің зиянды әсерлері аяқталмаған созылмалы қабынумен байланысты бірқатар созылмалы инфекцияларда байқалды. Тышқанның өкпесіндегі созылмалы туберкулез инфекциясы мен адамдардағы басқарылмайтын HIV-1 инфекциясы кезінде, қан айналымында MDSC санының көрсеткіші жоғарылайтыны, ал CD4⁺ T жасушалар деңгейінің төмендейтіні анықталды. Бұл кезде, MDSC супрессорлық функциясы арқылы инфекцияға қарсы иммунитет тиімділігін төмендетті [151, 152]. Ал, егде жастағы адамдардың қанда MDSC үлесі айтарлықтай жоғарылайды, бұл қан сарысуындағы IL-1 және IL-6 цитокиндер деңгейінің жоғарылауы және онкологиялық аурулардың даму қаупінің жоғалауымен корреляцияда болды [153]. Табиғи қартайған тышқандардағы инфекцияға тәуелсіз төмен дәрежелі қабыну реакциясы, сүйек кемігі мен көкбауырдағы NF-κB экспрессиялайтын CD11b⁺Gr1⁺ MDSC жасушаларының үлесінің айтарлықтай артуына әкелді [154]. Бұл мәліметтер MDSC феномені тек, қатерлі ісік процесінде ғана емес, сонымен қатар, әртүрлі қабынудың патогенезінде әртүрлі функциясы бар қатысушысы болатынын түсіндіреді.

1.2.3 Созылмалы қабынумен байланысты онкологиялық процестегі MDSC рөлі

Созылмалы қабыну жүрек-қан тамырлар ауруы, Альцгеймер ауруы, Паркинсон ауруы, қатерлі ісік, семіздік, диабет сияқты созылмалы аурулардың дамуының басты негативті факторы болып табылады. Бұл аурулардың болуы адамдардың қартаю кезінде өмір сапасын төмендетеді және ең соңында олардың өлімінің басты себебі болып қалады. Клиникалық және эпидемиологиялық мәліметтер, созылмалы қабыну процесі қатерлі ісіктердің прогрессиясы үшін қолайлы иммуносупрессивті микроортаны қалыптаструшы екенін көрсетті [7, р. 1005]. Бұл орталардың өкпе, қуық асты безі, бүйрек, ұйқы безі, өңеш, асқазан, бауыр және т.б. органдарда пайда болуы, сол орғандағы ісіктердің дамуы үшін ынталандырушы факторы бола алады. Мысалы, жарасы бар науқастардың 20%-нан астамы бастапқы диагноздан кейін 30 жыл ішінде жарамен байланысты қатерлі ісікке шалдығады [155]. Тыныс алу жүйесінің қатерлі ісігінің туындау қаупі, тыныс алу жүйесінің созылмалы қабынуының ауырлығымен және ұзақтығымен байланыста болса, созылмалы ұйқы без қабынуы мен ұйқы без қатерлі ісігі арасында да байланыс болатыны анықталды [156]. Асқазанның аденокарциномасының басты себебі – *Helicobacter pylori* инфекциясы және асқазан-ішек жолдарының созылмалы қабынуы болып табылады [138, р. 516]. Клиникалық зерттеулер стероид емес қабынуға қарсы дәрілердің «nonsteroidal anti-inflammatory drugs, (NSAIDs)», атап айтқанда аспирина қатты ісіктердің (solid tumor) метастазы мен науқастардың өлімінің төмендеуіне әкелетінін көрсетті [157], бұл қатерлі ісіктердің басталуы мен

дамуына созылмалы қабыну әсер етеді деген гипотезаның нақтылығын түсіндіреді.

Осы созылмалы қабынумен байланысты ісік дамуы кезіндегі иммундық жүйе жасушаларының ара-қатынасында MDSC рөлінің маңызды екені анықталды. Тәжірибелік үлгілерді қолданумен жүргізілген бірнеше зерттеулер созылмалы қабыну процесі индукциялаған MDSC, иммундық бақылау мен ісікке қарсы иммунитетті бұғаттау арқылы ісіктердің өсуі мен прогрессиясына көмектесетінін көрсетті. Мысалы, тоқ ішектегі қабыну кезінде MDSC-ді элиминациялау колитпен байланысты ісік дамуын баяулауына әкелген [158]. Керісінше, $Cxcr2^{-/-}$ тоқ ішек қабыну тудырылған тышқандарға MDSC-ді адаптивті көшіру, тоқ ішектің созылмалы қабынуын және колитке байланысты ісіктердің қалыптасуын және өсуін, ісік жасушаларына қарсы $CD8^{+}$ жасушалардың цитотоксикалығын тежеу арқылы ынталандырған [159]. Органдардағы қабынуды ынталандыратын IL-1 β , IL-6, PGE2, S100 ақуызы, GM-CSF [75, p. 4505-4506], TNF α және басқа да медиаторлар, сүйек кемігінде MDSC дифференциациясы мен активтенуін индукциялайды, сонымен бірге, бұл факторлар ісік дамуында өзіндік функциялары анықталған [160, 161]. трансгенді тышқандардың асқазан ұлпасында IL-1 β концентрациясының жоғарылауы, көкбауыры мен асқазанында MDSC-дің ұлғаюымен байланысты, асқазан қабынуының және асқазан қатерлі ісіктерінің дамуына әкелді және осы жасушалардың асқазанда инфильтрациясы қабыну дамуының ерте кезеңінде анықталған [162]. Осылайша, MDSC тек қатерлі ісік кезінде доминатты болып қана қоймай, қабыну мен қабыну медиаторларының қатерлі ісікке үлес қосуына жауап беретін негізгі механизмдерде де қатысушы бола алады.

1.3 MDSC функциясын тоқтатуға арналған зерттеулер

Жануарлардың ісіктерінен бөлініп алынған MDSC-дің негізгі қасиеті CTL және NK жасушаларының ісік жасушаларына қарсы цитолитикалық активтілігін төмендету болып табылады [15, p. 423-424]. Ал, қатерлі ісікпен ауыратын науқастардың қан айналымындағы MDSC-дің жоғары деңгейі иммунотерапияның тиімділігін шектейді. Мысалы, 1864 науқасқа жүргізілген мета-анализ нәтижесі, қатерлі ісік асқынған науқастарда MDSC-дің қандағы деңгейі жоғары болатындығын көрсетті [163]. Бұл қатерлі ісік кезіндегі MDSC-ді элиминациялаудың маңыздылығын көрсетеді. Осыған байланысты ісік процесі кезінде MDSC-дің иммуносупрессорлы активтілігін тежеу үшін MDSC-дің ісіктің ішіне жиналуын тежеу және миелопоэзді MDSC-ді өндіруші бағытынан тежеу және/немесе MDSC-ді элиминациялау сияқты терапиялық агенттер/жолдар қолданыла бастады [18, p. 6].

Осы агенттердің ішінде ретиноин қышқылының рецепторымен байланысатын А дәруменінің туындысы болып табылатын алл-транс-ретиноин қышқылын (ATRA) атап өткен жөн. ATRA, әдетте лейкозды емдеу үшін қолданылады, бірақ соңғы зерттеулер ATRA MDSC-ды жетілген миелоидты жасушалар популяцияларындағы DC мен макрофагтарға дифференциациялануын индукциялай алатынын көрсетті. Кішкене жасушалы

өкпенің қатерлі ісігі (SCLC) бар науқастарды клиникалық зерттеу кезінде АТРА препаратының MDSC функциясын тежегіш әсері расталды [164].

Осы саладағы зерттеулер төмен дозадағы 5-флуороурацил (5-fluorouracil) және гемцитабин (gemcitabine) сияқты цитотоксикалық агенттер MDSC-дің жинақталуын тежейтіндігін көрсетті [52, р. 6-7]. Бірақ, гемцитабинді ұйқы безінің қатерлі ісігі дамыған науқастарға, организмде ферментативті түрде 5-флуороурацилға айналатын препарат – капецитабинмен (capecitabine) бірге тағайындалғанда, қандағы MDSC деңгейінің төмендеуі байқалмады [165]. Басқада зерттеу жұмыстарында, MDSC элиминациялау қабілеті бар доцетакселді (docetaxel), 4T1 сүт бездерінің ісіктері бар тышқандарға қолдану гранулоциттік фракцияны қамтыған көкбауырдағы MDSC мөлшерінің төмендеуіне әкелді, сонымен қатар MDSC-дің супрессорлық әсерін тежеп, CD4⁺, CD8⁺ Т-жасушаларының функциялық активтілігі мен IFN- γ өнімін қалпына келтірді. Ал, доксорубицинмен (doxorubicin) сүт безінің қатерлі ісігі бар тышқандарды емдегеннен кейін көкбауыр мен шеткі қандағы MDSC пропорциясы мен абсолютті саны айтарлықтай төмендегені көрсетілді [166]. Сунитиниб (sunitinib) ісікке қарсы химиятерапиялық препарат, ол MDSC генерациясына қатысатын VEGF және c-kit сигналдарының берілуін бұғаттай алады. Осылайша, бүйрек жасушалық карциномасы бар пациенттерді сунитинибпен емдеу циркуляциялық MDSC деңгейінің төмендеуіне әкелді [167]. Дегенмен, MDSC өкпе қатерлі ісігі кезінде сунитинибқа (sunitinib), цисплатин (cisplatin) және басқада химиятерапияларға, сонымен қатар миеломада, doxorubicin мен мелфаланға (melphalan) төзімді әсер көрсетті [18, р. 7]. Бұл бағыттағы кейбір жетістіктерге қарамастан, MDSC-ге бағытталған химиялық терапияның жасуша-спецификалық емес болуына байланысты, олардың тұтас организмге кері әсері анықтала бастады [19, р. 6645].

MDSC-дің иммуносупрессорлы активтілігін тежеуге бағытталған басқа да стратегиялар бар. Олардың ішіндегі логикалық тәсіл MDSC иммуносупрессорлы активтілігіне делдал болатын Arg-1 және iNOS екі маңызды ферментті тежеу болып табылады. Осы екі ферменттің тежегіші – нитроаспирин (NO-аспирин) және фосфодиэстераза 5. Фосфодиэстераза 5 тежегіші IL-4R α экспрессиясын төмендетеді. Бұл кезде Arg-1 және iNOS экспрессиясының азаюы, көкбауырдағы MDSC деңгейінің төмендеуіне әкеледі [168, 169]. Бұр екі фермент физиологиялық жағынан мочевиана цикліне қатысады. Мочевина циклі организм қолданған ақуыз бен амин қышқылдарының ыдырауынан пайда болатын артық азотты өңдейді. Артық азотты ыдырату арқылы организмнен шығару, оның улы аммиак түрінде жиналуына жол бермейді [170]. Сондықтан оларды тежеу екінші жағынан кейбір физиологиялық процестердің өзгерістеріне әкелуі мүмкін.

MDSC-дің ісіктерге ену және жинақталу қабілетін тежеуге бағытталған қосымша агенттер зерттелуде. Соңғы жылдары, MDSC-ге фармакологиялық әсер ету үшін оның иммуносупрессорлық функциясын, олардан өндірілетін молекулаларды, олардың сүйек кемігінен жетілуін және сүйек кемігінен шеткі аймақтарға миграциясын тежейтін бірнеше әдістер өңделді. Олардың бірі

MDSC дифференциациясы мен реполяризациясын активті макрофагтар (M1) мен нейтрофилдер (N1) бағытына өзгерту [98, р. 267], бірақ бұл жолдарды қолдану санаулы онкопатологиямен шектелді. Ал, MDSC-ді Gr-1 маркеріне қарсы моноклонды антиденелермен селективті түрде элиминациялау, *in vivo* жағдайында Т жасушаларының ісікке қарсы активтілігін қалпына келтірді және ісік салмағының едәуір төмендеуіне әкелді [101, р. 11-12]. Бірақ бұл тәсілдің ықтимал қаупі, бұл антиденелер MDSC-ге ұқсас фенотиптік профилге ие гранулоциттердің жетіспеушілігіне, соның салдарынан оппортунистік инфекциялардың дамуына әкелуі мүмкін. Сонымен қатар, адамдарда MDSC Gr-1 маркерін экспрессия жасамайды, бұл жануарлар үлгісімен шектеледі. Осылайша MDSC-ге бағытталған терапияда көптеген қиындықтар мен сәтсіздіктер байқалауда.

Жинақтай келгенде, онкологиялық өлім-жітімді төмендету үшін канцерогенездің қауіпті факторларының иммундық жүйе жасушаларына әсерін терең зерттеу керек. Оның бірі созылмалы қабыну болып табылады. Созылмалы қабынудың қатерлі ісіктердің дамуын активтендірудегі MDSC-дің фенотиптік және функциялық ерекшеліктерін бірнеше үлгіде жан-жақты қарастыру, ол иммундық қадағалаудан құтылатын ісіктердің алдын алу және әсерлі емдеу шараларын жүргізу үшін көмектесетіні анық. Сонымен қатар, MDSC-дің активтенуі, ол қабыну процесімен ғана байланысты болмауы мүмкін. Бұл процеске қабыну реакциясын өзгерте алатын циркадиандық ырғақтардың бұзылуы да қатысуы мүмкін. Ал, MDSC-ді элиминациялау үшін селективті терапиялық агенттерді іздестіру керек. Осы анықталған бағытта зерттеулер жүргізу диссертациялық жұмыстың негізгі мақсаты болып табылады. Бұл зерттеулер иммунология саласы үшін маңызды.

2 ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ

2.1 Зерттеу материалдары

2.1.1 Жануарлар

Charles River зертханасынан (АҚШ) сатып алынған және М. Айкымбаев атындағы Қазақ карантиндік және зооноздық инфекциялар ғылыми орталығының виварийінде көбейтілген CD-1 линиялы тышқандар және Онкология және Радиология ғылыми-зерттеу институтының виварийінде көбейтілген CBA линиялы тышқандар пайдаланылды. Диссертациялық жұмысқа қажетті жануарлардың тәжірибелік үлгілері ҚР ДМ Онкология және Радиология ғылыми-зерттеу институтының вивариясында алынды және зерттеу жұмыстары аяқталғанға дейін сол жерде болды. Зерттеу жұмыстары үшін салмақтары 20-28 г. 5-7 апталық аталық тышқандар таңдап алынды. Жануарларды зерттеуге пайдалану Асфендияров атындағы Қазақ Ұлттық Медициналық Университетінің және М.А. Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институтының этика комитеті жағынан мақұлданды (№ 7 (71) отырысының хаттамасынан үзінді) және халықаралық этика талаптарына сай орындалды [171].

Тәжірибелерге бақылау жануарлары (БЖ), ісігі бар жануарлар (ІЖ), адьювант артритті жануарлар (АЖ), жарықтандырылған (түнде жарықтандыру) жануарлар (ЖЖ), адьювант артрит пен жарықтандырылған жануарлар (АЖЖ), адьювант артрит пен ісік біріктірілген жануарлар (АІЖ) топтары қолданылды. Әр тәжірибелік топқа кемінде алты тышқан кірді. Барлық жануарлар 21-23°C температурада, стандартты полипропилен торларында ұсталды және оларға стандартты зертханалық тамақ пен таза су берілді. Анестезияланған жануарлардан хирургиялық жолмен көкбауыры, сүйек кемігі, лимфотүйіндері, тимусы және тері асты ісігі алынды, ELISA үшін шеткі веналық қан көздің перии-орбитальды синусынан жиналды.

2.2 Зерттеу әдістері

2.2.1 Перкол дайындау

Перкол органдардан әртүрлі жасушалар фракциясын тығыздығына қарай бөліп алу үшін қолданылды. Қажетті перкол (Sigma-Aldrich, АҚШ) тығыздығын дайындау үшін залалсыздандырылған деионизирленген су және залалсыздандырылған 1,5 М NaCl ерітіндісі қолданылды. Перколдің бастапқы тығыздығы 1,13 г/мл. Қажетті перкол тығыздығын алу үшін бастапқы перколға 10% 1,5 М NaCl ерітіндісі және қажетті көлемге дейін деионизирленген су қосылды. Перкол көлемі төмендегі формула бойынша есептелінді (1) [172]:

$$V_0 = V(\rho - 0,1\rho_{10} - 0,9) / (\rho_0 - 1), \quad (1)$$

Мұндағы: V_0 – сұйытылатын бастапқы перколдің көлемі (мл)

V – қажетті перколдің көлемі (мл)

ρ – алынатын перкол ерітіндісінің тығыздығы (г/мл)

ρ_0 – бастапқы перкол ерітіндісінің тығыздығы (г/мл)

ρ_{10} – 1,5 М NaCl ерітіндісінің тығыздығы (г/мл)

2.2.2 Қоректік орталарды дайындау

Қоректік орталар жасушаларды *in vitro* жағдайында зерттеу үшін пайдаланылды. Сұйық қоректік орта құрғақ RPMI-1640 немесе DMEM препаратынан (Sigma-Aldrich, АҚШ) дайындалды. Препараттарды еріту үшін деионизирленген су пайдаланылды және өндірушінің нұсқаулығы бойынша рН 7,4 мәніне жеткізілді. Дайындалған сұйық орта 0,22 мкм мембраналық сүзгі арқылы ультрафилтрация жолымен залалсыздандырылды. 2-8 °С тоңазытқышта сақталды.

Толық қоректік орта (ТҚО) 10% бұзаудың эмбрионалды сарысуы (FBS), 100 мкг/мл пенициллин/стрептомицин (Sigma-Aldrich, АҚШ) және 2 мМ L-глутаминмен толықтырылған RPMI-1640 немесе DMEM негізінде дайындалды.

2.2.3 Фосфаты-тұзды буферін (PBS) және колонка буферін дайындау

PBS, жасушаларды жуу және колонка буферінің ерітіндісін дайындау үшін пайдаланылды. PBS ерітіндісін дайындау үшін тазартылған суда NaH_2PO_4 және NaCl ерітілді, рН 7,4 мәнге жету үшін NaOH пайдаланылды. Колонка буферін дайындау үшін PBS ерітіндісіне 0,5% FBS және 0,002 М EDTA қосылды. Барлық алынған ерітінділер диаметрі 0,22 мкм стерилді мембраналық сүзгіден өткізіліп қолданғанға дейін 4-8 °С тоңазытқышта сақталды.

2.2.4 AFP конъюгаттарын дайындау

AFP-FITC конъюгатын дайындау

Флуоресцеин изотиоцианатымен (FITC) (Sigma-Aldrich, АҚШ) AFP конъюгациясы үшін 1 мг лиофилденген AFP препараты 2 мл борат буферінде ерітілді (рН 9.0). Ертіндіге 1 мг/мл концентрациясындағы FITC/ДМСО ерітіндісінен 100 мкл қосылып, қараңғы жерде 37 °С температурада тұрақты шайқау арқылы инкубацияланды. Байланыспаған FITC, PBS арқылы PD-10 бағанында Sephadex G-25 филтрациясымен тазаланды. Алынған конъюгат -20 °С температурада сақталды [173].

AFP-DR конъюгатын дайындау

AFP мен даунорубицин (DR) (Sigma-Aldrich, АҚШ) конъюгациясы үшін 3 мг AFP және 0,5 мг DR препараттары 1 мл PBS ерітіндісінде ерітілді және ерітіндіге 4 мкл 25% глутаралдегид ерітіндісі қосылды (соңғы концентрациясы 0,1%). Ерітінді бөлме температурасында 15 мин. тұрақты шайқау арқылы инкубацияланды. Байланыспаған DR, PBS арқылы PD-10 бағанында Sephadex G-25 филтрациясымен тазаланды [174]. Алынған конъюгат -20 °С температурада сақталды. PD-10 бағанын тазалағаннан кейін, байланыспаған DR концентрациясы спектрофотометрде 482 нм (максималды сіңіру) калибр қисығының көмегімен (оптикалық тығыздыққа қарсы наив DR концентрациясы бойынша) анықталды. Конъюгаттағы AFP концентрациясы спектрофотометрде 280 нм толқын ұзындығында анықталды.

2.2.5 Жануарлардың тәжірибелік үлгілерін алу

2.2.5.1 Адьювант артрит үлгісін алу

Адьювант артрит үлгісі құрамында қыздыру арқылы активтілігі жойылған *Mycobacterium tuberculosis* (1 мг/мл) бар толық адьювант Фрейндт (ТАФ) ерітіндісін (Sigma-Aldrich, АҚШ), сынақ тобындағы тышқандардың артқы аяғының табан тері астына (100 мкл/тышқан) бір рет инъекциялау арқылы алынды [175]. Бақылау тобындағы тышқандарға адьювант Фрейндтің орнына 100 мкл PBS ерітіндісі инъекцияланды. Артқы аяқтың табан диаметрі артрит басталғанға дейін және кейін калиппер көмегімен өлшенді. Бақылау апталарынан кейін тышқандардың қажетті органы этикалық ережелерге сәйкес хирургиялық жолмен алынып зерттеулер үшін пайдаланылды.

2.2.5.2 Жарықтандыру үлгісін алу

Тәжірибелік тышқандар 2 немесе 4 апта бойы тек түнде, сағат 19:00 – 7:00 уақыт аралығында тұрақты жарықтандырылды (750 lux - қызу шамы: 60 Вт/1 метр квадрат жерге). Ал күндізгі уақытта қалыпты циклде ұсталды. Тәжірибе күн/түн ұзақтығы бірі біріне жақын наурыз және сәуір айларында жүргізілді. Ал бақылау топтары табиғи жарық/қараңғы циклінде ұсталды [176]. Тәжірибелік жануарлардың эвтаназияланды және ұлпалардың жиналуы циркадиандық тербелістер айрмашылығының алдын алу үшін әрдайым таңғы сағат 9:00 орындалды.

2.2.5.3 Эрлих ісік үлгісін алу

Эрлихтың асциттік ісігі тышқандардың сүт безінің спонталды аденокарциномасы болып ісік биологиясында жақсы қалыптасқан үлгі, негізінен ісіктердің патогенезін зерттеу және ісікке қарсы агенттерді дамыту үшін пайдаланылды. Алғашқы зерттеулер, тері астындағы Эрлих ісігінің өкпеге, бауырға, көкбауырға, бүйрекке, сүйекке, диафрагмаға, қан мен бүйрек үсті бездеріне метастазы болатынын көрсетті [177]. Ісік үлгісін алу үшін Эрлих ісік жасушалары, жабайы ақ тышқандардың іш қуысына залалсызданған физиологиялық ерітіндіде 5-10 миллион/мл жасушалық суспензия инъекцияланды. 10-15 күннен кейін асцитті сұйықтық шприц көмегімен алынып, ол жасушалар 1000 рет/мин. 10 мин. центрифугаланды және физиологиялық ерітіндіде суспензияланды. Осы Эрлих ісік жасушалары CD-1/CBA линиялы тышқандардың тері астына 500 мың/0,1 мл PBS ерітіндісінде инъекцияланды [178]. Бақылау топтары үшін тері астына PBS ерітіндісі инъекцияланды. Бақылау апталарынан кейін көкбауыры моноклеар жасушаларының суспензиясын алу үшін қолданылды. Ісіктің салмағы өлшенді.

2.2.6 Лимфоорганның жасушалылығын бағалау

Тышқандар бақылау мерзімі аяқталғаннан кейін, анестезияланған жануарлар цервикалды дислокация жолымен эвтаназияланды. Көкбауыр және жамбас сүйектері алынды. Лимфоидты мүшелер өлшеніп, шыны гомогенизатор көмегімен PBS ерітіндісінде жасуша суспензиясы дайындалды. Жамбас

сүйектері бұлшық еттерден тазартылып, сүйектің ішкі кемік майы 10 миллилитрлік шприцтің көмегімен PBS ерітіндісімен жуылды. Алынған жасуша суспензиясы диаметрі 30 мкм болатын мембрана арқылы сүзіліп, центрифугалау әдісімен 10 минут бойы екі қайталанып жуылды. Алынған жасушалар саны Горяев камерасындағы анықтады. Эритроциттер лизисі үшін құрамында 0,83% NH_4Cl , 0,1% KHCO_3 , 0,003% ЭДТА (рН 7,2-7,4) бар лизис буфер (ЛБ) пайдаланылды. Нәтижелер формула бойынша орган салмағының бір мг салмаққа бөлгендегі жасушалардың салыстырмалы құрамы анықталды (2):

$$C = L/M \text{ [кл./мг]} \quad (2)$$

Мұндағы: C – жасушалылығы;

L – органдағы жасуша саны;

M – орган салмағы.

2.2.7 Көкбауыр моноклеарлы жасушалар суспензиясын алу

Бақылау және тәжірибелік тобындағы тышқандардан этикалық ережелерге сәйкес хирургиялық жолмен алынған көкбауыр әйнек гомогенизатор көмегімен PBS ерітіндісінде гомогенизация жасалды. Көкбауыр моноклеар жасушалар фракциясы 3 түрлі жолмен алынды. Біріншісі, тікелей цитометриялық талдау үшін көкбауыр моноклеар жасушалар суспензиясынан эритроциттер ЛБ ерітіндісімен 4 мин. бойы бөлме температурасында ұстау арқылы лизис жасалды. Жалғасты жасушалар PBS ерітіндісінде 300g/10 мин. центрифугалау арқылы жуылып, диаметрі 30 мкм болатын сүзгілер арқылы ұлпа бөлшектері мен макро қалдықтардан тазаланды. Екіншісі, Ficol-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция) тығыздық градиентінде 400g/30 мин. бойы центрифугалау арқылы эритроциттерден оқшауланған жасушалар алынды. Үшіншісі, MDSC популяциясын магнитті бөлінуі үшін көкбауыр моноклеар жасушалары Histopaque-1083 (Sigma, США) тығыздық градиентінде ұқсас жағдайда центрифугалау арқылы алынды. Сақина түрінде бөлектелген моноклеар жасушалар фракциясы 300g/10 мин. бойы центрифугаланды және PBS ерітіндісінде суспензияланды.

2.2.8 Сүйек кемігі жасушаларының өміршеңдігін анықтау

Жасушалар тышқанның артқы аяғының сүйек кемігінен RPMI-1640 коректік ортасымен жуу арқылы алынды. Алынған суспензия залалсыз пластикалық пробиркаларда біртекті суспензия болғанға дейін суспензияланды. Алынған суспензия 200g/10 мин. бөлме температурасында центрифугаланды. Жасуша тұнбасы RPMI-1640 ортасында қалпына келтірілді және Горяев камерасында жасушалардың өміршеңдік пайызы трипан көк бояғышының көмегімен есептелінді. Трипан көгін жасушалар суспензиясына қосу 1:1 арақатынасында жүргізілді. Бұл әдіс сүйек кемігінің жасушаларын инкубация жасағаннан кейін де, олардың өміршеңдігін анықтау үшін пайдаланылды.

2.2.9 Сүйек кемігінен MDSC алу

Асептикалық жағдайда хирургиялық жолмен этикалық ережелер бойынша алынған артқы аяқ сүйек кемігінен моноклеар жасушалары жиналды. Эритроциттер ЛБ көмегімен лизис жасалынып, 10% DMEM толық қоректік ортасында жуылды және суспензияланды. Осы жасушалардан MDSC алу үшін 1×10^6 /мл жасушалар, құрамында 2-меркаптоэтанол (50 мкМ), GM-CSF (40 нг/мл) (Biolegend, АҚШ) және IL-6 (40 нг/мл) (Life Technologies, АҚШ) бар толық DMEM қоректік ортасында диаметрі 50 мм петри ыдыста икубацияланды. Зерттеу жұмыстарда, бұл цитокиндердің гемопоэтикалық бастапқы гетерогенді популяциялардан MDSC генерациялануын индукциялайтыны көрсетілген [79, р. 790]. Жасушалар 4 күн бойы 5% CO₂ бар инкубаторда өсірілді. Инкубация аяқталудан 18 сағат бұрын MDSC функцияларын активтендіру үшін қоректік ортаға TNF α цитокині (10 нг/мл) (Life Technologies, АҚШ) қосылды. Инкубация жасаған жасушалардың супернатантты жиналып -20 °C температурада сақталды (NO және ELISA талдауы үшін). Жасушалар PBS ерітіндісінде жуылып иммуносупрессорлық тест үшін қолданылды немесе ағынды цитометриялық талдау жасалды.

2.2.10 MDSC популяциясын иммуномагниттік сепарациялау әдісі

MDSC популяциясын тәжірибелік және бақылау тобындағы жануарлардың көкбауырынан немесе сүйек кемігінен иммуномагнитті бөлу, өндіруші фирманың нұсқаулығына (Miltenyi Biotech, Германия) сәйкес Myeloid-Derived Suppressor Cell Isolation Kit бөлу жиынтығы көмегімен жасалынды. Бұл үшін 1,083 г/мл тығыздық градиентінде алынған 10^8 моноклеар суспензиясы, 350 мкл колонка буферде суспензияланып, Fc рецепторларын бұғаттайтын реагент (50 мкл) қосылып толық араластырып 10 мин. 4 °C температурада инкубацияланды. Инкубациядан кейін биотинмен конъюгацияланған Ly6G маркеріне қарсы 100 мкл антидене қосылды, жалғасты 15 мин. 4 °C температурада инкубацияланды. Келесінде, жасушалар жуылып 800 мкл колонка буферде қайта суспензияланып, 200 мкл анти-биотин микробидс ерітіндісі қосылды және 15 мин. 4 °C температурада инкубацияланды. Бұл жасушалардан Gr-1^{high}Ly6G^{high} G-MDSC субпопуляциясы позитивті магниттік сепарация арқылы алынды. Қалған негативті фракция жуылып 400 мкл колонка буферде қайталай суспензияланып, 100 мкл Gr-1 маркеріне қарсы Gr-1-биотин антиденесі қосылып 10 мин. бойы 4 °C температурада инкубацияланды. Кейіннен жасушалар жуылып 100 мкл стрептавидин микробидс ерітіндісі мен 900 мкл колонка буферінде 15 мин. 4 °C температурада инкубацияланды, позитивті магниттік сепарация арқылы Gr-1^{dim}Ly-6G⁻ M-MDSC субпопуляциясы алынды. Ал басқа магниттік антиденелермен байланыспаған басқа иммундық жүйенің барлық жасушалары MDSC емес (non-MDSC) популяциялар да зерттеулер үшін пайдаланылды.

2.2.11 Жасушалардың пролиферациясын анықтауға арналған тесттер *MTT-тесті*

Тышқандардан алынған көкбауыр моноклеарлы фракциясы құрамында 5 мкг/мл Конканавалин А (ConA, Sigma-Aldrich, АҚШ) бар 10% FBS қосылған RPMI-1640 (Sigma Life-Science, АҚШ) толық қоректік ортасында 2×10^5 жасуша/200 мкл концентрациясы бойынша 96-ұяшықтық планшетке отырғызылды. Моноклеарлы жасушаларға (таргет жасушалар), магнитті бөлу арқылы алынған G-MDSC немесе M-MDSC (эффектор жасушалар) 2:1 және 1:1 қатынасында қосылды және 5% CO₂ 37 °C температурада 72 сағат бойына инкубацияланды. Инкубацияның аяқталуына 4 сағат қалғанда әр ұяшыққа 20 мкл (5 мг/мл) MTT ерітіндісі (Sigma-Aldrich, АҚШ) қосылды. Реакция соңында қоректік орта суспензиясы пипетка көмегімен мұқият алынып, кристалдардың тұнбасы бөлме температурасында құрғатылды, 100 мкл ДМСО қосылды. Формазан кристалдары ерігеннен кейін оптикалық тығыздығы (OD) 492/630 нм толқын аралығында StatFax 2100 (Awareness Technology Inc., АҚШ) талдағышында анықталды.

CFSE-тесті

Тышқандардан алынған көкбауыр моноклеарлы фракциясы 10% FBS қосылған RPMI-1640 толық қоректік ортада суспензияланды және жасушалардың пролиферациясын анықтауға қолданатын флуоресцентті бояғыш 6-carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Sigma-Aldrich, АҚШ) ерітіндісі (5 мкМ) қосылып 6 мин. бойы 4 °C температурада инкубацияланды. Келесінде, CFSE таңбасы белгіленген жасушалар құрамында 5 мкг/мл ConA бар 10% FBS қосылған RPMI-1640 толық қоректік ортада 2×10^5 жасуша/мл концентрациясында 5% CO₂, 37 °C температурада өсірілді. Магниттік бөлу арқылы алынған G-MDSC немесе M-MDSC эффектор: таргет 1:4 қатынасында қосылды. 72 сағаттан кейін жасуша культурасы ағынды цитофлуориметрияда талданды. Ал, сүйек кемігінен генерацияланған MDSC-мен бірге өсіру жағдайында, таргет жасуша культурасы жуылғаннан кейін CD8-PerCP флуоресцентті моноклонді антиденесімен боялады және CD8⁺ жасушаларының пролиферация деңгейі бағаланды.

2.2.12 Ісік ұлпаларының диссоциациясы

Ісіктен жеке жасушалар суспензиясын алу үшін ісік ұлпалары кішкене бөлшектерге бөлініп, 2 мг/мл коллагеназа IV типімен (Gibco, АҚШ) 37 °C температурада 1,5 сағат бойы диссоцияланды. Реакция 10% RPMI көмегімен тоқтатылды. Жасушалар 30 мкм сүзгілерден өткізіліп, жасушалардың өміршеңдік пайызы мен саны трипан көк бояғышының көмегімен есептелді. Ісік ұлпасының жасушалар суспензиясы құрамы, қажеттілікке қарай флуоресцентті таңбаланған антиденелер арқылы цитометриялық талдау жасалды.

2.2.13 AFP-FITC конъюгатының MDSC субпопуляцияларымен байланысуын бағалау

Әр түрлі MDSC субпопуляцияларымен AFP-FITC байланысуы, 3 апталық Эрлих ісігі бар СВА тышқандарынан алынған жасушаларда бағаланды. Екі тәжірибелік әдіс қолданылды. Біріншіден, көкбауыр моноклеар жасушаларын иммуномагнитті бөлу арқылы бөлінген G-MDSC, M-MDSC және (non-MDSC) фракциялар қараңғы жерде 30 мин. бойы 4°C температурада соңғы концентрациясы 100 мкг/мл AFP-FITC-пен инкубацияланды. Кейін жасушалар жуылып, Cytofix фиксация буферінде бекітіліп, ағынды цитометриямен талданды. Екіншісі, эритроциттер лизс жасалған көкбауыр моноклеарлы жасушалар фракциясы тікелей AFP-FITC және флуоресцентті антиденелер CD4-PE (Т-хелпер), CD8a-PerCP (цитотоксикалық Т-лимфоциттер), CD11c-PE (дендриттік жасушалар) және CD49b-PE (NK жасушалар) немесе CD11b-APC+Gr-1-PerCP (MDSC) белгіленіп ағынды цитометриямен талданды. Бұл AFP-FITC иммундық жасушалармен байланысуының спецификалығын көрсетуге мүмкіндік береді.

2.2.14 AFP конъюгаттарының Эрлих асцит жасушаларымен байланысуын бағалау

Тышқан асцитіндегі Эрлих жасушаларына 100 мкг/мл AFP-FITC (AFP концентрациясы бойынша), 13 мкг/мл AFP-DR немесе 13 мкг/мл DR (AFP концентрациясы бойынша 100 мкг/мл, DR концентрациясы бойынша 13 мкг/мл) қосылып 4 °C температурада 30 мин. бойы инкубацияланып, жуылып, бекітіліп, цитометриялық талдауы жасалынды. Цитометриялық FL1/FL2 канал бойынша жасушалардың FL1-оң (AFP-FITC байланысушы) немесе FL2-оң (DR-байланысушы) болуының пайыздық көрсеткіші CD45-теріс жасушалар (лейкоциттер емес жасушалар) арасында есептелді.

2.2.15 *In vitro* жағдайында AFP-DR конъюгатының цитотоксикалық әсерін бағалау

Көкбауыр мен сүйек кемігінен алынған MDSC және non-MDSC популяциялар (5×10^4 жасуша/ұяшық), 200 мкл 10% RPMI-1640 толық қоректік ортасында әртүрлі дозадағы AFP-DR немесе DR препаратымен 96-ұяшықтық планшеттерде 37 °C, 5% CO₂ инкубаторында инкубацияланды. G-MDSC жасушаларының өміршеңдігін ынталандыру үшін тышқанның рекомбинантты GM-CSF 10 нг/мл соңғы концентрациясында қосып өсірілді. 48 немесе 24 сағат ішінде жасушалардың өміршеңдігі 0,5% трипан көгімен және МТТ тестімен анықталды.

2.2.16 *In vivo* жағдайында MDSC популяциясын элиминациялау

Гемцитабин үшін адьювант артритті тышқандарға ісікке қарсы гемцитабин (“Eli Lilly”, АҚШ) препаратын 75 мг/кг ТАФ инъекциясынан кейінгі 7-, 10-күндері іш қуысына инъекцияланды, бақылау топтары үшін PBS қолданылды. Ал 14- күні тышқандардың тері астына Эрлих ісік жасушалары 500 мың /0,1 мл

де инъекция жасалды. Бақылаудың 28-күні тышқандардың ісігі өлшенді және көкбауыр моноклеар жасушаларына циомериялық талдау жасалды.

AFP-DR ісігі бар тышқандарға үш түрлі жолмен сынақталды. Бірінші схемада, конъюгатты салмағына қарай 0,3 мкг/г (0,5 мл PBS ерітіндісінде DR концентрациясы бойынша) бастап екі есе жоғарылатумен 2 тәуліктік аралықпен 3 рет іш қуысына инъекция жасалынды. Бұл СВА линиясындағы тышқандарға Эрлих ісік жасушаларын (5×10^5 жасуша/тышқан, 0,5 мл PBS ерітіндісі) тері астына инъекциясынан 10 күн өткен соң басталды. Екінші схемада, тышқандарға Эрлих ісік жасушаларын тері астына инъекциясынан 3 күн кейін басталды, тәуліктік аралықпен 5 күн іш қуысына инъекция жасалынды және 7 күндік үзілістен кейін инъекция бес күндік курсы қайталанды. Бақылау топтары үшін іш қуысына PBS немесе DR инъекцияланды. Үшінші схемада, конъюгатты (0,3 мкг/г) тышқандарға Эрлих ісік жасушаларын тері астына инъекциясынан 3 күн өткен соң басталды, тәуліктік аралықпен 5 күн инъекция жасалынды.

2.2.17 Ағынды иммуноцитофлуориметрия

Цитофлуориметриялық талдау Х. Жуматов атындағы гигиения және эпидемиология ғылыми орталығының иммунология және вакцинология зертханасындағы FACSCalibur ағынды цитометрінде (BD Biosciences, АҚШ) жасалынды. Ағынды иммуноцитофлуориметр ғылыми-зерттеу жұмыстарды орындауға арналған келісім-шарт (2015-2018 жж. №1) негізінде пайдаланылды.

Жасушаларды фенотиптеу CD-маркерлері арқылы ағынды иммуноцитофлуориметрия көмегімен жасалды. Бұл үшін жасушалар беткі және жасушаішілік бояу үшін фикоэритрин (PE), флуоресцеин-изотиоцианат (FITC), Алофицоцианин (APC) немесе Перидинин-хлорофилл белк (PerCP) таңбаларымен белгіленген CD-маркерлерге қарсы моноклонды антиденелермен (АД) өндіруші фирмалар (BD Biosciences, АҚШ немесе Milenyi Biotec, Германия) нұсқаулығына сәйкес инкубацияланды. Кейін Fixation/Permeabilization ерітіндісімен фиксацияланып, пермабилизацияланып және араластырылып бөлме температурасында 20 мин. инкубацияланады. Жасушалар Perm/Wash буфер ерітіндісімен жуылды және жасушаішілік молекулаларға тән антиденемен боялды. Жасушалар PBS ерітіндісімен жуылып, цитометрияға арналған ерітіндіде суспензияланып, CellQuest Pro бағдарламасын (BD Biosciences, АҚШ) пайдалана отырып FACSCalibur ағынды цитометрінде талдау жасалынды.

Тышқан жасушаларындағы FcR рецепторларын бұғаттайтын реагент (Milenyi Biotec, Германия) жасушаларға антиденемен боялғанға дейін спецификалық емес байланысуды тежеу үшін қолданылды. Жасуша беттік бояу үшін келесі антиденелер қолданылды: APC-CD11b, PerCP eFluor 710-Ly6G, PE-LAP (Invitrogen, АҚШ), PerCP-Cy5.5 anti-Ly6G, AF 488-Ly6C, PE-Ly6C, PE-CD282, PE-MHCII (eBioscience, АҚШ), PE-CD4, PerCP-CD8a PE-CD49b, PE-CD49d (BD Biosciences, АҚШ), FITC-CD62L (MILtenyi Biotec, Германия), FITC-CD11c, PerCP-CD11c, FITC-CD49d, APC-CD45, AF-488-CD49d, PerCP-CD4, APC-B220, AF-488-CD195, APC-CD3 (Biolegend, АҚШ), PerCP-CD8 и PE-

CD184 (R&D Systems, АҚШ). Жасуша ішілік бояу үшін PE-Arginase-1 (R & D Systems, АҚШ) қолданылды. MDSC CD11b⁺Gr-1⁺ фенотипті жасушалар, G-MDSC CD11b⁺Ly6G^{high} немесе CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low} фенотипті жасушалары, ал M-MDSC CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high} немесе CD11b⁺CD49d⁺ фенотипті жасушалар ретінде анықталды.

Реактивті оттегінің түрі (ROS) өндірісін бағалау үшін көкбауыр мононуклеар жасушалары, 2 мкМ 2'-7'-дихлорфлуорцеин диацетаты (DCFDA) (Sigma-Aldrich, АҚШ) (2 мкМ) қосылған RPMI-1640 қоректік ортада 37 °С температурасында 30 мин. бойы инкубацияланды. Жасушалар салқын PBS ерітіндісімен жуылды және флуоресценттік антиденелермен белгіленді. Мұз үстінде 20 мин. инкубациядан кейін жасушалар жуылып, бекітіліп, бояғыштың флуоресценттік интенсивтілігі жасыл канал бойынша ерекшеленген MDSC субпопуляциялары ағынды цитометр арқылы бағаланды. Бақылау ретінде DCFDA қосылмаған жасушалар пайдаланылды. Цитометриялық талдауды жүргізудің репрезентативті мәліметтері көрсетілді.

2.2.18 ELISA

Бақылау және тәжірибелік тышқандардың қан сарысуындағы TNF α , IL-10, IL-1 β , IL-6, IL-27, TGF- β 1, SDF-1 α , GM-CSF және S100 деңгейіне талдау жасау комерциялық ELISA жиынтықтарын қолданумен жүзеге асырылды. Олар: Mouse CXCL12/SDF-1 α Quantikine ELISA, TGF- β 1 Mouse Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, АҚШ); GM-SCF, IL-10, TNF α , IL-1 β , IL-6 Mouse ELISA Maxtm Standard ELISA, Kit Mouse IL-27 Heterodimer ELISA Kit (BioLegend, АҚШ), Mouse S100 Calcium Binding Protein (S100) ELISA Kit (Mybiosource, АҚШ). Нәтижелер StatFax 2100 талдағышында анықталды.

2.2.19 NO өнімін анықтау

Супернатант құрамындағы азот тотығы (NO) өнімін анықтау биологиялық сұйықтықтағы нитритті (NO₂-) және нитратты (NO₃-) анықтауға арналған Total nitric oxide assay kit (Invitrogen, АҚШ) жиынтық көмегімен өндірушінің нұсқауларына сәйкес жүргізілді. Бірінші кезеңде, нитратты нитритке айналдыру үшін нитратты редуктаза ферменті қолданылды. Екінші кезеңде, нитрит Грисс реакциясының азобояуының түсті өнімі ретінде анықталды, ол 540 нм толқын ұзындығында көрінетін жарықты сіңіреді. Осылайша, NO нитрит ретінде барлық нитраттар нитритке айналғаннан кейін өлшенеді. Жасуша супернатанттары 1:2 қатынасында Reagent diluent ерітіндісімен сұйылтылды. Жалғасты тәжірибеле 50 мкл сұйылтылған тексерілетін супернатант және 25 мкл ерітілген NADH және 25 мкл нитрат редуктазамен бірге 96 ұяшықтық планшетке қосылып, араластырылып 37 °С температурада 30 мин. инкубацияланды. Кейін ұяшықтарға 50 мкл Griess Reagent I және 50 мкл Griess Reagent II қосылып бөлме температурасында 10 мин. инкубацияланды. Нәтижелер иммунофермент талдағышы көмегімен 540 нм толқын ұзындығында өлшенді. NO өнімінің сандық өлшемі стандартты қисық сызықтың көмегімен есептелінді.

2.2.20 Статистикалық талдау

Зерттеу бойынша алынған мәліметтер Prizm 6 software (Graph Pad) және Excel қолданбалы бағдарламаларын қолдана отырып компьютерде статистика әдістерімен өңделді. Кестелер мен суреттерде орташа арифметикалық шамалар (M) және стандартты ауытқулар (SD) түрінде ақпарат берілді. Ағынды цитометрия деректері Flowing software 2.5.1. бағдарламасы көмегімен талдау жасалды. Айырмашылықтың нақтылық мәні t-Стьюдент критерийі (TTEST) бойынша анықталды. Егер, нөлдік болжамның ықтималдығы 5% ($p < 0,05$) шамадан аспаса, айырмашылықтар жарамсыз деп саналды.

3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛҚЫЛАУ

3.1 Созылмалы қабынудың адьювант артрит жануар үлгісіндегі MDSC фенотиптік және функциялық ерекшеліктерін зерттеу

3.1.1 Адьювант артрит үлгісіндегі MDSC фенотипін анықтау

Тышқандардағы MDSC сипаттамасы CD11b және Gr-1 маркерлерінің экспрессиясы мен Т жасушалық пролиферацияны тежеу қабілетіне байланысты жүргізіледі. Субпопуляциялардың жіктелуі Ly6G және Ly6C маркерлердің экспрессиялану деңгейіне сәйкес G-MDSC және M-MDSC болып бөлінеді. Осы маркерлер бойынша анықталған MDSC, қатерлі ісік сияқты патологиялық өзгерістерде, басқа иммундық жасушалармен бірге иммундық жауапты реттеуге қатысатыны және ісік прогрессиясындағы рөлі жан-жақты зерттелген, оның теріс реттеуші функциясы анықталған [179].

Созылмалы қабыну кезіндегі MDSC ерекшелігін анықтау үшін адьювант артрит үлгісі пайдаланылды және CD11b, Gr-1, Ly6G және Ly6C маркерлері қолданылды. Бұл үлгі толық адьювант Фрейдті (ТАФ) этикалық ережелерге сәйкес тышқандардың артқы аяғының табан тері астына бір рет 100 мкл (1 мг/мл *Mycobacterium tuberculosis*) инъекциялау арқылы алынды. ТАФ – зерттеулерде жиі қолданылатын адьюванттардың бірі. Оның құрамында қыздырылып активтілігі жойылған *Mycobacterium tuberculosis* бар, судағы май эмульсиясы ретінде қолданылады. Бұл метаболизмге ұшырамайтын майлардан (парафин майы және манниді моноолат) дайындалған. Осы майлар қабыну процесін ұзартады және өлі бактериялар иммундық жауапты тудырады. Жасуша аралық иммунитетті ынталандыруда әсерлі жұмыс істейтіні жақсы сипатталған [175, р. 46].

Тышқандарға ТАФ инъекциясынан кейін келесі күннен бастап табандарында қызару және ісіну байқалды (сурет 4) және бұл қабыну тәжірибенің соңына дейін жалғасты. Ал ісінген табандарының диаметрі 2 аптадан кейін өлшенді.

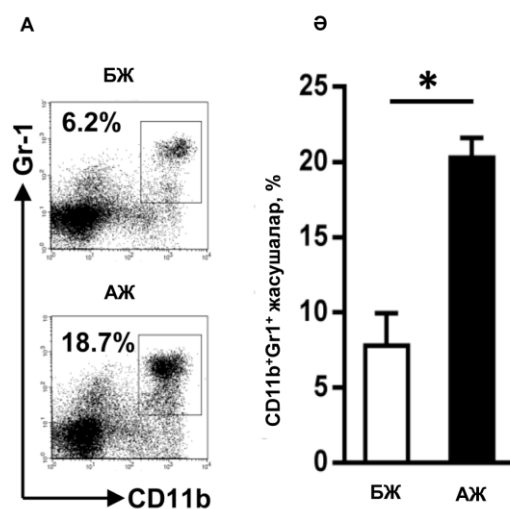


БЖ-бақылау жануарлар, АЖ – адьювантты жануарлар.

Сурет 4 – Тышқандардың артқы аяқтарына ТАФ және PBS инъекциясынан кейінгі табан қалыңдығының өзгерісі

Осы уақытқа дейінгі зерттеулерде, ТАФ индукциялаған адьювант артрит созылмалы қабынудың үлгісі ретінде жақсы сипатталған. Ісінудің шамасы, адьювант артрит кезіндегі қабыну процесінің деңгейін бағалау үшін жиі қолданылады. Сондықтан, инъекция жасалған аяғының ісіну көрсеткіштері бағаланды. Жануарларға адьювант тудырылғаннан кейін 2-аптаның соңына қарай АЖ тобының аяқтарының диаметрі $3,8 \pm 0,1$ мм, БЖ тобы $2,31 \pm 0,01$ мм ($p=0.0009$) және 4-аптаның соңына қарай АЖ тобында $3,5 \pm 0,1$ мм ал БЖ тобында $2,4 \pm 0,1$ мм ($p=0,0003$) болды. Бұл ТАФ созылмалы қабыну процесін тудырғанын көрсетеді [180].

Қабынудан кейінгі иммундық жасушалардың өзгерісін анықтау үшін жануарлардан хирургиялық жолмен алынған көкбауыр мононуклеар жасушалары зерттелді (шеткі қанның иммундық жасушалар көрсеткіші ретінде көкбауыр зерттелді). Жасушаларға CD11b және Gr-1 маркерлер бойынша талдау жасалынды. Алынған нәтижелер көрсеткендей, тәжірибе басталғаннан кейінгі 2 аптада АЖ тобындағы тышқандардың көкбауырындағы $CD11b^{+}Gr-1^{+}$ фенотипті MDSC популяциясының үлесі БЖ тобымен салыстырғанда үш есеге көбейді (сурет 5). Бұл созылмалы қабынудың адьювант артрит үлгісінде ісік кезіндегі фенотипке ұқсас MDSC жинақталуы жүретінін көрсетеді.

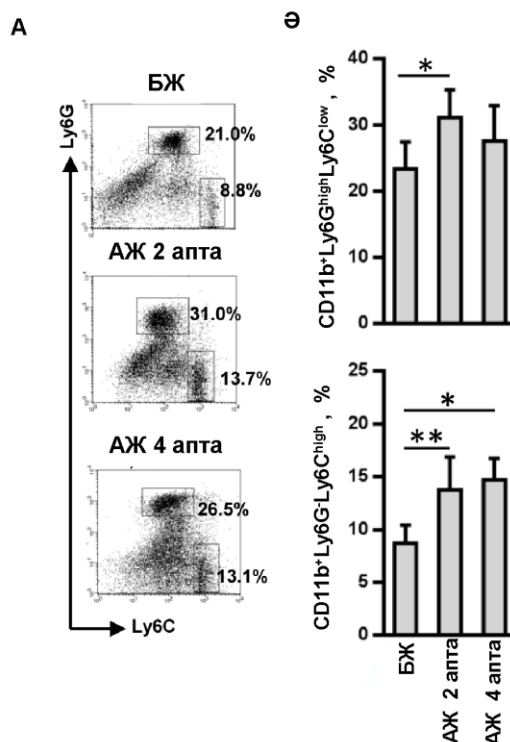


А) Цитофлуориметриялық талдаудың репрезентативті мәліметтері; Ә) Орташа мәндермен жинақталған мәліметтер $\pm SD$ ($n=7$), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні: $*p < 0,005$ (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 5 – Бақылау жануарлар (БЖ) мен адьювантты жануарлардың (АЖ) көкбауырындағы $CD11b^{+}Gr-1^{+}$ MDSC үлесі

Созылмалы қабыну кезіндегі MDSC үлесінің көбеюі қай субпопуляция есебінен туындағанын анықтау үшін Ly6C/Ly6G маркерлері қолданылды [11, р. 2]. Бұл адьювант артриттің даму динамикасының 2-, 4- аптасында зерттелді.

Талдау нәтижелері көрсеткендей, ТАФ инъекциясынан кейінгі екінші аптаның соңында көкбауырдағы $CD11b^{+}Ly6G^{high}Ly6C^{low}$ фенотипті G-MDSC және $CD11b^{+}Ly6G^{+}Ly6C^{high}$ фенотипті M-MDSC жасушаларының үлесі артатындығы анықталды, сондай-ақ, M-MDSC артуы төртінші аптаға дейін жалғасты (сурет 6).



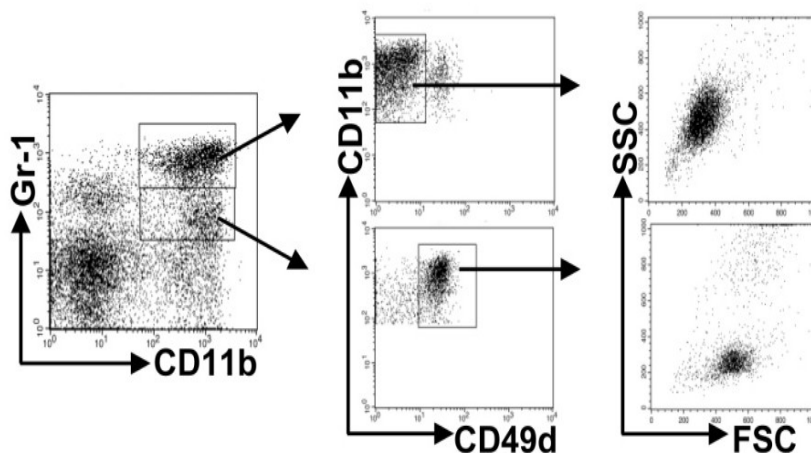
А) Цитофлуориметриялық талдаудың репрезентативті мәліметтері; Ә) Орташа мәндермен жинақталған $\pm SD$ мәліметтер ($n=7$), топтар арасындағы айырмашылықтардың нақтылығы $*p < 0,05$, $**p < 0,005$ (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 6 – Адьювантты артрит даму динамикасында тышқандар көкбауырындағы $CD11b^{+}Ly6G^{high}Ly6C^{low}$ және $CD11b^{+}Ly6G^{+}Ly6C^{high}$ жасушалар үлесі

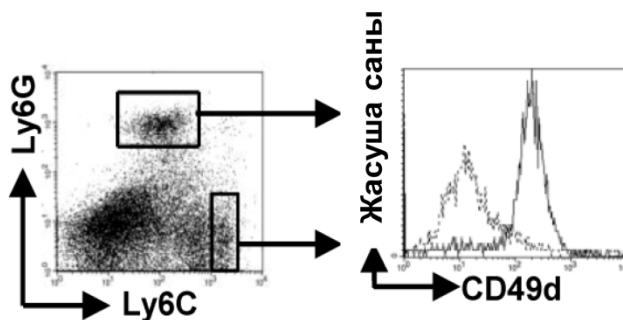
Созылмалы қабыну кезінде MDSC субпопуляцияларын жан-жақты анықтау үшін қосымша CD49d маркері қолданылды. Бұл маркерді ісік және ішектің қабынуы тудырылған тышқандарда, CD11b маркерімен комбинация жасап қолданған кезде, тек $CD11b^{+}Gr-1^{low/int}$ жасушаларында экспрессияланатыны анықталған және M-MDSC субпопуляциясын сипаттауға мүмкіндік берген [47, р. 203]. Сондықтан, CD49d маркерін адьювантты артрит үлгісінде пайдалану үшін $CD11b/Gr-1$ маркерлерімен комбинация жасалды. Зерттеу барысында, CD49d цитометрияда SSC каналы бойынша флуоресценттік интенсивтілігі төмен, моноциттік жасушаларға ұқсас фракциядағы $CD11b^{+}Gr-1^{low}$ (M-MDSC фенотипі) жасушаларда экспрессияланатыны анықталды, ал

Ly6G/Ly6C маркерлермен комбинация жасағанда, CD49d маркері CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high} (M-MDSC) жасушаларда экспрессияланды (сурет 7).

А



Ә



---- CD11b⁺Ly6G^{high}Ly6C^{low} жасушаларда гейттеді

— CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high} жасушаларда гейттеді

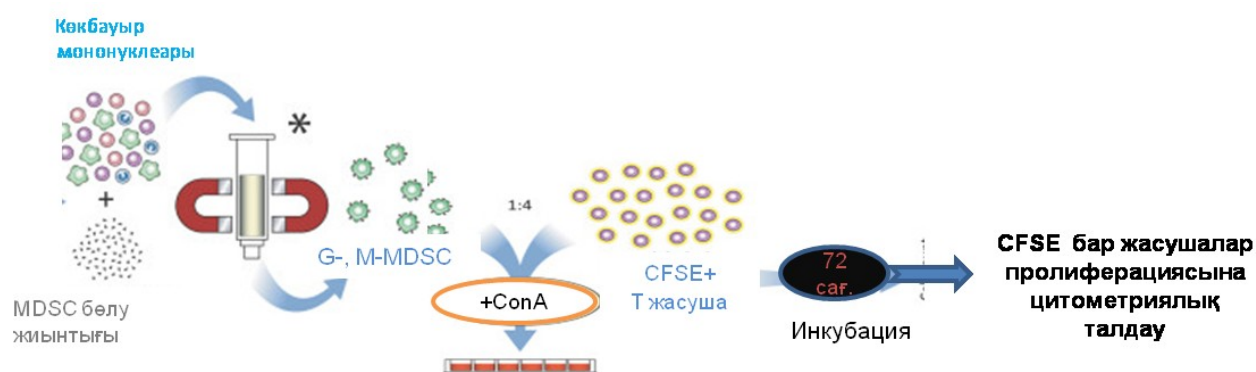
А) CD11b/Gr-1 маркерлерімен цитофлуориметриялық талдау; Ә) Ly6G/Ly6C маркерлерімен цитофлуориметриялық талдау.

Сурет 7 – MDSC субпопуляцияларындағы CD49d маркер экспрессиясы

Бұл, CD49d маркері созылмалы қабынудың тышқан үлгісінде M-MDSC субпопуляциясын анықтау үшін қолдануға болатындығын көрсетеді. Сондықтан, кейінгі тәжірибелерде M-MDSC анықтау үшін CD49d және Ly6C флуоресцентті антиденелерін қолдануға болады. Созылмалы қабынудың тәжірибелік үлгісі ретінде алынған адьювант артрит дамуы кезінде көкбауырда жинақталған MDSC, фенотиптік жағынан қатерлі ісік процесінде иммуносупрессияны тудыратын MDSC популяциясымен бірдей фенотиптік маркерлерді (Gr1, CD11b, Ly6G, Ly6C және CD49d) экспрессия жасайтыны анықталды [15, р. 422]. Бұл, MDSC феномені қабыну процесінде де доминантты болатынын білдіреді.

3.1.2 Адьювант артрит үлгісіндегі MDSC супрессорлық активтілігін зерттеу

MDSC – миелоидты жасушалардың гетерогенді популяциясы, олардың негізгі ерекшелігі иммундық жауапқа қатысушы басқада жасушалардың функциялық аспектілерін супрессиялау қабілетінің болуы. MDSC фенотиптік маркерлері басқа да миелоид текті жасушаларға өте жақын, атап айтқанда, гранулоциттер мен моноциттер сәйкесінше G-MDSC және M-MDSC сияқты фенотипке ие. Сондықтан, MDSC анықтауда фенотиптік маркерлер жеткіліксіз. Осы жасушалардан MDSC-ді ажырататын басты ерекшелігі, T жасушалардың пролиферациясы мен функциялық активтілігін тежеу қабілетінің болуы. Бұл MDSC сипаттаудың «алтын» стандарты саналады [11, р. 2-3]. Адьювант артрит тудырылған тышқандардың көкбауырында индукцияланған MDSC-дің супрессорлық потенциалын бағалау үшін, бақылау және созылмалы қабынуы бар тышқандардың көкбауырынан G-MDSC мен M-MDSC иммуномагнитті сепарация әдісімен бөлініп алынды және ConA лектиімен ынталандырылған және CFSE флуоресцентті бояуымен белгіленген аллогенді моноклеарлы жасушалармен бірге 72 сағат өсірілді (сурет 8).

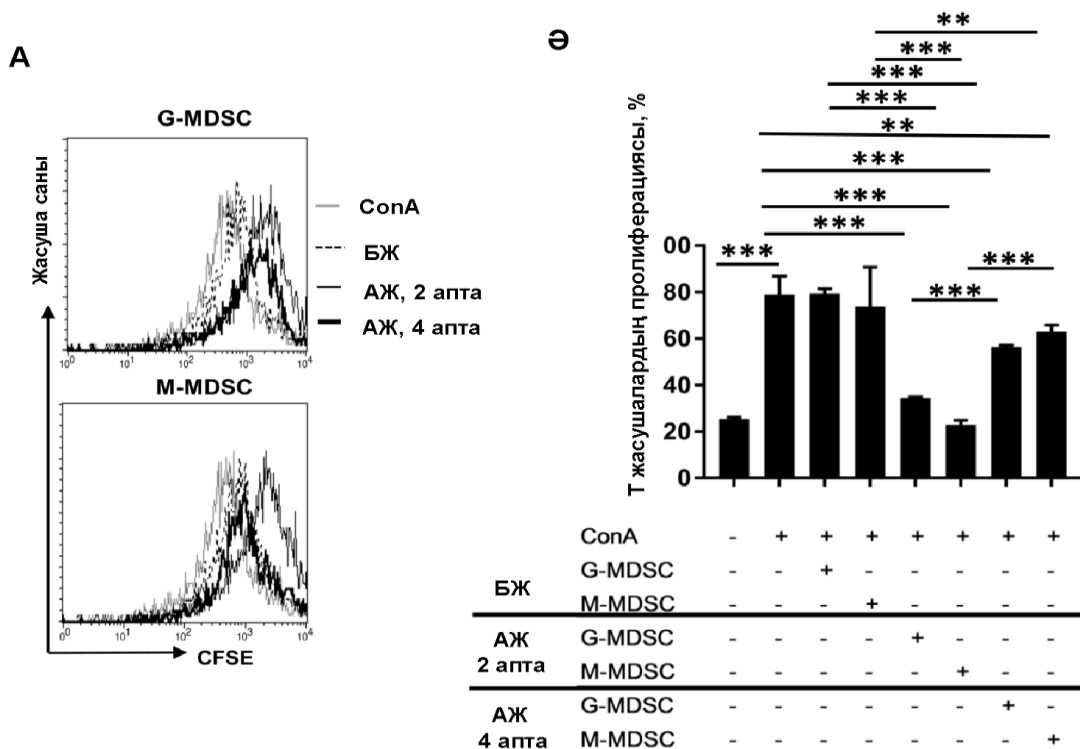


Сурет 8 – MDSC субпопуляцияларының супрессорлық активтілігін бағалаудың тәжірибе жобасы

Зерттеуде CFSE флуоресцентінің интенсивтілігі бойынша пролиферация жасаған жасушалар үлесі анықталды. Талдау көрсеткендей, БЖ топтарынан алынған G-MDSC және M-MDSC митоген-активтендірген $CD8^+$ жасушаларының пролиферациясын тежемеді (супрессор: нысана қатынасы 1:4), ал АЖ топтарынан алынған G-MDSC және M-MDSC субпопуляциясы $CD8^+$ T жасушалардың пролиферациясын айтарлықтай тежеді (сурет 9).

Бұл көрсеткіш қабынудың 2-аптасында алынған жасушаларда айқын байқалды. M-MDSC субпопуляциясының супрессорлық активтілігі G-MDSC субпопуляцияларына қарағанда жоғары екені анықталды. Басқада зерттеушілер ісігі бар тышқандарда M-MDSC жоғары иммуносупрессорлы, ал G-MDSC орташа иммуносупрессорлы болатынын көрсеткен. Бұл кезде, M-MDSC өз әсерін көбінесе антиген-спецификалық емес сипатта, ал G-MDSC антиген спецификалық механизм арқылы жүзеге асыратыны анықталған [54, р. 22-24]. Алынған нәтижелер, созылмалы қабыну кезінде көбейетін MDSC

ерекшеліктері, ісік кезіндегі MDSC-мен бірдей екенін көрсетті. Бұл қабыну кезінде MDSC-дің алғашқы индукциясы болатынын және оның иммундық жүйені негативті реттеуге қатысатынын түсіндіреді.



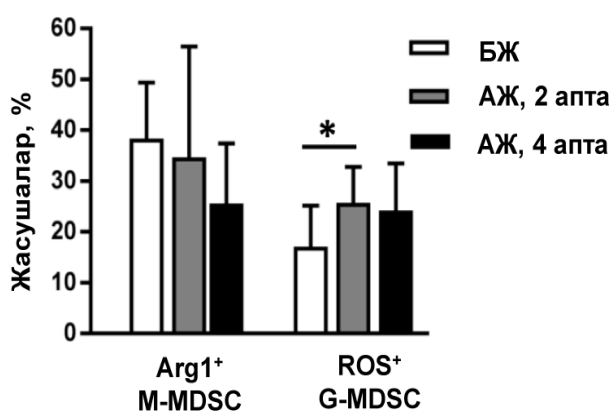
А) Цитофлуориметриялық талдаудың репрезентативті гистограмалары; Ә) Орташа мәндермен жинақталған $\pm SD$ мәліметтер ($n=7$), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні $**p<0,05$, $***p<0,005$ (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 9 – Созылмалы қабыну динамикасындағы БЖ және АЖ тобынан алынған MDSC субпопуляцияларының супрессорлық потенциалын анықтаудың CFSE тест нәтижелері

3.1.3 Адьювант артрит үлгісіндегі MDSC супрессорлық медиаторларын анықтау

Жұмыстың келесі кезеңінде MDSC субпопуляцияларының супрессорлық активтілігіне қатысады деп болжанған молекулалардың өндірілуі зерттелді. MDSC-дің супрессорлық функциясы әртүрлі факторларға байланысты жүреді. G-MDSC-дің супрессорлық функциясы негізінен ROS молекуласына тәуелді, бұл Т жасушалармен тығыз жасуша-жасуша байланысты қажет етеді, демек, бұл MDSC мен Т жасушалар арасындағы антиген-спецификалық әрекеттесу үшін тиімді. ROS ақуыздарға, липидтерге және нуклеин қышқылдарына зиян келтіреді, қабынуды күшейтеді және апоптозға әсер етеді. M-MDSC супрессорлық функциясын негізінен Arg-1 және әртүрлі қабынуды ынталандыратын цитокиндерді өндіру арқылы жүзеге асырады, сондықтан жасушалармен байланысуды қажет етпестен, антигенге тәуелсіз Т жасушалық

жауапты тиімді тежей алады [181]. Arg-1 Т жасушалардың пролиферациясы үшін маңызды, микроортадағы алмаспайтын L-Arg амин қышқылын ыдыратады. L-Arg амин қышқылының жетіспеушілігі түрлі механизмдер арқылы Т жасушалардың пролиферациясын тежейді, соның ішінде олардың CD3 ζ экспрессиясын төмендетеді [102, p. 21123]. Осы мәліметтерге және жоғарыдағы алынған нәтижелерге негізделіп созылмалы қабынудың екінші және төртінші аптасындағы тышқанның көкбауырындағы MDSC субпопуляцияларының ROS және Arg-1 өнімінің деңгейіне талдау жасалды. Цитометриялық талдау, созылмалы қабынуы бар АЖ көкбауырынан алынған CD11b⁺Ly6G^{high} G-MDSC БЖ тобымен салыстырғанда ROS молекуласын көбірек өндіретінін көрсетті. Бірақ, CD11b⁺CD49d⁺ M-MDSC функциясына қажетті Arg-1 өнімінде айырмашылықтар байқалмады (сурет 10).



Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер (n=7), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні * $p < 0,05$ (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 10 – Адьювантты артриттің даму динамикасындағы БЖ және АЖ топтарының көкбауырыдағы Arg-1 және ROS өндіретін M-MDSC және G-MDSC үлесі

Бұл қабынудың адьювант артрит үлгісінде M-MDSC супрессорлық активтілігіне Arg-1 ферментінің қатыспайтынын көрсетеді. Басқа авторлар зерттеулерінде, бауырдың созылмалы қабынуы бар тышқандарда супрессорлық қабілетке ие Ly6C⁺ миелоидты жасушалар, ал бүйректің созылмалы қабынуы бар тышқандарда супрессорлық қабілетке ие Ly6G⁺ миелоидты жасушалар пайда болатынын көрсеткен. Бұл үлгілерде де MDSC Arg-1 ферментін экспрессияламаған [137, p. 5]. Бұл созылмалы қабыну кезінде қан айналымында жүретін M-MDSC субпопуляциясының Т жасушалық жауапты тежеу қабілеті ісік процесінен өзгеше болып, аргинин механизмінен басқа жолдар арқылы жүргізуі мүмкін екенін түсіндіреді.

Жинақтай келгенде, зерттелген созылмалы қабынудың (адьювант артрит) дамуына митоген-активтендірген Т-жасушалық пролиферацияны тежейтін CD11b+Ly6G^{high}Ly6C^{low} немесе CD11b⁺Ly6G^{high} фенотипті G-MDSC және

CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high} немесе CD11b⁺CD49d⁺ фенотипті M-MDSC қатысатыны анықталды [182]. Бұл жергілікті созылмалы қабынудың жүйелік иммунологиялық жауапты, көкбауырда жинақталатын миелоидты супрессорлық жасушалардың индукциясы түрінде тудыратындығын көрсетеді. Олардың ісік процесі кезіндегі MDSC-ге ұқсас фенотипі және супрессорлық активтілігі, қабынудың иммуносупрессорлы фонын сақтауда маңызды болуы мүмкін.

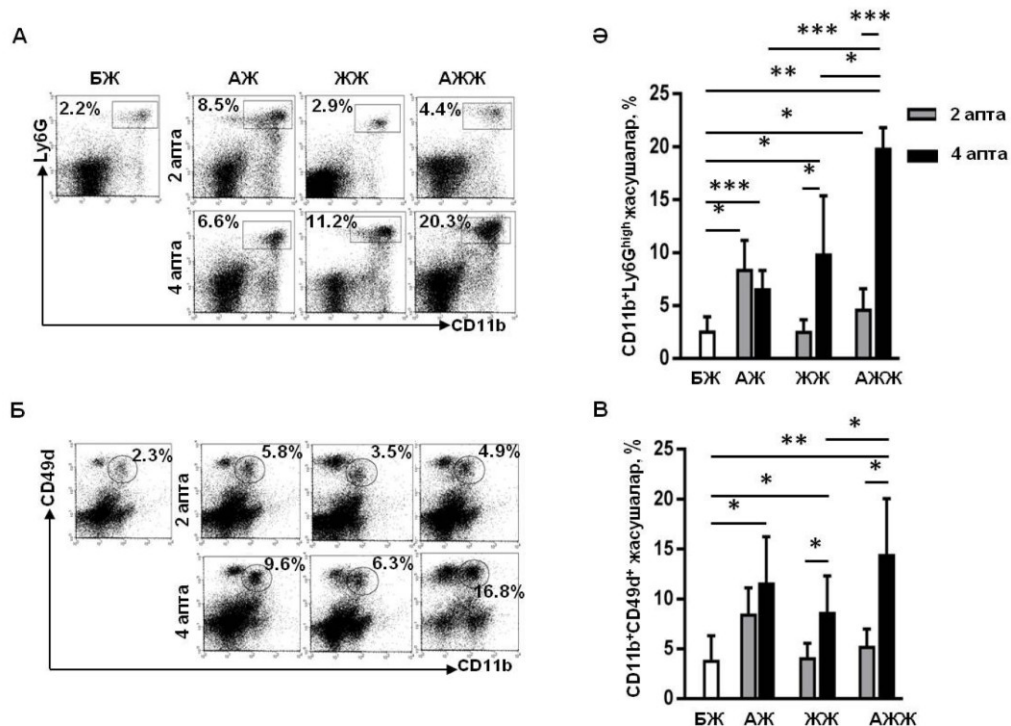
3.2 Созылмалы қабынудың жануарлар үлгісіндегі MDSC фенотиптік және функциялық ерекшеліктеріне түнде жарықтандырудың әсерін зерттеу

Соңғы уақыттарда, циркадиандық ырғақтардың бұзылуына көп назар аударылуда. Адам өмір салтындағы бұл өзгеріс денсаулығының барлық аспектілерінде қауіптің жоғарылауымен байланысты болды. Адам денсаулығы мен аурудың көптеген аспектілері күнделікті ырғаққа байланысты. Мидың супрахиазмалық ядросы және жасушадағы автономды молекулалық желілер, біздің биологиялық циркадиандық сағатты орнатады. Циркадиандық ырғақтардың ауытқуы созылмалы қабынуды қамтыған көптеген патологияларды дамуын ынталандырады. Циркадиандық ырғақтарға байланысты зерттеулерде, циркадиандық жүйе көптеген физиологиялық функцияларды реттейтінін, ал оның бұзылуы IL-6, TNF- α және C-реактивті ақуыздар сияқты қабыну цитокиндерінің деңгейлерін жоғарылата алатыны дәлелдеген [183]. Бұл медиаторлар өз кезегінде қабыну процесін ынталандыру арқылы иммуносупрессорлы микроортаның қалыптасуына қатысады. Яғни, созылмалы циркадиандық реттелудің бұзылуы да созылмалы қабыну ретінде сипатталады. Ал, жануарлар үлгісі мен адамда жүргізілген зерттеулердің нәтижесі, *in vivo* жағдайында қатерлі ісіктің дамуы, энергия балансы мен иммундық жүйе функциясында циркадиандық гомеостаздың жоғалуымен тығыз байланысты екенін көрсетті [184]. Циркадиандық ырғақтың негізгі реттеушілерінің бірі - жарық. Сондықтан, жарық-индукциялаған циркадиандық ырғақтардың бұзылуының иммуносупрессорлық жасушалар гомеостазына оның ішінде MDSC популяциясына әсерін зерттеу маңызды болып табылады. Ол созылмалы аурулардың көбеюінің иммунологиялық жағын түсінуге көмектеседі.

3.2.1 Түнде жарықтандыру және біріккен үлгілеріндегі көкбауырдағы MDSC ерекшелігін зерттеу

Бұл зерттеуге түнде жарықтандырылған жануарлардың (ЖЖ) және адьювант артрит пен жарықтандыру біріктірілген жануарлардың (АЖЖ) тәжірибелік үлгілері қолданылды. Бұл үшін созылмалы қабынуы бар және жоқ тышқандарға түнгі уақытта жарықтандыру жасалды, ал күндіз қалыпты жағдайда болды. Бақылау топтары ретінде БЖ және АЖ тобы күндіз/түн қалыпты жағдайында ұсталды. ТАФ инъекциясынан кейінгі 2- және 4- аптасында барлық тышқандардың артқы аяқ табанының ісіну диаметрі өлшенді.

АЖ тобымен (екінші апта $3,8 \pm 0,1$ мм; төртінші апта $3,5 \pm 0,1$ мм) салыстырғанда, АЖЖ тобындағы қабынған табандарында (екінші апта $3,8 \pm 0,3$ мм; төртінші апта $3,6 \pm 0,2$ мм) айырмашылық болмады. Көкбауыр жасушаларын цитофлуориметриялық талдау, АЖЖ топтарын БЖ, АЖ және ЖЖ топтарымен салыстырғанда, төртінші аптаның соңында $CD11b^+Ly6G^{high}$ және $CD11b^+CD49d^+$ фенотипті жасушалар санының айтарлықтай артатынын көрсетті (Сурет 11). MDSC популяция санының өсуіне қарамастан, АЖ мен АЖЖ топтарының арасындағы табанының қалыңдығында ешқандай айырмашылықтың болмауы, бұл жарықтандырудың қабыну процесінің күшеюіне әкелмегенін көрсетеді. Мүмкін, MDSC санының көбеюі аяқтың қабынуының табиғи жолмен шешілу процесіне әсер етіп оны ұзартады [137, p. 10-12].



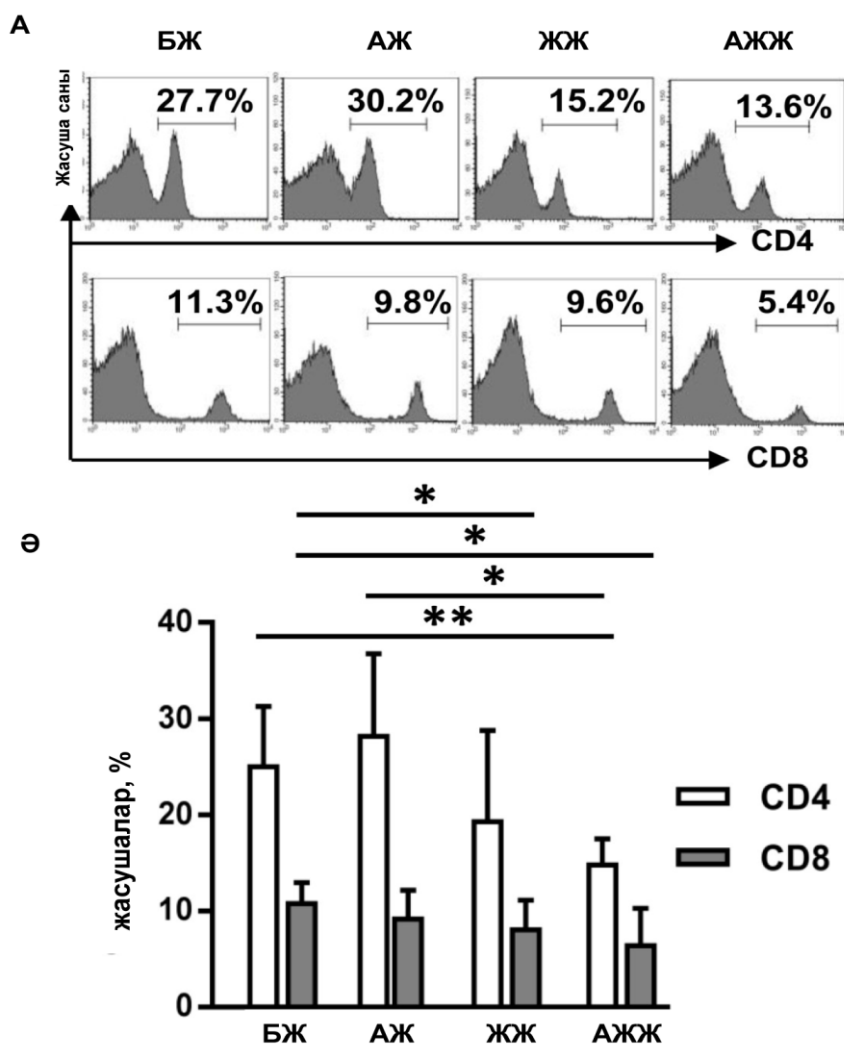
А, Б) Цитофлуориметриялық талдаудың репрезентативті мәліметтері; Ә, В) Орташа мәндермен жинақталған $\pm SD$ мәліметтер ($n=9$), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні $*p < 0,05$, $**p < 0,005$ $***p < 0,0005$ (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 11 – Адьювантты артрит даму динамикасындағы БЖ, АЖ, ЖЖ және АЖЖ тобының көкбауырындағы $CD11b^+Ly6G^{high}$ (Ә) және $CD11b^+CD49d^+$ (В) жасушалар үлесі

Жарық арқылы иммундық жасушалар ара-қатынасының өзгеруі жүйке жүйесіндегі гуморалдық реттелудің бұзылуынан жүреді. Ол қабынуды ынталандыратын факторлар (TNF α , IL-6 т.б.) өнімін көбейтіп иммундық эффекторлы жасушалардың дифункциясын бастайтыны анықталған [17, p. 4]. Сондықтан, жарықтандырылған жануарларда қабыну факторлары қатысқан

төмен деңгейлі қабыну процесі басталған болуы мүмкін, оның созылмалы қабынумен бірігуі MDSC жинақталуын ынталандырады деп тұжырымдауға болады.

Түнде жарықтандыру стресін алған созылмалы қабынуы бар тышқандарда төртінші аптаның соңында $CD11b^+CD49d^+$ және $CD11b^+Ly6G^{high}$ MDSC субпопуляцияларының үлесінің бірден өсуі, $CD8^+$ және $CD4^+$ Т жасушалар үлесінің төмендеуіне алып келді (сурет 12), бірақ В, NK және NKT жасушалар үлесінде өзгеріс болмады.



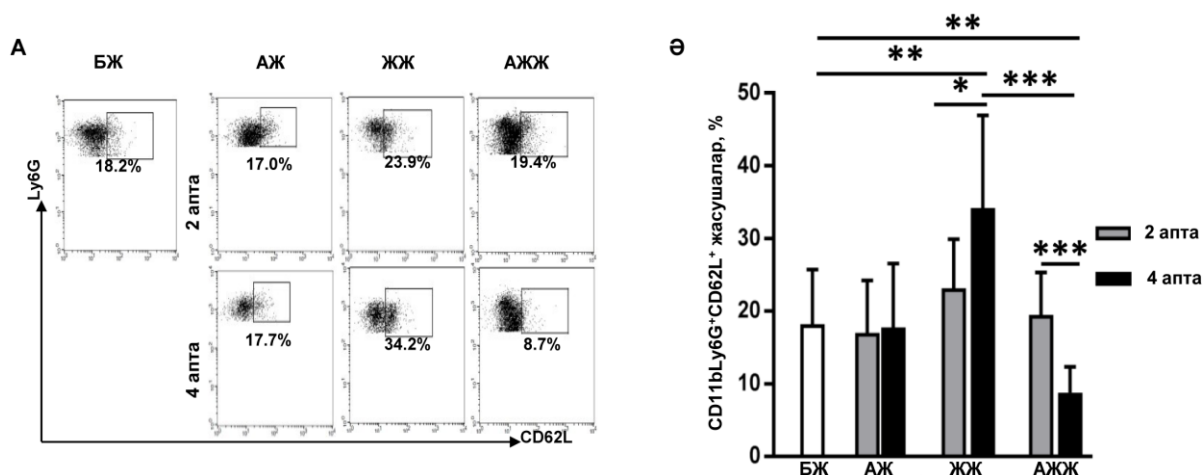
А) Цитофлуориметриялық талдаудың репрезентативті мәліметтері; Ә) Орташа мәндермен жинақталған $\pm SD$ мәліметтер ($n=9$), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні $*p<0,05$, $**p<0,005$ (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 12 – БЖ, АЖ, ЖЖ және АЖЖ көкбаурындағы $CD4^+$ және $CD8^+$ жасушалар құрамының өзгерісі

Көкбауыр жасушалылығын анықтауда, бақылау кезеңдерінде (2 және 4 апта) жануарлардың барлық топтарында көкбауырдың салмағы мен жасушалық құрамында (жасуша саны/көкбауырдың салмағы) айтарлықтай өзгерістер

болған жоқ (мәліметтер көрсетілмеді). Бұл факт, жасуша популяцияларының пропорциялары, олардың абсолютті санындағы өзгерістерге сәйкес келді деген қорытынды жасауға мүмкіндік береді. MDSC-дің басты ерекшелігі Т жасушалардың пролиферациясын тежеу қабілетінің болуы. 9-суретте көрсетілгендей, созылмалы қабынудың даму динамикасында супрессорлық потенциялаға ие және Т жасушалар пролиферациясын тежейтін MDSC популяциялар үлесінің көбейетіні анықталған. Сондықтан, жарық индукциялаған стресс кезінде созылмалы қабынуы тудырылған тышқандар тобында CD4⁺ және CD8⁺ жасушалар үлесінің төмендеуі, MDSC үлесінің көкбауырда көбеюінің нәтижесі деп тұжырымдауға болады.

MDSC генерациясы сүйек кемігінде жүреді. Олардың шеткі аймақтарға жинақталуы үшін миграциялануына жауапты жасуша беттік молекулалардың қатысатыны анық. Бұл молекулалар жасуша мембранасында экспрессияланып, жасушалардың қабыну ошақтары мен нысаналы ұлпаларға жетуін қамтамасыз етеді. Сонықтан, АЖ, ЖЖ және АЖЖ топтарында MDSC субпопуляциялар үлесінің жоғарылауы үшін қандай адгезия молекулалары маңызды екенін анықтау үшін CD62L (L-селектин) және CD195 (C-C химокинді рецепторлардың типі 5, CCR5) жасуша беткейлік экспрессиясына талдау жасалды. Барлық топтардың көкбауыр мононуклеар фракциясы алынды. Талдау нәтижелерінде, тәжірибе басталғаннан барлық бақылау кезеңдерінде АЖ топтарының MDSC популяциясының CD62L экспрессиясында өзгеріс болмады. Бірақ, БЖ топтарымен салыстырғанда ЖЖ топтарында CD62L экспрессиялайтын CD11b⁺Ly6G^{high} G-MDSC үлесінің жоғарылағаны, ал АЖЖ тобындағы CD62L экспрессиялайтын CD11b⁺Ly6G^{high} G-MDSC жасушалар үлесінің төмендегені анықталды (сурет 13). Жарықтандырудың 2-аптасына карағанда, 4-аптада MDSC үлесінің артуы айқын байқалды. Бұл нәтижелер, қабыну және жарық индукциялаған циркадиандық бұзылыс кезінде сүйек кемігінен MDSC дифференциациясын бастайтын және/немесе олардың миграциялануын индукциялайтын молекулалық механизмдердегі іргелі айырмашылықтардың бар екенін көрсетеді. Созылмалы циркадиандық бұзылыс бұл процесті күшейтеді [185]. Адгезия молекуласы CD62L иммундық жасушалардың эндотелий ұлпасының қабырғаларына бекініп қозғалуын, сондай-ақ жасушалардың қабыну ошақтарына, лимфа түйіндеріне жетуінің қамтамасыз етеді [186]. Супрессорлық функциясы бар жасушалардың циркадиандық бұзылыс кезінде осы молекуланы экспрессиялануы, олардың функциясын үшін тиімді екенін түсіндіреді

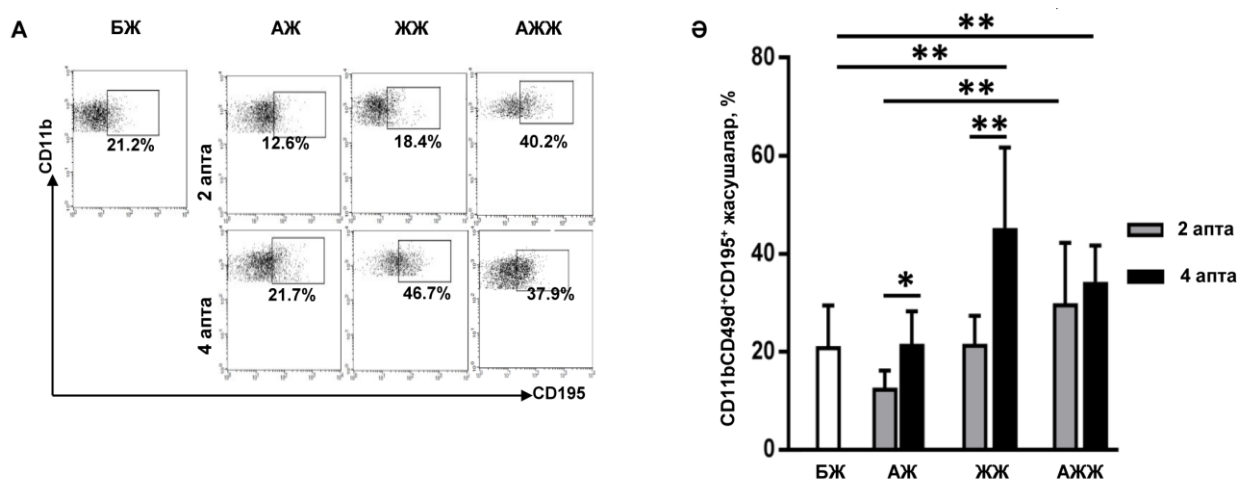


А) Цитофлуориметриялық талдаудың репрезентативті мәліметтері; Ә) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер ($n=9$), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні $*p<0,05$, $**p<0,005$, $***p<0,0005$ (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 13 – БЖ, АЖ, ЖЖ және АЖЖ көкбауырындағы CD62L экспрессиялайтын CD11b⁺Ly6G^{high} G-MDSC үлесі

Ал АЖЖ тобындағы CD62L экспрессиялайтын G-MDSC үлесінің едәуір төмендеуімен бір уақытта, 11Ә-суретте көрсетілгендей, G-MDSC жалпы үлесінің артуы анықталды. Бұл қабынған ұлпаның эндотелийіндегі CD62L молекуласы үшін лигандылар (гликозилденуге тәуелді жасушаның адгезия молекуласы-1) экспрессиясының жоғарылауынан, CD62L адгезиялық молекулаларын экспрессиялаған G-MDSC жасушаларын қан айналысынан селективті түрде қабыну ошағына қарай миграцияға әкелу нәтижесі болуы мүмкін. CD11b⁺Ly6G^{high} жасушаларының көпшілігі, сонымен қатар, CD11b⁺CD49d⁺ жасушалар барлық жануарлар тобында CD62L-негативті болды (мәліметтер көрсетілмеді). CD62L лимфоциттік органдарға бару үшін қажет болғандықтан [186, р. 213], CD11b⁺Ly6G^{high} және CD11b⁺CD49d⁺ MDSC субпопуляциялары қабыну кезінде екінші лимфоидты ұлпаларға төмен тропизмді, ал өздері иммуносупрессивті орта қалыптастыратын шеткі ұлпаларға жоғары тропизмді деп тұжырымдалды.

Ал тәжірибе басталғаннан кейінгі төртінші аптаның соңында ЖЖ және АЖЖ топтарындағы CD195 молекуласын экспрессиялайтын CD11b⁺CD49d⁺ M-MDSC үлесі жоғарылайтыны анықталды (сурет 14).



А) Цитофлуориметриялық талдаудың репрезентативті мәліметтері; Ә) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер (n=9), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні $*p < 0,05$, $**p < 0,005$ (Стьюдент тест бойынша).

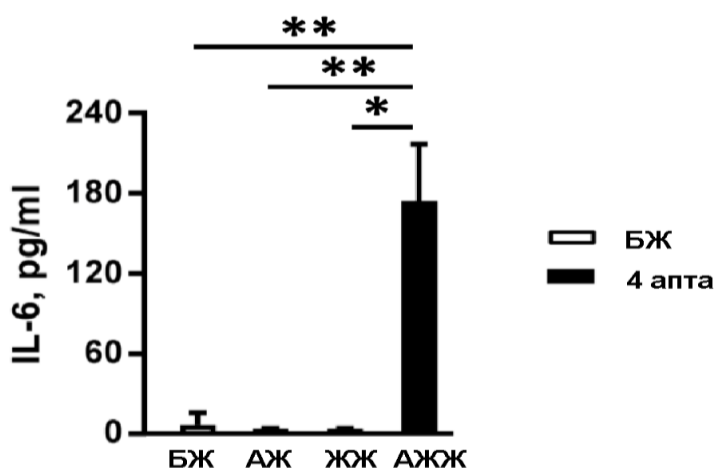
Сурет 14 – БЖ, АЖ, ЖЖ және АЖЖ көкбаурындағы CD195 экспрессиялайтын CD11b⁺CD49d⁺ M-MDSC үлесі

CD195 (CCR5) молекуласы лейкоциттердің ұлпалар арқылы трансэндотелиалды миграциялануы кезінде маңызды рөлі анықталған [187]. Сондықтан, түнде жарықтандыру кезінде M-MDSC субпопуляциясында CCR5 молекуласы экспрессиясының жоғары болуы, осы субпопуляцияның эндотелиалық тосқауыл арқылы ұлпаларға транслокациялану қабілетінің реттелуі циркадиандық ырғақтар негізінде болатындығын көрсетеді. Бұл басқа да зерттеушілер анықтаған күндізгі уақытта тышқандардың сүйек кемігінде гемопоэтикалық прекурсорлардың көбейетіні туралы нәтижесімен нақтыланады [188]. Сағат гендері (*Bmal1*, *Clock* және *Npas2*) миелоидты жасушалардың миграциялану процестерін реттейтіні белгілі [189]. Сонымен бірге, миелоидты жасушаларда *Bmal1* генінің жойылуы моноциттердің дифференциация жасауын күшейтіп, атеросклерозды үдететіндігін көрсетті және MDSC мен моноциттер бір прогиниторлардан дамитыны анықталды [190]. Бұл тұрақты жарықтандырудың тышқандардағы сағат гендер функциясына әсер ете алатынын түсіндіреді. Сондықтан, түнде жарықтандыру стресі CD62L және CD195 молекулаларын экспрессиялайтын MDSC субпопуляцияларының үлесін көбейтіп, олардың шеткі аймақтарға миграциялануын күшейткен болуы мүмкін [191]. Ал осы субпопуляциялардың АЖЖ тобында төртінші аптада азаюы, олардың қабыну аймағындағы ұлпаларға транслокацияланғанынан болуы мүмкін. Осылайша, бұл мәліметтер циркадиандық бұзылыстардың жасушалардың миграциялануына жауапты молекулаларының экспрессиясын индукциялау арқылы, созылмалы қабынумен байланысты процестердегі MDSC индукциясына әсер ететін бір жолын түсіндіреді.

3.2.2 Түнде жарықтандыру және біріккен үлгілеріндегі қан сарысуындағы цитокиндер деңгейін талдау

Созылмалы қабыну мен түнде тұрақты жарықтандыру кезіндегі MDSC үлесінің көбеюіне қатысатын, қан сарысуына секрецияланған цитокиндер деңгейіне талдау жасау үшін коммерциялық иммуноферменттік тест жинақтары қолданылды. MDSC супрессорлық активтілігі мен индукциясына қатысатын қабынуды ынталандыратын және қабынуға қарсы медиаторлар: IL-6, TGF- β 1, TNF α , IL-1 β және IL-27 зерттеу үшін алынды. Зерттеу нәтижелері көрсеткендей, БЖ, АЖ және ЖЖ топтарына салыстырғанда, тәжірибе басталғаннан кейінгі төртінші аптада АЖЖ тобында плазмалық IL-6 деңгейінің айтарлықтай жоғарылағаны анықталды (сурет 15).

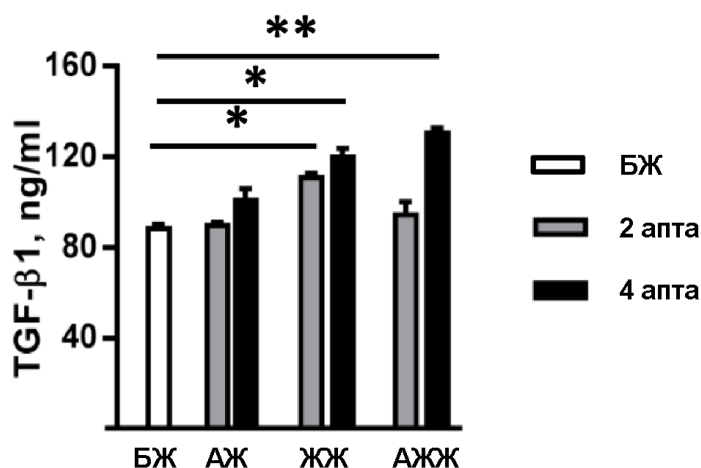
IL-6 цитокині MDSC-дің ROS, Arg-1 және p-STAT3 молекулаларының экспрессиясын ынталандырады. IL-6 цитокинінің секрециясын бұғаттау MDSC индукциясын және инвазивті ісіктердің пайда болуын болдырмайтыны анықталған [192]. Сондықтан, жарықтандыру және созылмалы қабыну тудырылған тышқандардың көкбауырында супрессорлық потенциалға ие және ROS молекуласын өндіретін MDSC жинақталуына IL-6 цитокині әсер еткен болуы мүмкін. Өйткені, MDSC жасушасы IL-6 рецепторларын экспрессиялайтыны белгілі, сондай-ақ, IL-1R дефицит тышқандарда IL-6 цитокині MDSC-дің ерте жинақталуын индукциялауға және ісік дамуын тездетуге қабілетті екендігі көрсетілген [66, p. 10019]. Тәжірибелік үлгілерде IL-6 тек, АЖЖ тобында айтарлықтай секрецияланды. Шамасы созылмалы қабыну мен жарықтың бір мезгілде әсер етуі қабыну сигналдарының синергиясына (жинақталуына) алып келеді де, нәтижесінде гипоталамус-гипофиз-бүйрек үсті без осі активтенуі арқылы IL-6 өнімінің «жойқын» көбеюін іске қосуы мүмкін [193].



Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер ($n=6$), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні $*p<0,006$, $**p<0,005$ (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 15 – БЖ, АЖ, ЖЖ және АЖЖ қан сарысуындағы плазмалық IL-6 деңгейі

Сонымен қатар, ЖЖ және АЖЖ топтарындағы плазмалық TGF- β 1 деңгейі БЖ тобымен салыстырғанда едәуір жоғарылағаны анықталды (сурет 16). Бұл ЖЖ және АЖЖ топтарындағы MDSC үлесінің (11-сурет) және олардың миграциялануына жауапты молекулалар экспрессиясының (13- және 14- сурет) жоғарылауымен корреляцияда болды.



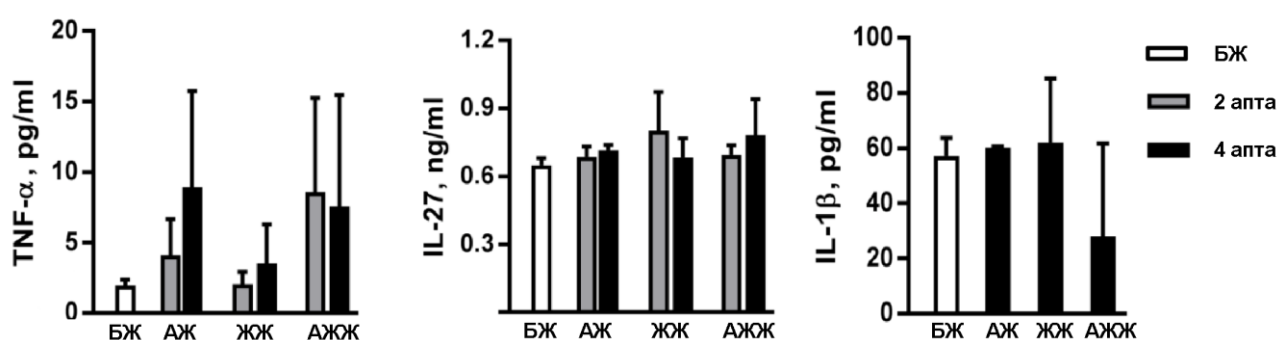
Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер (n=6), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 16 – БЖ, АЖ, ЖЖ және АЖЖ қан сарысуындағы плазмалық TGF- β 1 деңгейі

TGF- β 1 созылмалы қабыну процесінің патогенезінде маңызды рөл атқарады. Ішек қабыну ауруы кезінде ішек шырышты қабатының зақымдану деңгейімен, TGF- β 1 плазмалық деңгейінің нақтылы корреляциясы көрсетілген [194]. Кейбір үлгілерде TGF- β 1 қабынуды ынталандыру рөлін атқарады, оның жүйелік әсері супрессорлы болып табылады. TGF- β 1 ісік кезіндегі иммунитетті төмендететін негізгі медиаторларының бірі [195]. Ал, ісігі бар тышқандарда CD11b⁺Gr-1⁺ MDSC жасушалары TGF- β 1 цитокиндерін өндірушілердің бірі болып, сол арқылы NK жасушалардың функциялық активтілігін тежей алады [125, p. 1741]. Сондықтан, созылмалы қабыну процесіне жарықпен әсер ету кезіндегі қан сарысуында TGF- β 1 анықталуы, көкбауырдағы CD11b⁺CD49d⁺ және CD11b⁺Ly6G^{high} MDSC субпопуляциялар үлесінің артуынан (11-сурет) болуы мүмкін. Басқада ғылыми зерттеулерде, MDSC TGF- β 1 секрециясы арқылы ісікке спецификалық Т жасушаларының активтілігін және олардың клонды көбеюін тежейтіні [27, p. 1916], сонымен қатар, TGF- β 1 цитокинінің пайда болуы эффекторлы Т-жасушаларының төзімділігін индукциялайтын Treg жасушаларының дамуына делдал бола алатыны сипатталған [90, p. 1128-1129]. Бұл, 11-суретте көрсетілген, ЖЖ және АЖЖ топтардағы D8⁺ және CD4⁺ Т жасушалар үлесінің төмендеуінің себебін түсіндіруі мүмкін. TGF- β 1 MDSC экспанциясына әсері анықталды. TGF- β 1 мен VEGF бірлесіп DC жетілуін

тосып, миелоидты жасушаларды ісік микроортасындағы иммундық супрессорлық жасушаларға қарай бағыттайды [196, 197]. Осылайша, жарықтандыру стресі және онымен байланысты созылмалы қабыну процесіндегі MDSC экспанциясында TGF- β 1 цитокинінің қатысатыны анықталды.

Зерттеулерде жарықтық стресс қабыну процесін күшейтетіні анықталған. Жарықпен әсер етілген тышқандарды қараңғы түндегілерімен салыстырғанда микроглияда TNF- α , IL-1 β және IL-6 қабыну цитокиндерінің пайда болып және LPS қолданғаннан кейін қабыну уақытты ұзарған [198]. Біздің зерттеуде, плазмалық қабыну цитокиндерінің (TNF α , IL-1 β , IL-27) деңгейлерінде АЖ және ЖЖ топтар арасында нақтылы айырмашылық табылмады (сурет 17). Мүмкін, бұл цитокиндер тек қабынған ұлпаның ішінде пайда болып шеткі қандағы концентрациясы төмен болған болуы мүмкін.



Сурет 17 – БЖ, АЖ, ЖЖ және АЖЖ қан сарысуындағы плазмалық TNF α , IL-27 және IL-1 β деңгейлері

MDSC-дің сүйек кемігінен дифференциацияланып шеткі аймаққа жинақталуының жарық бойынша реттелу механизмі, жүйке жүйесіне, циркадиандық ырғақтардың кардиореттеушісіне тығыз байланысты екені анық. Бұл, ең алдымен, циркадианың негізгі реттегіші болып табылатын эпифиз арқылы секрецияланатын эндогендік гормон, мелатониннің (N-ацетил-5-метоксидиптамин) [199] өндірілуінің өзгеру нәтижесі болуы мүмкін. Мелатониннің өндірілуі жарық арқылы тежеледі. Оның жүре пайда болған және туа біткен иммундық жүйенің әртүрлі жасушалары мен цитокиндерінің жұмысын және гемопоэзді реттеуге қабілеттілігін көптеген зерттеулер көрсетті [200, 201]. Мелатонинмен емдеу Дюшенна бұлшық ет дистрофиясының (Duchenne muscular dystrophy) салдарынан болған созылмалы қабынумен ауратын науқастарда плазмалық IL-1 β , IL-2 және IL-6 цитокиндер деңгейі мен тотығу стресін қалыпқа келтірген [202]. Циркадиандық ауытқулармен қабыну процесінің қабаттасуы, созылмалы аурулардың дамуына әкелетін супрессорлық цитокиндер пайда болуы мен супрессорлық жасушалардың жинақталуын ынталандыруы, осы мелатонин синтезінің тежелуінен болған деп болжауға болады.

Жинақтай келгенде, созылмалы қабынудың созылмалы адьювант артрит және тұрақты жарықтандыру үлгісінде, ісік кезіндегі фенотипіне ұқсас және супрессорлық активтілігі бар MDSC субпопуляцияларының жинақталуын тудыратыны анықталды, бұл жасушалар үлесінің көбеюі өз кезегінде, қан айналымдағы CD8⁺ және CD4⁺ эффекторлық жасушалар үлесінің төмендеуімен сәйкес жоғарылады. Алынған мәліметтер, MDSC-дің созылмалы қабыну кезінде иммуносупрессорлы ортаны қалыптастыруға қатысатынын дәлелдейді. Сонымен бірге, алғаш рет жарықтық стресс кезінде тышқандар көкбауырында CD62L және CD195 адгезиялық молекулаларын экспрессиялайтын MDSC субпопуляцияларының жинақталуы жүретіні анықталды. Ал, жарық индукциялаған стрестің созылмалы қабынумен бірігуі тышқандарда CD11b⁺CD49d⁺ және CD11b⁺Ly6G^{high} MDSC субпопуляцияларының жиналу процесін күшейтетіні анықталды. Осы кезде MDSC активтілі мен супрессорлық механизмінде қажетті, IL-6 және TGF- β плазмалық цитокиндердің жоғарылауына алып келетіні көрсетілді [203]. Бұл MDSC-дің созылмалы қабыну және онымен байланысты циркадиандық бұзылуы кезінде иммундық жауапты реттеуге қабілеті қатысушылардың бірі екенін нақтылайды.

3.3 Созылмалы қабыну индукциялаған MDSC популяциясының трансплантацияланған ісіктердің өсуіне әсерін зерттеу

Соңғы онжылдықта жарияланған көптеген мақалалар созылмалы қабыну мен ісік микроортасы арасындағы тығыз байланыс барын көрсетті. Сонымен қатар, созылмалы қабынудың әртүрлі ісіктердің басталуы мен прогрессиясының маңызды факторы екені белгілі болды [204]. Алайда, созылмалы қабынудың ісіктің өсуін тездетуде иммуносупрессорлық жасушалардың фенотиптік ерекшелігі және функциялық рөлі туралы зерттеулер аз. Кейбір созылмалы қабынудың онкогенездегі рөлі туралы зерттеулер көбінесе қабынудың сол ұлпада орналасқан ісіктердің дамуына әсерін зерттеуге арналған [158, р. 5039]. Ал қатерлі ісік дамыған ұлпадан алыс туындаған организмдегі қабынулардың онкологиялық процеске әсері туралы және MDSC-дің осы процесітегі рөлі туралы зерттеулер жеткіліксіз.

3.3.1 Созылмалы қабынудың ісіктің өсуін ынталандырудағы MDSC рөлін анықтау

Зерттеуге ісігі бар жануарлардың (ІЖ) және адьювант артрит пен ісік біріккен жануарлардың (АІЖ) тәжірибелік үлгілері қолданылды. Бұл зерттеуге адьюватты артритпен байланысты ісік өсуін тәжірибелік үлгі ретінде пайдаланудың өзіндік ерекшелігі бар. Қазіргі уақыттағы созылмалы қабынудың онкогенездегі рөлі туралы тәжірибелік зерттеулердің көпшілігі қабынумен жақын байланысы бар ісік үлгілерін қолдану арқылы өткізіледі, олардың арасында жарамен байланысты тоқ ішек қатерлі ісігі үлгісі ең танымал. Бұл үлгілер бір ұлпада орналасқан қабынудың фонын ескере отырып, сол ұлпадағы қатерлі ісік ауруының даму механизмін зерттеуге көмектеседі, ал бізде ісік ауруының дамуымен гистологиялық байланыспайтын адьювант артрит үлгісі

қолданылды. Бұл тәжірибелік үлгілер ұсынылған аурудың табиғи процестерінен белгілі бір аспектілерде ерекшеленеді. Жергілікті созылмалы қабыну процесінің алыстағы ісіктердің өсуіне жүйелік әсерін зерттеуге мүмкіндік береді.

Созылмалы қабынудың ісіктердің өсуіне әсерін зерттеу үшін адьювант артрит тудырылғаннан екі аптадан кейін жануарларға, Эрлих ісігінің жасушалары тері астына этикалық ережелер бойынша инъекцияланды (сурет 18).



Сурет 18 – Созылмалы қабынудың ісіктің дамуына әсерін зерттеу тәжірибесінің жобасы

Ісік жасушалары трансплантацияланғаннан екі аптадан кейін жануарлардан ісіктер хирургиялық жолмен алынып май ұлпаларынан тазалағаннан кейін салмағы өлшенді. Зерттеу нәтижелер көрсетілгендей, созылмалы қабыну тудырылмаған ІЖ тобмен салыстырғанда АІЖ тобында ісіктердің айтарлықтай үлкейгені анықталды (сурет 19). Бұл мәліметтер, жергілікті созылмалы қабынудың қабыну ошағынан алыс орналасқан ісіктердің өсуіне әсер ете алатынын көрсетті [205].

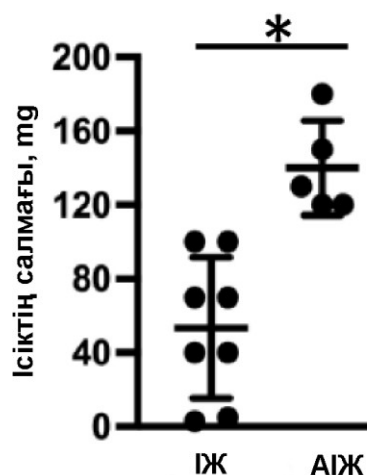
А



ІЖ

АІЖ

Ә



А) Репрезентативті мәліметтер; Ә) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер (n=8), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні $*p < 0,004$ (Стьюдент тест бойынша).

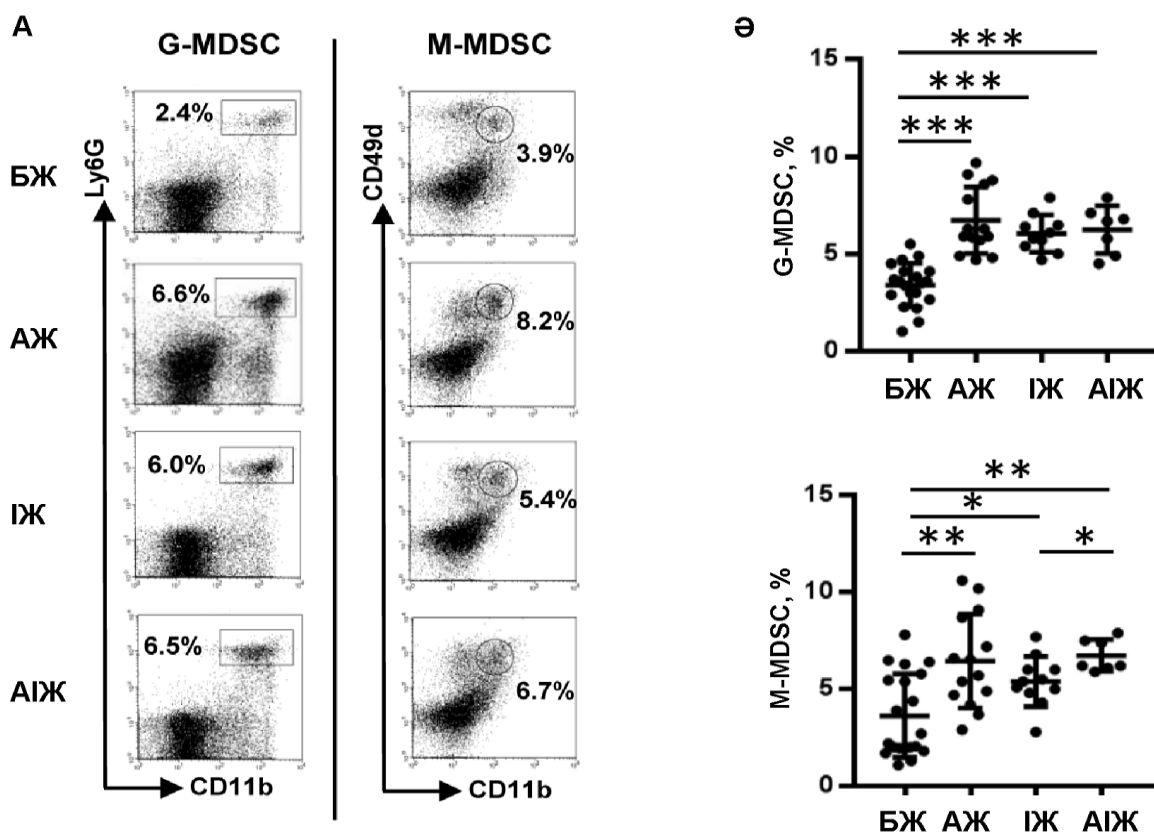
Сурет 19 – ІЖ және АІЖ тобындағы Эрлих ісігінің өсуі

Созылмалы қабыну ісіктердің басталуы мен дамуына иммундық емес және иммундық механизмдер арқылы әсер етеді. Иммундық емес механизмдерге мыналар кіреді: 1) генетикалық тұрақсыздыққа және ДНҚ молекуласының зақымдалуын тудыратын пероксинитриттер сияқты реактивті оттегі түрлерінің (ROS) өндірілуі; 2) ісіктердің тамырлануына әсер ететін тамырлы эндотелийдің өсу факторы (VEGF) сияқты проангиогенді факторлардың өндірілуі; 3) ісіктердің экспанциясы мен метастазын жеңілдететін матрицалық металлопротеаза ферментінің өндірілуі. Басты иммундық механизмдер, бұл антиген көрсетуші DC жетіспеушілігі және ісікке қарсы иммунитет жасушаларының дисфункциясын бастайтын миелопоэз мен гемопоэздің тежелуін қамтиды. Миелопоэздің бұзылуы шеткі қан айналымдағы гранулоциті-моноцитті жасуша популяцияларының, оның ішінде MDSC үлесінің өзгеруіне әкеледі. MDSC туа біткен және жүре пайда болған иммунитеттің жасушаларының функциясын әртүрлі механизмдер арқылы тежей алады [75, p. 4499].

Созылмалы қабынудың адьювант артрит тәжірибелік үлгісінде митоген-активтендірген Т жасушаларының пролиферациясын тежеу қабілеті бар CD11b⁺Ly6G^{high} G-MDSC және CD11b⁺CD49d⁺ M-MDSC көкбауырда жинақталатыны алдыңғы зерттеулерде анықталды [203, p. 711]. Осы жасушалардың созылмалы қабыну ынталандырған Эрлих ісігінің прогрессиясында өзгерісін анықтау үшін АЖ және АІЖ тәжірибелік топтары (ТАФ инъекциясынан 4 аптадан кейін), интакты жануарлар (БЖ) мен ІЖ топтарымен салыстыра зерттелді. Бақылау тобымен салыстырғанда АЖ, ІЖ және АІЖ топтарындағы көкбауыр G-MDSC және M-MDSC үлесінің едәуір жоғарылағаны анықтады. Ал АІЖ тобындағы M-MDSC үлесі ІЖ тобымен салыстырғанда жоғары болды (сурет 20).

19-суретте көрсетілгендей, АІЖ тобындағы ісіктің тез өсуі, осы топтың көкбауырындағы MDSC үлесінің көбеюімен корреляцияда болды. Бұл созылмалы қабыну индукциялаған MDSC популяциясының ісіктің өсуіне қатысатынын көрсетеді. Ісік дамуы кезінде шеткі қанда жинақталатын MDSC туа біткен және жүре пайда болған иммунитет жасушаларының ісікке қарсы активтілігін төмендету арқылы, ісік прогрессиясына ынталандырушы рөл атқаратынын зерттеулерде анықталған. Бұл жасуша үлесінің көбеюі, ісік және қабыну кезінде пайда болатын факторлар әсерінен жүйелік иммуносупрессияның жалпы процесінде доминатты бола алады [60, p. 16-17]. Тәжірибеде созылмалы қабыну индукциялаған MDSC ісіктің өсуіне ықпал ететін патогенді фактор екенін көрсету үшін осы жасушалар жергілікті созылмалы қабынудан кейін гемцитабинмен элиминацияланды.

Гемцитабин қолданыстағы кең таралған ісікке қарсы препарат, ол ісік жасушаларының апоптозды тудырады және ісіктің өсуін тежейді. Сонымен бірге зерттеулерде гемцитабинмен MDSC-ді элиминациялау жақсы нәтиже көрсеткен [206, 207]. Гемцитабиннің ісік жасушаларына қарсы тікелей әсер етуін болдырмау үшін тәжірибеде гемцитабинмен соңғы рет емдеу ісік жасушаларын инъекциялаудан 4 күн бұрын тоқтатылды (сурет 21).



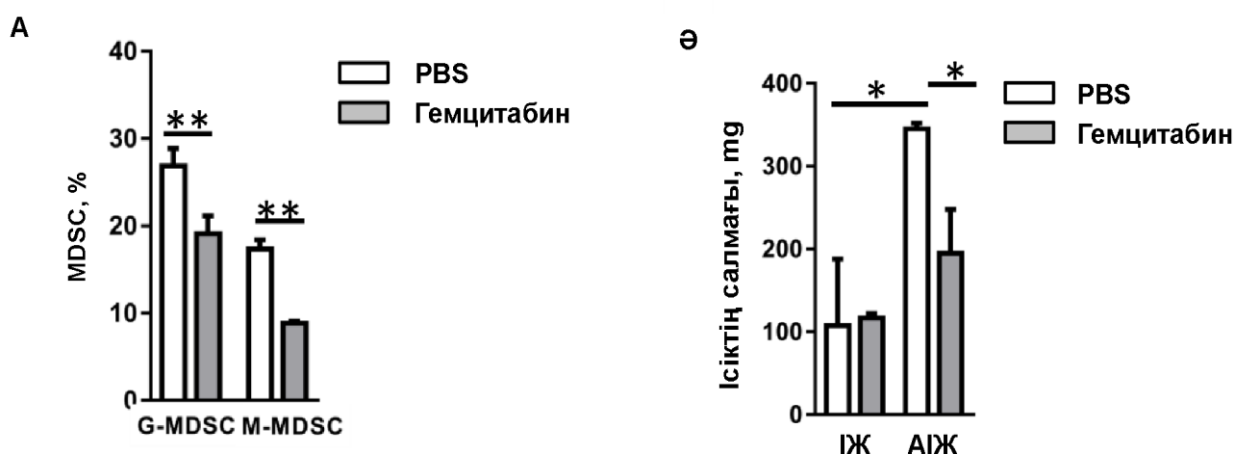
А) Цитофлуориметриялық талдаудың репрезентативті мәліметтері; Ә) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер (n=10), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$ (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 20 – БЖ, АЖ, ІЖ және АІЖ топтарынан алынған көкбауырдағы G-MDSC және M-MDSC үлесі



Сурет 21 – Созылмалы қабыну индукциялаған MDSC-дің ісіктің дамуына қатысуын зерттеудің тәжірибелік жобасы

Зерттеу барысында гемцитабинмен емделмеген АІЖ тобымен салыстырғанда, гемцитабинмен емдеу жүргізілмеген АІЖ көкбауырында G-MDSC және M-MDSC үлесінің төмендеуі анықталды (сурет 22А). Бұл төмендеу ісік өсуінің баяулауына алып келді (сурет 22Ә). Сонымен қатар, сурет 19Ә де көрсетілгендей, Эрлих ісігін тудырудан 4 күн бұрын инъекциясы тоқтатылған гемцитабин, тышқандар ісігінің өсуіне тікелей токсикалық әсер көрсетпеді.



А) 75 мг/кг гемцитабин және PBS инъекцияланған АІЖ тобынан алынған көкбауырдағы G-MDSC және M-MDSC үлесі; Ә) 75 мг/кг гемцитабин және PBS инъекцияланған ІЖ және АІЖ тобының ісік салмағы (n=10), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ (Стьюдент тест бойынша).

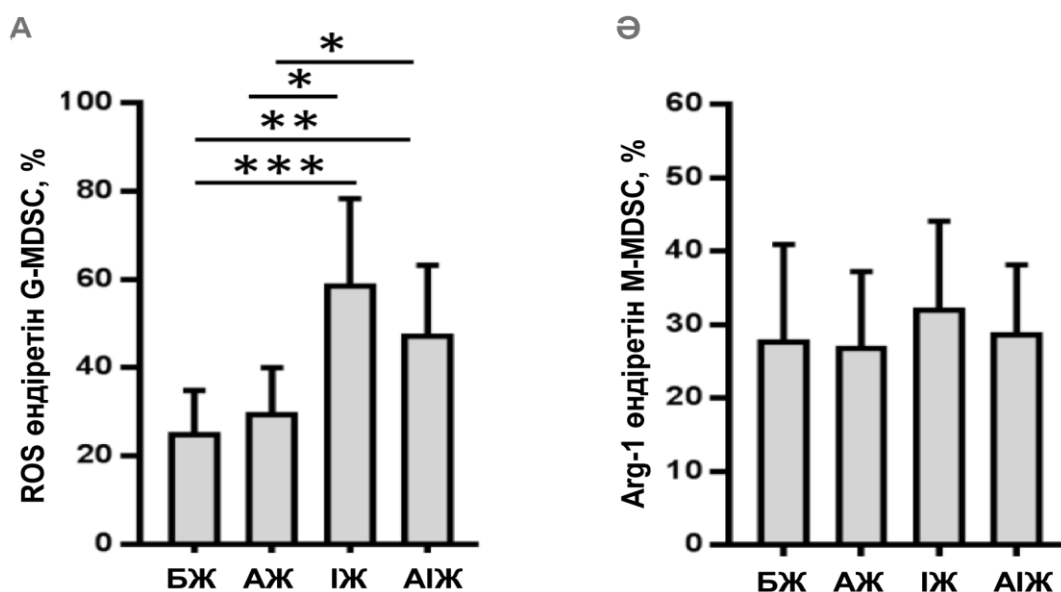
Сурет 22 – Созылмалы қабыну индукциялаған MDSC-дің ісіктің өсуіне қатысуын бағалау

Тышқандарды пайдаланған ісік зерттеулерінде, гемцитабин Gr-1⁺/CD11b⁺ миелоидтық супрессорлық жасушаларды элиминациялайтыны және ісікке қарсы иммундық активтілікті жоғарылататыны көрсетілген [208]. Алынған нәтижелерде, созылмалы қабыну кезінде MDSC-ді элиминациялау ісік өсуін баяулатты. MDSC-дің патологиялық активтенуі және жинақталуы жануарлардың иммунитет жасушаларының ісікке қарсы жауапта қауқарсыздық танытуына әкелумен қатар, ісіктің өсуіне және олардың метастазға дейінгі дамуына үлесін қосатындығы жануарлар үлгілерінде анық дәлелденген [15, p. 422; 209]. Осы мәліметтерге негізделіп созылмалы қабыну Эрлих ісігінің өсуін, MDSC-ді индукциялау арқылы күшейтеді деп тұжырым жасауға болады [210].

3.3.2 Созылмалы қабынумен байланысты ісіктің дамуындағы MDSC фенотиптік ерекшеліктерін зерттеу

Ісік дамуы кезінде MDSC супрессорлық активтілігі Arg-1 активтілігі арқылы микроортадағы L-Arg амин қышқылын ыдыратады. Оның жетіспеушілігі түрлі механизмдер арқылы NK, T жасушалардың активтенуін

тежейді [103, р. 2283]. Ал ROS эффекторлы жасушалардың рецепторларының ісік жасушасындағы MHC молекуласымен байланысуын азайтады, сол арқылы антиген спецификалық цитотоксикалық Т жасушаларының реакцияларына төзімді ісік жасушаларының пайда болуына жол ашады [123, р. 4015]. Осы молекулалардың қабынумен байланысты ісік кезіндегі өзгерісін анықтау үшін тышқандар көкбауырындағы Arg-1 және ROS өндіретін M-MDSC және G-MDSC жасушаларының үлесі зерттелді. Ісік жасушаларын инъекциялаған екі аптадан кейін (ТАФ инъекциясынан 4 аптадан кейін) АЖ және БЖ топтарымен салыстырғанда, ІЖ және АІЖ топтардағы ROS өндіретін G-MDSC субпопуляция үлесі айтарлықтай артатыны анықталды (сурет 23А). Ал M-MDSC субпопуляциясының Arg-1 өнімінде жануарлардың тәжірибелік топтары арасында айырмашылық табылған жоқ (сурет 23Ә). Бұл созылмалы қабынумен байланысты ісіктің өсуіне ROS молекулаларын экспрессиялайтын G-MDSC субпопуляциясы қатысатын көрсетеді. Ал Arg-1 экспрессиялайтын субпопуляцияда айырмашылықтың табылмауы, созылмалы қабыну кезінде MDSC супрессорлық функциясы Arg-1 байланысты емес болуы мүмкін немесе Arg-1, ол жасушадан тыс қан айналымына шығарылып жасуша ішінде болмаған болуы мүмкін. Сонымен қатар, бауыр және бүйрек созылмалы қабыну үлгілерімен жүргізілген зерттеу жұмыстарында миелоиты жасушалар Arg-1 экспрессиясын жасамаған [137, р. 5]. Созылмалы қабыну кезінде MDSC ісіктен өзгеше супрессорлық молекулаларды пайдалануы мүмкін.



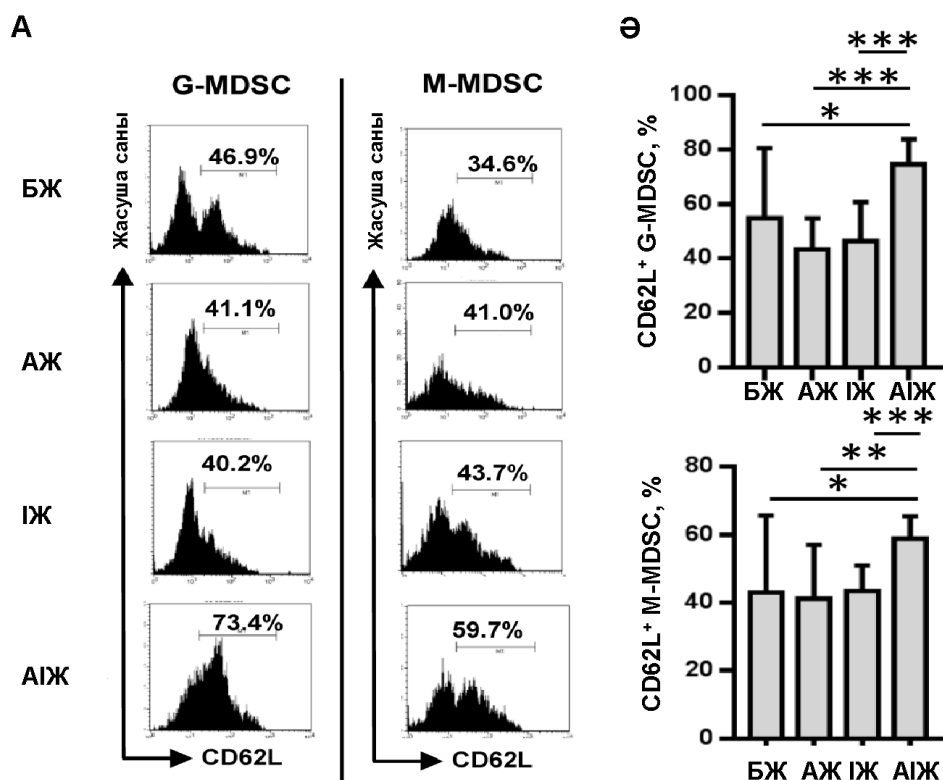
А, Ә) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер (n=10), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$ (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 23 – БЖ, АЖ, ІЖ және АІЖ топтарынан алынған көкбауырдағы ROS және Arg-1 өндіретін G-MDSC және M-MDSC үлесі

Жергілікті созылмалы қабынумен байланысты Эрлих ісігінің дамуында ісікке қарсы иммундық жасушалар үлесін бағалау үшін тәжірибелік тышқандардың көкбауырындағы CD8⁺, CD4⁺ және NK (CD3⁻CD49b⁺ ретінде анықталған) жасушаларының деңгейіне талдау жасалынды. Бақылау тобымен салыстырғанда созылмалы қабынумен байланысты ісік процесінде MDSC деңгейі жоғарылағанымен, CD8⁺, CD4⁺ және NK жасушалар үлесінде өзгеріс болмады. Негізінде MDSC ісік прогрессиясы кезінде G-MDSC ROS молекулаларымен Т жасушалардың функциясын тоқтата алатындығы анықталған [62, р. e1004983-3; 114, р. 367]. Сонымен қатар, ROS тобына кіретін PNT Т жасушалардың рецепторлары мен CD8 молекулаларын модификациялайды. Осы модификациялардан кейін CD8⁺ Т жасушалар фосфорланған MHC молекуласын байланыстыру қабілетін жоғалтады және шеткі қандағы CD8⁺ Т жасушалардың антигенге төзімділігі индукцияланатыны белгілі [119, р. 828]. 23А суретте көрсетілгендей G-MDSC субпопуляциясының ROS молекуласын өндіруі AIЖ тобында жоғары болды. Сондықтан, G-MDSC субпопуляциясы ROS арқылы CD8⁺, CD4⁺ және NK жасушалардың тек функциялық ерекшеліктерін өзгерткен болуы мүмкін. Бұл ісік жасушаларының иммундық қадағалаудан құтылуына мүмкіндік береді.

CD62L, L-селектин ретінде белгілі, лейкоциттердің барлық кластарында экспрессияланады және лейкоциттердің қан тамырларының қабырғаларына тікелей жабысуын қамтамасыз етеді [211], бұл жасушалардың қан айналым жүйесінен шеткергі ұлпаларға миграциялануының негізгі көмекшісі. Осы уақытқа дейін, *in vitro* жағдайында генерацияланған CD62L экспрессиялайтын MDSC, екінші лимфоидты органдарға қарқынды миграциялана алатыны, аллогенді Т жасушалардың пролиферациясы мен активтенуіне кедергі келтіретіні көрсетілген [212]. Сонымен қатар, Т. Лихтенштейн және басқалар жасаған фенотиптік талдау CD62L MDSC маркерлерінің бірі екенін көрсетті [213].

Осы молекуланың маңыздылығын ескере отырып, тәжірибелік тышқандардың көкбауырынан алынған әртүрлі MDSC субпопуляцияларында CD62L экспрессиясы зерттелді. Талдау көрсеткендей, CD62L экспрессиялайтын G-MDSC және M-MDSC үлесі БЖ, АЖ және ІЖ топтарына салыстырғанда AIЖ тобында айтарлықтай жоғары екендігі анықталды (сурет 24).



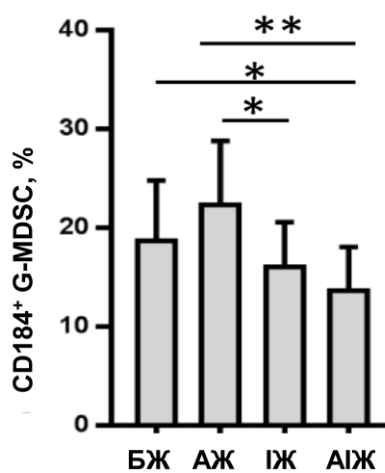
А) Цитофлуориметриялық талдаудың репрезентативті нәтижелері; Ә) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер (n=13), Топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні * $p < 0,05$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,005$ (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 24 – БЖ, АЖ, ІЖ және АІЖ алынған көкбауырдағы CD62L экспрессиялайтын G-MDSC және M-MDSC үлесі

MDSC-дің екінші лимфоидті органдар мен қабыну ошақтарына жоғары эндотели тамырлары арқылы жетуіне CD62L молекуласының маңызы бары анықталған [214]. Сондықтан, созылмалы қабынуы бар тышқандардағы Эрлих ісігінің тез өсуі, миграциялануға қабілетті, CD62L экспрессиялайтын MDSC субпопуляциялары әсерінен күшейген болуы мүмкін. Яғни, бұл MDSC-дің ісік аймағына жинақталуына мүмкіндік береді және иммуносупрессорлық фонды қалыптастырып ісіктің тез өсуіне қолайлы жағдай жасайды.

24-суретте көрсетілгендей, АЖ және ІЖ топтарында CD62L экспрессиялайтын G-MDSC және M-MDSC үлесінің БЖ мен салыстырғанда айырмашылықтың болмауы, керісінше 20-сурет көрсетілгендей MDSC жалпы пулінің көбеюі, CD62L экспрессиялайтын MDSC субпопуляцияларының шеткі аймақтан қабыну ошақтарына миграциялануынан болуы мүмкін. Тағы бір зерттеулерде, MDSC-дің ісігі бар тышқандарда лимфа түйіндеріне жинақталатынын анықталған [75, р. 4502]. Бұл қабыну кезінде MDSC-дің адгезиясы және олардың қан тамырларынан ұлпаларға миграциясы лимфоциттердің миграциясымен ұқсас екенін көрсетеді.

Хемокиндер және олардың рецепторлары лейкоциттердің нысаналы ұлпаларға жетуінің соңғы кезеңінде шешуші рөл атқарады. SDF-1 α (CXCL12) және оның рецепторы CXCR4 (CD184) иммуносупрессорлы жасушалардың, соның ішінде, MDSC жинақталуында маңызды рөл атқаратындығы көрсетілген [70, p. 7463]. Жануарлардың көкбауырындағы CD184 экспрессиялайтын MDSC субпопуляцияларына цитометриялық зерттеу барысында, CD184 экспрессиялайтын M-MDSC үлесі бойынша жануарлар топтары арасында айырмашылықтар байқалмады (мәліметтер көрсетілмеді). Дегенмен, CD184 экспрессиялайтын G-MDSC үлесі ІЖ және АІЖ топтарында БЖ және АЖ топтарымен салыстырғанда айтарлықтай төмендеді (сурет 25).



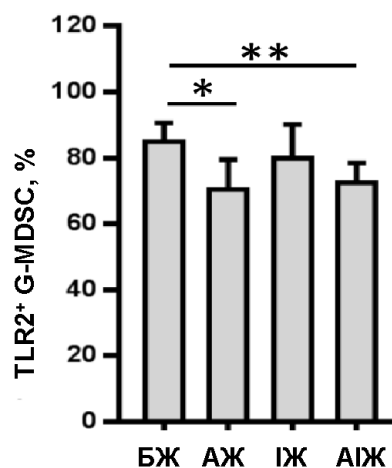
Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер (n=10), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні * p <0,05, ** p <0,005 (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 25 – Жануарлар топтары арасында CD184 экспрессиялайтын G-MDSC үлесі

Тәжірибелерде созылмалы қабыну тудыру үшін ТАФ қолданылды, оның құрамында қыздырылып активтілігі жойылған *Mycobacterium tuberculosis* микроб денелерінің суспензиясы бар. *Mycobacterium tuberculosis* - толл тәрізді рецептор 2 мен («Toll-like receptor 2, TLR2») танылатын антигендерді алып жүреді [215]. TLR2 – бұл белгілі бір жасушалардың бетінде экспрессияланатын мембраналық рецептор. Ол бөгде заттарды танып, иммундық жүйенің жасушаларына тиісті сигналдарды береді [216].

MDSC субпопуляцияларының TLR2 экспрессиясын талдау, БЖ тобымен салыстырғанда АЖ және АІЖ топтарындағы G-MDSC субпопуляциясында TLR2 экспрессиясы төмендегені байқалы (сурет 26). TLR2 экспрессиясы M-MDSC-де жануарлар топтары арасында айтарлықтай айырмашылықтар табылмады (мәліметтер көрсетілмеді). Ал адьювант артрит даму динамикасындағы TLR2 рецепторының M-MDSC және G-MDSC да экспрессиясын талдау, ТАФ инъекциясынан екі аптадан кейін G-MDSC TLR2

рецепторының ең төмен экспрессиясын көрсетті (2 аптада $53.08 \pm 11.30\%$ және 4 аптада $68.6 \pm 9.64\%$, $p=0.02$), ал M-MDSC де экспрессиясы барлық бақылау кезеңінде өзгерген жоқ (2 аптада $69,47 \pm 10,85\%$ және 4 аптада $62,76 \pm 9,63\%$ $p=0.13$).



Орташа мәндермен жинақталған $\pm SD$ мәліметтер ($n=10$), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні $*p < 0,05$, $**p < 0,005$ (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 26 – Жануарлар топтары арасында TLR2 экспрессиялайтын G-MDSC үлесі

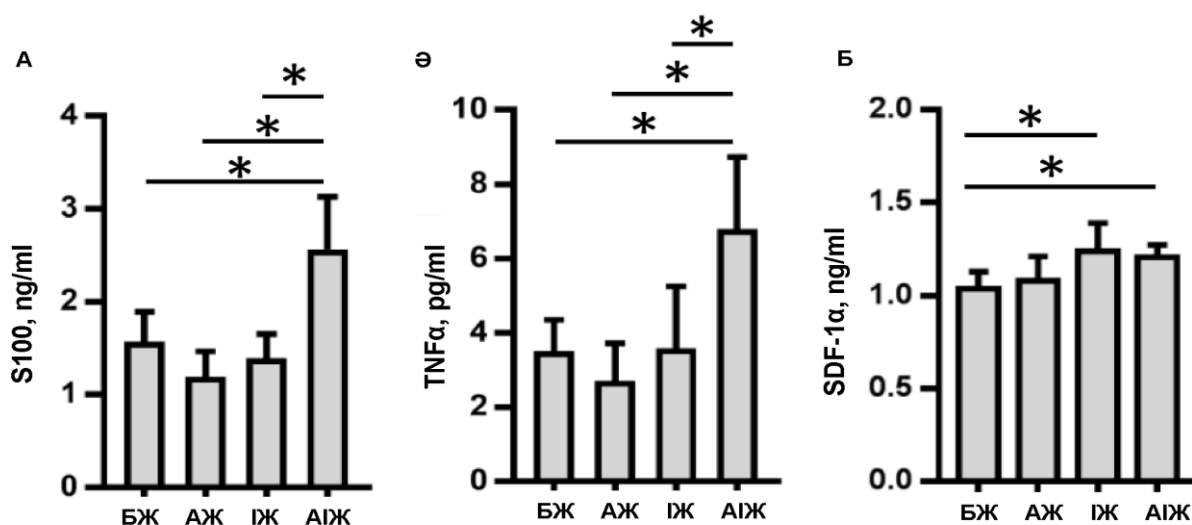
TLR рецепторларының лигандыларымен байланысуы мембраналық рецепторлар деңгейінің төмендеуіне және TLR mRNA деңгейінің компенсаторлық жоғарылауына әкеледі [217]. Бұл адьювант артрит тудырылған жануарларда (АЖ және АІЖ топтары) анықтаған TLR2 экспрессиясы бар G-MDSC деңгейінің төмендеуін түсіндіруі мүмкін. Жалпы, созылмалы қабыну және ісік үлгілеріндегі G-MDSC-дің CD184 және TLR2 рецепторлары экспрессиясының өзгерісі, сәйкесінше, осы субпопуляцияның шеткі ұлпаларға жоғары тропизмін көрсетеді. Миграцияға бірнеше рецептордың қатысуы созылмалы қабыну ошақтарына және ісік өсетін ұлпаға G-MDSC жиналуын ынталандыруы мүмкін.

3.3.3 Созылмалы қабыну мен трансплантацияланған ісіктің өсу үлгісінде қан сарысуындағы цитокиндер деңгейін талдау

Созылмалы қабынуы бар жануарлардан алынған қан сарысуындағы IL-27, TNF α және TGF- 1β талдауы ТАФ инъекциясынан 2 және 4 аптадан кейін интакті жануарлармен салыстырғанда айтарлықтай айырмашылықтар анықталған жоқ (мәліметтер көрсетілмеді). Жалғасты, БЖ, АЖ, ІЖ және АІЖ топтарынан алынған қан сарысудағы IL-6, IL- 1β , TNF α , S100, IL-10, SDF- 1α және GM-CSF деңгейлері зерттелді. IL-6 [218], IL- 1β [219] және TNF α [220] созылмалы қабынған аурулар кезінде өндірілетіні белгілі. S100 – қабыну процесінің маңызды маркері және ол IL-10 мен SDF- 1α болған кезде ісіктің

дамуын қолдап және күшейте алады [221]. GM-CSF MDSC дифференциациясында маңызды рөл атқарады [222].

Бұл цитокиндердің қан сарысуындағы өзгерісін талдау үшін комерциялық иммуноферменттік тест жиндықтары пайдаланылды. Алынған нәтижелер БЖ, АЖ және ІЖ жануарлар топтарымен салыстырғанда, АІЖ тобынан алынған қан сарысуындағы S100 және TNF α цитокиндер деңгейінің едәуір жоғарылағанын көрсетті (сурет 27А, Ә). Бақылау жануарларымен салыстырғанда ІЖ және АІЖ топтарында жоғары SDF-1 α концентрациясы анықталды (сурет 27Б). Бұл Эрлих ісік жасушаларының осы хемокинді бөліп шығаруымен байланысты болуы мүмкін. Алайда, жануарлар топтары арасында IL-1 β , IL-10, IL-6 және GM-CSF деңгейлерінде айтарлықтай айырмашылықтар байқалмады.



Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер (n=6), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні * $p < 0,05$ түрінде берілген (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 27 – БЖ, АЖ, ІЖ және АІЖ қан сарысуындағы S100, TNF α және SDF-1 α деңгейі

Қан сарысуындағы SDF-1 α деңгейінің жоғарылауы ІЖ және АІЖ топтарында анықталды, ал 25-суретте көрсетілгендей, G-MDSC субпопуляциясындағы мембраналық CXCR4 (CD184) экспрессиясының төмендеуі, осы топтарда анықталды. Бұл SDF-1 α лигандымен байланысу нәтижесінде пайда болған CXCR4 рецепторының интернализациясымен түсіндіруге болады [223]. Сондай-ақ, CXCR4-SDF-1 α осі тек ісік жасушаларының миграциясына ғана емес, сонымен қатар, иммуносупрессорлы иммундық жасушалардың, атап айтқанда, MDSC-дің жиналуына қатысатындығы тышқанның сүт безі ісігі үлгісінде көрсетілген [224]. Сонымен бірге, CXCR4-SDF-1 α осі өкпе ісігі бар тышқан үлгісінде p38 ақуыз-киназа ферментін активтендіру арқылы MDSC миграциясына әсер ететіні де анықталған [225]. Сондықтан, АІЖ тобындағы SDF-1 α хемокин мөлшерінің қандағы жоғарылауы, CD184 экспрессиялайтын G-MDSC-дің ісікке

хемотаксисын ынталандырады. Бұл ісік айналасында супрессорлық орта қалыптастыратын жасушалардың жинақталуын және олардың ісіктің өсуіне көмектесуін ынталандыруы мүмкін. Сондықтан, АІЖ көкбауырындағы G-MDSC үлесі ІЖ-мен бірдей деңгейде қалған болуы мүмкін.

TNF α MDSC-де S100A8, S100A9 және RAGE өнімдерінің өндірілуін индукциялайды, олар осы жасушалардың жетілмеген күйде болуын қамтамасыз ететіні көрсетілген. Ал TNF α қабыну факторын бейтараптандыру, S100A8 мен S100A9 өнімін бұғаттау, MDSC-дің DC жасушаларына қарай дифференциация жасауына әкеледі [161, p. 541]. Сондықтан, АІЖ тобынан алынған қан сарысуындағы S100 концентрациясының жоғарылауы, TNF α цитокинінің MDSC-ді ынталандыруы нәтижесінде байқалған болуы мүмкін. Сондай-ақ, қатерлі ісік кезінде S100A9 қабыну медиаторы миелоидты прекурсорлардан DC және макрофагтар дифференциациялануын тежеу арқылы MDSC жинақталуын жоғарылататыны анықталған [226]. Бұл АІЖ тобындағы қабыну факторы S100 мен MDSC үлесі корреляциясының себебі болуы мүмкін.

Басқа зерттеушілер көрсеткендей, адьювантпен индукцияланған M-MDSC TNF α цитокинінің жоғары деңгейін өндіреді [227]. АІЖ тобының көкбауырында MDSC жинақталуы, атап айтқанда, M-MDSC үлесінің жоғарылауында TNF α -ның маңызды рөлі барын көрсетті [228]. Сол себепті АІЖ тобында үлесі жоғарылаған M-MDSC, TNF α цитокинінің қосымша өндірушісі болып, ол, өз кезегінде MDSC-дің шеткі лимфоидты ұлпаларда үлесінің көбеюін қамтамасыз ететін автокринді әсердің кері байланыс циклін қалыптастыруға қатысуы мүмкін.

3.3.4 MDSC генерациясына қабыну факторы TNF α цитокинінің әсерін зерттеу

Қазіргі уақытта созылмалы қабыну және ісіктің өсуі кезінде MDSC-дің экспансиясы екі сигналды жолға негізделеді. Олар MDSC-дің жинақталуында екі түрлі, бірақ ішінара қабаттасатын сигнал түрлерін талап етеді: біріншісі жетілмеген миелоидты жасушалардың таралуына және олардың терминалды дифференциациясының тежелуіне, ал екіншісі осы жасушалардың патологиялық активтенуіне жауап береді. Сигналдардың бірінші тобы негізінен G-CSF, IL-6, GM-CSF сияқты факторлармен делдалданады және STAT3, IRF8 және NLRP3 транскрипциялық факторларының активтенуіне әкеледі. Сигналдың екінші тобын негізінен IFN γ , PGE2, IL-6, TNF α сияқты цитокиндер делдалдайды және NF- κ B, STAT1 және STAT6 активтенуіне әкеледі [52, p. 6-7]. Marigo және басқалар GM-CSF және IL-6 комбинациясы арқылы тышқандар мен адамдардың сүйек кемігінде болатын прекурсорлардан MDSC-ді генерациялауға болатынын көрсетті. Тышқандардың сүйек кемігінен генерацияланған бұл жасушалар CD8⁺ T жасушалардың пролиферациясын тежей алады [79, p. 790-791]. Ал созылмалы қабынуы бар тышқандар мен жарықпен әсер етілген тышқандарда MDSC-нің жинақталуы, MDSC-ді активтендіруге қажетті сигналдардың екінші тобына жататын TNF α қабыну медиаторы жоғары тенденциясымен бірге жүретіні көрсетілді [203, p. 719].

Сондай-ақ, әдебиеттерде $TNF\alpha$ сүйек кемігі жасушаларындағы CD62L экспрессиясын жоғарылатуға қабілетті екенін сипаттаған [229]. Осы мәліметтермен бірге AIЖ тобының қан сарысуындағы $TNF\alpha$ деңгейінің жоғарылауы, CD62L адгезия маркерлерінің экспрессиясы бар MDSC үлесінің жоғарылауымен қатар жүретін ескере отырып, сүйек кемігінен генерацияланған MDSC-ге $TNF\alpha$ цитокин әсері зерттелді.

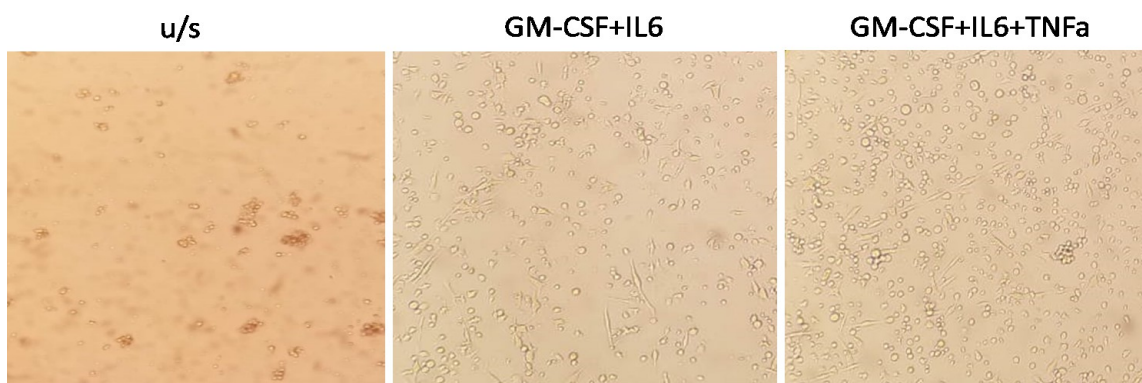
$TNF\alpha$ қабыну процесінде макрофагтар/моноциттер бөлетін қабыну цитокині және жасушаларды некрозға немесе апоптозға алып келетін сигналдардың әртүрлілігіне жауап береді. $TNF\alpha$ екі трансмембраналық рецепторлар TNFR1 және TNFR2 арқылы жасушалардың пролиферациясын, өмір сүруін, дифференциациясын және апоптозды қоса, бірқатар маңызды жасушалық функцияларды реттейді. $TNF\alpha$ қабынуға қатысатын жасушаларды активтендіруде басты рөл атқарады, қабынған ұлпаларда ең көп болатын кездесетін ерте медиаторларының бірі [220, р. 641]. Сондықтан, қабыну кезіндегі MDSC-дің активтенуінде $TNF\alpha$ рөлі маңызды болуы мүмкін.

Бұл үшін интакті тышқандардан алынған сүйек кемігі жасушалары, 4 күн бойы ынталандырушы GM-CSF+IL-6 немесе GM-CSF+IL-6+ $TNF\alpha$ цитокиндер бар толық қоректік ортада, MDSC индукциялау үшін инкубацияланды (сурет 28).



Сурет 28 – Интакті тышқандардың сүйек кемігінен MDSC генерациялау тәжірибесінің жобасы

Инкубациядан кейін жасушалар жуылып, цитофлуориметриялық талдау жасалды. Цитокиндермен ынталандырған сүйек кемігі жасушаларының дифференциациясы, MDSC маркерлері (CD11b, Ly6C және Ly6G) мен DC маркерлерінің (MHCII және CD11c) экспрессиясы бойынша бағаланды. Зерттеу нәтижелерінде, ынталандыру жасалмаған (unstimulated, u/s) жасушаларға қарағанда, цитокиндермен ынталандыру, културада біртекті үлкен және орташа гранулалы жасушалар түрлерінің пайда болуына әкелді (сурет 29).

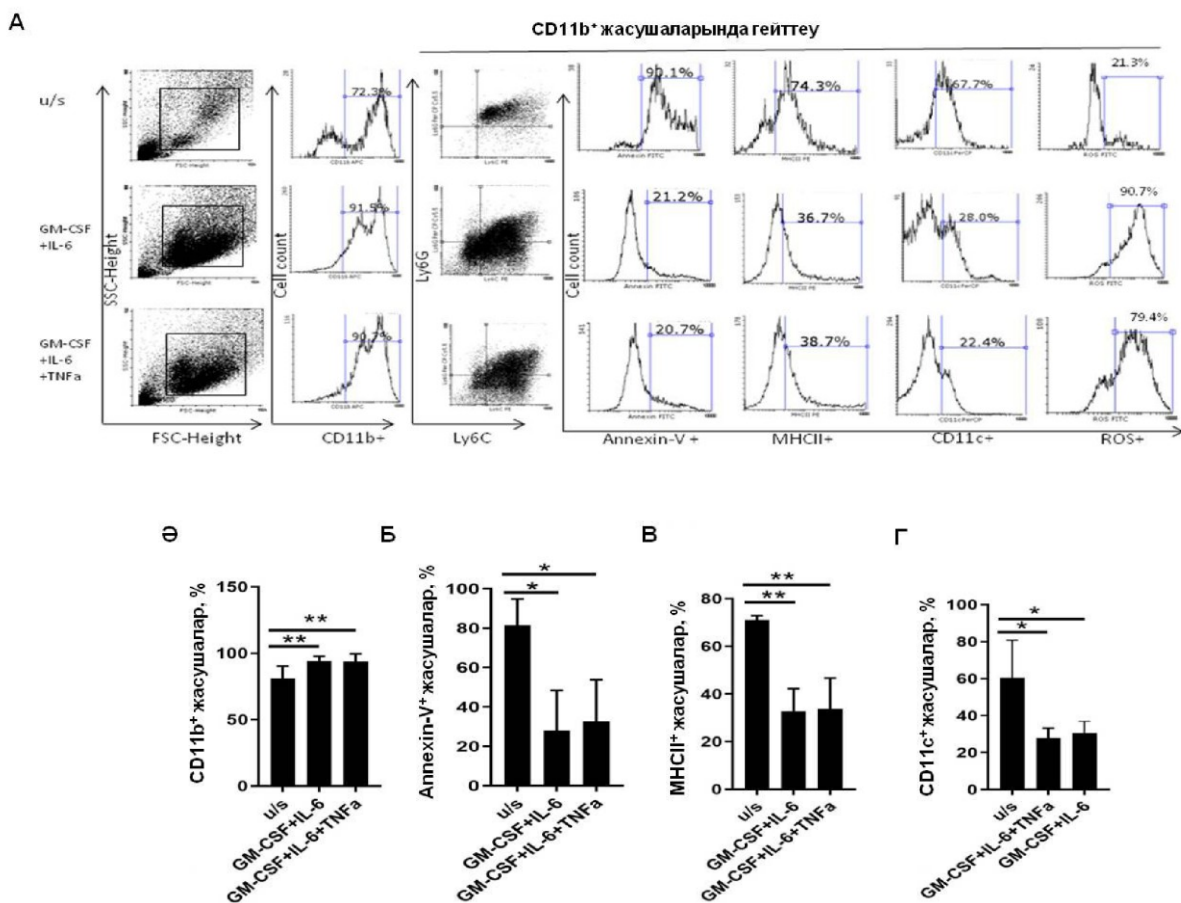


u/s – толық қоректік ортада өсірілген жасушалар; GM-CSF+ IL-6 немесе GM-CSF+IL-6+TNF α - толық қоректік ортада цитокиндердің қосындысымен өсірілген жасушалар (100x үлкейтілген).

Сурет 29 – *In vitro* жағдайында тышқанның сүйек кемігінен алынған жасушалар культураны

Цитокиндермен өсіру жағдайында MDSC-дің фенотиптік маркерлерін экспрессиялаған гранулацитті CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁻ және моноцитті CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁺ MDSC субпопуляцияларының екеуі де байқалды (сурет 30А). Сонымен бірге, бұл жасуша культураның CD11b маркерін экспрессиялайтын жасушалар үлесі едәуір артты (сурет 30Ә). u/s сүйек кемігі жасушаларымен салыстырғанда, цитокиндермен ынталандырған жасушаларда апоптоздың (апоптоз Annexin-V маркері бойынша анықталды) айтарлықтай төмендегені байқалды (сурет 30Б). DC маркерлерін цитофлуориметриялық талдау, 4 күндік өсіруден кейін CD11c маркерін, сондай-ақ, МНСІІ экспрессиялайтын CD11b⁺ жасушаларының үлесі 2 еседен көп азайғанын көрсетті (сурет 30В, Г).

CD11c, моноцитті және миелоидты жасушаларда экспрессияланатын адгезиялық молекулалар интегрин β тобының құрамына енеді және DC анықтау үшін кеңінен қолданылатын маркер болып табылады [230]. DC МНСІІ молекулаларын экспрессиялайды және антигенді жетілмеген Т жасушаларға көрсетуде маңызды рөлі бар және олардың активтенуі мен эффекторлық жасушаларға дифференциациялануын қамтамасыз етеді, сондай ақ, МНСІІ молекуласының экспрессиясы жасушалардың жетілуін көрсетеді [231].



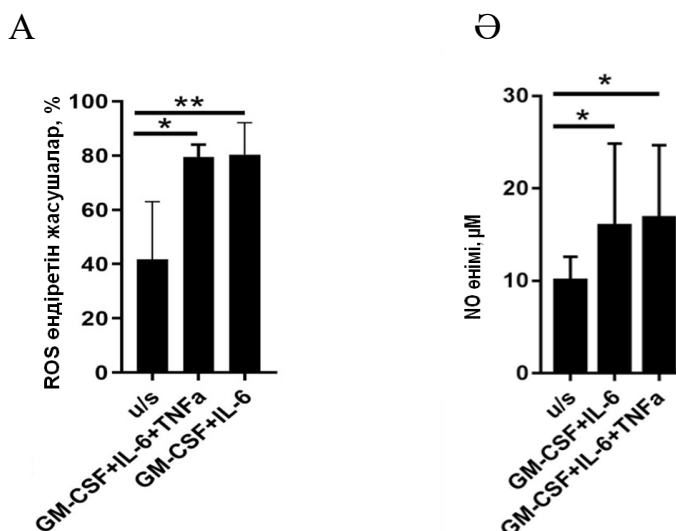
u/s –толық қоректік ортада өсірілген жасушалар; GM-CSF+IL-6 немесе GM-CSF+IL-6+TNF α - толық қоректік ортада цитокиндердің қосындысымен өсірілген жасушалар. А) Цитофлуориметриялық талдаудың репрезентативті гистограммалары; Ә, Б, В, Г) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер (n=6), айырмашылықтардың мәні * p <0,05, ** p <0,005 (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 30 – *In vitro* жағдайында тышқандардың сүйек кемігінен алынған MDSC-дің фенотиптік ерекшелігі

Басқа да зерттеу жұмыстарында, IL-4, GM-CSF және PGE2 қатысуымен тышқандардың сүйек кемігінің skit⁺ прогенитор жасушаларынан MDSC генерациялаған кезде жетілген DC санының төмендеуі мен MDSC санының жоғарылауы пропорционалды болатыны анықталған [68, p. 4507]. Бізде алынған нәтижеде, культурада CD11c⁺ DC үлесінің азаюы мен олардағы MHCII экспрессиясының төмендеуі, MDSC маркерлерін экспрессиялаған жасушалар үлесінің артуымен қатар жүрді. Бұл жетілмеген миелоидты жасушалардың популяциясын GM-CSF+IL-6 немесе GM-CSF+IL-6+TNF α цитокиндермен ынталандыру, MDSC-дің дифференциациясын индукциялайтынын түсіндіреді.

MDSC-дің NO өнімі, T жасушалардың активтілігі мен пролиферациясын Jak 3 және STAT5 сигналдық жолдарды бөгеу арқылы тежейді, нәтижесінде жасушалардың MHC II гендер экспрессиясы тежеліп апоптоз туындайды [108,

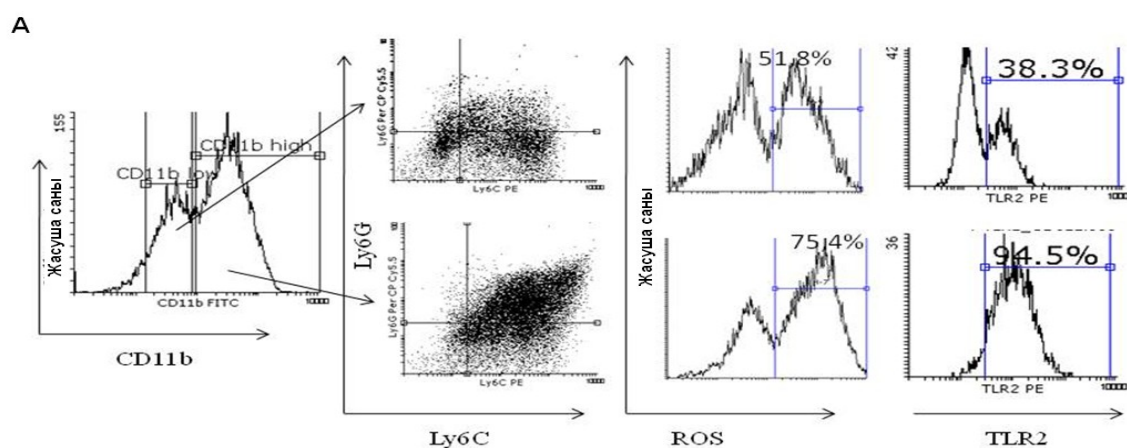
р. 689]. Цитокиндердің екі комбинациясымен ынталандыру MDSC супрессорлық активтілігінің негізгі факторлары ROS (сурет 31А) және NO өндірілуін күшейтті (сурет 31Ә).



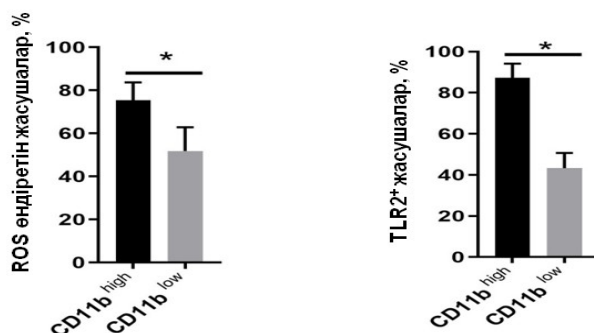
u/s –толық қоректік ортада өсірілген жасушалар; GM-CSF+IL-6 немесе GM-CSF+IL-6+TNFα - толық қоректік ортада цитокиндердің қосындысымен өсірілген жасушалар. Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер (n=6), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні $*p < 0,05$ (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 31 – *In vitro* жағдайында тышқандардың сүйек кемігінен алынған MDSC-дің ROS және NO өнімі

CD11b сүйек кемігі жасушаларының 44%-ында экспрессияланатын MDSC фенотиптік маркерлерінің бірі. GM-CSF+IL6+TNFα цитокиндермен ынталандыру жасушалардың CD11b^{high} және CD11b^{low} екі субпопуляциясының пайда болуына әкелді. Осы субпопуляцияларды цитофлуориметриялық талдау кезінде, M-MDSC және G-MDSC сияқты, CD11b^{low} субпопуляциясы негізінен Ly6G⁻Ly6C⁺ фенотипі бар жасушалармен, ал CD11b^{high} субпопуляциясы Ly6G⁺Ly6C⁺ фенотипі бар жасушалармен көрінді (сурет 32А). Сонымен қатар, CD11b^{high} жасушаларының көп бөлігі CD11b^{low} жасушаларына қарағанда ROS және TLR-2 жоғары экспрессиялады (сурет 32Ә).



Ә



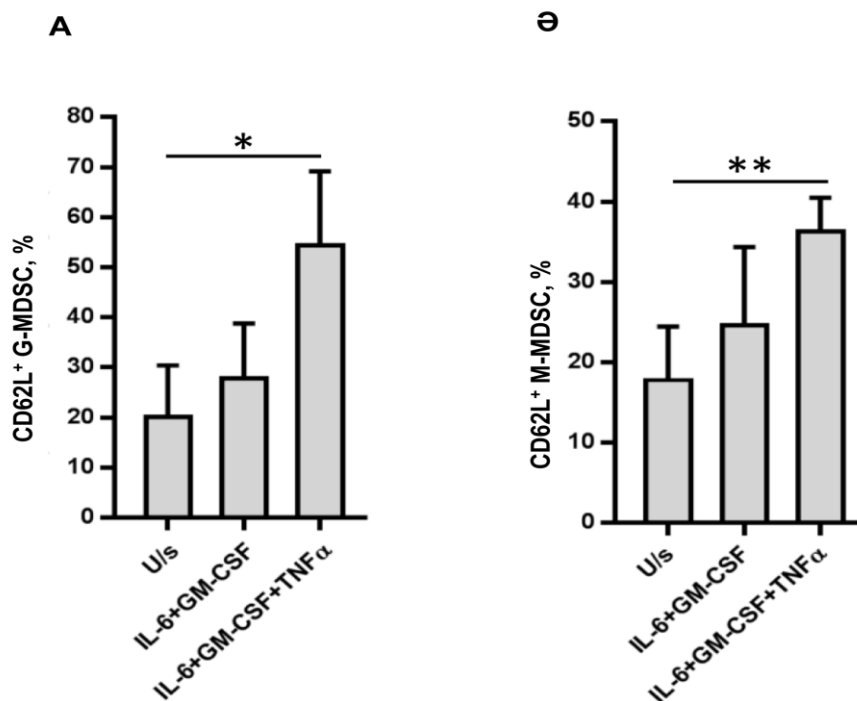
А) Цитофлуориметриялық талдаудың репрезентативті гистограммасы; Ә) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер (n=6), айырмашылықтардың мәні *p<0,05 (Стъюдент тест бойынша).

Сурет 32 – GM-CSF+IL6+TNF α цитокиндерінің комбинациясы болған кезде генерацияланған CD11b^{high} және CD11b^{low} MDSC субпопуляцияларының фенотиптік профілі

TLR-2 - әртүрлі пептидогликандар және грам-оң микроорганизмдердің липотейхой қышқылы сияқты иммундық жауапты ынталандыратын антигендік қасиетке ие лигандтармен, сонымен бірге, бірқатар ісік факторлары арқылы активтенеді. Ол жасушалардың патогенмен байланысқан молекулалық құрылымдар (PAMP) арқылы активтенуіне жауапты рецепторлардың бірі [232]. Бұрынғы зерттеулерде, TLR-2 M-MDSC және G-MDSC екі субпопуляциясында экспрессияланатыны және TLR-2 лигандтарының MDSC-дің супрессорлық функциясын активтендіру қабілеті бар екені көрсетілген [233]. Сүйек кемігі жасушаларын GM-CSF+IL6+TNF α цитокиндерімен ынталандыру, CD11b^{high}Ly6G⁺Ly6C⁺ фенотипі MDSC субпопуляцияларының TLR-2 экспрессиясының жоғарылауына әкелді. Бұл осы популяцияның PAMP-ға тәуелді активтене алатыны түсіндіреді [234].

MDSC маркерлерінің бірі CD62L екені анықталған және ол MDSC популяциясының иммуносупрессорлық ортаға қатысуы үшін олардың

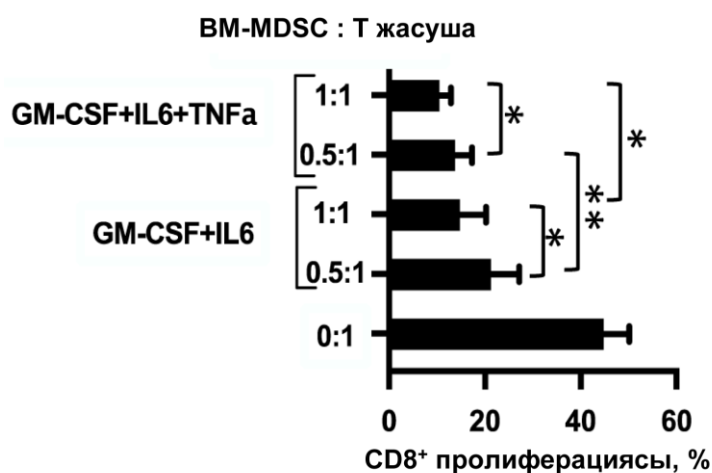
миграциясын қамтамсыз етеді [227, р. 12]. Сонымен бірге, *in vitro* жағдайында G-CSF пен GM-CSF цитокиндерімен генерацияланған MDSC миграцияға жауапты CD62L молекуласын экспрессиялайтыны анықталған [212, р. 5738]. Бізде алынған нәтижеде, GM-CSF+IL-6+TNF α цитокиндерінің комбинациясы сүйек кемігінен алынған CD62L экспрессиялайтын CD11b⁺Ly6G^{high}Ly6C^{low} G-MDSC және CD11b⁺Ly6G^{low}Ly6C^{high} M-MDSC жасушаларының үлесін көбейтті (сурет 33).



Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер (n=6), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 33 –Тышқанның сүйек кемігінің жасушаларын *in vitro* жағдайда өсіргеннен кейін алынған MDSC субпопуляцияларының CD62L экспрессиясы

In vitro жағдайында GM-CSF+IL-6 және GM-CSF+IL-6+TNF α цитокиндері бар қоректік ортада 4 күн өсірілгеннен кейін сүйек кемігінен алынған MDSC-дің (BM-MDSC) супрессорлық қасиеті зерттеу үшін оларды жеке-жеке сонА лектинімен активтендірілген және CFSE бояуымен белгіленген CD8⁺ Т жасушарымен бірге 72 сағат өсірілді. Т жасушардың пролиферациясы цитометрия көмегімен бағаланды. GM-CSF+IL-6 цитокиндері бар қоректік ортаға TNF α цитокинін қосу MDSC-дің супрессорлық потенциалын арттыратыны анықталды (сурет 34).



Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер ($n=6$), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні $*p<0,05$, $**p<0,005$ (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 34 – GM-CSF+IL-6+ және GM-CSF+IL-6+TNF α цитокиндерімен ынталандырылған BM-MDSC-дің супрессорлық активтілігі

Басқа да зерттеулерде, Tnf^{-/-} тышқандарынан алынған MDSC супрессорлық потенциалы Tnf^{+/+} тышқандарынан алынған MDSC-мен салыстырғанда едәуір төмендегенін көрсеткен [161, p. 546-547]. Бізде алынған нәтижеде, TNF α цитокиннің IL-6+GM-CSF комбинациясына қосылуы, жоғары супрессорлық активтілікке ие және CD62L экспрессиялайтын MDSC пайда болуын тудырды. Бұл қабыну цитокині TNF α , MDSC дифференциациясы мен функциясын үшін өте маңызды рөлі барын көрсетеді. Қабыну кезінде GM-CSF, IL6 және TNF α цитокиндерінің болуы MDSC индукциясын тудырады және оның супрессорлық фонды сақтауына делдал бола алады.

GM-CSF+IL-6+TNF α цитокиндері қосылған қоректік ортада өсірілген MDSC-дің жоғары деңгейде ROS пен NO супрессорлық медиаторларды өндіргенін ескере отырып, TNF α цитокиніне байланысты MDSC супрессорлық функциясы, осы екі медиатормен байланысты жүреді деп болжауға болады. Зерттеуде алынған мәліметтер, TNF α жіті фазалық реакцияны тудыратын жасушалық сигналдық ақуыз (цитокин) ретінде MDSC-ге кең спектрлі әсер көрсететінін растайды. Созылмалы қабыну кезінде бөлінген TNF α , MDSC-дің супрессорлық потенциалын және CD62L экспрессиясын жоғарылату арқылы олардың миграциялану қабілетін күшейтіп, сол арқылы ісіктердің өсуіне әсер етуі мүмкін екендігін көрсетті [235].

Жинақтай келгенде, ТАФ индукциялаған жергілікті созылмалы қабыну тышқандарда Эрлих ісігінің дамуын ынталандыратыны анықталды. Қабыну тудырылмаған тышқандармен салыстырғанда, созылмалы қабыну тудырылған тышқандардағы ісіктің тез өсуі, CD62L экспрессиялайтын G-MDSC және M-MDSC субпопуляцияларының жүйелі жинақталуымен және сарысудағы S100

және TNF α цитокиндер деңгейінің жоғарылауымен бірге жүретіні анықталды. Ал созылмалы қабыну индукциялаған MDSC-ді гемцитабинмен деплециялау ісіктің өсуінің тежелуіне әкелді. *in vitro* жағдайында цитокиндердің (GM-CSF+IL-6 және GM-CSF+IL-6+TNF α) комбинацияларымен тышқанның сүйек кемігінің жасушаларын 4 күндік инкубациялау арқылы MDSC алынды және сипатталды. Сүйек кемігінен алынған MDSC-ға экзогенді TNF α цитокинімен әсер ету, MDSC популяциясының CD62L экспрессиясын және олардың эффекторлы жасушаларға қарсы супрессорлық активтілігін жоғарылататыны анықталды. Бұл деректер созылмалы қабыну ісіктің өсуін TNF α цитокинімен делдалданатын MDSC мобилизациясын жоғарылату арқылы күшейтуі мүмкін екендігін көрсетеді. Алынған нәтижелер созылмалы қабынуды бақылаудың тіпті, қабыну ошағынан алыс ұлпаларда да қатерлі ісік ауруының алдын-алу үшін маңыздылығын айқындайды.

3.4 MDSC популяциясын нысаналы элиминациялаудың фармакологиялық жолын өңдеу

Созылмалы қабыну және онымен байланысты ісіктің дамуында MDSC-дің шеткі аймақтарға миграциялануы күшейетіні анықталды. MDSC-дің патологиялық активтенуі және жинақталуы жануарлардың жүре пайда болған иммунитет жасушалары – Т және NK жасушаларың ісікке қарсы жауапта қауқарсыздық танытуына әкелумен қатар, ісіктің өсуіне және олардың метастазға дейінгі дамуына үлесін қосатындығы және қатерлі ісікке қарсы иммунотерапияның тиімділігін төмендететіні анық дәлелденген [209, p. 79-80]. Патологиялық өзгерістер кезінде шеткі аймақта жинақталатын MDSC санын және/немесе функциясын әсерлі түрде жоятын немесе тежейтін жаңа тәсілдерді өңдеу қатерлі ісік иммунологиясының өзекті мәселесі болып табылады.

Қолданыстағы ісікке қарсы препараттармен MDSC-ді элиминациялау жұмыстары ойдағыдай нәтиже бермеуде, бұл препараттардың MDSC-ге селективті болмауы салдарынан адам денесіне анықталмаған кері әсерлер дамиды [236]. Ал антиденелермен емдеу алдын-ала күтпеген салдарларға әкелуі мүмкін, үйткені олар иммундық жүйенің басқа жасушаларында экспрессияланады. Бұл MDSC супрессорлық активтілігін тежеуге бағытталған жолдарды өңдеуде кедергілер келтіреді. Сонымен қатар, тәжірибелік жануарларда өңделген көптеген қатерлі ісік иммунотерапиялары клиникалық зерттеулерде сыналды. Кейбіреулері клиникалық әсерлер көрсеткенімен, көпшілігінің тиімділігі болмайды. Бұл адам мен тәжірибелік жануарлардағы MDSC фенотипіндегі айрмашылықтан болуы да мүмкін, Сондықтан, MDSC нысаналы танитын агент ретінде, адамның кіндік қанынан алынған альфа-фетопротеинді «*alfa-fetoprotein, (AFP)*» қолдану мүмкіндігі зерттелінеді.

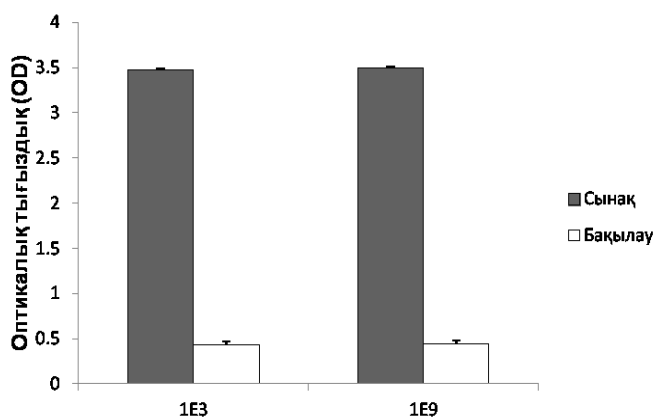
AFP – 68-72 кДа молекулалық салмақтағы онкофеталды ақуыз болып, оның иммуносупрессорлық активтілігінің зерттелгеніне 35 жылдан артық уақыт болды. Ол бауыр қатерлі ісігі, жыныс безінің қатерлі ісігі және эмбриондық ісік кезінде жоғары концентрацияда қанда байқалады [237, 238]. Сонымен бірге, иммуносупрессорлы AFP жүктілік кезінде аналық иммундық

төзімділікке қатысады [239]. AFP рецепторлары ісік пен эмбрионды жасушаларда экспрессияланатыны көрсетілген. Ісік пен эмбрионды жасушалар үшін AFP аутокринді өсу факторы функциясын атқарады [240].

AFP негізіндегі цитотоксикалық конъюгаттар арқылы AFP рецепторларын экспрессиялайтын тәжірибелік ісіктердің өсуін тежеу мақсатында зерттеулер жүргізілген [241, 242]. Бірақ ісік кезіндегі жинақталатын MDSC-ді AFP арқылы анықтау және элиминациялау жолы әлі күнге дейін зерттелмеген. Ісік кезінде MDSC мен AFP негізгі негативті қатысушы екенін ескерсек, олардың бір-бірімен байланысы болуы мүмкін. Сонымен қатар, AFP ақуызының NS жасушаларының активтілігін ынталандыра алатындығын, Беляев және біріккен авторлар анықтаған [178, р. 195]. NS жасушалары шын мәнінде, MDSC-дің алғашқы аталуы және бірдей функциялық ерекшелікке ие екені зерттеулерде көрсетілді [23, р.1237; 243]. Сондықтан, MDSC мен AFP арасындағы байланыс диссертацияның бір тапсырмасы ретінде алынды.

3.4.1 AFP активтілігін бағалау

Зерттеу жұмыстарына қолданылған адамның AFP препараты біздің зертханада бұрын алынған [244] және лиофилизацияланып -20°C температурада сақталған. Осы лиофилизирленген адамның AFP препаратының активтілігін анықтау үшін хрен пероксидазасымен (HRP) конъюгацияланған AFP ақуызына қарсы $1\text{E}9$ және $1\text{E}3$ моноклонды антиденелер көмегімен, тікелей иммунды-ферментті талдау арқылы AFP эпитоптарының тұтастығы тексерілді (сурет 35).



Сурет 35 – $1\text{E}3$ және $1\text{E}9$ моноклонды антиденелер арқылы AFP эпитопын анықтау

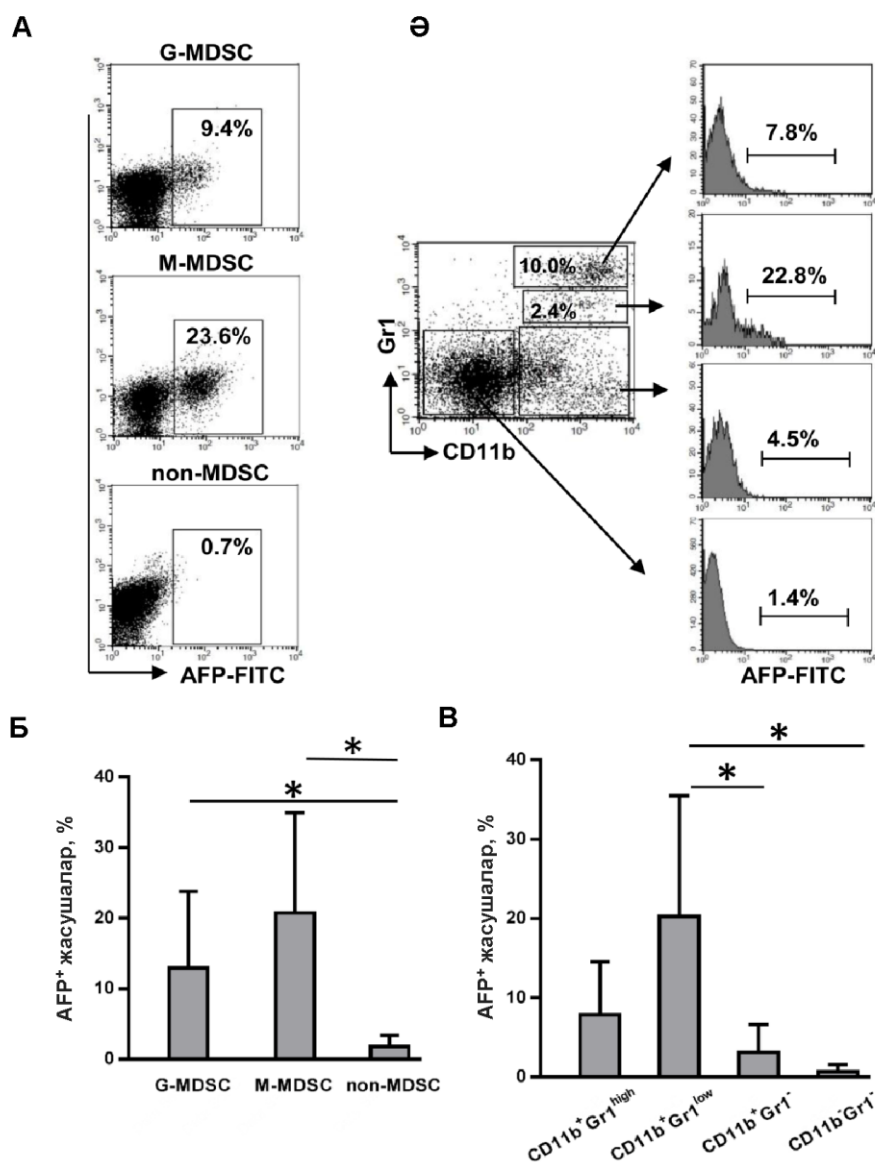
Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде, кіндік қаннан алынған лиофилизирленген адамның AFP препаратында, ұзақ уақыт сақтағаннан кейін де бастапқы ақуыздың физико-химиялық (молекулалық салмағы) және иммунохимиялық (эпитоптарының толықтығы) ерекшеліктері сақталғаны анықталды. Сондай-ақ, адам мен тышқандағы AFP ақуызының құрылымдық және функциялық қасиеттерінің бірдей болатыны анықталған [245, 246], бұл

адамның AFP препаратын тышқандармен жүргізілетін *in vitro* және *in vivo* зерттеулерге қолдануға мүмкіндік береді.

3.4.2 AFP-FITC конъюгатының MDSC популяцияларымен байланысуын бағалау

AFP нысана жасушаларға байланысуы және енуі тиісті жасушалық рецепторларға байланысу арқылы жүреді. Бірқатар, ісік жасушаларының мембранасында AFP рецепторы экспрессияланатыны анықталған [247]. MDSC мембранасында AFP рецепторының бар жоғын анықтау үшін флуоресценттік таңбамен белгіленген AFP-FITC конъюгаты жасалды және оның спецификалық емес байланысын болдырмайтын оңтайлы дозасы ағынды цитометрия көмегімен анықталды. Бұл үшін моноклеарлы фракция сау донордың шеткі қанынан, 1,076 г/мл тығыздықтағы перкол градиентінде центрифугалау арқылы бөлінді. Осы фракцияның жасушалары түрлі AFP-FITC концентрациясында (3.1-150.0 мкг/мл) 4 °С температурада 30 мин. инкубацияланды. AFP-FITC конъюгатының жасушалармен байланысу деңгейі AFP рецепторы жоқ CD4⁺ (Т-хелпер) жасушаларында және AFP рецепторы бар CD14⁺ (моноциттер) жасушаларда бағаланды [248]. Алынған нәтижелерде, 100 мкг/мл концентрациядағы AFP-FITC, CD14⁺ жасушаларына (17,1±4,3%) қарағанда CD4⁺ жасушалармен шамалы фонмен (6,3±3,4%) байланысатыны анықталды. 100 мкг/мл AFP сүйек кемігіндегі NS жасушалардың супрессорлық функциясын индукциялайтынын анықталған болатын [178, р. 194]. Сондықтан, осы концентрацияны MDSC мембранасындағы AFP рецепторының бар жоғын анықтау үшін қолданылды.

AFP-FITC конъюгатының MDSC-мен байланысу қабілетін зерттеу үшін 3 апталық Эрлих ісігі бар СВА линиялы тышқандар қолданылды. Эрлих ісігінің СВА тышқандардағы үлгісін пайдаланған зерттеулерде, MDSC құрамының көбеюі ісік салмағының артуына оң әсерін тигізетіні көрсетілген [249]. Сондықтан, Эрлих ісігі бар тышқандар көкбауырынан магниттік сепарациялау арқылы бөлінген MDSC субпопуляциялары және популяцияға бөлінбеген моноклеар жасушалары 100 мкг/мл AFP-FITC конъюгатымен жеке-жеке 4 °С температурада инкубацияланды. Олардың AFP-FITC конъюгатымен байланысу көрсеткіші ағынды цитометрия көмегімен бағаланды. Талдау көрсеткендей, G-MDSC және M-MDSC екі субпопуляция да non-MDSC-ге қарағанда едәуір жоғары деңгейде AFP-FITC конъюгатын байланыстыра алды (сурет 36А, Б). Ал жасушалар популяцияларына бөлінбеген көкбауыр моноклеарын цитометриялық талдауда, CD11b⁺Gr-1^{low} (M-MDSC) және CD11b⁺Gr-1^{high} (G-MDSC) фенотипті жасушалардың AFP-FITC конъюгатын байланыстыруы CD11b⁺Gr-1⁻ (моноциттер) мен CD11b⁻Gr-1⁻ (non-MDSC) қарағанда айтарлықтай жоғары болды (сурет 36Ә, В). Сонымен қатар, моноклеар жасушалар жалпы пулының 10,1±3,2% құрайтын G-MDSC субпопуляциясымен салыстырғанда, моноклеар жасушалардың жалпы пулының 2,6±0,6% құрайтын M-MDSC субпопуляциясында AFP-байланыстырушы жасушалардың жиілігі 2 есе жоғары екенін көрсетті [250].



А, Ә) Цитофлуориметриялық талдаудың репрезентативті мәліметтері; Б, В) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер ($n=7$), топтар арасындағы айырмашылықтардың мәні $*p<0,05$ (Стьюдент тест бойынша).

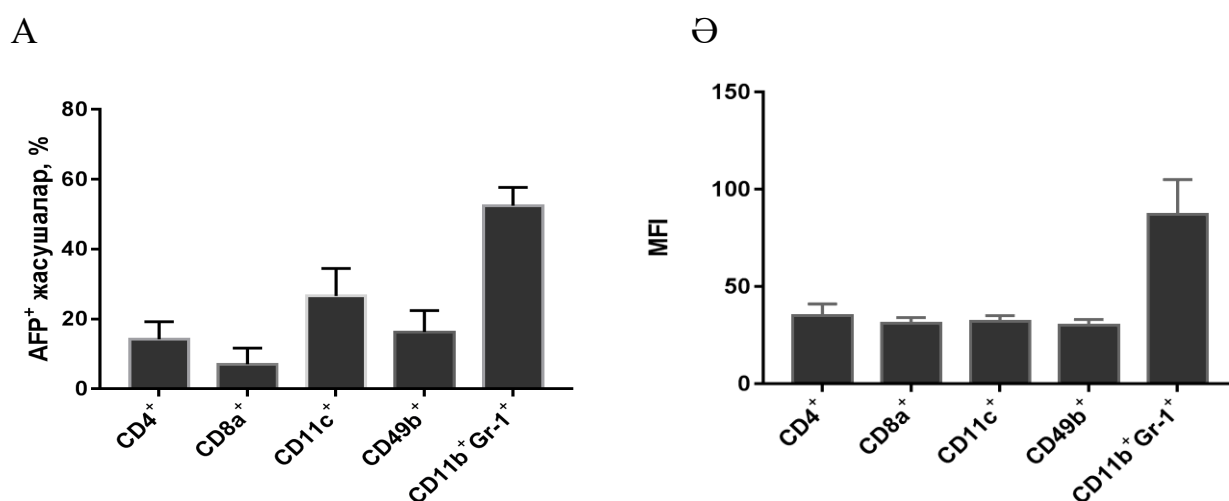
Сурет 36 – Эрлих тері асты ісігі бар тышқандардың көкбауырындағы MDSC субпопуляцияларының AFP-FITC конъюгатымен байланысу деңгейі

Зерттеулерде, AFP ақуызының жасушалар ішіне өтуі рецептормен делдалданатын эндоцитоз арқылы жүретіні анықталған [247, р. 244]. Сондай-ақ, 4°C температурада AFP-FITC конъюгатымен жасушаларды инкубациялау процесі фагоцитоздың пайда болу мүмкіндігін болдырмайды және спецификалық емес байланыстарды азайтады [251]. 36-суретте көрсетілгендей, G-MDSC және M-MDSC екі субпопуляцияда AFP-FITC конъюгатымен байланысу деңгейінде айырмашылық болды. Бұл мәліметтер MDSC

субпопуляциясының мембранасында AFP ақуызына арнайы рецепторлардың барын айқындайды. Бұл рецептор субпопуляция ерекшелігіне қарай әртүрлі деңгейде экспрессияланады. AFP-FITC конъюгатымен инкубациялау кезінде ісік тудырылған тышқандардан екі түрлі жолмен алынған MDSC субпопуляцияларының конъюгатпен байланысу қабілетінің бірдей екенін көрсетті және бұл жалғасты зерттеулерде екеуінің кез-келгенін қолдануға мүмкіндік береді.

3.4.3 AFP-FITC конъюгатының негізгі иммунокомпетент жасушаларымен байланысуын бағалау

MDSC мен AFP байланысын анықтауда, AFP-FITC төмен деңгейде MDSC-емес көкбауырдағы басқа иммундық жасушалармен байланысатыны анықталды. Осы нәтижені нақтылау үшін $CD11c^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ және $CD49b^+$ фенотипті жасушаларға тән арнайы CD маркерлеріне қарсы флуоресцентті антиденелерді қолдана отырып, олардың AFP-FITC конъюгатымен байланысуы $CD11b^+Gr-1^+$ MDSC-мен салыстыра отырып зерттеулер жүргізілді (n=7). Бұл үшін Эрлих ісігі тудырылған тышқандардың 1.076 г/мл тығыздықтағы көкбауыр моноклеарлы жасушалары AFP-FITC конъюгатымен инкубацияланғаннан кейін цитометрияда бағаланды. Бұл кезде де жасушалар популяция құрамындағы AFP-FITC байланыстырушы жасушалардың ең көп үлесін MDSC құрады. Қалған популяциялар спецификалық емес фонды сіңіруге сәйкес AFP байланыстырудың төмен деңгейін көрсетті (орташа флуоресценттік интенсивтілігі (MFI) 40 салыстырмалы бірліктен аз) (сурет 37). MFI әр жасушаның мембранасындағы молекулалардың экспрессия жасауының интенсивтілігін көрсетеді. Алынған мәліметтер AFP рецепторының экспрессиясы тек MDSC-де жоғары екенін түсіндіреді.



Сурет 37 – Эрлих тері асты ісігі бар тышқандардың көкбауырындағы иммунокомпетент жасушалар популяциясындағы AFP-FITC конъюгатын байланыстырушы жасушалар үлесі (А) және MFI (Б)

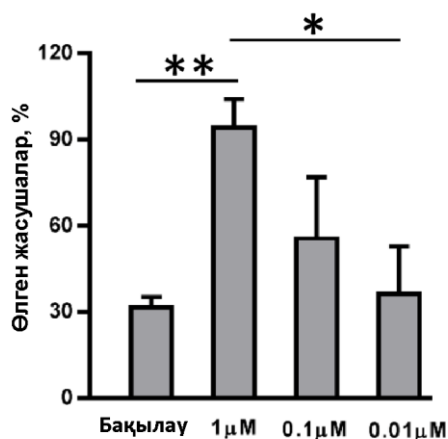
37Ә суретте көрсетілгендей, DC жасушалары MDSC-ден басқа жасушаларға қарағанда AFP-FITC конъюгатын жақсы байланыстырды. Бірақ, MFI көрсеткішінде айырмашылық болмауы, бұл DC жасушаларда AFP байланысушы сайттардың тым аз екенін көрсетеді. AFP иммуносупрессорлық әсерін зерттеу жұмыстарында оның NK жасушаларға тікелей иммуносупрессорлық әсері жоқ екені анықталған [252]. Тағы бір зерттеулерде адамның шеткі қан лимфоциттерінде арнайы AFP байланысатын сайттардың болмайтыны көрсетілген [248, p. 1530]. Бұл мәліметтер AFP ақуызының негізгі иммундық эффекторлы жасушалармен спецификалық байланысы болмайтынын көрсетеді. Бұл ісік кезінде көкбауырға жинақталған MDSC-дің басқа иммундық жасушалардан ерекшелігі арнайы рецепторларының болуына байланысты AFP ақуызын жақсы байланыстыра алады, бұл нәтижелер ісік немесе қабыну кезіндегі MDSC үлесін анықтау үшін AFP-FITC конъюгатын пайдалануға болатынын дәлелдейді [253].

3.4.4 *In vitro* жағдайында AFP-DR конъюгатының MDSC популяциясына әсерін бағалау

MDSC-дің AFP ақуызын жақсы байланыстыруы, бұл AFP негізіндегі MDSC-спецификалық цитотоксикалық конъюгатты қолданып, ісіктің микроортасында және шеткі аймақтарында иммуносупрессорлы ортаны қалыптастыратын MDSC-ді элиминациялауға мүмкіндік береді. AFP-мен конъюгация жасалатын цитотоксикалық агент ретінде даунорубицин (DR) алынды. DR антрациклиндер тобынан шыққан клиникалық тұрғыдан мақұлданған химиотерапиялық препарат болып табылады және көптеген қатерлі ісіктерге, оның ішінде өкпенің қатерлі ісігіне, лейкемияға кеңінен қолданылатын, жоғары тиімділікке ие, ісікке қарсы антибиотик. DR жасуша циклінің барлық кезеңдерінде, соның ішінде әсіресе интерфазада жоғары активтілікке ие. Ол ДНҚ молекуласымен интеграцияланып оның репликация және транскрипция кезінде матрицалық активтілігін зақымдайды [254]. Алайда, еркін формада инъекция жасалған DR өткір кардиотоксикалық және сүйек майының депрессиясы сияқты айқын жанама әсерлерді тудырады [255]. Векторлық молекулалар арқылы дәрілерді жеткізу олардың жанама әсерін төмендетеді және терапиялық тиімділігін арттырады. Сондықтан, AFP-DR конъюгаты жасалды.

Бұған дейінгі зерттеулерде, AFP ақуызының тышқандардың сүйек кемігінен алынған NS жасушалардың пролиферациясын ынталандырғаны және олардың супрессорлық активтілігін күшейтетіні анықталған [178, p. 196]. *In vitro* зерттеулерінде AFP сүйек кемігіндегі гемопозтикалық бағаналы жасушаларға (HSCs) өздігінен байланысуға қабілетті және оларға рецептор делдалдайтын транспорт арқылы енетіні көрсетілген [256]. AFP-DR цитотоксикалық конъюгатының онтайлы концентрациясын анықтау үшін, сау тышқандардың сүйек кемігінен алынған моноклеарлы жасушалар 10% FBS қосылған RPMI-1640 қоректік ортада әртүрлі уақыт аралығында (24 сағат және 48 сағат) конъюгаттың әртүрлі концентрацияларымен (1 μ M, 0,1 μ M және

0,01 μ M, DR концентрациясы бойынша) бірге өсірілді, жасушалардың өміршеңдігі трипан көгімен бағаланды. Зерттеу нәтижесінде, 1 μ M болатын AFP-DR концентрациясы 24 сағат инкубацияда, бақылаумен салыстырғанда (PBS) жоғары цитотоксикалық индексін (IC₅₀ ~ 60%) көрсетті (Сурет 38). Осы концентрация әрі қарай тәжірибелер жүргізу үшін таңдап алынды.

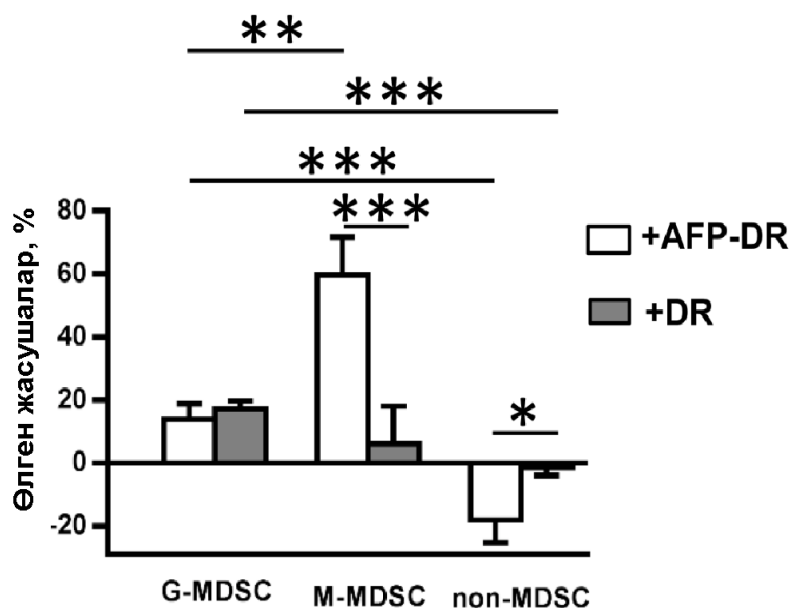


Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер (n=7). * p <0,05, ** p <0,01 (Стюдент тест бойынша).

Сурет 38 – *In vitro* жағдайында AFP-DR конъюгатының тиімді токсикалық концентрациясын анықтау

AFP-DR конъюгатының MDSC-ге цитотоксикалық әсерін анықтауда MDSC көп мөлшерде жинақталатын ісігі бар тышқандардың көкбауырынан G-MDSC, M-MDSC және non-MDSC популяциялары иммуномагниттік сепарация арқылы бөлініп және 1 μ M AFP-DR-мен 24 сағат бойы 10% FBS қосылған RPMI-1640 қоректік ортада өсірілді. Жасушалардың өміршеңдігі трипан көгімен бағаланды. Алынған мәліметтерде, M-MDSC популяциясы DR препаратына салыстырғанда AFP-DR конъюгатының цитотоксикалық әсеріне жоғары сезімталдық көрсетті. G-MDSC популяциясына DR және AFP-DR ұқсас әсер етті, ал non-MDSC-ға ешқайсысы әсер етпеді (сурет 39). AFP-DR конъюгатының G-MDSC-ға қарағанда M-MDSC-ға селективті цитотоксикалық әсері, AFP-FITC арқылы анықталған нәтижелерге тура пропорционалды болып, AFP-DR конъюгатының MDSC-ді, оның ішінде M-MDSC-ді әсерлі элиминациялайтынын көрсетті. Наив DR G-MDSC-ге ұқсас цитотоксикалық әсер тудырды, ал M-MDSC-ге әсер көрсетпеді. Басқада зерттеушілермен алынған нәтижелерде, онкологиялық ауруларды емдеуге қолданған препараттардың тек G-MDSC-ға цитотоксикалық әсер етіп, ал M-MDSC-ге цитотоксикалық әсері төмен болатыны анықталған [257]. Осы субпопуляциялардың ішінде M-MDSC-дің ісік кезінде G-MDSC-ге қарағанда, жоғары супрессорлық активтілікке ие және T лимфоциттер пролиферациясын жоғары деңгейде супрессиялайтыны анықталған [258]. Бізде алынған нәтижелерде, AFP-DR цитотоксикалық конъюгатының M-MDSC-ға тиімді әсер

көрсетті, бұл оның басқа цитотоксикалық препараттарға қарағанда анағұрлым әсерлі екенін дәлелдейді.



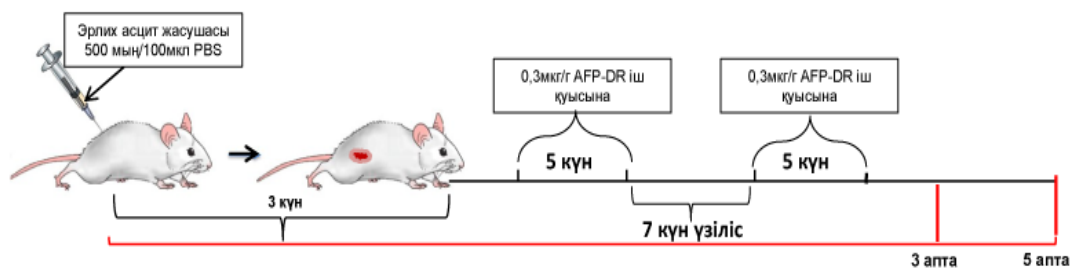
Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер ($n=7$), топтар арасындағы айырмашылықтың мәні $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,005$ (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 39 – DR және AFP-DR конъюгатының G-MDSC, M-MDSC және non-MDSC-ға цитотоксикалық әсері

3.4.5 *In vivo* жағдайында AFP-DR конъюгатының MDSC популяциясына әсерін бағалау

AFP-DR препаратының тиімділігі *in vivo* жағдайында Эрлих ісігінің тышқан үлгісінде тексерілді. Эрлих ісігі тышқандарды тез өлімге ұшырататын метастаздық сипатқа ие [177, p. 5599]. *In vivo* жағдайында AFP-DR конъюгатының Эрлих тері асты ісігінің дамуына әсерін анықтау үшін емдеудің 3 схемасы қолданылды. Бірінші схемада конъюгатты Эрлих ісігі тудырылғаннан 10 күн өткен соң тышқандар салмағына қарай 0,3 мкг/г (0,1 мл PBS те даунорубицин концентрациясы бойынша) дозадан бастап екі есе жоғарылатумен 2 тәуліктік аралықпен 3 рет іш қуысына этикалық ережелерге сәйкес инъекция жасалынды. Жануарлар AFP-DR конъюгаты инъекциясынан кейін 3 апта бойы бақыланды. Нәтижесінде, AFP-DR конъюгатының тышқандардың көкбауырындағы жасушалық құрам мен ісіктің өсуіне өң әсер көрсетпеді (нәтижелер көрсетілмеді). Бұл AFP-DR конъюгатының аз дозасынан немесе ісік тудырылғаннан кейінгі кеш емдеуден болуы мүмкін.

Келесі кезеңде AFP-DR конъюгатымен емдеудің екінші схемасы қолданылды (сурет 40).



Сурет 40 – AFP-DR конъюгатымен емдеудің 2-схемасы

Бұл емдеу кезінде тышқандардың үш тобына ісік тудырғаннан кейінгі үшінші тәуліктен бастап 5 күн тәуліктік сайын 0,3 мкг/г дозасында AFP-DR немесе DR (DR концентрациясы бойынша) және PBS (бақылау топтары үшін) дене салмағына қарай іш қуысына инъекцияланды. Емдеу 7 күндік үзілістен кейін 5 күндік емдеу тағы бір рет қайталанды. Ісік жасушасы инъекциясынан кейінгі 3 аптадан кейін барлық топтар арасында ісік салмағында айырмашылық байқалмады (кесте 1). Алайда, ісік инъекциясынан кейінгі бесінші аптаның соңында, AFP-DR және DR емі жүргізілген екі топта бақылаудағы жануарларға қарағанда ісік салмағының едәуір төмендегенін көрсетті. Алайда, DR инъекция жасалған топта он бес тышқанның үшеуі ісік тудырылғаннан кейінгі үш апта ішінде өлімге ұшырады, ал соңғы екі аптада он бесің тоғызы өлімге ұшырады, бұл DR жоғары токсикалығын көрсетеді. Бақылау тобындағы тірі қалу деңгейі AFP-DR инъекция жасалған топпен салыстырғанда айтарлықтай төмен болды (кесте 1).

Кесте 1 – AFP-DR және DR цитотоксикалық агенттерінің Эрлих ісігі бар тышқандардың тірі қалуы мен ісіктерінің өсуіне әсері

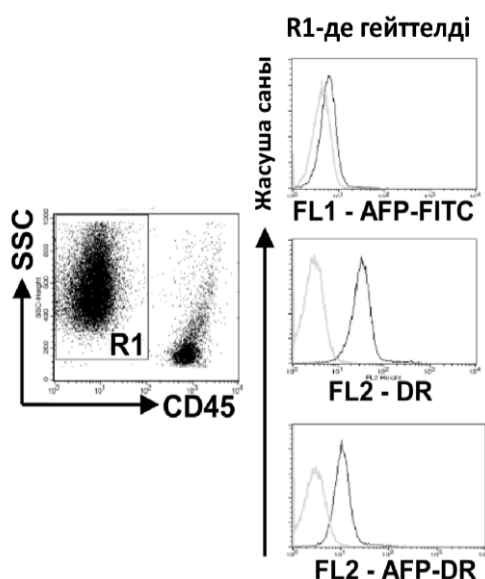
Мерзімі	Параметрі	Ісігі бар тышқан	+AFP-DR	+DR
3 апта	Ісік салмағы (г)	1.1±0.4	1.5±0.6	1.8±1.6
	Тышқандардың тірі қалуы	100% (15/15)	100% (15/15)	80% (12/15)
5 апта	Ісік салмағы (г)	7.2±1.2	1.8±1.1 *	1.6±0.3 *
	Тышқандардың тірі қалуы(%)	40% (6/15)	100% (15/15)	40% (6/15)

Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер (n=15). Топтар арасындағы айырмашылықтың мәні * $p < 0,01$ (Стьюдент тест бойынша).

DR әр түрлі ісік жасушаларына қарсы жоғары цитотоксикалық тиімділікке ие болғандықтан ісікке қарсы терапияда қолданады [254, р. 366]. Алайда, клиникалық зерттеулерде DR дозасының көбеюі өткір кардиотоксикалық және сүйек майының депрессиясын тудыратын жанама әсерлері анықталған [255, р. 814-815]. Бұл мәліметтер, DR препаратын инъекция жасаған топтағы ісік

салмағының төмендеуін, сонымен қатар, жануарлардың өлімінің себебін түсіндіре алады. Ал, AFP-DR конъюгатымен емделген топта ісіктердің өсуінің тежелуімен бірге барлық жануарлар тірі қалды. Бұл фактілер *in vivo* жағдайындағы AFP-DR конъюгатының токсикалық әсері жоқ екенін білдіреді. Осылайша, AFP-DR конъюгатымен емделген ісігі бар тышқандардың тірі қалу көрсеткіші (100%), DR (40%) және бақылаумен (40%) салыстырғанда жоғары екені анықталды.

Бірқатар ісік жасушаларында (сүт безі ісігі, гепатома, нейробластома, лимфома т.б.) AFP рецепторлары экспрессияланады [247, р. 244]. 1-кестеде көрсетілгендей, тышқандағы тері асты Эрлих ісігінің өсуінің AFP-DR тобында баяулауы, бұл AFP-DR конъюгатының тікелей ісік жасушасына әсері болуы мүмкін. Эрлих жасушаларында AFP рецепторларының экспрессиясын зерттеу үшін Эрлих асцитінің ісік жасушалары AFP-FITC, AFP-DR және DR мен 30 мин. инкубацияланды және ағынды цитофлуориметриялық талдау жасалды. Алынған деректерде, ісік жасушалары AFP-FITC байланыстырмады. Ал DR препараты қызыл түсті болғандықтан оның флуоресценттік сәуле шығару қабілеті (585 филтр) DR позитив ісік жасушалар үлесін бағалауға мүмкіндік берді. Алынған нәтижелерді талдау барысында Эрлих ісігінің асцит жасушалары DR препаратымен жақсы, ал AFP-DR конъюгатымен әлсіз байланысты (Сурет 41).



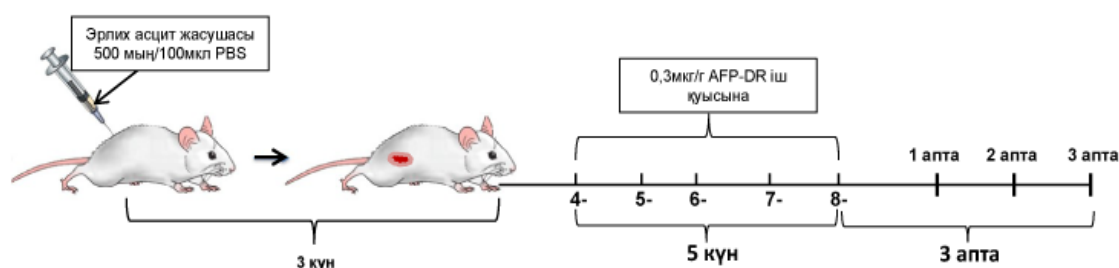
Сұр түсті гистограммалар жасушалардың автофлуоресценциясын, ал қара гистограммалар зерттеу үлгілерін көрсетеді.

Сурет 41 – Эрлих асцит жасушаларының AFP-FITC, AFP-DR және DR байланысуын бағалау

Алынған нәтижелер, Эрлих ісік жасушаларының сыртында AFP рецепторының экспрессиясы болмайтынын көрсетті. Сондықтан, AFP-DR конъюгатының Эрлих ісігіне тікелей әсері аз болған болуы мүмкін. Сонымен

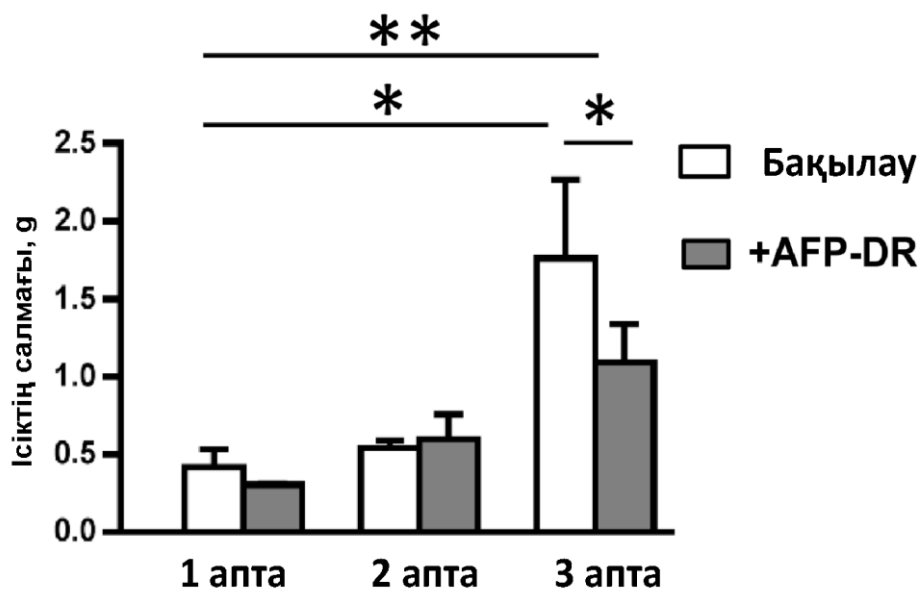
қатар, AFP-DR тышқандардың іш қуысына инъекцияланды. Бұл AFP-DR тікелей Эрлих ісігіне әсер көрсетпегенін түсіндіруі мүмкін. Ісіктің дамуының баяулауы иммундық жасушалық өзгерістер (ісікке қарсы цитотоксикалық жасушалардың активтенуі) арқылы болған деген жорамал жасалды.

Осы идеяны тексеру үшін AFP-DR конъюгатымен емдеудің үшінші схемасы қолданылды (сурет 42). AFP-DR конъюгатының тышқанның көкбауыр жасушалық құрамына әсерін бағалау үшін емдеу процесі тышқандарға Эрлих ісік жасушаларын тері астына инъекциясынан 3 күн өткен соң басталды, конъюгатты (0,3 мкг/г) 5 күн ұқсас дозада AFP-DR (сынақ үшін) немесе PBS (бақылау үшін) іш қуысына инъекцияланды. Тышқандарға соңғы AFP-DR инъекциясынан кейінгі 1-, 2- және 3-апталарда көкбауырындағы жасуша құрамы мен ісіктің өзгерісі зерттелді.



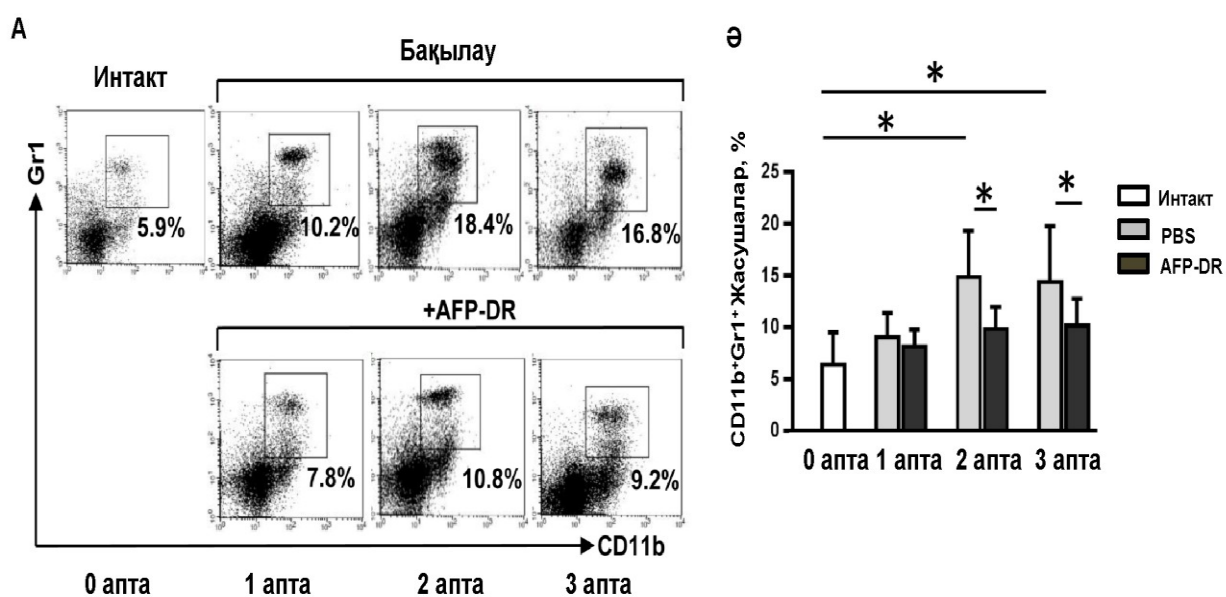
Сурет 42 – AFP-DR конъюгаттымен емдеудің 3-схемасы

Зерттеу нәтижелері көрсеткендей, үшінші аптаның соңында барлық жануарлар тірі болды. Сондай-ақ, AFP-DR конъюгатымен емделген топта бақылау тобымен салыстырғанда ісіктердің салмағы айтарлықтай төмендеді (Сурет 43). Бұл нәтижелер AFP-DR ісіктің өсуін баяулата алатынын көрсетеді. Бірақ бұл әсер AFP-DR соңғы іш қуысына инъекциялағаннан кейінгі үшінші аптада көрінді. Осы топтағы жануарлардағы иммундық жасушаларды зерттеу көрсеткендей, бақылаудағы жануарлардың көкбауырындағы MDSC мөлшері 2-ші аптада ең жоғары деңгейге жетті, ал AFP-DR конъюгатымен емделген топтағы MDSC бақылаудың барлық кезеңдері ішінде интакт жануарлармен салыстырғанда өзгермегені анықталды (сурет 44). 36-суретте көрсетілгендей, *in vitro* жағдайындағы зерттеуде MDSC субпопуляциясында оның ішінде, M-MDSC-де AFP рецепторының бар екенін және осы жасушаларға AFP-DR конъюгатының цитотоксикалық әсер ететіні көрсетілген (сурет 39) мәліметтерге негізделіп, AFP-DR конъюгатын іш қуысына инъекциялау көкбауырындағы MDSC үлесін M-MDSC есебінен азайтты деп тұжырымдалды.



Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер ($n=10$), топтар арасындағы айырмашылықтың мәні $*p<0,05$, $**p<0,003$ (Стъюдент тест бойынша).

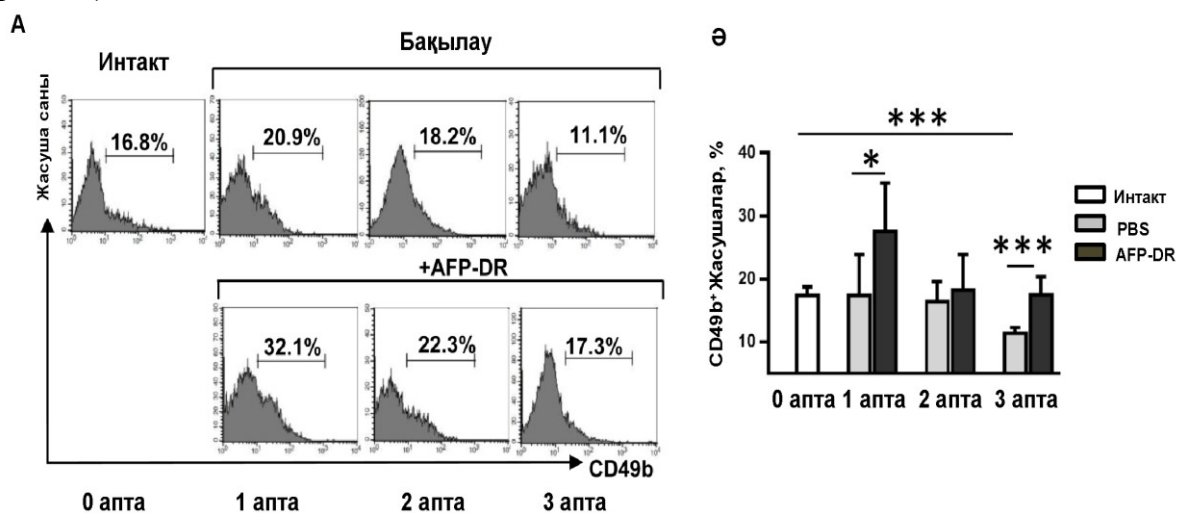
Сурет 43 – AFP-DR конъюгатының тышқанның тері асты Эрлих ісігінің өсуіне әсерінің динамикасы



А) Цитофлуориметриялық репрезентативті мәліметтер; Ә) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер ($n=10$), топтар арасындағы айырмашылықтың мәні $*p<0,05$ (Стъюдент тест бойынша).

Сурет 44 – AFP-DR конъюгатының тері асты Эрлих ісігі бар тышқанның көкбауырындағы MDSC үлесіне әсерінің динамикасы

Бақылау және AFP-DR конъюгатымен емделген тышқандардың көкбауырдағы жасушалар құрамын талдауда, $CD3^+CD4^+$ және $CD3^+CD8^+$ фенотипі Т жасушалардың үлесінде өзгерістер болмады. Дегенмен, бақылау тобындағы (PBS инъекцияланған ісік бар тышқандар) $CD49b$ фенотипті НК жасушалардың көрсеткішін, интакті тышқандармен салыстырғанда үшінші аптаның аяғында айтарлықтай төмендеді. Ал, AFP-DR конъюгатымен емделген топтарда, бірінші апта НК жасушаларының үлесі күрт жоғарылап, екінші аптада бақылаумен бірдей деңгейге жетті және үшінші аптада өзгеріссіз қалды (сурет 45).



А) Цитофлуориметриялық талдаудың репрезентативті мәліметтері, Ә) Орташа мәндермен жинақталған $\pm SD$ мәліметтер ($n=10$), топтар арасындағы айырмашылықтың мәні $*p<0,05$, $***p<0,005$ (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 45 – AFP-DR конъюгатының тәжірибелік тышқанның көкбауырындағы НК жасушасының үлесіне әсері

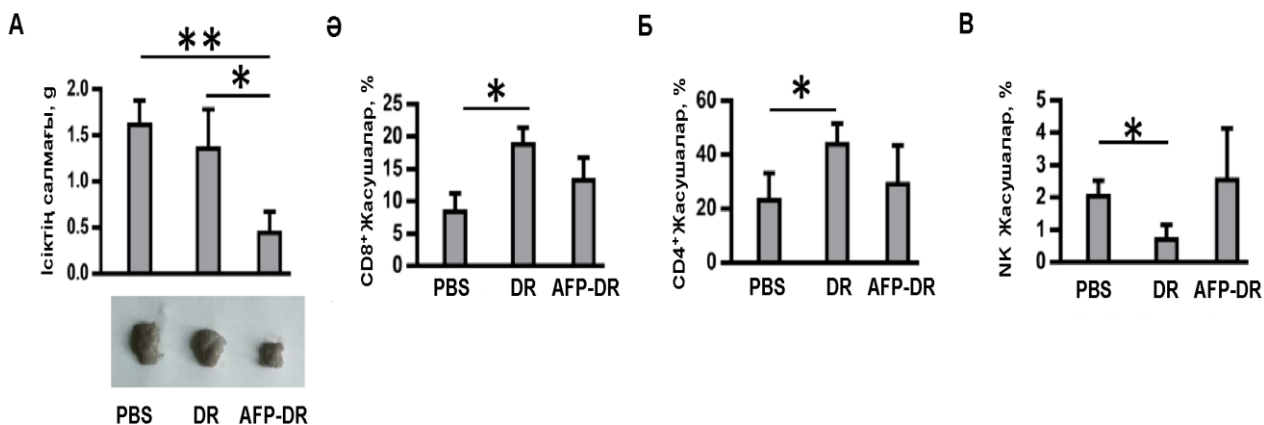
НК жасушалары туа біткен иммундық жүйенің маңызды жасушасы болып, өз функциясын МНС молекулалар экспрессиясына тәуелсіз және алдын ала активтенуді қажет етпестен, инфекцияланған жасушаларға және ісік жасушаларына қарсы тікелей цитотоксикалық әсері бар маңызды лимфоциттерінің бірі [259]. $CD11b^+Gr-1^+$ MDSC-дің НК жасушалардың ісік жасушаларына қарсы цитолитикалық активтілігін, олардың перфорин өндіруін тежеу арқылы супрессия жасауға қабілетті екені *in vitro* және *in vivo* зерттеулерінде анықталған [260]. Бұл мәліметтер, үшінші аптадағы бақылау тобындағы MDSC деңгейінің жоғарылауының НК жасуша үлесінің төмендеуімен және ісіктің тез өсуімен корреляция барын көрсетеді. Ал тәжірибелік топтарды AFP-DR конъюгатымен емдеу MDSC-ді элиминациялау арқылы ісіктің айналасындағы супрессорлық фонды төмендетіп, НК жасушаларының қан айналымындағы үлесін және цитотоксикалық активтілігін қалпына келтіреді деп тұжырымдауға болады. Сондай-ақ, НК жасушасының цитолитикалық активтілігі үшін Эрлих ісік жасушалары нысана бола алады,

үйткені олар МНС-I молекуласын төмен деңгейде экспрессиялайды. Сондықтан НК жасушалық активтілік тері асты Эрлих ісігінің өсуін тежелген болуы мүмкін.

Ісікке бағытталған иммунотерапияның эффективтілігі ісіктердің ішіне инфильтрацияланған лимфоциттердің ($CD49^+$ (NK), $CD4^+$ және $CD8^+$) деңгейінің өзгерісімен бағаланады. $CD8^+$ жасушалары TCR рецепторымен МНС I молекулаларының экспрессиясы бар ісік жасушаларын танып гранзимдер мен перфорин сияқты цитотоксикалық молекулаларды секреция жасау арқылы ісік жасушаларын жояды. $CD4^+$ жасушалары немесе Т хелперлер иммундық жүйеде, әсіресе, адаптивті иммундық жүйеде маңызды рөл атқаратын жасушалардың бір түрі. Бұл жасушалар иммундық жауаптарды тежеуге немесе реттеуге көмектеседі. МНС II класындағы антигендер арқылы активтене алады. Бір қатар зерттеу жұмыстарында, лимфоциттердің ісік-инфильтрациясының жоғарылауы, қатерлі ісіктің әртүрлі түрлерінде жақсы болжаммен байланысты екенін көрсетті [261]. Дегенмен, басқа зерттеулер де НК немесе $CD8^+$ жасушалардың ісікке қарқынды инфильтрациялануы қатерлі ісіктің дамуын жеделдетіп аурудың асқынуымен байланысуы мүмкін екенін анықтаған [262, 263]. Осы сәйкессіздіктердің себептері толық айқындалмаған, ол ісіктердің түріне, олардағы ісікке қарсы эффекторлы жасушар танитын антигендердің экспрессиясына байланысты өзгеруі мүмкін. Сондықтан, AFP-DR конъюгатының ісік ішіндегі лимфоциттерге әсері бағаланды. Бұл үшін тышқандарға ісік жасушасы егілгеннен кейінгі үшінші күннен бастап AFP-DR (0,3 мкг/г тышқан салмағына) немесе Dr (0,3 мкг/г тышқан салмағына) және PBS іш қуысына 5 күн тәуліктік аралықпен инъекцияланды. Ісік тудырылғанан кейінгі 3-аптада ісіктері өлшеніп, гомогенизацияланып жасушалық құрамы ($CD49^+$, $CD4^+$ және $CD8^+$) бағаланды.

Алынған нәтижелерде, AFP-DR конъюгатымен емделген жануарларды PBS немесе DR тобындағы жануарлармен салыстырғанда, оларда ісіктер салмағының айтарлықтай төмендегені байқалды (сурет 46А). Бір таңқаларлығы, PBS және AFP-DR топтардан алынған ісіктердің ішіндегі $CD4^+$, $CD8^+$ жасушалар және НК жасушалар популяцияларының пропорцияларында айтарлықтай айырмашылықтар анықталмады, сәйкесінше, DR тобында ісік ішіндегі $CD8^+$, $CD4^+$ Т жасушалар үлесінің едәуір жоғарылауы (сурет 46Ә, Б) және НК жасуша үлесінің төмендеуі анықталды (сурет 46В).

46Ә және 46Б суретте көрсетілгендей, DR-тобында $CD8^+$ немесе $CD4^+$ жасушалар үлесінің ісік ішінде көбеюі, ісік өсуінің тежелуіне әкелген жоқ, бұл ісік ұлпасының осы жасушалық популяциялармен толығымен ісікке қарсы жауаптың тиімділігіне әсер етпейтіндігін білдіреді. Сонымен қатар, ісік ұлпасының ішіндегі Т лимфоциттер үлесінің жоғарылауымен бір уақытта НК жасушалар үлесінің айтарлықтай төмендеуі, тек DR-мен емделген жануарларда байқалды.



Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер (n=10). Топтар арасындағы айырмашылықтың мәні * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Стьюдент тест бойынша).

Сурет 46 – Ісік ішіндегі эффекторы жасушаларға AFP-DR конъюгатының әсері

Эрлих ісігі гистосәйкестілік жүйесі 2 (H-2) антиген экспрессиясының болмауымен сипатталады [264], бұл оның цитотоксикалық Т жасушалар үшін емес, керісінше NK жасушалардың цитолитикалық активтілігі үшін нақты нысана болатынын көрсетеді. Сонымен қатар DR препаратымен емделген топтағы ісік инфильтрацияланған CD4⁺ Т жасушалардың жоғарылауы бұл ісікке қарсы иммунитетке теріс әсер ететін Treg жасушалардың үлесінің көбеюінен болуы мүмкін [265]. Берілген ісік үлгісіндегі DR препаратының NK жасушаларына элиминациялық әсері, оның ісікке қарсы иммунитетті төмендететін жалпы токсикалығын анықтайды. Бұл қазіргі онкологияда қолданатын ісікке қарсы химиялық препараттардың иммундық жүйеге кері әсерінің бір механизмін көрсетуі мүмкін. Ал AFP-DR конъюгаты эффекторлы иммундық жасушаларға токсикалық әсерінің болмауымен ерекшеленді. Осылайша, AFP-DR ісікке инфильтрацияланған NK жасушалар үлесінің көбеюіне әкеледі және ісіктің өсуін DR препаратымен салыстырғанда айтарлықтай жақсы тежейтіні анықталды.

Эрлих ісігі бар тышқандарға AFP-DR конъюгатын іш қуысына инъекциялау бір күндік аралықпен бес рет емдеу схемасы ең жақсы терапиялық әсерді көрсетті [266]. Бұл кезде тышқандардың көкбауырындағы MDSC үлесінің жоғарылауы және көкбауырдағы NK жасуша үлесінің төмендеуінің тежелуі байқалды. Сондай-ақ, тері асты Эрлих ісігінің өсуі айтарлықтай баяулайтыны анықталды [267].

Жинақтай келгенде, FITC-пен таңбаланған AFP ісік тудырылған тышқандардан алынған MDSC популяцияларымен соның ішінде әсіресе Gr1^{dim}Ly6G⁻ M-MDSC субпопуляциясымен спецификалық түрде байланысты. AFP-DR конъюгаты, MDSC популяцияларына соның ішінде әсіресе M-MDSC

субпопуляциясына селективті цитотоксикалық әсері анықталды, керісінше non-MDSC жасушаларға цитотоксикалық әсері болмады. *In vivo* жағдайындағы тәжірибелердің нәтижелері көрсеткендей, дайындаған AFP цитотоксикалық конъюгаты MDSC элиминациясы үшін әсерлі болды. Тері асты Эрлих ісігі тудырылған тышқандарды AFP-DR конъюгатымен емдеу көкбауырдағы MDSC үлесі мен ісіктің салмағын төмендетіп және NK жасушаларына токсикалық әсер етпейтіні анықталды. AFP-DR конъюгатымен емделген ісігі бар тышқандардың тірі қалу көрсеткіші (100%), бақылау (40%) және DR-мен (40%) салыстырғанда жоғары екені байқалды. Осылайша, AFP цитотоксикалық конъюгаты көмегімен ісік үлгісінде циркуляцияланған MDSC үлесінің деңгейін модуляциялау мүмкіндігі алғаш рет зерттелінді. Бұл ісікке қарсы иммунитеттің қуаттылығына супрессорлық әсері бар, ісік микроортасының маңызды құрамдас бөлігі MDSC-ге бағытталған иммунотерапия үшін маңызы бар нәтиже болып табылады.

ҚОРЫТЫНДЫ

Алынған нәтижелер негізінде төмендегідей тұжырымдар жасалды:

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 тудырды. Бұл кезде, қанда қабынуды ынталандырушы (IL-6) және қабынуға қарсы (TGF- β 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 α деңгейі жоғарылайды. Сонымен қатар, MDSC субпопуляцияларының екеуі де CD62L экспрессиясының жоғарылауымен сипатталады. *In vitro* тәжірибелерде, TNF α сүйек кемігіндегі MDSC-дің CD62L экспрессиясын және олардың CD8⁺ Т лимфоциттерге қарсы супрессорлық активтілігін күшейтетіні анықталды.

4 Алғаш рет онкофетальды ақуыз, альфа-фетопротеин, миелоидтық супрессорлық жасушалардың субпопуляцияларымен таңдамалы байланысатыны анықталды. Даунорубинмен альфа-фетопротеиннің химиялық конъюгаты *in vitro* жағдайында моноцитті MDSC субпопуляциясына селективті цитотоксикалық әсер етеді. *In vivo* жағдайында инъекциялау MDSC деңгейін едәуір төмендетеді, ал NK жасушаларының деңгейін жоғарылатады, бұл тышқанның тері асты Эрлих ісігі өсуінің баяулауына және тірі қалуының жоғарылауына әкеледі.

Диссертацияда алға қойылған міндеттердің барлығы орындалды.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

- 1 Meeto D. Chronic diseases: the silent global epidemic // British journal of nursing (Mark Allen Publishing). – 2008. – Vol. 17, № 21. – P. 1320–1325.
- 2 World Health organization reports: All cancers // <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>. 24.01.2020.
- 3 Kazakhstan. Globocan 2018 // <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/398-kazakhstan-fact-sheets.pdf>. 21.01.2020.
- 4 Стратегический план Казахского Научно-исследовательского Института Онкологии и Радиологии на 2017-2021 годы // https://onco.kz/wp-content/uploads/2017/12/SP_KazIOR_2017_2021.pdf. 05.01.2020.
- 5 Greten F.R., Grivennikov S.I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences // *Immunity*. – 2019. – Vol. 51, № 1. – P. 27–41.
- 6 Балпанова Г.Т., Бижигитова Б.Б., Хроническое воспаление и рак // Вестник КазНМУ. – 2017. № 4. – С. 424–426.
- 7 Wang D., Du Bois R.N. Immunosuppression associated with chronic inflammation in the tumor microenvironment // *Carcinogenesis*. – 2015. – Vol. 36, № 10. – P. 1085–1093.
- 8 Fleit H.B. Chronic Inflammation // *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*. – 2014. – P. 300–314.
- 9 N. Anisimov V., A. Vinogradova I., V. Panchenko A., G. Popovich I., A. Zabezhinski M. Light-at-Night-Induced Circadian Disruption, Cancer and Aging // *Curr. Aging Sci*. – 2013. – Vol. 5, № 3. – P. 170–177.
- 10 Gabrilovich D.I., Bronte V., Chen S.H., Colombo M.P., Ochoa A., Ostrand-Rosenberg S., Schreiber H. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells [1] // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67, № 1. – P. 425.
- 11 Bronte V., Brandau S., Chen S.H., Colombo M.P., Frey A.B., Greten T.F., Mandruzzato S., Murray P.J., et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards // *Nature Communications*. – 2016. – Vol. 7. – P. 1–13.
- 12 Veglia F., Perego M., Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age review-article // *Nature Immunology*. – 2018. – Vol. 19, № 2. – P. 108–119.
- 13 Köstlin N., Hofstädter K., Ostermeir A.L., Spring B., Leiber A., Haen S., Abele H., Bauer P., et al. Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype // *J. Immunol*. – 2016. – Vol. 196, № 3. – P. 1132–1145.
- 14 Kumar V., Patel S., Tcyganov E., Gabrilovich D.I. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment // *Trends in Immunology*. – 2016. – Vol. 37, № 3. – P. 208–220.
- 15 Ostrand-Rosenberg S., Fenselau C. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Immune-Suppressive Cells That Impair Antitumor Immunity and Are Sculpted by Their Environment // *J. Immunol*. – 2018. – Vol. 200, № 2. – P. 422–431.
- 16 Yang G., Shen W., Zhang Y., Liu M., Zhang L., Liu Q., Lu H. hui, Bo J.

Accumulation of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) induced by low levels of IL-6 correlates with poor prognosis in bladder cancer // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 24. – P. 38378–38388.

17 Rahman S.A., Castanon-Cervantes O., Scheer F.A.J.L., Shea S.A., Czeisler C.A., Davidson A.J., Lockley S.W. Endogenous circadian regulation of pro-inflammatory cytokines and chemokines in the presence of bacterial lipopolysaccharide in humans // *Brain. Behav. Immun.* – 2015. – Vol. 47. – P. 4–13.

18 Fleming V., Hu X., Weber R., Nagibin V., Groth C., Altevogt P., Utikal J., Umansky V. Targeting myeloid-derived suppressor cells to bypass tumor-induced immunosuppression // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9, № MAR. – P. 1–13.

19 Oun R., Moussa Y.E., Wheate N.J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: A review for chemists // *Dalton Transactions*. – 2018. – Vol. 47, № 19. – P. 6645–6653.

20 Rauscher F.J. Note from the editor-in-chief // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67, № 8. – P. 3986.

21 Youn J.-I., Nagaraj S., Collazo M., Gabrilovich D.I. Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor-Bearing Mice // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 181, № 8. – P. 5791–5802.

22 Greten T.F., Manns M.P., Korangy F. Myeloid derived suppressor cells in human diseases // *International Immunopharmacology*. – 2011. – Vol. 11, № 7. – P. 802–807.

23 Forghani P., Khorramizadeh M.R., Waller E.K. Natural suppressor cells; Past, present and future // *Front. Biosci.* – 2012. – Vol. E4, № 4. – P. 1237–1245.

24 Subiza J.L., Vinuela J.E., Rodriguez R., Gil J., Figueredo M.A., de la Concha E.G. Development of splenic natural suppressor (NS) cells in ehrlich tumor-bearing mice // *Int. J. Cancer*. – 1989. – Vol. 44, № 2. – P. 307–314.

25 Schleifer K.W., Mansfield J.M. Suppressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins // *J. Immunol.* – 1993. – Vol. 151, № 10. – P. 5492–5503.

26 Young M.R.I., Wright M.A., Lozano Y., Matthews J.P., Benefield J., Margaret Prechel M. Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: Influence on the immune infiltrate of the cancer // *Int. J. Cancer*. – 1996. – Vol. 67, № 3. – P. 333–338.

27 Young M.R., Wright M.A., Matthews J.P., Malik I., Prechel M. Suppression of T cell proliferation by tumor-induced granulocyte-macrophage progenitor cells producing transforming growth factor-beta and nitric oxide // *J. Immunol.* – 1996. – Vol. 156, № 5. – P. 1916–1922.

28 Pekarek L.A., Starr B.A., Toledano A.Y., Schreiber H. Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes // *J. Exp. Med.* – 1995. – Vol. 181, № 1. – P. 435–440.

29 Tepper R.I., Coffman R.L., Leder P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4 // *Science*. – 1992. – Vol. 257, № 5069. – P. 548–551.

30 Wright M.A., Wiers K., Vellody K., Djordjevic D., Young M.R.I. Stimulation of immune suppressive CD34+ cells from normal bone marrow by Lewis lung carcinoma tumors // *Cancer Immunol. Immunother.* – 1998. – Vol. 46, № 5. – P. 253–260.

31 Young M.R.I., Wright M.A., Lozano Y., Prechel M.M., Benefield J., Leonetti J.P., Collins S.L., Petruzzelli G.J. Increased recurrence and metastasis in patients whose primary head and neck squamous cell carcinomas secreted granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and contained CD34+ natural suppressor cells // *Int. J. Cancer.* – 1997. – Vol. 74, № 1. – P. 69–74.

32 Bronte V., Wang M., Overwijk W.W., Surman D.R., Pericle F., Rosenberg S.A., Restifo N.P. Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 161, № 10. – P. 5313–5320.

33 Gabrilovich D.I., Velders M.P., Sotomayor E.M., Kast W.M. Mechanism of Immune Dysfunction in Cancer Mediated by Immature Gr-1+ Myeloid Cells // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 166, № 9. – P. 5398–5406.

34 Bronte V., Apolloni E., Cabrelle A., Ronca R., Serafini P., Zamboni P., Restifo N.P., Zanovello P. Identification of a CD11b+/Gr-1+/CD31+ myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8+ T cells // *Blood.* – 2000. – Vol. 96, № 12. – P. 3838–3846.

35 Serafini P., De Santo C., Marigo I., Cingarlini S., Dolcetti L., Gallina G., Zanovello P., Bronte V. Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells // *Cancer Immunology, Immunotherapy.* – 2004. – Vol. 53, № 2. – P. 64–72.

36 Almand B., Clark J.I., Nikitina E., van Beynen J., English N.R., Knight S.C., Carbone D.P., Gabrilovich D.I. Increased Production of Immature Myeloid Cells in Cancer Patients: A Mechanism of Immunosuppression in Cancer // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 166, № 1. – P. 678–689.

37 Talmadge J.E. Pathways mediating the expansion and immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells and their relevance to cancer therapy // *Clinical Cancer Research.* – 2007. – Vol. 13, № 18. – P. 5243–5248.

38 Sinha P., Clements V.K., Ostrand-Rosenberg S. Reduction of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Induction of M1 Macrophages Facilitate the Rejection of Established Metastatic Disease // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 174, № 2. – P. 636–645.

39 Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Deans R.J., Krause D.S., et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy.* – 2005. – Vol. 7, № 5. – P. 393–395.

40 Kato H., Watanabe M. Myeloid-derived suppressor cells and therapeutic strategies in cancer // *Mediators Inflamm.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–13.

41 Gabrilovich D.I., Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system // *Nature Reviews Immunology.* – 2009. – Vol. 9, № 3. – P. 162–174.

42 Solovjov D.A., Pluskota E., Plow E.F. Distinct roles for the α and β subunits

in the functions of integrin $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, № 2. – P. 1336–1345.

43 Bronte V., Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism // *Nature Reviews Immunology.* – 2005. – Vol. 5, № 8. – P. 641–654.

44 Ribechini E., Leenen P.J.M., Lutz M.B. Gr-1 antibody induces STAT signaling, macrophage marker expression and abrogation of myeloid-derived suppressor cell activity in BM cells // *Eur. J. Immunol.* – 2009. – Vol. 39, № 12. – P. 3538–3551.

45 Lee P.Y., Wang J.-X., Parisini E., Dascher C.C., Nigrovic P.A. Ly6 family proteins in neutrophil biology // *J. Leukoc. Biol.* – 2013. – Vol. 94, № 4. – P. 585–594.

46 Dolcetti L., Peranzoni E., Ugel S., Marigo I., Gomez A.F., Mesa C., Geilich M., Winkels G., et al. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF // *Eur. J. Immunol.* – 2010. – Vol. 40, № 1. – P. 22–35.

47 Haile L.A., Gamrekashvili J., Manns M.P., Korangy F., Greten T.F. CD49d Is a New Marker for Distinct Myeloid-Derived Suppressor Cell Subpopulations in Mice // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 185, № 1. – P. 203–210.

48 Vuk-Pavlović S., Bulur P.A., Lin Y., Qin R., Szumlanski C.L., Zhao X., Dietz A.B. Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/- monocytes in prostate cancer // *Prostate.* – 2010. – Vol. 70, № 4. – P. 443–455.

49 Filipazzi P., Valenti R., Huber V., Pilla L., Canese P., Iero M., Castelli C., Mariani L., et al. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine // *Journal of Clinical Oncology.* – 2007. – Vol. 25, № 18. – P. 2546–2553.

50 Dumitru C.A., Moses K., Trellakis S., Lang S., Brandau S. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: Immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology // *Cancer Immunology, Immunotherapy.* – 2012. – Vol. 61, № 8. – P. 1155–1167.

51 Condamine T., Dominguez G.A., Youn J.I., Kossenkov A. V., Mony S., Alicea-Torres K., Tcyganov E., Hashimoto A., et al. Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients // *Sci. Immunol.* – 2016. – Vol. 1, № 2. – P. 1–12.

52 Gabrilovich D.I. Myeloid-derived suppressor cells // *Cancer Immunol. Res.* – 2017. – Vol. 5, № 1. – P. 3–8.

53 Zhou J., Nefedova Y., Lei A., Gabrilovich D. Neutrophils and PMN-MDSC: Their biological role and interaction with stromal cells // *Seminars in Immunology.* – 2018. – Vol. 35. – P. 19–28.

54 Auffray C., Sieweke M.H., Geissmann F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells // *Annu. Rev. Immunol.* – 2009. – Vol. 27, № 1. – P. 669–692.

55 Elkabets M., Ribeiro V.S.G., Dinarello C.A., Ostrand-Rosenberg S., Di Santo J.P., Apte R.N., Vosshenrich C.A.J. IL-1 β regulates a novel myeloid-derived

suppressor cell subset that impairs NK cell development and function // *Eur. J. Immunol.* – 2010. – Vol. 40, № 12. – P. 3347–3357.

56 Corzo C.A., Cotter M.J., Cheng P., Cheng F., Kusmartsev S., Sotomayor E., Padhya T., McCaffrey T. V., et al. Mechanism Regulating Reactive Oxygen Species in Tumor-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 182, № 9. – P. 5693–5701.

57 Youn J.I., Kumar V., Collazo M., Nefedova Y., Condamine T., Cheng P., Villagra A., Antonia S., et al. Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer // *Nat. Immunol.* – 2013. – Vol. 14, № 3. – P. 211–220.

58 Movahedi K., Guilliams M., Van Den Bossche J., Van Den Bergh R., Gysemans C., Beschin A., De Baetselier P., Van Ginderachter J.A. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell suppressive activity // *Blood.* – 2008. – Vol. 111, № 8. – P. 4233–4244.

59 Ugel S., Peranzoni E., Desantis G., Chioda M., Walter S., Weinschenk T., Ochando J.C., Cabrelle A., et al. Immune Tolerance to Tumor Antigens Occurs in a Specialized Environment of the Spleen // *Cell Rep.* – 2012. – Vol. 2, № 3. – P. 628–639.

60 Groth C., Hu X., Weber R., Fleming V., Altevogt P., Utikal J., Umansky V. Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression // *British Journal of Cancer.* – 2019. – Vol. 120, № 1. – P. 16–25.

61 Condamine T., Mastio J., Gabrilovich D.I. Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells // *J. Leukoc. Biol.* – 2015. – Vol. 98, № 6. – P. 913–922.

62 Zhao Y., Wu T., Shao S., Shi B., Zhao Y. Phenotype, development, and biological function of myeloid-derived suppressor cells // *Oncoimmunology.* – 2016. – Vol. 5, № 2. – P. e1004983.

63 Bunt S.K., Sinha P., Clements V.K., Leips J., Ostrand-Rosenberg S. Inflammation Induces Myeloid-Derived Suppressor Cells that Facilitate Tumor Progression // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 176, № 1. – P. 284–290.

64 Song X., Krelin Y., Dvorkin T., Bjorkdahl O., Segal S., Dinarello C.A., Voronov E., Apte R.N. CD11b+/Gr-1+ Immature Myeloid Cells Mediate Suppression of T Cells in Mice Bearing Tumors of IL-1 β -Secreting Cells // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 175, № 12. – P. 8200–8208.

65 Voronov E., Shouval D.S., Krelin Y., Cagnano E., Benharroch D., Iwakura Y., Dinarello C.A., Apte R.N. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol. 100, № 5. – P. 2645–2650.

66 Bunt S.K., Yang L., Sinha P., Clements V.K., Leips J., Ostrand-Rosenberg S. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67, № 20. – P. 10019–10026.

67 Wang D., DuBois R.N. Pro-inflammatory prostaglandins and progression of colorectal cancer // *Cancer Letters.* – 2008. – Vol. 267, № 2. – P. 197–203.

68 Sinha P., Clements V.K., Fulton A.M., Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67, № 9. – P. 4507–4513.

69 Ochoa A.C., Zea A.H., Hernandez C., Rodriguez P.C. Arginase, Prostaglandins, and Myeloid-Derived Suppressor Cells in Renal Cell Carcinoma // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13, № 2. – P. 721s-726s.

70 Obermajer N., Muthuswamy R., Odunsi K., Edwards R.P., Kalinski P. PGE 2-induced CXCL 12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment // *Cancer Res.* – 2011. – Vol. 71, № 24. – P. 7463–7470.

71 Foell D., Wittkowski H., Vogl T., Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules // *J. Leukoc. Biol.* – 2007. – Vol. 81, № 1. – P. 28–37.

72 Turovskaya O., Foell D., Sinha P., Vogl T., Newlin R., Nayak J., Nguyen M., Olsson A., et al. RAGE, carboxylated glycans and S100A8/A9 play essential roles in colitis-associated carcinogenesis // *Carcinogenesis.* – 2008. – Vol. 29, № 10. – P. 2035–2043.

73 Zhao F., Hoechst B., Duffy A., Gamrekelashvili J., Fioravanti S., Manns M.P., Greten T.F., Korangy F. S100A9 a new marker for monocytic human myeloid-derived suppressor cells // *Immunology.* – 2012. – Vol. 136, № 2. – P. 176–183.

74 Sinha P., Okoro C., Foell D., Freeze H.H., Ostrand-Rosenberg S., Srikrishna G. Proinflammatory S100 Proteins Regulate the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 181, № 7. – P. 4666–4675.

75 Ostrand-Rosenberg S., Sinha P. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 182, № 8. – P. 4499–4506.

76 Kishimoto T. IL-6: From its discovery to clinical applications // *Int. Immunol.* – 2010. – Vol. 22, № 5. – P. 347–352.

77 Naugler W.E., Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer // *Trends in Molecular Medicine.* – 2008. – Vol. 14, № 3. – P. 109–119.

78 Trikha M., Corringham R., Klein B., Rossi J.F. Targeted Anti-Interleukin-6 Monoclonal Antibody Therapy for Cancer: A Review of the Rationale and Clinical Evidence // *Clinical Cancer Research.* – 2003. – Vol. 9, № 13. – P. 4653–4665.

79 Marigo I., Bosio E., Solito S., Mesa C., Fernandez A., Dolcetti L., Ugel S., Sonda N., et al. Tumor-Induced Tolerance and Immune Suppression Depend on the C/EBP β Transcription Factor // *Immunity.* – 2010. – Vol. 32, № 6. – P. 790–802.

80 Wu C. Te, Hsieh C.C., Lin C.C., Chen W.C., Hong J.H., Chen M.F. Significance of IL-6 in the transition of hormone-resistant prostate cancer and the induction of myeloid-derived suppressor cells // *J. Mol. Med.* – 2012. – Vol. 90, № 11. – P. 1343–1355.

81 Sumida K., Wakita D., Narita Y., Masuko K., Terada S., Watanabe K., Satoh T., Kitamura H., et al. Anti-IL-6 receptor mAb eliminates myeloid-derived suppressor cells and inhibits tumor growth by enhancing T-cell responses // *Eur. J. Immunol.* – 2012. – Vol. 42, № 8. – P. 2060–2072.

82 Hamilton J.A. GM-CSF as a target in inflammatory/autoimmune disease: Current evidence and future therapeutic potential // *Expert Review of Clinical Immunology*. – 2015. – Vol. 11, № 4. – P. 457–465.

83 Bronte V., Chappell D.B., Apolloni E., Cabrelle A., Wang M., Hwu P., Restifo N.P. Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8⁺ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 162, № 10. – P. 5728–5737.

84 Morales J.K., Kmiecik M., Knutson K.L., Bear H.D., Manjili M.H. GM-CSF is one of the main breast tumor-derived soluble factors involved in the differentiation of CD11b-Gr1-bone marrow progenitor cells into myeloid-derived suppressor cells // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2010. – Vol. 123, № 1. – P. 39–49.

85 Schmidt K., Zilio S., Schmollinger J.C., Bronte V., Blankenstein T., Willmsky G. Differently immunogenic cancers in mice induce immature myeloid cells that suppress CTL in vitro but not in vivo following transfer // *Blood*. – 2013. – Vol. 121, № 10. – P. 1740–1748.

86 Lechner M.G., Liebertz D.J., Epstein A.L. Correction: Characterization of Cytokine-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells from Normal Human Peripheral Blood Mononuclear Cells // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 185, № 9. – P. 5668–5668.

87 Sinha P., Clements V.K., Bunt S.K., Albelda S.M., Ostrand-Rosenberg S. Cross-Talk between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Macrophages Subverts Tumor Immunity toward a Type 2 Response // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 179, № 2. – P. 977–983.

88 Hart K.M., Byrne K.T., Molloy M.J., Usherwood E.M., Berwin B. IL-10 immunomodulation of myeloid cells regulates a murine model of ovarian cancer // *Front. Immunol.* – 2011. – Vol. 2, № JUL. – P. 1–14.

89 Bak S.P., Walters J.J., Takeya M., Conejo-Garcia J.R., Berwin B.L. Scavenger receptor-A-targeted leukocyte depletion inhibits peritoneal ovarian tumor progression // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67, № 10. – P. 4783–4789.

90 Huang B., Pan P.Y., Li Q., Sato A.I., Levy D.E., Bromberg J., Divino C.M., Chen S.H. Gr-1⁺CD115⁺ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66, № 2. – P. 1123–1131.

91 Tanikawa T., Wilke C.M., Kryczek I., Chen G.Y., Kao J., Núñez G., Zou W. Interleukin-10 ablation promotes tumor development, growth, and metastasis // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72, № 2. – P. 420–429.

92 Palomino D.C. arolin. T., Marti L.C. avalheir. Chemokines and immunity // *Einstein (São Paulo, Brazil)*. – 2015. – Vol. 13, № 3. – P. 469–473.

93 Homey B., Müller A., Zlotnik A. Chemokines: Agents for the immunotherapy of cancer? // *Nature Reviews Immunology*. – 2002. – Vol. 2, № 3. – P. 175–184.

94 Zhang J., Patel L., Pienta K.J. CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2010. – Vol. 21, № 1. – P. 41–48.

95 Lesokhin A.M., Hohl T.M., Kitano S., Cortez C., Hirschhorn-Cymerman D., Avogadri F., Rizzuto G.A., Lazarus J.J., et al. Monocytic CCR2 + myeloid-derived suppressor cells promote immune escape by limiting activated CD8 T-cell infiltration into the tumor microenvironment // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72, № 4. – P. 876–886.

96 Corzo C.A., Condamine T., Lu L., Cotter M.J., Youn J.I., Cheng P., Cho H. II, Celis E., et al. HIF-1 α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment // *J. Exp. Med.* – 2010. – Vol. 207, № 11. – P. 2439–2453.

97 Noman M.Z., Desantis G., Janji B., Hasmim M., Karray S., Dessen P., Bronte V., Chouaib S. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced: MDSC-mediated T cell activation // *J. Exp. Med.* – 2014. – Vol. 211, № 5. – P. 781–790.

98 Gabrilovich D.I., Ostrand-Rosenberg S., Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours // *Nature Reviews Immunology.* – 2012. – Vol. 12, № 4. – P. 253–268.

99 Kusmartsev S., Gabrilovich D.I. Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer // *Cancer Immunology, Immunotherapy.* – 2006. – Vol. 55, № 3. – P. 237–245.

100 Nagaraj S., Gabrilovich D.I. Regulation of suppressive function of myeloid-derived suppressor cells by CD4⁺ T cells // *Seminars in Cancer Biology.* – 2012. – Vol. 22, № 4. – P. 282–288.

101 Srivastava M.K., Zhu L., Harris-White M., Kar U., Huang M., Johnson M.F., Lee J.M., Elashoff D., et al. Myeloid suppressor cell depletion augments antitumor activity in lung cancer // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 7. – P. 1–13.

102 Rodriguez P.C., Zea A.H., Culotta K.S., Zabaleta J., Ochoa A.C., Ochoa J.B. Regulation of T cell receptor CD3 ζ chain expression by L-arginine // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 24. – P. 21123–21129.

103 Goh C.C., Roggerson K.M., Lee H.C., Golden-Mason L., Rosen H.R., Hahn Y.S. Hepatitis C Virus-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells Suppress NK Cell IFN- γ Production by Altering Cellular Metabolism via Arginase-1 // *J. Immunol.* – 2016. – Vol. 196, № 5. – P. 2283–2292.

104 Rodriguez P.C., Quiceno D.G., Ochoa A.C. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression // *Blood.* – 2007. – Vol. 109, № 4. – P. 1568–1573.

105 Bogdan C. Nitric oxide and the immune response // *Nature Immunology.* – 2001. – Vol. 2, № 10. – P. 907–916.

106 Fischer T.A., Palmetshofer A., Gambaryan S., Butt E., Jassoy C., Walter U., Sopper S., Lohmann S.M. Activation of cGMP-dependent Protein Kinase I β Inhibits Interleukin 2 Release and Proliferation of T Cell Receptor-stimulated Human Peripheral T Cells // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 8. – P. 5967–5974.

107 Bingisser R.M., Tilbrook P.A., Holt P.G., Kees U.R. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 160, № 12. – P. 5729–5734.

108 Mazzone A., Bronte V., Visintin A., Spitzer J.H., Apolloni E., Serafini P., Zanovello P., Segal D.M. Myeloid Suppressor Lines Inhibit T Cell Responses by an NO-Dependent Mechanism // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 168, № 2. – P. 689–695.

109 Pericle F., Sconocchia G., Segal D.M., Bronte V., Kirken R.A., Dasilva L. Immunocompromised tumor-bearing mice show a selective loss of STAT5a/b expression in T and B lymphocytes // *J. Immunol.* – 1997. – Vol. 159, № 6. – P. 2580–2585.

110 Pericle F., Pinto L.A., Hicks S., Sconocchia G., Shearer G.M., Segal D.M., Kirken R.A., Rusnak J., et al. Cutting edge: HIV-1 infection induces a selective reduction in STAT5 protein expression // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 160, № 1. – P. 28–31.

111 Xia Y., Roman L.J., Masters B.S.S., Zweier J.L. Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, № 35. – P. 22635–22639.

112 Izawa S., Kono K., Mimura K., Kawaguchi Y., Watanabe M., Maruyama T., Fujii H. H₂O₂ production within tumor microenvironment inversely correlated with infiltration of CD56dim NK cells in gastric and esophageal cancer: Possible mechanisms of NK cell dysfunction // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2011. – Vol. 60, № 12. – P. 1801–1810.

113 Bronte V., Serafini P., De Santo C., Marigo I., Tosello V., Mazzone A., Segal D.M., Staib C., et al. IL-4-Induced Arginase 1 Suppresses Alloreactive T Cells in Tumor-Bearing Mice // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 170, № 1. – P. 270–278.

114 Han S., Yang Y. Phenotypic and functional dissection of myeloid-derived suppressor cells // *Applied Biological Chemistry.* – 2016. – Vol. 59, № 3. – P. 367–371.

115 Wei J., Zhang M., Zhou J. Myeloid-derived suppressor cells in major depression patients suppress T-cell responses through the production of reactive oxygen species // *Psychiatry Res.* – 2015. – Vol. 228, № 3. – P. 695–701.

116 Kusmartsev S., Nefedova Y., Yoder D., Gabrilovich D.I. Antigen-Specific Inhibition of CD8+ T Cell Response by Immature Myeloid Cells in Cancer Is Mediated by Reactive Oxygen Species // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172, № 2. – P. 989–999.

117 Förstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: Regulation and function // *European Heart Journal.* – 2012. – Vol. 33, № 7. – P. 829–837.

118 Alvarez B., Radi R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins // *Amino Acids.* – 2003. – Vol. 25. – P. 295–311.

119 Nagaraj S., Gupta K., Pisarev V., Kinarsky L., Sherman S., Kang L., Herber D.L., Schneck J., et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer // *Nat. Med.* – 2007. – Vol. 13, № 7. – P. 828–835.

120 Molon B., Ugel S., Del Pozzo F., Soldani C., Zilio S., Avella D., De Palma A., Mauri P.L., et al. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells // *J. Exp. Med.* – 2011. – Vol. 208, № 10. – P. 1949–1962.

121 Rastad J.L., Green W.R. Myeloid-derived suppressor cells in murine AIDS inhibit B-cell responses in part via soluble mediators including reactive oxygen and

nitrogen species, and TGF- β // *Virology*. – 2016. – Vol. 499. – P. 9–22.

122 Lelis F.J.N., Jaufmann J., Singh A., Fromm K., Teschner A.C., Pöschel S., Schäfer I., Beer-Hammer S., et al. Myeloid-derived suppressor cells modulate B-cell responses // *Immunol. Lett.* – 2017. – Vol. 188. – P. 108–115.

123 Lu T., Ramakrishnan R., Altiok S., Youn J.I., Cheng P., Celis E., Pisarev V., Sherman S., et al. Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice // *J. Clin. Invest.* – 2011. – Vol. 121, № 10. – P. 4015–4029.

124 Li M.O., Flavell R.A. TGF- β : A Master of All T Cell Trades // *Cell*. – 2008. – Vol. 134, № 3. – P. 392–404.

125 Terabe M., Matsui S., Park J.M., Mamura M., Noben-Trauth N., Donaldson D.D., Chen W., Wahl S.M., et al. Transforming Growth Factor- β Production and Myeloid Cells Are an Effector Mechanism through Which CD1d-restricted T Cells Block Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Tumor Immunosurveillance: Abrogation Prevents Tumor Recurrence // *J. Exp. Med.* – 2003. – Vol. 198, № 11. – P. 1741–1752.

126 Li H., Han Y., Guo Q., Zhang M., Cao X. Cancer-Expanded Myeloid-Derived Suppressor Cells Induce Anergy of NK Cells through Membrane-Bound TGF- β 1 // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 182, № 1. – P. 240–249.

127 Wolfrain L.A., Walz T.M., James Z., Fernandez T., Letterio J.J. p21(Cip1) and p27(Kip1) Act in Synergy to Alter the Sensitivity of Naive T Cells to TGF- β -Mediated G 1 Arrest through Modulation of IL-2 Responsiveness // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 173, № 5. – P. 3093–3102.

128 Lee C.R., Lee W., Cho S.K., Park S.G. Characterization of multiple cytokine combinations and TGF- β on differentiation and functions of myeloid-derived suppressor cells // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, № 3. – P. 1–12.

129 Yang R., Cai Z., Zhang Y., Yutzy IV W.H., Roby K.F., Roden R.B.S. CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1 +CD11b + myeloid cells // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66, № 13. – P. 6807–6815.

130 Whiteside T.L. Immune responses to malignancies // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2010. – Vol. 125, № 2 SUPPL. 2. – P. S272–S282.

131 Zoso A., Mazza E.M.C., Bicciato S., Mandruzzato S., Bronte V., Serafini P., Inverardi L. Human fibrocytic myeloid-derived suppressor cells express IDO and promote tolerance via Treg-cell expansion // *Eur. J. Immunol.* – 2014. – Vol. 44, № 11. – P. 3307–3319.

132 Hanson E.M., Clements V.K., Sinha P., Ilkovitch D., Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-Derived Suppressor Cells Down-Regulate L-Selectin Expression on CD4+ and CD8+ T Cells // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183, № 2. – P. 937–944.

133 Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: More mechanisms for inhibiting antitumor immunity // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2010. – Vol. 59, № 10. – P. 1593–1600.

134 Casella I., Feccia T., Chelucci C., Samoggia P., Castelli G., Guerriero R., Parolini I., Petrucci E., et al. Autocrine-paracrine VEGF loops potentiate the maturation of megakaryocytic precursors through Flt1 receptor // *Blood*. – 2003. – Vol. 101, № 4. – P. 1316–1323.

135 Shojaei F., Wu X., Qu X., Kowanetz M., Yu L., Tan M., Meng Y.G., Ferrara N. G-CSF-initiated myeloid cell mobilization and angiogenesis mediate tumor refractoriness to anti-VEGF therapy in mouse models // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2009. – Vol. 106, № 16. – P. 6742–6747.

136 Ray A., Chakraborty K., Ray P. Immunosuppressive MDSCs induced by TLR signaling during infection and role in resolution of inflammation // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* – 2013. – Vol. 4, № SEP. – P. 1–8.

137 Höchst B., Mikulec J., Baccega T., Metzger C., Welz M., Peusquens J., Tacke F., Knolle P., et al. Differential induction of Ly6G and Ly6C positive myeloid derived suppressor cells in chronic kidney and liver inflammation and fibrosis // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, № 3. – P. 1–13.

138 Macarthur M., Hold G.L., El-Omar E.M. Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy // *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology.* – 2004. – Vol. 286. – P. G515–G520.

139 Opal S.M., DePalo V.A. Anti-inflammatory cytokines // *Chest.* – 2000. – Vol. 117, № 4. – P. 1162–1172.

140 Chung H.Y., Sung B., Jung K.J., Zou Y., Yu B.P. The molecular inflammatory process in aging // *Antioxidants and Redox Signaling.* – 2006. – Vol. 8, № 3–4. – P. 572–581.

141 Lavrovsky Y., Chatterjee B., Clark R.A., Roy A.K. Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases // *Experimental Gerontology.* – 2000. – Vol. 35, № 5. – P. 521–532.

142 Тулеуханов С.Т., Аблайханова Н.Т., Акшалова Л.М. Хронофизиологические механизмы устойчивости организма к стрессорным воздействиям // *Вестник КазНУ. Серия экологическая.* – 2012. – Т. 35, № 3. – С. 7–11.

143 Popovich I.G., Zabezhinski M.A., Panchenko A. V., Piskunova T.S., Semenchenko A. V., Tyndyk M.L., Yurova M.N., Anisimov V.N. Exposure to light at night accelerates aging and spontaneous uterine carcinogenesis in female 129/Sv mice // *Cell Cycle.* – 2013. – Vol. 12, № 11. – P. 1785–1790.

144 Gale J.E., Cox H.I., Qian J., Block G.D., Colwell C.S., Matveyenko A. V. Disruption of circadian rhythms accelerates development of diabetes through pancreatic beta-cell loss and dysfunction // *J. Biol. Rhythms.* – 2011. – Vol. 26, № 5. – P. 423–433.

145 Castanon-Cervantes O., Wu M., Ehlen J.C., Paul K., Gamble K.L., Johnson R.L., Besing R.C., Menaker M., et al. Dysregulation of Inflammatory Responses by Chronic Circadian Disruption // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 185, № 10. – P. 5796–5805.

146 Shearer W.T., Reuben J.M., Mullington J.M., Price N.J., Lee B.N., O'brian Smith E., Szuba M.P., Van Dongen H.P.A., et al. Soluble TNF- α receptor 1 and IL-6 plasma levels in humans subjected to the sleep deprivation model of spaceflight // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2001. – Vol. 107, № 1. – P. 165–170.

147 Fonken L.K., Lieberman R.A., Weil Z.M., Nelson R.J. Dim light at night

exaggerates weight gain and inflammation associated with a high-fat diet in male mice // *Endocrinology*. – 2013. – Vol. 154, № 10. – P. 3817–3825.

148 Hashiramoto A., Yamane T., Tsumiyama K., Yoshida K., Komai K., Yamada H., Yamazaki F., Doi M., et al. Mammalian Clock Gene Cryptochrome Regulates Arthritis via Proinflammatory Cytokine TNF- α // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 184, № 3. – P. 1560–1565.

149 Xia S., Sha H., Yang L., Ji Y., Ostrand-Rosenberg S., Qi L. Gr-1⁺ CD11b⁺ myeloid-derived suppressor cells suppress inflammation and promote insulin sensitivity in obesity // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, № 26. – P. 23591–23599.

150 Singh U.P., Singh N.P., Singh B., Hofseth L.J., Taub D.D., Price R.L., Nagarkatti M., Nagarkatti P.S. Role of resveratrol-induced CD11b⁺ Gr-1⁺ myeloid derived suppressor cells (MDSCs) in the reduction of CXCR3⁺ T cells and amelioration of chronic colitis in IL-10^{-/-} mice // *Brain. Behav. Immun.* – 2012. – Vol. 26, № 1. – P. 72–82.

151 Obregón-Henao A., Henao-Tamayo M., Orme I.M., Ordway D.J. Gr1^{int}CD11b⁺ Myeloid-Derived Suppressor Cells in Mycobacterium tuberculosis Infection // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 11. – P. e80669-13.

152 Vollbrecht T., Stirner R., Tufman A., Roider J., Huber R.M., Bogner J.R., Lechner A., Bourquin C., et al. Chronic progressive HIV-1 infection is associated with elevated levels of myeloid-derived suppressor cells // *Aids*. – 2012. – Vol. 26, № 12. – P. 283.

153 Verschoor C.P., Johnstone J., Millar J., Dorrington M.G., Habibagahi M., Lelic A., Loeb M., Bramson J.L., et al. Blood CD33(+)/HLA-DR(-) myeloid-derived suppressor cells are increased with age and a history of cancer // *J. Leukoc. Biol.* – 2013. – Vol. 93, № 4. – P. 633–637.

154 Flores R.R., Clauson C.L., Cho J., Lee B.C., McGowan S.J., Baker D.J., Niedernhofer L.J., Robbins P.D. Expansion of myeloid-derived suppressor cells with aging in the bone marrow of mice through a NF- κ B-dependent mechanism // *Aging Cell*. – 2017. – Vol. 16, № 3. – P. 480–487.

155 Eaden J.A., Abrams K.R., Mayberry J.F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: A meta-analysis // *Gut*. – 2001. – Vol. 48, № 4. – P. 526–535.

156 Whitcomb D.C. Inflammation and cancer: V. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer // *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2004. – Vol. 287. – P. G315–G319.

157 Algra A.M., Rothwell P.M. Effects of regular aspirin on long-term cancer incidence and metastasis: A systematic comparison of evidence from observational studies versus randomised trials // *Lancet Oncol.* – 2012. – Vol. 13, № 5. – P. 518–527.

158 Poh T.W., Madsen C.S., Gorman J.E., Marler R.J., Leighton J.A., Cohen P.A., Gendler S.J. Downregulation of hematopoietic MUC1 during Experimental colitis increases tumor-promoting myeloid-derived suppressor cells // *Clin. Cancer Res.* – 2013. – Vol. 19, № 18. – P. 5039–5052.

159 Katoh H., Wang D., Daikoku T., Sun H., Dey S.K., DuBois R.N. CXCR2-Expressing Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Essential to Promote Colitis-

- Associated Tumorigenesis // *Cancer Cell*. – 2013. – Vol. 24, № 5. – P. 631–644.
- 160 Zhao X., Rong L., Zhao X., Li X., Liu X., Deng J., Wu H., Xu X., et al. TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation // *J. Clin. Invest.* – 2012. – Vol. 122, № 11. – P. 4094–4104.
- 161 Sade-Feldman M., Kanterman J., Ish-Shalom E., Elnekave M., Horwitz E., Baniyash M. Tumor Necrosis Factor- α Blocks Differentiation and Enhances Suppressive Activity of Immature Myeloid Cells during Chronic Inflammation // *Immunity*. – 2013. – Vol. 38, № 3. – P. 541–554.
- 162 Tu S., Bhagat G., Cui G., Takaishi S., Kurt-Jones E.A., Rickman B., Betz K.S., Penz-Oesterreicher M., et al. Overexpression of Interleukin-1 β Induces Gastric Inflammation and Cancer and Mobilizes Myeloid-Derived Suppressor Cells in Mice // *Cancer Cell*. – 2008. – Vol. 14, № 5. – P. 408–419.
- 163 Ai L., Mu S., Wang Y., Wang H., Cai L., Li W., Hu Y. Prognostic role of myeloid-derived suppressor cells in cancers: a systematic review and meta-analysis // *BMC Cancer*. – 2018. – Vol. 18, № 1. – P. 1220.
- 164 Iclozan C., Antonia S., Chiappori A., Chen D.T., Gabrilovich D. Therapeutic regulation of myeloid-derived suppressor cells and immune response to cancer vaccine in patients with extensive stage small cell lung cancer // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2013. – Vol. 62, № 5. – P. 909–918.
- 165 Wang Z., Till B., Gao Q. Chemotherapeutic agent-mediated elimination of myeloid-derived suppressor cells // *Oncoimmunology*. – 2017. – Vol. 6, № 7. – P. e1331807.
- 166 Alizadeh D., Trad M., Hanke N.T., Larmonier C.B., Janikashvili N., Bonnotte B., Katsanis E., Larmonier N. Doxorubicin eliminates myeloid-derived suppressor cells and enhances the efficacy of adoptive T-cell transfer in breast cancer // *Cancer Res.* – 2014. – Vol. 74, № 1. – P. 104–118.
- 167 Ko J.S., Zea A.H., Rini B.I., Ireland J.L., Elson P., Cohen P., Golshayan A., Rayman P.A., et al. Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15, № 6. – P. 2148–2157.
- 168 De Santo C., Serafini P., Marigo I., Dolcetti L., Bolla M., Del Soldato P., Melani C., Guiducci C., et al. Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2005. – Vol. 102, № 11. – P. 4185–4190.
- 169 Serafini P., Meckel K., Kelso M., Noonan K., Califano J., Koch W., Dolcetti L., Bronte V., et al. Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203, № 12. – P. 2691–2702.
- 170 Caldwell R.W., Rodriguez P.C., Toque H.A., Priya Narayanan S., Caldwell R.B. Arginase: A multifaceted enzyme important in health and disease // *Physiological Reviews*. – 2018. – Vol. 98, № 2. – P. 641–665.
- 171 Council of Europe. Guidelines for accomodation and care of animals (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes) // *Cets*. – 2006. – Vol. 123, № June. – P.

109.

172 Kjeldsen L., Sengeløv H., Borregaard N. Subcellular fractionation of human neutrophils on Percoll density gradients // *J. Immunol. Methods.* – 1999. – Vol. 232, № 1–2. – P. 131–143.

173 Protein labeling with FITC // [http://www.ridgeviewinstruments.com/docs/LigandTracer Protocol Protein labeling with FITC 1.4.pdf](http://www.ridgeviewinstruments.com/docs/LigandTracer%20Protocol%20Protein%20labeling%20with%20FITC%201.4.pdf). 13.01.2020.

174 Ohkawa K., Hatano T., Tsukada Y., Matsuda M. Chemotherapeutic efficacy of the protein-doxorubicin conjugates on multidrug resistant rat hepatoma cell line *in vitro* // *Br. J. Cancer.* – 1993. – Vol. 67, № 2. – P. 274–278.

175 Chillingworth N.L., Donaldson L.F. Characterisation of a Freund's complete adjuvant-induced model of chronic arthritis in mice // *J. Neurosci. Methods.* – 2003. – Vol. 128, № 1–2. – P. 45–52.

176 Vinogradova I.A., Anisimov V.N., Bukalev A. V., Semenchenko A. V., Zabezhinski M.A. Circadian disruption induced by light-at-night accelerates aging and promotes tumorigenesis in rats // *Aging (Albany, NY).* – 2009. – Vol. 1, № 10. – P. 855–865.

177 Mishra S., Tamta A.K., Sarikhani M., Desingu P.A., Kizkekra S.M., Pandit A.S., Kumar S., Khan D., et al. Subcutaneous Ehrlich Ascites Carcinoma mice model for studying cancer-induced cardiomyopathy // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 5599.

178 Belyaev N.N., Bogdanov A.Y., Savvulidi P.G., Krasnoshtanov V.K., Tleulieva R.T., Alipov G.K., Sekine I., Bae J.S., et al. The influence of alpha-fetoprotein on natural suppressor cell activity and Ehrlich carcinoma growth // *Korean J. Physiol. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 12, № 4. – P. 193–197.

179 Беляев Н.Н., Перфильева Ю.В., Остапчук Е.О., Абрамова В.А. Абдолла Н. Иммунорегуляторные клетки как потенциальные биомаркеры рака // *КазНМУ Вестник.* – 2016. № 3. – С. 185–191.

180 Philippe L., Gegout-Pottie P., Guingamp C., Bordji K., Terlain B., Netter P., Gillet P. Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* – 1997. – Vol. 273, № 4. – P. R1550–R1556.

181 Youn J.I., Gabrilovich D.I. The biology of myeloid-derived suppressor cells: The blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity // *European Journal of Immunology.* – 2010. – Vol. 40, № 11. – P. 2969–2975.

182 Абдолла Н., Перфильева Ю.В., Остапчук Е.О., Тлеулиева Р., Красноштанов В.К., Беляев Н.Н. Адьювант-индукцияланған артриттің тышқан үлгісіндегі миелоидты супрессорлық жасушалардың фенотиптік және функционалдық ерекшелігі // *КазҰМУ хабаршысы.* – 2017. № 3. – Б. 204–206.

183 Mullington J.M., Haack M., Toth M., Serrador J.M., Meier-Ewert H.K. Cardiovascular, Inflammatory, and Metabolic Consequences of Sleep Deprivation // *Prog. Cardiovasc. Dis.* – 2009. – Vol. 51, № 4. – P. 294–302.

184 Fu L., Kettner N.M. The circadian clock in cancer development and therapy // *Prog Mol Biol Transl Sci.* – 2013. – Vol. 119. – P. 221–282.

185 Belyaev N.N., Perfilyeva Y.V., Abdolla N., Ostapchuk Y.O., Tleulieva

R.T., Oskolchenko I.A., Abramova V.A. Light induced stress and myeloid derived suppressor cells // Materials international conference «Biomedical innovation for healthy longevity». - St. Petersburg,. – 2016. – P. 95.

186 Raffler N.A., Rivera-Nieves J., Ley K. L-selectin in inflammation, infection and immunity // Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies. – 2005. – Vol. 2, № 3. – P. 213–220.

187 Weber C., Weber K.S.C., Klier C., Gu S., Wank R., Horuk R., Nelson P.J. Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and TH1-like/CD45RO+ T cells // Blood. – 2001. – Vol. 97, № 4. – P. 1144–1146.

188 Méndez-Ferrer S., Chow A., Merad M., Frenette P.S. Circadian rhythms influence hematopoietic stem cells // Current Opinion in Hematology. – 2009. – Vol. 16, № 4. – P. 235–242.

189 Scheiermann C., Kunisaki Y., Frenette P.S. Circadian control of the immune system // Nature Reviews Immunology. – 2013. – Vol. 13, № 3. – P. 190–198.

190 Huo M., Huang Y., Qu D., Zhang H., Wong W.T., Chawla A., Huang Y., Tian X.Y. Myeloid Bmal1 deletion increases monocyte recruitment and worsens atherosclerosis // FASEB J. – 2017. – Vol. 31, № 3. – P. 1097–1106.

191 Абдолла Н., Перфильева Ю.В., Тлеулиева Р, Остапчук Е.О. Тышқандардағы супрессорлық потенциялы бар меилоидтық супрессорлық жасушалардың адыюант артрит және жарықтық стресс кездеріндегі көбеюі // Студенттер мен жас ғалымдардың IV халықаралық ғылыми конференциясы «Фараби әлемі». - Алматы. – 2017. – Б. 26.

192 Chen M.F., Kuan F.C., Yen T.C., Lu M.S., Lin P.Y., Chung Y.H., Chen W.C., Lee K. Der. IL-6-stimulated CD11b + CD14 + HLA-DR - myeloid-derived suppressor cells, are associated with progression and poor prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus // Oncotarget. – 2014. – Vol. 5, № 18. – P. 8716–8728.

193 Humphreys D., Schlesinger L., Lopez M., Araya A.V. Interleukin-6 production and deregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in patients with major depressive disorders // Endocrine. – 2006. – Vol. 30, № 3. – P. 371–376.

194 Wiercińska-Drapalo A., Flisiak R., Prokopowicz D. Effects of ulcerative colitis activity on plasma and mucosal prostaglandin E2 concentration // Prostaglandins Other Lipid Mediat. – 1999. – Vol. 58, № 2–4. – P. 159–165.

195 Massague J. TGFbeta in Cancer // Cell. – 2008. – Vol. 134, № 2. – P. 215–230.

196 Flavell R.A., Sanjabi S., Wrzesinski S.H., Licona-Limón P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFÎ 2 // Nature Reviews Immunology. – 2010. – Vol. 10, № 8. – P. 554–567.

197 Kim R., Emi M., Tanabe K. Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses // Cancer Biology and Therapy. – 2005. – Vol. 4, № 9. – P. 924–933.

198 Fonken L.K., Weil Z.M., Nelson R.J. Mice exposed to dim light at night exaggerate inflammatory responses to lipopolysaccharide // Brain. Behav. Immun. –

2013. – Vol. 34. – P. 159–163.

199 Reiter R.J. Melatonin: The chemical expression of darkness // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 1991. – Vol. 79, № 1–3. – P. C153–C158.

200 Touitou Y., Reinberg A., Touitou D. Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of circadian disruption // *Life Sciences.* – 2017. – Vol. 173. – P. 94–106.

201 Miller S.C., Pandi P.S.R., Esquifino A.I., Cardinali D.P., Maestroni G.J.M. The role of melatonin in immuno-enhancement: Potential application in cancer // *International Journal of Experimental Pathology.* – 2006. – Vol. 87, № 2. – P. 81–87.

202 Chahbouni M., Escames G., Venegas C., Sevilla B., García J.A., López L.C., Muñoz-Hoyos A., Molina-Carballo A., et al. Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and nitrosative/oxidative stress in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy // *J. Pineal Res.* – 2010. – Vol. 48, № 3. – P. 282–289.

203 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 // *Inflamm. Res.* – 2017. – Vol. 66, № 8. – P. 711–724.

204 Taniguchi K., Karin M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age // *Nature Reviews Immunology.* – 2018. – Vol. 18, № 5. – P. 309–324.

205 Абдолла Н., Перфильева Ю.В., Тлеулиева Р., Остапчук Е.О., Красноштанов В.К., Тулеуханов С.Т., Беляев Н.Н. Созылмалы қабыну белсендендірген миелоидты супрессорлық жасушалар (MDSCS) ісіктің өсуін ынталандырады // *КазҰМУ хабаршысы.* – 2018. № 2. – Б. 333–336.

206 Le H.K., Graham L., Cha E., Morales J.K., Manjili M.H., Bear H.D. Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice // *Int. Immunopharmacol.* – 2009. – Vol. 9, № 7–8. – P. 900–909.

207 Annels N.E., Shaw V.E., Gabitass R.F., Billingham L., Corrie P., Eatock M., Valle J., Smith D., et al. The effects of gemcitabine and capecitabine combination chemotherapy and of low-dose adjuvant GM-CSF on the levels of myeloid-derived suppressor cells in patients with advanced pancreatic cancer // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2014. – Vol. 63, № 2. – P. 175–183.

208 Suzuki E., Kapoor V., Jassar A.S., Kaiser L.R., Albelda S.M. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b + myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11, № 18. – P. 6713–6721.

209 Belyaev N.N. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) as a main tumor induced negative regulators of cancer immunity and possible ways for their elimination // *Kaznu. Bull. Biol. Ser.* – 2014. – Vol. 60, № 1(1). – P. 79–83.

210 Abdolla N., Perfilyeva Y.V., Tleulieva R. Myeloid derived suppressor cells induced by chronic inflammation facilitate tumor development // *Materials*

international scientific Conference of Students and Young Scientists "Farabi Alemi ". - Almaty. – 2018. – P. 86.

211 Springer T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm // *Cell*. – 1994. – Vol. 76, № 2. – P. 301–314.

212 Highfill S.L., Rodriguez P.C., Zhou Q., Goetz C.A., Koehn B.H., Veenstra R., Taylor P.A., Panoskaltsis-Mortari A., et al. Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13 // *Blood*. – 2010. – Vol. 116, № 25. – P. 5738–5747.

213 Liechtenstein T., Perez-Janices N., Gato M., Caliendo F., Kochan G., Blanco-Luquin I., van der Jeught K., Arce F., et al. A highly efficient tumor-infiltrating MDSC differentiation system for discovery of anti-neoplastic targets, which circumvents the need for tumor establishment in mice // *Oncotarget*. – 2014. – Vol. 5, № 17. – P. 7843–7857.

214 Garrood T., Lee L., Pitzalis C. Molecular mechanisms of cell recruitment to inflammatory sites: General and tissue-specific pathways // *Rheumatology*. – 2006. – Vol. 45, № 3. – P. 250–260.

215 Yu X., Zeng J., Xie J. Navigating through the maze of TLR2 mediated signaling network for better mycobacterium infection control // *Biochimie*. – 2014. – Vol. 102, № 1. – P. 1–8.

216 Kozhanova S., Bizhigitova B., Tarabayeva A., Bitanova E. The significance of pattern recognition receptors in the pathogenesis of some diseases // *Bull. NASRK*. – 2015. – Vol. 2, № 354. – P. 148–155.

217 Bosisio D., Polentarutti N., Sironi M., Bernasconi S., Miyake K., Webb G.R., Martin M.U., Mantovani A., et al. Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon- γ : A molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide // *Blood*. – 2002. – Vol. 99, № 9. – P. 3427–3431.

218 Scheller J., Ohnesorge N., Rose-John S. Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer // *Scandinavian Journal of Immunology*. – 2006. – Vol. 63, № 5. – P. 321–329.

219 Sims J.E., Smith D.E. The IL-1 family: Regulators of immunity // *Nature Reviews Immunology*. – 2010. – Vol. 10, № 2. – P. 89–102.

220 Zelová H., Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances // *Inflammation Research*. – 2013. – Vol. 62, № 7. – P. 641–651.

221 Kim R., Emi M., Tanabe K., Arihiro K. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression // *Cancer Research*. – 2006. – Vol. 66, № 11. – P. 5527–5536.

222 Gargett T., Christo S.N., Hercus T.R., Abbas N., Singhal N., Lopez A.F., Brown M.P. GM-CSF signalling blockade and chemotherapeutic agents act in concert to inhibit the function of myeloid-derived suppressor cells in vitro // *Clin. Transl. Immunol*. – 2016. – Vol. 5, № 12. – P. e119.

223 Haribabu B., Richardson R.M., Fisher I., Sozzani S., Peiper S.C., Horuk R.,

Ali H., Snyderman R. Regulation of human chemokine receptors CXCR4: Role of phosphorylation in desensitization and internalization // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, № 45. – P. 28726–28731.

224 Yang L., Huang J., Ren X., Gorska A.E., Chytil A., Aakre M., Carbone D.P., Matrisian L.M.M., et al. Abrogation of TGF β Signaling in Mammary Carcinomas Recruits Gr-1+CD11b+ Myeloid Cells that Promote Metastasis // *Cancer Cell.* – 2008. – Vol. 13, № 1. – P. 23–35.

225 Andrés Cerezo L., Remáková M., Tomčík M., Gay S., Neidhart M., Lukanidin E., Pavelka K., Grigorian M., et al. The metastasis-associated protein S100A4 promotes the inflammatory response of mononuclear cells via the TLR4 signalling pathway in rheumatoid arthritis // *Rheumatol. (United Kingdom).* – 2014. – Vol. 53, № 8. – P. 1520–1526.

226 Cheng P., Corzo C.A., Luetke N., Yu B., Nagaraj S., Bui M.M., Ortiz M., Nacker W., et al. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein // *J. Exp. Med.* – 2008. – Vol. 205, № 10. – P. 2235–2249.

227 Guo C., Hu F., Yi H., Feng Z., Li C., Shi L., Li Y., Liu H., et al. Myeloid-derived suppressor cells have a proinflammatory role in the pathogenesis of autoimmune arthritis // *Ann. Rheum. Dis.* – 2016. – Vol. 75, № 1. – P. 278–285.

228 Abdolla N., Perfilyeva Y.V., Ostapchuk Y.O., Tleulieva R., Krasnoshtanov V.C., Belyaev N.N. Expansion of CD62L-expressing myeloid-derived suppressor cells in inflammation-related tumor progression // *Biol. Markers Fundam. Clin. Med. (collection Abstr.).* – 2018. – Vol. 2, № 2. – P. 12–12.

229 Liu X., Ming Y., Chen L., Peng L., Ye Q., Zheng S., Fan Z. TNF- α and G-CSF induce CD62L and CD106 expressions on rat bone marrow-derived MSCs // *Asian Biomed.* – 2012. – Vol. 6, № 3. – P. 453–458.

230 Jung S., Unutmaz D., Wong P., Sano G.I., De Los Santos K., Sparwasser T., Wu S., Vuthoori S., et al. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens // *Immunity.* – 2002. – Vol. 17, № 2. – P. 211–220.

231 Thaiss C.A., Semmling V., Franken L., Wagner H., Kurts C. Chemokines: A New Dendritic Cell Signal for T Cell Activation // *Front. Immunol.* – 2011. – Vol. 2, № AUG. – P. 1–9.

232 Xiang X., Liu Y., Zhuang X., Zhang S., Michalek S., Taylor D.D., Grizzle W., Zhang H.G. TLR2-mediated expansion of MDSCs is dependent on the source of tumor exosomes // *Am. J. Pathol.* – 2010. – Vol. 177, № 4. – P. 1606–1610.

233 Shime H., Maruyama A., Yoshida S., Takeda Y., Matsumoto M., Seya T. Toll-like receptor 2 ligand and interferon- γ suppress anti-tumor T cell responses by enhancing the immunosuppressive activity of monocytic myeloid-derived suppressor cells // *Oncoimmunology.* – 2018. – Vol. 7, № 1. – P. e1373231.

234 Абдолла Н., Перфильева Ю.В., Тлеулиева Р.Т., Кали А., Остапчук Е.О., Красноштанов В.К., Габрилович Д.И., Беляев Н.Н. Идентификация ингибиторов активности миелоидных супрессорных клеток (MDSC) с использованием культуры MDSC, генерированных в условиях *in vitro* //

Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий». - Санкт-Петербург, - 2019. - С. 27.

235 Perfilyeva Y. V., Abdolla N., Ostapchuk Y.O., Tleulieva R., Krasnoshtanov V.C., Perfilyeva A. V., Belyaev N.N. Chronic Inflammation Contributes to Tumor Growth: Possible Role of I-Selectin-Expressing Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs) // *Inflammation*. – 2019. – Vol. 42, № 1. – P. 276–289.

236 Monsuez J.J., Charniot J.C., Vignat N., Artigou J.Y. Cardiac side-effects of cancer chemotherapy // *International Journal of Cardiology*. – 2010. – Vol. 144, № 1. – P. 3–15.

237 Shiota G., Miura N. Biomarkers for hepatocellular carcinoma // *Clinical Journal of Gastroenterology*. – 2012. – Vol. 5, № 3. – P. 177–182.

238 Isonishi S., Ogura A., Kiyokawa T., Suzuki M., Kunito S., Hiramama M., Tachibana T., Ochiai K., et al. Alpha-fetoprotein (AFP)-producing ovarian tumor in an elderly woman // *Int. J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 14, № 1. – P. 70–73.

239 Mizejewski G.J. Biological roles of alpha-fetoprotein during pregnancy and perinatal development // *Experimental Biology and Medicine*. – 2004. – Vol. 229, № 6. – P. 439–463.

240 Mizejewski G.J. Biological role of α -fetoprotein in cancer: Prospects for anticancer therapy // *Expert Review of Anticancer Therapy*. – 2002. – Vol. 2, № 6. – P. 709–735.

241 Lutsenko S. V., Feldman N.B., Finakova G. V., Gukasova N. V., Petukhov S.P., Posypanova G.A., Skryabin K.G., Severin S.E. Antitumor activity of alpha fetoprotein and epidermal growth factor conjugates in vitro and in vivo // *Tumor Biol.* – 2000. – Vol. 21, № 6. – P. 367–374.

242 Pak V. The use of α -fetoprotein for the delivery of cytotoxic payloads to cancer cells // *Therapeutic Delivery*. – 2014. – Vol. 5, № 8. – P. 885–892.

243 Talmadge J.E., Gabrilovich D.I. History of myeloid-derived suppressor cells // *Nature Reviews Cancer*. – 2013. – Vol. 13, № 10. – P. 739–752.

244 Sinenko S.A., Belyaev N.N., Kuzovlev V.D. The immunochemical distinctions of human alpha-fetoprotein preparations as revealed with novel monoclonal antibodies // *Reports AS RK*. – 1999. № 1. – P. 72–80.

245 Baker M.E. Evolution of alpha-fetoprotein: Sequence comparisons among AFP species and with albumin species // *Tumor Biol.* – 1988. – Vol. 9, № 2–3. – P. 123–136.

246 Chakraborty M., Mandal C., Chakraborty M. Immuno-suppressive effect of human alphafetoprotein: A Cross species study // *Immunol. Invest.* – 1993. – Vol. 22, № 5. – P. 329–339.

247 Mizejewski G.J. Review of the putative cell-surface receptors for alpha-fetoprotein: Identification of a candidate receptor protein family // *Tumor Biology*. – 2011. – Vol. 32, № 2. – P. 241–258.

248 Suzuki Y., Zeng C.Q.Y., Alpert E. Isolation and partial characterization of a specific alpha-fetoprotein receptor on human monocytes // *J. Clin. Invest.* – 1992. –

Vol. 90, № 4. – P. 1530–1536.

249 Абдолла Н., Перфильева Ю.В., Остапчук Е.О., Оскольченко И.А., Красноштанов В.К., Северова Е.А., Поминова Н.М., Денисов Ю.Д., Беляев Н.Н. Тәжірибелік созылмалы қабыну кезіндегі миелоидық супрессорлық жасушалар // ҚазҰУ хабаршысы. Биология сериясы. – 2016. – Т. 67, № 2. – Б. 179–186.

250 Оскольченко И.А., Абдолла Н., Абрамова В.А. Перфильева Ю. Анализ связывания альфа-фетопротейна с миелоидными супрессорными клетками костного мозга // Материалы международной конференции студентов и молодых ученых «Фараби әлемі». - Алматы. – 2015. – С. 45.

251 Peterson P.K., Verhoef J., Quie P.G. Influence of temperature on opsonization and phagocytosis of staphylococci. // *Infect. Immun.* – 1977. – Vol. 15, № 1. – P. 175–179.

252 Wang X., Wang Q. Alpha-Fetoprotein and Hepatocellular Carcinoma Immunity // *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2018. – Vol. 2018. – P. 1–8.

253 Пат. 32074 РК. Способ определения связывания миелоидных супрессорных клеток с альфа-фетопротейном // Беляев Н.Н., Абдолла Н., Перфильева Ю.В., Остапчук Е.О., Абрамова В.А., Кузовлев В.А., Красноштанов В.К.; 18.04.2017.

254 Balendiran G. Fibrates in the Chemical Action of Daunorubicin // *Curr. Cancer Drug Targets.* – 2009. – Vol. 9, № 3. – P. 366–369.

255 Owattanapanich W., Owattanapanich N., Kungwankiattichai S., Ungprasert P., Ruchutrakool T. Efficacy and Toxicity of Idarubicin Versus High-dose Daunorubicin for Induction Chemotherapy in Adult Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-analysis // *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.* – 2018. – Vol. 18, № 12. – P. 814-821.e3.

256 Bogdanov A.Y., Bogdanova T.M., Ilin A.I. Endocytic pathway of alpha-fetoprotein in mouse bone marrow hematopoietic stem cells: Molecular characterization and role in biological activity modification // *Cytol. Genet.* – 2014. – Vol. 48, № 1. – P. 21–32.

257 Djeu J., Wei S. Chemoimmunomodulation of MDSCs as a novel strategy for cancer therapy // *OncoImmunology.* – 2012. – Vol. 1, № 1. – P. 121–122.

258 Haverkamp J.M., Smith A.M., Weinlich R., Dillon C.P., Qualls J.E., Neale G., Koss B., Kim Y., et al. Myeloid-derived suppressor activity is mediated by monocytic lineages maintained by continuous inhibition of extrinsic and intrinsic death pathways // *Immunity.* – 2014. – Vol. 41, № 6. – P. 947–959.

259 Vivier E., Tomasello E., Baratin M., Walzer T., Ugolini S. Functions of natural killer cells // *Nature Immunology.* – 2008. – Vol. 9, № 5. – P. 503–510.

260 Liu C., Yu S., Kappes J., Wang J., Grizzle W.E., Zinn K.R., et al. Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host // *Blood.* – 2007. – Vol. 109, № 10. – P.4336–4342.

261 Fridman W.H., Pagès F., Sauts-Fridman C., Galon J. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome // *Nature Reviews Cancer.* – 2012. – Vol. 12, № 4. – P. 298–306.

262 Levi I., Amsalem H., Nissan A., Darash-Yahana M., Peretz T.,

Mandelboim O., Rachmilewitz J. Characterization of tumor infiltrating Natural Killer cell subset // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6, № 15. – P. 1–9.

263 Nakano O., Naito Y., Nagura H., Ohtani H., Nakano O., Sato M., Suzuki K., Orikasa S., et al. Proliferative activity of intratumoral CD8+ T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: Clinicopathologic demonstration of antitumor immunity // *Cancer Res*. – 2001. – Vol. 61, № 13. – P. 5132–5136.

264 Chen L., Watkins J.F. Evidence against the presence of H2 histocompatibility antigens in ehrlich ascites tumour cells // *Nature*. – 1970. – Vol. 225, № 5234. – P. 734–735.

265 Nishikawa H., Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity // *International Journal of Cancer*. – 2010. – Vol. 127, № 4. – P. 759–767.

266 Абдолла Н., Перфильева Ю.В., Остапчук Е.О., Қали А., Абрамова В.А. Оскольченко И.А. Беяев Н.Н. AFP-DR конъюгаты көмегімен тышқан моделінде MDSC элиминациясын тудырып ісіктің өсуін баяулату // Халықаралық ғылыми-практикалық конференция «биотехнологияның заманауи мәселелері: зертханалық зерттеулерден өндіріске». - Алматы. – 2016. – Б. 157–158.

267 Belyaev N.N., Abdolla N., Perfilyeva Y. V., Ostapchuk Y.O., Krasnoshtanov V.K., Kali A., Tleulieva R. Daunorubicin conjugated with alpha-fetoprotein selectively eliminates myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and inhibits experimental tumor growth // *Cancer Immunol. Immunother*. – 2018. – Vol. 67, № 1. – P. 101–111.

ҚОСЫМША А



ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ

№ 97890

АВТОРДЫҢ КУӘЛІГІ

Абдолла Нуршат (KZ)

және Беляев Николай Николаевич (KZ); Перфильева Юлия Викторовна (KZ); Остапчук Екатерина Олеговна (KZ); Абрамова Вера Александровна (KZ); Кузовлев Владимир Анатольевич (KZ); Красноштанов Владимир Константинович (KZ); Фурсов Олег Владимирович (KZ)

өнертабыс авторы(лары) болып табылатындығы осымен куәландырылады

(11) 32074


(54) Миелоидтық супрессорлық жасушаның альфа-фетопротеинмен байланысуын анықтау тәсілі

(73) *Патент иеленушісі:* Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігі Ғылым Комитетінің "М.А. Айтхожин атындағы Молекулярлық биология және биохимия институты" шаруашылық жүргізу құқығындағы республикалық мемлекеттік кәсіпорны (KZ)

(21) 2015/1336.1

(22) 13.11.2015

Қазақстан Республикасы
Әділет министрінің орынбасары



Э. Әзімова

ҚОСЫМША Ә



(19) **ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ**

ӨНЕРТАБЫСҚА

(11) **№ 32074**

(12) **ПАТЕНТ**

(54) **АТАУЫ:** Миелоидтық супрессорлық жасушаның альфа-фетопротеинмен байланысуын анықтау тәсілі

(73) **ПАТЕНТ ИЕЛЕНУШІСІ:** Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігі Ғылым Комитетінің "М.А. Айтхожин атындағы Молекулярлық биология және биохимия институты" шаруашылық жүргізу құқығындағы республикалық мемлекеттік кәсіпорны (KZ)

(72) **АВТОР (АВТОРЛАР):** Беляев Николай Николаевич (KZ); Абдолла Нуршат (KZ); Перфильева Юлия Викторовна (KZ); Остапчук Екатерина Олеговна (KZ); Абрамова Вера Александровна (KZ); Кузовлев Владимир Анатольевич (KZ); Красноштанов Владимир Константинович (KZ); Фурсов Олег Владимирович (KZ)

(21) **Өтінім №** 2015/1336.1

(22) **Өтінім берілген күн:** 13.11.2015

18.04.2017 Қазақстан Республикасы Өнертабыстардың мемлекеттік тізілімінде тіркелді.

Патентті күшінде ұстау ақысы уақытылы төленген жағдайда, патенттің күші Қазақстан Республикасының бүкіл аумағында қолданылады.

**Қазақстан Республикасы
Әділет министрінің орынбасары**

Э. Әзімова

Өзгерістер енгізу туралы мәліметтер осы патентке қосымша түрінде жеке парақта келтіріледі

002719