

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ВЫДЕЛЕНИЮ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ИЗ СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК METHODOLOGICAL APPROACH TO LYMPHOID CELLS ISOLATION FROM MUCOSA

**Д. Цеханович¹, А. Старостин², О. Дыбов², Н. Манаева², Д. Нужегородова^{1,2}
D. Tsekhanovich¹, A. Starastin², A. Dybau², N. Manaeva², D. Nizheharodava^{1,2}**

¹Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ
г. Минск, Республика Беларусь
kaf_immunal@iseu.by

²Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск, Республика Беларусь

¹International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU
Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

Лимфоциты являются неотъемлемым компонентом иммунной системы, постоянно рециркулирующими между вторичными лимфоидными органами, включая слизистые оболочки организма. На сегодняшний день большой интерес представляет изучение гетерогенной популяции резидентных лимфоцитов, среди которых особое внимание уделяется интраэпителиальным лимфоцитам (IEL) желудочно-кишечного тракта и опухоль-инфильтрирующим лимфоцитам (TIL). Обладая широким спектром биологических свойств, резидентные лимфоциты выполняют специализированные функции врожденного и приобретенного иммунитета, а также взаимодействуют с другими типами иммунных клеток для поддержания целостности тканей и гомеостаза как в норме, так и при патологических состояниях. Несмотря на активное изучение данных популяций, на сегодняшний день отсутствуют универсальные протоколы выделения мукозальных лимфоидных клеток, что затрудняет интерпретацию данных, полученных в ходе различных исследований. В данной статье представлена оптимальная методология выделения лимфоидных клеток из слизистой оболочки дыхательной и пищеварительной системы человека.

Lymphocytes are an integral component of the immune system, constantly recirculating between secondary lymphoid organs, including the mucous membranes of the body. The study of heterogeneous resident lymphocytes' population, among which special attention is paid to intraepithelial lymphocytes (IEL) of the gastrointestinal tract and tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) is of great interest. Possessing a wide range of biological properties, resident lymphocytes perform specialized functions of innate and adaptive immunity, as well as interact with other types of immune cells to maintain tissue integrity and homeostasis both in normal and pathological conditions. Despite the active study of these populations, to date there are no universal protocols of mucosal lymphoid cell isolation, which makes it difficult to interpret the data obtained in the course of various studies. This article presents the optimal methodology for the isolation of lymphoid cells from the mucous membrane of the human respiratory and digestive systems.

Ключевые слова: интраэпителиальные лимфоциты, опухоль-ассоциированные лимфоциты, клеточная диссоциация, иммунопатология.

Keywords: intraepithelial lymphocytes, tumor-associated lymphocytes, cell dissociation, immunopathology.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2023-1-288-291>

Введение. Слизистые оболочки являются первой линией защиты организма, которые контактируют с большим количеством как комменсальных, так и патогенных микроорганизмов, и участвуют в поддержании и формировании необходимого симбиоза между организмом человека и микробиотой. Иммунная система слизистых оболочек как физический барьер препятствует проникновению патогенных микроорганизмов и иммуногенных компонентов во внутреннюю среду, но наряду с этим выполняет важную задачу по индукции толерантности к различным антигенным структурам. Современные концепции этиологии иммунопатологических состояний рассматривают роль патологической активации мукозального иммунитета в результате постоянной стимуляции и длительного присутствия определенных факторов роста и воспалительных сигналов в условиях хронических инфекций, злокачественной онкопатологии или аутоиммунного воспаления. При этом основную линию защиты в слизистых оболочках осуществляют ткане-резидентные лимфоидные клетки. Современная классификация выделяет несколько субпопуляций данной группы лимфоцитов. В настоящее время особое интерес представляют популяции интраэпителиальных лимфоцитов кишечника (IEL), которые непосредственно участвуют в воспалительных заболеваниях кишечника, и опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL), представляющие

собой мигрирующие из периферии и лимфоидных органов лимфоциты. Подвергаясь постоянному воздействию агрессивных факторов внешней среды, таких как неправильное питание, длительный прием лекарственных препаратов, вредные привычки, загрязнение воздуха (повышенная концентрация диоксида азота, окиси углерода, и других дисперсных частицы), высокий уровень психологического стресса, хронические инфекции ЖКТ и дыхательной системы, могут приводить к изменению концентрации резидентных клеток в тканях слизистой оболочки с нарушением их жизнеспособности, что безусловно приводит к патологическому состоянию.

IEL включают гетерогенную популяцию лимфоидных клеток, формирующих вместе с энтероцитами слизистый барьер желудочно-кишечного тракта. IEL локализуются базально между эпителиальными клетками слизистой оболочки, в особенности в тех местах, которые соприкасаются с внешней средой, и играют решающую роль в поддержании гомеостаза и защитного иммунитета, являясь важными посредниками между микробиотой и адаптивной иммунной системой. Основные механизмы для реализации толерантности IEL осуществляются за счет контактного ингибирования посредством супрессивных молекул (CTLA-4, PD-1), секреции противовоспалительных цитокинов (TGF β , IL-10 и IL-35), секвестрации факторов роста (IL-2 - необходимым для активации эффекторных клеток), метаболической активности (расщепление АТФ до аденозина с ограничением провоспалительного действия иммунных клеток). В то же время aberrantные или неконтролируемые IEL, индуцированные Th-профилем, почти всегда вовлечены в формирование иммунопатологических состояний (органоспецифические аутоиммунные синдромы, синдромы хронического воспаления в ткани и др.) и играют большую роль в деструкции ткани, которая ставит под угрозу барьерную функцию эпителия слизистой оболочки. Рядом авторов продемонстрирована прямая корреляция между количеством IEL в слизистой оболочке кишечника и тяжестью заболевания у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника [1].

TIL являются опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами, которые также высоко гетерогенны по своему составу и непосредственно участвуют в антиген-специфическом противоопухолевом иммунитете, являясь важным компонентом микроокружения новообразования. В последние годы данная популяция лимфоцитов рассматривается в качестве потенциальной терапевтической мишени при лечении злокачественных новообразований. На ранней стадии онкологического заболевания наличие TIL коррелирует с патологическим ответом: сниженная активность ограничивает их способность преодолевать рост опухоли. Увеличение количества и активности TIL способствует супрессии роста новообразования посредством выработки цитокинов (TNF, IL-6, IL-21, TGF β) и ингибирования клеточных рецепторов опухоли. Недостаток исследований о микроокружении опухоли является одной из причин лимитированного успеха первичной терапии TIL. Несмотря на появление генетически-конструированных TIL, сделавших революцию в методах иммунотерапии рака, гетерогенность отдельных опухолей слизистых оболочек требует углубленного изучения данной популяции клеток [2].

Необходимость в улучшении диагностики и поиск новых патогенетических мишеней обусловлена растущей заболеваемостью иммунопатологии, а современные протоколы выделения мукозальных лимфоидных клеток не в полном объеме отражают иммунные процессы, происходящие в патологическом очаге. Несмотря на многочисленные исследования ткане-резидентных лимфоидных клеток на экспериментальных моделях животных и человека, их потенциальное клиническое значение до сих пор полностью не установлено, что и определяет актуальность данного исследования. Цель исследования – оптимизировать протоколы выделения IEL и TIL из слизистых оболочек у пациентов с иммунопатологическими состояниями.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования послужили образцы тканей, выделенных у пациентов с новообразованиями слизистой оболочки носа и околоносовых пазух (группа 1 – доброкачественные, группа 2 – злокачественные) и их группы сравнения (группа 3 – доноры с полипозным риносинуситом), а также у пациентов с воспалительными аутоиммунными заболеваниями кишечника (группа 4) и их группы сравнения (группа 5 – здоровые доноры). Клинико-демографическая характеристика групп представлена в таблице 1. Диагнозы подтверждены морфологическим исследованием биопсийного материала.

Таблица 1

Клинико-демографическая характеристика исследуемых групп

Группы		Количество, <i>n</i>	Тип лимфоидных клеток	Пол, М/Ж	Возраст, года
Группа 1	Пациенты с доброкачественными опухолями полости носа	6	TIL	4/2	63,5 [45,7 ÷ 69,2]
Группа 2	Пациенты со злокачественными опухолями полости носа	8	TIL	5/3	58,0 [45,0 ÷ 61,0]
Группа 3	Доноры с полипозным риносинуситом	5	TIL	3/2	47,0 [41,0 ÷ 58,0]
Группа 4	Пациенты с воспалительными заболеваниями кишечника	7	IEL	5/2	26,0 [22,5 ÷ 41,5]
Группа 5	Здоровые доноры	5	IEL	3/2	32,0 [27,0 ÷ 48,0]

Примечание: IEL – интраэпителиальные лимфоциты кишечника, TIL – опухоль-инфильтрирующие лимфоциты.

Программную механическую диссоциацию тканей проводили с помощью диссоциатора GentleMACS™ Dissociator (Германия). Ферментативную диссоциацию выполняли с использованием наборов реагентов для первичной диссоциации опухолевых тканей (Tumor Dissociation Kit, Miltenyi Biotec) и тканей кишечника (Lamina Propria Dissociation Kit, Miltenyi Biotec). Концентрацию подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность определяли по окрашиванию трипановым синим.

Результаты представляли в виде медианы и 25-го и 75-го процентилей. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 8.0.

Результаты и обсуждение. Методология выделения TIL у пациентов с новообразованиями слизистой полости носа и околоносовых пазух представлена на рисунке 1А. Биопсийный материал слизистой оболочки измельчали на мелкие кусочки размером 2–4 мм². Полученный образец добавляли в пробирку, содержащую смесь ферментов: 100 мкл фермента Н, 50 мкл фермента R и 12,5 мкл фермента А, входящих в комплект набора реагентов и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С при непрерывном вращении ротатора. После это дважды проводили программную диссоциацию ткани с последующим инкубированием в течение 30 мин при 37 °С. Ресуспендированную клеточную суспензию пропускали через сетчатый фильтр CellStrainer с порами 100 мкм. Образовавшуюся клеточную суспензию центрифугировали при 300 g 10 мин и после удаления супернатанта определяли концентрацию и жизнеспособность клеток (таблица 2).

Таблица 2

Концентрация и жизнеспособность TIL у пациентов с синоназальными новообразованиями

Группы		Тип лимфоидных клеток	Концентрация клеток на 1 г ткани, ×10 ⁶	Жизнеспособность
Группа 1	Пациенты с доброкачественными опухолями полости носа	TIL	27,3 ** [25,5 ÷ 35,3]	86,4 [85,2 ÷ 90,5]
Группа 2	Пациенты с злокачественными опухолями полости носа	TIL	23,7 ** [13,1 ÷ 24,7]	87,1 [85,0 ÷ 95,6]
Группа 3	Доноры с полипозным риносинуситом	TIL	14,9 [13,6 ÷ 16,2]	90,3 [87,6 ÷ 97,9]

*Примечание: TIL – опухоль-инфильтрирующие лимфоциты; **p<0,05.*

В ходе проведенной механической и ферментативной диссоциации тканей получены иммунокомпетентные клетки лимфоидного происхождения. Показано статистически значимое увеличение процентного содержания TIL в 1,8 раза у пациентов с доброкачественными опухолями, как и у пациентов со злокачественными опухолями в 1,6 раза по отношению к группе сравнения ($p<0,05$) с незначительным снижением клеточной жизнеспособности, что непосредственно связано с локальным микроокружением опухоли. Значительное присутствие TIL в новообразовании может указывать на активный иммунный ответ, направленный на распознавание опухолевых антигена. И наоборот, взаимодействие между опухолевыми клетками и TIL могут создавать иммуносупрессивную сеть, которая приводит к уклонению опухоли от иммунного надзора и ослаблению иммунотерапевтической эффективности. Механизмы, участвующие в данном процессе включают экспрессию мембранного лиганда FasL путем клеточного контакта в микроокружении опухоли, интенсивную лейкоцитарную инфильтрацию, состоящую преимущественно из Т-клеток и макрофагов, однако, как реализуются данные механизмы еще не до конца изучено [3].

Методология выделения IEL у пациентов с воспалительными аутоиммунными заболеваниями кишечника представлена на рисунке 1Б. Биопсийный материал слизистой оболочки измельчали на мелкие кусочки размером 0,5 см², которые переносили в пробирку, содержащую 20 мл раствора для первичной диссоциации (5 mM EDTA – этилендиаминуксусная кислота, 5% FBS – фетальная бычья сыворотка, 1 mM DTT – дитиотреитол), и инкубировали в течение 20 мин при 37 °С при непрерывном вращении ротатора. Полученную суспензию фильтровали через сетчатый фильтр CellStrainer с порами 70 мкм и собирали осадок, повторяя процедуру несколько раз. Образовавшуюся клеточную суспензию отмывали при 300 g в течение 10 мин, удаляли супернатант и определяли полученную концентрацию и жизнеспособность клеток (таблица 3).

Таблица 3

Концентрация и жизнеспособность IEL у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника

Группы	Тип лимфоидных клеток	Концентрация клеток на 1 г ткани, ×10 ⁶	Жизнеспособность
Группа 4	IEL	30,1 ** [27,9 ÷ 39,0]	88,8 [86,1 ÷ 94,6]
Группа 5	IEL	19,4 [15,6 ÷ 24,7]	92,1 [89,0 ÷ 98,3]

*Примечание: IEL – интраэпителиальные лимфоциты кишечника, **p<0,05.*

Установлено достоверное увеличение процентного содержания IEL клеток у пациентов с воспалительными аутоиммунными заболеваниями кишечника в 1,5 раз, по отношению к здоровым донорам ($p < 0,05$), что свидетельствует об активности аутоиммунного процесса. Повышение IEL в тканях нарушает баланс между иммунной толерантностью и иммунным ответом на собственные антигены при аутоиммунном воспалении, что может приводить к повреждению эпителия кишечника.

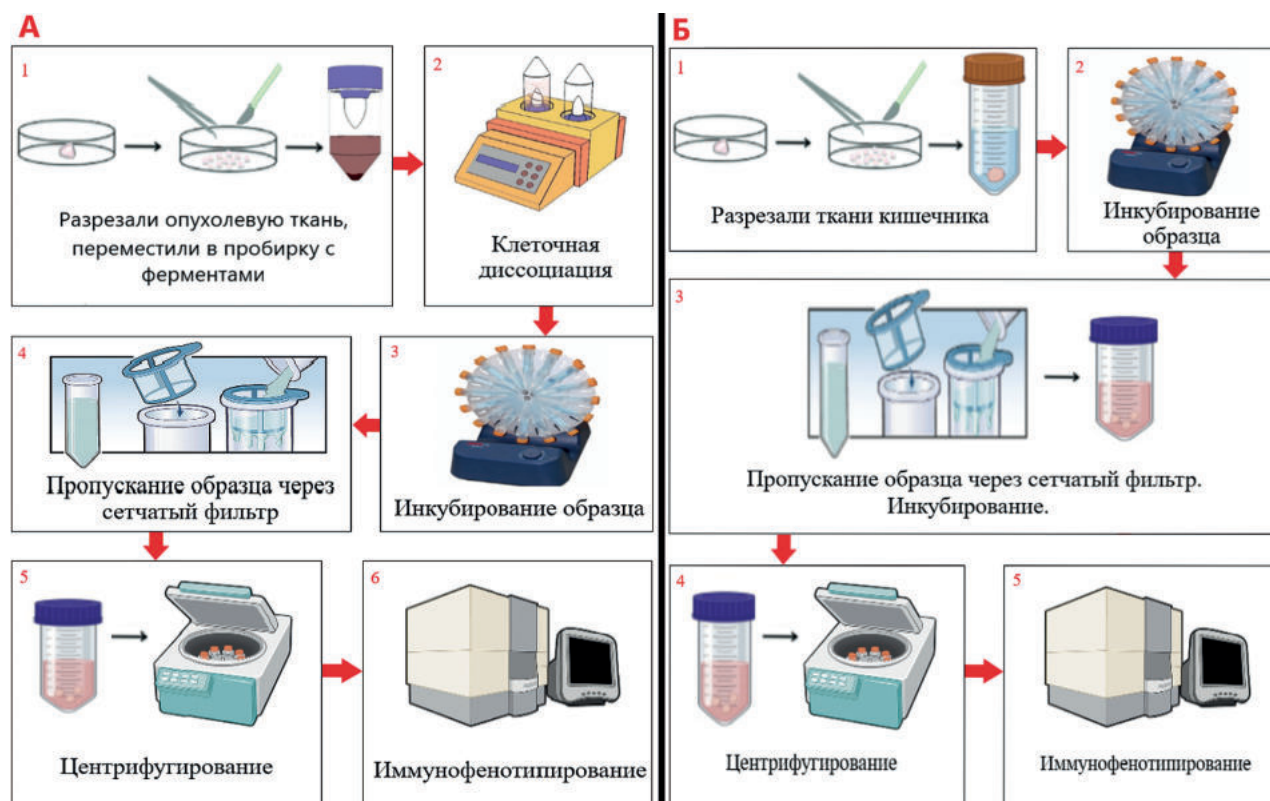


Рисунок 1 – Методология выделения лимфоидных клеток у пациентов с новообразованиями слизистой оболочки полости носа и околоносовых пазух (А) и с аутоиммунными воспалительными заболеваниями кишечника (Б)

Согласно литературным данным увеличение IEL в дистальных участках ворсинок сопряжено с нарушением нормального распознавание антигенных паттернов, что вызывает диффузную инфильтрацию ворсинчатого эпителия и последующую его атрофию [4]. В связи с этим, количество IEL представляет собой перспективный маркер потенциального прогрессирования аутоиммунного воспаления слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, однако точный механизм аутоагрессии до сих пор неизвестен.

Закключение. Адаптирование протоколов выделения клеток у пациентов с иммунопатологическими состояниями позволило выделить в ходе первичной комбинированной (механической и ферментативной) диссоциации ткани жизнеспособные опухоль-инфильтрирующие лимфоциты из слизистой полости носа и околоносовых пазух в концентрации 23,7 – 27,3 млн. клеток/г ткани, а также интраэпителиальные лимфоциты из слизистой кишечника в концентрации 30,1 млн. клеток/г ткани, что представляет собой оптимальный клеточный выход для последующего изучения лимфоидных клеток и понимания их молекулярных эффекторных механизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Haoyu, S. Tissue-resident lymphocytes: from adaptive to innate immunity / S. Haoyu [et al.] // Cellular and Molecular Immunology. 2019. № 16. P. 205–215.
2. Chun, C. Tissue-Resident Lymphocytes Across Innate and Adaptive Lineages / C. Chun [et al.] // Frontiers in Immunology. 2018. № 9. P. 2104.
3. Yip, W. K. Increase in tumour-infiltrating lymphocytes with regulatory T cell immunophenotypes and reduced ζ -chain expression in nasopharyngeal carcinoma patients / W. K. Yip [et al.] // Clinical and Experimental Immunology. 2009. № 155. P. 412–422.
4. Chang, F. Pathological and clinical significance of increased intraepithelial lymphocytes (IELs) in small bowel mucosa / F. Chang [et al.] // Review. 2005. № 113. P. 385–99.