Захын цуснаас дархлааны NK эсийг сонгомлоор ялган авч тодорхойлсон дүн

Б.Халиун[1], Э.Намуун[1], З.Гэрэлцэцэг[2], Б.Ариунзаяа[1,2], Н.Золмөнх[1,2], Г.Батбаатар[1], С.Цогтсайхан[1], Д.Нямбаяр[1,3], Т.Хонгорзул[1,2]

[1]АШУҮИС, БАС, Дархлаа судлалын тэнхим;
[2]АШУҮИС, МЯЭ, Эмнэлзүйн Төв Лаборатори;
[3]ХБНГУ, Мюнхений Техникийн Их Сургууль,ТрансплаТУМ Хавдар Судлалын Эрдэм Шинжилгээний Төв
Цахим хаяг: khongorzul.t@mnums.edu.mn, Утас: 99157313

Түлхүүр үг:

Байгалийн устгагч эс
CD 56 микро соронз
Микро соронзоор үйлчилж эс ялгах

Товч утга: Байгалийн устгагч эс (Natural Killer, NK) нь захын цусны лимфоцитийн 5-20 хувийг эзэлдэг, хавдрын эс болон вирусээр халдварлагдсан эсийг хамгийн түрүүнд таньж устгадаг[1]. NK эсийг цэврээр ялган авах нь дархлаа эсийн эмчилгээний үр дүнтэй шууд хамааралтай байдаг[2]. NK эсэд суурилсан хорт хавдрын дархлаа эмчилгээ нь дэлхийн олон оронд хийгдэж байгаа ба NK эсийг сонгомлоор ялган авах нь манай улсад дархлааны эсийн эмчилгээ нэвтрэхэд суурь судалгааны нэг хэсэг болно. Судалгаанд сайн дурын оролцогчийн захын цусыг шинжлэгдэхүүн болгон ашиглав. Захын цуснаас мононуклеар эсүүдийг фиколлын уусмал ашиглан нягтын зөрүүгээр ялган авав. Мононуклеар эсүүдээс NK эсийг CD56 микро соронз ашиглан соронзтой холбогдсон эсийг ялган авах технологи (Magnetic Activated Cell Sorting, MACS, Miltenyi Biotec, Germany) ашиглан ялган авав. Судалгааг “Дархлаа хяналтын дэвшилтэт технологийг нутагшуулах, арга зүйг боловсруулан эмнэлзүйн практикт нэвтрүүлэх нь” төслийн хүрээнд АШУҮИС-ийн Монгол-Японы эмнэлгийн Эмнэлзүйн Төв Лаборатори ба Эмгэг судлалын тасгийг түшиглэн хийж гүйцэтгэв.

Үндэслэл: NK эсийн эмчилгээ нь эмнэлзүйд үр дүнтэй болох нь эмнэлзүйн туршилтуудаар батлагдсан бөгөөд Т эсээс ялгаатай нь NK эс нь гадаргуугийн өвөрмөц рецепторгүй байдаг учир эзний эсрэг хариу урвал үүсгэдэггүй шинжид үндэслэн орчин үеийн дархлаа эмчилгээний чухал сэдвийн нэг болоод байна[3,4]. NK эсэд суурилсан хорт хавдрын дархлаа эмчилгээ нь дэлхийн олон оронд хийгдэж байгаа ба NK эсийг сонгомлоор ялган авах нь манай улсад дархлааны эсийн эмчилгээ нэвтрэхэд суурь судалгааны нэг хэсэг болно. NK эсийг захын цус, хүйн цус, үүдэл эс зэрэг эх үүсвэрээс ялган авч, эмчилгээнд хэрэглэх боломжтой байдаг[5]. Захын цуснаас NK эсийг сонгомлоор ялган авсан судалгаа манай улсад хийгдээгүй байна.

Зорилго: Захын цуснаас дархлааны NK эсийг микро соронзоор үйлчилж сонгомлоор ялган авах

Материал, арга зүй: Захын цуснаас мононуклеар эсүүдийг фиколлын уусмал (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare Bio-Sciences, Sweden) ашиглан нягтын зөрүүгээр ялган авав. Мононуклеар эсүүдээс NK эсийг CD56 микро соронз (CD56 MicroBeads, human, Miltenyi Biotec, Germany) ашиглан соронзон технологи (Magnetic Activated Cell Sorting, MACS, Miltenyi Biotec, Germany)-ийн тусламжтай ялган авав. Ялган авсан NK эсийг цитоспин центрифуг ашиглан тавиур шил дээр байрлуулж, May-Grunwald (Cypress Diagnostics, Belgium) бэхжүүлэгчээр бэхжүүлж, Giemsa (Cypress Diagnostics, Belgium) будгаар будаж микроскопт харж үнэлэв. Эсийн тоог трипан хөх (Trypan blue dye, 0.4% solution, Bio-Rad Laboratories, USA) будгаар будаж, автомат эс тоологч (Bio-Rad TC20™ Automated Cell Counter, USA) ашиглан тодорхойлов.

Үр дүн:

Захын цуснаас мононуклеар эсийг ялгаж, тоог тодорхойлсон үр дүн: Судалгаанд сайн дурын үндсэн дээр судалгаанд оролцохыг зөвшөөрсөн 20-25 насны 3 шинжлүүлэгчээс 1-2 удаагийн давтамжтай цусны

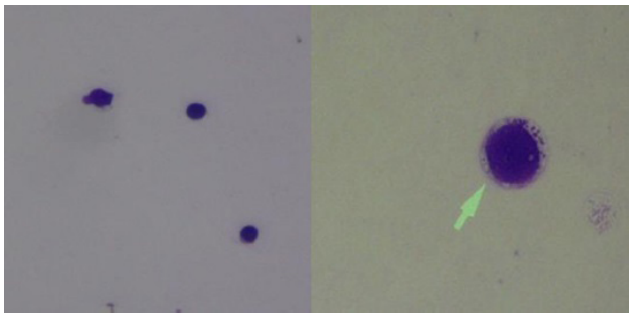
шинжлэгдэхүүн авч ашиглав. Цусны шинжлэгдэхүүнээс мононуклеар эсийг фиколлын уусмал ашиглан нягтын зөрүүгээр ялгав. Ялган авсан мононуклеар эсээс CD56 эерэг NK эсийг микро соронз ашиглан сонгомлоор ялган авч, микроскопоор харж үнэлэв.

Хүснэгт 1. 3 мл цуснаас ялган авсан мононуклеар эсийн дундаж тоо

Туршилтын тоо	Эсийн тоо (эс/мл)		Амьд эсийн эзлэх хувь (%)
	Нийт эс	Амьд эс	
1	$11.4x10^6$	$7.51x10^6$	66
2	$3.25x10^6$	$2.13x10^6$	66
3	$2.22x10^6$	$1.59x10^6$	71
4	$7.69x10^5$	$4.03x10^5$	52
5	$2.44x10^6$	$1.22x10^6$	50
Дундаж	$4.01x10^6$	$2.57x10^6$	61

3 мл хэмжээтэй цуснаас ялган авсан мононуклеар эсийн тоо дунджаар $4.01x10^6$ эс/мл, үүнээс амьд эсийн тоо $2.57x10^6$ эс/мл, амьд эсийн эзлэх хувь 61% байв.

CD56 эерэг NK эсийг будаж микроскопоор харж үнэлсэн үр дүн: Мононуклеар эсээс ялган авсан CD56 эерэг NK эсийг тавиур шилэн дээр байрлуулж, Мэи-Грунвэлдийн уусмалаар бэхжүүлж, Гимзийн будгаар будаж, гэрлийн микроскопоор харж үнэлэв. Ялган авсан CD56 эерэг NK эсийн харагдах байдлыг зураг 1-д харуулав.



Зураг 1. CD56 эерэг NK эсийн микроскопт харагдах байдал

Тайлбар: А. Ялган авсан CD56 эерэг NK эсийн микроскопийн x40 өсгөлтөөр харагдах байдал. В. CD56 эерэг NK эсийн микроскопийн x100 өсгөлтөөр харагдах байдал.

NK эс нь тод хөхөөр будагддаг, бөөм нь том, цитоплазмдаа мөхлөгтэй бөгөөд мөхлөгүүд нь улаан ягаан өнгөтэй харагддаг. CD56 эерэг эсийг будагдсан шинжид үндэслэн NK эс мөн болохыг тодорхойлов.

Хэлцэмж: Хэрэв 20-25 насны хүмүүст NK эсийн дундаж тоо $2.26x10^5$ эс/мл байдаг гэж тооцвол соронзоор үйлчилж эсийг ялгасны дараа ойролцоогоор $5.04x10^4$ эс/мл тооны нийт NK эс тоологдсон. Энэ тооцооллоор тооцож үзвэл нягтын зөрүүгээр эс ялгах, соронзоор үйлчилж эс ялгах гэсэн хоёр төрлийн дараалсан ажилбарын үед $17.5x10^4$ тооны NK эсийг алдсан байх боломжтой байна.

Дүгнэлт: 3 мл хэмжээтэй захын цуснаас дунджаар $3.27x10^4$ эс/мл тооны CD56 эерэг амьд NK эсийг сонгомлоор ялган авах боломжтой байна.

Ном зүй:

1. *Langers I, Renoux VM, Thiry M, Delvenne P, Jacobs N. Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. Biologics (2012) 6:73-82. doi:10.2147/BTT.S23976*
2. *Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural killer cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. Front. Immunol (2018) 9:1869. doi:10.3389/fimmu.2018.01869*
3. *Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, et al. NKAML: A Pilot Study to Determine the Safety and Feasibility of Haploidentical Natural Killer Cell Transplantation in Childhood Acute Myeloid Leukemia. J Clin Oncol. 2010;28(6):955-959. doi:10.1200/JCO.2009.24.4590*
4. *Cooley S, He F, Bachanova V, et al. First-in-human trial of rhIL-15 and haploidentical natural killer cell therapy for advanced acute myeloid leukemia. Blood Adv. 2019;3(13):1970-1980. doi:10.1182/bloodadvances.2018028332*
5. *L. Herrera, S. Santos, M. A. Vesga, J. Anguita, I. Martin-Ruiz, T. carrascosa, M. Juan C.Eguizabal. Adult peripheral blood and umbilical cord blood nK cells are good sources for effective CAR therapy against CD19 positive leukemic cells. Scientific Reports (2019) 9:18729. doi:10.1038/s41598-019-55239-y*

Results of selective isolation of NK cells from peripheral blood

Khaliun B[1], Namuun E[1],Gereltsetseg Z[2], Ariunzaya B[1,2], Zolmunkh N[1,2], Batbaatar G[1], Tsogtsaikhan S[1], Nyambayar D[1,3], Khongorzul T[1,2]

[1]Department of Immunology, School of Biomedicine, MNUMS;
[2]Central Clinical Laboratory, Mongolia-Japan Hospital,MNUMS;
[3]TranslaTUM Cancer Research Center, Munich Technical University,Germany
E-mail: khongorzul.t@mnums.edu.mn, Tel: 99157313

Background: Natural killer (NK) cells, which compose 5 to 20 percent of peripheral blood lymphocytes, are the first to recognize and destroy cancer cells and virus infected cells. The basic principle of NK cell immunotherapy is to isolate NK cells and activate them with anti-inflammatory cytokines to transfuse them into the recipient. Purity of isolated NK cells is directly related to the effectiveness of immune cell therapy. Immune cell therapy is practiced in many countries around the world, and the selective isolation of NK cells will be part of the basic research on the introduction of immune cell therapy in our country. There is no study on the selective isolation of immune cells in our country.
Aim: To do selective isolation of NK cells from peripheral blood using microbeads
Materials and methods: Peripheral blood from volunteers was used as a test sample. Mononuclear cells were isolated from peripheral blood using a Ficoll-Paque PLUS solution with a difference in density. NK cells were isolated from mononuclear cells using a CD56 magnetic bead (CD56 MicroBeads, human, Miltenyi Biotec, Germany) by MACS (Magnetic Activated Cell Sorting, MACS, Miltenyi Biotec, Germany). The isolated NK cells were placed on a slide glass using a cytospin centrifuge, fixed and stained with a May- Grunwald (Cypress Diagnostics, Belgium) and evaluated under a microscope. Cell counts were determined using Trypan blue dye (Trypan blue dye, 0.4% solution, Bio-Rad Laboratories, USA) and an automated cell counter (Bio-Rad TC20™ Automated Cell Counter, USA).
Results and conclusion: Mononuclear cells with a density difference of $4.01x10^6$ cells/ml (of which the number of viable cells was $2.57x10^6$ cells/ml and the percentage of viable cells was 61%) were isolated from 3ml of peripheral blood using ficoll solution. Approximately $5.04x10^4$ cells/ml of CD56 positive NK cells (of which $3.27x10^4$ cells/ml, 53% of which were viable cells) were isolated from of $4.01x10^6$ mononuclear cells. Approximately $5.04x10^4$ cells/ml (viable cells $3.27x10^4$ cells/ml, 53%) of CD56 positive NK cells can be selectively isolated from 3 ml of peripheral blood using CD56 microbeads.

Key word: Natural Killer cells, CD56 microbeads, Magnetic Activated Cell Sorting