

БИОАНАГААХ

Урсгал эс тоолуур ашиглан хулганы ийлдсэнд олон төрлийн цитокиныг зэрэг хэмжсэн дүн

Гансүх Ч.¹, Энхтүшиг Г.¹, Ананд А.¹, Мөнхжаргал Д.¹, Нямбаяр Д.¹,
Цогтсайхан С.¹, Хонгорзул Т.^{1,2}

¹Анагаахын Шинжлэх Ухааны Үндэсний Их Сургууль, Био-Анагаахын сургуулийн Дархлаа судлалын тэнхим

²Анагаахын Шинжлэх Ухааны Үндэсний Их Сургууль, Био-Анагаахын хүрээлэнгийн Иммунологи лаборатори
e-mail: khongorzul.t@mnums.edu.mn

Abstract

Measurement of multiple cytokines in mouse serum using the flowcytometry

Gansukh Chojjilsuren¹, Enkhtushig Gavaabaljir¹, Anand Altankhuyag¹, Munkhjargal Davaajargal¹, Nyambayar Dashtsoodol¹, Tsoigtsaikhan Sandag¹, Khongorzul Togoo^{1,2}

¹Department of Immunology, School of Biomedicine, Mongolian National University of Medical Sciences,

²Laboratory of Immunobiology, Institute of Biomedical Sciences, Mongolian National University of Medical Sciences

Introduction

Accurate measurement of multiple cytokines concurrently is essential for comprehensively understanding immune responses in various diseases.

Goal

To develop a technological methodology for the simultaneous quantification of multiple cytokines in mouse serum using a flowcytometry

Materials and Methods

Utilizing a C57BL/6 mouse model, we induced cytokine production by intraperitoneal injection of alpha-galactosylceramide (α -GalCer) and analyzed cytokine levels 24 hours later using a MACSQuant analyzer 10 equipped with LEGENDplex™ Mouse Th Panel (13-plex) assay. Means between groups were compared using the independent sample t test, and statistically significant differences were considered at $p \leq 0.05$.

Results

Our results demonstrate that the emitted intensity increased proportionally with standard concentration, with slightly elevated cytokine staining observed for MCP-1 and IL-10.

The concentration of each cytokine was determined using a regression equation based on the mean fluorescence intensity value of the cytokine in each standard. Importantly, we observed significantly highest levels of IFN- γ ($p < 0.05$) in α -GalCer-injected mice, indicating successful induction of cytokine production, particularly from NKT cells. Notably, our investigation revealed that levels of IFN-b, IL-17A and IL-27 in α -GalCer-injected mice increased ($p < 0.05$) those of other cytokines, compared to negative controls. The determination of multiple cytokines simultaneously via flowcytometry, facilitated by the LEGENDplex assay, holds significant importance in enabling comprehensive comparison of cytokine concentrations.

Conclusion

An experimental methodology for the simultaneous determination of multiple cytokines by flowcytometry was successfully developed.

Key words

Capture beads, Concentration, Immunoassay, LEGENDplex, Sandwich ELISA

Pp 3-7, Table 1, Figures 2, References 15

Оршил

Цитокин нь дархлаа тогтолцооны эсүүдээс цочролын нөлөөгөөр ялгарч дархлааны хариу урвал болон үрэвслийн урвалд оролцож, тэдгээрийн хүч болон үргэлжлэх хугацааг зохицуулдаг байна. Цитокиныг биологийн үйлчлэлийн хувьд плейотроп, илүүдэл (redundancy), синерги, антагонист, каскад гэж ангилдаг. Цитокин нь маш бага тунгаар биологийн өндөр идэвх үзүүлдэг онцлогтой бөгөөд бай эсийн рецептортой холбогдмогц эсэд нөлөөлж, түүний нүүн шилжилт, ялгаран

Зорилго

Урсгал эс тоолуурын аргаар олон төрлийн цитокиныг зэрэг тодорхойлох технологийн арга зүйг боловсруулах

Материал, арга зүй

Энэхүү туршилт судалгаанд C57BL/6 загварын хулганыг сонгон зохиомлоор эсийг идэвхжүүлж, цитокиныг шинжлэхийн тулд альфа-галактозилцерамид (α -ГалЦер) гэх бодис ашигласан. α -ГалЦер нь *Agelas mauritianus* замгаас гаргаж авсан гликолипидийн төрлийн бодис юм. Дархлааны хариу урвалд α -ГалЦер нь Natural Killer T (NKT) эсийн лигандын үүргийг гүйцэтгэж сонгомлоор идэвхжүүлэн IL-4 болон IFN- γ зэрэг дархлааны өндөр идэвхтэй цитокиныг ялгаруулан хавдрын эсрэг дархлаа тогтолцоог дайчилдаг. Хулганы хэвлийн хөндийд α -ГалЦер-ийг 5 мкг хэмжээтэй тарьж, 24 цагийн дараа хулганын цусыг цуглуулан авч ийлдсэнд олон төрлийн цитокиныг LEGENDplex™ Mouse Th Panel (13-plex) цомгийг ашиглан шинжилсэн. Энэхүү цомог нь зууш фермент холбоот эсрэгбиеийн урвалын зарчимд суурилсан

Судалгааны ажлын ёс зүй

Энэхүү судалгааг “Урсгал эс тоолуурын аргаар олон төрлийн цитокиныг зэрэг тодорхойлох технологийг эмнэл зүйн практикт нэвтрүүлэх

Үр дүн

1. А ба В- микро соронзод хамаарах цитокины стандарт концентрацийг тодорхойлсон үр дүн

Стандартын 2.4 пг/мл концентрацид цитокины туяарах эрчим хамгийн бага тодорхойлогдсон

хөгжил эсвэл апоптозыг идэвхжүүлэг, Олон цитокиныг зэрэг тодорхойлох нь өвчин эмгэгийн эсрэг дархлааны хариу урвалын эрчим болон төрлийг тодорхойлж тухайн эмгэгийн эмгэг жамын механизмыг нарийн тодруулахад чухал төдийгүй өвчний эрт илрүүлэг, эмчилгээний хяналт, оношилгоонд ач холбогдолтой. Өндөр хөгжилтэй орнуудад эрхтэн шилжүүлэн суулгалт болон хорт хавдрын эмчилгээний хяналтад урсгал эс тоолуур ашиглан олон төрлийн цитокиныг зэрэг тодорхойлж байна.

А болон В микро соронз бүхий туяарагч эсрэгбие, биотинжсэн эсрэгбиеийг тодорхойлох зориулалттай. Биотинжсэн эсрэгбиеетэй холбогдсон туяарагч бодисын эрчмийг урсгал эс тоолуурын анализатор (MACSQuant analyzer 10)-т уншуулав. А-микро соронзод IL-23, IL-1 α , IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-12p70, В-микро соронзод IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-27, IL-17A, IFN- β , GM-CSF цитокин хамаарна. Цитокин тус бүрийн концентрацийг стандарт концентрацитай харьцуулан тодорхойлов. Стандарт тус бүрт цитокины гэрлийн шингээлтийн эрчмийн утгыг харгалзуулан, регрессийн тэгшитгэл ашиглаж муруй байгуулсан. Бүлэг хоорондын дундаж үзүүлэлтийг үл хамааралт түүврийн t сорил ашиглан харьцуулж $p \leq 0.05$ үед статистикийн ач холбогдол бүхий ялгаатай байна гэж үзэв.

нь” төслийн хүрээнд ЭМЯ-ны АУ-ы Ёс Зүйн Хяналтын Хороо (тогтоол 23/021)-ны зөвшөөрлөөр хийж гүйцэтгэв.

бол эерэг хяналт болох 10000 пг/мл концентрацид хамгийн өндөр тодорхойлогдов. Жишээ болгож А-микро соронзод хамаарах 6 цитокины стандарт утгыг харуулав (Хүснэгт 1).

Table 1. Mean fluorescence intensity and standard concentration of cytokines

Standards (pg/ml)	Mean fluorescence intensity (MFI)					
	IL-23	IL-1 α	IFN- γ	TNF- α	MCP-1	IL-12p70
2.4	α	0.2	0.2	0.2	0.1	0.3
9.8	0.2	0.9	0.4	0.4	0.2	0.9
39.1	0.3	1.4	0.6	0.6	0.4	1.1
156.3	0.7	5.3	2.1	2.4	3.0	2.7
625	3.26	15.0	8.2	10.5	14.7	7.67
2500	10.9	26.5	20.7	25.0	30.1	14.5
10000	25.0	38.7	38.4	36.4	42.6	25.4

Notes: Standard concentration of 6 cytokines for beads A

Стандартин концентраци ихсэх тусам туяарагчийн эрчим нэмэгдэж байна.

А-микро соронзод хамаарах цитокины стандарт концентраци ба туяарагчийн сарнилтын эрчим бүхий стандарт муруйг харуулав (Зураг 1).

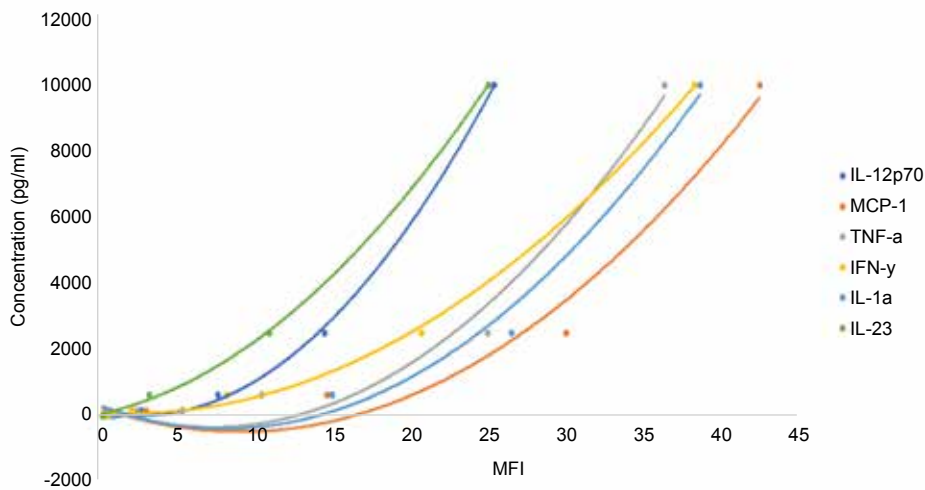


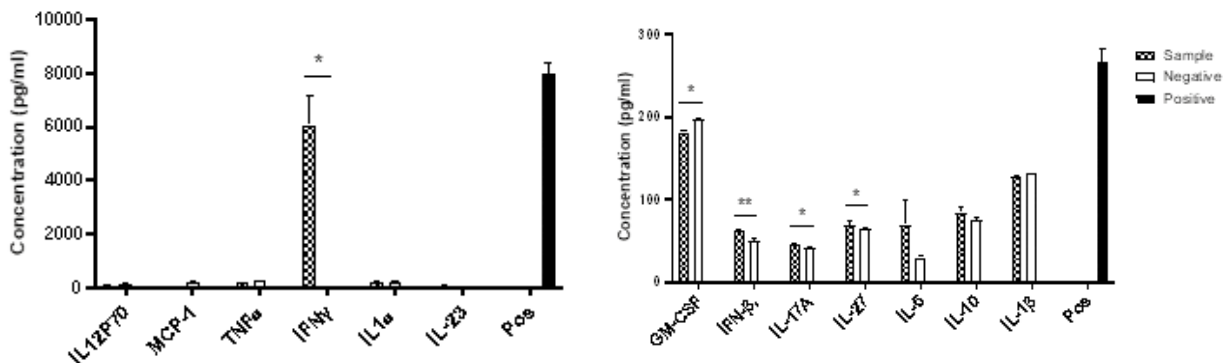
Figure 1. Standard curves for 6 cytokines

А бүлгийн цитокиноос MCP-1, В бүлгийн цитокиноос IL-10 цитокины будагдалтын эрчим бусдаасаа их харагдаж байв.

Стандарт бүрт цитокины гэрлийн шингээлтийн эрчмийн утгыг харгалзуулан, регрессийн тэгшитгэл ашиглаж цитокин тус бүрийн концентрацийг тодорхойлов.

2. Цитокины концентрацийг хяналттай харьцуулсан үр дүн

Хулганад α -ГалЦер тарьснаас 24 цагийн дараа хэмжсэн цитокин тус бүрийн дундаж концентрацийг эерэг болон сөрөг хяналттай харьцуулав (Зураг 2).



Notes: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Figure 2. Concentrations of 13 cytokines in α -GalCer-injected mice

А бүлгийн цитокиноос IFN-γ-ийн концентраци α-ГалЦер тарьсан хулганад өндөр, сөрөг хяналтаас ялгаатай ($p < 0.05$) тодорхойлогдов. α-ГалЦер нь NKT эсийг өдөөж, түүнээс ялгарах IFN-γ-ийн хэмжээ өндөр гарсан нь бид цитокин

Хэлцэмж

Туршилтын амьтны ийлдсэн дэх олон төрлийн цитокины агууламжийг зэрэг тодорхойлоход IFN-γ-ийн концентраци бусад цитокиноос өндөр байв. 13 төрлийн цитокиныг нэг цомог ашиглан урсгал эс тоолуураар тодорхойлсон нь цитокины агууламжийг хооронд нь харьцуулах боломжийг олгож байна. Девеси Ф, Акбулут Х, Тургут Т нарын судалгаагаар сүрьеэ өвчний үед TGF-β1 цитокины түвшин бусад цитокины түвшнээс өндөр буюу 258 ± 36.6 пг/мл хэмжээтэй байсан нь өвчнийг эрт илрүүлэхэд ач холбогдолтой байсан байна. Олон төрлийн цитокиныг зэрэг тодорхойлох нь өвчин эмгэгийн үеийн дархлааны хариу урвалын эрчим болон төрлийг тодорхойлж тухайн эмгэгийн эмгэг жамын механизмыг нарийн тодруулахад чухал төдийгүй өвчний эрт илрүүлэг, эмчилгээний хяналт, оношилгоонд

Дүгнэлт

α-ГалЦер тарьсан хулганы ийлдсэн дэх IFN-γ-ийн хэмжээ ихэссэн нь NKT эсийн идэвхжлийг илэрхийлж байна. Урсгал эс тоолуурын аргаар олон төрлийн цитокиныг зэрэг тодорхойлох туршилтын арга зүйг амжилттай боловсруулав.

Ном зүй

- An J, Zhang J-M. Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics*. Spring 2007;45(2):27-37.
- Cardona AG, Garcna Morbn GA, Parra-Medina R, et al. Cytokines, chemokines and growth factors. *Autoimmunity: From Bench to Bedside*. Bogota (Colombia): El Rosario University Press; 2013 Jul 18. Chapter 9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459450/>
- Б.Баярт, Ц.Түвшинжаргал. Цитокины тогтолцоо. 2015:11-12.
- Kaiser P, Stdheli P. Chapter 10 - Avian Cytokines and Chemokines. *Avian Immunology*. Boston: Elsevier; 2013:189-204.
- Foster JR. The functions of cytokines and their uses in toxicology. *Int J Exp Pathol*. 2001;82(3):171-192.
- Cretney E, Hayakawa Y, Kershaw MH, Smyth MJ. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunological reviews*. Dec 2004;202:275-293.
- Chu D, George J, Kalantar-Zadeh K, Liu C, Liu G, Young HA. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Adv Sci (Weinh)*. 2021;8(15):e2004433.
- Jarczак D, Nierhaus A. Cytokine Storm-Definition, Causes, and Implications. *Int J Mol Sci*. 2022;23(19):11740. Published 2022 Oct 3. doi:10.3390/ijms231911740
- Akimoto K, Morita M, Motoki K, et al. Structure-Activity Relationship of .alpha.-Galactosylceramides against B16-Bearing Mice. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1995/06/01 1995;38(12):2176-2187.
- Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: Immune regulation via CD1d -dependent NKT

үүсэлтийг амжилттай сэдээснийг илтгэж байна. Харин В бүлгийн цитокиноос IFN-б, IL-17A, IL-27-ийн үүсэлт сөрөг хяналтаас их ($p < 0.05$) тодорхойлогдов.

чухал ач холбогдолтой боловч одоогоор Монгол улсад цитокины шинжилгээг зөвхөн фермент холбоот эсрэгбиеийн шинжилгээний аргаар гүйцэтгэж байна. Туршилтын амьтанд α-ГалЦер тарьснаас 24 цагийн дараа ийлдсийн 13 төрлийн цитокины концентрацийг харьцуулахад IFN-γ-ийн концентраци бусдаасаа өндөр байсан нь Тимилшина.М, Канг Ю, Дахал И, Тапа П, Жанг Г, Ши Си нарын судалгааны ажлын үр дүнтэй дүйж байна., Одоогоор манай оронд ийлдсийн цитокины агууламжийг урсгал эс тоолуурын аргаар тодорхойлсон судалгаа байхгүй байна. Энэхүү арга зүйд үндэслэн хүний ийлдсийн цитокины шинжилгээг эмнэлзүйн салбарт нэвтрүүлж, эмгэг байдлын эрт үеийн оношилгоо, дархлаа хяналтыг эхлүүлэхийг зорьж байна.

Талархал: Энэхүү судалгааг санхүүжүүлсэн Шинжлэх Ухаан, Технологийн Санд талархал илэрхийлье.

- cells. The Journal of Clinical Investigation. 2004/11/15; 114(10):1379-1388.
11. Iwakabe K, Kitamura H, Yahata T, et al. The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. J Exp Med. 1999;189(7):1121-1128. doi:10.1084/jem.189.7.1121
 12. LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay Kit, BioLegend.com https://www.biolegend.com/Files/Images/media_assets/pro_detail/datasheets/75528_Mu_HSC_Panel_01092018_V01.pdf
 13. Akbulut HH, Deveci F, Muz MH, Turgut T. Changes in serum cytokine levels in active tuberculosis with treatment. Mediators of inflammation. 2005/10/24; 2005(5):256-262.
 14. Thapa P, Xia C, Zhang G, et al. Nanoparticle formulated alpha-galactosylceramide activates NKT cells without inducing anergy. Vaccine. 2009/05/26; 27(25-26):3484-3488.
 15. Nyambayar D, Iwabuchi K, Hedlund E, et al. Characterization of NKT-cell hybridomas expressing invariant T-cell antigen receptors. Journal of clinical and experimental hematopathology : JCEH. Apr 2007;47(1):1-8.

*Танилцаж, нийтлэх санал өгсөн:
Анагаах ухааны доктор, профессор Г.Батбаатар*