

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის
თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

რუსუდან ჭანკოტაძე

**B ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიის უჯრედული ხაზის
MEC1 უჯრედებში სპეციფიური სტიმულაციით გამოწვეული
საპასუხო რეაქციის შესწავლა**

იმუნოლოგია

სამაგისტრო ნაშრომი შესრულებულია
ბიოლოგიის მაგისტრის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

ხელმძღვანელი : ნ. კულიკოვა
ბიოლოგიის მეც. დოქტორი

თბილისი

2013

ანოტაცია

ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემია (ქლლ) - ლეიკემიის ყველაზე გავრცელებული ფორმა დასავლეთის ქვეყნებში. დაავადება ძირითადად 50 წლის შემდეგ ვლინდება. ქლლ უჯრედები წარმოადგენენ მომწიფებულ, იმუნოკომპეტენტურ ლიმფოციტებს. B-ქლლ ერთადერთია ლეიკემიებს შორის, რომლის განვითარებაც არაა დაკავშირებული რადიაციული გამოსხივების, ქიმიური აგენტებისა და მედიკამენტების ზემოქმედებასთან. ქლლ უჯრედები წარმოადგენენ CD5+CD23+CD19+ CD40+ ლიმფოციტებს, მათ ზედაპირზე სხვა ზედაპირული მოლეკულების ექსპრესია მეტად ცვალებადია(მაგ., IgM, CD79a, CD79b-ს, CD20- ის და CD38-ის).

იმუნოგლობულინის (Ig) მძიმე ჯაჭვის (H) (IGHV) არამუტირებული და მუტირებული გენების მიხედვით ქლლ კლონებს ყოფენ ორ ძირითად ქვეჯგუფად შესაბამისად დაავადების აგრესიული და დადებითი პროგნოზით. ნაჩვენები იქნა, რომ Toll-მსგავს რეცეპტორების ოჯახის წევრი - CD180/RP105 ჰეტეროგენულად არის ექსპრესირებული ქლლ უჯრედებზე, ძირითადად კი - მუტირებული IGHV გენების მქონე უჯრედებზე. ასევე დადგინდა CD180-ის მონაწილეობა პრო-გადარჩენის პროცესებში ქლლ უჯრედებში და ასევე ის, რომ CD180 იყენებს იგივე ფოსფოინოზიტოლ-3-კინაზის (PI3K) სასიგნალო გზას, რაც B უჯრედული რეცეპტორი (BCR). მონოკლონური ანტისხეულებით CD180-ის შებოჭვა განაპირობებს CD180+ B-ქლლ კლონების დაახლოებით 50%-ის პროლიფერაციას, აქტივაციას და აპოპტოზისგან გადარჩენას, რის საფუძველზე მოხდა დაყოფა ე.წ. “მორეაგირე” და “არამორეაგირე” ქლლ კლონებად.

აღსანიშნავია, რომ ქლლ პაციენტებში პროლიფერაცია მიმდინარეობს მხოლოდ ე.წ. „პროლიფერაციულ ცენტრებში“ - ლიმფურ კვანძებსა და ძვლის ტვინში, ხოლო პერიფერიული სისხლიდან გამოყოფილი ლიმფოციტები გაჩერებულნი არიან უჯრედული ციკლის G₀ ფაზაში. აღნიშნული ფაქტი განაპირობებს იმას, რომ პაციენტების სისხლიდან მიღებულ უჯრედებზე მუშაობისას, შეუძლებელია აქტიურად პროლიფერირებადი პოპულაციის მიღება ციტოკინების დამატების გარეშე და კვლევა იზღუდება უჯრედული ციკლის G₀ ფაზაში გაჩერებული მცირე ზომის ლიმფოციტების პოპულაციით. შესაბამისად, ზემოხსენებული შეზღუდვის აცილების მიზნით, კვლევისთვის გამოვიყენეთ სამოდელო სისტემა - მუტირებული IGHV გენების მქონე ქლლ პაციენტის

ლიმფოციტებისგან მიღებული უჯრედული ხაზი MEC1, რათა მოგვეცეს საშუალება აქტიურად ციკლირებად უჯრედების პოპულაციაზე, შევისწავლოთ სპეციფიური სტიმულაციის გავლენა სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნების და პროლიფერაციულ მექანიზმებზე. ჩვენმა კვლევითმა ჯგუფმა იქამდე შეისწავლა CD180-ის ექსპრესიის სტაბილურობა უჯრედული ციკლის ფაზების გავლისას, უჯრედების აქტივაციის ხარისხთან მიმართებაში. ნაჩვენებია იქნა, რომ MEC1 უჯრედების აქტივაციის ხარისხი მატულობს უჯრედული ციკლის სტაბილიზაციის ფონზე, ასევე პირველად დადგინდა, რომ CD180-მაექსპრესირებელი უჯრედების პროცენტი პროლიფერებად ქლლ კულტურაში არ არის სტაბილური: CD180-მაექსპრესირებელი უჯრედების რაოდენობის მომატება შეიმჩნეოდა პოპულაციის ლოგარითმული ზრდის ფონზე გადათესვიდან პირველი 72 საათის განმავლობაში. ამგვარად, CD180-ის ექსპრესიის უჯრედების პროლიფერაციულ სტატუსთან დამოკიდებულების შემდგომი შესწავლის მიზნით, მოცემული ნაშრომის ფარგლებში შევისწავლეთ ზედაპირული IgM-ის ან/და CD180-ის შებოჭვის შემდგომ უჯრედული ციკლის ფაზებში უჯრედების პროცენტული გადანაწილების სურათი, შევაფასეთ აპოპტოზური MEC1 უჯრედების პროცენტული მაჩვენებელი და უჯრედების აქტივაციური სტატუსი. კვლევა სამ ამოცანად დაიყო: 1. MEC1 უჯრედებში IgM-ის შებოჭვის ეფექტის შესწავლა; 2. IgM-ის სასიგნალო გზის აქტივაციის გავლენის შეფასება CD180-ის ექსპრესიაზე; 3. სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნების და პროლიფერაციულ მექანიზმებზე IgM-ის ან/და CD180-ის შებოჭვის ეფექტის შედარება.

სტიმულაციის საპასუხოდ უჯრედების პროლიფერაციული სტატუსის შესაფასებლად, ეთიდიუმ ბრომიდით ორმაგჯაჭვიანი დნმ-ის შეღებვის გზით, ვაკვირდებოდით უჯრედების გადანაწილების სურათს უჯრედული ციკლის ფაზებში. სიცოცხლისუნარიანობის შესაფასებლად, ვაკვირდებოდით, როგორც აპოპტოზის გვიან სტადიებზე მყოფი უჯრედების პროცენტულ მაჩვენებელს (ეთიდიუმ ბრომიდით შეღებვით მიღებულ სურათზე - ჰიპოპლოიდურ მონაკვეთი), ასევე ადრეული აპოპტოზის სტადიებზე მყოფი უჯრედების პროცენტობასაც: ფოსფატიდილსერინის ზედაპირული ექსპრესიის დადგენის გზით(გამოვიყენეთ ანექსინ V/ პროპიდიუმ იოდიდით ორმაგი შეღებვის მეთოდი). აქტივაციური სტატუსის შესაფასებლად ვაკვირდებოდით

აქტივაციური მარკერის - CD38-ის ზედაპირულ ექსპრესიას. ყველა ჩამოთვლილი მეთოდის შემთხვევაში ნიმუშების ანალიზი ხდებოდა გამდინარე ციტომეტის გამოყენებით (FACScan, Becton Dickinson).

კვლევის პირველ ეტაპზე IgM-ის შებოჭვის ეფექტი შევასეთ დროის მოკლე ვადაზე, ანუ სტიმულირების შემდგომ 0.5 საათში. რადგანაც, ცნობილია, რომ B უჯრედული რეცეპტორის შებოჭვის შედეგად საპასუხო რეაქცია სწრაფად ვითარდება. ვაფასებდით, როგორც პროლიფერაციის დონეს (უჯრედული ციკლის ფაზებში უჯრედების პროცენტული გადანაწილების სურათის მიხედვით), ასევე აქტივაციის ხარისხს აქტივაციური მარკერის CD38-ის ექსპრესიის მიხედვით და ადრეული აპოპტოზის დონეს ფოსფატიდილსერინის ზედაპირული ექსპრესიის შეფასების გზით. მიღებული შედეგების მიხედვით IgM-ის შებოჭვის საპასუხოდ ადგილი არ ჰქონდა არც პროლიფერაციას (G2/M ფაზაში: სპონტ. $2\pm0.6\%$; სტიმ.: $2.25\pm0.6\%$; S ფაზაში: სპონტ. $5\pm0.7\%$; სტიმ. $4.7\pm1.1\%$), არც აქტივაციას (სპონტ.: $30.6\pm8.1\%$; სტიმ.: $24.5\pm1.2\%$) , არც აპოპტოზური უჯრედების პროცენტობის ცვლილებას (სპონტ.: $13.45\pm4.1\%$; სტიმ. $9.83\pm3.9\%$). ამგვარად, დავადგინეთ, რომ MEC1 უჯრედები ანერგიულნი არიან B უჯრედული რეცეპტორის შებოჭვის მიმართ. აღნიშნული გვადლევს საფუძველს, ჩავთვალოთ ეს უჯრედული ხაზი „არამორეაგირე“ ქლლ კლონის მოდელად. სამომავლო კვლევაში ამგვარი მოდელის გამოყენება დაგვეხმარება უკეთ შევისწავლოთ IgM-ის და CD180-ის სასიგნალო გზის/გზების ფუნქციური მდგომარეობა ანერგიის შემთხვევაში.

B უჯრედული რეცეპტორის და CD180-ის ფუნქციური კავშირის შესწავლის მიზნით, ვაკვირდებოდით ასევე ზედაპირული IgM-ის შებოჭვის გავლენას CD180-ის ზედაპირულ ექსპრესიაზე. აღნიშნულ ეფექტს ვაფასებდით დროის სამ წერტილში: სტიმულირების შემდგომ 0.5, 6 და 24 საათში. მიუხედავად იმისა, რომ დროის მოკლე ვადებზე არ დაფიქსირდა სტატისტიკურად სარწმუნო განსხვავება სპონტანურ და სტიმულირებულ კულტურებს შორის (0.5სთ: სპონტ.- 10.4 ± 2.3 სტიმ.- 16.3 ± 3.8 ; 6სთ: სპონტ.- 28.2 ± 8 ; სტიმ.- 27 ± 2), 24 საათისთვის დადგინდა CD180-ის მაექსპრესირებელი უჯრედების პროცენტული მაჩვენებლის დაქვეითება (სპონტ. : 29.5 ± 5.2 ; სტიმ.: 15.5 ± 3.5 , $p<0.05$). რაც კიდევ ერთხელ ადასტურებს ფუნქციურ კავშირს CD180-ისა და B უჯრედულ რეცეპტორს შორის. რადგანაც აღნიშნული ეფექტი გამოვლინდა მხოლოდ 24 საათის შემდგომ, IgM-ის

შეზოჭვის ეფექტი შევაფასეთ მოგვიანებით ვადაზეც: სტიმულაციის 24 საათის შემდგომ. პარალელურად სტიმულაციას ვახდენდით როგორც ცალკე ანტი-CD180 მკა-ით, ასევე კომბინაციაში: ანტი- CD180 და ანტი- IgM მკა-ით ერთდროულად. მიღებული შედეგების მიხედვით ანტი- CD180 და ანტი- IgM მკა-ით მოქმედებისას დაფიქსირდა აპოპტოზისგან დაცვა (სპონტ.: % subG₀=21±1.8; კომბ. სტიმ.: % subG₀=12.5±2.8, p<0.05), რაც მიუთითებს იმაზე, რომ MEC1 უჯრედების შემთხვევაში CD180-ის და ზედაპირული IgM-ის შეზოჭვას სინერგისტული ეფექტი გააჩნია უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნების სასიგნალო გზაზე.

CD180-ის და B უჯრედული რეცეპტორის კავშირს შეიძლება ჰქონდეს დიდი მნიშვნელობა ქლლ-ის იმუნოპათოგენეზისთვის, რადგანაც ვარაუდობენ რომ ამ დაავადების განვითარებას ბიძგს აძლევს ჰიპოთეტური ჯერ-ჯერობით უცნობი ანტიგენი, ხოლო CD180, როგორც Toll-მსგავსი რეცეპტორების ოჯახის წევრი, ერთ-ერთი პირველი სავარაუდო რეცეპტორია, რომელმაც მონაწილეობა უნდა მიიღოს ამ პირველადი ანტიგენის ამოცნობაში. მაშასადამე CD180-ის და B უჯრედულ რეცეპტორის ურთიერთქმედების შესწავლა დაგვეხმარება უკეთ გავიგოთ ქლლ-ის ჩამოყალიბების მექანიზმები, რაც საშუალებას მოგვცემს მოვნახოთ სწორი გზა ამ დღესდღეობით განუკურნებელი დაავადებისთვის ახალი თერაპიული საშუალებების შემუშავებისთვის.

Annotation

Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL) is the most common type of leukaemia in Western countries. The disease affects individuals above 50 years old. CLL cells are mature immuno-competent lymphocytes. B-CLL is the only form of leukaemia, which is radiation-, chemicals- or drug-independent. CLL cells have CD5+CD19+CD23+CD40+ immunophenotype, expression of other surface markers is rather variable (for example, IgM, CD79a, CD79b, CD20 or CD38). CLL can be characterised into two major subgroups with unmutated and mutated immunoglobulin (Ig) heavy (H) chain genes (IGHV), which is prognostic of an aggressive or an indolent disease respectively. It has been shown, that a member of Toll-like receptor (TLR) family - CD180/RP105 is expressed heterogeneously on CLL cells, and mainly on those with mutated IGHV genes. Also it has been demonstrated that CD180-mediated signalling uses the same phosphoinositol-3-kinase (PI3K) signalling pathway as B-cell receptor and proved CD180 participation in pro-survival processes in CLL cells. Ligation of CD180 with monoclonal antibodies (mAb) induced activation of approximately 50% of the CD180+ B-CLL clones, subdividing them into Responders (R) and Non-Responders (NR).

It should be emphasized, that in CLL patients proliferation takes place only in so called “proliferation centers” in the lymph nodes and bone marrow, while lymphocytes separated from peripheral blood are blocked in the G0 stage of the cell cycle. The abovementioned fact, is the main cause why while working with patients’ CLL cells it appears impossible to get an actively proliferating lymphocytes population in vitro. Subsequently the research appears to be restricted to lymphocytes population, which is blocked in G0. To avoid this restriction for the current studies we have chosen a model system – cell line MEC1, developed from peripheral blood lymphocytes of CLL patient with mutated IGVH genes, which gives us opportunity to investigate the effect of specific stimulation on pro-survival and proliferative processes in actively cycling cells. Our research group previously has investigated the stability of CD180 surface expression on CLL cells during the progression through the cell cycle in relevance to cell activation state. It has been shown, that MEC1 cells activation level increased together with cell cycle stabilisation. Also it has been demonstrated for the first time, that the percentage of CD180 expressing cells in proliferating CLL culture is not stable: an increase in CD180+ cells number can be seen during exponential growth stage, first 72 hours after the cell culture re-seeding. Therefore, to continue further

investigation of CD180 expression dependence on the cells progression through the cell cycle, in the frame of the current research we have studied CD180 or/and IgM ligation induced effect in MEC1 cells: cells distribution between cell cycle phases, percentage of apoptotic cells, cells activation level. The research has been structured into 3 tasks: 1. Study of IgM ligation effect on MEC1 cells; 2. Evaluation of IgM signalling pathway activation effect on CD180 expression; 3. Comparison of IgM and/or CD180 ligation influence on pro-survival and proliferative processes.

To evaluate the proliferative state of cells in response to stimulation, we looked at cells distribution between cell cycle stages by staining of double-stranded DNA with ethidium bromide. To evaluate pro-survival processes, we measured apoptosis level, looking at both: percentage of cells on late stages of apoptosis (on EB staining-derived picture – hypoploid section) and percentage of cells on early stages of apoptosis (using detection of phosphatidylserine surface expression by Annexin V, combined with propidium iodide staining). To evaluate cells activation we checked surface expression of the activation marker – CD38. In case of all abovementioned assays, sample analyses has been performed on flow cytometer (FACScan, Becton Dickinson).

At the first stage of the research we have evaluated IgM-ligation effect after short-time stimulation – in 0.5 h. This time-point has been chosen due to the fact, that B cell receptor (BCR) ligation has been known to induce an immediate effect. We were simultaneously evaluating proliferation, activation and early apoptosis levels. According the obtained results in response to IgM ligation there was no increase in proliferation (% of cells in G2/M: spont. $2\pm0.6\%$; stim. $2.25\pm0.6\%$; % of cells in S phase: spont. $5\pm0.7\%$; stim. $4.7\pm1.1\%$), activation (spont.: $30.6\pm8.1\%$; stim: $24.5\pm1.2\%$) or apoptosis (spont.: $13.45\pm4.1\%$; stim. $9.83\pm3.9\%$) levels. In other words, we have revealed , that MEC1 cells are absolutely anergic towards IgM ligation. This fact gives us possibility to observe MEC1 cells line as a model of Non-Responder CLL clone. Usage of this model system will help us in our further studies to investigate functional connection between CD180 and IgM signalling pathways in case of anergic clones.

To investigate functional connection between BCR and CD180 we studied IgM ligation effect on the level of CD180 surface expression. The effect has been evaluated at 3 different time-points: 0.5, 6 and 24 hours after stimulation. Beside the fact, that no significant change in

CD180 expression level has been detected at short time-points (0.5h: spont.-10.4±2.3; stim. -16.3±3.8; 6h: spont.-28.2±8; stim.-27±2), for 24 hours it has been demonstrated a decrease in CD180 expression level in stimulated cultures (0.5h: spont.-10.4±2.3; stim. -16.3±3.8; 6h: spont.-28.2±8; stim.-27±2). The obtained result once more emphasizes the existing functional connection between CD180 and BCR. As this change has been revealed at a later time-point, we decide to check the possibility, that specific stimulation might has a delayed effect in MEC1 cells. In this case we stimulated cultures with anti-IgM and/or anti-CD180 mAbs. According the obtained data CD180 and IgM simultaneous ligation has resulted in anti-apoptosis protective effect (spont.: % subG₀=21±1.8; combined stim.: % subG₀=12.5±2.8, p<0.05), which means that in case of MEC1 cells CD180 and IgM ligation have a synergic effect on pro-survival pathways.

The study of mechanisms leading to survival and proliferation in MEC1 cells will enable a better understanding of the microenvironmental stimuli that lead to the expansion of the leukaemic cells and progression of the disease, in order to develop new therapies for this currently incurable disease.

სარჩევი

1. შემოკლებათა სია.....	გვ-10
2. შესავალი.....	გვ-11
3. ლიტერატურული მიმოხილვა.....	გვ-13
4. მასალა და მეთოდები.....	გვ-31
5. შედეგები და მათი განხილვა.....	გვ-38
6. დასკვნა.....	გვ-44
7. გამოყენებული ლიტერატურის სია.....	გვ-45

შემოკლებათა სია

ქლლ - ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემია

მკა - მონოკლონური ანტისხეულები

BCR – B უჯრედული რეცეპტორი

Zap70 - პროტეინ თიროზინ კინაზა

TLR – Toll-like receptor (Toll-ის მსგავსი რეცეპტორი)

TdT - ტერმინალური დინუკლეოტიდილ ტრანსფერაზა

PTK - პროტეინ თიროზინ კინაზა

ფსი - ფლუორესცენციის საშუალო ინტენსივობა

შფი - შეფარდებითი ფლუორესცენციის ინტენსივობა

PLCy2 - phospholipase C γ 2 (ფოსფოლიპაზა C γ 2)

ITIM - immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (იმუნორეცეპტორის თიროზინზე დაფუძნებული ინჰიბიტორული თანმიმდევრობა)

Btk - Bruton's tyrosine kinase (ბრუტონის თიროზინ კინაზა)

PI3K - phosphatidylinositol-3 kinase (ფოსფატიდილ-ინოზიტოლ-3 კინაზა)

LPS - Lipopolysaccharide (ლიპოპოლისაქარიდი)

IGHV - immunoglobulin heavy chain variable region (იმუნოგლობულინის მძიმე ჯაჭვის ვარიანტული უბანი).

AID - Activation-Induced Deaminase (აქტივაციის მაინდუცირებელი დეამინაზა

PIP3 - phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (ფოსფატიდილინოზიტოლ(3,4,5)-ტრიფოსფატი)

p38MAPK - P38 mitogen-activated protein kinases (P38 მიტოგენით აქტივირებული პროტეინ კინაზა)

BAM32 - B cell adaptor molecule of 32 kDa

ITAM - immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (იმუნორეცეპტორის თიროზინზე დაფუძნებული აქტივაციური თანმიმდევრობა)

შესავალი

ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემია (ქლლ) - ლეიკემიის ყველაზე გავრცელებული ფორმაა დასავლეთის ქვეყნებში. დაავადება ძირითადად 50 წლის შემდეგ ვლინდება. ქლლ უჯრედები წარმოადგენენ მომწიფებულ, იმუნოკომპეტენტურ ლიმფოციტებს. B-ქლლ ერთადერთია ლეიკემიებს შორის, რომლის განვითარებაც არაა დაკავშირებული რადიაციული გამოსხივების, ქიმიური აგენტებისა და მედიკამენტების ზემოქმედებასთან. ქლლ უჯრედები წარმოადგენენ CD5+CD23+CD19+ CD40+ ლიმფოციტებს, მათ ზედაპირზე სხვა ზედაპირული მოლეკულების ექსპრესია მეტად ცვალებადია(მაგ., IgM, CD79a, CD79b-ს, CD20- ის და CD38-ის) [1-3].

იმუნოგლობულინის (Ig) მძიმე ჯაჭვის (H) (IGHV) არამუტირებული და მუტირებული გენების მიხედვით ქლლ კლონებს ყოფენ ორ ძირითად ქვეჯგუფად შესაბამისად დაავადების აგრესიული და დადებითი პროგნოზით [4]. ნაჩვენები იქნა, რომ Toll-მსგავს რეცეპტორების ოჯახის წევრი - CD180/RP105 ჰეტეროგენულად არის ექსპრესირებული ქლლ უჯრედებზე, ძირითადად კი - მუტირებული IGHV გენების მქონე უჯრედებზე [5,6]. ასევე დადგინდა CD180-ის მონაწილეობა პრო-გადარჩენის პროცესებში ქლლ უჯრედებში და ასევე ის, რომ CD180 იყენებს იგივე ფოსფოინოზიტოლ-3-კინაზის (PI3K) სასიგნალო გზას, რაც B უჯრედული რეცეპტორი (BCR). მონოკლონური ანტისხეულებით CD180-ის შებოჭვა განაპირობებს CD180+ B-ქლლ კლონების დაახლოებით 50%-ის პროლიფერაციას, აქტივაციას და აპოპტოზისგან გადარჩენას, რის საფუძველზე მოხდა დაყოფა ე.წ. “მორეაგირე” და “არამორეაგირე” ქლლ კლონებად [6].

აღსანიშნავია, რომ ქლლ პაციენტებში პროლიფერაცია მიმდინარეობს მხოლოდ ე.წ. „პროლიფერაციულ ცენტრებში“ - ლიმფურ კვანძებსა და ძვლის ტვინში, ხოლო პერიფერიული სისხლიდან გამოყოფილი ლიმფოციტები გაჩერებულნი არიან უჯრედული ციკლის G₀ ფაზაში [1-3]. აღნიშნული ფაქტი განაპირობებს იმას, რომ პაციენტების სისხლიდან მიღებულ უჯრედებზე მუშაობისას, შეუძლებელია აქტიურად პროლიფერირებადი პოპულაციის მიღება ციტოკინების დამატების გარეშე და კვლევა იზღუდება უჯრედული ციკლის G₀ ფაზაში გაჩერებული მცირე ზომის ლიმფოციტების

პოპულაციით. შესაბამისად, ზემოხსენებული შეზღუდვის აცილების მიზნით, კვლევისთვის გამოვიყენეთ სამოდულო სისტემა - მუტირებული IGHV გენების მქონე ქლლ პაციენტის ლიმფოციტებისგან მიღებული უჯრედული ხაზი MEC1 [7], რათა მოგვეცეს საშუალება აქტიურად ციკლირებად უჯრედების პოპულაციაზე, შევისწავლოთ სპეციფიური სტიმულაციის გავლენა სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნების და პროლიფერაციულ მექანიზმებზე. ჩვენმა კვლევითმა ჯგუფმა იქამდე შეისწავლა CD180-ის ექსპრესიის სტაბილურობა უჯრედული ციკლის ფაზების გავლისას, უჯრედების აქტივაციის ხარისხთან მიმართებაში. ნაჩვენები იქნა, რომ MEC1 უჯრედების აქტივაციის ხარისხი მატულობს უჯრედული ციკლის სტაბილიზაციის ფონზე, ასევე პირველად დადგინდა, რომ CD180-მაექსპრესირებელი უჯრედების პროცენტი პროლიფერებად ქლლ კულტურაში არ არის სტაბილური: CD180-მაექსპრესირებელი უჯრედების რაოდენობის მომატება შეიმჩნეოდა პოპულაციის ლოგარითმული ზრდის ფონზე გადათესვიდან პირველი 72 საათის განმავლობაში. ამგვარად, CD180-ის ექსპრესიის უჯრედების პროლიფერაციულ სტატუსთან დამოკიდებულების შემდგომი შესწავლის მიზნით, გადავწყვიტეთ ზედაპირული IgM-ის ან/და CD180-ის შებოჭვის შემდგომ დავაკვირდეთ უჯრედული ციკლის ფაზებში უჯრედების პროცენტული გადანაწილების სურათს, შევაფასოთ აპოპტოზური MEC1 უჯრედების პროცენტული მაჩვენებელი და ასევე უჯრედების აქტივაციური სტატუსი. კვლევა სამ ამოცანად დავყავით: 1. MEC1 უჯრედებში IgM-ის შებოჭვის ეფექტის შესწავლა; 2. IgM-ის სასიგნალო გზის აქტივაციის გავლენის შეფასება CD180-ის ექსპრესიაზე; 3. სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნების და პროლიფერაციულ მექანიზმებზე IgM-ის ან/და CD180-ის შებოჭვის ეფექტის შედარება.

თავი1. ლიტერატურის მიმოხილვა

1. B- ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემია (B-ქლლ)

B-ქლლ წარმოადგენს ავთვისებიან ლიმფოპროლიფერაციულ დაავადებას. იგი ხასიათდება იმუნოლოგიურად არაკომპეტენტური, მონოკლონური CD5+/CD19+/CD23+ B უჯრედების დიდი რაოდენობით დაგროვებით პერიფერიულ სისხლში და ძვლის ტვინში, რაც გამოწვეულია უჯრედების წარმოშობასა და სიკვდილს შორის ბალანსის დარღვევით. B- ქლლ მოზრდილთა ლეიკემიების ყველაზე გავრცელებული ფორმაა დასავლეთ ქვეყნებში. აშშ-ში B-ქლლ-ზე მოდის მთელი ლეიკემიების 30%. ყოველწლიურად აშშ-ში ყოველ 100,000 ადამიანიდან ფიქსირდება ქალების 3.65 და მამაკაცების 6.75 ახალი შემთხვევა, ევროპაში კი ქალების - 4.01 და მამაკაცების - 5.87 ახალი შემთხვევა. ეს დაავადება ძირითადად გვხვდება მოზრდილებში, 50 წლის ზემოთ ასაკში. პაციენტების საშუალო ასაკი შეადგენს 70 წელს, თუმცა გვხვდება 30-39 წლამდე ასაკის პირებშიც. პაციენტების რიცხვი ასაკის მატებასთან ერთად იზრდება. დაავადება უფრო მეტად გავრცელებულია მამაკაცებში ვიდრე ქალებში. [1-3]

B-ქლლ -ის კლინიკური მიმდინარეობა მრავალფეროვანია და ინდივიდუალურ ხასიათს ატარებს. ავადმყოფთა ერთ ჯგუფში იგი წლების განმავლობაში ძლიერ ნელა პროგრესირებს და ამდენად, შესაძლებელია, არც მოითხოვდეს სპეციფიურ მკურნალობას. ზოგჯერ სიკვდილის მიზეზი სრულიად სხვა დაავადება ხდება. მეორე ჯგუფის ავადმყოფებში კი აგრესიულ ხასიათს იძენს, სწრაფად პროგრესირებს და სწრაფადვე სრულდება ლეტალური შედეგით. თანამედროვე შეხედულების თანახმად B-ქლლ-ის უარყოფითი პროგნოზი დაკავშირებულია იმუნოგლობულინების მძიმე ჯაჭვების ჩანასახოვანცენტროვანი მუტაციების ბლოკირებასა და CD38-ის ექსპრესიასთან. დაავადების მიმდინარეობისას ლეიკემიური B უჯრედების დიდი რაოდენობით დაგროვებას პერიფერიულ სისხლსა და ძვლის ტვინში, თან სდევს უჯრედული და ჰუმორული იმუნიტეტის დაქვეითება, რაც თავის მხრივ ხდება მეორეული დაავადების (ინფექციური, აუტოიმუნური, სიმსივნური) მიზეზი.

B-ქლლ უჯრედებს გააჩნიათ დაბალი პროლიფერაციული ინდექსი და გახანგრძლივებული გადარჩენადობა. ისინი გაჩერებული არიან ციკლის G0/G1 ფაზაში და არ პროლიფერირებენ. ისინი აგრეთვე არ განიცდიან აპოპტოზს, რითაც არის გამოწვეული მათი დაგროვება სისხლში. [1-3] B-ქლლ უჯრედები მორფოლოგიურად მსგავსია მცირე მომწიფებული B ლიმფოციტებისა, მაგრამ ისინი ფუნქციურად მოუმწიფებელნი და იმუნოლოგიურად არაკომპეტენტურნი არიან, ამიტომაც B-ქლლ უჯრედები ვერ აწვითარებენ ნორმალურ იმუნურ პასუხს და ვერც იმუნური სისტემის ნორმალური ელემენტები რეაგირებენ გავრცელებადი სიმსივნური უჯრედების წინააღმდეგ. B-ქლლ უჯრედები წარმოიქმნებიან ეგზოგენური ან აუტოანტიგენების მოქმედების შემდეგ და რომლებშიც გენეტიკური დარღვევის შედეგად, შეინიშნება დარღვევები აპოპტოზის გამოწვევის მექანიზმებში. აღნიშნული გენეტიკური დარღვევები არამემკვიდრული ხასიათისაა. ჯერ-ჯერობით დაუდგენელია, თუ რა იწვევს პაციენტებში დნმ-ის ამგვარ ცვლილებებს, თუმცა ზოგიერთი მარკერის და გენების ექსპრესიის გამო ფიქრობენ რომ, B-ქლლ უჯრედები არიან გააქტივებული მეხსიერების უჯრედები.

1.1 გენეტიკური დარღვევები, რომლებიც საფუძვლად უდევს

B-ქლლ-ს

B-ქლლ გამოირჩევა გენომური ცვლილებების მაღალი დონით, მართალია მასთან დაკავშირებული ქრომოსომული აბერაციებისა და გენომური ცვლილებების მექანიზმები ჯერ-ჯერობით სრულყოფილად არ არის შესწავლილი, თუმცა ცნობილია, რომ , უჯრედებს ახასიათებთ დამოკლებული ტელომერები და AID-ის ექსპრესია.

ჩვეულებრივ უჯრედის ყოველი გაყოფის შემდეგ ხდება ტელომერის დამოკლება.ამგვარად, ტელომერის სიგრძე უჯრედის პროლიფერაციული ისტორიის ერთგვარი მაჩვენებელია. B-ქლლ უჯრედების ტელომერებიმოკლეა,ვიდრე ნორმალური B უჯრედებისა. თავის მხრივ, არამუტირებულ B-ქლლ უჯრედებს უფრო მოკლე ტელომერები აქვთ, ვიდრე მუტაციის მქონე ლიმფოციტებს. აღსანიშნავია,ის რომ არამუტირებული IGVH გენების შემცველი უჯრედები უფრო ნაკლები სიხშირით იყოფიან, მუტირებულთან შედარებით. აღნიშნულ შემთხვევაში ფერმენტ ტელომერაზას აქტივობა გაცილებით მაღალია, რაც შეიძლება აკომპენსირებდეს უკიდურესად მოკლე ტელომერებს. ტელომერის მნიშვნელოვანმა დამოკლებამ შესაძლოა განაპირობოს ტელომერული დისფუნქცია, რომელიც იწვევს გენომის არასტაბილურობას. არარეციპროკული ქრომოსომული გადაჯგუფება, როგორც წესი წარმოადგენს ტელომერული დისფუნქციის შედეგს,რაც ასევე იწვევს ქრომოსომის დაკარგვას,რეგიონულ ამპლიფიკაციას ან დელეციას.[1]

B-ქლლ-ს 80%-ში ადგილი აქვს ქრომოსომულ დელეციებსა და ამფლიკაციებს.[8] B-ქლლ პაციენტებში დაავადების პროგნოზი დამოკიდებულია ნეოპლაზიურ უჯრედებში არსებულ გენეტიკურ ცვლილებებზე. აღიარებულია ოთხი ძირითადი გენეტიკური ცდომილება,რომლებსაც დიდი გავლენა აქვთ დაავადების ტიპზე, მიმდინარეობაზე. 1. მე-17 ქრომოსომის მოკლე მხრის ნაწილის დელეცია(17p) . სწორედ ამ უბანში არის ლოკალიზებული უჯრედული ციკლის მარეგულირებელი ცილა p53-ის მაკოდირებელი გენი- TP53. მისი აქტივაცია განაპირობებს უჯრედული ციკლის შენელებას, დნმ-ს აღდგენას . მას შეუძლია მოახდინოს აპოპტოზის ინიცირება , თუ დნმ-ში არსებული დაზიანება გამოუსწორებელია. B-ქლლ დიაგნოსტირებულ პაციენტებში , რომლებსაც აღენიშნებათ 17p დელეცია,გადარჩენის ხანგრძლივობა მხოლოდ 3-5 წელია.17p დელეცია ნანახია შემთხვევათა 5-10%-ში. 2. მე-11 ქრომოსომის გრძელი მხრის დელეცია(11p). იგი მოქმედებს ATM გენზე. 11p დელეციას ადგილი აქვს არც თუ ისე ხშირად და გვხვდება შემთხვევათა მხოლოდ 5-10%-ში. ახასიათებს ცუდი პროგნოზი. 3. მე-12 ქრომოსომის ტრისომია. გვხვდება შემთხვევათა 20-25%-ში. ახასიათებს საშუალო პროგნოზი. 4. მე-13 ქრომოსომის გრძელი მხრის დელეცია (13p) არის ყველაზე დამახასიათებელი ანომალია B-ქლლ-სთვის.გვხვდება შემთხვევათა 50%-

ში. დაავადების პროგნოზი ყველაზე კარგია,უმეტესობა პაციენტებისა ცხოვრობს დიდი ხნის განმავლობაში,ათეულობით წლებიც კი , თერაპიის საჭიროების გარეშე [9]

B-ქლლ შეიძლება წარმოიქმნას არამუტირებული IgVH გენების მქონე naive უჯრედიდან, ან მეხსიერების მქონე ჩანასახოვანი ცენტრიდან გამოსული უჯრედიდან, რომელსაც აქვს მუტირებული IgVH გენები. ამ ორ ჯგუფს აქვს განსხვავებული ფენოტიპი და მორფოლოგია.პაციენტებს არამუტირებული IgVH გენებით ახასიათებთ ატიპიური მორფოლოგია, მე- 12 ქრომოსომის ტრისომია, მუტირებული გენების მქონე პაციენტები შეადგენენ B-ქლლ-ს 50-70%-ს. აქედან გამომდინარე განარჩევენ B - ქლლ-ის 2 ძირითად ტიპს იმუნოგლობულინის მძიმე ჯაჭვის ვარიანტული რეგიონის გენში (IG VH) არსებული მუტაციის არსებობის ან არარსებობის მიხედვით. ერთი ტიპი წარმოიქმნება ნაკლებ დიფერენცირებული B უჯრედებისაგან, სადაც არ ხდება IG VH გენის მუტაცია. ამ შემთხვევაში ხდება დაავადების სწრაფი პროგრესირება. მეორე ტიპი ვითარდება უფრო მეტად დიფერენცირებული B უჯრედებისაგან, სადაც ადგილი აქვს IG VH გენის მუტაციას და დაავადებას აქვს კარგი პროგნოზი. ეს ორი ჯგუფი ასევე განსხვავდება ტელომერის სიგრძითაც. არამუტირებული გენების მქონე B უჯრედებს ახასიათებთ უფრო მოკლე ტელომერები და ფერმენტ ტელომერაზას მაღალი დონე, რაც მიუთითებს გავლილი ციკლების მეტ რაოდენობაზე. დელეციები 11p, 17p და მე-12 ქრომოსომის ტრისომია კორელაციაშია უფრო მოკლე ტელომერებთან და ტელომერაზას მაღალ დონესთან, განსხვავებით ქრომოსომული აბერაციების არმქონე ან 13p დელეციის მქონე უჯრედებისგან.[10]

დადგენილია,რომ კლინიკურად მძიმე პაციენტებს , რომლებსაც არ გააჩნიათ IgVH გენის მუტაცია, ახასიათებთ CD38 -ის, CD69-ის CD 40-ის უფრო მაღალი ექსპრესია და CD71-ის, CD62L-ის, CD39-ის უფრო დაბალი ექსპრესია, აგრეთვე ახასიათებთ p53-ის დისფუნქცია. გარდა ამისა, B-ქლლ-ის შემთხვევაში სომატური ჰიპერმუტაციები საკმაოდ ხშირია, ხოლო AID გენი, რომელიც ნორმალურ B უჯრედებში განაპირობებს IgVH გენის მუტაციას და დნმ-ის სეგმენტის დელეციას იზოტიპური გადართვის დროს - ექსპრესირდება B-ქლლ-ის შემთხვევაშიც, თუმცა მხოლოდ მცირე ფრაქციაში.[1]

1.2 B-ქლლ-ს ფენოტიპი

B-უჯრედული დარღვევების დროს, იმუნოფენოტიპირება საშუალებას იძლევა IgM-ის მსუბუქი ჯაჭვის რესტრიქციის საპუძველზე, დავადგინოთ დაავადების კლონური ბუნება. იმუნოფენოტიპური პროფილის შესწავლა იძლევა აგრეთვე მნიშვნელოვან დიაგნოსტიკურ ინფორმაციას დაავადების ფორმის შესახებ. იმუნოფენოტიპის განსაზღვრა აუცილებელია B-ქლლ-ის დიაგნოსტიკისათვის.

B-ქლლ-ს ახასიათებს CD19, CD20, CD23, CD40 ფენოტიპის მქონე მონოკლონური B უჯრედები. მათ ახასიათებთ ზედაპირული IgM და IgD-ს დაბალი დონე, რის გამოც BCR-ს შებოჭვის შედეგად აღიძვრება სუსტი პასუხი. სავარაუდოდ, B-ქლლ წარმოიშვება CD5+ მანტიის ზონის ლიმფოციტებისგან, რომლებიც გამოიმუშავენ აუტოანტისხეულებს. CD5 ზოგადად T უჯრედული მარკერია, თუმცა ნორმაში გვხვდება ემბრიონულ B უჯრედებზე, მოზარდებში კი ძვლის ტვინში არ ვლინდება, თუმცა პერიფერიულ ლიმფურ კვანძში შეადგენს B უჯრედების 30%-ს, ხოლო ელენთაში 10%-ს. CD5 შეიძლება მოვიხსენიოთ, როგორც აქტივაციური მარკერი, მისი ექსპრესია შეიძლება ნიშნავდეს წინამორბედ აქტივაციას. ცნობილია, რომ B-ქლლ-ს დროს B უჯრედებზე მუდმივად ექსპრესირდება CD5-ის ერთ-ერთი ლიგანდი CD72.

CD5 წარმოადგენს BCR-ის სასიგნალო გზის უარყოფით რეგულატორს. ნაჩვენებია იქნა, რომ CD5-ის ლიგაცია ანტი-CD5 მონოკლონური ანტისხეულებით (მკა) ნორმალურ B უჯრედებში იწვევდა მათ აპოპტოზს.[5] უფრო მეტიც, B-ქლლ-ის მქონე ყოველ მესამე პაციენტში რომელთა სიმსივნური B უჯრედებიც აექსპრესირებდნენ CD5-ს, უჯრედების უმეტესობამ განიცადა აპოპტოზი ანტი-CD5 ანტისხეულები მოქმედების შედეგად, ხოლო იმ პაციენტების B-ქლლ უჯრედებში, რომელთაც არ განიცადეს ანტი-CD5 მკა-ით ინდუცირებული აპოპტოზი - CD5-ის სასიგნალო გზაში აღინიშნებოდა დარღვევები, კერძოდ CD5 ვერ უკავშირდებოდა IgM-ს და ლიპიდური ტივის შემადგენლობაში სხვა მნიშვნელოვან სასიგნალო მოლეკულებს. IgM-ს შეუძლია დაუკავშირდეს CD5-ს SHP-1-ით, რაც მეტია sIgM-ის დონე, მით მეტი CD5 უკავშირდება BCR-ს და შესაბამისად იზრდება აპოპტოზის გამოწვევის შესაძლებლობა.

B-ქლლ უჯრედებზე ექსპრესირდება B ლიმფოციტებისათვის სპეციფიკური ტრანსმემბრანული გლიკოპროტეინი- CD19. იგი წარმოადგენს იმუნოგლობულინების სუპეროჯახის წევრს და გვხვდება B უჯრედული განვითარების ყველა სტადიაზე.(B უჯრედზე ექსპრესირებული ყველაზე ადრეული მარკერია) CD19 წარმოადგენს B უჯრედული კომპლექსის (BCR) სასიგნალო გზის პოზიტიურ რეგულატორს და განიცდის ფოსფორილირებას გააქტივებულ BCR-თან თანადაკავშირებისას, თუმცა მისი ლიგანდი ჯერ-ჯერობით არაა ცნობილი.

B-ქლლ უჯრედებზე მაღალი დონით ექსპრესირდება CD23.იგი წარმოადგენს B ლიმფოციტების აქტივაციის მარკერს.იგი B უჯრედებზე ასოცირდება HLA-DR-თან.წარმოადგენს IgE-ის რეცეპტორს და შეუძლია დაკავშირება CD21-თან.CD23-ის ექსპრესია B-ქლლ უჯრედებზე გამოწვეულია ამ უჯრედების ურთიერთქმედებით უმეტესად გააქტივებულ T უჯრედებთან. [11] B -ქლლ უჯრედების ზედაპირზე არ არის ან ძალიან დაბალი დონითაა წარმოდგენილი CD22, რომელიც მნიშვნელოვან როლს თამაშობს სიგნალის გადაცემაში.

B-ქლლ-ს ჰეტეროგენულობას ასევე ადასტურებს CD79-ს ექსპრესიის ხასიათი. ჰეტეროდიმერი, რომელიც შედგება CD79a, CD79b მოლეკულებისგან, წარმოადგენს B უჯრედული რეცეპტორის კომპლექსის ნაწილს და არეგულირებს IgM-ს ზედაპირულ ექსპრესიას. B-ქლლ-ს შემთხვევების 75-95%-ში, მისი ექსპრესიის დონე საკმაოდ შემცირებულია ან საერთოდ არ რეგისტრირდება.

B-ქლლ-ს დროს ლიმფოციტებს ახასიათებთ მცირე ზომის, მოსვენებული უჯრედების მორფოლოგია, თუმცა ფენოტიპური ანალიზის მიხედვით აღმოჩნდა, რომ ეს დაავადება მაღალი ჰეტეროგენურობით გამოირჩევა და B-ქლლ-ს უჯრედების უმრავლესობას ზედაპირზე აქვს სახესხვაობა აქტივაციური მოლეკულებისა, მაგალითად: CD23, CD25, CD27, CD69, CD71 და მომატებული HLA-DR. B-ქლლ-ს უჯრედები ნორმალური B უჯრედების მსგავსად ღებულობენ გადარჩენის და პროლიფერაციის მაინდუცირებელ სიგნალებს. ამ სიგნალების წარმოშობა ხდება უჯრედების ურთიერთქმედების ხარჯზე. მაგალითად B უჯრედებს, ნორმაშიც და სიმსივნის დროსაც, ზედაპირზე ექსპრესირებული აქვთ მოლეკულა - CD40,(TNF-ის ოჯახის რეცეპტორი) რომლის ლიგანდი CD40L ნორმაში B უჯრედებზე არ

ექსპრესირდება, B-ქლლ-სგან განსხვავებით. ასევე CD27 და CD70 ერთდროულად ექსპრესირდება B უჯრედებზე. ეს მოლეკულები შუამავლობენ B-B, B-T უჯრედების ურთიერთობას, ეხმარებიან ნეოპლაზიური პროცესების წარმოშობასა და განვითარებას[11]

B-ქლლ ლიმფოციტები ნორმალურ B უჯრედებთან შედარებით უფრო მაღალი ინტენსივობით აექსპრესირებენ აქტივაციის მარკერებს: - CD23, CD25, CD 69, CD71 და ნაკლებად- BCR-ის ნეგატიურ რეგულატორებს: CD22, CD79b, IgD. გარდა ამისა, ლეიკემიური უჯრედები აექსპრესირებენ CD27-ს, რაც იმის მანიშნებელია, რომ მათ გაიარეს მეხსიერების უჯრედული სტადია. [11]

B-ქლლ-ს ახასიათებს CD38-ის ექსპრესია. დადგინდა, რომ CD38-ის ექსპრესიის დონე მნიშვნელოვან პროგნოსტიკულ ფაქტორს წარმოადგენს B-ქლლ-ს დროს. CD38 - ტრანსმემბრანული გლიკოპროტეინია, რომელიც ჩვეულებრივ დიდი რაოდენობით ექსპრესირდება B უჯრედების წინამორბედებზე, ჩანასახოვან B უჯრედებზე და პლაზმურ უჯრედებზე, მოცირკულირე B ლიმფოციტებზე კი უფრო ნაკლები ინტენსივობითაა წარმოდგენილი. მონაწილეობს Ca-ს მობილიზაციაში, მისი ლიგაცია იწვევს CD19-ს ფოსფორილირებას. მხოლოდ ის უჯრედები, რომლებზეც ექსპრესირებულია CD38, განიცდიან აპოპტოზს ანტი-IgM ანტისხეულების მოქმედებით, ხოლო CD38- B -ქლლ უჯრედები, რეზისტენტულნი არიან აპოპტოზის მიმართ. აქედან გამომდინარე, მართებულია ვარაუდი იმისა, რომ CD38 თამაშობს მნიშვნელოვან როლს B-ქლლ უჯრედების აპოპტოზში. პაციენტებს, რომელთაც ახასიათებთ CD38-ს მაღალი ექსპრესია, გამოირჩევიან IgM V გენის მუტაციების დაბალი სიხშირით, მოკლე გადარჩენის პერიოდით, ხოლო CD38-ს დაბალი ექსპრესია ასოცირდება IgM V გენების მაღალი სიხშირით მუტაციასთან, კარგ პროგნოზთან, პაციენტებს სჭირდებათ მინიმალური თერაპიული ჩარევა. [3,12,13]

აღსანიშნავია, რომ ZAP70 და CD38 მონაწილეობენ არამუტირებული გენების მქონე B უჯრედებში IgM-ს სიგნალის გადაცემაში. ZAP70 ნორმაში T უჯრედებზე და ბუნებრივ კილერებზე ექსპრესირდება, მონაწილეობს TCR-ს სასიგნალო გზაში. B-ქლლ-ს დროს თითქმის იგივე პროცენტით ექსპრესირდება B უჯრედებში. ZAP70-ს მომატებული ექსპრესია ასოცირდება არამუტირებული გენების მქონე B-ქლლ-თან. ZAP70 T

უჯრედებში და Syk B უჯრედებში მსგავს ფუნქციას ასრულებენ. B-ქლლ-ს დროს ZAP70-ს ექსპრესიისას ვლინდება Syk-ს ძლიერი ფოსფორილირება, რაც ზრდის სიგნალის გადაცემას [14,15]

B-ქლლ უჯრედების ფენოტიპი, რომელიც მნიშვნელოვნად განსხვავდება ნორმალური უჯრედების ფენოტიპისაგან, აფერხებს რა აპოპტოზს, ხელს უწყობს მათ გადარჩენასა და აკუმულაციას პერიფერიულ სისხლში.

1.3 CD180: სტრუქტურა და ფუნქციები

B-ქლლ უჯრედების დაახლოებით 60% ზედაპირზე აექსპრესირებს CD180-ს. CD 180 არის 105kD მოლეკულური მასის ტრანსმემბრანული ცილა, რომელიც წარმოადგენს Toll-მსგავსი რეცეპტორების ოჯახის წევრს(TLR). ის აღმოაჩინეს ადამიანის B naive უჯრედებზე (და არა ჩანასახოვან ცენტრებზე) მონოკლონური ანტისხეულებით, მოლეკულას უწოდეს Bgp95, დამოუკიდებელ ექსპერიმენტებში დადგინდა, რომ ის ექსპრესირდება თავის B უჯრედებზე და უწოდეს RP105,(მათი აღმოჩენის თანმიმდევრობის მიხედვით, შესაბამისად ადამიანისა და თავის უჯრედებში) ეს მოლეკულა გამოირჩეოდა ლეიციწით მდიდარი თანმიმდევრობებით და თავებს იცავდა დასხივებით გამოწვეული აპოპტოზისგან. ლიმფოციტების გარდა, CD180 ექსპრესირდება მონოციტებზე და დენდრიტულ უჯრედებზე. მისი შებოჭვა B უჯრედებში იწვევს შიდაუჯრედული Ca-ს მობილიზაციას, C-myc-ს ექსპრესიასა და უჯრედების ციკლში შესვლას. B უჯრედების აქტივაციას თან სდევს CD180-ს ექსპრესიის დონის შემცირება. [16].

CD180 ჰეტეროგენულად ექსპრესირდება B-ქლლ უჯრედებზე. B-ქლლ უჯრედები შეიძლება დაიყოს CD180 + და CD180- კლონებად. CD180+ B -ქლლ კლონის 50% CD180-ის მონოკლონური ანტისხეულებით შებოჭვაზე რეაგირებს აქტივაციითა და პროლიფერაციით, ხოლო დანარჩენი 50% არ რეაგირებს. აქედან გამომდინარე, CD180+ B-ქლლ კლონები იყოფა „მორეაგირე“(R-Responders) და

„არამორეაგირე“ (NR-Non-Responders) უჯრედებად. B-ქლლ-ში CD180⁺ უჯრედების რიცხვი ყოველთვის ნაკლებია, ნორმალურ B უჯრედებთან შედარებით. CD180-თან ერთად B უჯრედებზე კო-ექსპრესირდება MD-1 მოლეკულა, რომელიც აუცილებელია CD180-ს ექსპრესიისთვის. B-ქლლ-ში CD180-ს დაბალი ექსპრესია სწორედ MD-1-ს სიმცირეს უკავშირდება [6].

CD180-ს IgVH გენების მუტაციურ სტატუსთან კავშირის შესწავლისას აღმოჩნდა, რომ CD180 ყოველთვის უფრო მაღალია მუტირებული გენების მქონე B უჯრედებში. იმ დროს, როცა sIgM -ს დონე პირიქით არამუტირებული გენების მქონე უჯრედებში უფრო მაღალია [5].

CD180 არის TLR4-ს ჰომოლოგი, რომელიც არის LPS-ს გამომცნობი მთავარი რეცეპტორი, იგი კო-ექსპრესირდება MD-2-თან ერთად, რომელიც MD-1-ს ჰომოლოგია. B უჯრედებზე CD180-ს ექსპრესია გაცილებით მაღალია TLR4-თან შედარებით. LPS-ის დაკავშირება TLR4-თან იწვევს B უჯრედის აქტივაციას, აინდუცირებს TLR-ის ტრადიციულ სასიგნალო გზას. აქტივდება MYD88/IRAK და MYD88-გან დამოუკიდებელი TIRAP სასიგნალო გზები, რის შედეგადაც ხდება JNK-ს და NF-κB-ს აქტივაცია [17,18] მეორეს მხრივ, ნაჩვენებია იყო, რომ B უჯრედული რეცეპტორის (BCR) სასიგნალო გზაში წილე მოლეკულების: CD19-ის, Lyn-ის, Btk-ს, PI3K, BLNK ან PLC2-ის დეფიციტის შემთხვევაში LPS-ით სტიმულაციის შემდეგ შეინიშნება პროლიფერაციული პასუხის მნიშვნელოვანი დარღვევები. Btk, PI3K, BLNK და PLC2 BCR-ის სასიგნალო გზაში თანმიმდევრულად არიან ასოცირებულნი “B უჯრედულ სიგნალოსომაში”, რომელიც უჯრედშიდა Ca^{+2} -ის ცვლას არეგულირებს. ხოლო CD19 B უჯრედში განსაზღვრავს BCR-დან სიგნალის გადაცემის ზღურბლს, Lyn კინაზის აქტივაციის რეგულირების მეშვეობით. ამასთანავე, ბოლო წლების განმავლობაში დადგინდა მრავალი ფაქტი, რომელიც CD19-ის და CD180-ის ფუნქციურ კავშირზე მიუთითებს, აგრეთვე CD19-ის როლზე LPS-ით ინდუცირებულ სასიგნალო გზაში [19].

CD19-ის ციტოპლაზმური დომენი შეიცავს 9 მაღალკონსერვატორულ თიროზინის ნაშთს, რომლებიც ფოსფორილების შემდეგ წარმოადგენენ დამაკავშირებელ საიტებს ისეთი SH2 დომენების შემცველი სასიგნალო მოლეკულებისათვის, როგორიცაა Lyn, VAV და PI3-კინაზა[19].

დადგინდა, რომ CD180-ის შებოჭვას მოსდევს CD19-ის ფოსფორილება, ტრანსლოკაცია ლიპიდურ ტივებში და CD19-ის მიერ პროტეინ თიროზინ კინაზა Lyn-ის და ადაპტორული ცილა VAV-ის აქტივაცია და SH2 დომენის მეშვეობით მათი დაკავშირება, ისევე, როგორც ეს ხდება BCR –ის სასიგნალო გზის შემთხვევაში[19].

BCR-ის და LPS-ით ინდუცირებული CD19-ის ფოსფორილირების შედარებისათვის ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ BCR-ის ლიგაციის შემდეგ ადგილი ჰქონდა CD19-ის ძლიერ, მაგრამ ხანმოკლე ფოსფორილებას, იმ დროს, როცა LPS-ით ან ანტი-CD180-ით ინდუცირებული CD19-ის ფოსფორილებას ახასიათებდა დაბალი, მაგრამ ხანგრძლივი პერიოდი. (მაქსიმალურ დონეს აღწევდა 20 წუთში და გრძელდებოდა 120 წთ-ის განმავლობაში). LPS-ით ინდუცირებული CD19-ის ფოსფორილებისათვის აუცილებელია CD180/MD1-ის ექსპრესია, რადგანაც ანტი-MD-1 ანტისხეულებით დამუშავება, რომლებიც ახდენდნენ CD180/MD1 კომპლექსთან LPS-ის დაკავშირების ბლოკირებას სრულიად თრგუნავდა CD19-ის ფოსფორილირებას[19].

CD19-ის მნიშვნელოვანი როლი CD180-ის სასიგნალო გზაში ასევე ნაჩვენები იქნა ექსპერიმენტულად თაგვებში, როცა TLR-/- და MYD88-/- დეფიციტურ თაგვებში ანტი-CD180 მკა-ით მოქმედების საპასუხოდ გამოვლინდა B უჯრედების ისეთივე პროლიფერაციული პასუხი, როგორიც wild type თაგვების შემთხვევაში, რაც მიუთითებდა იმაზე, რომ CD180-ის სასიგნალო გზა რეგულირდება არა TLR-ებისათვის დამახასიათებელი MYD88-ით და IL-1R გამააქტივებელი კინაზის (IRAK) მიერ, არამედ B უჯრედ-სპეციფიური სასიგნალო მოლეკულების, კერძოდ CD19-ის მიერ[19]

ამგვარად, CD180 და TLR4 სიგნალის გადაცემისათვის იყენებენ სხვადასხვა მოლეკულებს. TLR 4 იყენებს MYD88-ს და არ არის დამოკიდებული CD19-ის ექსპრესიაზე, იმ უჯრედების მსგავსად, რომლებიც საერთოდ არ ექსპრესირებენ CD19-ს. ამის საპირისპიროდ CD180-ის ლიგაცია იწვევს Lyn-ის აქტივაციას და CD19-ის ფოსფორილებას, CD19 კი თავის მხრივ, კიდევ უფრო აძლიერებს Lyn-ის აქტივაციას. აღსანიშნავია, რომ CD180-ის და CD19-ის ფიზიკური კავშირი ჯერ-ჯეჯრობით არ არის დადგენილი. ასევე გაუგებარია ის მექანიზმი, რომლითაც CD180 და TLR4

ურთიერთშეთანხმებით არეგულირებენ LPS-დმი პასუხს. TLR4-ს ძირითადი როლი აკისრია B უჯრედის LPS-ით აქტივაციაში. ამის საპირისპიროდ, LPS იწვევს მხოლოდ სუსტ პროლიფერაციას CD180-ის არ არსებობის შემთხვევაში. ამ მონაცემების საფუძველზე შეიძლება ითქვას, რომ B უჯრედის LPS-ით აქტივაციისათვის საჭიროა TLR4-ის ექსპრესია, ხოლო CD180 შესაძლოა აძლიერებდეს ამ პასუხს.

ადამიანისა და თაგვის B უჯრედებში CD180-ის შებოჭვის საპასუხოდ ვითარდება აქტივაციის პროცესი. აქტივაციისას ადგილი აქვს მისი ექსპრესიის დონის შემცირებასა და MHC II კლასის, CD80/CD86-ისა და CD40-ს ექსპრესიის დონის გაზრდას [6]. ასევე იზრდება CD19⁺ B უჯრედების რიცხვი, რომლებიც შედიან ციკლში. ამგვარად CD180-ს შებოჭვა ნორმაში იწვევს B უჯრედების აქტივაციასა და პროლიფერაციას. ცნობილია, რომ CD40-ს ლიგაცია და IL4-ს დამატება იწვევს B უჯრედების ძლიერ აქტივაციას [6]. ჯანმრთელ დონორების და „მორეაგირე“ B-ქლლ-ის შემთხვევაში CD40-ის ან CD180-ს შებოჭვას ან IL4-ს დამატებას მოჰყვება CD19⁺CD86⁺ და CD19⁺/ki67⁺ უჯრედების პროცენტის მომატება, თანაც პროცენტული მაჩვენებლების შედარებისას გამოჩნდა, რომ CD180 უფრო ძლიერი აქტივატორული გავლენა გააჩნია. ცნობილია, რომ ანტი-CD40 მონოკლონური ანტისხეულებით (მკა) ზემოქმედება და IL-4 იცავს B-ქლლ უჯრედებს აპოპტოზისგან. ანტი-CD180 მკა-ით ზემოქმედების საპასუხოდ ჯანმრთელ დონორების B უჯრედებში და „მორეაგირე“ B-ქლლ კლონის შემთხვევაში, ასევე ადგილი აქვს აპოპტოზისგან დაცვას, რადგან იზრდება Mcl-1-ს დონე. აღსანიშნავია, რომ CD180⁻ B-CLL კლონები სუსტად პასუხობენ ანტი-CD40 მკა-ით და IL-4-ით სტიმულაციაზე. აგრეთვე CD40-ს დონე „მორეაგირე“ და „არამორეაგირე“ უჯრედებში მნიშვნელოვნად არ განსხვავდება. CD180-სა და CD40-ს კო-შებოჭვა ნორმაში და „მორეაგირე“ B-ქლლ კლონებში იწვევს B უჯრედების უფრო მაღალ აქტივაციას, ციკლის ფაზებში უჯრედების რაოდენობის ზრდასა და CD86⁺ MFI-ს მომატებას. თუმცა ამ მოლეკულების კომბინაციას B-ქლლ-ს „არამორეაგირე“ უჯრედებზე და CD180⁻ კლონებზე მნიშვნელოვანი შედეგი არ აქვს. CD180-ს შებოჭვა კონტროლში და B-ქლლ კლონებში იწვევს pZAP70/Syk, p38MAPK, ERK და Akt პროტეინ-კინაზების ფოსფორილირებას. მოლეკულების

ფოსფორილირების დონე უფრო მაღალია „მორეაგირე“ B-ქლლ კლონებში, კონტროლთან შედარებით [6].

1.4 B უჯრედული რეცეპტორის სასიგნალო გზა

B-უჯრედული რეცეპტორი (BCR) – ექსპრესირებულია ყველა მომწიფებული B ლიმფოციტის ზედაპირზე. იგი მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ანტიგენის გამოცნობაში და B უჯრედების გააქტივებაში. მას აქვს ორი ძირითადი ფუნქცია: 1. გადასცეს სიგნალები, რომლებიც არეგულირებენ B ლიმფოციტების ბედს 2. ანტიგენის პროცესინგი და მისი წარდგენა T უჯრედებისათვის. BCR-ის შემადგენლობაში შედის მემბრანული იმუნოგლობულინი (mIg) , რომელიც ასოცირდება Ig α /CD79a (CD79A ანტიგენი) და Ig β /CD79b (CD79B ანტიგენი) ჰეტეროდიმერთან. mIg-ს სუბერთეული უკავშირდება ანტიგენს, იწვევს რეცეპტორის აგრეგაციას, ხოლო Ig α და Ig β სუბერთეულები უზრუნველყოფენ სიგნალის უჯრედში გადაცემას[20,21] BCR-ანტიგენის კომპლექსი ააქტივებს შიდაუჯრედულ ცილებს-თიროზინ კინაზებს Syk, Btk, Fyn. ეს თიროზინ კინაზები აფოსფორილირებენ კო-რეცეპტორების CD19-ს და BCAP-ის YXXM მოტივებს, რაც უზრუნველყოფს PI3K შემდგომ დაკავშირებას ამ უბნებთან. CD19 ხელს უწყობს PI3K-ს გააქტიურებას BCR-ს სტიმულაციის შემდეგ, CD19- აქტივაციის მთავარი რეგულატორია B უჯრედებში. CD19 ქმნის კომპლექსს CD21-თან და CD81-თან. CD21 უკავშირდება ოფსონიზირებულ ანტიგენის ნაწილაკებს და ააქტივებს კომპლემენტის კომპონენტებს C3-ს. B უჯრედს აქვს სხვა ტრანსმემბრანული რეცეპტორებიც, რომლებიც მონაწილეობენ BCR სიგნალში, მაგალითად CD45 და Fc-GammaRIIB (CD32)[21,22]

CD19-ის ფოსფორილირება განაპირობებს Lyn-ის გააქტიურებას, რომელიც თავის მხრივ ააქტიურებს PI3K1-ს. Lyn-ს იწვევს Vav და Tec თიროზინ კინაზების მომდევნო აქტივაციას. Vav და Tec ხელს უწყობენ PI3K-ს აქტივაციაში. B უჯრედის პროლიფერაცია ასევე სტიმულირდება IL-4/IL-4R-ით, IRS - ინსულინის რეცეპტორის სუბსტრატის აქტივაციით, LPS-ს მიერ - TLR4/CD180-ს სტიმულაციით, ან CD40-CD40L-ის დაკავშირებით. CD40 ააქტიურებს Cbl-ს, რომელიც უკავშირდება p85Alpha-ასოცირებულ p110Delta, შესაბამისად აძლიერებს PI3K-ს სიგნალს. რეგულატორული I კლასის PI3K სუბერთეულები ააქტივებენ კატალიზურ სუბერთეულებს, შედეგად აქტიური კატალიზური I კლასის PI3K აფოსფორილირებს PIP2-ს, რის შედეგად წარმოიქმნება PIP3 და ასევე ააქტიურებს III კლასის PIK3C3-ს, რომ გააძლიეროს ფოსფორილების პროცესი. PI3K /PIP3 მოქმედებს Akt-ზე და ზრდის უჯრედის გადარჩენის პროცესს[23,24]. PIP2-ს PIP3-ად გარდაქმნას ხელს უშლის PTEN ლიპიდური ფოსფატაზა, რომელიც გამოყოფს D3 PIP3-დან[25]. მსგავსი ინჰიბიტორული ფუნქცია აქვს Fc-Gamma-RIIB-თი ინდუცირებულ SHIP-ს. BCR-ს კო-ლიგაციით Lyn-თან და ასოცირებული კო-რეცეპტორები ქმნიან SH2-ს ამოცნობის უბნებს, რაც უზრუნველყოფს დაკავშირების უბანს სასიგნალო ინჰიბიტორული მოლეკულა SHIP-სთვის, ეს უკანასკნელი ხელს უშლის PIP3-ს ჭარბ აკუმულაციას და გარდაქმნის მას PtdInsP2-ად, რაც იწვევს PI3K/PIP3 სიგნალის გაუქმებას. ხოლო PI3K-ს ცვლის TAPP ადაპტორული ცილა, რომელიც სპეციფიურად უკავშირდება PtdInsP2 -ს და გავლენას ახდენს ჩონჩხის რეორგანიზაციაზე[26,27]. PIP3-ს გარდაქმნა PtdInsP2-ად ზღუდავს Vav, Tec და სასიგნალო კომპლექსის(BTK, PLC-Beta, PLC-Gamma, BLNK) აქტივაციას. PIP3 და PtdIns(3,4)P2-ს გენერაცია რთავს BAM32-ს ადაპტორულ ცილას, რომელიც მაღალი აფინობით ქმნის ბმას PIP3-თან PH-დომენით, რაც იწვევს BCR-დამოკიდებულ კალციუმის ნაკადს. BCR-ს ლიგაციის შემდეგ BAM32 პლაზმურ მემბრანასთან მიზიდვას PH დომენით დაკავშირების ხარჯზე. BCR-ით სტიმულირებული კალციუმის გამოსვლა დამოკიდებულია BCR ასოცირებული კო-რეცეპტორების, BAM32, Vav, Tec, აქტივაციაზე. PLC-Beta და PLC-Gamma-ს თანმიმდევრული ფოსფორილირება Lyn-ს მიერ და BTK-ს აუტოფოსფორილირება ხელს უწყობს BCR-ით სტიმულირებულ და PI3K-დამოკიდებულ კალციუმის სიგნალს.

ამ პროცესს ასევე არეგულირებს BAM32. ეს ფოსფოლიპაზები იყენებენ PIP2-ს როგორც სუბსტრატს IP3 და DAG გამომუშავებისთვის. IP3 ააქტიურებს IP3R-ს, რომ გამოანთავისუფლოს კალციუმის იონები, მაშინ როცა DAG და კალციუმი რთავენ PKC-Beta და Calm-ს შესაბამისად. გაზრდილი კალციუმის რაოდენობის ერთ-ერთი სამიზნეა ტრანსკრიფციის ფაქტორი NFAT, ბირთვული ტრანსლოკაციებს ხელს უწყობს მისი დე-ფოსფორილირება. PKC-Beta აფოსფორილირებს IKKs-ს რაც შედეგად იწვევს IκBs-ს ფოსფორილირებასა და დეგრადაციას და NF-κB-ს ბირთვში ტრანსლოკაციას. PKC ააქტიურებს BIMP1/Bcl10/MALT1-ს, შედეგად ფორმირდება ძლიერი და სპეციფიური კომპლექსი უჯრედის შიგნით, რომ ერთდროულად გაააქტიურონ NF-κB, მაშინ როცა Calm აამუშავებს CaMKII-ს NF-κB აქტივაციისთვის[28,29]. კატალიზური PI3Ks მიერ NF-κB ტრანსლოკაცია მოგვიანებით ზრდის BCR-ით სტიმულირებულ PI3K გენების ექსპრესიას. PI3K-თი გაშუალებული გენების ექსპრესია BCR/c-AbI-ს გავლენის ქვეშ ააქტიურებს MAPK კასკადს aPKC/Raf1MEK გზით. MAPKs-ს შემდგომი გააქტიურება არეგულირებს MAPK გზას, რომ გააკონტროლოს ტრანსკრიფციის ფაქტორებით ინდუცირებული უჯრედების პროლიფერაცია. ეს ფაქტორები ასევე არეგულირებენ Opn გენის ექსპრესიას, რომელიც მონაწილეობს ისეთი უჯრედული პროცესების მოდულირებაში, როგორიცაა იმუნური ჰომეოსტაზი, ძვლად გადაქცევა, მიელინიზაცია. Opn ასევე აკონტროლებს ინტეგრინის გზას ECM/ინტეგრინის ურთიერთობის გზით, რათა მოიზიდოს რეგულატორული PI3Ks[30].

BCR-ის ორი მთავარი სასიგნალო გზის - MEK1/2-ERK1/2 და PI3K/AKT შესწავლისას, დადგინდა, რომ ქლლ პაციენტების 50%-ში ფიქსირდება ERK1/2-ის მუდმივი ფოსფორილირება. იგივე სურათი დადგინდა MEC1 უჯრედული ხაზისთვის, მაშინ როცა AKT-ს ფოსფორილირებას ადგილი არ აქვს[31]

1.5 B ლიმფოციტების უჯრედულ ციკლში შესვლის რეგულაცია

B ლიმფოციტების ციკლში შესვლა მტკიცედ კონტროლირებადი პროცესია[32,33]. მიტოგენური სიგნალები აღმოცენდება სხვადასხვა წყაროებიდან. ცილები ან პოლისაქარიდული ანტიგენები ასტიმულირებენ BCR-ს, ხოლო პათოგენური პროდუქტები Toll-მსგავსი რეცეპტორებს[34,35]. პროლიფერაციას ადგილი აქვს მხოლოდ B უჯრედის განვითარების გარკვეულ ეტაპზე ან იმუნური პასუხისას, როდესაც B უჯრედები ვრცელდებიან ანტიგენის საპასუხოდ და ქმნიან ჩანასახოვან ცენტრებს T უჯრედის დახმარებით.

BCR-ს კომპლექსი B უჯრედს სიგნალს გადასცემს CD79a, CD79b მოლეკულების ITAM-ების საშუალებით. BCR-ს შებოჭვა ასტიმულირებს პროტეინ-თიროზინ კინაზების Lyn და Syk-ს აქტივაციას. Lyn - Src ოჯახის წევრი კინაზაა, რომელიც აფოსფორილირებს ITAM-ებს, ხოლო Syk აფოსფორილირებს BLNK/SLP65, ხელს უწყობს სასიგნალო გზის განვითარებას შემდეგი მოქმედებებით, PLC γ 2 და BTK გამონათავისუფლებენ შიდაუჯრედულ თავისუფალ კალციუმს, აქტივდება პროტეინ კინაზა C(PKC) და მიტოგენით აქტივირებული პროტეინ კინაზა(MAPK). BCR-დან წამოსული სიგნალები არეგულირებენ ტრანსკრიპციულ, პოსტ-ტრანსკრიპციულ და პოსტ-ტრანსლაციურ მოქმედებებს, რაც განსაზღვრავს B უჯრედების ბედს.

არსებობს რამდენიმე მექანიზმი რომლითაც რეგულირდება სიგნალის ხარისხი ანტიგენთან შეხვედრის შემდეგ. ადაპტორული ცილები, რომლებსაც თავისმხრივ არავითარი ფერმენტული აქტივობა არ გააჩნიათ, გადაწყვეტ როლს თამაშობენ სასიგნალო გზაში B უჯრედის ბედის გადაწყვეტისას. Syk-ს მიერ BLNK-ს ფოსფორილირებისას სასიგნალო გზაში ერთვება PLC γ 2 და Vav. BLNK-ნოკაუტირებულ თაგვებში B უჯრედების განვითარების სტადიები დარღვეულია, უჯრედები სრულად ვერ მწიფდებიან, დარღვეულია კალციუმის გამონათავისუფლების პროცესი, NF- κ B-ს აქტივაცია და BCR-ით ინდუცირებული პროლიფერაცია.

BCR-ს რეგულირების სხვა საშუალება გაშუალედებულია BCR-ს კომპლექსთან ასოცირებულ კო-რეცეპტორებთან. ესენია CD22, CD19, CD21, Fc γ RIIB, მათი კო-ლიგაცია BCR-თან იწვევს სიგნალის მოდულირებას. როდესაც კომპლემენტის რეცეპტორი

2(CD21) ასოცირდება CD19-თან, ანტიგენს C3d-სთან კომპლექსში შეუძლია დაუკავშირდეს CD19/CD21 და გააძლიეროს სიგნალი PI3K-ს დონის მომატებით. PI3K-ს ლიპიდური პროდუქტები კი მიიზიდავენ BTK-ს პლაზმურ მემბრანასთან, ხელს შეუწყობენ სხვადასხვა სასიგნალო გზას, ასევე კალციუმის მობილიზაციას. Lyn მიერ CD22-ს ITIM-ების ფოსფორილირება იწვევს SH2-დომენ შემცველი SHIP-1 ცილის, თიროზინ ფოსფატაზის ინდუცირებას, რაც თავის მხრივ იწვევს BCR-ს სასიგნალო გზაში SYK ან PLC γ 2 -ს დე-ფოსფორილირებას. [36]

უჯრედები, რომელთა სტიმულაციაც არ ხდება იმყოფებიან მოსვენებულ მდგომარეობაში G₀ ფაზაში. მიტოგენური სიგნალების შედეგად ეს უჯრედები გამოდიან G₀ ფაზიდან და შედიან უჯრედულ ციკლში. G₁ ფაზაში, უჯრედული ციკლის პირველ ფაზაში უჯრედი ემზადება დნმ-ს რეპლიკაციისთვის მომდენვო ფაზაში. გვიან G₁ ფაზაში უჯრედები გადიან რესტრიქციის წერტილს, რის შედეგადაც ისინი გადადიან S ფაზაში. მექანიზმები, რომლებიც აკონტროლებენ უჯრედის ციკლში შესვლას და მის პროგრესიას საკმაოდ კომპლექსური და განსხვავებულია. მოსვენების მდგომარეობა აქტიური პროცესია და სრულიად არ არის გამოწვეული სტიმულაციის სიმცირით. მიტოგენურმა სიგნალებმა არამარტო უნდა გადასცენ სიგნალები უჯრედული ციკლის დადებით რეგულატორებს, არამედ უნდა გააუვნებელყონ ის ფაქტორები, რომლებიც თრგუნავენ უჯრედულ ციკლს. BCR -ს შებოჭვის შემდეგ თიროზინ კინაზები Syk და Lyn ინიცირებენ სასიგნალო კასკადს ცილების ფოსფორილირების გზით. B უჯრედთან მყოფი ხელშემწყობი ცილები მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ სიგნალების გადაცემაში და ენზიმების მათ სუბსტრატებთან ერთად თავმოყრაში. [37] ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი მოლეკულაა BAM32, ასევე ცნობილია DAP1 სახელით. [38] BAM32 მაღალი დონით ექსპრესირდება ჩანასახოვან B უჯრედებში, შეიცავს ტერმინალურ პლექსტრინის ჰომოლოგიის (PH) დომენს, BCR -ს შებოჭვისას სწრაფად ფოსფორილირდება თიროზინ 139-ზე Src კინაზების გზით და ტრანსლოცირდება პლაზმურ მემბრანაზე PH დომენით. ეს ტრანსლოკაცია ასევე დამოკიდებულია PI3K-ს აქტივობაზე. BAM32 წიწილის (DT40) და ადამიანის (BJAB) B უჯრედებში არეგულირებს კალციუმის დინებას PLC γ 2-ს საშუალებით. [39,40] BAM32 არეგულირებს აქტინის ქსელს Rac1 გუანოზინ ტრიფოსფატით. Rac1, Rho-ოჯახის GTPაზა, განაგებს აქტინის პოლიმერიზაციასა და

მემბრანის დანაოჭებას. BAK32-ს ჭარბი ექსპრესიისას, ასევე Rac1 აქტივობა და ბაზალური F-აქტინის დონე მაღალია. აქტინთან ასოცირებული ჩონჩხის რეგულირებისთვის საჭიროა მოხდეს BAK32-ს ფოსფორილირება Y139-ზე Lyn-ს მიერ და უნდა ქონდეს დაუზიანებელი PH და SH2 დომენები. ასევე მნიშვნელოვანია BAK32-ს დაკავშირება სამიზნე ინოზიტიდთან. BAK32-ს აძლიერებს სასიგნალო გზას MAPK გზით და იწვევს უჯრედის გადარჩენას.[41]

1.6 MEC1 უჯრედული ხაზი

MEC1 უჯრედული ხაზი მიიღეს 58 წლის მამაკაცისგან, რომელსაც 1990 წელს დაუდგინეს B-ქლლ-ს მე-2 სტადია. პაციენტს აღენიშნებოდა გუმპრეტის ჩრდილების დიდი რაოდენობა, მონოკლონური B უჯრედების 90% აექსპრესირებდნენ CD5-ს. პაციენტის ფენოტიპი ძლიერ განსხვავდებოდა კლასიკური B-ქლლ-სგან, რადგან ახასიათებდა ზედაპირული იმუნოგლობულინის(sIg) მაღალი ინტენსივობით ექსპრესია. CD23 და FMC7 კი უარყოფითი იყო. მომდევნო წლებში პაციენტის უჯრედები ხელახლა გააანალიზეს და გამოვლინდა რიგი ცვლილებები. 1992 წელს უჯრედები გახდნენ CD25 და FMC7 დადებითები. 1993 წელს B უჯრედებს 80%-ს ახასიათებდათ ძლიერი sIg და FMC7, ხოლო CD5 და CD23 აღარ ახასიათებდათ. მორფოლოგიაში აღინიშნებოდა მოცირკულირე უჯრედების 50%-ში პროლიმფოციტური ტრანსფორმაცია. [3,14] ტრანსლოკაცია და Bcl-1 -ს რეარანჟირება, რაც იწვევს PRAD/Cyclin D1 ცილის მომატებულ ექსპრესიას და არის მანტიის ზონის ლიმფომისთვის დამახასიათებელი, არ აღინიშნებოდა. ამ შედეგების მიხედვით პაციენტს დაუდგინდა B-ქლლ-ს პროლიმფოციტური ტრანსფორმაცია. დროთა განმავლობაში პაციენტს გამოუვლინდა ლიმფური კვანძებისა და ელენთის გადიდება.

MEC1 უჯრედული ხაზი წარმოადგენს პაციენტიდან მიღებულ, ტრანსფორმირებულ B ლიმფოციტებს. უჯრედული ხაზი მიიღეს პაციენტის პერიფერიული სისხლის ლიმფოციტებიდან 1993 წელს. თეთრი უჯრედების რიცხვი შეადგენდა $39 \times 10^3/\text{მლ}$. უჯრედები გამოყვეს ფიკოლ-ჰიპაკის სიმკვრივის გრადიენტში, შემდეგ 2-ჯერ გარეცხეს RPMI-1640 საკვები არით, გადაიტანეს Iscove's Modified Dulbecco Medium (IMDM)-ში, დაუმატეს 10%-იანი ჩანასახოვანი ხბოს შრატი, შემდეგი კონცენტრაციით - $2 \times 10^6/\text{მლ}$ 25სმ² ზომის კულტურალურ ბოთლში მოათავსეს 37 °C -ზე ინკუბატორში, სადაც CO₂-ს დონე 5%-ს შეადგენდა. 4 კვირის შემდეგ უჯრედებმა დაიწყეს მუდმივი პროლიფერაცია.

MEC1 უჯრედები იზრდებიან ჭურჭლის კედლებზე და წარმოქმნიან აგრეგატებს. მათ ახასიათებთ მე-17 ქრომოსომის მოკლე მხრის დელეცია. უჯრედების გაორმაგების დრო შეადგენს - 40 საათს, განუწყვეტელი ზრდა შეუძლიათ 50 თვეზე მეტ ხანს. MEC1 უჯრედული ხაზი ხასიათდება მომწიფებული B უჯრედების მახასიათებელი მარკერებით CD19, CD20, CD21, CD22, გამოირჩევიან CD23, CD80 და CD86-ს მაღალი ექსპრესიით. ასევე MEC1-ზე წარმოდგენილია შემდეგი ადჰეზიური მოლეკულები: CD11a, CD18, CD44, CD49d და CD54, ხოლო CD5, CD28 და FMC7-ზე უარყოფითია. მიელოიდური და T უჯრედული მარკერები MEC1-ში არ ვლინდება. MEC1 არის EBV⁺, B-ქლლ-ს მქონე პაციენტების უმეტესობა არიან ასევე EBV⁺, მათ ლიმფოციტების ზედაპირზე აქვთ EBV-ს რეცეპტორი CD21. MEC1 B უჯრედების ხაზის შექმნის მთავარი მიზეზი იყო, შეექმნათ B-ქლლ-ს ანალოგიური in vitro მოდელი, რომ შეესწავლათ მასში მიმდინარე ბიოლოგიური პროცესები. [42]

თავი 2. კვლევის მასალა და მეთოდები

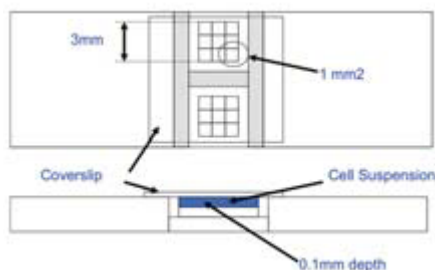
გამოყენებული ანტისხეულები

გამოყენებული გვექონდა შემდეგი თავის მონოკლონური ანტისხეულები (მკა):
ანტი – CD180-PE (BD Biosciences), ანტი – CD32 –FITC (BD Biosciences), ანტი – CD38-
FITC (BD Biosciences), ანტი –11a- PE (BD Biosciences), და შესაბამისი იზოტიპის
კონტროლი: ანტი - IgG1-FITC, ანტი-IgG1-PE (BD Biosciences).

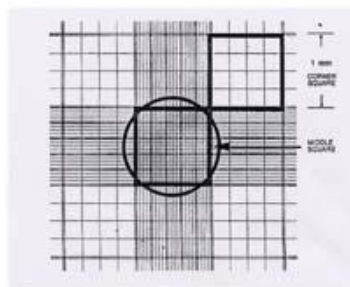
MEC1 უჯრედული კულტურა

MEC1 უჯრედული კულტურა იზრდებოდა საკვებ არეზე – RPMI 1640- ზე, რომელიც შეიცავდა ინაქტივირებულ ხბოს ემბრიონალურ შრატს (10%), L- გლუტამინს, გენტამიცინს. უჯრედებს ვათავსებდით 200მლ/ლ კულტურალურ ბოთლებში 37°C -ზე, 5% CO₂-ის ატმოსფეროში. გადათესვისას უჯრედების

კონცენტრაცია მიგვეყვდა 0.5×10^6 /მლ. გადათესვისთვის ვხმარობდით 37°C –მდე გამთბარ არეს. კულტურის ზრდის მონიტორინგისთვის ყოველ 24 საათში ჰემოციტომეტრში ვითვლიდით უჯრედების საერთო რაოდენობას. დათვლისას ვიყენებთ სტანდარტულ მეთოდს: უჯრედების რაოდენობას ვითვლიდით მიკროსკოპში X400 გადიდებაზე, ჰემოციტომეტრის 4 კუთხის კვადრატში (თითოეული – 1mm^2) (სურათი 1.) და მიღებულ რაოდენობას ვამრავლებდით 10^4 , რათა მიგვეღო კონცენტრაცია ერთ მლ–ში .



ბ.



სურათი 1. ჰემოციტომეტრი ა. ზოგადი ნახაზი; ბ. კამერის დახაზვის სქემა

სიცოცხლისუნარიანობის შემოწმების მიზნით, კულტურიდან ამოღების შემდგომ უჯრედებს ვლევადით ტრიპანის ლურჯის 18%-იანი ხსნარით, პროპორციით 20 მიკროლ ტრიპანის ლურჯის/20 მიკროლ უჯრედების სუსპენზიაზე. მიკროსკოპში X 400 გადიდებაზე ჰემოციტომეტრში ვითვლიდით შეღებილი უჯრედების რაოდენობას კამერის ოთხივე კუთხის დიდ კვადრატში (მინიმუმ 100 უჯრედზე). ნეკროზული უჯრედების გამოთვლას ვაკეთებდით ფორმულით: შეღებილი უჯრედების რაოდენობა/უჯრედების საერთო რაოდენობა X 100%.

MEC1 უჯრედების სტიმულაცია

უჯრედების სტიმულაციას ვახდენდით ანტი-IgM ან/და ანტი-CD180 მკა-ით. ანტისხეულების საბოლოო კონცენტრაცია შეადგენდა 20 მკგ/მლ. ანუ 96-ფოსოიან ბრტყელძირიანი იმუნოლოგიური პლანშეტის ფოსოში მოთავსებულ 200 მკლ უჯრედებს (10⁶/მლ) ვუმატებდით 0.5 მკგ/მლ მკა-ის 8 მკლ-ს.

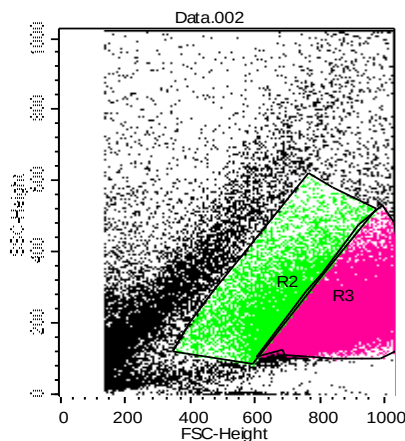
MEC1 B უჯრედული ხაზის ფენოტიპირება

MEC1- სთვის დამახასიათებელი აგრეგატების წარმოქმნის გამო, ექსპერიმენტის დაწყებამდე ინკუბატორიდან გამოღების შემდეგ, უჯრედებს ვათავსებდით 20 წთ, +4°C – ზე, რის შემდეგაც პიპეტირების გზით ადვილად ვლევულობდით ცალკეული უჯრედების სუსპენზიას. უჯრედების კონცენტრაცია სუსპენზიაში მიგვყავდა 2x 10⁶ უჯრედებამდე მლ/ლ-ში და გადაგვქონდა 2 მლ-ან ეპენდორფებში. უჯრედებს ვაცენტრიფუგირებდით 5 წუთი, 1500 ბრ/წმ, +4°C . უჯრედების ნალექს ვრეცხავდით 2-ჯერ 200 მკლ 1%-იანი PBS– BSA . შემდეგ ვამატებდით სათანადო ზედაპირული მარკერების საწინააღმდეგო თავის მონოკლონურ ანტისხეულებს (მკა) (5 მკლ). კონტროლისათვის ვხმარობდით შესაბამის იზოტიპურ კონტროლს. მონოკლონურ ანტისხეულებთან უჯრედებს ვაინკუბირებდით 30 წუთი , +4°C ზე. ინკუბაციის დამთავრებისას, უჯრედებს ორჯერ ვრეცხავდით 1 % –იან PBS - BSA -ის

ხსნარით.ვაფიქსირებდით 2 %-იან პარაფორმალდეჰიდით. შედეგების აღრიცხვას ვაწარმოებდით გამდინარე ციტომეტრის - FACScan (Becton Dickinson) გამოყენებით.

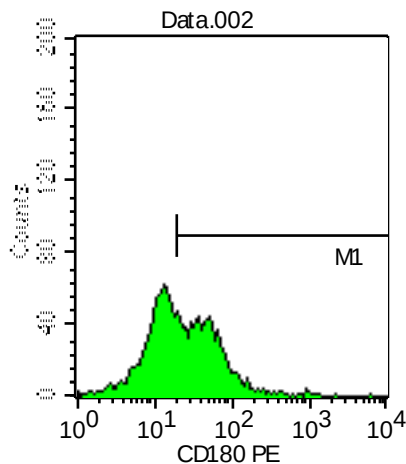
MEC1 B უჯრედული ხაზის ფენოტიპირების შედეგების ანალიზირება

MEC1 B უჯრედული ხაზის ფენოტიპირების შედეგების ანალიზირებას ვაწარმოებდით CellQuest პროგრამის საშუალებით. ანალიზირებისას, უპირველეს ყოვლისა, ზომის და გრანულარობის ხარისხის მიხედვით ვარჩევდით უჯრედების მცირე და დიდი ზომის ლიმფოციტების სიცოცხლისუნარიან პოპულაციებს (სურათი 2.)



X ღერძი - ზომა FSC
Y ღერძი - გრანულარობა SSC

სურათი 2. უჯრედების განაწილება ზომის და გრანულარობის მიხედვით



File: Data.002
Patient ID:
Gate: G2
Total Events: 116467

Sample ID: MEC1_A2
Tube: CD180
Gated Events: 10317

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	10317	100.00	8.86	33.48
M1	20, 9910	5069	49.13	4.35	56.35

სურათი 3. ზედაპირული მარკერის ექსპრესიის გამოსახულება ჰისტოგრამის სახით

X-ღერძი- ფლუორესცენციის ინტენსივობა

Y-ღერძი- უჯრედების რიცხვი

M1- მარკერია,რომელიც დაყენებულია იზოტიპური კონტროლის მიხედვით,იმისთვის,რომ ვნახოთ სათანადო ანტიგენის მაექსპრესირებელი პოპულაციისათვის ფლუორესცენციის საშუალო ინტენსივობა MF1 და პროცენტული მაჩვენებელი,ანუ ის თუ რამდენ პროცენტს შეადგენს უჯრედთა საერთო

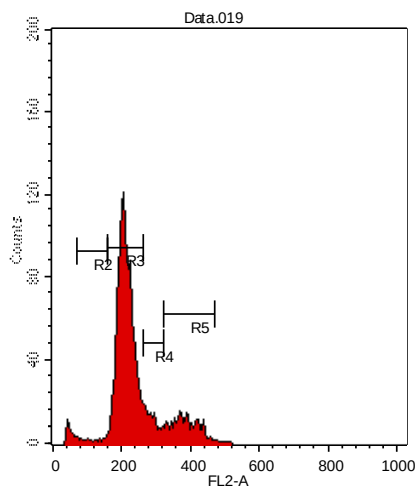
პოპულაციიდან ეს კონკრეტული პოპულაცია გვერდით ტაბულაში ნაჩვენებია მარკერის მიხედვით ავტომატურად გამოთვლილი პროცენტული მაჩვენებელი (Gated%) და MF1-ს მნიშვნელობა (Mean)

მცირე ზომის პოპულაციისათვის ვნახულობდით სათანადო ზედაპირული მარკერის ექსპრესიის დონეს. შედეგები გამოისახებოდა ჰისტოგრამების სახით, სადაც ფლუორესცენციის ინტენსივობა (X ღერძი) შეფარდებული იყო უჯრედების რიცხვთან (Y ღერძი) (სურათი 3.) ყოველი ნიმუშისათვის ვსაზღვრავდით მარკერის მაქსიმალურად ექსპრესირებული უჯრედების პროცენტს ლიმფოციტების საერთო პოპულაციაში და აგრეთვე ფლუორესცენციის შეფარდებით ინტენსივობას (ფში) რომელიც უდრის ანტისხეულებით შეღებილი უჯრედების ფლუორესცენციის საშუალო ინტენსივობის (ფსი) შეფარდებას IgG1 იზოტიპური კონტროლის ფსი-თან.

უჯრედული ციკლის ფაზებში MEC1 უჯრედების გადანაწილების განსაზღვრა და აპოპტოზის დონის შეფასება ეთიდიუმ ბრომიდით შეღებვის მეთოდით

უჯრედული ციკლის სურათის მისაღებად ფართოდ გამოიყენება ეთიდიუმ ბრომიდით (ებ) შეღებვის მეთოდი. ეთიდიუმ ბრომიდი ინტერკალატორულ საღებავებს მიეკუთვნება და უკავშირდება ორმაგ-ჯაჭვიან დნმ-ს. ამგვარად, ეთიდიუმ ბრომიდით შეღებვის შედეგად მიიღება უჯრედების გადანაწილების სურათი ორმაგ-ჯაჭვიანი დნმ-ის შემცველობის მიხედვით [43]. ინკუბაციის დამთავრებისას, უჯრედებს ვაცენტრიფუგირებდით 5 წუთი, 1500 ბრ/წმ, +4°C -ზე. მიღებული უჯრედების ნალექს ვაფიქსირებდით ყინულოვანი 70%-იანი ეთანოლით (1 მლ), რომელსაც ინტენსიური შენჯღრევის პირობებში ვორტექსზე ვამატებდით წვეთ-წვეთობით. დაფიქსირებულ ნიმუშებს ებ-ით შეღებვამდე მინიმუმ 18 საათის განმავლობაში ვაინკუბირებდით +4°C-ზე. ებ-ით შეღებვის წინ, ნიმუშებს ვაცენტრიფუგირებდით 10 წუთი, 2000 ბრ/წმ, +2°C-ზე. ნალექზედა სითხის გადასხმისას ვტოვებდით 20 მკლ-ს (რადგანაც რნმ-აზა აქტიურია ეთანოლში), მომდევნო ეტაპზე, ვორტექსზე შენჯღრევის შემდეგ, უჯრედების ნალექს ვამატებდით რნმ-აზას 2 მკლ (10 მგ/მლ) და ვაინკუბირებდით 30 წუთი ოთახის ტემპერატურაზე. შემდეგ უჯრედებს ვასუსპენზირებდით ეთიდიუმ ბრომიდის ხსნარში, რომელიც წარმოადგენდა 1%-იან გლუკოზის ხსნარს ფოსფატურ ბუფერში და

შეიცავდა ეთიდიუმ ბრომიდს კონცენტრაციით 50 მკგ/მლ. ნიმუშებს ვაინკუბირებდით 30 წუთი ოთახის ტემპერატურაზე და ვანალიზებდით გამდინარე ციტომეტრიის საშუალებით (სურ.4).



X-ღერძი — წითელი ფლუორესცენციის ინტენსივობა

Y-ღერძი — უჯრედების რიცხი

R2- ჰიპოპლოიდური მონაკვეთი - აპოპტოზური უჯრედები

R3- დიპლოიდური მონაკვეთი - G0/G1 ფაზაში მყოფი უჯრედები

R4- გარდამავალი მონაკვეთი დიპლოიდურ და ტეტრაპლოიდურს შორის - S ფაზაში მყოფი უჯრედები

R5- ტეტრაპლოიდური მონაკვეთი - G2/M ფაზაში მყოფი უჯრედები.

სურათი 4. ეთიდიუმ ბრომიდით შეღებვის შედეგად მიღებული დნმ-ის ჰისტოგრამა

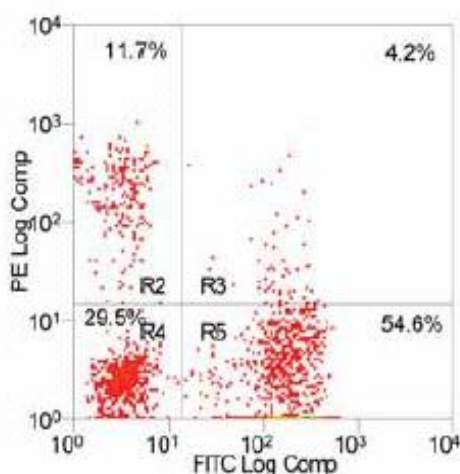
დნმ-ის ჰისტოგრამაზე (X ღერძი - ფლუორესცენციის ინტენსივობა, Y ღერძი - უჯრედების რიცხი), დნმ-ის შემცველობის მიხედვით გამოვყოფდით: 1. ჰიპოპლოიდურ მონაკვეთს - აპოპტოზური უჯრედები; 2. დიპლოიდურ მონაკვეთს - G0/G1 ფაზაში მყოფი უჯრედები; 3. გარდამავალ მონაკვეთს - დიპლოიდურ და ტეტრაპლოიდურს შორის- S ფაზაში მყოფი უჯრედები; 4. ტეტრაპლოიდურ მონაკვეთს- G2/M ფაზაში მყოფი უჯრედები. ვადგენდით უჯრედების პროცენტულ შემცველობას თითოეულ მონაკვეთში

აპოპტოზის ადრეულ სტადიაზე მყოფი უჯრედების იდენტიფიცირება ანექსინ V/ პროპიდიუმ იოდიდით ორმაგი შეღებვის მეთოდით

იმისათვის, რომ დავკვირვებოდით აპოპტოზის ადრეულ სტადიაზე მყოფი უჯრედების რიცხვს, უჯრედებს ერთდროულად ვღებავდით Annexin V-FITC-ით, რომელიც უკავშირდება ფოსფატიდილ სერინს აპოპტოზური უჯრედების ზედაპირზე, და

პროპიდიუმ იოდიდით, რომელიც ამ შემთხვევაში სიცოცხლისუნარიანობის მარკერის ფუნქციას ასრულებს: მისი შეღწევა უჯრედის შიგნით ხდება მხოლოდ უჯრედული მემბრანის დაზიანების შემთხვევაში [43].

გამოყენებულ იქნა ნაკრები: Annexin Kit (BD Biosciences). შედეგების პროცედურას ვაწარმოებდით ნაკრების ინსტრუქციაში მითითებული პროტოკოლის მიხედვით. კერძოდ, 200 მკლ უჯრედებს კულტურიდან ამოღების შემდეგ, ვაცენტრიფუგირებდით 5 წუთი, 1500ბრ/წმ, +4°C-ზე, ვაშორებდით ნალექზედა სითხეს და ორჯერ ვრეცხავდით 20ჯერ განზავებული ბუფერით: Binding Buffer X20 (BD Biosciences), რისთვისაც უჯრედების ნალექს ვუმატებდით ბუფერის 200 მკლ და ვაცენტრიფუგირებდით 5 წუთი, 1500ბრ/წმ, +4°C-ზე. ნალექზედა სითხის მოშორების შემდგომ პროცედურას ვიმეორებდით. მომდევნო ეტაპზე გარეცხილ უჯრედებს ვუმატებდით 1 მკლ პროპიდიუმ იოდიდს და 2მკლ Annexin V-FITC. ვაინკუბირებდით 30 წთ, +4°C-ზე. ინკუბაციის შემდგომ უჯრედებს ორჯერ ვრეცხავდით ბუფერში ისე, როგორც აღწერილია ზემოთ და ბოლოს ვასუსპენდირებდით 200მკლ ფოსფატურ ბუფერში (PBS, Sigma). ნიმუშების ანალიზს ვაწარმოებდით გამდინარე ციტომეტრზე. შედეგების გაანალიზირებას ვაწარმოებდით პროგრამა CellQuestPro - ს გამოყენებით. ვარჩევდით 4 პოპულაციას (სურ. 5) : ანექსინ V-ზე უარყოფითი, პროპიდიუმ იოდიდ-ზე უარყოფითი (AnnV-PI-) - სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების პოპულაცია (R4); ანექსინ V-ზე დადებითი, პროპიდიუმ იოდიდ-ზე უარყოფითი (AnnV+PI-) (R5) - აპოპტოზის ადრეულ სტადიაზე მყოფი უჯრედების პოპულაცია; ანექსინ V-ზე დადებითი, პროპიდიუმ იოდიდ-ზე დადებითი (AnnV+PI+) (R3) - აპოპტოზის გვიან სტადიაზე მყოფი უჯრედების პოპულაცია; ანექსინ V-ზე უარყოფითი, პროპიდიუმ იოდიდ-ზე დადებითი (AnnV-PI+) (R2) - ნეკროზული უჯრედების პოპულაცია;



სურათი 5. აპოპტოზური უჯრედების პროცენტობის დადგენა: Annexin V-FITC /პროპიდიუმ იოდიდით (PI) შეღებილი უჯრედების პოპულაციების გადანაწილება

- R2 - AnnV-PI+ - ნეკროზული უჯრედები;
- R3 - AnnV+PI- - აპოპტოზის გვიან სტადიაზე მყოფი უჯრედები;
- R4 - AnnV-PI- - აპოპტოზის ადრეულ სტადიაზე მყოფი უჯრედები;
- R5 - AnnV+PI+ - სიცოცხლისუნარიანი უჯრედები;

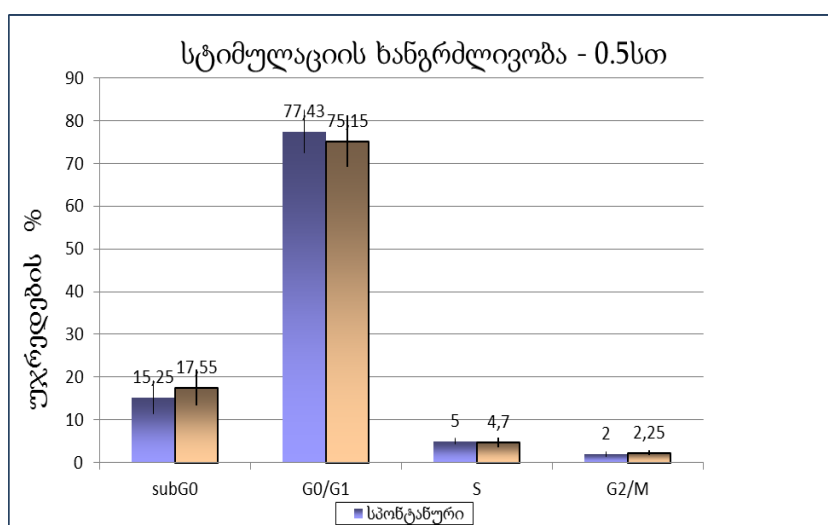
სტატისტიკური ანალიზი

შედეგები გაანალიზირებული იქნა შესაბამისი სტატისტიკური მეთოდებით: სტანდარტული პარამეტრული (სტიუდენტის t-ტესტი) ან არაპარამეტრული (მან-უიტნის U-ტესტი) ტესტების გამოყენებით. p-ს მნიშვნელობა <0.05 მიჩნეულ იქნა სტატისტიკურად მნიშვნელოვან და ღირებულ მაჩვენებლად.

სტატისტიკური დამუშავებისთვის და გრაფიკების აგებისთვის გამოყენებულ იქნა Microsoft Office Excel, ასევე ვისარგებლით შემდეგი ვებ-კალკულატორით: <http://elegans.som.vcu.edu/~leon/stats/utest.html> (მან-უიტნის U-ტესტი).

თავი 3. შედეგები და განხილვა

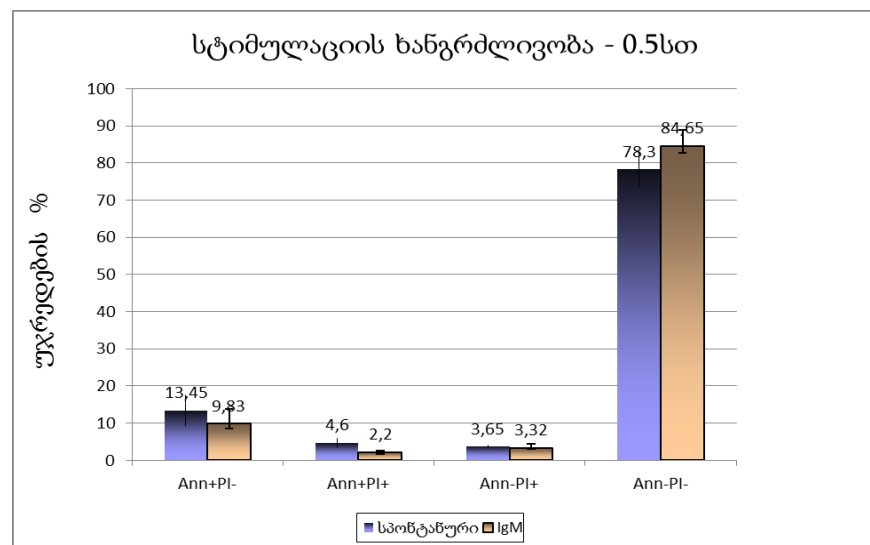
CD180-ის ექსპრესიის უჯრედების პროლიფერაციულ სტატუსთან დამოკიდებულების შემდგომი შესწავლის მიზნით, მოცემული ნაშრომის ფარგლებში შევისწავლეთ ზედაპირული IgM-ის ან/და CD180-ის შებოჭვის შემდგომ უჯრედული ციკლის ფაზებში უჯრედების პროცენტული გადანაწილების სურათი, შევაფასეთ აპოპტოზური MEC1 უჯრედების პროცენტული მაჩვენებელი და უჯრედების აქტივაციური სტატუსი. კვლევა სამ ამოცანად დაიყო: 1. MEC1 უჯრედებში IgM-ის შებოჭვის ეფექტის შესწავლა; 2. IgM-ის სასიგნალო გზის აქტივაციის გავლენის შეფასება CD180-ის ექსპრესიაზე; 3. სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნების და პროლიფერაციულ მექანიზმებზე IgM-ის ან/და CD180-ის შებოჭვის ეფექტის შედარება.



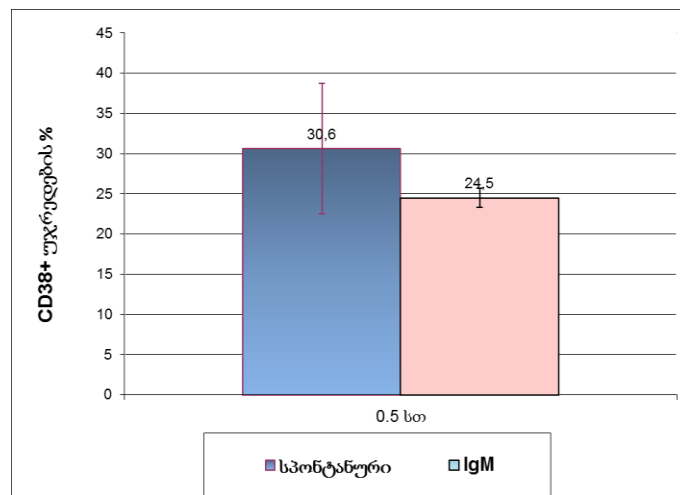
სურათი 6. უჯრედული ციკლის ფაზებში უჯრედების გადანაწილების შეფასება

კვლევის პირველ ეტაპზე IgM-ის შებოჭვის ეფექტი შევაფასეთ დროის მოკლე ვადაზე, ანუ სტიმულირების შემდგომ 0.5 საათში. რადგანაც, ცნობილია, რომ B უჯრედული რეცეპტორის შებოჭვის შედეგად საპასუხო რეაქცია სწრაფად ვითარდება. ვაფასებდით, როგორც პროლიფერაციის დონეს (უჯრედული ციკლის ფაზებში უჯრედების პროცენტული გადანაწილების სურათის მიხედვით), ასევე აქტივაციის ხარისხს აქტივაციური მარკერის CD38-ის ექსპრესიის მიხედვით და ადრეული

აპოპტოზის დონეს ფოსფატიდილსერინის ზედაპირული ექსპრესიის შეფასების გზით [43]. მიღებული შედეგების მიხედვით IgM-ის შებოჭვის საპასუხოდ ადგილი არ ჰქონდა არც პროლიფერაციას (G2/M ფაზაში: სპონტ. $2\pm0.6\%$; სტიმ.: $2.25\pm0.6\%$; S ფაზაში: სპონტ. $5\pm0.7\%$; სტიმ. $4.7\pm1.1\%$) (სურ.6), არც აქტივაციას (სპონტ.: $30.6\pm8.1\%$; სტიმ.: $24.5\pm1.2\%$) (სურ.7), არც აპოპტოზური უჯრედების პროცენტობის ცვლილებას (სპონტ.: $13.45\pm4.1\%$; სტიმ. $9.83\pm3.9\%$) (სურ.8).



სურათი 7. აპოპტოზური უჯრედების პროცენტული მაჩვენებლის შეფასება



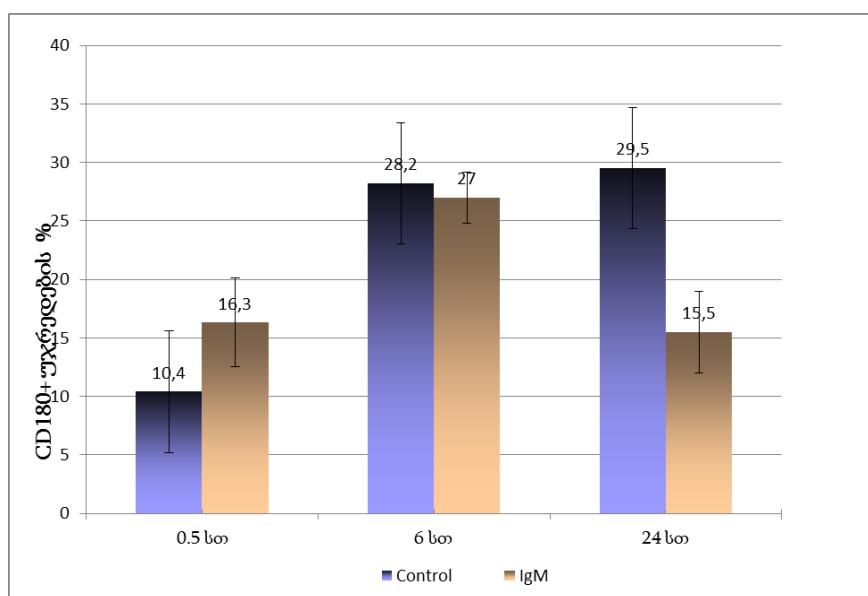
სურათი 8. CD38+ უჯრედების პროცენტული მაჩვენებლის შეფასება

უჯრედული ციკლის შესწავლით გამოვლინდა, რომ MEC1 უჯრედებს არ ახასიათებთ პროლიფერაციული პასუხი - IgM-ის შებოჭვაზე, თანაც ამავე დროს,

საპასუხოდ არც აპოპტოზიც არ უვითარდებად ანუ უბრალოდ არ რეაგირებენ IgM-ის შებოჭვაზე. ეს შედეგი კარგად ეთანხმება ცოტა ხნის წინ გამოქვეყნებულ მონაცემებს [44], რომ MEC1 უჯრედებს ახასიათებთ ანერგიული მდგომარეობა, რომელსაც თან ახლავს MEK/(ERK)1/2 /NF-AT სასიგნალო გზის კონსტიტუციური ფოსფორილირება, Akt სასიგნალო გზის აქტივაციის გარეშე [44]; ავტორების აზრით, MEC1 უჯრედები წარმოადგენენ მოდელს B უჯრედული რეცეპტორის ანერგიის შესასწავლად. იმის გათვალისწინებით, რომ MEC1 უჯრედებს გააჩნიათ მუტირებული IgVH გენები და ამ დროს ახასიათებთ CD180-ის და IgM-ის შებოჭვაზე პასუხის განუვითარებლობა, შეგვიძლია ვივარაუდოთ, წინა შედეგების საფუძველზე [5,6], რომ MEC1 უჯრედები „არა-მორეაგირე“ (NR) კლონს წარმოადგენენ. შესაბამისად, მეტად პერსპექტიულად გვევლინება აღნიშნულ სამოდელო სისტემაზე CD180-ის და IgM-ის სასიგნალო გზის დათრგუნვის მექანიზმის შემდგომი შესწავლა. საინტერესოა, რომ, როგორც აღნიშნეს Muzio et al. [44], MEC1 უჯრედულ ხაზში ნანახი ამგვარი ანერგიის ბუნება ჯერჯერობით გაუგებარია, რადგანაც ქლლ პაციენტების სისხლიდან გამოყოფილი მსგავსი ანერგიული პროფილის მქონე უჯრედების შემთხვევაში ნაჩვენები იქნა *in vitro* IgM-ის მგრძნობელობის აღდგენის შესაძლებლობა IgM-ის ინტერნალიზაციის ინდუქციის გზით [45]. ანუ, როგორც ივარაუდეს ავტორებმა, ანერგიული მდგომარეობა გამოწვეულია IgM-ის დაკავშირებით გარკვეულ ანტიგენთან *in vivo*, შესაბამისად, რადგანაც იქამდე დადგინდა, რომ ანერგიული მდგომარეობის შენარჩუნებისთვის აუცილებელია B უჯრედული რეცეპტორის მუდმივი დაკავშირება ანტიგენთან და სიგნალის გადაცემა [46], შესაბამისად *in vitro* პირობებში თუ მოხდებოდა ანტიგენთან-დაკავშირებული Bურ-ის ინტერნალიზაცია, უჯრედის ზედაპირზე Bურ-ის ხელახლა ექსპრესირების შემდგომ, ის უკვე თავისუფალი იქნებოდა ანტიგენისგან და, შესაბამისად, მგრძნობიარე, რადგანაც ანერგიის მაინდუცირებელი ანტიგენის ექსპრესია ავტორების ვარაუდით ხდება მიკროგარემოს უჯრედებზე და შესაბამისად არ მოიპოვება გამოყოფილი ლიმფოციტების კულტურაში *in vitro* [45]. ხოლო MEC1 უჯრედებში ნანახი Bურ-ის სტაბილური ანერგია ზემოხსენებულ სქემაში არ ჯდება. თუმცა აქვე უნდა აღენიშნოს, რომ Muzio et al. [44] მონაცემებით MEC1 უჯრედებში ანერგია ეხება სიგნალის გადაცემას Bურ-ის გზით.

ამგვარად, დავადგინეთ, რომ MEC1 უჯრედები ანერგიულნი არიან B უჯრედული რეცეპტორის შებოჭვის მიმართ. აღნიშნული გვადლევს საფუძველს, ჩავთვალოთ ეს უჯრედული ხაზი „არამორეაგირე“ ქლლ კლონის მოდელად. სამომავლო კვლევაში ამგვარი მოდელის გამოყენება დაგვეხმარება უკეთ შევისწავლოთ IgM-ის და CD180-ის სასიგნალო გზის/გზების ფუნქციური მდგომარეობა ანერგიის შემთხვევაში.

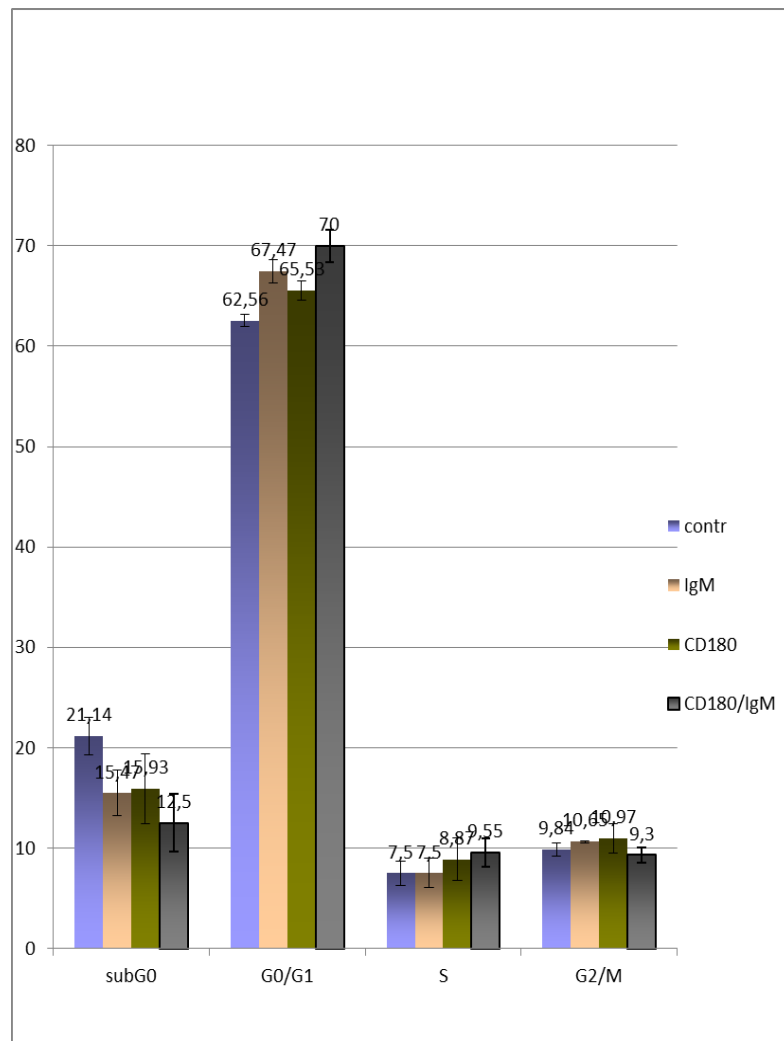
B უჯრედული რეცეპტორის და CD180-ის ფუნქციური კავშირის შესწავლის მიზნით, ვაკვირდებოდით ასევე ზედაპირული IgM-ის შებოჭვის გავლენას CD180-ის ზედაპირულ ექსპრესიაზე. აღნიშნულ ეფექტს ვაფასებდით დროის სამ წერტილში: სტიმულირების შემდგომ 0.5, 6 და 24 საათში. მიუხედავად იმისა, რომ დროის მოკლე ვადებზე არ დაფიქსირდა სტატისტიკურად სარწმუნო განსხვავება სპონტანურ და სტიმულირებულ კულტურებს შორის (0.5სთ: სპონტ.- 10.4 ± 2.3 სტიმ.- 16.3 ± 3.8 ; 6სთ: სპონტ.- 28.2 ± 8 ; სტიმ.- 27 ± 2) (სურ.9), 24 საათისთვის დადგინდა CD180-ის მაქსიმალური უჯრედების პროცენტული მაჩვენებლის დაქვეითება (სპონტ. : 29.5 ± 5.2 ; სტიმ.: 15.5 ± 3.5 , $p < 0.05$) (სურ.9), რაც კიდევ ერთხელ ადასტურებს ფუნქციურ კავშირს CD180-ისა და B უჯრედულ რეცეპტორს შორის.



სურათი 9. CD180+ უჯრედების პროცენტული ცვლილება IgM-ით შებოჭვის საპასუხოდ

რადგანაც აღნიშნული ეფექტი გამოვლინდა მხოლოდ 24 საათის შემდგომ, IgM-ის შებოჭვის ეფექტი შევაფასეთ მოგვიანებით ვადაზეც: სტიმულაციის 24 საათის შემდგომ.

პარალელურად სტიმულაციას ვახდენდით როგორც ცალკე ანტი-CD180 მკა-ით, ასევე კომბინაციაში: ანტი- CD180 და ანტი- IgM მკა-ით ერთდროულად. მიღებული შედეგების მიხედვით ანტი- CD180 და ანტი- IgM მკა-ით მოქმედებისას დაფიქსირდა აპოპტოზისგან დაცვა (სპონტ.: % subG₀=21±1.8; კომბ. სტიმ.: % subG₀=12.5±2.8, p<0.05) (სურ.10) , რაც მიუთითებს იმაზე, რომ MEC1 უჯრედების შემთხვევაში CD180-ის და ზედაპირული IgM-ის შებოჭვას სინერგისტული ეფექტი გააჩნია უჯრედების სიცოცხლისუნარუანობის შენარჩუნების სასიგნალო გზაზე.



სურათი 10. 24 საათიანი სტიმულაციის შემდგომ უჯრედული ციკლის ფაზებში უჯრედების გადანაწილების სურათი

CD180-ის და B უჯრედული რეცეპტორის კავშირს შეიძლება ჰქონდეს დიდი მნიშვნელობა ქლლ-ის იმუნოპათოგენეზისთვის, რადგანაც ვარაუდობენ რომ ამ დაავადების განვითარებას ბიძგს აძლევს ჰიპოთეტური ჯერ-ჯერობით უცნობი ანტიგენი

[4], ხოლო CD180, როგორც Toll-მსგავსი რეცეპტორების ოჯახის წევრი, ერთ-ერთი პირველი სავარაუდო რეცეპტორია, რომელმაც მონაწილეობა უნდა მიიღოს ამ პირველადი ანტიგენის ამოცნობაში. მათასადამე CD180-ის და B უჯრედულ რეცეპტორის ურთიერთქმედების შესწავლა დაგვეხმარება უკეთ გავიგოთ ქლლ-ის ჩამოყალიბების მექანიზმები, რაც საშუალებას მოგვცემს მოვინახოთ სწორი გზა ამ დღესდღეობით განუკურნებელი დაავადებისთვის ახალი თერაპიული საშუალებების შემუშავებისთვის.

დასკვნა:

1. MEC1 უჯრედული ხაზი ანერგიულია B უჯრედული რეცეპტორის შებოჭვის მიმართ
2. IgM-ის შებოჭვა იწვევს CD180+ უჯრედების პროცენტობის შემცირებას სტიმულაციის 24 საათისთვის
3. ანტი-CD180-ის და ანტი-IgM მკა-ით კომბინირებული სტიმულაცია 24 საათის შემდეგ განაპირობებს აპოპტოზისგან დაცვას

გამოყენებული ლიტერატურა:

1. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. (2005) *New Eng J Med*, **352**, 804-815;
2. Caligaris-Cappio F. (2000) *Rev Clin Exp Hematol*, **4**,1, 5-15;
3. Damle R.N. Wasil T; Fais F. et al. (1999). *Blood*, **94**, 1840-1847;
4. Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. (2008) *J Int Med*, **264**, 549-562.
5. Porakishvili N., Kulikova N., Jewell A.P. et al. (2005) . *Br J Haematol*, **131**, 313-319
6. Porakishvili N, Memon A, Vispute K, et al (2011) *Br J Haematol*, **153**(4), 486-98.
7. Ricciardi M.R., Petrucci M.T., Gregorj C., et al. (2001) *Br J Haematol*, **113**, 391-399
8. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, et al. (2001) *Blood*, **98**(9),2633-9
9. Stilgenbauer S, Dohner H. (2004) *Hematol Oncol Clin*. **18**(4)
10. Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F, et al. (2004) *Blood*; **103**(2), 375-82
11. Damle RN, Calissano C, Chiorazzi N, et al. (2010) *Haematol*; **23** ,33-45
12. Ghia P, Guida G, Stella S, et al. (2003) *Blood*, **101**(4), 1262-69
13. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, et al. (2001) *Blood*, **98**(9),2633-9
14. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, et al. (2003) *Blood*, **101**(12),4944-51
15. Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. (2003) *N Engl J Med*, **348**(18), 1764-75
16. Nagai Y, Shimazu R, Ogata H, et al. (2002) *Blood* , **99**:1699-1705.
17. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohibaum AM, et al. (2002) *Nature*, **416**: 603-607
18. Michael J . Keating , Chiorazzi N, Messmer B, et al. (2003). *Hem American Soc Hem Educ Progr*,1:153-175
19. Fujimoto M, Fujimoto Y, Poe JC, et al. (2002) *Immunity* , **13**:47-57.
20. Fruman DA (2004) *Curr. Opin. Immunol.*, **16**(3):314-20
21. Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. (2003) *Nat. Rev. Immunol.*, **3**(4):317-30.
22. Donahue AC, Fruman DA.. (2004) *Semin. Cell Dev. Biol.*, **15**(2),183-97
23. Hebeis B, Vigorito E, Kovesdi D, et al. (2005) *Blood*, **106**(2): 635-40.
24. Otero DC, Omori SA, Rickert RCJ. (2001) *Biol. Chem.* **276**(2):1474-8.
25. Tybulewicz VL. (2004) *Eur. J. Immunol.*, **34**(11):2964-7.

26. Decker SJ, Saltiel AR. (2005) *Nat. Med.*, **11(2)**:123-4.
27. Marshall AJ, Krahm AK, Ma K, et al. (2002) *Cell Biol.*, **22(15)**:5479-91.
28. Hess KL, Donahue AC, Ng KL, et al. (2004) *Immunol.* , **34(11)**:2968-76
29. Jou ST, Carpino N, Takahashi Y, et al. (2002) *Cell Biol.*, **22(24)** : 8580-91.
30. Kharas MG, Deane JA, Wong S, et al. (2004) *Blood*, **103 (11)** :4268-75.
31. Stauffer F, Holzer P, Garcia-Echeverria C. (2005) *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents.* **5(5)**:449-62
32. Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, et al. (2007) *Nat Rev Immunol.*, **7**, 633-643
33. Allen CD, Okada T, Cyster JG. (2007) *Immunity*, **2**, 190-202
34. Gerondakis S, Grumont RJ, Banerjee A, (2007) *Immunol Cell Biol.*, **85**, 471-475
35. Dal Porto JM, Gauld SB, Merrell KT, et al. (2004) *Mol Cell*, **41**:599-613
36. Del Nagro CJ, Otero DC, Anzelon AN, et al. (2005) *Immunol Res*, **31**:119-131
37. Grumont RJ, Strasser A, Gerondakis S. (2002) *Mol Cell*, **10**:1283-1294.
38. Dowler S, Currie RA, Downes CP, et al. (1999) *Biochem*, **342**:7-12.
39. Marshall AJ, Krahm AK, Ma K, et al. (2002) *Mol Cell Biol* , **22**:5479-5491.
40. Nihiro H, Maeda A, Kurosaki T, et al. (2002) *J Exp Med* , **195**:143-149.
41. Allam A, Nihiro H, Clark Ea, et al. (2004) *J Biol Chem*, **279**:39775-39782.
42. Stacchini A, Aragno M, Vallario A, et al. (1999) *Leuk Res.*,**23**,127-136.
43. Ormerod MG, (2002) *J ImmunMethods*, **265**, 73–80;
44. Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, et al (2008) *Blood*, **112**, 188–195.
45. Mockridge I.C., Potter K.N., Wheatley I. et al (2007) *Blood*, **109**, 4424-4431.
46. Gauld S.B, Benshop R.J, Merrell K.T, Cambier J.C. (2005) *Nat Immunol.* **6(11)**, 1160-1167.

