

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის
თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

სალომე ოქრიაშვილი

**B ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიის უჯრედული ხაზის
MEC1 უჯრედებში არასპეციფიური 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) ხასიათდება CD5+CD19+CD23+ უჯრედების კლონური ექსპანსიით და აკუმულირებით ძვლის ტვინში, პერიფერიულ ლიმფურ ორგანოებსა და ქსოვილებში. იმუნოგლობულინის (Ig) მძიმე ჯაჭვის (H) (IGHV) არამუტირებული და მუტირებული გენების მიხედვით ქლლ კლონებს ყოფენ ორ ძირითად ქვეჯგუფად შესაბამისად დაავადების აგრესიული და დადებითი პროგნოზით. ნაჩვენებია, რომ ქლლ უჯრედები მიკროგარემოსგან დებულობენ სიგნალებს, რომლებიც ხელს უწყობენ მათ დაყოფას, გადარჩენასა და ექსპანსიას *in vivo*. სავარაუდოთ, ქლლ-ის განვითარებას ბიძგს აძლევს ჰიპოთეტური ანტიგენი ან ანტიგენები. შესაბამისად, მეტად მნიშვნელოვანია როგორც ზემოაღნიშნული ანტიგენის იდენტიფიცირება, ასევე ქლლ-ის უჯრედებში არსებული პრო-გადარჩენის სასიგნალო გზების შესწავლა. სავარაუდოთ, ერთ-ერთი რეცეპტორი რომელიც ურთიერთქმედებს მიკროგარემოსთან - Toll-მსგავს რეცეპტორების ოჯახის წევრი - CD180. ნაჩვენებია იქნა, რომ CD180 ჰეტეროგენულად არის ექსპრესირებული ქლლ უჯრედებზე, ძირითადად კი - მუტირებული IGHV გენების მქონე უჯრედებზე, ხოლო მონოკლონური ანტისხეულებით (მკა) CD180-ის შებოჭვა განაპირობებს CD180⁺ B-ქლლ კლონების დაახლოებით 50%-ის პროლიფერაციას, აქტივაციას და აპოპტოზისგან გადარჩენას, რის საფუძველზე მოხდა მათი დაყოფა ე.წ. “მორეაგირე” და “არამორეაგირე” ქლლ კლონებად.

ქლლ უჯრედული ხაზი - MEC1 მიღებულ იქნა 1999 წელს ებშტეინ-ბარის ვირუსზე (EBV)-სეროპოზიტიული დაავადებულის პერიფერიული სისხლის ლიმფოციტებიდან. აღნიშნული უჯრედული ხაზი უკვე აღიარებულ მოდელს წარმოადგენს ქლლ-ის იმუნოპათოგენეზის შესასწავლად.

აღსანიშნავია, რომ MEC1 უჯრედები მიღებულია მუტირებული IGHV გენების მქონე ქლლ პაციენტისგან (მუტირების ხარისხი - 94.6%). ჩვენი კვლევითი ჯგუფის წინა მონაცემებით დადგინდა, რომ MEC1 უჯრედული ხაზი ანერგიულია B უჯრედული რეცეპტორის შებოჭვის მიმართ და შეიძლება განიხილოს, როგორც „არამორეაგირე“ ქლლ -ის კლონის მოდელი. მეორეს მხრივ. ჩვენმა ჯგუფმა ასევე აჩვენა, რომ MEC1 უჯრედებზე ხდება CD180-ის ექსპრესია და CD180-მაექსპრესირებელი უჯრედების პროცენტი არ არის სტაბილური: CD180-მაექსპრესირებელი უჯრედების რაოდენობის

მომატება შეიმჩნევა პოპულაციის ლოგარითმული ზრდის ფონზე გადათესვიდან პირველი 72 საათის განმავლობაში. იმის გათვალისწინებით, რომ ანერგიული MEC1 უჯრედები პროლიფერირებენ არასპეციფიური სტიმულაციის - გადათესვის (საკვები არის გამოცვლის) საპასუხოდ, და ასევე იმის გათვალისწინებით, რომ ლიტერატურაში არსებული მონაცემებით, დაავადებულთა სისხლიდან გამოყოფილი „არამორეაგირე“ ქლლ კლონების შემთხვევაში ნაჩვენები იყო მიტოგენური სიგანალით უჯრედების აქტივაციის შესაძლებლობა, გადაწყვიტეთ გვეცადა MEC1 უჯრედების სტიმულაცია მიტოგენით, რათა გამოწვეული პროლიფერაციის პირობებში სავარაუდოდ მომატებული CD180-ის ექსპრესიის ფონზე, შევისწავლოთ ამ რეცეპტორის მონაწილეობა პროგადარჩენის სასიგნალო გზებში.

ამგვარად, ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა არასპეციფიური სტიმულაციის ეფექტის შესწავლა MEC1 უჯრედებში. რისთვისაც გამოვიყენეთ ფართო სპექტრის მიტოგენი - ფორბოლ-მირისტატ აცეტატის (ფმა). აღნიშნული კვლევა ითვალისწინებდა ფმა-ით გამოწვეული სტიმულაციის ეფექტის შეფასებას და გულისხმობდა სტიმულაციის შემდგომ: 1. უჯრედების ფენოტიპურ პროფილის შესწავლას; 2. სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნების შეფასებას; 3. პროლიფერაციულ სტატუსის შესწავლას; 4. აქტივაციის ხარისხის შეფასებას. ასევე დამატებით (მე-5) ამოცანად დავისახეთ შევისწავლოთ ფენოტიპური პროფილის ცვალებადობა დროში სპონტანურ კულტურაში. CD180-ის შემთხვევაში, კვლევის წინა ეტაპზე, ჩვენ უკვე ნანახი გვექონდა 24 -144სთ ინტერვალში MEC1 უჯრედებში მისი ზედაპირული ექსპრესიის ცვალებადობა. კონტროლის სახით ვიყენებდით ექსპერიმენტულ ნიმუშთან ერთდროულად გადათესილ სპონტანურ კულტურას. დროის სხვადასხვა წერტილებში ვსაზღვრავდით უჯრედების აპოპტოზის დონეს, პროლიფერაციის ხარისხს, აქტივაციური მარკერის CD38-ის ზედაპირულ ექსპრესიას, B უჯრედულ რეცეპტორთან ფუნქციურად დაკავშირებული რეცეპტორების - CD180-ის და CD32-ის ზედაპირულ ექსპრესიას.

ზედაპირული მარკერების ექსპრესიას ვადგენდით ფლუოროქრომ-მონიშნული შესაბამისი მკა-ის გამოყენებით იმუნოფენოტიპირების მეთოდით და შემდგომი ანალიზით გამდინარე ციტომეტრზე (FACSscan, Becton Dickinson). 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).

მიღებული შედეგების თანახმად, უჯრედული კულტურის ზრდის 0.5 სთ-ზე აღინიშნებოდა CD180-ის ექსპრესიის მკვეთრი მომატება კონტროლთან შედარებით (CD180⁺ უჯრედების % სპონტანურ კულტურაში: 10.4±2.3, ფმა-სტიმულირებულ კულტურაში: 30.5±4.6, p<0.01), CD32-ის ექსპრესიის დონე უცვლელი რჩებოდა კონტროლთან შედარებით. პარალელურად, დადგინდა ფმა-სტიმულირებულ კულტურებში აპოპტოზის გვიან სტადიებზე მყოფი უჯრედების პროცენტობის მომატება კონტროლთან შედარებით (უჯრედების % subG₀ ფაზაში: სპონტ. 15.25±3.9; სტიმ. 30.43±3.9, p<0.05). მეორეს მხრივ, აპოპტოზის ადრეულ სტადიებზე მყოფი უჯრედების პროცენტული მაჩვენებელი (რომელსაც ვადნედით ანექსინ V/პროპიდიუმ იოდიდით ორმაგი შეღებვის მეთოდით) მომატებული არ იყო, პირიქით, აღინიშნებოდა მისი დაკლების ტენდენცია კონტროლთან შედარებით (სპონტ. 13.5±4%; სტიმ. 3.31±1.4%). აღნიშნული წინააღმდეგობა აიხსნება იმით, რომ, როგორც ჩანს, მიტოგენის საპასუხოდ უჯრედების პოპულაციის ნაწილი განიცდის აქტივაციით-განპირობებულ კვდომას, რომელიც მეტად სწრაფად მიმდინარეობს, და სტიმულაციის 0.5 სთ-ის შემდეგ უკვე შეუძლებელია ამ უჯრედების იდენტიფიცირება აპოპტოზის ადრეული სტადიების დადგენის მეთოდით, რადგანაც ამ უჯრედებში დროის მოცემულ

წერტილში უკვე დნმ-ის ფრაგმენტირება შეიმჩნევა, რომლის გამოვლენა შესაძლებელი აღმოჩნდა ეთიდიუმ ბრომიდით დნმ-ის შეღებვით.

ამავე დროს, როგორც დადგინდა უჯრედული ციკლის ფაზებში უჯრედების გადანაწილების შესწავლისას, მიტოგენზე საპასუხოდ არ შეინიშნებოდა უჯრედების პროლიფერაციის მომატება (უჯრედების % S ფაზაში: სპონტ. 5 ± 0.7 ; სტიმ. 3.25 ± 0.5 ; უჯრედების % G_2/M ფაზაში: სპონტ. 2 ± 0.6 ; სტიმ. 1.9 ± 0.5). იმ დროს, როცა ჩვეულებრივად ნორმალური ლიმფოციტები ფმა-ით სტიმულაციაზე ინტენსიური პროლიფერაციით პასუხობენ. ასევე აღსანიშნავია, რომ ფმა-ით სტიმულაციის შემდგომ არ დაფიქსირდა აქტივაციური მარკერის CD38-ის ზედაპირულ ექსპრესიის მომატებაც კონტროლთან შედარებით (CD38⁺ უჯრედების % სპონტანურ კულტურაში: 30.6 ± 8.1 ; სტიმ. 19.7 ± 5.5), რაც ასევე არ შეესაბამება ნორმალური ლიმფოციტების შემთხვევაში ნაჩვენებ სურათს, როცა ფმა-ით სტიმულაციის შემდგომ ხდება მკვეთრი მომატება ყველა აქტივაციური მარკერის. სპონტანურ კულტურაში CD38-ის ექსპრესია მაქსიმალურ დონეს აღწევდა გადათესვიდან 0.5 სთ შემდგომ ($30.6 \pm 8.1\%$), ხოლო დროის მოგვიანებით წერტილებში (24 სთ, 48სთ, 72 სთ, 96 სთ) კლებულობდა და 96 საათისთვის საბოლოოდ მხოლოდ 5%-ს შეადგენდა (5 ± 0.01). სპონტანურ კულტურაში ასევე შესწავლილ იქნა CD180-ის ექსპრესიის პროფილი 0.5 -24 სთ ინტერვალში. დადგინდა, რომ CD180-ის ზედაპირული ექსპრესია გადათესვიდან 8 სთ-ის შემდეგ იწყებდა მომატებას (CD180⁺ უჯრედების %: 0.5 სთ - 10.4 ± 2.3 ; 8სთ - 24.2 ± 3.5 , $p < 0.05$) და აღწევდა მაქსიმუმს 24 საათისთვის (29.5 ± 5.2 , $p < 0.05$). B უჯრედული რეცეპტორის სასიგნალო გზის ნეგატიური რეგულატორის - CD32-ის ზედაპირული ექსპრესია დროის ამ წერტილში, პირიქით დაბალი აღმოჩნდა ($11 \pm 3.8\%$) და მაქსიმუმს აღწევდა გადათესვიდან 96 საათის შემდგომ ($36 \pm 1.3\%$).

ამგვარად, მიღებული მონაცემების თანახმად, MEC1 უჯრედები სპონტანურ კულტურაშიც იმყოფებიან ნაწილობრივად აქტივირებულ მდგომარეობაში (CD38-ის მაქსიმალური ექსპრესირებული უჯრედების პროცენტი $30.6 \pm 8.1\%$ აღწევს) და მიტოგენით სტიმულაციის საპასუხოდ ამ უჯრედებში ვითარდება არა მოსალოდნელი პროლიფერაცია/აქტივაცია, არამედ, პოპულაციის ნაწილი ე.წ. აქტივაციით-ინდუცირებული კვდომას განიცდის, უმეტესი ნაწილი კი ანერგიული რჩება

მიტოგენური სიგნალის მიმართ. MEC1 უჯრედული ხაზი წარმოადგენს მუტირებული IGVH გენების მქონე „არამორეაგირე“ ქლლ კლონის მოდელს, ლიტერატურაში არსებული [Muzio et ai., 2008] მონაცემებით, დაავადებულთა სისხლიდან გამოყოფილი „არამორეაგირე“ ქლლ კლონების შემთხვევაში, ნაჩვენები იყო მიტოგენური სიგნალით უჯრედების აქტივაციის შესაძლებლობა, რადგანაც მიტოგენით გამოწვეული სტიმულაცია არ არის დამოკიდებული B უჯრედული რეცეპტორის სასიგნალო გზაზე. შესაბამისად, ჩვენი ვარაუდით, მსგავს სურათს ველოდბოდით MEC1 უჯრედებშიც, ამ დროს დადგინდა ამ უჯრედული ხაზის ანერგია მიტოგენური სტიმულის მიმართაც. აღსანიშნავია, რომ აღწერილი ანერგიის ფონზე, მიტოგენის საპასუხოდ გარკვეული დაგვიანებით (24 სთ-ში) შეინიშნებოდა ცვლილება რეცეპტორულ პროფილში, კერძოდ მკვეთრად მატულობდა CD180-ის ზედაპირული ექსპრესია. MEC1 უჯრედებში ნაჩვენები B უჯრედული რეცეპტორის ანერგიის და ასევე CD180-ის და B უჯრედული რეცეპტორის სასიგნალო გზების კავშირის გათვალისწინებით აღნიშნული ფაქტი მიუთითებს იმაზე, რომ ამ ორი რეცეპტორული კომპლექსის რეგულაცია ნაწილობრივად ერთმანეთისგან დამოუკიდებლად მიმდინარეობს. როგორც ზემოთ ავღნიშნეთ, MEC1 უჯრედული ხაზი წარმოადგენს მუტირებული IGVH გენების მქონე „არამორეაგირე“ ქლლ კლონის მოდელს, შესაბამისად ამ მოდელისთვის ვაჩვენეთ, რომ გარე სტიმულს შეუძლია ამ „არამორეაგირე“ კლონში CD180-ის დონის მოდულირება. მიღებული მონაცემები დაგვეხმარება ქლლ „არამორეაგირე“ კლონების ანერგიის ფენომენის და ასევე ქლლ-ის პათოგენეზში CD180-ის როლის შესწავლაში.

Annotation

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) presents with clonal expansion and accumulation of CD5+CD19+CD23+ cells in peripheral lymphoid organs and tissues and bone marrow. The disease can be characterized into two major subgroups, immunoglobulin (Ig) heavy (H) chain gene (*IGHV*) unmutated and mutated, which is prognostic of an aggressive or an indolent disease respectively. There is increasing evidence that CLL cells receive microenvironmental signals which support their growth, survival and expansion *in vivo*. Since CLL has been suggested to be antigen driven (although currently unknown) elucidation of both – the antigen itself and the pro-survival signaling pathways are pivotal in identifying a cure for the disease. Possible receptor, which interacts with the microenvironment is a member of Toll-like receptors family – CD180. It has been shown, that CD180 is expressed heterogeneously on CLL cells, and mainly on those with mutated *IGHV* genes. 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).

CLL cell line MEC1 has been established in 1999 from peripheral blood lymphocytes of EBV-seropositive CLL patient. Since this time MEC1 cell line is approved as a model for CLL immunopathology studies.

It should be noted, that MEC1 cell line was established from the patient with mutated *IGHV* genes (mutation level – 94.6%). At the previous stage of the research, performed by our group, it has been demonstrated, that MEC1 cells are anergic towards B cell receptor (BCR) ligation and can be observed as a model of non-responder CLL clone. Our group also has shown, that MEC1 cells express CD180, but the percentage of CD180-expressing cells isn't stable: an increase in CD180+ cells number can be seen during exponential growth stage, first 72 hours after the cell culture re-seeding. Taking into account, that anergic MEC1 cells proliferate in response to non-specific stimulation – culture re-seeding and also based on data published by others, that it was possible to induce proliferation of non-responder clones from CLL patients by mitogenic stimulation, we suggested, that MEC1 cells stimulation with mitogen, might give

us possibility in case of mitogen-derived proliferation further investigate CD180 participation in pro-survival pathways.

Therefore the main aim of our research was to investigate an effect of non-specific stimulation in MEC1 cells. For stimulation we have used phorbolmyristate acetate (PMA). The current research suggested to investigate how mitogen-stimulation affects: 1. Phenotypic profile; 2. Pro-survival pathways; 3. Proliferation process; 4. Activation level. Also additionally we have added a task (5th): to investigate time-related changes in phenotype of MEC1 cells in spontaneous culture. At the previous stage of the research, we already have seen, that during the time interval 24 h – 144h after culture re-seeding, CD180 expression on MEC1 is variable at different time-points. As a control unstimulated cultures re-seeded simultaneously with the experiment have been used. At different time-points we measured proliferation, apoptosis and activation levels in stimulated cultures, also checking surface expression of receptors functionally linked to BCR signalling pathway: CD180 and CD32.

Surface expression level was detected by using subsequent fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (mAbs), according standard immunophenotyping procedure. Samples were analysed on flow cytometer (FACScan, Becton Dickinson). 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).

According the obtained results an increase in CD180 surface expression level has been detected after the stimulation with PMA (CD180⁺ cells % spont: 10.4±2.3, PMA-stim.: 30.5±4.6, p<0.01). CD32 expression was unchanged compared to control. At the same time in PMA-stimulated cultures an increased percentage of late apoptotic cells have been detected (cells % in subG₀: spont. 15.25±3.9; stim.. 30.43±3.9, p<0.05). From the other side, the percentage of cells at

the early stage of apoptosis not only wasn't increased, but also had a tendency to decrease compared to spontaneous cultures (spont. $13.5 \pm 4\%$; stim $3.31 \pm 1.4\%$). The abovementioned discrepancy can be explained by activation-induced cell death (ACID), which seems to be triggered by PMA in a part of MEC1 cells population. Therefore due to the immediate character of ACID process, at 0.5h time-point all cells already exhibit signs of late apoptosis and can't be detected by Annexin V/ PI double staining.

MEC1 cells distribution between cell cycle stages hasn't revealed proliferation in response to mitogenic stimulation (cells % in S phase: spont. 5 ± 0.7 ; stim. 3.25 ± 0.5 ; cells % in G₂/M: spont. 2 ± 0.6 ; stim. 1.9 ± 0.5). While normal lymphocytes respond to PMA with an intensive proliferation. Neither an increase of activation level (according CD38 surface expression) has been detected (CD38⁺ cells % spont. 30.6 ± 8.1 ; stim 19.7 ± 5.5). In spontaneous cultures, CD38 expression was maximal at 0.5h after re-seeding ($30.6 \pm 8.1\%$), while at later time-points it decreased (at 96h: 5 ± 0.01). CD180 expression profile also has been studied in 0.5 – 24h interval after re-seeding. It has been shown, that CD180 expression starts to increase at 8h after re-seeding (CD180⁺ cells %: 0.5 h - 10.4 ± 2.3 ; 8h - 24.2 ± 3.5 , $p < 0.05$), reaching maximal point at 24h (29.5 ± 5.2 , $p < 0.05$). BCR signalling pathway's negative regulator – CD32 expression in contrast to CD180 is low at 24h ($11 \pm 3.8\%$), while increasing at 96h ($36 \pm 1.3\%$).

Abovementioned results reveal that MEC1 cells appeared to be anergic not only towards BCR stimulation, but also towards strong mitogenic stimulation. From the other side with a certain delay a change in phenotyping profile in response to PMA stimulation has been detected: CD180 expression increased on 24h after stimulation. This fact suggests, that beside acting through the same signalling pathway, BCR and CD180 are partially independently regulated. As it has been already mentioned, MEC1 cells present a model for non-responder CLL clone, therefore in case of this anergic clone we have shown, that by an external stimulus can induce modulation of CD180 surface expression. The obtained results will help to investigate the anergy phenomenon of non-responder clones and also the role of CD180 in CLL pathogenesis.

სარჩევი

1. შემოკლებათა სია.....გვ-11
2. შესავალი.....გვ-13
3. ლიტერატურული მიმოხილვა.....გვ-15
4. კვლევის მასალა და მეთოდები.....გვ-33
5. შედეგები და მათი განხილვა.....გვ-40
6. დასკვნა.....გვ-47
7. გამოყენებული ლიტერატურის სია.....გვ-48

შემოკლებათა სია

B-ქლლ - B ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემია

BCR - B cell receptor (B უჯრედული რეცეპტორი)

LPS - Lipopolysaccharide (ლიპოპოლისაქარიდი)

ERK - extracellular-signal-regulated kinase (გარე-უჯრედული სიგნალით რეგულირებული კინაზა)

NF-kB - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells(აქტივირებული B უჯრედის ბირთვული ფაქტორი kappa-მსუბუქი ჯაჭვის გამამლიერებელი)

NF-AT - Nuclear factor of activated T-cells(გააქტივებული T უჯრედების ბირთვული ფაქტორი)

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

TLR – Toll Like Receptor (Toll- მსგავსი რეცეპტორი)

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

Zap70 - Zeta-chain-associated protein kinase 70 (Zeta ჯაჭვთან ასოცირებული პროტეინ კინაზა 70)

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

AID - Activation-Induced Deaminase (აქტივაციის მაინდუცირებელი დეამინაზა)

sIg – surface Immunoglobulin (ზედაპირული იმუნოგლობულინი)

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

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

PI3K - phosphatidyl inositol-3 kinase (ფოსფატიდილ-ინოზიტოლ-3 კინაზა)

PLCγ2 - phospholipase Cγ2 (ფოსფოლიპაზა Cγ2)

BAM32 - B cell adaptor molecule of 32 kDa

TdT – Terminal deoxynucleotidyl transferase (ტერმინალური დინუკლეოტიდილ ტრანსფერაზა)

MFI - Mean Fluorescence Intensity(საშუალო ფლუორესცენციის ინტენსივობა)

შესავალი

ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემია (ქლლ) ხასიათდება CD5+CD19+CD23+ უჯრედების კლონური ექსპანსიით და აკუმულირებით ძვლის ტვინში, პერიფერიულ ლიმფურ ორგანოებსა და ქსოვილებში[1]. იმუნოგლობულინის (Ig) მძიმე ჯაჭვის (H) (IGHV) არამუტირებული და მუტირებული გენების მიხედვით ქლლ კლონებს ყოფენ ორ ძირითად ქვეჯგუფად შესაბამისად დაავადების აგრესიული და დადებითი პროგნოზით [2]. ნაჩვენებია, რომ ქლლ უჯრედები მიკროგარემოსგან დებულობენ სიგნალებს, რომლებიც ხელს უწყობენ მათ დაყოფას, გადარჩენასა და ექსპანსიას *in vivo* [2]. სავარაუდოთ, ქლლ-ის განვითარებას ბიძგს აძლევს ჰიპოთეტური ანტიგენი ან ანტიგენები. შესაბამისად, მეტად მნიშვნელოვანია როგორც ზემოაღნიშნული ანტიგენის იდენტიფიცირება, ასევე ქლლ-ის უჯრედებში არსებული პრო-გადარჩენის სასიგნალო გზების შესწავლა. სავარაუდოთ, ერთ-ერთი რეცეპტორი რომელიც ურთიერთქმედებს მიკროგარემოსთან - Toll-მსგავს რეცეპტორების ოჯახის წევრი - CD180 [3]. ნაჩვენებია იქნა, რომ CD180 ჰეტეროგენულად არის ექსპრესირებული ქლლ უჯრედებზე, ძირითადად კი - მუტირებული IGHV გენების მქონე უჯრედებზე [4,5], ხოლო მონოკლონური ანტისხეულებით (მკა) CD180-ის შებოჭვა განაპირობებს CD180⁺ B-ქლლ კლონების დაახლოებით 50%-ის პროლიფერაციას, აქტივაციას და აპოპტოზისგან გადარჩენას, რის საფუძველზე მოხდა მათი დაყოფა ე.წ. “მორეაგირე” და “არამორეაგირე” ქლლ კლონებად [4,5].

ქლლ უჯრედული ხაზი - MEC1 მიღებულ იქნა 1999 წელს ებშტეინ-ბარის ვირუსზე (EBV)-სეროპოზიტიული დაავადებულის პერიფერიული სისხლის ლიმფოციტებიდან. აღნიშნული უჯრედული ხაზი უკვე აღიარებულ მოდელს წარმოადგენს ქლლ-ის იმუნოპათოგენეზის შესასწავლად [6].

აღსანიშნავია, რომ MEC1 უჯრედები მიღებულია მუტირებული IGHV გენების მქონე ქლლ პაციენტისგან (მუტირების ხარისხი - 94.6%). ჩვენი კვლევითი ჯგუფის წინა მონაცემებით დადგინდა, რომ MEC1 უჯრედული ხაზი ანერგიულია B უჯრედული რეცეპტორის შებოჭვის მიმართ და შეიძლება განიხილოს, როგორც „არამორეაგირე“ ქლლ-ის კლონის მოდელი. მეორეს მხრივ, ჩვენმა ჯგუფმა ასევე აჩვენა, რომ MEC1

უჯრედებზე ხდება CD180-ის ექსპრესია და CD180-მაექსპრესირებელი უჯრედების პროცენტი არ არის სტაბილური: CD180-მაექსპრესირებელი უჯრედების რაოდენობის მომატება შეიმჩნევა პოპულაციის ლოგარითმული ზრდის ფონზე გადათესვიდან პირველი 72 საათის განმავლობაში. იმის გათვალისწინებით, რომ ანერგიული MEC1 უჯრედები პროლიფერირებენ არასპეციფიური სტიმულაციის - გადათესვის (საკვები არის გამოცვლის) საპასუხოდ, და ასევე იმის გათვალისწინებით, რომ ლიტერატურაში არსებული მონაცემებით, დაავადებულთა სისხლიდან გამოყოფილი „არამორეაგირე“ ქლლ კლონების შემთხვევაში ნაჩვენებია იყო მიტოგენური სიგანალით უჯრედების აქტივაციის შესაძლებლობა [7], გადაწყვეტიტეთ გვეცადა MEC1 უჯრედების სტიმულაცია მიტოგენით, რათა გამოწვეული პროლიფერაციის პირობებში სავარაუდო მომატებული CD180-ის ექსპრესიის ფონზე, შევისწავლოთ ამ რეცეპტორის მონაწილეობა პროგადარჩენის სასიგნალო გზებში.

ამგვარად, ჩვენი კვლევის მიზანად დავისახეთ არასპეციფიური, მიტოგენ-განპირობებული სტიმულაციის ეფექტის შესწავლა MEC1 უჯრედებში. მიტოგენით სტიმულაციის ეფექტის შეფასებისთვის დავგეგმეთ სტიმულაციის შემდგომ: 1. უჯრედების ფენოტიპურ პროფილის შესწავლა; 2. სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნების შეფასება; 3. პროლიფერაციულ სტატუსის შესწავლა; 4. აქტივაციის ხარისხის შეფასება. ასევე დამატებით ამოცანად დავისახეთ შევისწავლოთ ფენოტიპური პროფილის ცვალებადობა დროში სპონტანურ კულტურაში. რადგანაც, CD180-ის შემთხვევაში, კვლევის წინა ეტაპზე, უკვე ნანახი გვქონდა 24 -144სთ ინტერვალში MEC1 უჯრედებში მისი ზედაპირული ექსპრესიის ცვალებადობა.

თავი1. ლიტერატურული მიმოხილვა

1. B-ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემია

B ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემია წარმოადგენს სიმსივნურ დაავადებას, რომლის დროსაც ადგილი აქვს იმუნოლოგიურად არაკომპეტენტური, მონოკლონური CD5⁺CD19⁺CD23⁺ B უჯრედების დიდი რაოდენობით აკუმულაციას პერიფერიულ სისხლში, ძვლის ტვინსა და ლიმფურ ქსოვილებში[1]. B-ქლლ ზრდასრულებში ლეიკემიის ყველაზე გავრცელებული ფორმაა. დაავადება ძირითადად ვლინდება 50 წლის ზემოთ. B-ქლლ-ის კლინიკური მიმდინარეობა მრავალფეროვანი და ინდივიდუალურია. ავადმყოფთა ნაწილში დაავადება წლების განმავლობაში ძალიან ნელა პროგრესირებს და შესაძლოა არ საჭიროებდეს მკურნალობას. ზოგჯერ სიკვდილის მიზეზი სრულიად სხვა დაავადება შეიძლება გახდეს. პაციენტთა ნაწილში კი ვლინდება დაავადების მიმდინარეობის აგრესიული ფორმა, რომელიც სწრაფად სრულდება ლეტალური შედეგით. დაავადების მიმდინარეობას თან ახლავს უჯრედული და ჰუმორალური იმუნიტეტის დაქვეითება, რაც განპირობებულია ლეიკემიური B უჯრედების დიდი რაოდენობით დაგროვებით პერიფერიულ სისხლსა და ძვლის ტვინში. ამიტომ პაციენტებში იზრდება ინფექციების მიმართ მგრძობელობა, რაც ხშირ შემთხვევაში სიკვდილიანობის მიზეზი ხდება.

1.1 B-ქლლ-ის იმუნოფენოტიპი

B-ქლლ უჯრედების ფენოტიპი გარკვეულწილად მომწიფებული B უჯრედების მორფოლოგიის მსგავსია, რადგან უჯრედები TdT⁻, sIg⁺-ია და ექსპრესირებენ B უჯრედულ მარკერებს CD19, CD20, CD21-ს. TdT ექსპრესირდება მოუმწიფებელი ლეიკემიისა და ლიმფომის შემთხვევაში, მომწიფებულ ფორმებში არასდროს არ გვხვდება.[9] ზედაპირული Ig B-ქლლ უჯრედებზე ექსპრესირდება დაბალი დონით. იგი ძირითადად IgM და IgD-ა (ძალიან იშვიათად IgG ან IgA), რომელიც წარმოადგენს

პოლირეაქტიულ აუტოანტისხეულს და გააჩნია რევმატოიდული ფაქტორის აქტივობა. არსებული მოსაზრების მიხედვით B უჯრედების აკუმულაციის ერთ-ერთი მიზეზი უნდა იყოს მათი ურთიერთქმედება საკუთარ აუტოანტიგენებთან[9,10]. მასთან კოექსპრესირდება CD5. B-ქლლ-ის დროს ყოველთვის შეინიშნება CD5 ექსპრესია. იგი T უჯრედულ მარკერს წარმოადგენს. ხასიათდება მაღალი სიმკვრივით, რომელიც ინდივიდუალურად ცვალებადობს. ჩვეულებრივ CD5 ნაჩანჩის სისხლის მიმოქცევაში მყოფი B უჯრედების 5–30%-ზე. ასევე ლიმფოიდური ფოლიკულების მანტიის ზონაში მყოფ B უჯრედებზე. ცნობილია, რომ CD5⁺ B უჯრედების ერთი ნაწილი მუდმივად აექსპრესირებს CD5-ს და მათ მიაკუთვნებენ ე.წ. B-1 სუბპოპულაციას. ხოლო მეორე ნაწილი კი CD5-ს სტიმულაციის შემდეგ აექსპრესირებს, როგორც აქტივაციურ მარკერს და შეესაბამება B-2 უჯრედებს. B-1 უჯრედების რაოდენობა მომატებულია აუტოიმუნური დაავადებების დროს, ამიტომ B-ქლლ-ს დროს აუტოანტისხეულებისა და აუტოიმუნური დაავადებების სიხშირე მაღალია და ლეიკემიური უჯრედების მიერ სეკრეტირებული IgM ხშირად ჯვარედინად რეაგირებს სხვადასხვა პოტენციურ აუტოანტიგენებთან. ჯერჯერობით უცნობია B-ქლლ უჯრედები წარმოადგენენ ნორმალური CD5⁺ B უჯრედების ავთვისებიანი ტრანსფორმაციის თუ ტრანსფორმირებულ B უჯრედებზე CD5-ის de novo ექსპრესიის შედეგს. CD5 ნორმალურ B-1 უჯრედებში BCR-ის კომპლექსთან არის ასოცირებული და კორეცეპტორის როლს ასრულებს. იგი BCR-ის სასიგნალო გზის უარყოფითი რეგულატორია. CD5-ის ლიგაცია ანტი-CD5 მონოკლონური ანტისხეულებით ნორმალურ B უჯრედებში იწვევს აპოპტოზს[11].

B-ქლლ უჯრედებზე CD5 ექსპრესირებულია CD72-თან ერთად, რომელიც ასევე BCR-ის ნეგატიური რეგულატორის როლს ასრულებს. B-1 უჯრედებში CD72 CD5-ის ლიგანდს წარმოადგენს. CD5 შეუძლია დაბალაფინურად დაუკავშირდეს BCR-ის შემადგენლობაში მყოფ IgM მოლეკულის V_H რეგიონს. შეიძლება სწორედ ეს დაკავშირება განაპირობებდეს BCR-ით გადარჩენის სიგნალის გადაცემას. ეს არის ერთ-ერთი მიზეზი B-ქლლ უჯრედების გახანგრძლივებული სიცოცხლისუნარიანობისა.

B-ქლლ უჯრედებზე ზედაპირული მოლეკულის – CD38-ის ექსპრესია კორელაციაშია დაავადების ცუდ პროგნოზთან და მის აგრესიულ ფორმაზე

მიუთითებს. B-ქლლ პაციენტები ორ ჯგუფად იყოფიან: ერთ ჯგუფში CD38-ის ექსპრესია მაღალია, მეორეში კი – თითქმის არ გვხვდება. CD38 ჩართულია Ca^{2+} -ის მობილიზაციაში და უჯრედული პროლიფერაციის რეგულაციის გზაში. CD38-ის ლიგაცია იწვევს CD19-ის ფოსფორილებას და შესაბამისად გავლენას ახდენს BCR-ის სასიგნალო გზაზე. ნორმაში CD38 ექსპრესირდება ლიმფოციტურ წინამორბედებზე და აქტივირებულ ლიმფოციტებზე. ქიმიური ბუნებით CD38 ფერმენტია, რომელიც მონაწილეობს ნიკოტინამიდადენინდინუკლეოტიდის (NAD^+) გარდაქმნაში ციკლურ ადენოზინ დიფოსფატირებად (cADPR) და cADPR-ს ჰიდროლოზში, რის შემდეგაც მიიღება ADPR. ანტი-CD38 მონოკლონური ანტისხეულები იწვევენ პროტეინტიროზინკინაზების აქტივაციას. მხოლოდ ის B-ქლლ უჯრედები განიცდიან აპოპტოზს ანტი-IgM ანტისხეულების მოქმედებით, რომლებზეც ექსპრესირებულია CD38.[12] შესაბამისად ვარაუდობ, რომ CD38 მნიშვნელოვან როლს თამაშობს B-ქლლ უჯრედების აპოპტოზში, მართებულია.

B-ქლლ უჯრედებზე ასევე წარმოდგენილია ტრანსმემბრანული გლიკოპროტეინი CD23, რომელიც B ლიმფოციტების აქტივაციის მარკერია. იგი უჯრედებზე ასოცირდება HLA-DR-თან ერთად. CD23 IgE-ს დაბალაფინური რეცეპტორია, რომელიც ლიმფოციტების ზრდასა და პროლიფერაციაში მონაწილეობს და შეუძლია დაუკავშირდეს CD21-ს (ეპსტეინ ბარის ვირუსის რეცეპტორი). აღმჩნდა, რომ CD23-ის ექსპრესია B-ქლლ უჯრედებზე გამოწვეულია ამ უჯრედების ურთიერთქმედებით უმეტესად გააქტივებულ უჯრედებთან. ალტერნატიული სპლაისინგით მიიღება CD23-ის ორი იზოფორმა: CD23a და CD23b. CD23a უჯრედის სიცოცხლიუნარიანობასთან არის დაკავშირებული, CD23b კი – უჯრედის პროლიფერაციასთან. B-ქლლ უჯრედების ციტოკინებით სტიმულაცია იწვევს CD23-ის ამ ორი ფორმის წარმოამნის რეგულაციის დარღვევას. მემბრანული CD23-ის სპონტანური პროტეოლიზური დეგრადაციის შედეგად გამოიყოფა CD23-ის ხსნადი ფორმა – sCD23. B-ქლლ-ის დროს CD23b მაღალი დონით ექსპრესირდება და სისხლის შრატში მატულობს sCD23-ის კონცენტრაცია.

B-ქლლ-ის დროს მნიშვნელოვნად არის მომატებულია CD25-ის ხსნადი შრატისმიერი კონცენტრაცია და კორელაციაშია B-ქლლ-ის კლინიკურ სტადიასთან.

CD25 ინტერლეიკინ 2-ის (IL-2) რეცეპტორია და B-ქლლ უჯრედების 50%-ზე ექსპრესირდება.

B-ქლლ უჯრედების ზედაპირზე, ნორმალური B ლიმფოციტების მსგავსად, ექსპრესირდება ტრანსმემბრანული გლიკოპროტეინი CD19. იგი გვხვდება B უჯრედული განვითარების ყველა სტადიაზე და წარმოადგენს იმუნოგლობულინების სუპეროჯახის წევრს. CD19 მაღალორგანიზებულ ცილას წარმოადგენს. შედგება 2 უჯრედგარე იმუნოგლობულინის მსგავსი დომენისა და ციტოპლაზმური თანმიმდევრობისგან, რომლებიც შეიცავენ თიროზინის ფოსფორილერების 9 უბანს. თიროზინის ფოსფორილირება ხდება უჯრედში სხვადასხვა სასიგნალო გზის აქტივაციისას. CD19 CD21-თან, CD81-თან და არაკლასტერულ Leu-13-თან ერთად ქმნის სიგნალის გადამცემ არაკოვალენტურ კომპლექსს[13]. BCR-ის ჯვარედინი დაკავშირება CD19-თან, CD21-თან ან CD81-თან, ხელს უშლის Ca^{2+} -ის იონების მობილიზაციას და აქვეითებს პროლიფერაციის უნარს.

სიმსივნის ნეკროზული ფაქტორის (TNF)-ს ოჯახის რეცეპტორი – CD40 ასევე ექსპრესირდება B-ქლლ უჯრედებზე. მისი ლიგანდი CD40L წარმოდგენილია აქტივირებულ T ლიმფოციტებზე. CD40-ის ლიგანდთან ურთიერთქმედების შედეგად მიღებული სიგნალი ძალიან მნიშვნელოვანია B ლიმფოციტების აქტივაციისა და პროლიფერაციისათვის. B-ქლლ-ის დროს აქტივირებულ T ლიმფოციტებზე არ ექსპრესირდება CD40, რაც აფერხებს ამ სიგნალს.

აღმოჩნდა, რომ B-ქლლ უჯრედები ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან ზოგიერთი მარკერის ექსპრესიის პროცენტული მაჩვენებლით, მათში IGVH გენის მუტაციის არსებობის ან არარსებობის მიხედვით. ეს განსხვავება ნაწილობრივ იყო CD5 -ს Zap-70-ის ექსპრესიის შემთხვევაში. Zap-70 არის 70 kD მასის მქონე ციტოპლაზმური პროტეინი თიროზინ კინაზა (PTK), რომელიც როგორც წესი, ექსპრესირდება მხოლოდ ბუნებრივ ქილერებზე (NK) და T უჯრედებზე. სადაც ის ასოცირდება T - უჯრედულ რეცეპტორის კომპლექსში შემავალ CD3 -ის ჯაჭვთან. გამოკვლევებით დადგინდა, რომ არამუტირებული IgVH გენების შემცველ B-ქლლ უჯრედებში Zap-70-ის ექსპრესიის

დონე თითქმის ისეთივეა, როგორც ნორმალურ T უჯრედებში, ხოლო მუტაციის მქონე უჯრედებში კი ამ ცილის მომატებული დონე აღინიშნება. Zap-70-ის ექსპრესიას მნიშვნელოვანი ფუნქცია აკისრია T უჯრედული რეცეპტორის (TCR) სასიგნალო მოქმედებაში. Zap-70 არის PTK, რომელიც შედგება ტანდემურად განლაგებული 2 ჰომოლოგიური SH2 დომენისაგან. TCR -ის სტიმულაციის შემდეგ ადგილი აქვს Src ოჯახის PTK -ების აქტივაციას, რომლებიც ახდენენ TCR-ის კომპლექსში შემავალი მოლეკულების ციტოპლაზმური თანმიმდევრობის ITAM დომენების ფოსფორილებას. ფოსფორილებულ ITAM -ებთან ხდება Zap-70-ის რეკრუტირება, რასაც მოჰყვება მისი აქტივაცია. აქტივირებული Zap-70, თავის მხრივ, აქტივებს Tec ოჯახის PTK -ებს და ფოსფორილდება C/Ca²⁺ ის სასიგნალო გზას, აგრეთვე Ras/MARK გზას.

ნორმალური B უჯრედებში Zap-70 ძირითადად არ გვხვდება, მის ნაცვალად BCR-ის კომპლექსიდან სიგნალის გადაცემას ახდენს PTK -p72 Syk. Zap-70 -ის მსგავსად Syk კინაზაც მიიზიდება გააქტივებული BCR კომპლექსის ITAM დომენებთან, სადაც განიცდის აქტივაციას. ამგვარად, ანტიგენური რეცეპტორის სასიგნალო გზაში Zap -70 და Syk ანალოგიური ფუნქციას ასრულებენ.[14,15]

მომწიფებული B ლიმფოციტების BCR წარმოადგენს მულტიმერულ კომპლექსს, რომელიც ზედაპირული იმუნოგლობულინის ჰომოდიმერისაგან ფორმირდება. მასთან დისულფიდური ბმებით დაკავშირებულია ჰეტეროდიმერი CD79a და CD79b (Igα და Igβ). იგი სიგნალის გადაცემას უზრუნველყოფს. B-ქლლ ავადმყოფთა დაახლოებით 2/3-ის უჯრედებზე CD79b ან საერთოდ არ არის წარმოდგენილი, ან ექსპრესიის დონე ძალიან დაბალია. CD79b აპოპტოზის ინდუქციაში მნიშვნელოვან როლს თამაშობს. იგი გავლენას ახდენს ანტიგენის ინტერნალიზაციაზე და ზრდის ანტიგენის წარდგენის ეფექტურობას. შესაბამისად მისი არ არსებობა B-ქლლ უჯრედებზე მნიშვნელოვან როლს თამაშობს დაავადების პათოგენეზში.

B-ქლლ უჯრედებზე ზედაპირული IgM/IgD დაბალი სიმკვრივეთაა წარმოდგენილი.

ზედაპირული მარკერი CD22 მნიშვნელოვან როლს თამაშობს სიგნალის გადაცემის პროცესში. B-ქლლ უჯრედების ზედაპირზე იგი ძალიან დაბალი დონით ექსპრესირდება ან, შესაძლოა საერთოდ არ ვლინდებოდეს.

ანტიაპოპტოზური ონკოპროტეინის bcl-2-ის დიდი რაოდენობით ექსპრესირება B-ქლლ უჯრედების ციტოპლაზმაში ზრდის bcl-2/Bax ინდექსს და დიდ როლს თამაშობს აპოპტოზის ინჰიბირებაში.

1.2 B-ქლლ–სთან ასოცირებული გენეტიკური დარღვევები

B-ქლლ ავადმყოფთა 50%-ში დაავადების განვითარება ასოცირებულია გენეტიკურ დარღვევებთან. კარიოტიპულმა კვლევებმა აჩვენა, რომ CLL დაკავშირებულია დელეციებთან 13q14, 11q22-q23, 17p13-ში, მე-12 ქრომოსომის ტრისომიასთან[16,17,18,19]. სავარაუდოდ მე-12 ქრომოსომაში არის დომინანტური ან კოდომინანტური პროტონკოგენი, რომელიც აქტივირდება B-ქლლ–ის დროს. შემთხვევათა დაახლოებით 15%-ში ადგილი აქვს მე-12 ქრომოსომის ტრისომიას.[17,18]

B-ქლლ–ის დროს ყველაზე ხშირია დელეცია 13q14 ქრომოსომაში და თავს იჩენს შემთხვევათა 50–60%-ში. სპეციფიკური გენი, რომელიც უშუალოდ ზიანდება 13q14–ის დელეციის დროს, შესაძლოა იყოს სიმსივნის სუპრესორული გენი, რომელიც ინაქტივირებულია B-ქლლ–ის დროს.

B-ქლლ პაციენტების 12%-ში გვხვდება მე-17 ქრომოსომის 17p ლოკუსის დელეცია. აქ მდებარეობს სიმსივნის სუპრესორული გენი p53.[20,21] ამ გენის პროდუქტის ცილა p53–ის ფუნქციის დარღვევა, რომელიც გამოწვეულია მაკოდირებელი გენის დელეციით ან მუტაციით, შესაძლოა იწვევდეს G1 რესტრიქციის მოხსნას B-ქლლ უჯრედებში. ცილა p53–ს შეუძლია იმოქმედოს როგორც ტრანსკრიფციულ ფაქტორს, რომელიც იწვევს გენების ექსპრესიის ტრანსაქტივაციას ან ტრანსრეგრესიას. p53–ით გამოწვეული ტრანსაქტივაციის სამიზნეებია გენები, რომლებიც ჩართულნი არიან G1/S ციკლირებაში. ერთ–ერთი ასეთი გენია ციკლინ ინჰიბიტორი p21–WAF-1 და გენები, რომლებიც

ჩაბმულნი არიან აპოპტოზის კონტროლში. ასეთია Bcl-2-ის ანტაგონისტი Bax. p53-ით განპირობებული ტრანსრეგრესიის სამიზნეა Bcl-2 გენი. p53-ის აქტივობის დაკარგვას შეუძლია გამოიწვიოს უჯრედის პროლიფერაციის აჩქარებაც და გადარჩენის გახანგრძლივებაც. p53 გენის მუტაციის დროს სიმსივნური უჯრედები იძენენ კლონური გამრავლების უნარს.

იმისათვის, რომ მოხდეს IgVH გენის მუტაცია საჭიროა BCR-ის დაკავშირება Ag-თან და აქტივაციის მთელი რიგი პროცესების განხორციელება. ამგვარად, ის B-ქლლ უჯრედები, რომლებშიც ადგილი აქვს IgVH გენის მუტაციას, ვითარდებიან იმუნოლოგიურად კომპეტენტური B უჯრედებიდან. ამის საფუძველზე, არსებობს ვარაუდი, რომ ის B-ქლლ უჯრედები, რომლებშიც არ არის IgVH გენის მუტაცია ვითარდებიან მოუმწიფებელი, naive არაკომპეტენტური უჯრედებიდან, თუმცა მეორეს მხრივ, შესაძლებელია, რომ წარმოიშვნენ ისეთი კომპეტენტური B უჯრედებიდან, რომლებიც ანტიგენით სტიმულაციის შემდეგ არ განიცდიან მუტაციას. [22]

ჯერ-ჯერობით არ არის ცნობილი ის მექანიზმები, რომლებიც განაპირობებენ B-ქლლ-თან დაკავშირებულ ქრომოსომულ აბერაციებს და გენომურ ცვლილებებს. თუმცა აღსანიშნავია, ორი ნიშანი, რომელიც დამახასიათებელია B-ქლლ უჯრედებისათვის. ესენია: დამოკლებული ტელომერები და AID-ის ექსპრესია.

უჯრედის ყოველ დაყოფას თან სდევს ტელომერის დამოკლება. B-ქლლ უჯრედების ტელომერები ნორმალური B უჯრედებთან შედარებით გაცილებით მოკლეა. არამუტირებულ B-ქლლ უჯრედებს უფრო მოკლე ტელომერები აქვთ, ვიდრე მუტაციის მქონე ლიმფოციტებს. აღსანიშნავია ის, რომ პირველი ტიპის ანუ არამუტირებული IgVH გენების შემცველი უჯრედები უფრო ნაკლები ინტენსივობით იყოფიან, ვიდრე მეორე ტიპის უჯრედები. ამ შემთხვევაში ტელომერაზული აქტივობა მნიშვნელოვნად მაღალია, რაც შესაძლოა ერთგვარ კომპენსაციას უკეთებს ამ უჯრედებში 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.

B-ქლლ ავადმყოფებს რომლებსაც არ გააჩნიათ IgVH გენის მუტაცია და აქვთ დიდი ოდენობით CD38+ უჯრედები, ანუ რომლებიც მიეკუთვნებიან კლინიკურად მძიმე პაციენტებს, აქვთ ძალიან მოკლე ტელომერები და მრავალი ქრომოსომული აბერაცია. აგრეთვე აღენიშნებათ p53-ის დისფუნქცია. გარდა ამისა, B-ქლლ-ის შემთხვევაში სომატური ჰიპერმუტაციები საკმაოდ ხშირია.[22] უფრო მეტიც, AID გენი, რომელიც ნორმალურ B უჯრედებში IgVH გენის მუტაციას განაპირობებს და დნმ-ის სეგმენტების დელეციას იზოტიპური გადართვის დროს ექსპრესირდება B-ქლლ-ის შემთხვევაშიც, თუმცა მხოლოდ მცირე ფრაქციაში.[22]

40 წელზე მეტი ასაკის ჯანმრთელი ადმიანების სისხლში ნანახი იქნა ისეთი B ლიმფოციტების მცირე შემცველობა (3%), რომლებსაც ახასიათებთ B-ქლლ-ის უჯრედების მსგავსი იმუნოფენოტიპი (CD19+, CD20+, CD79b low), როგორც ჩანს ისინი წარმოიქმნენ B ლიმფოციტების სელექციისას კლონური ამპლიფიკაციით. ამას ადასტურებს ის ფაქტი, რომ მათ აღენიშნებათ L ჯაჭვის იზოტიპების მონოტიპური ექსპრესია და IgVH გენების ვიწრო რეპერტუარი. ეს მოვლენა 2-ჯერ უფრო ხშირია კაცებში 60 წლის ზემოთ, ვიდრე ქალებში [22]

1.3 B ლიმფოციტების უჯრედულ ციკლში შესვლის რეგულაცია

B უჯრედების პროლიფერაცია ხდება მათი განვითარების გარკვეულ ეტაპზე ან იმუნური პასუხის დროს, როდესაც ხდება B უჯრედების გავრცელება ანტიგენის საპასუხოდ და T უჯრედის დახმარების მეშვეობით ქმნიან ჩანასახოვან ცენტრებს.

B უჯრედულ რეცეპტორის სტიმულირება ხდება ცილებით ან პოლისაქარიდული ანტიგენებით. Toll-მსგავსი რეცეპტორების კი – პათოგენური პროდუქტებით[23,24].

G₀ ფაზაში იმყოფება მოსვენებულ მდგომარეობაში მყოფი უჯრედები, რომელთა სტიმულაციაც არ მოხდა. 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.

B უჯრედებში სიგნალის გადაცემა ხდება ITAM დომენების მეშვეობით, რომლებიც შედიან BCR-ს კომპლექსის CD79a, CD79b მოლეკულების შიდაციტოპლაზმური თანმიმდევრობების შემადგენლობაში. BCR-ს შებოჭვა განაპირობებს პროტეინ-თიროზინ კინაზების Lyn და Syk-ს აქტივაციას. 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). Lyn კი - Src ოჯახის წევრი კინაზაა, რომელიც აფოსფორილირებს ITAM-ებს.

ადაპტორული ცილები, რომლებსაც თავისმხრივ არავითარი ფერმენტული აქტივობა არ გააჩნიათ, გადამწყვეტ როლს თამაშობენ სასიგნალო გზაში B უჯრედის ბედის გადაწყვეტისას.

Nox არის მრავალ კომპონენტური ფერმენტი, რომელიც წარმოდგენილია, როგორც ფაგოციტურ ისე არა-ფაგოციტურ სხვადასხვა უჯრედებში. მოსვენებულ უჯრედებში Nox არა-აქტიურია და შედგება ორი ჯგუფისგან: მემბრანასთან დაკავშირებული ფლაგოციტოქრომი b558 და ციტოზოლური კომპლექსისგან p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}. აქტივაციის შემდეგ PKC აფოსფორილირებს ციტოზოლურ კომპონენტებს, რაც იწვევს კონფორმაციულ ცვლილებებს და შედეგად საშუალებას აძლევს მათ გადაინაცლონ ზედაპირზე gp91^{phox} და p22^{phox}-ს კომპლექსთან

ერთად. ტრანსლოკაციისას p47^{phox} -ს phox დომენი უკავშირდება PI(3,4)P₂ -ს პლაზმურ მემბრანაში[25]. ჟანგბადის რადიკალის გამომუშავებისთვის ფერმენტისთვის აუცილებელია, რომ Rac GTP-აზა იყოს აქტიური. B უჯრედები გამოიმუშავებენ 5-10% სუპეროქსიდს, როგორც ფაგოციტები, რაც აიხსნება ლიმფოციტებში ოქსიდაზას კატალიზური კომპონენტის, gp91^{phox} შემცირებული დონით. სუპეროქსიდი BCR-ს მოქმედებას აძლიერებს არაპირდაპირ PTK-ზე მოქმედებით, ასევე ახდენს კალციუმის დონის მოდულირებას[26].

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 გამონთავისუფლების პროცესი, NF- κ B-ს აქტივაცია და BCR-ით ინდუცირებული პროლიფერაცია.

BCR-ს რეგულირების სხვა საშუალება გამუალედებულია BCR-ს კოპლექსთან 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[27].

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[28]. ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი მოლეკულაა BAM32, ასევე ცნობილია DAPP1 სახელით[29]. 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[30,31]. BAM32 არეგულირებს აქტინის ქსელს Rac1 გუანოზინ ტრიფოსფატით. Rac1, Rho-ოჯახის GTPაზა, განაგებს აქტინის პოლიმერიზაციასა და მემბრანის დანაოჭებას. BAM32-ს ჭარბი ექსპრესიისას, ასევე Rac1 აქტივობა და ბაზალური F-აქტინის დონე მაღალია. აქტინთან ასოცირებული ჩონჩხის რეგულირებისთვის საჭიროა მოხდეს BAM32-ს ფოსფორილირება Y139-ზე Lyn-ს მიერ და უნდა ქონდეს დაუზიანებელი PH და SH2 დომენები. ასევე მნიშვნელოვანია BAM32-ს დაკავშირება სამიზნე ინოზიტიდან[32]. BAM32-ს აძლირებს სასიგნალო გზას MAPK გზით და იწვევს უჯრედის გადარჩენას.

ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი ასპექტი რაც BAM32-ს ახასიათებს არის მისი PH დომენის უნარი დაუკავშირდეს PI(3,4)P $_2$ -ს უფრო ძლიერად, ვიდრე PI(3,4,5)P $_3$. BCR -ს შებოჭვის შემდეგ PI3K აკატალიზებს PIP $_3$ -ს წრმოქმნას PI(4,5)P $_2$ -დან. SHIP გარდაქმნის PI(3,4,5)P $_3$ -ს - PI(3,4)P $_2$ -ად. მართალია BAM32-ის პლაზმურ მემბრანაზე რეკრუტირება დამოკიდებულია PI3K-ს აქტივობაზე, თუმცა BAM32 განსხვავდება PI3K-ზე დამოკიდებული სხვა ცილებისგან, მაგალითად BTK-სგან. რადგან მისი რეკრუტირებას ადგილი აქვს ისეთ პირობებში, როცა PI3K-ზე დამოკიდებული სხვა გზების აქტივაციის ხარისხი დაქვეითებულია. BAM32-ს რეკრუტირება შეიძლება ეხმარებოდეს განსაზღვრულ სასიგნალო გზებს. BAM32-ნოკაუტირებულ (BAM32 KO) თაგვებში ნაჩვენებია იქნა BCR-ის შებოჭვით ინდუცირებული პროლიფერაციის მკვეთრი შემცირება, იმ დროს როცა პროლიფერაციული პასუხები მიტოფენებზე დარღვეული არ იყო. ასევე BAM32 KO თაგვებში T-დამოკიდებული ანტისხეულების პასუხების შესწავლისას გამოვლინდა, რომ მიუხედავად იმისა, რომ IgG-ს ჯამური დონე ნორმას შეესაბამება, ჩანასახოვანი ცენტრების შენარჩუნების და აფინობის მომწიფების პროცესები ამ თაგვებში დარღვეულია. აღნიშნული დარღვევები კორელირებდა იზოტიპ-სპეციფიურ დეფიციტებთან კლასების გადართვის დროს. მიღებული

მონაცემებზე დაყრდნობით ჩამოყალიბდა ჰიპოთეზა, რომ BAM32 ხელს უწყობს BCR-ით ინდუცირებული პასუხების შენარჩუნებას[33,34].

BAM32 KO თაგვებში ადგილი აქვს უჯრედული ციკლის დეფექტს. IgM-ით სტიმულაციის შემდეგ მათ ახასიათებთ ზომის და რნმ-ს შემცველობის მომატების დარღვევა, უჯრედები გამოდიან მოსვენებული მდგომარეობიდან, მაგრამ ვერ პროგრესირებენ G_1 გვიან ფაზაში, რაც საჭიროა S ფაზაში გადასასვლელად. BCR-ით ინდუცირებული BAM32 KO თაგვები BAM32-ს სიმცირისას გამოიმუშავენ სუპეროქსიდის უფრო მდბალ დონეს wild type თაგვების უჯრედებთან შედარებით, ასევე ხდება BAM32 KO ელენტის B უჯრედებში. ხოლო მისი ჭარბი ექსპრესიისას პირიქით სუპეროქსიდის დონე ძალიან შემცირებულია[35,36]. სუპეროქსიდის გამომუშავება BAM32 KO თაგვების B უჯრედებში უკუკორელირებს BAM32-ს Rac-ს აქტივობაზე ზემოქმედებასთან და აქტინის პოლიმერიზაციასთან. ამგვარად BAM32 თამაშობს, როგორც დადებით, ისე უარყოფით როლს BCR-ს სასიგნალო გზაში. არა-ფაგოციტურ უჯრედები სხვადასხვა სტიმულაციის შემდეგ გამოიმუშავენ მცირე რაოდენობით სუპეროქსიდს. ამ უჯრედებში რეაქტიული ჟანგბად ნაერთები(ROS) აბალანსირებენ თიროზინის ფოსფორილირება-დეფოსფორილირებას[37,38]. PTK-ს აქტივობის გაძლიერების ნაცვლად, სუპეროქსიდი აინჰიბირებს დეფოსფორილირებას და ეხმარება რეცეპტორს სიგნალის მოდულირებაში. ROS -ს სამიზნე არის PTP-აზას ცისტეინის აქტიური უბნები. ამ ცისტეინის უკუ-ფოსფორილირება გარდაქმნის დროებით არააქტიურად. საშუალებას აძლევს PTK-ს შეუზღუდავად შეასრულოს სამუშაო. სუპეროქსიდი შეიძლება გამოიმუშავოს მიტოქონდრიამ და Nox[39].

1.4 B უჯრედული რეცეპტორის სასიგნალო გზა

BCR კომპლექსი, როგორც მომწიფებულ, ისე მოუმწიფებელ B ლიმფოციტებში, უზრუნველყოფს სხვადასხვა ბუნების სიგნალის გადაცემას, რასაც შეიძლება მოჰყვეს

როგორც უჯრედული აქტივაცია, ასევე აპოპტოზი. ეს დამოკიდებულია იმაზე, თუ დიფერენცირების რომელ სტადიაზეა უჯრედი.

BCR ტრანსმემბრანული კომპლექსია, რომლის შემადგენლობაშიც შედის IgM – მემბრანული იმუნოგლობულინი (mIg) და კიდევ 2 მოლეკულა: CD79a (Ig α) და CD79b (Ig β). IgM წარმოადგენს BCR–ის ანტიგენდამაკავშირებელ ნაწილს. ხოლო Ig α და Ig β უზრუნველყოფს BCR–იდან სიგნალების გადაცემას.[40,41]

მემბრანული იმუნოგლობულინების დაკავშირება ანტიგენტან ააქტიურებს შიდაუჯრედულ ცილებს-თიროზინ კინაზებს Syk, Btk, Fyn. შემდეგ აღნიშნული 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- წარმოადგენს აქტივაციის მთავარი რეგულატორს 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).[42,43] 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.[44,45] PIP2-ს PIP3-ად გარდაქმნას ხელს უშლის PTEN ლიპიდური ფოსფატაზა, რომელიც გამოყოფს D3 PIP3-დან[46]. მსგავსი

ინჰიბიტორული ფუნქცია აქვს Fc-Gamma-RIIB-თი ინდუცირებულ SHIP-ს. BCR-ს კოლიგაციით 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[47,48]. 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 ტრანსკრიპციის 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[49,50]. კატალიზური PI3Ks მიერ NF-κB ტრანსლოკაცია მოგვიანებით ზრდის BCR-ით სტიმულირებულ PI3K გენების ექსპრესიას. PI3K-თი გაშუალდებული გენების ექსპრესია BCR/c-AbI-ს გავლენის ქვეშ ააქტიურებს MAPK კასკადს aPKC/Raf1MEK გზით. MAPKs-ს შემდგომი გააქტიურება

არეგულირებს MAPK გზას, რომ გააკონტროლოს ტრანსკრიპციის ფაქტორებით ინდუცირებული უჯრედების პროლიფერაცია. ეს ფაქტორები ასევე არეგულირებენ Opn გენის ექსპრესიას, რომელიც მონაწილეობს ისეთი უჯრედული პროცესების მოდულირებაში, როგორცაა იმუნური ჰომეოსტაზი, ძვლად გადაქცევა, მიელინიზაცია. Opn ასევე აკონტროლებს ინტეგრინის გზას ECM/ინტეგრინის ურთიერთობის გზით, რათა მოიზიდოს რეგულატორული PI3Ks[51].

ქლლ პაციენტების 50%-ში ფიქსირდება ERK1/2-ის მუდმივი ფოსფორილირება. რაც დადგინდა BCR-ის ორი მთავარი სასიგნალო გზის - MEK1/2-ERK1/2 და PI3K/AKT შესწავლის შედეგად. როგორც აღმოჩნდა, AKT-ს ფოსფორილირების არ არსებობის დროს, MEK1 უჯრედული ხაზისთვისაც იგივე სურათი ვლინდება[52].

1.5 Toll-მსგავსი რეცეპტორი – CD180

CD180 წარმოადგენს Toll-მსგავსი რეცეპტორების ოჯახის წევრს. თავდაპირველად აღმოჩენილ იქნა 1988 წელს ადამიანის B უჯრედებზე და აღინიშნა როგორც Bgp95. შემდგომში 1994 წელს, დადგინდა, რომ იგი ექსპრესირდება თავის B უჯრედებზე და ეწოდა RP105. იგი თავებს იცავდა დასხივებით გამოწვეული აპოპტოზისგან. CD180 ძირითადად ექსპრესირდება მომწიფებულ B უჯრედებზე, მონოციტებზე და დენდრიტულ უჯრედებზე[53].

CD180-ის უჯრედგარე ნაწილი წარმოადგენილია ლეიციინით მდიდარ თანმიმდევრობით, უჯრედშიდა ნაწილი კი მოკლე ციტოპლაზმურ კუდიტ. უჯრედგარე ნაწილი ასოცირებულია MD1 მოლეკულასთან და უჯრედის ზედაპირზე ქმნის რეცეპტორულ კომპლექსს CD180/MD1. MD1 მოლეკულის არსებობა აუცილებელია CD180-ის ექსპრესიისათვის. B-ქლლ-ში CD180-ს დაბალი ექსპრესია სწორედ MD-1-ს სიმცირეს უკავშირდება[54].

CD180-ს ლიგაცია B უჯრედებში იწვევს შიდაუჯრედული Ca-ს მობილიზაციას, C-myc-ს ექსპრესიასა და უჯრედების ციკლში შესვლას. B უჯრედების აქტივაციას თან მოსდევს CD180-ს ექსპრესიის დონის შემცირება.

კვლევის ანალიზმა აჩვენა, რომ CD180-ის ექსპრესია მაღალია მუტირებული IgVH გენის მქონე უჯრედებში, ვიდრე არამუტირებულ უჯრედებში. sIgM-ის ექსპრესიის დონე კი პირიქით არამუტირებული IgVH გენის მქონე უჯრედებშია მომატებული[55].

B-ქლლ უჯრედებზე CD180 ჰეტეროგენულად ექსპრესირდება. ძირითადად კი მუტირებული IGVH გენის მქონე უჯრედებზე. B-CLL უჯრედები შეიძლება დაიყოს CD180+ და CD180- კლონებად. CD180+ B-CLL კლონები იყოფა “მორეაგირე” და “არამორეაგირე” უჯრედებად. მორეაგირე უჯრედები CD180-ს შებოჭვას, პასუხობენ აქტივაციითა და პროლიფერაციით, არამორეაგირე – კი შესაბამისად არ პასუხობს. B-ქლლ-ში CD180+ უჯრედების რიცხვი ყოველთვის ნაკლებია, ნორმალურ B უჯრედებთან შედარებით[4,5].

CD180 არის LPS-ს გამომცნობი მთავარი რეცეპტორის – TLR-4-ის ჰომოლოგი. მისი ექსპრესიის დონე პირდაპირ ასახავს TLR4-ის ექსპრესიას ადამიანისა და თაგვის მაკროფაგებსა და დენდრიტულ უჯრედებზე. TLR-4 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-kB-ს აქტივაცია[56,57]. მეორეს მხრივ, ნაჩვენებია იყო, რომ B უჯრედული რეცეპტორის (BCR) სასიგნალო გზაში მონაწილე 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 უჯრედშია Ca²⁺-ის ცვლას არეგულირებს. ხოლო CD19 B უჯრედში განსაზღვრავს BCR-დან სიგნალის გადაცემის ზღურბლს, Lyn

კინაზის აქტივაციის რეგულირების მეშვეობით[58]. 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[58].

სტრუქტურულმა მსგავსებამ TLR4-ს და CD180-ს შორის განაპირობა CD180-ით TLR4-ის სიგნალების ნეგატიური რეგულაციის ჰიპოთეზის ჩამოყალიბება. CD180-MD1 პირდაპირ უკავშირდება TLR4-MD2-ის უჯრედგარე სასიგნალო კომპლექსს. გარდა ამისა გარკვეულ იქნა CD180-ით ინჰიბირებისთვის საჭირო უჯრედგარე ლოკუსიც. დადგინდა, რომ CD180-MD1 უკავშირდება TLR4-MD2-ს შორის. ამ კავშირის გამო ითვლება LPS-ის დაკავშირება სასიგნალო კომპლექსთან.

TLR4 და სხვა TLR-ების ერთდროულმა სტიმულაციამ შეიძლება დაბლოკოს TLR4-ის სიგნალების CD180 დამოკიდებული ინჰიბირება. ცხადია, რომ მიკრობების უმრავლესობა, რომლებიც აექსპრესირებენ TLR4 მასტიმულირებელ ლიგანდებს ასევე აექსპრესირებენ ლიგანდებს სხვა TLR-ებისთვის.

TLR4-ის უნარი, გამოიწვიოს ენდოგენური პროტეინები და უჯრედგარე მატრიქსის კომპონენტები დაზიანებული ქსოვილით, გვაფიქრებინებს, რომ CD180 მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ანთებითი პასუხების დათრგუნვაში და აუტოიმუნურ დაავადებებში.

ანტიCD180 ანტისხეულის უნარი, გამოიწვიოს B უჯრედების პოლიკლონური აქტივაცია *in vitro*, ამტკიცებს CD180-ის შესაძლო მონაწილეობას თანდაყოლილი იმუნური პასუხის რეგულაციაში.

CD180-ის შებოჭვამ გამოიწვია ZAP70, p38MAPK, Erk, და განსაკუთრებით Akt პროტეინ კინაზების ფოსფორილირების ძლიერი აქტივაცია როგორც ნორმალურ B უჯრედებში, ასევე “მორეაგირე” უჯრედებში, რაც მიუთითებს მის პრო-გადარჩენის ფუნქციაზე ამ უჯრედებში. ამგვარად, CD180-ით გაშუალებულ ურთიერთქმედებას მიკროგარემოსა და R-ქლლ უჯრედებს შორის შეუძლია ხელი შეუწყოს ლეიკემიური კლონების ექსპანსიას *in vivo*: ლიმფურ კვანძებსა და ძვლის ტვინში ე.წ. “პროლიფერაციულ ცენტრებში” (PCs). შესაბამისად, CD180-ის ლიგანდებს, როგორც ხსნადს, ასევე

ზედაპირულს, “პროლიფერაციულ ცენტრებში” შეუძლიათ შეასრულონ კოსტიმულატორული მოლეკულების ფუნქცია CD40/CD40L-თან და ციტოკინებთან ერთად, რათა ხელი შეუწყონ ქლლ უჯრედების ექსპანსიასა და გადარჩენას.

1.6 სამოდულო სისტემა – MEC1 უჯრედული ხაზი

MEC1 უჯრედული ხაზი უკვე აღიარებულ მოდელს წარმოადგენს ქლლ-ის იმუნოპათოგენეზის შესასწავლად[6]. იგი მიღებულია მუტირებული IgVH გენების მქონე, ეპშტეინ-ბარის ვირუსზე სეროპოზიტიური (EBV⁺) ქლლ პაციენტის პერიფერიული სისხლის ლიმფოციტებიდან. MEC1 B უჯრედების ხაზის შექმნის მთავარი მიზეზი იყო, შეექმნათ B-ქლლ-ს ანალოგიური *in vitro* მოდელი, რომ შეესწავლათ მასში მიმდინარე ბიოლოგიური პროცესები[59]. მათთვის დამახასიათებელია მე-17 ქრომოსომის მოკლე მხრის დელეცია. MEC1 უჯრედები ზედაპირზე ექსპრესირებენ CD19, CD20, CD21, CD22-ს, მომწიფებული B უჯრედების მსგავსად. CD21 მარკერის არსებობა განაპირობებს ამ უჯრედების EBV⁺-ს. მაღალი დონით ექსპრესირებენ CD23, CD80 და CD86-ს და ადჰეზიური მოლეკულების CD11a, CD18, CD44, CD49d და CD54-ს მიმართ დადებითები, CD5, CD28 და FMC7-ზე კი უარყოფითები. მიელოიდური და T უჯრედული მარკერები MEC1-ში არ ვლინდება.

MEC1 უჯრედებს ახასიათებთ ტენდენცია აგრეგირებისკენ. იზრდებიან ჭურჭლის კედლებზე და წარმოქმნიან აგრეგატებს. მათი გაორმაგების დროა 40 საათი. განუწყვეტელად იზრდებიან 50 თვეზე მეტ ხანს.

თავი 2. კვლევის მასალა და მეთოდები

გამოყენებული ანტისხეულები:

გამოყენებული გვქონდა თავის მონოკლონური ანტისხეულები (მკა): ანტი-CD180-PE, ანტი- CD32-FITC, ანტი- CD38-FITC, ანტი-11a-PE, ანტი-IgG-FITC, ანტი-IgG-PE (ყველა მკა - BD Biosciences).

MEC1 უჯრედული კულტურები

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

ჩვეულებრივ B ლიმფოციტებთან შედარებით MEC1 უჯრედებს უფრო დიდი ზომა ახასიათებთ [6]. აღსანიშნავია, რომ მიუხედავად იმისა, რომ MEC1 ხაზი - სუსპენზიური კულტურაა, ჰორიზონტალურად მოთავსებულ კულტურალურ ბოთლში ის კედელზე ადჰეზირდება, ხოლო ვერტიკალურად მოთავსებულ ჭურჭელში - ქმნის უჯრედულ აგრეგატებს.შესაბამისად, MEC1 უჯრედებთან მუშაობისას, კულტურიდან უჯრედების ამოღების შემდეგ საჭირო იყო აღნიშნული აგრეგატების დაშლა და მხოლოდ ამის შემდეგ ნებისმიერი ექსპერიმენტალური პროცედურების ჩატარება. აღნიშნული აგრეგატები ცუდათ იშლებოდა ჩვეულებრივი პიპეტირებისას, საჭირო აღმოჩნდა კულტივირების შემდგომ, უჯრედების მოთავსება 4°C-ზე, 20 წუთით, რის შედეგადაც უჯრედული აგრეგატები თავისით იშლებოდნენ და ვლებულობდით ცალკეული უჯრედების სუსპენზიას.

უჯრედების სტიმულაციას ვახდენდით ფორბოლ მირისტატ აცეტატით, კონცენტრაციით 100ნგ/მლ, ანუ 96-ფოსოიან ბრტყელძირიანი იმუნოლოგიური პლანშეტის ფოსოში მოთავსებულ 200მკლ უჯრედებს (10⁶/მლ) ვუმატებდით 10მკგ/მლ ფმა-ს 2მკლ-ს.

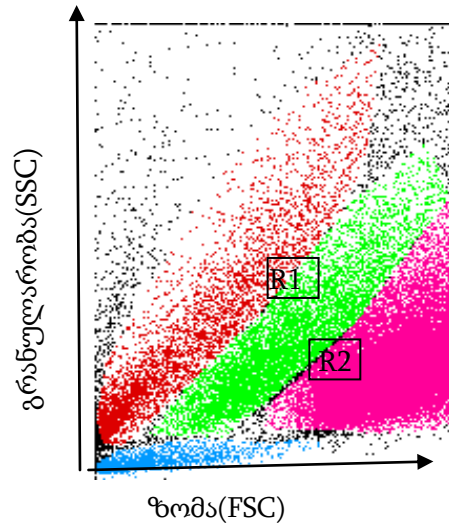
MEC1 B უჯრედული ხაზის ფენოტიპირება

MEC1-სთვის დამახასიათებელი აგრეგატების წარმოქმნის გამო, ექსპერიმენტის დაწყებამდე ინკუბატორიდან გამოღების შემდეგ, უჯრედებს ვათავსებდით 20წთ 4°C-ზე, რის შემდეგაც პიპეტირების გზით ადვილად ვღებულობდით ცალკეული უჯრედების სუსპენზიას. უჯრედების კონცენტრაცია სუსპენზიაში მიგვყავდა 2×10^6 უჯრედამდე მლ-ში და გადაგვეყონდა 2მლ-ან ეპენდორფებში. უჯრედებს ვაცენტრიფუგირებდით 5 წუთი, 400G-ზე, +4°C-ზე. უჯრედების ნალექს ვრეცხავდით 2-ჯერ 200 მკლ 1%-ანი PBS(Sigma)BSA(Sigma) და ვამატებდით სათანადო ზედაპირული მარკერების საწინააღმდეგო თავის მონოკლონურ ანტისხეულებს (მკა) კონცენტრაციით 20 მკგრ/მლ-ზე. კონტროლისათვის ვხმარობდით შესაბამის იზოტიპურ კონტროლს. მონოკლონურ ანტისხეულებთან უჯრედებს ვაინკუბირებდით 30 წუთი +4°C-ზე. ინკუბაციის დამთავრებისას, უჯრედებს ორჯერ ვრეცხავდით 1%-ანი PBS (SIGMA)-BSA (SIGMA)-ის ხსნარით. ვაფიქსირებდით 2%-იან პარაფორმალდეჰიდით (SIGMA). შედეგების აღრიცხვას ვაწარმოებდით გამდინარე ფლუორომეტრით (Becton&Dickinson).

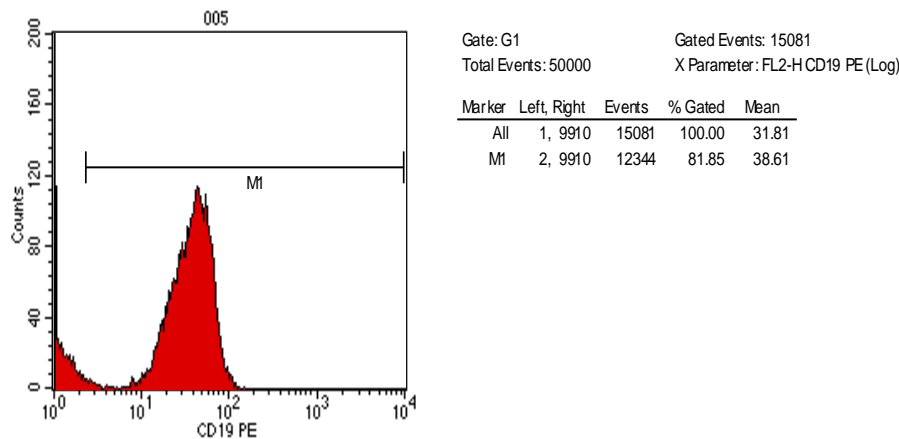
MEC1 უჯრედული ხაზის ფენოტიპირების შედეგების ანალიზი

MEC1 უჯრედული ხაზის ფენოტიპირების შედეგების გაანალიზირებას ვაწარმოებდით CellQuestPro პროგრამის საშუალებით. ანალიზირებისას, უპირველეს ყოვლისა, ზომის და გრანულარობის ხარისხის მიხედვით ვარჩევდით უჯრედების მცირე და დიდი ზომის ლიმფოციტების სიცოცხლისუნარიან პოპულაციებს. მცირე ზომის პოპულაციისათვის ვნახულობდით სათანადო ზედაპირული მარკერის ექსპრესიის დონეს. შედეგები გამოისახებოდა ჰისტოგრამების სახით, სადაც ფლუორესცენციის ინტენსივობა (X ღერძი) შეფარდებული იყო უჯრედების რიცხვთან Y ღერძი). ყოველი ნიმუშისათვის ვსაზღვრავდით მარკერის მაქსიმალური უჯრედების პროცენტს ლიმფოციტების საერთო პოპულაციაში და აგრეთვე ფლუორესცენციის შეფარდებით ინტენსივობას (ფში), რომელიც უდრის ანტისხეულებით შეღებილი უჯრედების

ფლუორესცენციის საშუალო ინტენსივობის (ფსი) შეფარდებას IgG იზოტიპური კონტროლის ფსი-თან.



სურათი 1. უჯრედების განაწილება ზომის და გრანულარობის მიხედვით



სურათი2. ზედაპირული მარკერის ექსპრესიის გამოსახულება ჰისტოგრამის სახით

X-ღერძი -- ფლუორესცენციის ინტენსივობა

Y-ღერძი -- უჯრედების რიცხი

M1 - მარკერია, რომელიც დაყენებულია იზოტიპური კონტროლის მიხედვით, იმისთვის, რომ ვნახოთ სათანადო ანტიგენის მაქსიმალური პოპულაციისათვის ფლუორესცენციის საშუალო ინტენსივობა, MFI 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 MFI-ს მნიშვნელობა (Mean).

აპოპტოზის განსაზღვრა ანექსინ V/პროპიდიუმ იოდიდით ორმაგი შედეგის მეთოდით

შესაბამისი სტიმულაციის შემდეგ B-ქლლ უჯრედებში აპოპტოზის დონეს ვსაზღვრავდით FITC-კონიუგირებული ანექსინ V-ით (Ann) და პროპიდიუმ იოდიდით (PI) უჯრედების შედეგის ხარისხის მიხედვით (გამოვიყენეთ "Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit", Sigma). აპოპტოზის დადგენის ამ მეთოდს საფუძვლად უდევს ის ფაქტი, რომ აპოპტოზის ადრეულ სტადიებზე უჯრედულ ცვლილებათა შორის შეიმჩნევა ფოსფოლიპიდური ასიმეტრიის დარღვევა, კერძოდ, ფოსფატიდილსერინი, რომელიც ნორმაში მემბრანის შიგნითა ზედაპირზეა წარმოდგენილი, ტრანსლოცირდება მემბრანის გარეთა ზედაპირზე და, ამგვარად, უჯრედში მიმდინარე აპოპტოზური პროცესის მაჩვენებლის როლს თამაშობს [8]. ანექსინები კი ჰომოლოგიური ცილების ჯგუფია, რომლებიც Ca^{2+} -ის იონების თანაობისას ფოსფოლიპიდებს უკავშირდებიან. AnnV-FITC — ფლუორესცენტული სინჯია, რომელიც Ca^{2+} -ის იონების-შემცველ ბუფერში უკავშირდება ფოსფატიდილსერინს. აპოპტოზის ადრეული და გვიანი (მეორადი ნეკროზი) სტადიების გარჩევის მიზნით, უჯრედებს ერთდროულად ვამუშავებდით AnnV-FITC-ით და PI-ით: AnnV-FITC უკავშირდება ფოსფატიდილსერინს აპოპტოზის ადრეულ სტადიებზე მყოფი უჯრედების მემბრანებზე, ხოლო პროპიდიუმ იოდიდი უკავშირდება უჯრედულ დნმ-ს იმ უჯრედებში, სადაც უჯრედის მემბრანის ინტაქტურობა უკვე მთლიანად დარღვეულია [8].

მეთოდის მიხედვით, სტიმულაციის დამთავრებისას, უჯრედები ბრტყელძირიანი პლანშეტიდან გადაგვქონდა მრგვალძირიან პლანშეტში (2×10^5 უჯრედი/ფოსოში). ამის შემდგომ, უჯრედებს ვაცენტრიფუგირებდით (5 წუთი, 400გ, $+4^{\circ}C$) და ნალექზედა სითხის ამოღების შემდეგ ვუმატებდით 200 მკლ-ს PBS-ს, ვაცენტრიფუგირებდით (5 წუთი, 400გ, $+4^{\circ}C$). ასეთ გარეცხვას ვაწარმოებდით ორჯერ. გარეცხილ უჯრედებს ვასუსპენდირებდით Ca^{2+} -ის იონების-შემცველ შემაკავშირებელ ბუფერში და ვაინკუბირებდით სიბნელეში 10 წუთის განმავლობაში FITC-კონიუგირებულ ანექსინ V-თან (2.5 მკლ) და პროპიდიუმ იოდიდთან (1 მკლ). შედეგების აღრიცხვას ვაწარმოებდით გამდინარე ციტომეტრით.

**ანექსინ V/პროპიდიუმ იოდიდით ორმაგი შეღებვით მიღებული შედეგების
ანალიზირება**

Ann V-FITC-ით და PI-ით ორმაგი შეღებვით მიღებული შედეგების ანალიზირებისათვის, საჭირო იყო გვენახა უჯრედთა პოპულაციების განაწილება ერთდროულად მწვანე და წითელი ფლუორესცენციის ინტენსივობის მიმართ. ამგვარად, ვნახულობდით უჯრედთა პოპულაციების განაწილებას კოორდინატთა სისტემაში, რომელშიც X ღერძი - მწვანე ფლუორესცენციაა (FL1) [ამ შემთხვევაში, Ann V-FITC-ით განპირობებული], ხოლო Y ღერძი - წითელი ფლუორესცენციაა (FL2) [PI-ით განპირობებული].

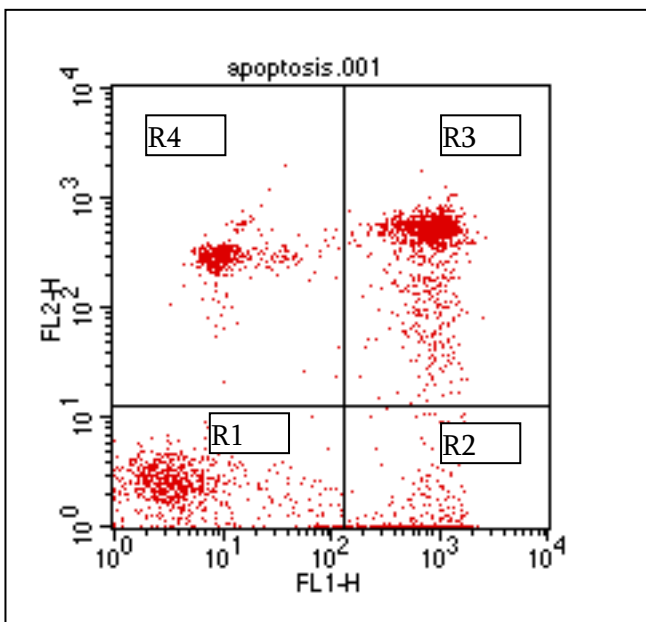
შესაძლო იყო განგვესხვავებინა 4 პოპულაცია. ძირითადებია: R1 - (Ann-/PI-), სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების პოპულაცია; R2 - (Ann+/PI-), აპოპტოზის ადრეულ სტადიებზე მყოფი უჯრედების პოპულაცია; R3 - (Ann+/PI+) აპოპტოზის გვიან სტადიებზე მყოფი უჯრედების პოპულაცია; R4 - (Ann-/PI+), ნეკროზული უჯრედების პოპულაცია. (სურ.3).

სურათი 3.

ანექსინ V-FITC-ით და პროპიდიუმ იოდიდით შეღებილი უჯრედების პოპულაციები

X ღერძზე - FL1, მწვანე ფლუორესცენციის ინტენსივობის ლოგარითმული სკალა (ანექსინ V-FITC)

Y ღერძზე - FL2, წითელი ფლუორესცენციის ინტენსივობის ლოგარითმული სკალა (პროპიდიუმ იოდიდი)

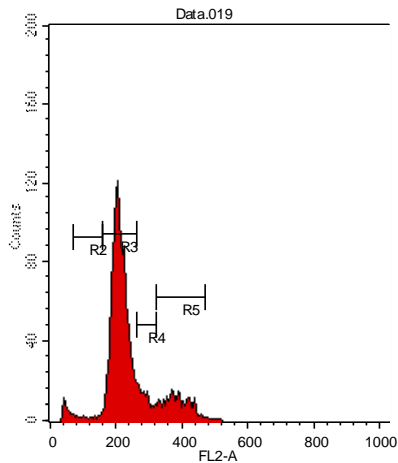


- R1(Ann-/PI-) - სიცოცხლისუნარიანი უჯრედები;
- R2(Ann+/PI-) - აპოპტოზის ადრეულ სტადიებზე მყოფი უჯრედები;
- R3 (Ann+/PI+) - აპოპტოზის გვიან სტადიებზე მყოფი უჯრედები;
- R4(Ann-/PI+) - ნეკროზული უჯრედები;

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

ეთიდიუმ ბრომიდით (ებ) შეღებვის მეთოდი ფართოდ გამოიყენება უჯრედული ციკლის სურათის მისაღებად. ეთიდიუმ ბრომიდი ინტერკალატორულ საღებავებს მიეკუთვნება და უკავშირდება ორმაგ-ჯაჭვიან დნმ-ს. ამგვარად, ებ-ით შეღებვის შედეგად მიიღება უჯრედების გადანაწილების სურათი ორმაგ-ჯაჭვიანი დნმ-ის შემცველობის მიხედვით [8].

უჯრედებს ვაცენტრიფუგირებდით 5 წუთი, 1500 ბრ/წმ, +4°C-ზე და მიღებულ უჯრედების ნალექს ვაფიქსირებდით ყინულოვანი 70%-იანი ეთანოლით (1მლ), 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 15 წთ, 1500 ბრ/წმ, +4°C-ზე. ნალექზედა სითხის გადასხმისას ვტოვებდით დაახლოებით 20 მკლ-ს (რადგანაც რნმ-აზა აქტიურია ეთანოლში), მომდევნო ეტაპზე, ვორტექსზე შენჯღრევის შემდეგ, უჯრედების ნალექს ვამატებდით რნმ-აზას 2მკლ (10 მგ/მლ) და ვაინკუბირებდით 30 წუთი ოთახის ტემპერატურაზე. რის შემდეგაც, უჯრედებს ვასუსპენდირებდით 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 ვაანალიზებდით გამდინარე ციტომეტრიის საშუალებით. დნმ-ის ჰისტოგრამაზე (X ღერძი – ფლუორესცენციის ინტენსივობა, Y ღერძი – უჯრედების რიცხვი), 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.



სურათი 4. ეთიდიუმ ბრომიდით შეღებვის შედეგად მიღებული დნმ-ის ჰისტოგრამა
X-ღერძი -- წითელი ფლუორესცენციის ინტენსივობა
Y-ღერძი -- უჯრედების რიცხი
R1- პიპოპლოიდიური მონაკვეთი – აპოპტოზური უჯრედები
R2- დიპლოიდიური მონაკვეთი - G0/G1 ფაზაში მყოფი უჯრედები
R3- გარდამავალი მონაკვეთი დიპლოიდურ და ტეტრაპლოიდურს შორის - S ფაზაში მყოფი უჯრედები
R4- ტეტრაპლოიდიური მონაკვეთი - G2/M ფაზაში მყოფი უჯრედები

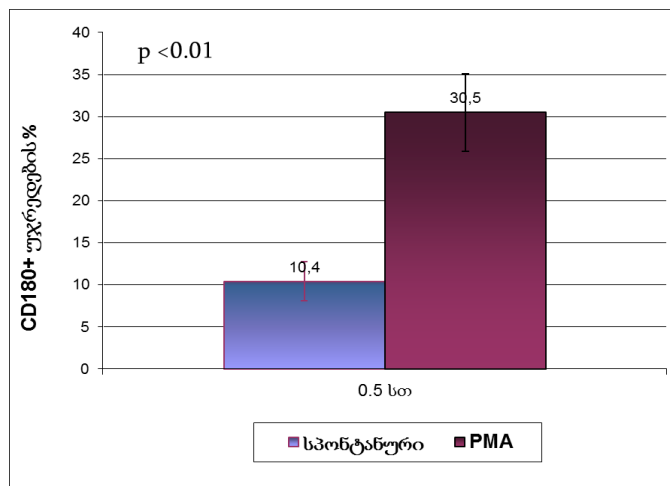
სტატისტიკური ანალიზი

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

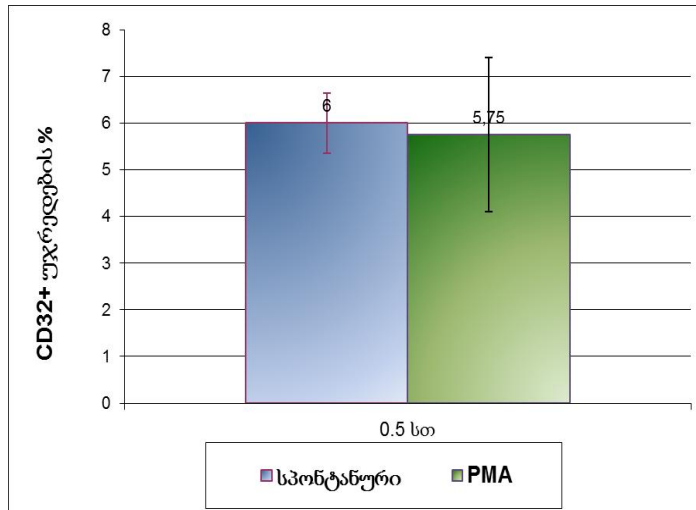
ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა არასპეციფიური სტიმულაციის ეფექტის შესწავლა MEC1 უჯრედებში. რისთვისაც გამოვიყენეთ ფართო სპექტრის მიტოგენი - ფორბოლ-მირისტატ აცეტატის (ფმა). აღნიშნული კვლევა ითვალისწინებდა ფმა-ით გამოწვეული სტიმულაციის ეფექტის შეფასებას და გულისხმობდა სტიმულაციის შემდგომ: 1. უჯრედების ფენოტიპურ პროფილის შესწავლას; 2. სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნების შეფასებას; 3. პროლიფერაციულ სტატუსის შესწავლას; 4. აქტივაციის ხარისხის შეფასებას. ასევე დამატებით (მე-5) ამოცანად დავისახეთ შევისწავლოთ ფენოტიპური პროფილის ცვალებადობა დროში სპონტანურ კულტურაში. CD180-ის შემთხვევაში, კვლევის წინა ეტაპზე, ჩვენ უკვე ნანახი გვეონდა 24-144სთ ინტერვალში MEC1 უჯრედებში მისი ზედაპირული ექსპრესიის ცვალებადობა. კონტროლის სახით ვიყენებდით ექსპერიმენტულ ნიმუშთან ერთდროულად გადათესილ სპონტანურ კულტურას. დროის სხვადასხვა წერტილებში ვსაზღვრავდით უჯრედების აპოპტოზის დონეს, პროლიფერაციის ხარისხს, აქტივაციური მარკერის CD38-ის ზედაპირულ ექსპრესიას, B უჯრედულ რეცეპტორთან ფუნქციურად დაკავშირებული რეცეპტორების - CD180-ის და CD32-ის ზედაპირულ ექსპრესიას.



სურათი 5. CD180+ უჯრედების პროცენტული ცვლილება PMA-ით სტიმულაციის შემდეგ

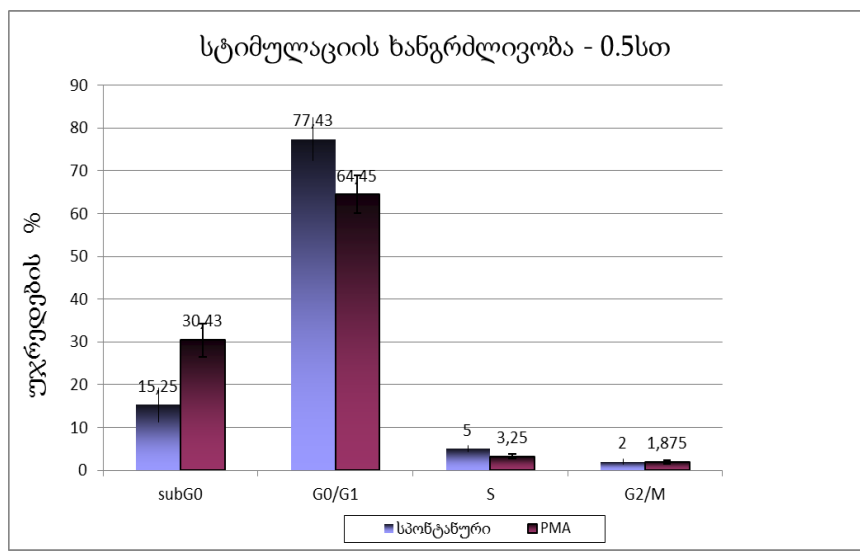
მიღებული შედეგების თანახმად, უჯრედული კულტურის ზრდის 0.5 სთ-ზე აღინიშნებოდა CD180-ის ექსპრესიის მკვეთრი მომატება კონტროლთან შედარებით

(CD180⁺ უჯრედების % სპონტანურ კულტურაში: 10.4±2.3, ფმა-სტიმულირებულ კულტურაში: 30.5±4.6, p<0.01)(სურ.5), CD32-ის ექსპრესიის დონე უცვლელი რჩებოდა კონტროლთან შედარებით (სურ.6). პარალელურად, დადგინდა ფმა-სტიმულირებულ კულტურებში აპოპტოზის გვიან სტადიებზე მყოფი უჯრედების პროცენტობის მომატება კონტროლთან შედარებით (უჯრედების % subG₀ ფაზაში: სპონტ. 15.25±3.9; სტიმ. 30.43±3.9, p<0.05) (სურ.7).



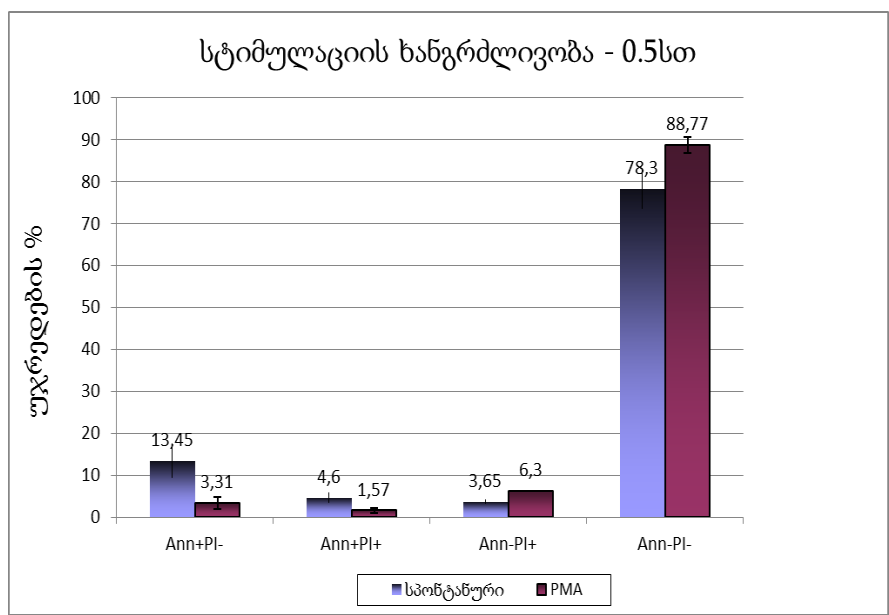
სურათი 6. CD32+ უჯრედების პროცენტული ცვლილება PMA-ით სტიმულაციის შემდეგ

მეორეს მხრივ, აპოპტოზის ადრეულ სტადიებზე მყოფი უჯრედების პროცენტული მაჩვენებელი (რომელსაც ვადნედით ანექსინ V/პროპიდიუმ იოდიდით ორმაგი შეღებვის მეთოდით) მომატებული არ იყო, პირიქით, აღინიშნებოდა მისი დაკლების ტენდენცია კონტროლთან შედარებით (სპონტ. 13.5±4%; სტიმ. 3.31±1.4%) (სურ.8). აღნიშნული წინააღმდეგობა აიხსნება იმით, რომ, როგორც ჩანს, მიტოგენის საპასუხოდ უჯრედების პოპულაციის ნაწილი განიცდის აქტივაციით-განპირობებულ კვდომას, რომელიც მეტად სწრაფად მიმდინარეობს, და სტიმულაციის 0.5 სთ-ის შემდეგ უკვე შეუძლებელია ამ უჯრედების იდენტიფიცირება აპოპტოზის ადრეული სტადიების დადგენის მეთოდით, რადგანაც ამ უჯრედებში დროის მოცემულ წერტილში უკვე დნმ-ის ფრაგმენტირება შეიმჩნევა, რომლის გამოვლენა შესაძლებელი აღმოჩნდა ეთიდიუმ ბრომიდით დნმ-ის შეღებვით.



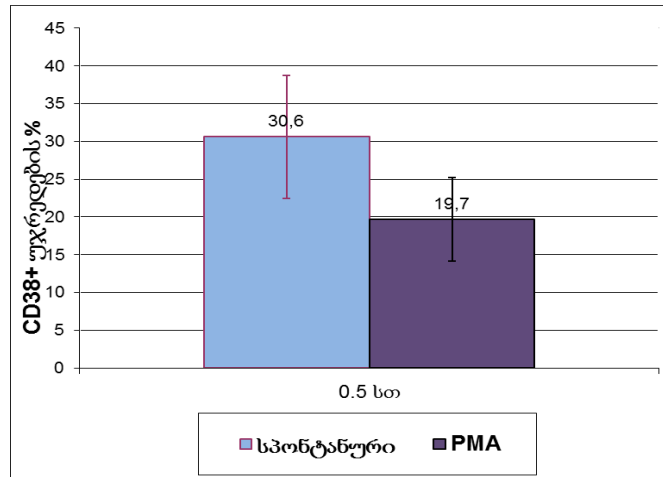
სურათი 7. უჯრედული ციკლის ფაზებში უჯრედების გადანაწილების შეფასება

ამავე დროს, როგორც დადგინდა უჯრედული ციკლის ფაზებში უჯრედების გადანაწილების შესწავლისას, მიტოგენზე საპასუხოდ არ შეინიშნებოდა უჯრედების პროლიფერაციის მომატება (უჯრედების % S ფაზაში: სპონტ. 5 ± 0.7 ; სტიმ. 3.25 ± 0.5 ; უჯრედების % G₂/M ფაზაში: სპონტ. 2 ± 0.6 ; სტიმ. 1.9 ± 0.5) (სურ.7). იმ დროს, როცა ჩვეულებრივად ნორმალური ლიმფოციტები ფმა-ით სტიმულაციაზე ინტენსიური პროლიფერაციით პასუხობენ.



სურათი 8. აპოპტოზის ადრეულ სტადიებზე მყოფი უჯრედების პროცენტული მაჩვენებელი

ასევე აღსანიშნავია, რომ ფმა-ით სტიმულაციის შემდგომ არ დაფიქსირდა აქტივაციური მარკერის CD38-ის ზედაპირულ ექსპრესიის მომატებაც კონტროლთან შედარებით (CD38⁺ უჯრედების % სპონტანურ კულტურაში: 30.6±8.1; სტიმ. 19.7±5.5) (სურ.9), რაც ასევე არ შეესაბამება ნორმალური ლიმფოციტების შემთხვევაში ნაჩვენებ სურათს, როცა ფმა-ით სტიმულაციის შემდგომ ხდება მკვეთრი მომატება ყველა აქტივაციური მარკერის.

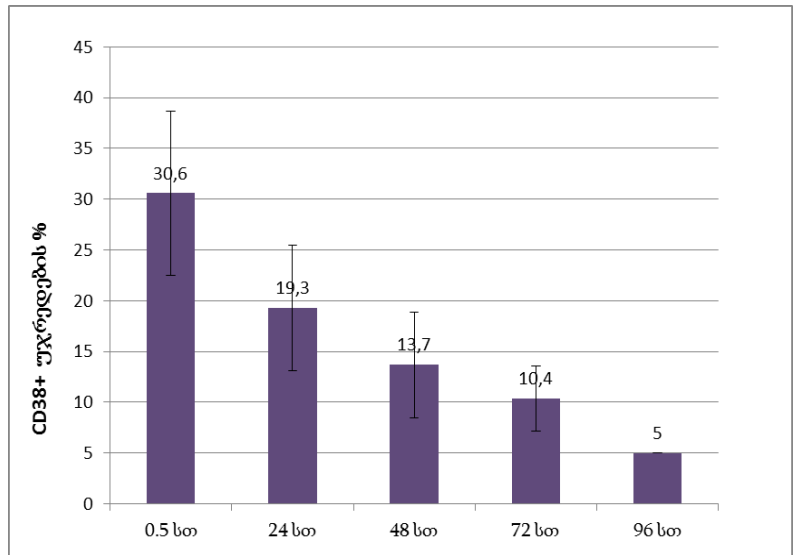


სურათი 9. CD38⁺ უჯრედების პროცენტული ცვლილება PMA-ით სტიმულაციის შემდეგ

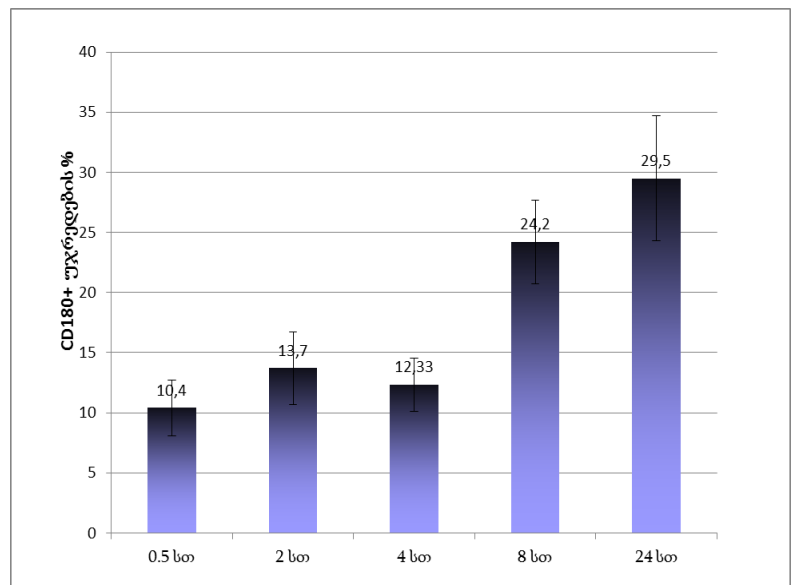
სპონტანურ კულტურაში CD38-ის ექსპრესია მაქსიმალურ დონეს აღწევდა გადათესვიდან 0.5 სთ შემდგომ (30.6±8.1%) (სურ.10), ხოლო დროის მოგვიანებით წერტილებში (24 სთ, 48სთ, 72 სთ, 96 სთ) კლებულობდა და 96 საათისთვის საბოლოოდ მხოლოდ 5%-ს შეადგენდა (5±0.01) (სურ.10). სპონტანურ კულტურაში ასევე შესწავლილ იქნა CD180-ის ექსპრესიის პროფილი 0.5 -24 სთ ინტერვალში. დადგინდა, რომ CD180-ის ზედაპირული ექსპრესია გადათესვიდან 8 სთ-ის შემდეგ იწყებდა მომატებას(CD180⁺ უჯრედების %: 0.5 სთ - 10.4±2.3; 8სთ - 24.2±3.5, p<0.05) (სურ.11) და აღწევდა მაქსიმუმს 24 საათისთვის (29.5±5.2, p<0.05). B უჯრედული რეცეპტორის სასიგნალო გზის ნეგატიური რეგულატორის - CD32-ის ზედაპირული ექსპრესია დროის ამ წერტილში, პირიქით დაბალი აღმოჩნდა (11±3.8%) და მაქსიმუმს აღწევდა გადათესვიდან 96 საათის შემდგომ (36±1.3%)(სურ.12).

ამგვარად, მიღებული მონაცემების თანახმად, MEC1 უჯრედები სპონტანურ კულტურაშიც იმყოფებიან ნაწილობრივად აქტივირებულ მდგომარეობაში (CD38-ის

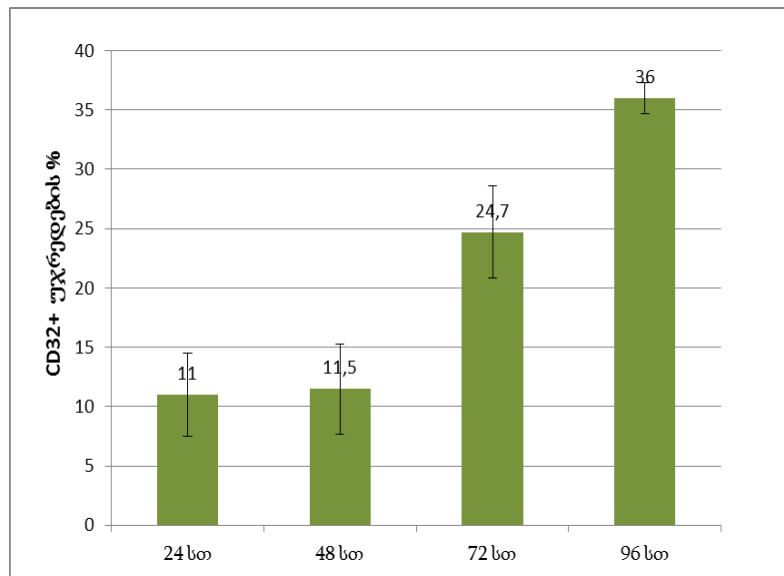
მაქსპრესირებელი უჯრედების პროცენტი $30.6 \pm 8.1\%$ აღწევს) და მიტოგენით სტიმულაციის საპასუხოდ ამ უჯრედებში ვითარდება არა მოსალოდნელი პროლიფერაცია/აქტივაცია, არამედ, პოპულაციის ნაწილი ე.წ. აქტივაციით-ინდუცირებული კვდომას განიცდის, უმეტესი ნაწილი კი ანერგიული რჩება მიტოგენური სიგნალის მიმართ.



სურათი 10. CD38+ უჯრედების რაოდენობის პროცენტული ცვლილება სპონტანურ კულტურაში



სურათი 11. CD180+ უჯრედების რაოდენობის პროცენტული ცვლილება სპონტანურ კულტურაში



სურათი 12. CD32+ უჯრედების რაოდენობის პროცენტული ცვლილება სპონტანურ კულტურაში

MEC1 უჯრედული ხაზი წარმოადგენს მუტირებული IGVH გენების მქონე „არამორეაგირე“ ქლლ კლონის მოდელს, ლიტერატურაში არსებული [Muzio et al., 2008] მონაცემებით, დაავადებულთა სისხლიდან გამოყოფილი „არამორეაგირე“ ქლლ კლონების შემთხვევაში, ნაჩვენები იყო მიტოგენური სიგანალით უჯრედების აქტივაციის შესაძლებლობა, რადგანაც მიტოგენით გამოწვეული სტიმულაცია არ არის დამოკიდებული B უჯრედული რეცეპტორის სასიგნალო გზაზე. შესაბამისად, ჩვენი ვარაუდით, მსგავს სურათს ველოდებით MEC1 უჯრედებშიც, ამ დროს დადგინდა ამ უჯრედული ხაზის ანერგია მიტოგენური სტიმულის მიმართაც. აღსანიშნავია, რომ აღწერილი ანერგიის ფონზე, მიტოგენის საპასუხოდ გარკვეული დაგვიანებით (24 სთ-ში) შეინიშნებოდა ცვლილება რეცეპტორულ პროფილში, კერძოდ მკვეთრად მატულობდა CD180-ის ზედაპირული ექსპრესია. MEC1 უჯრედებში ნაჩვენები B უჯრედული რეცეპტორის ანერგიის და ასევე CD180-ის და B უჯრედული რეცეპტორის სასიგნალო გზების კავშირის გათვალისწინებით აღნიშნული ფაქტი მიუთითებს იმაზე, რომ ამ ორი რეცეპტორული კომპლექსის რეგულაცია ნაწილობრივად ერთმანეთისგან დამოუკიდებლად მიმდინარეობს. როგორც ზემოთ ავღნიშნეთ, MEC1 უჯრედული ხაზი

წარმოადგენს მუტირებული IGVH გენზის მქონე „არამორეაგირე“ ქლლ კლონის მოდელს, შესაბამისად ამ მოდელისთვის ვაჩვენეთ, რომ გარე სტიმულს შეუძლია ამ „არამორეაგირე“ კლონში CD180-ის დონის მოდულირება. მიღებული მონაცემები დაგვეხმარება ქლლ „არამორეაგირე“ კლონების ანერგიის ფენომენის და ასევე ქლლ-ის პათოგენეზში CD180-ის როლის შესწავლაში.

დასკვნა:

1. მიტოგენით სტიმულაცია იწვევს CD180-ის ექსპრესიის მომატებას
2. მიტოგენით სტიმულირებისას MEC1 უჯრედებში არ ვითარდება არც პროლიფერაციული არც აქტივაციური პასუხი
3. მიტოგენური სტიმულაციის საპასუხოდ MEC1 უჯრედების ნაწილი განიცდის სწრაფ აქტივაცია - ინდუცირებულ კვდომას
4. MEC1 უჯრედების გადათესვა იწვევს ამ უჯრედების ძლიერ აქტივაციას
5. MEC1 უჯრედების ფენოტიპური პროფილი სტაბილური არ არის და ცვალებადობს დროში

გამოყენებული ლიტერატურა:

1. Ghia P, Ferreri AM, Galigaris-Cappio F. (2007) *Crit Rev Oncol Hematol*, **64**, 234–246.
2. Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. (2008) *J Int Med*, **264**, 549–562.
3. Valentine M.A, Clark E.A, Shu G.L, et al (1988) *J Immunol*, **140**, 4071–4078.
4. Porakishvili N., Kulikova N., Jewell A.P. et al. (2005) . *Br J Haematol*, **131**, 313-319
5. Porakishvili N, Memon A, Vispute K, et al (2011) *Br J Haematol*, **153(4)**, 486-98.
6. Ricciardi M.R., Petrucci M.T., Gregorj C., et al. (2001) *Br J Haematol*, **113**, 391–399
7. Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, et al (2008) *Blood*, **112**, 188–195.
8. Ormerod MG, (2002) *J ImmunMethods*, **265**, 73–80;
9. Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, et al.(2007) *MayoClin Proc* **82(4)**:449–53
10. Martin F, Kearney JF. (2001) *Curr Opin Immunol*, **13(2)**: 195-201
11. Porakishvili N; Kulikova N; Manoussaka M; Jevell A.P. et al. (2004) *Blood*, **104**, 768a (abstract)
12. Hamblin T.J. Davis Z. Gardiner A. Oscier D.G. Stevenson F.K. (1999) *Blood*, **94**, 1848-1854
13. Jurlander J.et al. (1998) *Crit Rev Oncol Hematol*27, 29-52
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. Swerdlow SH , et al. (2008) *WHO Class Tum Haem And Lym Tiss*, 4th ed.
17. Chiorazzi N, Rai KR, Ferraini M. (2005) *N Engl Med*, **358(8)**:804-815
18. Dohner H, et al. (2000) *N Engl Med*, **343(26)**:1910-1916
19. Caporaso N, et al. (2007) *Br J Haematol*, **139(5)**:630-634
20. Bieging KT, Attardi LD. (2012) *Trends Cell Biol*, **22(2)**:97-106
21. Chiaretti S, et al. (2011) *Gene Chromosomes Cancer*, **50(4)**:263-274
22. Chiorazzi N, M. D. Kanti R. Rai , M.B. and Manlio Ferrarini M.D. (2005) *The New England journal of Medicine*
23. Gerondakis S, Grumont RJ, Banerjee A, (2007) *Immunol Cell Biol.*, **85**,471-475
24. Dal Porto JM, Gauld SB, Merrell KT, et al. (2004) *Mol Cell*, **41**:599-613
25. Richards S, Clark EA. (2007) *Keystone Symposia*, **358**:10

26. Richards S, Watanabe C, Lorna S, et al. (2008) *Immunol Rev*, **224**:183-200
27. Del Nagro CJ, Otero DC, Anzelon AN, et al. (2005) *Immunol Res*, **31**:119-131
28. Grumont RJ, Strasser A, Gerondakis S. (2002) *Moll Cell*, **10**:1283-1294
29. Dowler S, Currie RA, Downes CP, et al. (1999) *Biochem*, **342**:7-12
30. Marshall AJ, Krahn AK, Ma K, et al. (2002) *Mol Cell Biol.*, **22**:5479-5491
31. Niiro H, Maeda A, Kurosaki T, et al. (2002) *J Exp Med*, **195**:143-149
32. Allam A, Niiro H, Clark Ea, et al. (2004) *J Biol Chem*, **279**:39775-39782
33. Han A, Saijo K, Mecklenbrauker I, et al. (2003) *Immunity*, **19**:621-632
34. Fournier E, et al. (2003) *Curr Biol*, **13**:1858-1866
35. Marshall AJ, Zhang T, Al-Alwan M. (2007) *Biochem Soc Trans*, **35**:181-182
36. Clark EA, Richards S, Santos L. (2007) *Keystone Symposia*, **173**:77
37. Meng TC, Fukada T, Tonks NK. (2002) *Mol Cell*, **9**:387-399
38. Sumimoto H, Miyano K, Takeya R. (2005) *Biochem Biophys Res Com*, **338**:677-686
39. Singh DK, Kumar D, Siddiqui Z, et al. (2005) *Cell*, **121**:281-293
40. Chiorazzi N, M. D. Kanti R. Rai, M.B. and Manlio Ferrarini M.D. (2005) *The New England journal of Medicine*
41. Fruman DA (2004) *Curr. Opin. Immunol.*, **16(3)**:314-20
42. Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. (2003) *Nat. Rev. Immunol.*, **3(4)**:317-30
43. Donahue AC, Fruman DA. (2004) *Semin Cell Dev. Biol.*, **15(2)**,183-97
44. Hebeis B, Vigorito E, Kovesdi D, et al. (2005) *Blood*, **106(2)**:635-40
45. Otero DC, Omori SA, Rickert RCJ. (2001) *Biol. Chem*, **276(2)**:1474-8
46. Tybulewicz VL. (2004) *Eur. J. Immunol.*, **34(11)**:2964-7
47. Decker SJ, Saltiel AR. (2005) *NAT.MED.*, **11(2)**:123-4
48. Marshall AJ, Krahn AK, Ma K, et al. (2002) *Cell Biol.*, **22(15)**:5479-91
49. Hess KL, Donahue AC, Ng KL, et al. (2004) *Immunol.*, **34(11)**:2968-76
50. Jou ST, Carpino N, Takahashi Y, et al. (2002) *Cell Biol.*, **22(24)**:8580-91
51. Kharas MG, Deane JA, Wong S, et al. (2004) *Blood* **103(11)**:4268-75
52. Stauffer F, Holzer P, Garcia-Echeverria C. (2005) *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents* **5(5)**:449-62

53. Nagai Y, Shimazu R, Ogata H, et al. (2002) *Blood*, **99**:1699-1705
54. Porakishvili N, Memon A, Vispute K, et al (2011) *Br J Haematol*, **153**(4), 486-98
55. Porakishvili N., Kulikova N., Jewell A.P. et al. (2005) . *Br J Haematol*, 131, 313-319
56. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohibaum AM, et al. (2002) *Nature*, **416**: 603-607
57. Michael J. Keating, Chiorazzi N, Messmer B, et al. (2003) *Hem American Soc Hem Educ Progr*, **1**: 153-175
58. Fujimoto M, Fujimoto Y, Poe JC, et al. (2002) *Immunity*, **13**:47-57
59. Stacchini A, Aragno M, Vallario A, et al. (1999) *Leuk Res.*, **23**, 127-136