ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ნათია ხარაზაძე

5-აზაციტიდინისა და ლენალიდომიდის იმუნოლოგიური ეფექტების შესწავლა ანტისიმსივნურ იმუნურ პასუხში მონაწილე ეფექტორულ უჯრედებზე

ბიოლოგია

სამაგისტრო ნაშრომი შესრულებულია ბიოლოგიის მაგისტრის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

სამაგისტრო ნაშრომის ხელმძღვანელი: ბ. მ. დ. ნუნუ მიცკევიჩი

თბილისი 2016

ანოტაცია

პროსტატის სიმსივნე ერთ-ერთი გავრცელებული სიმსივნეა მამაკაცებში და სიკვდილიანობის მიხედვით მეორე ადგილზეა სტატისტიკური მონაცემებით მიუხედავად არსებული მკურნალობის მეთოდებისა, მაინც ვერ ხერხდება სიმსივნის წინააღმდეგ ეგეფექტური ბრძოლა, რაც კარგად აისახება სტატისტიკურ მონაცემებში.

თანამედროვე მეთოდს წარმოადგენს სიმსივნეზე ისეთი იმუნოთერაპიული საშუალებებით ზემოქმედება, როგორებიცაა 5-აზაციტიდინი და ლენალიდომიდი. ჩვენი მიზანია ლენალიდომიდისა და 5-აზაციტიდინის, როგორც ცალკეული,ასევე კომბინირებული ეფექტის შესწავლა ანტისიმსივნურ ეფექტორულ უჯრედებზე. არსებული ლიტერატურული მონაცემებით, ლენალიდომიდითა და 5-აზაციტიდინით კომბინირებული თერაპიის ერთადერთი გამოყენება ნანახია ჰემატოლოგიური ონკოლოგიური პათოლოგიების დროს. არაჰემატოლოგიური სიმსივნეების თერაპიაში ამ კომბინაციის გამოყენების მონაცემები არ არის. ჩვენი კვლევა ამ მხრივ სიახლეს წარმოადგენს პროსტატის ავთვისებიან სიმსივნის იმუნოთერაპიულ მოდულაციაში.

პროექტის ფარგლებში ჩვენ შევისწავლით იმუნოთერაპიული წამლების მოქმედებას სიმსივნეზე და ასევე მათ გავლევას იმუნურ სისტემაზე. იმუნურმა სისტემამ უნდა აღიქვას სიმსივნური უჯრედი და მის წინააღმდეგ უნდა განახორციელოს იმუნური პასუხი, მაგრამ სიმსივნურ უჯრედებს გააჩნიათ იმუნური ზედამხედველობისგან თავისარიდების უნარი. შესაბამისად, 5-აზაციტიდინისა და ლენალიდომიდის მოქმედებით უნდა გაძლიერდეს იმუნური პასუხი. კვლევის ფარგლებში შესწავლილი იქნება ეფექტორული უჯრედების (T ციტოტოქსიკური უჯრედის, NK უჯრედისა და NKTუჯრედის) მოქმედება, რამდენად გაძლიერდება მათი ეფექტურობა იმუნოთერაპიული საშუალებების მკურნალობის შედეგად.

თაგვებზე იმუნოთერაპული საშუალებებით კომბინირებული ზემოქმედების შემდეგ სასურველი პასუხის მიიღების შემთხვევაში შესაძლებებლია ვივარაუდოთ, რომ იგივე კომბინაცია გამართლებული იქნება ადამიანში პროსტატის სიმსივნის სამკურნალოდ.

Annotation

Prostate cancer is one of the common cancer among men and takes second place by mortality rates as statistics show. Despite the wide range of existing treatment methods cancer could not be defeated, which is well reflected in the statistics.

One of the new treatment modalities is immunotherapy impact on cancer with 5-Azacytidine and Lenalydomine. Our goal is to study separate and combined effects of 5-Azacytidine and Lenalydomine on cancer cells; description of dose dependence of these 2 medicines upon combined immunotherapy. According to the existing literature, use of combined therapy with 5-Azacytidine and Lenalydomine was reviewed only during hematological pathologies. there is no information about the usage of this combination during non-hematological cancers; in this regard our research is a novelty in malignant prostate cancer treatment with immunotherapy modulation. If the favorable result is obtained after combined impact of immunotherapy preparations in mice we will be able to assume that the same combination will be appropriate in human as well, in order to defeat prostate cancer.

Within the project, we study the effect of tumor immunotherapy drugs and their effect on the immune system. Immune system should perceive the tumor cells and generate the immune response, but cancer cells have the ability to evade immune surveillance. In accordance with 5-azatsitidinisa lenalidomidi and actions need to strengthen the immune response. Within the research we study effector cells (T cytotoxic cells, NK cells and NKT cells) and their actions, how to strengthen the effectiveness of immunotherapy treatments.

The combined impact of the desired response in mice with immunotherapy suggests that the combination would be justified in people with prostate cancer.

შინაარსი

თავი 1 შესავალი

1.1 პრობლემის აქტუალობა, კვლევის მიზანი და ამოცანები 5

1.2 კვლევის მიზანი 10

1.3 კვლევის ამოცანა 10

თავი 2 ლიტერატურის მიმოხილვა 11

2.1 ანტისიმსივნური იმუნური პასუხი და მონაწილე ეფექტორული უჯრედების დახასიათება 11

2.1.1 NK უჯრედების ზოგადი დახასიათება 17

2.1 2 T უჯრედების ზოგადი დახასიათება 18

2.1.3 NKT უჯრედების ზოგადი დახასიათება 19

2.2 გამდინარე ციტომეტრიის მიმოხილვა 20

2.3 ცხოველური მოდელების გამოყენება სიმსივნეების ექსპერიმენტულ კვლევებში 24

თავი 3 კვლევის ობიექტი და მეთოდები 25

3.1 კვლევის ობიექტი 25

3. 2 კვლევის მეთოდები 26

3.2.1 In vivo RM1 უჯრედების შეყვანა და სიმსივნის მოდელის შექმნა 26

3.2.2 თაგვის ელენთი და საკვლევი უჯრედების გამოყოფა 26

3. 3გამდინარე ციტომეტრია 26

თავი 4კვლევის შედეგები და მათი განხილვა 27

თავი 5დასკვნები 31

გამოყენებული ლიტერატურა 32

შესავალი

1.1 პრობლემის აქტუალობა, კვლევის მიზანი და ამოცანები

ამერიკის ეროვნული ბიოტექნოლოგიის საინფორმაციო ცენტრის (NCBI) მონაცემებით 2016 წელს 1 მილიონზე მეტი სიმსივნის ახალი შემთხვევა დაფიქსირდა და გარდაიცვალა 500 000-ზე მეტი ადამიანი მხოლოდ აშშ-ში.ეს რიცხვები უფრო მზარდია თუ მსოფლიოს სხვადასხვა ქვეყნის მონაცემებს დავაჯამებთ.(1)

სიმსივნე არის არანორმალური ქსოვილოვანი მასა,რომლის ზრდის სიჩქარა განსხვავდება ნორმალური ქსოვილოვანი ზრდისგან. ხდება უჯრედების არაკონტროლირებადი ზრდა. თავდაპირველად ერთი უჯრედი გარკვეული მიზეზების გამო სიმსივნურ უჯრედად ტრანსფორმირდება.

სიმსივნური უჯრედების გამოცნობა და განადგურება ხდება იმუნური სისტემის მიერ . სიმსივნის წინააღმდეგ იმუნური პასუხის არსებობა 1943 წელს გროსმა აღმოაჩინა, რომელმაც იმუნოკომპეტენტურ სინგენურ თაგვებს კანში შეუყვანა სიმსივნური უჯრედები. წარმოიქმნა კვანძები, მაგრამ გარკვეული პერიოდის შემდეგ რეგრესირდა. სიმსივნური უჯრედების განმეორებითი შეყვანის შემდეგ, თაგვებში სიმსივნე აღარ წარმოიქმნა. აღნიშნული შედეგები ახსნეს, როგორც სიმსივნის საწინააღმდეგო იმუნური პასუხის განვითარება .(2)

სიმსივნის წინააღმდეგ განხორციელებული იმუნური პასუხი უნდა იყოს ეფექტური, რადგან სიმსივნური უჯრედები იზრდებიან სწრაფად და უნდა მოხდეს მათი განადგურება. სიმსივნის საწინაარმდეგო დაცვაში მნიშვნელოვანი ადგილი უკავია ეფექტორულ უჯრედებს,როგორიცაა T, NK და NKT უჯრედები.

სიმსივნის წინააღმდეგ ბრძოლა მიმდინარეობს სხვადასხვა საშუალებებით, როგორიცაა ქიმიოთერაპია, სხივური თერაპია, რადიოთერაპია. განსხვავებით ჩამოთვლილთაგან შედარებით ახალი მიდგომაა იმუნოთერაპია, რომელიც გულისხმობს ისეთ მკურნალობას, რომელიც იყენებს ორგანიზმის იმუნური სისტემის გარკვეულ ნაწილებს სიმსივნის წინააღმდეგ. ეს მიიღწევა რამდენიმე გზით: საკუთარი იმუნური სისტემის სტიმულაცია და იმუნური სისტემისათვის ისეთი კომპონენტების მიწოდება, რომელიც აღძრავს იმუნურ პასუხს.

იმუნოთერაპია ეფუძნება იმუნოლოგიურ მიდგომას. იმუნურ სისტემას შეუძლია დაიცვას ცოცხალი ორგანიზმი სიმსივნური უჯრედებისგან. ნებისმიერი ნივთიერებას, თუ კი აღქმული იქნება იმუნური სისტემის მიერ უცხოდ, შესწევს უნარი გაანადგუროს იგი. სწორედ ასე შეგვიძლია წარმოვიდგინოთ სიმსვნის შემთხვევაშიც. სხვა სიტყვებით რომ ვთქვათ, თუ იმუნური სისტემა სიმსივნეს აღიქვამს, როგორც უცხოს, ანუ ორგანიზისთვის არადამახასიათებელს, მაშინ უნდა განავითაროს იმუნური პასუხი ტრანსფორმირებული უჯრედის წინააღმდეგ და გაანადგუროს იგი. ცხადია, არსებობს შეზღუდვები იმუნური სისტემის მიერ, როცა არ ან ვერ ხდება სიმსივნური უჯრედების აღქმა და შესაბამისად მასთან ბრძოლა. აქვე ვიტყვი იმასაც, რომ შესაძლებელია აღიქვას იმუნურმა სისტემამ სიმსვნური უჯრედები, მაგრამ მის წინააღმდეგ განხორციელებული პასუხი არ იყოს იმდენად ძლიერი, რომ მოხდეს მისი განადგურება. დღესდღეობით აქტიურად მიმდინარებს კვლევები, რათა იმუნურმა სისტემამ აღიქვას სიმსივნური უჯრედი და აღძრას მის წინააღმდეგ სათანადო სიძლიერის პასუხი. ბოლო ათწლეულების განმავლობაში იმუნოთერაპია უფრო და უფრო მნიშვნელოვანი ხდება სიმსივნის წინააღმდეგ მკურნალობაში. (3)

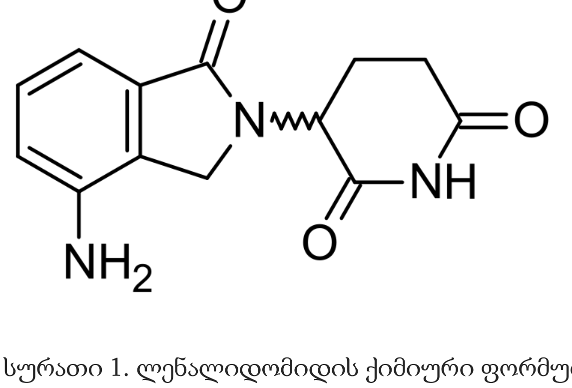
სიმსივნის წინააღმეგ იმუნოთერაპია მოიცავს შემდეგ ტიპებს:

- მონოკლონური ანტისხეულები - ორგანიზმის იმუნურ სისტემას აქვს უნარი, წარმოქმნას ანტისხეული თუკი აღმოაჩენს რაიმე საზიანოს. ანტისხეული არის ცილა, რომელიც იბრძვის ინფექციის, ამ შემთხვევაში სიმსივნის წინააღმდეგ. მონოკლონური ანტისხეულები შექმნილია ლაბორატორიაში და ისინი განკუთვნილნი არიან სიმსივნური უჯრედების კონკრეტული ცილებისთვის. აღნიშნული იმუნოთერაპიის ტიპი უაღრესად სპეციფიკურია.
- სიმსივნის ვაქცინები - არის ორი სახის: პრევენციული და სამკურნალო ვაქცინები. პრევენციული ვაქცინები გამოიყენება იმ შემთხვევაში, თუ ადამიანს არ აქვს სიმსივნე, მაგრამ არსებობს იმის პოტენციალი რომ ახლო მომავალში დაავადდეს. მაგალითად, თუ ადამიანს აქვს პაპილომავირუსი (HPV) არსებობს იმის შანსი, რომ დაემართოთ საშვილოსნოს კიბო ან სხვა ტიპის სიმსივნე. ასეთ შემთხვევაში მიმართავენ პრევენციულ ვაქცინებს, რაც შეეხება სამკურნალო ვაქცინებს, გამოიყენება სიმსივნური უჯრედების გასანადგურებლად, ასევე პრევენციის მიზნით, რათა სიმსივნე თავიდან აღარ განვითარდეს, მთლიანად აღმოიფხვრას

მკურნალობის შედეგად დარჩენილი სიმსივნური უჯრედი, ან შეწყვიტოს სიმსივნურმა უჯრედმა ზრდა.

- არასპეციპიკური იმუნოთერაპია - ასევე ეხმარება იმუნურ სისტემას სიმსივნური უჯრედების განადგურებაში. ძირითადად გამოიყენება ინტერფერონები და ინტერლეიკინები. ინტერფერონები ეხმარება იმუნურ სისტემას სიმსივნის წინაარმდეგ ბრძოლაში და ანელებს სიმსივნური უჯრედების ზრდას. რაც შეეხება ინტერლეიკინებს, ისინი ეხმარებიან იმუნურ სისტემას აწარმოონ ისეთი უჯრედები, რომლებიც გაანადგურებენ სიმსივნეს.
- ონკოლიტური ვირუსული თერაპია- იმუნოთერაპიის ახალი ტიპია, როდესაც გამოიყენება გენეტიკურად მოდიფიცირებული ვირუსი სიმსივნის მოსაკლავად. ასეთი ვირუსი მიგრირებს სიმსივნიან უჯრედში და აკეთებს საკუთარი თავის ასლებს. საბოლოოდ უჯრედი კვდება, რასაც მოსდევს სიმსივნური ანტიგენების გამოთავისუფლება. შედეგად იმუნური სისტემა თავს ესხმის ყველა სიმსივნიან უჯრედებს, რომლებსაც აქვთ იგივე ანტიგენები. ვირუსით არ ინფიცირდებაჯანსაღი უჯრედები, შესაბამისად ჯანსაღი უჯრედების განადგურება არ მოხდება. [5]

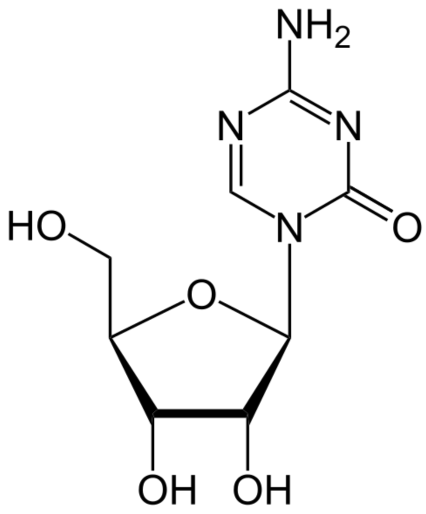
ბოლო წლების კვლევებში საკმაოდ ხშირად გამოიყენება ანტისიმსივნური იმუნური პასუხის ეპიგენეტიკური მოდულაცია სხვადასხვა სამკურნალო საშუალებების გამოყენებით.მათი მოქმედების მექანიზმის ბიოლოგიური საფუძვლები კარგად არ არის შესწავლილი, მაგრამ ფაქტია , რომ ეფექტურად მოქმედებენ სიმსივნის წინააღმდეგ. ჩვენს კვლევაში გამოყენებული 5-აზაციტიდინისა და ლენალიდომიდის მოქმედების შედეგად, როგორც ცალ-ცალკე, ისე კომბინირებულად, უნდა მოხდეს იმუნური პასუხის გაძლიერება და შესაბამისად გაიზრდება განხორციელებულიიმუნური პასუხის ანტისიმსივნური ეფექტურობა.



სურათი 1. ლენალიდომიდის ქიმიური ფორმულა [6]

ლენალიდომიდი (სურ. 1) მიეკუთვნება თალიდომიდის ჯგუფს. იგი ბოლო 10 წელია ფართოდ გამოიყენება ანთებითი დაავადებების და სიმსივნის დროს. მისი მოქმედების ეფექტურობა ნანახია, როგორც in vivo, ისე in vitro კვლევებში. in vitro ლენალიდომიდს აქვს 3 ძირითადი მოქმედება: პირდაპირი ანტისიმისვნური ეფექტი, ანგიოგენეზის დათრგუნვა და იმუნომოდულატორის როლი. In vivo, ლენალიდომიდი იწვევს სიმსივნური უჯრედების პირდაპირ და არაპირდაპირ აპოპტოზს, ანტიანგიოგენეზს და იმუნომოდულატორულ აქტივობას [6] . ლენალიდომიდს შეუძლია ციტოკინების მოდულაცია და T უჯრედების კოსტიმულაცია. მოგვიანებით ნაჩვენები იქნა ამ უჯრედების გავლენით NK უჯრედების აქტივაცია. კარგად არის შესწავლილი T უჯრედების კოსტიმულაცია, რომლის დროსაც გაიზარდა ინტერლეიკინ 2 (IL-2) სინთეზი, როგორც $CD4^{+}$ T , ისე $CD8^{+}$ T უჯრედების მიერ.[7]რომ შევაჯამოთ, ლენალიდომიდი ხასიათდება იმუნომოდულატორული და ანტიანგიოგენური თვისებებით, შეუძლია ციტოკინების პროდუქცია და T უჯრედების აქტივაცია, ზრდის NK უჯრედების ფუნქციის ეფექტურობას. [8]

5-აზაციტიდინი (სურ.2) წარმოადგენს ციტიდინის ქიმიურ ანალოგს. აზაციტიდინი და მისი წარმოებული (ცნობილია როგორც 5-აზა-2-დეოქსიციტიდინი) გამოიყენება, როგორც ქიმიოთერაპიული საშუალება კიბოს წინააღმდეგ. [9] 5-აზაციტიდინი ცნობილია, როგორც დნმ-ის დიმეთილატორი, რომელიც არეგულირებს გენის ექსპრესიას უჯრედებში. როდესაც არ ხდება დნმ-ის მეთილირება ჭარბად, იბლოკება სუპრესორული გენის აქტივაცია , რომელიც თავის მხრივ არეგულირებს უჯრედების ზრდასა და გაყოფას. თუ კი სუპრესორული გენები დაიბლოკირება უჯრედების გაყოფა მოხდება ყოველგვარი რეგულაციის გარეშე, რაც სიმსივნის განვითარების ხელის შემწყობი ხდება. 5-აზაციტიდინის ანტისიმსივნური ეფექტი ვლინდება სიმსივნის სუპრესორული გენების ნორმალური ფუქნციონირების აღდგენით და შესაბამისად აღდგება უჯრედების ზრდაზე კონტროლი.



სურათი 2. აზაციტიდინის ქიმიური ფორმულა [9]

5-აზაციტიდინი ასევე განეკუთვნება ანტიმეტაბოლიტებს. ანტიმეტაბოლიტი მსგავსია უჯრედული ნივთიერების და მარტივად ხდება მისი და უჯრედის ურთიერთქმედება. ერთვება რა მეტაბოლიზმში, ახორციელებს პირდაპირ ციტოტოქსიურ ეფექტს, რომელიც მიმართულია სიმსივნის წინააღმდეგ. [10]

5- აზაციტიდინიც და ლენალიდომიდიც აქტიურად გამოიყენება ცალ-ცალკე სიმსივნის მკურნალობისას სხვადასხვა თერაპიულ საშუალებებთან ერთად და საკმაოდ ეფექტურადაც. საინტერესოა მათი გამოყენება კომბინირებულად პროსტატის სიმსივნის შეთხვევაში. აქვე უნდა აღინიშნოს ისიც, რომ ოპტიმალური დოზის შერჩევა ორივე მედიკამენტის შემთხვევაში არის აუცილებელი, რადგან გადაჭარბებულმა დოზამ შესაძლებელია არასასურველი შედეგები გამოიწვიოს. 5-აზაციტიდინისა და ლენალიდომიდის კომბინირებულმა გამოყენებამ კარგი შედეგი აჩვენა მიელოდისპლაზიური სინდრომის დროს. [11] მათი გამოყენება შესაძლებელია ორგანოს მკვრივი კონსისტენციის სიმსივნის დროს კომბინირებულად.

ჩემი მიზანია, ვაჩვენო ამ ორი მედიკამენტის დადებითი როლი პროსტატის სიმსივნის შემთხვევაში, როგორც ინდივიდუალური, ისე კომბინირებული მოქმედების შემდეგ.

1.2 კვლევის მიზანი

5-აზაციტიდინისა და ლენალიდომიდის, როგორც კომბინირებული, ასევე განცალკავებული ზემოქმედებით აქტივირებული ეფექტორული უჯრედების მიერ განხორციელებული ანტისიმსივნური იმუნური პასუხი შეფასება.

1.3 კვლევის ამოცანები

კვლევის ამოცანას წარმოადგენს სიმსივნის გარზდა C57BL/6 ხაზის თაგვებში, რომელსაც მოვახდენ RM1 ჯრედების ინექციით კანქვეშ. შემდეგ თაგვში შემყავს ლენალიდომიდი და 5-აზაციტიდინი, საბოლოოდ კი ვახდენ თაგვის ევთანაზისა და ელენთის გამოყოფას, ელენთიდან კი ხდება ეფექტორული უჯრედების მიღება. საბოლოოდ, ვსაზღვრავ ეფექტორული უჯრედების რაოდენობრივ და ფუნქციურ მაჩვენებლებს იმუნოფლუორესცენტრული მეთოდის გამოყენებით, ასევე ვაფასებ ზედაპირული მარკერების ექსპრესიას:

- CD 314, NKG2A/C/E, CD49b, perforin - NK უჯრედები;
- CD314, CD3 - NKT უჯრედები;
- CD3, CD8– Tcუჯრედები.

2 . ლიტერატურის მიმოხილვა

2.1 ანტისიმსივნური იმუნური პასუხი და მონაწილე ეფექტორული უჯრედების დახასიათება

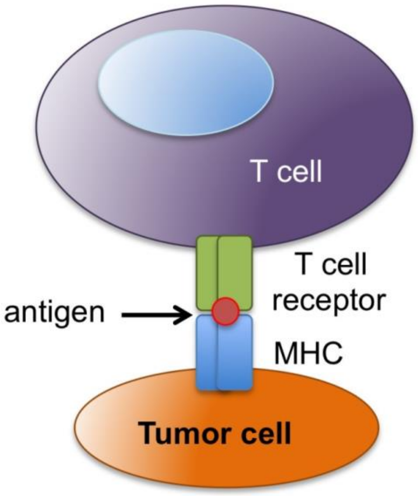
ანტისიმსივნური ზედამხედველობა ხორციელდება იმუნური სისტემის მიერ, რომელშიც მონაწილეობას ღებულობენ დენდრიტული უჯრედი, ნეიტროფილი, მაკროფაგი, ანტისხეული, კომპლემენტი, T ჰელპერი უჯრედი , Tციტოტოქსიკური უჯრედი, NK უჯრედი, NKT უჯრედი. იმისათვის რომ, იმუნურმა სისტემამ „დაინახოს" სიმსივნური უჯრედი, ამ უკანასკნელის ზედაპირზე უნდა მოხდეს სიმსივნური ანტიგენის ექსპრესია. სიმსივნის დროს მატულობს ასეთი ანტიგენების რაოდენობა, ან შენიღბულ მდომარეობაშია. სიმივნის ანტიგენებს წარმოადგენს:

1. სიმსივნე სპეციფიკური ანტიგენები, რომლებიც წერტილოვანი მუტაციის ან გენის რეარანჟირების შედეგად ჩნდება ;
2. ანტიგენები, რომელთა მაკოდირებელი გენები ნორმაში მხოლოდ ჩანასახოვან ან ემბრონალურ უჯრედებში ექსპრესირდება
3. მადიფერენცირებელი ანტიგენები , რომელთა მაკოდირებელი გენები მხოლოდ განსაზღვრული ტიპის ქსოვილებში ექსპრესირდება
4. ანტიგენები, რომელთა ექსპრესიის ხარისხი სიმსივნურ უჯრედებზე ნორმალურ უჯრედებთან შედარებით მნიშვნელოვნად მაღალია.
5. ანტიგენები, რომელთა პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციის შედეგად ჩნდება
6. ანტიგენები, რომელთაც ვირუსული ონკოგენები აკოდირებს.

ანტისიმსივნური იმუნური პასუხი ხორციელდება ჰუმორული და უჯრედული მექანიზმებით. ჩვენთვის საინტერესოა, თუ როგორ ხორციელდება ანტისიმსივნური პასუხი ეფექტორული უჯრედების (Tციტოტოქსიკური უჯრედი, NK უჯრედი, NKT უჯრედი) მიერ.

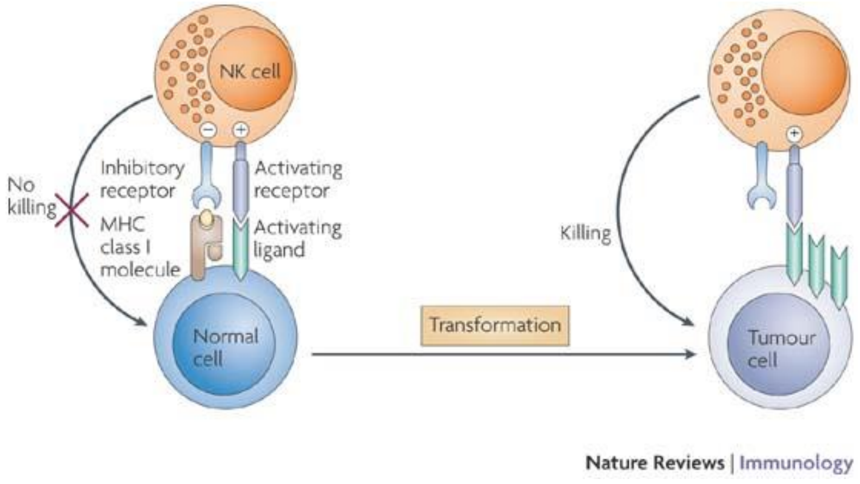
T ციტოტოქსიკური უჯრედი წარმოადგენს CD3 $^{+}$CD8^{+} T ორმაგ დადებით უჯრედს. ეს ორი მარკერი წარმოადგენს T ციტოტოქსიკური უჯრედის სადიაგოსტიკო მარკერებს. სიმსივნური უჯრედის წარდგენა სწორედ MHC I კლასის მეშვეობით ხორცილედება, რომელსაც CD8 მოლეკულა უკავშირდება. საბოლოოდ MHCI კლასის დაკავშირება ხდება TCR-თან , რომელიც CD3 ერთად წარმოქმნის T უჯრედულ

რეცეპტორის კომპლექსს. (სურ.3) CD3 $^{+}$CD8^{+} T უჯრედი ხასიათდება ციტოტოქსიკური აქტივობით, რაც გამოიხატება იმაში რომ ის შეიცავს პერფორინებსა და გრანზიმებს. მას შედემდეგ რაც მოხდება T უჯრედით სიმსივნური უჯრედის შეცნობა MHC I კლასის მეშვეობით, T ციტოტოქსიკური უჯრედი ახორციელებს ეფექტურ ფუნქციას და შიგთავსის მეშვეობით ანადგურებს სამიზნე უჯრედს.



სურ. 3 T ციტოტოქსიკური უჯრედის მიერ სიმსივნური უჯრედის შეცნობა.

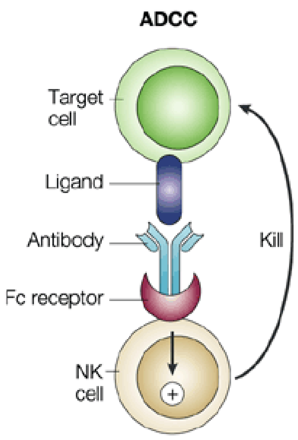
ანტისიმსივნურ იმუნურ პასუხში მონაწილე უჯრედებიდან პერფორინებითა და გრანზიმებით უჯრედის კვლას ეფექტურად ახორციელებენ NK უჯრედები, იგივე ნატურალური მკვლელი უჯრედები და NKT უჯრედები. განვიხილოთ ორივე მათგანი. ზოგიერთ შემთხვევაში სიმსივნე ემალება იმუნურ სისტემას, რაც გამოიხატება თუნდაც იმაში, რომ სიმსივნურ უჯრედზე აღარ ხდება MHC I კლასის ექსპრესია, შესაბამისად T ციტოტოქსიკური უჯრედები ვეღარ აღიქვამენ დაავადებულ უჯრედს და აღარ ხდება მის საწინააღმდეგო პასუხის აღძვრა. სწორედ ასეთ უჯრესებს უკავშირდება ნატურალური მკვლელი უჯრედი. NK შეიცნობს ისეთ უჯრედებს, რომლებსაც დაკარგული ან შეცვლილი აქვს MHC I კლასის მოლეკულა, საბოლოოდ უკავშირდება სამიზნე უჯრედს და პერფორინებისა და გრანზიმების მეშვეობით სიმსივნური უჯრედი ნადგურდება. (სურ.4)



სურ. 4 NK უჯრედის ეფექტორული ფუნქციის განხორციელება MHC I კლასის არ არსებობის შემთხვევაში.

რაც შეეხება NKT უჯრედს, CD1d მოლეკულის მიერ წარდგენილ სიმსივნურ უჯრედს გამოიცნობს. სამიზნე უჯრედის კვლას კი ეს უკანასკნელიც პეფორინებისა და გრანზიმების მეშვეობით ახორციელებს. საბოლოოდ კი უჯრედი იღუპება აპოპტოზით.

ეფექტორული უჯრედები სამიზნე უჯრედის კვლას ასევე ახდენენ ანტისხეულდამოკიდებული უჯრედული ციტოტოქსიკურობითაც (ADCC), რომელიც ხორციელდება შემდეგნაირად. პირვე ეტაპზე სიმსივნის ზედაპირზე ხდება სიმსივნის საწინააღმდეგო ანტისხეულის დაკავშირება, ეს უკანასკნელი კი უკავშირდება ისეთ ეფექტორულ უჯრედს რომლის ზედაპირზეც ანტისხეულის Fc-ფრაგმენტისადმი რეცეპტორებია ექსპრესირებული. საბოლოოდ კი ეფექტორული უჯრედიდან გამოყოფილი ნივთირებებით სიმსივნური უჯრედის განადგურება ხდება. [12] (სურ.5)



სურ.5 NK უჯრედის მიერ სამიზნე უჯრედის განადგურება ანტისხეულდამოკიდებული უჯრედული ცოტოტოქსიკურობით.

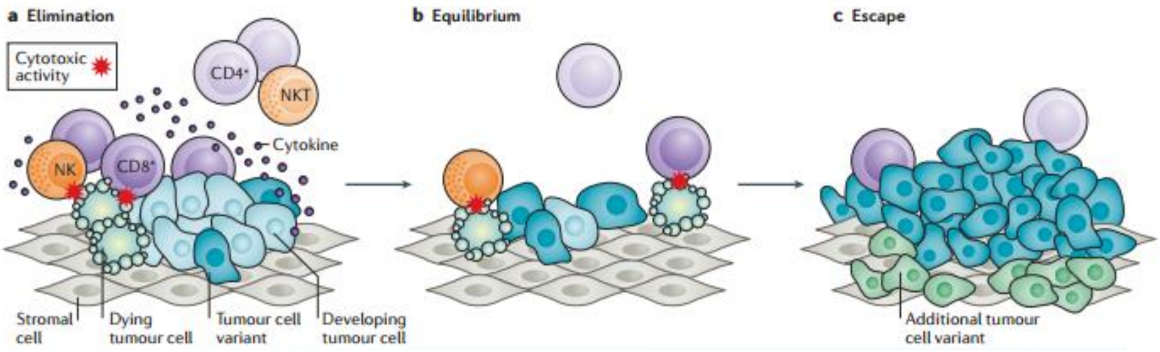
გარდა ზემოთ ჩამოთვლილი უჯრედებისა, ანტისიმსივნურ იმუნურ პასუხში მონაწილეობენ სხვა მოლეკულებიც, როგორიცაა CD314, NKG2A/C/F , CD49b.

CD 314, იგივე NKG2D ექსპრესირებულია როგორც T ციტოტოქსიკურ, ისე NK და NKT უჯრედებზე. ძირითადად NK უჯრედებზე მათი მოქმედება არის საყურადღებო, რადგან CD314 დიდ როლს თამაშობს ნატურალური მკვლელი უჯრედების აქტივაციასა და ინჰიბირებაში, გარდა ამისა ხელს უწყობს ანტისიმსივნური იმუნური პასუხის განვითარებას. CD314 ასოცირდება სასიგნალო მოლეკულებთან DAP10 და DAP13, სიგნალს გადასცემს PI3-კინაზასა და Syk-Zap70 სასიგნალო გზების მეშვეობით. CD314 თავის ლიგანდთან ერთად არეგულირებს ციტოტოქსიკურ პასუხს. [13]

NKG2A/C/E მიეკუთვნება NKG2 ოჯახს , რომელიც ექსპრესირდება როგორც NK უჯრედებზე, ისე T ციტოტოქსიკურ უჯრედებზე. NKG2A რეცეპტორი გადასცემს ინჰიბიტორულ სიგნალს, რის შედეგადაც NK უჯრედების აქტივაციის ინჰიბირება მოხდება. [14]

მიუხედავად იმისა, რომ იმუნური სისტემა ახორციელებს აქტიურ ზედამხედველობას ორგანიზმზე, მაინც ხდება სიმსივნის მიერ თავისი საწინააღმდეგო პასუხის აცლება, რაც დაკავშირებულია იმასთან, რომ სიმსივნესთან ასოცირებული ანტიგენები, რომლებიც საერთოა როგორს სიმივნური,ისე მასპინძელისთვის, საკუთარი ანტიგენის როლში გამოდის და შესაბამისად, ამ დროს სუსტ იმუნურ პასუხსაყალიბებს. ასეთი ანტიგენი სუსტი იმუნოგენია და საბოლოოს ვერ ყალიბდება ეფექტური იმუნური პასუხი. გარდა ამ მიზეზისა, სიმსივნური უჯრედის მიერ იმუნური ზედამხდველობის აცილების სხვა საშუალებებიც არრსებობს, მაგალითად ზოგი საერთოდ არ წარადგენს ანტიგენს, ზოგი კარგავს MHC I კლასს და უხილავი ხდება CD8 ციტოტოქსიკური უჯრედებისთვის, ან სიმსივნური უჯრედი დიდი რაოდენობით გამოჰყოფს სიმსივნურ ანტიგენს, რომელსაც სიმსივნის საწინააღმდეგო ანტისხეულები უკავშირდება, რაც უჯრედებთან ამ კავშირს აღკვეთს. [1]

სიმსივნისა და იმუნური სისტემის ურთიერთობა შეიძლება გამოვყოთ სამ ფაზად : ელიმინაცია, წონასწორობის აღდგენა და გაქცევა ე. წ immune-editing. (სურ. 6)

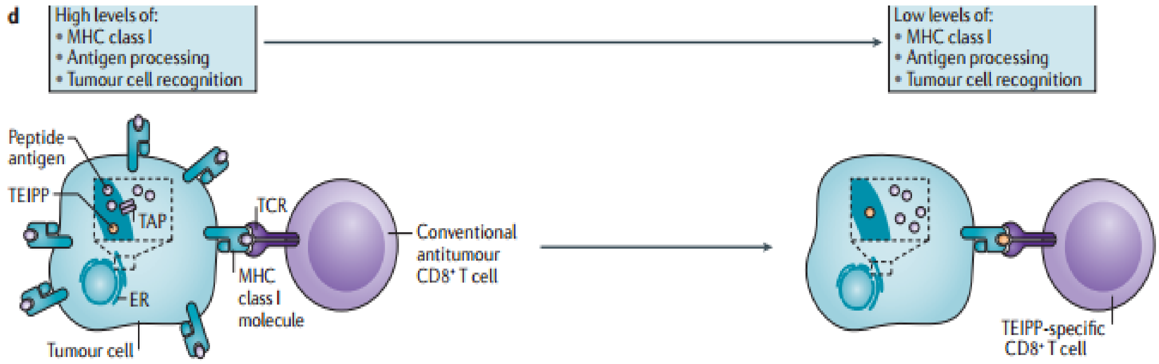


სურ. 6 სიმსივნესა და ინფილტრირებულ იმუნურ სისტემას შორის რთული ურთიერთობა, რომლის დროსაც გენეტიკური არასტაბილურობა და სიმსივნური არაერთგვაროვნება იზრდება და ხდება იმუნური სელექცია -I ფაზა (a). იმუნური სისტემის კომტროლი, რომლის შედეგიცაა სიმსივნური უჯრედის აღმოფხვრა - II ფაზა (b). წარმოიქნება სიმსივნური უჯრედების ვარიანტები, რათა მოხდეს მათი მოცულობაში ზრდა და გადაურჩეს იმუნურ შეტევას - ფაზა III. [15]

წონასწორობის აღდგენის ფასაზაში, იმუნური უჯრედებისა და კიბოს უჯრედების თანხვედრის (თანაარსებობის) დროს, სიმსივნურ უჯრედებში ხდება ცვლილებები, რათა ამ უკანასკნელმა თავიდან აიცილოს იმუნური კონტროლი. [16; 17] მექანიზმები, რომელთა მეშვეობითაც სიმსივნე ახერხებს თავი აარიდოს იმუნურ სისტემას, აქტიური შესწავლის საგანია და მოიცავს შიდაუჯრედულ (სიმსივნის) ისეთ ცვლილებებს, რომლების მიმართავს სიმსივნურ მიკროგარემოს ისე, რომ იმუნური სისტემის მიერ აღარ მოხდება ორგანიზმისთვის სასურველი პასუხის განვითარება. სიმსივნური უჯრედებშიდა მექანიზმებია:

- დეფექტები ჰისტოშეთავსებადობის კოპლექსის (MHC) I კლასის ცილებში (მაგ. MHC ლოკუსის დაკარვა გენეტიკური ცვლილებების გამო)
- ეპიგენეტიკური გაჩუმება იმ მექანიზმებისა, რომლებიც ანტიგენის პროცესიგნში მონაწილეობს (მაგ. ტრასპორტერთან ასოცირებული ანტიგენის პროცესიგნი (TAP) და ენდოპლაზმური ბადეში ამინოპეპტიდაზები (ERAPs))
  [18; 19]
- სიმსივნესთან ასოცირებული ანტიგენების დაკარგვა (მაგ. მელანომას უჯრედების დედიფერენციაცია) [20]
- მოსალოდნელი (Shedding) განგაშის ცილები (მაგ. NKG2D) [21]

- გაზრდილი რეზისტენტობა იმუნური უჯრედისადმი (მაგ. გაზრდილი ექსპრესია FLICE-მსგავსი ინჰიბიტორული ცილების) [22]
- ინჰიბიტორულ რეცეპტორებზე ლიგანდების ექსპრესია (მაგ. უჯრედში სიკვდილის ცილა 1 ლიგანდი 1 (PDL1); CD200 და ადამიანის ლეიკოციტების ანტიგენი E (HLA0E))



სურ. 7 პირველ ეტაპზე ხდება სიმსივნური უჯრედების ზედაპირზე MHC Iკლასის მაღალი რაოდენობით ექსპრესია. მათი ანტიგენების პროცესინგის მექანიზმები (APM) კვლავ უცვლელია და ადვილად გამოიცნობიან CD8 + Tუჯრედების მიერ, როგორც ჩვეულებრივი სიმსივნის ანტიგენები.გვიან ეტაპზე სიმსივნურ უჯრედებზე მცირდება MHC I კლასის ექსპრესია, რაც ასოცირდება ანგიგენის ნაკლებ პრეზენტაციასთან APM დეფექტების გამო. ამგვარად შემცირებულია სიმსივნური უჯრედების გამოცნობა და განადგურებაCD8+ T უჯრედების მიერ. ჩნდება სიმსივნური ანტიგენების ახალი ნაკრები, რომელიც ცნობილია T უჯრედის ეპიტოპში დაკავშირებულ პეპტიდის დარღვეულ პროცესინგთან (TEIPP) და წარმოადგენს ალტერნატიულ პეპტიდებს, რომელიც გაქცევის არაჩვეულებრივი საშუალებაა.

სიმსივნური უჯრედების მიერ იმუნოსუპრესორული მიკროგარემოს შექმნის გარე მექანიზმები:

- სუპრესორული უჯრედების ინფილტრაცია (მაგ. მარეგულირებელი T უჯრედების, მაკროფაგებისა და მიელოიდური სუპრესორული უჯრედები (MDSCs)
- იმუნური რეცეპტორების ინაქტივაცია
- საკვების ნივთირებისა და ჟანგბადის წართმევა/ჩამორთმევა [23]

- იმუნოსუპრესორული ციტოკინების სეკრეცია (მაგ. ტრანსფორმაციის ზრდის ფაქტორი β (TGF β), ინტერლეიკინ-10 (IL-10) და ვასკულალურ-ენდოთელური ზრდის ფაქტორი (VEGF))

2.1.1 NK უჯრედების ზოგადი დახასიათება

NK უჯრედები ლიმფოიდური წარმოშობის უჯრედებია. პირველად მათი იდენტიფიცირება მოხდა 1975 წელს, როგორც ლიმფოციტების ქვესიმრავლე, რომელიც ზომით განსხვავდებოდა T და B ლიმფოციტებისგან. უჯრედების ციტოპლაზმური გრანულები შეიცავსპროტეოგლიკანებს, ცილა პერფორინს და გრანზიმს(პროტეაზა). NK უჯრედები ვრცელდება ლიმფოიდურ და არა ლიმფოიდურ ქსოვილებში, როგორიცაა მაგლითად, სისხლი, ელენთა, ლიმფური კვანძი დ. ა. შ.

NK უჯრედები არიან $CD3^{-}CD56^{+}$ უჯრედების პოპულაცია. მისი აქტივაცია დამოკიდებულია ინვარიანტული რეპტეპტორების გამააქტიურებელ და დამრთგუნველ სიგნალზე. ისინი მიეკუთვნებიან იმუნური დაცვის არასპეციფიურ ხაზს. არ შეუძლია ანტიგენის შეცნობა სპეციფიურად. NK უჯრედები იმუნურ ზედამხედველობას ახორციელებენ ისეთ უჯრედებზე, რომლებსაც საკუთარი MHC მოლეკულა არ აქვთ. ამ უჯრედების ფუნქცია სიმსივნური ან ვირუსით ინფიცირეული უჯრედების ამოცნობა და განადგურებაა, რასაც ახორციელებს ზედაპირზე ექსპრესირებული ორი სახის რეცეპტორით: კვლის მაინჰიბირებელი რეცეპტორი (KIR) და კვლის გამააქტიურებელი რეცეპტორი (KAR) . თუ KIR (გამოიცნობს MHC I კლასის მოლეკულას) რეცეპტორი დაუკავშირდება შესაბამისს ლიგანდს, მაშინ სამიზნე უჯრედის კვლის ინჰიბირება განხორციელდება. იმ შემთხვევაში თუ სამიზნე უჯრედს კვლის ინჰიბირების რეცეპტორი დაკარგული ან შეცვლილი აქვს, მაშინ KAR-ის გააქტიურება მოხდება და შედეგად უჯრედი კვდება. თუ საკუთარ უჯრედზე KIR რეცეპტორის ლიგანდი გაქრა ან შეიცვალა, ეს ფაქტი დაკავშირებული შეიძლება იყოს ან ვირუსით ინფიცირებასთან ან სიმსივნურ ტრანსფორმაციასთან.

NK უჯრედს სამიზნე უჯრედის მოკვლა ანტისხეულდამოკიდებული ციტოტოქსიკურობითაც შეუძლია. აღნიშნულ შემთხვევაში NK უჯრედი უკავშირდება სამიზნე უჯრედს G/M კლასის იმუნოგლობულინით. ანტისხეულდამოკიდებულ

უჯრედულ ციტოტოქციურობას NK უჯრედი ახორციელებს შემდეგნაირად : პირველ რიგში უნდა მოხდეს სიმსივნის ზედაპირზე სიმსივნის საწინააღმდეგო ანტისხეულის დაკავშირება. მხოლოდ ამის შემდეგ ხდება NK უჯრედის შეკავშირება სისმივნურ უჯრედთან, მაგრამ NKუჯრედის ზედაპირზე აუცილებლად უნდა ექსპრესირდეს ანტისხეულის Fc ფრაგმენტისადმი სპეციფიკური რეცეპტორი. ყოველივე ამის შემდეგ, უფექტორული უჯრედიდან გამოიყოფილი ნივთირერებები მოქმედებს სიმსივნურ უჯრედებზე და ანადგურებს მას.

2.1.2 T უჯრედის ზოგადი დახასიათება

T ლიმფოციტის სახელწოდება უკავშირდება თიმუსს, სადაც ხდება პრე-T-უჯრედების დიფერენცირება T ლიმფოციტებად. T ლიმფოციტი შეიცნობს ანტიგენს გადამუშავებული სახით, მას შემდეგ რაც MHC მოლეკულა წარმუდგენს მას. T ლიმფოციტის მთავარ მარკერს წარმოადგენს CD3(TCR)წარმოადგენს.

T ლიმფოციტი CD4 და CD8 მარკერის ექსპრესიის მიხედვით იყოფა განსხვავებულ პოპულაციებად. CD4 მარკერის მქონე უჯრედები - T ჰელპერები იმუნური პასუხის დამხმარის ან ინდუქტორის როლს ასრულებს, რაც შეეხება CD8 მარკერის მქონე უჯრედებს - T ციტოტოკქსიურ უჯრედებს - ხასიათდებიან ციტოტოქსიური ბუნებით. CD4 უჯრედები ანტიგენს MHC II კლასის მეშვეობით გამოიცნობს, CD8 კი MHC I კლასის დახმარებით. ანტიგენთან სტიმულაციის შემდეგ CD4 T (TH0) უჯრედს შეუძლია ილ-2ის სინთეზი. ხანგრძლივი აქტივაციური სიგნალის შემდეგ CD4 T უჯრედი დიფერენცირდება TH 1 ან TH 2 ლიმფოციტებად, რასაც განსაზღვრავს ციტოკინების პროფილი: მაგალითად, თუ მოხდება ილ-12 გამომუშავება, მაშინ იმუნური პასუხი წარიმართბა TH 1 გზით, ხოლო თუ ილ-4, მაშინ TH 2 გზით.

CD8 უჯრედები გამომუშავებული ციტოკინების მიხედით იყოფიან TC 1 და T C2 უჯრედებად. T ციტოტოქსიკური უჯრედები შეიცავენ პერფორინებსა და გრანზიმებს და სწორედ მათი მეშეობით ახორციელებენ უჯრედის კვლას. მას აქვს უნარი ყოველგვარი პრეზენტაციის გარეშე დაუკავშირდეს ინფიცირებულ/სიმსივნურ უჯრედს და

გაანადგუროს იგი. გარდა ამისა , T ციტოტოქსიკური უჯრედი ხასიათდება ანტისხეულდამოკიდებული უჯრდული ცოტოტოქსიკურობითაც.

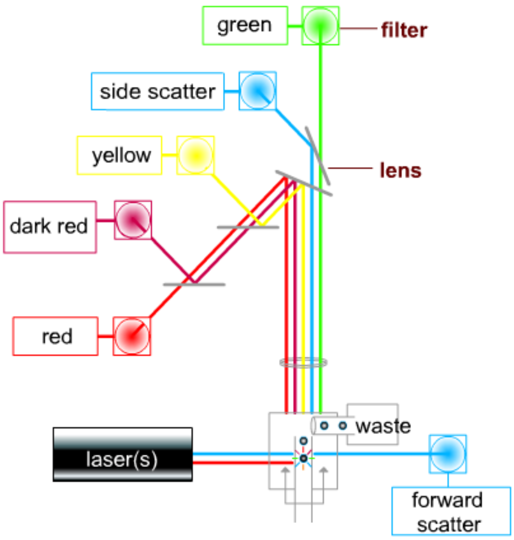
2.1.3. NKT უჯრედების ზოგადი დახასიათება

მოცირკულირე T ლიმფოციტების მცირე ნაწილს NK უჯრედების მარკერიც აქვს. ასეთ უჯრედებს უწოდებენ NKT ლიმფოციტებს. წარმოადგენენ პერიფერიული სისხლის T უჯრედების მხოლოდ 0.1% . NKT უჯრედებზე მდებარეობს არაპოლიმორფული CD1d მოლეკულა, რომელიც ანტიგენ-წარმდგენი მოლეკულაა. იგი იკავშირებს საკუთარ და უცხო ლიპიდებსა თუ გლიკოლიპიდებს. NKT უჯრედები მოიცავს როგორც NK1.1 + და NK1.1-, ასევე CD4 +, CD4-, CD8 + და CD8- უჯრედებს. მათ შეიძლება გაიზიარონ NK უჯრედების თვისებები,როგორიცაა CD16 და CD56 ექსპრედია და გრანზიმების წარმოქმნა. [24] იდენტიფიცირებულია NKT უჯრედების რამდენიმე ქვეტიპი. სიმსივნის დროს, I ტიპის NKT უჯრედები ძირითადად დამცავ ფუნქციას ასრულებენ, აწარმოებენ რა ინტერფერონ-γ-ს ააქტიურებენ NK და CD8 + T უჯრედებს. II ტიპიც NKT უჯრედები ხასიათდებიან მრავალფეროვანი TCR-ით, რომელიც გამოიცნობს CD1d მოლეკულის მიერ წარგენილ ლიპიდს. I-სა და II ტიპის NKT უჯრედებს შორის არის გარკვეული ბალანსი, რის დარღვევამაც შეიძლება გავლენა იქონიოს იმუნური პასუხის სხვა რგოლზებზე. [25]

NKT უჯრედი CD1d მოლეკულად უკავშირდება TCR-ით. თავის მხრივ CD1d დკავშირებულია ანტიგენთან. NKT უჯრედთან CD1d მოლეკულის შეკავშირებას მოსდევს ნატურალური ქილერული T უჯრედის აქტივაცია, რის შედეგადაც ის გამოიმიშავებს დიდი რაოდენობით IFNγ, IL-4, გრანულოციტ-მაკროფაგის კოლონიის მასტიმულირებელი ფაქტორებს (GM-CSF) და სხვადასხვა ციტოკინებსა და ქემოკინებს: IL-2,IL-13, IL-17, IL-21, TNF-α .

2.2 გამდინარე ციტომეტრიის მიმოხილვა

სიტყვა „ციტომეტრია“ მოდის ბერძნულიდან - “cyto” - უჯრედი, “meter” - გაზომვა. გამდინარე ციტომეტრია - ეს თანამედროვე ტექნოლოგიაა, რომელიც საშუალებას გვაძლევს დავახასიათოთ და გავაანალიზოთ უჯრედები. ამ ტექნოლოგიით ერთდროულად ხდება თითოეული ცალკეული ნაწილაკის, ძირითადად უჯრედების, რამდენიმე ფიზიკური მახასიათებლის აღრიცხვა და გაანალიზება. ამ მახასიათებლების აღრიცხვა იმ მომენტში ხდება, როცა სითხის ნაკადში ნაწილაკები გადაკვეთავენ სინათლის (ლაზერის) სხივს. გამდინარე ციტომეტრიით შესაძლებელია ნებისმიერი 0.2-0.5 მიკრომეტრის ზომის ნაწილაკების ან უჯრედების სუსპენზიის შესწავლა. გამდინარე ციტომეტრია ინფორმაციას გვაძლევს უჯრედის (ან ნაწილაკის) ზომის, გრანურალობისა და ფლუორესცენციის შესახებ.

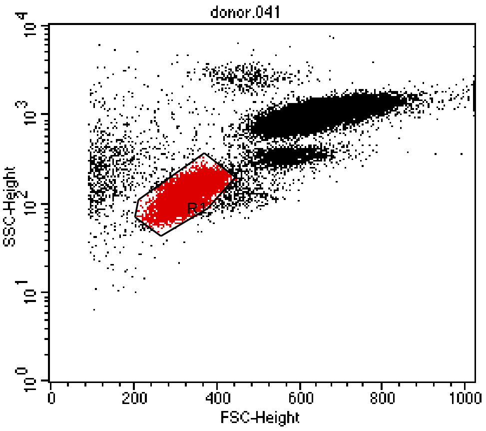


სურ.8 გამდინარე ციტომერტიის აგებულება

გამდინარე ციტომეტრი შეიცავს ლაზერს, გამდინარე ნაკადის სისტემას, ლინზების რთულ სისტემას, 5-ს და მეტ ფოტოანალიზატორს, რომლებსაც ფოტოსიგნალი გადაჰყავთ ელექტრონულ ფორმაში და სიგნალის პროცესორებს, რომელბიც სიგნალის შემდგომ დამუშავებას ახდენენ და გადასცემენ ციტომეტრთან დაკავშირებულ კომპიუტერს. ყველა ზემოთ ჩამოთვლილი სისტემა შეთანხმებულად მუშაობს იმისთვის, რომ ეფექტურად მოხდეს თითოეული ნაწილაკის მიერ გაბნეული სინათლისა და გამოსხივების ფლუორესცენციის აღრიცხვა: გამდინარე ნაკადის მიერ ხდება

ნაწილაკების გადატანა ლაზერული სხივის გადაკვეთის წერტილამდე; ოპტიკური სისტემა შედგება აგზნებისა და შეგროვების კომპონენტებისგან. აგზნების კომპონენტი შეიცავს ლაზერს და ლაზერული სხივის სწორი ფოკუსირებისთვის საჭირო ლინზებს და ფილტრებს. სინათლის შემგროვებელი კომპინენტი შეიცავს შესაბამისად განლაგებულ ლინზებს, ფილტრებსა და ფოტოდეტექტორებს. როდესაც ნაწილაკი გადაკვეთს ლაზერის სხივს ხდება სინათლის გაბნევა. იმ შემთხვევაში , თუ უჯრედს გააჩნია ფლუორესცენცია , გამოსხივება ასევე ლაზერის გადაკვეთის წერტილში აღირიცხება. შესაბამისად განლაგებული ლინზები გაბნეული და გამოსხივებული სინათლის შეგროვებას შეასრულებენ და გადასცემენ ფოტოდეტექტორებს. დეტექტორები სიგნალს გადასცემენ სიგნალის პროცესორებს. თითოეული ფოტოსიგნალი გამოისახება, როგორც რიცხვი. რაც მეტია სიგნალი, მით მეტია ამ რიცხვის მნიშვნელობა. შედეგების შენახვა ხდება კომპიუტერული სისტემის მიერ გამდინარე ციტომეტრიის სტანდარტული (FCS) ფაილების ფორმატში.

უჯრედების სუსპენზიის გამდინარე ციტომეტრიით გაანალიზების დროს უპირველეს ყოვლისა ხდება უჯრედების ზომისა და გრანულარობის აღრიცხვა.მიღებული მონაცემები გრაფიკულად გამოისახება წერტილოვანი გრაფიკის სახით (“dot plot”), სადაც თითოეული უჯრედი წერტილის სახით არის გამოსახული. ყველა წერტილს გააჩნია ორი კოორდინატი X და Y ღერძზე. X-ზე გამოსახულია ზომა (FCS), Y-ზე - გრანულარობა (SSC). ზომისა და გრანულარობის მიხედვით, მაგალითად პეროფერიულ სისხლში, ერითროციტების ლიზირების შემდეგ, ადვილად შესაძლებელია ლიმფოციტების, მონოციტების და ნეიტროფილების პოპილაციების გარჩევა, რადგანაც ლიმფოციტები ყველაზე მცირე ზომით და ყველაზე ნაკლები გრანულარობით ხასიათდებიან; ნეიტროფილები კი პირიქით, მაღალი გრანულარობით და დიდი ზომით განირჩევიან; მონოციტებს - შუალედური პოზიცია უჭირავთ. (სურ. 9)

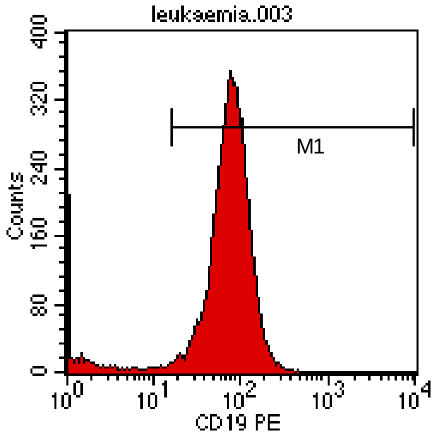


სურ.9 ერითროციტების ლიზირების შემდეგ ლიმფოციტების, მონოციტებისა და ნეიტროფილების განლაგება.

უმრავლეს შემთხვევაში გამდინარე ციტომეტრიის მეთოდი გულისხმობს ფლუორესცენტული სინჯით უჯრედში რომელიმე სპეციფიკური მოლეკულების მონიშვნას. ამისთვის გამოიყენება ფლუოროქრომთან კონიუგირებული მონოკლონური ანტისხეულები, რომლებიც მიმართული შეიძლება იყოს ამა თუ იმ მოლეკულის წინააღმდეგ. სამიზნე ანტიგენი შეიძლება იყოს როგორც ზედაპირული, ასევე ციტოპლაზმური. სხვადასხვა ფერის ფლუოროქრომებთან კონიუგირებული ანტისხეულების გამოყენების მეშვეობით შესაძლებელია ერთროულად რამდენიმე ანტიგენის ექსპრესიის შესწავლა. შესწავლისთვის შერჩეული ანტიგენი შეიძლება იყოს უჯრედ-სპეციფიკური (მაგალითად, CD3 – T ლიმფოცოტების მარკერი, CD19 – B ლიმფოციტების მარკერი დ. ა. შ.), ან უჯრედის ამა თუ იმ ფუნქციური მდგომარეობისთვის დამახასიათებელი (მაგალითად, აქტივაციის მარკერები), ან უჯრედის განვითარების სტადია-სპეციფიკური და ა. შ.

ამგვარად, რამდენიმე ანტიგენის ექსპრესიის ერთდროული შესწავლით შესაძლებელია, უჯრედების კონკრეტულ სუბპოპულაციაში კონკრეტული ფუნქციური პროცესის შესწავლა, ან შერეულ პოპულაციაში რამდენიმე ტიპის უჯრედების გარჩევა და სხვა.

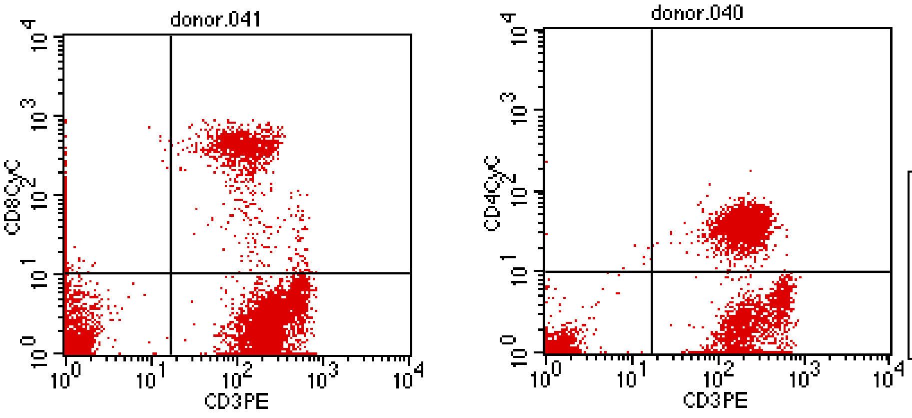
გაანალიზირების დროს აღრიცხული ფლუორესცენცია გამოისახება ან ერთპარამეტრიანი ჰისტოგრამის სახით (სურ. 10), ან შესაძლებელია წერტილოვანი გრაფიკების სახითაც გამოისახოს. თუ არჩეული იქნება რომელიმე მეორე პარამეტრი - ან მეორე ფერის ფლუორესცენცია (თუ ერთდროულად ხდებოდა ერთზე მეტი ანტიგენის შესწავლა) , ან ზომა, ან გრანულარობა.



სურ.10 ფლუოროსცენციის გამოსახვა ჰისტოგრამის სახით.

განვიხილოთ ერთ-ერთი მარტივი მაგალითი: T უჯრედების ჰელპერული და ციტოტოქსიკური სუბპოპულაციების პროცენტული შეფარდების განსაზღვრა. ამისთვის საჭიროა, შევისწავლოთ T უჯრედების საერთო CD3+ პოპულაციაში CD4+ (T ჰელპერები) და CD8+ (T ციტოტოქსიკური) უჯრედების პროცენტი. თუ შევარჩევთ სხვადასხვა ფერის ფლუოროქრომთან კონიუგირებულ მონოკლონურ ანტისხეულებს, მაგალითად ანტი-CD3 PE (ნარინჯისფერი), ანტი-CD3 FITC (მწვანე) და ანტი-CD8 PerCP (წითელი) ერთსაფეხურიანი შეღებვით შეგვიძლია მივაღწიოთ ჩვენს მიზანს. ამისთვის, ჯერ დავაინკუბირებთ პერიფერიულ სისხლის 100 მიკროლიტს სამივე ანტისხეულების ნარევთან (დაახლოებით 30 წუთი) იმისთვის, რომ ანტისხეულები დაუკავშირდნენ თავის სამიზნე ანტიგენებს. შემდეგ მოვახდენთ ერითროციტების ლიზისს მალიზირებელი ბუფერით (ერითროცირების ლიზისი აუცილებელია იმისთვის, რომ ერითროციტების რიცხვი ბევრად აღემატება პერიფერიულ სისხლში ლეიკოციტების სხვა პოპულაციებს. ერითროციტების პოპულაცია თავისებურ „ღრუბელს" ქმნის, რომელიც ზომისა და გრანულარობის დოთ-პლოტზე ფარავს ყველა სხვა პოპულაციებს, რადგან ერითროციტები სხვადასხვა ზომის აგრეგატებს ქმნიან, მიუხედავად იმისა, რომ ცალკეული ერითრიციტი ზომით ლიმფოციტზე ნაკლებია. ასეთი აგრეგატები ნეიტროფილების ზომასაც აღწევენ.) ლიზისის შემდგომ უჯრედები უნდა გაირეცხოს იზოტონურ ბუფერში, იმისთვის რომ მოვაშოროთ, როგორც ლიზირებული ერითროციტების ნარჩენები, ასევე ის ანტისხეულები, რომლებიც არ დაუკავშირდა თავის სამიზნე ანტიგენებს. ბოლოს კი, დავაფიქსირებთ ნიმუშებს და გავაანალიზებთ გამდინარე ციტომეტრზე. ანალიზის შედეგად ჩვენ საშუალება მოგვეცემა ჯერ ზომის და გრანულარობის გრაფიკზე ამოვარჩიოთ ლიმფოციტების პოპულაცია, შემდეგ კი ამ პოპულაციების შიგნით ვნახოთ ორპარამეტრიანი წერტილოვანი გრაფიკების

საშუალებით CD3+CD4+ უჯრედების პროცენტი და CD3+CD8+ უჯრედების პროცენტი. (სურ. 11)



სურ. 11CD3/CD8 უჯრედები (მარცხნივ) და CD3/CD4უჯრედები (მარჯვნივ)

2.3 ცხოველური მოდელების გამოყენება სიმსივნეების ექსპერიმენტულ კვლევებში

ცხოველური ორგანიზმი წარმატებით გამოიყენება სხვადასხვა კვლევებში ადამიანის დაავადებების იდენტიფიცირებისთვის, ამ დაავადების მექანიზმის შესასწავლად და შემდგომ მის აღმოსაფრქველად მკურნალობის გზით. არსებობს უძველესი ცნობები, იმის შესახებ რომ ჯერ კიდევ არისტოტელე (384-322 წ) გამოიყენებდა ცხოველურ ორგანიზმებს ექსპერიმენტებისთვის. დაახლოებით XIXსაუკინიდან უკვე აქტიურად დაიწყო ცოცხალი ცხოველების გამოყენება ექსპერიმენტებში, რისი დამსახურებაცაა დღევანდელი მიღწევები თანამედროვე ბიოლოგიასა თუ მედიცინაში. თანამდეროვე მედიცინაში გამოიყენება სხვადასხვა ცხოველური ორგანიზმები, როგორებიცაა თაგვები, ვირთაგვები, კურდღლები, მაიმუნები, დროზოფილა დ.ა.შ. იმას თუ რომელ ცხოველს გამოვიყენებთ ცდაში, ეს დამოკიდებულია კვლევის შინაარსზე და მიზანზე.[26]

სიმისვნის მიმდინარეობა საკმაოდ რთული პროცესია. სიმსივნეზე ჩატარებული კვლევებისთვის კი გამოიყენება ძირითადად თაგვები. ისმის კითხვა, რატომ თაგვები? იმიტომ, რომ მათ ბევრი საერთი აქვთ ადამიანებთან და მის ორგანიზმში შეიძლება განვითარდეს ყველა ის სიმსივნის ტიპი, რაც ადამიანისთვის არის დამახასიათებელი. ასევე, თაგვებშიც იგივე გენია ჩართული სიმსივნის მიმდინარეობის პროცესში. გარდა ამისა, თაგვები იოლად ხელმისაწვდომია და მისი გენომი ახლოს დგას ადამიანის

გენომთან, რამაც მნიშვნელოვნად გაზარდა თაგვების გამოყენება ექპერიმენტალურ მოდელად.[27]

ჩვენი კვლევის მოდელს წარმოადგენს C57BL/6 ხაზის თაგვები, რომელებიც ფართოდ გამოიყენებიან ლაბორატორიულ კვლევებში, როგორც ამა თუ იმ ადამიანის დაავადების მოდელი. C57BL ხაზის თაგვები პირველად შეიქმნა 1921 წელს Clarence Cook Little-ის მიერ ბასეის გამოყენებითი ბიოლოგიისა და კვლევის ინტიტუტში. [2]

3. კვლევის ობიექტი და მეთოდები

3.1 კვლევის ობიექტი

საკვლევ ობიექტს წარმოადგენდა C57BL/6 ხაზის თაგვები, რომლებიც არიან სპეციალურად გენეტიკურად გამოყვანილი თაგვები. კვლევაში გამოყენებული იქნა 18თაგვის ელენთა. კონტროლის სახითშეირჩა5 თაგვი,რომელსაც მხოლოდ სიმსივნე შევუყვანე და აღარ ხდებოდა მათი მკურნალობა. 4-4 თაგვში შეგვყავდა 5-აზაციტიდინი და ლენალიდომიდი ერთმანეთისგან დამოუკიდებლად, ხოლო 5 თაგვი გამოყვავით კომბინირებული მკურნალობისთვის.

გარდა ზემოთ აღნიშნულისა, კვლევის ობიექტს ასევე წარმოადგენდა შემდეგი მოლეკულები:

I. CD3 -ექსპრესირებულია ყველა T უჯრედზე, ასევე NKT უჯრედების მარკერსაც წარმოადგენს.
II. CD8 – გამოიყენებაTციტოტოქსიკური უჯრედების დიაგნოსტირებისთვის.
III. CD314 – გამოვიყენე როგორც NKT უჯრედის სადიაგნოსტიკო მარკერი CD3-თან კონბინაციაში, ასევე NK უჯრედის ამოსაცნობად და მისი აქტივობის დასადგენად.
IV. CD49b – განვსაზღვრეCD314-თან კონბინაციაში NK უჯრედები.
V. NKG2A/C/E _ გამოვიყენე , როგორც NK უჯრედის KIR-ის (კვლის ინჰიბირების რეცეპტორი) მარკერი CD314 -თან კომბინაციაში.
VI. Perforin - მეშვეობით შესაძლებელია შევაფასოთ NK უჯრედი რამდენად აქტიურად ახორციელებს თავის ეფექტს.

3.2 კვლევის მეთოდები

3.2.1 In vivo მეთოდი - RM1 უჯრედების თაგვებში შეყვანა და სიმსივნის მოდელის შექმნა

C57BL/6 ხაზის თაგვებში კანქვეშ ინექციის გზით შევუყვანე RM-1 უჯრედები PBS-ის თანაობისას. RM-1 უჯრედები არიან თაგვის პროსტატის კიბოს სიმსივნური ხაზის უჯრედები, რომელთა ინექცია C57BL/6 ხაზის თაგვებში იწვევს სიმსივნის განვითარებას.

თაგვებში სიმსივნის მოდელის შექმნის შემდეგ ხდებოდა 5-აზაციტიდინისა და ლენალიდომის შეყვანა მუცლის ღრუში - ინექციიდან მეორე დღეს, თაგვებში შემყავდა დღეგამოშვებით 5-აზაციტიდინისა და ლენალიდომიდი, როგორც კომბინირებულად, ისე ცალ-ცალკე.

3.2.2 თაგვის ელენთიდან საკვლევი უჯრედების გამოყოფა

მკურნალობის დასრულების შემდეგ, ევთანაზირებული თაგვიდან გამოყოფილი ელენთა დავსრისე მექანიკურად RPMI-ის თანაობისას (5მლ) . ცენტრიფუგირების შემდეგ (1300ბრ 5 წთ 4^0C) გამოყოფილ უჯრედებს დავამატე 4მლ ლიზის ბუფერი და ოთახის ტემპერატურაზე 2წთიანი ინკუბაციის შემდეგ გავრეცხე ორჯერ PBS-ით (500მკლ).

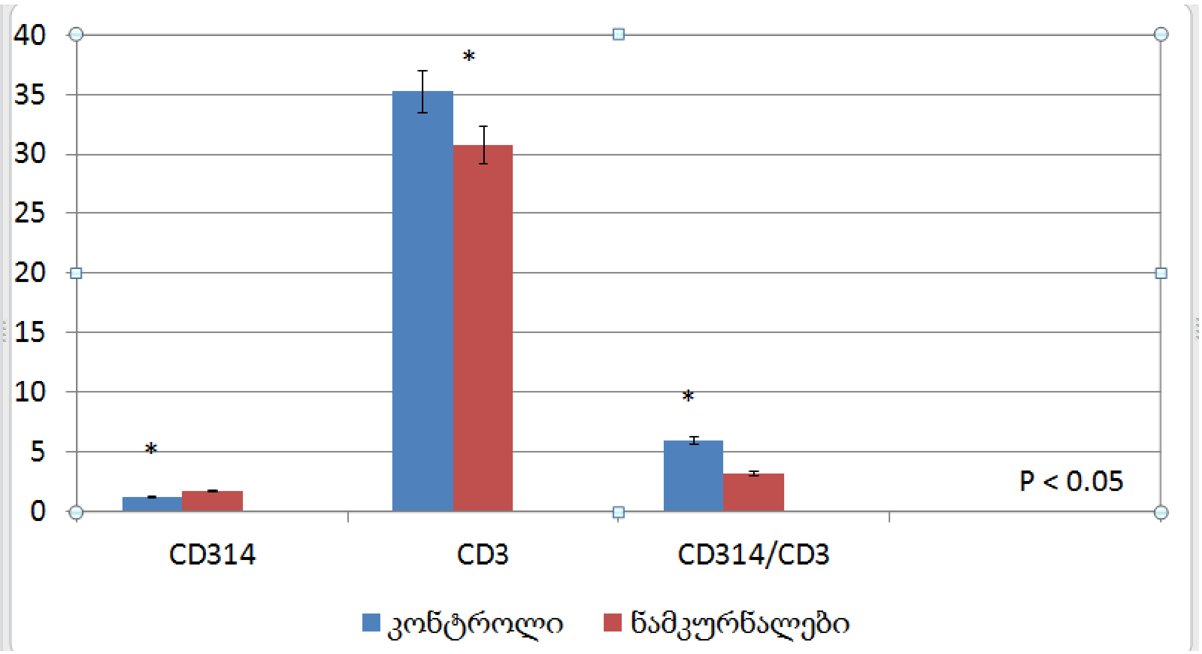
3.3 გამდინარე ციტომეტრიის მიმოხილვა

ელენთიდან მიღებული სუფთა უჯრედები მოვამზადე გამდინარე ციტომეტრიისთვის. ამისთვის დავამატე შემდეგი ანტისხეულები (3მკლ): CD3, CD8, CD127, CD314, CD49b, NKG2A/C/E, Perforin. 30 წუთიანი ინკუბაციის შემდეგ ისევ გავრეცხე ორჯერ PBS-ით (500 მკლ), რის შემდეგაც უშუალოდ ხდება უჯრედების ფენოტიპირება გამდინარე ციტომეტრის მეშვეობით.

4. კვლევის შედეგები და მათი გახილვა

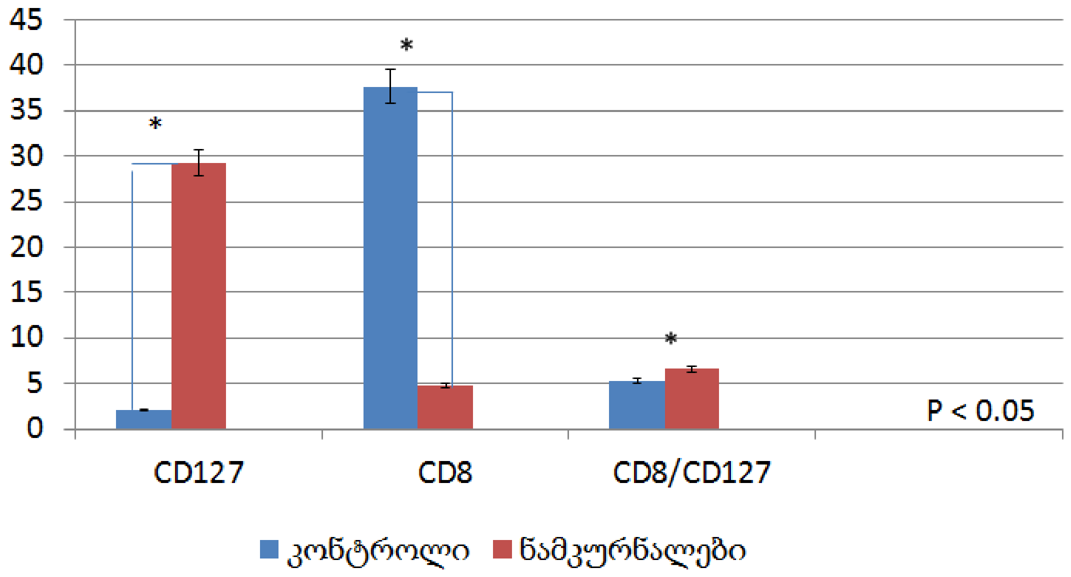
კვლევის მიზნიდან გამომდინარე, ექსპერიმენტის უპირველესი სამიზნე იყო ციტოტოქსიური უჯრედი(Tc) და ნატურალური კილერები (NK). როგორც აღმოჩნდა T უჯრედების საერთო რაოდენობა არის დაკლებული, ხოლო მის რაოდენობრივ კომპენსაციას ახდენს NK უჯრედები. როგორც ჩვენი კვლევიდან ჩანს, მკურნალობის შედეგად აქტიურდება კილერების არასპეციფიური ხაზი - NK უჯრედები.

CD314 ექპსრესირებულია NK, NKT დაT ციტოტოქსიკურ უჯრედებზე. ორმაგდადებითიCD314+/CD3+მონიშვნით ვსაზღვრავთ NKT უჯრედებს, სადაც CD314 მომატებულია ნამკურნალებ თაგვებში. CD3 დაკლებულია არანამკურნალებთან შედარებით. ორმაგ დადებითი უჯრედების რაოდენობაც დაკლებულია. (დიაგრამა 1)



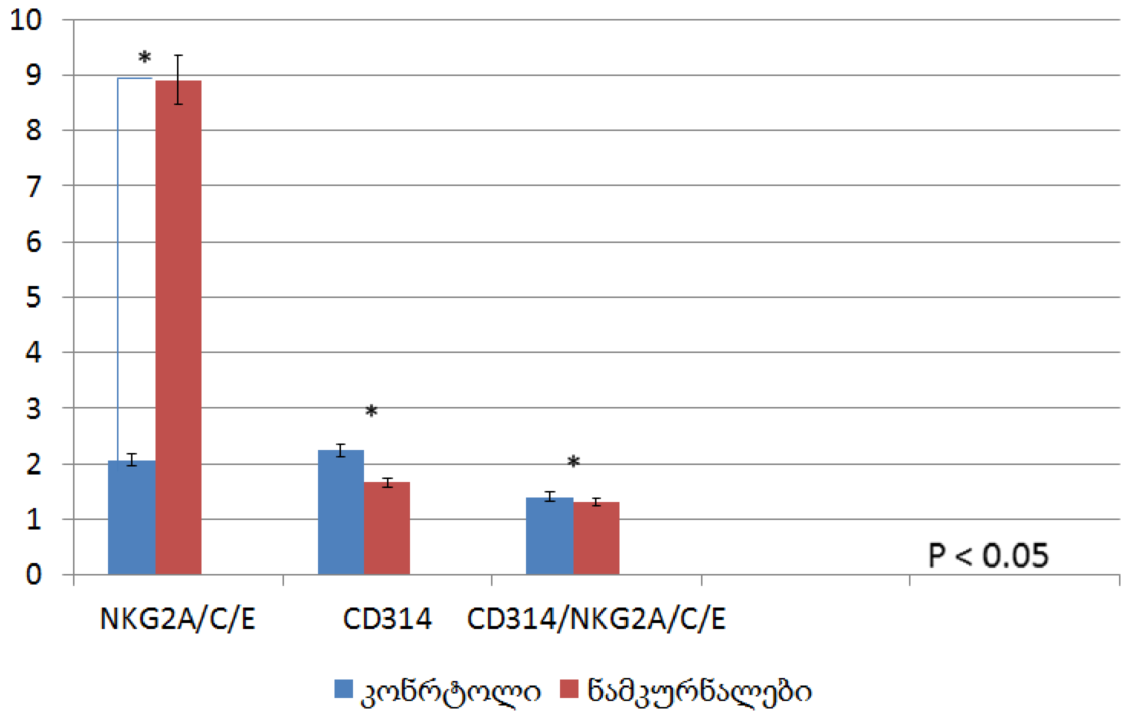
(დიაგრამა 1)

CD8 მარკერით ვსაზღვრავთ T ციტოტოქსიკურ უჯრდებს. CD127 ნამკურნალებ თაგვებში მომატებულია, ხოლო CD8 უჯრედების რაოდენობა პირიქით დაკლებულია. ასევე მომატებულია CD127/CD8 უჯრედების რაოდენობაც. (დიაგრამა2)



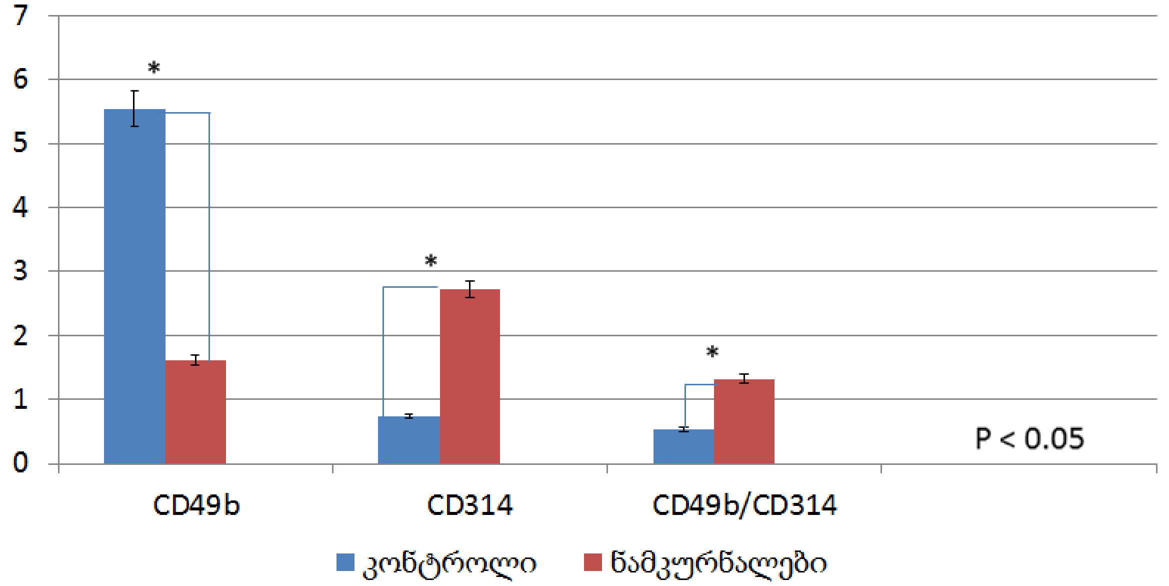
(დიაგრამა 2)

NKG2A/C/E მოლეკულა მონაწილეობს NKუჯრედის აქტივაციაში, ანუ გამოიყენება როგორც კვლის ინჰიბირების რეცეპტორის (KIR) განმსაზღვრელ მარკერად. ორმაგ დადებთი უჯრედების პოპულაციით კი ვსაზღვრავთ იმას, თუ რადენად ეფექტურად ხორციელდება NK უჯრედის მიერ ე.წ. ქილინგი ლენალიდომიდისა და აზაციტიდინით მკურნალობის შემთხვევაში. შედეგებმა აჩვენა, რომ NKG2A/C/E საგრძნობლად მომატებულია ნამკურნალევ თაგვებში, მაშინ როცა CD314 რაოდენობა დაკლებულია. (დიაგრამა3)



(დიაგრამა 3)

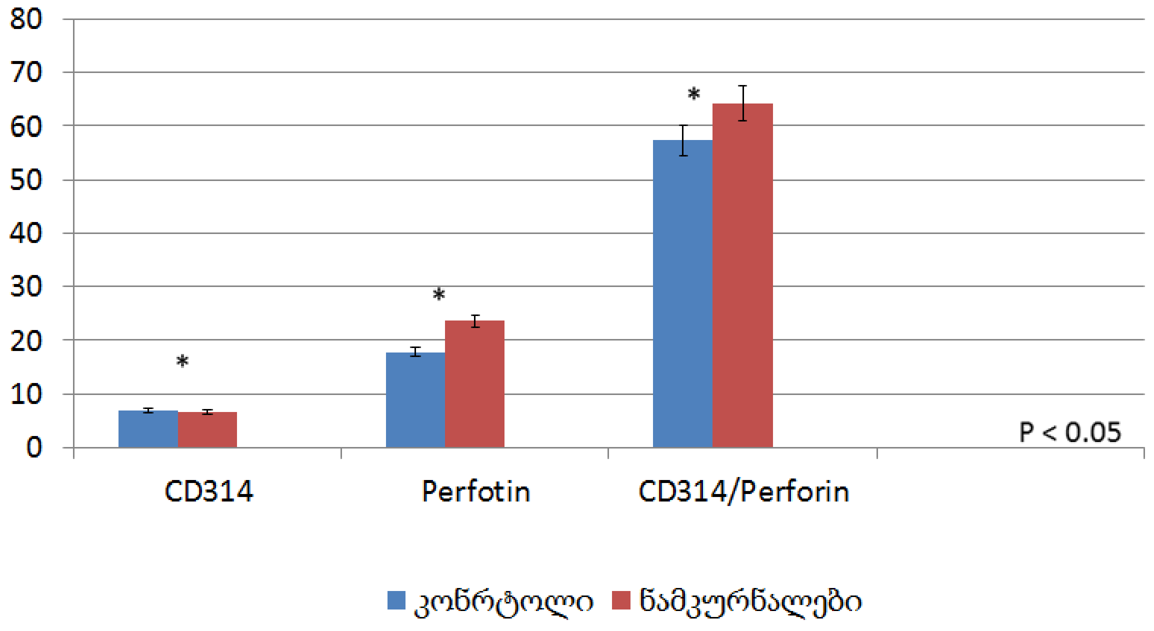
CD49b დაკლებულია ნამკურნალებ თაგვებში, ხოლო CD314 მომატებულია, ჯამში მომატებულია ნამკურნალებ თაგვებში ორმაგ დადებითი უჯრედების რაოდენობა. (დიაგრამა4)



(დიაგრამა 4)

CD314 მოლეკულა, რომელიც ექსპრესირებულია NK უჯრედებზე, მონაწილეობს სიგნალის გადაცემაში, რომელიც თავის მხრივ არეგულირებს ამ უჯრედის აქტივაციისა

და ინჰიბირებას. რაც შეეხება პერფორინს, მისი მეშვეობით ხორციელდება სიმსივნური უჯრედის კვლა, ორმაგ დადებით უჯრედებით ჩვენ ვადგენთ NK უჯრედის ეფექტს. შედეგების მიხედვით, CD314 დაკლებულია ნამკურნალებ თაგვებში, პერფორინი მომატებულია, ორმაგ დადებითი უჯრედებიც მომატებულია. (დიაგრამა 5)



(დიაგრამა 5)

5. დასკვნა

5-აზაციტიდინითა და ლენალიდომიდით მკურნალობა პროსტატის სიმსივნის საწინააღმდეგო პასუხის ეფექტორულ რგოლზე მნიშვნელოვან გავლენას ახდენს. გაძლიერებულია არასპეციფიკური კილერული მექანიზმი, რაც გამოიხატება როგორც NK უჯრედების რაოდენობრივი ზრდით, ასევე მისი უჯრედშიდა ფუნქციური ფაქტორების - პერფორინის რაოდენობის მატებით.

პრაქტიკული რეკომენდაცია

5-აზაციტიდინითა და ლენალიდომიდით კომბინირებული მკურნალობა შესაძლოა შეთავაზებული იქნას პროსტატის სიმსივნის სამკურნალოდ, როგორც არასპეციფიკური ეფექტორებისთვის კვლის მასტიმულირებელი საშუალება.

6.გამოყენებული ლიტერატურა

1. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742998
2. https://en.wikipedia.org/wiki/C57BL/6
3. http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/immunotherapy/immunotherapy-what-is-immunotherapy
4. Vallet, S., Witzens-Harig, M., Jaeger, D. and Podar, K.: Update on immunomodulatory drugs(IMiDs) in hematologic and solid malignancies. Expert Opin Pharmacother, 13: 473-494, 2012
5. http://www.cancer.net/navigating-cancer-care/how-cancer-treated/immunotherapy-and-vaccines/understanding-immunotherapy
6. https://en.wikipedia.org/wiki/Lenalidomide
7. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4232904/
8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22584909
9. https://en.wikipedia.org/wiki/Azacitidine
10. http://chemocare.com/chemotherapy/drug-info/5-azacitidine.aspx
11. Phase I combination trial of lenalidomideand azacitidine in patients with higher-risk myelodysplastic syndromes.
12. თ. ჩიქოვანი., იმუნოლოგია. 19-21, 153-162 (2012)
13. http://www.sinobiological.com/NKG2D-CD314-a-6008.html
14. https://en.wikipedia.org/wiki/CD94/NKG2
15. Mittendorf, E. A. et al. Clinical trial results of the HER-2/neu (E75) vaccine to prevent breast cancer recurrence in high-risk patients: from US Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02. Cancer 118, 2594–2602 (2012)
16. Melero, I. et al. Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. Nat. Rev. Clin. Oncol. 11, 509–524 (2014)
17. Finn, O. J. Vaccines for cancer prevention: a practical and feasible approach to the cancer epidemic. Cancer Immunol. Res. 2, 708–713 (2014)
18. Setiadi, A. F. et al. Epigenetic enhancement of antigen processing and presentation promotes immune recognition of tumors. Cancer Res. 68, 9601–9607 (2008)

19. Shastri, N., Nagarajan, N., Lind, K. C. & Kanaseki, T. Monitoring peptide processing for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. Curr. Opin. Immunol. 26, 123–127 (2014).
20. Landsberg, J. et al. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. Nature 490, 412–416 (2012)
21. Schlecker, E. et al. Metalloprotease-mediated tumor cell shedding of B7-H6, the ligand of the natural killer cell-activating receptor NKp30. Cancer Res. 74, 3429–3440 (2014).
22. Medema, J. P., de Jong, J., van Hall, T., Melief, C. J. & Offringa, R. Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE- inhibitory protein. J. Exp. Med. 190, 1033–1038 (1999).
23. Munn, D. H. & Mellor, A. L. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. Trends Immunol. 34, 137–143 (2013)
24. https://en.wikipedia.org/wiki/Model_organism
25. http://science.jrank.org/pages/382/Animal-Cancer-Tests.html
26. https://en.wikipedia.org/wiki/Natural_killer_T_cell
27. 27.http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19055947