ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო
უნივერსიტეტი

კახა მჭედლიშვილი

ანტისიმსივნური იმუნური პასუხის იმუნომოდულაცია დენდრიტული უჯრედების ქიმიური და ბიოლოგიური პრეპარატებით სტიმულაციით

ბიოლოგია

ნაშრომი შესრულებულია ბიოლოგიის მაგისტრის

აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

სამაგისტრო ნაშრომის ხელმძღვანელი:

ბ.მ.დ. ასოცირებული პროფესორი ნუნუ მიცკევიჩი

თბილისი 2016

ტერმინთა განმარტება

DC - დენდრიტული უჯრედი

Treg - რეგულატორული T ლიმფოციტი

Tc - ციტოტოქსიკური T ლიმფოციტი

Th - დამხმარე T ლიმფოციტი

CD – უჯრედის დიფერენცირების მარკერი

MHC – მთავარი ჰისტოშეთავსებულობის კომპლექსი

CTLA4 - ციტოტოქსიკურ T ლიმფოციტთან ასოცირებული ანტიგენი 4

ილ - ინტერლეიკინი

ანოტაცია

სიმსივნის იმუნოლოგიის შესახებ სამეცნიერო ცოდნის დაგროვებასთან ერთად, იზრდება იმუნოთერაპიის როლი სიმსივნის მკურნალობაში. იმუნომოდულაცია ერთ-ერთია ყველაზე მზარდად გამოყენებადი მეთოდია თანამედროვე მედიცინაში სხვადასხვა სახის სიმსივნის სამკურნალოდ. უდიდესი წინსვლა იქნა მიღწეული ჰემატოლოგიური მალიგნიზაციის, მიელომისა და სხვადასხვა ტიპის სიმსივნის წინააღმდეგ თერაპიაში. დაგროვილი მონაცემები გვაძლევს საშუალებას ვიფიქროთ, რომ მყარი ორგანოების სიმსივნეების მკურნალობაში, პროსტატის სიმსივნის ჩათვლით, იმუნომოდულაცია ეფექტური იქნება. კლინიკურ კვლევებში ნანახია თერაპიის დადებითი შედეგები, თუმცა იმუნური მექანიზმები ბოლომდე ცნობილი არ არის და დამატებით შესწავლას საჭიროებს.

წინამდებარე კვლევის მთავარი მიზანი იყო დენდრიტული უჯრედების მოქმედების მექანიზმების დადგენა 5-აზაციტიდინითა და ლენალიდომიდით სტიმულირებისას; ასევე სიმსივნური ანტიგენის პრეზენტაციისა და ადაპტური იმუნური პასუხის თავისებურებების კვლევა.

დენდრიტული უჯრედების როლის კვლევა სიმსივნის იმუნოპათოგენეზში და მათი სტიმულაციით ანტისიმსივნური იმუნური პასუხის გაძლიერება ერთ-ერთი აქტუალური მიმართულებაა სიმსივნის შემსწავლელ სამეცნიერო ჯგუფებში. ისინი პროფესიული ანტიგენწარმდგენი უჯრედებია და დღეისთვის ნათელია, რომ ცენტრალური ადგილი უჭირავს იმუნურ სისტემაში. ამრიგად, ისინი მთავარი სამიზნე რგოლია სიმსივნის საწინააღმდეგო თერაპიული იმუნიტეტის გამომუშავებისთვის.

სხვადასხვა კვლევის ფარგლებში ნანახია აზაციტიდინისა და ლენალიდომიდის მოქმედება T ლიმფოციტებსა და ნატურალურ კილერებზე, თუმცა ჯერ უცნობია მათი გავლენა დენდრიტულ უჯრედებზე. ასევე არ არსებობს მონაცემები პროსტატის კიბოს მკურნალობის შესახებ მათი კომბინაციით. მიუხედავად იმისა, რომ ნანახია ამ პრეპარატთა დადებითი შედეგები კლინიკურ კვლევებში, შეუსწავლელია იმუნური მექანიზმები, რომლებიც შედეგებს უდევს საფუძვლად.

დაგეგმილი in vivo კვლევის ფარგლებში, პროსტატის სიმსივნური ხაზის RM-1 უჯრედების C57BL/6 თაგვებში კანქვეშ ინექციერებით მივიღეთ თაგვის სიმსივნური

მოდელი. იმუნომოდულატორების, 5-აზაციტიდინისა (5-აზაც) და ლენალიდომიდის (ლენა) შეყვანის შემდეგ ვაწარმოებდით სიმსივნის ზრდის მონიტორინგს. In vitro კვლევისთვის თაგვის ძვლის ტვინიდან გავზარდეთ დენდრიტულ უჯრედები GM-CSF და ილ-4-ით სტიმულაციით. უჯრედულ კულტურებზე გამოვცადეთ 5-აზაც-ის და ლენა-ს სხვადასხვა დოზები, როგორც ცალ-ცალკე, ისე კომბინაციაში. სტიმულაციის შემდეგ მოვახდინეთ უჯრედების ფენოტიპირება გამდინარე ციტომეტრიით, რათა შეგვესწავლა უჯრედული მარკერების ექსპრესიაზე საკვლევი პრეპარატების მოქმედება. ჩატარებული კვლევის შედეგად მივიღეთ ანტიგენის გაძლიერებული წარდგენა დენდრიტული უჯრედების მიერ. ანტიგენწარმდგენი მთავარი მოლეკულების და კომასტიმულირებელი რეცეპტორების (MHC II, CD40, CD80, CD86, CD205, MHC I) ექსპრესიის ხარისხი, რომლებიც ანტიგენის პრეზენტაციაში მონაწილეობენ გაიზარდა დაახლოებით 10%-ით. რაც შეეხება T რეგულატორულ უჯრედებს მათი რაოდენობა შემცირებულია.

მიღებული შედეგებზე დაყრდნობით, შესაძლოა დავასკვნათ, რომ იმუნოთერაპია 5-აზაციტიდინისა და ლენალიდომიდის კომბინაციით ანტისიმსივნური იმუნური პასუხის მოდულაციის საშუალებას გვაძლევს და რეკომენდებულია მათი კომბინაციის გამოყენება ანტისიმსივნურ იმუნოთერაპიაში.

Annotation

Though the benefits of therapy have been shown in clinical trials, the underlying immune mechanisms responsible for the outcomes have not been completely elucidated. With clinical research confirming the benefits of combination therapy over monotherapy, it has become more important than ever to define the effects each drug has upon the immune system and the target malignancy so that new regimens might be created to maximize efficacy and minimize side effects. To research the role of dendritic cells in cancer imunopathogenesis and enhancement of anti-tumor immune response by stimulation is one of the actual direction in cancer research scientific groups. Immunomodulatory drugs are being used with increasing frequency to treat various cancers. And although some of the greatest advancements have been achieved in the treatment of hematologic malignancies, a growing body of evidence exists to suggest a benefit in the treatment of solid organ tumors, including prostate cancer. As our understanding of tumor immunology has evolved, the role for immunotherapy in the treatment of malignancy has evolved as well. Today we already have data how to treat hematologic malignisation, myeloma and other types of cancer with immunomodulatory drugs.

Researches show effects of 5-azacitidin and Lenalidomid on T lymphocytes and natural killers, but there is no data about effects on dendritic cells. Also, they has not been used together in prostate cancer treatment yet.

Aim of our project was to determine anti-tumoral effects of dendritic cells stimulated with imunomodulatory drugs, such as 5-azacitidine and Lenalidomide.

Results of this research suggest enhancement of antigen presentation by dendritic cells. Expression rate of the molecules (MHC II, CD40, CD80, CD86, CD205, MHC I)which play main role in this process was raced by 10%. Treg cells where detected to decrease in number by 34%. Referring this results we can suppose that immunotherapy with 5-azacytidine and Lenalidomide can be used to enhance anti-tumor immune response.

შინაარსი

1.	შესავალი	8
1.1.	თემის აქტუალობა	8
1.2.	კვლევის მიზანი და ამოცანები	10
1.3.	კვლევის შედეგების სამეცნიერო ღირებულება და პრაქტიკულიგამოყენება	11
2.	ლიტერატურის მიმოხილვა	13
2.1	ანტისიმსივნური იმუნური პასუხის მექანიზმები	13
2.2	დენდრიტული უჯრედები	14
2.3	T რეგულატორები	17
2.4	სიმსივნის ანტიგენები	18
2.5	CD8+ T უჯრედები და ანტისიმსივნური იმუნიტეტი	18
2.6	CD4+ T უჯრედები, მათი როლი ანტისიმსივნურ იმუნიტეტში	19
2.7	MHC II კლასი და იმუნოთერაპია	19
2.8	MHC II კლასის აფრეგულაცია	20
3.	კვლევის მასალა და ობიექტი	21
3.1	კვლევაში გამოყენებული CD მარკერები	21
3.1.1	MHC II კლასი	21
3.1.2	CD80/CD86	21
3.1.3	CD40	21
3.1.4	CD11c	21
3.1.5	CD205	21
3.1.6	MHC I	21
3.1.7	CD4	22
3.1.8	CD25	22
3.2	5-აზაციტიდინი	22
3.3	ლენალიდომიდი	24
3.4	RM1 უჯრედები	25
3.5	ლაბორატორიული ცხოველები	26

3.6	ცხოველური მოდელები სიმსივნეებში	26
3.7	პროსტატის სიმსივნე	26
4.	კვლევის მეთოდები	29
4.1	პროსტატის სიმსივნის თაგვის მოდელის მიღება და პრეპარატების გამოცდა	29
4.2	დენდრიტული უჯრედების გაზრდა და პროლიფერაცია საკვლევი პრეპარატების თანაობისას	30
4.3	იმუნოფლუორესცენციის მეთოდი გამდინარე ციტომეტრიის გამოყენებით	31
5.	ექსპერიმენტალური კვლევის შედეგები და განხილვა	33
5.1.	დენდრიტული უჯრედების იმუნოფენოტიპირების შედეგები	33
5.2.	T რეგულატორული უჯრედების იმუნოფენოტიპირების შედეგები	35
6.	დასკვნა	38
7.	გამოყენებული ლიტერატურა	39

1. შესავალი

1.1. თემის აქტუალობა

იმუნომოდულაცია ერთერთია იმ მრავალ მეთოდს შორის, რომელიც თანამედროვე მედიცინაში სხვადასხვა სახის სიმსივნის სამკურნალოდ უფრო და უფრო ხშირად გამოიყენება. სიმსივნის იმუნოლოგიის შესახებ სამეცნიერო ცოდნის დაგროვებასთან ერთად, იზრდება იმუნოთერაპიის როლი სიმსივნის მკურნალობაში. უდიდესი წინსვლები იქნა მიღწეული ჰემატოლოგიური მალიგნიზაციის, მიელომისა და სხვადასხვა ტიპის სიმსივნის წინააღმდეგ თერაპიაში. დაგროვილი მონაცემები გვაძლევს საშუალებას ვიფიქროთ, რომ მყარი ორგანოების სიმსივნეების მკურნალობაში, პროსტატის სიმსივნის ჩათვლით, იმუნომოდულაცია ეფექტური იქნება. (1) კლინიკურ კვლევებში ნანახია თერაპიის დადებითი შედეგები, თუმცა შედეგის მომცემი იმუნური მექანიზმები ბოლომდე ცნობილი არ არის და დამატებით შესწავლას საჭიროებს.

წინამდებარე კვლევის მიზანი იყო დაგვედგინა 5-აზაციტიდინითა და ლენალიდომიდით სტიმულირებული დენდრიტული უჯრედების (DC) ანტიგენის პრეზენტაციის მოლეკულური მექანიზმები. დენდრიტული უჯრედების როლის კვლევა სიმსივნის იმუნოპათოგენეზში და მათი სტიმულაციით ანტისიმსივნური იმუნური პასუხის გაძლიერება ერთერთი აქტუალური მიმართულებაა სიმსივნის შემსწავლელ სამეცნიერო ჯგუფებში. ისინი პროფესიონალური ანტიგენწარმდგენი უჯრედებია და დღეისთვის ნათელია, რომ ცენტრალური ადგილი უჭირავთ იმუნურ სისტემაში. ამრიგად, ისინი მთავარი სამიზნე რგოლია სიმსივნის საწინააღმდეგო თერაპიული იმუნიტეტის გამომუშავებისთვის.

5-აზაციტიდინი და სხვა ანალოგიური დნმ-ის ინჰიბიტორები, ნაჩვენებია, ზრდიან სიმსივნის წარდგენას იმუნური სისტემისთვის სხვადასხვა მექანიზმებით, რომელებიც მოიცავს როგორც სიმსივნის ანტიგენების აფრეგულაციას, ისევე პირდაპირ ციტოტოქსიკურ ეფექტს სიმსივნის უჯრედების დნმ-ის დემეთილირების შედეგად.

ლენალიდომიდი და მისი ანალოგები თალიდომიდისაგან მიღებული სინთეთიკური ნაერთებია ნაკლები ნეიროლოგიური გვერდითი ეფექტებით, რომლებიც

ქიმიოთერაპიულ პრეპარატებთან თანაობისას აძლიერებს ბუნებრივ და ადაპტურ იმუნურ პასუხებს ავთვისებიან ზრდაზე პასუხის გაუმჯობესების შედეგად. (2) პროსტატის სიმსივნე ორივე სქესში გავრცელებულ სიმსივნეებს შორის სიხშირით მეოთხეა და მეორე მამაკაცებში. 2012 წელს ეს დიაგნოზი დაახლოებით 1,1 მილიონი მამაკაცს დაუსვეს მსოფლიოში, რაც მამაკაცებში სიმსივნის დიაგნოზების 15%-ს შეადგენს. ხოლო უფრო განვითარებულ რეგიონებში 70%-ს (759000). (WHO, 2012). სიკვდილიანობის მაჩვენებლით სხვა ავთვისებიან სიმსივნეებს შორის მეორე ყველაზე ხშირი გამომწვევია ფილტვის კიბოს შემდეგ. (3) მიუხედავად იმისა, რომ ადრეული დიაგნოსტიკა ბოლო წლების მანძილზე გაუმჯობესდადა კომპლექსური თერაპიის ახალი მეთოდები დაინერგა, არსებული სტატისტიკა უცვლელი რჩება. პროსტატის კარცინომის სამკურნალოდ, სტადიის გათვალისწინებით, მიმართავენ ქირურგიულ ჩარევას, რადიო, ქიმიოთერაპიასა ან/და ჰორმონულ თერაპიას. თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ ქიმიოთერაპია ხასიათდება არასელექტიურობითა და არასასურველი გვერდითი ეფექტებით. ხოლო რადიოთერაპიის გამოყენება შეზღუდულია სიმსივნის ლოკალიზაციით და მეტასტაზების არსებობის შემთხვევაში არაეფექტურია. რაც შეეხება ჰორმონოთერაპიას, იგი მხოლოდ ჰორმონდამოკიდებული პროსტატის კიბოს მკურნალობისას არის ეფექტური. დღეისათვის, ამ კვლევაში გამოყენებული პრეპარატები გამოიყენება სხვა ქიმიოთერაპიულ საშუალებებთან ერთად კომბინაციაში ზოგიერთი ჰემატოლოგიური სიმსივნეების სამკურნალოდ და იძლევა სხვადასხვა შედეგს. (4) კვლევებიდან ჩანს, რომ 5-აზაციტიდინით მკურნალობისას ლენალიდომიდის დამატება თერაპიულ შედეგს იძლევა ავთვისებიანი სიმსივნის შემთხვევაში. (5)

ვინაიდან არ იყო ცნობილი თერაპიის შედეგის განმაპირობებელი მექანიზმები, შევისწავლეთ 5-აზაციტიდინისა დალენალიდომიდის კომბინირებული გამოყენების პარამეტრები პროსტატის სიმსივნის სამკურნალოდ.

1.2. კვლევის მიზანი და ამოცანები;

კვლევის მთავარი მიზანი იყო დენდრიტული უჯრედების მოქმედების მექანიზმების დადგენა 5-აზაციტიდინითა და ლენალიდომიდით სტიმულირებისას; ასევე სიმსივნური ანტიგენის პრეზენტაციისა და ადაპტური იმუნური პასუხის თავისებურებების კვლევა.

ნანახია, რომ ლენალიდომიდი აძლიერებს დენდრიტული უჯრედების პროლიფერაციას in vitro, ხოლო მაღალი დოზა თაგვის პროსტატის კიბოს უჯრედებისთვის ტოქსიკურია. ვინაიდან ამ მიმართულებით ღრმა კვლევები აქამდე არ ჩატარებულა, ეს შედეგები ჯერ-ჯერობით არ არის სტაისტიკურად სარწმუნო. საჭიროა კვლევების გაგრძელება სტატისტიკური სანდოობის მისაღწევად.

ლენალიდომიდის მოქმედება იმუნური სისტემის ფუნქციონირებაზე, მიღებული მონაცემების თანახმად, პროლიფერაციის გაძლიერებით არ გამოიხატება, რადგან უმნიშვნელოდ მოქმედებს მასზე. სავარაუდოდ, ეფექტი სხვა მექანიზმით მიიღწევა. დენდრიტული უჯრედების მარკერების ექსპრესიის შესწავლამ აჩვენა, რომ ლენალიდომიდის დამატება, ზრდის დენდრიტული უჯრედების მარკერების ექსპრესიას. შესაძლებელია, ლენალიდომიდის მაღალ კონცენტრაციას მასუპრესირებელი მოქმედება ქონდეს. ამდენად საჭირო გახდა ოპტიმალური დოზის დადგენა.

5-აზაციტიდინი დენდრიტული უჯრედების პროლიფერაციის დოზაზე დამოკიდებულ დაქვეითებას იწვევს. ვინაიდან იგი დნმ-ის მეთილირების ინჰიბიტორია, ციტოტოქსიკურია პროლიფერირებადი უჯრედებისათვის. მიუხედავად ამისა, როგორც ჩანს, 5-აზაციტიდინი ინტერლეიკინების IL12 და IL15 წარმოქმნის მატებითა და ენდოთელინის რეცეპტორის ექსპრესიის გაზრდით დენდრიტულ უჯრედებს ააქტივებს. აღნიშნული ინტერლეიკინების მატება, სავარაუდოდ, მოახდენს ბუნებრივი იმუნური სისტემის აქტივაციას ნატურალურ კილერებზე ზემოქმედების გზით, ხოლო ადაპტური იმუნიტეტის აქტივაციას მისი Th-უჯრედებზე მოქმედებით. მიუხედავად ამისა, ჩატარებული წინასწარი კვლევებით მიღებული შედეგები წინააღმდეგობაში მოდიოდა სხვა კვლევების შედეგებთან, ამდენად ისინი განმეორებას საჭიროებდნენ.

დასახული მიზნების მისაღწევად შევასრულეთ შემდეგი ამოცანები:

1. In vitro დენდრიტული უჯრედების პროლიფერაციის შესწავლა;

1.1. ლენალიდომიდით სტიმულაციისას;

1.2. 5-აზაციტიდინით სტიმულაციისას;

1.3. 5-აზაციტიდინისა და ლენელიდომიდის კომბინაციით სტიმულაციისას;

2. In vivo თაგვის პროსტატის სიმსივნის მოდელის მიღება C57BL/6j ხაზის თაგვებში;

3. 5-აზაციტიდინისა და ლენალიდომიდის ცალკეული ზემოქმედების in vivo შესწავლა;

4. სიმსივნის ზრდის შეფასება;

1.3. კვლევის შედეგების სამეცნიერო ღირებულება და პრაქტიკული გამოყენება

კვლევა მიზნად ისახავდა 5-აზაციტიდინისა და ლენალიდომიდის გავლენის შესწავლას დენდრიტული უჯრედებზე დამოუკიდებლად და კომბინაციაში. შეფასდა ანტისიმსივნური ეფექტის გაძლიერება in vivo და in vitro მოდელებში. გამოვავლინეთ ამ პრეპარატების მოქმედების იმუნური მექანიზმები. შედეგები ადასტურებს საკვლევი პრეპარატების მოქმედების გაძლიერებას სიმივნის წარდგენაში. მაშასადამე, თუ 5-აზაციტიდინის და ლენალიდომიდის კომბინაციის გამოყენებით ანტისიმსივნური იმუნური პასუხი მნიშვნელოვნად ძლიერდება, მაშინ მათი კომბინაციით მკურნალობა წარმატებული იქნება პროსტატის კარცინომის შემთხვევაში.

შესაძლებელია, რომ ეს კომბინაცია დაემატოს ამჟამად არსებულ იმუნოთერაპიულ მეთოდებს უკეთესი ეფექტურობის მისაღწევად. რაც შეეხება ქიმიური პრეპარატების დამოუკიდებელ მოქმედებას, დადგინდა მათი მოქმედების ზოგიერთი მექანიზმი, ეს კი წინ გადადგმული ნაბიჯია სიმსივნური ზრდის საწინააღმდეგო პრევენციული ვაქცინის მისაღებად დენდრიტული უჯრედების გამოყენებით. სამომავლოდ ამ მეთოდის გამოყენება შესაძლებელია ტუბერკულოზისა და აივ-ის საწინააღმდეგოდაც ეფექტური იყოს.

იმუნოთერაპია პროსტატისა და სხვა შარდსასქესო ავთვისებიანი სიმსივნეების მკურნალობის იმედის მომცემი მიმართულებაა. იგი თავს იმკვიდრებს როგორც მკურნალობის ალტერნატიული ფორმა. იმუნომოდულატორული წამლების, კერძოდ 5-აზაციტიდინის და ლენალიდომიდის კომბინაციაში გამოყენებამ შესაძლოა მოახდინოს იმუნური პასუხის მნიშვნელოვნად გაძლიერება და დადებითად იმოქმედოს პროსტატის კიბოს მკურნალობაში კლინიკურ კვლევებში.

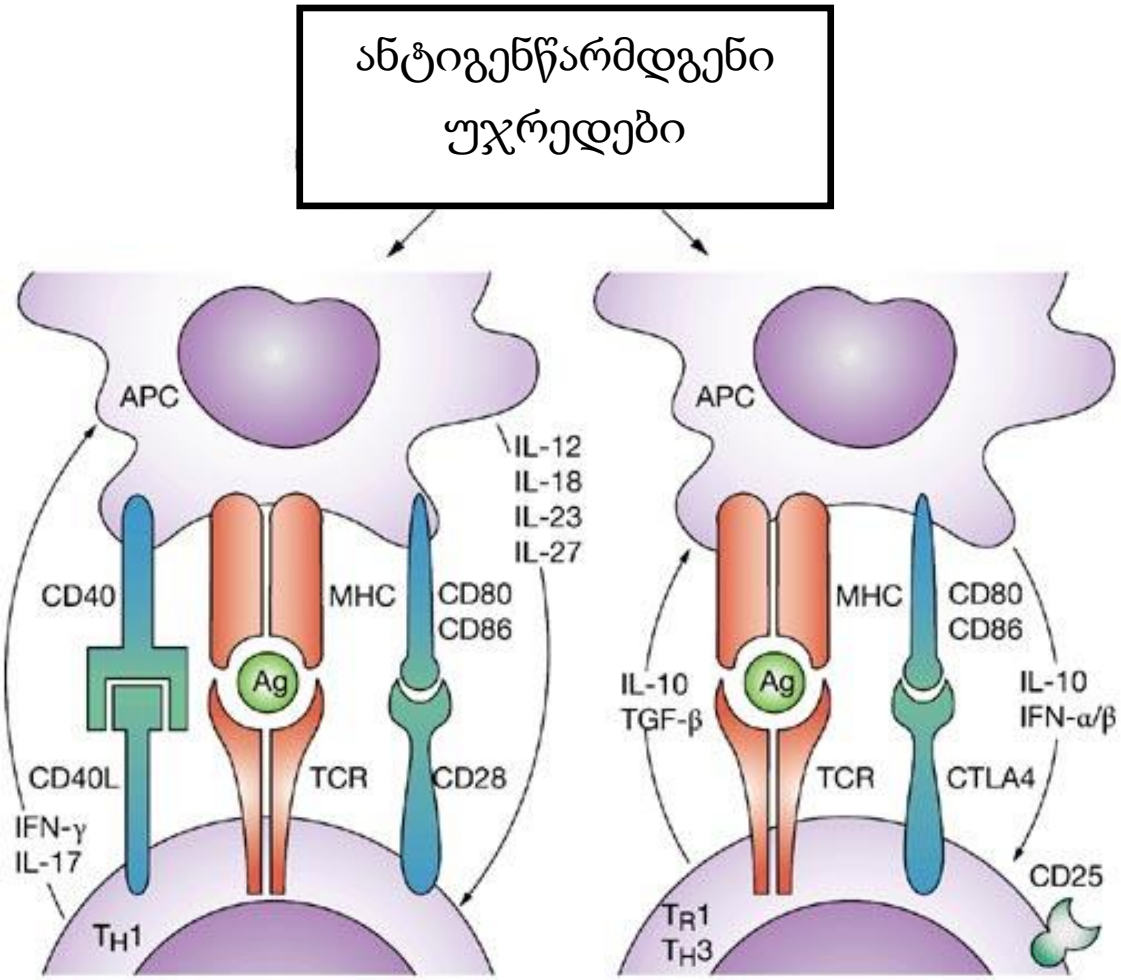
ყველაფერთან ერთად, წარმოდგენილი კვლევები ბიძგს აძლევს იმუნომოდულატორული თერაპიის გავლენის შესწავლას არა მხოლოდ პროსტატის კიბოზე, არამედ აგრეთვე იმუნურ სისტემაზეც. მოქმედების მექანიზმების ცოდნა გააადვილებს პროსტატის კიბოს ამგვარი თერაპიისათვის კომბინირებული მკურნალობის სქემაში ადგილის მონახვას. მიღებული ცოდნის საფუძველზე, შესაძლებელი გახდება შემდგომი კვლევების დაგეგმვა და წარმოება ეპიგენეტიკისა და იმუნომოდულაციის გამოყენებით, სხვადასხვა, არსებული ან ახლად შექმნილი, სიმსივნის ვაქცინების ან იმუნურ უჯრედებზე დაფუძნებული თარეპიის მიმართულებით.

2. ლიტერატურის მიმოხილვა

2.1. ანტისიმსივნური იმუნური პასუხის მექანიზმები

იმუნური პასუხი ორგანიზმის დამცავი მექანიზმია, რომელიც უზრუნველყოფს ორგანიზმში ჰომეოსტაზის შენარჩუნებას. იგი რთული პროცესია მასში ჩართული იმუნური უჯრედებითა და მოლეკულებით. იმუნური პასუხი აღიძვრება უცხო ანტიგენის ორგანიზმში მოხვედრისას, ან საკუთარი ანტიგენების მიმართ, ზოგიერთ შემთხვევაში. იმისათვის რომ ადაპტურმა იმუნურმა სისტემამ შეძლოს ანტიგენისადმი პასუხის აღძვრა, აუცილებელია პროფესიონალმა ანტიგენწარმდგენმა უჯრედებმა (APC): დენდრიტულმა უჯრედებმა, მაკროფაგებმა, B ლიმფოციტებმა, - გადამუშავებული ანტიგენი წარუდგინოს T ლიმფოციტებს MHC (მთავარი ჰისტოშეთავსების კომპლექსი) მოლეკულებით. უნდა აღინიშნოს, რომ არსებობს ამ მოლეკულის ორი კლასი: MHC I კლასის მოლეკულა ექსპრესირებულია ყველა ეუკარიოტულ უჯრედზე. ხოლო MHC II კლასი მხოლოდ პროფესიონალ ანტიგენწარმდგენ უჯრედებზე. ანტიგენის წარდგენის მექანიზმი განსხვავებულია ენდოგენური და ეგზოგენური ანტიგენების შემთხვევაში. ენდოგენური ანტიგენები APC-ის მიერ წარედგინება ციტოტოქსიკურ T ლიმფოციტს MHC I კლასის მოლეკულით, ხოლო ეგზოგენური დამხმარე T ლიმფოციტს MHC II კლასის მოლეკულით.

T ლიფოციტი მასზე ექსპრესირებული მოლეკულების მიხედვით რამდენიმე კლასად იყოფა. ჩვენთვის საინტერესოა T ციტოტოქსიკური (Tc) (CD45+,CD3+,CD8+), T ჰელპერი (Th) (CD45+, CD3+, CD4+) და T რეგულატორული (Treg) (CD4+, CD25+, Foxp3+) პოპულაციები. Tc პირდაპირი ციტოტოქსიკურობით კლავს სიმსივნურ უჯრედებს, ვირუსით ინფიცირებულ ან სხვამხრივ დაზიანებულ უჯრედებს. მას შემდეგ, რაც APC ანტიგენს წარუდგენს, იგი აქტიურდება და კლავს დაზიანებულ უჯრედებს ციტოტოქსინების: პერფორინის, გრანზიმებისა და გრანულიზინის გამოყენებით. ციტოტოქსინები ააქტიურებენ კასპაზების კასკადს და იწვევენ უჯრედის პროგრამირებულ სიკვდილს - აპოპტოზს. მეორე მექანიზმი კი Fas ცილის გზით წარიმართება და ასევე აპოპტოზს იწვევს.

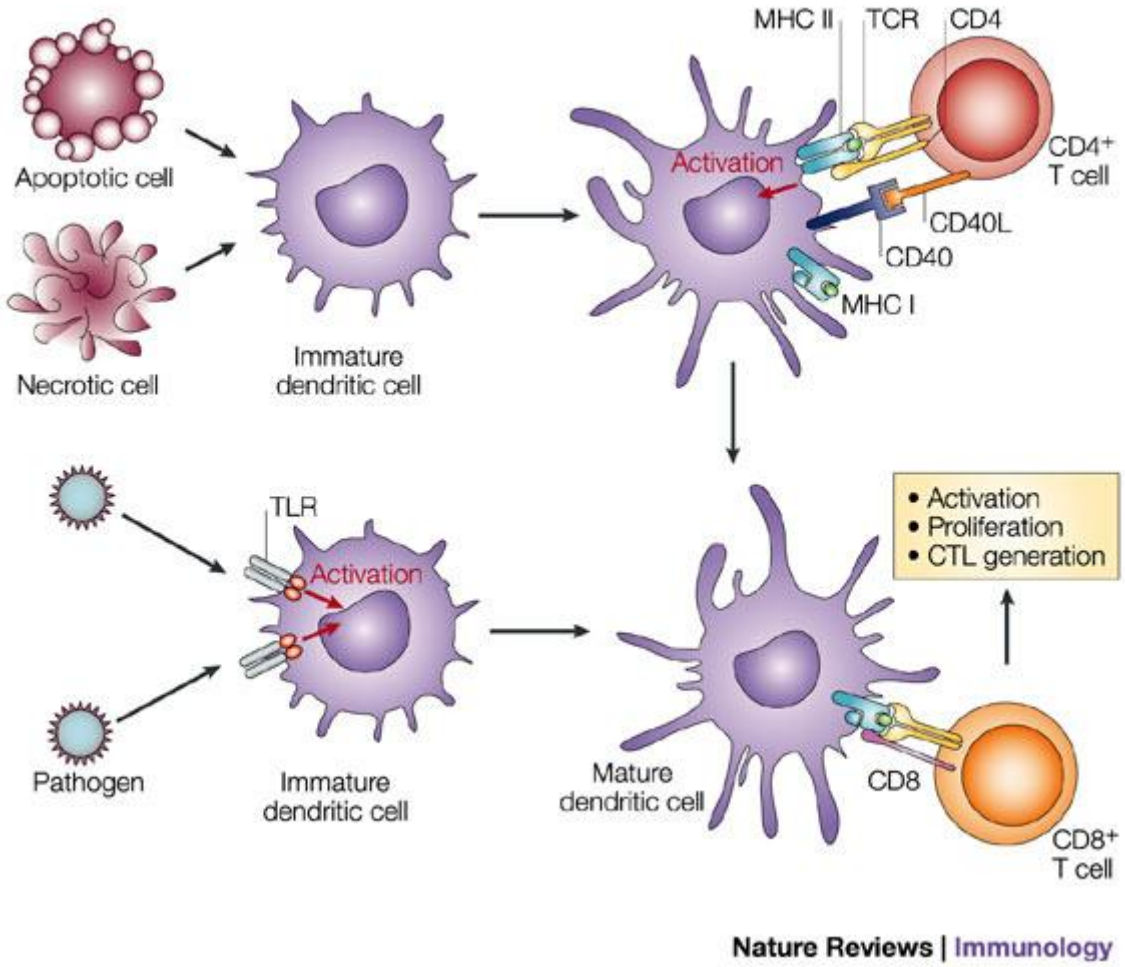


სურათი 1: ანტიგენის წარდგენაში მონაწილე მოლეკულები

Th უჯრედები იმუნურ სისტემაში მნიშვნელოვან ფუნქციებს ასრულებენ, ძირითადად ადაპტურ იმუნურ სისტემაში. ისინი ციტოკინების გამოყოფით სხვა იმუნურ უჯრედებს გააქტიურებაში ეხმარებიან. ეს უჯრედები იმუნური პასუხების სუპრესიას ან რეგულაციას ახდენენ. მხოლოდ ისინი უზრუნველყოფენ B ლიმფოციტების კლასის გადართვას, Tc-ების გააქტიურებასა და ზრდას. ზრდიან ფაგოციტების, როგორიცაა მაკროფაგები, ბაქტერიციდულ აქტივობას.

მომწიფებული T უჯრედები ექსპრესირებენ CD4 ზედაპირულ მოლეკულებს და მათ CD4+ T უჯრედებს უწოდებენ. ითვლება, რომ ასეთ T უჯრედებს დამხმარე უჯრედის წინასწარგანსაზღვრული როლი აქვთ იმუნურ სისტემაში. მაგალითად, როდესაც APC

ექსპრესირებს ანტიგენს MHC II კლასის მოლეკულის დახმარებით, CD4+ უჯრედი მათ უჯრედ-უჯრედული კავშირებით (CD40 და CD40L) და ციტოკინებით ეხმარება.



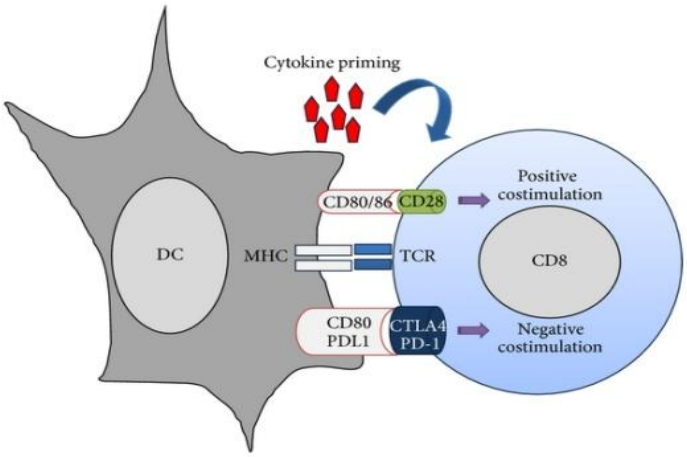
სურათი 2: დენდრიტული უჯრედების მიერ სიმსივნური ანტიგენის წარდგენა T ციტოტოქსიკურისა და დამხმარე T უჯრედისთვის.

2.2 დენდრიტული უჯრედები

დენდრიტული უჯრედები პროფესიონალი ანტიგენწარმდგენი უჯრედებია, რომლებიც გვხვდებიან კანში, ლორწოვან გარსებსა და ლიმფურ ქსოვილევში. მათი მთავარი ფუნქცია ანტიგენის გადამუშავება და შემდეგ T უჯრედებისთვის წარდგენაა. შედეგად

იმუნური პასუხი აღიძვრება უცხო ანტიგენების მიმართ, ხოლო საკუთარისადმი ტოლერანტობა ყალიბდება. ისინი ასევე გამოყოფენ ციტოკინებს იმუნური პასუხის რეგულაციისთვის. (6)

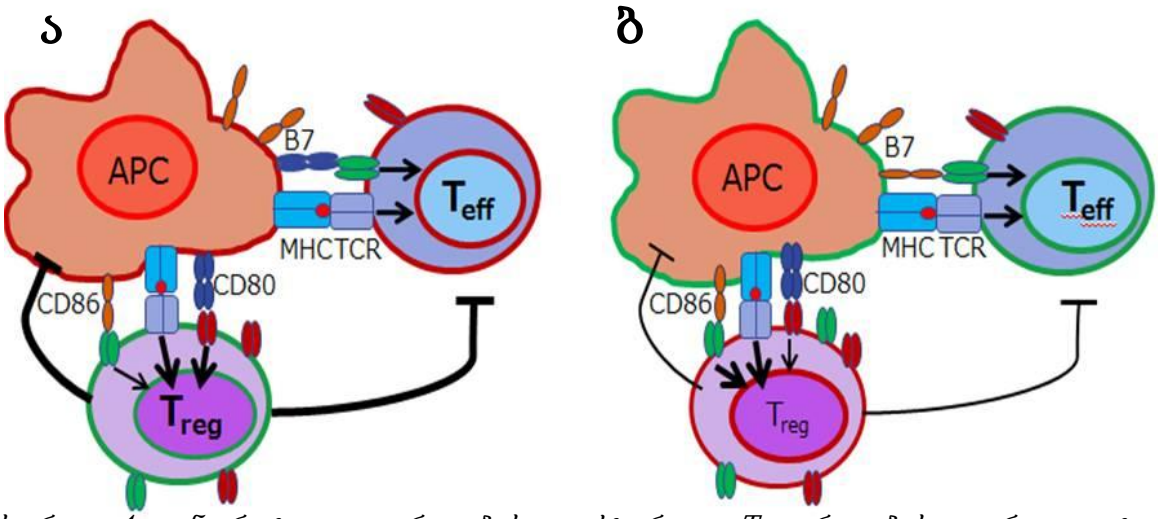
დენდრიტულ უჯრედები ანტიგენის წარსადგენად იყენებენ MHC I და II კლასის მოლეკულებს სხვა კოსტიმულატორულ მოლეკულებთან ერთად. ესენია CD 80/86 და CD40. MHC მოლეკულები მათში მოთავსებული ანტიგენის პეპტიდით ამოიცნობა T უჯრედული რეცეპტორის მიერ (TCR). Th უჯრედები CD4 მოლეკულითაც ამოიცნობს MHC II კლასს. ხოლო Tc CD8 მოლეკულით ამოიცნობს MHC I კლასს. CD40 მოლეკულის CD154 (CD40L)-თანდაკავშირებისასT უჯრედი ააქტიურებს ანტიგენწარმდგენ უჯრედს და ახდენს სხვადასხვა დაუნსთრიმ ეფექტების ინდუქციას. CD80 /CD86 წარმოქმნის T უჯრედების გააქტიურებისა და გადარჩენისთვის აუცილებელ კოსტიმულატორულ სიგნალებს. იმ შემთხვევაში თი ის CD28 მოლეკულას დაუკავშირდა. ეს პოზიტიური კოსტიმულაციაა. ხოლო თუ CTLA4 მოლეკულას დაუკავშირდა ნეგატიურ კოსტიმულაციას აქვს ადგილი და T უჯრედები ანერგიაში გადადის. CD28-სა და CTLA4 მოლეკულას შორის მუდმივი კონკურენციაა. ამ მექანიზმის რეგულაცია სიმსივნის იმუნოლოგიაში ახალ მიმართულებას წარმოადგენს. ლენალიდომიდს აქვს უნარი CD28-ის თიროზინის ფოსფორილირება მოახდინოს და T ლიმფოციტების კლონური ექსპანსია დაიწყოს მაშინაც, კი როცა CD80/86 მოლეკულა CTLA4-ით არის დაბლოკილი. (7) რეგულატორული T უჯრედები CTLA-4 მოლეკულით არეგულირებენ დენდრიტული უჯრედის აქტივობას. CTLA-4 შესაძლოა მთავარი მექანიზმია რომლითაც Treg-ები ანტიგენწარმდგენ უჯრედების ფუნქციონირებას აკონტროლებენ.



სურათი 3: დენდრიტული უჯრედების მიერ სიმსივნური ანტიგენის წარდგენა T ციტოტოქსიკური უჯრედისთვის. CD80/86-ის CD28-სთან დაკავშირება პოზიტიურ კოსტიმულაციას ახდენს, CTLA-4 -თან კი უარყოფითს.

2.3 T რეგულატორები

T რეგულატორული უჯრედები სიმსივნეებში ერთერთი მთავარი მარეგულიერგელია. სხვადასხვა სიმსივნეში ნანახია მათი მომატებული რაოდენობა. ამის მიზეზი სამი მთავარი მექანიზმია. პირველი CD4+CD25+Foxp3+Treg ანუ ბუნებრივად წარმოქმნილი Treg-ები ახდენენ სიმსივნის ინფილტრაციას. შემდეგ ამას მოსდევს ქემოკინური რეცეპტორის CCR4 და CCL22 ლიგანდის ექსპრესია ამ უჯრედებზე სიმსივნის ქსოვილში. მეორე, ზოგიერთი იმუნოკომპეტენტური უჯრედი MDSC-ები, DC-ები, მაკროფაგები და ნატურალური Treg-ები, ისევე როგორც თავად სიმსივნური უჯრედები ახდენენ CD4+Foxp3- უჯრედების მომწიფებას ე.წ. ინდუცირებულ Treg-ებად (Foxp3+) და/ან ილ-10-ის მაპროდუცირებელ Tr1 უჯრედებად (CD4+IL-10+Foxp3-) TGF-β და/ანილ-10-ის სეკრეციის გზით. მესამე, ცნობილია, რომ დისფუნქციური მიელოიდური უჯრედები სიმსივნური ქსოვილის შიგნით დამატებით ასტიმულირებს Treg-ების გამრავლებას. (8) მნიშვნელოვანია ფაქტი, რომ ამ დროს მიმდინარეობს ჯვარედინი დიალოგი სიმსივნეში ნანახ სხვადასხვა იმუნოკომპეტენტურ უჯრედს შორის, ისევე როგორც იმუნურ და სიმსივნურ უჯრედებს ან თავად სიმსივნურ უჯრედებს შორის. ეს ჯვარედინი დიალოგები გვარწმუნებს, რომ სიმსინვუნრი ქსოვილი რჩება იმუნომასუპრესირებელი უჯრედების, მაგალითად Treg-ების, თავშესაფრად. (9)



სურათი 4: დენდრიტული უჯრედების, ეფექტორული T უჯრედებისა და რეგულატორული T უჯრედების ურთიერთობა. ა) გაძლიერებული სუპრესია, შემცირებული პროლიფერაცია. ბ) შემცირებული სუპრესია, გაძლიერებული პროლიფერაცია.

2.4 სიმსივნის ანტიგენები

სიმსივნური ანტიგენები ექსპრესირდება სიმსივნურ უჯრედებზე და შეიცნობიან ნორმალურისაგან განსხვავებულობის გამო. უმეტესად სიმსივნური ანტიგენები ენდოგენურად სინთეზირებული მოლეკულებია და MHC I კლასის მოლეკულებით CD8+ T ლიმფოციტებს წარედგინება. ასეთი ანტიგენები შეიცავს ონკოგენების პროდუქტებს ან სიმსივნის სუპრესორი გენების, ან სხვა მუტანტურ გენებს, ან იმ გენთა პროდუქტებს რომლებიც ნორმაში გაჩუმებულია, ან ნორმაზე მეტად ექსპრესირებლი გენების პროდუქტები, ონკოგენური ვირუსების პროდუქტები, ონკოფეტალურ ანტიგენებს (ცილები რომლებიც ნორმაში მხოლოდ ემბრიოგენეზის დროს აქტიურდება) გლიცოლიპიდები და გლიკოპროტეინები. MHC II კლასით წარდგენილი ანტიგენები ჯერჯერობით კარგად შესწავლილი არ არის. ახალი ტექნოლოგიების განვითარებით შესაძლებელი გახდა ზოგიერთი მათგანის იდენტიფიცირება, თუმცა დამატებითი კვლევებია საჭირო. (10)

2.5 CD8+ T უჯრედები და ანტისიმსივნური იმუნიტეტი

ისტორიის მანძილზე, CD8+ T უჯრედების ანტისიმსივნურ როლზეუფრო მეტი ყურადღება ეთმობოდა ვიდრე CD4+ T უჯრედებს. ეს რამდენიმე ფაქტთანაა დაკავშირებული: CD4+ T ლიმფოციტები აღიქვამენ მხოლოდ MHC II კლასით წარდგენილ ანტიგენებს. ამასთან უჯრედების უმრავლესობას მხოლოდ MHC I კლასი აქვს ექსპრესირებული. მეორე, CD8+ T უჯრედებს, ანტიგენის ამოცნობის შემდეგ, შეუძლიათ პირდაპირ მოკლან სიმსივნური უჯრედებიმათში აპოპტოზის მექანიზმის ჩართვის გზით. ამ მექანიზმებს ჩვენ არ განვიხილავთ, თუმცა ისინი კარგადაა შესწავლილი (11) და ბოლოს, უკეთესადაა შესწავლილი MHC I კლასით წარდგენილი ანტიგენები. MHC II კლასის ანტიგენები კი ჯერ კარგად გამოკვლეული არ არიან. (12)

ფიქრობენ, რომ CD4+ T უჯრედები პირდაპირ არ არიან ჩართული ანტისიმსივნურ იმუნიტეტში, თუმცა ანტიგენმაპრეზენტირებელი უჯრედების აქტივაციისა და MHC I კლასით ანტიგენის პრეზენტაციის გაძლიერების გზი, აძლიერებენ CD8+ T უჯრედულ

პასუხს. ისინი ასევე გამოყოფენ იმუნური პასუხის გამაძლიერებელ ციტოკინებს, როგორიცაა ილ-2.

2.6 CD4+ T უჯრედები, მათი როლი ანტისიმსივნურ იმუნიტეტში

CD4+ T უჯრედების როლი ანტისიმსივნურ იმუნურ პასუხში ჯერ კიდევ საკამათოა. ვარაუდობენ, რომ CD4+ T უჯრედებს შეუძლიათ თავად ამოიცნონ სიმსივნური უჯრედების ზედაპირზე MHC II კლასის მოლეკულებით ექსპრესირებული სიმსივნური ანტიგენები. (13) თუმცა უკანასკნელი მონაცემების მიხედვით სიმსივნური უჯრედების პირდაპირი ამოცნობა სიმსივნურ ანტიგენსპეციფიკური CD4+ T უჯრედების მიერ ყოველთვის სასარგებლო არ არის. მაგალითად, ბოლოდროინდელი კვლევებით დადგინდა, რომ CD4+ T უჯრედები სიმსივნური ანტიგენის ამოცნობის შემდეგ თავდაპირველად გამოყოფს TNF მოლეკულებს მელანომაში. TNF-მა შესაძლოა ლოკალური იმუნოსუპრესია გამოიწვიოს და გააუარესოს CD8+ T უჯრედების ეფექტორული ფუნქციები. (14)

2.7 MHC II კლასი და იმუნოთერაპია

ზემოთხსენებული მრავალი მექანიზმის მიხედვით, ანტისიმსივნურ იმუნიტეტში მონაწილე CD4+ T უჯრედების აქტიურობა დამოკიდებულია ანტიგენწარმდგენი უჯრედების მიერ სიმსივნური უჯრედის ფაგოციტოზის და მათი ანტიგენების MHC II კლასით პრეზენტაციის უნარზე. საკმაოდ იშვიათად ხდება, რომ სიმსივნურმა უჯრედებმა MHC II კლასით თავად წარუდგენონ ანტიგენი პირდაპირ გააქტიურებულ CD4+ T უჯრედებს. აქედან გამომდინარე, ორი მიდგომა არსებობს CD4+ T უჯრედების გასააქტიურებლად. ყველაზე მარტივი მიდგომა ადჰეზიური მოლეკულების აფრეგულაციაა, რაც გახანგრძლივებულ პრეზენტაციას უზრუნველყობს ანტიგენწარმდგენი უჯრედების მხრიდან. (15) მეორე მიდგომა გულისხმობს სიმსივნურ უჯრედებზე MHC II კლასის მოლეკულების ექსპრესიის ზრდას. ეს მიდგომა ჯერჯერობით არ გამოუცდიათ in vivo, თუმცა ჩატარებულია ინექციები, რომელშიც

გამოიყენეს ხელოვნურად შეცვლილი სიმსივნური უჯრედები, რომლებიც MHC II კლასს ექსპრესირებდა. (16) თაგვებში, რომლებსაც შეუყვანეს დასხივებული ეს უჯრედები, უფრო ძლიერი იმუნური პასუხი აღიძრა იგივე სიმსივნეზე. ეს მიგნებები სამომავლოდ საიმედო შედეგებს გვპირდება სიმსივნის ვაქცინების შემუშავებაში.

2.8 MHC II კლასის აფრეგულაცია

MHC II კლასის მოლეკულებს მაღალი პოლიმორფიზმი ახასიათებთ, ამის გამო ამ ცილების პირდაპირი ტრანსფუზია არაპრაქტიკულია სიმსივნის საწინააღმდეგო ვაქცინის შესაქმნელად. (17)არსებობს კიდევ ორი ალტერნატიული მეთოდი MHC II კლასის მოლეკულების ექსპრესიის ზრდის მისაღწევად MHC II კლასის არ მქონე უჯრდებში. პირველი მეთოდი გულისხმობს IFNγ -ს შეყვანას, რასაც MHC II კლასის მომატებულ ექსპრესიას იწვევს. (18) მეორე, უფრო ეფექტური მიდგომა მოიცავს იმ გენების აქტივაციას, რომლებიც II კლასის სინთეზზეა პასუხისმგებელი. ამ მეთოდით MHC II- უჯრედები MHC II+ ხდებიან. (19) ზოგიერთ სიმსივნეში, მაგალითად მწვავე მიელოიდური ლეიკემია (AML), უჯრედები MHC II+ არიან, თუმცა ზედაპირზე არ ექსპრესირებენ ზოგიერთი გენის (CIITA პრომოტორი) მეთილირების გამო (20) და მისი დემეთილირებით შესაძლებელია MHC II კლასის ექსპრესიის აღდგენა. წინამდებარე ნაშრომში გამოყენებული ერთერთი იმუნომოდულატორული პრეპარატი 5-აზაციტიდინი დნმ-ის მეთილირებული უბნების დემეთილირებას ახდენს. ამდენად, გასაგები ხდება მისი კვლევაში გამოყენების მიზეზი.

3. კვლევის მასალა და ობიექტი

3.1. კვლევაში გამოყენებული CD მარკერები

3.1.1. MHC II კლასი პროფესიონალ ანტიგენწარმდგენ უჯრედებზე ექსპრესირებს. მისი საშუალებით ეგზოგენური ანტიგენის პრეზენტაცია ხდება CD4+ T უჯრედებისთვის. იგი ამოიცნობა TCR-ის მიერ. ხასიათდება მაღალი პოლიმორფიზმით. MHC II კლასი წამყვანი მოლეკულაა ადაპტური იმუნური პასუხის ჩამოყალიბების პროცესში.

3.1.2. CD80/CD86 ექსპრესირდება ანტიგეწარმდგენ უჯრედებზე. ეს მოლეკულები წარმოქმნიან T უჯრედების გააქტიურებისა და გადარჩენისთვის აუცილებელ კოსტიმულატორულ სიგნალებს. ანტიგენის პრეზენტაციის შემდეგ სწორედ ამ მოლეკულებით გადაცემული სიგნალი იწვევს ანტიგენსპეციფიკური T კლონის გამრავლებას.

3.1.3. CD40 ექსპრესირდება ანტიგენწარმდგენ უჯრედებზე და CD154 (CD40L) -თან დაკავშირებისას ააქტიურებს ანტიგენწარმდგენ უჯრედს, რითაც ახდენს სხვადასხვა დაუნსთრიმ ეფექტების ინდუქციას. მას მნიშვნეოვანი როლი აკისრია ანტიგენის წარდგენის პროცესში.

3.1.4. CD11c ექსპრესირებს დენდრიტულ უჯრედებზე, მონოციტებზე, მაკროფაგებზე,ნეიტროფილებზე და ზოგიერთ B უჯრედზე. იგი გამოიყენება დენდრიტული უჯრედების მარჯერად თავებში. CD11c/CD18 კომპლექსი რეცეპტორია კომპლემენტის კომპონენტის iC3b ასევე ფიბრინოგენისა და მონაწილეობს უჯრედის ადჰეზიაში. CD11c ასევე ებმის კომპლემენტის ფაქტორს Bb. CD11c იმუნური პასუხების რეგულაციაში მნიშვნელოვანი ადგილი უჭირავს.

3.1.5. CD205 ექსპრესირდება ძირითადად დენდრიტულ უჯრედებზე, თიმუსის ეპითელიუმზე. იგი შესაძლოა გამოყენებული იყოს როგორც დენდრიტული უჯრედების მარკერი. ეს მემბრანული ცილა ენდოციტური რეცეპტორია და ანტიგენის ეფექტურ პროცესინგსა და პრეზენტაციას უზრუნველყოფს in vivo. რაც T უჯრედების გააქტიურებაზე ან ტოლერანტობის ჩამოყალიბებაზე აისახება.

3.1.6. MHC I ყველა ეუკარიოტულ უჯრედზე ექსპრესირდება. იგი ანტიგენს წარუდგენს CD8+ T უჯრედებს. მისი საშუალებით Tc უჯრედებს წარედგინება ენდოგენური ანტიგენები. ახასიათებს მაღალი პოლიმორფიზმი.

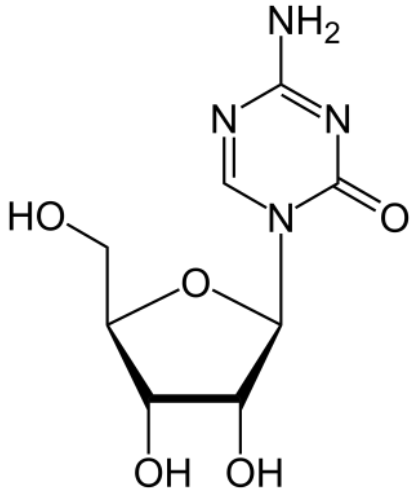
3.1.7. CD4 მოლეკულები ექსპრესირებს Th, Treg და T4 უჯრედებზე. იგი წარმოადგენს T უჯრედული რეცეპტორის (TCR) კორეცეპტორს ანტიგენის პრეზენტაციის პროცესში. ის აძლიერებს TCR-ის სიგნალს და ააქტიურებს სასიგნალო გზებს.

3.1.8. CD25 ესქსპრესირებს უმეტეს B ლიმფოციტზე, T რეგულატორებზე, თიმოციტებზე, მიელოიდური ხაზის პრეკურსორებზე, ოლიგოდენდროციტებზე. ის ილ-2 -ის რეცეპტორის ალფა ჯაჭვია. ეს მოლეკულა გამოიყენება CD4+FoxP3+ T რეგულატორების მარკერად თაგვებში.

3.2. 5-აზაციტიდინი

5-აზაციტიდინი და მისი ანალოგები, დნმ-ში მეთილტრანსფერაზას ინჰიბიტორები, როგორც კვლევებმა აჩვენა, ზრდის სიმსივნის ექსპოზიციას იმუნური სისტემისათვის სხვადასხვა მექანიზმებით, რომლებიც მოიცავს სიმსივნური ანტიგენების გენების ექსპრესიის აფრეგულაციას, ასევე სიმსივნური უჯრედების პირდაპირ ციტოტოქსიურ ეფექტებს დნმ-ის დემეთილირების შედეგად. 5-აზაციტიდინი ის გამოიყენება სხვადასხვა ტიპის სიმსივნეების იმუნოთერაპიაში. ნანახია, რომ 5-აზაციტიდინი განსხვავებულად მოქმედებს არა მხოლოდ სხვადასხვა სახეობებში, არამედ ერთი სახეობის შიგნით სხვადასხვა სიმსივნურ უჯრედებზე. ბისულფიტური სექვენირებით დამტკიცებულია გენის სპეციფიური პრომოტორის რეგიონის დემეთილიზაციასა და მასთან ასოცირებული გენის ექსპრეციის ზრდის შორის კორელაცია. ამასთან მკურნალობა 5-აზაციტიდინის დიდი დოზებით ტოქსიკური აღმოჩნდა მხოლოდ სიმსივნური უჯრედებისთვის და არა ჯანმრთელთათვის მკერდის ყველა უჯრედული ხაზისთვის ყველა სახეობაში, რაც ამ პრეპარატის თერაპიულ პოტენციალზე მიუთითებს. (21) დნმ-ის მეთილირების დაქვეითებას გავლენა აქვს სიმსივნის დიფერენცირებასა და სიმსივნეგენურობაზე და 5-აზა შესაძლოა ახდენდეს როგორც ქრომოსომული აბერაციების ინდუცირებას, ასევე დნმ-ის მეთილირების ცვლილებას (22). ვინაიდან ნანახია პრეპარატის დადებითი ეფექტი მკვრივი კონსისტენციის სიმსივნეზე, შესაძლოა ვივარაუდოთ, რომ ამ პრეპარატს მსგავსი პოზიტიური ეფექტი ექნება პროსტატის სიმსივნის მოდელშიც.

აზაციტიდინის მოქმედეის მექანიზმი ჯერჯერობით ბოლომდე ცნობილი არ არის. იგი წარმოადგენს ციტოზინის ანალოგს და არის რიბონუკლეოზიდი, რაც იმას ნიშნავს რომ უფრო მეტად რნმ-ს უკავშირდება ვიდრე დნმ-ს. რნმ-სთან ურთიერთქმედება იწვევს პოლირიბოსომების დაშლას, დეფექტურ მეთილირებას და ცილის სინთეზის ინჰიბირებას. (23) დნმ-სთან ურთიერთქმედებისას კოვალენტურად ებმის მეთილტრანსფერაზას, რაც დნმ-ს სინთეზს უშლის ხელს და იწვევს ციტოტოქსიკურ ეფექტს.

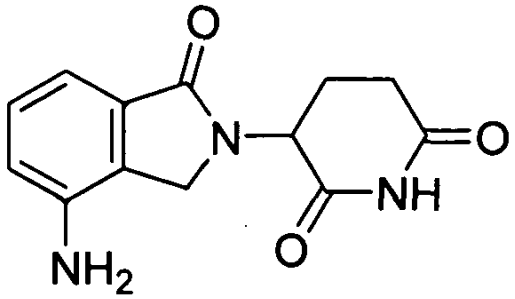


სურათი 4: 5-აზაციტიდინის ქიმიური ფორმულა

რაკი აზაციტიდინი ციტოზინის ანალოგია, შეუძლია დაიკავოს მისი ადგილი დნმ-ში და გაუწყვილდეს გუანინს. აზაციტიდინ - გუანინის წყვილი ნორმაში ამოიცნობა დნმ მეთილტრანსფერაზას მიერ როგორც ბუნებრივი სუბსტრატი და მეთილირების ინიცირებას მოახდენს ნუკლეოფილური შეტევით. შედეგად წარმოიქმნება კოვალენტური ბმა ციტოზინის რგოლის ნახშირბადის-6 ატომსა და ფერმენტს შორის. ბმა როგორც წესი ნახშირბადის-5 ატომის ბეტა-ელიმინაციით წყდება, მაგრამ აზაციტინის შემთხვევაში ნახშირბადის-5 ატომი ჩანაცვლებულია აზოტით. ამრიგად, მეთილტრანსფერაზა დაკავშირებული რჩება დნმ-თან და იბლოკება მისი ფუნქცია. ამასთან, დნმ-სთან მჭიდროდ დაკავშირებული ცილა არღვევს დნმ-ის ნორმალურ ფუნქციონირებას და აღძრავს დნმ-ის დაზიანების სიგნალებს. შედეგად დაკავშირებული დნმ მეთილტრანსფერაზები დეგრადირდება. დნმ-ის რეპლიკაციისას მეთილირების ნიშნები იკარგება. (24)

3.3. ლენალიდომიდი

ლენალიდომიდი და მისი ანალოგები წარმოადგენენ თალიდომიდიდან მიღებულ სინთეზური ნაერთებს მაღალი ეფექტურობით და ნაკლები გვერდითი ნევროლოგიური ეფექტებით. მისი ეფექტები ნანახია როგორც თანდაყოლილ, ისე ადაპტურ იმუნურ პასუხებში. ნაჩვენებია, რომ მათი ქიმიოტერაპიულ წამლებთან კომბინაციაში გამოყენებით ძლიერდება როგორც თანდაყოლილი, ასევე შეძენილი იმუნური პასუხები და უმჯობესდება პასუხი მალიგნიზაციაზე (25). ასევე დადასტურებული იქნა, რომ ეს წამლები, პირდაპირ მაინჰიბირებელ ეფექტს ავლენს ანგიოგენეზსა და სიმსივნური უჯრედების პროლიფერაციაზე (26). მრავლი კვლევის ფარგლებში ნანახია ამ წამლების გავლენა ნატურალურ კილერებსა და T ლიმფოციტებზე (27).

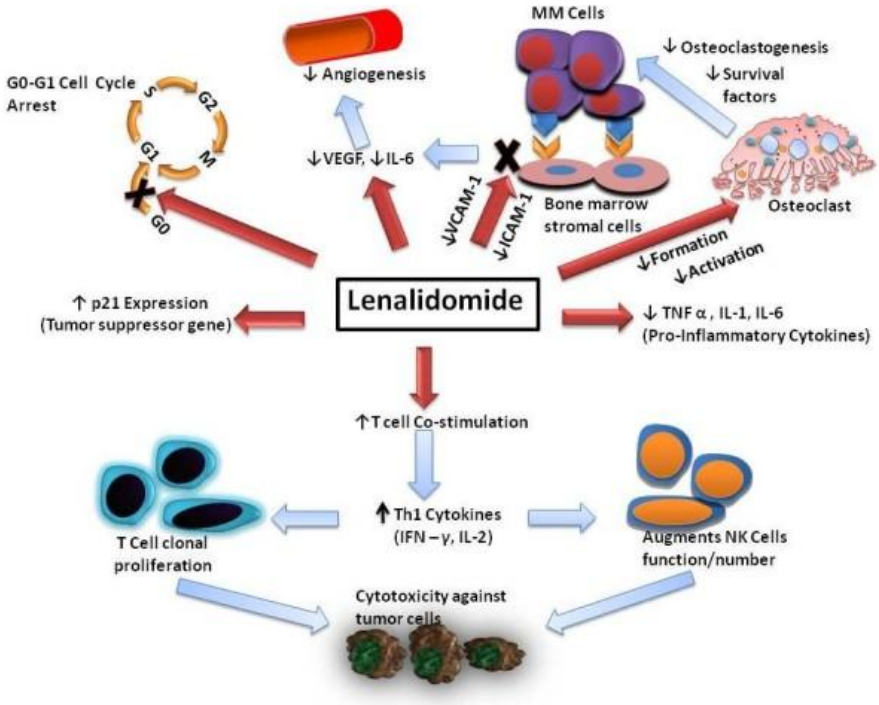


სურათი 5 :ლენალიდომიდის ქიმიური ფორმულა.

ლენალიდომიდს აქვს მოქმედების მრავალი მექანიზმი რომელთაგან შესწავლილია:

- ციტოკინების წარმოქმნის ცვლილება
- T უჯრედების აქტივაცია
- NK უჯრედების ფუნქციის გაძლიერება
- ანტი ანგიოგენეზური აქტივობა
- პირდაპირი ანტისიმსივნური მოქმედება

მას შეუძლია გააააქტიუროს CD28 მაშინაც კი თუ იგი დაკავშირებულია მაინჰიბირებელ მოლეკულასთან CTLA-4, რითაც T უჯრედების გააქტიურებას იწვევს და შედეგად აძლიერებს იმუნურ პასუხს.



სურათი 6:ლენალიდომიდის მოქმედების მექანიზმები სიმსივნის დროს

3.4. RM1 უჯრედები

RM-1, თაგვის პროსტატის კიბოს უჯრედული ხაზი, საჩუქარად გადმოგვცა ვირჯინიის თანამეგობრობის უნივერსიტეტმა. სიმსივნური უჯრედებს ვინახავდით სრულ საკვებ არეში 37°C ტემპერატურაზე 5% CO_2 პირობებში. RM-1 უჯრედები პროსტატის სიმსივნის ეპითელიური უჯრედებია, შესაბამისაც სწრაფად მზარდი კულტურაა და in vivo მოდელებში 7 დღეში დაახლოებით ორ სანტიმეტრამდე წარმონაქმნს ვიღებთ 25000 უჯრედი/მლ ინექციისას.

ნანახია RM-1 უჯრედების უარყოფითი გავლენა ოსტეობლსტებზე. (28) RM-1 უჯრედები, სხვა სიმსივნური უჯრედების მსგავსად, MHC I კლასის მოლეკულებს მცირედ ექსპრესირებენ. თუმცა ამ უჯრედების გამოყენებით ნაჩვენებია, რომ შესაძლებელია დამცველობითი T უჯრედული იმუნიტეტის ჩამოყალიბება დაბალექსპრესირებული MHC I კლასის სიმსივნეებშიც. (29)

3.5. ლაბორატორიული ცხოველები

C57BL/6 ხაზის თაგვები შეძენილ იქნა ENVIGO ლაბორატორიიდან (იტალია). მათ ვინახავდით ივ. ჯავახიშვილის სახ. თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის ვივარიუმში სტანდარტული გაიდლაინის მიხედვით.

C57BL/6 თაგვები შავი ფერის ინბრიდული ხაზია. ადვილად მრავლდება და ჯანმრთელობის პრობლემები ნაკლებად აღენიშნებათ. ისინი გამოიყენება მრავალი ტიპის კვლევაში. ხშირად იყენებენ სიმსივნის ბიოლოგიაში როგორც in vivo მოდელებს. მოსახერხებელია მათგან გენეტიკურად მოდიფიცირებული თაგვების მიღება.

3.6. ცხოველური მოდელები სიმსივნეებში

გენური ინჟინერიით მიღებული თაგვების ხაზებმა მნიშვნელოვანი წვლილი შეიტანა სიმსივნის ბიოლოგიის შესწავლაში. ისინი წარმატებით გამოიყენებიან გენეტიკური და მოლეკულური მექანიზმების უკეთ შესასწავლად, ახალი ონკოგენების, სიმსივნის ბიომარკერების აღმოჩენისათვის, უკეთესი კლინიკური მოდელებისა და მათზე ახალი თერაპიული სტრატეგიების გამოცდისთვის. მიუხედავად ამისა, ლაბორატორიულ თაგვებს სხვადასხვა შეზღუდვები აქვთ, როდესაც ადამიანის სიმსივნის მოდელად ვიყენებთ. ეს სახეობათშორის განსხვავებებს გულისხმობს. (30)

სამომავლოდ მრავალი გამოწვევაა უკეთესი ცხოველური მოდელების მისაღებად, რათა უფრო ზუსტი შედეგები მივიღოთ მოლეკულურ, უჯრედულ და გენომურ მექანიზმების შესასწავლად სიმსივნის ბიოლოგიაში. ასევე უკთესი ტექნოლოგიების შესაქმნელად სიმსივნის in vivo იმიჯინგსა და მაღალმგრძნობიარე სკრინინგისთვის. (31)

3.7. პროსტატის სიმსივნე

პროსტატის კიბო, არის სიმსივნური პროცესების განვითარება მამაკაცის წინამდებარე ჯირკვალში (პროსტატაში). პროსტატის სიმსივნეების უმეტესობა ხასიათდება ნელი ზრდით, თუმცა, გარკვეულ შემთხვევებში ხდება მისი სწრაფი და აგრესიული ზრდა. პროსტატის კიბო ზოგჯერ იძლევა მეტასტაზებს ირგვლივმდებარე ქსოვილებში,

ლიმფურ კვანძებში, ძვლებში. პროსტატის კიბომ შეიძლება გამოიწვიოს ტკივილი პროსტატის მიდამოში, შარდვის გაძნელება და ტკივილი, პრობლემები სექსუალურ ცხოვრებაში, მათ შორის ერექტიული დისფუნქცია. სხვა სიმპტომები აღმოცენდება სიმსივნის უფრო გვიანდელ სტადიებზე.

პროსტატის კიბოს გავრცელება ქვეყნებში სხვადასხვაგვარია, აღმოსავლეთ ქვეყნებში შედარებით იშვიათია, ევროპაში შედარებით ხშირი. პროსტატის კიბო ძირითადად ვითარდება ასაკში, 50 წლის ზევით, თუმცა ზოგჯერ სიმსივნე ახალგაზრდა ასაკშიც ვითარდება. სიმსივნე იზრდება წლების განმავლობაში და შეიძლება არ ჰქონდეს არანაირი სიმპტომი და ადამიანმა ცხოვრება გაატაროს ისე, რომ არც იცოდეს ამ სიმსივნის არსებობის შესახებ და გარდაიცვალოს სულ სხვა მიზეზით.

პროსტატის სიმსივნის გავრცელების მიხედვით იყოფა სტადიებად პირველი და მეორე სტადიის დროს (T1 და T2) სიმსივნე ვრცელდება, მხოლოდ პროსტატაში. T3 და T4 – ის დროს სიმსივნე შეიძლება გავრცელდეს სხვა ქსოვილებში და ორგანოებში, პროსტატის გარდა.

ნიშნები და სიმპტომები: ძირითადად პროსტატის კიბოს სიმპტომები არ აქვს საწყის ეტაპზე, თუმცა შეიძლება იყოს გარკვეული სიმპტომები გამოხატული. ძირითადად, პროსტატ სპეციფიური ანტიგენის (PSA) რაოდენობის მომატება არის პირველი ნიშანი. ხშირად, კი პროსტატის კეთილთვისებიან ჰიპერპლაზიას და სიმსივნეს, ერთნაირი სიმპტომატიკა აქვთ. გახშირებული შარდვა (პოლიურია), ნოქტურია (ღამით ხშირი შარდვა), შარდვის დაწყების გაძნელება და ნაკადის უწყვეტობის შენარჩუნების გაძნელება. ჰემატურია (სისხლი შარდში) და დიზურია (ტკივილი მოშარდვის დროს).

მიზეზები: პროსტატის კიბოს განვითარების მიზეზის ზუსტი დადგენა შეუძლებელია(ამ ეტაპზე), ყველაზე დიდ რისკ ფაქტორის მისი განვითარებისთვის წარმოადგენს ასაკი და ოჯახური ისტორია. ძალიან იშვიათა პროსტატის კიბოს განვითარების რისკი 45 – წლის ასაკის ქვემოთ. პროსტატის კიბოს დიაგნოსტირების საშუალო ასაკი 70 წელია. თუმცა მამაკაცების დიდი რაოდენობა ისე ატარებს სიცოცხლეს, რომ ვერასდროს გებულობენ, რომ მათ პროსტატის კიბო ჰქონდათ. ადამიანები, რომლებიც დაიღუპნენ პროსტატის კიბოთი 20-30% იყო 50 წლის ასაკის, 70-80 % კი 70 წლის ფარგლებში. თუ ადამიანს ჰყავს პირველი რიგის ნათესავი პროსტატის

კიბოთი, მათთვის სიმსივნის განვითარების რისკი ორმაგდება. 2005 წლისთვის 230 000 პროსტატის კიობოს შემთხვევიდან 30 000 დასრულდა სიკვდილით. ანუ 13 % სიკვდილიანობით სრულდება. პროსტატის კიბო, უფრო ხშირია შავკანიანებში, ვიდრე თეთრკანიანებში. BRCA1, BRCA2 გენების ნმუტაცია არის შემჩნეული პროსტატის კიბოს განვითარების დროს. ამ გენების მუტაცია იწვევს ქალებში მკერდის კიბოს და საკვერ ცხეების სიმსივნესაც. აგრეთვე გამოკვეთილია Hereditary Prostate cancer gene 1 (HPC1) გენის მუტაცია. საეთო ჯამში შეგვიძლია ვთქვათ, რომ მრავალი გენის მუტაციამ შეიძლება გამოიწვიოს პროსტატის სიმსივნის განვითარება, მაგრამ ერთი გამოკვეთილი გენი არ არსებობს, რომელიც შეიძლება მისი მიზეზი გახდეს.

კვება – D ვიტამინების დეფიციტი შეიძლება იყოს რისკ-ფაქტორი, პროსტატის კიბოს განვითარებისთვის. კარგია მცენარეების და ხილის მიღება, ულტრაიისფერი სხივების მიღება. პროსტატის კიბოს განვითარების რისკი შეიძლება გახდეს მულტივიტამინების გადამეტებული მიღებაც. ფოლის მჟავამ შეიძლება (B6 ვიტამინი) გაზარდოს კიბოს განვითარების რისკი. ალკოჰოლის მიღებამ და სხვა მავნე ჩვევებმაც, შეიძლება გაზარდოს პროსტატის კიბოს განვითარების რისკი. ანტიქოლოესტერინულმა საშუალებებმა, მაგ. სტატინებმა შეიძლება შეამციროს პროსტატის კიბოს განვითარების რისკი.

პროსტატის საბოლოო დიაგნოზი ხდება ბიოფსიით. გამოკვლევები: პროსტატსპეციფიური ანტიგენი, ულტრაბგერა. ტრანსრექტალური ულტრასონოგრაფია, თითით, რექტალური გასინჯვა Digital rectal examination. საჭიროების შემთხვევაშ ასრულებენ მაგნიტურ-რეზონანსურ გამოკვლევას და კომპიუტერულ ტომოგრაფიას.

სკრინინგის ფორმებია რექტალური გასინჯვა, პროსტატ-სპეციფიური ანტიგენის განსაზღვრა. თუმცა ბოლო კვლევებით სკრინინგის მნიშვნელობა ეჭვქვეშ დგას, რადგან იგი არ ამცირებს ან შეუმჩნევლად ამცირებს სიმსივნით სიკვდილიანობას.

პრევენცია - მნიშვნელოვანია ცხოვრების ჯანსაღი წესი, ვარჯიში, დიეტა, 5 ალფა რედუქტაზას ინჰიბიტორების და ალფა ბლოკერების მიღება შეიძლება აგრეთვე გახდეს პრევენციის ფორმა.

მკურნალობაში მნიშვნელოვანი 5 ალფარედუქტაზას ინჰიბიტორები: finasteride and dutasteride, ძირითად მკურნალობას კი წარმოადგენს სიმსივნის ქირურგიული მკურნალობის მეთოდები.

5 ალფა რედუქტაზას ინჰიბიტორების გამოყენება სიმსივნის განვითარების რისკს ამცირებს 9%-მდე.

ხშირად არის განხილვის საგანი ეაკულაციის სიხშირე და სიმსივნის რისკი, ხშირი ეაკულაცია გარკვეული კვლევებით ამცირებს სიმსივნის განვითარების რისკს, გარკვეული კვლევებით ზრდის. თუმცა საბოლოო ჯამში დიდი და უმრავლესი კვლევების მიხედვით ეაკულაციის სიხშირეს რაოდენობა არ აქვს, ან უფრო ამცირებს სიმსივნის განვითარების რისკს, ვიდრე ზრდის.

იგივე შეიძლება ითქვას ვიტამინებზე, გარკვეული მოსაზრებებით შეიძლება ზრდიდეს განვითარების რისკს, თუმცა საერთ ჯამში მისი გავლენა არ მტკიცდება. (32)

4. კვლევის ობიექტი, კვლევის მეთოდები

კვლევისათვის გამოვიყენე ლაბორატორიული დიაგნოსტიკის როგორც in vitro, ასევე in vivo მეთოდები.

ექსპერიმენტულ ცხოველებზე ჩატარებული მანიპულაციები და კვლევის დიზაინი განხილული და ნებადართულია ეთიკური კომისიის მიერ.

In vivo

4.1. პროსტატის სიმსივნის თაგვის მოდელის მიღება და პრეპარატების გამოცდა

RM1 სიმსივნის უჯრედებს ვინახავდი ზრდის ხსნარში 37°C- ზე 5% CO_2 ინკუბატორში. In vivo კვლევისათვის PBS-ში გახსნილი RM-1 უჯრედები (25000 უჯრედი/100 μლ) შევიყვანე სუბკუტანურად (SC) თაგვებში. პრეპარატები 5-აზაციტიდინი (კონცენტრაციით 0.2 მგ/კგ.) და ლენალიდომიდი (კონცენტრაციით 0.5 მგ/კგ) შემყავდა ინტრაპერიტონიულად კვირაში 3-ჯერ, ორი კვირის განმავლობაში. სიმსივნის არსებობა პალპაციით ისინჯებოდა ორთი კვირის შემდეგ. სიმსივნის ზრდას ვზომავდი ყოველდღიურად მიკლოკალიპერის გამოყენებით. როდესაც სიმსივნის ზომამ 3000 $მმ^3$ -ს მიაღწია (მოცულობას ვითვლი ფორმულით: m12 X m2X 0.5236, სადაც m1 გამოხატავს მოკლე ღერძს და m2 გრძელს), მოვახდინე ცხოველების ევთანაზია. შემდეგ ამოვკვეთე ელენთა, საიდანაც გამოვყავი T რეგულატორული უჯრედები და ჩავუტარე იმუნოფენოტიპირება გამდინარე ციტომეტრზე.

ექსპერიმენტული ცხოველევბი დავყავით ოთხ ნაწილად მიზნობირობის მიხედვით: პირველ ჯგუფში გვყავდა თაგვები, რომლებსაც შევუყვანეთ RM-1 უჯრედები და ვმკურნალობდით 5-აზაციტიდინით. მეორე ჯგუფში RM-1 უჯრედები და ვმკურნალობდით ლენალიდომიდით. მესამე ჯგუფი შერჩეული იყო ამ ორი პრეპარატით კომბინაციით თერაპიისთვის. RM-1 უჯრედები მათაც შევუყვანეთ. საკონტროლო ჯგუფს შევუყვანეთ სიმსივნური უჯრედები და არ ვმკურნალობდით რათა დაგვენახა კონტრასტი ნამკურნალებ და არანამკურნალებ ცხოველებს შორის.

In vitro კვლევები:

4.2. დენდრიტული უჯრედების გაზრდა და პროლიფერაცია საკვლევი პრეპარატების თანაობისას

დენდრიტული უჯრედების კულტურების მისაღებად ძვლის ტვინი გამოვყავიC57BL/6 თაგვების(Envigo inc.) წვივისა და ბარძაყის ძვლებიდან შესაბამისი ეთიკური ნორმებისდაცვით. [Animal welfare act].ერითროციტების მოსაშორებლად გამოვიყენე AKC ლიზის ბუფერი. შემდგომ, ვახდენდი უჯრედების ინკუბაციას ღამის განმავლობაში (37°C, 5% CO_2) ექვსფოსოიან პლეიტზე. თითიოეულ ფოსოში ემატებოდა 4მლ უჯრედების სუსპენზია - 106 უჯრედები/მლ კონცენტრაციით სრულ არეში [RPMI 1640 არეს დამატებული 10% –იანი თერმოინაქტივირებული ხარის შრატი (FBS;Gemini Bio-Products, დასავლეთ საკრამენტო,კალიფორნია), PEN-STREP, Liq.,10000(Life Technologies, კარლსბადი, კალიფორნია), 100მმ ნატრიუმის პირუვატი (Quality Biological,Inc.გეითერსბურგი, მერილენდი), MEM არაესენციალური ამინო მჟავების სხნარი 10მმ (100X) (Life Technologies, კალსბადი,კალიფორნია).

მონონუკლეარულ უჯრედებს ვაგროვებდი მსუბუქი პიპეტირებით და ვარესუსპენზირებდი 250.000 უჯრედი/მლ კონცენტრაციით სრულ არეში, რომელსაც ვასტიმულირებდი 1000 ერთეული/მლ თაგვის რეკომბინანტული ილ4-თა და GM-CSF-ით დღეგამოშვებით ერთი კვირის მანძილზე. უჯრედების კულტივაცია განხორციელდა ექვსფოსოიან პლანშეტზე (4მლ/ფოსოში) 7 დღის განმავლობაში 37°C ტემპერატურაზე , 5% CO_2 პირობებში. არადჰეზიურ დენდრიტულუჯრედებს ვაგროვებდი მსუბუქი პიპეტირებით.

დენდრიტული უჯრედების მომწიფების შემდეგ, მოვახდინე მათი პროლიფერაცია საკვლევი პრეპარატების თანაობისას: კულტურებს ვამატებდი ლენალიდომიდსა და 5-აზაციტიდინს დღეგამოშვებით ერთი კვირის მანძილზე. ლენალიდომიდს ვაზავებდი 100%-იან დიმეთილსულფოქსიდში (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). DMSO-ს საბოლოო კონცენტრაცია თითოეულ ნიმუშში იყო 0.1%.PBS- ში განზავებულ 5-აზაციტიდინს უჯრედულ კულტურებს ვუმატებდი1.0 μმ და 0.5 μმ კონცენტრაციით.

გამდინარე ციტომეტრის გამოყენებით შევისწავლე დენდრიტული უჯრედების რაოდენობრივი და ხარისხობრივი მაჩვენებლებიზედაპირული მოლეკულების(MHC I, MHC II, CD205, CD80, CD86, CD40, CD11c) ექსპრესიის შეფასებით.

4.3. იმუნოფლუორესცენციის მეთოდი გამდინარე ციტომეტრიის გამოყენებით

ანტისხეულები, რომლებიც გამდინარე ციტომეტრიის ანალიზისათვის იქნა შემენილი იყო BD-ის ან eBioscience-ის წარმოებული. საექსპერიმენტო უჯრედების გარეცხვა განხორციელდა FACS ბუფერის საშუალებით (2% FCS in PBS). მოვახდინეთ უჯრედების პრეინკუბირება15 წუთის განმავლობაში იმუნოგლობულინის კონსტანტურ ფრაგმენტ(Fc)-რეცეპტორის მაბლოკირებელი ანტისხეულებით (anti CD16/CD32, Clone 2.4G2), რათა შემცირდეს არასპეციფიური დაკავშირება. დენდრიტული უჯრედების შეღებვა განხორციელდა მონიშნული ანტისხეულებით, რომლებსაც ჰქონდათ შემდეგი სპეციფიკურობა - CD11c-სთვის (კლონი N418), CD40-სათვის (კლონი 3/23), F4/80-სთვის (klone BM8), CD86 -სთვის (clone P 0.3 (Invitrogen); MHC class II (I-A) (clone NIMR-4, eBioscience); CD205 (clone NLDC-145, Miltenyi Biotec); I-Ad/I-Ed (clone a2G9, BD). ანტისხეულების იზოტოპების გამოყენება მოხდა პარარელურად მიმდინარე ნიმუშებში რათა დაზუსტებულიყო ბმის სპეციფიკურობა. უჯრედების ანალიზი განხორციელდა 488 და 633 ნანომეტრზე გამდინარე ცოტომეტრიის გამოყენებით FACSscan (BD Biosciences). მიღებული მონაცემები პროგრამის CellQuest გამოყენებით დამუშავეთ. დენდრიტული უჯრედების იდენტიფიკაცია მოხდა CD11c-ისა და დაბალი ავტოფლურენსცენციის საფუძველზე.

5. ექსპერიმენტალური კვლევის შედეგები და განხილვა

5.1. დენდრიტული უჯრედების იმუნოფენოტიპირების შედეგები

დენდრიტული უჯრედების იმუნური მექანიზმების შესასწავლად გამოვიყენეთ ორი ტიპის უჯრედული მარკერები. MHC II, CD40, CD80, CD86, ანტიგენის პრეზენტაციაში უშუალოდ მონაწილე მოლეკულებია და ჩვენი კვლევის მთავარ სამიზნეს წარმოადგენდნენ. როგორც ცნობილია, ეს მოლეკულები მხოლოდ დენდრიტულ უჯრედებზე არ ექსპრესირდება და სხვა ანტიგენწარმდგენ უჯრედებზეც გვხვდება. იმისათვის რომ აღნიშნული მოლეკულები მხოლოდ დენდრიტულ უჯრედებზე დაგვეთვალა შევარჩიეთ თაგვის დენდრიტული უჯრედების მარკერი CD11c და CD205. ხოლო უჯრედების რაოდენობის დასადგენად გამოვიყენეთ MHC I კლასს საწინააღმდეგო ანტისხეულები. (დიაგრამა #1)

კვლევის შედეგებმა გვიჩვენა, რომ MHC II კლასის მოლეკულების ექსპრესია კონტროლთან შედარებით გაიზარდა 10%-ით. როგორც 3.1.1. თავში აღვნიშნეთ, MHC II კლასის მოლეკულა ანტიგენმაპრეზენტირებელი მოლეკულაა. იგი უშუალოდ წარუდგენს ეგზოგენური ანტიგენის, მათ შორის ფაგოციტირებული სიმსივნური ანტიგენების, გადამუშავებულ პეპტიდს T უჯრედულ რეცეპტორს. ამ მოლეკულების მომატებული ექსპრესია ნიშნავს იმას, რომ გაიზარდა ანტიგენის პრეზენტაციის ხარისხი. შესაბამისად მეტი დამხმარე T (Th) უჯრედი გააქტიურდება და აღიძვრება ადაპტური იმუნური პასუხი სიმსივნის წინააღმდეგ.

CD80/CD86 ექსპრესიის ხარიხსი 10%-ით გაიზარდა კონტროლთან შედარებით. ეს მოლეკულები კორეცეპტორებია ანტიგენის წარდგენის პროცესში და მათი რაოდენობის ზრდა ნიშნავს იმას, რომ გაძლიერდა ანტიგენის წარდგენა. CD80/CD86 ერთად ქმნის კომპლექსს, რომელიც T უჯრედზე CD28-ს ან CTLA-4 მოლეკულას ებმის. იმ შემთხვევაში თუ კომპლექსი CD28-ს დაუკავშირდა T ლიმფოციტს პროლიფერაციისა და აქტივაციის სიგნალები გადაეცემა, რაც მათ კლონურ ექსპანსიასა და გააქტიურებას

იწვევს. შედეგად ანტიგენსპეციფიკური იმუნური პასუხი აღიძვრება. ხოლო თუ CTLA-4 -ს დაუკავშირდა T უჯრედები ანერგიაში გადადიან. (დიაგრამა #1)

რაც შეეხება CD40 მოლეკულას, მათი ექსპრესია 10%-ით გაიზარდა კონტოლთან შედარებით. ამ მოლეკულას კომასტიმულირებელი ფუნქცია აქვს ანტიგენის წარდგენის პროცესში. ლიგანდთან შეკავშირების შემდეგ იგი გადასცემს სიგნალს ანტიგენწარმდგენ უჯრედს და ააქტიურებს მათ. CD40/CD40L კავშირის გარეშე ანტიგენის პრეზენტაცია არ აღძრავს სრულყოფილ იმუნურ პასუხს. CD40-ის ექსპრესიის გაზრდა ნიშნავს ანტიგენის წარდგენის გაძლიერებას, რაც თავის მხრივ იმუნური პასუხის გაძლიერებაზე აისახება. (დიაგრამა #2)

MHC I კლასის მოლეკულები, როგორც ზემოთ აღვნიშნე, ყველა ეუკარიოტულ უჯრედზეა და მათი ფუნქცია ენდოგენური ანტიგენის წარდგენაა. მათმა რაოდენობამ, ჩვენი შედეგების მიხედვით, 10%-ით მოიმატა დენდრიტულ უჯრედებზე. მათი რაოდენობის ზრდა მიანიშნებს ორ რამეზე: 1. გაიზარდა ამ მოლეკულების ექსპრესია თითოეულ უჯრედზე; 2. გაიზარდა უჯრედების რაოდენობა. ორივე შემთხვევაში ძლიერდება ანტიგენის წარდგენის ხარისხი, რაც ანტისიმსივნური იმუნური პასუხის გაზლიერებას გვაძლევს. რაკი კვლევაში გამოყენებულ პრეპარატებს აქვთ უნარი გააძლიერონ MHC I კლასის ექსპრესია, საინტერესო იქნება სამომავლოდ შემოწმდეს მათი მოქმედება სიმსივნურ უჯრედებზე. მათზე MHC I კლასის მოლეკულების რაოდენობის გაზრდას შესაძლოა თერაპიული შედეგი ჰქონდეს სიმსივნეების დროს. (დიაგრამა #2)

CD205 ენდოციტური რეცეპტორია და მონაწილეობს ანტიგენების უჯრედის შიგნით შეტანისა და ქროს-პრეზენტაციის პროცესში. დიდი რაოდენობით ექსპრესირდება თაგვის დენდრიტულ უჯრედებზე, ამიტომ მის მარკერად გამოიყენება. ნანახია რომ მისი ექსპრესია იმატებს მომაკვდავ უჯრედებზე და გამოიყენება აპოპტოზის მარკერად. ჩვენი მონაცემების თანახმად მათი რაოდენობა 10%-ით გაიზარდა. ეს იმაზე მეტყველებს, რომ 1. გაიზარდა დენდრიტული უჯრედების რიცხვი; 2. გაიზარდა ამ მოლეკულათა ექსპრესია. თავის მხრივ ეს ნიშნავს, რომ მოიმატა ანტიგენის წარდგენის სიხშირემ და შედეგად გაძლიერდა ანტისიმსივნური იმუნური პასუხი. (დიაგრამა #2)

ისევე როგორც CD205, CD11c თაგვის დენდრიტული უჯრედის მარკერია. ექსპერიმენტის შედეგების თანახმად მათი ექსპრესიის ხარისხი გაიზარდა 10%-ით. ეს იმაზე მეტყველებს, რომ 1. გაიზარდა დენდრიტული უჯრედების რიცხვი; 2. გაიზარდა ამ მოლეკულათა ექსპრესია. თავის მხრივ ეს ნიშნავს, რომ მოიმატა ანტიგენის წარდგენის სიხშირემ და ამის შედეგად გაძლიერდა ანტისიმსივნური იმუნური პასუხი.

როგორც ვხედავთ, მიღებულ შედეგებში ანტიგენწარმდგენი და მათი თანამასტიმულირებელი მოლეკულების ექსპრესიის ხარისხი გაზრდილია 5-აზაციტიდინისა და ლენალიდომიდის მოქმედების შედეგად. გაძლიერდა სიმსივნური ანტიგენის წარდგენა იმუნური სისტემისთვის, რაც იმას ნიშნავს, რომ იმუნური სისტემა შეძლებს უკეთ დაინახოს სიმსივნური უჯრედები და გაანადგუროს ისინი. სამომავლოდ, ამ პრეპარატებით განხორციელებულ იმუნოთერაპიას, შესაძლოა პოზიტიური შედეგები მოჰყვეს კლინიკურ კვლევებში.

5.2. T რეგულატორული უჯრედების იმუნოფენოტიპირების შედეგები

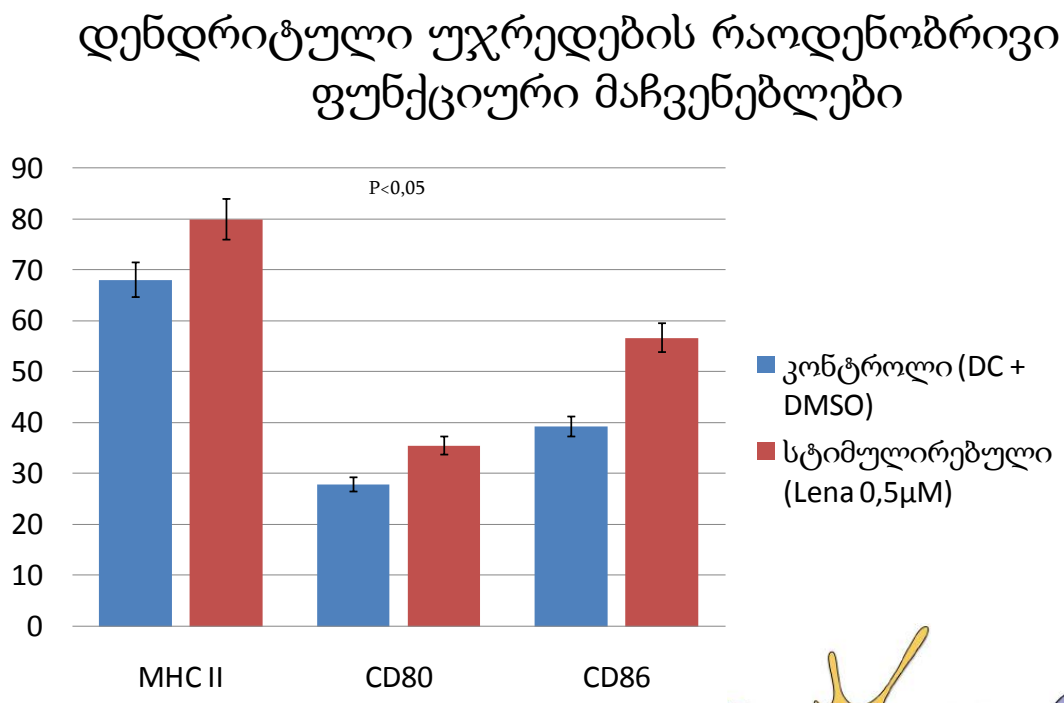
T რეგულატორული უჯრედები CD4+CD25+FoxP3+ პოპულაციაა. კვლევაში გამოყენებული მარკერები სწორებ ამ უჯრედების რაოდენობის დასადგენად შევარჩიეთ. გაავზომეთ ამ მოლეკულების რაოდენობა ცალ-ცალკე და კომბინაციაში.

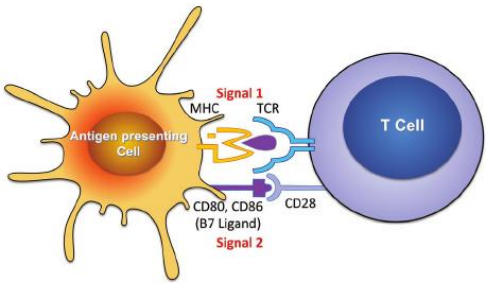
შედეგებზე დაყრდნობით CD4 მოლეკულების, ექსპრესიის ხარისხი კონტროლთან შედარებით შემცირდა 51%-ით. ეს ნიშნავს, რომ საერთო პოპულაციაში შემცირდა T უჯრედების რიცხვი. CD4 მოლეკულები ექსპრესირებს Th, Treg და T4 უჯრედებზე. T ლიმფოციტების პოპულაციის შემცირება იმუნური პასუხის შესუსტებას გამოიწვევს.

CD25-ისა ექსპრესია გაიზარდა 273%-ით. (დიაგრამა #3) ეს საკმაოდ დიდი ციფრია და მიგვანიშნებს იმაზე, რომ ძლიერდება ილ-2 -ის აღქმა უჯრედების მიერ. შედეგად ძლიერდება პროლიფერაცია და T უჯრედების Tრეგულატორებად დიფერენცირების პროცესი. CD25 ესქსპრესირებს უმეტეს B ლიმფოციტზე, T რეგულატორებზე, თიმოციტებზე, მიელოიდური ხაზის პრეკურსორებზე, ოლიგოდენდროციტებზე.

რაც შეეხება CD4+/CD25+ ორმაგ დადებით უჯრედებს, მათი რაოდენობა შემცირდა 34%- ით. ეს უჯრედები T რეგულატორი უჯრედებია. ეს საკმაოდ ახალი პოპულაციაა და ისინი არეგულირებენ ტოლერანტობისა და იმუნური პასუხის საკითხს. მათ შეუძლიათ, აპოპტოზის მექანიზმის ჩართვის გზით, პირდაპირ მოკლან სხვა იმუნოკომპეტენტური უჯრედები. T რეგულატორების შემცირება შესაძლოა ნიშნავდეს იმას, რომ შემცირდა მათი იმუნოსუპრესიული მოქმედება სხვა T ლიმფოციტებზე. ეს კი იმუნური პასუხის გაძლიერებასა და ბალანსის შენარჩუნებაზე მიანიშნებს.

მიღებული შედეგი არ დაემთხვა ჩვენს მოსალოდნელ შედეგებს თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ T რეგულატორული უჯრედები ახალი პოპულაციაა და კარგად შესწავლილი არ არის. მათ შიგნით თხუთმეტამდე სხვადასხვა პოპულაცია განირჩევა. ამდენად რთულია არსებული მონაცემებით იმუნური პასუხის მთლიანი სურათის დანახვა.

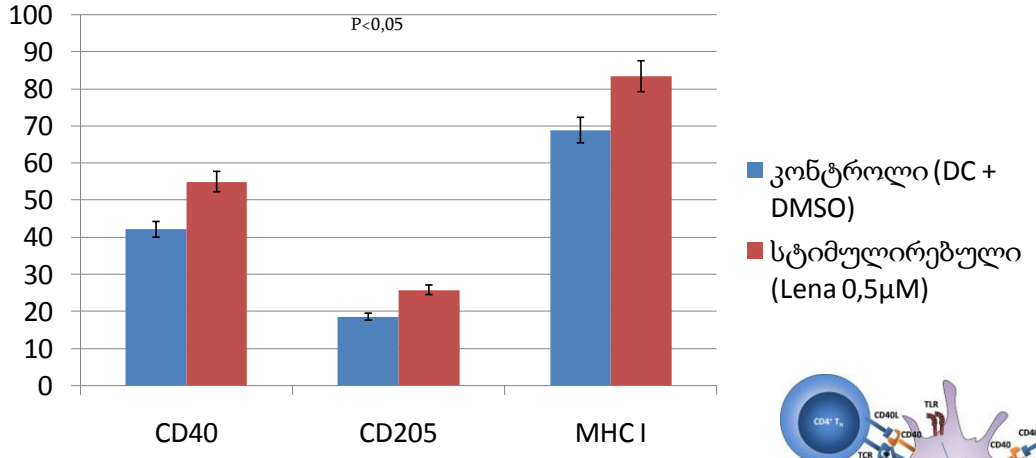


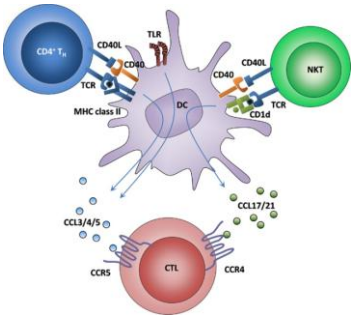


დიაგრამა #1

MHC I კლასი - ანტიგენწარმდგენი მოლეკულა
MHC II კლასი - ანტიგენწარმდგენი მოლეკულა
CD40 - კოსტიმულატორული მოლეკულა

დენდრიტული უჯრედების რაოდენობრივი და ფუნქციური მაჩვენებლები

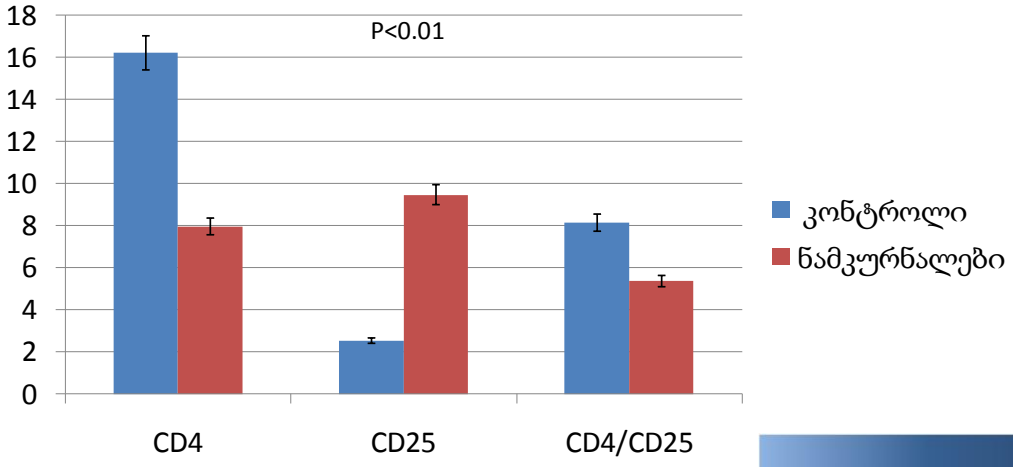


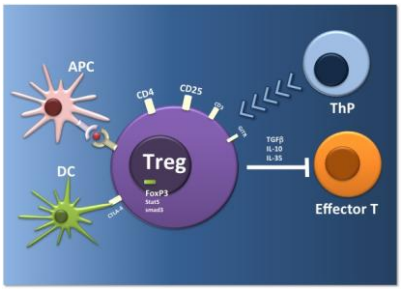


დიაგრამა #2

CD80 - კოსტიმულატორული მოლეკულა
CD86 - კოსტიმულატორული მოლეკულა
CD205 - აპოპტოზის მარკერი

T რეგულატორული უჯრედების რაოდენობრივი და ფუნქციური მაჩვენებლები





დიაგრამა #3

CD4 – Th უჯრედების მარკერი
CD25 - ილ-2 -ის რეცეპტორი
CD4/CD25 – Treg-ების მარკერები

6. დასკვნა

5-აზაციტიდინითა და ლენალიდომიდით დენდრიტულ უჯრედებზე კომბინირებული მოქმედების შედეგად ძლიერდება ანტიგენწარმდგენი - MHC II კლასისა და თანამასტიმულირებელი მოლეკულების - CD40, CD80, CD86 ექსპრესია, რაც საშუალებას იძლევა რეკომენდაცია გავუწიოთ აღნიშნულ იმუნომოდულატორების კომბინაციას კლინიკური კვლევებში ჩასართავად.

7. გამოყენებული ლიტერატურა

1. *Update on immunomodulatory drugs (IMiDs) in hematologic and solid malignancies.* **Vallet, S., Witzens-Harig, M., Jaeger, D. and Podar, K.** 202, Expert Opin Pharmacother,, pp. 13: 473-494, 2012.

2. *Lenalidomide in solid tumors.* **Segler, A. and Tsimberidou, A. M.** 2012, Cancer ChemotherPharmacol, pp. 69: 1393-1406.

3. World Health Organization. [Online] 2015. http://www.who.int/cancer/en/.

4. *Effect of Epigenetic Modification and Immunomodulation on Murine Prostate Cancer and Dendritic Cells.* **Sulek, J., et al.** 2015, Prostate Cancer: Basic Research III, pp. MP55-17.

5. *Activation and Protection of Dendritic Cells in the Prostate Cancer Environment.* **Georgi Guruli, Mark L. Jordan.** 2011 , U.S. Army Medical Research and Materiel Command Fort Detrick, pp. 212-306.

6. *Cancer immunotherapy via dendritic cells.* **Karolina Palucka, Jacques Banchereau.** April 2012, Nature Reviews Cancer , pp. 265-277.

7. *CTLA-4 blockade and the renaissance of cancer immunotherapy.* **Simone Mocellin, Donato Nitti.** 2013, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, pp. 187–196.

8. **Joeri J. Pen, Joeri. L. Aerts, Thérèse Liechtenstein, David Escors, Karine Breckpot.** *Manipulating Immune Regulatory Pathways to Enhance T Cell Stimulation.* Brussels : Science, Technology and Medicine open access publisher, 2014.

9. *Regulatory T cells in cancer.* **Mougiakakos D1, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson CC.** 2010;, Advances in Cancer Research, pp. 107:57-117.

10. *Prostate-specific membrane antigen association with filamin A modulates its internalization and NAALADase activity.* **Anilkumar G1, Rajasekaran SA, Wang S, Hankinson O, Bander NH, Rajasekaran AK.** 2003 , Cancer Research, pp. 15;63(10):2645-8.

11. **Abbas and Lichtman.** *Cellular and molecular immunology.* Philadelphia : Philadelphia, PA : Elsevier/Saunders, 2015.

12. *The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity.* **Pardoll DM, Topalian SL.** 1998, Current Opinion in Immunology , pp. 588-94.

13. *How do CD4+ T cells detect and eliminate tumor cells that either lack or express MHC class II molecules?* **Ole Audun Werner Haabeth, Anders Aune Tveita, Marte Fauskanger, Fredrik Schjesvold, Kristina Berg Lorvik, Peter O. Hofgaard, Hilde Omholt, Ludvig A. Munthe, Zlatko Dembic, Alexandre Corthay.** 2014, Frontiers in Immunology, pp. 150-230.

14. *Aberrant Expression of MHC Class II in Melanoma Attracts Inflammatory Tumor-Specific CD4+ T- Cells, Which Dampen CD8+ T-cell Antitumor Reactivity.* **Marco Donia, Rikke Andersen, Julie W. Kjeldsen, Paolo Fagone, Shamaila Munir, Ferdinando Nicoletti, Mads Hald Andersen, Per thor Straten, Inge Marie Svane.** 2015, Cancer Research, pp. 75(18):3747-59.

15. **Chamuleau.** CD4+ T cells and antitumor immunity. *Wikipedia.* [Online] 2006. https://en.wikipedia.org/wiki/CD4%2B_T_cells_and_antitumor_immunity.

16. **Qiu.** [Online] 1999. https://en.wikipedia.org/wiki/CD4%2B_T_cells_and_antitumor_immunity.

17. **Chamuleau.** [Online] 2006. https://en.wikipedia.org/wiki/CD4%2B_T_cells_and_antitumor_immunity.

18. **Perussia, Trincheiri and.** [Online] 1985. https://en.wikipedia.org/wiki/CD4%2B_T_cells_and_antitumor_immunity.

19. **Dieter Kabelitz and Stefan H.E. Kaufmann.** *Methods in Microbiology - (Vol 32).* Berlin : Elsever science ltd, 2000.

20. *CIITA methylation and decreased levels of HLA-DR in tumour progression.* **N. Iizuka, M. Oka.** 2004, British Journal of Cancer, p. 91(4): 813.

21. *A Comparative Study on the In Vitro Effects of the DNA Methyltransferase Inhibitor 5-Azacytidine (5-AzaC) in Breast/Mammary Cancer of Different Mammalian Species.* **Harman RM, Curtis TM, Argyle DJ, Coonrod SA, Van de Walle GR.** 27002722, s.l. : Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2016. 10.1007/s10911-016-9350-y.

22. *Azacytidine-induced tumorigenesis of CHEF/18 cells: correlated DNA methylation and chromosome changes.* **Harrison JJ, Anisowicz A, Gadi IK, Raffeld M, Sager R.** s.l. : Proceedings of the National Academy of Sciences, 1983 , Vols. 80(21):6606-10. 6195661 .

23. *5-Azacytidine/Azacitidine .* **Martens, UM, ed.** ISBN 978-3-642-01222-8., Heidelberg : Springer, 2010, Vol. Small molecules in oncology.Recent Results in Cancer Research, pp. 159–170. doi:10.1007/978-3-642-01222-8.

24. *Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. .* **Stresemann, C.; Lyko, F.** doi:10.1002/ijc.23607, s.l. : Int. J. Cancer, 2008, Vols. 123 (1): 8–13. PMID 18425818.

25. *Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies.* **Kotla, V., Goel, S., Nischal, S., Heuck, C., Vivek, K., Das, B. and Verma, A.:.** 2: 36, s.l. : J Hematol Oncol, 2009.

26. *lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellularcytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells.* **Wu, L., Adams, M., Carter, T., Chen, R., Muller, G., Stirling, D., Schafer, P. and Bartlett, J.B.** 14: 4650-4657, s.l. : Clin Cancer Res, 2008.

27. *Lenalidomide enhances anti-myeloma cellular immunity.* **Luptakova, K., Rosenblatt, J., Glotzbecker, B., Mills, H., Stroopinsky, D., Kufe, T., Vasir,B., Arnason, J., Tzachanis, D., Zwicker, J. I., Joyce, R. M., Levine, J. D., Anderson, K. C., Kufe, D.and Avigan,.** 62: 39-49, s.l. : Cancer Immunol Immunother, 2013.

28. *Intraosseous injection of RM1 murine prostate cancer cells promotes rapid osteolysis and periosteal bone deposition.* **N. Patrick McCabe, Maria Madajka, Amit Vasanji, and Tatiana V. Byzovacorresponding .** Issue 5, s.l. : Clin Exp Metastasis, 2010 , Vol. Volume 25.

29. *Induction of protective immunity to RM-1 prostate cancer cells with ALVAC-IL-2/IL-12/TNF-alpha combination therapy.* **Grant JF1, Iwasawa T, Sinn HW, Siemens DR, Griffith TS, Takacs EB, Ratliff TL.** 119(11):2632-41., s.l. : Int J Cancer, 2006.

30. *Cancer modeling in the modern era: progress and challenges.* **Terry Van Dyke, Tyler Jacks.** Issue 2, s.l. : Cancer review, 2002, Vol. Volume 108. p135–144.

31. *Mouse models of cancer.* **Cheon DJ, Orsulic S.** s.l. : Annu Rev Pathol, 2011, Vols. 6:95-119. doi: 10.1146/annurev.pathol.3.121806.154244..

32. **Todua, Kote.** პროსტატის კიბო. *Geosexmd.* [Online] November 22, 2011. https://goo.gl/dWvd5Z.

33. *How do CD4+ T cells detect and eliminate tumor cells that either lack or express MHC class II molecules?* .