

ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო  
უნივერსიტეტი

თ ა მ ა რ ც ე რ ც ვ ა ძ ე

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი  
ბიოლოგიის მიმართულება  
050410-იმუნოლოგია

*ბ ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიის პირობებში მონოციტების  
ფუნქციური და ფენოტიპური ცვლილებები*

დ ი ს ე რ ტ ა ც ი ა

ბიოლოგიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

სამეცნიერო ხელმძღვანელი,  
თსუ იმუნოლოგიისა და მიკრობიოლოგიის  
კათედრის გამგე, პროფესორი

ნინო ფორაქიშვილი



თბილისი

2015

**Iv. Javakhishvili Tbilisi State University**

**Tamar Tsertsvadze**

**Faculty of Exact and Natural Sciences**

**Department of Biology**

050410-Immunology

**Functional and phenotypic changes in monocytes in B cell Chronic  
Lymphocytic Leukaemia (B-CLL)**

**Research Director,**

**Professor**

**Nino Porakishvili**

**Tbilisi**

**2015**

## ანოტაცია

B ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემია (B-ქლლ) – ლეიკემიის ყველაზე გავრცელებული ფორმაა აშშ-სა და ევროპაში, საქართველოს ჩათვლით. ლეიკემიასთან დაკავშირებული სიმპტომოკომპლექსის გარდა, ქლლ პაციენტებს ახასიათებთ ინფექციური დაავადებებით მაღალი ავადობა რომელიც შეიძლება იყოს გამოწვეული როგორც ლეიკემიის პროგრესირებით, ასევე ქიმიოთერაპიით, და მიუთითებს შეძენილ იმუნოდეფიციტზე. იმუნოდეფიციტი მოიცავს როგორც ადაპტურ, ასევე თანდაყოლილ იმუნურ პასუხებს, მათ შორის მონოციტების ანტიმიკრობულ ფუნქციებს. ამასთანავე მონოციტები მონაწილეობენ ანტისიმსივნურ იმუნოთერაპიაში, განაპირობებენ რა თერაპიული ანტისხეულებით ოფსონირებული სიმსივნური უჯრედის Fcγ-რეცეპტორ (FcγR)-გაშუალებულ ფაგოციტოზს.

ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა B-ქლლ-ის დროს შეგვესწავლა პერიფერული სისხლის მონოციტების ფუნქციური და ფენოტიპური ცვლილებები, და დაგვედგინა ანტი-CD64/ანტი-CD19 ბისპეციფიური ანტისხეულის უნარი გამოიწვიოს B-ქლლ უჯრედების ფაგოციტოზი. ამთვის შევისწავლეთ *ex vivo* გამოყოფილი და G-CSF და IFN ციტოკინებით აქტივირებული მონოციტების მიერ ოფსონირებული და არაოფსონირებული *Staphylococcus aureus* -ის შთანთქმის უნარი. ასევე დავადგინეთ CD64, CD32 და CD16 Fc რეცეპტორების და თოლ-მსგავსი რეცეპტორის CD180-ის ექსპრესიის პროფილი მონოციტებზე, B-ქლლ Rai სტადიასთან და ავადმყოფების მკურნალობასთან კორელაციაში; შევისწავლეთ B-ქლლ უჯრედების ანტიგენმტვირთავი ფენოტიპი, რეგულატორი რეცეპტორების ექსპრესია პროლიფერირებად ქლლ MEC1 უჯრედულ ხაზზე.

მიღებული შედეგების თანახმად, B-ქლლ-ით დაავადებულებში, ჯანმრთელ საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით, ადგილი აქვს მონოციტების მიერ *Staphylococcus aureus* -ის მიერთებისა და შთანთქმის ფუნქციის მნიშვნელოვან დაქვეითებას, რომელიც G-CSF და IFN ციტოკინებით სტიმულაციისას კიდევ უფრო ღრმავდება. აგრეთვე აღინიშნება Fcγ-რეცეპტორების CD64 და CD16 და CD180-ის ექსპრესიის დაქვეითება, რაც ასუსტებს მონოციტების ანტიბაქტერიულ იმუნურ პასუხებს. CD32 ექსპრესია კი, პირიქით, ქლლ უჯრედებზე მნიშვნელოვნად არის გაზრდილი, ისევე როგორც MEC1 უჯრედების გრძელვადიან კულტურაში, მაშინ როდესაც CD180 ექსპანსია MEC1 უჯრედებში შემცირებულია 0-96-საათიანი ზრდის პირობებში. ეს მეტყველებს ქლლ უჯრედების აქტივაციაზე პროლიფერაციის პროცესში, რამაც, შესაძლოა, გააძლიეროს მათი შემდგომი გადარჩენა და ექსპანსია ლიმფოიდური ქსოვილების პროლიფერატორულ ცენტრებში.

ჩვენს მიერ მოპოვებული მონაცემები საშუალებას იძლევა დაიგეგმოს B-ქლლ-ს დროს მონოციტების ფუნქციური აქტივობის კორექციის მიმართულება, რათა შესაძლებელი გახდეს, ერთის მხრივ, ქლლ ინფექციური გართულებების მიმართ მგრძნობელობის მიზეზების აღმოფხვრა, მეორეს მხრივ კი, B-ქლლ-ს საწინააღმდეგოდ ეფექტური იმუნოთერაპიული მეთოდების შემუშავება. ჩვენ ვაჩვენეთ, რომ ბისპეციფიური ანტი-CD64/ანტი-CD19 ანტისხეულის მნიშვნელობა ქლლ-ის თერაპიაში ჰეტეროგენულია და მოითხოვს ინდივიდუალურ მიდგომას *in vitro* ტესტირების საფუძველზე.

## Annotation

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukaemia in the US and in Europe, including Georgia. Patients with CLL are susceptible to infectious diseases as a result of both, the disease progression and chemotherapy that indicates deficiency of immune responses to pathogens, including innate immunity, mediated by monocytes. Monocytes are also often recruited by therapeutic antibodies which exert anti-tumour toxicity through Fc  $\gamma$ -receptor (Fc  $\gamma$ R)-mediated phagocytosis of opsonised leukaemic cells.

The aim of this research was to study an important innate component of immunodeficiency in B-CLL such as functional and phenotypic changes of peripheral blood monocytes, and establish the ability of anti-CD64/anti-CD19 bispecific antibody to induce phagocytosis of B-CLL cells. For this we studied the ability of freshly isolated ex vivo or activated by G-CSF and IFN  $\gamma$  cytokines monocytes to absorb opsonized and non-opsonized *Staphylococcus aureus* particles. We identified the expression profile of CD64, CD32 and CD16 Fc  $\gamma$  receptors and Toll-like CD180 receptor on monocytes in correlation with B-CLL Rai stage and treatment, and on proliferating MEC1 cell line cells.

Our data demonstrated that monocyte ability to engulf opsonized *Staphylococcus aureus* was significantly decreased and that the monocytes from B-CLL patients compared to normal age-matched control volunteers were unable to efficiently phagocytose the bacterial particles. Peripheral blood monocytes of CLL patients were characterized by reduced expression of CD64, CD16 and CD180 that would substantially undermine their ability to contribute to anti-bacterial immune responses. In addition, aberrant expression of CD64 would negatively affect the efficiency of antibody-mediated immunotherapies. In contrast, CD32 is significantly increased on CLL cells as well as on MEC1 cells in a long-term culture, whilst CD180 expression on MEC1 cells drops throughout 0-96h of culture. This would indicate augmented activation of CLL cells during cells culture which might further support CLL cell survival and expansion in proliferation centers in bone marrow and lymph nodes.

Our data would help to identify optimal approaches to the correction of monocytic deficiencies in B-CLL. This would allow first of all, to decrease bacterial infections pre- and post therapeutic intervention, and to develop novel effective treatments of CLL. It is evident from the results of this study that effectiveness of bispecific anti-CD64/anti-CD19 antibody for the purpose of induction of phagocytosis of leukemic cells is heterogeneous and requires individual approach following in vitro testing.

## სარჩევი

შემოკლებების სია .....	6
შესავალი .....	8
თავი 1. ლიტერატურის მიმოხილვა .....	12
1.1. B-ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემია (B-ქლლ) .....	12
1.1.1. B-ქლლ ეპიდემიოლოგია და დიაგნოსტიკა .....	12
1.1.2 B-ქლლ უჯრედების იმუნოფენოტიპი .....	13
1.1.3 B-ქლლ პროგნოსტიფიცირება .....	16
1.1.4 ციტოგენეტიკური და გენური ცვლილებები .....	19
1.1.5 თანმხლები გართულებები და მკურნალობა .....	19
1.2 მონოციტები და მაკროფაგები: ფენოტიპი, ფუნქცია .....	23
1.2.1 ფაგოციტოზი და მისი ეტაპები .....	26
1.2.2 ფაგოციტოზში მონაწილე რეცეპტორები .....	28
1.2.2.1 Fcγ -რეცეპტორები .....	28
1.2.3 G-CSF-ისა და IFNγ-ს გავლენა .....	34
1.2.4 თოლ-მსგავსი რეცეპტორები (TLR) .....	35
1.2.4.1 TLR ოჯახის დახასიათება .....	35
1.2.4.2 TLR-ების ექსპრესია მონოციტ/მაკროფაგებზე .....	38
1.3 MEC1 უჯრედული ხაზი .....	39
თავი 2. გამოყენებული მასალა და კვლევის მეთოდები .....	41
თავი 3. მიღებული შედეგები და მათი განხილვა .....	48
3.1 ქლლ მონოციტებს დაქვეითებული აქვთ ბაქტერიების ფაგოციტოზის უნარი .....	48
3.2 Fcγ-რეცეპტორების და CD180-ის ექსპრესია ქლლ მონოციტებზე დაქვეითებულია..	53
3.3 B-ქლლ უჯრედების ანტიგენ-მტვირთავი ფენოტიპი.....	61
3.4 რეგულატორი რეცეპტორების ექსპრესია პროლიფერირებად ქლლ უჯრედებზე ....	64
3.5 ფაგოციტების მიერ ქლლ უჯრედების დამიზნება ბისპეციფიური ანტისხეულის ანტი-CD19/ანტი-CD64 მეშვეობით .....	68
დასკვნა .....	77
გამოყენებული ლიტერატურის სია .....	78

## შემოკლებების სია

აიუკ - აქტივაციით ინდუცირებული უჯრედული კვდომა

ბსას - ბისპეციფიური ანტისხეული

გფა - გუანოზინტრიფოსფატი

მპო - მიელოპეროქსიდაზა

მკა - მონოკლონური ანტისხეული

პმნ - პოლიმორფულბირთვიანი ნეიტროფილები

სოდ - სუპეროქსიდდისმუტაზა

ჰმკ - ჰისტოშეთავსებულობის მთავარი კომპლექსი

AID - Activation-induced Cytidine Deaminase (აქტივაციით გამოწვეული ციტიდინ დეამინაზა)

ASCT - Autologous Stem Cell Transplantation (აუტოლოგიური ღეროვანი უჯრედების ტრანსპლანტაცია)

BCR – B Cell Receptor (B უჯრედული რეცეპტორი, ბურ)

B-ქლლ - B-ქრინიკული ლიმფოციტური ლეიკემია

CD - Cluster of Differentiation (დიფერენცირების კლასტერი)

COP - Cyclophosphamide, Vincristine, Prednisolone (ციკლოფოსფამიდი, ვინკრისტინ სულფატი, პრედნიზონი)

CR - Complement Receptor (კომპლემენტის რეცეპტორი)

DD - Death Domain (სიკვდილის დომენი)

FcR - Fc- Receptor (Fc-რეცეპტორი)

FCR - Fludarabin, Cyclophosphamide, Rituximab (ფლუდარაბინი, ციკლოფოსფამიდი, რიტუქსიმაბი)

G-CSF - Granulocyte Colony Stimulating factor (გრანულოციტების კოლონიების მასტიმულირებელი ფაქტორი)

GM-CSF - Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor (გრანულოციტ/მაკროფაგების კოლონიების მასტიმულირებელი ფაქტორი)

HLA - Human Leukocyte Antigens (ადამიანის ლეიკოციტური ანტიგენები)

ICAM - Intercellular Adhesion Molecule (უჯრედშორისი ადჰეზიური მოლეკულები)

IFN - Interferon (ინტერფერონი)

Ig - Immunoglobulin (იმუნოგლობულინი)

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

IL - Interleukin (ინტერლეიკინი)

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

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

MFI - Mean Fluorescence Intensity (ფლუორესცენციის საშუალო ინტენსივობა, ფსა)

MHC - Major Histocompatibility Complex (მთავარი ჰისტოკომეთავსებულობის კომპლექსი)

MyD88 - Myeloid Differentiation Factor 88 (მიელოიდური დიფერენციაციის ფაქტორი 88)

NADP - Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (ნიკოტინ ადენინ დინუკლეოტიდ ფოსფატი)

NK - Natural killer (ბუნებრივი კილერი)

NTP - Nucleoside Transporter Protein (ნუკლეოტიდების გადამტანი ცილა)

PAMP - Pathogen-associated molecular pattern (პათოგენტთან ასოცირებული მოლეკულური ნაკრებები)

PBS - Phosphate Buffer Saline (ფოსფატური ბუფერები)

sIg - surface Immunoglobulin (ზედაპირული იმუნოგლობულინი)

TCR - T-Cell Receptor (T უჯრედული რეცეპტორი)

TdT - Terminal deoxynucleotidyl transferase (ტერმინალური დეოქსინუკლეოტიდილ ტრანსფერაზა)

TGF - Transforming Growth Factor (მატრანსფორმირებელი ზრდის ფაქტორი)

TLR - Toll-like Receptor (თოლ მსგავსი რეცეპტორი)

TNF - Tumor Necrosis Factor (სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორი)

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

## შესავალი

B-ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემია (B-ქლლ) არის ავთვისებიანი ლიმფოპროლიფერატორული დაავადება. ქლლ-ის შემთხვევათა 95% B უჯრედული ფენოტიპისაა, მხოლოდ 5% მიეკუთვნება T-ქლლ-ს, ამიტომაც თანამედროვე სპეციალურ ლიტერატურაში B-ქლლ მოიხსენიება როგორც ქლლ (Dighiero *et al.*, 2008). ჩვენ ამ ნაშრომში ორივე აბრევიატურას გამოვიყენებთ. B-ქლლ მოზრდილთა ლეიკემიების ყველაზე გავრცელებული ფორმაა დასავლეთის ქვეყნებში და საქართველოში, შეადგენს რა ყველა ლეიკემიის დაახლოებით 30%-ს. საინტერესოა, რომ შორეული აღმოსავლეთის ქვეყნებში (იაპონია, კორეა, ჩინეთი) მისი გავრცელების სიხშირე 5%-ს არ აღემატება, თუმცა ჯერჯერობით არ არსებობს ახსნა ამ ეპიდემიოლოგიური განსხვავებების ([www.cancer.net](http://www.cancer.net)). B-ქლლ ძირითადად გვხვდება ხანდაზმულ (50 წელს ზემოთ) პირებში, დაავადების საშუალო ასაკი არის 72 წელი (Young *et al.*, 2006; Ferrajoli *et al.*, 2010; Delgado *et al.*, 2014). მამაკაცებში ქლლ-ს დიაგნოზი დაახლოებით ორჯერ მეტია, ვიდრე ქალებში, თანაფარდობით 1.7:1 (Dong *et al.*, 2012).

B-ქლლ ხასიათდება CD5<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup>(low)/CD23<sup>+</sup> ფენოტიპის მქონე B უჯრედების კლონური ექსპანსიით და აკუმულირებით პერიფერიულ ლიმფურ ორგანოებსა და ქსოვილებში და ძვლის ტვინში (Chiorazzi *et al.*, 2003; Ghia *et al.*, 2007; Hallek *et al.*, 2008). აღსანიშნავია, რომ ლეიკემიური უჯრედების პროლიფერაცია მიმდინარეობს მხოლოდ ე.წ. „პროლიფერატორულ ცენტრებში“ - პირველ რიგში ძვლის ტვინში, ნაკლებად - ლიმფურ კვანძებში, ხოლო პერიფერიული სისხლიდან გამოყოფილი ლიმფოციტები გაჩერებული არიან უჯრედული ციკლის Go/G1 ფაზაში (Shanafelt *et al.*, 2009; Giné *et al.*, 2010). ნაჩვენებია, რომ ქლლ უჯრედები პასუხობენ რა თავისი B უჯრედული რეცეპტორით (B cell receptor, BCR) (აუტო)ანტიგენებზე, დამხმარე სიგნალ(ებ)ს დებულობენ მიკროგარემოსგან. ეს სიგნალები ხელს უწყობენ ლეიკემიური უჯრედების გადარჩენას აპოპტოზისგან, დაყოფას, და ექსპანსიას *in vivo* (Ghia *et al.*, 2008). B-ქლლ-ის იმუნოპათოგენეზის მექანიზმის დასადგენად მეტად მნიშვნელოვანია როგორც (პოლი)სპეციფიური ანტიგენების დადგენა, ასევე დამხმარე სიგნალების დახასიათება.

B-ქლლ-ის მკურნალობა მკვეთრად გაუმჯობესდა კლინიკურ, ბიოლოგიურ და გენეტიკურ პარამეტრებზე დაფუძნებული პროგნოზის და რისკის ფაქტორების შეფასების საფუძველზე (Hallek *et al.*, 2013). B-ქლლ მკურნალობის თანამედროვე საშუალებები მოიცავენ ქიმიოთერაპიას (ფლუდარაბინი, კლადრიბინი, 2-ქლოროდიოქსიადენოზინი, ბენდამუსტინი); იმუნოთერაპიას (მონოკლონური ანტისხეულები: რიტუქსიმაბი, ალემტუზუმაბი და ოფატუმუმაბი), მოლეკულურ თერაპიას (პროტეინკინაზების ინჰიბიტორები: იბრუტინიბი, იდეალისიბი და სხვა) და კომბინირებული თერაპია (Montserrat *et al.*, 1996; Shanafelt *et al.*, 2012). ასე მონოკლონური ანტისხეულების (მკა) მონოთერაპიის სახით ეფექტურობა დაბალია, და აუცილებელია კომბინირებული სქემების გამოყენება ქიმიოთერაპიასთან ერთად



(Fernandez *et al.*, 1997). ეს უკანასკნელი ხასიათდება რა ძლიერი ციტოტოქსიურობით, ლეიკემიურ უჯრედებთან ერთად აზიანებს ნორმალურ, განსაკუთრებით, ძვალტვინოვან უჯრედებს და იწვევს გვერდით მოვლენებს და გართულებებს, როგორცაა, მაგალითად, იმუნოდეფიციტი. საქართველოში, კვლავინდებურად გამოიყენება B-ქლლ-ის პოლითერაპიული მკურნალობა ე.წ. COP (ციკლოფოსფამიდი, ვინკრისტინ სულფატი, პრედნიზონი), და სწორედ ამ კომპლექსით ნამკურნალებ ქლლ პაციენტების პერიფერულ სისხლს ჩვენ ვიყენებდით ამ ნაშრომში.

B-ქლლ პაციენტებში მომატებულია ინფექციური დაავადებების სიხშირე შეძენილი იმუნიტეტის ჩამოყალიბების გამო, რაც წარმოადგენს დაავადების მსვლელობის ან/და აქტიური თერაპიის შედეგს. B-ქლლ პაციენტების სიკვდილის უმთავრესი მიზეზი არის ბაქტერიული ან ვირუსული ინფექცია, უფრო ნაკლები სიხშირით გვხვდება მიკობაქტერიული ან სოკოვანი ინფექციები, და რიხტერის ტრანსფორმაცია აგრესიულ ლიმფომაში (Castejon *et al.*, 1997; Chiorazzi *et al.*, 2005; Efremov *et al.*, 2007).

იმუნოდეფიციტის მნიშვნელოვან შემადგენელ ნაწილს ფაგოციტური სისტემის დარღვევა წარმოადგენს, რომლის ერთ-ერთი კომპონენტია მონოციტ/მაკროფაგები. მიუხედავად იმისა, რომ მათი ფუნქციური უკმარისობა შესაძლებელია მოგვევლინოს იმუნოდეფიციტის მნიშვნელოვან მიზეზად, ინფორმაცია ამის შესახებ ხელმისაწვდომ ლიტერატურაში მეტად მწირია. გარდა ამისა, ფაგოციტების ფუნქციურ მდგომარეობას დიდი მნიშვნელობა აქვს მონოკლონური ანტისხეულებით მკურნალობისთვის. ზოგიერთი მკა-ს, როგორცაა, მაგალითად, ანტი-CD20 რიტუქსიმაბი, თერაპიული ეფექტი, გამოწვეულია ოფსონიზირებული ლეიკემიური უჯრედების განადგურებით Fc-რეცეპტორებით განპირობებული ანტისხეულდამოკიდებული ციტოტოქსიურობის და კომპლემენტ-დამოკიდებული ლიზისის საშუალებით (Byrd *et al.*, 2001; Grdiša *et al.*, 2004). სხვადასხვა Fc-რეცეპტორები ექსპრესირებულია მთერ რიგ უჯრედებზე, მათ შორის ფაგოციტურ უჯრედებზე, მაგრამ მათი როლი ოფსონიზირებული ლეიკემიური უჯრედების დესტრუქციაში სათანადოდ შესწავლილი არ არის.

უკანასკნელ პერიოდში დიდ ყურადღებას იპყრობს ბისპეციფიური ანტისხეულების (ბსას) გამოყენება ლეიკემიების სამკურნალოდ, სადაც მთავარი ეფექტორის როლს ფაგოციტური უჯრედები თამაშობენ, უზრუნველყოფენ რა მათ *in vivo* აქტივაციას და მობილიზაციას. ანტი-CD19/ანტი-CD64 ბისპეციფიური ანტისხეული უკავშირდება რა CD19 მოლეკულებს B-ქლლ უჯრედებზე და CD64 მოლეკულებს (FcγRI) ექსპრესირებულ მონოციტებზე და აქტივირებულ ნეიტროფილებზე, იწვევს ლეიკემიური უჯრედების ფაგოციტოზს (Crespo *et al.*, 2003; Wiestner *et al.*, 2003). ბისპეციფიური ანტისხეულების გამოყენება, ამდენად, წარმოადგენს სიმსივნეთა მკურნალობის ერთ-ერთ პერსპექტიულ სტრატეგიას.

ზემოთქმულიდან გამომდინარე, მეტად მნიშვნელოვნად მივიჩნიეთ სისხლის მონოციტების ფუნქციური მდგომარეობის შესწავლა B-ქლლ-ს დროს, ნეიტროფილურ

ფაგოციტებთან შედარებით. ეს საჭიროა ფაგოციტების იმ დარღვევების დასადგენად, რომლებიც ამ პაციენტებში, ჰიპოგამაგლობულინემიასთან ერთად, წარმოადგენს იმუნოდეფიციტის ჩამოყალიბების და ინფექციებისადმი მომატებული მგრძობელობის მიზეზს. მეორეს მხრივ, ფაგოციტების ფუნქციური მდგომარეობა გავლენას ახდენს რეკომბინანტული ანტისხეულების თერაპიულ პოტენციალზე.

### **კვლევის მიზანი და ამოცანები:**

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა B-ქლლ-ის დროს შეგვესწავლა ბუნებრივი იმუნოდეფიციტის მნიშვნელოვანი კომპონენტი, როგორცაა პერიფერული სისხლის მონოციტების და ანტიგენმაპრეზენტირებელი უჯრედების ფუნქციური და ფენოტიპური ცვლილებები, და დაგვედგინა ანტი-CD64/ანტი-CD19 ბისპეციფიური ანტისხეულის უნარი გამოიწვიოს B-ქლლ ლეიკემიური უჯრედების ფაგოციტოზი.

ამ მიზნის მისაღწევად დაისახა შემდეგი ამოცანები:

1. შეგვესწავლა *ex vivo* გამოყოფილი და G-CSF და IFN $\gamma$  ციტოკინებით აქტივირებული მონოციტების მიერ ოფსონიზებული და არაოფსონიზებული *Staphylococcus aureus* -ის ნაწილაკების შთანთქმის უნარი;
2. დაგვედგინა CD64, CD32 და CD16 Fc $\gamma$  რეცეპტორების და თოლ-მსგავსი რეცეპტორის CD180-ის ექსპრესიის პროფილი მონოციტებზე, B-ქლლ Rai სტადიასთან და ავადმყოფების მკურნალობასთან კორელაციაში;
3. შეგვესწავლა B-ქლლ უჯრედების ანტიგენმტვირთავი ფენოტიპი;
4. დაგვედგინა რეგულატორი რეცეპტორების ექსპრესია პროლიფერირებად ქლლ MEC1 უჯრედულ ხაზზე.
5. შეგვეფასებინა ანტი-CD64/ანტი-CD19 ბისპეციფიური ანტისხეულის მიერ B-ქლლ უჯრედების ფაგოციტოზის ინდუქციის უნარი *ex vivo* გამოყოფილი და G-CSF და IFN $\gamma$  ციტოკინებით აქტივირებული ნეიტროფილების მიერ.

### **მიღებული მონაცემების სამეცნიერო სიახლე:**

ნაშრომში პირველად იყო ნაჩვენები რომ:

1. B-ქლლ დროს ადგილი აქვს მონოციტების მიერ *Staphylococcus aureus* -ის მიერთებისა და შთანთქმის ფუნქციის მნიშვნელოვან დაქვეითებას, რომელიც G-CSF და IFN $\gamma$  ციტოკინებით სტიმულაციისას კიდევ უფრო ღრმავდება, რაც წარმოადგენს ბუნებრივი იმუნიტეტის დეფიციტის ერთ-ერთ მნიშვნელოვან შემადგენელ ნაწილს.
2. B-ქლლ მონოციტებზე ადგილი აქვს დაბალაფინური CD16 და, განსაკუთრებით, მაღალაფინური CD64 Fc $\gamma$  რეცეპტორების ექსპრესიის მკვეთრ დეფიციტს, რომელიც ღრმავდება დაავადების პროგრესირებასთან ერთად და უკიდურესად მქდავანდება B-ქლლ COP-ით მკურნალობის პირობებში.

3. B-ქლლ პირობებში ადგილი აქვს ორი ანტიგენწარმდგენელი უჯრედული პოპულაციის - მონოციტების და ქლლ უჯრედების, ფენოტიპის გადახრას CD32 Fcγ რეცეპტორის სასარგებლოდ. CD32-ის სელექციური უპირატესობა ჩვენს მიერ შესაწავლილ ანტიგენმტვირთავ რეცეპტორებს შორის უნიკალურია.
4. ინდივიდუალური B-ქლლ კლონები ხასიათდებიან მნიშვნელოვანი ჰეტეროგენულობით BCR-ის ნეგატიური რეგულატორების CD32-ის და CD5 მიხედვით, რომელთა ექსპრესია კორელირების მაღალი კოეფიციენტით გამოირჩევა.
5. პროლიფერირებად MEC1 უჯრედებზე იზრდება BCR-ის ნეგატიური რეგულატორის (CD32) და მცირდება აპოპტოზისგან გადამრჩენი რეცეპტორის ექსპრესია (CD180), რაც მიუთითებს ნეგატიური რეგულაციის გააქტივებას B-ქლლ უჯრედული ციკლის დროს.
6. ანტი-CD64/ანტი-CD19 ბისპეციფიურ ანტისხეულს გააჩნია ნეიტროფილების მიერ ქლლ ლეიკემიური უჯრედების ფაგოციტოზის ინდუქციის შეზღუდული უნარი, რომელზედაც G-CSF და IFNγ ციტოკინები გავლენას ვერ ახდენენ. შესაბამისად, ამ ანტისხეულის გამოყენება B-ქლლ იმუნოთერაპიის მიზნით უნდა მიმდინარეობდეს პაციენტების ინდივიდუალური მგრძობელობის დადგენის საფუძველზე.

**ნაშრომის თეორიული და პრაქტიკული მნიშვნელობა:**

ნაშრომს მნიშვნელოვანი თეორიული წვლილი შეაქვს არსებულ მონაცემებში B-ქლლ-ის დაავადებულებში პერიფერიული სისხლის მონოციტების ფუნქციის შესახებ. მასში ნათლადაა ნაჩვენები, რომ B-ქლლ-ით დაავადებული პირებისათვის დამახასიათებელია მონოციტების ფუნქციის არასრულფასოვნება, რომელიც მნიშვნელოვან როლს ასრულებს B-ქლლ დროს არსებული იმუნოდეფიციტის და ინფექციებისადმი მგრძობელობის ჩამოყალიბებაში. გარდა ამისა, ეს დეფიციტი საჭიროებს კორექციას ანტისიმსივნიური თერაპიის ისეთი მეთოდების გამოყენებამდე, რომლებიც აქტიურ ფაგოციტოზზეა დაყრდნობილი, როგორცაა მკა და ბსას. ამდენად, ნაშრომს დიდი პრაქტიკული მნიშვნელობა აქვს B-ქლლ მკურნალობის თერაპიული სტრატეგიების შემუშავებისათვის, ვინაიდან იგი იძლევა კონკრეტულ ინფორმაციას B-ქლლ-ს დროს მონოციტებში არსებული დარღვევების ხასიათის შესახებ.

ჩვენს მიერ მოპოვებული მონაცემები საშუალებას იძლევა დაიგეგმოს B-ქლლ-ს დროს მონოციტების ფუნქციური აქტივობის კორექციის მიმართულება, რათა შესაძლებელი გახდეს, ერთის მხრივ, ინფექციური გართულებების მიმართ მგრძობელობის მიზეზების აღმოფხვრა, მეორეს მხრივ კი, B-ქლლ-ს საწინააღმდეგოდ ეფექტური იმუნოთერაპიული მეთოდების შემუშავება. ასეთ მეთოდს მიეკუთვნება ბისპეციფიური ანტი-CD64/ანტი-CD19 ანტისხეულის გამოყენება ლეიკემიური უჯრედების ფაგოციტოზის ინდუქციის მიზნით. მოცემულ ნაშრომში ჩვენ თვალნათლივ ვაჩვენეთ, რომ ამ ანტისხეულის თერაპიული მნიშვნელობა ჰეტეროგენულია და მოითხოვს ინდივიდუალურ მიდგომას *in vitro* ტესტირების შემდეგ.

# თავი I

## ლიტერატურის მიმოხილვა

### 1.1. B-ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემია (B-ქლლ)

#### 1.1.1. B-ქლლ ეპიდემიოლოგია და დიაგნოსტიკა

B-ქლლ არის ავთვისებიანი ლიმფოპროლიფერატორული დაავადება, რომელიც ხასიათდება იმუნოლოგიურად არაკომპეტენტური, მონოკლონური CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup>(low)/CD23<sup>+</sup> B უჯრედების დიდი რაოდენობით დაგროვებით პერიფერულ ლიმფურ ორგანოებსა და ქსოვილებში და ძვლის ტვინში (Chiorazzi *et al.*, 2003; Ghia *et al.*, 2007; Burger *et al.*, 2009). პერიფერიაში B-ქლლ უჯრედები შეჩერებული არიან უჯრედული ციკლის G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> ფაზაში და არ პროლიფერირებენ, მაგრამ აქტიურად მრავლდებიან ე.წ. ძვალტვინოვან პროლიფერატორულ ცენტრებში (Shanafelt *et al.*, 2009; Giné *et al.*, 2010). B-ქლლ უჯრედებში ბლოკირებულია აპოპტოზის გამომწვევი სასიგნალო გზები, რითაც არის გამოწვეული მათი დაგროვება პერიფერულ ლიმფურ ორგანოებსა და სისხლში.

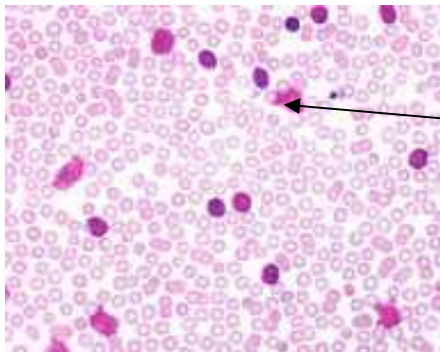
B-ქლლ უჯრედები მორფოლოგიურად მსგავსია მცირე მომწიფებული B ლიმფოციტების, მაგრამ ისინი ფუნქციურად მოუმწიფებელნი და იმუნოლოგიურად არაკომპეტენტურია, ვერ აწვდიან ნორმალურ იმუნურ პასუხს (Ghia *et al.*, 2008). B-ქლლ უჯრედების უმრავლესობა მიეკუთვნება ხანგრძლივად მცხოვრებ მეხსიერების ტიპის B უჯრედებს, რადგან ისინი მოკლებულია TdT-ს (Terminal deoxynucleotidyl transferase) და ექსპრესირებენ sIg<sup>+</sup> (surface immunoglobulin) და პან-B-უჯრედულ მარკერებს CD19, CD20, CD21 (Damle *et al.*, 2010).

B-ქლლ პირველადი დიაგნოზის კრიტერიუმია პერიფერიული სისხლში მონოკლონური B ლიმფოციტოზი, რომელიც აღემატება 5x10<sup>9</sup>/ლ და გრძელდება მინიმუმ 3 თვის განმავლობაში. ლიმფოციტოზის დადგენა ხშირად შემთხვევით ხდება რუტინული ლაბორატორული გამოკვლევისას. კლინიკურ სიმპტომატიკაში ჭარბობს არასპეციფიური ჩივილები, როგორცაა:

- უმტკივნეულო გაზრდილი ჯირკვლები კისრის, ილიის, ან საზარდულის მიდამოებში;
- დაღლილობა, უმადობა და ქოშინი;
- გამოხატული ანემია;
- ციებცხელება და განმეორებითი ინფექციები;
- ტკივილი ძვლების, ნეკნების და მუცლის მიდამოში;
- მარტივი სისხლის ჩაქცევები და სისხლდენა, თრომბოპენია.

მოციროვანი B-ქლლ კლონის არსებობა უნდა დაადასტურდეს გამდინარე ციტომეტრით. ტიპური ფენოტიპი ქლლ ლიმფოციტების არის CD5<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup>, CD10<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>. B-ქლლ კლონების 90% ახასიათებს ზედაპირული იმუნოგლობულინების (κ ან λ მსუბუქი ჯაჭვის, IgM, IgD) დაბალი ექსპრესია (Lewis *et al.*, 2005). B-ქლლ-თვის დამახასიათებელი CD23 ექსპრესიით მას არჩევენ მანტიის ზონის ლიმფომისაგან.

B-ქლლ-ის პერიფერიული სისხლის ნაცხში აღინიშნება უჯრედული ჩრდილები, ე.წ. გუმპრეხტის ჩრდილები (სურათი 1.1; Nowakowski *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2010). უჯრედული ჩრდილების რაოდენობა უკუკავშირშია ციტოჩინების მოლეკულა ვიმენტინის შიდაუჯრედულ ექსპრესიასთან (Nowakowski *et al.*, 2009).



უჯრედული ჩრდილები  
(გუმპრეხტის ჩრდილები)

**სურათი 1.1.** B-ქლლ პაციენტის პერიფერიული სისხლის ნაცხში უჯრედული ჩრდილები (გადიდება X400; (Nowakowski *et al.*, 2009).

B-ქლლ-ს დიაგნოზისთვის ძვლის ტვინის გამოკვლევა არ არის საჭირო, გამდინარე ციტომეტრი არის გადამწყვეტი სწორი დიაგნოზის დასასმელად (Hallek *et al.*, 2008), თუმცა ზოგ შემთხვევაში პროგნოსტიფიცირებისთვის საჭიროა ძვალტვინოვანი სურათის დადგენა. ძვლის ტვინის პათოლოგია გამოიხატება B-ქლლ უჯრედების ინფილტრაციით, ნაწილობრივი ანემიით ან თრომბოციტოპენიით (Clifford *et al.*, 2012).

### 1.1.2 B-ქლლ უჯრედების იმუნოფენოტიპი

B-ქლლ უჯრედების ფენოტიპი შეესაბამება მომწიფებული B ლიმფოციტის მორფოლოგიას. ისინი მიეკუთვნებიან TdT<sup>-</sup>, sIg<sup>+</sup> პოპულაციას და ექსპრესირებენ პან-B-უჯრედულ მარკერებს CD19, CD20, CD21. ზედაპირული იმუნოგლობულინების (sIg) ექსპრესია დაბალია, და ისინი ძირითადად, IgM და/ან IgD კლასს მიეკუთვნება (ძლიერ იშვიათია IgG ან IgA). B უჯრედული რეცეპტორი (BCR, ბურ) წარმოადგენს პოლირეაქტიულ აუტოანტისხეულს, და შესაძლოა, რომ B უჯრედების აკუმულირების და ექსპანსიის ერთ-ერთი მიზეზი არის სწორედ მისი ურთიერთქმედება აუტოანტიგენებთან. B-ქლლ-ზე კოექსპრესირდება CD5, რომელიც პან-T უჯრედული და B1 პოპულაციის მარკერია (Bichi *et al.*, 2002; Goldin *et al.*, 2010). მისი სიმკვრივე მაღალია, მაგრამ ინდივიდუალური ცვალებადობით ხასიათდება. ჯანმრთელ პირებში CD5 მოიპოვება სისხლის მიმოქცევაში მყოფი B უჯრედების მხოლოდ 5-10%-ზე და ლიმფოიდური ფოლიკულების მანტიის ზონის B უჯრედებზე (Bichi *et al.*, 2002; Goldin

*et al.*, 2010). CD5<sup>+</sup> B უჯრედები მიეკუთვნებიან ე.წ. B1 სუბპოპულაციას, რომელთა რაოდენობა მომატებულია აუტოიმუნური დაავადებების დროსაც (Youinou *et al.*, 2000). მართლაც, B-ქლლ-ის დროს მომატებულია აუტოიმუნური ჰემოლიზური ანემიის სიხშირე, და ლეიკემიური უჯრედების მიერ სეკრეტირებული IgM ხშირად ჯვარედინად რეაგირებს სხვადასხვა პოტენციურ აუტოანტიგენებთან (Nowakowski *et al.*, 2007; Galletti *et al.*, 2009). დღემდე არ არის დადგენილი, წარმოადგენენ B-ქლლ უჯრედები ნორმალური CD5<sup>+</sup> B უჯრედების ავთვისებიანი ტრანსფორმაციის, თუ ტრანსფორმირებულ B უჯრედებზე CD5-ის *de novo* ექსპრესიის შედეგს. ნორმალურ B1 უჯრედებზე CD5 მოლეკულა BCR-ის კომპლექსთან არის ასოცირებული, სადაც კორეცეპტორის და ნეგატიური რეგულატორის როლს ასრულებს. ვარაუდობენ, რომ CD5 მოლეკულას B-ქლლ უჯრედებში იგივე ფუნქცია აკისრია (Martin *et al.*, 2001; Gary-Gouy *et al.*, 2007). B-ქლლ უჯრედებზე CD5 ექსპრესირებულია ლიგანდთან, CD72-თან ერთად (Jurlander *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2002), რომელიც აგრეთვე ასრულებს BCR-ის ნეგატიური რეგულატორის როლს. CD5-ს შეუძლია დაბალაფინურად დაუკავშირდეს IgM-ის შემადგენლობაში VH რეგიონს. შესაძლებელია, სწორედ ამ ურთიერთქმედების გზით ხდება BCR-ის მეშვეობით გადარჩენის სიგნალის გადაცემა და ეს იყოს ერთ-ერთი მიზეზი B-ქლლ უჯრედების გახანგრძლივებული სიცოცხლისუნარიანობისა [Wiestner *et al.*, 2003].

B-ქლლ უჯრედებზე ექსპრესირებულია CD6, მემბრანული გლიკოპროტეინი, რომელიც გვხვდება მომწიფებულ T ლიმფოციტებზე, თიმოციტებზე და ნორმალური B უჯრედების მცირე სუბპოპულაციაზე. T უჯრედული აქტივაციის დროს CD6 დამხმარე მოლეკულის როლს ასრულებს. B-ქლლ უჯრედებში CD6 მონაწილეობს აპოპტოზის პროცესის დათრგუნვაში, ხელს უწყობს რა მათ გადარჩენას Bcl-2/Bax თანაფარდობის რეგულაციის (ზრდის) გზით (Sanz *et al.*, 2004).

ნორმალური B ლიმფოციტების მსგავსად, B-ქლლ უჯრედების ზედაპირზე ექსპრესირებული CD19 ქმნის სიგნალის გადამცემ არაკოვალენტურ კომპლექსს CD21-თან, CD81-თან და არაკლასტერულ Leu-13-თან. BCR-ის CD19-თან, CD21-თან ან CD81-თან ჯვარედინი დაკავშირება ხელს უშლის B-ქლლ უჯრედებში Ca<sup>2+</sup> იონების მობილიზაციას და აქვეითებს პროლიფერაციის უნარს (Mongini *et al.*, 2003; Vences-Catalán *et al.*, 2012).

ზედაპირული რეცეპტორი CD20, მსგავსად CD19-ის, ექსპრესირდება ყველა B-ქლლ უჯრედზე, მაგრამ მისი ექსპრესიის სიმკვრივე საგრძნობლად დაბალია ნორმასთან შედარებით (Breton *et al.*, 2014).

B-ქლლ უჯრედების ერთ-ერთი მთავარი მარკერი, რომლის საშუალებითაც ხდება მათი იდენტიფიცირება, არის ტრანსმემბრანული გლიკოპროტეინი CD23. იგი IgE-ს დაბალაფინური რეცეპტორია, რომელიც მონაწილეობს ლიმფოციტების ზრდასა და პროლიფერაციაში და რომელსაც შეუძლია დაუკავშირდეს CD21-ს. ალტერნატიული

სპლაისინგით მიიღება CD23-ის ორი იზოფორმა: CD23a და CD23b (Onguru *et al.*, 2011). CD23a დაკავშირებულია უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობასთან, ხოლო CD23b - უჯრედის პროლიფერაციასთან (Ewart *et al.*, 2002). B-ქლლ უჯრედების ციტოკინებით სტიმულირება იწვევს CD23-ის ამ ორი ფორმის წარმოქმნის დარღვევას. მემბრანული ქლლ უჯრედებიდან პროტეოლიზური დეგრადაციის შედეგად სპონტანურად გამოიყოფა CD23-ის ხსნადი (სეკრეტორული) ფორმა - sCD23, რაც წარმოადგენს დაავადების მსვლელობის უარყოფითი პროგნოზის მარკერს (Acharya *et al.*, 2010).

B-ქლლ უჯრედების დაახლოებით 50%-ზე ექსპრესირდება ინტერლეიკინ-2 (IL-2)-ის რეცეპტორი CD25, რომლის ხსნადი შრატისმიერი ფორმის კონცენტრაცია მნიშვნელოვნად არის მომატებული და კორელაციაშია B-ქლლ-ის კლინიკურ სტადიასთან (Decker *et al.*, 2010).

კიდევ ერთი ზედაპირული მოლეკულის CD40-ის ურთიერთქმედებით მის ლიგანდთან, ექსპრესირებულ აქტივირებულ T ლიმფოციტებზე CD40L მიღებული სიგნალი ძალზედ მნიშვნელოვანია B ლიმფოციტების აქტივაციისა და პროლიფერაციისათვის. აღმოჩნდა, რომ B-ქლლ-ის დროს დაქვეითებულია აქტივირებულ T ლიმფოციტებზე CD40L-ის ექსპრესია, მაგრამ ამ ფუნქციას თვით ქლლ უჯრედები აიტაცებენ (Porakishvili *et al.*, 2001, 2004; von Bergwelt-Baildon *et al.*, 2004; Kay *et al.*, 2005).

მომწიფებული B უჯრედების BCR არის მულტიმერული კომპლექსი, რომელიც ფორმირდება ზედაპირული იმუნოგლობულინის ჰომოდიმერისაგან. მასთან დისულფიდური ბმებით დაკავშირებულია ჰეტეროდიმერი CD79a/CD79b (Ig $\alpha$ /Ig $\beta$ ), რომელიც სიგნალის გადაცემას უზრუნველყოფს. CD79b BCR-ის კომპონენტია, რომელიც თამაშობს მნიშვნელოვან როლს აპოპტოზის ინდუქციაში, გავლენას ახდენს ანტიგენის ინტერნალიზაციაზე და ზრდის ანტიგენის წარდგენის ეფექტურობას. B-ქლლ ავადმყოფების დაახლოებით 2/3-ის უჯრედებზე CD79b-ს ექსპრესია ძალიან დაბალია ან საერთოდ არ არის. ვარაუდობენ, რომ ეს თამაშობს ცენტრალურ როლს დაავადების პათოგენეზში (Minuzzo *et al.*, 2005). B-ქლლ უჯრედებზე დაბალი სიმკვრივითაა წარმოდგენილი ზედაპირული IgM/IgD (Packham *et al.*, 2010), ხოლო ციტოპლაზმაში დიდი რაოდენობით ექსპრესირდება ანტი-აპოპტოზური ონკოპროტეინი bcl-2, რაც ზრდის bcl-2/Bax ინდექსს და დიდ როლს თამაშობს აპოპტოზის ინჰიბირებაში (Datta *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2001).

ბოლო წლებში დიდ ყურადღებას იპყრობს ქლლ უჯრედებზე თოლ-მსგავი რეცეპტორების (Toll Like Receptors, TLR) ექსპრესია და როლი, განსაკუთრებით კი - CD180 და TLR9, რომლებზეც ქვემოთ უფრო დაწვრილებით ვისაუბრებთ (Porakishvili *et al.*, 2005; 2011; 2015).

### 1.1.3 - B-ქლლ - ის პროგნოსტიფიცირება

B-ქლლ-ის კლინიკური მიმდინარეობა მრავალფეროვანია და ინდივიდუალურ ხასიათს ატარებს. ავადმყოფთა ერთ ჯგუფში იგი წლების განმავლობაში ნელა პროგრესირებს და, ამდენად, ხანგრძლივი დროის განმავლობაში არ მოითხოვს სპეციფიკურ მკურნალობას. ზოგჯერ სიკვდილის მიზეზი სრულიად სხვა დაავადება ხდება, მაგალითად, ინფექციური გართულება. მეორე ჯგუფის ავადმყოფებში კი B-ქლლ მსვლელობა აგრესიულ ხასიათს იძენს, სწრაფად პროგრესირებს და სწრაფადვე სრულდება ლეტალური შედეგით. ქლლ დაავადების სავალალო პროგნოზია რიხტერის სინდრომი, რომელიც განიხილება, როგორც მეორადი კიბო. რიხტერის სინდრომს დროს ადგილი აქვს ქლლ-ის ტრანსფორმაციას აგრესიულ დიდ გრანულარულ ლიმფომად ან ჰოჯკინის ლიმფომად (Mao *et al.*, 2007; Parikh *et al.*, 2014).

B-ქლლ-ის კლასიფიკაციისათვის გამოიყენება Rai-სა და Binet-ის სისტემები (Rai *et al.*, 1975; Binet *et al.*, 1981; Hallek *et al.*, 2008). ორივე სისტემა გამოირჩევა სიმარტივით, მაგრამ არცერთი მათგანი არ არის სრულყოფილი.

Rai-ს მიხედვით B-ქლლ იყოფა 4 სტადიად: დაბალი რისკის ჯგუფი - 0 სტადია, საშუალო რისკის ჯგუფი - I და II სტადიები, მაღალი რისკის ჯგუფი - III და IV სტადიები (ტაბულა 1.1; Rai *et al.*, 1975). Binet-ის კლასიფიკაციაში გამოიყოფა A, B და C სტადიები დაავადების სიმძიმის მიხედვით (ტაბულა 1.2). კლინიკური სტადიის გარდა, არაკეთილსაიმედო პროგნოზული ფაქტორია პაციენტის ასაკი (>55) და მამრობითი სქესი (Binet *et al.*, 1981; Hallek *et al.* 2008).

ტაბულა 1.1. B-ქლლ-ს კლასიფიკაცია Rai სისტემის მიხედვით

სტადია	ცვლილებები სტადიებზე	აღწერა	სიცოცხლის ხანგრძლივობა, წლები
0	დაბალი რისკის ჯგუფი	ლიმფოციტოზი	>10
I	საშუალო რისკის ჯგუფი	ლიმფოციტოზი + ლიმფადენოპათია	7-9
II	საშუალო რისკის ჯგუფი	ლიმფოციტოზი, სპლენომეგალია± ლიმფადენოპათია	7-9
III	მაღალი რისკის ჯგუფი	ლიმფოციტოზი + ანემია ± ლიმფადენოპათია, სპლენომეგალია	1.5-5
IV	მაღალი რისკის ჯგუფი	ლიმფოციტოზი + თრომბოციტოპენია ± ანემია ± სპლენომეგალია± ლიმფადენოპათია	1.5-5



ტაბულა 1.2. B-ქლლ-ს კლასიფიკაცია Binet-ს სისტემის მიხედვით

სტადია	სისხლის ფორმულა	ჩართული ორგანოების რაოდენობა	სიცოცხლის ხანგრძლივობა, წლები
A	ჰემოგლობინი >100 გ/ლ თრომბოციტები >100·10 <sup>9</sup> /ლ	<3	>10
B	ჰემოგლობინი >100 გ/ლ თრომბოციტები >100·10 <sup>9</sup> /ლ	>3	7
C	ჰემოგლობინი <100 გ/ლ თრომბოციტები <100·10 <sup>9</sup> /ლ	>3	5

მკურნალობის მიდგომები ქლლ კეთილთვისებიანი და აგრესიული ფორმის შემთხვევაში კარდინალურად განსხვავდება - ან „ლოდინი და მონიტორინგი“ ან აგრესიული თერაპიის მიდგომა. მკურნალობის სწორი სტრატეგიის შესარჩევად გამოიყენება ე.წ. პროგნოსტიკური მარკერები - ანუ B-ქლლ უჯრედების მახასიათებლები, რომლებიც დაკავშირებულია დადებით ან უარყოფით პროგნოზთან. ამათგან ყველაზე უფრო გამოყენებადია CD38 და ZAP-70 ექსპრესია და იმუნოგლობულინების მძიმე ჯაჭვების ვარიანტული დომენების სომატური მუტაციების სიხშირე (Oscier *et al.*, 2002; Rassenti *et al.*, 2008). დამატებითი პროგნოსტიკული მარკერების სახით გამოიყენება ქრომოსომების გარკვეული აბერაციები და CD180-ის ექსპრესია, შემოთავაზებული ჩვენს მიერ (Porakishvili *et al.*, 2005; 2011; 2015).

**იმუნოგლობულინების მძიმე ჯაჭვების ვარიანტული დომენების სომატური მუტაციების სიხშირე**

B-ქლლ შეიძლება წარმოიქმნას ლიმფური კვანძების ჩანასახოვანი ცენტრების გარეთ დარჩენილი არამუტირებული *IgVH* გენების მქონე უჯრედიდან (Unmutated, U-ქლლ), ან ჩანასახოვანი ცენტრიდან გამოსული უჯრედიდან მუტირებული *IgVH* გენებით (Mutated, M-ქლლ). M-ქლლ შეადგენენ B-ქლლ-ს 55%-ს. ამ ორ ჯგუფს აქვს განსხვავებული ფენოტიპი და მორფოლოგია. U-ქლლ ახასიათებთ დამოკლებული ტელომერები და ფერმენტ ტელომერაზას მაღალი დონე, რაც მიუთითებს გავლილი უჯრედული ციკლების მეტ რაოდენობაზე (Hamblin *et al.*, 1999; Damle *et al.*, 1999; 2004). დელეციები 11q, 17p-ში და მე-12 ქრომოსომის ტრისომია კორელაციაშია დამოკლებულ ტელომერებთან და ტელომერაზას მაღალ დონესთან, განსხვავებით ქრომოსომული აბერაციების არმქონე ან 13q დელეციის მქონე ქლლ უჯრედებისგან (Dohner *et al.*, 2000; Zenz *et al.*, 2010). დადგენილია, რომ კლინიკურად მძიმე პაციენტებს, რომლებსაც არ გააჩნიათ *IgVH* გენის მუტაცია, ახასიათებთ CD38-ის,

CD69-ის, CD40-ის მომატებული ექსპრესია და CD71-ის, CD62L-ის, CD39-ის დაქვეითებული ექსპრესია, აგრეთვე ახასიათებთ *p53*-ის დისფუნქცია და დელეცია (Biegging *et al.*, 2012). გარდა ამისა, B-ქლლ-ის შემთხვევაში სომატური ჰიპერმუტაციები საკმაოდ ხშირია, ხოლო აქტივაციის-გამომწვევი ციტიდინდემინაზას (AID) გენი, რომელიც ნორმალურ B უჯრედებში განაპირობებს *IgVH*-ს სომატურ მუტაციას და დნმ-ის სეგმენტების დელეციას იზოტიპური გადართვის დროს - ექსპრესირდება B-ქლლ-ის შემთხვევაშიც, თუმცა მხოლოდ მცირე ფრაქციაში (Caporaso *et al.*, 2007; Patten *et al.*, 2012). U-ქლლ მიჩნეულია როგორც უარყოფითი პროგნოზის „ოქროს სტანდარტი“ და ასეთი პაციენტების აგრესიული მკურნალობა უნდა სასწრაფოდ დაიწყოს, მაშინ როდესაც M-ქლლ მეტ შემთხვევაში კეთილთვისებიანი განვითარება ახასიათებს, და ხშირად არ საჭიროებს მკურნალობას ბევრი წლის განმავლობაში.

### **ZAP-70 ექსპრესია**

ZAP-70 არის 70 kD მასის მქონე ციტოპლაზმური პროტეინ თიროზინ კინაზა (PTK), რომელიც ნორმაში ექსპრესირდება ბუნებრივ ქილერებსა (NK) და T უჯრედებში, სადაც ის ასოცირდება T - უჯრედულ რეცეპტორის კომპლექსში შემავალ CD3 -ის ჯაჭვთან. დადგინდა, რომ U- ქლლ უჯრედებში ZAP-70-ის ექსპრესიის დონე (ლეიკემიური კლონის 20% ან მეტ უჯრედებზე) მაღალია, ხოლო M-ქლლ-ში კი ამ ცილის დაქვეითებული დონე აღინიშნება (ლეიკემიური კლონის 20%-ზე ნაკლებ უჯრედებზე) (Chen *et al* 2002). B-ქლლ-ს დროს ZAP70-ს ექსპრესიისას ვლინდება Syk-ს ძლიერი ფოსფორილირება, რაც ზრდის გადარჩენის და პროლიფერაციის სიგნალის გადაცემას B უჯრედული რეცეპტორიდან (Crespo *et al.*, 2003; Fruman *et al.*, 2004; Rassenti *et al.*, 2004). ამრიგად, ZAP-70 ექსპრესია ქლლ უჯრედებზე მეტყველებს დაავადების უარყოფით პროგნოზზე.

### **CD38 მარკერის ექსპრესია**

CD38 არის ფერმენტი, რომელიც მონაწილეობს ნიკოტინამიდადენინდინუკლეოტიდის (NAD<sup>+</sup>) გარდაქმნაში ციკლურ ადენოზინ დიფოსფატ-რიბოზად (cADPR ) და cADPR-ს ჰიდროლიზში, რის შედეგადაც მიიღება ADPR (Damle *et al.*, 2010). ნორმაში CD38 ექსპრესირდება ლიმფოიდურ წინამორბედებზე და აქტივირებულ ლიმფოციტებზე. B-ქლლ-ით დაავადებულების ერთ ჯგუფში CD38-ის ექსპრესია მაღალია (ლეიკემიური კლონის 30% და მეტ უჯრედებზე), ხოლო მეორეში - თითქმის არ გვხვდება ან დაბალია (Jaksic *et al.*, 2004; Zupo *et al.*, 2005). CD38<sup>+</sup> ლეიკემიური კლონი უარყოფითი პროგნოზის მანიშნებელია. ანტი-CD38 მონოკლონური ანტისხეული (მკა) იწვევს პროტეინთიროზინკინაზების აქტივაციას (Kitanaka *et al.*, 1997). დადგინდა, რომ ძვლის ტვინისა და პერიფერული ლიმფური ორგანოების ე.წ. „ჩანასახოვან ცენტრებში“ პროლიფერირებად ქლლ უჯრედებს ახასიათებთ CD38-ის მაღალი ექსპრესია. უფრო მეტიც, CD38<sup>+</sup> ქლლ უჯრედები ექსპრესირებენ Ki-67 - უჯრედის ციკლისთვის დამახასიათებელ პროტეინს, რაც მათ აქტიურ დაყოფაზე მიუთითებს (Deaglio *et al.*,

2007). ვარაუდობენ, რომ CD38 წარმოადგენს ქლლ უჯრედების მიკროგარემოსთან ურთიერთქმედების მნიშვნელოვან რეცეპტორს და განაპირობებს მათ რეცირკულირებას (Deaglio *et al.*, 2006; Chiorazzi *et al.*, 2005; 2011).

#### 1.1.4. ციტოგენეტიკური და გენური ცვლილებები

B-ქლლ პაციენტების 50%-ში აღმოჩენილია ციტოგენეტიკური დარღვევები. B-ქლლ პაციენტების 10-20%-ში დაავადების განვითარება ასოცირებულია მე-12 ქრომოსომის ტრისომიასთან (Tsimberidou *et al.*, 2006). შესაძლოა, რომ მე-12 ქრომოსომაში არის დომინანტური ან კოდომინანტური პროტოონკოგენი, რომელიც აქტივირდება B-ქლლ განვითარების დროს.

B-ქლლ დროს ხშირად გვხვდება სტრუქტურული დარღვევები მე-13 ქრომოსომის გრძელ მხარზე q14 ლოკუსში, სადაც ხშირია დელეციები და ჰეტეროზიგოტულობის დაკარგვა. ფიქრობენ, რომ 13q14-ის დელეციამ შესაძლოა დააზიანოს სიმსივნის სუპრესორული გენი (Dohner *et al.*, 2000).

მე-17 ქრომოსომის 17p ლოკუსში მდებარეობს სიმსივნის სუპრესორული გენი *p53*. ამ გენის დელეცია ან მუტაცია, შეიძლება იწვევდეს უჯრედული ციკლის G1 ფაზის რესტრიქციის მოხსნას B-ქლლ უჯრედებში, და გვხვდება B-ქლლ პაციენტების დაახლოებით 12%-ში. *p53*-ს შეუძლია იმოქმედოს, როგორც ტრანსკრიპტორული ფაქტორი, რომელიც იწვევს გენების ექსპრესიის ტრანსაქტივაციას ან ტრანსრეგრესიას (Chiaretti *et al.*, 2011). *p53*-ით გამოწვეული ტრანსაქტივაციის სამიზნეებია გენები, რომლებიც ჩართული არიან G1/S ციკლირებაში, ერთ-ერთი ასეთი გენია ციკლინ-ინჰიბიტორი p21-WAF-1, და გენები, რომლებიც აკონტროლებენ აპოპტოზს როგორცაა *Bcl2*-ის ანტაგონისტი *Bax*. *p53*-ის აქტივობის დაკარგვას შეუძლია გამოიწვიოს უჯრედის პროლიფერაციის აჩქარებაც და გადარჩენის გახანგრძლივებაც. *p53* გენის მუტაციისას სიმსივნური უჯრედები იძენენ კლონური გამრავლების უნარს (Morabito *et al.* 1997; Wickremasinghe *et al.*, 2011). *p53* მუტაციის მქონე პაციენტები ხასიათდებიან დაავადების ყველაზე აგრესიული მიმდინარეობით და უკიდურესად სავალალო პროგნოზით.

ქლლ დაავადებულების 10%-ში ნანახია მუტაციები *NOTCH1* გენის, აქტივაცია ამ გენის იწვევს აპოპტოზისაგან დაცვას და ზრდის ქლლ უჯრედების გადარჩენას (Rasi *et al.*, 2012). *NOTCH1* გენის მუტაციების რაოდენობის ზრდა კორელაციაშია ქლლ-ის სავალალო პროგნოზთან, მაგალითისთვის შეიძლება მოვიყვანოთ რიხტერის სინდრომი (Di Ianni *et al.*, 2009; Rosati *et al.*, 2009).

#### 1.1.5. თანმხლები გართულებები და მკურნალობა

ქლლ გართულებების 25%-ს შეადგენს აუტოიმუნური პროცესები. აუტოიმუნური რეაქციები მიმართულია ჰემოპოეტური უჯრედების წინააღმდეგ და ვლინდება, როგორც აუტოიმუნური ჰემოლიზური ანემია (პაციენტების 10-15%) ან აუტოიმუნური

თრომბოციტოპენია (პაციენტების 2%). ეს გამოწვეულია, არა სიმსივნური კლონის (რომელიც ხშირად პოლირეაქტიულია) მიერ გამომუშავებული მონოკლონური ანტისხეულებით, არამედ პოლიკლონური ანტისხეულებით (Hall *et al.*, 2007; Hodgson *et al.*, 2011). ქლლ-ს გართულებას წარმოადგენს რიხტერის სინდრომი, როდესაც ადგილი აქვს ქლლ-ს ტრანსფორმაციას აგრესიულ დიდ გრანულარულ ლიმფომად ან ჰოჯკინის ლიმფომად. შედარებით იშვიათად გვხვდება გრანულოციტოპენია ან ერითროციტული აპლაზია. აღწერილია ე.წ. პარანეოპლასტური ჰემფიგუსი, რაც ვლინდება პირის ღრუს ლორწოვანი გარსის, ტუჩის, კონიუქტივის მტკივნეული, პერსისტენტული წყლულის სახით. ციტოპენიები შეიძლება გამოწვეული იყოს პერიფერიულად მიმდინარე აუტოიმუნური პროცესით, ან ძვლის ტვინის ნეოპლასტური უჯრედებით ინფილტრირების გამო ღერო უჯრედების გამოთიშვით. აუტოიმუნური დაავადებების წარმოშობის მიზეზები ბოლომდე არ არის ცნობილი, შესაძლებელია, რომ ეს იყოს T უჯრედების მარეგულირებელი ფუნქციის დაქვეითება. მაგალითად, ელენთაში მოხვედრილი ერთეული ნორმალურ B უჯრედები აქტიურდებიან CD4<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup> T უჯრედების მიერ და იქვე მყოფი ერითროციტებისა და თრომბოციტების დაშლის პროდუქტებთან ურთიერთქმედების გამო იწყებენ მათ საწინააღმდეგო აუტოანტისხეულების სინთეზს (Buhman *et al.*, 1999; von Bergwelt-Baildon *et al.*, 2004; Hodgson *et al.*, 2011).

დაავადების მიმდინარეობისას ლეიკემიური B უჯრედების დიდი რაოდენობით დაგროვებას პერიფერიულ სისხლსა და ძვლის ტვინში თან სდევს უჯრედული და ჰუმორალური იმუნიტეტის დაქვეითება, რაც თავის მხრივ ხდება მეორეული დაავადებების (ინფექციური, აუტოიმუნური, სიმსივნური) მიზეზი. ინფექციები ქლლ პაციენტებში დეფექტური იმუნიტეტის მნიშვნელოვანი შედეგია და გაცილებით უფრო ხშირად იწვევს სიკვდილიანობას, ვიდრე სხვა გართულებები ან დაავადების პროგრესირება. ინფექციების მიმართ მომატებული მგრძნობელობის მიზეზი შეიძლება იყოს ან განვითარებული ჰიპოგამაგლობულინემია ან ფაგოციტური სისტემების დარღვევები (Shimoni *et al.*, 1997; Siodras *et al.*, 2000). განსაკუთრებით ხშირია ბაქტერიული, განსაკუთრებით გრამდადებითი, და ვირუსული ინფექციები, სოკოვან და პარაზიტულ დაავადებებთან შედარებით (Barton *et al.*, 2006). აღსანიშნავია *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* -ს მიერ გამოწვეული ინფექციები (Hallek *et al.*, 2008).

ქლლ პაციენტებისთვის დამახასიათებელი ჰიპოგამაგლობულინემია (ქვეითდება შრატისმიერი IgG და IgA კონცენტრაცია, მაგრამ არა IgM), წარმოადგენს ინფექციებისადმი მომატებული მგრძნობელობის ერთ-ერთი მიზეზს (Shimoni *et al.*, 1997; Siodras *et al.*, 2000).

მეორე მნიშვნელოვანი მიზეზია ფაგოციტური სისტემის დარღვევები, რომლებიც ასევე განაპირობებს ინფექციებისადმი მიდრეკილების გაზრდას ქლლ პაციენტებში. ძვლის

ტვინის დაზიანებამ შეიძლება გამოიწვიოს გრანულო- და მონოციტოპენია ნორმალური წინამორბედი უჯრედების შენაცვლებით სიმსივნური უჯრედების, სიმსივნური პროდუქტებით გამოწვეული სუპრესიის ან ქიმიოთერაპიის მიელოტოქსიური ეფექტის შედეგად (Hallek *et al.*, 2008).

ინფექციებისადმი მგრძობელობას შესაძლებელია განაპირობდეს უჯრედული იმუნიტეტის დარღვევებიც. ქლლ პაციენტებში ჰერპეს ვირუსული ინფექციების სიხშირე და მიმდინარეობის სიმძიმე მეტყველებს T უჯრედული ფუნქციების დარღვევაზე, ხშირად, მკურნალობის შედეგად. მიუხედავად იმისა, რომ B-ქლლ-ს დროს პერიფერიულ სისხლში T უჯრედების რაოდენობა ნორმაშია ან მომატებულია, ნანახია, რომ *in vitro* T უჯრედების პროლიფერაცია მიტოგენის ან ანტი-CD3 მკა საპასუხოდ არის დაქვეითებული (Damle *et al.*, 2004). ქიმიოთერაპიული საშუალებები განსაკუთრებით თრგუნავენ CD4<sup>+</sup>T უჯრედებს, რაც აგრეთვე აუტოიმუნური დაავადებების განვითარების მიზეზი ხდება, CD4<sup>+</sup> სუპრესოლული T-უჯრედების ფუნქციის დარღვევის გამო (Porakishvili *et al.*, 2004; Hallek *et al.*, 2008).

B-ქლლ-ს თერაპიის დასაწყებად აუცილებელია წინასწარ იყოს ცნობილი დაავადების სტადია და პროგნოზი. მაგალითად, ZAP-70 ექსპრესია და U-CLL, *p53* ინაქტივაცია მიუთითებს არაკეთილსაიმედო პროგნოზს და ეს პაციენტები საჭიროებენ მკურნალობას დიაგნოზის დასმისთანავე. მეორეს მხრივ, პაციენტებისათვის, რომელთაც აქვთ კარგი პროგნოზი, მაგალითად, M-CLL და დაბალი/უარყოფითი ZAP-70 ექსპრესია გამოიყენება „ლოდინის და დაკვირვები“ მიდგომა კლინიკური სიმპტომების მკაცრი მონიტორინგის ფონზე (Chen *et al.*, 2002).

B-ქლლ-ის თერაპიისადმი რამდენიმე მიდგომა არსებობს. მათგან მნიშვნელოვანია ქიმიოთერაპია, იმუნოთერაპია, მოლეკულური თერაპია და ღერო უჯრედების ტრანსპლანტაცია.

**ქიმიოთერაპია.** მოძველებული მეთოდის მიხედვით, რომელიც დღემდე გამოიყენება საქართველოში, და ამდენად ჩვენი პაციენტების მკურნალობა ამ მეთოდებით ხდებოდა, მკურნალობისთვის იყენებენ ისეთ ქიმიოთერაპიულ აგენტებს, როგორცაა ქლორამბუცილი და პრედნიზონი. შემუშავებულია პოლითერაპიული მკურნალობის ორი სახე: ე.წ. „COP“-ით (ციკლოფოსფამიდი, დოქსორუბიცილი, პრედნიზონი) და „CHOP“-ით (ციკლოფოსფამიდი, ადრიამიცილი, ვინკრისტინი, პრედნიზონი). B-ქლლ-ს ქიმიოთერაპიის მეორე, თანამედროვე მიდგომა, ითვალისწინებს ახალი თერაპიული აგენტების – პურინის ანალოგების გამოყენებას, როგორცაა ფლუდარაბინი, 2-ქლოროდიოქსიადენოზინი, კლადრიბინი (Fernandez *et al.*, 1997).

2-ქლოროდიოქსიადენოზინი (2-CdA) დიოქსიადენოზინის ანალოგია და თანაბარი ეფექტურობით მოქმედებს როგორც უჯრედული ციკლის S ფაზაში, ასევე G<sub>1</sub> ფაზაში მყოფ უჯრედებზე. 2-CdA-ს ამ თვისებას განსაკუთრებული მნიშვნელობა აქვს B-ქლლ-ის მკურნალობისთვის, რადგანაც B-ქლლ-ის უჯრედები პერიფერიაში გაჩერებულები

არიან უჯრედული ციკლის Go ფაზაში. *In vitro* ექსპერიმენტებმა აჩვენეს, რომ 2-CdA-თან ან ფლუდარაბინთან ინკუბაციის შემდეგ ლიმფოციტებში ადგილი ჰქონდა აპოპტოზისთვის დამახასიათებელი დნმ-ის ფრაგმენტაციას (Beck *et al.*, 2004).

ფლუდარაბინი ერთ-ერთი ყველაზე კარგად შესწავლილი პურინის ანალოგია. დადგინდა, რომ ის აინჰიბირებს დნმ პოლიმერაზას და რიბონუკლეოტიდ რედუქტაზას (Dillman *et al.*, 1989; Keating *et al.*, 1998). ფლუდარაბინის და 2-CdA-ის უჯრედში შეღწევას უზრუნველყოფს სპეციფიური ნუკლეოზიდების გადამტანი ცილა (nucleoside transporter protein, NST). დადგინდა, რომ NST-ს ექსპრესიის დონე B-ქლლის უჯრედებზე დაბალია, მაგრამ პურინის ანალოგებთან 48 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ NST -ს ექსპრესია საგრძნობლად მატულობს და პარალელურად იზრდება S ფაზაში მყოფი უჯრედების პროცენტი. ლიტერატურაში არსებული მონაცემების თანახმად, პურინის ანალოგები იწვევენ B-ქლლ უჯრედებში Bcl-2-ის კონცენტრაციის დაქვეითებას და აპოპტოზს (Podhorecka *et al.*, 2011).

**იმუნოთერაპია.** თანამედროვე იმუნოთერაპიულ პრაქტიკაში დაინერგა მონოკლონური ანტისხეულების რიტუქსიმაბის (ანტი-CD20) და ალემტუზუმაბის (კამპასი, ანტი-CD52) გამოყენება, თუმცა მონოთერაპიის სახით მათი ეფექტურობა დაბალია, და აუცილებელია კომპლექსური თერაპიული სქემების გამოყენება ქიმიოთერაპიასთან ერთად (O'Brien *et al.*, 2001). რიტუქსიმაბით მონოთერაპიის მიმართ ქლლ პაციენტების დაბალი მგრძობელობა, შესაძლებელია გამოწვეული იყოს CD20 დაბალი სიმკვრივე ქლლ უჯრედებზე. სამაგიეროდ, პაციენტებს რომლებიც იღებენ ფლუდარაბინს რიტუქსიმაბთან ერთად, აღენიშნებათ მნიშვნელოვნად გაუმჯობესებული პროგნოზი (Byrd *et al.*, 2006). თანამედროვე სქემის მიხედვით, ქლლ მკურნალობის „ოქროს სტანდარტს“ წარმოადგენს FCR (Fludarabine, Cyclophosphamide, Rituximab) სქემა, რომელიც მიეკუთვნება მკურნალობის პირველ რიგს.

ერთ-ერთ უახლეს თერაპიულ მიდგომას, რომელიც დღესდღეობით კლინიკური გამოცდების ეტაპზეა წარმოადგენს CART-ით (ქიმერული T უჯრედული რეცეპტორით) მკურნალობა, სადაც რეკომბინანტული T უჯრედული რეცეპტორის მემბრანასთან ასოცირებული პარატოპი ანტისხეულის ანტიგენგამომცნობ დომენს წარმოადგენს, ხოლო უჯრედშიდა სასიგნალო აპარატი - T უჯრედს მიეკუთვნება. ერთ-ერთი ასეთი ქიმერული რეცეპტორი CART19 მიმართულია CD19-ის წინააღმდეგ (Porter *et al.*, 2011). განსხვავებით ანტისხეულებით გაშუალებული თერაპიისა, ამ მოდიფიცირებულ T-უჯრედებს *in vivo* შეუძლიათ განახორციელონ სიმსივნეზე გრძელვადიანი და მდგრადი კონტროლი (Kalos *et al.*, 2011).

**მოლეკულური თერაპია.** ახლად აღმოჩენილ კინაზას ინჰიბიტორებს მიეკუთვნება: იბრუტინიბი (BTK ინჰიბიტორი), იდელალიზიბი (GS1101; PI3K-დელტა ინჰიბიტორი), BCL2 ანტაგონისტი GDC-0199 (ABT-199). იმ მრავალრიცხოვან აგენტებს შორის რომელთა სამიზნესაც წამოადგენენ BCR-ი, შეიძლება გამოვყოთ ბრუტონის თიროზინ

კინაზას (BTK) ინჰიბიტორი, იბრუტინიბი. ბრუტონ თიროზინ კინაზა (BTK) მიეკუთვნება Tec კინაზების ოჯახს და ექსპრესირდება ჰემოპოეზურ უჯრედებზე და B ლიმფოციტებზე, მაგრამ არა T-უჯრედებზე ან/და პლაზმურ უჯრედებზე (Genevier *et al.* 1994; Ponader *et al.*, 2012). იბრუტინიბის მიღება ხდება პერიორალურად, ის კოვალენტურად უკავშირდება BTK ცისტეინ-481 ამინომჯავას. პრეკლინიკურმა კვლევებმა აჩვენა, რომ იბრუტინიბის მოქმედება აფერხებს ERK სიგნალს, NF-κB დნმ დაკავშირებას და სიმსივნური უჯრედების მიგრაციას (Honigberg *et al.*, 2010; Herman *et al.*, 2011; Ponader *et al.*, 2012). იბრუტინიბს არა აქვს ტოქსიური ზეგავლენა ნორმალურ T უჯრედებზე და, განასხვავებთ სხვა ქლლ მკურნალობის საშუალებებისგან, ახასიათებს მსუბუქი გვერდითი მოვლენები. იდეალიზიბი (CAL-101) არის PI3K იზოფორმა, რომლის მიღება ასევე ხდება პერიორალურად. იგი იწვევს ქლლ უჯრედების ამორჩევით აპოპტოზს, არ მოქმედებს T ლიმფოციტებსა ან/და ბუნებრივ მკვლელებზე და არ ამცირებს ანტისხეულდამოკიდებულ უჯრედულ ციტოტოქიურობას (Hallek *et al.*, 2013). ეს ინჰიბიტორი კომბინირებულად გამოიყენება რიტუქსიმაბთან და ოფატუმამბთან ან ბენდამუსტინ/რიტუქსიმაბთან ერთად რაც იძლევა კარგ შედეგს (Hallek *et al.*, 2013; O'Brien *et al.*, 2013;). როგორც უკვე დავძინეთ, მოლეკულური თერაპიის საშუალებები საქართველოში ჯერჯერობით არ გამოიყენება.

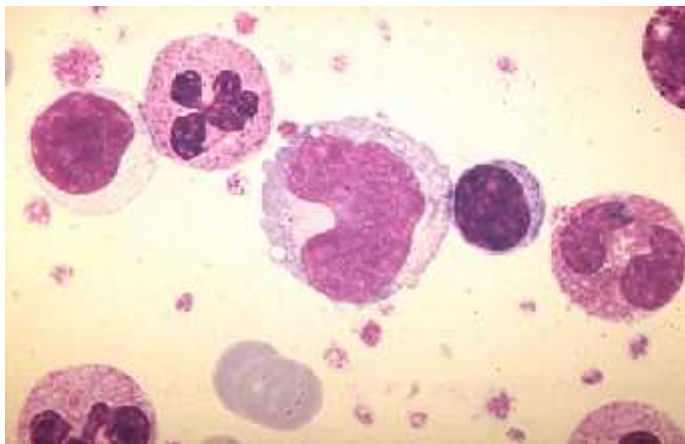
**სისხლმზადი ღეროვ-უჯრედების ტრანსპლანტაცია** ქლლ-ის პაციენტებში იშვიათად გამოიყენება. აუტოლოგიური ღერო-უჯრედების ტრანსპლანტაციას (ASCT) შეუძლია გაზარდოს დაავადების პროგრესირების დრო, მაგრამ იგი ნაკლებად შედეგიანია ქიმიოთერაპიასთან შედარებით (Dreger *et al.*, 2010; Sutton *et al.*, 2011).

## 1.2. მონოციტები და მაკროფაგები: ფენოტიპი, ფუნქცია

მონოციტები, ყველაზე მსხვილი აგრანულოციტებია და შეადგენენ ლეიკოციტების 5-10%-ს. მათი რიცხვი საგრძნობლად იზრდება ლიმფოგრანულომატოზის, მწვავე ინფექციების დროს. მონოციტოზი, რომელსაც თან ახლავს ლეიკოციტოზი, შეიმჩნევა ყვავილის, ქუნთრუშის, ათაშანგისა და სხვა ინფექციების პირობებში, ხოლო მონოციტების რიცხვის შემცირება კი შეიძლება გამოწვეული იყოს თანდაყოლილი და შეძენილი იმუნოდეფიციტებით, ქრონიკული ინფექციებით, აუტოიმუნური და ალერგიული დაავადებებით. მონოციტ/მაკროფაგების სუბპოპულაციების სიცოცხლის ხანგრძლივობა, სხვადასხვა მონაცემებით, მერყეობს 20 დღე-ღამიდან 7 თვემდე, ხოლო მათი განახლების დროა 20-40 დღე (Villardangos *et al.*, 2007).

მვალტვინოვანი მიელოიდური რიგის წინამორბედი უჯრედები დიფერენცირდებიან პრომონოციტებად, შემდეგ კი სისხლის მონოციტებად. ეს უკანასკნელები ქსოვილებში განსახლებისას დიფერენცირდებიან მაკროფაგებში. მონოციტი სისხლის მომწიფებულ უჯრედებს შორის ყველაზე დიდი უჯრედია (10-30 მმკ), ხოლო მაკროფაგი ხასიათდება დიდი ზომით (15-25 მმკ), უსწორმასწორო ფორმის ბირთვით და ქრომატინის წვრილი სტრუქტურით.

აღსანიშნავია, რომ მრგვალი ფორმის მონოციტებისაგან განსხვავებით, მაკროფაგებს აქვთ უფრო მსხვილი, გაბრტყელებული და უსწორმასწორო მოხაზულობა, ამიტომაც საკმაოდ პოლიმორფულნი არიან. მონოციტებში ბირთვს უჭირავს უჯრედის დიდი ნაწილი, ზოგჯერ ბირთვის გარშემო ლაგდება ვაკუოლები, პიგმენტები და სხვა. მონოციტში შეიმჩნევა აზუროფილური გრანულებიც, რომლებიც წარმოადგენენ ლიზოსომებს დაბალი pH-ით. ისინი შეიცავენ მჟავე პროტეაზებსა და ჰიდროლაზებს; მიელოპეროქსიდაზას, რომელიც ჟანგბადური აფეთქების პროცესში მონაწილეობს; ლიზოციმს, რომელიც ახდენს გრამ-დადებით ბაქტერიათა გარკვეული პეპტიდოგლიკანების ჰიდროლიზს. ტრანსგლუტამინაზა გვხვდება მხოლოდ



მომწიფებულ მაკროფაგებში. აქტივირებული მაკროფაგები გამოიმუშავებენ კოლაგენაზას, ელასტაზას, პროტეინაზას, ლიპაზას, ნუკლეაზას, ფოსფატაზას და სხვა (Villadangos *et al.*, 2007).

**სურათი 1.2.** სისხლის მონოციტი (ცენტრში).

<http://www.isto.ucl.ac.be/safe/sang2.htm>

მონოციტ/მაკროფაგები ანადგურებენ («შთანთქავენ») ცოცხალ და მკვდარ მიკრობებს, ანტიგენ-ანტისხეულის კომპლექსებს, რომლებიც წარმოიქმნებიან ვირუსებთან, ბაქტერიებთან და მათ ტოქსინებთან, საკუთრივ ორგანიზმის დაღუპულ უჯრედებს. მაკროფაგების გააჩნია ანტიგენის წარდგენის და ციტოკინების წარმოქმნის ფუნქციებიც (Auger *et al.*, 2008).

მონოციტ/მაკროფაგების ფერმენტები მონაწილეობენ მათ ბაქტერიციდულ ფუნქციაში. ჟანგბადდამოკიდებულ ანტიმიკრობულ მოქმედებას განაპირობებენ NADPH-ოქსიდაზა, მიელოპეროქსიდაზა, სუპეროქსიდდისმუტაზა, კატალაზა, ხოლო ჟანგბადდამოუკიდებელი ანტიმიკრობულ ფუნქციას წარმართავენ ლიზოციმი, კატეფსინ G, არგინაზა, პროტეაზები და სხვა ჰიდროლაზები, კათიონური ცილები.

მონოციტ/მაკროფაგები ასეკრეტირებენ არაქიდონის მჟავის მეტაბოლიზმის პროდუქტებს, ციტოკინებს, კომპლემენტის კომპონენტებს, ჰორმონებს, კათიონურ ცილებს, ერიტროპოეტინს, პროტეოგლიკანებს, ფიბრონექტინს, თრომბოსპოდინს.

ხშირად, მონოციტ/მაკროფაგების იდენტიფიცირება მორფოლოგიური ნიშნებით არ არის საკმარისი. ამ შემთხვევაში მიმართავენ უჯრედების იდენტიფიკაციის ენზიმოლოგიურ მეთოდს. საზღვრავენ რა არასპეციფიურ ესთერაზებს, რომლებიც ლოკალიზებულია დიფუზურად მონოციტ/მაკროფაგების ციტოპლაზმაში ან/და მიელოპეროქსიდაზას, რომლის აქტივობა მონოციტიდან მაკროფაგად



დიფერენცირების პროცესში ქვეითდება. ამ დროს იზრდება 5'-ნუკლეოტიდაზების, β-გალაქტოზიდაზების და ამინოპეპტიდაზების აქტივობა. მხოლოდ მომწიფებულ მაკროფაგებში გვხვდება ტრანსგლუტამინაზა (Leon *et al.*, 2005).

მონოციტ/მაკროფაგების ზედაპირზე გამოვლენილია შემდეგი რეცეპტორები:

- მაკროფაგის მანოზილისა და ფუკოზილის რეცეპტორი, რომელიც არ გააჩნია არც მონოციტებს და არც ნეიტროფილებს (Tavassoli *et al.*, 1990);
- რეცეპტორები ფოსფატიდილსერინისა და სიალის მჟავისაგან წარმოქმნილი ლიგანდებისათვის, რაც აპოპტოზური სხეულების ფაგოციტოზს უზრუნველყოფს. მათ „ნავის გამტანებსაც“ უწოდებენ (Tobias *et al.*, 1989);
- CD14, რომელიც გრამუარყოფითი ბაქტერიების ლიპოპოლისაქარიდის დამაკავშირებელი პლაზმური ცილის (LBP, lipopolysaccharide binding protein) რეცეპტორს წარმოადგენს. მიკრობული ლიპოპოლისაქარიდი ასტიმულირებს მაკროფაგებს ციტოკინების გამოსაყოფად (Tobias *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 1990);
- Fc-რეცეპტორები: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16), რომლებიც IgG-ის Fc-ფრაგმენტის მიმართ ხასიათდებიან, შესაბამისად, მაღალი, საშუალო და დაბალი აფინობით. Fc-რეცეპტორები უზრუნველყოფენ IgG-ით ოფსონიზებული მიკრობების ფაგოციტოზს და ბაქტერიების უჯრედგარე ლიზის (Fridman *et al.* 1993);
- კომპლემენტის რეცეპტორები: CR1(CD35) - ანტისხეულებითა და კომპლემენტით ოფსონიზირებული ნაწილაკების შთანთქმა გაშუალებულია CR1-ით (იმუნური ადჰეზიის რეცეპტორი, ანუ C3b/C4b რეცეპტორი ანუ CD35); CR3 (ინტეგრინი CD11b/CD18), მისი საშუალებით ხდება iC3b-ით ოფსონიზირებული ნაწილაკების ფაგოციტოზი და გარკვეული ნახშირწყლების შეკავშირება, მაგალითად საფუარი *Saccharomyces cereviziae*, *Staphylococcus epidermidis* და *Histoplasma capsulatum*. CR3-ის სხვა ლიგანდებიც არსებობს: ფიბრინოგენი, ფაქტორი X და ICAM-1; CR4 (p150-95, ინტეგრინი CD11c/CD18) ყველაზე ნაკლებად შესწავლილია რეცეპტორთა ამ ჯგუფში, მაგრამ ცნობილია, რომ ის უკავშირდება iC3b-ს კალციუმ-დამოკიდებული გზით, აგრეთვე უკავშირდება ფიბრინოგენს და ჩართულია მონოციტების ენდოთელიუმთან ადჰეზიაში (Wright *et al.*, 1982);
- რეცეპტორები T უჯრედების ციტოკინებისათვის IL-2, IL-4 და IFNγ, რომელთა ზემოქმედებით გააქტივებული მონოციტ/მაკროფაგები თავადაც წარმოქმნიან ციტოკინებს - ინტერფერონებს, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 და TNFα (tumor necrosis factor-α), პროსტაგლანდინებს, ლეიკოტრიენ B<sub>4</sub>-ს (LTB<sub>4</sub>), თრომბოციტების გამაქტივირებელ ფაქტორს (PAF - platelet-activating factor), ჟანგბადის თავისუფალ რადიკალებსა და აზოტის ოქსიდს (Koyama *et al.*, 1999);
- MHC II კლასის ანტიგენები;

- CD115, მონოციტების ზრდის ფაქტორის რეცეპტორი (Breslin *et al.*, 2013);
- CD180/RP105 Toll-ის მსგავსი რეცეპტორი (Divanovic *et al.*, 2005).

### 1.2.1. ფაგოციტოზი და მისი ეტაპები

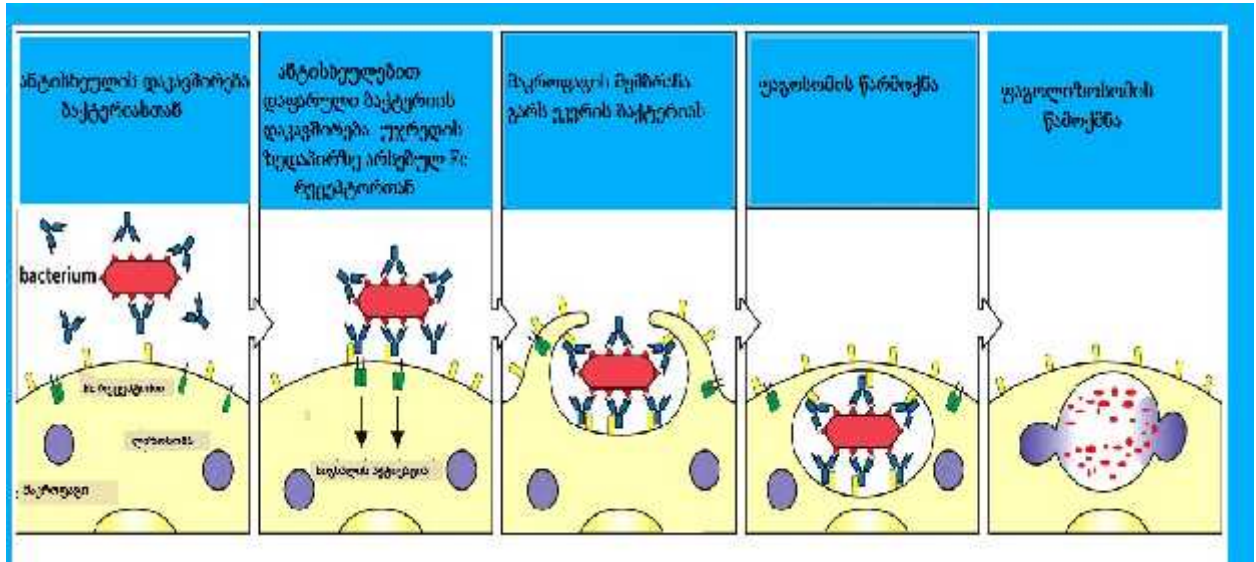
ფაგოციტოზს ორი ტიპის უჯრედი ახორციელებს: ერთბირთვიანი ლეიკოციტები (მონოციტები და მაკროფაგები) და პოლიმორფულბირთვიანი ლეიკოციტები (ნეიტროფილები). ფაგოციტები ჯანსაღ ორგანიზმში შთანთქავენ და ანადგურებენ მრავალ ბაქტერიას, საფუარს, სოკოს, მიკოპლაზმას, წმენდავენ ორგანიზმს ნეკროზისა და აპოპტოზის ნარჩენებისაგან, სუსტად, მაგრამ მონაწილეობს სიმსივნური უჯრედების განადგურებაშიც (Roitt *et al.*, 2001).

მონოციტებსა და ნეიტროფილების მიერ განხორციელებული ფაგოციტოზი უჯრედ-სამიზნის სპეციფიური ანტისხეულებით და/ან კომპლემენტით ოფსონინაციის შემთხვევაში მკვეთრად ძლიერდება. ფაგოციტური უჯრედების Fc $\gamma$ -რეცეპტორები და კომპლემენტის რეცეპტორები CR1 და CR3 გამოიცნობენ რა ოფსონინებით დაფარულ ნებისმიერი ნაწილაკს, რომლის სიდიდე გარკვეულ ზღვარს არ აჭარბებს, ახდენენ მის ფაგოციტირებას (Roitt *et al.*, 2001). მონოციტ/მაკროფაგისა და ნეიტროფილის რეცეპტორებთან ოფსონინირებული ნაწილაკის დაკავშირება იწვევს ამ რეცეპტორების თავმოყრას კონტაქტის არის ირგვლივ. შემდეგ უჯრედი წარმოქმნის ფსევდოპოდიებს, რომლებიც გარს შემოერთებენ ოფსონინირებულ ნაწილაკს. რეცეპტორები თანმიმდევრულად უკავშირდება ოფსონინებს. ამის შედეგად ფსევდოპოდიები მჭიდროდ შემოეკვრება ნაწილაკს, ბოლოს ერთმანეთს შეერწყმება და ფაგოციტის შიგნით ნაწილაკის ირგვლივ წარმოიქმნება დახშული მემბრანის ბუშტუკი - ფაგოსომა, ფაგოსომას შეერწყმის ლიზოსომა, წარმოიქმნება ფაგოლიზოსომა, რომელშიც ხდება შთანთქმული ნაწილაკის მონელება (Hoffman *et al.*, 2000; და ნახატი 1.1 ).

უფრო დაწვრილებით, ფაგოციტოზი შეიძლება დაიყოს შემდეგ ეტაპებად: (ა) ქემოტაქსისი; (ბ) ადჰეზია; (გ) მემბრანის აქტივაცია; (დ) ფაგოსომის აქტივაცია; (ე) ფაგოსომის წარმოქმნა; (ვ) გრანულების შერწყმა ფაგოსომებთან; (ზ) მიკროორგანიზმის კვდომა; (თ) მონელება; (ი) მონელებული პროდუქტების გარეთ გამოთავისუფლება. (გ) და (დ) ეტაპებზე ადგილი აქვს სუნთქვითი ჯაჭვის და NADPH-ოქსიდაზას აქტივაციას. (ე) ეტაპზე ხდება რეაქტიულ ჟანგბადის გარდამავალი პროდუქტების წარმოქმნით მიკრობის დაზიანება. (ვ) და (ზ) საფეხურებზე ადგილი აქვს მიკროორგანიზმის დაშლას პეროქსიდაზით, კათიონური ცილებით, ლიზოციმით და ლაქტოფერინით (Schwarzer *et al.*, 1996; Nauseef *et al.*, 2004).

მონოციტის მემბრანის რეცეპტორების შეკავშირება შესაბამის ლიგანდებთან აღძრავს რეაქტიული ჟანგბადნაერთების წარმოქმნას და გრანულათა შიგთავსის გამოთავისუფლებას (დეგრანულაციას). რეაქტიული ჟანგბადნაერთების წარმოქმნა უჯრედთა მიერ ჟანგბადის მოხმარების გაძლიერებასთანაა დაკავშირებული, რასაც

"ჟანგბადურ აფეთქებას" უწოდებენ და იგი NADPH-ოქსიდაზის აქტივაციით იწყება. ეს ფერმენტი გააქტივებული მონოციტის პლაზმურ მემბრანაში და ფაგოსომის მემბრანაშია მოთავსებული. რეაქციის პროდუქტი სუპეროქსიდის ანიონი O<sub>2</sub>-ჟანგბადის მონოვალენტურად რედუცირებული რადიკალია (Leto *et al.*, 2006).



**ნახატი 1.1.** ანტისხეულით ოფსონიზირებული მიკროორგანიზმის Fc $\gamma$ -რეცეპტორებით გაშუალებული ფაგოციტოზი (The Immune System, 3 ed. Garland Science, 2009)

მართალია, მიელოპეროქსიდაზას (მპო) მონაწილეობით წარმოქმნილი ანტიმიკრობული სისტემა აქტიურად ფუნქციონირებს ბრომიდითაც და იოდდითაც, მაგრამ ფიზიოლოგიური ჰალიდი ქლორიდია, რომელიც იჟანგება და გარდაიქმნება ჰიპოქლორმჟავად/ჰიპოქლორიდად (HOCl/OCl<sup>-</sup>). მჟავე pH-ის დროს HOCl-მა შეიძლება იმოქმედოს ჭარბ ქლორიდთან, რის შედეგადაც ქლორინი მიიღება. თვით HOCl ძლიერ ტოქსიკურია მრავალი მიკროორგანიზმისათვის, მაგრამ საკმაოდ სწრაფად იშლება. თუმცა მან შეიძლება იმოქმედოს პირველად და მეორად ამინებთან და წარმოქმნას N-ქლორამინები, მეტად სტაბილური მიკრობიციდული აგენტები (Balázs *et al.*, 2008).

უჯრედშორის სივრცეში ნახსენებ ტოქსიკურ ნივთიერებათა მოხვედრა იმით არის განპირობებული, რომ დეგრანულაცია შეიძლება დაიწყოს მანამ, სანამ ფორმირების პროცესში მყოფი კიდეები შეერწყმება ერთმანეთს და ფაგოსომაში მოხვედრილი ტოქსიკური ნაერთები გარეთ გამოვა. ამიტომ მპო-ს სისტემამ შეიძლება ტოქსიკურად იმოქმედოს არა მხოლოდ შიდაფაგოსომურ სამიზნეებზე (ბაქტერიებზე, სოკოებზე, ერთუჯრედიანებზე), არამედ უჯრედის მახლობლად მყოფ მიკროორგანიზმებზე (ბაქტერიებზე, სოკოებზე, ვირუსებზე, ერთუჯრედიანებზე, ჭიებზე), საკუთარ ნორმალურ და მალიგნიზირებულ უჯრედებზე და გარკვეულ უჯრედგარე ნივთიერებებზე, მაგალითად,  $\alpha_1$ -პროტეინაზის ინჰიბიტორზე, ლეიკოტრინებზე, ქემოტაქსისის ფაქტორებზე (Moskwa *et al.*, 2007)

## 1.2.2. ფაგოციტოზში მონაწილე რეცეპტორები

### 1.2.2.1. Fc $\gamma$ -რეცეპტორები

რეცეპტორები, რომლებიც ჩართულია იმუნური სისტემის უჯრედების მიერ ანტიგენის ამოცნობაში, მოიცავს (BCR), T უჯრედულ რეცეპტორს (TCR) და Fc რეცეპტორებს (FcR). FcR ამოიცნობს ანტისხეულის Fc ნაწილს და თამაშობს მნიშვნელოვან როლს იმუნური კომპლექსებისგან გასუფთავებაში და იმუნოგლობულინით ოფსონიზირებული პათოგენების ფაგოციტოზსა და სიკვდილში (Frank *et al.*, 2014). Fc რეცეპტორები არსებობს ანტისხეულის ყველა კლასისათვის: Fc $\gamma$ R იკავშირებს IgG-ს, Fc $\alpha$ R - IgA-ს, Fc $\epsilon$ R - IgE-ს, Fc $\mu$ R - IgM-ს, ხოლო Fc $\delta$ R - IgD-ს (Ravetch *et al.*, 1991; 2010).

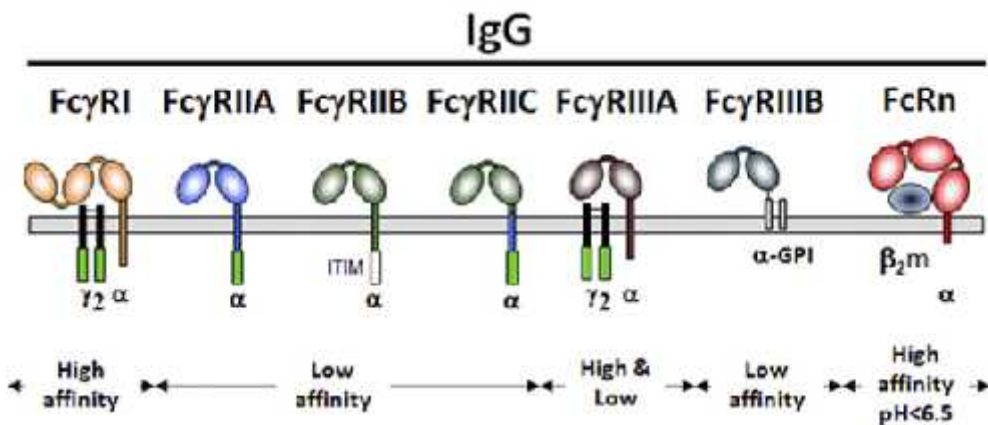
Fc $\gamma$ -რეცეპტორები მემბრანული გლიკოპროტეინებია, რომლებიც იკავშირებენ IgG-ს მონომერული ან აგრეგირებული ფორმით. ისინი ექსპრესირებულია როგორც ჰემოპოეტურ, ასევე დამხმარე (ფოლიკულოდენდრიტულ, ლანგერჰანის, ენდოთელურ) უჯრედებზე (Winkel *et al.*, 1991) და მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ მრავალ იმუნურ რეაქციაში, ქმნიან რა დამაკავშირებელ რგოლს უჯრედულ ეფექტორულ მექანიზმებსა და ჰუმორულ იმუნიტეტს შორის (Fridman *et al.*, 1993; Flesch *et al.*, 2001). IgG-ით ოფსონიზირებული პათოგენი ან იმუნური კომპლექსი Fc-ფრაგმენტით უკავშირდება უჯრედზე არსებულ რეცეპტორს, რაც განაპირობებს მის ფაგოციტოზს გრანულოციტებისა და მონოციტ/მაკროფაგების მიერ. Fc-რეცეპტორი განაპირობებს აგრეთვე ამ უჯრედებისა და ბუნებრივი კილერების მიერ ანტისხეულდამოკიდებულ უჯრედულ ციტოტოქსიურ რეაქციას (ადუც, ADCC), რომელიც MHCII-დამოუკიდებელია და მიმართულია ვირუსით ინფიცირებული და სიმსივნური უჯრედების წინააღმდეგ (Deo *et al.*, 1997; Hunter *et al.*, 1998).

ლიგანდ-რეცეპტორული კომპლექსის წარმოქმნა ბიძგს აძლევს სხვა მნიშვნელოვან რეაქციებსაც: თრომბოციტების მიერ მედიატორის გამოყოფას და ადჰეზიის მოლეკულების ექსპრესიას; B-უჯრედების მიერ იმუნოგლობულინების სინთეზის რეგულაციას; ანთებითი ციტოკინების, მაგ. IL-1, IL-6, TNF $\gamma$  გამოთავისუფლებას და, აქედან გამომდინარე, ანთებითი პროცესის აღძვრას (Koyama *et al.*, 1999). Fc $\gamma$ R<sup>+</sup> უჯრედთა ერთი ნაწილი ამავდროულად ანტიგენ-წარმდგენიცაა (მაკროფაგები, დენდრიტული უჯრედები), ამიტომ ამ რეცეპტორით გაშუალებული ინტერნალიზაცია განაპირობებს ანტიგენის წარდგენას და იმუნური პასუხის გაძლიერებას (Gosselin *et al.*, 1992).

ადამიანში აღმოჩენილია Fc $\gamma$ R -ების სამი სხვადასხვა ტიპი (ნახატი 1.2). ისინი მიეკუთვნებიან იმუნოგლობულინების სუპეროჯახს და სპეციფიურია IgG-ს Fc ფრაგმენტისადმი: Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) და Fc $\gamma$ R (CD16). ეს რეცეპტორები განსხვავდებიან თავიანთი უჯრედული გავრცელებით, მოლეკულური მასით,

ლიგანდსპეციფიურობით, აფინობით, და ფუნქციებით. იმუნური კომპლექსების შთანთქმვაში ჩართულია სამივე FcγR (Fossati *et al.*, 2001).

FcγR გენები ლოკალიზებულია 1q21-23 ქრომოსომაში. სამი გენი - A, B და C არის ცნობილი როგორც FcγRI-ის (FcγRIA; FcγRIB; FcγRIC), ისე FcγR II-ისთვის (FcγRIIA; FcγRIIB; FcγRIIC). ორი გენი - A და B აკოდირებს FcγRIII-ს (FcγRIIIA და FcγRIIIB). ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის, ინტრონ-ეგზონური ორგანიზაციის და სტრუქტურული ორგანიზაციის შესწავლამ გამოავლინა, რომ FcγR გენები შეიძლება იყოს წარმოშობილი საერთო FcγR გენიდან (Oakey *et al.*, 1992).



**ნახატი 1.2.** ადამიანის Fcγ-რეცეპტორები და მათი აფინობა. ადაპტირებულია: P. Bruhns. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. Blood, 2012;119 (24): 5640-5649.

სიგნალებმა რომ მიაღწიოს უჯრედის ბირთვამდე, FcγR-ები უნდა აგრეგირდეს უჯრედის ზედაპირზე ანტისხეულებით და/ან მულტივალენტური ანტიგენებით (ლიგანდებით), რაც იძლევა ბიძგს უჯრედში აქტივაციის სიგნალის გადასაცემად. FcγR-თა ერთი ნაწილი ჰეტერო-ოლიგომერული კომპლექსია (Fridman *et al.*, 1992; Anderson *et al.*, 2013). ამ ჯგუფს მიეკუთვნება FcγRI, FcγRIIIa. სასიგნალო ჯაჭვის ციტოპლაზმურ ნაწილში მოიპოვება ე.წ. იმუნორეცეპტორის აქტივაციის თიროზინშემცველი თანმიმდევრობა (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) (ITAM), რომელიც შედგება ორჯერადი თირ-X-X-ლეი თანმიმდევრობისაგან და ჰეპტაპეპტიდისგან. მეორე ჯგუფს ეკუთვნის ერთჯაჭვიანი FcγRIIa,c. მათ გააჩნიათ ITAM, რომელიც შეიცავს არა შვიდ, არამედ თორმეტ ამინომჟავას. მათ ემსგავსება FcγRIIb, მაგრამ მის ციტოპლაზმურ ნაწილში არის არა ITAM, არამედ ე.წ. იმუნორეცეპტორის დამთრგუნველი თიროზინიანი თანმიმდევრობა (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, ITIM). მესამე ჯგუფში შემავალი რეცეპტორები საერთოდ არ საჭიროებენ სიგნალის გადაცემას, რადგანაც მხოლოდ IgG-ს გადატანას ემსახურებიან (FcRn). მეოთხე ჯგუფში მხოლოდ ერთი წევრია: FcγRIIb, რომელიც დაკავშირებულია მემბრანის ლიპიდურ შრეში არსებულ გლიკოფოსფატიდილ ინოზიტოლთან, არ გააჩნია ტრანსმემბრანული და ციტოპლაზმური ნაწილები, და

სიგნალის გადასაცემად სხვა რეცეპტორთან კავშირი ესაჭიროება (Edberg *et al.*, 1995; Lennartz *et al.*, 1999; Vossebeld *et al.*, 1999).

არჩვენ მაღალ და დაბალაფინურ FcγR-ებს (ნახატი 1.2). მაღალაფინურ FcγR-ს მიეკუთვნება FcγRI (CD64), რომელიც მაღალი აფინობით იკავშირებს მონომერულ IgG-ს, კერძოდ კი ადამიანის IgG1-სა და IgG3-ს, მაგრამ არა IgG2-ს. FcγRII (CD32) და FcγRIII (CD16) იკავშირებენ ანტიგენ-ანტისხეულის კომპლექსს მაღალი აფინობით, მაგრამ გააჩნია დაბალი ავიდობა მონომერული ლიგანდისადმი. ამრიგად, მონომერული ანტისხეულები უკავშირდება მაღალაფინურ FcγR-ებს სანამ შექმნის კომპლექსებს მულტივალენტურ ანტიგენტან, მაშინ, როცა დაბალაფინურ FcγR-ებთან დაკავშირებისას ანტისხეულებს უკვე შექმნილი აქვს კომპლექსები ანტიგენტან (Flesch *et al.*, 2001).

**FcγRI (CD64)** გლიკოპროტეინია. აქვს გლიკოზილირების ექვსი შესაძლო წერტილი (Duchemin *et al.*, 1994). რეცეპტორი შედგება ციტოპლაზმური (C-ბოლო), ტრანსმემბრანული და უჯრედგარე ნაწილებისაგან. უჯრედში აქტივაციის სიგნალი გადაეცემა ლიგანდდამაკავშირებელ ჯაჭვთან ასოცირებული γ-γ ჰომოდიმერის მეშვეობით. γ-ჯაჭვი არ მიეკუთვნება იმუნოგლობულინების სუპეროჯახს, იგი TCR-ის ζ ს ჰგავს, α-ჯაჭვს უერთდება ტრანსმემბრანულ ნაწილში მყოფი ასპარაგინის მჟავას ნაშთით (Ernst *et al.*, 1992). γ ჯაჭვის არსებობა აუცილებელია არა მხოლოდ სიგნალის გადაცემის, არამედ რეცეპტორის ექსპრესიისა და მისი მაღალი აფინობისთვის. CD64 რეცეპტორი მაღალაფინურად ( $10^{8-9}$ /მოლი) იკავშირებს IgG1, IgG3, IgG4-ს, როგორც მონომერულ, ასევე აგრეგირებულ ფორმას. არეს pH ლიგანდის დაკავშირებაზე არ მოქმედებს (Davis *et al.*, 1995; van Vugt MJ *et al.*, 1996; Honeychurch *et al.*, 2000). ეს რეცეპტორი ექსპრესირებულია CD34<sup>+</sup> მიელოიდურ წინამორბედებზე, მონოციტებზე, მაკროფაგებსა და დენდრიტულ უჯრედებზე, დაბალი სიმკვრივით ახლადგამოყოფილ გრანულოციტებზე (<1000), რომელიც იზრდება IFNγ-ის მოქმედებით (Lopez *et al.*, 1999; Vossebeld *et al.*, 1999). მისი სიმკვრივე ახალშობილებსა და მოზრდილებში ერთნაირია.

**FcγRII (CD32)** მოიცავს უჯრედშიდა, ტრანსმემბრანულ და უჯრედგარე ნაწილებს ორი Ig-ს მსგავსი დომენით, და აქვს FcγR-ებს შორის ყველაზე ფართო უჯრედული გავრცელება. იგი ექსპრესირებულია სისხლის თითქმის ყველა ფორმიან ელემენტზე - მონოც/მაკროფაგებზე, გრანულოციტებზე, თრომბოციტებზე, B-ლიმფოციტებზე, T ლიმფოციტების სუბპოპულაციაზე, ასევე ლანგერჰანისა და დენდრიტულ უჯრედებზე (Stuart *et al.*, 1989; Tate *et al.*, 1992). ამ რეცეპტორის აფინობა IgG-ს მიმართ გაცილებით მცირეა და  $10^7$ /მოლს აღწევს, ამასთან, კავშირი მყარდება მხოლოდ IgG-ს აგრეგატებთან და იმუნურ კომპლექსებთან. FcγRII შეესაბამება სამი გენური ელემენტი: RIIA, RII B, RII C, რომელთა პროდუქტებია, შესაბამისად, RIIa, b, c (Brooks *et al.*, 1989).

FcγRIIa მნიშვნელოვანია მონოციტ/მაკროფაგების და გრანულოციტების ფაგოციტური ფუნქციისთვის, განაპირობებს რესპირატორულ აფეთქებას ნეიტროფილებში და

მედიატორების გამოთავისუფლებას თრომბოციტების მიერ. FcγRIIa ადამიანის ერთადერთი FcγR-ია, რომელიც იკავშირებს ადამიანის IgG2-ს, რომელიც არ ააქტივებს კომპლემენტის სისტემას (Unkeless *et al.*, 1995; Carver *et al.*, 2000).

FcγRIIb აღმოჩენილია მონოციტებზე, მაკროფაგებსა და B ლიმფოციტებზე. FcγRIIb -ის შესაბამისი ი-რნმ-ის ალტერნატიული სპლაისინგით წარმოიქმნება FcγRIIb1 (უპირატესად ექსპრესირდება ლიმფოიდური ხაზის უჯრედებით) ან FcγRIIb2. FcγRIIb მულტივალენტური ლიგანდით აგრეგაციის შემდეგ განაპირობებს ენდოციტოზსა და ფაგოციტოზს (Brooks *et al.*, 1989; Carver *et al.*, 2000).

**FcγRIII (CD16)** ძლიერ გლიკოზილირებული რეცეპტორია. გლიკოზილირების ხარისხის მიხედვით მისი მოლეკულური მასა მერყეობს 40-80კდა. ცილას აკოდირებს 1q23-24 ლოკუსში მდებარე ორი ჰომოლოგიური გენი FcγRIIIA,B, რომლებიც ერთმანეთისაგან მხოლოდ ცხრა ნუკლეოტიდური წყვილით განსხვავდებიან. FcγRIIIa ტრანსმემბრანული მოლეკულაა, აქვს 25 ამინომჟავისაგან შემდგარი ციტოპლაზმური "კუდი" (Fernandes *et al.*, 2006). იგი ექსპრესირებულია 10-15% მონოციტებზე, მაკროფაგებზე, LGL/NK, პრე-B, Tγ/δ უჯრედებზე, მოლეკულური მასა დამოკიდებულია უჯრედ-მატარებელზე, ლიგანდდამაკავშირებელი ნაწილი უკავშირდება სიგნალის გადამცემს, რომელიც წარმოდგენილია γ ჯაჭვის ჰომოდიმერით, TCR-ის ζ ჰომოდიმერით, ζ-γ ჰეტეროდიმერით, ანდა ერთეული β ჯაჭვით (Abboud *et al.*, 2009). არსებობს მონაცემები, რომ ζ-ს მატარებელი NK უჯრედები და ნეიტროფილები უფრო ძლიერ ციტოტოქსიურ რეაქციას განახორციელებენ, ვიდრე γ-სი, ხოლო ფაგოციტური აქტივობა პირიქითაა.

β-ჯაჭვი მიეკუთვნება CD20-ის ოჯახს. იგი უკავშირდება პოხიერ უჯრედზე მყოფ FcγRIIIa-ს ლიგანდდამაკავშირებელ α-ჯაჭვს და მემბრანას ოთხჯერ განჭოლავს. სასიგნალო თანმიმდევრობა C-ბოლოზეა მოთავსებული. უჯრედგარე ნაწილი FcγRII-ის ჰომოლოგიურია. მასში ორი ცვალებადი წერტილია: 48-ე ამინომჟავის განსხვავების საფუძველზე გამოიყოფა სამი ალოტიპი, ხოლო 158-ე პოზიციაში ვალინის ან ფენილალანინი იწვევს ფუნქციურ განსხვავებას. ეს პოლიმორფიზმი მნიშვნელოვანია ორგანიზმის აუტოიმუნური დაავადებების მიმართ მგრძობელობისათვის. გრანულოციტების კოლონიების მასტუმილირებელი ფაქტორის (G-CSF) და IL-4-ის მოქმედებით ამ რეცეპტორის სიმკვრივე ნეიტროფილებზე ქვეითდება (Lobell *et al.*, 1993; Vance *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 2001).

FcγRIIIa-ს 203-ე ამინომჟავა ფენილალანინია, FcγRIIIb-ში კი ამ ადგილს სერინი იკავებს. მისი შესაბამისი გენის იმ კოდონში, რომელიც აკოდირებს 204-ე ამინომჟავას, FcγRIIIA-საგან განსხვავებით აღინიშნება ტრანსვერსია C→T, წარმოიქმნება "სტოპ-კოდონი" TGA, ტრანსკრიფცია ვეღარ გრძელდება. ამის გამო FcγRIIIb მოკლებულია ტრანსმემბრანულ და ციტოპლაზმურ ნაწილებს. იგი უკავშირდება მემბრანის ლიპიდურ შრეში არსებულ გლიკოფოსფოინოზიტოლს (გფი). 190 ამინომჟავის

სიგრძის მქონე უჯრედგარე ნაწილში ორი Ig-ს მსგავსი დომენია. Fc $\gamma$ RIIIb-ს არ შეუძლია სიგნალის გადაცემა Fc $\gamma$ RIIIa-საგან დამოუკიდებლად (Fernandes *et al.*, 2006). ნეიტროფილებზე ამ რეცეპტორის რიცხვი  $1-2 \times 10^5$  აღწევს, მაგრამ აქტივატორთა დამატებით მათი რაოდენობა 50-90%-ით მცირდება. შესაძლებელია, ისინი ააქტიურებდნენ ენდოგენურ პროტეაზას, რომელიც "ხსნის" მოლეკულას უჯრედის ზედაპირიდან. რეცეპტორს სამი იზოფორმა გააჩნია - NA1 (Neutrophil Antigen), NA2 და SH (Small Hydrophobic, Fc $\gamma$ RIIIb-ს გენის წერტილოვანი მუტაციის შედეგად წარმოქმნილი ალოანტიგენი), რომლებიც განსხვავდებიან ლიგანდსპეციფიურობითა და აფინობით (Fernandes *et al.*, 2006).

**FcRn**, რომელიც მაღალაფინურად იკავშირებს მონომერულ IgG-ს, ჰეტეროდიმერია და აგებულია ლიგანდდამაკავშირებელი  $\alpha$  სუბერთეულისაგან, რომელიც MHC I-ის მსგავსია, და  $\beta$ -მიკროგლობულინისგან.  $\alpha$  სუბერთეულის უჯრედგარე ნაწილში სამი C1-ტიპის Ig-მსგავსი დომენია. რეცეპტორი ექსპრესირებულია ნაწლავის ეპითელიურ, ჩანასახის ყვითრის პარკის, ტროფობლასტის, ჰეპატოციტებზე (ამ უკანასკნელს IgG ნაღვლიდან პარენქიმაში გადააქვს). ლიგანდ-რეცეპტორული კომპლექსი ერთვება პინოციტურ ვაკუოლში და ასეთი სახით აღწევს ციტოპლაზმაში, რაც იცავს მას ლიზოსომური ფერმენტებისაგან (Ravetch *et al.*, 2001, 2010).

FcRn და Fc $\gamma$ R განსხვავდება ერთმანეთისაგან IgG-სთან ურთიერთქმედების სტექიომეტრიითაც. IgG-ის Fc-ფრაგმენტსა და FcRn-ს შორის ურთიერთქმედების მნიშვნელოვანი მახასიათებელი არის ის, რომ Fc-ფრაგმენტი არის ფუნქციურად ბივალენტური, ამრიგად თითოეულ Fc ფრაგმენტს შეუძლია დაუკავშირდეს ორ მოლეკულას ერთდროულად. ამისგან განსხვავებით, IgG-ის Fc ფრაგმენტი ურთიერთქმედებს Fc $\gamma$ R-თან 1:1 სტექიომეტრიაში. IgG-ს მონოვალენტურობა Fc $\gamma$ R - ისთვის მიუთითებს მონომერული IgG-ს უძლურებაზე აღძრას უჯრედული პასუხი, ვინაიდან არ შეუძლია Fc $\gamma$ R-ის აგრეგაცია (Chaudhury *et al.*, 2006).

უჯრედთა უმეტესობა ექსპრესირებს FcR-ის ერთზე მეტ ტიპს. ურთიერთქმედებენ რა ამ უჯრედებთან, ზოგიერთი იზოტიპის იმუნური კომოლექსები ახდენენ FcR-ის ერთზე მეტი ტიპის კოაგრეგაციას. სხვადასხვა FcR -ების კოაგრეგაციას ერთიდაიგივე უჯრედზე შეიძლება ჰქონდეს პოზიტიური და/ან ნეგატიური ეფექტები. იდენტური FcR-ების აგრეგაცია, ახდენენ რა ერთმანეთის ტრანსფოსფორილირებას, არის პოზიტიური კოოპერაციის მაგალითი. ეს შეიძლება ხდებოდეს სხვადასხვა FcR-ებს შორისაც იმუნოგლობულინის ერთიდაიგივე იზოტიპისათვის, როგორცაა Fc $\gamma$ RI და Fc $\gamma$ RIIIA მაკროფაგებზე, ანდა სხვადასხვა იზოტიპისათვის, როგორცაა Fc $\gamma$ RI და Fc $\gamma$ RIIIA პოხიერ უჯრედებზე.

როგორც წესი, სამივე რეცეპტორი მსგავს პროცესებში (ანტიგენის წარდგენა, ფაგოციტოზი, ციტოტოქსიკური მოქმედება) მონაწილეობს. მაგრამ, მიუხედავად იმისა, რომ უჯრედგარე დომენები არ ამჟღავნებენ განსაკუთრებულ



ლიგანდსპეციფიკურობას, თითოეული მათგანი ზიბგს აძლევს ბიოლოგიურ პასუხს, რომლის ბუნებასაც განსაზღვრავს უჯრედი-მატარებელი (Masuda *et al.*, 1993). ერთიდაიგივე უჯრედზე ერთდროული ექსპრესიის შემთხვევაში FcγR-ები ტრანსმემბრანული ნაწილების მეშვეობით ურთიერთქმედებენ როგორც ერთმანეთთან, ასევე სხვა რეცეპტორებთანაც. ამას განსაკუთრებული მნიშვნელობა აქვს FcγRIIIb-სათვის, რომელსაც, როგორც აღინიშნა, არ გააჩნია ტრანსმემბრანული და ციტოპლაზმური ნაწილები და არც სასიგნალო ჯაჭვს უკავშირდება. სამაგიეროდ, მას აქვს FcγRIIa-თან ჰეტეროტიპური კლასტერების წარმოქმნის უნარი და სწორედ მას იყენებს სიგნალის გადამცემად. აქედან გამომდინარე, წარმოიშვა მოსაზრება, რომ იგი მხოლოდ ლიგანდდამაკავშირებელი მოლეკულაა FcγRIIa-თვის. ერთობლივ ქმედებას ხელს უწყობს ისიც, რომ ორივე მათგანი იკავშირებს IgG-იან იმუნურ კომპლექსებს. ამასთანავე ერთდროული ამოქმედების დროს აღძრული პასუხი (Ca<sup>2+</sup> მობილიზაცია, ჟანგბადური რადიკალების გამომუშავება, ფაგოციტოზის სხვა მაჩვენებლები) სინერგისტული აღმოჩნდა (Hunter *et al.*, 1998). საინტერესოა, რომ სინერგისტულ ეფექტზე გავლენას ახდენს რეცეპტორების იზოტიპი, კერძოდ, FcγRIII/NA1 და FcγRIIa ურთიერთქმედებისას ფაგოციტოზი უფრო აქტიურდება, ვიდრე NA2 ფორმის შემთხვევაში. უნდა აღინიშნოს ისიც, რომ კომპლემენტის სისტემის ნაკლოვანების დროს FcγRIIIb/NA2 და FcγRIIa/R131 კომბინაციის მატარებელი პირები უფრო მგრძობიარენი არიან მენინგოკოკური ინფექციის მიმართ (Masuda *et al.*, 1993). FcγRIIIb ურთიერთქმედებს სხვა რეცეპტორებთანაც, მაგ. CR-ებთან ფაგოციტოზის დროს. აღწერილია მის და Mac-1 (CD11b/CD18; CR3) მიერ მემბრანის ზედაპირზე შექმნილი "ქუდები", რაც განაპირობებს ჟანგბადურ აფეთქებას და აუცილებელია ფაგოციტოზისათვის (Masuda *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 2002). FcγRI-სა და FcγRII შორის ურთიერთქმედებაზე მიუთითებს ის, რომ FcγRI საწინააღმდეგო ანტისხეულების მოქმედებით ითრგუნებოდა FcγRII-ით გაშუალებული ფაგოციტოზი (Masuda *et al.*, 1993; Ross *et al.*, 2002). უარყოფითი ურთიერთქმედების მაგალითებიდან უპირველესად უნდა დასახელდეს FcγRIIb-ს უარყოფითი გავლენა ITAM-ის შემცველ ყველა რეცეპტორზე. მისი აგრეგაცია BCR-თან თრგუნავს B-უჯრედის აქტივაციას და Ig-ების სინთეზს. იგივე ითქმის TLR-ისა და FcγRI-ის შემთხვევაშიც (Huang *et al.*, 2003).

საინტერესოა აღინიშნოს ისიც, რომ მჟავე pH ზრდის ორივე დაბალაფინური FcγR -ის (FcγRII და FcγRIII) ავიდობას, მაგრამ არ მოქმედებს FcγRI-ის აფინობა/ავიდობაზე. ვინაიდან მჟავე pH ხშირად ახასიათებს ანთებით პროცესებს, აციდოზი შეიძლება ამწვავებდეს მას იმუნურ კომპლექსებსა და ფაგოციტურ უჯრედებს შორის ურთიერთქმედების ავიდობის ზრდით (Bruhns *et al.*, 2009).

ანტიგენ-ანტისხეულის კომპლექსებს შეუძლიათ მნიშვნელოვნად გააძლიერონ ანტიგენის პრეზენტაცია. მოსვენებული B უჯრედები ვერ უზრუნველყოფენ მეორე სიგნალს, რომელიც საჭიროა T უჯრედების აქტივაციისა და T უჯრედული

დახმარების გენერირებისთვის. მაკროფაგებსა და IFN $\gamma$ -ით აქტივირებულ მონოციტებს იმუნური კომპლექსების დაკავშირების შემდეგ შეუძლია უზრუნველყოს მეორე სიგნალი და გაააქტივოს T უჯრედები, რომელთა ზეგავლენით B ლიმფოციტები გადაიქცევიან ანტისხეულ-წარმომქმნელ პლაზმურ უჯრედებად (Raghavan *et al.*, 1997).

### 1.2.3 G-CSF-ისა და IFN $\gamma$ -ს გავლენა

მონოციტების აქტივაციისათვის ხშირად მიმართავენ ციტოკინებით სტიმულაციას. ასეთი ციტოკინების რიცხვს, როგორც უკვე აღვნიშნეთ, მიეკუთვნება G-CSF და IFN $\gamma$ .

G-CSF (გრანულოციტების კოლონია მასტიმულირებელი ფაქტორი) - 18kDa-იანი გლიკოპროტეინია და მიეკუთვნება კოლონია მასტიმულირებელი ფაქტორების (CSF)-ის ოჯახს. იგი კოდირდება მე-17 ქრომოსომის გრძელ მხარში განლაგებული გენით. G-CSF პროდუცირდება აქტივირებული მონოციტებისა და მაკროფაგების, აგრეთვე ენდოთელური უჯრედებისა და ფიბრობლასტების მიერ. G-CSF-ს იკავშირებს ნეიტროფილურ-გრანულოციტური რიგის ყველა უჯრედი. მისი რეცეპტორი 115kDa-ია, მიეკუთვნება 1 ტიპის ციტოკინური რეცეპტორების ოჯახს. G-CSF-ის რეცეპტორის ოთხი ფორმა არსებობს, რომლებიც ალტერნატიული სპლაისინგით მიიღება. ლიგანდის დაკავშირება რეცეპტორთან იწვევს Jak1, Tyk2 და Jak2-ის აქტივაციას და stat1, stat3 და stat5-ის ფოსფორირებას. G-CSF-ის ბიოლოგიური თვისებები კარგადაა შესწავლილი. იგი ახდენს პლურიპოტენტური ღერო უჯრედების და გრანულოციტების წინამორბედების პროლიფერაციას, ამცირებს კომიტირებული წინამორბედების მომწიფების დროს და ახანგრძლივებს მომწიფებული ეფექტორული უჯრედების სიცოცხლეს ცირკულაციაში. ადამიანის რეკომბინატული G-CSF დღესდღეობით ფართოდ გამოიყენება კლინიკაში პოსტქიმიოთერაპიული მკურნალობისთვის (Haernesh *et al.*, 2012).

IFN- $\gamma$  34 kDa-იანი ჰომოდიმერული ცილაა და გლიკოპროტეინების ოჯახს მიეკუთვნება (Petersen *et al.*, 1996). იგი მე-12 ქრომოსომაშია კოდირებული. IFN $\gamma$ -ს ორი ფორმაა ცნობილი, რომელიც პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციით, გლიკოზილირებით მიიღება. ანტიგენურ სტიმულზე დამოკიდებულებით, CD4<sup>+</sup>T და CD8<sup>+</sup>T უჯრედები IFN- $\gamma$ -ს ძირითადი მაკროდუცირებლები არიან, თუმცა ამის უნარი აქტივირებულ NK უჯრედებსაც გააჩნიათ. სხვა ციტოკინების მსგავსად, IFN- $\gamma$  უკავშირდება მაღალაფინურ ( $K=10^{-10}$ - $10^{-11}$ M) მემბრანულ რეცეპტორს (CD119) (Willems *et al.*, 1994). IFN- $\gamma$ -ს რეცეპტორებს ადამიანის ყველა უჯრედი ატარებს და მათი რაოდენობა მერყეობს 200-დან 10000-მდე. მემბრანდაკავშირებული IFN- $\gamma$  სწრაფად ინტერნალიზდება და დეგრადირდება 37°C -ზე. IFN- $\gamma$ -ს აძლიერებს მაკროფაგების ანტი-სიმსივნურ და ანტი-მიკრობულ ფუნქციას, ნეიტროფილების, NK, ვასკულარული ენდოთელური უჯრედების აქტივაციას, Fc $\gamma$ R-რეცეპტორების ინდუქციას და TNF $\alpha$ -ს სინთეზს. TNF $\alpha$  კი აძლიერებს ადჰეზიური მოლეკულების

ექსპრესიას ენდოთელურ უჯრედებსა და ნეიტროფილებზე, ასტიმულირებს მაკროფაგების მიერ IL-1-ის, IL-6-ს და თვით IFN- $\gamma$ -ს სინთეზს (Petersen *et al.*, 1996).

#### 1.2.4 Toll-მსგავსი რეცეპტორები (TLR)

##### 1.2.4.1 TLR-ების ოჯახის დახასიათება

ბუნებრივი იმუნური პასუხი წარმოადგენს მიკრობული პათოგენების წინააღმდეგ მიმართული თავდაცვის პირველ ხაზს. იმუნური სისტემის გააქტივებას იწვევს პათოგენებისთვის და დაზიანებისთვის დამახასიათებელი მოლეკულური ნაკრებების (pathogen- and damage-associated molecular patterns - PAMPs, DAMPs) მოქმედება, მაგალითად, ბაქტერიული ლიპოპოლისაქარიდები (LPS), პეპტიდოგლიკანები, ლიპოთეიქოის მჟავა, ლიპოარაბინომანანი და ბაქტერიული დნმ, ვირუსული დნმ და რნმ, სითბური შოკის პროტეინები და სხვა (Hirschfeld *et al.*, 2000).

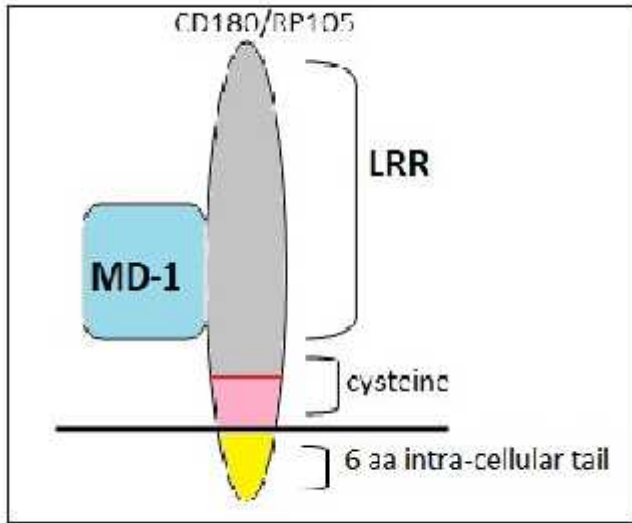
თოლ-მსგავსი რეცეპტორები (TLR) - რეცეპტორების ოჯახია, რომლებიც მწერებიდან დაწყებული ადამიანის ჩათვლით ყველა ორგანიზმში გვხვდება და ცენტრალურ როლს თამაშობენ ბუნებრივ იმუნურ პასუხში. ისინი I ტიპის ტრანსმემბრანული მოლეკულებია და ჰომოლოგიას ავლენენ IL-1-ის რეცეპტორის ციტოპლაზმურ თიროზინის შემცველ (Toll/IL-1R-TIR) დომენტან, რომელიც მონაწილეობს სასიგნალო კასკადის ინიცირების პროცესში. IL-1R TLR-ებისაგან განსხვავდება იმით, რომ მისი უჯრედგარე ნაწილი შედგება სამი იმუნოგლობულინის მსგავსი დომენისაგან. TLR დომენი ასევე ნაწილობრივ ციტოპლაზმურ ცილაში – მიელოიდური დიფერენციაციის ფაქტორ 88-ში (MyD88), სადაც იგი, როგორც კარბოქსიტერმინალური დომენი უკავშირდება ამინოტერმინალურ “სიკვდილის დომენს” (DD) (Hirschfeld *et al.*, 2000).

TLR-ების აქტივაცია იწვევს ტრანსკრიპტორული ფაქტორის NF- $\kappa$ B-ს აქტივაციას და იმ გენების ექსპრესიას, რომლებსაც NF- $\kappa$ B აკონტროლებს. ადამიანში TLR-ების შებოჭვა იწვევს კოსტიმულატორული მოლეკულის B7.1-ის ექსპრესიას, რომელიც აუცილებელია T უჯრედების აქტივაციისათვის. დღეისათვის ადამიანში ცნობილია 10 TLR და სამი ცილა CD180, (Nucleotide-Binding Oligomerization Domain Receptors) NOD1 და NOD2, რომლებიც მათთან სტრუქტურულ და ფუნქციურ ჰომოლოგიას ავლენენ (Muzio *et al.*, 2012).

CD180 (RP105) TLR4-ის ჰომოლოგს წარმოადგენს. TLR4 არის LPS-ის გამომცნობი ძირითადი რეცეპტორი. ადამიანსა და თაგვებში მისი მუტაცია იწვევს LPS-დმი ჰიპორეაქტიულობას. TLR4-თან ასოცირებულია MD1 მოლეკულა, მისი კოექსპრესია აუცილებელია LPS-ით გამოწვეული სიგნალის გადაცემისათვის.

CD180 წარმოადგენს 105kD მოლეკულური მასის მქონე ტრანსმემბრანულ ცილას, რომელიც ექსპრესირდება მონოციტებზე და დენდრიტულ უჯრედებზე (Nagai *et al.*, 2002), ასევე გამოუცდელ, მაგრამ არა ჩანასახოვანცენტრიან B უჯრედებზე. TLR4-ს მსგავსად CD180 თანა-ექსპრესირდება MD-2-თან ერთად, რომელიც MD-1-ს

ჰომოლოგია (ნახატი 1.3). CD180 შეიცავს უჯრედგარე 22 LRRs და ცისტეინის ნარჩენს, შიდაუჯრედული „კუდი“ ძალიან მოკლეა და შედგება 6 ამინომჟავისაგან.



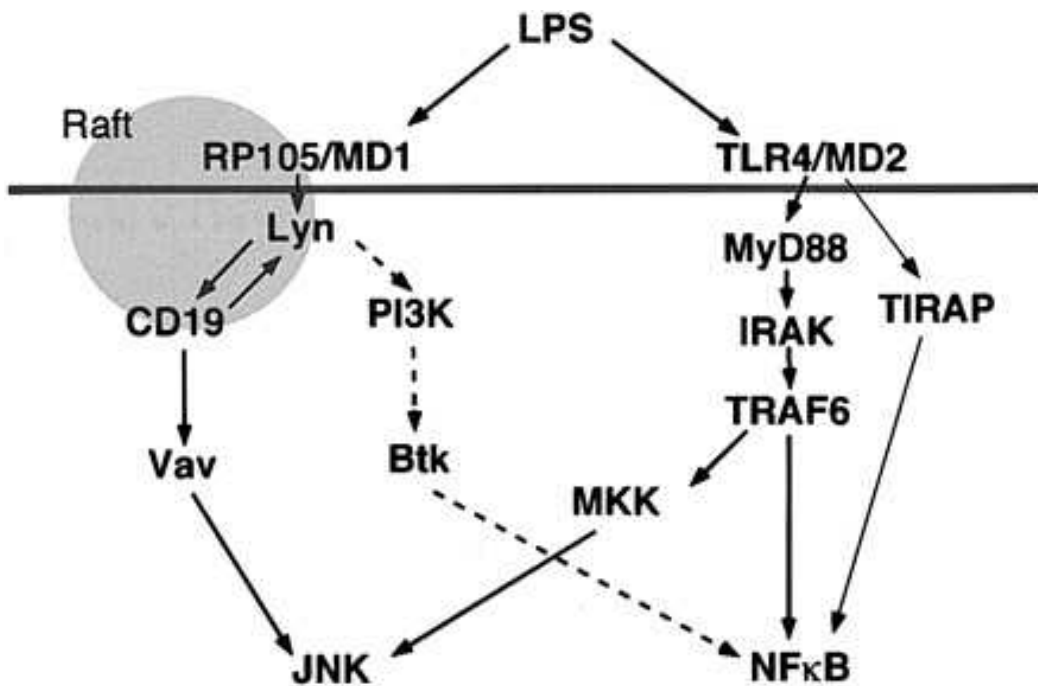
**ნახატი 1.3.** CD180-ის სტრუქტურა.

LPS-ის დაკავშირება TLR4-თან იწვევს B უჯრედის აქტივაციას, აინდუცირებს TLR-ის ტრადიციულ სასიგნალო გზას. აქტივდება MYD88/IRAK და MYD88-გან დამოუკიდებელი TIRAP სასიგნალო გზები, რის შედეგადაც ხდება JNK-ს და NF-κB-ს აქტივაცია (Leadbetter *et al.*, 2002; Michael *et al.*, 2004). მეორეს

მხრივ, ნაჩვენებია იყო, რომ BCR სასიგნალო გზაში მონაწილე მოლეკულების CD19-ის, LYN-ის, BTK-ს, PI3K, BLNK ან PLC2-ის დეფიციტის შემთხვევაში LPS-ით სტიმულაციის შემდეგ შეინიშნება პროლიფერირებული პასუხის მნიშვნელოვანი დარღვევები. BTK, PI3K, BLNK და PLC2 BCR-ის სასიგნალო გზაში თანმიმდევრულად არიან ასოცირებულნი “B უჯრედულ სიგნალოსომაში”, რომელიც უჯრედშია  $Ca^{2+}$ -ის ცვლას არეგულირებს. CD19 კი B უჯრედში განსაზღვრავს BCR-დან სიგნალის გადაცემის ზღურბლს, LYN კინაზის აქტივაციის რეგულირების მეშვეობით (Fujimoto *et al.*, 2002). ამასთანავე, დადგინდა მრავალი ფაქტი, რომელიც CD19-ის და CD180-ის ფუნქციურ კავშირზე მიუთითებს, აგრეთვე CD19-ის როლზე LPS-ით ინდუცირებულ სასიგნალო გზაში (Fujimoto *et al.*, 2002).

B უჯრედებზე CD180 ექსპრესია გაცილებით მაღალია, ვიდრე TLR4-ის. იგი ობოლი რეცეპტორია, რომელიც ანტისხეულით შებოჭვის შემთხვევაში იწვევს ნორმალური B უჯრედების აქტივაციასა და გამრავლებას. დადგინდა, რომ CD180-ის შებოჭვას მოსდევს CD19-ის ფოსფორილება, ტრანსლოკაცია ლიპიდურ ტივებში და CD19-ის მიერ პროტეინ თიროზინ კინაზა LYN-ის და ადაპტორული ცილა VAV-ის აქტივაცია და SH2 დომენის მეშვეობით მათი დაკავშირება, ისევე, როგორც ეს ხდება BCR -ის სასიგნალო გზის შემთხვევაში (Fujimoto *et al.*, 2002; Yazawa *et al.*, 2003). BCR-ის ლიგაციის შემდეგ ადგილი ჰქონდა CD19-ის ძლიერ, მაგრამ ხანმოკლე ფოსფორილებას, იმ დროს, როცა LPS-ით ან ანტი-CD180-ით ინდუცირებული CD19-ის ფოსფორილებას ახასიათებდა დაბალი, მაგრამ ხანგრძლივი პერიოდი. LPS-ით ინდუცირებული CD19-ის ფოსფორილებისათვის აუცილებელია CD180/MD1-ის ექსპრესია, რადგანაც ანტი-MD-1 ანტისხეულები, რომლებიც აბლოკებდნენ CD180/MD1 კომპლექსთან LPS-ის დაკავშირებას, სრულიად თრგუნავდა CD19-ის

ფოსფორილირებას (Fujimoto *et al.*, 2002). CD19-ის მნიშვნელოვანი როლი CD180-ის სასიგნალო გზაში ასევე ნაჩვენებია იქნა ექსპერიმენტულად თავგებში, როცა TLR-/- და MYD88-/- დეფიციტურ თავგებში ანტი-CD180 მკა-ით მოქმედების საპასუხოდ გამოვლინდა B უჯრედების ისეთივე პროლიფერაციული პასუხი, როგორც wild type თავგების შემთხვევაში, რაც მიუთითებდა იმაზე, რომ CD180-ის სასიგნალო გზა რეგულირდება არა TLR-ებისათვის დამახასიათებელი MYD88-ით და IL-1R გამაქტივებელი კინაზის (IRAK) მიერ, არამედ B უჯრედ-სპეციფიური სასიგნალო მოლეკულების, კერძოდ CD19-ის მიერ (Fujimoto *et al.*, 2002).



**ნახატი 1.4.** CD180/RP105-ის და TLR4-ის სასიგნალო გზები (Yazawa *et al.*, 2003)

ამგვარად, CD180 და TLR4 სიგნალის გადაცემისათვის იყენებენ სხვადასხვა მოლეკულებს. TLR4 იყენებს MYD88-ს და არ არის დამოკიდებული CD19-ის ექსპრესიაზე, იმ უჯრედების მსგავსად, რომლებიც საერთოდ არ ექსპრესირებენ CD19. ამის საპირისპიროდ, CD180-ის ლიგაცია იწვევს LYN-ის აქტივაციას და CD19-ის ფოსფორილბას, CD19 კი თავის მხრივ, კიდევ უფრო აძლიერებს LYN-ის აქტივაციას. აღსანიშნავია, რომ CD180-ის და CD19-ის ფიზიკური კავშირი ჯერ-ჯეჯრობით არ არის დადგენილი. ასევე გაუგებარია ის მექანიზმი, რომლითაც CD180 და TLR4 ურთიერთშეთანხმებით არეგულირებენ LPS-დმი პასუხს. ადამიანისა და თავგის B უჯრედებში CD180-ის შებოჭვის საპასუხოდ გამოწვეული აქტივაციისას ადგილი აქვს MHC II კლასის, CD80/CD86-ისა და CD40-ს ექსპრესიის ზრდას (Porakishvili *et al.*, 2005; 2011; 2015), უჯრედშიდა  $Ca^{2+}$ -ის მობილიზაციას, C-myc-ს ექსპრესიასა და უჯრედული

ციკლის აჩქარებას. ამავდროულად, B უჯრედების აქტივაციას თან სდევს CD180-ს ექსპრესიის დონის შემცირება.

ჩვენმა საერთაშორისო ჯგუფმა დაადგინა, რომ CD180 ჰეტეროგენულად ექსპრესირდება B-ქლლ უჯრედებზე, თუმცა B-ქლლ-ში CD180<sup>+</sup> უჯრედების რიცხვი ყოველთვის ნაკლებია, ნორმალურ B უჯრედებთან შედარებით. CD180-ს ექსპრესიის *IgVH* გენების მუტაციურ სტატუსთან კავშირის შესწავლისას აღმოჩნდა, რომ CD180 უფრო მაღალია M-CLL-ის შემთხვევაში მაშინ, როდესაც sIgM-ს ექსპრესია, პირიქით, U-CLL ჭარბობდა (Porakishvili *et al.*, 2005).

CD180<sup>+</sup>B-ქლლ უჯრედები იყოფა ორ ჯგუფად - “არამოპასუხე” და “მოპასუხე”, რომლებიც CD180-ის შებოჭვას მკა-თი პასუხობენ აქტივაციითა და პროლიფერაციით. ჯანმრთელ დონორების B-ლიმფოციტების და „მოპასუხე“ B-ქლლ-ის შემთხვევაში CD40-ის ან CD180-ს შებოჭვას ან რეკომბინანტული rIL-4-ს დამატებას მოჰყვება CD19<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> და CD19<sup>+</sup>/Ki67<sup>+</sup> უჯრედების რაოდენობის ზრდა, ამასთანავე CD180-ს უფრო ძლიერი აქტივატორული გავლენა გააჩნდა, ვიდრე ანტი-CD40 ან rIL-4-ს (Porakishvili *et al.*, 2005; 2011).

ცნობილია, რომ ანტი-CD40 მკა და IL-4 იცავს B-ქლლ უჯრედებს აპოპტოზისგან. ანტი-CD180 მკა-ით ზემოქმედების საპასუხოდ ჯანმრთელი დონორების B უჯრედებში და „მოპასუხე“ B-ქლლ უჯრედებში ასევე მცირდებოდა აპოპტოზი და იზრდებოდა Mcl-1-ს დონე. აღსანიშნავია, რომ CD180<sup>+</sup> და „არამოპასუხე“ B-CLL კლონები ასევე სუსტად პასუხობენ ანტი-CD40 მკა-ით და IL-4-ით სტიმულაციაზე, თუმცა CD40-ს ექსპრესია „მოპასუხე“ და „არამოპასუხე“ უჯრედებში მნიშვნელოვნად არ განსხვავდება, რაც, შესაძლოა, მეტყველებს ამ უკანასკნელების ანერგიაზე. CD180-სა და CD40-ს თანა-შებოჭვა ნორმაში და „მოპასუხე“ B-ქლლ კლონებში იწვევს სინერგისტულ ეფექტს, თუმცა „არამოპასუხე“ უჯრედებზე ასეთი თანა-სტიმულაცია ეფექტს არ ახდენს. უფრო მოგვიანებით დადგინდა, რომ CD180-ის შებოჭვა ჯანმრთელი დონორების B-ლიმფოციტებსა და „მოპასუხე“ B-ქლლ კლონებში იწვევს pZAP70/Syk, p38MAPK, ERK და AKT პროტეინ-კინაზების ფოსფორილირებას (Porakishvili *et al.*, 2011; 2015).

#### 1.2.4.2 TLR-ების ექსპრესია მონოციტ/მაკროფაგებზე

მონოციტ/მაკროფაგებით წარმოებული იმუნური პასუხი მიმდინარეობს მიკრობის PAMP-სებისა და ქსოვილოვანი DAMP-სების გამოცნობით, ფაგოციტოზით და ანთებითი მედიატორების გამოთავისუფლებით (Visintin *et al.*, 2001). თოლ-მსგავსი რეცეპტორების ოჯახის ორი წარმომადგენელი მონაწილეობას ღებულობს ამ პროცესში: TLR4 ამოიცნობს გრამ-ნეგატიური ბაქტერიების LPS, TLR2 კი ამოიცნობს გრამ-პოზიტიური მიკროორგანიზმებისა და მიკობაქტერიულ კომპონენტებს. MyD88 ადაპტორი ცილა თავისი კარბოქსი-ტერმინალური TLR დომენით, ხოლო ამინოტერმინალური DD დომენით იკავშირებს კინაზა IRAK-ის ამინოტერმინალურ DD დომენს. IRAK წარმოადგენს სერინ/თრეონინ კინაზის ოჯახის წევრს. ამის შემდეგ

IRAK განიცდის აუტოფოსფორილებას და უკავშირდება TRAF6-ს, რომელიც ადაპტორულ ცილას წარმოადგენს და მონაწილეობს რა თოლ-მსგავსი რეცეპტორებიდან, IL-1R-დან და TNF- $\alpha$  -დან სიგნალის გადაცემაში, მნიშვნელოვან როლს ასრულებს NF-kB-ს აქტივაციაში (Visintin *et al.*, 200; Muroi *et al.*, 2008). აღსანიშნავია, რომ IL-1-დან სიგნალის გადაცემა ხდება ისეთივე გზით, როგორც TLR-დან და მასში მონაწილეობენ იგივე სასიგნალო მოლეკულები (Muzio *et al.*, 2008). TLR2 და TLR6-სგან შემდგარი ჰეტეროდიმერი ამოიცნობს პეპტიდოგლიკანს. TLR2 და TLR6-ის ურთიერთკავშირის შედეგად ხდება ციტოკინების ინდუქცია. TLR2 მონომერი და მონოდიმერი ამოიცნობს სხვა კომპონენტებს, ბაქტერიულ ლიპოპროტეინებს.

ჩვენი ჯგუფის წინა კვლევებში დადგინდა თოლ-მსგავსი რეცეპტორების ოჯახის წევრის CD180-ის დაკლებული ექსპრესია B ქლლ უჯრედებზე (Porakishvili *et al.*, 2005) იმის გათვალისწინებით რომ, ქლლ პირობებში CD180-ის ექსპრესია მონოციტ/მაკროფაგებზე აქამდე შესწავლილი არ იყო, მიზანშეწონილად ჩავთვალეთ მონოციტებში CD180-ის ექსპრესიის შესწავლა.

### 1.3 MEC1 უჯრედული ხაზი

MEC1 უჯრედული ხაზი წამოადგენს ქლლ პაციენტიდან მიღებულ, ტრანსფორმირებულ B ლიმფოციტებს. იგი მიიღეს 58 წლის მამაკაცისგან, რომელსაც 1990 წელს დაუდგინეს B-ქლლ-ს მე-2 სტადია, თუმცა პაციენტის ფენოტიპი განსხვავდებოდა კლასიკური B-ქლლ-სგან იმით, რომ ახასიათებდა ზედაპირული იმუნოგლობულინის (sIg) მაღალი ექსპრესია, CD23 და FMC7 კი უარყოფითი იყო. მომდევნო წლებში პაციენტის უჯრედები ხელახლა გააანალიზეს და გამოვლინდა რიგი ცვლილებები. 1992 წელს უჯრედები გახდნენ CD25 და FMC7 დადებითები. 1993 წელს B უჯრედების 80%-ზე გამოვლინდა ძლიერი sIg და FMC7, ხოლო CD5 და CD23 აღარ ქონდათ. მორფოლოგიურად აღინიშნებოდა მოცირკულირე უჯრედების 50%-ში პროლიმფოციტური ტრანსფორმაცია. (11;14) ტრანსლოკაცია და Bcl-1-ს გადაჯგუფება, რაც იწვევს PRAD/Cyclin D1 (Parathyroid Adenomatosis/ Cyclin D1) ცილის მომატებულ ექსპრესიას და არის მანტიის ზონის ლიმფომისთვის დამახასიათებელი, არ აღინიშნებოდა. ამ შედეგების მიხედვით, პაციენტს დაუდგინდა B-ქლლ-ს პროლიმფოციტური ტრანსფორმაცია. დროთა განმავლობაში პაციენტს გამოუვლინდა ლიმფური კვანძებისა და ელენთის გადიდება (Stacchini *et al.*, 1999; Rasul *et al.*, 2014).

უჯრედული ხაზი მიიღეს პაციენტის პერიფერიული სისხლის ლიმფოციტებიდან 1993 წელს. თეთრი უჯრედების რიცხვი შეადგენდა  $39 \times 10^3$ /მლ. უჯრედები გამოყვეს ფიკოლ-ჰიპაკის სიმკვრივის გრადიენტში, შემდეგ 2-ჯერ გარეცხეს RPMI-1640 საკვები არით, გადაიტანეს Iscove's Modified Dulbecco Medium (IMDM)-ში, დაუმატეს 10%-იანი ჩანასახოვანი ხბოს შრატი, შემდეგი კონცენტრაციით -  $2 \times 10^6$ /მლ  $25 \text{ cm}^2$  ზომის კულტურალურ ბოთლში მოათავსეს ინკუბატორში  $37^\circ \text{C}$  -ზე 5%  $\text{CO}_2$ -ს პირობებში. 4 კვირის შემდეგ უჯრედებმა დაიწყეს მუდმივი პროლიფერაცია.

MEC1 უჯრედები იზრდებიან ჭურჭლის კედლებზე და წარმოქმნიან აგრეგატებს. მათ ახასიათებთ მე-17 ქრომოსომის მოკლე მხრის დელეცია. უჯრედების გაორმაგების დრო შეადგენს 40 საათს, განუწყვეტელი ზრდა შეუძლიათ 50 თვეზე მეტ ხანს. MEC1 უჯრედული ხაზი ხასიათდება მომწიფებული B უჯრედების მარკერებით CD19, CD20, CD21, CD22, გამოირჩევიან CD23, CD80 და CD86-ს მაღალი ექსპრესიით. ასევე MEC1-ზე წარმოდგენილია შემდეგი ადჰეზიური მოლეკულები: CD11a, CD18, CD44, CD49d და CD54, ხოლო CD5, CD28 და FMC7-ით უარყოფითია. მიელოიდური და T უჯრედული მარკერები MEC1-ზე არ ვლინდება. MEC1 არის EBV<sup>+</sup>, B-ქლლ-ს მქონე პაციენტების უმეტესობა არიან ასევე EBV<sup>+</sup>, მათ ლიმფოციტების ზედაპირზე აქვთ EBV რეცეპტორი CD21.

MEC1 B უჯრედების ხაზის ჩამოყალიბების მთავარი მიზეზი იყო შეექმნათ B-ქლლ-ს ანალოგიური *in vitro* მოდელი, რომ შეესწავლათ მასში მიმდინარე ბიოლოგიური პროცესები (Stacchini *et al.*, 1999). სხვა ანალოგიური მოდელი ჯერჯერობით არ არსებობს. ჩვენ ეს მოდელი გამოვიყენეთ პროლიფერირებადი ქლლ უჯრედების ზოგიერთი თვისების დასადგენად.



## თავი 2

### გამოყენებული მასალა და კვლევის მეთოდები

#### *პაციენტების დახასიათება*

გამოკვლევა ჩატარებულია ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის იმუნოლოგიის და მიკრობიოლოგიის კათედრასთან არსებულ სასწავლო და კვლევით ლაბორატორიაში. კვლევის მასალად გამოვიყენეთ B-ქლლ-ით დაავადებულების და ჯანმრთელი პირების პერიფერიული სისხლი, რომლის აღება წარმოებდა დილით 11-12.00 სთ-ზე, უზმოზე. ანტიკოაგულანტად გამოიყენებოდა ჰეპარინი 10მლ სისხლზე 1000 ერთეულის გაანგარიშებით.

გამოკვლეულ იქნა 51 B-ქლლ დაავადებულის პერიფერიული სისხლი, რომელიც მოწოდებულ იქნა გრ. მუხაძის სახ. საქართველოს ჰემატოლოგიისა და სისხლის გადასხმის ინსტიტუტიდან (ექიმი პროფესორი დ. ღირდალაძე). ავადმყოფთა საშუალო ასაკი 64 წელი იყო (52-დან 79-მდე). საკონტროლო ჯგუფად აღებული იქნა ამავე ასაკის 20 ჯანმრთელი პირის სისხლი (ასევე მოწოდებული პროფესორ დ. ღირდალაძის მიერ).

გამოკვლეული B-ქლლ ავადმყოფებიდან 24 იყო მამაკაცი და 27 ქალი. 28 ავადმყოფი იყო პრაქტიკულად არანამკურნალები, ანუ მკურნალობა არ მიუღია გამოკვლევამდე მინიმუმ 6 თვის განმავლობაში, ხოლო 23 ნამკურნალები. მკურნალობა მიმდინარეობდა კორტიკოსტეროიდებით და COP-ით.

გართულებების სახით აღინიშნებოდა, ძირითადად, სასუნთქი გზების ვირუსული და ბაქტერიული ინფექციები, ასევე ჰერპესული ინფექცია. ყველა B-ქლლ პაციენტის დიაგნოზი დადასტურდა იმუნოფენოტიპირებით ჩვენს ლაბორატორიაში, გამდინარე ციტომეტრის საშუალებით (CD5>60%,CD19>60%).

#### *პერიფერიული სისხლის მონოციტების და ნეიტროფილების გამოყოფა სიმკვრივის გრადიენტში*

10 მლ სისხლს ვიღებდით წინამხრის ვენიდან და ვაზავებდით ჰენქსის ხსნარით (Gibco) 1:1 შეფარდებით. 10 მლ ნარევს ვაშრევებდით 3 მლ ფიკოლ-ჰაიპაკის (LymphoPrep, Nycomed) 1.119 გ/ლ და 3 მლ ფიკოლ-ჰაიპაკის 1077გ/ლ სიმკვრივის გრადიენტებზე ორი განსხვავებული უჯრედული პოპულაციის მისაღებად, ვაცენტრიფუგებდით 40წთ 800 ბრ/წთ-ზე +4°C-ზე. ვიღებდით ინტერფაზებიდან უჯრედების რგოლს ცალცალკე, ორჯერ ვრეცხავდით ჰენქსის ხსნარში 15წთ და 10წთ-ით 400 ბრ/წთ-ზე ცენტრიფუგირებით. ამის შემდეგ უჯრედებს ვასუსპენდირებდით 1მლ არე RPMI-1640-ში (Sigma) გამდიდრებულ 10% ხბოს ემბრიონული შრატით (Gibco) და ვითვლიდით მათ რაოდენობას სინათლია მიკროსკოპში 1მლ-ში ჰემოციტომეტრის

4 კუთხის კვადრატში (თითოეული - 1მმ<sup>2</sup>) და მიღებულ რაოდენობას ვამრავლებდით 10<sup>4</sup>, რათა მიგვეღო უჯრედების კონცენტრაცია/მლ-ში.

### **მონოციტების და ნეიტროფილების სტიმულაცია G-CSF-ითა და IFN $\gamma$ -ით**

გამოყოფილ და გარეცხილ მონოციტებს ან ნეიტროფილებს ვასუსპენდებდით არე RPMI-1640-ში კონცენტრაციით 10<sup>6</sup> უჯრედი/მლ. 96-ფოსოიანი პლანშეტის ფოსოებში (Nunc) გადაგვქონდა 200  $\mu$ l უჯრედების სუსპენზია და ვუმატებდით 10  $\mu$ l რეკომბინანტულ IFN $\gamma$ -ს (Sigma) კონცენტრაციით 500ერთ/მლ ან/და 50  $\mu$ l რეკომბინანტულ G-CSF (Sigma) კონცენტრაციით 100 ნგ/მლ. საკონტროლო უჯრედებს ციტოკინებს არ ვუმატებდით. უჯრედებს ვაინკუბირებდით თერმოსტატში +37°C-ზე, 12 საათის განმავლობაში. ინკუბაციის შემდეგ უჯრედებს ვრეცხავდით ორჯერ. რეცხვა მიმდინარეობდა RPMI-1640-ში 1500 ბრუნზე 5-5 წთ. უჯრედების კონცენტრაცია მიგვყავდა კვლავ 10<sup>6</sup> უჯრედი/მლ და ამ სუსპენზიას ვიყენებდით *Staphylococcus aureus*-ის ნაწილაკების ფაგოციტოზის შესასწავლად.

### **ოფსონიზირებული და არაოფსონიზირებული *Staphylococcus aureus*-ის ფაგოციტოზი მონოციტების მიერ**

#### **ნაწილაკების ოფსონიზაცია:**

სინჯარაში ვათავსებდით 15მკლ *Staphylococcus aureus*-ის ნაწილაკებს, ვუმატებდით 15მკლ მაოფსონიზირებელ ანტი-*S. aureus* პოლიკლონურ IgG-ს (ორივე – Molecular Probes), ვასუსპენდებდით და 1 სთ-ით ვაინკუბირებდით თერმოსტატში +37°C -ზე. შემდეგ ვრეცხავდით ოთხჯერ 200 მკლ PBS-ით (Sigma) 1500 ბრ/წთ-ზე 15 წთ-ის განმავლობაში. სუპერნატანტს ვასხავდით, ხოლო ნალექს ვუმატებდით 400 მკლ არეს RPMI-1640-ს და კარგად ვასუსპენდებდით.

#### **ნაწილაკების შერევა მონოციტებთან**

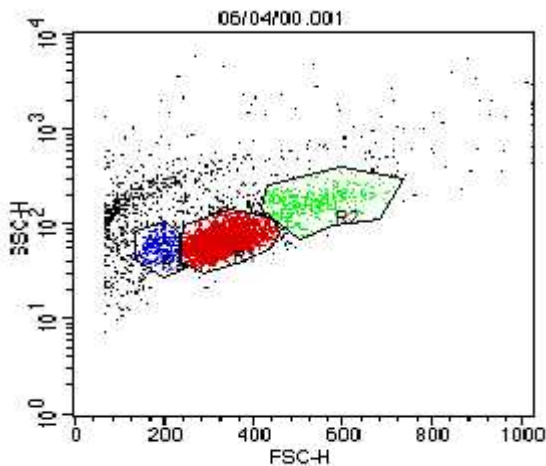
გამოყოფილი და გარეცხილი მონოციტების კონცენტრაცია მიგვყავდა 1x10<sup>6</sup> უჯრედი/100მკლ-ში. სუსპენზიის ერთ ნიმუშს ვუმატებთ 20 მკლ წინასწარ ოფსონიზებულ *S. aureus*-ის ნაწილაკებს, მეორე ნიმუშს კი არაოფსონიზირებულ ნაწილაკებს იმავე რაოდენობით, შემდეგ ვასუსპენდებდით, 40 წთ და ვაინკუბირებდით თერმოსტატში +37°C -ზე.

#### **უჯრედების შეღებვა ტრიპანის ლურჯით**

როგორც ოფსონიზირებული ისე არაოფსონიზირებული *S.aureus* პრეპარატებით დამუშავებული მონოციტების 100მკლ სუსპენზიას ვუმატებდით 10მკლ ტრიპანის ლურჯის (Sigma) 1%-იან ხსნარს, რომელსაც წინასწარ ვამზადებდით ციტრატულ ბუფერში pH=4.8 (Sigma). როგორც შეუღებავ, ისე ტრიპანის ლურჯით შეღებილ ნიმუშებში ფაგოციტოზის პროცენტულ მაჩვენებელს ვსაზღვრავდით გამდინარე ციტომეტრში (FACScan, Beckton&Dincinson).

### მონოციტების და ქლლ უჯრედების ფენოტიპირება

200მკლ სისხლს ვამატებდით 4-4 მლ +37°C -მდე შემთბარ ლიზის-ბუფერს (0,9% NaCl-FACS-Lysing Solution, განზავებით 1:10, Becton&Dickinson) და ვაინკუბირებდით თერმოსტატში, +37°C ტემპერატურაზე, 5 წთ. შემდეგ ვაცენტრიფუგებდით 1500 ბრ/წთ, 5 წთ. ნალექს ვრეცხავდით 200 მკლ 1% PBS/BSA ხსნარით 1500 ბრ/წთ, 5წთ და ვუმატებდით 10 მკლ ფლუოროქრომებით მონიშნულ მკა ადამიანის რეცეპტორების მიმართ: FITC-კონიუგირებულ anti-CD64 და anti-CD16 (ორივე - BD Pharmagen), PE-კონიუგირებულ anti-CD32 (Immunotech) და anti-CD180 (BD Pharmagen), და იზოტიპურ კონტროლებს FITC-თაგვის IgG1 და PE-თაგვის IgG1 (ორივე - BD Pharmingen). უჯრედებს ვაინკუბირებდით 40 წთ 4°C ტემპერატურაზე, ვრეცხავდით ორჯერ PBS/BSA ხსნარით და ნალექის ვასუსპენდებდით 1% პარაფორმალდეჰიდის ხსნარში. ნიმუშებს ვაანალიზებდით გამდინარე ციტომეტრში.ფენოტიპირების შედეგების ანალიზს ვაწარმოებდით WinMDI 2.0 პროგრამის საშუალებით. ანალიზის დროს, უჯრედების ზომის და გრანულარობის ხარისხის მიხედვით ვარჩევდით ლიმფოციტების სიცოცხლისუნარიან პოპულაციას (ნახატი 2.1) და ამ პოპულაციისათვის ვნახულობდით სათანადო ზედაპირული მარკერის ექსპრესიის დონეს.



**ნახატი 2.1** უჯრედების განაწილება ზომის და გრანულარობის მიხედვით.

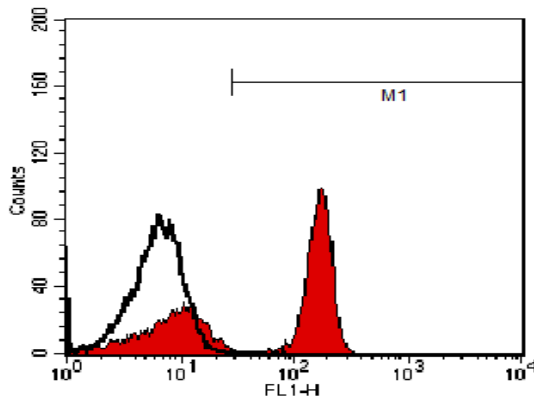
X-ღერძი - უჯრედების ზომა;

Y-ღერძი - უჯრედების გრანულარობა

წითელი ფერის პოპულაცია - სიცოცხლისუნარიანი ლიმფოციტები; მწვანე ფერის პოპულაცია -- მონოციტები; ლურჯი ფერით პოპულაცია - მკვდარი უჯრედები;

შავი ფერით პოპულაცია - დარჩენილი ერთროციტები, მემბრანების ნახლეჩები.

შედეგები გამოისახებოდა ჰისტოგრამების სახით, სადაც ფლუორესცენციის ინტენსივობა (X ღერძი) შეფარდებული იყო უჯრედების რიცხვთან (Y ღერძი) (ნახატი 2.2). ყოველი ნიმუშისათვის ვსაზღვრავდით მარკერის მაექსპრესირებელი უჯრედების პროცენტს უჯრედების საერთო პოპულაციაში. ზედაპირული მარკერების სიმკვრივის დასადგენად, ვიყენებდით დაკავშირებული მკა საშუალო ფლუორესცენციის ინტენსივობას (ფსი), რომელსაც ვსაზღვრავდით იმუნოფლუორესცენტული მიკრობურთულები (standart immunofluorecent microbeads, Becton&Dickinson) დახმარებით. ჰისტოგრამების საშუალებით პროცენტული შედგენილობის დასადგენად ვხმარობდით M1 - მარკერს, დაყენებულს იზოტიპური კონტროლის მიხედვით (ნახატი 2.2).



Gate: G1		Gated Events: 15081		
Total Events: 50000		X Parameter: FL2-H CD19 PE (Log)		
Marker	Left, Right	Events	% Gated	Mean
All	1, 9910	15081	100.00	31.81
M1	2, 9910	12344	81.85	38.61

**ნახატი 2.2.** ზედაპირული მარკერის ექსპრესიის გამოსახულება ჰისტოგრამის სახით.

X-ღერძი – ფლუორესცენციის ინტენსივობა;

Y-ღერძი – უჯრედების რიცხი;

შავი ხაზით აღნიშნულია იზოტიპური კონტროლის კონტური.

გვერდით ტაბულაში ნაჩვენებია მარკერის მიხედვით ავტომატურად გამოთვლილი პროცენტული მაჩვენებელი (Gated%) და MFI-ს (ფსი) მნიშვნელობა (Mean).

### ***B-ქლოლ ლეიკემიური უჯრედების გამოყოფა***

ლიმფოციტების ფრაქციას კონცენტრაციით  $4 \times 10^6$  უჯრედი/მლ, ვუმატებდით 500 მკლ ანტი-CD8 და 500 მკლ ანტი-CD4 მკა (BD Pharmingen) და ვაინკუბირებდით 45წთ-ის განმავლობაში 4°C. ინკუბაციის პარალელურად ვრეცხავდით თხის ანტი-თაგვური ანტისხეულებით დაფარულ 300 მკლ მაგნიტურ ბურთულებს (Dynal) 3-ჯერ 2 მლ არე RPMI-1640 (1 წთ ვაჩერებდით მაგნიტზე) და ვინახავდით მაცივარში.

უჯრედებს 2-ჯერ ვრეცხავდით ანტისხეულებისგან 5 მლ არე RPMI-1640 და ვასუსპენირებდით არე RPMI-1640, ვამატებდით გარეცხილ ბურთულებს, კვლავ კარგად ვასუსპენდებდით, რის შემდეგ ვაინკუბირებდით 45 წთ-ის განმავლობაში 4°C მუდმივი ბრუნვის პირობებში. ინკუბაციის შემდეგ ვაჩერებდით 3 წთ მაგნიტზე, ვაშორებდით სუპერნატანტს და მას 2-ჯერ ვრეცხავდით 5 მლ არე RPMI-1640 ცენტრიფუგირებით 1500 ბრუნვი, 4°C. უჯრედებს ვითვლიდით ჰემაციტომეტრში. გარეცხილ უჯრედებს ვაცილებდით სუპერნატანტს და ვასუსპენდებდით 1 მლ არეში.

### ***B-ქლოლ უჯრედების მონიშვნა ფლუორესცენტული საღებავით***

უჯრედთა ნალექს ვუმატებდით 1 მლ Diluent C (Sigma) და ვასუსპენდებდით 25°C. პარალელურად 996 მკლ Diluent C ვუმატებდით 4მკლ Red Fluorescent Linker (RFL, PKH26, Sigma) საღებავს, კარგად ვურევდით 25°C. 1 მლ საღებავს ვუმატებთ 1 მლ უჯრედულ სუსპენზიას და კარგად ვურევდით 2-5წთ-ის განმავლობაში. რეაქციის გასაჩერებლად ვუმატებდით 2მლ ხბოს ემბრიონულ შრატს და ვაზავებდით 4მლ არე

RPMI-1640-ით, შემდეგ ვაცენტრიფუგებდით 1500 ბრუნზე, 4°C, 10 წთ-ის განმავლობაში. უჯრედებს ვრეცხავდით 10მლ არე RPMI-1640 ცენტრიფუგირებით 1500 ბრუნ, 4°C, 10წთ. უჯრედები გადაგვქონდა ახალ სინჯარაში და ვრეცხავდით არე RPMI-1640-ში კიდევ ორჯერ ზედმეტი (დაუკავშირებელი) საღებავის სრული მოცილების მიზნით. უჯრედებს ვასუსპენდებდით 1მლ არე RPMI-1640-ში და ამ სუსპენზიის 10 მკლ-ს, ვუმატებდით 200 მკლ ფოსფატურ ბუფერს და ვამოწმებდით შეღებვის ხარისხს გამდინარე ციტომეტრიის მეშვეობით. B-ქლლ ლეიკემიურ უჯრედთა კონცენტრაცია მიგვყავდა  $4 \times 10^6$  უჯრედი/მლ.

### ***ნეიტროფილების მიერ ლეიკემიური უჯრედების მიმაგრება/ინტერნალიზაცია***

გასუფთავებული ნეიტროფილებისა და წეთელი საღებავით მონიშნული B-ქლლ ლეიკემიური უჯრედების თანაინკუბაციას ვაწარმოებდით 4სთ და 24 სთ-ის განმავლობაში ბისპეციფიური ანტისხეულის ანტი-CD64/ანტი-CD19 (ბსას, MEDAREX, USA) 2 მკგ/მლ კონცენტრაციის თანაობისას ან ბსას გარეშე (კონტროლი). უჯრედებს ორჯერ ვრეცხავდით არე RPMI-1640-ში, 1000 ბრუნ, 10წთ, 4°C და ნეიტროფილების მიერ ლეიკემიური უჯრედების მიმაგრება/ინტერნალიზაციას ვსაზღვრავდით გამდინარე ციტომეტრში (Beckton&Dincinson). ნეიტროფილების პოპულაციაში ვითვლიდით იმ ნეიტროფილთა რაოდენობას, რომელთაც დაკავშირებული ჰქონდათ RFL<sup>+</sup> წითელი ქლლ უჯრედები, მინიმუმ 20 000 ნეიტროფილზე.

### ***MEC1 უჯრედული კულტურა***

ეს უჯრედული ხაზი მიღებულია საჩუქრად უესტმისტერის უნივერსიტეტიდან (დიდი ბრიტანეთი). უჯრედებს ვასუსპენდებდით არე RPMI-1640-ში, რომელიც შეიცავდა 10% ინაქტივირებულ ხბოს ემბრიონალურ შრატს, 200U/მლ პენიცილინს, 100 გ/მლ სტრეპტომიცინს, L-გლუტამინს (ყველა - Gibco). უჯრედების კონცენტრაცია მიგვყავდა  $1 \times 10^6$ /მლ-ში, და მათ ვათავსებდით 200 მლ/ლ კულტურალურ ბოთლებში 37°C-ზე, 5% CO<sub>2</sub>-ის ატმოსფეროში. ბოთლში სითხის რაოდენობა შეადგენდა 35მლ-ს. გადათესვას 6 დღიანი ექსპერიმენტების დროს ვაწარმოებდით 144 საათზე. გადათესვისას უჯრედების კონცენტრაცია მიგვყავდა  $0.5 \times 10^6$ /მლ 37°C-მდე გამთბარ არეში. კულტურის ზრდის მონიტორინგისთვის ყოველ 24 საათში ჰემოციტომეტრში (Sigma) ვითვლიდით უჯრედების საერთო რაოდენობას, როგორც ზემოთ არის აღწერილი.

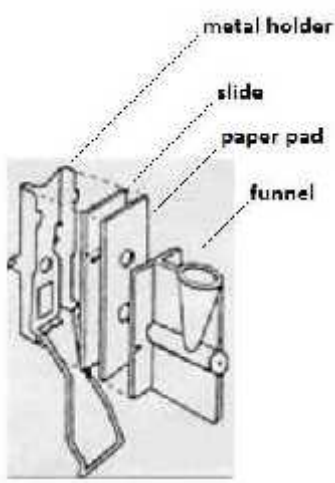
### ***უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის შემოწმება***

სიცოცხლისუნარიანობის შემოწმების მიზნით უჯრედებს კულტურიდან ამოღებისას ვღებავდით ტრიპანის ლურჯის 18%-ანი ხსნარით (Sigma), პროპორციით 20 მკლ ტრიპანის ლურჯის/20 მკლ უჯრედების სუსპენზიაზე. მიკროსკოპში X400 გადიდებაზე ჰემოციტომეტრში ვითვლიდით შეღებილი უჯრედების რაოდენობას კამერის ოთხივე კუთხის დიდ კვადრატში (მინიმუმ 100 უჯრედზე). ნეკროზული

უჯრედების გამოთვლას ვაკეთებდით ფორმულით: შეღებილი უჯრედების რაოდენობა/უჯრედების საერთო რაოდენობა x 100%.

**პრეპარატების მიღება ციტოცენტრიფუგირების გზით**

უჯრედების კონცენტრაცია მიგვყავდა  $2 \times 10^6$ /მლ-მდე, 100 მკლ უჯრედების სუსპენზია გადაგვქონდა ციტოცენტრიფუგას (Shandon Cytospin 2) კიუვეტებში. კიუვეტა შედგებოდა სასაგნე მინისგან (slide), მეტალის დამჭერისგან (metal holder), ძაბრისგან (funnel) და ქაღალდის ფილტრისგან (paper pad, ნახატი 2.3). სუსპენზიას ვამატებდით ცენტრიფუგაში ჩამდგარი კიუვეტის ძაბრში. ციტოცენტრიფუგას ვაყენებდით 5 წუთზე, 600(RPM) ბრუნვის სიჩქარეზე. ცენტრიფუგირების შემდეგ სასაგნე მინაზე დალექვის გზით მიღებულ პრეპარატს ვაფიქსირებდით ძმარმჟავა-ეთანოლის (3:1) ფიქსატორით 10 წუთის განმავლობაში, ვავლებდით გამოხდილი წყლით და ვაშრობდით ჰაერზე.



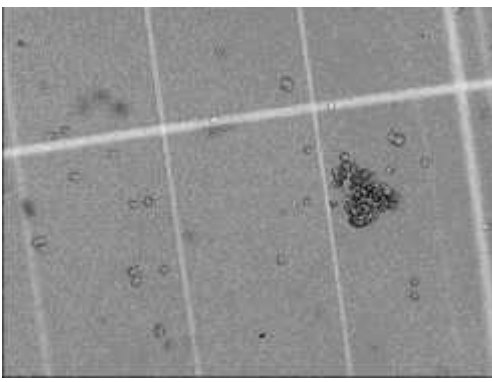
პრეპარატის შესაღებად ვიყენებდით გიმზა-რომანოვსკის საღებავს განზავებით 1:20 დისტილირებულ წყალში. პრეპარატებს ვღებავდით 5-7 წუთის განმავლობაში, რის შემდეგ ვრეცხავდით ჯერ გამდინარე და მერე გამოხდილი წყლით და ვაშრობდით ჰაერზე.

**ნახატი 2.3.** ციტოცენტრიფუგის კიუვეტის სქემატური გამოსახულება: მეტალის დამჭერი(metal holder), სასაგნე მინა (slide), ქაღალდის ფილტრი (paper pad), ძაბრი (funnel).

**მიტოზური ინდექსის განსაზღვრა**

მიტოზური ინდექსის (MI) დასათვლელად მიკროსკოპში  $\times 1,000$  გადიდებაზე ვითვლიდით მიტოზური უჯრედების რაოდენობას 1000 უჯრედზე. მიტოზური უჯრედების სურათებს ვიღებდით მიკროსკოპზე მიერთებული ციფრული კამერით DP300i პროგრამული პაკეტის Minisee-ს გამოყენებით.

**MEC1 უჯრედული ხაზის ფენოტიპირება**



MEC1-სთვის დამახასიათებელი აგრეგატების წარმოქმნის გამო (სურათი 2.1).

**სურათი 2.1.** MEC1 უჯრედების აგრეგატი ჰემოციტომეტრის კამერაში. გადიდება  $\times 200$ .

ექსპერიმენტის დაწყებამდე ინკუბატორიდან გამოღების შემდეგ, უჯრედებს ვათავსებდით 20 წთ  $4^{\circ}\text{C}$ -ზე, რის შემდეგაც პიპეტირების გზით ადვილად ვღებულობდით ცალკეული უჯრედების

სუსპენზიას.

უჯრედების კონცენტრაცია სუსპენზიაში მიგვყავდა  $2 \times 10^6$  უჯრედამდე მლ-ში და გადაგვქონდა 2მლ-ან ეპენდორფებში. უჯრედებს ვაცენტრიფუგებდით 5 წუთი, 400G-ზე, 4°C-ზე. უჯრედების ნალექს ვრეცხავდით 2-ჯერ 200 მკლ 1%-ანი PBS/BSA(Sigma) და ფენოტიპირებას ვაწარმოებდით, როგორც ზემოთაა აღწერილი. შედეგების ვანალიზებდით გამდინარე ფლუორომეტრით.

### **სტატისტიკური ანალიზი**

მიღებული შედეგები გაანალიზირებული იქნა შესაბამისი სტატისტიკური მეთოდებით, საჭიროების მიხედვით:

- სტანდარტული პარამეტრული სტიუდენტის  $t$ -ტესტით;
- პირსონის კორელაციის კოეფიციენტით;
- არაპარამეტრული მან-უიტნის  $U$ -ტესტით;
- სპირმანის კორელაციის კოეფიციენტით.

$p$ -ს მნიშვნელობა  $< 0.05$  მიჩნეულ იქნა სტატისტიკურად მნიშვნელოვან და ღირებულ მაჩვენებლად.

სტატისტიკური დამუშავებისთვის და გრაფიკების აგებისთვის გამოყენებულ იქნა Microsoft Office Excel, ასევე ვისარგებლით შემდეგი ვებ-კალკულატორებით: <http://www.danielsoper.com/statcalc/calc44.aspx> (კორელაციის სარწმუნოების შეფასება Student  $t$  ტესტის მიხედვით); <http://elegans.som.vcu.edu/~leon/stats/utest.html> (მან-უიტნის  $U$ -ტესტი).

## თავი 3

### მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

#### 3.1 ქლლ მონოციტებს დაქვეითებული აქვთ ბაქტერიების ფაგოციტოზის უნარი

როგორც არაერთხელ აღვნიშნეთ ლიტერატურის მიმოხილვაში, ქლლ მიმდინარეობას ახასიათებს იმუნოდეფიციტის ჩამოყალიბება, რასაც მოჰყვება ინფექციური დაავადებების სიხშირის მომატება. ეს გამოწვეულია როგორც დაავადების მსვლელობით, ასევე მკურნალობით. ხშირად სწორედ ინფექციური გართულებები წარმოადგენენ ამ ლეიკემიის ლეტალური შედეგის მიზეზს, განსაკუთრებით აგრესიულად მიმდინარე ფორმებში. აქვე უნდა დავძინოთ, რომ საქართველოში კვლავინდებურად გამოიყენება ქლლ მკურნალობის ტრადიციული თერაპიული საშუალებები, როგორცაა COP.

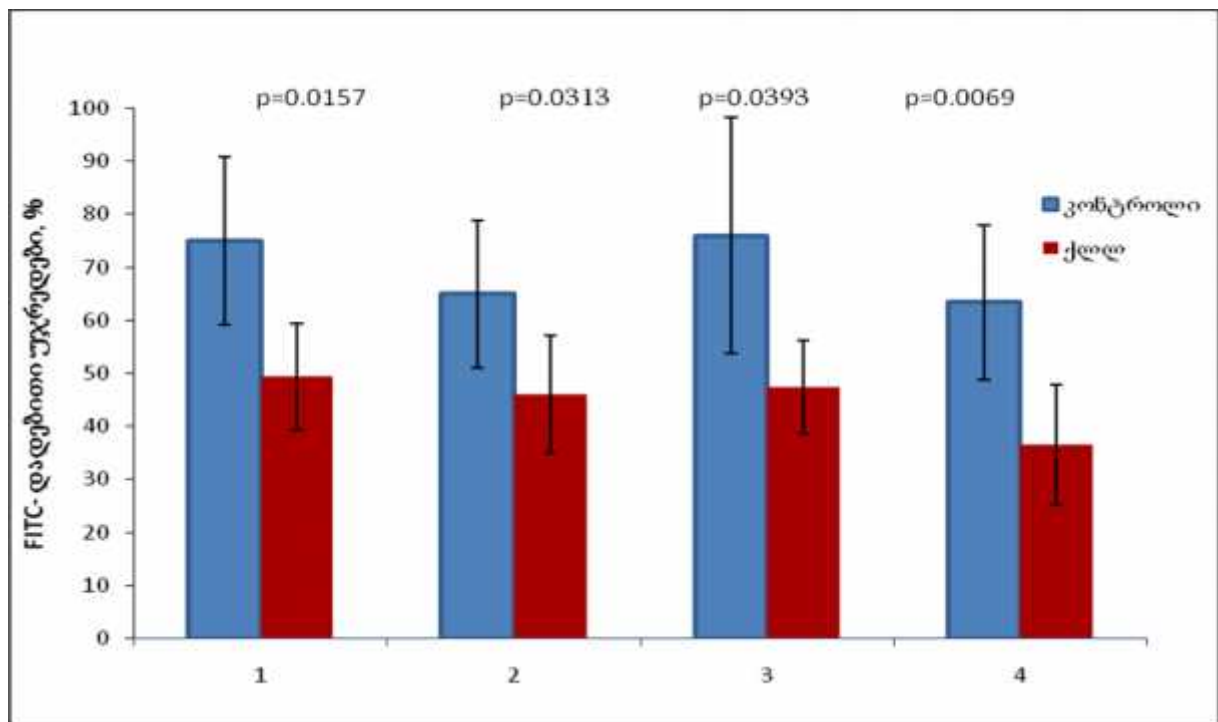
ბაქტერიული და ვირუსული ინფექციების სიხშირის მატება B-ქლლ-ით დაავადებულებში ინტერესის ფოკუსში ათავსებს მათ საწინააღმდეგო ბუნებრივი იმუნიტეტს რეაქციების - ფაგოციტოზისა და ADCC, რასაც განახორციელებენ გრანულოციტები, მონოციტ/მაკროფაგები და NK უჯრედები (Punit *et al.*, 2006). ეს რეაქციები ასევე მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ მკა-ით მკურნალობის ეფექტურობაში, ანადგურებენ რა მკა-ით ოფსონიზირებულ ლეიკემიურ უჯრედ-სამიზნეებს. მიუხედავად ამისა, ლიტერატურული მონაცემები ფაგოციტური უჯრედების ფუნქციური დარღვევების შესახებ ძალიან მწირია და შემოიფარგლება ინფორმაციით შემცირებული ქემოტაქსისის შესახებ (Itala *et al.*, 1996). ჩვენს ხელთ არ აღმოჩნდა რაიმე ინფორმაცია ქლლ-ის დროს მონოციტების ფუნქციური ცვლილებების შესახებ, რაც წარმოადგენს მოცემული ნაშრომის ერთ-ერთ მნიშვნელოვან ამოცანას.

ჩვენმა მონაცემებმა აჩვენა, რომ ქლლ პირობებში ადგილი აქვს *Staphylococcus aureus*-ის ნაწილაკების მონოციტებთან შეკავშირების უნარის სარწმუნო დაქვეითებას საკონტროლო უჯრედებთან შედარებით (გრაფიკი 3.1). ამ გრაფიკზე ნაჩვენებია ბაქტერიების შემაკავშირებელი მონოციტების პროცენტი. საინტერესოა, რომ *Staphylococcus*-ის ნაწილაკების ოფსონიზაციამ არ მოახდინა ამ შედეგებზე რაიმე გავლენა (გრაფიკი 3.1, სვეტები 1 და 3). მოსალოდნელი იყო, რომ ბაქტერიული ნაწილაკების ოფსონიზაცია ხელს შეუწყობდა მათ ადჰეზიას მონოციტების ზედაპირზე, მაგრამ ეს ჰიპოთეზა არ დამტკიცდა, რაც არაპირდაპირი გზით მიუთითებს Fc რეცეპტორების აბერანტულ აფინობას ან/და ექსპრესიაზე ქლლ მონოციტებზე, ამ საკითხს ჩვენ ქვევით განვიხილავთ.

პირადი კომუნიკაციიდან (პროფესორი ჯონ ჰოლტონი, დიდი ბრიტანეთი) ჩვენ შევიტყვეთ, რომ ტრიპანის ლურჯით ფაგოციტების დამუშავება ხელს უშლის



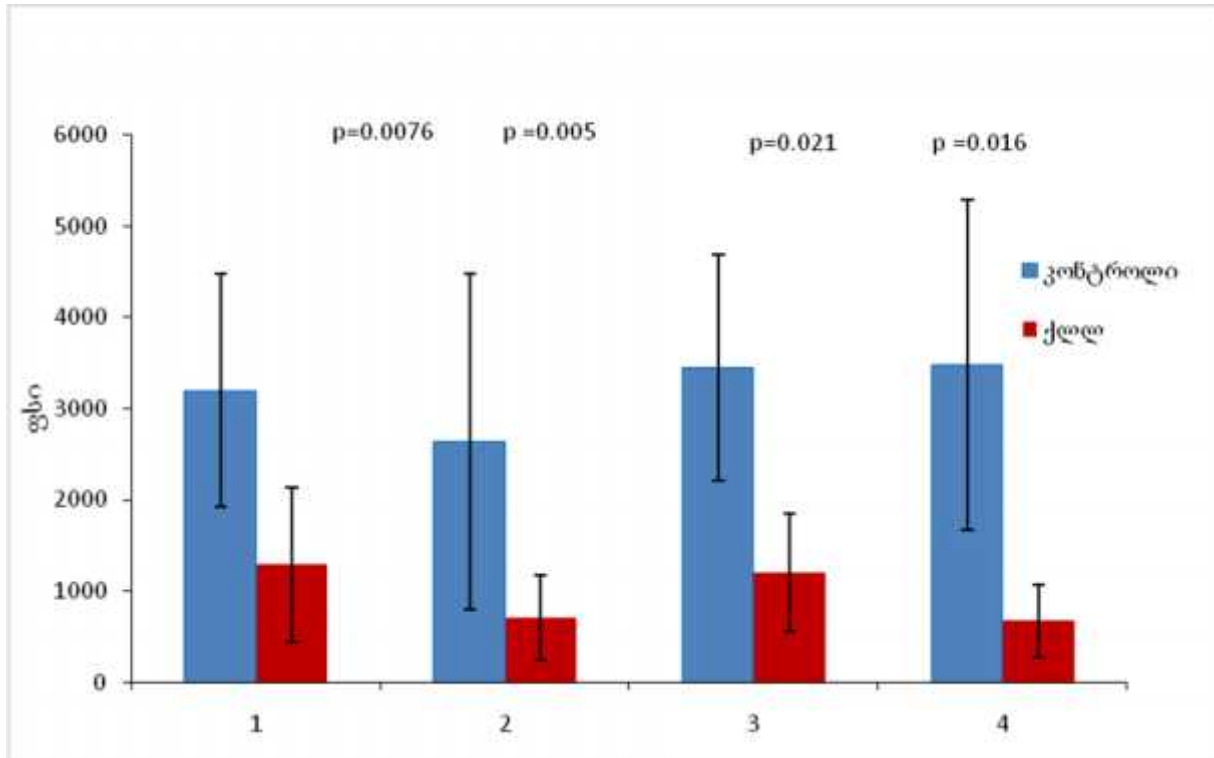
ბაქტერიების ინტერნალისაციას, მაგრამ არ მოქმედებს მათ ადჰეზიაზე. მაშასადამე, ჩვენი ჰიპოთეზის მიხედვით, ტრიპანის ლურჯით დამუშავებას უნდა მოყოლოდა ბაქტერიული ნაწილაკების ოფსონიზაციის მკვეთრი შესუსტება როგორც საკონტროლო, ასევე ქლლ მონოციტებში. მართლაც, გარკვეულწილად ტრიპანის ლურჯით მონოციტების დამუშავებამ შეაფერხა ოფსონიზირებული *S. Aureus* მონოციტების მიერ შთანთქმა, თუმცა ეს რედუქცია არ ატარებდა დრამატულ ხასიათს და არ აღმოჩნდა სარწმუნო (გრაფიკი 3.1, სვეტები 3 და 4,  $p=0.051$ ).



**გრაფიკი 3.1.** *S. aureus*-ის ნაწილაკების ფაგოციტოზი B-ქლლ პაციენტებისა ( $n=22$ ) და ჯანმრთელი პირების ( $n=15$ ) მონოციტების მიერ. სვეტები 1: ფაგოციტოზი არაოფსონიზირებული ნაწილაკების; 2: ფაგოციტოზი არაოფსონიზირებული ნაწილაკების ტრიპანის ლურჯით; 3: ფაგოციტოზი ოფსონიზირებული ნაწილაკების; 4: ფაგოციტოზი ოფსონიზირებული ნაწილაკების ტრიპანის ლურჯით; გრაფიკზე წარმოდგენილია საშუალო  $\pm$  საშუალოდან გადახრა,  $p$  გამოთვლილია არაპარამეტრული  $U$ - ტესტით.

ქლლ-ის დროს მონოციტების ფაგოციტური უნარიანობის დაქვეითება გაცილებით უფრო დრამატულად გამოიხატებოდა ფლუორესცენციის საშუალო ინტენსივობის მაჩვენებლის (ფსი - Mean Fluorescence Intensity, MFI), გამოყენებით ( გარფიკი 3.2). ფსი აჩვენებს არა იმას, თუ რამდენმა მონოციტმა შემოიერთა/შთანთქა *S. aureus* ნაწილაკები, არამედ რამდენი ნაწილაკის შთანთქმის უნარი გააჩნდა ამ მონოციტებს. როგორც ნათელია 3.2 გრაფიკიდან, ქლლ მონიციტების ეს ფუნქცია ძლიერ დაქვეითებულია, საკონტროლო მონოციტებთან შედარებით. კვლავინდებურად ტრიპანის ლურჯით მონოციტების დამუშავებამ კიდევ უფრო მეტად და სარწმუნოდ შეაფერხა

არაოფსონიზირებული (სვეტები 1 და 2,  $p=0.01$ ) და ოფსონიზირებული (სვეტები 3 და 4,  $p=0.001$ ) ბაქტერიული ნაწილაკების შთანთქმა. საინტერესოა, რომ ტრიპანის ლურჯის ეს ეფექტი გამოვლინდა მხოლოდ ქლლ, და არა საკონტროლო მონოციტების შემთხვევაში.

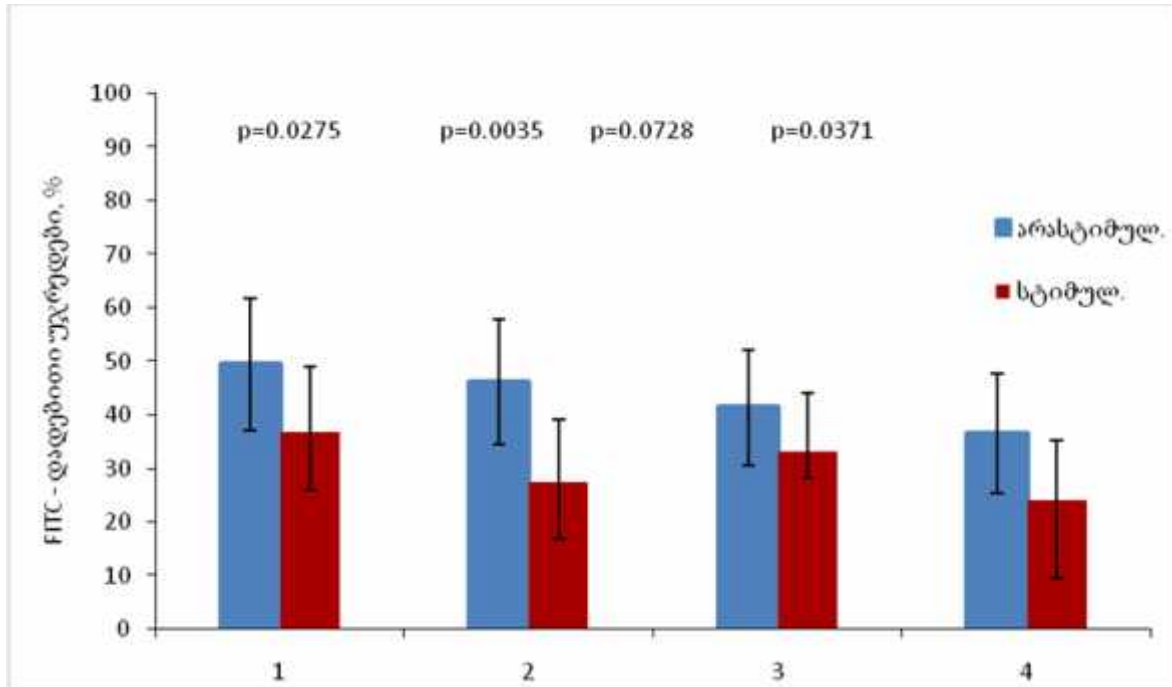


**გრაფიკი 3.2.** *S. aureus*-ის ნაწილაკების ფაგოციტოზი B-ქლლ პაციენტებისა ( $n=22$ ) და ჯამრთელი პირების ( $n=15$ ) მონოციტებზე ფლურესცენციის საშუალო ინტენსივობის (ფსი) მიხედვით. სვეტები 1: ფაგოციტოზი არაოფსონიზირებული ნაწილაკების; 2: ფაგოციტოზი არაოფსონიზირებული ნაწილაკების ტრიპანის ლურჯით; 3: ფაგოციტოზი ოფსონიზირებული ნაწილაკების; 4: ფაგოციტოზი ოფსონიზირებული ნაწილაკების ტრიპანის ლურჯით; გრაფიკზე წარმოდგენილია საშუალო±საშუალოდან გადახრა,  $p$  გამოთვლილია არაპარამეტრული  $U$ - ტესტით,  $n=22$ .

ამრიგად, ჩვენი პირველივე ექსპერიმენტებით დადგინდა რომ ქლლ დროს ადგილი აქვს მონოციტების მიერ ბაქტერიების მიერთებისა და შთანთქმის ფუნქციის მნიშვნელოვან დარღვევას.

აქედან გამომდინარე, ჩვენ დავსვით შეკითხვა, ხომ არ შეიძლება ამ ფუნქციის გაძლიერება და გაუმჯობესება კლინიკურ პრაქტიკაში მიღებული ციტოკინებით, კერძოდ კი  $IFN\gamma$ -ით და G-CSF-ით დამუშავების შედეგად. ეს ციტოკინები, განსაკუთრებით კი G-CSF, ფართოდ გამოიყენება გრანულოციტების მიერ ფაგოციტოზის გასაძლიერებლად, თუმცა მის მიმართ რეცეპტორები ექსპრესირებულია მონოციტებზეც (Roilides *et al.*, 1991; Behnen *et al.*, 2010). ჩვენსდაგასაკვირად,  $IFN\gamma$ -ით და G-CSF-ით 12სთ-მა სტიმულაციამ არამცთუ არ

გააძლიერა, არამედ კიდევ უფრო დააყინა ქლლ მონოციტების მიერ *S. aureus*-ის მიერთების და შთანთქმის უნარი, შეფასებული როგორც ფაგოციტოზში ჩართული მონოციტების პროცენტული რაოდენობით (გრაფიკი 3.3), ასევე მიერთებული და შთანთქმული ბაქტერიების რაოდენობით - ფსი საშუალებით (გრაფიკი 3.4).

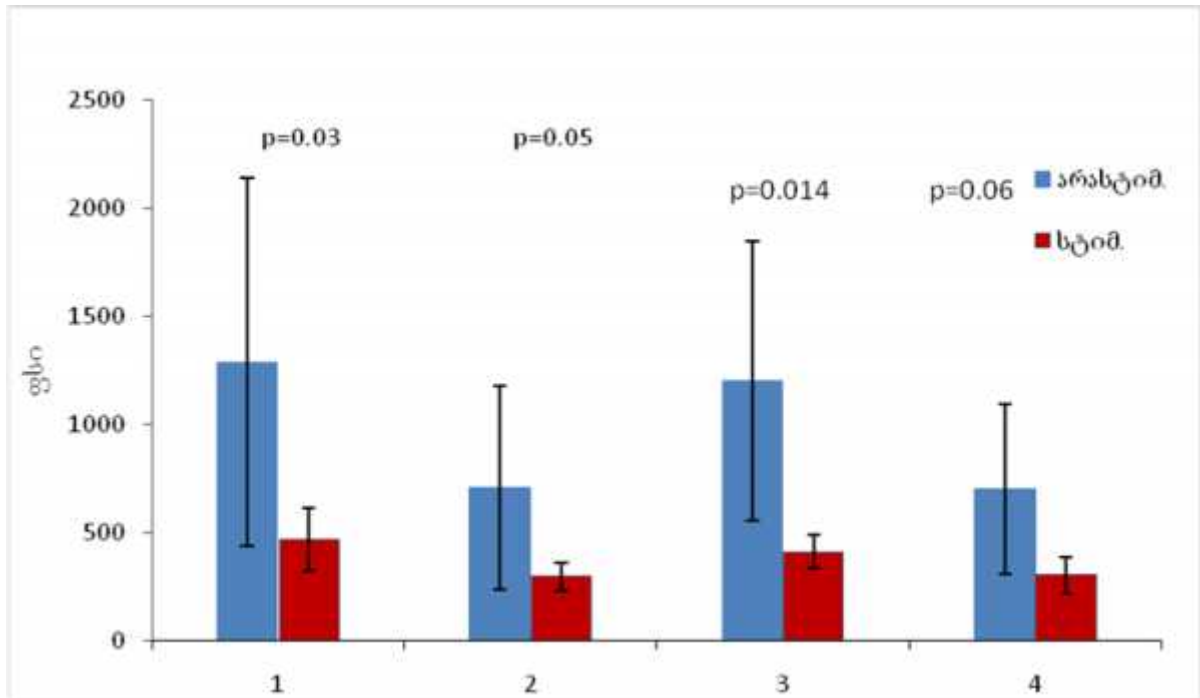


**გრაფიკი 3.3.** *S. aureus*-ის ნაწილაკების ფაგოციტოზი B-ქლლ პაციენტების IFN $\gamma$ -ით და G-CSF-ით სტიმულირებულ და არასტიმულირებული მონოციტების მიერ. სვეტები 1: ფაგოციტოზი არაოფსონიზირებული ნაწილაკების; 2: ფაგოციტოზი არაოფსონიზირებული ნაწილაკების ტრიპანის ლურჯით; 3: ფაგოციტოზი ოფსონიზირებული ნაწილაკების; 4: ფაგოციტოზი ოფსონიზირებული ნაწილაკების ტრიპანის ლურჯით. გრაფიკზე წარმოდგენილია საშუალო  $\pm$  საშუალოდან გადახრა, *p* გამოთვლილია არაპარამეტრული *U*- ტესტით, *n*=22.

საინტერესოა, რომ ტრიპანის ლურჯით დამუშავებამ გამოამჟღავნა, რომ ციტოკინებით ქლლ მონოციტების სტიმულაციის პირობებში ყველაზე უფრო დაქვეითდა სწორედ ბაქტერიების მიერთების/შთანთქმის ინტენსივობა (გრაფიკი 3.3, სვეტები 1 და 2, *p*=0.05; 3 და 4, *p*=0.047; და გრაფიკი 3.4, სვეტები 1 და 2, *p*= 0.016; 3 და 4, *p*=0.007).

IFN $\gamma$ -ით და G-CSF-ით სტიმულირებული მონოციტებით მიღებული მოულოდნელი შედეგები მეტად საინტერესოა. ის, რომ ციტოკინებით სტიმულაციისას ადგილი არ ჰქონდა ბაქტერიების ფაგოციტოზის ფუნქციის მომატებას შეიძლება ავხსნათ ქლლ პირობებში მონოციტების ფაგოციტოზის მექანიზმების დარღვევით (არაოფსონიზირებული ბაქტერიები) და Fc $\gamma$  რეცეპტორების ექსპრესიის ან/და აფინობის დაქვეითებით (ოფსონიზირებული ბაქტერიები), რადგანაც ოფსონიზაციის ანტისხეული IgG კლასს მიეკუთვნებოდა. Fc $\gamma$  რეცეპტორები იკავშირებენ რა IgG-ს,

ხელს უწყობენ ოფსონიზირებული პათოგენის ფაგოციტოზს და ელიმინაციას (Mikael *et al.*, 2001; Behnen *et al.*, 2005). ამ ჰიპოთეზას მომდევნო თავში განვიხილავთ.



**გრაფიკი 3.4.** *S. aureus*-ის ნაწილაკების ფაგოციტოზი B-ქლლ პაციენტების IFN $\gamma$ -ით და G-CSF-ით სტიმულირებული და არასტიმულირებული მონოციტების მიერ ფლურესცენციის საშუალო ინტენსივობის (ფსი) მიხედვით. 1: ფაგოციტოზი არაოფსონიზირებული ნაწილაკების; 2: ფაგოციტოზი არაოფსონიზირებული ნაწილაკების ტრიპანის ლურჯით; 3: ფაგოციტოზი ოფსონიზირებული ნაწილაკების; 4: ფაგოციტოზი არაოფსონიზირებული ნაწილაკების ტრიპანის ლურჯით; გრაფიკზე წარმოდგენილია საშუალო $\pm$ საშუალოდან გადახრა, *p* გამოთვლილია არაპარამეტრული *U*-ტესტით, *n*=22.

საინტერესო ფენომენი, რომელიც ჩვენ დავადგინეთ ექსპერიმენტების ამ სერიაში - ანუ ის რომ IFN $\gamma$ -ით და G-CSF-ით ქლლ მონოციტების სტიმულაციას მოჰყვა მათი ფაგოციტური ფუნქციის კიდევ უფრო ძლიერი დაკნინება შეიძლება აიხსნას ორი მოსაზრებით: სტიმულაციის შედეგად ქლლ მონოციტები განიცდიან (ა) ანერგიას; (ბ) აქტივაციით ინდუცირებულ უჯრედულ კვდომას (Activation induced cell death – AICD, აიუკ). ჩვენ უფრო ვიხრებით მეორე ჰიპოთეზისკენ, რადგანაც, ლიმფოციტებისგან განსხვავებით, მონოციტების ანერგია იშვიათი მოვლენაა, და იმიტომაც, რომ აიუკ წარმოადგენს საკმაოდ გავრცელებულ ფენომენს (Miranda-Garcia *et al.*, 2013).

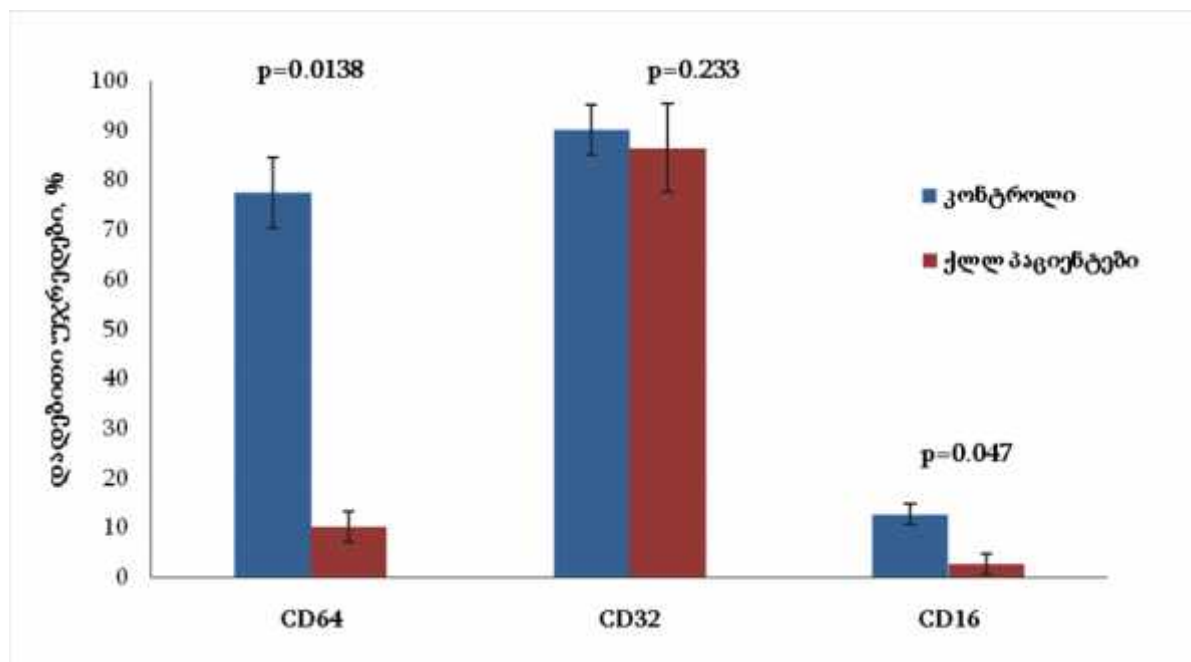
მართლაც, ციტოკინებით გამოწვეული მონოციტების აიუკ, კიდევ უფრო გააღრმავებდა *in vivo* ფაგოციტოზის ფუნქციის დაქვეითებას ქლლ პაციენტებში და შესაბამისად ანტიბაქტერიულ იმუნოდეფიციტს, რომელიც გავრცელებულია ამ ავადმყოფებში (Miranda-Garcia *et al.*, 2013). უფრო მეტიც, ჩვენმა ადრინდელმა

მონაცემებმა აჩვენეს, რომ ასეთივე რეაქცია ციტოკინებით სტიმულაციაზე გააჩნია ქლლ ნეიტროფილებსაც (Gabunia *et al.*, 2002), ანუ ლეიკემიის დროს ადგილი აქვს არა მხოლოდ ფაგოციტური უჯრედების (ნეიტროფილები და მონოციტ/მაკროფაგები) ბაქტერიების ფაგოციტოზის ფუნქციის დრამატულ დაქვეითებას, არამედ მათი აიუკ-ის მიმართ მგრძობილობის მომატებას ციტოკინური სტიმულაციის შედეგად. ეს კი იმას ნიშნავს რომ G-CSF-ით ქლლ პაციენტების მკურნალობა, რომელსაც იყენებენ ალოგენური ძვლის ტვინის გადანერგვის შემთხვევაში (Brien *et al.*, 1997), უნდა მოხდეს სიფრთხილით და იმის გათვალისწინებით, რომ მას მოყვება ანტიბაქტერიული ბუნებრივი იმუნიტეტის დეფიციტის გაღრმავება.

### 3.2 Fcγ-რეცეპტორების და CD180-ის ექსპრესია ქლლ მონოციტებზე დაქვეითებულია

Fcγ რეცეპტორები იკავშირებენ IgG-ს, რათა ფაგოციტურმა უჯრედმა ეფექტურად მოახდინოს ოფსონიზირებული პათოგენის ელიმინაცია. რამდენადაც ქლლ პაციენტებში მნიშვნელოვნად აღმოჩნდა დაქვეითებული ოფსონიზირებული ნაწილაკების მიმაგრებისა და შთანთქმის მაჩვენებელი, ჩვენ შევამოწმეთ მონოციტების მიერ სხვადასხვა აფინობის მქონე Fcγ რეცეპტორების ექსპრესია ქლლ დაავადებულებში, ანუ მაღალაფინური Fcγ რეცეპტორი I (CD64), Fcγ რეცეპტორი II (CD32) და დაბალაფინური Fcγ რეცეპტორი III (CD16).

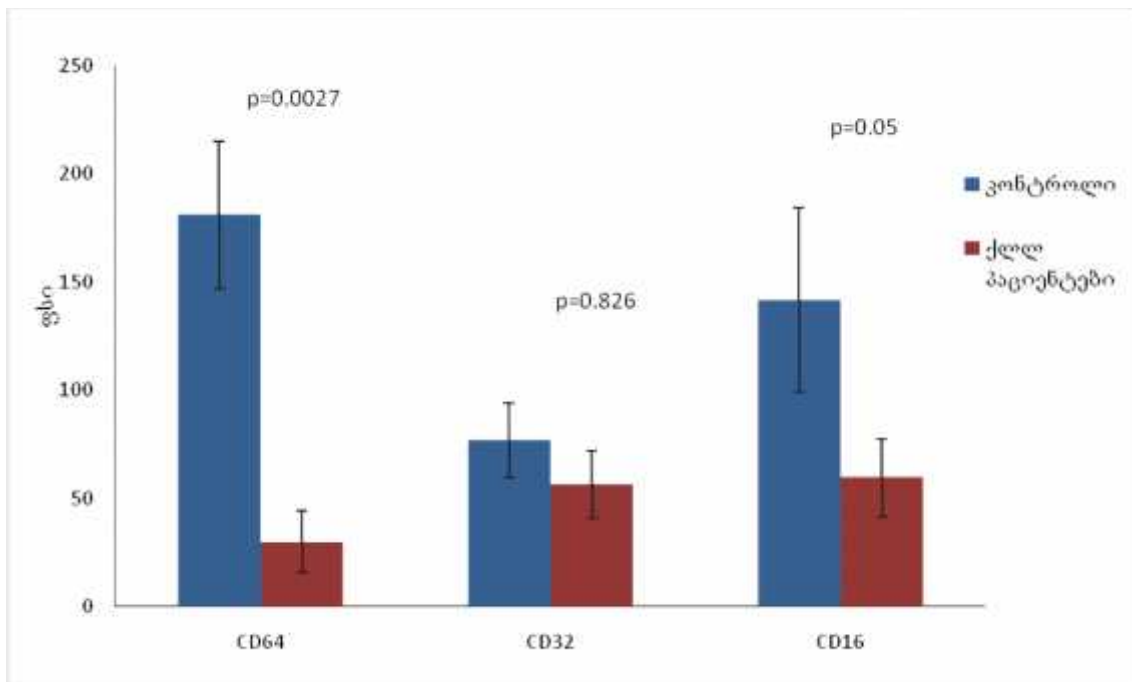
ჩვენი შედეგების თანახმად, CD64 და CD16 მაექსპრესირებელი მონოციტების პროცენტი B-ქლლ დროს მკვეთრად არის შემცირებული, საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით, ხოლო CD32<sup>+</sup> მონოციტების პროცენტული მაჩვენებელი B-ქლლ და ჯანმრთელ პირებში არ განსხვავდებოდა (გრაფიკი 3.5).



გრაფიკი 3.5. CD64, CD32 და CD16 რეცეპტორების ექსპრესიის პროცენტული მაჩვენებელი B-ქლლ-ით დაავადებული (n=35) და ჯანმრთელი პირების (n=15)

მონოციტებზე. გრაფიკზე წარმოდგენილია საშუალო  $\pm$  საშუალოდან გადახრა,  $p$  გამოთვლილია არაპარამეტრული  $U$ -ტესტით.

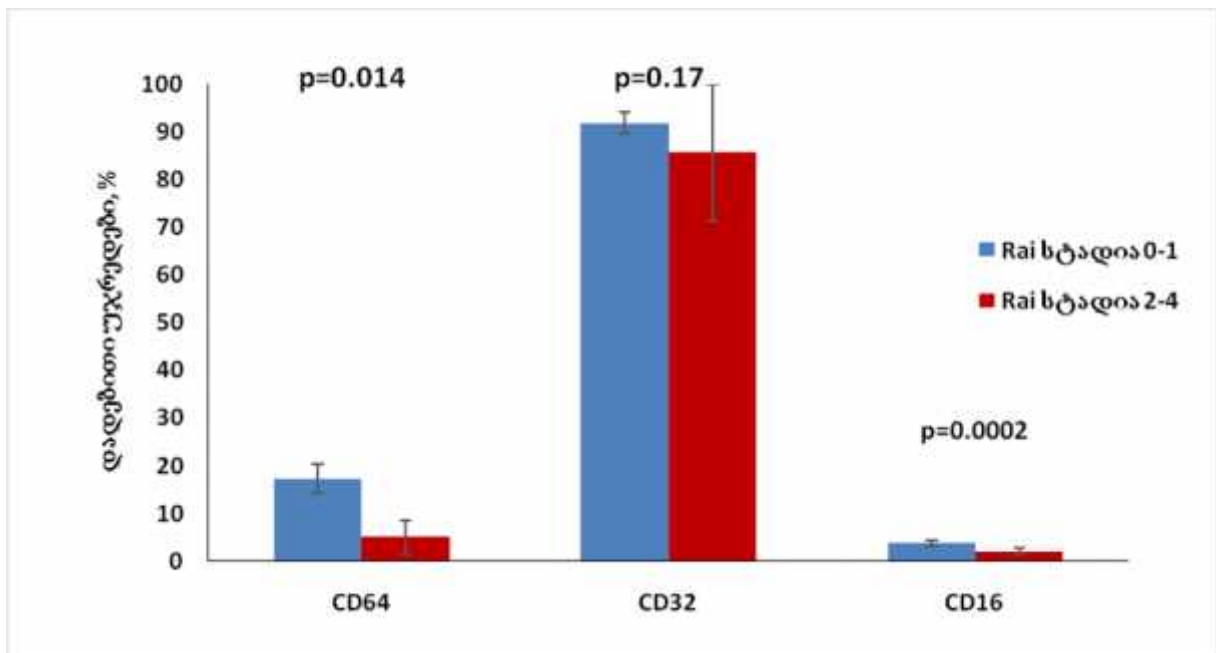
მონოციტების მიერ CD64, CD32 და CD16 ექსპრესიის დონე შეიძლება განისაზღვროს ამა თუ იმ რეცეპტორის სიმკვრივით მემბრანაზე, რომელსაც არაპირდაპირი გზით გამოსახავს ფლუორესცენციის საშუალო ინტენსივობის მაჩვენებელი, ფსი. ფსი-ს გამოყენებამ დაადასტურა უკვე მიღებული შედეგები პროცენტული შედგენილობის შესახებ (გრაფიკი 3.6). კერძოდ, CD64 და CD16 რეცეპტორების ექსპრესიის დაქვეითება მონოციტების ზედაპირზე, კონტროლთან შედარებით, მაშინ როდესაც CD32-ის მემბრანული სიმკვრივის მიხედვით საკონტროლო და ქლლ მონოციტები ერთმანეთისგან არ განსხვავდებოდნენ.



**გრაფიკი 3.6.** CD64, CD32 და CD16 რეცეპტორების ექსპრესია ფლუორესცენციის საშუალო ინტენსივობის (ფსი) მიხედვით B-ქლლ-ით დაავადებულ ( $n=35$ ) და ჯანმრთელი პირების ( $n=15$ ) მონოციტებზე. გრაფიკზე წარმოდგენილია საშუალო  $\pm$  საშუალოდან გადახრა,  $p$  გამოთვლილია არაპარამეტრული  $U$ -ტესტით.

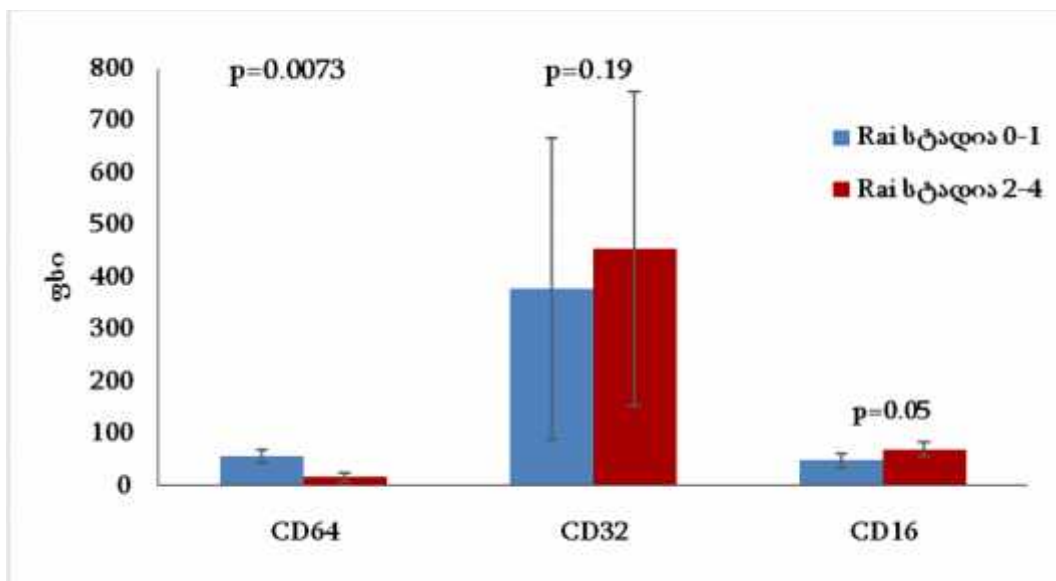
ამრიგად დადგენილად შეიძლება ჩაითვალოს, რომ CD64 და CD16 ექსპრესია ქლლ მონოციტებზე მკვეთრად არის დაქვეითებული, კონტროლთან შედარებით. ეს გამოკვლევა ჩატარდა ჩვენთვის მოწოდებული ყველა ქლლ პაციენტის სისხლზე. ამიტომ ჩვენ დავინტერესდით იმით, თუ აღმოჩენილი ცვლილებები კორელირებდა დაავადების სტადიასთან. ამისათვის გამოვიკვლიე  $Fc\gamma$  რეცეპტორების CD64, CD32 და CD16-ის ექსპრესია არანამკურნალები პაციენტების დაავადების ადრეულ (Rai 0-1) და გვიან (Rai 2-4) სტადიებზე (პირველადი დიაგნოსტიკა). მიღებულმა შედეგებმა (გრაფიკი 3.7) აჩვენა, რომ CD64 და CD16-ის ექსპრესიის დეფიციტი ქლლ მონოციტებზე სარწმუნოდ ღრმავდება დაავადების სტადიასთან ერთად, მაგრამ CD32

ექსპრესია კვლავინდებურად სტაბილურია, თუმცა მატულობს მისი ექსპრესიის ჰეტეროგენულობა, რაც აისახება სტანდარტული გადახრის ზრდაში (გრაფიკი 3.7).



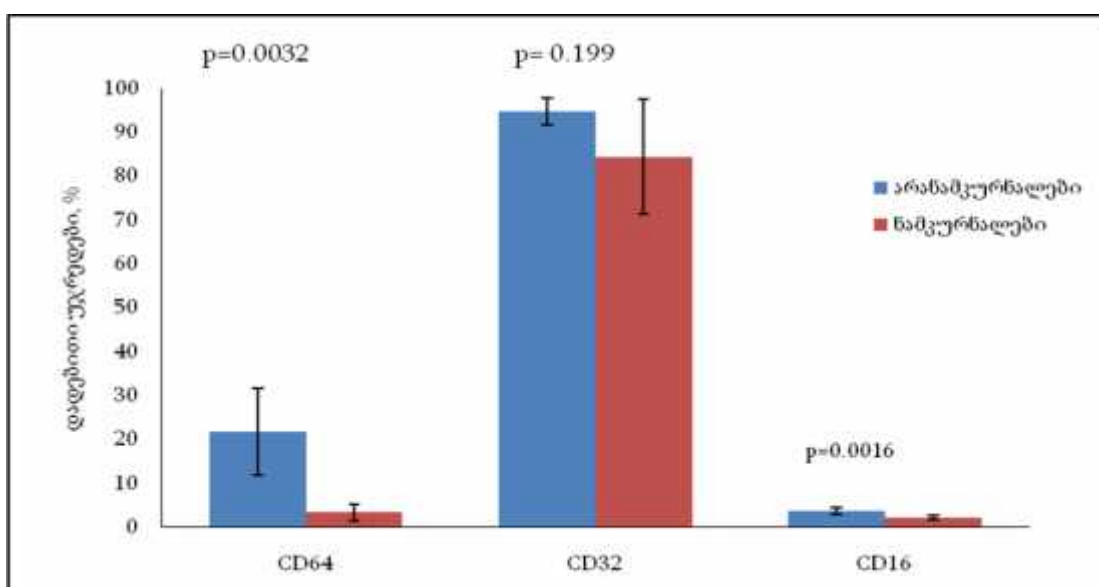
**გრაფიკი 3.7.** ქლლ პაციენტების პერიფერიული სისხლის მონოციტებზე CD64, CD32 და CD16-ის ექსპრესია დაავადების სხვადასხვა სტადიაზე, გამოხატული მაექსპრესირებელი უჯრედების პროცენტით. გრაფიკზე წარმოდგენილია საშუალო ± საშუალოდან გადახრა, *p* გამოთვლილია არაპარამეტრული *U*-ტესტით, *n*=15 და 20.

CD64, CD32 და CD16-ის ექსპრესიის სიმკვრივის გამოთვლისას მონოციტების უჯრედულ მემბრანაზე (ფსი ინდექსი-შეკავშირებული ანტისხეულის ჯამური ფლუორესცენცია) გაირკვა საინტერესო ფაქტი: მაშინ როდესაც CD64 ექსპრესიის სიმკვრივე დაავადების სტადიასთან მცირდება პროცენტულ მაჩვენებელთან ერთად (გრაფიკი 3.8), ხოლო CD32 ექსპრესიის სიმკვრივე არ იცვლება, CD16 ექსპრესიის ფსი მაჩვენებელი ქლლ განვითარების პროცესში იზრდება. ეს კი იმას ნიშნავს, რომ თუმცა ქლლ პროგრესირებასთან ერთად CD16 მაექსპრესირებელი მონოციტების პროცენტი მცირდება, ისინი ატარებენ უფრო მეტ მემბრანულ CD16 მოლეკულას. ვინაიდან CD16 მიეკუთვნება დაბალაფინურ Fcγ რეცეპტორებს (Maffei *et al.*, 2013), ჩვენ შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ქლლ პროგრესირებასთან ერთად ადგილი აქვს მაღალაფინური Fcγ რეცეპტორის (CD64) მატარებლობის ჩანაცვლებას დაბალაფინური (CD16) Fcγ რეცეპტორით. ამან კი არ შეიძლება არ გამოიწვიოს ოფსონიზირებული სამიზნეების შეკავშირების აფინობის დაცემა, რასაც ნეგატიური გავლენა ექნება როგორც ბუნებრივ იმუნურ პასუხზე ოფსონიზირებული ბაქტერიების წინააღმდეგ, ასევე თერაპიული მკა-ით ოფსონიზირებული აუტოლოგიური ლეიკემიური უჯრედების შემოჭვასა და შთანთქმაზე, ანუ თერაპიული მკა გამოყენების ეფექტურობა იქ, სადაც ეს შეეხება ფაგოციტების აქტივაციას, უნდა მცირდებოდეს ქლლ პროგრესირებასთან ერთად.



**გრაფიკი 3.8.** ქლლ პაციენტების პერიფერიული სისხლის მონოციტებზე CD64, CD32 და CD16-ის ექსპრესია დაავადების სხვადასხვა სტადიაზე (ფლოუორესცენციის საშუალო ინტენსივობა, ფსი). გრაფიკზე წარმოდგენილია საშუალო  $\pm$  საშუალოდან გადახრა,  $p$  გამოთვლილია არაპარამეტრული  $U$ -ტესტით,  $n=15$  და  $20$ .

როგორც ეს აღინიშნა ლიტერატურ მიმოხილვაში, გვიან სტადიაზე (2-4) ქლლ დიაგნოზი საქართველოში უმეტეს შემთხვევაში ნიშნავს მკურნალობის დაწყებას. ამიტომ აუცილებლად ჩავთვალეთ შეგვემოწმებინა  $Fc\gamma$  რეცეპტორების ექსპრესია არანამკურნალებ და ნამკურნალებ პაციენტებზე. მკურნალობა მიმდინარეობდა COP-ით. როგორც მოველოდით, მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ ქლლ პაციენტების მკურნალობას მოჰყვა CD64 და CD16-ის ექსპრესიის უკიდურესი შემცირება ქლლ მონოციტებზე CD32 მატარებელი მონოციტების უცვლელ ფონზე (გრაფიკი 3.9).

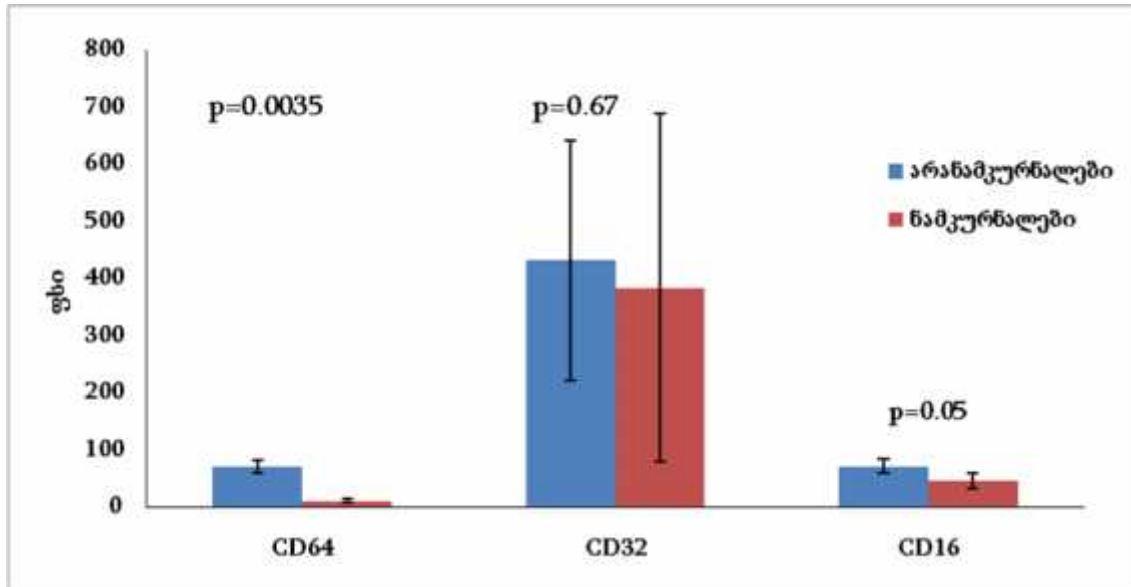


**გრაფიკი 3.9.** B-ქლლ-ით დაავადებულ ნამკურნალები ( $n=17$ ) და არანამკურნალები ( $n=18$ ) პაციენტების პერიფერიული სისხლის მონოციტებზე CD64, CD32 და CD16



რეცეპტორების ექსპრესია. გრაფიკზე წარმოდგენილია საშუალო  $\pm$  საშუალოდან გადახრა,  $p$  გამოთვლილია არაპარამეტრული  $U$ - ტესტით.

ეს შედეგები მთლიანად დამტკიცდა ფსი მაჩვენებლის ანალიზის გამოყენებისას (გრაფიკი 3.10)



გრაფიკი 3.10. B-ქლლ-ით დაავადებულ ნამკურნალები (n=17) და არანამკურნალები (n=18) პაციენტების პერიფერიული სისხლის მონოციტებზე CD64, CD32 და CD16 რეცეპტორების ექსპრესია ფლურესცენციის საშუალო ინტენსივობის (ფსი) მიხედვით. გრაფიკზე წარმოდგენილია საშუალო  $\pm$  საშუალოდან გადახრა,  $p$  გამოთვლილია არაპარამეტრული  $U$ - ტესტით.

გამოკვლევების ამ სერიის შედეგად შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ქლლ მონოციტებზე ადგილი აქვს CD16 და, განსაკუთრებით, CD64 მაღალაფინური Fc $\gamma$  რეცეპტორების ექსპრესიის მკვეთრ დეფიციტს, რომელიც ღრმავდება დაავადების პროგრესირების პროცესში და უკიდურესად მჟღავნდება ქლლ მკურნალობის შედეგად ტრადიციული თერაპიის გამოყენებით - COP-ით (Tsertsvadze *et al.*, 2015). ვინაიდან სამუშაო ტარდებოდა საქართველოში, მკურნალობის სხვა, თანამედროვე, საშუალებები განხილული არ იყო. ჩვენ ამ კუთხით ვაპირებთ სამუშაოს გაგრძელებას საერთაშორისო კონსორციუმის ფარგლებში. აშკარაა, რომ ქლლ მონოციტების მიერ IgG1 კლასის ანტისხეულებით ოფსონიზირებული *S. aureus* ნაწილაკების მიერთების/შთანთქმის დაქვეითება, რომელზედაც ზემოთ ვისაუბრე გამოწვეულია, ნაწილობრივ მაინც, Fc $\gamma$ RI (CD64) მკვეთრი დეფიციტით. ამავდროულად, ისიც არის გასათვალისწინებელი, რომ Fc $\gamma$ RI და Fc $\gamma$ RII-ით გაშუალებული ფაგოციტოზი სინერგისტულია, და მასში ორივე რეცეპტორი დებულობს მონაწილეობას (Masuda *et al.*, 1993; Ross *et al.*, 2002). CD32 ექსპრესია კი ჩვენს ექსპერიმენტებში განსაკუთრებული სტაბილობით ხასიათდებოდა, თუმცა ქლლ პროგრესირებასთან და მკურნალობასთან ერთად იზრდებოდა მისი ექსპრესიის ჰეტეროგენულობა ინდივიდუალურ

პაციენტებში, ანუ ზოგი მათგანის მონოციტი კარგავდა CD32 მაღალი ექსპრესიის უნარს (Tsertsvadze *et al.*, 2015).

საინტერესოა CD64 დეფიციტის შესაძლო მიზეზები. CD64-ის დაბალი ექსპრესია B-ქლლ-ით დაავადებული პაციენტების მონოციტებზე შეიძლება დაკავშირებული იყოს ჭარბი IL-4-ის წარმოქმნასთან B-ქლლ უჯრედების მიერ, რომელთათვის ეს ციტოკინი გადარჩენის ძლიერ ფაქტორს წარმოადგენს (Mainou-Fowler *et al.*, 2001). B-ქლლ-ის დროს ასევე იმატებს Th2 სუბპოპულაციის წილი, რომლებიც პასუხისმგებელია IL-4-ის სინთეზზე (Rossmann *et al.*, 2002; 2003). ეს ციტოკინი ერთი მხრივ განაპირობებს Bcl-2 გენების ექსპრესიას და ხელს უწყობს ნეოპლასტიური უჯრედების მიერ აპოპტოზისაგან თავის არიდებას, მეორეს მხრივ კი, დამრთავუნველად მოქმედებს FcγR-ების ექსპრესიაზე (Mitchell *et al.*, 2014). ადრე ნაჩვენები იქნა რომ IL-4 აქვეითებს CD64-ის ექსპრესიას ნორმალურ მონოციტებზე (GarciaGarcia *et al.*, 2002).

მნიშვნელოვნად მიგვაჩნია ჩვენს მიერ დადგენილი ფაქტი ქლლ პროგრესირების პირობებში მაღალაფინური CD64 რეცეპტორის დაბალაფინურ CD16 რეცეპტორით ჩანაცვლების შესახებ, რაც მოითხოვს შემდგომ კვლევას. ცნობილია, რომ FcγRIII (CD16) მცირე რაოდენობით ექსპრესირდება ახალგაზრდა მონოციტებზე, ხოლო მაკროფაგებზე FcγRIII-ს ექსპრესია უფრო მაღალია (Soehnlein *et al.*, 2010). მონოციტებზე CD16 სიმკვრივის ზრდის ერთ-ერთი გამომწვევი ფაქტორი შეიძლება იყოს IL-10, რომლის გამომუშავება მატულობს ქლლ პირობებში. აღსანიშნავია, რომ IL-10 იმავდროულად იწვევს მონოციტების აპოპტოზსაც (Iwahashi *et al.*, 2004), რაც კარგად ხსნის ჩვენს მიერ მიღებულ შედეგებსაც - CD16<sup>+</sup> მონოციტების პროცენტული რაოდენობის შემცირებას CD16 სიმკვრივის ზრდის ფონზე. მაგრამ ეს ჰიპოთეზა შეუთავსებლობაშია ჩვენს მიერ ნაჩვენებ CD64 ექსპრესიის პარალელურ დაქვეითებასთან. საქმე იმაშია, რომ IL-10 იწვევს CD64 რეცეპტორის ექსპრესიის ზრდას (Wang *et al.*, 2001). არ არის გამორიცხული, რომ ქლლ-ის მიმდინარეობისას ჭარბად წარმოქმნილი IL-4 ციტოკინის ნეგატიური ეფექტი ანეიტრალებს IL-10-ის პოზიტიურ ზემოქმედებას CD64-ის ექსპრესიაზე.

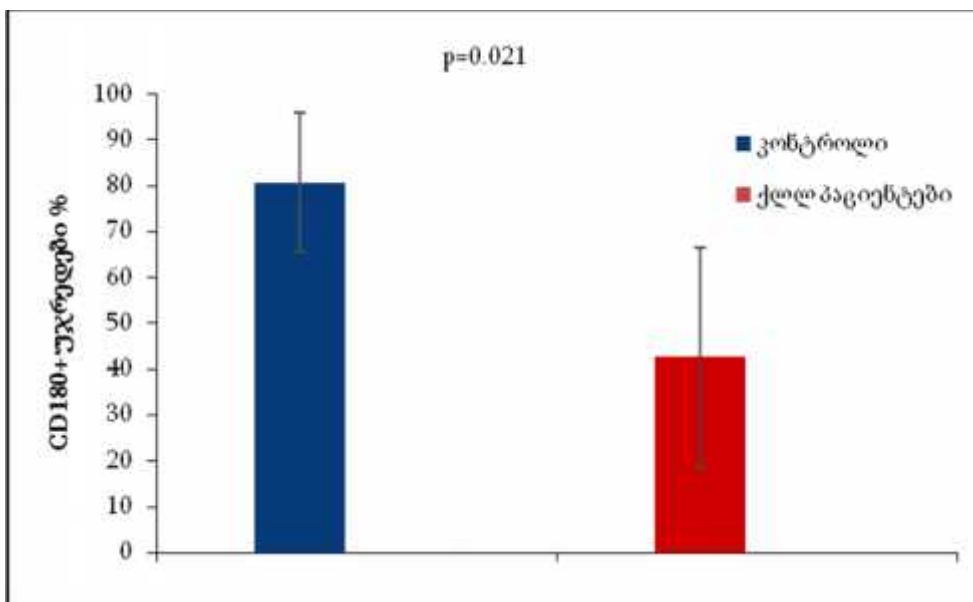
CD16<sup>+</sup> მონოციტების პროცენტული შემცირება შეიძლება გამოწვეული ყოფილიყო G-CSF და INFγ ციტოკინებით. მათმა კომბინაციამ, როგორც ზემოთ ვაჩვენეთ, გამოიწვია ოფსონიზირებული ბაქტერიების შეკავშირების/შთანთქმის მძაფრი შემცირება. საინტერესოა, რომ ჩვენი ადრინდელი გამოკვლევებით დადგინდა ქლლ დროს CD64<sup>+</sup> ნეიტროფილების რიცხვის შესამჩნევი ზრდა და ამ რეცეპტორის სიმკვრივის მატება (Gabunia *et al.*, 2002), ეს კი მიუთითებს ამ ორი მნიშვნელოვანი ფაგოციტური უჯრედის განსხვავებულ მგრძობელობაზე ციტოკინების ბადის მიმართ.

როგორც უკვე აღვნიშნეთ ნეოპლასტიური B-ქლლ ლიმფოციტები პროდუცირებენ სხვა ციტოკინებს, როგორცაა IL-6 (Moreno *et al.*, 2001), INFγ (Buschle *et al.*, 1993), TNFα (Mainou-Fowler *et al.*, 2001; Gallego *et al.*, 2003), IL-8 (Cella *et al.*, 1994; Binsky *et al.*, 2007),

IL-1, GM-CSF და G-CSF (Corcione *et al.*, 1996; Morikawa *et al.*, 2002). B-ქლლ პაციენტების შრატში ნანახია  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL-8 მომატებული კონცენტრაცია, რაც კორელირებდა ლეიკემიურ უჯრედებში შესაბამისი გენების ექსპრესიასთან (Buschle *et al.*, 1993; Gallego *et al.*, 2003; Binsky *et al.*, 2007). ყველა ეს ციტოკინი დაავადების იმუნოპათოგენეზში მნიშვნელოვან როლს ასრულებს, პარალელურად  $Fc\gamma R$  რეცეპტორების ექსპრესიაზეც მოქმედებს. ციტოკინების ამ კოქტილის ჯამური *in vivo* მოქმედების, რომელსაც ხშირად „ციტოკინების ბადის ეფექტს“ უწოდებენ, დადგენა *in vitro* გამოკვლევების ექსტრაპოლაციით ყოველთვის არაზუსტი იქნება. ჩვენი მონაცემების მიხედვით, CD32 რეცეპტორის ექსპრესია მონოციტებზე შედარებით მდგრადია ციტოკინების ჯამური ეფექტის მიმართ.

$Fc\gamma R$  რეცეპტორების გარდა, ანტიბაქტერიული ბუნებრივი იმუნური პასუხების განხორციელებაში და PAMPs გამოცნობაში მონაწილეობენ თოლ-მსგავსი რეცეპტორები (Rozkova *et al.*, 2010), მათ შორის CD180. ამ ნაშრომში ჩვენ შევისწავლეთ CD180 ექსპრესია ქლლ მონოციტებზე, იმის გამო რომ ჩვენმა ჯგუფმა ადრე აჩვენა, რომ CD180 ექსპრესია ქლლ უჯრედებზე დაქვეითებულია ნორმალურ B ლიმფოციტებთან, როგორც  $CD5^+$  ასევე  $CD5^-$ , შედარებით (Porakishvili *et al.*, 2005).

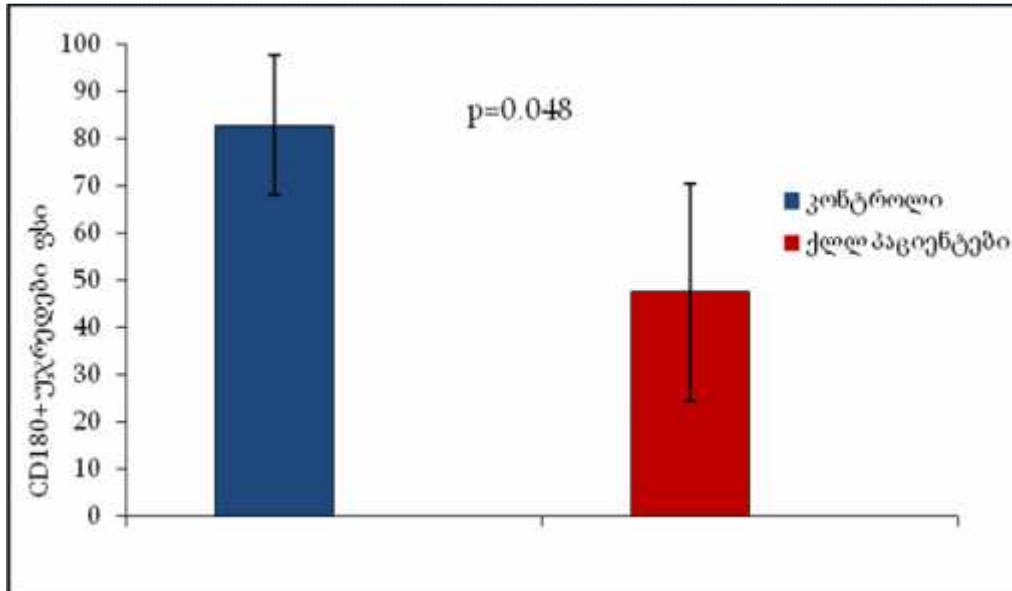
მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ ქლლ მონოციტებზე, ლეიკემიური უჯრედების მსგავსად, დაქვეითებულია CD180 ექსპრესია როგორც პროცენტული (გრაფიკი 3.11) ასევე ფსი მაჩვენებლების (გრაფიკი 3.12) გამოყენებით.



**გრაფიკი 3.11.** ქლლ პაციენტების პერიფერიული სისხლის მონოციტებზე თოლ-მსგავსი რეცეპტორის CD180-ის ექსპრესია (%). გრაფიკზე წარმოდგენილია საშუალო ± საშუალოდან გადახრა,  $p$  გამოთვლილია არაპარამეტრული  $U$ - ტესტით,  $n=38$ .

თოლ-მსგავსი რეცეპტორის ექსპრესიის დაქვეითებამ ქლლ მონოციტებზე, შესაძლოა თავისი წვლილი შეიტანა,  $Fc$ -რეცეპტორებთან ერთად, ბაქტერიების მიირთებისა და

ფაგოციტოზის დაქვეითებაში, რაც ჩვენ ზემოთ ვაჩვენეთ. ამ საკითხის დაზუსტებისთვის მომავალში საჭირო იქნება სხვა თოლ-მსგავსი რეცეპტორების მონოციტებზე ექსპრესიის დადგენა ქლლ პირობებში, განსაკუთრებით TLR4 და TLR2, რომლებიც მონაწილეობენ ანტი-ბაქტერიულ ბუნებრივ იმუნურ პასუხებში (Yu *et al.*, 2006; Shoenfelt *et al.*, 2009).

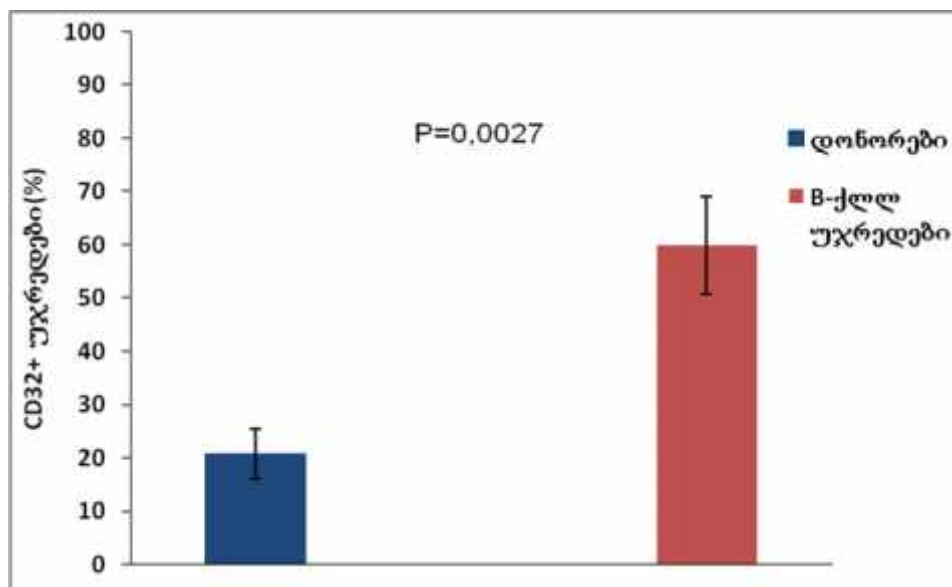


**გრაფიკი 3.12.** ქლლ პაციენტების პერიფერიული სისხლის მონოციტებზე თოლ-მსგავსი რეცეპტორის CD180-ის ექსპრესია (ფხი). გრაფიკზე წარმოდგენილია საშუალო ± საშუალოდან გადახრა, *p* გამოთვლილია არაპარამეტრული *U*- ტესტით, *n*=38.

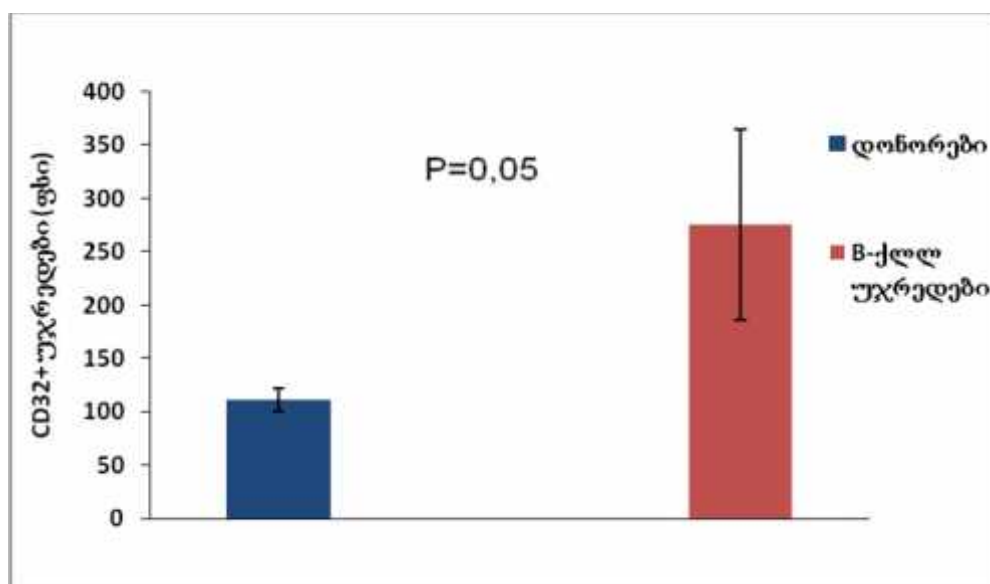
თოლ-მსგავსი რეცეპტორული აპარატის დაკნინება ქლლ მონოციტ/მაკროფაგებზე უთუოდ ნეგატიურ გავლენას მოახდენდა მათ მიერ განხორციელებულ ფაგოციტოზზე. მაგრამ ამ უჯრედებს ხომ კიდევ ერთი მნიშვნელოვანი ფუნქცია გააჩნიათ - ანტიგენწარმდგენელი. ანტიგენწარმდგენელი უჯრედების (აწუ) ანტიგენებით დატვირთვაში მისი გადამუშავების (პროცესინგის) და წარდგენის მიზნით თოლ-მსგავსი რეცეპტორები ერთ-ერთ წამყვან როლს თამაშობენ. ლოგიკურია ვივარაუდოთ, რომ ეს ფუნქციაც დაქვეითებულია ქლლ მონოციტ/მაკროფაგებზე. მართლაც, ჰიპოთეტური ქლლ-გამომწვევი ანტიგენ(ებ)ის პირველად გამოცნობაში, უნდა მონაწილეობდნენ ანტიგენწარმდგენი უჯრედების (აწუ) სხვადასხვა პოპულაციები. პროფესიული აწუ-ს ორ სახეობას: მაკროფაგებს და დენდრიტული უჯრედების ერთ-ერთ პოპულაციას - მონოციტოიდურ დენდრიტულ უჯრედებს დასაბამს აძლევენ მონოციტები (Varol *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010). ამრიგად, კვლევის პირველ ეტაპზე, ჩვენ დავახასიათეთ აწუ-ს ამ ორი პოპულაციის წინამორბედი უჯრედის - მონოციტის ანტიგენ-მტვირთავი ფენოტიპი. იმ ფაქტის გათვალისწინებით, რომ პროფესიულ აწუ-ს B უჯრედებიც მიეკუთვნება, რომელთა ექსპანსიას ადგილი აქვს ქლლ-ის დროს ლეიკემიური უჯრედების სახით, გადავწყვიტეთ კვლევის მომდევნო ეტაპზე B უჯრედებზე Fcγ-რეცეპტორის: FcγRII (CD32)-ის და CD180 ექსპრესიის შესწავლა.

### 3.3 B-ქლლ უჯრედების ანტიგენ-მტვირთავი ფენოტიპი

მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ CD32-ის ექსპრესია B-ქლლ უჯრედებზე დრამატულად მომატებულია საკონტროლო B უჯრედებთან შედარებით, რაც გამოიხატებოდა როგორც ამ რეცეპტორის მათეკსპრესირებელი უჯრედების პროცენტული მაჩვენებლის (გრაფიკი 3.13), ასევე ფსი კოეფიციენტის გამოყენებით (გრაფიკი 3.14).

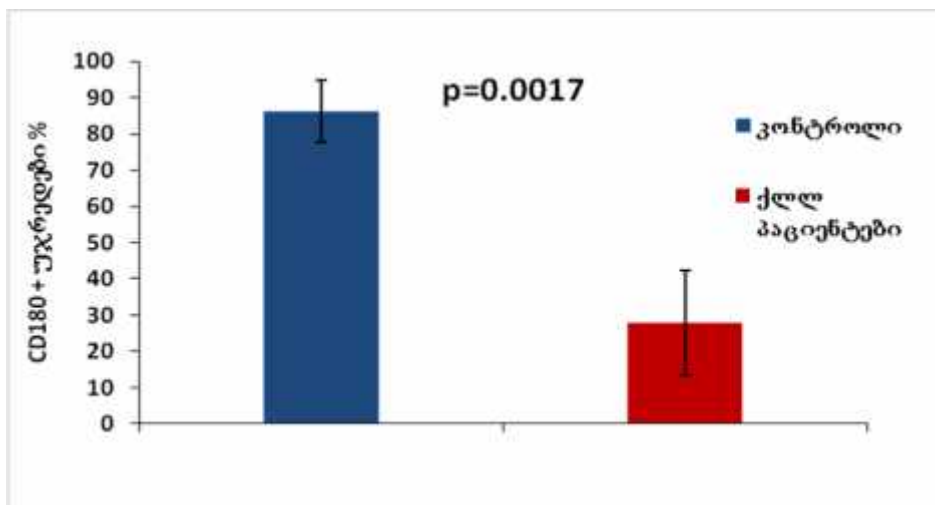


გრაფიკი 3.13. CD32<sup>+</sup> (%) ექსპრესია B-ქლლ უჯრედებსა და ნორმალურ B ლიმფოციტებზე. გრაფიკზე წარმოდგენილია საშუალო ± საშუალოდან გადახრა, *p* გამოთვლილია არაპარამეტრული *U*-ტესტით, n=41.

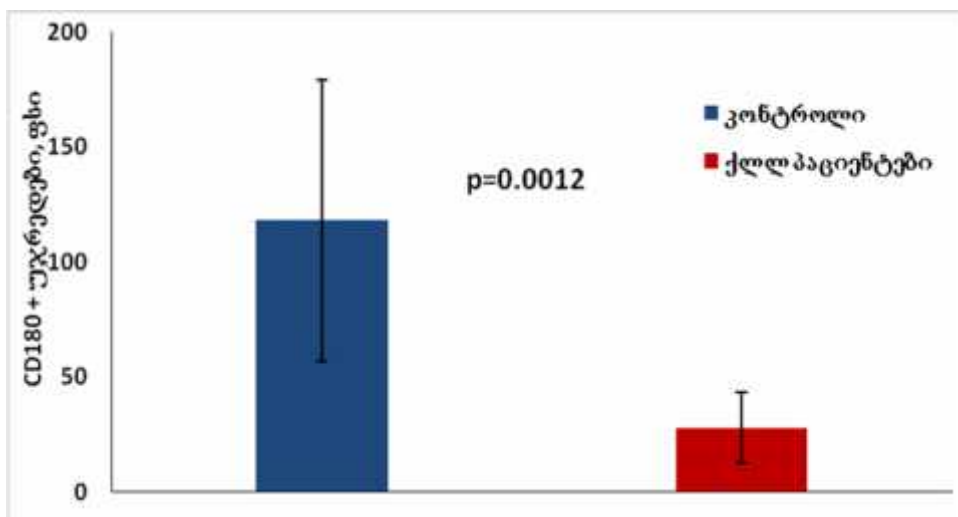


გრაფიკი 3.14. CD32<sup>+</sup> ექსპრესია B-ქლლ უჯრედებსა და ნორმალურ B ლიმფოციტებზე (ფსი). გრაფიკზე წარმოდგენილია საშუალო ± საშუალოდან გადახრა, *p* გამოთვლილია არაპარამეტრული *U*-ტესტით, n=41.

ამრიგად გამოძღვანდა მეტად საინტერესო კანონზომიერება. როგორც ჩვენ ზემოთ ვაჩვენეთ, ქლლ მონოციტებზე ადგილი აქვს FcγR რეცეპტორების ექსპრესიის დაქვეითებას, CD32-ის გარდა. უფრო მეტიც, ქლლ უჯრედებზე ამ რეცეპტორის ექსპრესია დრამატულად მომატებულია, რაც იმას ნიშნავს, რომ ქლლ პირობებში ადგილი აქვს ორი ანტიგენწარმდგენელი სუბპოპულაციის ფენოტიპის გადახრას CD32 რეცეპტორის სასარგებლოდ. CD32-ის სელექციური უპირატესობა ჩვენს მიერ შესწავლილ ანტიგენმტვირთავ რეცეპტორებს შორის აღმოჩნდა უნიკალური, რადგანაც ქლლ უჯრედებზე CD180-ის ექსპრესია დაქვეითებულია. ჩვენი ახალი შედეგები, აღბეჭდილი გრაფიკებზე 3.15 (პროცენტული რაოდენობა) და 3.16-ზე (CD180-ის ექსპრესიის ფსი) ამტკიცებს ადრე მოღებულ შედეგებს ( Porakishvili *et al.*, 2005, 2015).



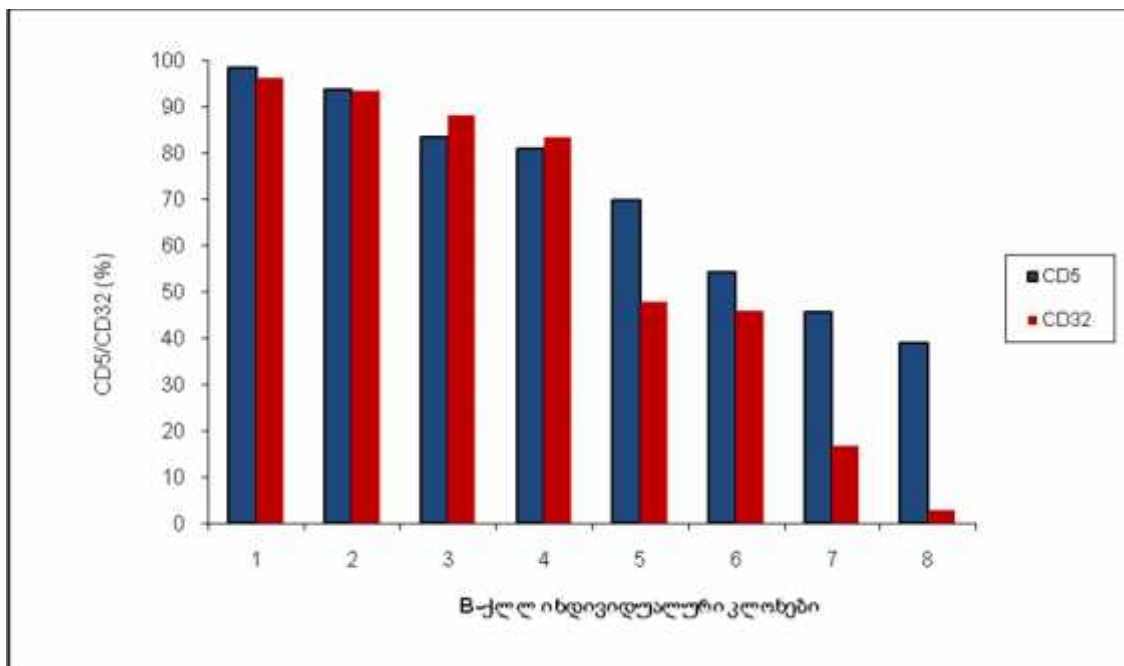
**გრაფიკი 3.15.** B-ქლლ უჯრედებზე CD180 ექსპრესია, %. წარმოდგენილია საშუალო ± საშუალოდან გადახრა, *p* გამოთვლილია არაპარამეტრული *U*-ტესტით, n=45.



**გრაფიკი 3.16.** B-ქლლ უჯრედებზე CD180-ის ექსპრესია, ფსი. გრაფიკზე წარმოდგენილია საშუალო±საშუალოდან გადახრა, *p* გამოთვლილია არაპარამეტრული *U*-ტესტით, n=45.

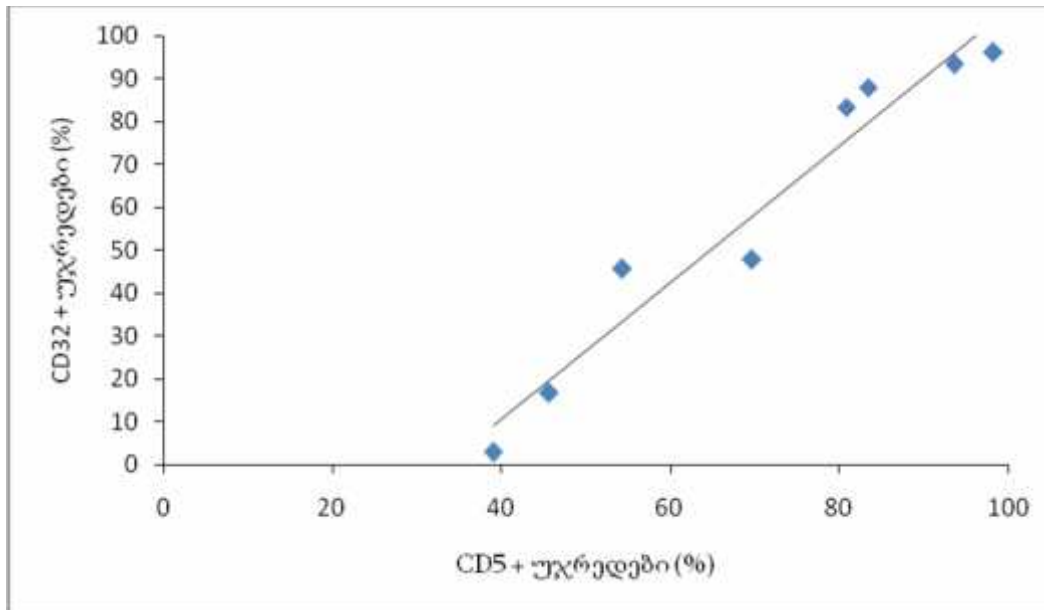
CD32-ის ასეთი სელექტიური უპირატესობა ქლლ პაციენტებში მეტად დამაფიქრებელია. ამ რეცეპტორის ერთ-ერთი ფუნქცია B უჯრედებზე არის B უჯრედული რეცეპტორის (BCR) სასიგნალო გზის ნეგატიური რეგულირება (Horejs-Hoeck *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). იმის გასარკვევად, თუ ამ რეცეპტორის ექსპრესიის ზრდა ქლლ უჯრედებზე BCR ნეგატიურ რეგულირებასთან იყო დაკავშირებული, ჩვენ შევაფასეთ CD32-ის ექსპრესიის დინამიკის შესაძლო კორელაცია CD5-ის ექსპრესიასთან, რადგანაც ამ უკანასკნელსაც BCR-ის ნეგატიური რეგულირების ფუნქცია აკისრია (Ochi *et al.*, 2000; Gary-Gouy *et al.*, 2002). მართალია, CD5 ექსპრესირებულია უკლებლივ ყველა ქლლ კლონზე, ექსპრესიის ხარისხი ინდივიდუალურ ქლლ უჯრედებზე კლონის ფარგლებში ძლიერ განსხვავებულია (Ghia *et al.*, 2004).

ჩვენი გამოკვლევების შედეგად დადგინდა პირდაპირი კორელაცია CD32-ის და CD5-ის ექსპრესიას შორის ინდივიდუალურ ქლლ კლონებზე (კორ.კოეფ = 0,97, გრაფიკები 3.17 და 3.18).



**გრაფიკი 3.17.** CD32-ის და CD5-ის ექსპრესია ქლლ ინდივიდუალურ კლონებზე, პროცენტული მაჩვენებელი.

ამრიგად ქლლ უჯრედებზე BCR -ის ნეგატიური რეგულატორების CD32-ის და CD5-ის ექსპრესიის დონე ურთიერთკორელირებს. ეს კი იმას ნიშნავს, რომ ინდივიდუალური ქლლ კლონები ხასიათდებიან ამ რეცეპტორების ან მეტად დაბალი ანდა ჭარბი ექსპრესიით, ანუ აღინიშნება BCR-ის ნეგატიური რეგულატორების მიხედვით ქლლ კლონების მნიშვნელოვანი ჰეტეროგენურობა, რაც, ჩვენი ინფორმაციით, ადრე არ იყო ცნობილი (Tsertsvadze *et al.*, 2015).



**გრაფიკი 3.18.** კორელაცია CD32-ის და CD5-ის ექსპრესიას შორის ქლლ ინდივიდუალურ კლონებზე (კორელაციის კოეფიციენტი =0.97, p=0.02).

ამ ფაქტის დამტკიცებამ ჩვენს წინაშე შემდეგი შეკითხვები დააყენა, სახელდობრ BCR-ის რომელი ფუნქციის ნეგატიურ რეგულირებას შეიძლება ქონდეს ადგილი. სხვა მკვლევართა და ჩვენივე საკუთარი მონაცემებით, ნანახი იქნა, რომ BCR-ის ძირითადი ფუნქციური დატვირთვა ქლლ-ის დროს არის ქლლ უჯრედების გადარჩენისა და ექსპანსიის, პროლიფერატორულ ცენტრებში მიმდინარე გამრავლების უზრუნველყოფა (Chiorazzi *et al.*, 2003; Ghia *et al.*, 2008; Porakishvili *et al.*, 2015).

ჩვენი ამჟამინდელი დაკვირვებები, შესაძლოა, მიუთითებს იმას, რომ ქლლ ინდივიდუალური კლონები განსხვავდებიან გადარჩენის/გამრავლების პოტენციალით ნეგატიური რეგულატორების ექსპრესიის ჰეტეროგენულობის საფუძველზე. მართლაც, ადრეც იყო ნაჩვენები, მათ შორის ჩვენს მიერაც, რომ ქლლ კლონები განსხვავდებიან მათი *in vivo* ექსპანსიითაც და *in vitro* უჯრედული ციკლის ინტენსივობით, და რომ ეს ჰეტეროგენულობა არ არის დამოკიდებული თავად BCR-ის ექსპრესიის დონეზე (Porakishvili *et al.*, 2005; 2011). ამის გასარკვევად ჩვენ გადავწყვიტეთ შეგვესწავლა CD32-ის ექსპრესია პროლიფერირებად ქლლ უჯრედებზე.

### 3.4 რეგულატორი რეცეპტორების ექსპრესია პროლიფერირებად ქლლ უჯრედებზე

ცნობილია, რომ ქლლ უჯრედების პროლიფერაცია, როგორც პერიფერულ სისხლში *in vivo*, ასევე *in vitro* პირობებში, მეტად შეზღუდულია, და მათი *in vivo* აკუმულირება ხორციელდება ძვალტვინოვან და ნაკლებად, ლიმფურკვანძოვან ე.წ. „პროლიფერატორულ ცენტრებში“ გამრავლების ხარჯზე. ამრიგად, ერთადერთი საშუალება *in vitro* ქლლ უჯრედების პროლიფერაციაზე დაკვირვების არის სპეციალიზებული ქლლ-ის უჯრედხაზოვანი მოდელის MEC1 გამოყენება. ეს უჯრედოვანი ხაზი მიღებულია ეპშტეინ-ბარის ვირუსით სტიმულირებული ქლლ

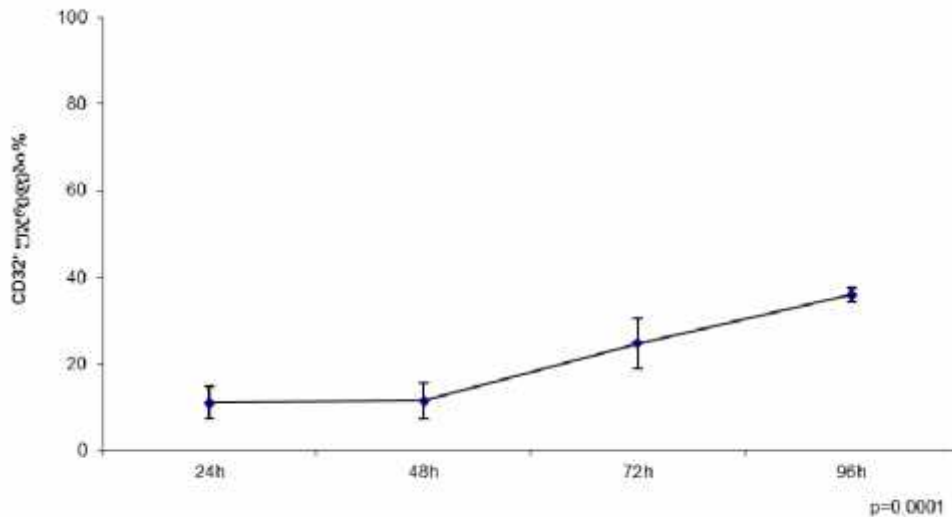


კლონიდან და აღიარებულია, როგორც სამოდულო სისტემა ქლლ პათოგენების შესასწავლად ( Stacchini *et al.*, 1999).

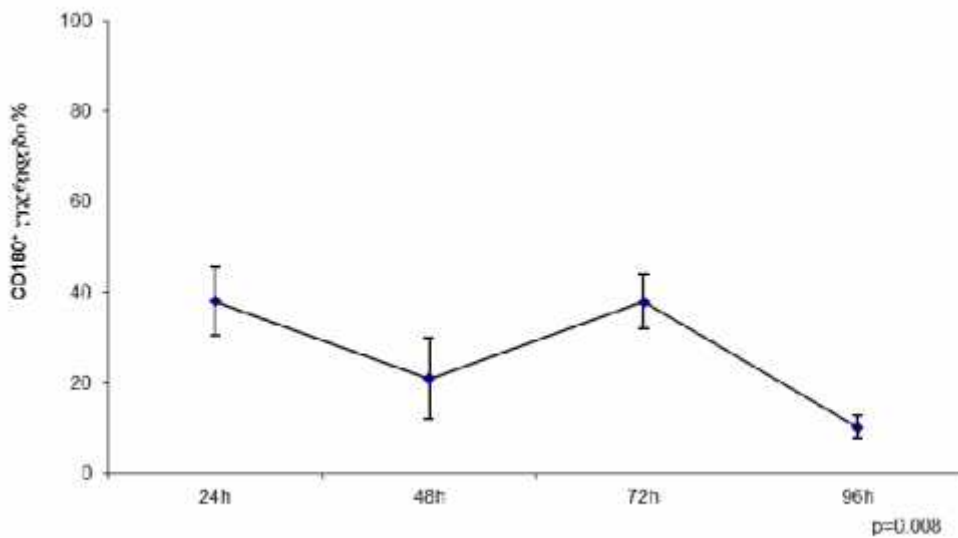
MEC1 უჯრედული ხაზი მიღებულია M-ქლლ პაციენტისგან (მუტირების ხარისხი - 94.6% ) (Ricciardi *et al.*, 2001), ჩვეულებრივი ქლლ უჯრედებისგან მათ განასხვავებს CD5-ის ნეგატიური ექსპრესია (თავდაპირველად, პაციენტის უჯრედების 90% აექსპრესირებდა CD5-ს, მაგრამ დროთა განმავლობაში, დაავადების პროგრესირებასთან ერთად მოხდა აღნიშნული რეცეპტორის ზედაპირული ექსპრესიის მნიშვნელოვანი შემცირება (Ricciardi *et al.*, 2001). ამიტომაც ამ ნაშრომში ჩვენ ვაკვირდებით მხოლოდ CD32-ის ნეგატიურ რეგულატორს. CD5-ის ექსპრესიის დონის შემცირება MEC1 უჯრედულ ხაზზე შეიძლება ყოფილიყო განპირობებული ქლლ უჯრედების აქტივაციით (Pritchard *et al.*, 2003), რაზეც მეტყველებს აქტივატორული მარკერების - CD80/CD86-ის და ადჰეზიური მოლეკულების (CD11a, CD18, CD44, CD49d, CD54) მაღალი ექსპრესია. MEC1 უჯრედების კულტივირებისას, ჩვენ დავაკვირდით B ლიმფოციტების ნეგატიური რეგულატორის CD32 და აპოპტოზისგან გადარჩენის სიგნალის გადმომცემი CD180 (Porakishvili *et al.*, 2005, 2011, 2015) ექსპრესიის დინამიკას.

კვლევის შედეგად დავადგინეთ CD32-ის ექსპრესიის დადებითი კორელაცია MEC1 უჯრედების კულტურის ხანგრძლივობასთან. კერძოდ, თუ 24სთ-ზე CD32-ის ექსპრესია MEC1 უჯრედებზე  $11 \pm 3.8\%$  უდრიდა, კულტურის გადათესვიდან 96 საათისთვის CD32-ის ექსპრესია აღწევდა  $36 \pm 1.3\%$ -ს,  $p=0.0001$  (გრაფიკი 3.19). რაც შეეხება CD180-ის ექსპრესიას, მიღებული მონაცემებით დაფიქსირდა მისი ფლუქტუაცია MEC1 უჯრედების კულტივირების პროცესში, რაც მეტად საინტერესო ფენომენს წარმოადგენს, და მომდევნო კვლევას მოითხოვს (გრაფიკი 3.20). ამავდროულად, თუ შევადარებთ უჯრედული ხაზის კულტურის იგივე წერტილებს რაც CD32-თვის - 24სთ და 96სთ, დავინახავთ, რომ CD180-ის ექსპრესიის დინამიკა MEC1 უჯრედების კულტურაში უარყოფითია, და მცირდებოდა  $38.1 \pm 8.5\%$ -დან  $10.2 \pm 2.9\%$ -მდე ( $p=0.008$ ). ამრიგად, ჩვენი მონაცემებით, MEC1 უჯრედების კულტივირების პროცესში ადგილი ჰქონდა CD32 რეცეპტორის ექსპრესიის სარწმუნო მატებას CD180 რეცეპტორის ექსპრესიის სარწმუნო შემცირების ფონზე.

ჩვენი შედეგებით გამოვლინდა CD32 რეცეპტორის ექსპრესიის შესამჩნევი სტაბილობა როგორც მონოციტებზე, ასევე მოსვენებულ ქლლ უჯრედებზე. უფრო მეტიც, ქლლ უჯრედოვანი ხაზის პროლიფერაციის პროცესში ადგილი ჰქონდა მის მატებას (Tsertsvadze *et al.*, 2015). ცნობილია, რომ CD32 რეცეპტოს უნარი აქვს დაიკავშიროს თავისუფალი IgG და მისი აგრეგატები (Horejs-Hoeck *et al.*, 2005), ხოლო ქლლ უჯრედებზე ექსპრესირებულ იზოფორმას Fc $\gamma$ RIIa კი - IgG2 (Haagen *et al.*, 1995). შესაძლოა წარმოვიდგინოთ, რომ ეს კავშირები მონაწილეობენ ქლლ უჯრედების *in vivo* პროლიფერაციისა და ექსპანსიის რეგულირებაში, რაც შემდგომ კვლევას მოითხოვს.



**გრაფიკი 3.19.** CD32 რეცეპტორის ექსპრესია MEC1 უჯრედების 96-საათიან კულტურაში. გრაფიკზე წარმოდგენილია საშუალო  $\pm$  საშუალოდან გადახრა,  $p$  გამოთვლილია არაპარამეტრული  $U$ - ტესტით,  $n=10$ .



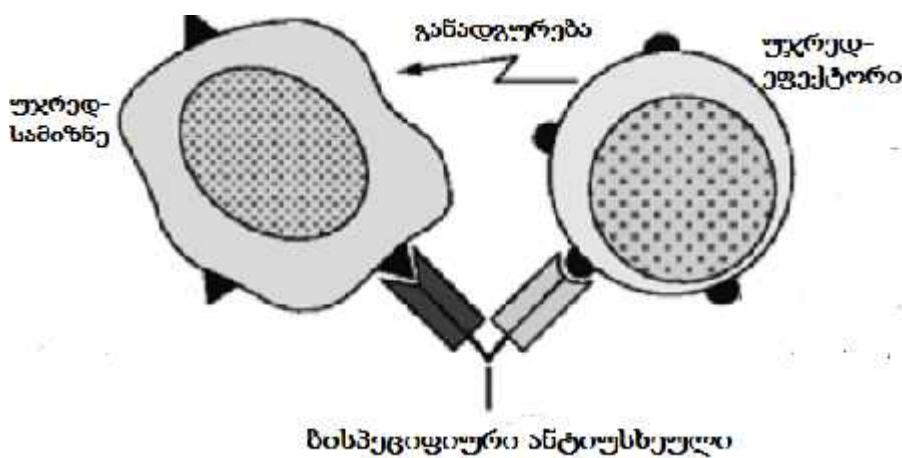
**გრაფიკი 3.20.** CD180 რეცეპტორის ექსპრესია MEC1 უჯრედების 96-საათიან კულტურაში. გრაფიკზე წარმოდგენილია საშუალო  $\pm$  საშუალოდან გადახრა,  $p$  გამოთვლილია არაპარამეტრული  $U$ - ტესტით,  $n=10$ .

რაც შეეხება CD180-ის დინამიკას MEC1 უჯრედების კულტურაში, ჩვენ მიგვაჩნია, რომ მისი ექსპრესიის ფლუქტუაცია და საბოლოო შემცირება უნდა იყოს დაკავშირებული ამ რეცეპტორის ენდოციტოზთან, როგორც ეს ადრე იყო ნაგარაუდები ნორმალური B უჯრედების შემთხვევაში (Chiron *et al.*, 2008). გარდა ამისა ნაჩვენებია, რომ CD180-ის ექსპრესია მცირდება აუტოიმუნური დაავადებების დროს აქტივირებულ B უჯრედებზე (Fujita *et al.*, 2012) ანუ უჯრედების აქტივაციას, რაც დამახასიათებელია MEC1 მზარდი

კულტურისთვის, უნდა გამოეწვია CD180-ის ექსპრესიის დაქვეითება. თუ როგორ მოქმედებს CD180-ის დაბალი ექსპრესია ქლლ უჯრედების გადარჩენაზე ხანგრძლივ კულტურაში საინტერესო საკითხს წარმოადგენს და მოითხოვს შემდგომ კვლევას.

ჩვენს მიერ ნანახი CD32 და CD180-ის საპირისპირო დინამიკა პროლიფერირებად ქლლ უჯრედულ ხაზში საკმაოდ უჩვეულოა, ვინაიდან უჯრედული ციკლის მატებასთან ერთად იზრდებოდა BCR-ის ნეგატიური რეგულატორის ექსპრესია (CD32) და მცირდებოდა გადამრჩენი რეცეპორის ექსპრესია (CD180). ეს შეიძლება იმას ნიშნავდეს, რომ ნეგატიური რეგულაცია ჩაირთო უჯრედული ციკლის შეზღუდვის მიზნით, თუმცა, როგორც ვიცით, *in vivo* ქლლ უჯრედების ნეგატიური რეგულირება ხშირად ვერ ხერხდება. არ არის გამორიცხული, რომ CD5 რეცეპტორის გარეშე (MEC1 უჯრედული ხაზში) ბალანსი BCR-ის ნეგატიური და პოზიტიური რეგულირების სიგნალებს შორის ირღვევა. MEC1 და ქლლ უჯრედებში სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნების მექანიზმების გამოკვლევა დაგვეხმარება უკეთ ავხსნათ თუ როგორ მოქმედებს მიკროგარემოთი განპირობებული სტიმულაცია ლეიკემიური უჯრედების ექსპანსიაზე და, ზოგადად, დაავადების პროგრესირებაზე, რაც საშუალებას მოგვცემს ახალი თერაპიული საშუალებების შემუშავებას.

ამ ნაშრომის დასკვნითი ნაწილი მიემდვნა მოლეკულური თერაპიის ერთ-ერთი თანამედროვე მეთოდის - ბისპეციფიური ანტისხეულების გამოყენებადობის საკითხს ქლლ მკურნალობაში. ბისპეციფიური ანტისხეული უკავშირდება, ერთი ანტიგენდამაკავშირებელი დომენით უჯრედ-სამიზნის რეცეპტორს, ხოლო მეორე ანტიგენდამაკავშირებელი დომენით კი - ეფექტორული უჯრედის რეცეპტორს, რათა მოახდინოს ამ უკანასკნელის აქტივაციის გზით სამიზნის მიმართ ეფექტორული ფუნქციის განხორციელება (Löffler *et al.*, 2003; Lüttgauet *et al.*, 2013; Weidle *et al.*, 2013). როგორც ეს ნაჩვენებია ნახატ 3.1-ზე.



**ნახატი 3.1.** ბისპეციფიური ანტისხეულების მოქმედების ზოგადი სქემა.

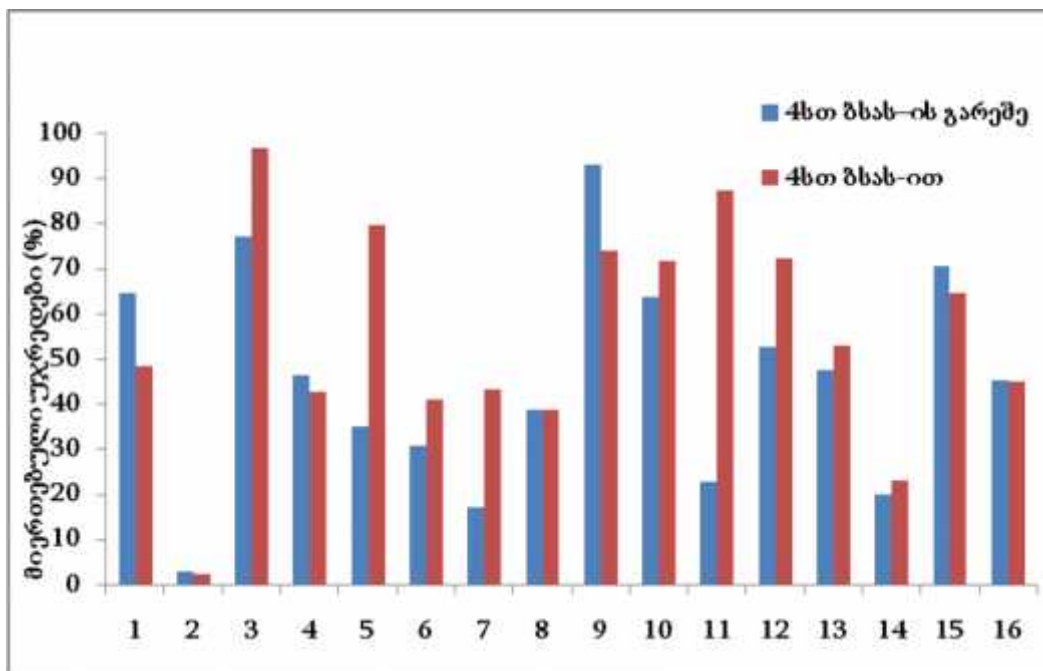
ამისათვის საჭიროა, რომ ორივე უჯრედზე - სამიზნესა და ეფექტორზე ექსპრესირებულ იქნას შერჩეული რეცეპტორები სათანადო სიმკვრივითა და აფინობით. ჩვენს მიერ გამოყენებულია ბისპეციფიური კომერციულად არსებული ანტისხეული CD64/CD19, რომელიც შემოთავაზებულია როგორც თერაპიული საშუალება B უჯრედული ლიმფომების სამკურნალოდ (Stein *et al.*, 2012). ამ ნაშრომის წინა თავებში ჩვენ შევისწავლეთ მონოციტების როგორც პოტენციური ეფექტორული უჯრედების და ქლლ-სამიზნეების რეცეპტორული აპარატი, რათა შემეფასებინა CD64/CD19 ბისპეციფიური ანტისხეულის (ბსას) გამოყენებადობა ქლლ პირობებში.

### **3.5. ფაგოციტების მიერ ქლლ უჯრედების დამიზნება ბისპეციფიური ანტისხეულის ანტი-CD19/ანტი-CD64 მეშვეობით**

ბისპეციფიური ანტისხეულები თავისი მოქმედების მექანიზმით ეფექტურ თერაპიულ საშუალებას მიეკუთვნება. ბისპეციფიური ანტისხეული თავისი ბუნებიდან და სტრუქტურიდან გამომდინარე სამიზნე-ეფექტორი კომპლექსის ჩამოყალიბებას იწვევს, რაც ეფექტორულ უჯრედებს მიზანდასახულად მიმართავს სამიზნე უჯრედის გასანადგურებლად. ბისპეციფიური ანტისხეულის შერჩევასა ყურადღება უნდა მიექცეს იმ ანტიგენ-დამაკავშირებელი მხრის სპეციფიკურობას, რომლითაც იგი უნდა დაუკავშირდეს სამიზნე უჯრედის რეცეპტორს. B-ქლლ-ის შემთხვევაში ასეთ რეცეპტორს CD19 წარმოადგენს, რომელიც როგორც პან-B უჯრედულ მარკერი, ექსპრესირებულია ყველა B-ლიმფოციტზე. ბისპეციფიური ანტისხეულის მეორე ანტიგენდამაკავშირებელი მხარი უნდა უკავშირდებოდეს ეფექტორული უჯრედის ზედაპირზე ექსპრესირებულ მოლეკულას, და ეს უკანასკნელი უნდა ჩართული იყოს ეფექტორული მექანიზმების აქტივაციის პროცესში. ფაგოციტების შემთხვევაში უპირატესობა მიენიჭა CD64 (FcγRI) რეცეპტორს, რომელიც ლიგაციის შემთხვევაში იწვევს ფაგოციტოზს, O<sub>2</sub>-სა და ციტოკინების გამოყოფას (Bovolenta *et al.*, 1998).

ჩვენი გამოკვლევებიდან გამომდინარე, ქლლ მონოციტებზე CD64 ექსპრესია დაბალია (Tsertsvadze *et al.*, 2015), და თითქოს უფრო ლოგიკური იქნებოდა CD32-ის გამოყენება, რომელიც ხასიათდება სტაბილური ექსპრესიით, მაგრამ მხოლოდ დაკავშირებას უჯრედ-ეფექტორთან მნიშვნელობა როდი აქვს. უჯრედ ეფექტორი უნდა გააქტიურდეს და განახორციელოს თავისი ფიზიოლოგიური ფუნქცია, ამ შემთხვევაში ფაგოციტოზი, რაც CD64-ის და არა CD32-ის შეკავშირების შედეგია. ამავდროულად ცნობილია, რომ სისხლის მონოციტები, ქსოვილოვან მაკროფაგებისგან განსხვავებით, ნაკლები ეფექტორული ფუნქციით ხასიათდებიან (Jenkins *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2014). ჩვენი ადრინდელი გამოკვლევებით დადგინდა, რომ B-ქლლ-ით დაავადებული პირების ნეიტროფილების ზედაპირზე CD64 მოლეკულის ექსპრესია მკვეთრად მომატებულია, ნორმასთან შედარებით (Gabunia *et al.*, 2002). ამიტომაც ნათელი გახდა, რომ ნეიტროფილები წარმოადგენენ პრაქტიკულად უფრო მისაღებ უჯრედ-ეფექტორს ანტი-CD64/ანტი-CD19 ბისპეციფიური ანტისხეულის შესასწავლად ქლლ უჯრედებზე.

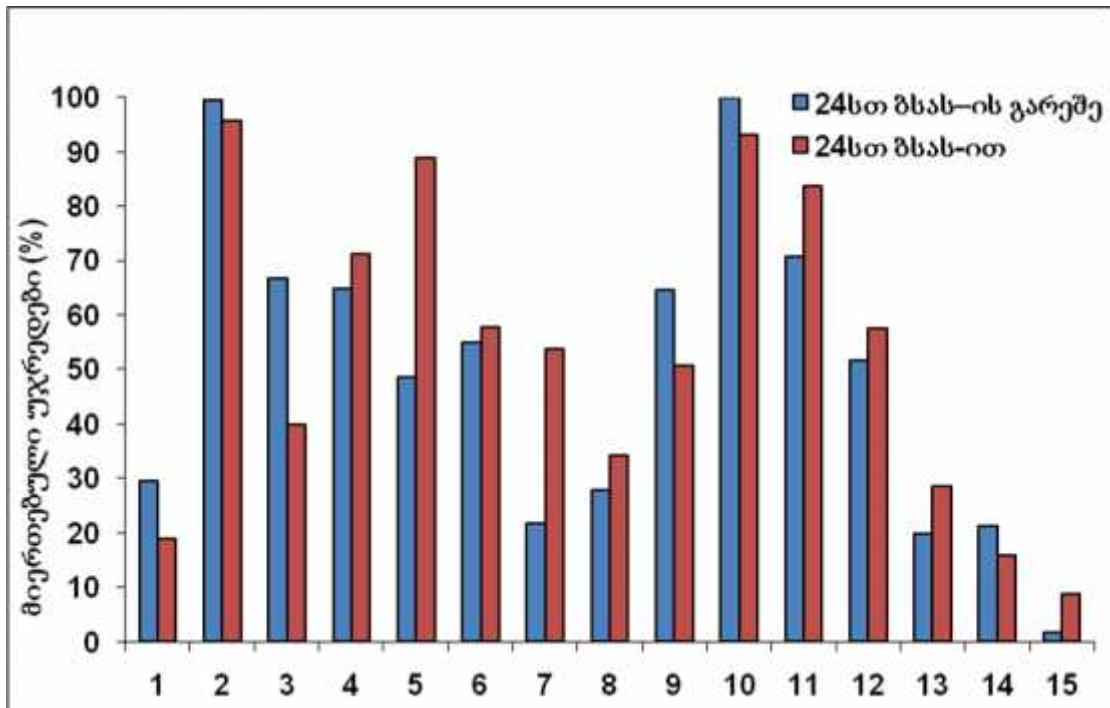
იმისათვის, რომ არასტიმულირებულ ნეიტროფილებს მოეხდინათ B-ქლლ ლეიკემიური უჯრედების ფაგოციტოზი ჩვენ ვახდენდით ნეიტროფილებისა და ლეიკემიური უჯრედების ინკუბაციას ანტი-CD64/ანტი-CD19 ბისპეციფიურ ანტისხეულთან (ბსას) ერთად 4 და 24 საათის განმავლობაში, კონტროლად გამოვიყენეთ უჯრედთა იგივე კომბინაცია ბსას გარეშე. მიღებულმა შედეგებმა გვაჩვენა, რომ ბსას გარეშეც ნეიტროფილები ქმნიან კომპლექსებს ლეიკემიურ უჯრედებთან. ბისპეციფიური ანტისხეულების თანაობისას 4 სთ-იანი ინკუბაციის შედეგად 16 შემთხვევიდან 9-ში (56,25%) მოხდა ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების მიერთების მატება (გრაფიკი 3.21).



**გრაფიკი 3.21.** ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების მიერთება 4 სთ-იანი ინკუბაციის შედეგად ბსას გარეშე (ლურჯი სვეტები) ან ბსას თანაობისას (წითელი სვეტები), n=16.

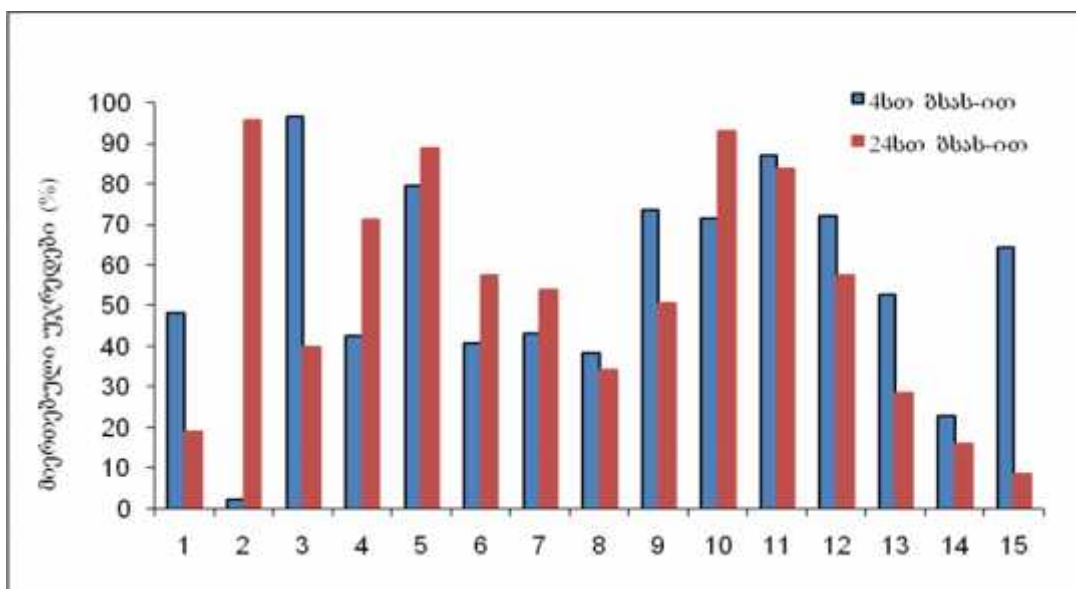
საინტერესოა, რომ 24სთ-იანი ინკუბაციისას ეს მაჩვენებელი ნანახი იქნა 15-დან მხოლოდ 5 შემთხვევაში (31.25%), ანუ სამიზნეებისა და ეფექტორული უჯრედების თანაინკუბაციის დროის გაზრდისას ბსას გავლენის ეფექტი ფაგოციტოზის მაჩვენებელზე კლებულობს (გრაფიკი 3.22).

ის, რომ ბსას არ გამოუწვევიათ ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების შეკავშირების დრამატული მატება ყველა გამოყენებულ შემთხვევაში შესაძლოა განპირობებული იყოს სამიზნე/ეფექტორის არასპეციფიური ურთიერთდაკავშირებით, სავარაუდოდ, ადჰეზიის მოლეკულების (LFA-1 და ICAM-1) მეშვეობით (Csanaky *et al.*, 1994; Kimby *et al.*, 1994).



**გრაფიკი 3.22.** ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების მიერთება 24 სთ-იანი ინკუბაციის შედეგად ბსას გარეშე (ლურჯი სვეტები) ან ბსას თანაობისას (წითელი სვეტები), n=15.

მართლაც, როდესაც ჩვენ ჩავატარეთ ბსას ეფექტის ანალიზი სამიზნე/ეფექტორული უჯრედების 4 და 24 სთ-იანი თანაინკუბაციის რეჟიმში ინდივიდუალურ პაციენტებში გაირკვა, რომ მხოლოდ 6/15 შემთხვევაში (40%) ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების მიერთებამ მოიმატა (გრაფიკი 3.23).



**გრაფიკი 3.23.** ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების მიერთება ბსას თანაობისას 4სთ (ლურჯი სვეტები) ან 24 სთ (წითელი სვეტები) ინკუბაციის შედეგად, n=15.

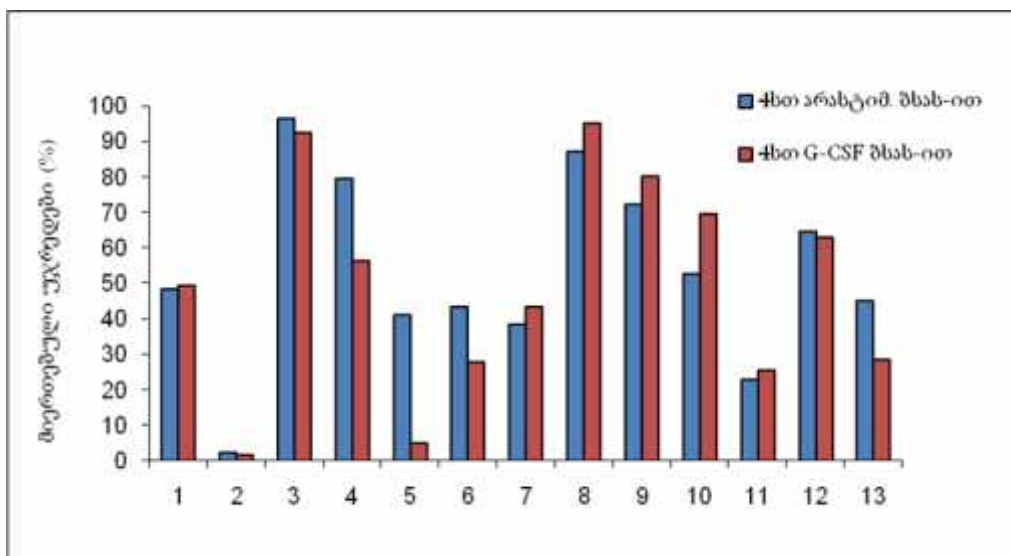
ამრიგად, ბსას უნარი გააძლიეროს ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების მიერთება შეზღუდულია, და არ აღემატება ინდივიდუალური პაციენტების 56.25%-ს სამიზნე/ეფექტორული უჯრედების 4 სთ-იანი თანაინკუბაციის პირობებში. ინკუბაციის დროის გაზრდა მხოლოდ 40% შემთხვევაში აძლიერებს ამ ეფექტს.

ნეიტროფილების ზედაპირზე CD64 მოლეკულის ექსპრესიის ინდუქციისათვის აუცილებელია მათი ციტოკინებით (G-CSF, IFN $\gamma$ ) სტიმულირება (Bovolenta *et al.*, 1998). აქედან გამომდინარე, ჩვენ შევისწავლეთ ციტოკინებით (G-CSF, IFN $\gamma$ ) ნეიტროფილების წინასწარი სტიმულირების ეფექტი მათ მიერ ლეიკემიური უჯრედების ფაგოციტოზის ინდუქციაზე, გაშუალებული ბსას-ით. ამისათვის ჩვენ ვახდენდით ქლლ დაავადებულების პერიფერიული სისხლის ნეიტროფილების სტიმულაციას 12სთ-ის განმავლობაში ციტიკინებით 3 კომბინაციით:

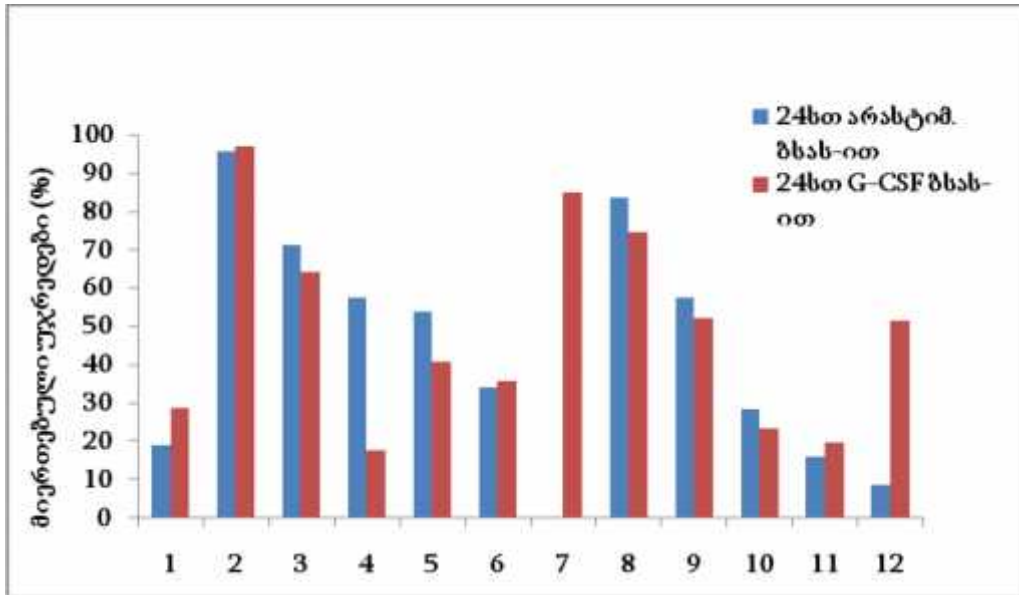
1. მხოლოდ G-CSF, კონცენტრაციით 100 ნგ/მლ;
2. მხოლოდ IFN $\gamma$ , კონცენტრაციით 500 ერთ/მლ;
3. მათი კომბინაციით (G-CSF+ IFN $\gamma$ ) იგივე კონცენტრაციით.

ციტოკინებით სტიმულირებული ნეიტროფილების გამოყენებით ექსპერიმენტის სქემა იგივე დარჩა: ვახდენდით ნეიტროფილების თანაინკუბაციას ლეიკემიურ უჯრედებთან ერთად ბსას თანაობისას 4სთ და 24სთ-ის განმავლობაში.

მიღებულმა შედეგებმა გვიჩვენა, რომ G-CSF-ით ქლლ ნეიტროფილების დამუშავებამ მოახდინა დადებითი გავლენა მათ მიერ ქლლ უჯრედების მიერთების უნარზე 5/13 (38,46%) შემთხვევაში 4სთ-იანი ინკუბაციის პირობებში (გრაფიკი 3.24) და 5/12 (41.7%) შემთხვევაში 24 სთ-იანი თანაინკუბაციის პირობებში (გრაფიკი 3.25).

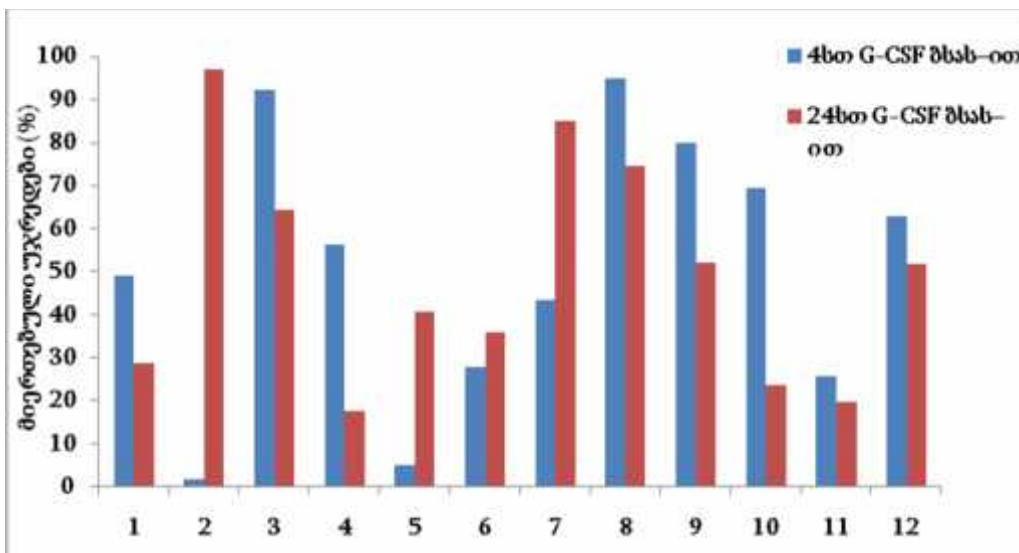


**გრაფიკი 3.24.** G-CSF-ის ზეგავლენა ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების მიერთებაზე 4 სთ-იანი ინკუბაციის შედეგად ბსას თანაობისას. ლურჯი სვეტები - ციტოკინის გარეშე; წითელი სვეტები - ციტოკინით დამუშავების პირობებში, n=13.



**გრაფიკი 3.25.** G-CSF-ის ზეგავლენა ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების მიერთებაზე 24 სთ-იანი ინკუბაციის შედეგად ბსას თანაობისას. ლურჯი სვეტები - ციტოკინის გარეშე; წითელი სვეტები - ციტოკინით დამუშავების პირობებში, n=12.

ინკუბაციის დროის გაზრდამ, კვლავინდებურად, არ მოგვცა ცალსახოვანი დასკვნის საშუალება, მოახდინა რა ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების მიერთების გაძლიერება მხოლოდ 4/12 შემთხვევაში (33.3%, გრაფიკი 3.26), ხოლო დანარჩენ 66.7% შემთხვევაში მას უარყოფითი გავლენა ქონდა.

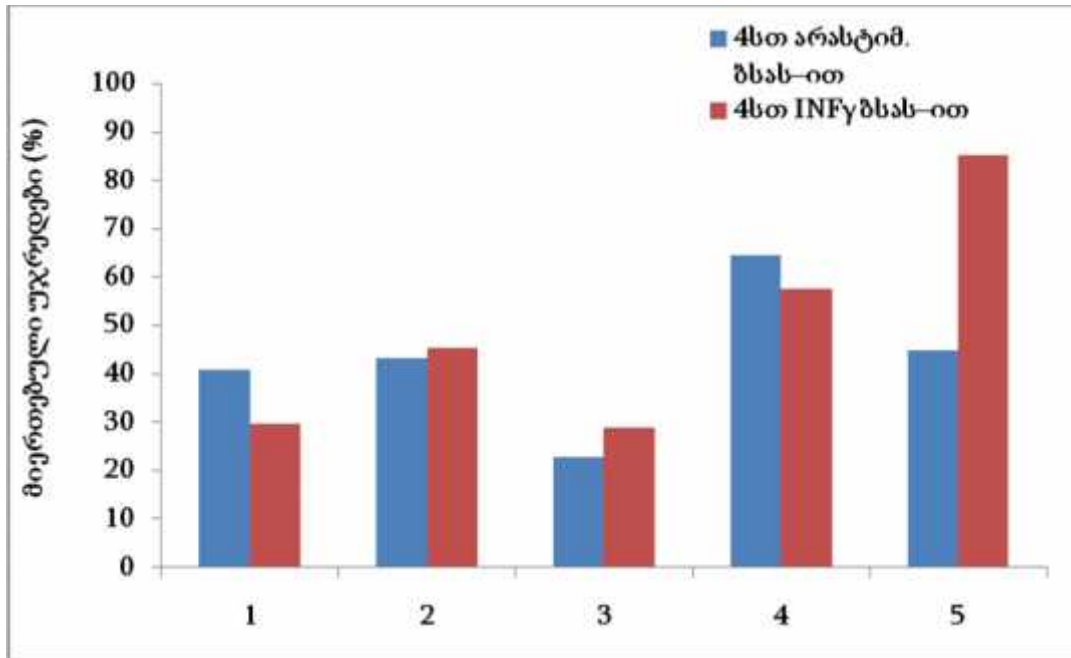


**გრაფიკი 3.26.** G-CSF-ით აქტივირებული ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების მიერთება ბსას თანაობისას 4 სთ-იანი (ლურჯი სვეტები) ან 24 სთ-იანი (წითელი სვეტები) ინკუბაციის შედეგად, n=12.

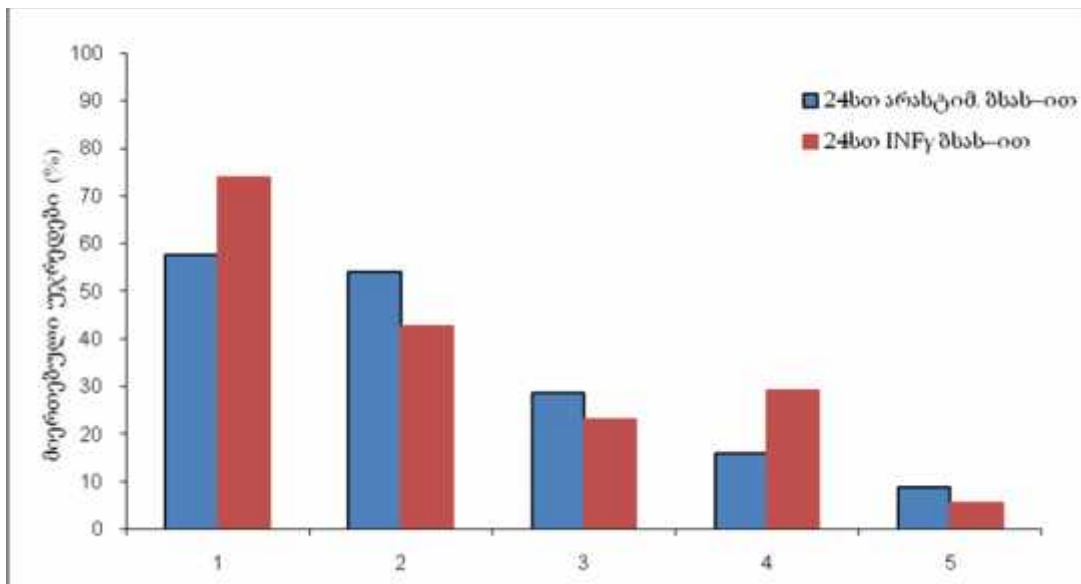
IFN $\gamma$ -ით ნეიტროფილების წინასწარი დამუშავებისას მიღებულმა შედეგებმა გვიჩვენა, რომ არც მას ჰქონდა გადამწყვეტი ეფექტი ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების



მიერთებაზე. ორივე, 4-სთ-იანი და 24-სთიანი თანაინკუბაციისას უჯრედ-სამიზნეთა მიერთება გაიზარდა მხოლოდ 2/5 შემთხვევაში (გრაფიკები 3.27 და 3.28).

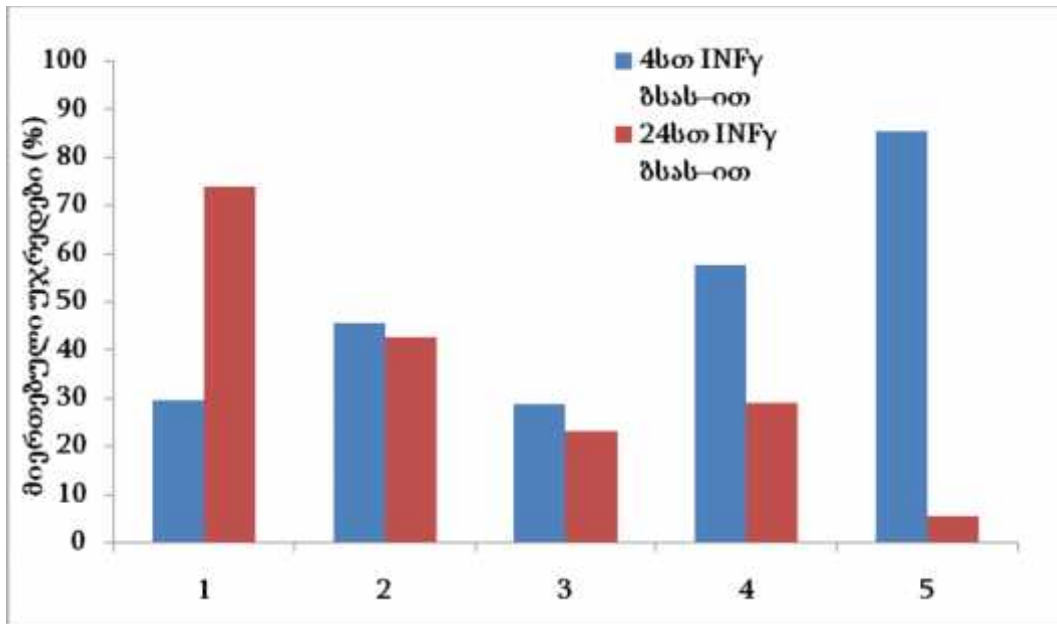


**გრაფიკი 3.27.** IFN $\gamma$ -ის ზეგავლენა ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების მიერთებაზე 4 სთ-იანი ინკუბაციის შედეგად ბსას თანაობისას. ლურჯი სვეტები - ციტოკინის გარეშე; წითელი სვეტები - ციტოკინით დამუშავების პირობებში, n=5.



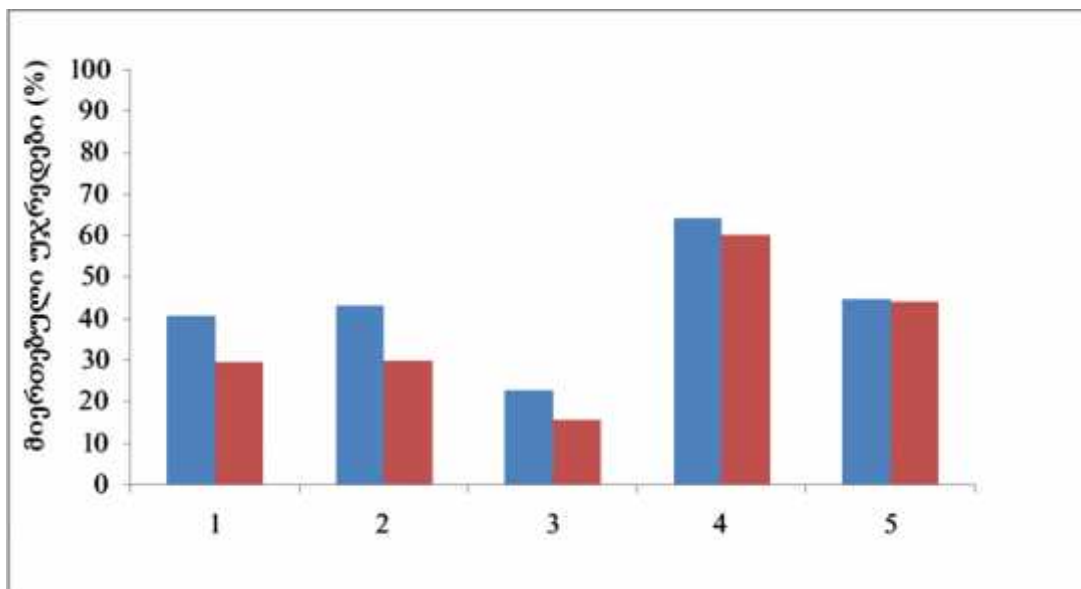
**გრაფიკი 3.28.** IFN $\gamma$ -ის ზეგავლენა ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების მიერთებაზე 24 სთ-იანი ინკუბაციის შედეგად ბსას თანაობისას. ლურჯი სვეტები - ციტოკინის გარეშე; წითელი სვეტები - ციტოკინით დამუშავების პირობებში, n=5.

ინკუბაციის დროის ზრდამ კი 4/5 შემთხვევაში უარყოფითი გავლენა მოახდინა უჯრედ-ეფექტორისა და უჯრედ-სამიზნის ურთიერთკავშირზე (გრაფიკი 3.29).



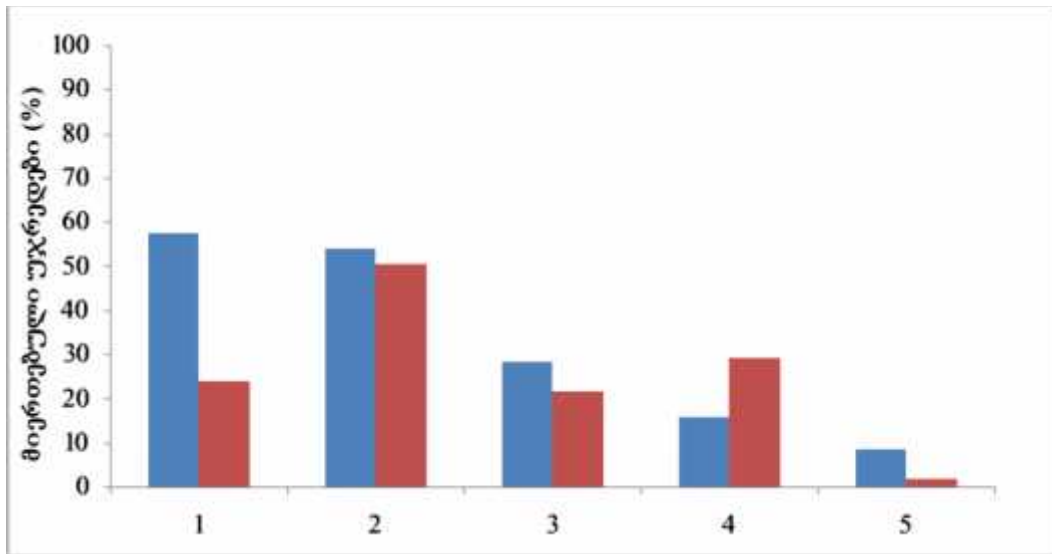
**გრაფიკი 3.29.** IFN $\gamma$ -ით აქტივირებული ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების მიერთება ბსას თანაობისას 4 სთ-იანი (ლურჯი სვეტები) ან 24 სთ-იანი (წითელი სვეტები) ინკუბაციის შედეგად, n=5.

ექსპერიმენტის შემდგომ ეტაპზე შევისწავლეთ, თუ ამ ორ ციტოკინს (G-CSF და IFN $\gamma$ ) კუმულაციური ეფექტი ექნებოდა ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების მიერთება/შთანთქმაზე. ჩვენდა გასაკვირვად ასეთი კუმულაციური ეფექტი მართლაც აღიბეჭდა, მაგრამ - უარყოფითი ხასიათის: ორივე ციტოკინით აქტივირებული ნეიტროფილების ქლლ უჯრედების შეკავშირების უნარი დაქვეითდა 4/5 შემთხვევაში, როგორც 4სთ (გრაფიკი 3.30), ასევე 24სთ (გრაფიკი 3.31) თანაინკუბაციისას.



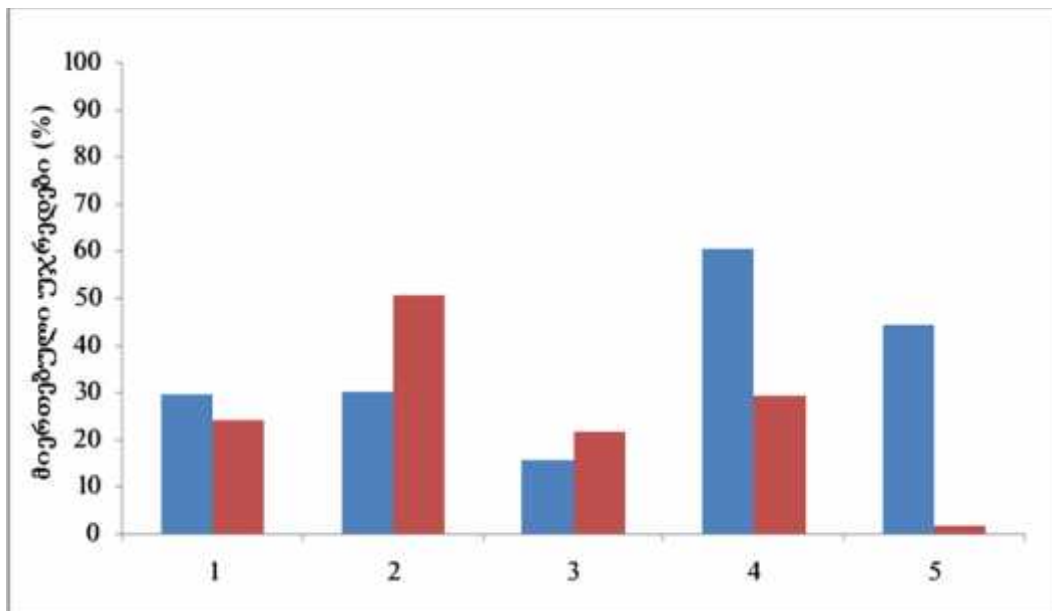
**გრაფიკი 3.30.** G-CSF და IFN $\gamma$ -ის კუმულაციური ზეგავლენა ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების მიერთებაზე 4 სთ-იანი ინკუბაციის შედეგად ბსას თანაობისას.

ლურჯი სვეტები - ციტოკინების გარეშე; წითელი სვეტები - ციტოკინებით დამუშავების პირობებში, n=5.



**გრაფიკი 3.31.** G-CSF და IFN $\gamma$ -ის კუმულაციური ზეგავლენა ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების მიერთებაზე 24 სთ-იანი ინკუბაციის შედეგად ბსას თანაობისას. ლურჯი სვეტები - ციტოკინების გარეშე; წითელი სვეტები - ციტოკინებით დამუშავების პირობებში, n=5.

ინკუბაციის დროის ზრდამ კი დადებითი გავლენა მოახდინა უჯრედ-ეფექტორის მიერ სამიზნის მიერთებაზე 2/5 შემთხვევაში (გრაფიკი 3.32).



**გრაფიკი 3.32.** G-CSF და IFN $\gamma$ -ით აქტივირებული ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების მიერთება ბსას თანაობისას 4 სთ-იანი (ლურჯი სვეტები) ან 24 სთ-იანი (წითელი სვეტები) ინკუბაციის შედეგად, n=5.

მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე, შეიძლება დავასკვნათ, რომ ანტი-CD64/ანტი-CD19 ბისპეციფიურ ანტისხეულებს გააჩნიათ ნეიტროფილების მიერ ლეიკემიური უჯრედების მიერთების/ფაგოციტოზის ინდუქციის შეზღუდული შესაძლებლობა. ეს შეიძლება აიხსნას ეფექტორული უჯრედების მიერ ქლლ სამიზნეების სპონტანური მიერთების ინტენსივობით, რასაც ვხედავთ გრაფიკებზე 3.21 და 3.22, ზოგიერთ შემთხვევაში ნეიტროფილი/ქლლ კომპლექსებით კულტურების გაჯერებასაც ვხედავთ (მაჩვენებელი 100%-ს უახლოვდება). ამავდროულად, იქ, სადაც სპონტანური კომპლექსების წარმოქმნა დაბალია, ბსას ყოველთვის ვერ იწვევდა მათ ზრდას. როგორც ჩანს, ნეიტროფილი/ქლლ კომპლექსების რაოდენობა კლებულობს ინკუბაციის ხანგრძლივობასთან ერთად.

ჩვენი შედეგებიდან გამომდინარე შესაძლოა დავასკვნათ, რომ ციტოკინები (G-CSF და IFN $\gamma$ ) ვერც ცალცალკე და ვერც ერთობლივად ვერ ახდენენ ფაგოციტური მაჩვენებლის გაუმჯობესებას, რაც საკმაოდ მოულოდნელი აღმოჩნდა. აღნიშნული ფენომენი შემდეგნაირად შეიძლება აიხსნას: ნორმაში G-CSF და IFN $\gamma$  იწვევენ ნეიტროფილებზე CD64-ის ძლიერ ექსპრესიას და, ამგვარად, ახდენენ ფაგოციტოზის ინდუქციას. ჩვენ ადრე ვაჩვენეთ, რომ B-ქლლ შემთხვევაში CD64-ის ექსპრესია *ex vivo* ნეიტროფილებზე აბერანტულად მაღალია, ნორმალურ ნეიტროფილებთან შედარებით (Gabunia *et al.*, 2000; 2002). აქედან გამომდინარე, შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ ქლლ პირობებში ნეიტროფილები *ex vivo* სტიმულირებულ მდგომარეობაში იმყოფებიან და გამოყენებული ციტიკინები არსებითად ვეღარ ახდენენ მათ ზედაპირზე CD64-ის ექსპრესიის გაძლიერებას. მართლაც, ცნობილია (Garcia-Garcia *et al.*, 2002) რომ B-ქლლ უჯრედებს შეუძლიათ G-CSF-ის სინთეზი და გამოყოფა, რასაც მოყვება *in vivo* CD64-ის ექსპრესიის მატება. ყურადსაღებია, აგრეთვე, რომ G-CSF და IFN $\gamma$  ერთობლივმა ეფექტმა შესაძლოა, მონოციტების მსგავსად, გამოიწვიოს ნეიტროფილების აქტივაციით ინდუცირებული უჯრედული კვდომა (აიუკ) (Miranda-Garcia *et al.*, 2013).

ამრიგად, უნდა დავასკვნათ, რომ ანტი-CD64/ანტი-CD19 ბისპეციფიურ ანტისხეულის თერაპიული ეფექტი ქლლ ავადმყოფებში ლეიკემიური უჯრედების ფაგოციტოზის გაძლიერების მიზნით შეზღუდულია, და მისი გამოყენება უნდა მიმდინარეობდეს პაციენტების ინდივიდუალური მგრძობიანობის დადგენის საფუძველზე.

ამრიგად, ჩვენი შედეგებიდან გამომდინარე შეგვიძლია გავაკეთოთ შემდეგი დასკვნები:

1. B-ქლლ პირობებში აღინიშნება მონოციტების მიერ ოფსონიზირებული და არაოფსონიზირებული *Staphylococcus aureus* ბაქტერიების ფაგოციტოზის უნარის მკაფიო დაქვეითება, რაც იმუნოდეფიციტის ერთ-ერთ მნიშვნელოვან კომპონენტს წარმოადგენს.
2. IFN $\gamma$ -ით და/ან G-CSF ციტოკინებით ქლლ მონოციტების სტიმულაციას მოჰყვა მათი ფაგოციტური ფუნქციის უკიდურესი დაკნინება რაც შეიძლება იყოს ანერგიის ან აქტივაციით ინდუცირებულ უჯრედულ კვდომას შედეგი.
3. CD64 და CD16 Fc $\gamma$  რეცეპტორების ექსპრესია ქლლ მონოციტებზე მკვეთრად არის დაქვეითებული და ეს დეფიციტი ღრმავდება დაავადების პროგრესირების და COP-ით (ციკლოფოსფამიდი, ვინკრისტინ სულფატი, პრედნიზონი) მკურნალობის შედეგად CD32 სტაბილური ექსპრესიის ფონზე.
4. ქლლ უჯრედებზე BCR-ის ნეგატიური რეგულატორების CD32-ის და CD5-ის ექსპრესიის დონე ურთიერთკორელირებს: ინდივიდუალური ქლლ კლონები ხასიათდებიან ამ რეცეპტორების ან მეტად დაბალი ანდა ჭარბი ექსპრესიით.
5. ქლლ პირობებში CD180-ის ექსპრესია არის შემცირებული, როგორც მონოციტებზე, ასევე B ლიმფოციტებზე. MEC1 უჯრედული ხაზის პროლიფერაციის პროცესში ადგილი აქვს CD32-ის რეცეპტორის ექსპრესიის მატებას CD180 რეცეპტორის შემცირების ფონზე.
6. ანტი-CD64/ანტი-CD19 ბისპეციფიურ ანტისხეულის უნარი გააძლიეროს ნეიტროფილების მიერ ლეიკემიური უჯრედების ფაგოციტოზი ჰეტეროგენულია, და არ მატულობს IFN $\gamma$ -ით და/ან G-CSF ციტოკინების ფონზე.
7. ანტი-CD64/ანტი-CD19 ბისპეციფიური ანტისხეულის თერაპიული ეფექტი ქლლ ავადმყოფებში ლეიკემიური უჯრედების ფაგოციტოზის გაძლიერების მიზნით შეზღუდულია, და მათი გამოყენება უნდა მიმდინარეობდეს ინდივიდუალური მგრძობელობის დადგენის საფუძველზე.

## ლიტერატურის სია

- Abboud G, Staumont-Salle D, Kanda A, *et al.* FcRI and FcRIII/CD16 Differentially Regulate Atopic Dermatitis in Mice. *The Journal of Immunology*. 2009; 182:6517–6526;
- Acharya M, Borland G, Edkins AL, *et al.* CD23/FcεRII: molecular multi-tasking. *ClinExpImmunol*. 2010; 162(1):12–23;
- Anderson CL, Kim J. Surmounting an impasse of FcRn structure. *Structure*. 2013; 21(11):1907–8;
- Anthony SG, Lozano-Calderon SA, Simmons BP, Jupiter JB. Gender Ratio of Dupuytren’s Disease in the Modern U.S. Population. *Hand*. 2008; 3(2):87–90;
- Auger MJ, Ross JA. The biology of macrophage. In: Lewis CE, McGee JO, editor. *The Macrophage*. Oxford University Press. 2008; 2-74;
- Balázs Z, Nashev LG, Chandsawangbhuwana C, Baker ME, Odermatt A. Hexose-6-phosphate dehydrogenase modulates the effect of inhibitors and alternative substrates of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2008; 301.1–2,117–122;
- Barton JC, Ratard RC. *Vibrio vulnificus* bacteremia associated with chronic lymphocytic leukemia, hypogammaglobulinemia, and hepatic cirrhosis: relation to host and exposure factors in 252 *V. vulnificus* infections reported in Louisiana. *Am J Med Sci*. 2006; 332(4):216–20;
- Beck FW, Eilender DS, Dandashi MH, *et al.* Factors affecting bryostatin 1-enhanced 2-CdA cytotoxicity in resistant B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Mol Med*. 2004; 14(1):113–9;
- Bichi R, Shinton SA, Martin ES, *et al.* Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl AcadSci U S A*. 2002; 99(10):6955–60;
- Bieging KT, Attardi LD. Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression. *Trends Cell Biol*. 2012; 22(2):97–106;
- Binet NR, Auquier A, Dighiero G, *et al.* A new prognosis classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981; 48:198–206;
- Bovolenta Ch, Gasperini S, McDonald PP, Cassatella MA. High Affinity Receptor for IgG (FcγRI/CD64) Gene and STAT Protein Binding to the IFN-g Response Region (GRR) Are Regulated Differentially in Human Neutrophils and Monocytes by IL-10. *Journal of Immunology*. 1998; 160:911–919;

Breslin WL, Strohacker K, Carpenter KL, Haviland DL, McFarlin BK. Mouse blood monocytes: Standardizing their identification and analysis using CD115. *Journal of Immunological Methods*. 2013; 390,1(2),1–8;

Breton CS, Nahimana A, Aubry D, *et al*. A novel anti-CD19 monoclonal antibody (GBR 401) with high killing activity against B cell malignancies. *J Hematol Oncol*. 2014; 7:33;

Brooks DG, Qiu WQ, Luster AD, Ravetch JV. Structure and expression of human IgG FcRII (CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes. *J Exp. Med*. 1989; 170:1369-1386;

Brooks DG, Qiu WQ, Luster AD, Ravetch JV. Structure and expression of human IgG FcRII (CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes. *J Exp. Med*. 1989; 170:1369-1386;

Bruhns P, Iannascoli B, England P, *et al*. Specificity and affinity of human Fc receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*. 2009; 113:3716-3725;

Buhman R, Notte P, Westhaus D, Emmerich B, Hallek M. CD40-activated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor immunotherapy: stimulation of allogenic versus autologous T cells generates different types of effector cells. *Blood*. 1999; 93(6):1992-2002;

Burger, J. A., Ghia, P., Rosenwald, A. & Caligaris-Cappio, F. The Microenvironment In Mature B-Cell Malignancies: A Target For New Treatment Strategies. *Blood*. 2009; 114:3367-3375;

Byrd JC, Murphy T, Howard RS, *et al*. Rituximab using a thrice weekly dosing schedule in B-cell chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma demonstrates clinical activity and acceptable toxicity. *J Clin Oncol*. 2001; 19:2153–2164;

Byrd JC, Gribben JG, Peterson BL, *et al*. Select high-risk genetic features predict earlier progression following chemoimmunotherapy with fludarabine and rituximab in chronic lymphocytic leukemia: justification for risk-adapted therapy. *J Clin Oncol*. 2006; 24(3):437-43;

Caporaso N, Goldin L, Plass C, *et al*. Chronic lymphocytic leukaemia genetics overview. *Br J Haematol*. 2007; 139(5):630-634;

Carver DJ, Aman MJ, Ravichandran KS. SHIP inhibits Akt activation in B cells through regulation of Akt membrane localization. *Blood*. 2000; 96:1449-1456;

Castejon R, Vargas JC, Briz M *et al*. Induction of apoptosis by 2-chlorodeoxyadenosine in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 1997; 12:1253-1257;

Chamorro S, Revilla C, Gomez N, *et al*. In vitro differentiation of porcine blood CD163- and CD163+ monocytes into functional dendritic cells. *Immunobiology*. 2004; 209:57–65;

Chaudhury C, Brooks CL, Carter DC, Robinson JM, Anderson CL. Albumin binding to FcRn: distinct from the FcRn-IgG interaction. *Biochemistry*. 2006; 45(15):4983-90;

Chen L, Widhopf G, Huynh L *et al.* Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002; 100(13):4609–4614;

Chiaretti S, Tavolaro S, Marinelli M, *et al.* Evaluation of TP53 mutations with the AmpliChip p53 research test in chronic lymphocytic leukemia: correlation with clinical outcome and gene expression profiling. *Genes Chromosomes Cancer.* 2011; 50(4):263-274;

Chiorazzi N, Ferrarini M. B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: Lessons Learned From Studies Of The B Cell Antigen Receptor. *Annu Rev Immunol.* 2003;21,841-94;

Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21:841-94;

Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular Origin(S) Of Chronic Lymphocytic Leukemia: Cautionary Notes And Additional Considerations And Possibilities. *Blood.* 2011; 17:1781-91;

Chiorazzi N, Kanti MD, Rai R, Ferrarini M. Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal Of Medicine.* 2005; 352:804-815;

Chiron D, Bekeredjian-Ding I, Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Jigo G. Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells. *Blood.* 2008; 112(6):2205-2213;

Clifford R, Schuh A. State-of-the-Art Management of Patients Suffering from Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Med Insights Oncol.* 2012; 6:165-178;

Crespo M, Bosch F, Villamor N, *et al.* ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2003; 348(18):1764-75;

Csanaky G. High endothelial venules and cell adhesion molecules in B-cell chronic lymphocytic leukaemia and related low grade B-cell lymphoma/leukaemia: II. Expression of cell adhesion molecules in lymph nodes biopsies. *Histol Histopathol.* 1994; 9(3):577-82;

Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F, *et al.* Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood.* 2004; 103:375–382;

Damle RN, Calissano C &Chiorazzi N. Chronic Lymphocytic Leukaemia: A Disease Of Activated Monoclonal B Cells. *Best Pract Res ClinHaematol.* 2010; 23:33-45;

Damle RN, Wasil T, Fais F, *et al.* Ig V Gene Mutation Status And CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators In Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood.* 1999; 94:1840-7;

Datta SR. Dudek H, Tao X, *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cellintrinsic death machinery. *Cell.* 1997; 91(2):231–241;



Davis W, Harrison PT, Hutchinson MJ, Allen JM. Two distinct regions of FcγRI initiate separate signalling pathways involved in endocytosis and phagocytosis. *EMBO J.* 1995; 14: 432-441;

Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, *et al.* CD38 And Zap-70 Are Functionally Linked And Mark CLL Cells With High Migratory Potential. *Blood.* 2007; 110:4012-4021;

Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, Ferrero E, Malavasi F. In-tandem insight from basic science combined with clinical research: CD38 as both marker and key component of the pathogenetic network underlying chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2006; 108(4):1135-44;

Decker T, Bogner C, Oelsner M, Peschel C, Ringshausen I. Antiapoptotic effect of interleukin-2 (IL-2) in B-CLL cells with low and high affinity IL-2 receptors. *Ann Hematol.* 2010; 89(11):1125-32;

Delgado J, Villamor N. Chronic lymphocytic leukemia in young individuals revisited. *Haematologica.* 2014; 99(1):4-5;

Deo YM, Graziano RF, Repp R, Winkel JG. Clinical significance of IgG Fc receptors and FcγR-directed immunotherapies. *Immunology Today.* 1997; 18(3):127-135;

Di Ianni M, Baldoni S, Rosati E, Ciurnelli R, *et al.* A new genetic lesion in B-CLL: a NOTCH1 PEST domain mutation. *Br J Haematol.* 2009; 146(6):689-91;

Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 2008; 371(9617):1017- 29;

Dillman RO, Mick R, McIntyre OR. Pentostatin in chronic lymphocytic leukemia: a phase II trial of Cancer and Leukemia group B. *Journal of Clinical Oncology.* 1989; 7(4):433-438;

Divanovic, S. *et al.* Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nature immunology.* 2005; 6(6):571-578;

Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl Med.* 2000; 343(26):1910-1916;

Dong HJ, Fang C, Fan L, *et al.* MDM2 promoter SNP309 is associated with an increased susceptibility to chronic lymphocytic leukemia and correlates with MDM2 mRNA expression in Chinese patients with CLL. *Int J Cancer.* 2012; 130(9):2054-61;

Dreger P, Dohner H, Ritgen M, *et al.* Allogeneic Stem Cell Transplantation Provides Durable Disease Control In Poor-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia: Long-Term Clinical And Mrd Results Of The German CLL Study Group CLL3x Trial. *Blood.* 2010; 116:2438-47;

Duchemin AM, Ernst LK, Anderson CL. Clustering of the high-affinity Fc receptor for IgG (FcγRI) results in phosphorylation of its associated γ-chain. *J Biol. Chem.* 1994; 269:12111-12117;

Ederberg JC, Lin CT, Lau D, Unkeless JC, Kimberly RP. The Ca<sup>2+</sup> dependence of human Fcγ receptor-initiated phagocytosis. *J Biol. Chem.* 1995; 270:22301-22307;

Efremov DG, Gobessi S, Longo PG. Signaling Pathways Activated By Antigen-Receptor Engagement In Chronic Lymphocytic Leukemia B-Cells. *Autoimmunity Reviews.* 2007; 7:102-108;

Ernst LK, van de Winkel JGJ, Chiu IM, Anderson CL. Three genes for the human high affinity Fc receptor for IgG (FcγRI) encode four distinct translation products. *J Biol. Chem.* 1992; 267:15692-15700;

Ewart M-A, Ozanne BW, Cushley W. The CD23a and CD23b proximal promoters display different sensitivities to exogenous stimuli in B lymphocytes. *Genes and Immunity.* 2002; 3: 158-164;

Fernandes M J, Rollet-Labelle E, Pare G, *et al.* CD16b associates with high-density, detergent-resistant membranes in human neutrophils. *Biochem. J.* 2006; 393: 351-359;

Fernandez JC, Durantez MN. Induction of apoptosis by 2-chlorodeoxyadenosine in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 1997; 11:1253-1257;

Ferrajoli A. Treatment of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2010; 2010:82-9;

Flesch BK, Voge K, Henrichs T, Neppert J. Fcγ receptor-mediated immune phagocytosis depends on the class of FcγR and on the immunoglobulin-coated target cell. *VoxSanguinis.* 2001; 81:128-133;

Fossati G, Bucknall RC, Edwards SW. Fcγ receptors in autoimmune diseases. *Eur J Clinical Investigation.* 2001; 31:821-831;

Frank M., Walker R.C., Lanzilotta W.N., Prestegard J.H., Barb A.W. Immunoglobulin G1 Fc domain motions: implications for Fc engineering. *J. Mol. Biol.* 2014; 426(8):1799-1811;

Fridman WH, Bonnerot C, Daeron M, Amigorena S, Teillaud JL, Sautes C. Structural bases of Fcγ receptor functions. *Immunol. Rev.* 1992; 125:49-76;

Fridman WH, Teillaud JL, Bouchard C, *et al.* Soluble Fcγ receptors. *J Leukocyte Biol.* 1993; 54: 504-512;

Fruman DA. Phosphoinositide 3-kinase and its targets in B-cell and T-cell signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 2004; 16(3):314-20;

Fujimoto M, Fujimoto Y, Poe JC, *et al.* CD19 regulates Src family protein tyrosine kinase activation in B lymphocytes through processive amplification. *Immunity.* 2000; 13:47-5;

Fujita K, Akasaka Y, Kuwabara T, *et al.* Pathogenesis of lupus-like nephritis through autoimmune antibody produced by CD180-negative B lymphocytes in NZBWF1 mouse. *Immunol Lett.* 2012; 144(1-2):1-6;

Gabunia Kh, Kardava L, Kulikova N, *et al.* Phagocytosis and the regulation of apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia. *Bulletin of the Georgian Academy of Sciences.* 2002; 166.1;

Galletti J, Cañones C, Morande P, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia cells bind and present the erythrocyte protein band 3: possible role as initiators of autoimmune hemolytic anemia. *J Immunol.* 2008; 181(5):3674–83;

Gary-Gouy H, Sainz-Perez A, Marteau JB, *et al.* Natural phosphorylation of CD5 in chronic lymphocytic leukemia B cells and analysis of CD5-regulated genes in a B cell line suggest a role for CD5 in malignant phenotype. *J Immunol.* 2007; 1,179(7):4335-44;

Gary-Gouy HL, Harriague J, Dalloul A, Donnadiou E, Bismuth G. CD5-Negative Regulation of B Cell Receptor Signaling Pathways Originates from Tyrosine Residue Y429 Outside an Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif. *J. Immunol.* 2002; 168:232–239;

Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental Influences In Chronic Lymphocytic Leukaemia: The Role Of Antigen Stimulation. *Journal Of Internal Medicine.* 2008; 264:549-562;

Ghia P, Prato G, Scielzo C, *et al.* Monoclonal CD5 and CD5 B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly. *Blood.* 2004; 103:2337-2342;

Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, *et al.* Geographic Patterns And Pathogenetic Implications Of Ighv Gene Usage In Chronic Lymphocytic Leukemia: The Lesson Of The Ighv3-21 Gene. *Blood.* 2005; 105:1678-85;

Ghia P, Scielzo C, Frenquelli M, Muzio M, Caligaris-Cappio F. From normal to clonal B cells: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) at the crossroad between neoplasia and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2007; 7(2):127-31;

Giné, E, Martinez A, Villamor N, Lopez-Guillermo, *et al.* 2010. Expanded And Highly Active Proliferation Centers Identify A Histological Subtype Of Chronic Lymphocytic Leukemia (“Accelerated” Chronic Lymphocytic Leukemia) With Aggressive Clinical Behavior. *Haematologica.* 2010; 95:1526-1533;

Goldin LR, Lanasa MC, Slager SL, *et al.* Common Occurrence 173 Of Monoclonal B-Cell Lymphocytosis Among Members Of High-Risk Cll Families. *Br J Haematol.* 2010; 151:152-8;

Gosselin EJ, Wardwell K, Gosselin DR, Alter N, Fisher JL, Guyre PM. Enhanced antigen presentation using human Fcγ receptor (monocyte/macrophage)-specific immunogens. *Blood.* 1992; 3477-3481;

- Grdiša M. Sensitivity of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia to Rituximab and Campath-1H and Correlation with the Expression of Cell Cycle Regulatory Proteins. *Basic Sciences*. 2004; 45(2):136-141;
- Haagen IA, Geerars AJ, Clark MR, van de Winkel JG. Interaction of human monocyte Fc gamma receptors with rat IgG2b. A new indicator for the Fc gamma RIIa (R-H131) polymorphism. *J Immunol*. 1995; 154(4):1852-60;
- Hall AM, Vickers MA, McLeod E, Barker RN. Rh autoantigen presentation to helper T cells in chronic lymphocytic leukemia by malignant B cells. *Blood*. 2005; 105(5):2007-15;
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, *et al*. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008; 111(12):5446-56;
- Hallek M. Prognostic Factors In Chronic Lymphocytic Leukemia. *Ann Oncol*. 2008; 19(14): 51-53;
- Hallek M. Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013; 2013:138-50;
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 1994; 94:1848-1854;
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) Genes Are Associated With A More Aggressive Form Of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 1999; 94:1848-54;
- Hermesh T, Moran TM, Jain D, López CB. Granulocyte colony-stimulating factor protects mice during respiratory virus infections. *PLoS one*. 2012; 7(5):e37334;
- Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine Toll-like receptor 2. *J Immunol*. 2000; 165:618-622;
- Hodgson K, Ferrer G, Montserrat E, Moreno K. Chronic Lymphocytic Leukemia And Autoimmunity: A Systematic Review. *Haematologica*. 2011; 96:752-761;
- Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al. Hematology: Basic Principles and Practice (3rd Edition). *Churchill Livingstone*. 2000; 667-701;
- Honeychurch J, Tutt AL, Valerius T. Therapeutic efficacy of Fc gamma RI/CD64-directed bispecific antibodies in B-cell lymphoma. *Blood*. 2000; 96(10):3544-3552;

- Horejs-Hoeck J, Hren A, Mudde GC, Woisetschläger M. Inhibition of immunoglobulin E synthesis through FcγRII (CD32) by a mechanism independent of B-cell receptor co-cross-linking. *Immunology*. 2005; 115(3):407–415;
- Huang Z, Hunter S, Kim M, Indik Z, Schreiber A. The effect of phosphatases SHP-1 and SHIP-1 on signaling by the ITIM- and ITAM-containing Fcγ receptors FcγRIIB and FcγRIIA. *J LeukocBiol*. 2003; 73(6):823–9;
- Hunter Sh, Indik ZK, Kim MK, Cauley MD, Park JG, Schreiber AD. Inhibition of Fcγ receptor-mediated phagocytosis by a nonphagocytic Fcγ receptor. *Blood*. 1998; 91(5):1762-1768;
- Jaksic O, Paro M M, KardumSkelin I, Kusec R, Pejsa V & Jaksic B. CD38 On B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Has Higher Expression In Lymph Nodes Than In Peripheral Blood Or Bone Marrow. *Blood*. 2004; 103:1968-9;
- Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, *et al*. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of Th2 inflammation. *Science*. 2011; 332(6035):1284–1288;
- Johansson P, Eisele L, Klein-Hitpass L, *et al*. Percentage of smudge cells determined on routine blood smears is a novel prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research*. 2010; 34:892-898;
- Jurlander J. The cellular biology of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Haematol*. 1998; 27:29-52;
- Kalos M, Levine BL, Porter DL, *et al*. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *SciTransl Med*. 2011; 10;3(95):95ra73;
- Kay NE, Wasil T. Survival of chronic lymphocytic leukemia cells: CD40L and the vascular endothelial growth factor (VEGF) connection. *Leukemia*. 2005; 19, 531–532;
- Keating M J. Chronic Lymphocytic Leukemia In The Next Decade: Where Do We Go From Here? *Semin Hematol*. 1998; 35:27-33;
- Kimby E, Rincón J, Patarroyo M, Mellstedt H. Expression of adhesion molecules CD11/CD18 (Leu-CAMs, beta 2-integrins), CD54 (ICAM-1) and CD58 (LFA-3) in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1994; 13(3-4):297-306;
- Kitanaka A, *et al*. CD38 ligation in human Bcellproganitors triggers tyrosine phosphorylation CD19 and association of CD19 with lyn and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol*. 1997; 159:184-191;

Kosaka K, Fujiwara H, Tatsumi K, *et al.* Human chorionic gonadotropin (HCG) activates monocytes to produce interleukin-8 via a different pathway from luteinizing hormone/HCG receptor system. *J Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2002; 87(11); 5199-5208;

Koyama S, Sato E, Nomura H, *et al.* Monocyte chemotactic factors released from type II pneumocyte-like cells in response to TNF- $\alpha$  and IL-1 $\alpha$ . *Eur Respir J*. 1999; 13(4):820-8;

Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AH, *et al.* Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*. 2002; 416:603–607;

Lennartz MR. Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. *IJBCB*. 1999; 415-430;

Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol*. 2005; 17:313-8;

Leto TL, Geiszt M. Role of Nox family NADPH oxidases in host defense. *Antioxid Redox Signal*. 2006; 8(9-10):1549-61;

Lewis RE, Cruse JM, Pierce S, Lam J, Tadros Y. Surface and cytoplasmic immunoglobulin expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Exp Mol Pathol*. 2005; 79(2):146-50;

Li DH, Tung JW, Tarner IH, *et al.* CD72 Down-Modulates BCR-Induced Signal Transduction and Diminishes Survival in Primary Mature B Lymphocytes. *The Journal of Immunology*. 2006; 176:5321–5328;

Li M, Wirthmueller U, Ravetch JV. Reconstitution of human Fc $\gamma$ RIII cell type specificity in transgenic mice. *J Exp. Med*. 1996; 183:1259-1263;

Liu H, Perlman H, Pagliari LJ, Pope RM. Constitutively Activated Akt-1 Is Vital for the Survival of Human Monocyte-Differentiated Macrophages Role of Mcl-1, Independent of Nuclear Factor (Nf)- $\kappa$ b, Bad, or Caspase Activation. *The Journal of experimental medicine*. 2001; 194(2):113–126;

Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunological Reviews*. 2010; 234:45–54;

Lobell RB, Arm JP, Raizman MB, Austen KF, Katz HR. Intracellular degradation of Fc $\gamma$ RIII in mouse bone marrow culture-derived progenitor mast cells prevents its surface expression and associated function. *J Biol. Chem*. 1993; 268:1207-1212;

Löffler A, Gruen M, Wuchter C, *et al.* Efficient elimination of chronic lymphocytic leukaemia B cells by autologous T cells with a bispecific anti-CD19/anti-CD3 single-chain antibody construct. *Leukemia*. 2003; 17:900–909;

Lopez DH, Trevani AS, Salamone G, *et al.* Acidic pH increases the avidity of Fc $\gamma$ R for immune complexes. *Immunology*. 1999; 98:450-455;

Lüttgau S, Deppe D, Meyer S, *et al.* Immunotherapy of B-Cell Lymphoma with an Engineered Bispecific Antibody Targeting CD19 and CD5. *Antibodies*. 2013; 2:338-352;

Mainou-Fowler T, Proctor SJ, Miller S, Dickinson AM. Expression and production of interleukin 4 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma*. 2001; 42(4):689-98;

Mao Z, Quintanilla-Martinez L, Raffeld M, *et al.* IgVH mutational status and clonality analysis of Richter's transformation. *Am J SurgPathol* 2007; 31(10):1605-1614;

Martin F, Kearney JF. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *CurrOpinImmunol*. 2001; 13(2):195-201;

Masuda M, Roor D. Association of all three types of FcγR (CD64, CD32, CD16) with a γ chain homodimer in cultured human monocytes. *J Immunol*. 1993; 151:6382-6388;

Michels J, O'Neill JW, Dallman CL, *et al.* Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage. *Oncogene*. 2004; 23:4818-4827;

Minuzzo S, Indraccolo S, Tosello V, *et al.* Heterogeneous intracellular expression of B-cell receptor components in B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) cells and effects of CD79b gene transfer on surface immunoglobulin levels in a B-CLL-derived cell line. *Br J Haematol*. 2005; 130(6):878-89;

Mitchell WB, Pinheiro MP, Boulad N, *et al.* Effect of thrombopoietin receptor agonists on the apoptotic profile of platelets in patients with chronic immune thrombocytopenia. *Am J Hematol*. 2014; 89(12):228-34;

Molica S. Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Lymphoma*. 2006; 47:1477-80;

Mongini PK, Jackson AE, Tolani S, *et al.* Role of complement-binding CD21/CD19/CD81 in enhancing human B cell protection from Fas-mediated apoptosis. *J Immunol*. 2003; 171(10):5244-54;

Montserrat E, Lopez-Lorenzo JL, Manso F, *et al.* Fludarabine in resistant or relapsing B-cell chronic lymphocytic leukemia: the Spanish Group experience. *Leuk Lymphoma*. 1996; 21(5-6):467-472;

Morabito F, Filangeri M, Callea I, *et al.* Bcl-2 protein expression and p53 gene mutation in chronic lymphocytic leukemia: correlation with in vitro sensitivity to chlorambucil and purine analogs. *Haematologica*. 1997; 82(1):16-20;

Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*. 2006; 107: 265-76;

Muroi M, Tanamoto K. TRAF6 distinctively mediates MyD88- and IRAK-1-induced activation of NF-kappaB. *J Leukoc Biol.* 2008; 83(3):702-7;

Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, *et al.* Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood.* 2008; 112:188–195;

Muzio M, Fonte E, Caligaris-Cappio F. Toll-like Receptors in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012; 4(1):e2012055;

Nagai Y, Shimazu R, Ogata H, Akashi S, Sudo K, Yamasaki H, Hayashi S, Iwakura Y, Kimoto M, Miyake K. Requirement for MD-1 in cell surface expression of RP105/CD180 and B-cell responsiveness to lipopolysaccharide. *Blood.* 2002; 99:1699–1705;

Nauseef WM Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem Cell Biol.* 2004; 22(4):277-91;

Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, *et al.* Percentage of smudge cells on routine blood smear predicts survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2009; 27(11):1844–9

Nowakowski GS, Hoyer JD, Shanafelt TD, *et al.* Using smudge cells on routine blood smears to predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: A universally available prognostic test. *Mayo Clin Proc.* 2007; 82:449–453;

Oakey RJ, Howard TA, Hogarth PM, Tani K, Seldin MF. Chromosomal mapping of the high affinity FcγR gene. *Immunogenetics.* 1992; 35:279-282;

O'Brien SG. Imatinib For Chronic Myeloid Leukaemia: A Nice Mess. *Lancet.* 2001; 358:1902-3;

Ochi H, Watanabe T. Negative regulation of B cell receptor-mediated signaling in B-1 cells through CD5 and Ly49 co-receptors via Lyn kinase activity. *Int Immunol.* 2000; 12(10):1417-23;

Onguru D, Liang YM, Elliot J, *et al.* CD23b Isoform Expression in Human Schistosomiasis Identifies a Novel Subset of Activated B Cells. *Infect Immun.* 2011; 79(9):3770–3777;

Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, *et al.* Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood.* 2002; 100(4):1177-84;

Packham G, Stevenson F. The Role Of The B-Cell Receptor In The Pathogenesis Of Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Semin Cancer Biol.* 2010; 20:391-9;

Parikh SA, Kay NE, Shanafelt TD. How we treat Richter syndrome. *Blood.* 2014; 123(11):1647-57;

Parrens M, Sawan B, Dubus P, Lacombe F, *et al.* Primary digestive Richter's syndrome. *Mod Pathol.* 2001; 14(5):452-7;



Patten PE, Chu CC, Albesiano E, *et al.* IGHV-unmutated and IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia cells produce activation-induced deaminase protein with a full range of biologic functions. *Blood*. 2012; 120(24):4802-11;

Petersen AJ, Brown RD, Gibson J, *et al.* Nucleoside transporters, bcl-2 and apoptosis in CLL cells exposed to nucleoside analogues in vitro. *Eur J Haematol*. 1996; 56(4):213-220;

Podhorecka M, Halicka D, Klimek P, *et al.* Resveratrol increases rate of apoptosis caused by purine analogues in malignant lymphocytes of chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol*. 2011; 90(2):173-83;

Porakishvili N, Kardava L, Jewell AP, Yong K, Glennie M, Akbar A, Lydyard PM. Perforin expressing CD4+T cells in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) are cytotoxic. *Haematologica*. 2004; 89:435-443;

Porakishvili N, Kulikova N, Manoussaka M, *et al.* Differential expression of CD180 and sIgM by B chronic lymphocytic leukaemia cells (B-CLL) using mutated and unmutated Vh genes. *Blood*. 2004; 104,768a (abstract);

Porakishvili N, Kulikova N, Jewell AP *et al.* Differential expression of CD180 and IgM by B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells using mutated and unmutated immunoglobulin VH genes. *Br J Haematol*. 2005; 131:313-319;

Porakishvili N, Memon A, Vispute K, *et al.* CD180 functions in activation, survival and cycling of B chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol*. 2011; 153:486-498;

Porakishvili N, Vispute K, Rajakaruna N, Andrew S, Kulikova N, Tsertsvadze T, *et al.* Re-wiring of sIgM-mediated signaling by CD180-toll-like receptor in CLL. *Molecular Medicine*. 2015; 15(1):459;

Porakishvili N, Roschupkina T, T Kalber, Jewell AP, Young K, Patterson K, Lydyard PM. Expansion of CD4+ T Cells with a cytotoxic phenotype in patients with B-Chronic Lymphocytic Leukaemia (B-CLL). *Clin Exp Immunol*. 2001; 126:29-36;

Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells In Chronic Lymphoid Leukemia. *N Engl J Med*. 2011; 365: 725-33;

Raghavan M, Bjorkman PJ. Fc receptors and their interactions with immunoglobulins. *Annu Rev Dev Cell Biol*. 1997; 15:17-22;

Rai KR, Sawitsky A, Cronkite E P, *et al.* Clinical Staging Of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 1997; 46:219-34;

Rai KR. The Natural History Of CLL And New Prognostic Markers. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2008; 6:4-5;

- Rasi S, Monti S, Spina V, *et al.* Analysis of *NOTCH1* mutations in monoclonal B-cell lymphocytosis. *Haematologica*. 2012; 97(1): 153–154;
- Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, *et al.* Zap-70 Compared With Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Mutation Status As A Predictor Of Disease Progression In Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2004; 351, 893-901;
- Rasul E, Salamon D, Nagy N, *et al.* The MEC1 and MEC2 lines represent two CLL subclones in different stages of progression towards prolymphocytic leukemia. *PLoS One*. 2014; 9(8):e106008;
- Ravetch J. In vivo veritas: the surprising roles of Fc receptors in immunity. *Nat Immunol*. 2010; 11(3):183-5;
- Ravetch JV, Kinet J-P. Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol*. 1991; 9:457-492;
- Roitt IM, Delves PJ. Roitt's Essential Immunology (10th Edition). *Blackwell Science*. 2001; 1-20;
- Rosati E, Sabatini R, Rampino G, *et al.* Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood*. 2009; 113(4):856–65;
- Ross GD. Role of the lectin domain of Mac-1/CR3 (CD11b/CD18) in regulating intercellular adhesion. *Immunol Res*. 2002; 25(3):219-27;
- Rossmann ED, Jeddi-Tehrani M, Österborg A, Mellstedt H. T-cell signaling and costimulatory molecules in B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): an increased abnormal expression by advancing stage. *Leukemia*. 2003; 17:2252–2254;
- Rossmann ED, Lewin N, Jeddi-Tehrani M, Osterborg A, Mellstedt H. Intracellular T cell cytokines in patients with B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). *Eur J Haematol*. 2002; 68:299–306;
- Sanz L, Garcia-Marco JA, Casanova B, *et al.* Bcl-2 family gene modulation during spontaneous apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *BiochemBiophys Res Commun*. 2004; 315(3):562-7;
- Schwarzer E, Arese P. Phagocytosis of malarial pigment hemozoin inhibits NADPH-oxidase activity in human monocyte-derived macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 23;1316(3):169-75;
- Sensitization of IL-2 Signaling through TLR-7 Enhances B Lymphoma Cell Immunogenicity. Tomic J, White D, Shi Y, *et al.* *Journal of Immunology*. 2006; 176:3830–39;
- Shanafelt TD, Jenkins G, Call TG, *et al.* Validation of a new prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2009; 115(2):363-372;

Shanafelt TD, Kay NE, Rabe KG, et al. Brief Report: Natural History Of Individuals With Clinically Recognized Monoclonal B-Cell Lymphocytosis Compared With Patients With Rai 0 Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal Of Clinical Oncology*. 2009; 27:3959-3963;

Shanafelt TD, Kay NE, Rabe KG, et al. Survival Of Patients With Clinically Identified Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (Mbl) Relative To The Age- And SexMatched General Population. *Leukemia*. 2012; 26:373-6;

Shanafelt TD. Improving Treatment For Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematology*. 2012; 17(1):133-6;

Shimoni A, Marcus H, Canaan A, et al. A Model for Human B-Chronic Lymphocytic Leukemia in Human/Mouse Radiation Chimera: Evidence for Tumor-Mediated Suppression of Antibody Production in Low-Stage Disease. *Blood*. 1997; 89(6):2210–2218;

Shoenfelt J, Mitkus RJ, Zeisler R, et al. Involvement of TLR2 and TLR4 in inflammatory immune responses induced by fine and coarse ambient air particulate matter. *J Leukoc Biol*. 2009; 86(2):303-12;

Siodras S, Samonis G, Keating MJ, Kontoyiannis DP. Infection and immunity in chronic lymphocytic leukemia. *Mayo ClinProc*. 2000; 75:1039-1054;

Stacchini A, Aragno M, Vallario A, et al. MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leuk Res*. 1999; 23:127-136;

Stein C, Schubert I, Fey GH. Natural Killer (NK) and T-Cell Engaging Antibody-Derived Therapeutics. *Antibodies*. 2012; 1:88-123;

Stuart SG, Simister NE, Clarkson SB, et al. Human IgG Fc receptor (hFcRII; CD32) exists as multiple isoforms in macrophages, lymphocytes and IgG-transporting placental epithelium. *EMBO J*. 1989; 8:3657-3667;

Sutton L, Chavret S, Tornilhac O, et al. Autologous stem cell transplantation as a first-line treatment strategy for chronic lymphocytic leukemia: a multicenter, randomized, controlled trial from the SFGM-TC and GFLLC. *Blood*. 2011; 117(23):6109–6119;

Tate BJ, Witort E, McKenzie IF, Hogarth PM. Expression of the high responder/non-responder human FcγRII. Analysis by PCR and Transfection into FcR-COS cells. *Immunol. Cell Biol*. 1992; 70:79-87;

Tavassoli M, Hardy CL. Molecular basis of homing of intravenously transplanted stem cells to the marrow. *Blood*. 1990; 76(6):1059-70;

Thomas R, Ribeiro I, Shepherd P, et al. Spontaneous clinical regression in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2002; 116:341;

Tobias PS, Soldau K, and Ulevitch RJ. Identification of a lipid binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *JBiol Chem.* 1989; 264:10867-10871;

Tsertsvadze T, Mitskevich N, Ghirdaladze D, Porakishvili N. Correlation of the expression of CD32 and CD180 receptors on CLL cells and MEC1 Cell Line. *Georgian Medical News.* 2015; 2(240):56-59;

Tsertsvadze T, Mitskevich N, Ghirdaladze D, Porakishvili N. Aberrant expression of Fcγ receptors and toll like receptor CD180 on monocytes from patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Georgian Medical News.* 2015; 2(239):35-38;

Tsimberidou AM, Keating MJ. Treatment Of Fludarabine-Refractory 187 Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer.* 2009; 115, 2824-36;

Tsimberidou AM, O'Brien S, Kantarjian HM, *et al.* Hodgkin transformation of chronic lymphocytic leukemia: the M. D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer.* 2006; 107(6):1294-302;

Unkeless JC, Shen Z, Lin CW, DeBeus E. Function of human FcγRIIA, FcγRIIIB. *Semin. Immunol.* 1995; 7:37-44;

van Vugt MJ, Heijnen IAFM, Capel PJA, *et al.* FcRγ-chain is essential for both surface expression and function of human FcγRI (CD64) in vivo. *Blood.* 1996; 87(9): 3593-3599;

Vance BA, Huizinga TWJ, Wardwell K, Guyre PM. Binding of monomeric human IgG defines an expression polymorphism of Fc gamma RIII on large granular lymphocyte/natural killer cells. *J Immunol.* 1993; 151:6429-6439;

Varol C, Landsman L, Darin K. *et al.* Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med.* 2007; 204(1):171-180;

Vences-Catalán F, Rajapaksa R, Levy S, Santos-Argumedo L. The CD19/CD81 complex physically interacts with CD38 but is not required to induce proliferation in mouse B lymphocytes. *Immunology.* 2012; 137(1): 48-55;

Villadangos JA. Hold on the monocytes are coming! *Immunity.* 2007; 26:390-2;

Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wylie DH, *et al.* Regulation of Toll-Like Receptors in Human Monocytes and Dendritic Cells. *The Journal of Immunology.* 2001; 166:249-255;

vonBergwelt-Baildon M, Maecker B, Schultze J, Gribben JG. CD40 activation: potential for specific immunotherapy in B-CLL. *Ann Oncol.* 2004;15(6):853-7;

Vossebeld A. Heterotopic FcγR clusters evoke a synergistic Ca<sup>2+</sup>-response in human neutrophils. *Blood.* 1999; 5:154-161;

Weidle UH, Tiefenthaler G, Weiss EH, *et al.* The Intriguing Options of Multispecific Antibody Formats for Treatment of Cancer. *Cancer Genomics & Proteomics*. 2013; 10:1-18;

Wickremasinghe RG, Prentice AG, Steele AJ. p53 and Notch signaling in chronic lymphocytic leukemia: clues to identifying novel therapeutic strategies. *Leukemia*. 2011; 25(9):1400–1407;

Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, *et al.* ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003; 101(12):4944-51;

Willems F, Marchant A, Delville J P, *et al.* Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol*. 1994; 24:1007–1009;

Winkel JG, Anderson CL. Biology of human IgG Fc receptors. *J Leukoc.Biol*. 1991; 49:511-524;

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990; 249:1431-1433;

Wright SD, Silverstein SC. Tumor-promoting phorbol esters stimulate C3b and C3b' receptor-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. *J Exp Med*. 1982; 156:1149-64;

Wu H, Bondada S. Positive and negative roles of CD72 in B cell function. *Immunologic Research*. 2002; 25(2):155-166;

Yamamoto K., Sugita N., Kabayashi T., Okuda K., van de Winkel JGJ., Yoshie H. Evidence for a novel polymorphism affecting both N-linked glycosylation and ligand binding of the IgG receptor IIIB (CD16). *Tissue antigens*. 2001; 57:363-366;

Yang J, Zhang L, Yu C, *et al.* Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res*. 2014; 2:1;

Youinou P, Pers JO, Jamin C, Lydyard PM. CD5-positive B cells at the crossroads of B cell malignancy and nonorgan-specific autoimmunity. *Pathologie Biologie*. 2000; 48(6)574–576;

Yu M, Wang H, Ding A, *et al.* HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock*. 2006; 26(2):174-9;

Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, *et al.* Tp53 Mutation Profile In Chronic Lymphocytic Leukemia: Evidence For A Disease Specific Profile From A Comprehensive Analysis Of 268 Mutations. *Leukemia*. 2010; 24:2072-9;

Zhou MJ, Lublin DM, Link DC, Brown EJ. Distinct tyrosine kinase activation and Triton X-100 insolubility upon FcγRII or FcγRIIIB ligation in human polymorphonuclear leukocytes. Implications for immune complex activation of the respiratory Burst. *J Biol. Chem*. 1995; 270: 13553-13560;

Zupo S, Dono M, Massara R, *et al.* Expression Of CD5 And CD38 By Human CD5- B Cells: Requirement For Special Stimuli. *Eur J Immunol*. 2005; 24:1426-33;