ივ.ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ბიოლოგიის ფაკულტეტი იმუნოლოგიის კათედრა

ხათუნა მურთაზის ასული გაბუნია

დისერტაცია

პოლიმორფულბირთვიანი ნეიტროფილების ფუნქციური აქტივობა **B**-ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიით დაავადებულ პირებში

ხელმძღვანელი: ბიოლოგიურ მეცნიერებათა დოქტორი
პროფ. ნ. ფორაქიშვილი

2003 წელი

შინაარსი

შემოკლებების სია

ბსა	ბისპეციფიური ანტისხეული
გფა	გუანოზინტრიფოსფატი
ლ	ლიტრი
მპო	მიელოპეროქსიდაზა
მკგ	მიკროგრამი
მკლ	მიკროლიტრი
მლ	მილილიტრი
მკა	მონოკლონური ანტისხეული
ნლტ	ნიტროლურჯი ტეტრაზოლიუმის ტესტი
პკC	პროტეინკინაზაC
პმნ	პოლიმორფულბირთვიანი ნეიტროფილები
სოდ	სუპეროქსიდდისმუტაზა
ფმა	ფორბოლ მირისტატ აცეტატი
ჰმკ	ჰისტოშეთავსებულობის მთავარი კომპლექსი
ACOP	ადრიაბლასტინი, ციკლოფოსფამიდი, ონკოვინი, პრედნიზოლონი
BCR	**B**-უჯრედული რეცეპტორი
bFGF	ფიბრობლასტების ზრდის ძირითადი ფაქტორი
B-ქლლ	**B**-ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემია
BSA	ხარის შრატის ალბუმინი
CD	დიფერენცირების კლასტერი
COP	ციკლოფოსფამიდი, ონკოვინი, პრედნიზოლონი
DAG	დიაცილგლიცეროლი
EB	ეთიდიუმ ბრომიდი
FcR	**Fc** რეცეპტორი
FCS	ხბოს ემბრიონული შრატი
FITC	ფლუორესცინ იზოთიოციანატიციანატი
fMLP	**N**-ფორმილ-მეთიონილლეუცილფენილალანინი
G-CSF	გრანულოციტების კოლონიების მასტიმულირებელი ფაქტორი
GM-CSF	გრანულოციტ/მაკროფაგების კოლონიების მასტიმულირებელი ფაქტორი

HLA	ადამიანის ლეიკოციტური ანტიგენი
ICAM	უჯრედშორისი ადჰეზიური მოლეკულა
IFN	ინტერფერონი
IL	ინტერლეიკინი
Ig	იმუნოგლობულინი
IP_3	ინოზიტოლ 1,4,5 ტრიფოსფატი
L	ლიგანდი
LAP	ლეიკოციტების ტუტე ფოსფატაზა
LGL	დიდი გრანულარული ლიმფოციტები
LFA	ლეიკოციტების ფუნქციური ანტიგენი
MHC	ჰისტოშეთავსებულობის მთავარი კომპლექსი
NADP	ნიკოტინამიდადენინდინუკლეოტიდფოსფატი
NK	ბუნებრივი კილერი
NO	აზოტოვანი ოქსიდი
O_2^-	სუპეროქსიდის ანიონი
PBS	ფოსფატური ბუფერი
TCR	T უჯრედული რეცეპტორი
TNF	სიმსივნის ნეკროზული ფაქტორი

შესავალი

B ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემია (B-ქლლ) წარმოადგენს კლონურ ნეოპლაზიას, რომელიც ხასიათდება მოსვენებული, G0/G1 ფაზაში მყოფი, ლიმფოიდური უჯრედების თანდათანობითი აკუმულაციით, რომლებიც ხანგრძლივი სიცოცხლისუნარიანობით უფრო გამოირჩევიან, ვიდრე აქტიური პროლიფერაციით [Nelson et al., 1999]. B-ქლლ უჯრედები მორფოლოგიურად მსგავსია მცირე მომწიფებული B ლიმფოციტებისა, მაგრამ ისინი ფუნქციურად მოუმწიფებელი და იმუნოლოგიურად არაკომპეტენტურნი არიან [Caligaris-Cappio et al., 2000; Matutes et al., 2000].

B-ქლლ მოზრდილთა ლეიკემიების ყველაზე გავრცელებული ფორმაა დასავლეთის ქვეყნებში და შეადგენს ყველა ლეიკემიის 25%, ხოლო აღმოსავლეთის ქვეყნებში მისი გავრცელების სიხშირე 5%-ზე ნაკლებია. იგი ძირითადად გვხვდება ხანდაზმულ (50 წელზე მეტი) ადამიანებში [Nelson et al., 1999; Foon et al., 1990]. ამ დაავადების წარმოშობის მიზეზი ჯერ-ჯერობით უცნობია, სავარაუდოდ იგი არ უკავშირდება მაიონიზებელი რადიაციის, მაალკილირებელი აგენტებისა თუ ქიმიური ნივთიერებების მოქმედებას [Kenneth et al., 1990; Hoffman., 2000]. დაავადებულთა ნათესავებს შორის B-ქლლ-სა და სხვა B-უჯრედული ლიმფოპროლიფერაციული დაავადებების სიხშირე მიუთითებს გენეტიკური ფაქტორის შესაძლო როლზე.

B-ქლლის შესწავლის სწრაფი პროგრესის მიუხედავად, დღეისათვის არ არსებობს B-ქლლ-ის მკურნალობის ეფექტური მეთოდი. ყველაზე მეტად გავრცელებულია ქიმიოთერაპია ციტოტოქსიკური საშუალებებით (ქლორამბუცილი, ციკლოფოსფამიდი, პურინის

ანალოგები), რომლის პარალელურადაც ტარდება სიმპტომური მკურნალობა (ანტიბიოტიკები, იმუნოგლობულინის ინტრავენური შეყვანა და ა. შ.), მაგრამ მათი ეფექტი მხოლოდ დროებითია და ემსახურება სიცოცხლის გახანგრძლივებას და არა საბოლოო განკურნებას, გარდა ამისა, ციტოტოქსიკური აგენტები თრგუნავენ არამარტო პათოლოგიურ, არამედ ნორმალურ უჯრედებსაც და ხელს უწყობენ მეორეული გართულებების განვითარებას. აქედან გამომდინარე, დიდი მნიშვნელობა ენიჭება მკურნალობის ალტერნატიული მეთოდების შემუშავებას.

მიუხედავად იმისა, რომ პოლიმორფულბირთვიანი ნეიტროფილების (პმნ) ბიოლოგიის მრავალი ასპექტი შესწავლილია, ბოლო წლებში ინტერესი გაჩნდა პმნ-ების ანტისიმსივნური პოტენციალის მიმართ [Carlo et al., 2001; Mollinedo et al., 1999; Lichtenstein et al., 1990]. პმნ-ებს ნაწილობრივ გააჩნიათ ბუნებრივი ანტისიმსივნური აქტივობა [Kindzelskii et al.,1999; Dallegri et al., 1992]. ამასთან ერთად, სიმსივნური უჯრედების განადგურების მიღწევა შესაძლებელია FcγR-ებით გაშუალებული ფაგოციტოზისა და ანტისხეულდამოკიდებული უჯრედული ციტოტოქსიურობის (ADCC) მეშვეობით ბისპეციფიური (ბსა) და მონოკლონური (მკა) სიმსივნსაწინააღმდეგო ანტისხეულების გამოყენებით, რაც სიმსივნის თერაპიის პროგრესულ მიდგომას წარმოადგენს [Winkel et al., 1997; Elsasser et al., 1997]. ამ მიდგომის პრაქტიკაში გამოყენებისათვის საჭიროა ნეიტროფილების ფუნქციის შესწავლა და ოპტიმიზაცია.

ნეიტროფილების ფუნქციური აქტივობა B-ქლლს დროს ბოლომდე არ არის შესწავლილი. ცნობილია, რომ B-ქლლ პაციენტებში მომატებულია ინფექციური გართულებების სიხშირე. შესაძლებელია, ამის მიზეზი ფაგოციტური სისტემის დარღვევებიც იყოს. ლიტერატურული მონაცემები B-ქლლს დროს ნეიტროფილების

ფუნქციების შესახებ ძალიან მცირეა. ამის გამო, ჩვენ შევეცადეთ შეგვესწავლა ნეიტროფილების ფუნქციების ზოგიერთი ასპექტი B-ქლლს დროს, რადგანაც ამით შესაძლებელი იქნება, ერთი მხრივ, ინფექციური გართულებების მიმართ მგრძნობელობის მიზეზის გამორკვევა, მეორე მხრივ კი, იმის დადგენა, რამდენად შესაძლებელია დაავადების საწინააღმდეგოდ პმნ-ზე დაფუძნებული იმუნოთერაპიული მეთოდების შემუშავება.

კვლევის მიზანი და ამოცანები: კვლევის მიზანს წარმოადგენდა შეგვესწავლა თუ რამდენად სრულფასოვანია ნეიტროფილების ფუნქციები B-ქლლ-ს დროს და მიგვეკვლია პმნ-ის იმ დარღვევებისათვის, რაც ამ პაციენტებში განვითარებულ ჰიპოგამაგლობულემიასთან ერთად იწვევს ინფექციებისადმი მომატებულ მგრძნობელობას. ამ მიზნის მისაღწევად დაისახა შემდეგი ამოცანები: ***in vitro*** შეგვესწავლა B-ქლლ პაციენტების ნეიტროფილების ფუნქციური აქტივობის შემდეგი მახასიათებლები:

1. ჟანგბადის რადიკალების გამოყოფა ფორბოლ მირისტ ატაცეტატით (ფმა) სტიმულირებული ნიტროლურჯი ტეტრაზოლიუმის (ნლტ) ტესტის საშუალებით.
2. ტუტე ფოსფატაზას აქტივობის განსაზღვრა.
3. მიელოპეროქსიდაზას ექსპრესიის განსაზღვრა.
4. ჟანგბადური აფეთქების შეფასება ქემილუმინესცენციით.
5. ოფსონიზირებული ***Staphylococcus aureus***-ის შთანთქმის უნარი.
6. სხვადასხვა FcγR ექსპრესია.
7. B-ქლლ დაავადებულთა შრატის გავლენა ნეიტროფილების ფუნქციებზე.

მიღებული მონაცემების მეცნიერული სიახლე: ნაშრომში პირველადაა ნაჩვენები, რომ:

- B-ქლლ-ს დროს ფმა-სტიმულირებულ ნეიტროფილებს შემცირებული აქვთ ნლტ-ს აღდგენის უნარი, რაც არ არის გამოწვეული არც პმნ-ის მოუმწიფებლობით და არც დარღვევებით ფერმენტულ სისტემებში.
- B-ქლლ-ს დროს დარღვეულია პმნ-ების მიერ ოფსონიზირებული ნაწილაკების დაკავშირებისა და შთანთქმის უნარი, მიუხედავად იმისა, რომ ისინი ნორმალურად აექსპრესირებენ CD32 მოლეკულებს.
- B-ქლლ-ის შემთხვევაში *ex vivo* ნეიტროფილები აექსპრესირებენ CD64 მოლეკულებს, რომელიც პმნ-ის აქტივაციის მარკერს წარმოადგენს. ამავე დროს დაქვეითებულია CD16 ექსპრესიის დონე.
- პმნ-ის დარღვევები განპირობებულია B-ქლლ პაციენტების სისხლის შრატში არსებული კომპონენტებით და კორელირებს ლეიკოციტების საერთო რიცხვის მატებასთან.

ნაშრომის თეორიული და პრაქტიკული მნიშვნელობა: ნაშრომს მნიშვნელოვანი თეორეული წვლილი შეაქვს არსებულ მონაცემებში B-ქლლ პერიფერიული სისხლის ნეიტროფილების ფუნქციის შესახებ. მასში ნათლადაა წარმოდგენილი, რომ B-ქლლ-ით დაავადებული პირებისათვის დამახასიათებელია პმნ-ის ფუნქციური არასრულფასოვნება, რომელიც მნიშვნელოვან როლს ასრულებს B-ქლლს დროს არსებული იმუნოდეფიციტის ჩამოყალიბებაში და საჭიროებს კორექციას ანტი-სიმსივნური თერაპიის მეთოდების გამოყენებამდე.

ამრიგად, ნაშრომს დიდი პრაქტიკული მნიშვნელობა აქვს ლეიკემიების მკურნალობის თერაპიული სტრატეგიის შემუშავებისათვის, ვინაიდან იძლევა ახალ ინფორმაციას B-ქლლს დროს ნეიტროფილებში არსებული დარღვევების ხასიათის შესახებ.

ჩვენს მიერ მოპოვებული მონაცემები საშუალებას იძლევია დაიგეგმოს B-ქლლს დროს ნეიტროფილების ფუნქციური აქტივობის

კორექცია, რათა შესაძლებელი გახდეს, ერთი მხრივ, ინფექციური გართულებების მიმართ მგრძნობელობის მიზეზების აღმოფხვრა, მეორე მხრივ კი, B-ქლლს საწინააღმდეგოდ ახალი იმუნოთერაპიული მეთოდების შემუშავება, რაც ჩვენი სამომავლო კვლევის საგანს წარმოადგენს.

ლიტერატურის მიმოხილვა

თავი I. B-ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიის თავისებურებანი

1. 1. შესავალი

B ქრონიკული ლიმფოიდური ლეიკემია არის კლონური ნეოპლაზია, რომელიც ხასიათდება მოსვენებული, G0/G1 ფაზაში მყოფი ლიმფოიდური უჯრედების თანდათანობითი აკუმულაციით. ისინი გამოირჩევიან აპოპტოზისადმი რეზისტენტობითა და სუსტი პროლიფერაციით. B-ქლლ უჯრედები მორფოლოგიურად მსგავსია მცირე მომწიფებული B ლიმფოციტებისა, მაგრამ ისინი ფუნქციურად მოუმწიფებელი და იმუნოლოგიურად არაკომპეტენტურნი არიან. B-ქლლ უჯრედები გაჩერებულნი არიან დიფერენცირების იმ სტადიაზე, რომელიც ფენოტიპურად ემსგავსება ხანგრძლივად მცხოვრებ მეხსიერების ტიპის B უჯრედებს [3; 7], რადგან ისინი TdT^-, sIg^+-ია და ექსპრესირებენ პან-B-უჯრედულ მარკერებს CD19, CD20, CD21 [1, 2, 6].

B-ქლლ მოზრდილთა ლეიკემიების ყველაზე გავრცელებული ფორმაა დასავლეთის ქვეყნებში და შეადგენს ყველა ლეიკემიის 25%, ხოლო აღმოსავლეთის ქვეყნებში მისი გავრცელების სიხშირე 5%-ზე ნაკლებია[1]. აშშ-ში ქლლ-ის შემთხვევათა 95% B უჯრედული ფენოტიპისაა, მაშინ როცა აზიაში T უჯრედული ქლლ დომინირებს [8]. იგი ძირითადად გვხვდება ხანდაზმულ (50 წელზე მეტი) ადამიანებში [4; 5], 40 წელზე ახალგაზრდა პირებზე კი შემთხვევათა მხოლოდ 10% მოდის. დაავადება უფრო ხშირია მამაკაცებში, ვიდრე ქალებში (შეფარდებით 1,7 : 1) [2; 9].

დაავადების ეტიოლოგია დღემდე უცნობია, იგი არ არის თანდაყოლილი, არ უკავშირდება მაალკილირებელი აგენტების, მედიკამენტების, ქიმიური ნივთიერებებისა და რადიაციის მოქმედებას [2; 4; 10] და არ წარმოადგენს იმუნოდეფიციტური დაავადებების თანამგზავრს. სავარაუდოა გენეტიკური ფაქტორის მნიშვნელობა, რადგან არსებობს შემთხვევათა მომატებული სიხშირე ავადმყოფთა ახლო ნათესავებში (2-7-ჯერ იმატებს B-ქლლ განვითარების საფრთხე და აღინიშნება სხვა B-უჯრედული ავთვისებიანი და აუტოიმუნური დაავადებებიც). კონკორდანტობა იშვიათია [4, 36], ხოლო დაავადების "ოჯახურობის" შემთხვევაში ადგილი აქვს ანტიციპაციის ფენომენს [1; 2; 11; 12].

დაავადების მიმდინარეობის შესასწავლად ხელსაყრელია მასში ცალკეული სტადიების გამოყოფა. დღეისათვის ყველაზე გავრცელებულია B-ქლლ სტადიური კლასიფიკაცია ორი ავტორის Rai-სა და Binet-ის მიხედვით (ტაბულა 1). ორივე სისტემა გამოირჩევა სიმარტივით, მაგრამ არცერთი მათგანი არ არის სრულყოფილი. ამჟამად მიმდინარეობს კვლევა კლასიფიკაციის ამ ორი სისტემის შეჯერების მიმართულებით.

B-ქლლ-ის კლინიკური მიმდინარეობა მრავალფეროვანია და ინდივიდუალურ ხასიათს ატარებს. ავადმყოფთა ერთ ნაწილში იგი წლების განმავლობაში ძლიერ ნელა პროგრესირებს და ამდენად, შესაძლებელია, არც მოი
თხოვდეს სპეციფიკურ მკურნალობას (ზოგჯერ სიკვდილის მიზეზი სრულიად სხვა დაავადება ხდება) [2], მეორე ჯგუფის ავადმყოფებში კი აგრესიულ ხასიათს იძენს, სწრაფად პროგრესირებს და სწრაფადვე სრულდება ლეტალური შედეგით [1, 2, 6]. თანამედროვე შეხედულებების თანახმად B-ქლლ-ის უარყოფითი პროგნოზი დაკავშირებულია იმუნოგლობულინების მძიმე ჯაჭვების

ჩანასახოვანცენტროვანი მუტაციების ბლოკირებასა და CD38 ექსპრესიასთან [23].

ტაბულა 1.1. B-ქლლ-ის კლასიფიკაცია

სისტემა	სტადია	საფრთხე	კლინიკური თავისებურება	სიცოცხლის ხანგრძლივობა
Rai	0	მცირე	ლიმფოციტოზი სისხლსა და ძვლის ტვინში	>10 წელი
	I		იგივე+	7
	II	საშუალო	ლიმფადენოპათია+ჰეპატო- და/ან სპლენომეგალია	1,5
	III	მაღალი	იგივე+ანემია და/ან თრომბო-ციტოპენია	
	IV	მაღალი	იგივე	
Binet	A		ჩართულია 3 ლიმფურ კვანძზე ნაკლები	>10
	B		ჩართულია 3 ლიმფური კვანძი, ან მეტი	5
	C		ანემია და/ან თრომბოციტოპენია	2

დაავადების მიმდინარეობისას პერიფერიულ სისხლსა და ძვლის ტვინში დიდი რაოდენობით ლეიკემიური B უჯრედების დაგროვებას მოსდევს უჯრედული და ჰუმორული იმუნიტეტის დაქვეითება, ეს კი, თავის მხრივ, მეორეული დაავადებების (ინფექციური, აუტოიმუნური, სიმსივნური) მიზეზი ხდება [2; 6]. ინფექციები არის მნიშვნელოვანი შედეგი დეფექტური იმუნიტეტისა ქლლ პაციენტებში და ყველაზე ხშირად ისინი ხდებიან სიკვდილიანობის მიზეზი, ვიდრე სხვა გართულებები ან დაავადების პროგრესირება [3,15]. ინფექციების მიმართ მომატებული მგრძნობელობის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი

მიზეზი არის ამ ავდმყოფებში განვითარებული ჰიპოგამაგლობულინემია. გარდა ამისა, შესაძლებელია ფაგოციტური სისტემის დარღვევებიც იყოს ინფექციური გართულებების მიზეზი.

გრანულოციტების რაოდენობა ქლლ პაციენტებში ჩვეულებრივ ნორმაშია ან ოდნავ შემცირებული და ღრმა გრანულოციტოპენია ხშირად ასოცირებულია აგრესიულ ქიმიოთერაპიასთან და შორსწასულ დაავადებასთან [20, 21]. არსებობს განსხვავებული მოსაზრება იმის შესახებ თუ როგორია ნეიტროფილების ფუნქციები ამ პაციენტებში: ნორმალური თუ შეცვლილი [3]. აღრიცხული ცვლილებები ხშირად ეხებოდა პმნ-ის მიერ სინთეზირებულ ციტოკინებს.

1. 2. ციტოკინები

ციტოკინების, როგორც იმუნოციტების აუტო- და პარაკრინული რეგულატორების, მოქმედების შესწავლას დიდი მნიშვნელობა აქვს უჯრედშორისი კონტაქტების, გენების ექსპრესიისა და უჯრედის მიერ სასიცოცხლო ფუნქციების განხორციელების გამოსარკვევად, ჯერ-ჯერობით B-ქლლ-ის დროს მათი მოქმედება გამოკვლეულია მხოლოობითად და არა სხვა ციტოკინებთან ერთობლიობაში.

პირველი ციტოკინი, რომლის შესაძლებელი მონაწილეობა დაავადებაში იყო პოსტულირებული, არის IL-2. IL-2 B-ქლლ-ის დროს, ხასიათდება როგორც პირდაპირი, ისე არაპირდაპირი მოქმედებით, ლეიკემიურ კლონზე და T და NK უჯრედებზე. B-ქლლ-ის ნეოპლასტური უჯრედები აექსპრესირებენ **IL-2R**-ის α-ჯაჭვს (p55), ზოგ შემთხვევაში საშუალო აფინობის β ჯაჭვსაც (p75), ხოლო γ-ჯაჭვი (p64) კონსტანტურად ექსპრესირებულია. ამას ამტკიცებს B-ქლლ უჯრედების მიერ IL-2-ის ადსორბციის უნარი[19]. გარდა ამისა, B-ქლლ პაციენტებში ნაჩვენებია შრატში sIL-2R მომატებული კონცენტრაცია,

რაც დაავადების სიმძიმის უკუპროპორციულია. ამ უკანასკნელის არსებობა განაპირობებს IL-2-ის „ჩაჭერას" და მიუწვდომელს ხდის მას T უჯრედებისათვის. IL-2 ასევე აქტიურ გავლენას ახდენს ლეიკემიური უჯრედების პოპულაციაზე, რამდენადაც მას შეუძლია IL-2-ის რეცეპტორის p55 სუბერთეულის ექსპრესიის რეგულირება, რითაც იძლევა კო-მასტიმულირებელ სიგნალს [2]. IL-2-ის *in vivo* ფიზიოლოგიური აქტივობის დაქვეითება გასაგებს ხდის B-ქლლ-ში არალეიკემიური აქსესორული უჯრედების ზოგიერთ დარღვევას. ეს დადასტურებული იქნა იმით, რომ ეგზოგენური IL-2-ის მოქმედება მნიშვნელოვნად ზრდის T უჯრედების მიერ კოლონიის წარმოქმნის შესაძლებლობასა და ციტოტოქსიურ ფუნქციებს B-ქლლ-ში [16].

IL-4 არის ზრდის ფაქტორი, რომელიც აძლიერებს B უჯრედების პროლიფერაციას ანტიგენსა ან ანტი-IgM-ს საპასუხოდ[61]. ნეოპლასტური ქლლ უჯრედები არ პროდუცირებენ IL-4, მაგრამ აექსპრესირებენ IL-4R თავის ზედაპირზე [17]. B-ქლლ უჯრედებზე IL-4-ის *in vivo* გავლენა დამოკიდებულია გარემოზე: იგი თრგუნავს IL-2 და TNFα-ით გამოწვეულ პროლიფერაციას, მაგრამ ააქტიურებს მას ანტი-CD40-ის თანაობისას. ყოველივე ამის მიზეზი შესაძლებელია იყოს სიგნალის გადაცემის განსხვავებული გზები [38]. B-ქლლ პაციენტებში გაზრდილია CD30-ის მატარებელი და IL-4 მაპროდუცირებელი T ლიმფოციტების რაოდენობა, რაც შესაძლებელია *in vivo* განაპირობებდეს T და B უჯრედებს შორის ურთიერთქმედებას IL-4-ის პროდუქციით [40,54]. ეს კი ხელს შეუწყობს ნეოპლასტური კლონის აკუმულაციასა და გაფართოებას [22, 40].

B-ქლლ უჯრედები წარმოქმნიან როგორც **TNFα**, ისე მის რეცეპტორსაც და ეს სისტემა განაპირობებს დნმ-ს სინთეზის კო-სტიმულაციას [60,63,70]. ავადმყოფების შრატში მისი დონე

მომატებულია [70], მაგრამ დინამიკის შესახებ მონაცემები წინააღმდეგობრივია: ერთი ნაწილი მას სტადიის უკუპრო-პორციულად, მეორე კი პირდაპირპროპორციულად თვლის. **TNFα** დონე კორელირებს მონოციტების რიცხვთან. როგორც ჩანს, იგი აკონტროლებს პროლიფერაციას, თუმცა არსებობს მონაცემები მისი ნეიტრალური, ან დამთრგუნველი როლის შესახებაც [18]. იგივე ითქმის მის რეცეპტორზეც (იდენტიფიცირებულია ორი ფორმა - p55 და p75). შემჩნეულია TNFα კორელაცია ანემიის განვითარებასა და ლიმფოციტების საერთო რიცხვთან, რაც ამტკიცებს, რომ იგი არეგულირებს ურთიერთქმედებას ნეოპლასტურ და ძვალტვინოვან უჯრედებს შორის [6].

IL-6, რომლის რეცეპტორი ასევე მოიპოვება ნეოპლასტურ უჯრედებზე, აინჰიბირებს TNFα–ით გამოწვეულ პროლიფერაციას და სპონტანურ აპოპტოზს [6,60].

IL-8 ნეიტროფილების აქტივატორი და ფართო მოქმედების ქემოატრაქტანტია [61]. *In vitro* B უჯრედები ექსპრესირებენ მას და მის რეცეპტორს, რაც მოწმობს, რომ იგი აუტოკრინული რეგულატორია [25,71]. სავარაუდოდ, იგი არ მოქმედებს უჯრედების პროლიფერაციაზე, მაგრამ განაპირობებს მათ სიცოცხლისუნარიანობას[25]. ამასთან, *in vitro* ანტიაპოპ-ტოზურ ეფექტს იწვევს მისი იგივე რაოდენობა, რაც გამოიყოფა B-ქლლ-უჯრედების მიერ *in vivo*. შესაძლებელია იგი მოქმედებდეს Bcl-2-ის ექსპრესიაზე, რის სასარგებლოდ მეტყველებს ავადმყოფთა შრატებში მისი დონის მომატება და კორელაცია მასსა და TNFα და Bcl-2-ის მ-რნმ-ს დონესთან [59]. სავარაუდოდ, მის შრატულ კონცენტრაციას საპროგნოზო მნიშვნელობა შეიძლება ჰქონდეს [71].

ნეოპლასტური უჯრედები გამოყოფენ **TGFβ,** რომელიც ენდოგენური ზრდის ინჰიბიტორია და განაპირობებს დაავადების ნელ პროგრესირებას. იგი თრგუნავს პროლიფერაციას, მაგრამ არ მოქმედებს აპოპტოზზე [2], აგრეთვე, თრგუნავს T უჯედების მოქმედებასაც [13].

IL-10 წარმოადგენს ციტოკინების სინთეზის მაინჰიბირებელ ფაქტორს, რამდენადაც იგი აინჰიბირებს IFNγ, TNFα, IL-1, IL-3-სა და T და NK უჯრედების მიერ პროდუცირებული რამდენიმე სხვა ციტოკინის სინთეზს [61] B-ქლლ უჯრედები აექსპრესირებენ როგორც IL-10, ისე მის რეცეპტორს [6,13,65]. მისი შესაბამისი მ-რნმ-ის რაოდენობა დაავადების პროგრესირების უკუპროპორციულია და ასოცირებულია სტაბილურ ფაზასთან, თუმცა პროგრესირების პერიოდშიც არ იცვლება. ამ ციტოკინის შრატში კონცენტრაციისა და დაავადების ფაზის შესახებ წინააღმდეგობრივი მონაცემები არსებობს: ერთი შეხედულების მიხედვით, იგი არ განსხვავდება ნორმისა და პათოლოგიის დროს და მხოლოდ ცალკეულ პირებში მატულობს [62], მაგრამ უკანასკნელ ხანს უფრო მეტი მომხრე ჰყავს მეორე მოსაზრებას, რომელიც აღნიშნავს IL-10-ის საერთო მატებას, განსაკუთრებით, გვიან სტადიებში [24].

bFGF-ის დონე კორელირებს დაავადების სტადიასთან, ამასთან, რაც უფრო მაღალია მისი მაჩვენებელი, მით უფრო მდგრადია B-ქლლ უჯრედები აპოპტოზისადმი *in vitro* [6, 9].

I. 3. გართულებები

დაავადების მიმდინარეობის პროცესში აღმოცენებული გართულებები შეიძლება იყოს პირველადი ანუ გამოწვეული იმუნური სისტემის უმნიშვნელოვანესი რგოლების ფუნქციონირების მოშლით და მეორადი - დაკავშირე-ბული მკურნალობასთან.

გართულებების 25%-ს შეადგენს აუტოიმუნური დაავადებები [4,29]. მათი ობიექტი უმეტესად, ჰემოპოეზური უჯრედები ხდება, ყველაზე ხშირია აუტოიმუნური ჰემოლიზური ანემია და თრომბოციტოპენია, უფრო იშვიათი - გრანულოციტოპენია ან ერითროციტული აპლაზია [4,5]. აღწერილია ე.წ. პარანეოპლასტური პემფიგუსი, რაც ვლინდება პირის ღრუს, ლორწოვნი გარსის, ტუჩის, კონიუნქტივის მტკივნეული, პერსისტენტული წყლულების სახით [7]. ციტოპენიების წარმოშობის შესახებ ინფორმაციას იძლევა ძვლის ტვინის მორფოლოგია, რადგანაც იგი შეიძლება გამოწვეული იყოს პერიფერიულად მიმდინარე აუტოიმუნური პროცესით, ან ძვლის ტვინის ნეოპლასტური უჯრედებით ინფილტრირების გამო ღერო-უჯრედების გამოთიშვით. აუტოანტისხეულები პოლიკლონურია და არ გამომუშავდება ავთვისებიანი კლონის მიერ [5, 29].

აუტოიმუნური დაავადებების წარმოშობის მიზეზები ბოლომდე არ არის ცნობილი, შესაძლებელია, რომ ეს იყოს T უჯრედების მარეგულირებელი ფუნქციის დაქვეითება, აგრეთვე, B-T ურთიერთქმედების მოშლა [5,6,13]. კონკრეტულად ამ ორი აუტოიმუნური დაავადების წარმოშობის მიზეზი შეიძლება იყოს ის გარემო, რომელიც ექმნებათ ელენთაში მოხვედრილ ერთეულ ნორმალურ B უჯრედებს. აქ ისინი აქტიურდებიან $CD4^{+}CD40L^{+}T$ უჯრედების მიერ და იქვე მყოფი ერითროციტებისა და თრომბოციტების დაშლის პროდუქტებთან ურთიერთქმედების გამო იწყებენ მათ საწინააღმდეგო აუტოანტისხეულების სინთეზს [29].

ქლლ პაციენტებში იმუნური სისტემის დარღვევების ფონზე იმატებს ინფექციური დაავადებების სიხშირე. განსაკუთრებით ხშირია ბაქტერიული და ვირუსული ინფექციები, სოკოვანი და პარაზიტული კი იშვიათია [3]. არსებობს მონაცემები, რომ ტიპიური ფორმის დროს 60%-ში სიკვდილიანობის მიზეზი სწორედ ბაქტერიული და ვირუსული

დაავადებებია [13]. პირველთაგან ხშირია კაფსულიანი მიკროორგანიზმები (მაგ. გრამუარყოფითი ბაქტერიები) [7]. აღსანიშნავია *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Escherichia coli*-ს მიერ გამოწვეული ინფექციები [6].

რამდენადაც ქლლ-ში B რგოლის უმოქმედობის პირველი ნიშანია ჰიპოგამაგლობულინემია (ქვეითდება IgG და IgA, მაგრამ არა IgM), სწორედ იგია ინფექციებისადმი მომატებული მგრძნობელობის ძირითადი მიზეზი [26,27]. ჰიპოგამაგლობულინემიის პათოგენეზი ქლლ-ის დროს ბოლომდე არ არის გარკვეული. შესაძლებელია ამას იწვევდეს დისფუნქცია არაკლონური B უჯრედების ხარჩენი პოპულაციისა, რომლებიც პროგრესულად განზავდება და/ან ინჰიბირდება ინერტული ნეოპლასტური B უჯრედებით [28].

ამის გარდა, სხვა მექანიზმებიც განაპირობებენ ქლლ-ის დროს ინფექციებისადმი მგრძნობელობას. მაგალითად, არსებობს მონაცემები ქლლ პაციენტებში უჯრედული იმუნიტეტის დარღვევების შესახებ. ქლლ პაციენტებში ჰერპეს ვირუსული ინფექციების სიხშირე და მიმდინარეობის სიმძიმე მეტყველებს მათში T უჯრედული ფუნქციების დარღვევების არსებობაზე, რომელიც უფრო მეორეული ფენომენია, ვიდრე პირველადი [26]. 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 მონოკლონური ანტისხეულების საპასუხოდ არის დაქვეითებული [37].

გარდა ამისა, პმნ-ის ფაგოციტური სისტემის დარღვევები ასევე შესაძლებელია განაპირობებდეს ინფექციებისადმი მიდრეკილების გაზრდას ქლლ პაციენტებში. ძვლის ტვინის დაზიანებამ შეიძლება გამოიწვიოს გრანულოციტოპენია რამდენიმე მექანიზმით: სიმსივნური უჯრედებით ნორმალური წინამორბედი უჯრედების შენაცვლებით,

სიმსივნური პროდუქტებით გამოწვეული სუპრესიით ან დაზიანებით ქიმიოთერაპიის მიელოტოქსიური ეფექტით. გრანულოციტების რაოდენობა ქლლ პაციენტებში უმეტესად ნორმაშია ან მცირედ არის შემცირებული და ღრმა გრანულოციტოპენია ჩვეულებრივ აგრესიულ ქიმიოთერაპიასა და შორს წასულ დაავადებასთან არის ასოცირებული [15]. ზოგი ავტორი მიიჩნევს, რომ ნეიტროფილების ფუნქციები ქლლ-ს დროს ნორმალურია [36], მაგრამ არსებობს მონაცემები დაავადებაში პმნ-ის ფაგოციტური და ბაქტერიციდული დეფექტების, შემცირებული ქემილუმინესცენციისა და დარღვეული ქემოტაქსისის შესახებ [3, 30-35].

მეორეული გართულებები გამოწვეულია სამკურნალოდ გამოყენებული ციტოტოქსიკური საშუალებების მოქმედებით როგორც ნეოპლასტურ, ისე ნორმალურ უჯრედებზე, რაც ვლინდება ლიმფო- და მიელოსუპრესიით. ისინი განსაკუთრებით თრგუნავენ $CD4^{+}T$ უჯრედებს, რაც აგრეთვე აუტოიმუნური დაავადების განვითარების მიზეზი ხდება, რადგანაც, როგორც ცნობილია, T უჯრედების ზოგიერთი სუბპოპულაცია თრგუნავს აუტორეაქტიული B უჯრედების მოქმედებას [7].

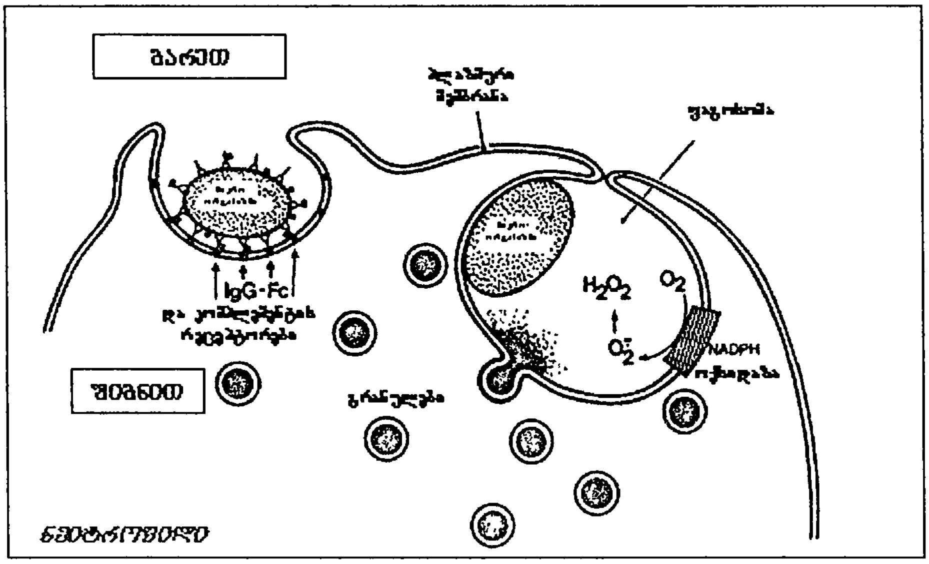
თავი II. პოლიმორფულბირთვიანი ნეიტროფილები

2.1. ნეიტროფილების ფაგოციტარული ფუნქცია.

პოლიმორფულბირთვიანი ნეიტროფილები სისხლში ყველაზე უხვი უჯრედებია და შეადგენს სისხლის თეთრი უჯრედების 40-60%. ჩვეულებრივ მათი კონცენტრაცია $3\text{-}5X10^6$ უჯრედია 1მლ სისხლში. ეს რიცხვი დრამატულად იზრდება ინფექციების შემთხვევაში. სისხლში პმნ-ის ასეთი დიდი რაოდენობა მიანიშნებს, თუ რამდენად მნიშვნელოვანია მათი როლი ინფექციებისაგან ორგანიზმის დაცვაში [44]. ნეიტროფილები შთანთქავენ და ანადგურებენ მრავალ ბაქტერიას, სოკოს, მიკოპლაზმას და, შესაძლებელია, ვირუსებსაც. ისინი წარმოადგენენ პირველ უჯრედებს, რომლებიც მოიზიდება ინფექციის უბანზე და პასუხობენ სწრაფად და ძლიერად. პმნ-ს შეუძლიათ მოძრაობა ქსოვილებში ქიმიურ სიგნალებსა და ქემოატრაქტანტებზე საპასუხოდ და შეიცავენ ციტოტოქსიური მექანიზმების დიდ რაოდენობას, რაც შესაძლებელს ხდის მათ მიერ რიგი მიკრობული პათო გენების განადგურებას [41].

მიკროორგანიზმთა უდიდესი ნაწილის შთანთქმა ნეიტროფილებს მხოლოდ ოფსონინებით (სპეციფიური ანტისხეულებით და/ან კომპლემენტის ფრაგმენტებით) ამ მიკროორგანიზმთა დაფარვის ანუ ოპსონიზაციის შემდეგ შეუძლია. ნეიტროფილების ზედაპირზე არის სპეციფიური რეცეპტორები IgG-ისა (Fcγ-რეცეპტორები ანუ FcγR-ები) [57] და კომპლემენტის კომპონენტებისათვის C3b (CR1) და ინაქტივირებულ C3b ანუ iC3b (CR3) [58]. ოფსონინებით დაფარული ნებისმიერი ნაწილაკი, რომლის სიდიდე გარკვეულ ზღვარს არ აჭარბებს, შთაინთქმება ნეიტროფილების მიერ. ასეთი ნაწილაკები შეიძლება წარმოდგენილი იყოს არა მხოლოდ მიკროორგანიზმებით ან

თვით ორგანიზმის ხნიერი, დაზიანებული უჯრედებით, არამედ მარტივი იმუნური კომპლექსების სახითაც, რომლებიც მხოლოდ ერთ ანტიგენს შეიცავენ [39]. ნეიტროფილის პლაზმური მემბრანის რეცეპტორებთან ოფსონიზირებული ნაწილაკის დაკავშირება იწვევს ასეთი რეცეპტორების თავმოყრას კონტაქტის მიდამოს ირგვლივ. შემდეგ უჯრედი წარმოქმნის ფსევდოპოდიებს, რომლებიც გარს შემოერტყმება ოფსონიზირებულ ნაწილაკს (სურ.1). რეცეპტორები თანმიმდევრულად უკავშირდება ოფსონინებს. ამის შედეგად ფსევდოპოდიები მჭიდროდ შემოეკვრება ნაწილაკს, ბოლოს ერთმანეთს შეერწყმება და ნეიტროფილის შიგნით ნაწილაკის ირგვლივ წარმოიქმნება დახშული მემბრანის ბუშტუკი-ფაგოსომა [47,50].



ნახატი 1. ნეიტროფილის აქტივაციის სქემატური გამოსახვა. ოფსონიზირებული მიკროორგანიზმების კონტაქტით პმნ-ის ზედაპირულ რეცეპტორებთან **(IgG-Fc** *და კომპლემენტის რეცეპტორებთან) იწყება ფაგოციტოზი, ოქსიდაზას აქტივაცია და დეგრანულაცია. ფაგოსომის შიგნით ოქსიდატური პროდუქტები ურთიერთქმედებენ გრანულების ცილებთან, რათა უზრუნველყონ მიკროორგანიზმების ეფექტური განადგურება.*

ნეიტროფილის პლაზმური მემბრანის რეცეპტორის დაკავშირება შესაბამის ლიგანდებთან იწვევს პმნ-ის აქტივაციას - ხორციელდება მეორადი მესენჯერების სინთეზი, რომლებიც პირდაპირი ან არაპირდაპირი გზით (მაგ. ფოსფორილირების რეაქციებით) ააქტიურებენ სპეციფიურ ფერმენტულ სისტემებს. ეს კი აღძრავს რეაქტიულ ჟანგბადნაერთების წარმოქმნას და გრანულათა შიგთავსის გამოთავისუფლებას (დეგრანულაციას). ორივე პროცესი ლოკალურია, რადგან ორივე სახის მიკრობიციდული ნაერთების გამოთავისუფლება შემოიფარგლება ფაგოსომით. თუმცა ამ პროდუქტთა სეკრეცია იწყება ფაგოსომის დახურვამდე და ამიტომ მიკრობიციდულ ნაერთთა ნაწილი ფაგოსომიდან უჯრედგარე სივრცეში გამოდის [50]. რეაქტიული ჟანგბადნაერთების წარმოქმნა უჯრედთა მიერ ჟანგბადის მოხმარების გაძლიერებასთანაა დაკავშირებული, რასაც "ჟანგბადურ აფეთქებას " უწოდებენ [46,48,49].

ჟანგბადზე დამოკიდებულ ანტიმიკრობულ სისტემასთან ერთად ნეიტროფილებში, როგორც აღვნიშნეთ. მოქმედებს ჟანგბადისაგან დამოუკიდებელი ანტიმიკრობული სისტემაც, რომლის კომპონენტებს ნეიტროფილთა გრანულების შედგენილობაში შემავალი ნაერთები წარმოადგენს [47]. ნეიტროფილთა გრანულებს ორ კატეგორიად ყოფენ: აზუროფილურ ანუ პირველად და სპეციფიკურ ანუ მეორად გრანულებად (ტაბულა 2) [51].

აზუროფილური გრანულები სხვა ტიპის უჯრედთა ლიზოსომების მსგავსად მჟავე ჰიდროლაზებს შეიცავენ და აქვს pH-ის დაბალი ოპტიმუმი. ეს გრანულები შეიცავს მიელოპეროქსიდაზასაც, რომელიც ჟანგბადური აფეთქების პროცესში მონაწილეობს, და სერინ პროტეინაზებს. გარდა ამისა, აზუროფილური გრანულები შეიცავს დიდი რაოდენობით ე.წ. დეფენსინებს - მრავალი მიკროორგანიზმის

მიმართ ბაქტერიციდული აქტივობის მქონე მცირე პეპტიდებს [52] და ბაქტერიციდულ შეღწევადობის გამზრდელ ცილას (ბშგ)- სწრაფად მოქმედ, ძალზე ძლიერ ანტიბიოტიკს, რომელიც გრამ-უარყოფით ბაქტერიებს ანადგურებს. ლიზოციმი, რომელიც ახდენს გრამ-დადებით ბაქტერიათა გარკვეული პეპტიდგლიკანების ჰიდროლიზს, წარმოდგენილია ნეიტროფილთა როგორც აზუროფილურ, ისე სპეციფიკურ გრანულებში [51].

სპეციფიკურ გრანულათა სხვა ცილებია: ლაქტოფერინი – რკინის დამაკავშირებელი და აქედან გამომდინარე ბაქტერიოსტატიკური ცილა, ვიტამინ B12-ის დამაკავშირებელი ცილა, მეტალპროტეინაზები – კოლაგენაზა და ელასტაზა[51].

ტაბულა 2. ნეიტროფილების გრანულების შიგთავსი

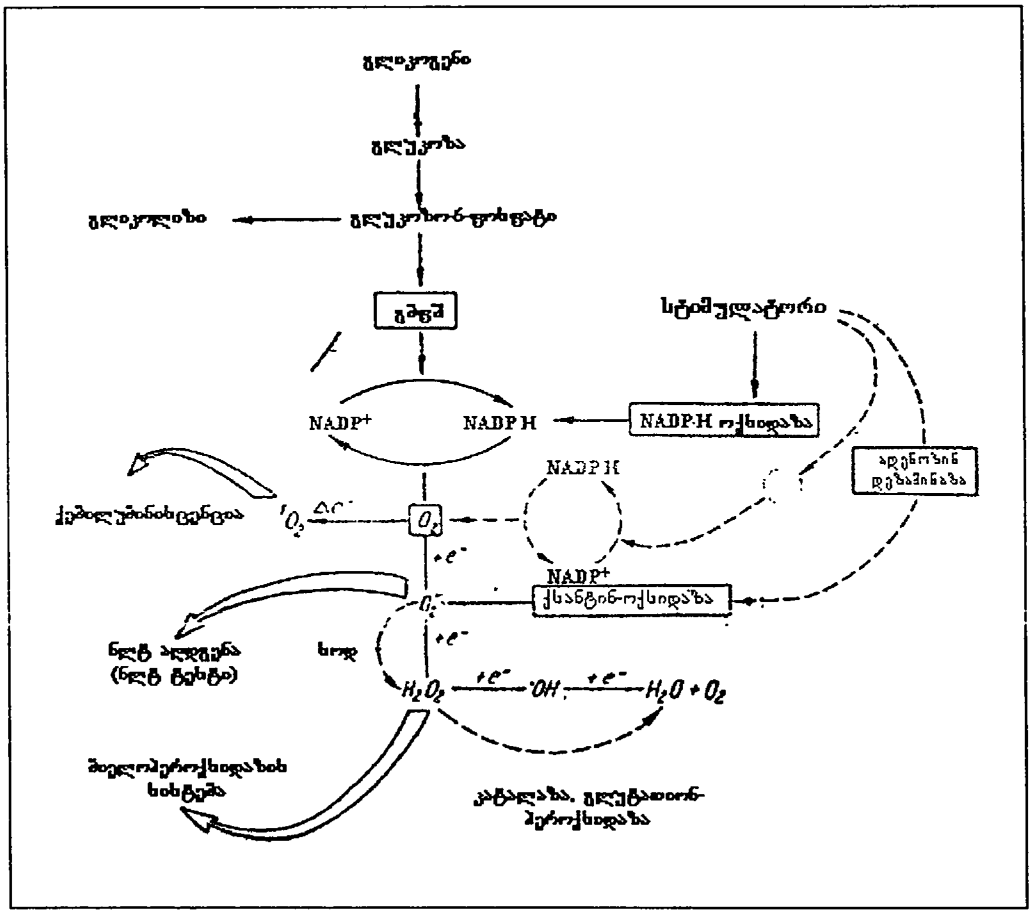
აზუროფილური	სპეციფიკური
სერინ - პროტეინაზები	
ელასტაზა	
კატეფსინი G	
პროტეინაზა 3	
პ29ბ (=AGP7)	
მჟავე ჰიდროლაზები	
β-გლუკორონიდაზა	
β-გლიცეროფოსპატაზა	
N-აცეტილ-β-გლუკოსამინიდაზა	
α-მანოზიდაზა	
კატეფსინი B	
კატეფსინი D	
მეტალპროტეინაზები	
	კოლაგენაზა
	ჟელატინაზა
სხვა ცილები	
მიელოპეროქსიდაზა	ლიზოციმი
ლიზოციმი	ჰისტამინაზა
დეფენზინები	ლაქტოფერინი

ჟანგბადნაერთთა წარმოქმნასა და გრანულების შიგთავსის გამონთავისუფლების ინტენსივობა შეიძლება გაზარდოს ე.წ.

წინასწარ დამამუშავებელმა (მაპრაიმირებელმა) აგენტებმა, რომლებიც თავისთავად არ იწვევენ სეკრეციას და მხოლოდ აძლიერებენ ნეიტროფილთა გამააქტივებელი აგენტების მოქმედებას. ფიზიოლოგიური მაპრაიმირებელი აგენტებია სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორი (TNF), თრომბოციტების გამააქტივებელი ფაქტორი და ბაქტერიული ენდოტოქსინი. საყურადღებოა, რომ ეს ნაერთები ნეიტროფილთა და სისხლძარღვების ენდოთელიუმის უჯრედთა ზედაპირის რეცეპტორების ექსპრესიის გაზრდით აძლიერებენ ნეიტროფილთა ადჰეზიას და ქემოტაქსისს [41,46].

2.2. ჟანგბადზე დამოკიდებული მიკრობიციდური მექანიზმები.

სტიმულაციას ფაგოციტები ე.წ. ჟანგბადური აფეთქებით პასუხობენ (სურ.2). ჟანგბადურ აფეთქებას უჯრედთა მიერ ჟანგბადის მოხმარების მკვეთრ გაძლიერებას უწოდებენ. შთანთქმული ჟანგბადის უდიდესი ნაწილი გარდაიქმნება ძლიერ რეაქტიულ დამჟანგველად, ტოქსიკურ შთანთქმული ორგანიზმებისა და გარკვეული უჯრედგარე სამიზნეებისათვის. სტიმულაცია შეიძლება იყოს: ა) ფიზიკური, მაგალითად, როცა ფაგოციტები რაიმე ზედაპირს ეწებებიან; ბ) ქიმიური, როცა სტიმულატორებად წარმოგვიდგება მრავალი ხსნადი ნივთიერება და შედარებით მსხვილი ნაწილაკები [41,46]



ნახატი 2. ჟანგბადური აფეთქების მოლეკულური მექანიზმი.

ხსნად სტიმულატორებს მიეკუთვნება ფორბოლის ეთერები, ქემოტაქსისის ფაქტორები, როგორიცაა მიკრობული პროდუქტი ფორმილმეთიონილ-ლეიცილ-ფენილ-ალანინი, (f-met-leu-phe) [56], კომპ-ლემენტის აქტივაციის პროდუქტი C5a ან ლეიკოტრიენი B_1, გარკვეული ციტოკინები, მაგ. სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორი (TNF) და გრანულოციტ/მაკროფაგების კოლონია მასტიმულირებელი ფაქტორი (GM-GSF) და ბევრი სხვა [41]. სტიმულატორული ნაწილაკები, მაგალითად, ოფსონიზირებული მიკროორგანიზმები ურთიერთქმედებენ ნეიტროფილების ზედაპირზე არსებულ რეცეპტორებთან. ქიმიური ან ფიზიკური სტიმული ან ორი ქიმიური სტიმული შეიძლება ერთდროულად მოქმედებდეს უჯრედზე, რასაც უფრო მძლავრი

სტიმულაცია მოჰყვება, ვიდრე ამ სტიმულთა ცალცალკე მოქმედებას[47,49]. მაგალითად, მრავალი ქიმიური სტიმული ადჰეზიაში მონაწილე გლიკოპროტეინების (ინტეგრინების) ოჯახის ერთი ან მეტი წევრის ზედაპირზე ექსპრესიის გაზრდით აძლიერებს ფაგოციტების ადჰეზიას და ამის შედეგად სტიმულაციასაც. TNF, რომელიც თავისთავად სუსტი სტიმულატორია, აძლიერებს და ახანგრძლივებს ნეიტროფილების ჟანგბადურ აფეთქებას, როცა ნეიტროფილები მიკრულნი არიან ენდოთელიუმის უჯრედებზე, ან შრატის ან ქსოვილთა გარკვეული ცილებით დაფარულ ზედაპირზე. რიგმა ქიმიურმა სტიმულმა, მაგალითად, γ ინტერფერონმა (INFγ), რომლებიც თავისთავად სუსტი სტიმულატორია, შეიძლება საკმაოდ გააძლიეროს ფაგოციტების საპასუხო რეაქცია ბევრ მეორად სტიმულზე. [41]. - ჟანგბადურ აფეთქებას განაპირობებს პლაზმურ მემბრანაში ელექტრონების გადამტანი სისტემის კომპლექსის აწყობა და ელექტრონების გადატანა მემბრანის ციტოპლაზმისაკენ მიმართულ ზედაპირზე მყოფი NADPH-დან უჯრედშორის სითხეში ან ინტრაფაგოსომურ სივრცეში მყოფ ჟანგბადზე [46].

ელექტრონთა გადამტანი ფერმენტების სისტემას ეწოდება ფაგოციტთა ოქსიდაზა (ფოქსი) ანუ ფაგოციტთა NADPH-ოქსიდაზა. NADPH-ოქსიდაზა რთული ფერმენტია. იგი შეიცავს 6 სხვადასხვა ცილას, რომელთაგან 3 პლაზმური მემბრანის მუდმივი კომპონენტია, 3 კი - მოსვენებულ უჯრედთა ციტოზოლშია მოთავსებული. ასეთ მდგომარეობაში ფერმენტი არააქტიურია [55]. ნეიტროფილის აქტივაციის დროს (ფიზიკური ან ქიმიური სტიმულით) NADPH-ოქსიდაზის, ციტოზოლში მყოფი 3 კომპონენტი პლაზმურ მემბრანაში გადაინაცვლებს და ოქსიდაზას 3 მემბრანულ კომპონენტთან ერთად აქტიურ ფერმენტულ კომპლექსს ქმნის. სწორედ ეს კომპლექსი წარმოშობს სუპეროქსიდის ანიონს [51]. ოქსიდაზის აქტივაცია

რთული და არასრულად შესწავლილი პროცესია. ჩვეულებრივ, მაგრამ არა ყოველთვის, სტიმულაცია იწყება სტიმულატორის დაკავშირებით მაღალი აფინობის მქონე სპეციფიკურ რეცეპტორთან, რომელიც უჯრედის ზედაპირზე იმყოფება [47]. ასეთი რეცეპტორების მაგალითია FcγR და CR1, რომლებიც ამოიცნობენ ოფსონიზირებულ ნაწილაკებთან ბმულ ლიგანდებს, f-met-leu-phe-ის რეცეპტორი და სხვა[41]. ზოგი სტიმულატორის შემთხვევაში სიგნალის გადაცემის ის მექანიზმი, რომელიც რეცეპტორისა და ლიგანდის ურთიერთქმედებას მოჰყვება, დაკავშირებულია ფოსფოინოზიტიდ-პროტეინკინაზა C-ს სისტემის (პკC) აქტივაციასთან: გუანოზინტრიფოსფატის (GTP) დამაკავშირებელი ცილა ანუ ე.წ. G-ცილა ააქტივებს ფოსფოლიპაზა C-ს, რომელიც ახდენს ფოსფატიდილინოზიტოლის (პოლ) ჰიდროლიზს. ჰიდროლიზის პროდუქტებია დიაცილგლიცეროლი და ინოზიტოლ1,4,5ტრიფოსფატი (IP_3) [80,81] .

დიაცილგლიცეროლი ააქტივებს ციტოზოლის პროტეინკინაზა C-ს, რომელიც ამავე დროს მემბრანისაკენ გადაინაცვლებს, ხოლო IP_3 აქვს უნარი გამოიწვიოს Ca^{2+} იონთა გამოსვლა ენდოპლაზმური ბადის ცისტერნებიდან. ფორბოლის ეთერები (მაგალითად, ფორბოლ მირისტატ აცეტატი, ფმა) ან გარკვეული სინთეზური დიაცილგლიცეროლები (მაგალითად, 1-ოლეოილ-2-აცეტილგლიცეროლი, OAG) გვერდს უვლის სიგნალის გადაცემის ადრეულ ეტაპებს და უშუალოდ ააქტივებს პროტეინკინაზა C-ს [82].

სიგნალის გადაცემა შესაძლებელია არა მხოლოდ ზემოთ განხილული გზით, როცა მეორად შუამავლებს ანუ მესენჯერებს DG_1, IP_3 და Ca^{2+} იონები წარმოადგენს, არამედ მეორე გზითაც, როცა მეორადი შუამავალი ციკლური ადენოზინმონოფოსფატია (cAMP), რომელიც პროტეინკინაზა A-ს ან თიროზინკინაზას აქტივაციას

განაპირობებს. პროტეინკინაზის აქტივაციას მოსდევს ოქსიდაზას კომპონენტების ფოსფოლირება ანუ აქტივაცია. სტიმულაციის შედეგად ოქსიდაზის ორი კომპონენტი – 47kd ცილა (ე. წ. p47-ფოქსი) და 67kd ცილა (ე. წ. p67-ფოქსი), რომლებიც მიელოიდური რიგის უჯრედების ციტოზოლშია წარმოდგენილი, პლაზმური მემბრანისაკენ გადაინაცვლებს [41,47,82].

გააქტივებულ ნეიტროფილებში ჟანგბადის მეტაბოლიზმის მკვეთრი გაძლიერება დაკავშირებულია როგორც ჟანგბადის გაძლიერებულ შთანთქმასთან, ისევე გლუკოზის მეტაბოლიზმის გაძლიერებასთან, რასაც შედეგად მოსდევს H_2O_2-ისა და ჟანგბადის ტოქსიკური ნაერთების წარმოქმნა ფაგოსომაში. გლუკოზის უტილიზაცია ხდება პენტოზოფოსფატური გზით, რომელსაც ჰექსოზომონოფოსფატურ ციკლს ან აპოტომიურ ჟანგვასაც უწოდებენ. ამ პროცესის პროდუქტები CO_2 და პენტოზაა. გლუკოზის პენტოზოფოსფატური გზით უტილიზაციის დროს წარმოიქმნება NADPH, რომელიც ელექტრონების წყაროა ჟანგბადისათვის გააქტივებულ ნეიტროფილებში [47,49].

მიჩნეულია, რომ ელექტრონები NADPH-დან უშუალოდ გადაეცემა FAD-ის შემცველ მემბრანის ფლავოპროტეინს, ამ უკანასკნელიდან ციტოქრომ b_{558}-სა და შემდეგ ჟანგბადს. b ციტოქრომის შიდაუჯრედული მარაგი წარმოდგენილია ნეიტროფილების სპეციფიკური (მეორადი) გრანულების მემბრანაში. ეს ნაერთი ჩაშენდება ოქსიდაზას კომპლექსში, როცა გრანულის მემბრანა შეერწყმება პლაზმურ მემბრანას. b ციტოქრომი პირდაპირ გარდაქმნის ჟანგბადს სუპეროქსიდად [50].

ჟანგბადური აფეთქების საწყისი პროდუქტია სუპეროქსიდის ანიონი (O_2^-), რომელიც წონასწორობაშია პერჰიდროქსილის რადიკალთან (HO_2)[46,47]. O_2^- უპირატესად აღმდგენია, მაგრამ შეიძლება

მჟანგავადაც წარმოგვიდგეს. ბიოლოგიურად მნიშვნელოვანი მრავალი ნაერთი ძლიერ ნელა ურთიერთქმედებს O_2^- -თან, ამიტომ ითვლება, რომ O_2^- არ აქვს საკმარისი რეაქტიულობა იმისათვის, რომ იგი ტოქსიკური იყოს უჯრედთათვის. თუმცა O_2^- -ის ქიმიური აქტიურობა საგრძნობლად იზრდება არაპოლარულ გარემოში, როგორიცაა მემბრანათა ჰიდროფობური უბნები, ვინაიდან აქ არ არის კონკურენცია O_2^- -ის მონაწილეობით მიმდინარე რეაქციებსა და დისმუტაციის რეაქციას შორის, რომელიც პროტონს საჭიროებს[49].

HO_2^- გაცილებით უფრო ძლიერი მჟანგავია, ვიდრე O_2^-. ეს იძლევა საშუალებას ვივარაუდოთ, რომ pH-ის ლოკალური ვარდნა, რასაც შეიძლება ადგილი ჰქონდეს ფაგოსომაში ან მემბრანის ზედაპირთან, გამოიწვევს წონასწორობის გადანაცვლებას HO_2^- -სკენ. O_2^- შედარებით დაბალი რეაქტიულობის გამო მას შეიძლება ჰქონდეს ბიოლოგურ სითხეებში და გარკვეულ მემბრანათა ანიონურ არხებში დიფუზიის უნარი, რაც თავის მხრივ განაპირობებს მის ტოქსიკურ ზემოქმედებას O_2^- წარმომქმნელი უჯრედებიდან მოშორებულ სამიზნეებზე უფრო რეაქტიული მჟანგავების წარმოქმნის გზით [47].

როდესაც ურთიერთქმედებს ორი სუპეროქსიდის ანიონი O_2^-, ერთ-ერთი იჟანგება, მეორე კი-აღდგება დისმუტაციის რეაქციაში, რომლის პროდუქტია წყალბადის პეროქსიდი H_2O_2:

$$2O_2^- + 2\,H^+ \rightarrow O_2 + H_2\,O_2$$

ეს რეაქცია ან სპონტანურად წარიმართება, ან მას სუპეროქსიდდისმუტაზა (სოდ) აკატალიზებს. სპონტანური დისმუტაციისათვის ოპტიმალურია pH=4,8. მისი ეფექტურობა მცირდება pH-ის ზრდასთან ერთად. ამ დროს დიდ მნიშვნელობას იძენს სოდ-ის მონაწილეობით მიმდინარე კატალიზური რეაქცია. თუმცა არის ცნობები შიდაფაგოსომური pH-ის ადრეული მატების თაობაზე,

მაგრამ გამოკვლევათა უმრავლესობამ აჩვენა, რომ ფაგოსომაში pH იმ დონემდე ეცემა, რომელიც ოპტიმალურია სპონტანური დისმუტაციისათვის. აქედან გამომდინარე, კატალიზი სოდ-ის მონაწილეობით შეიძლება არცაა აუცილებელი H_2O_2 წარმოსაქმნელად. არ არსებობს მონაცემები, რომელთა მიხედვით ნეიტროფილთა სოდი ფაგოსომაში გადადის. მაგრამ სოდი შეიძლება მოხვდეს ფაგოსომაში შთანთქმული ორგანიზმის კომპონენტის სახით.

მიუხედავად იმისა, რომ ფაგოციტების მიერ წარმოქმნილ H_2O_2-ს აქვს ტოქსიკური თვისებები, მისი რეაქტიულობა მისგანვე (H_2O_2) წარმოქმნილ ტოქსიკურ პროდუქტებთან (ჰიპოჰალოგენ მჟავები). H_2O_2-ის ტოქსიკურობა ძლიერ იზრდება ჰალიდებთან ურთიერთქმედების შედეგად, რასაც პეროქსიდაზა აკატალიზებს. ჰალიდებს ჟანგავს პეროქსიდაზასა და H_2O_2 -ის კომპლექსი, რის შედეგადაც მიიღება ჰიპოჰალოგენ მჟავები, ჰალოგენები ან სხვა ტოქსიკური ჰალოგენწარმოებულები [41,47].

ძუძუმწოვართა ქსოვილებში არის ბევრი სხვადასხვა პეროქსიდაზა, რომლებიც ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან პირველადი სტრუქტურით, პროსთეტიული ჯგუფით და მიკრობოციდული აქტივობისათვის საჭირო ჰალიდის მოთხოვნილებით. ნეიტროფილების პეროქსიდაზა ანუ მიელოპეროქსიდაზა (მპო) წარმოდგენილია ამ უჯრედთა აზუროფილურ გრანულებში და ფაგოსომებში გვხვდება ნაწილაკის შთანთქმით გამოწვეული დეგრანულაციის შედეგად. მპო ურთიერთქმედებს ჰალიდთან და H_2O_2 რომელიც ან ჟანგბადური აფეთქების ან გარკვეულ შთანთქმულ მიკროორგანიზმთა ცხოველქმედების პროდუქტია. ურთიერთქმედების შედეგად იქმნება მიკრობოციდული სისტემა [51].

მართალია, მპო–ს მონაწილეობით წარმოქმნილი ანტიმიკრობული სისტემა აქტიურად ფუნქციონირებს ქლორიდით, ბრომიდითა და

იოდიდითაც, მაგრამ ფიზიოლოგიური ჰალიდი ქლორიდია, რომელიც იჟანგება და გარდაიქმნება ჰიპოქლორმჟავად/ჰიპოქლორიდად ($HOCl/OCl^-$). მჟავე pH-ის დროს HOCl-მა შეიძლება იმოქმედოს ჭარბ ქლორიდთან, რის შედეგადაც ქლორინი მიიღება. თვით HOCl ძლიერ ტოქსიკურია მრავალი მიკროორგანიზმისათვის, მაგრამ საკმაოდ სწრაფად იშლება. მან შეიძლება იმოქმედოს პირველად და მეორად ამინებთან და ამგვარად წარმოშობს N-ქლორამინებს, რომელთაგან რიგი მეტად სტაბილური მიკრობოციდული აგენტია[47].

ნორმალური ფაგოციტოზის პირობებში ნეიტროფილები სუპეროქსიდის 75%-ს გარდაქმნიან ჰიპოქლორმჟავად და N-ქლორამინებად და, ამგვარად, ფაგოსომებსა და უჯრედშორის სივრცეში ძლიერ ტიქსიკურ გარემოს ქმნიან. ეს კი იმით არის განპირობებული, რომ დეგრანულაცია შეიძლება დაიწყოს ფაგოსომის კედლების საბოლოო ფორმირებამდე. ამიტომ მპო-ს სისტემამ შეიძლება ტოკსიკურად იმოქმედოს არა მხოლოდ შიდაფაგოსომურ სამიზნეებზე (მაგ, ბაქტერიებს, სოკოებსა და ერთუჯრედიანებზე), არამედ უჯრედის მახლობელ მიკროორგანიზმებზე (ბაქტერიებს, სოკოებს, ვირუსებს, ერთუჯრედიანებსა და ჭიებზე), ძუძუმწოვართა ნორმალურ და მალიგნიზირებულ უჯრედებზე და გარკვეულ უჯრედგარე ნივთიერებებზე (α_1-პროტეინაზის ინჰიბიტორი, ლეიკოტრიენები ქემოტაქსისის ფაქტორები). მიუხედავად იმისა, რომ პეროქსიდაზას სისტემა ბუნებით ზოგადად მაინჰიბირებელია მას შესწევს უნარი ასტიმულიროს გარკვეული უჯრედები (თრომბოციტები, პოხიერი უჯრედები) და ამგვარად აიძულოს ამ უჯრედებს სათანადო ნივთიერებათა სეკრეცია ან გააქტივოს გარკვეული ფერმენტები (პროკოლაგენაზა, პროჟელატინაზა). პეროქსიდაზას სისტემის მოქმედების შედეგად წარმოქმნილ მჟანგავებს შეუძლიათ სამიზნე უჯრედთა ან მოლეკულათა სხვადასხვა ქიმიური საიტის

(სულფჰიდროლის ჯგუფები, რკინა–გოგირდის ცენტრები, გოგირდ–ეთერის ჯგუფები, უჯერი ცხიმოვანი მჟავები, კიდურა ამინოჯგუფები, პეპტიდური ბმები და სხვა) დაჟანგვა. შესაძლებელია აგრეთვე ჰალიდის კოვალენტური დაკავშირებაც (ჰალოგენიზაცია) სამიზნესთან. მეორე მექანიზმი, რომელიც ზრდის H_2O_2 -ის ტოქსიურობას, წარმოადგენს Fe^{2+} -ის (ფენტონის რეაგენტი) ან სხვა ლითონის მონაწილეობით მიმდინარე რეაქციებს, რომლებიც ჰიდროქსილის რადიკალს (OH) წარმოქმნიან [41].

კიდევ ერთი ტოქსიკური პროდუქტი ჟანგბადური აფეთქებისა არის სინგლეტური ჟანგბადი ($^1O_2$). იგი წარმოიქმნება, როცა ჟანგბადის გაუწყვილებელი სავალენტო ელექტრონი უფრო მაღალ ენერგეტიკულ ორბიტალზე გადაინაცვლებს, რასაც თან მისი სპინის შებრუნება ახლავს. არსებობს $^1O_2$ ორი ფორმა – დელტა (δ) და სიგმა (σ). დელტა–$^1O_2$ ის ენერგია სიგმა–$^1O_2$ ის ენერგიაზე დაბალია, მაგრამ იგი უფრო ხანგრძლივად არსებობს (დაახლოებით 2 მკწმ) და წარმოადგენს $^1O_2$ რეაქტიულ ფორმას. ხსნარში იგი ძლიერ ელექტროფილურია ქიმიურ ნაერთებთან, მაღალი ელექტრონული სიმკვრივის უბნებში ურთიერთქმედებს და ჟანგავს მათ. მართალია, ფაგოციტთა ანტიმიკრობული სისტემები *in vitro* $^1O_2$ ს წარმოქმნიან, მაგრამ ინტაქტურ ნეიტროფილებში ამ პროცესის გამოვლინების მცდელობანი წარუმატებლად დასრულდა და, როგორც ჩანს, უჯრედში წარმოქმნილი $^1O_2$-ის რაოდენობა არაა საკმარისი ანტიმიკრობული სისტემის მოქმედებაში მნიშვნელოვანი წვლილის შესატანად [41].

თავი III. ფუნქციური დარღვევები ნეიტროფილებში B-ქლლ-ს დროს

ლიტერატურული მონაცემები პმნ-ის ფუნქციური დარღვევების შესახებ B-ქლლ-ს დროს ძალიან მცირეა. Itala-სა და თანამშრომლების მიერ **B**-ქლლ პაციენტებში ნანახი იყო ასოციაცია ინფექციებისადმი მიდრეკილებასა და პმნ-ის დარღვეულ ქემოტაქსისს შორის: იმ პაციენტებს, რომელთაც აღენიშნებოდათ ინფექციური გართულებები, მნიშვნელოვნად ჰქონდათ შემცირებული პასუხი 2 ქემოტაქტურ ფაქტორზე, fMLP და C5a-ზე, **B**-ქლლ არაინფექციურ პირებსა და ჯანმრთელ კონტროლებთან შედარებით. მათ ასევე შეისწავლეს პმნ-ის ბაქტერიციდული ფუნქციები: ქემილუმინესცენცია, ფაგოციტოზი და უჯრედშიდა კილინგი. აღმოჩნდა, რომ ქემილუმინესცენცია მნიშვნელოვნად იყო შემცირებული მიმდინარე ინფექციის მქონე **B**-ქლლ პაციენტებში. ქემილუმინესცენციის დეფექტი ამ პაციენტებში არ იყო გამოწვეული მიელოპეროქსიდაზის დეფიციტით. პმნ-ის ფაგოციტური აქტივობა, რომელიც შეისწავლეს პრეოფსონიზირებული *S.aureus*-ის გამოყენებით, იყო ინტაქტური [3].

B-ქლლ პაციენტებში ქემილუმინესცენციის შემცირება ასევე ნანახი იყო სხვა მკვლევარების მიერ, თუმცა ქემილუმინესცენციის დარღვევა არ კორელირებდა ინფექციურ გართულებებთან [32]. ასევე ნაჩვენებია **B**-ქლლ-ს დროს შრატის ოფსონური აქტივობის შემცირება, რაც არ უკავშირდება შრატის IgG ან კომპლემენტის ფაქტორთა კონცენტრაციას [31].

B-ქლლ პაციენტების შრატში ნანახია გრანულოციტებისკენ მიმართული ქემოკინეზის ინჰიბირების ფაქტორი და ნაჩვენებია, რომ ამ ფაქტორის გამომუშავება მხოლოდ B-ქლლ უჯრედებს ახასიათებთ [35,43]. რაც შეეხება პმნ-ის ფაგოციტურ ფუნქციებზე გავლენას,

ნანახია, რომ B-ქლლ დაავადებულთა ნერწყვს აქვს ფაგოციტოზის ინჰიბირების უნარი. დადგენილია, რომ ჯანმრთელი ადამიანის ნერწყვი შეიცავს ფაგოციტოზის სტიმულირების ფაქტორს. იგი ზრდის ***in vitro*** ლატექსის ნაწილაკების ფაგოციტოზს პმნ-ის მიერ, ხოლო ჯანმრთელი დონორების ნეიტროფილები, რომელთაც დამატებული ჰქონდათ B-ქლლ დაავადებულთა ნერწყვი, ავლენდნენ ლატექსის ნაწილაკების ფაგოციტირების დაქვეითებას კონტროლთან შედარებით [42].

თავი IV. Fcγ-რეცეპტორები

4.1 ზოგადი დახასიათება

Fcγ-რეცეპტორები მემბრანული გლიკოპროტეინებია, რომლებიც იკავშირებენ IgG-ს მონომერული ან აგრეგირებული ფორმით. ისინი ექსპრესირებულია როგორც ჰემოპოეტურ, ასევე დამხმარე (ფოლიკულოდენდრიტულ, ლანგერჰანსის, ენდოთელურ) უჯრედებზე [75,83] და მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ მრავალ იმუნურ რეაქციაში, ქმნიან რა დამაკავშირებელ რგოლს უჯრედულ ეფექტორულ მექანიზმებსა და ჰუმორულ იმუნიტეტს შორის [78,83]. IgG-ით ოპსონიზირებული პათოგენი ან იმუნური კომპლექსი Fc-ფრაგმენტით უკავშირდება უჯრედზე არსებულ რეცეპტორს, რაც განაპირობებს მის ფაგოციტოზს გრანულოციტებისა და მონოციტ/მაკროფაგების მიერ. რეცეპტორი განაპირობებს აგრეთვე ამ უჯრედებისა და დიდი გრანულარული ლიმფოციტების (LGL/NK) ე.წ. ანტისხეულდამოკიდებულ უჯრედულ ციტოტოქსიკურ რეაქციას (ADCC), რომელიც MHC I-დამოუკიდებელია და მიმართულია ვირუსით ინფიცირებული და სიმსივნური უჯრედების წინააღმდეგ[39].

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, TNFα გამოთავისუფლებას და, აქედან გამომდინარე, ანთებითი პროცესის აღძვრას [83,84]. $Fc\gamma R^{+}$ უჯრედთა ერთი ნაწილი ამავდროულად ანტიგენ-წარმდგენიცაა (მაკროფაგები, დენდრიტული უჯრედები), ამიტომ რეცეპტორით გაშუალებული ინტერნალიზაცია განაპირობებს ანტიგენის წარდგენას და იმუნური პასუხის გაძლიერებას [83,85].

მოლეკულური მასის, ლიგანდსპეციფიკურობის, აფინობისა და გავრცელების მიხედვით გამოყოფენ Fcγ–რეცეპტორების სამ ტიპს: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16). ცალკე განიხილავენ FcRn, რომელიც IgG-ს ტრანსციტოზს ემსახურება. თითოეულ კლასში, თავის მხრივ, გამოიყოფა ქვეკლასები, რომელთაგანაც ყოველ მათგანს საკუთარი გენი შეესაბამება. ადამიანის შემთხვევაში ყველა მათგანი მოთავსებულია I ქრომოსომის გრძელ მხარში [77,83].

მჟავე არე ზრდის რეცეპტორის ავიდობას იმუნური კომპლექსების მიმართ, დაკავშირების საერთო უნარის ცვლილების გარეშე. ეს მოვლენა საინტერესოა, თუ გავითვალისწინებთ, რომ ანთებითი რეაქციის (რომლის აღძვრაშიც იმუნური კომპლექსები მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ) არეს $pH<7$ [84].

FcγR-ები ლიგანდის დაკავშირების შედეგად აგრეგირდებიან, რაც იძლევა ბიძგს უჯრედში აქტივაციის სიგნალის გადასაცემად. ეს კი რამდენიმე გზით ხორციელდება. FcγR-თა ერთი ნაწილი ჰეტეროოლიგომერული კომპლექსია და მოიცავს ლიგანდდამაკავშირებელ α-ჯაჭვს და სასიგნალო კომპონენტს [75,83,84], რომელიც წარმოდგენილია γ (CD4), ξ (TCR), β ჯაჭვებით. ამ ჯგუფს მიეკუთვნება FcγRI, FcγRIIIa. სასიგნალო ჯაჭვის ციტოპლაზმურ

ნაწილში მოიპოვება ე.წ. იმუნორეცეპტორის აქტივაციის თიროზინიანი თანმიმდევრობა (ITAM), რომელიც შედგება ორჯერადი თირ-X-X-ლეი თანმიმდევრობისაგან, რომელთა შორისაც ჰეპტაპეპტიდია [75]. მეორე ჯგუფს ეკუთვნის ერთჯაჭვიანი FcγRIIa,c. მათ გააჩნიათ ITAM, რომელიც შუალედში შეიცავს არა შვიდ, არამედ თორმეტ ამინომჟავას. მათ ემსგავსება FcγRIIb-ც, მაგრამ მის ციტოპლაზმურ ნაწილში არის არა ITAM, არამედ ე.წ. იმუნორეცეპტორის დამთრგუნველი თიროზინიანი თანმიმდევრობა (ITIM). მესამე ჯგუფში შემავალი რეცეპტორები საერთოდ არ საჭიროებენ სიგნალის გადაცემას, რადგანაც მხოლოდ IgG-ს გადატანას ემსახურებიან (FcγRn). დასასრულს, მეოთხე ჯგუფში მხოლოდ ერთი წევრია: FcγRIIIb, რომელიც დაკავშირებულია მემბრანის ლიპიდურ შრეში არსებულ გლიკოფოსფატიდილინოზიტოლთან, არ გააჩნია ტრანსმემბრანული და ციტოპლაზმური ნაწილები და სიგნალის გადასაცემად სხვა რეცეპტორთან კავშირი ესაჭიროება [75,76].

FcγRI (CD64, M_r=72კდა) გლიკოპროტეინია. აქვს გლიკოზილირების ექვსი შესაძლო წერტილი [78]. რეცეპტორი შედგება ციტოპლაზმური (C-ბოლო), ტრანსმემბრანული და უჯრედგარე ნაწილებისაგან. უჯრედში აქტივაციის სიგნალი გადაეცემა ლიგანდდამაკავშირებელ ჯაჭვთან ასოცირებული γ–γ ჰომოდიმერის მეშვეობით. γ-ჯაჭვი არ მიეკუთვნება IgSF-ს, იგი TCR-ის ζ–ს ჰგავს, α-ჯაჭვს უერთდება ტრანსმემბრანულ ნაწილში მყოფი ასპარაგინის მჟავას ნაშთით. მისი გენი როგორც თაგვში, ასევე ადამიანში პირველ ქრომოსომაშია მოთავსებული [75]. γ–ჯაჭვის არსებობა აუცილებელია არა მხოლოდ სიგნალის გადაცემის, არამედ რეცეპტორის ექსპრესიისა და მისი მაღალი აფინობისთვისაც. რეცეპტორი მაღალაფინურად (10^{8-9}/მოლი) იკავშირებს IgG1, IgG3, IgG4–ს [78,83] როგორც მონომერულ, ასევე

აგრეგირებულ ფორმას. არეს pH ლიგანდის დაკავშირებაზე არ მოქმედებს [84]. რეცეპტორი ექსპრესირებულია $CD34^{+}$ მიელოიდურ წინამორბედებზე, მონოციტებზე, მაკროფაგებსა და დენდრიტულ უჯრედებზე [83]; მისი სიმკვრივე ახალშობილებსა და მოზრდილებში ერთნაირია. ახლადგამოყოფილ გრანულოციტებზე ცოტაა (<1000) [38]. პმნ-ზე **IFNγ** მოქმედება ზრდის **CD64** სიმკვრივეს [58]. ანალოგიურად (მხოლოდ უფრო ნაკლებად) მოქმედებს ნეიტროფილებზე G-CSF[67]. ექსპრესიის გამაძლიერებელია IL-10-იც. მათი საწინააღმდეგო მოქმედება აქვთ IL-4, IL-13-ს [83].

FcγRII (CD32) მოიცავს უჯრედშიდა, ტრანსმემბრანულ და უჯრედგარე ნაწილებს. ამ უკანასკნელში ორი Ig-ს მსგავსი დომენია. რეცეპტორი ექსპრესირებულია სისხლის თითქმის ყველა ფორმიან ელემენტზე - მონოციტებზე, გრანულოციტებზე, თრომბოციტებზე (მათთვის ერთადერთი რეცეპტორია), B-ლიმფოციტებზე, T ლიმფოციტების სუბპოპულაციაზე, ასევე მაკროფაგებზე, ლანგერჰანსისა და დენდრიტულ უჯრედებზე [83]. რეცეპტორის აფინობა IgG-ს მიმართ გაცილებით მცირეა და 10^{7}/მოლს აღწევს, ამასთან, კავშირი მყარდება მხოლოდ IgG-ს აგრეგატებთან და იმუნურ კომპლექსებთან. გენომში მას შეესაბამება სამი გენური ელემენტი: RIIA, RIIB, RIIC, რომელთა პროდუქტებია, შესაბამისად, RIIa, b, c [77].

FcγRII-ის ცალკეული ტიპები განსხვავებული გავრცელებითაც ხასიათდებიან. FcγRIIa,c ექსპრესირებულია მონოციტებზე, მაკროფაგებზე, გრანულოციტებზე, თრომბოციტებზე, FcγRIIB-ს კი - მონოციტებზე, მაკროფაგებზე, B-ლიმფოციტებზე [83]. მონოციტ/მაკროფაგებზე მისი სიმკვრივე დაახლოებით ერთნაირია და მას GM-CSF ზრდის, ხოლო IL-4 კი - თრგუნავს [77].

FcγRIII (CD16) ძლიერ გლიკოზილირებული რეცეპტორია. გლიკოზილირების ხარისხის მიხედვით მისი მოლეკულური მასა მერყეობს 40-80კდა. ცილას აკოდირებს 1q23-24 ლოკუსში მდებარე ორი ჰომოლოგიური გენი FcγR III A, B, რომლებიც ერთმანეთისაგან მხოლოდ ცხრა ნუკლეოტიდური წყვილით განსხვავდებიან. ცილოვან პროდუქტებს FcγRIIIa, b უჯრედსპეციფიკური გავრცელება ახასიათებთ. FcγRIIIa ტრანსმემბრანული მოლეკულაა, აქვს 25 ამინომჟავისაგან შემდგარი ციტოპლაზმური "კუდი" [75]. ექსპრესირებულია მონოციტებზე (ძლიერ მცირედ, მათ სუბპოპულაციაზე, რომლის წილი დაახლოებით 10-15%-ია [83,85], მაკროფაგებზე, LGL/NK, პრე-B, T (ალბათ γ/δ) უჯრედებზე. მოლეკულური მასა დამოკიდებულია უჯრედ-მატარებელზე [75]. ლიგანდდამაკავშირებელი ნაწილი უკავშირდება სიგნალის გადამცემს, რომელიც წარმოდგენილია γ–ჯაჭვის ჰომოდიმერით, TCR-ის ζ–ჰომოდიმერით, ζ–γ ჰეტეროდიმერით, ანდა ერთეული β–ჯაჭვით. ζ და γ ჯაჭვებს შორის არის როგორც რაოდენობრივი, ასევე თვისებრივი განსხვავებები: პირველი მათგანი გამოიხატება იმით, რომ ζ–ს სამი ITAM-ი აქვს, მეორე კი გულისხმობს განსხვავებებს სიგნალის გადაცემის გზასა და ეფექტორულ ფუნქციაში, მაგ. პროტეინკინაზების განსხვავებულად დაკავშირებას და აქტივაციას.

არსებობს მონაცემები, რომ ζ–ს მატარებელი NK უჯრედები და ნეიტროფილები უფრო ძლიერ ციტოტოქსიკურ რეაქციას განახორციელებენ, ვიდრე γ–სი, ხოლო ფაგოციტური აქტივობა პირიქითაა. ამის მიზეზია სპეციფიკურ და შუალედურ თანმიმდევრობებში განსხვავებული ამინომჟავების არსებობა, თუმცა თიროზინული და ლეიცინური ნაშთები უცვლელია [75,87]. β-ჯაჭვი მიეკუთვნება CD20-ის ოჯახს. იგი უკავშირდება პოხიერ უჯრედზე

მყოფ FcγRIIIa-ს ლიგანდდამაკავშირებელ α-ჯაჭვს. β-მემბრანას ოთხჯერ განჭოლავს. სასიგნალო თანმიმდევრობა C-ბოლოზეა მოთავსებული [75]. სასიგნალო ჯაჭვები იცავენ რეცეპტორს ენდოპლაზმურ ბადეში დაშლისაგან და განაპირობებენ მის ექსპრესიას უჯრედის ზედაპირზე. უჯრედგარე ნაწილი FcγRII-ის ჰომოლოგიურია. მასში ორი მნიშვნელოვანი ცვალებადი წერტილია. 48-ე წერტილში განსხვავების საფუძველზე გამოიყოფა სამი ალოტიპი, ხოლო 158-ში ვალინის ან ფენილალანინის არსებობა იწვევს ფუნქციურ განსხვავებას. ვალინ-ფენილალანინური პოლიმორფიზმი მნიშვნელოვანია ორგანიზმის აუტოიმუნური დაავადებების მიმართ მგრძნობელობისათვის [78]. G-CSF-ს მოქმედებით რეცეპტორის სიმკვრივე ნეიტროფილებზე ქვეითდება. დამთრგუნველ მოქმედებას ავლენს IL-4-იც [77].

FcγRIIIa-ს 203-ე ამინომჟავაა ფენილალანინი, მისგან განსხვავებით FcγRIIIb-ში ამ ადგილს სერინი იკავებს. მისი შესაბამისი გენის იმ კოდონში, რომელიც აკოდირებს 204-ე ამინომჟავას, FcγRIIIA-საგან განსვავებით აღინიშნება ტრანსვერსია C→T, წარმოიქმნება "სტოპ-კოდონი" TGA, ტრანსკრიპცია ველარ გრძელდება. ამის გამო FcγRIIIb მოკლებულია ტრანსმემბრანულ და ციტოპლაზმურ ნაწილებს. იგი უკავშირდება მემბრანის ლიპიდურ შრეში არსებულ გლიკოფოსფოინოზიტოლს (გფა). 190 ამინომჟავის სიგრძის მქონე უჯრედგარე ნაწილში ორი Ig-ს მსგავსი დომენია [77]. რეცეპტორი ექსპრესირებულია გრანულოციტებზე. ნეიტროფილებზე მათი რიცხვი 1-2X10^5 აღწევს [84], მაგრამ აქტივატორთა დამატების შედეგად მათი რაოდენობა 50-90%-ით მცირდება. შესაძლებელია, ისინი ააქტიურებდნენ ენდოგენურ პროტეაზას, რომელიც "ხსნის" მოლეკულას უჯრედის ზედაპირიდან [77]. რეცეპტორის სხვადასხვა

ფორმების M_r=40-80კდა. მას სამი იზოფორმა გააჩნია - NA1 (Neutrophil Antigen),NA2, SH. ისინი განსხვავდებიან ამინომჟავური შედგენილობით, რაც მოქმედებს მათ ლიგანდსპეციფიურობასა და აფინობაზე [78].

FcRn, რომელიც მაღალაფინურად იკავშირებს მონომერულ IgG-ს, პირველად აღწერილ იქნა ახალშობილ ვირთაგვებში. იგი ჰეტეროდიმერია და აგებულია ლიგანდდამაკავშირებელი α სუბერთეულისაგან, რომელიც MHC I-ის მსგავსია, და β_2-მიკროგლობულინისაგან. α სუბერთეულის უჯრედგარე ნაწილში სამი C1-ტიპის Ig-მსგავსი დომენია [75,84]. რეცეპტორი ექსპრესირებულია ნაწლავის ეპითელურ, ჩანასახის ყვითრის პარკის, ტროფობლასტის, ღვიძლის უჯრედებზე (ამ უკანასკნელს IgG ნაღვლიდან პარენქიმაში გადააქვს). ლიგანდ-რეცეპტორული კომპლექსი ერთვება პინოციტურ ვაკუოლში და ამგვარი სახით აღწევს ციტოპლაზმაში, რაც იცავს მას ლიზოსომური ფერმენტებისაგან [75].

რეცეპტორის აფინობა მონომერული IgG-ს მიმართ 2-5X10^7/მოლია. კავშირი მყარდება pH 6,0-ზე, მის მატებასთან ერთად კი, ჯერ ორჯერ იკლებს, შემდეგ კი pH 7,3 -ზე სრულიად ქრება. ამის შესაბამისად, ნაწლავში, სადაც მჟავე არეა, FcRn იკავშირებს რძეში მყოფ დედისეულ IgG-ს, ბავშვის სისხლში კი, სადაც pH=7,3-ია, კავშირი წყდება და მოლეკულა თავისუფლად ცირკულირებს [75,84]. დაკავშირებისათვის საჭიროა Fc-ში არსებული ჰისტიდინის ნაშთების (3-4) იონიზაცია, რაც ფრაგმენტს რეცეპტორის ლიგანდდამაკავშირებელი უბნის ამინომჟავურ ნაშთებთან ელექტროსტატიკურად ბმის უნარს ანიჭებს. როგორც ჩანს, pH-ის ცვლილება სწორედ იონიზაციის პროცესზე ახდენს გავლენას [84].

4.2. FcγR-ების ურთიერთქმედება ერთმანეთთან და სხვა რეცეპტორებთან

როგორც წესი, სამივე რეცეპტორი ერთსა და იმავე პროცესებში (ანტიგენის წარდგენა, ფაგოციტოზი, ციტოტოქსიკური მოქმედება) მონაწილეობს, მაგრამ, მიუხედავად იმისა, რომ უჯრედგარე დომენები არ ამჟღავნებენ განსაკუთრებულ ლიგანდსპეციფიურობას, თითოეული მათგანი ბიძგს აძლევს დამახასიათებელ ბიოლოგიურ პასუხს, რომლის ბუნებასაც განსაზღვრავს უჯრედი-მატარებელი [83]. ზოგიერთი უჯრედი ერთდროულად ატარებს სხვადასხვა FcγR-ს, მაგ. ლანგერჰანსის უჯრედებზე არის FcγRIIb და FcγRIIIa, თაგვის მაკროფაგებზე - FcγRI FcγRIIb და FcγRIIIa, ადამიანის ნეიტროფილებზე - FcγRI, FcγRIIa და FcγRIIIb [75]. უჯრედზე ერთდროული ექსპრესიის შემთხვევაში FcγR-ები ტრანსმემბრანულ ნაწილების მეშვეობით ურთიერთქმედებენ როგორც ერთმანეთთან, ასევე სხვა რეცეპტორებთანაც. ურთიერთქმედება შეიძლება იყოს დადებითი, ან უარყოფითი. 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 და ამ ლიგანდს წარუდგენს FcγRIIa-ს [88], ერთობლივ ქმედებას ხელს უწყობს ისიც, რომ ორივე მათგანი იკავშირებს IgG-იან იმუნურ კომპლექსებს, რაც განაპირობებს მათ ერთობლივ აქტივაციას [77]. ამასთანავე ერთდროული ამოქმედების დროს აღძრული პასუხი (Ca^{2+} მობილიზაცია, ჟანგბადური რადიკალების გამომუშავება, ფაგოციტოზის სხვა მაჩვენებლები)

ცალკეული მათგანის აქტივაციით გამოწვეულზე უფრო ინტენსიური და ძლიერი აღმოჩნდა [78]. ურთიერთქმედება საჭირო აღმოჩნდა ADCC რეაქციის ჯეროვანი განხორციელებისთვისაც [88].

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 მგრძნობიარენი არიან მენინგოკოკური ინფექციის მიმართ [78]. 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 [75,88,91].

FcγRI-სა და FcγRII შორის ურთიერთქმედებაზე მიუთითებს ის, რომ FcγRI საწინააღმდეგო ანტისხეულების მოქმედებით ითრგუნებოდა FcγRII-ით გაშუალებული ფაგოციტოზი [78]. FcγRIIIa-ს ურთიერთქმედება ფიბრონექტინის რეცეპტორთან იცავს IL3-ზე დამოკიდებულ უჯრედებს აპოპტოზისაგან IL3-ს მოკლებულ არეში.

უარყოფითი ურთიერთქმედების მაგალითებიდან უპირველესად უნდა დასახელდეს FcγRIIb-ს უარყოფითი გავლენა ITAM-ის შემცველ ყველა რეცეპტორზე [75,83]. მისი აგრეგაცია BCR-თან თრგუნავს B-უჯრედის აქტივაციას და Ig-ების სინთეზს. იგივე ითქმის TCR-ისა და FcεRI-ის შემთხვევაშიც.

4.3. FcγR -ების მნიშვნელობა სიმსივნეების იმუნოთერაპიისათვის

დღეისათვის უკვე კარგადაა ცნობილი, რომ სიმსივნური უჯრედების განადგურება ხორციელდება FcγR-ებით გაშუალებული ფაგოციტოზისა და ADCC-ს მეშვეობით. აქედან გამომდინარე, ამ რეაქციების განმახორციელებელი FcγR$^+$-უჯრედებისადმი (გრანულოციტები, მონოციტ/მაკროფაგები, NK უჯრედები) მიმართული ბისპეციფიური მოლეკულების და სიმსივნის საწინააღმდეგო მონოკლონური ანტისხეულების (მკა) გამოყენება ამჟამად ყველაზე უფრო აქტუალური მიდგომაა სიმსივნის თერაპიის გზების კვლევაში.

მონოკლონური ანტისხეულების გამოყენება მიზნად ისახავს სიმსივნური უჯრედის რომელიმე ზედაპირული მარკერის საწინააღმდეგო მკა-ს მეშვეობით მის დაფოკუსირებას ეფექტორულ უჯრედზე, რომელიც მის მიმართ განახორციელებს ფაგოციტოზს, ან ADCC [95]. რა თქმა უნდა, რეაქციის სასურველი გზით წარსამართად საჭიროა მრავალი დამატებითი ფაქტორის, უპირველეს ყოვლისა კი, სხვა რეცეპტორული კავშირების, ციტოკინების მონაწილეობის გათვალისწინება. მხედველობაში უნდა იქნეს მიღებული რეცეპტორის ტიპი, მისი აფინობა ლიგანდის მიმართ, IgG-ის იზოტიპი. ადამიანის შემთხვევაში ანტისხეულის საუკეთესო კანდიდატად ითვლება IgG1, რომელსაც შეუძლია მაღალაფინური დაკავშირება რეცეპტორების ფართო სპექტრთან, აქვს კომპლემენტის აქტივაციის უნარი. *In vivo* მათ ახასიათებთ კარგი ფარმაკოკინეტიკა, ხანგრძლივი ნახევარდაშლის პერიოდი და ოპტიმალური სტაბილურობა [96], რაც გამოწვეულია მისი შედარებით ნაკლები იმუნოგენურობით, აგრეთვე FcRn-თან დაკავშირების უნარით, რაც, როგორც ითქვა, იცავს მათ დაშლისაგან [89]. რეცეპტორებიდან ყველაზე მეტი ყურადღება ექცევა FcγRI და FcγRIIIa-ს, რადგანაც სწორედ მათი მატარებელი უჯრედები განახორციელებენ ციტოტოქსიკურ რეაქციებს სიმსივნური უჯრედების

წინააღმდეგ [75,89,95]. განსაკუთრებით აღსანიშნავია პირველი მათგანი, რადგან იგი მოიპოვება ანტიგენწარმდგენ უჯრედებზეც და, ამგვარად, ამ ფუნქციასაც ასტიმულირებს [96].

რიგი გამოკვლევებისა აჩვენებს, რომ FcγR-ების ექსპრესიის გამომწვევი და გამაძლიერებელი ციტოკინების მოქმედებით შესაძლებელია ეფექტორული უჯრედების (ნეიტროფილები, მონოციტ/მაკროფაგები, T და NK უჯრედები) მიერ სიმსივნესაწინააღმდეგო რეაქციების გამოწვევა და გაძლიერება. მათგან აღსანიშნავია G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IFNγ, IL-2, IL-10. G-CSF-ის მოქმედებით, როგორც *in vitro*, ასევე *in vivo,* იმატებს ნეიტროფილების რიცხვი და აქტიურდება მათი ფუნქციები: O_2^- გამოყოფა, ადჰეზია, იმატებს ადჰეზიის მოლეკულების LAM-1, CD11b/CD18 (Mac-1) ექსპრესია [90]. უკანასკნელი მათგანი აუცილებელი აღმოჩნდა ნეიტროფილების მიერ სამიზნე-უჯრედთან მჭიდრო კონტაქტის (ე.წ. იმუნოლოგიური სინაპსის) წარმოსაქმნელად და ADCC-ს განხორციელებისათვის [91]. G-CSF-ით ნამკურნალევი სიმსივნით დაავადებული პირების სისხლიდან გამოყოფილი, ასევე in vitro IFNγ-ით გააქტიურებული ნეიტროფილები ეფექტურად ანადგურებდნენ სიმსივნურ (ნეირობლასტომურ) უჯრედებს ADCC-ს მეშვეობით [90,95]. როგორც აღმოჩნდა, IFNγ ანალოგიურად მოქმედებდა ნეიტროფილების მიერ ქლლ უჯრედების საწინააღმდეგო ციტოტოქსიკური რეაქციის განხორციელებაზეც, PBMC-ზე კი მისი ეფექტი გაცილებით სუსტი იყო. ეს უკანასკნელნი რეაქციისათვის იყენებდნენ FcγRIIIa-ს, ხოლო ნეიტროფილები - FcγRI-ს, რომლის ექსპრესიაც ძლიერდებოდა IFNγ-ით. სამაგიეროდ, PBMC-თა მიერ ქლლ უჯრედების საწინააღმდეგო რეაქციას (როგორც ანტისხეულ-დამოუკიდებელი, ისე ანტისხეულდამოკიდებული) აძლიერებდა მათი IL-2-თან ექსპოზიცია (როგორც *in vitro*, ასევე *in vivo*) [92].

IL-2, როგორც უჯრედული იმუნური რეაქციების მრავალმხრივმა აქტივატორმა ფართო გამოყენება ჰპოვა იმუნოთერაპიაში, მაგრამ ამ მეთოდს აღმოაჩნდა უარყოფითი მხარეც, კერძოდ, ნამკურნალევ პაციენტებში აღინიშნებოდა ნეიტროფილების რაოდენობის დაქვეითება და ფუნქციური ცვლილებები, რაც ბაქტერიული ინფექციების სიხშირის მატების მიზეზი ხდებოდა. მცირდებოდა ნეიტროფილების მიერ O_2^- ის წარმოება, ქემოტაქსისი და FcγRII,III-ის ექსპრესია, თუმცა ფაგოციტირების და ADCC-ის განხორციელების უნარი თითქმის უცვლელი იყო [93]. ეს შესაძლებელია, მიუთითებდეს ნეიტროფილების მიერ ამ რეაქციების განხორციელებისათვის FcγRI-ის უპირატეს მნიშვნელობაზე. პმნ-ის აქტივატორებს მიეკუთვნება GM-CSF-ც, რომელიც ამცირებდა ნეიტროფილების შემთხვევით მიგრაციას, ზრდიდა O_2^- ის მეტაბოლიზმს და ფაგოციტურ აქტივობას, აძლიერებდა მათ მიერ HL-60, HTLV-2-ით ინფიცირებული B-ლიმფობლასტური და თაგვის Raji ხაზის უჯრედების ADCC-ს [75,95]. არსებობს მონაცემები, რომ მაკროფაგები და ნეიტროფილები სიმსივნის საწინააღმდეგოდ განსხვავებული გზებით მოქმედებენ, კერძოდ, ნეიტროფილები ციტოტოქსიურად მოქმედებენ დიდი ზომის სამიზნე უჯრედზე, ძირითადად, უჯრედგარე მექანიზმით, ხოლო მაკროფაგებს შეუძლიათ სამიზნის ფაგოციტირება [91].

დღეისათვის პრაქტიკაში უკვე გამოიყენება და დამაიმედებელ შედეგებს იძლევა ჰუმანიზებული მკა-ების საფუძველზე შექმნილი პრეპარატები რიტუქსანი (ანტი-CD20, არაჰოჯკინის ლიმფომის დროს) და ჰერცეპტინი (ანტი-Her2-erbB2 პროტოონკოგენის პროდუქტი, რომელიც ახასიათებს ბევრ სიმსივნეს) - სარძევე ჯირკვლის კიბოს შემთხვევაში, რომელთაც გააჩნიათ ანტიპროლიფერაციული და პროაპოპტოზური მოქმედება [89,94,97]. როგორც ითქვა, მკა-ებმა გამოყენება ჰპოვა B-ქლლ-ის დროსაც [5] .

ყოველივე ზემოთჩამოთვლილის მიუხედავად, *in vivo* მკა-ების, როგორც სამკურნალო საშუალებების გამოყენება მაინც ბევრ სიძნელეს აწყდება და მიღებული შედეგები ხშირად არ ემთხვევა *in vitro* მონაცემებს. მაგ. ცნობილია, რომ შრატისმიერი IgG კონკურირებს მკა-სთან FcγR-თან დასაკავშირებლად, რაც ცხადია, თრგუნავს ADCC-ს რეაქციას [83]. წარუმატებლობის მიზეზი შეიძლება გახდეს FcγR-ების პოლიმორფიზმი და ფართო გავრცელება. FcγRII მოიპოვება როგორც ფაგოციტოზისა და ADCC-ს განმახორციელებელ ნეიტროფილებსა და მონოციტ/მაკროფაგებზე, ისე B-უჯრედებსა და თრომბოციტებზე. რეცეპტორების უმრავლესობა რეაგირებს IgG1,3- თან. მკა-ებს, ცხადია, არ შეუძლიათ უჯრედსპეციფიური დაკავშირება, რაც ამცირებს "სასარგებლო კავშირების" რაოდენობას და უფრო მეტიც, იწვევს უარყოფითი სიგნალის გადაცემას (B უჯრედებზე მყოფი FcγRII-ს შემთხვევაში), არასასურველი მედიატორების გამოთავისუფლებას (იგივე რეცეპტორი თრომბოციტებზე), ან იმუნური კომპლექსების წარმოქმნას (FcγRIIIa, რომელსაც ხსნადი ფორმები გააჩნია) [89,94,,96]. საბოლოოდ კი, ითრგუნება სიმსივნის საწინააღმდეგო რეაქციები.

ზემოთხსენებული დაბრკოლების გადალახვის საშუალებას იძლევა ხელოვნურად კონსტრუირებული ბისპეციფიური ანტისხეულები (ბსა, რომლებიც მიიღება ორი სხვადასხვა ანტიგენისადმი მიმართული მკა-ს Fab ფრაგმენტების შეუღლებით). იმუნოთერაპიაში გამოყენებული ბსა მიმართულია, ერთი მხრივ, სიმსივნური, ხოლო, მეორე მხრივ, უჯრედის რომელიმე მარკერის (ამ შემთხვევაში FcγR) წინააღმდეგ. მათი ფუნქცია იგივეა, რაც მკა-ისა, მაგრამ მათთან შედარებით გარკვეული უპირატესობები გააჩნიათ [83,89,94].

შედარებით ნაკლები ტოქსიურობისა და გვერდითი მოვლენების გამო FcγR-ის გამოყენება ბსა-ების სამიზნედ უფრო ხელსაყრელია, ვიდრე

ეფექტორული უჯრედების სხვა მარკერებისა (მაგ. CD3), თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ მიუხედავად გაადვილებული შეღწევადობისა, ბსა-ების ფარმაკოკინეტიკა უფრო რთული და არახელსაყრელია, ვიდრე მკა-ებისა, რაც იწვევს მათი ეფექტურობის დაქვეითებას. ისევე, როგორც მკა-ების, ბსა-ების შემთხვევაშიც გამოიყენება FcγRI და FcγRIIIa. ზემოხსენებული დადებითი მხარეების გათვალისწინებით, უპირატესობა პირველ მათგანს ენიჭება. სამიზნე უჯრედების მარკერებიდან აღსანიშნავია CD15, CD19, CD30, EGFR, GD2 (დისიალოგანგლიოზიდი) და ა.შ. [83,96]. შედარებით კარგადაა შესწავლილი 2B1 ბსა, რომელიც წარმოადგენს კვადრომას და მიმართულია, ერთი მხრივ, FcγRIII, მეორე მხრივ კი, სიმსივნური ანტიგენის HER2/neu (იგი და EGFR საერთოდ, ბევრი სიმსივნური უჯრედისათვისაა დამახასიათებელი) წინააღმდეგ. მისი შეყვანა იწვევდა ციტოკინების TNFα, IL-6, IL-8, GM-CSF, IFNγ გამოთავისუფლებას, რომლებიც ამჟღავნებდნენ ტოქსიკურ მოქმედებას, ეფექტი კი მცირე იყო, მიუხედავად სიმსივნის საწინააღმდეგო IgM, IgG ანტისხეულების გამომუშავებისა. *In vivo* გამოცდილ იქნა აგრეთვე αCD64XαHER2/neu (ან EGFR)- ბსა-ები (MDX210, MDX447), რომელთაც, 2B1-საგან განსხვავებით, არ გააჩნიათ Fc უბანი. მათი მოქმედებით მცირდებოდა მიმოქცევადი სიმსივნური უჯრედების რიცხვი, აღინიშნებოდა სიმსივნური მასის ინტენსიური ინფილტრაცია, იზრდებოდა ანთებითი ციტოკინების IL-6, TNFα, G-CSF-ის და სიმსივნის საწინააღმდეგო IgM, IgG კონცენტრაცია [83].

CD64-თან მორეაგირე ბსა-ების შემთხვევაში პროცესის გასააქტიურებლად გამოიყენება G-CSF, ან GM-CSF. ეს ციტოკინები ზრდიან ლეიკოციტების, განსაკუთრებით კი ნეიტროფილების, რიცხვს. უკეთეს შედეგებს იძლევა პირველი მათგანი, რომელიც იწვევს მათზე CD64-ის ექსპრესიის მატებას, ზრდის უჯრედების ინდივიდუალურ

აქტივობას და ხელს უწყობს HER2/neu^{+} სიმსივნური უჯრედების ლიზისს, თუმცა არ მოქმედებს CD20^{+} ლიმფომის უჯრედების შემთხვევაში [89,96]. ლიმფომის ზოგიერთი ფორმის დროს (ხელოვნურ უჯრედულ ხაზებში) G-CSF-სთან ერთობლივი შეყვანისას ეფექტური აღმოჩნდა hucD64XId ბსა-იც. ეს ციტოკინი არ ამჟღავნებდა პირდაპირ ანტისიმსივნურ მოქმედებას. იგი ზრდიდა რეცეპტორის სიმკვრივეს, მაგრამ გაურკვეველია, ასევე მოქმედებდა თუ არა ეფექტორული უჯრედების ციტოტოქსიკურ პოტენციალზე. ამასთანავე, ამ ბსა-ს ეფექტი *in vitro* გაცილებით ძლიერი აღმოჩნდა, ვიდრე *in vivo*. იგი აღემატებოდა როგორც ანტიიდიოტიპური ანტისხეულის, ისე სხვა სამიზნეებისადმი მიმართული ბსა-ების შედეგს, რადგანაც ჰქონდა T-უჯრედული პასუხის გამოწვევის უნარი. ამგვარი ბსა ბიძგს აძლევდა ლიმფომის უჯრედების აპოპტოზს, რომელთაც, ალბათ შემდეგ შთანთქავდნენ ანტიგენწარმდგენი უჯრედები, რაც შემდეგში განაპირობებდა ციტოტოქსიური პასუხის აღძვრას. სხვა სახის ბსა-ები კი განაპირობებდნენ მხოლოდ მათ ფაგოციტირებას მიელოიდური უჯრედების მიერ [94,89].

სასურველი ეფექტის მისაღწევად საჭიროა ბსა-ების შეყვანა ისეთი დოზით, რომ თითო ეფექტორულ უჯრედზე თითო სამიზნე მაინც მოდიოდეს. შემდგომი გამოკვლევების მიზანია მაქსიმალური კლინიკური ეფექტურობის მქონე ბსა-ების შემუშავება. ამისათვის საჭიროა ისეთი სირთულეების დაძლევა, როგორიცაა კავშირის მაღალსპეციფიურობა, სამიზნესთან მაღალაფინურობა და მონოვალენტობა ეფექტორულ უჯრედთან, სიმსივნის შერჩევითი ანთების და ლეიკოციტური ინფილტრირების გამოწვევის უნარი, კარგი შეღწევადობა, ხანგრძლივი მიმოქცევა და მაქსიმალური ჰუმანიზაცია [96].

როგორც უკვე აღვნიშნეთ, მოცემული ნაშრომის მიზანს შეადგენდა B-ქლლ-ით დაავადებულ პირებში ნეიტროფილების ძირითადი ფუნქციური მაჩვენებლების შესწავლა როგორც პმნ-ზე აგებული ბსა-თერაპიის განვითარების წინაპირობა.

თავი V. გამოყენებული მასალა და კვლევის მეთოდები

5.1. ავადმყოფებისა და დინორების დახასიათება

გამოკვლევა ჩატარებულია ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის იმუნოლოგიის კათედრაზე. კვლევის მასალად გამოყენებულ იქნა B-ქლლ-ით დაავადებულების და ჯანმრთელი დონორების პერიფერიული სისხლი, რომლის აღება წარმოებდა დილით 11-12სთ-ზე, უზმოზე. ანტიკოაგულანტად გამოიყენებოდა ჰეპარინი 10მლ სისხლზე 1000 ერთეული ანტიკოაგულანტის გაანგარიშებით.

გამოკვლეულ იქნა 53 ავადმყოფი, საქართველოს ჰემატოლოგიისა და სისხლის გადასხმის ინსტიტუტიდან (ექიმი მ.მ.დ. დ. ღირდალაძე) რომელთა ასაკი 55-80 წელი იყო და შესაბამისი ასაკის 20 ჯანმრთელი დონორი (მოწოდებული მ.მ.დ. დ. ღირდალაძის მიერ). გამოკვლეული B-ქლლ ავადმყოფებიდან 23 იყო მამაკაცი და 30 ქალი. დაავადების სტადია განისაზღვრებოდა Rai-ს კლასიფიკაციით (0-IV სტადია), 13 ავადმყოფს ჰქონდა B-ქლლ-ს 0 სტადია, 10-ს – I, 9-ს – II, 10-ს – III და 11-ს – IV.

29 ავადმყოფი იყო პრაქტიკულად უმკურნალო, ხოლო დანარჩენი 24 ნამკურნალევი. მკურნალობა მიმდინარეობდა კორტიკოსტეროიდებით, COP-ით, ACOP-ით.

ავადმყოფების პერიფერიული სისხლის ლეიკოციტების საერთო რაოდენობა მერყეობდა 1მლ სისხლში $1{,}5X10^{6}$-დან $450X10^{6}$-ლეიკოციტამდე (ტაბულა 1). გართულებების სახით აღინიშნებოდა ძირითადად, სასუნთქი გზების ვირუსული და ბაქტერიული ინფექციები, ასევე ჰერპესული ინფექცია. ყველა B-ქლლ პაციენტის დიაგნოზი

დადასტურდა ჩვენს მიერ იმუნოფენოტიპირებით გამდინარე ციტომეტრის საშუალებით (CD5>60%, CD19>60%.).

ტაბულა 1. B-ქლლ ავადმყოფების კლინიკური მახასიათებლები

სტადია	რაოდენობა	მოცირკულირე ლეიკოციტების რიცხვი 1მლ სისხლში	მკურნალობა
0-IV	53	$1.5X10^6$ - $450X10^6$	29/53–არ ჩატარებულა 3/53–ლეიკერინი 15/53-COP 6/53-ACOP
0	13/53	$1.5X10^6$ - $85X10^6$	11/13–არ ჩატარებულა 2/13-COP
I	10/53	$14X10^6$ - $110X10^6$	7/10–არ ჩატარებულა 2/10–ლეიკერინი 1/10-COP
II	9/53	$11X10^6$ - $200X10^6$	2/9–არ ჩატარებულა 5/9-COP 2/9-ACOP
III	10/53	$14X10^6$ - $450X10^6$	6/10–არ ჩატარებულა 1/10–ლეიკერინი 2/10-COP 1/10-ACOP
IV	11/53	$12X10^6$ - $200X10^6$	3/11–არ ჩატარებულა 5/11-COP 3/11-ACOP

*საქართველოს ჰემატოლოგიისა და სისხლის გადასხმის ინსტიტუტის ლაბორატორიული მონაცემები.

5.2 ფორბოლ მირისტატ აცეტატით (ფმა) სტიმულირებული ნეიტროფილების ნიტროლურჯი ტეტრაზოლიუმის (ნლტ) ტესტი

ამ ტესტის საშუალებით ვიკვლევდით **B-ქლლ** ნეიტროფილების ფუნქციურ აქტივობას. ტესტი ეყრდნობა სტიმულაციის შედეგად გააქტივებულ ნეიტროფილებში წარმოქმნილი ჟანგბადის სუპეროქსიდის უნარს ყვითელი ფერის ნლტ გარდაქმნას ფორმაზანის მოშავო-ლურჯ კრისტალებად. ტესტის ჩასატარებლად საჭიროა შემდეგი ხელსაწყოები და რეაქტივები:

ხელსაწყოები:

მიკროპიპეტები (50-500 მკლ), მიკროპიპეტის თავები, ეპენდორფის სინჯარები, თერმოსტატი, სასაგნე მინები, სინათლის მიკროსკოპი.

რეაქტივები:ნიტროლურჯი ტეტრაზოლიუმი (Sigma), 0. 9%-იანი NaCl, ადამიანის ალბუმინი (Sigma), ფორბოლმირისტატ აცეტატი (ფმა) (Sigma), 96%-იანი სპირტი, გიმზა-რომანოვსკის საღებავი (Sigma).

მასალა:1 მლ ჰეპარინიზებული სისხლისა (აღებული არაუმეტეს 12 სთ-ით ადრე)

სამუშაოს მსვლელობა:

I. 0.1% ნლტ-ს (არამასტიმულირებელის) მომზადება

1. სინჯარაში ვასხავდით 20 მლ. 0.9 % NaCl
2. ვუმატებდით 0.02 გრ ნლტ
3. კარგად ვურევდით, რათა უზრუნველგვეყო მყარი ნაწილაკების გახსნა

II. ფმა მასტიმულირებელი ხსნარის მომზადება

1. სინჯარაში ვასხავდით 20 მლ 0.9% NaCl
2. ვუმატებდით 25 მგ ნლტ
3. ვუმატებდით 350 მგ ადამიანის ალბუმინს
4. ვუმატებდით 20 მკგ ფმა

III. ნლტ რეაქციის მსვლელობა

1. ვასხავდით 100 მკლ ნლტ-ს რეაქტივს I სინჯარაში და 100 მკლ ფმა-ს რექტივს II სინჯარა'ში.
2. ვამატებდით 100-100 მკლ პაციენტის მთლიან სისხლს I და II სინჯარებში.
3. სინჯარებს კარგად ვარესუსპენდირებდით და ვაინკუბირებდით 20 წთ. 37^0C-ზე.
4. თერმოსტატიდან გამოღებულ სინჯარებს 10წთ ვტოვებდით ოთახის ტემპერატურაზე.
5. სინჯარის შიგთავსს ისევ კარგად ვარესუსპენდირებდით და ვამზადებდით ნაცხებს.

IV.ნაცხის მომზადება და შეღებვა

1. სუსპენზიის წვეთს ვათავსებდით სასაგნე მინის ბოლოს და მეორე სასაგნე მინის მოძრაობით (გვეჭირა 45^0-იანი დახრილი კუთხით პირველისადმი), ვანაწილებდით ხაზის სახით.
2. ნაცხს ვაფიქსირებდით 96%-იანი ეთილის სპირტით 1წთ-ის განმავლობაში, შემდეგ ვრეცხდით გამოხდილ წყალში.

3. ნაცხს ვღებავდით გიმზა-რომანოვსკის საღებავის 15%-იანი ხსნარით 6წთ, შემდეგ ვავლებდით ონკანის წყალში და ვაშრობდით.

V. შედეგების შეფასება:

შეღებვის შემდეგ სისხლის შეღებილ ნაცხს ვსინჯავდით ზეთის იმერსიული მიკროსკოპით, რომლის დროსაც ვითვლიდით ფორმაზან-დადებითი უჯრედების რიცხვს (ნახ. 3) 200 ნეიტროფილზე ანუ სტიმულირებული ნეიტროფილების რიცხვს. დათვლა ხდებოდა 4 სტადიური სისტემით (Levinsli et al., 1983):

I სტადია: ფორმაზანის კრისტალებს უკავია ციტოპლაზმის 60-100%. ბირთვი ძნელად გაირჩევა.

II სტადია: კრისტალებს უკავია ციტოპლაზმის 30-60%; ბირთვის გარჩევა შეიძლება.

III სტადია: კრისტალებს უკავია ციტოპლაზმის 30%-ზე ნაკლები. ბირთვი კარგად გაირჩევა

IV სტადია: ციტოპლაზმაში კრისტალების რაოდენობა ძალიან მცირეა. ბირთვი კარგად გაირჩევა.

ნახატი 3. ნლტ რედუქცია ნეიტროფილში: ციტოპლაზმა ამოვსებულია ფორმაზანის კრისტალებით.

5.3. ტუტე–ფოსფატაზას ექსპრესია ნეიტროფილებში.

ტუტე-ფოსფატაზას აქტივობა დამახასიათებელია მხოლოდ მომწიფებული ნეიტროფილებისათვის და გამოიყენება მომწიფებული უჯრედების რაოდენობის დასადგენად. პირველად ტუტე-ფოსფატაზას არსებობა ლეიკოციტებში ივარაუდა Kay (1929). მაგრამ მხოლოდ რამოდენიმე წლის შემდეგ Kaplow შეიმუშავა შეღებვის მეთოდი ამ ფერმენტის დემონსტრირებისათვის. მან გამოიყენა ნატრიუმის α-ნაფტილის ფოსფატი სუბსტრატის სახით, fast blue RR მარილი როგორც დიაზონიუმის მარილი და შეიმუშავა დათვლის მეთოდი.

ჩვენს მიერ გამოყენებული იყო Sigma-ს ნაკრები. ამ დიაგნოსტიკუმში შედის ნაფტოლ AS MX ფოსფატი, რომლის ხსნარში აინკუბირებენ ნაცხებს და თუ უჯრედს გააჩნია ფოსფატაზური აქტივობა, გამოიყოფა ნაფტოლი და მაშინვე უერთდება დიაზონიუმის მარილს არახსნადი, თვალით ხილული პიგმენტის წარმოქმნით, რომელიც ჩანს სინათლის მიკროსკოპში ფოსფატაზის აქტივობის უბნებში. ტესტის ჩასატარებლად საჭიროა შემდეგი ხელსაწყოები და რეაქტივები:

ხელსაწყოები:

მიკროპიპეტები (1000 მკლ), მიკროპიპეტის თავები, ეპენდორფის სინჯარები, თერმოსტატი, სასგნე მინები, სინათლის მიკროსკოპი.

რეაქტივები:

Fast blue RR მარილის კაფსულები; ნაფტოლ AS MX ფოსფატის 0,25%ხსნარი; მაიერის ჰემოტოქსილინის ხსნარი, აცეტონი, ციტრატის კონცენტრირებული ხსნარი, დისტილირებული სტერილური წყალი.

მასალა:

ჰეპარინიზებულ სისხლი, რომელიც აღებული იყო არაუმეტეს 12 საათით ადრე.

სამუშაოს მსვლელობა:

I. ციტრატული წყლის დამზადება:

2 მლ ციტრატის კონცენტრირებულ ხსნარს (ლიმონმჟავისა და ნატრიუმის ციტრატის 1,5 მოლი/ლიტრი) ვუმატებდით 98 მლ დისტილირებულ სტერილურ წყალს.

II. ნაცხების დამაფიქსირებელი ხსნარის დამზადება:

ციტრატულ ხსნარს ვუმატებდით აცეტონს ფარდობით 2:3.

III. დიაზონიუმის მარილის ხსნარის დამზადება:

Fast blue RR-ის 1 კაფსულას ვხსნიდით დისტილირებულ, ოთახის ტემპერატურის წყალში. შემდგომში ამ ხსნარს ვუმატებდით 2 მლ ნაფტოლ AS MX ფოსფატის 0,25%ხსნარს.

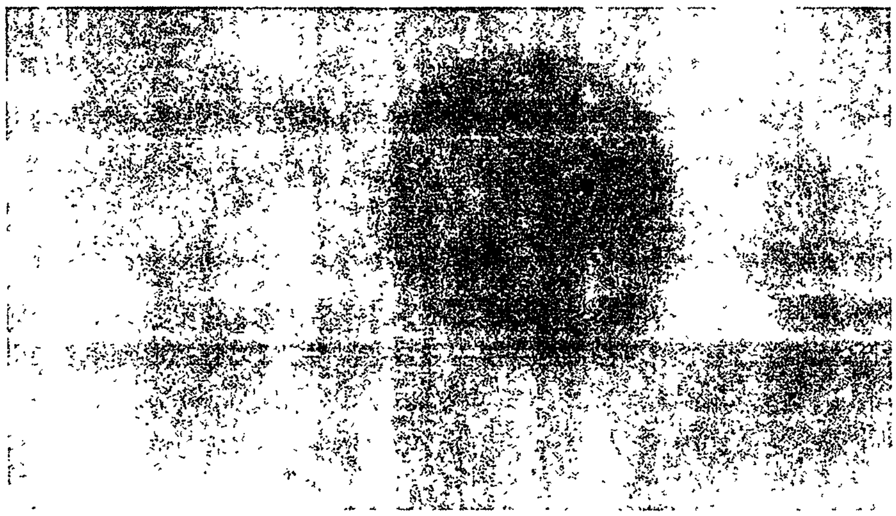
IV. რეაქციის მსვლელობა

1. ვამზადებდით ნაცხებს, ვაშრობდით და ნაცხს ვფარავდით დამაფიქსირებელი ხსნარით 30 წამით.
2. ნაცხები ფაქიზად ირეცხებოდა და ვათავსდებდით დისტილირებულ წყალში 45 წამით.
3. წყლიდან ამოღების შემდეგ ნაცხები არ უნდა გაშრეს და მაშინვე ვფარავდით დიაზონიუმის მარილის ხსნარით და 30 წუთის განმავლობაში ვდებდით ბნელ ადგილას.

4. ნაცხებს კარგად ვრეცხავდით დისტილირებულ წყალში 2 წუთის განმავლობაში და გაუშრობლად ვფარავდით მეიერის ჰემატოქსილინის ხსნარით.
5. 10 წუთის შემდეგ ნაცხებს ვრეცხდით 2 წუთის განმავლობაში დისტილირებულ წყალში. გაშრობის შემდეგ ვითვლიდით იმერსიული ობიექტივით ×90 გადიდებაზე.

V. შედეგების შეფასება

შეღებილ უჯრედებში ჩანს წითელი გრანულები, ნეიტროფილების ციტოპლაზმა იღებება ღია ვარდისფრიდან-წითელამდე, ბირთვი ღია ცისფერია, მაგრამ ზოგჯერ იგი არ ჩანს (ნახ. 4). ტუტე ფოსფატაზას მიმართ დადებითი უჯრედების პროცენტული შედგენილობა გამოითვლება 200 უჯრედიდან.



ნახატი 4. ტუტე-ფოსფატაზას შემცველი გრანულებით ამოვსებული ნეიტროფილი.

5.4. მიელოპეროქსიდაზას (მპო) აქტივობის განსაზღვრა ნეიტროფილებში.

ამ ფერმენტის განსაზღვრისათვის ვიყენებდით Sigma-ს დიაგნოსტიკუმს. ამ ტესტს საფუძვლად უდევს p-ფენილენდიამისა და კატექოლის რეაქცია უჯრედში წარმოქმნილ H_2O_2-თან.

ტესტის ჩასატარებლად საჭიროა შემდეგი ხელსაწყოები და რეაქტივები:

ხელსაწყოები:მიკროპიპეტები (1000 მკლ), მიკროპიპეტის თავები, ეპენდორფის სინჯარები, თერმოსტატი, სასაგნე მინები, სინათლის მიკროსკოპი.

რეაქტივები:ტრიზმის ბუფერის კონცეტრატი, მჟავე ჰემოტოქსილინის ხსნარი,პეროქსიდაზის ინდიკატორის რეაგენტი, ფორმალდეჰიდი 37% და 95%-ანი ეთანოლი, 3%-იანი წყალბადის ზეჟანგი.

მასალა: ჰეპარინიზებული სისხლი, აღებული არაუმეტეს 12 საათით ადრე.

სამუშაოს მსვლელობა:

I. დამაფიქსირებელი ხსნარის დამზადება:

5 მლ 37% ფორმალდეჰიდს ვუმატებდით 45 მლ 95% ეთანოლს.

II. ტრიზმის განზავებული ბუფერის დამზადება:

5 მლ ტრიზმის ბუფერის კონცენტრატს ვუმატებთ 45 მლ დისტილირებულ წყალს.

III. რეაქციის მსვლელობა:

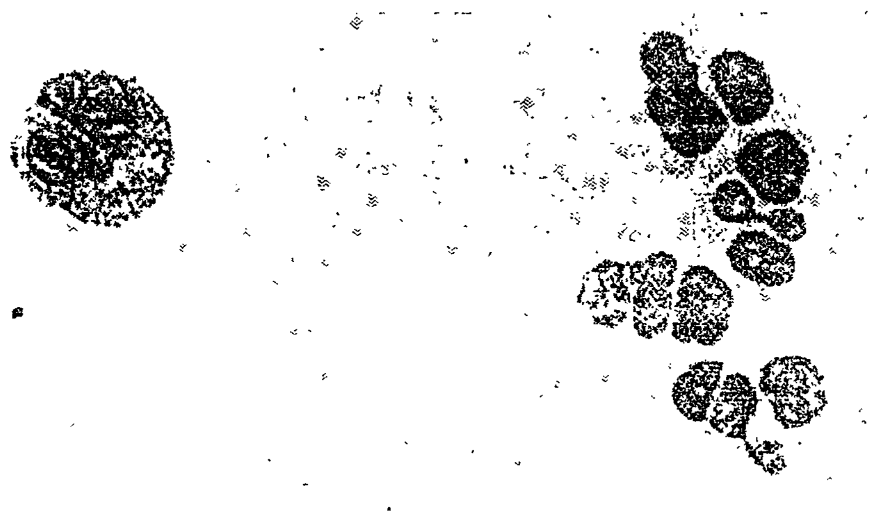
1. ვამზადებდით ნაცხებს, ვაშრობდით და ვფარავდით დამაფიქსირებელი ხსნარით 30 წამის განმავლობაში.
2. ნაცხებს ფაქიზად ვრეცხდით ონკანის წყლით.
3. წყლის აბაზანაში ვათბობდით 50 მლ ტრიზმის განზავებული ბუფერის ხსნარს. მაშინვე, გამოყენების წინ, ვუმატებდით

შემთბარ ტრიზმის ხსნარს 1 ფლაკონ პეროქსიდაზის ინდიკატორის რეაგენტს და 200 მკლ 3% წყალბადის ზეჟანგს. კარგათ ვურევდით.

4. დაფიქსირებულ ნაცხებს ვათავსებდით ამ ხსნარში 30 წუთით ბნელ ადგილას 37?C წყლის აბაზანაზე.
5. ინკუბაციის შემდეგ ნაცხები ფაქიზად ირეცხებოდა ონკანის წყლით 15-30 წამის განმავლობაში და შემდეგ ნაცხებს ვაშრობდით.
6. ნაცხებს 10 წუთით ვფარავდით მეიერის ჰემატოქსილინის ხსნარით. შემდეგ ნაცხებს ვრეცხდით დისტილირებულ წყალში.
7. ნაცხების გაშრობის შემდეგ ვითვლიდით სინათლის მიკროსკოპზე იმერსიული ობიექტივით ×90 გადიდებაზე.

შედეგების შაფასება:

შეღებილ უჯრედებში ჩანდა ყავისფერ-შავი გრანულები (ნახ.5). მიელოპეროქსიდაზას მიმართ დადებითი უჯრედების პროცენტულ შედგენილობას ვითვლიდით 200 უჯრედზე.



ნახატი 5. მიელოპეროქსიდაზას ექსპრესია ნეიტროფილებში.

5.5. ლიმფოციტებისა და ნეიტროფილების გამოყოფა სიმკვრივის ორმაგ გრადიენტზე.

სამუშაოს მსვლელობა:

1. აღებულ 10 მლ პერიფერიულ სისხლს ვაზავებდით 1:1 **HBSS**-ით (Hanks' Balansed Salt Solution, Ca^{2+}/Mg^{2+} და ფენოლის წითლის გარეშე, **Gibco BRL**).
2. თითოეულ სინჯარაში ვიღებდით ჯერ 3მლ **Histopaque-1119** (სიმკვრივე-1119გ/სმ^3, **Sigma**) და შემდეგ 3მლ **Histopaque-1017** (სიმკვრივე-1017გ/სმ^3, **Sigma**) და მასზე ფრთხილად ვაშრევებდით 7-7მლ გაზავებულ სისხლს.
3. სინჯარებს ვაცენტრიფუგირებდით 40წთ, 3000 ბრ/წთ. წარმოქმნილ ლიმფოციტურ და ნეიტროფილურ რგოლებს ვიღებდით ცალ-ცალკე და უჯრედებს ვრეცხავდით ორჯერ, 5მლ **HBSS**-ით, 10წთ, 1500ბრ/წთ.
4. ვახდენდით თითოეულის რესუსპენდირებას 1მლ არე **RPMI-1680**-ში (**Sigma**) და ვითვლიდით ჰემოციტომეტრით.

5.6. ოფსონიზირებული **Staphylococcus aureus-ის** ფაგოციტოზი ნეიტროფილების მიერ

I. Staphylococcus aureus-ის ოპსონიზაცია

სინჯარაში გადაგვქონდა 15 მკლ Staphylococcus aureus და 15 მკლ მაოპსონიზებელი IgG (ორივე – Molecular Probes), ვურევდით და ვაინკუბირებდით 37^0C -ზე, 1 სთ განმავლობაში. შემდეგ ვრეცხავდით სამჯერ, 200 მკლ PBS-ით, 1500 ბრ/წთ, 10 წთ განმავლობაში. სუპერნატანტს ვაცილებდით, დანალექის რესუსპენდირებას ვახდენდით 400 მკლ არე RPMI-1640-ში.

II. ფაგოციტოზი

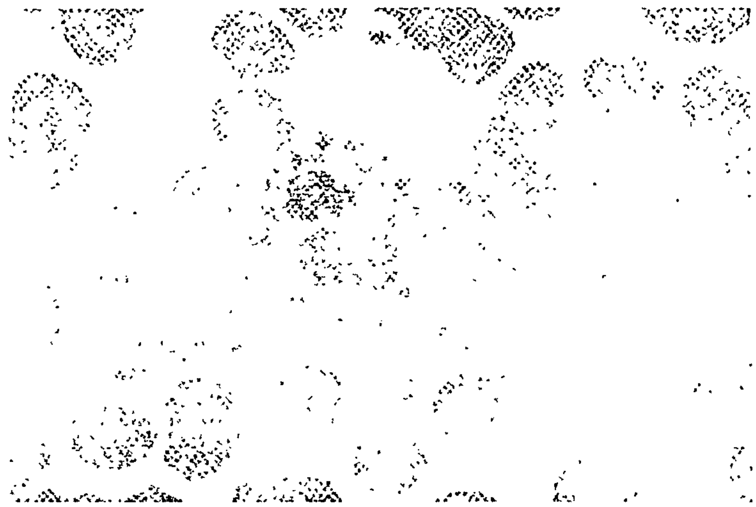
გამოყოფილი და გარეცხილი ნეიტროფილების კონცენტრაცია მიგვყავდა $0,1X10^6$ უჯრედი/მლ. დუბლიკატებში ვუმატებდით ოპსონიზირებული Staphylococcus aureus-ის 20 მკლ, ვურევდით და ვაინკუბირებდით თერმოსტატში 37^oC-ზე 40წთ განმავლობაში. სუპერნატანტს ვაცილებდით, ვახდენდით ნალექის რესუსპენდირებას და ვამზადებდით ნაცხებს, რომელთაც ვღებავდით გიმზა-რომანოვსკის საღებავით 6წთ განმავლობაში, შემდეგ ვრეცხავდით გამოხდილ წყალში და ვიკვლევდით მიკროსკოპულად (იმერსიული წესით). ვარჩევდით ნეიტროფილებისა და ოპსონიზებული სტაფილოკოკის ურთიერთქმედების შემდეგ ფორმებს (ნახ.6):

1.დაუკავშირებელი;

2.მემბრანასთან დაკავშირებული;

3.უჯრედში მოქცეული (ფაგოციტირებული);

4. დაკავშირებული და ფაგოციტირებული.



*ნახატი 6. ოფსონიზირებული **Staphylococcus aureus**-ის ფაგოციტოზი ნეიტროფილების მიერ*

5.7. FcγR-ების ექსპრესიის შესწავლა სისხლის ნიმუშებში

გამოყენებული ხსნარების მომზადება:

1. ფოსფატური ბუფერი:

PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma)–ის 1 ტაბლეტს ვხსნით 200 მლ გამოხდილ წყალში.

2. 1%-იანი ალბუმინის ხსნარი (PBS/BSA)

500 მგ ხარის შრატის ალბუმინს- BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma) ვხსნით 50მლ ფოსფატურ ბუფერში.

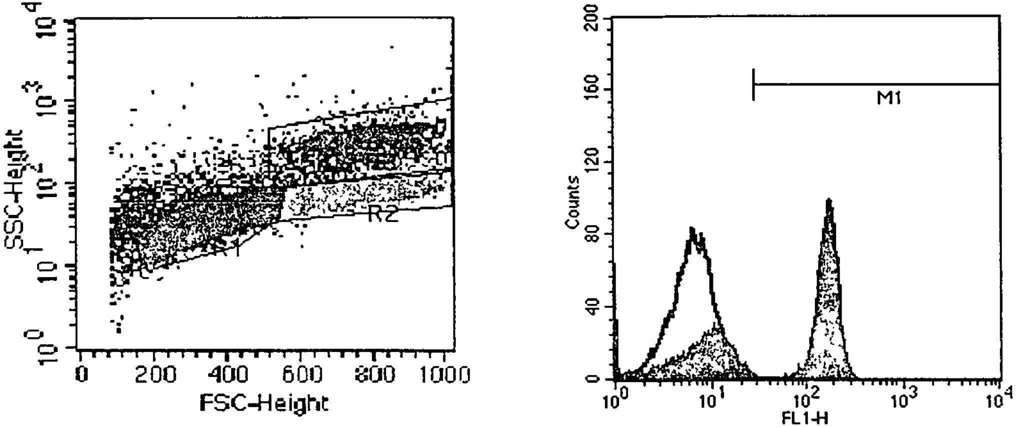
3. 1%-იანი პარაფორმალდეჰიდის ხსნარი (PFA)

5 გრ პარაფორმალდეჰიდის ფხვნილს (Sigma) ვხსნით 500 მლ ფოსფატურ ბუფერში.

სამუშაოს მსვლელობა:

1. 200მკლ სისხლი გადაგვქონდა სინჯარებში, ვამატებდით 4-4მლ 37^0C-მდე შემთბარ ლიზის-ბუფერს (0,9% NaCl-FACS-Lysing Solution, განზავებული 1:10, Becton&Dickinson) და ვაინკუბირებდით თერმოსტატში, 37^0C ტემპერატურაზე, 5 წთ.
2. ვაცენტრიფუგირებდით 1500 ბრ/წთ, 5 წთ. ნალექს ვრეცხავდით 200 მკლ 1% PBS/BSA ხსნარით 1500 ბრ/წთ, 5წთ და ვუმატებდით 10 მკლ ფლუორესცენტული ნივთიერებებით მონიშნულ მონოკლონურ ანტისხეულებს: FITC~anti Human CD64, FITC~anti Human CD32 (ორივე - Pharmingen), PE~anti Human CD16 (Immunotech) და იზოტიპური კონტროლისათვის FITC~mouse IgGκ, PE~mouse IgGκ (Pharmingen).
3. კარგად ვანჯღრევდით და ვაინკუბირებდით 4^0C, 40 წთ. შემდეგ ვრეცხავდით ორჯერ PBS/BSA ხსნარით და ნალექის რესუსპენდირებას ვახდენდით 1% პარაფორმალდეჰიდის ხსნარში.

4. ნიმუშებს ვაანალიზებდით გამდინარე ციტომეტრის (Becton&Dickinson) მეშვეობით (ნახ. 7).



ა) ბ)

ნახატი 7. პერიფერიული სისხლის პოლიმორფულბირთვიანი ნეიტროფილების იმუნოფენოტიპირება გამდინარე ციტომეტრიის გამოყენებით: ა) უჯრედების განაწილება ზომის და გრანულარობის მიხედვით. ***R3*** *პოპულაცია არის სიცოცხლისუნარიანი ნეიტროფილების პოპულაცია. ბ) ნეიტროფილების იმუნოფენოტიპირების შედეგების აღრიცხვა ჰისტოგრამის სახით. შავი კონტურის სახით მოცემულია იზოტიპური კონტროლი.*

5.8. B-ქლლ დაავადებულთა შრატის გავლენა პმნ-ის ფუნქციებზე

პმნ-ზე B-ქლლ შრატის გავლენის შესასწავლად ჯანმრთელი დონორების პერიფერიულ სისხლს ვუმატებდით B-ქლლ პაციენტების სისხლიდან მიღებულ შრატს და ინკუბაციის შემდეგ ვატარებდით ნლტ ტესტს.

I. შრატის გამოყოფა:

იდაყვის ვენიდან აღებულ 10მლ ჰეპარინიზირებულ სისხლს პლაზმის დაწვდომისათვის ვათავსებდით 37^0C t-ზე თერმოსტატში 20 წთ-ით, 45^0-იანი დახრილი კუთხით. შემდეგ, 20 წთ-ის განმავლობაში ვერტიკალურად ვათავსებდით ოთახის ტემპერატურაზე. პლაზმის შრეს ამოვიღებდით და ვაცენტრიფუგებდით 10წთ-ით 200-g რეჟიმში, რის შემდეგაც, ნალექზედა სითხეს ამოვიღებდით და ვინახავდით ეპენდორფებით, ალიქვოტებად საყინულეში -10^0C-ზე.

სამუშაოს მსვლელობა:

ჯანმრთელი დონორების 90 მკლ მთლიან პერიფერიულ სისხლს ვუმატებდით B-ქლლ პაციენტების სისხლიდან მიღებულ შრატს 10 მკლ ოდენობით და ვაინკუბირებდით თერმოსტატში 37°C-ზე 0,5სთ, 1სთ, 3სთ და 6სთ განმავლობაში. საკონტროლოდ კი 90 მკლ დონორის სისხლს ვუმატებდით 10 მკლ PBS-ის ხსნარს. ყოველი შესაბამისი დროის გასვლის შემდეგ ნიმუშებზე ვატარებდით ფმა- სტიმულირებულ ნლტ ტესტს ზემოთაღწერილი (3.2) მეთოდით.

5.9 ნეიტროფილების ქემილუმინესცენცია*

ქ:მილუმინესცენციის მეთოდის საშუალებით შევაფასეთ ჟანგბადის თავისუფალი რადიკალების (ჟთრ) გამონთავისუფლება ფმა-სტიმულირებული ნეიტროფილებიდან. პროდუცირებული ჟთრ ურთიერთქმედებს სუბსტრატთან (ლუცინოგენთან) და იწვევს ქ:მილუმინესცენციას.

სამუშაოს მსვლელობა:

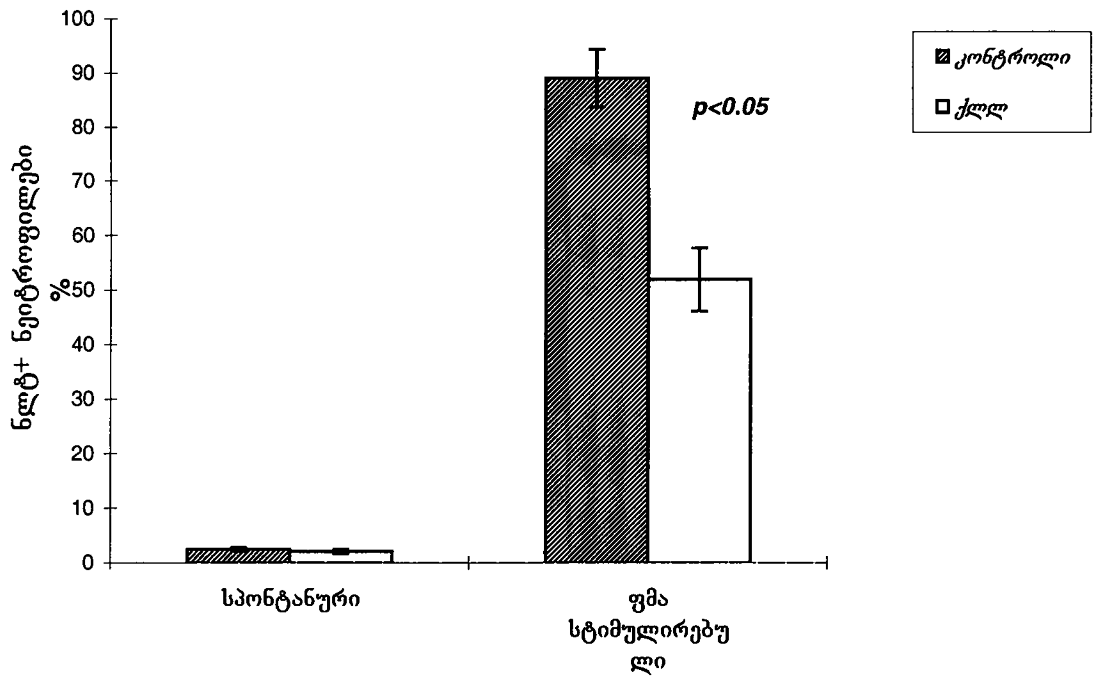
1. ფიკოლ-ჰიპაკის (Sigma Diagnostics) ორმაგ გრადიენტზე გამოყოფილი $1X10^6$ ნეიტროფილები მოთავსებულნი 2,5 სმ დიამეტრის პეტრის ჯამებში (Nunc) სტიმულირდებოდა 1ნგ/მლ ფმა-ით (Sigma) და 1M ლუციგენინით (Sigma).
2. 10 წთ-ის შემდეგ (ეს არის ქემილუმინესცენციისათვის ოპტიმალური დრო) პეტრის ჯამი თავსდებოდა ქემილუმინომეტრში (EFLAB) და იზომება ქემილუმინესცენციის დონე, რაც პირდაპირ კორელირებს ჟთრ-ების ინტენსივობასთან.

*.მ მეთოდით გამოკვლევები ჩატარდა University College London, Department of Oncology.

თავი VI. მიღებული შედეგები

6.1. B-CLL ავადმყოფებში შემცირებულია ნლტ ინტენსივობა

ჩვენს მიერ შესწავლილი იქნა ორმოცდაცამეტი B-ქლლ დაავადებულისა და ოცი შესაბამისი ასაკობრივი ჯგუფის ჯანმრთელი დონორების ნეიტროფილების ფმა-სტიმულირებული ნლტ ტესტი, რომელმაც გვიჩვენა, რომ B-ქლლ დროს ნეიტროფილებს მნიშვნელოვნად აქვთ დაქვეითებული ნლტ-ს აღდგენის უნარი (51,9±5,8%) ჯანმრთელ საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით (89,1±5,3%) (**p<0,05**) (ნახატი 8).

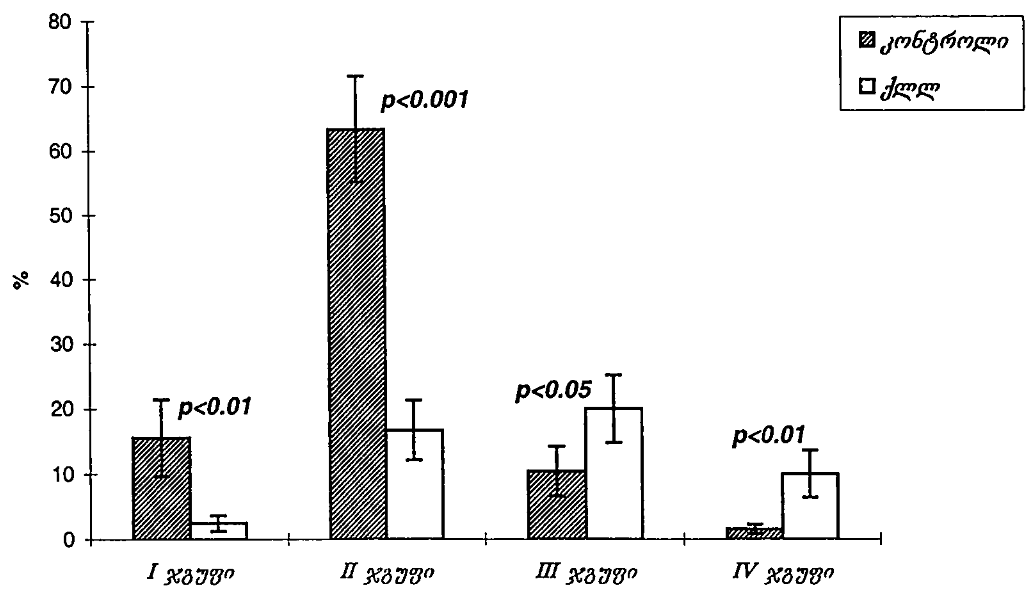


*ნახატი 8. ნლტ რედუქცია **B**-ქლლ პაციენტებსა და ჯანმრთელ დონორებში: ა) სპონტანური; ბ) ფმა სტიმულირებული*

სპონტანური ნლტ რედუქციის მაჩვენებელი B-ქლლ დაავადებულებში (2,1 ± 0,4%) არ განსხვავდებოდა ჯანმრთელი კონტროლებისაგან (2,5 ±

0,3 %), (ნახატი 8.) რაც გამორიცხავს პაციენტებში ნეიტროფილების სპონტანური აქტივაციის არსებობას.

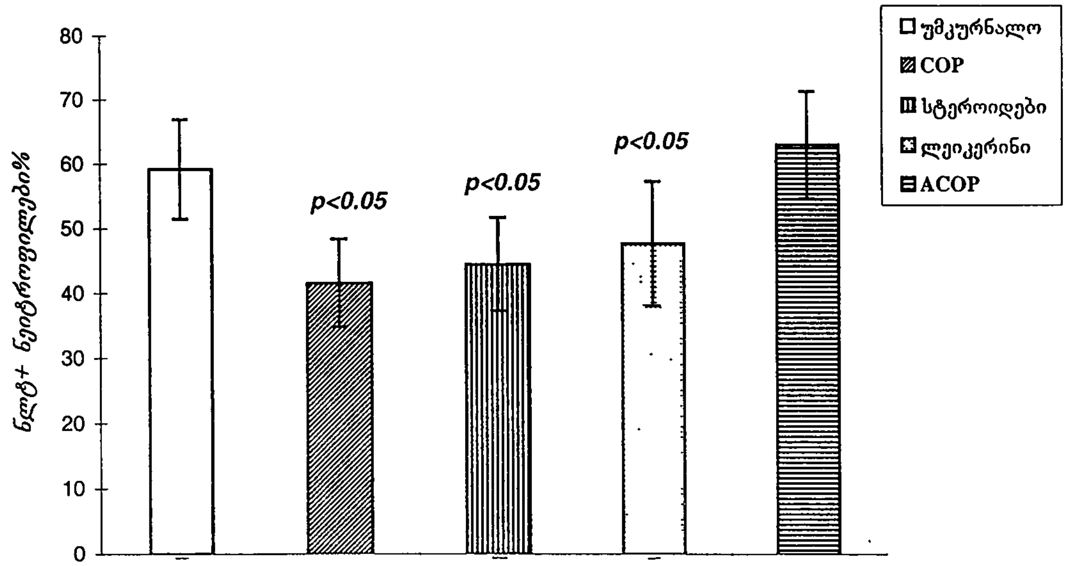
ნლტ+ ნეიტროფილები მათ ციტოპლაზმაში არსებული ფორმაზანის კრისტალების ინტენსივობის მიხედვით დავყავით 4 ჯგუფად. პირველ ჯგუფში გაერთიანებულია პმნ, რომელთა ციტოპლაზმის 100–60% ამოვსებულია მოშავო–მოლურჯო ფერის კრისტალებით; მეორე ჯგუფის უჯრედებში ციტოპლაზმის 60-30% არის დაფარული კრისტალებით, მესამე ჯგუფში კრისტალების რაოდენობა < 30%, ხოლო მეოთხე ჯგუფი მოიცავს იმ უჯრედებს, რომლებშიც ერთეული კრისტალები იყო წარმოდგენილი.



ნახატი 9. ფმა-სტიმულირებულ ნეიტროფილებში ფორმაზანის კრისტალების ინტენსივობა ნლტ ტესტის შედეგად. კრისტალების ინტენსივობა: I ჯგუფში - 100–60%; II-60-30; III - < 30%; და IV ჯგუფში ერთეული კრისტალებია.

B-ქლლ დაავადებულებში I ჯგუფის კრისტალების შემცველი პმნ-ის რაოდენობა 2,5 ± 1,2% შეადგენს; პმნ II ჯგუფის კრისტალებით 16,7 ± 4,6% ; III – 20 ± 5,2% და IV ჯგუფში 10 ± 3,6%. ჯანმრთელებში ეს მონაცემები შემდეგნაირად გამოიყურება: I ჯგუფი – 15,6 ± 5,9%; II – 63,3 ± 8,2%; III – 10,4 ± 3,8% და IV - 1,6±0,7% (ნახატი 9).

როგორც მონაცემები ცხადყოფს B-ქლლ-ს დროს ჯანმრთელ დონორებთან შედარებით დაქვეითებულია როგორც ნლტ+ ნეიტროფილების როდენობა, ასევე მათში წარმოქმნილი ფორმაზანის კრისტალების ინტენსივობაც. ორივე ეს პარამეტრი გაცილებით შემცირებულია Rai IV სტადიის მქონე პირებში (41,8 ± 5,4%) ვიდრე **57,2 ± 8,2%** Rai 0/I სტადიის პაციენტებში (**p<0,05**).



*ნახატი 10. ნლტ რედუქცია **B**-ქლლ უმკურნალო და ნამკურნალები პაციენტების ფმა-ით სტიმულირებულ ნეიტროფილებში. 1) უმკურნალო 2) COP; 3) სტეროიდები; 4) ლეიკერინი; 5) ACOP*

ჩვენი მონაცემების თანახმად B-ქლლს შემთხვევაში ნლტ-ს აღდგენის უნარი დაქვეითებული აღმოჩნდა როგორც უმკურნალო, ასევე ნამკურნალევ პციენტებში. უმკურნალო პაციენტებში ნლტ+ პმნ-ის რაოდენობა შეადგენდა 59,2 ± 7,7%. ნლტ+ პმნ-ის მაჩვენებელი ცვალებადობს სხვადასხვა პრეპარატებით მკურნალობის კურსთან (ნახატი10). ACOP ნამკურნალევი პაციენტების მცირე ჯგუფში ნლტ+ პმნ-ის რიცხვი გაცილებით მაღალი იყო 63 ± 8,3% ($p<0.01$), მაშინ როცა COP-ით ნამკურნალევ პირებში 41,6 ± 6,8%, ლეიკერინით – 47,7±9,6% და სტეროიდებით (პრედნიზოლონი) ნამკურნალევებში – 44,5±7,2% ($p<0.04$)

B-ქლლ-ს დროს ჩვენს მიერ ნანახი ნლტ-ს აღდგენის უნარის დაქვეითება ნეიტროფილებში კორელირებდა პერიფერიულ სისხლში მოცირკულირე ლეიკოციტების საერთო რაოდენობასთან.

ლეიკოციტების რაოდენობის მიხედვით პაციენტები 3 ჯგუფად დავყავით. პირველ ჯგუფში გავაერთიანეთ ისინი, რომელთა ლეიკოციტების საერთო რიცხვი 1 მლ სისხლში $40X10^9$-ზე ნაკლები იყო, მეორე ჯგუფში ლეიკოციტების რაოდენობა მერყეობდა 40-დან $90X10^9$-მდე, ხოლო მესამეში $90X10^9$-ზე მეტი იყო. ნლტ-ს აღდგენის უნარი B-ქლლ პოლიმორფულბირთვიანი უჯრედების მიერ მცირდებოდა პაციენტების სისხლში ლეიკოციტების რაოდენობის ზრდასთან ერთად. ლეიკოციტების დაბალ რიცხვზე ($<40X10^6$) ნლტ+ უჯრედების რიცხვი მაღალი იყო და შეადგენდა 59,4 ± 6,8%, $40\text{-}90X10^9$-ზე უდრიდა 49,6 ± 6,1%, ხოლო ლეიკოციტების $90X10^9$ მეტ რაოდენობაზე, მაჩვენებელი იყო მინიმალური 39,9 ± 4,1%. ასევე კორელირებდა ნლტ-ს მაჩვენებლები ლეიკოციტების საერთო რიცხვთან B-ქლლ უმკურნალო პაციენტებშიც (ტაბულა 3).

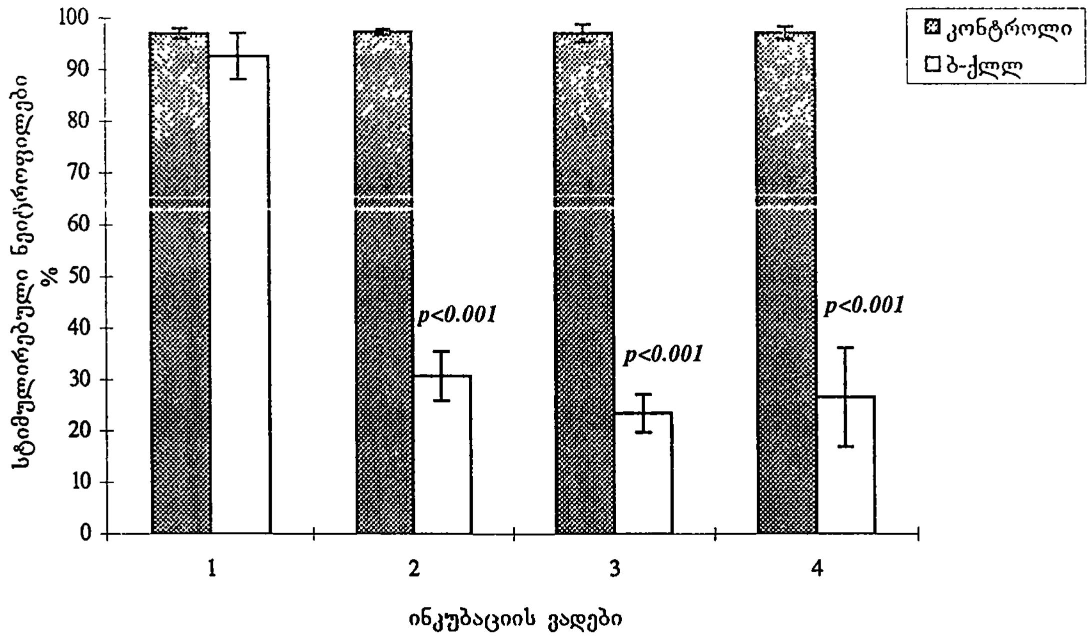
ტაბულა 3. ნეიტროფილების მიერ ნლტ-ს აღდგენის დამოკიდებულება B-ქლლ-ით დაავადებულების მოცირკულირე ლეიკოციტების რიცხვთან.

გამოკვლეული ჯგუფები	მოცირკულირე ლეიკოციტების რიცხვი 1მლ სისხლში, (X10^9)		
	< 40	40 - 90	>90
ნლტ+პმნ% B-ქლლ პაციენტებში	59,4 ± 6,8	49,6 ± 6,1 **p<0.01**	39,9 ± 4,1 **p<0.01**
ნლტ+ პმნ% B-ქლლ უმკურნალო პაციენტებში	59,6 ± 5,3	48,4 ± 5,8 **p<0.01**	29,5 ± 6,4 **p<0.05**

6.2. B-ქლლ შრატი მაინჰიბირებელ გავლენას ახდენს ჯანმრთელი პირების ნეიტროფილების ფუნქციებზე.

იმის გასარკვევად თუ რა ფაქტორი ახდენდა გავლენას პმნ-ის ფუნქციებზე, გადავწყვიტეთ შეგვესწავლა B-ქლლ შრატის გავლენა ჯანმრთელი პირების ნეიტროფილების ფუნქციებზე. როგორც აღმოჩნდა B-ქლლ შრატი მნიშვნელოვნად აინჰიბირებდა ჯანმრთელი პმნ-ის მიერ ნლტ-ს რედუქციას (ნახატი 11). B-ქლლ შრატთან 30 წუთიანი ინკუბაციის შემდეგ პმნ-ის მიერ ნლტ-ს რედუქცია არ მცირდებოდა (92,6 ± 4,5%) და თითქმის არ განსხვავდებოდა კონტროლისაგან (97 ±1%). 60 წუთიანი ინკუბაციის შემდეგ კი

ხდებოდა ნლტ-ს აღდგენის მნიშვნელოვანი ინჰიბიცია (30,8 ± 4,8%) კონტროლთან შედარებით (97,3 ± 0,6%). ამის შემდეგ ეს მაჩვენებლები ნარჩუნდებოდა, რამეთუ 3 სათიანი ინკუბაციის შემდეგ შეადგენდა 28,5 ± 3,7%, (97 ± 1,7% კონტროლი) და 6 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ 26,6±3,6%, (97±1,2%კონტროლი).

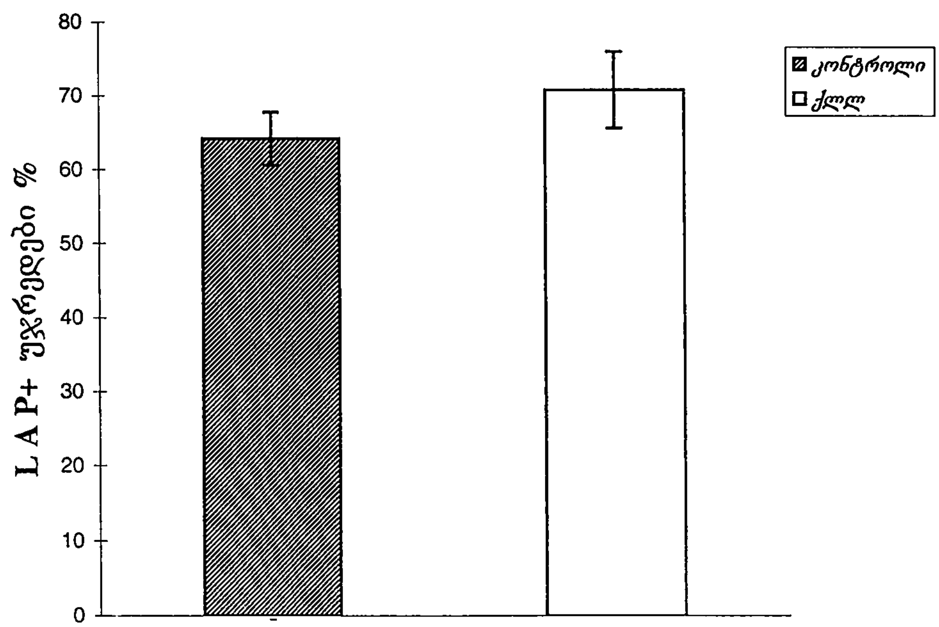


*ნახატი 11. **B**-ქლლ შრატის გავლენა ჯანმრთელი დონორების პერიფერიული სისხლის ნეიტროფილების მიერ ნლტ-ს აღდგენის უნარზე. ინკუბაციის ვადები: 1) 30წთ, 2) 60წთ, 3)3სთ და 4)6სთ*

აქედან გამომდინარე ფაგოციტური ფუნქციების დარღვევები B-ქლლ-ს დროს შესაძლებელია განპირობებული იყოს შრატისმიერი ფაქტორების ზეგავლენით.

6.3. B-ქლლ-ს დროს ნეიტროფილები არ განიცდიან ფერმენტული სისტემების დეფიციტს.

მიღებულმა ნლტ ტესტის შედეგებმა დაგვაფიქრა იმაზე, ხომ არ არის ნეიტროფილების დაქვეითების მიზეზი მათი მოუმწიფებლობა. ნეიტროფილების მომწიფების მარკერად ითვლება ციტოპლაზმაში ტუტე-ფოსფატაზას (LAP) არსებობა [86]. ჩვენს მიერ მიღებული შედეგებიდან გამომდინარეობს, რომ B-CLL-ის დროს ნეიტროფილების მომწიფების პროცესი დარღვეული არ არის და მათი აქტივობის დაქვეითების მიზეზს არ წარმოადგენს. B-CLL-ის დროს ნეიტროფილებში ტუტე ფოსფატაზას ექსპრესია კონტროლთან (64,2±3,.6%) შედარებით ოდნავ მომატებულია (70,8 ± 5,2%) (ნახატი 12).



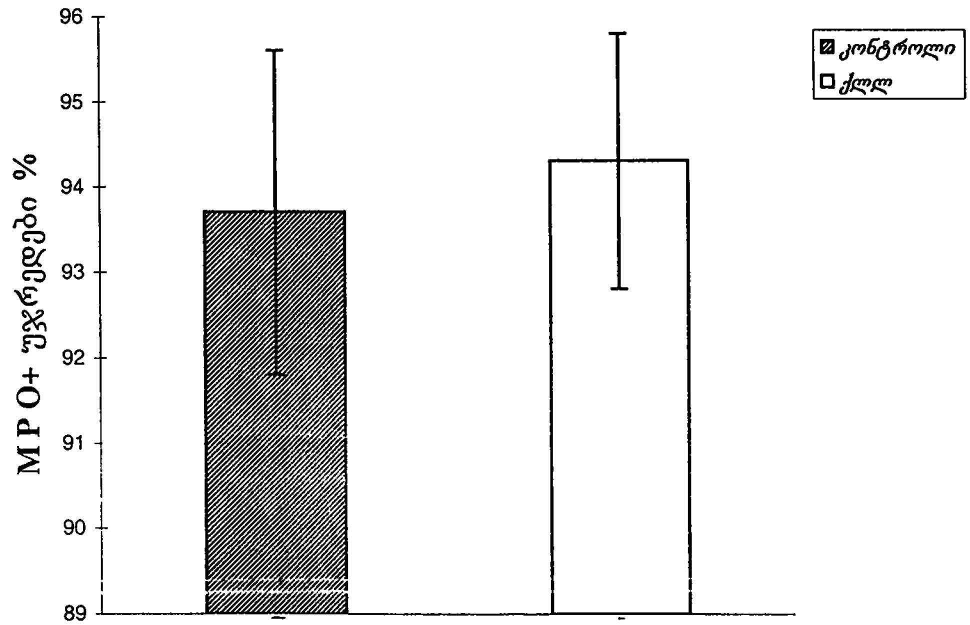
ნახატი 12. ტუტე-ფოსფატაზას ექსპრესია ***B-CLL*** *პაციენტებისა და ჯანმრთელი დონორების ნეიტროფილების მიერ.*

ნეიტროფილების ფაგოციტური პროცესების დარღვევები შეიძლება მრავალი მიზეზით იყოს განპირობებული. პირველ რიგში იგი შეიძლება გამოწვეული იყოს პმნ-ის ფერმენტული სისტემების

უკმარისობით. გარდა ამისა, ნლტ-ს რედუქციის დაქვეითება შესაძლებელია შთანთქმის პროცესის დარღვევასაც უკავშირდებოდეს, რადგან პერიფერიულ სისხლში ნლტ წარმოქმნის კომპლექსებს ფიბრინოგენთან და ჰეპარინთან და ამ კომპლექსების შთანთქმა ნეიტროფილების მიერ ხორციელდება მიკროპრეციპიტატების სახით [46]. ამგვარად, ნებისმიერი დისფუნქცია, იმ რეაქციებისა, რომელიც უზრუნველყოფს რესპირატორული აფეთქების დროს O_2^- პროდუქციას აისახება ნლტ ტესტის მიერ, რადგან O_2^- -თან ურთიერთქმედებით ხორციელდება ნლტ-ს აღდგენა.

აქედან გამომდინარე, B-ქლლ-ს დროს ფაგოციტოზის პროცესის დარღვევის მიზეზების კვლევა დავიწყეთ ფერმენტული სისტემების მოქმედების შესწავლით. ჟანგბად-დამოკიდებული მიკრობიციდული რეაქციები იყოფა მიელოპეროქსიდაზა (მპო) დამოკიდებულ და მპო დამოუკიდებლად (მაგრამ ჟანგბადის რადიკალებზე დამოკიდებულ რეაქციებად) [47]. ამიტომ, ჩვენ გადავწყვიტეთ შეგვემოწმებინა B-ქლლ პაციენტების ნეიტროფილებში, როგორც ციტოპლაზმური მპო-ს ექსპრესია, ასევე ქემილუმინესცენციის საშუალებით განგვესაზღვრა ფმა-სტიმულირებული ჟანგბადის თავისუფალი რადიკალების (ჟთრ) გამოყოფა მპო-დამოუკიდებელ სისტემაში.

მიღებული შედეგებიდან ჩანს რომ B-CLL-ის დროს მპო-ს აქტივობა ნორმაშია (94,3 ± 1,5%) და არ განსხვავდება კონტროლისაგან (93,7 ± 1,9%) (ნახატი 13). ასევე არ არის დაქვეითებული ჟთრ გამოყოფის მაჩვენებელი. ქემილუმინესცენციის ხარისხი B-ქლლ პაციენტებში შეადგენდა 2697 ± 580 და ჯანმრთელ კონტროლებში 2318 ± 1731. აქედან გამომდინარე, შეიძლება დავასკვნათ, რომ B-ქლლ-ს დროს ნეიტროფილები არ განიცდიან ფერმენტული სისტემების დეფიციტს.

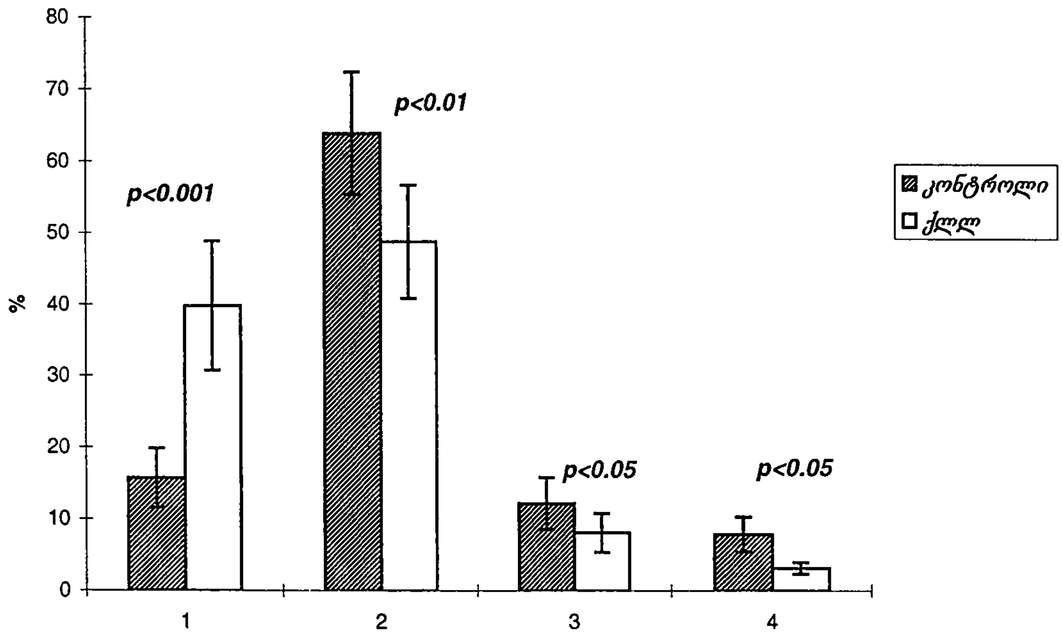


*ნახატი13. მიელოპეროქსიდაზას აქტივობა **B-CLL** პაციენტებსა და ჯანმრთელ პირებში.*

6.4. B-ქლლ-ს დროს ნეიტროფილებს დარღვეული აქვთ ოფსონიზირებული ნაწილაკების ფაგოციტირების უნარი

რამდენადაც ნლტ-ს რედუქციის დაქვეითება შთანთქმის პროცესის დარღვევებმაც შეიძლება გამოიწვიოს, ჩვენ გადავწყვიტეთ შეგვემოწმებინა პმნ-ის მიერ ოფსონიზირებული ნაწილაკების შთანთქმის უნარი. ამისათვის გამოვიყენეთ ანტისხეულებით

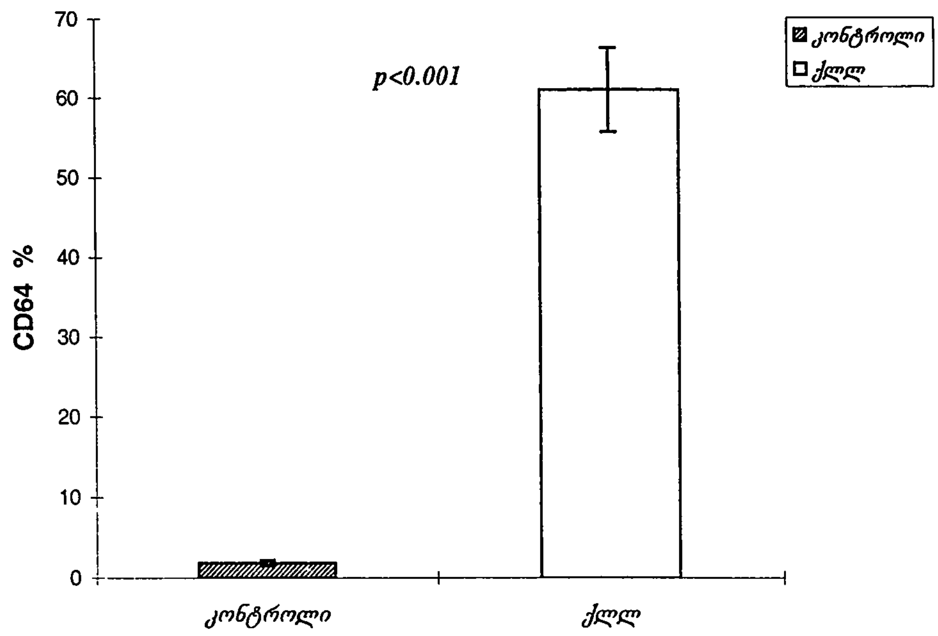
ოფსონიზირებული **Staphylococcus aureus**-ი. აღმოჩნდა, რომ პმნ--ის მიერ ოფსონიზირებული **Staphylococcus aureus**-ის მიმაგრება და შთანთქმა B-ქლლ პაციენტებში მნიშვნელოვნად არის დაქვეითებული კონტროლთან შედარებით (ნახ. 14). მიმაგრება არ აღინიშნებოდა B-ქლლ 39.8 ± 9.1%-სა და საკონტროლო ჯგუფის 15.7 ± 4.1%-ში. მხოლოდ მიმაგრებას ჰქონდა ადგილი შესაბამისად, 48.8 ± 7.9%-სა და 63,9 ± 8.5%-ში, მხოლოდ ინტერნალიზაციას-8.1 ± 2.7%-სა და 12.1 ± 3.6%-ში და მიმაგრება და ინტერნალიზაცია- 3.2 ± 0.8%-სა და 7.9 ± 2.4%-ში.



ნახატი 14. ოფსონიზირებული **Staphylococcus aureus**-*ის მიმაგრება და ინტერნალიზაცია ნეიტროფილების მიერ: 1. თავისუფალი პმნ, 2. მხოლოდ მიმაგრებული, 3. მხოლოდ ინტერნალიზებული, 4. მიმაგრებული და ინტერნალიზებული.*

6.5. FcγR ექსპრესია B-ქლლ პირების ნეიტროფილებზე.

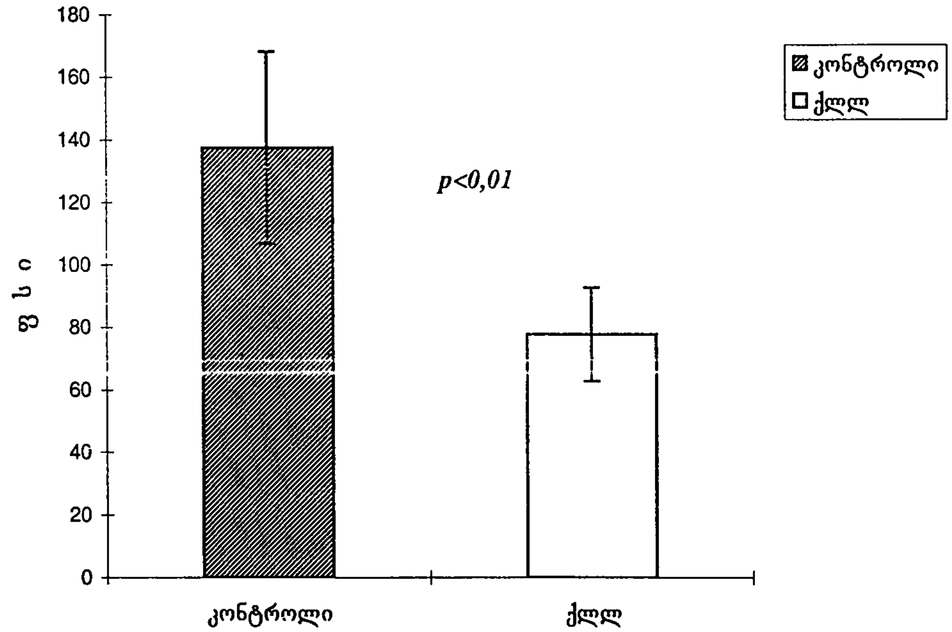
რამდენადაც, B-ქლლ პირებში მნიშვნელოვნად აღმოჩნდა დაქვეითებული ოფსონიზირებული ნაწილაკების მიმაგრებისა და შთანთქმის მაჩვენებელი, ჩვენ გადავწყვიტეთ შეგვემოწმებინა ნეიტროფილების მიერ FcγR ექსპრესია, რომელთა მონაწილეობით ხორციელდება ანტისხეულებით ოპსონიზირებული ანტიგენის ფაგოციტოზი. როგორც აღმოჩნდა, B-ქლლ-ით დაავადებულ პირებში CD64^{+}-ნეიტროფილების რაოდენობა ნორმასთან (1,9 ± 0,4%) შედარებით მნიშვნელოვნად მომატებული აღმოჩნდა, (61 ± 5,3%) ამასთან, უმკურნალო და ნამკურნალევ პირებში მათი საშუალო მაჩვენებელი (61,6 ± 5,9% უმკურნალო და 58,7 ± 4,2% ნამკურნალევი) თითქმის არ განსხვავდებოდა.



ნახატი 15. CD64-ის ექსპრესია B-ქლლ პირებსა და ჯანმრთელ კონტროლებში.

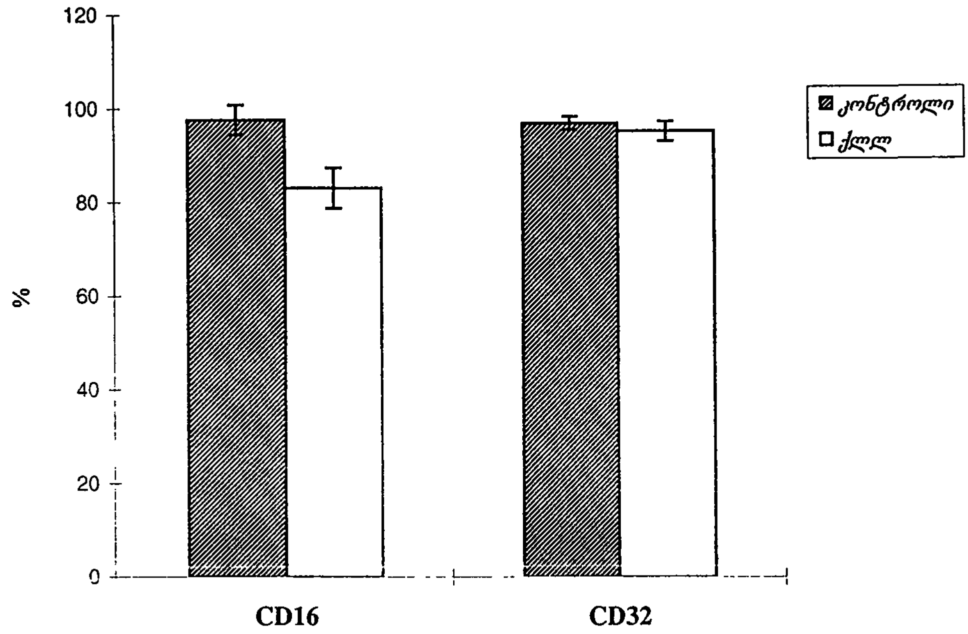
იგივე ითქმის ფლუორესცენციის საშუალო ინტენსივობაზეც, რომელიც ნორმალურ პირებში 137,46 ± 30,6 შეადგენდა, ავადმყოფებში

კი საშუალოდ 77,8 ± 14,9 -ს, აქედან უმკურნალოებში უფრო მაღალ მნიშვნელობებს აღწევდა (143,48 ± 44,7), ნამკურნალევებთან შედარებით. (ნახატი 15 , 16).

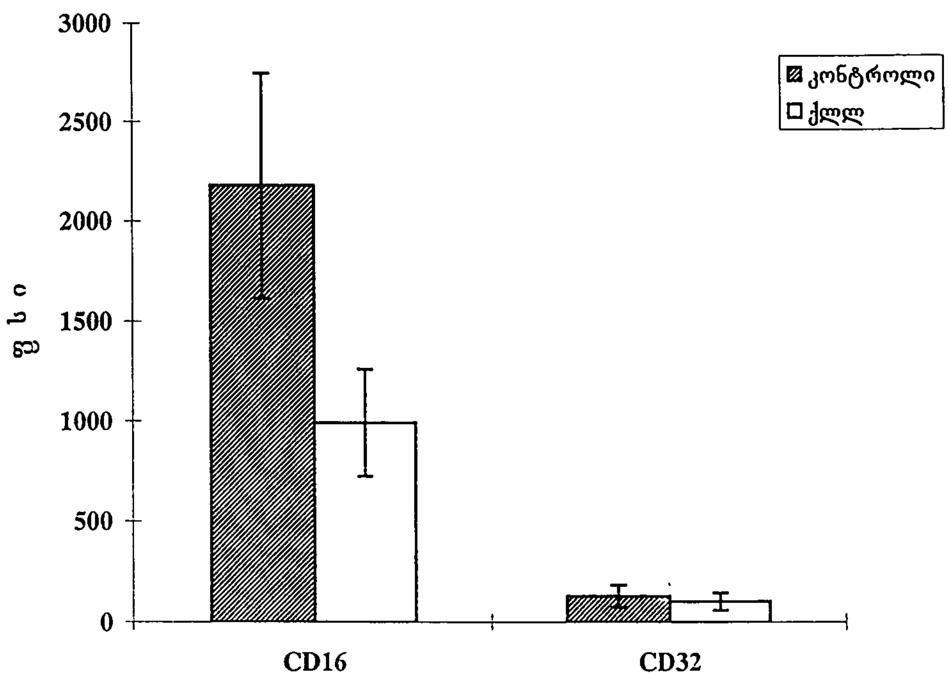


ნახატი 16. CD64-ის ექსპრესიის საშუალო ფლუორესცენციის საშუალო ინტენსივობა (ფსი) B-ქლლ პირებსა და ჯანმრთელ დონორებში.

CD32^{+} ნეიტროფილების რაოდენობა პრაქტიკულად არ განსხვავდებოდა B-ქლლ-იან პირებსა და ჯანმრთელ დონორებს შორის (9!5 ± 2,1% და 96,7 ± 1,4% შესაბამისად) (ნახატი 17). არა არსებითი იყო ნეიტროფილებში საშუალო ფლუორესცენციის ინტენსივობებს შორის განსხვავებაც - 131,32 ± 55 და 104,61 ± 43 კონტროლში (ნახატი 18).



ნახატი 17. CD16 და CD32-ის ექსპრესია B-ქლლ პირებსა და ჯანმრთელ კონტროლებში.



ნახატი 18. *CD16 და CD32 ექსპრესიის ფლუორესცენციის საშუალო ინტენსივობა B-ქლლ პირებსა და ჯანმრთელ კონტროლებში*

CD16$^+$ნეიტროფილების რიცხვი B-ქლლ-იან პირებში მცირედ განსხვავდებოდა ჯანმრთელი პირების იგივე მახასიათებლისაგან და შეადგენდა 82,95 ± 4,3% და 97,53 ± 3,2% შესაბამისად (ნახატი 17). საშუალო ფლუორესცენციის ინტენსივობა კი - დაქვეითებული იყო B-ქლლ პაციენტებში 992,7 ± 268 კონტროლთან შედარებით 2180,55 ± 565. (ნახატი 18).

თავი VII. შედეგების განხილვა

ბაქტერიული და ვირუსული ინფექციების სიხშირის მატება B-ქლლ-ით დაავადებულებში პირველ რიგში იწვევს ინტერესს მათი საწინააღმდეგო რეაქციების-ფაგოციტოზისა და ADCC მიმართ, რასაც განახორციელებენ გრანულოციტები, მონოციტები, მაკროფაგები, NK უჯრედები [3].

ლიტერატურული მონაცემები პმნ-ის ფუნქციური დარღვევების შესახებ B-ქლლ-ს დროს ძალიან მცირე და ურთიერთსაწინააღმდეგოა. ზოგიერთი ავტორი მიიჩნევს, რომ ნეიტროფილების ფუნქციები B-ქლლ-ს დროს არ არის დარღვეული [30], მაგრამ არსებობს მონაცემები დაავადებულებში პმნ-ის ფაგოციტური და ბაქტერიციდული დეფექტების, შემცირებული ქემილუმინესცენციისა და ქემოტაქსისის შესახებ [3; 30-35].

ნეიტროფილების ფუნქციური დარღვევები შეიძლება მოიცავდეს გართულებებს ადგეზიის, მიგრირების, ფორმის ცვლილების, მიკრობის ან ნაწილაკის მიმაგრების, შთანთქმის, ფაგოციტირების, ფაგოსომის წარმოქმნის, დეგრანულაციის, პათოგენის განადგურებისა თუ შთანთქმული ნაწილაკების ელიმინირების პროცესებში [41;52;53]. გრანულოციტების სტანდარტული ფუნქციური ტესტები მოიცავს ნლტ-ს და ქემილუმინესცენციას. ეს უკანასკნელნი გამოხატავენ ფერმენტული სისტემების აქტივობას, რომლებიც უზრუნველყოფენ უჯრედების ჟანგბად-დამოკიდებულ ბაქტერიციდულობას [46; 48; 49].

ჩვენი შედეგების თანახმად, B-ქლლ დაავადებულებში მნიშვნელოვნად არის დაქვეითებული ნეიტროფილების მიერ ნლტ-ს აღდგენის უნარი, რაც, პირველ რიგში შესაძლებელია განპირობებული იყოს ფერმენტული სისტემების დარღვევებით. ნეიტროფილების

ფერმენტული აქტივობა B-ქლლ-ს დროს ჩვენს მიერ შემოწმებული იყო მიელოპეროქსიდაზას ექსპრესიის შეფასებითა და ქემილუმინესცენციის საშუალებით, რომელიც საზღვრავს უჯრედებში მპო-დამოუკიდებელ (მაგრამ ჟანგბადურ რადიკალებზე დამოკიდებულ) ბაქტერიციდულობას [47]. ჩვენი შედეგების მიხედვით, როგორც მპო-ს შემცველობა, ასევე ქემილუმინესცენციის ხარისხი არ განსხვავდება საკონტროლო მაჩვენებლებისაგან. აქედან გამომდინარე, პმნ-ის ფერმენტული სისტემების დეფიციტი არ წარმოადგენს B-ქლლ დაავადებულებში ნლტ-ს აღდგენის დაქვეითების მიზეზს. ტუტე-ფოსფატაზას ნორმალური ექსპრესია კი გამორიცხავს ამ უჯრედების მოუმწიფებლობას, როგორც ფუნქციური დარღვევის შესაძლო მიზეზს.

B-ქლლ დაავადებულებში ნეიტროფილების მიერ ნლტ-ს აღდგენის რეაქცია დაქვეითებულია როგორც ნამკურნალევ, ისე უმკურნალო პაციენტებში. ცნობილია, რომ ქიმიოთერაპიული აგენტები იწვევენ ნეიტროფილების დისფუნქციას მიმდინარე დაავადებისაგან დამოუკიდებლადაც. მაგალითად, კორტიკოსტეროიდები მაღალი დოზით მოქმედებენ გრანულოციტების სხვადასხვა ფუნქციებზე [50], თუმცა ნანახია, რომ კორტიკოსტეროიდების მოქმედების ეფექტი პმნ-ის ფუნქციებზე დოზაზეა დამოკიდებული და მხოლოდ მაღალი დოზები იწვევს ინჰიბიციას [51].

ჩვენი შედეგებიდან ჩანს, რომ ნლტ-ს რედუქციის დაქვეითება არ არის გამოწვეული მკურნალობის კურსით, რადგან იგი მნიშვნელოვნად არის დაქვეითებული უმკურნალო პაციენტებშიც. გარდა ამისა, ჩვენს მიერ ნანახი იყო, რომ B-ქლლ დაავადებულთა შრატი იწვევდა ჯანმრთელი დონორების პმნ-ების მიერ ნლტ-ს აღდგენის ინჰიბირებას. ეს კი მიანიშნებს, რომ შრატში არსებული ფაქტორები არის ნეიტროფილების დისფუნქციის მიზეზი.

ლიტერატურული მონაცემები B-ქლლ დროს ნეიტროფილების ფუნქციებზე შრატის მაინჰიბირებელი გავლენის შესახებ ძალიან მცირეა. **B**-ქლლ პაციენტების შრატში ნანახია გრანულოციტების მიმართული ქემოკინეზის ინჰიბირების ფაქტორი და ნაჩვენებია, რომ ამ ფაქტორის გამომუშავება მხოლოდ B-ქლლ უჯრედებს ახასიათებთ [35;43]. რაც შეეხება პმნ-ის ფაგოციტურ ფუნქციებზე გავლენას, ნანახია, რომ B-ქლლ დაავადებულთა ნერწყვს აქვს ფაგოციტოზის ინჰიბირების უნარი. დადგენილია, რომ ჯანმრთელი ადამიანის ნერწყვი შეიცავს ფაგოციტოზის სტიმულირების ფაქტორს. იგი ზრდის ***in vitro*** ლატექსის ნაწილაკების ფაგოციტოზს პმნ-ის მიერ, ხოლო ჯანმრთელი დონორების ნეიტროფილები, რომელთაც დამატებული ჰქონდათ B-ქლლ დაავადებულთა ნერწყვი ავლენდნენ ლატექსის ნაწილაკების ფაგოციტირების დაქვეითებას კონტროლთან შედარებით [42]. აქედან გამომდინარე ადვილი შესაძლებელია B-ქლლ შრატშიც არსებობდეს ნეიტროფილების ფაგოციტოზის მაინჰიბირებელი ფაქტორები.

B-ქლლ-ს დროს ჩვენს მიერ ნანახი ნლტ-ს აღდგენის უნარის დაქვეითება ნეიტროფილებში, როგორც აღმოჩნდა, კორელირებდა პერიფერიული სისხლის მოცირკულირე ლეიკოციტების საერთო რაოდენობასთან, რაც აგრეთვე მოწმობს, რომ ლეიკემიური უჯრედების კრიტიკული რაოდენობა აუცილებელია ჰუმორული ფაქტორების ისეთი კონცენტრაციის მისაღწევად, რომელიც თრგუნავს ნლტ-ს რეაქციას.

ნლტ-ს რედუქციის დაქვეითება შესაძლებელია შთანთქმის პროცესის დარღვევასაც უკავშირდებოდეს, რადგან პერიფერიულ სისხლში ნლტ წარმოქმნის კომპლექსებს ფიბრინოგენთან და ჰეპარინთან და ამ კომპლექსების შთანთქმა ნეიტროფილების მიერ ხორციელდება მიკროპრეციპიტატების სახით [46]. აღნიშნულის შესაფასებლად ჩვენ გადავწყვიტეთ შეგვემოწმებინა პმნ-ის მიერ ანტისხეულებით

ოფსონიზირებული ნაწილაკების შთანთქმის უნარი. ამისათვის გამოვიყენეთ ოფსონიზირებული ***Staphylococcus aureus***-ი. აღმოჩნდა, რომ B-ქლლ დაავადებულთა პმნ-ს მნიშვნელოვნად დაქვეითებული აქვთ ოფსონიზირებული ნაწილაკების მიმაგრებისა და შთანთქმის უნარი.

ანტისხეულებით ოფსონიზირებული ნაწილაკების მიმაგრება და შთანთქმა პმნ-ის მიერ FcR საშუალებით ხორციელდება [41] და FcR დარღვევები შეიძლება ასოცირებული იყოს უჯრედის დეფექტურ ფუნქციებთან [66]. ჩვენ შევაფასეთ FcγR-ების ექსპრესიის ხარისხი პმნ-ების მიერ და აღმოჩნდა რომ B-ქლლ-ის დროს ინტაქტურ ნეიტროფილებზე მომტებულია CD64 ექსპრესია, ამავე დროს, აღინიშნება CD16-ის ექსპრესიის დაქვეითება, $CD16^{+}$ ნეიტროფილების მცირეოდენი შემცირება, ხოლო $CD32^{+}$ ნეიტროფილების რიცხვი და რეცეპტორის საშუალო ფლუორესცენციის მაჩვენებელი არ განსხვავდებოდა ნორმისაგან.

ლიტერატურული მონაცემების მიხედვით ნორმალურ პირობებში ინტაქტურ ნეიტროფილებზე მოიპოვება FcγRII (CD32) და FcγRIII (CD16), ხოლო FcγRI (CD64) პმნ-ზე მხოლოდ IFNγ და G-CSF-ით სტიმულაციის შემდეგ ექსპრესირდება. მაღალაფინური CD64 რეცეპტორი მიჩნეულია, როგორც პმნ-ის აქტივაციის მარკერი [41,77]. შესაბამისად, ***in vitro*** პმნ-ების ფუნქციურ აქტივობაზე სწორედ ეს რეცეპტორებია პასუხისმგებელი, რაც შეეხება ***in vivo*** მდგომარეობას, აქ სხვა უჯრედულ-ჰუმორული მარეგულირებელი ფაქტორების ჩართვის გამო იცვლება როგორც FcγR, ისე მათი კორეცეპტორების ექსპრესია და აღინიშნება ფუნქციების სხვაგვარი გადანაწილება [78]. ეს მით უფრო საინტერესოა B-ქლლ-ის დროს, როდესაც აღინიშნება ნორმისაგან რადიკალურად განსხვავებული შრატისმიერი გარემო და უჯრედშორისი ურთიერთქმედებები. ნაჩვენებია, რომ B-ქლლ

პაციენტების ნეოპლასტური B ლიმფოციტები აპროდუცირებენ სხვადასხვა ციტოკინებს, როგორიცაა IL-6 [68], IFNγ [69], TNFα [70], IL-8 [71], IL-1 [72], GM-CSF [73] და G-CSF [67]. ასევე, B-ქლლ პაციენტების შრატში ნანახია IFNγ, TNFα, IL-8 მომატებული კონცენტრაცია, რაც კორელირებდა ლეიკემიურ უჯრედებში შესაბამისი გენების ექსპრესიასთან [69-71]. ზოგიერთი მონაცემის მიხედვით კი B-ქლლ-ის დროს პერიფერიული სისხლის ლიმფოციტების (პსლ) რაოდენობის მომატებისას იზრდება $CD4^+$ T უჯრედების წილი. ნანახია, რომ $CD3^-CD56^+$ (NK) უჯრედების, ისევე როგორც $CD8^+$, $CD8^+CD45RO^+$ და $CD3^+CD57^+$ T სუბპოპულაციების პროცენტული შემცველობა მაღალია იმ პაციენტებში, რომელთაც აქვთ დაბალი პსლ რაოდენობა ($<30X10^9$/ლ), მაღალი პსლ რაოდენობის ($>30X10^9$/ლ) მქონე პირებთან შედარებით. ხოლო, $CD3^+HLADR^+$, $CD4^+$ და $CD4^+CD45RO^+$ ლიმფოციტების პროცენტული რაოდენობა მაღალია მაღალი პსლ რიცხვის შემთხვევაში, ვიდრე დაბალი პსლ რაოდენობის მქონე პირებში. $CD4^+CD45RO^+$ უჯრედები კი ეფექტურად ახდენენ IFNγ, TNFα-სა და IL-4 პროდუცირებას [40].

აღნიშნული ციტოკინები, რომლებიც დაავადების იმუნოპათოგენეზში მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ პარალელურად ნეიტროფილების ფუნქციებსა და FcγR-ების ექსპრესიაზეც მოქმედებენ. მაგალითად, G-CSF არის ციტოკინი, რომელიც ასტიმულირებს კომიტირებული მიელოიდური პროგენიტორების პროლიფერაციასა და დიფერენციაციას და იწვევს ნეიტროფილების აქტივაციას [74]. G-CSF და GM-CSF თრგუნავენ CD16-ის ექსპრესიას ნეიტროფილებზე. G-CSF და IFNγ იწვევენ და აძლიერებენ პმნ-ზე CD64-ის ექსპრესიას. ამის გარდა, IFNγ მომწიფებულ ნეიტროფილებში ზრდის ანტისხეულ-დამოკიდებულ ციტოტოქსიურობასა და რეაქტიული ჟანგბადნაერთების

წარმოქმნას, ასევე, შერჩევითად ასტიმულირებს ცილების ბიოსინთეზს [74-76]. TNFα, რომელიც არის ნეიტროფილების ქემოტაქტური ფაქტორი ასევე იწვევს მათ დეგრანულაციასა რეაქტიული ჟანგბადნაერთების წარმოქმნას, ზრდის ფაგოციტოზსა და ანტისხეულ-დამოკიდებულ ციტოტოქსიურობას [41]. მიუხედავად ამისა, ჩვენი შედეგები ცხადყოფს, რომ ქლლ-ს დროს პმნ-ს დაქვეითებული აქვთ ფაგოციტური აქტივობა.

ყოველივე ზემოთ აღნიშნულიდან გამომდინარე, შესაძლებელია მივიჩნიოთ, რომ სწორედ დაავადებულებში არსებული ციტოკინების "ზადის ეფექტი" (პირველ რიგში G-CSF და GM-CSF მონაწილეობით) არის CD16-ის ექსპრესიის დაქვეითების, $CD16^+$ ნეიტროფილების მცირეოდენი შემცირებისა და $CD64^+$ ნეიტროფილების რიცხვის შესამჩნევი ზრდის მიზეზი. ხოლო რაც შეეხება CD32, იგი შედარებით მდგრადია ციტოკინების მიმართ. ეს ერთგვარად აისახება $CD32^+$ ნეიტროფილების რიცხვის და რეცეპტორის სიმკვრივის შესაბამისობაში საკონტროლო მაჩვენებლებთან [41].

$CD64^+$ ინტაქტური ნეიტროფილების რაოდენობის მომატება ასევე ნანახია ნამგლისებურ-უჯრედოვანი ანემიის დროს, კერძოდ დაავადების კრიზისულ ფაზაში, რომლის დროსაც $CD64^+$ პმნ-ები ხასიათდებოდნენ ენდოთელიალურ შრეზე მაღალი ადჰეზიურობის უნარით. დაადგინეს, რომ ამ პათოლოგიის დროს CD64 წარმოადგენს ადჰეზიური პმნ-ების მარკერს, მიუხედავად იმისა, რომ იგი პასიურ როლს თამაშობს ადჰეზიაში. ამ პაციენტებში CD64-ის მაღალი ექსპრესია არ აღმოჩნდა განპირობებული ცირკულაციაში ხსნადი ფაქტორების აქტივობით, რამეთუ დაავადებულთა შრატი შეიცავდა G-CSF, GM-CSF, IFNγ და სხვა ციტოკინების ნორმალურ რაოდენობას. როგორც ფიქრობენ, $CD64^+$ პმნ-ების მომატების მიზეზი არის ამ უჯრედების კონტაქტი

სისხლძარღვების კედელთან ან ძვლის ტვინში განვითარებული მიკროგარემო [79].

ჩვენი მონაცემებით, B-ქლლ დაავადებულებში CD64^{+} პმნ-ების მომატებული რაოდენობის მიუხედავად მათ ნეიტროფილებს მნიშვნელოვნად აქვთ დაქვეითებული *in vitro* ანტისხეულებით ოპსონიზებული სტაფილოკოკების მიმაგრების და შთანთქმის უნარი. როგორც აღინიშნა, ნორმალური ინტაქტური ნეიტროფილები მოქმედებენ მხოლოდ CD32 და CD16-ის მეშვეობით, რომელთაც უფრო დაბალაფინური კავშირის წარმოქმნის უნარი აქვთ, ვიდრე CD64-ს. ეს მეტად საინტერესოდ წარმოაჩენს შედეგს, როცა ნორმალური ნეიტროფილები დაბალაფინური კავშირის ხარჯზე უფრო უკეთ იკავშირებენ და შთანთქავენ ბაქტერიებს, ვიდრე გაცილებით მაღალაფინური CD64-ის მატარებელი ქლლ-იანი პირების ნეიტროფილები.

B-ქლლ-იანი პირების ნეიტროფილების ამგვარი უმოქმედობის მიზეზი შეიძლება იყოს მათი ანერგიულ მდგომარეობაში გადასვლა CD64-ის ექსპრესიის გამაძლიერებელი ზემოხსენებული ციტოკინებით განუწყვეტელი აქტივაციის გამო. გადაჭარბებული აქტივაციის მაჩვენებლად შეიძლება მიჩნეულ იქნეს ნეიტროფილებზე FcγRIII (CD16)-ის ექსპრესიის დაქვეითებაც: როგორც ცნობილია ნეიტროფილების აქტივატორები (მაგ. G-CSF, GM-CSF) ააქტიურებენ ენდოგენურ პროტეაზებს, რომლებიც "ხსნიან" უჯრედის ზედაპირიდან გფა-სთან დაკავშირებულ მოლეკულას.

ნეიტროფილების ფუნქციის ამგვარი დაქვეითება და მათზე რეცეპტორების სიმკვრივის შემცირება შესაძლებელია, ინფექციების მიმართ ავადმყოფთა განსაკუთრებული მგრძნობელობის ერთ-ერთი განმსაზღვრელი ფაქტორი იყოს და გათვალისწინებულ უნდა იქნას

შემდგომში სტანდარტული ქიმიოთერაპიის გამოყენებისა და იმუნოთერაპიის ახალი გზების შემუშავების დროს.

ჩვენი შემდგომი კვლევის საგანს წარმოადგენს პმნ-ის ***in vitro*** ფუნქციების კორექციის მეთოდების შემუშავება ციტოკინების საშუალებით და მათი გამოყენება ბისპეციფიური ანტისხეულებით განპირობებული ლეიკემიური უჯრედების ფაგოციტოზისა და აპოპტოზისათვის.

დასკვნები

1) B-ქლლ-ს დროს ფორბოლ მირისტატ აცეტატით სტიმულირებულ ნეიტროფილებს შემცირებული აქვთ ნიტროლურჯი ტეტრაზოლიუმის აღდგენის უნარი, რაც მოწმობს მათ ფუნქციურ არასრულფასოვნებას. B-ქლლ მკურნალობის ზოგიერთი სქემა აძლიერებს პმნ-ების ფუნქციურ დეფიციტს.

2) B-ქლლ-ს დროს ნეიტროფილების დარღვევები არ არის გამოწვეული არც პოლიმორფულბირთვიანი ნეიტროფილების მოუმწიფებლობით და არც იმ ფერმენტული სისტემების უკმარისობით, რომლებიც დააკავშირებულია ჟანგბად-დამოკიდებულ ბაქტერიციდულ ფუნქციებთან.

3) B-ქლლ-ს დროს დარღვეულია პოლიმორფულბირთვიანი ნეიტროფილების მიერ ოფსონიზირებული ნაწილაკების დაკავშირებისა და შთანთქმის უნარი, მიუხედავად იმისა, რომ ისინი ნორმალურად აექსპრესირებენ CD32 რეცეპტორს (FcγRII)

4) B-ქლლ-ის შემთხვევაში *ex vivo* ნეიტროფილები აექსპრესირებენ CD64 (FcγRI) მოლეკულებს, რომელიც პოლიმორფულბირთვიანი ნეიტროფილების აქტივაციის მარკერს წარმოადგენს. ამავე დროს, ამ უჯრედებზე დაქვეითებულია CD16 (FcgRIII) ექსპრესიის დონე.

5) პოლიმორფულბირთვიანი ნეიტროფილების ფუნქციური დარღვევები განპირობებულია B-ქლლ პაციენტების სისხლის შრატში არსებული კომპონენტებით და კორელირებს პერიფერიულ სისხლში ლეიკოციტების საერთო რიცხვის მატებასთან.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Nelson Kalil, Bruce D.Cheson. Chronic Lymphocytic Leukaemia *The Oncologist.* 1999; 4:352-369

2.Caligaris-Cappio F. Biology of Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Rev Clin Exp Hematol.* 2000; vol 4.1, 5-15

3.Itala M., Vainio O., Remes K. Functional abnormalities in granulocytes predict susceptibility to bacterial infections in chronic lymphocytic leukaemia. *Eur. J. Haematol.* 1996; 57(1), 46-53

4.Foon K.A., Rai K.R., Gale R.P. Chronic Lymphocytic Leukaemia: New Insights Into Biology and Therapy. *Annals of Internal Medicine.* 1990; 113, 525-539.

5.Matutes E., Polliack A. Morphological and Immunophenotypic Features of Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Rev Clin Exp Hematol.* 2000; vol 4.1, 22-47.

6.Orsini E., Guarini A., Foa R. Accessory Cells, Cytokine Loops and Cell-To-Cell Interaction in Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Rev Clin Exp Hematol.* 2000; vol 4.1, 73-91

7.Hoffman R., Benz E. et al. Haematology-Basic Principles and practice. Third Eddition.2000

8.Rozman C., Montserrat E., Current concepts: Chronic Lymphocytic Leukaemia. *N.Engl J Med.* 1995; 333:1052-1057

9.Molika S., Brugiatelli M., Callea V. Comparison of younger versus older B-cell Chronic Lymphocytic Leukaemia patients for clinical presentation and prognosis. A retrospective study of 53 cases. *Eur J Haematol* 1994; 52: 216-221

10.Malone KE., Koepsell TD., Daling JR. Chronic Lymphocytic Leukaemia in relation to chemical exposures. *Am J Epidemiol* 1989; 130: 1152-1158

11.Horwitz M., Goode EL, Jarvik GP. Anticipation in familial leukemia. *Am J Hum Genet* 1996; 59:990-998.

12.Cuttner J. Increased incidence of hematological malignancies in first-degree relatives of patients with Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Canser Invest.* 1992; 10: 103-109.

13.Bartik M.M., Walker D., Kay N.E. Impairments in immune cell function in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Semin Oncol.* 1998; 25: 27-33.

14.Itala M., Pelliniemi T., Remes K. GM-CSF raises serum levels of b-microglobulin and thymidine kinase in patients with Chronic Lymphocytic Leukaemia *Br J Haematol*, 1996; 94: 129-132.

15.Bunch C., Chapel H., Gale RP. Infectious complications in Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Harwood Academic,* 1988: 249-262.

16. Foa R., Fierro MT., et al. Immunoregulatory T-cell defects in B-cell Chronic Lymphocytic Leukaemia : cause or consequence of the disease? The contributory role of a decreased availability of IL-2. *Blood cells*, 1987;12:399-412.

17.Zola H., Flego L., Weedon H. Expression of IL-4 reseptor on human T and B lymphocytes. *Cell Immunol*, 1993; 150: 159-158.

18.Foa R., Massaia M., Cardona S., et al. Production of tumor necrosis factor alpha (TNF-α) by B cell Chronic Lymphocytic Leukaemia cells: a possible regulatory role of TNFα in the prognosis of the diseas. *Blood* 1990; 76: 393-400.

19.Tolero D., Celle F. P., Cignetti A., Foa R. The IL-2 receptor complex:exspression and function on normal and leukaemic B cells. *Leukemia*, 1995; 9: 1425-1431.

20. Lomas D.A., Chamba M.I., Stokley R.A. The effect of *in vitro* and *in vivo* dexamethasone on human neutrophil function. *Agents Actions* 1991: 33: 279-285.

21.Kunica J.E., Talle M.A., Denhardt G.H., Brown M. Immunosuppression by glucocorticoids: Inhibition of production of multiple lymphokines by in vivo administration of dexamethasone. *Cell Immunol* 1993: 149: 39-49.

22.Totero D., Reato G., Mauro F, et al., IL-4 production and increased CD30 expression by a unique CD8 T-cell subset in B cell Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Br J Haematol*, 1999; 104: 589-599.

23.Zwiebel J. A., Cheson B. D. Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors. *Seminars in Oncology*, Vol.25, No.1,1998: 42-59.

24.Egle A., Marschitz I., Posch B, et al., IL-10 serum levels in B cell Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Br J Haematol*, 1996; 94: 211-212.

25.Celle P.F., Mariani S., Riera L. IL-8 induces the accumulation of B cell Chronic Lymphocytic Leukaemia cells by prolonging survival in an autocrin fashion. *Blood*, 1996; 87:3327-3335.

26.Chapel H.M., Bunch C. Mechanisms of infections in Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Semin Hematol*, 1987; 24:291-296.

27.Itala M., Helenius H., Nikoskelainen J., Remes K. Infections and serum IgG levels in patients with Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Eur J Haematol*, 1992; 48: 266-270.

28.Dieghero G., Travade P., Chevret S., Fenaux P., Chastang C., Binet J.L. B cell Chronic Lymphocytic Leukaemia: present status and future directions. *Blood*, 1991; 78: 1901-1914.

29.Kipps T., Carson D.A. Autoantibodies in chronic lymphocytic leukaemia and related systemic autoimmune diseases. *Blood*, 1993; 81: 2475-2487.

30.Dekaris D., Handl S., Sabioncello A., Rabatic S. Function of granulocytes in B-chronic lymphocytic leukaemia. *Blut*, 1990; 61(6): 354-357.

31.Kansu E., Akalin E., Civelek C., Tekesin O., Laleli Y. Serum bactericidal and opsonic activities in chronic lymphocytic leukaemia and multiple myeloma. *Am J Hematol*, 1986; 23: 191-196.

32.Nagler A., Obedeanu N., Tatarsky I., Hocherman I., Carter A. Chemiluminescence response of polymorphonuclear leukocytes to serum opsonised zymosan-a predictive parameter for infections and prognosis in multiple myeloma patients. *Clin Lab Haematol*, 1988; 10: 365-375.

33.Yayaswal U., Roper S. Impairment of neutrophil chemotaxis by serum from patients with chronic lymphoproliferative disease. *J Clin Pathol*, 1983; 36: 446.

34.Siegbahn A., Simonsson B.,Venge P. The chemokinetic inhibitori factor in serum of CLL patients: correlation with infection propensity and disease activity. *Scand J Haematol*, 1985; 35: 80-87.

35.Siegbahn A., Nilsson K., Venge P. The chemokinetic inhibitori factor derived from chronic lymphocytic leukaemia cells. Partial purification and characterization of a new lymphokine. *Scand J Immunol,* 1986; 23: 15-23.

36.Matzner Y., Neutrophil function in hematological neoplasia. *Leuk Lymphoma,* 1991; 4: 9-15.

37.Prieto A., Garcia-Suarez J., Reyes E., Lapena P. Diminished DNA synthesis in T cells from B chronic lymphocytic leukaemia after phytohemagglutinin, anti-CD3 and PMA mitogenic signals. *Exp Haematol,* 1993; 21: 1563-1569.

38.Reittie J.E., Hoffbrand A.V. IL-4 inhibits proliferation and spontaneous cytokine release by chronic lymphocytic leukaemia cells. *Leuk Res*, 1994; 18: 55-60.

39.Janeway C.A., Travers P., Hunt S. *Immunobiology*. Third Edition, 1997.

40.Martin P.A., Martin R.E., Garcia-Suarez J., Arriagada C.F., et al. A low blood lymphocyte count is assosiated with an expansion of activated cytotoxic lymphocytes in patients with B cell Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Eur J Haematol*, 1997; 59: 89-99.

41.Edwards S.W. Biochemistry and physiology of neutrophil. Cambridge university press..1994

42.Mittelman M., Fishman P., Djaidetti M. Reduced phagocytosis promoting activity of saliva from patients with Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Biomed Pharmacother*, 1986; 40:8, 308-311

43.Siegbahn A., Garcia R.C., Kishi K., Nilsson K., Venge P. Specific binding of B-CLL cell-derived chemokinetic inhibitory factor (CIF) to human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Haematol*, 1987; 39(2): 172-179.

44. Watson F., Robinson J.J., Edwards S.W. Neutrophil function in whole blood and after purification: Changes in receptor expression, oxidase activity and responsiveness to cytokines. *Biosci. Rep.* 1992; 12: 123-133.

45. Weisbart R.H., Golde D.W., Gasson J.C., Biosynthetic human GM-CSF modulates the number and affinity of neutrophil f-Met-Leu-Phe receptors. *J Immunol*, 1986; 137: 3584-3587.

46. Маянский А.Н.,Галлиулин А.Н. Реактивность Нейтрофила. 1984.

47. Lee R.G., Bithell T.C., Foerster J., Athens J.W., Lukens J.W. Wintrobe's Clinical Hematology. Ninth Edition; 1998; 223-257.

48. Гусева С.А. Бактерицидная функция нейтрофилов крови при миелопролиферативних заболеваниях. *Врачебное дело*, 1990;8:27-29

49. Gallin J.I., Goldstein I.M.,Snyderman R. Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. New York: Raven Press, 1988.

50. Hampton M.B., Kettle A.J., Winterbourn C.C. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial killing. *Blood*, 1998; 92(9): 3007-3017.

51. Borregaard N., Cowland J.B. Granules of the human neutrophilic polimorphonuclear leukocyte. *Blood*, 1997; 89(10): 3503-3521.

52. Lillard J.W., Boyaka P.N., et al. Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Blood*, 1999; 96(2): 651 -656.

53. Hoffman R., Benz E. et al. Haematology-Basic Principles and practice. Third Eddition. 2000; 720-738.

54. Mu X., Kay N.E., Gosland M.P., Jennings C.D. Analysis of blood T-cell cytokine expression in B-chronic lymphocytic leukaemia: evidence for increased levels of cytoplasmic IL-4 in resting and activated CD8 T cells. *Br J Haematol*, 1997; 96: 733-735.

55. Jones R.D., Hancock J.T., Morice A.H. NADPH oxidase: A universal oxygen sensor? *Free Radical Biology & Medicine*, 2000; 29(5): 416-424.

56.Tan S., Ahmed N., Berridge M.V. Acute regulation of glucose transport after activation of human peripheral blood neutrophils by Phorbol Myristate Acetate, fMLP, and GM-CSF. *Blood*, 1998; 91(2): 649-655.

57.Neuman E., Huleatt J.W., Jack R.M. GM-CSF increases synthesis and expression of CR1 and CR3 by human peripheral blood neutrophils. *J Immunol*, 1990; 145: 3325-3332.

58.Fanger M.W., Shen L., Graziano R.F., Guyre P.M. Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG. *Immunol Today*, 1989; 10: 92-99.

59.Molica S., Vitelli G., Levato D., et al. Clinico-biological implications of increased serum levels of IL-8 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Haematologica,* 1999; 84: 208-211.

60.Capablo S., Lapietra A., Mele G., et al. Serum levels of TNF, IL-6 and sCD23 correlate with changes in lymphocyte count in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia receiving IFNα therapy. *Leuk Lymphoma*, 1997; 24: 327.

61.Aguilar-Santelises M., Gigliotti D., Osorio L.M. Cytokine expression in B-CLL in relation to disease progression and *in vitro* activation. *Med Oncol*, 1999; 16: 289-295.

62.Knauf W.U., Ehlers B., Bisson S., et al. IL-10 serum levels in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Blood*, 1995; 86: 4382-4383.

63.Adami F., Guarini A., Pini M. Serum levels of TNFα in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer,* 1994; 30: 1259-1263.

64.Trenin L., Zambello R., Agostini C., et al. Expression and regulation of tumor necrosis factor, IL-2, and hematopoietic growth factor receptors in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Am J Hematol*, 1993; 43: 81-85.

65.Jurlander J., Lai C.F., Tan J., et al. Characterisation of IL-10 receptor expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 1997; 89: 4146-4152.

66. Elghetany M.T. Surface marker abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Haematologica,* 1998; 83: 1104-1115.

67.Corcione A., Corrias M.V., Daniele S., et al. Expression of G-CSF and G-CSF receptor genes in partially overlapping monoklonal B-cell populations from chronic lymphocytic leukaemia patients. *Blood*, 1996; 87(7):2861-2869.

68.Biondi A., Rossi V., Bassan R., et al. constitutive expression of the Il-6 gene in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood*, 1989; 73: 1279-1288.

69.Buschle M., Campana D., Carding S.R., et al. IFNγ inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *J Exp Med*, 1993; 177:213.

70.Malech HL: Phagocyte oxidative mechanisms. *Curr opin hematol,* 1993; 123.

71.Malech HL., Nauseef WM. Primary inherited defects in neutrophil function: etiology and treatment. *Semin Hematol*, 1997; 34:27

72.Pistoia V., Ghio R., Roncella S., et al. Production of colony stimulating activity by normal and neoplastic human B lymphocytes. *Blood*, 1987; 69:1340.

73.Zupo S., Perussia B., et al. Production of GM-CSF but not IL-3 by normal and neoplastic human B lymphocytes. *J Immunol*, 1992; 148:1423.

74.Demetri D., Griffin J.D. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*, 1991;78:2791.

75.Daeron M. Fc receptor Biology. *Annual Rev Immunol*, 1997; 15: 203-234.

76.Vossebeld A., et al. Heterotypic FcγR Clusters evoke a synergistic Ca-Response in Human Neurtophils. *Blood,* 1999; 5: 154-161

77.Encyclopedia of Immunology.Vol.1-3.Academic Press. 1992.

78.Fossati G., Bucknall R.C., Edwerds S.W. Fcγ receptors in autoimmune diseases. *Eur J Clin Invest,* 2001; 31(9): 821-831.

79.Faldon E., Vordermeier S., et al. Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. *Blood*, 1998; 91(1): 266-274.

80.Berton G. Tyrosine kinases in Neutrophils. *Current Opinion in Hematology*, 1999; 6: 51-58.

81.Lennartz M.R. Phospholipases and phagocytosis:the role of phospholipidderived second messengers in phagocytosis. *IJBCB*, 1999; 415-430.

82.Ambruso D.R., Bolscher B.J.M., et al. Assembly and activation of the NADPH:O_2 oxidoreductase in human neutrophils after stimulatiom with Phorbol Myristate Acetate. The Journal of Biological Chemistry, 1990; 265(2):924-930.

83.Deo Y.M., Graziano R.F., Repp R., Winkel J.G.J. Clinical significance of IgG Fc receptors and FcγR-directed immunotherapies. *Immunology Today,* 1997; 18 (3): 127-135.

84.Lopez D., Trevani A., et al. Acidic pH increases the avidity of FcγR for Immune Complexes. *Immunology*, 1999; 98: 489-496

85.Matzner Y:Acquired neutrophil disfunction and deseases with an inflamatory component. *Semin Hematol*, 1997; 34:291

86.Dotti G., Garratini E., et al. Leukocyte alkaline phosphatase identifies terminally differentiated normal neutrophils and its lack in chronic myelogenous leukaemia is not dependent on p210 tyrosine kinase activity. *British Jounal of Hematology,* 1999; 105:163-172.

87.Roberts M., Cooke K., et al. Antigen-specific Cytolisis by Neutrophils and NK cells Expressing Chimeric Immune Receptors bearing ζ or γ Domains. *Journal of Immunology*, 1998; 161-170

88.Kushner B.H., Cheung N.V. Absolute requirement of CD11/CD18 adhesion molecules, FcRII, and the phosphatidylinositol-linked FcRIII for monoclonal antibody-mediated neutrophil antihuman tumor cytotoxicity. *The American Society of Hematology,* 1992; 1484-1490.

89.Stockmeyer B., Elsasser D., et al. Mechanisms of G-CSF-or GM-CSF-stimulated Tumor Cells by FcR-directed Bispecific Antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 2001; 248-257

90.J. Michon J., A. Gey A., et al. In vivo induction of functoinal FcγRI on Neutrophils and modulation of Blood Cytikine mRNA levels in cancer patients treated with G-CSF. *British Jounal of Hematology,* 1998;

91. Spriel A.B., Leusen J.H.W., Egmond M., Dijkman H.B.P.M., Assmann K.J.M., MayadasT.N., Winkel J.G.J. Mac-1 (CD11b/Cd18) is essential for Fc receptor mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation. *Blood,* 2001; 97: 2478-2486.

92.Cemerlic D., Dadey B., et al. Cytikine Influence on Killing of Fresh Chronic Lymphocutic Leukemia Cells by Human Leukocytes. *Blood,* 1991; 77: 578-590

93.Jablons D., Bolton E., et al. IL-2-based Immunotherapy alters Circulating Neutrophil FcR Expression and Chemotaxis. *The Journal of Immunology,* 1990.

94.Honeychurch J., Tutt A., et al. Therapeutic Efficacy of FcγR/CD64-directed Bispecific Antibodies in B-Cell Lymphoma. *Blood,* 2000; 96: 279-285

95.Carlo E., Forni G., Lollini P.L., Colombo M.P., Modesti A., Musiani P. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood,* 2001; 97: 339-34.

96.van Spiel A., van Ojik H., G. van der Winkel. Immunotherapeutic perspective for Bispecific Antibodies. *Immunology Today,* 2000; 21: 1147-1154

97.Lydiard P., Whelan A., Fanger M. *Immunology.* Instant Notes. BIOS. 2000.

98.Pers J., Berthou C., Porakishvili N., et al. CD5 Induced apoptosis of B cells in some patients with B-chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia,* 2002; 16: 225

99.Fcγ Receptor-mediated immune phagocytosis depends on the class of FcγR and on the immunoglobulin-coated target cell. Vox Sanguinis 81.2001.