

ღერუღია მორფოლოგიური ცვლილებების ძვალში. ყველაზე მეტი გამძლეობა აღინიშნა შტიფტის გამოყენებისას ბიოკომპოზიციური დაფერვით, ფირფიტისა - ბიოკომპოზიციური დაფერვით, ვერცხლით დამუშავებული ფირფიტისა - ჰიდროქსიაპატიტით დაფერვით (8 კვირა ოპერაციის შემდეგ). ყველაზე დაბალი გამძლეობა აღინიშნა ნიმუშებში ფირფიტების გამოყენებისას დაფერვის გარეშე, შტიფტისა - ვერცხლით დამუშავებული ჰიდროქსიაპატიტით დაფერვით (4 კვირა) და შტიფტით დაფერვის გარეშე (8 კვირა იმპლანტაციის შემდეგ). ელექტრონულ-მიკროსკოპიულ

ღონეზე დადასტურდა ლითონის იმპლანტანტების ზედაპირზე დაფერილი ბიომინის ინტეგრაცია ირგვლიმდებარე ქსოვილთან.

დამტკიცებულია ინტრამედულური და ძვალზედა ფიქსტორების უპირატესობა, რომელთა ზედაპირი დაფერილია მასალით ბიოაქტიური მინის საფუძველზე: იზრდება დიდი დატვირთვისადმი მათი ამტანობის შესაძლებლობა სტაბილური ფიქსაციის პირობებში, რაც წარმოადგენს საფუძველს ოსტეოსინთეზის მეთოდის არჩევისათვის პაციენტებში დიდი წვივის ძვლის პათოლოგიური მოტეხილებებით.

## ATTACHMENT OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA CELLS BY AUTOLOGOUS POLYMORPHONUCLEAR NEUTROPHILS MEDIATED BY BISPECIFIC ANTI-CD19/CD64 ANTIBODY

<sup>1</sup>Tsertsvadze T., <sup>1</sup>Mitskevich N., <sup>2</sup>Datikashvili-David I., <sup>3</sup>Ghirdaladze D., <sup>1,4</sup>Porakishvili N.

<sup>1</sup>Iv. Javakhishvili Tbilisi State University, Division of Immunology and Microbiology; <sup>2</sup>M. Zodelava Hematology Center, Tbilisi; <sup>3</sup>Institute of Haematology and Blood Transfusiology, Tbilisi, Georgia; <sup>4</sup>University of Westminster, London, UK

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) presents with clonal expansion and accumulation of CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> cells in peripheral lymphoid organs and tissues and in bone marrow [1-3]. The disease remains incurable, albeit there are new molecular and immunotherapy methods currently available, which, in conjunction with chemotherapy, lead to the "precision therapy" approach [4,5]. The majority of immunotherapies are based on the ability of therapeutic antibodies to mobilize anti-tumour potential of the complement, natural killer cells and phagocytic cells through their Fcγ-receptors (FcγR) [6,7]. Bispecific antibodies (BsAb) are also considered in the treatment of CLL, whereby phagocytic cells play a key effector role in the destruction of the target CLL cells. Anti-CD19/anti-CD64 BsAb binds to CD19 receptors on CLL cells and to CD64 receptors (FcγRI) on monocytes and activated neutrophils, thus inducing phagocytosis of the leukaemic cells [8].

We previously showed that the expression of CD64 receptor on polymorphonuclear neutrophils (PMNs) in CLL is significantly higher than that on normal PMNs [7,9] indicating that PMNs in CLL are potentially powerful effector cells for therapeutic application of anti-CD64/CD19 BsAb. The effector potential of PMNs could be further enhanced through activation mediated by cytokines granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and interferon γ (IFNγ) [10,11,12]. The aim of this study was to evaluate the ability of anti-CD64/CD19 BsAb to induce phagocytosis of CLL cells mediated by PMNs activated with G-CSF and IFNγ cytokines.

**Material and methods.** Peripheral blood was obtained from 16 CLL patients, at various stages of the disease (Rai I-IV), aged 45-80 (median age 67), care of Professor Darejan Ghirdaladze, Institute of Haematology and Blood Transfusiology and Dr Irina Datikashvili-David, M. Zodelava Hematology Center, Tbilisi, Georgia. White blood cell (WBC) counts in patients varied from 4.9 x 10<sup>9</sup>/L to 120 x 10<sup>9</sup>/L. Seventeen patients were untreated during six months prior to the study, 8 were treated with COP. Ten ml of blood were collected in heparinized tubes (Sigma-Aldrich), stored at a room temperature and processed on the same day.

**Isolation of CLL cells and autologous PMNs.** CLL cells and autologous PMNs were isolated in double density gradient in Histopaque 1.077 and 1.119 (Sigma-Aldrich). CLL cells and PMNs were collected separately from the 1.077 and 1.119 interphases respectively and washed twice with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma-Aldrich). The supernatant was removed and the pellets were re-suspended in medium RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich). The concentration of isolated CLL cells and PMNs was adjusted to 0.1x10<sup>6</sup> cells/ml.

**CLL cell labeling.** Isolated CLL cells were labeled with Red Fluorescent Linker (PKH-26 kit, RFL, Sigma-Aldrich) by diluting the dye 1:1000 in Diluent C and mixing 1 ml of the diluted dye with 1 ml of CLL cell suspension at a concentration 1x10<sup>6</sup> cells/ml for several minutes at room temperature. The labeling was stopped by the addition of RBMI-FBS, followed by two washes in the same medium.

**Stimulation of PMNs with G-CSF and IFNγ.** 100μl of PMN suspension at a concentration 0.1x10<sup>6</sup> cells/ml. were treated with IFNγ (Sigma-Aldrich) at a final concentration 100ng/ml and/or with recombinant G-CSF (Sigma-Aldrich) at a final concentration 500 units/ml. The cells were incubated at +37°C in CO<sub>2</sub> incubator for 12 hours. After incubation, cells were washed twice in RPMI-1640 at 1500 rpm for 5 min. The concentration of cells was adjusted to 0.1x10<sup>6</sup> cells/ml in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS. The quality of the labelling was tested in the FACScan flow cytometer (Becton & Dickinson) using the FL2 scatter.

**PMN attachment to autologous leukemic cells.** 100μl of PMN cell suspension and 100μl of RFL-labelled CLL cell suspension at the same concentration of cells 0.1x10<sup>6</sup> cells/ml were co-incubated at +37°C in CO<sub>2</sub> incubator under various regimen: in eight combinations and two time categories (4 h and 24 h) each: 1) unstimulated PMNs with CLL cells without the anti-CD19/CD64 bispecific antibody (BsAb); 2) unstimulated PMNs with CLL cells and with the BsAb; 3) G-CSF stimulated PMNs with CLL cells without the BsAb; 4) G-CSF stimulated PMNs with CLL cells and with the BsAb; 5) IFNγ stimulated PMNs with

CLL cells without the BsAb; 6) IFN $\gamma$  stimulated PMNs with CLL cells and with the BsAb; 7) G-CSF+IFN $\gamma$  stimulated PMNs with CLL cells without the BsAb; 8) G-CSF+IFN $\gamma$  stimulated PMNs with CLL cells and with the BsAb.

The PMN/CLL cell adhesion was analyzed with the flow cytometer. The results were expressed as percentages of PMNs with adhered RFL-positive cells in the PMN gate of a dot-plot in the side/forward scatter (SSC-FSC).

The data was statistically analyzed using the Mann-Whitney non-parametric *U*-test.

**Results and discussion.** Our results demonstrated that even without BsAb, after 4h incubation, PMNs could form complexes with CLL cells, whilst the addition of anti-CD19/CD64 BsAb, in 9 out of 16 (56.25%) cases enhanced the adhesion of PMNs to CLL cells (Fig. 1,  $p=0.049$ ). Interestingly, in case of a 24h incubation, compared to 4h incubation BsAb increased the PMN adhesion to CLL cells in only 5 out of 16 cases (31.25%), e.g. the BsAb effect on phagocytosis drops with an increase in target and effector cell co-incubation time (Fig. 1).

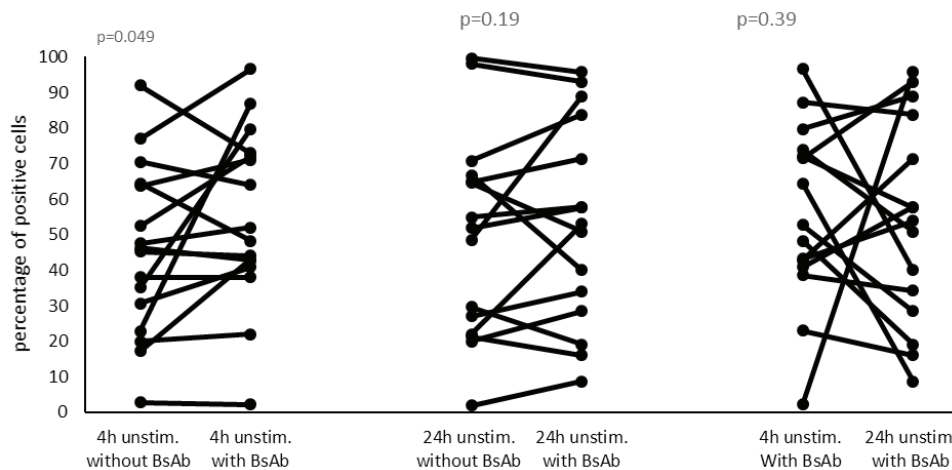


Fig. 1. Adhesion of CLL cell by PMNs upon 4h and 24h incubation without or with BsAb,  $n=16$

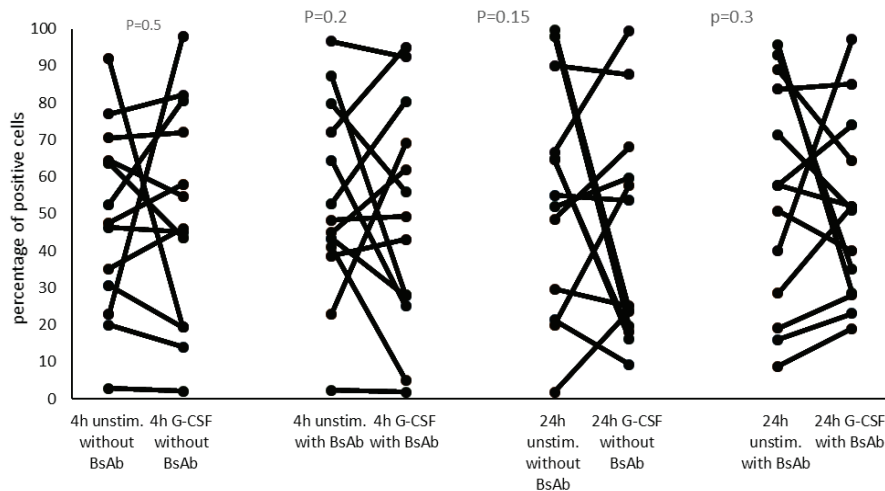


Fig. 2. Adhesion of CLL cells by PMNs, unstimulated or stimulated with G-CSF, upon 4h and 24h incubation with and without BsAb,  $n=13$

The very fact that BsAb didn't induce an increase in CLL cell binding by PMNs in 40% of cases could be conditioned by a nonspecific binding of the target/ effector cells, presumably through adhesion molecules (LFA-1 and ICAM-1) [13]. Indeed, the comparison of BsAb effect on PMN/CLL adhesion after 4h and 24h co-incubation mode revealed an adhesion increase in only in 6 (40%) out of 16 cases (Fig. 1).

Thus, BsAb capacity to enhance PMN/CLL cell adhesion is limited, not exceeding 56.25% for 4h.

The CD64/CD19 BsAb stimulatory capacity is greatly dependant on the level of CD64 expression on effector cells. Induction of CD64 expression on PMNs requires stimulation with cytokines such as G-CSF and IFN $\gamma$  [14]. Hence, we studied the effect of PMN pre-stimulation with these cytokines on the in-

duction of phagocytosis of leukaemic cells, mediated by BsAb. For this purpose, the CLL patients' PMNs were pre-stimulated for 12h using 3 cytokine combinations: G-CSF or IFN $\gamma$  alone, or combination of the two.

Our data demonstrated that pre-treatment of PMNs with either G-CSF (Fig. 2,  $n=13$ ) or IFN $\gamma$  (Fig. 3,  $n=5$ ) did not result in overall appreciable enhancement of the adhesion of CLL cells by autologous PMNs. Moreover, the increase in the incubation time between the effector and the target cells did not lead to an improved attachment of CLL cells to PMNs either. However it must be noted that the response was heterogeneous and that in around 30-45% of samples we did observe enhancement of the adhesion. Further investigation is required to address the reasons for the heterogeneous response.

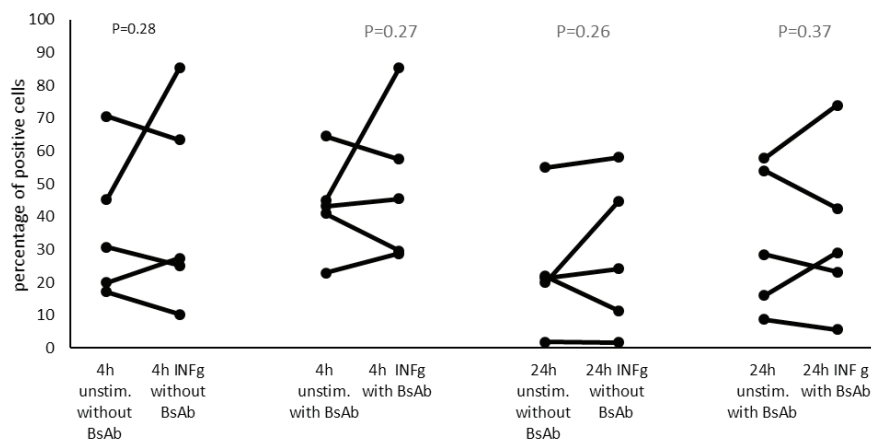


Fig. 3. Adhesion of CLL cells by PMNs unstimulated or stimulated with  $INF\gamma$  upon 4h and 24h incubation with and without BsAb, n=5

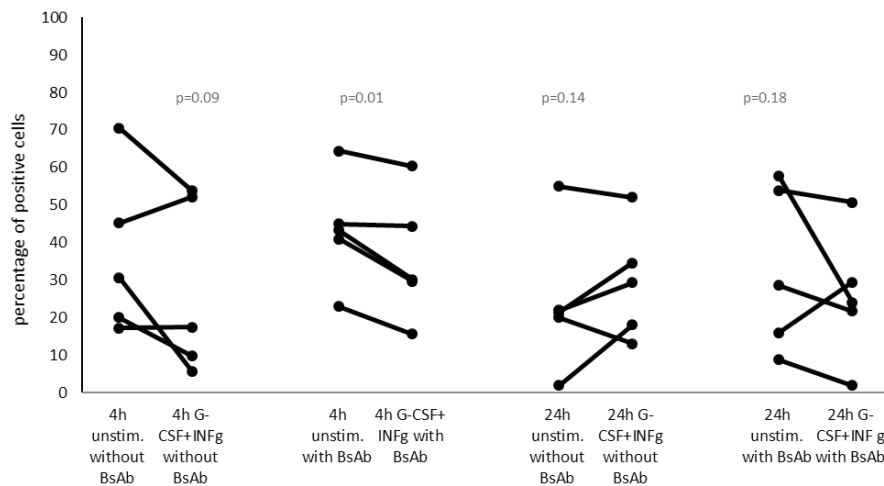


Fig. 4. Adhesion of CLL cells by PMNs unstimulated or stimulated with G-CSF and  $INF\gamma$  upon 4h and 24h incubation with and without BsAb, n=5

We further studied possible cumulative effect of those two cytokines (G-CSF and  $INF\gamma$ ) on CLL cell adhesion/absorption by autologous PMNs. Surprisingly, with both cytokines applied the ability of PMNs to attach CLL cells was largely reduced (Fig. 4) with rare exception. When BsAbs were used, the decrease in the attachment was particularly notable after 4h incubation time ( $p=0.01$ ).

We demonstrate here that anti-CD19/anti-CD64 BsAb has limited capacity to enhance leukemic cell attachment/phagocytosis by autologous PMNs. This could partially be explained by the intensity of spontaneous CLL target cell adhesion by PMNs, as shown in Figure 1, which might saturate the attachment capacity of autologous PMNs. Indeed, in some cases saturation of cultures with PMN/CLL complexes could be observed (approaching 100%). Spontaneous, FcR-independent ability of PMNs to adhere to autologous CLL cells appears to be quite remarkable (Fig. 1).

In our hands, pre-treatment of PMNs from CLL patients with cytokines G-CSF and  $INF\gamma$ , alone or jointly did not lead to an enhancement of the adhesion of the leukaemic cells. We have demonstrated earlier that CD64 expression on CLL PMNs is aberrantly higher as compared to normal blood neutrophils [9,19]. This could be due to their *in vivo* stimulation, hence *in vitro* treatment with G-CSF and  $INF\gamma$  is unable to further substantially enhance CD64 expression on PMNs and hence – BsAb-mediated CLL cell

adhesion. Indeed, it has been shown previously that CLL cells can aberrantly synthesize G-CSF resulting in increased *in vivo* CD64 expression [15,16]. Moreover, G-CSF and  $INF\gamma$  joint effect may lead to activation-induced cell death (AICD) [7,17,18] and reduction in the adhesion capacity of the effector PMNs.

It appears, that therapeutic effect of anti-CD19/anti-CD64 BsAb on enhancing attachment of leukaemic cells in CLL patients is limited and its application should be based on the assessment of individual capacity of the patients' phagocytic cells.

**Acknowledgement.** This work was supported by Shota Rustaveli National Science Foundation of Georgia (SRNSF) [Grant № YS-18-042].

## REFERENCES

1. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. // *Nat Rev Cancer*. 2016; 16(3):145–62.10.1038.
2. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. // *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3:16096.10.1038.
3. Ghia P, Ferreri AM, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia. // *Crit Rev Oncol Hemato*. 2007;64:234–46.

4. Byrd J, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Kay NE, et al. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. // *New England Journal of Medicine*. 2014; 371, 213–223.
5. Byrd JC, Owen R, O'Brien SM, Brown JR, Hillmen P, et al. Pooled analysis of safety data from clinical trials evaluating acalabrutinib monotherapy in hematologic malignancies. // *Blood*. 2017; 130, 4326–4326.
6. Tsertsvadze T, Mitskevich N, Ghirdaladze D, Porakishvili N. Correlation of the expression of CD32 and CD180 receptors on CLL cells and MEC1 Cell Line. // *Georgian Medical News*. 2015; 2(240): 56-59.
7. Tsertsvadze T, Mitskevich N, Ghirdaladze D, Porakishvili N. Aberrant expression of Fcγ receptors and toll like receptor CD180 on monocytes from patients with chronic lymphocytic leukaemia. // *Georgian Medical News*. 2015, 2(239): 35-38.
8. Zhang X, Yang Y, Fan D, Xiong D. The development of bispecific antibodies and their applications in tumor immune escape. // *Exp Hematol Oncol*. 2017; 6:12.
9. Gabunia Kh, Kardava L, Kulikova N, et al. Phagocytosis and the regulation of apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia. // *Bulletin of the Georgian Academy of Sciences*. 2002; 166 (1), pp. 153-157.
10. Shimoji K, Yuasa S, Onizuka T, Hattori T, Tanaka T. G-CSF Promotes the Proliferation of Developing Cardiomyocytes In Vivo and in Derivation from ESCs and iPSCs. // *Cell Stem Cell*. 2010; 6(3): 227-237.
11. Tecchio C, Cassatella MA. Neutrophil-derived chemokines on the road to immunity. // *Semin Immunol*. 2016;28(2):119–28;
12. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. // *Front Immunol*. 2014;5:508.
13. Reina M, Espel E. Role of LFA-1 and ICAM-1 in Cancer. *Cancers*. 2017; 9(11): 153.
14. Castellani S, D'Oria S, Diana A, Polizzi AM, Di Gioia S. G-CSF and GM-CSF Modify Neutrophil Functions at Concentrations found in Cystic Fibrosis. *Scientific Reports*. 2019; 9: 12937.
15. Höglund M, Håkansson L, Venge P. Effects of in vivo administration of G-CSF on neutrophil functions in healthy volunteers. // *Haematology*. 2009; 195-202.
16. Kawano M, Mabuchi S, Matsumoto Y, Sasano T, Takahashi R, et al. The significance of G-CSF expression and myeloid-derived suppressor cells in the chemoresistance of uterine cervical cancer. // *Scientific Reports*. 2015; 5:18217.
17. Miranda-García M, Däbritz J, Varga G, et al. PRE-S-FINAL-2332: Activation-induced cell death of human monocytes as a novel mechanism fine-tuning inflammation and autoimmunity. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2013; 11(2): P322.
18. Tsertsvadze T, Bilanishvili A, Mitskevich N, Ghirdaladze D, Porakishvili N. Phagocytosis and expression of Fcγ-receptors and CD180 by Monocytes in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). // *Georgian Medical News*. 2017; (270):88-93.
19. Gabunia K, Gachechiladze N, Burjanadze L, Roschupkina T, Baloyan D, et al. Impaired phagocytic function of polymorphonuclear neutrophils in B chronic lymphocytic leukemia. // *Haematologica*. 2000; 85: 28-29.
20. Porakishvili N, Vispute K, Rajakaruna N, Andrew S, Kulikova N, Tsertsvadze T, et al. Re-wiring of sIgM-mediated signaling by CD180-toll-like receptor in CLL. // *Molecular Medicine*. 2015; 21:46-57.

#### SUMMARY

### ATTACHMENT OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA CELLS BY AUTOLOGOUS POLYMORPHONUCLEAR NEUTROPHILS MEDIATED BY BISPECIFIC ANTI-CD19/CD64 ANTIBODY

<sup>1</sup>Tsertsvadze T., <sup>1</sup>Mitskevich N., <sup>2</sup>Datikashvili-David I., <sup>3</sup>Ghirdaladze D., <sup>4</sup>Porakishvili N.

<sup>1</sup>*Iv. Javakishvili Tbilisi State University, Division of Immunology and Microbiology;* <sup>2</sup>*M. Zodelava Hematology Center, Tbilisi;* <sup>3</sup>*Institute of Haematology and Blood Transfusiology, Tbilisi, Georgia;* <sup>4</sup>*University of Westminster, London, UK*

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common adult leukaemia in the US and in Europe, including Georgia. CLL presents with clonal expansion and accumulation of CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> cells in peripheral lymphoid organs and tissues and in bone marrow. The disease remains incurable, albeit there are new molecular and immunotherapy methods currently available, which, in conjunction with chemotherapy, lead to the “precision therapy” approach. The majority of immunotherapies are based on the ability of therapeutic antibodies to mobilize anti-tumour potential of immune responses. Bispecific antibodies (BsAb) are also considered in the treatment of CLL, whereby phagocytic cells play a key effector role in the destruction of the target CLL cells. Anti-CD19/anti-CD64 BsAb binds to CD19 receptors on CLL cells and to CD64 receptors (FcγRI) on monocytes and activated polymorphonuclear neutrophils (PMNs), thus inducing phagocytosis of the leukaemic cells.

The aim of this study was to evaluate the ability of anti-CD19/CD64 BsAb to enhance adherence of CLL cells by PMNs, intact or activated with G-CSF and IFNγ cytokines. Membranes of the isolated CLL cells of 16 patients were stained with Red Fluor-

escent Linker and CLL cells were co-incubated with isolated autologous PMNs, intact or pre-stimulated with G-CSF and/or IFNγ for 4h or 24h. The PMN/CLL cell adhesion was analyzed with the FACScan flow cytometer by gating on PMNs with adhered RFL-stained CLL cells.

The results were heterogeneous. Our data demonstrate that anti-CD19/anti-CD64 BsAb has limited capacity to enhance leukaemic cell attachment by autologous PMNs. This could partially be explained by the remarkable intensity of spontaneous ability of PMNs to adhere to autologous CLL cells. Pre-treatment of PMNs from CLL patients with G-CSF and IFNγ, alone or jointly did not enhance the adhesion of the leukaemic cells. Moreover, G-CSF and IFNγ joint effect led to the reduction in the adhesion capacity of the effector PMNs.

It appears, that therapeutic effect of anti-CD19/anti-CD64 BsAb on enhancing attachment of leukaemic cells to PMNs in CLL patients is limited and its application should be based on the assessment of individual capacity of the patients' phagocytic cells.

**Keywords:** chronic lymphocytic leukaemia (CLL), PMN, Bispecific antibody (BsAb).

## РЕЗЮМЕ

### АДГЕЗИЯ КЛЕТОК ХРОНИЧЕСКОЙ ЛИМФОЦИТАРНОЙ ЛЕЙКЕМИИ ПОЛИМОРФНОЯДЕРНЫМИ НЕЙТРОФИЛАМИ, ОПОСРЕДОВАННАЯ БИСПЕЦИФИЧЕСКИМИ АНТИ-CD19/АНТИ-CD64 АНТИТЕЛАМИ

<sup>1</sup>Церцвадзе Т.Ш., <sup>1</sup>Мицкевич Н.Г.,  
<sup>2</sup>Датикашвили-Давид И.Г., <sup>3</sup>Гирдаладзе Д.М.,  
<sup>1,4</sup>Поракишвили Н.З.

<sup>1</sup>Тбилисский государственный университет им. Ив. Джавахишвили, кафедра иммунологии и микробиологии; <sup>2</sup>Гематологический центр им. М. Зоделава, Тбилиси; <sup>3</sup>Институт гематологии и трансфузиологии, Тбилиси, Грузия; <sup>4</sup>Вестминстерский университет, Лондон, Великобритания

Хроническая лимфоцитарная лейкемия (ХЛЛ) - наиболее распространенный тип лейкемии у взрослых в США и в Европе, включая Грузию. ХЛЛ представляет собой лимфопролиферативное заболевание, характеризующееся накоплением моноклональных CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> лимфоцитов в периферических лимфоидных органах и тканях и костном мозге. Эта лейкемия остается неизлечимой, хотя в настоящее время разработан целый ряд новых молекулярных и иммунных методов терапии ХЛЛ, которые, совместно с химио-терапией, составляют т.н. «точную терапию». Большинство иммунотерапевтических подходов основано на способности терапевтических антител мобилизовать спектр иммунных ответов. При лечении ХЛЛ также рассматривается применение биспецифических антител (БАТ), при этом фагоцитарные клетки выполняют основную функцию эффектора в процессе разрушения клеток-мишеней ХЛЛ. Анти-CD19/анти-CD64 биспецифические антитела связываются с рецепторами CD19 на поверхности клеток ХЛЛ и с рецепторами CD64 (Fc-гамма-рецептор 1/FcγRI) на моноцитах и активированных полиморфноядерных нейтрофилах (ПМН), тем самым стимулируя фагоцитоз лейкемических клеток.

Целью данного исследования явилась оценка способности анти-CD19/CD64 биспецифических антител стимулировать адгезию ХЛЛ клеток нейтрофилами, интактными, либо активированными цитокинами G-CSF и IFNγ.

ХЛЛ клетки, выделенные из периферической крови 16 пациентов с ХЛЛ, меченые красным флюоресцирующим красителем, были ко-инкубированы с аутологичными ПМН, интактными или предварительно стимулированными цитокинами G-CSF и/или IFNγ в течение 4 или 24 часов. Степень адгезии ПМН/ХЛЛ проанализирована с помощью проточного цитометра FACScan (Becton Dickinson).

Полученные данные показывают, что анти-CD19/CD64 биспецифические антитела имеют ограниченную возможность усиления адгезии нейтрофилами лейкемических клеток, что, по всей вероятности, следует объяснить значительной спонтанной способностью ПМН присоединять аутологичные клетки ХЛЛ.

Предварительная обработка цитокинами G-CSF и IFNγ полиморфноядерных нейтрофилов, полученных от пациентов с ХЛЛ, как вместе, так и по отдельности, не усилила адгезию лейкемических клеток. Более того, совместное применение G-CSF и IFNγ привело к снижению адгезивной способности ПМН.

Терапевтическое влияние анти-CD19/CD64 биспецифических антител на усиление адгезии лейкемических клеток нейтрофилами у пациентов с ХЛЛ, по всей вероятности, ограничено и его применение должно основываться на оценке индивидуального статуса ПМН пациентов.

რეზიუმე

ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემიის უჯრედების ადჰეზია აუტოლოგიური პოლიმორფულირთვიანი ნეიტროფილების მიერ გაშუალებული ბისპეციფიური anti-CD19/anti-CD64 ანტისხეულით

<sup>1</sup>თ.შ.ცერცვაძე, <sup>1</sup>ნ.მიცკევიჩი, <sup>2</sup>ი.დათიკაშვილი-დავიდ,  
<sup>3</sup>დ.დირდალაძე, <sup>4</sup>ნ.ფორაქიშვილი

<sup>1</sup>ივ. ჯავახიშვილის სახ. თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი, იმუნოლოგიისა და მიკრობიოლოგიის კათედრა; <sup>2</sup>მ. ზოდელავას ჰემატოლოგიის ცენტრი, თბილისი; <sup>3</sup>ჰემატოლოგიისა და ტრანსფუზიოლოგიის ინსტიტუტი, თბილისი, საქართველო; <sup>4</sup>ვესტმისტერის უნივერსიტეტი, ლონდონი, დიდი ბრიტანეთი

ქრონიკული ლიმფოციტური ლეიკემია (ქლლ) - ლეიკემიის ყველაზე გავრცელებული ფორმაა აშშ-სა და ევროპაში, საქართველოს ჩათვლით. ქლლ - ლიმფოპროლიფერაციული დაავადებაა, რომელიც ხასიათდება მონოკლონური CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> ლიმფოციტების დაგროვებით პერიფერიულ ლიმფურ ორგანოებში, სისხლსა და ძვლის ტვინში. ქლლ განუკურნებელი დაავადებაა, თუმცა დღეისათვის შემოთავაზებულია მოლეკულური და იმუნოთერაპიის თანამედროვე მეთოდები, რომლებიც, ქიმიოთერაპიასთან ერთად, ცნობილია ე.წ. „ზუსტი თერაპიის“ სახელით. იმუნოთერაპიული მიდგომების უმეტესობა ეფუძნება თერაპიული ანტისხეულების უნარს მოახდინოს იმუნური პასუხების ფართო სპექტრის მობილიზება. ქლლ მკურნალობისთვის ასევე განიხილება ბისპეციფიური ანტისხეულები (ბსას), რომელთა თანაობისას ფაგოციტური უჯრედები მნიშვნელოვან ეფექტურ როლს ასრულებენ სამიზნე ქლლ უჯრედების განადგურებაში. ანტი-CD19/ანტი-CD64 ბსას უკავშირდება CD19 რეცეპტორს ქლლ უჯრედებზე და CD64 რეცეპტორებს (FcγRI) მონოციტებსა და გააქტიურებულ ნეიტროფილებზე, რითაც იწვევს ლეიკემიური უჯრედების ფაგოციტოზს.

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა დაგვედგინა ანტი-CD64/ანტი-CD19 ბისპეციფიური ანტისხეულის უნარი გააძლიეროს ქლლ ლეიკემიური უჯრედების ადჰეზია G-CSF და IFNγ ციტოკინებით გააქტიურებული ან ინტაქტური პოლიმორფულირთვიანი ლეიკოციტების მიერ. 16 ავადმყოფის პერიფერული სასხლიდან გამოყოფილ ქლლ უჯრედებს ვლვადით წითელი ფლუორესცენტული საღებავით და ვაინკუბირებდით 4 ან 24 სთ განმავლობაში აუტოლოგიურ პოლიმორფულირთვიან ლეიკოციტებთან (პმნ), რომლებიც იყო ინტაქტური ან გასტიმულირებული G-CSF ან/და IFNγ-ით. პმნ/ქლლ უჯრედების ადჰეზიას ვსწავლობდით გამდინარე ციტომეტრის საშუალებით ნეიტროფილების ფანჯარაში.

მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ ანტი-CD64/ანტი-CD19 ბისპეციფიურ ანტისხეულებს გააჩნიათ აუტოლოგიური პოლიმორფულირთვიანი ნეიტრო-

ფილების მიერ ლეიკემიური უჯრედების მიერთების ინდუქციის შეზღუდული უნარი, რაც ნაწილობრივ აიხსნება ნეიტროფილების სპონტანური უნარით დაიკავშირონ აუტოლოგიური ქლლ უჯრედები. ქლლ ნეიტროფილების წინასწარმა დამუშავებამ G-CSF-ით ან/და IFN $\gamma$ -ით არ აძლიერებდა ლეიკემიური უჯრედების ადჰეზიას. უფრო მეტიც, G-CSF და IFN $\gamma$  ერთობლივმა ეფექტმა განაპირობა კმნ-ების ადჰეზიის

უნარის მნიშვნელოვანი დაქვეითება. როგორც ჩანს, ანტი-CD64/ანტი-CD19 ბისპეციფიური ანტი-სხეულების თერაპიული ეფექტი ქლლ ავადმყოფებში სისხლის ნეიტროფილების მიერ ლეიკემიური უჯრედების ადჰეზიის გაძლიერებაზე შეზღუდულია და მისი გამოყენება უნდა მიმდინარეობდეს პაციენტების ინდივიდუალური მგრძობელობის დადგენის საფუძველზე.

## НАРУШЕНИЕ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСА В ТКАНИ СЕЛЕЗЕНКИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Сорока Ю.В., Андрийчук И.Я., Лихацкий П.Г., Фира Л.С., Лисничук Н.Е.

*Тернопольский национальный медицинский университет им. И.Я. Горбачевского МЗ Украины, Украина*

Проблема злокачественного роста является одной из актуальных в медицине и биологии. Несмотря на успехи в изучении причин и особенностей онкозаболеваний, частота и смертность от них продолжает расти [2]. Искусственно индуцированные с помощью определенных канцерогенов опухоли у лабораторных животных создают возможность для исследования различных аспектов канцерогенеза, которые не могут быть эффективно изучены непосредственно на человеческом организме. Одной из них является диметилгидразиновая модель. Она является эффективным инструментом для исследования патогенетических особенностей развития канцерогенеза [20].

Одним из универсальных механизмов жизнедеятельности клеток и процессов, происходящих в межклеточном пространстве, является образование свободных радикалов (СР). Процессы свободнорадикального окисления (СРО) следует рассматривать как необходимое метаболическое звено в окислительном фосфорилировании, биосинтезе простагландинов и нуклеиновых кислот, в иммунных реакциях [5,6,9]. На сегодня учеными выявлена прямая связь между онкологическими заболеваниями и СРО. Процессы СРО, которые вышли из-под контроля антиоксидантной защиты, могут быть причиной стремительного развития канцерогенеза [8,10,11].

Известно, что СР образуются в результате перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот с регулированием физических свойств биологических мембран. С другой стороны, СРО является универсальным патофизиологическим феноменом при многих патологических состояниях, в частности при развитии опухолей [16].

Значительную роль в регуляции перекисного окисления липидов (ПОЛ) играют ингибиторы свободнорадикальных реакций - антиоксиданты. Антиоксидантная система (АОС) обеспечивает адаптационную устойчивость организма в целом и регулирует реакции ПОЛ благодаря функционированию системы ферментативных и неферментативных механизмов контроля за содержанием активных форм кислорода, свободных радикалов и продуктов ПОЛ. Нарушения в этой системе приводят к развитию различных патологий, обусловленных окислением в липидах клеток полиненасыщенных жирных кислот активными формами кислорода [18,19].

Высокий уровень антиоксидантов в тканях опухоли способствует их пролиферативной активности. В условиях злокачественного роста опухоль интенсивно накапливает биоантиоксиданты из крови, обеспечивая тем самым условия для дальнейшей опухолевой прогрессии и роста. При этом ресурсы физиологической АОС истощаются, противоопухолевая реактивность организма снижается, что является предпосылкой для дальнейшего опухолевого роста [4,13,15].

В доступной для анализа научной литературе практически отсутствуют сведения об изменениях селезенки, как знакомого иммунокомпетентного органа, в динамике развития опухолевых процессов.

Учитывая вышеизложенное, целью исследования явилось изучение проантиоксидантного гомеостаза в ткани селезенки белых крыс в динамике экспериментально индуцированного канцерогенеза.

**Материал и методы.** Экспериментальное исследование выполнено на 96 половозрелых беспородных белых крысах-самцах с массой тела  $175,0 \pm 4,2$  г, которые содержались в стандартных условиях вивария. Все манипуляции с экспериментальными животными осуществляли с соблюдением положений «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и других научных целей», а также согласно «Научно-практических рекомендаций по содержанию лабораторных животных и работы с ними» [12,14].

Подопытные животные разделены на следующие группы: контрольная – 12 особей; экспериментальная группа животных с смоделированным индуцированным канцерогенезом – 84 особи. Животных экспериментальной группы выводили из эксперимента через каждые 30 суток по 12 особей.

Индукцированный канцерогенез моделировали путем введения диметилгидразина дигидрохлорида (ДМГ) (Sigma-Aldrich Chemie, Япония серия D161802), предварительно разведенного физиологическим раствором натрия хлорида. Канцероген вводили подкожно в межлопаточную область тела животного в дозе 7,2 мг/кг (в расчете на действующее вещество) 1 раз в неделю в течение 30 недель [17].

Экспериментальное моделирование и забор селезенки для исследования осуществляли в одно время суток (10.00-12.00 ч) в специальном помещении при температуре воздуха 18-20°C.