



პანკრეასის კიბოს პერინერვული ინვაზიის თავისებურებანი

(სადისერტაციო კვლევის ძირითადი შედეგები)

ივანე აბიათარი

2009 წელი

*თბილისის ივანე ჯავახიშვილის სახელობის სახელმწიფო უნივერსიტეტის, მედიცინის
ფაკულტეტისა და*

მიუნხენის ტექნიკური უნივერსიტეტის, „კლინიკუმ რეხტს დერ იზარ“-ის

ერთობლივი სადოქტორო პროგრამა

ხელმძღვანელები:

პროფ. მერაბ კილაძე

პროფ. იორგ კლეფი

აქტუალობა

პანკრეასის დუქტალური ადენოკარცინომის (პდა) შემთხვევითობა თითქმის უტოლდება ამ დაავადებით გამოწვეული სიკვდილიანობის რაოდენობას, რაც თავისთავად ხაზს უსვამს იმ ფაქტს რომ, პანკრეასის კიბოს აქვს ერთ-ერთი უარესი პროგნოზი სხვა ავთვისებიან დაავადებათა შორის [1]. მოლეკულური ბიოლოგიის მიღწევებმა ბევრად გასაგები გახადა პანკრეასის სიმსივნის პათოფიზიოლოგიური თავისებურებანი. ონკოგენური მუტაციები ისეთი როგორიცაა *K-ras* გენი, სიმსივნის სუპრესორული გენების მუტაციები როგორიცაა: *p53*, *p15* და *Smad4* გენები, აპოპტოზთან დაკავშირებული გენების დარღვეული ექსპრესია, მეტასტაზების სუპრესორული გენების დაუნ-რეგულაცია და მიტოგენური ზრდის ფაქტორებისა და მათი რეცეპტორების ჰიპერ-ექსპრესია მიეკუთვნება იმ ძირითად დარღვევებს რომელთაც ადგილი აქვთ ავთვისებიანი სიმსივნის ჩამოყალიბების პროცესში [2].

პდა ხასიათდება ხშირი სტრომალური კომპონენტის არსებობით (დესმოპლაზია), პერინერვული ინვაზიით (პნი) და ლიმფური კვანძებისა და ღვიძლის ადრეული მეტასტაზირებით [3]. სისტემურ გავრცელებასთან ერთად პნი არის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი ინდიკატორი დაავადების ცუდი პროგნოზისა [4-6]. პნი არის სპეციფიკური გზა პდა-ის სიმსივნური უჯრედების გავრცელებისა. მიუხედავად იმისა რომ ეს ფენომენი აგრეთვე აღმოჩენილი იქნა სხვა სიმსივნური დაავადებების დროსაც, პნი მაინც უფრო ხშირად გვხვდება და უფრო მეტად აქტუალურია პანკრეასის კიბოს დროს [7, 8]. სიმსივნური უჯრედების პირველადი ინფილტრაცია რეტროპერიტონეალურ ნერვულ წნულში [9] და ნერვების გასწვრივ, ხელს უშლის რადიკალურ რეზექციას [10] და ითვლება რეზექციის შემდგომი ლოკალური რეციდივის მთავარ მიზეზად. შესაბამისად პნი-ის მოლეკულური მექანიზმების ამოცნობას ენიჭება უდიდესი მნიშვნელობა ქირურგიული და ონკოლოგიური თერაპიისათვის.

ამ ნაშრომში ჩვენ შევიმუშავეთ ახალი მეთოდი პნი-ის მონიტორინგისა *ex-vivo*, რომლის მეშვეობითაც მოხერხდა ძლიერ ნერვ-ინვაზიური პანკრეასის კიბოს უჯრედების კლონირება. გენომის ფართო, ექსპრესიული ანალიზის მეშვეობით, ძლიერ-ინვაზიური კლონებისა მცირედ-ინვაზიური კლონების წინააღმდეგ, დადგინდა გენების ტრანსკრიპციული პროფილი. შედეგად ამ ექსპერიმენტით გამოვლენილი ფაქტორებიდან რამოდენიმეს ჩაუტარდა შემდგომი დეტალური ანალიზი.

მასალა და მეთოდები

უჯრედული კულტურა

Panc-1, Colo357 და T3M4 პანკრეასის კიბოს უჯრედები კულტივირებული იქნა RPMI მედიუმში, 10% იანი ფეტალური ხბოს შრატისა, 100 ერთ./მლ პენიცილინთან და 100 მკგ/მლ სტრეპტომიცინთან ერთად. უჯრედები იზრდებოდნენ 37°C ტემპერატურაზე ტენიან ინკუბატორში 5% იანი CO₂ ისა და 95% იანი ატმოსფერული ჰაერის გარემოში.

ნერვ-ინვაზიური უჯრედული კლონების სელექცია

დაახლოებით 5 მმ ზომის ვირთაგვას სტერილურად რეზეცირებული ვაგუსის ცერვიკალური ნაწილი მოთავსებულ იქნა სპეციალურად დამზადებულ ინვაზიურ კამერაში, მის ფსკერზე არსებული 0.7 მმ ზომის ნახვრეტის გავლით. კამერა მოთავსდა პეტრის ფინჯანზე რომელიც შეიცავდა სტანდარტულ უჯრედულ მედიუმს. პდა-ის უჯრედული ხაზები ტრიპსინირებულ და რესუსპენდირებულ იქნა კულტურულ მედიუმში და ეს უჯრედული სუსპენზია (2×10^6 უჯრედი) მოთავსდა კამერაში. ამ მეთოდით პანკრეასის კიბოს უჯრედებს შეეძლოთ ჩაზრდა ნერვში და მისი გავლით გამოსვლა პეტრის ფინჯანში.

მას შემდეგ რაც ერთეული უჯრედები შენიშნულ იქნა ფინჯანში (2-3 კვირა), კამერა მოშორებულ იქნა ფინჯანიდან და ჩატარდა ამ უჯრედების მომრავლება. ეს მთლიანი პროცედურა განმეორდა სამჯერ სამი უჯრედული ხაზის გამოყენებით (Panc-1, Colo357, T3M4), შესაბამისად მივიღეთ სამი ნერვ-ინვაზიური პანკრეასის კიბოს უჯრედული პასაჟი / კლონი (0 – ველური ტიპი; 1, 2, 3, ნერვ-ინვაზიური კლონი). იმისათვის რომ თავიდან აგვეცილებინა „ფსევდო-კლონირება“ (უჯრედების გადასვლა ფინჯანზე ნერვული ინვაზიის გარეშე) უჯრედული მედიუმის დონე კამერაში (medium 1) დაყენებულ იქნა ფინჯანზე არსებული მედიუმის დონეზე მაღლა (medium 2) და ეს შეფარდება გაკონტროლებული იქნა მთელი ექსპერიმენტის მანძილზე რათა გამოგვერიცხა კამერიდან მედიუმ/უჯრედების სუსპენზიის გაჟონვა (სურათი 1). აგრეთვე, უჯრედების ყოველი პასაჟის შემდეგ ნერვი ფიქსირდებოდა ფორმალინში და

ყალიბდებოდა პარაფინში ინვაზიური უჯრედების იმუნოჰისტოქიმიური ვიზუალიზაციის მიზნით (სურათი 2A). იგივე ზომის ვირთაგვას მყესი გამოყენებულ იქნა საკონტროლო ჯგუფში.

იმუნოჰისტოქიმია

პარაფინში ჩაყალიბებული ნერვები და ადამიანის პანკრეასის ქსოვილის ანათლები (3 მკმ სისქის) დამუშავდა იმუნოჰისტოქიმიური შედეგების მეთოდით [11]. ანათლები დეპარაფინირებულ იქნა როტიკლევარით და რეჰიდრატირებულ იქნა პროგრესულად დაღმავალი კონცენტრაციის ალკოჰოლში. ანტიგენის გამოსხნა ხდებოდა ციტრატ ბუფერში 15 წუთიანი დუღილის მეშვეობით. ენდოგენური პეროქსიდაზას აქტივობის ჩახშობა ხდებოდა 3% - იანი წყალბადის პეროქსიდის მეთანოლიანი ხსნარის გამოყენებით. პირველად ანტისხეულებთან ინკუბაციის ხანგრძლივობა შეადგენდა 1 დამეს 4°C. მეორადი ანტისხეულები გამოყენებულ იქნა 30 წუთის ხანგრძლივობით ოთახის ტემპერატურაზე. საკონტროლო ჯგუფში ანათლები ინკუბირებულ იქნა საკონტროლო იმუნოგლობულინებთან და არა სპეციფიურ ანტისხეულებთან. მინების ვიზუალიზაცია ჩატარდა „აქსიოპლან 2“ სინათლის მიკროსკოპის მეშვეობით.

ფუნქციური ექსპერიმენტები

უჯრედების ინვაზიური ანალიზი ჩატარდა 8 მკმ ზომის პორებიანი „მატრიჯელის ინვაზიური კამერების“ მეშვეობით [12].

უჯრედების პროლიფერაციული აქტივობა განსაზღვრულ იქნა 3-(4,5-მეთილთიაზოლ-2-ილ) -2,5- დიფენილტეტრაზოლიუმ ბრომიდის (მტტ) კოლორიმეტრული ზრდის ანალიზის გამოყენებით [13].

ანოიკის ანალიზი შესრულდა 12 განყოფილებიან უჯრედულ თეფშებზე რომელიც დაფარული იყო პოლიჰიდროქსიეთილმეთაკრილატ (პოლიჰემა) / ალკოჰოლის 20 მგ/მლ კონცენტრაციის ხსნარით. „ფაქს“ ანალიზი გამოყენებულ იქნა აპოპტოზური უჯრედების გამოსავლენად [14].

გენების ექსპრესიული პროფილი

გენომის ფართო ექსპრესიის მონახაზი შესრულებულ იქნა 51K Human Unigene III c-DNA მიკრო-ერეის გამოყენებით [15]. ერეის მონაცემები და ჯაჭვური ანალიზი განხორციელებულ იქნა TableButler software package - ის მეშვეობით [15]. სტატისტიკური ანალიზი განხორციელდა SUMO software package – ის დახმარებით (<http://www.MolecularOncology.de>).

ქვანტიტატიური პოლიმერაზას ჯაჭვური რეაქცია (QRT-PCR)

ყველა გამოყენებული რეაგენტი მოწოდებული იქნა Roche Applied Science-ის მიერ. ინფორმაციული რნმ-ი იზოლირებული და ცდნმ სინთეზირებული იქნა RT-PCR synthesis kit-ის მეშვეობით მწარმოებლის ინსტრუქციის შესაბამიად. სპეციფიკური ტრანსკრიპტების რაოდენობის ნორმალიზება ხდებოდა საკონტროლო ციკლოფილინ B –სთან მიმართებაში. ნერვული ინვაზიის ანალიზისას მონაცემების ნორმალიზება ხდებოდა ვირთაგვას GAPDH –თან მიმართებაში.

ქსოვილების მოპოვება

პანკრეასის ქსოვილების ნიმუშების შეგროვება ხდებოდა იმ პაციენტებიდან რომლებსაც ჩაუტარდათ პანკრეასის სხვადასხვა სახის რეზექცია ან ორგანოთა დონორული პროგრამის მონაწილე ჯანმრთელი ადამიანებისაგან. ყველა კვლევა ნებადართული იყო გერმანიის ფედერაციის, ჰეიდელბერგისა და მიუნხენის ტექნიკური უნივერსიტეტების The Human Subjects Committee –ის მიერ. წერილობითი თანხმობა იქნა მიღებული თითოეული პაციენტისაგან.

რნმ-ის ტრანსფექცია

დროებითი ტრანსფექციისათვის სხვადასხვა სი-რნმ-ის მოლეკულა იქნა გამოყენებული 5 მკგ. კონცენტრაციით. RNAi-Fect –ი გამოყენებული იქნა როგორც ტრანსფექციის რეაგენტი [12]. ფუნქციონალური ექსპერიმენტები ჩატარდა ტრანსფექციიდან 48 საათში.

იმუნობლოტინგი

ცილების ექსპრესიის დადგენა ხდებოდა იმუნობლოტინგის მეთოდის მეშვეობით რომლისთვისაც გამოიყენებოდა სპეციფიური ანტისხეულები [14]. დენსიტომეტრული ანალიზი ბლოტებისა ხდებოდა ImageJ software –ის მეშვეობით.

იმუნოფლუორესცენცია

ფორმალინში ფიქსირების და 3% BSA/PBS –ით ბლოკირების მერე უჯრედების ინკუბირება ხდებოდა პირველად ანტისხეულებთან. მეორადი ანტისხეულები მონიშნული იყო სხვადასხვა ფერის ფლუორესცენციული სუბსტრატით. მიკროსკოპული ანალიზი ჩატარდა Leica-ს ფლუორესცენტრული მიკროსკოპის მეშვეობით [16].

სტატისტიკური ანალიზი

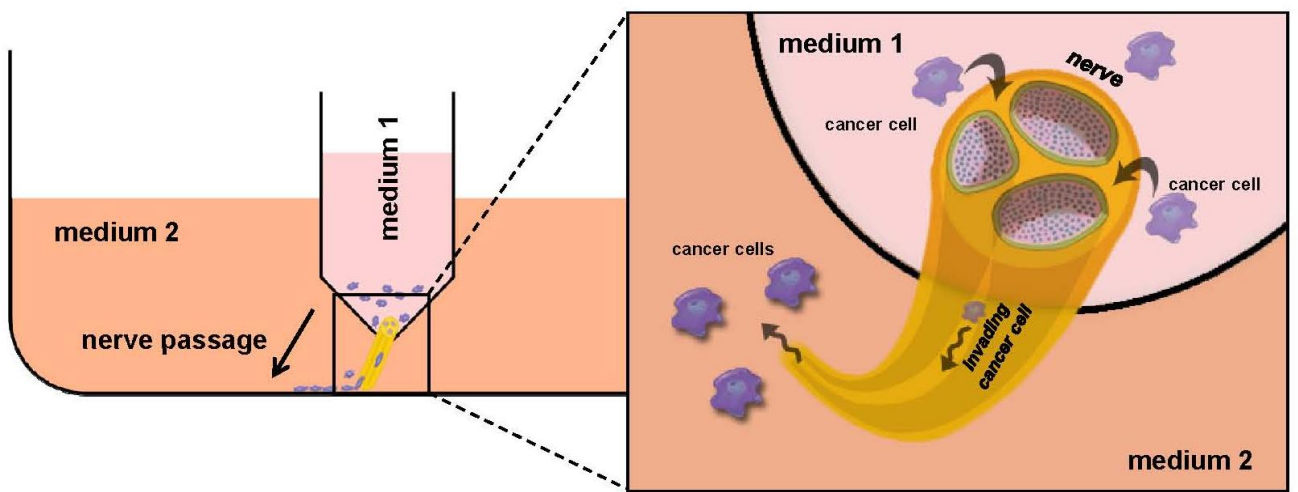
რეზულტატები გამოსახულია საშუალო \pm საშუალო სტანდარტული ცდომილება. სტატისტიკური ანალიზისათვის არა-პარამეტრული მან-ვიტნის უ ტესტი იქნა გამოყენებული. მნიშვნელოვნობა განისაზღვრა როგორც $p < 0.05$.

შედეგები

პანკრეასის კიბოს უჯრედების, ნერვ-ინვაზიური კლონირება

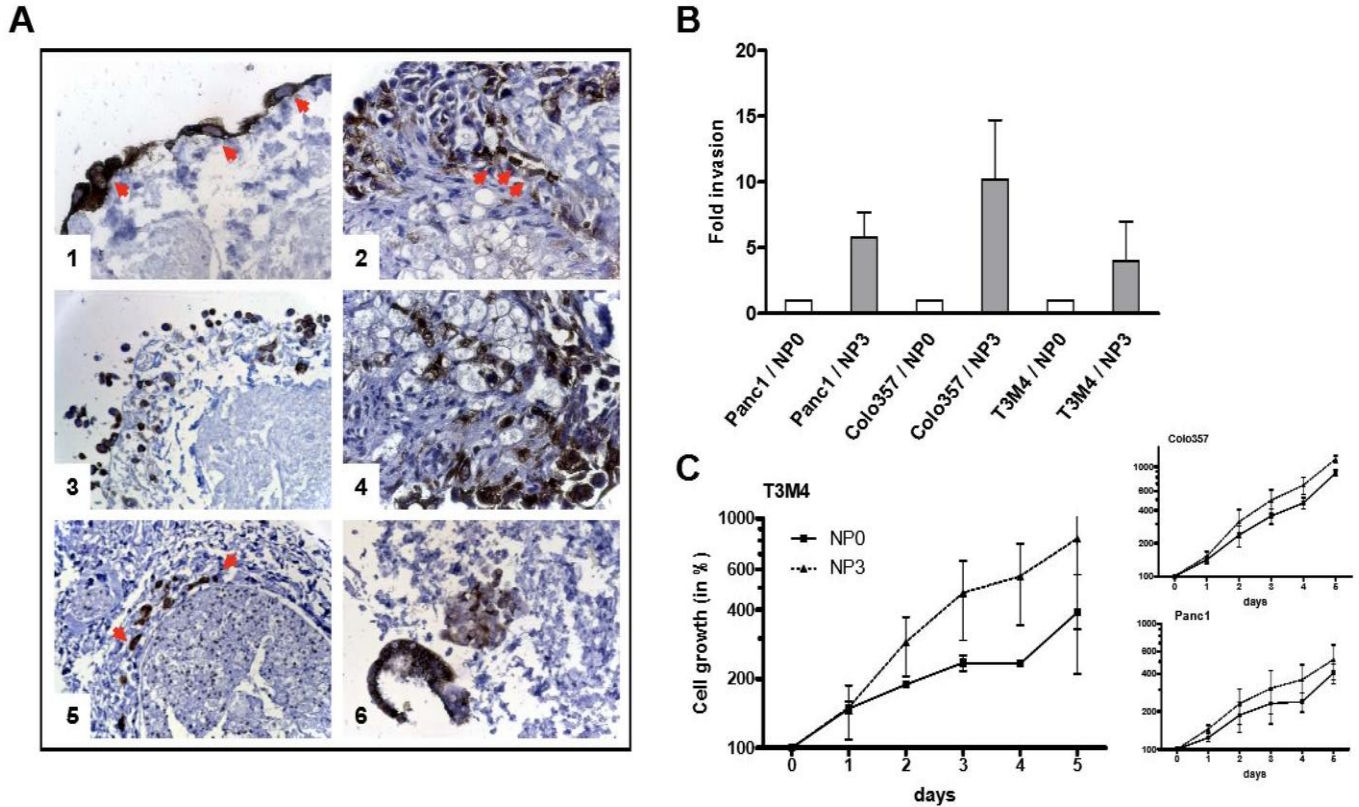
იმისათვის რომ მიგველო პანკრეასის კიბოს ნერვ-ინვაზიური უჯრედები, შემუშავებულ იქნა ნერვ-ინვაზიური მოდელი ვირთაგვას ვაგალური ნერვისა და პანკრეასის კიბოს უჯრედების გამოყენებით (სურათი 1). სამი ნერვ-ინვაზიური კლონი იქნა მიღებული (NP1, NP2, NP3) Panc-1, Colo357 და T3M4 –პანკრეასის კიბოს უჯრედების პასაჟით როგორც აღწერილია მასალა და მეთოდების ნაწილში [17]. უჯრედული პასაჟის დრო ნერვების გავლით თანდათანობით შემცირდა პირველიდან მესამე პასაჟამდე (დაახლოებით 25 დან 12 დღემდე), რაც მიუთითებს კლონების გაზრდილ პერინერვულ ინვაზიურობას. იმუნოჰისტოქიმიურმა შედეგებამ გამოავლინა კიბოს უჯრედების პერინერვული კავშირი (სურათი 2A). არავითარი პასაჟი თუ ინვაზია არ იქნა ნანახი საკონტროლო (მყესი) ჯგუფში.

ნერვ-ინვაზიური კლონების მიღების შემდეგ ჩატარდა ამ უჯრედების ველურ ტიპთან (NP0) ბაზალურ-ინვაზიური შედარებითი ანალიზი. ექსპერიმენტმა უჩვენა 4.0 - 10.2 ჯერ მომატებული ინვაზიური აქტივობა NP3 უჯრედებისა, NP0–თან შედარებით (სურათი 2B). იგივე უჯრედების ბაზალური უჯრედული ზრდის შედარებისას დადგინდა მომატებული T3M4 უჯრედების “გაორმაგების დრო” (doubling time) NP3 კლონისა (1.4 ± 0.4 დღე) NP0 უჯრედებთან შედარებით (2.5 ± 0.4 დღე; $p < 0.05$). მისგან საპირისპიროდ Colo357 და Panc-1 NP3 უჯრედების “გაორმაგების დრო” არ იყო მნიშვნელოვნად განსხვავებული NP0–თან შედარებით (სურათი 2C).



სურათი 1

სქემატური დემონსტრირება შემუშავებული პერინერული ინვაზიის მოდელისა ვირთაგვას ვაგალური ნერვებისა და პანკრეასის კიბოს უჯრედული საზების გამოყენებით.



სურათი 2

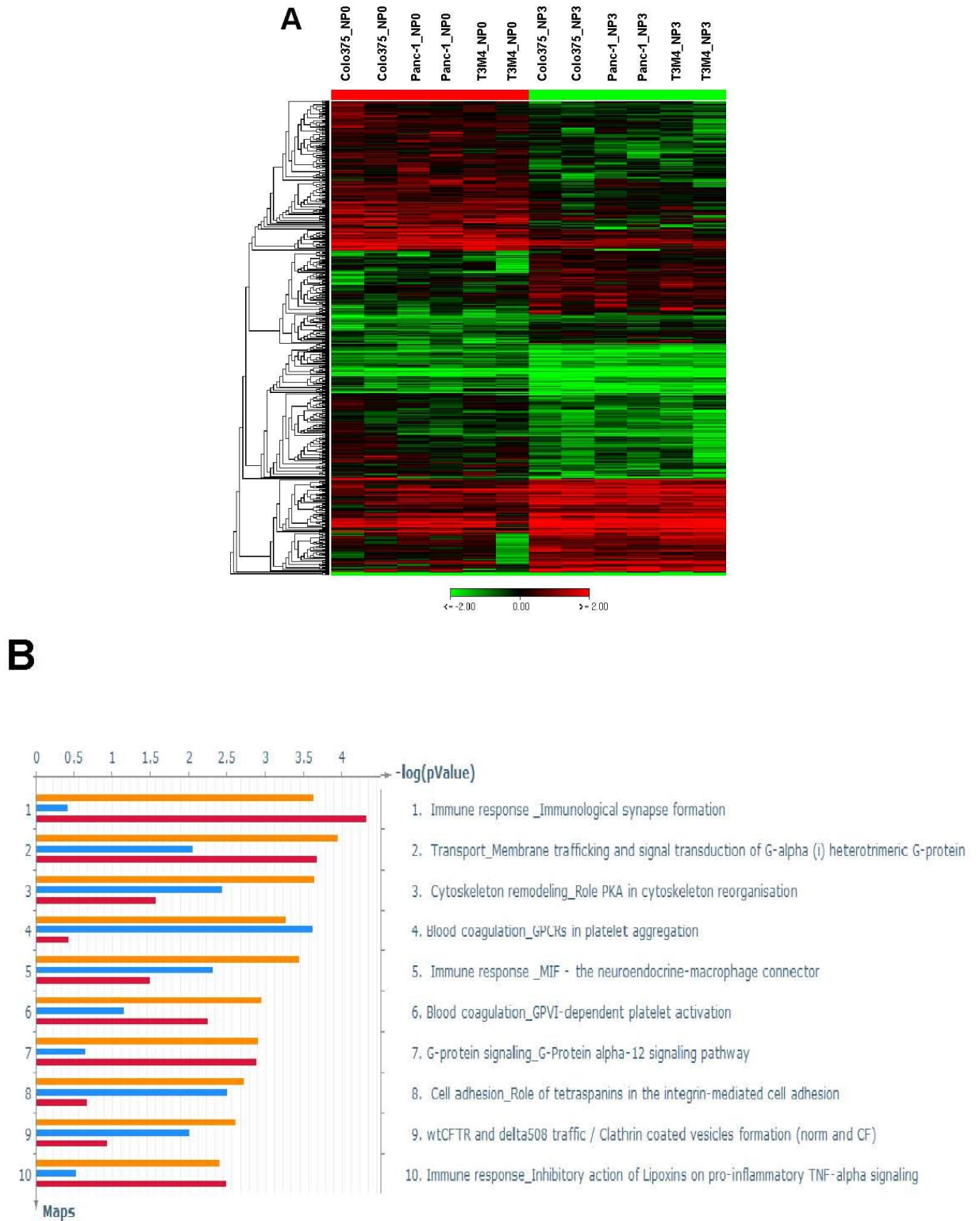
(A) ვირთაგვას პერინერვულ სივრცეში / ნერვში ჩაზრდილი პანკრეასის კიბოს უჯრედების იმუნოჰისტოქიმიური შედეგვა (ყავისფერი). (B) ბაზალურ-ინვაზიური შედარებითი ანალიზი NP0 და NP3 პანკრეასის უჯრედებისა. (C) MTT პროლიფერაციული შედარებითი ანალიზი NP0 და NP3 უჯრედებისა. ყველა ექსპერიმენტი გამეორებულია სამჯერ.

ნერვული ინვაზიის ტრანსკრიპციული ხელწერა

იმისათვის რომ დაგვეხასიათებინა პანკრეასის სიმსივნის ნერვული ინვაზიურობის მოლეკულური მექანიზმები ტრანსკრიპციულ დონეზე, გენომის ფართო ექსპრესიის პროფილი იქნა შემუშავებული ცდნმ-ის ერეის მეთოდით. შედეგად ტრანსკრიპციული მონაცემები წარმოქმნილ იქნა სამი ნერვ-ინვაზიური კლონის ექსპრესიის გენების არა ნერვ-ინვაზიურ უჯრედების გენებთან შედარების შედეგად. 680 სხვადასხვა, განსხვავებული ექსპრესიის ტრანსკრიპტი იქნა აღმოჩენილი NP3 უჯრედების NP0 თან შედარებისას (სურათი 3A). 45 გამორჩეულად შეფარდებული გენი იქნა შერჩეული ჩვენს მიერ რომლებიც წარმოდგენილია №1 ცხრილში. აგრეთვე ჩვენს მიერ ჩატარდა ფუნქციური ანალიზი ნერვული ინვაზიისა. შესაბამისად პანკრეასის კიბოს ნერვული ინვაზიის დროს შესამჩნევად დარღვეული 10 ფუნქციური პროცესი იქნა შერჩეული ამ ანალიზის შედეგად (სურათი 3B). სიმსივნური უჯრედების პასაჟმა ნერვულ ქსოვილში გამოიწვია მნიშვნელოვანი ცვლილებები ისეთი გენური ონტოლოგიური პროცესებისა როგორცაა: იმუნური პასუხი, ტრანსპორტი, მემბრანის ტრეფიკინგი და სიგნალური ტრანსდუქცია, ციტოსკელეტარული რეორგანიზაცია და უჯრედული მოძრაობა, სისხლის კოაგულაცია, უჯრედული ადჰეზია და სხვა (სურათი 3B). სხვადასხვა მნიშვნელოვნად შეცვლილი ექსპრესიის მქონე და ამ დარღვეული უჯრედული პროცესების მონაწილე გენები იქნა შერჩეული ჩვენს მიერ შემდგომი ანალიზისათვის.

KIF14 და ARHGDI β -ის ექსპრესიის განსაზღვრა პანკრეასის კიბოს ნერვულ-ინვაზიაში

რადგანაც KIF14 და ARHGDI β აღმოჩნდნენ ნერვული-ინვაზიის სპეციფიური გენები, ჩავატარეთ მათი ექსპრესიის ანალიზი ყველა ნერვ-ინვაზიურ კლონში პანკრეასის სიმსივნის უჯრედებისა. KIF14 –ის დაუნ-რეგულაცია (სურათი 4A) და ARHGDI β –ის აფ-რეგულაცია (სურათი 4B), იყო მნიშვნელოვნად გამოხატული ყველა პანკრეასის კიბოს უჯრედის ნერვ-ინვაზიურ კლონში რამაც დაადასტურა ჩვენი გენური მიკრო ერეის შედეგები. მიუხედავად იმისა რომ ეს ცვლილება არ იყო სტატისტიკურად მნიშვნელოვანი, ტენდენცია იყო აშკარად გამოხატული (სურათი 4AB). KIF14 –ის დაუნ-რეგულაცია და ARHGDI β –ის აფ-რეგულაცია ასევე შესამჩნევი იყო ცილების ექსპრესიის დონეზე (სურათი 4AB ქვედა პანელი).

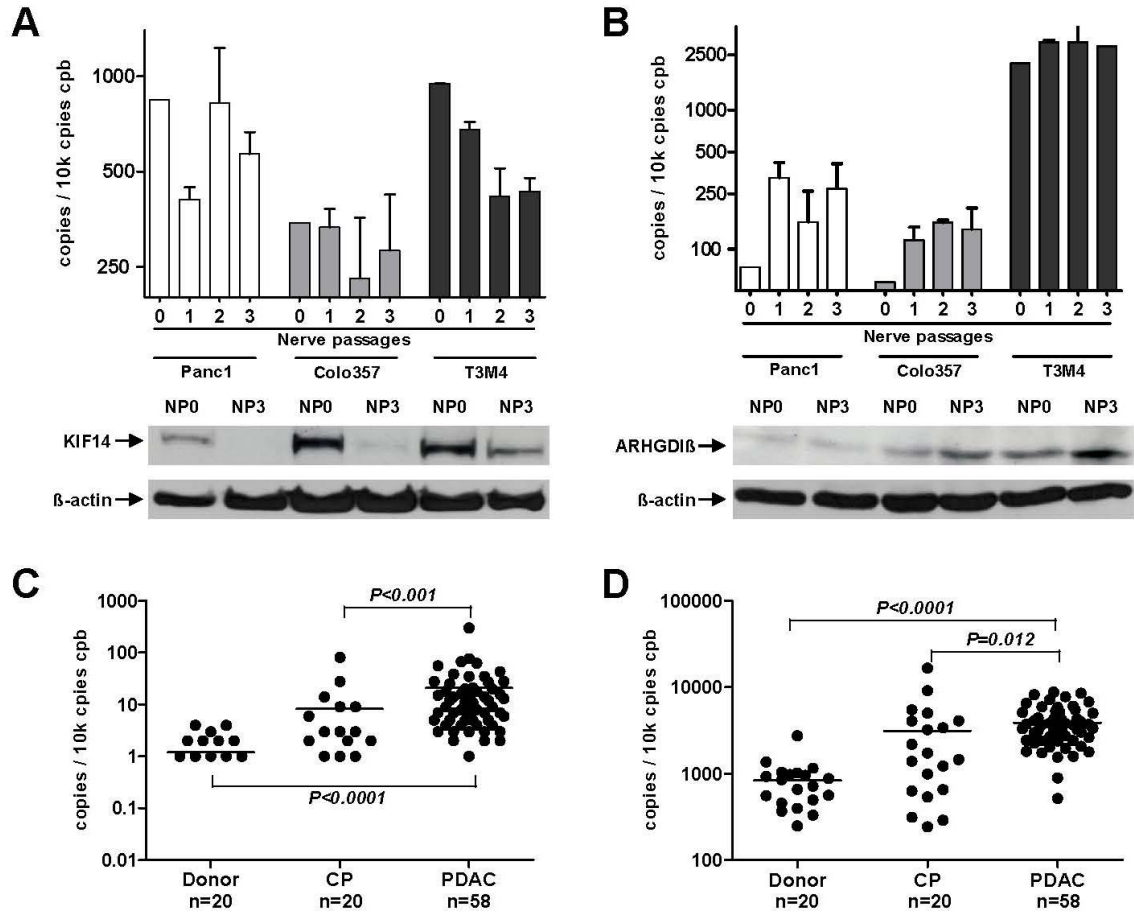


სურათი 3

ნერვული ინვაზიის ტრანსკრიპციული ხელწერა

Gene name	Gene description	RefSeq	Difference NP0-NP3 (L)
KIF14	<i>Homo sapiens</i> KIF14 mRNA	XM_375825	-9.48
SFRS1	<i>H. sapiens</i> hypothetical gene supported by AK126318 mRNA	XM_375475	-8.68
FLJ34443	<i>H. sapiens</i> hypothetical protein FLJ34443 mRNA	NM_175918	-7.81
ADSSL1	<i>H. sapiens</i> adenylosuccinate synthase-like 1, transcript variant 2, mRNA	NM_152328	-7.46
UNC84A	<i>H. sapiens</i> unc-84 homolog A (<i>Caenorhabditis elegans</i>) mRNA	XM_379766	-6.91
EPS8L2	<i>H. sapiens</i> EPS8-like 2mRNA	NM_022772	-6.87
LOC399959	<i>H. sapiens</i> hypothetical gene supported by BX647608 mRNA	XM_378316	-6.84
YPEL5	<i>H. sapiens</i> yippee protein (CGI-127), mRNA	NM_016061	-5.86
GSTZ1	<i>H. sapiens</i> glutathione transferase ζ1 (maleylacetoacetate isomerase)	NM_145870	-4.81
GNRH1	<i>H. sapiens</i> gonadotropin-releasing hormone 1 (luteinizing-releasing hormone)	NM_000825	-4.75
YPEL1	<i>H. sapiens</i> yippee-like 1 (<i>Drosophila</i>) mRNA	NM_013313	-4.69
YTHDC2	<i>H. sapiens</i> FLJ21940 protein mRNA	NM_022828	-4.38
CLK1	<i>H. sapiens</i> CDC-like kinase 1 mRNA	NM_004071	-4.27
LOC442546	<i>H. sapiens</i> similar to GTF2I repeat domain-containing 1 isoform 2	XM_380014	-4.09
SUMF1	<i>H. sapiens</i> sulfatase modifying factor 1 mRNA	NM_182760	-4.06
RBAF600	<i>H. sapiens</i> retinoblastoma-associated factor 600 mRNA	NM_020765	-3.82
CDH19	<i>H. sapiens</i> cadherin 19, type 2 mRNA	NM_021153	-3.61
KIAA1856	<i>H. sapiens</i> KIAA 1856 protein mRNA	XM_379774	-3.55
COX7C	<i>H. sapiens</i> cytochrome c oxidase subunit VIIc nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_001867	-3.26
PMP22	<i>H. sapiens</i> peripheral myelin protein 22 transcript variant 3 mRNA	NM_153322	-3.03
CAT	<i>H. sapiens</i> catalase mRNA	NM_001752	-2.99
LSM3	<i>H. sapiens</i> LSM3 homologue, U6 small nuclear RNA associated (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) mRNA	NM_014463	2.42
NARG2	<i>H. sapiens</i> NMDA receptor-regulated gene 2 mRNA	NM_024611	2.6
SETMAR	<i>H. sapiens</i> SET domain and mariner transposase fusion gene mRNA	NM_006515	2.64
PREI3	<i>H. sapiens</i> preimplantation protein 3, transcript variant 2 mRNA	NM_199482	3.04
PCBP1	<i>H. sapiens</i> poly(rC) binding protein 1 mRNA	NM_006196	3.05
ITIH4	<i>H. sapiens</i> inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma kallikrein-sensitive glycoprotein)	NM_002218	3.38
ARF4	<i>H. sapiens</i> ADP-ribosylation factor 4 mRNA	NM_001660	4.11
DKFZP434O047	<i>H. sapiens</i> DKFZP434O047 protein mRNA	NM_015598	4.49
ADK	<i>H. sapiens</i> adenosine kinase transcript variant ADK-long mRNA	NM_006721	4.53
LOC126669	<i>H. sapiens</i> hypothetical protein mRNA	XM_375809	4.64
PDCD11	<i>H. sapiens</i> programmed cell death 11 mRNA	XM_374829	4.78
BRMS1	<i>H. sapiens</i> breast cancer metastasis suppressor 1 mRNA	NM_015399	5.13
SRPRB	<i>H. sapiens</i> signal recognition particle receptor B subunit mRNA	NM_021203	5.16
PME-1	<i>H. sapiens</i> protein phosphatase methylesterase-1 mRNA	NM_016147	5.84
NUDT5	<i>H. sapiens</i> nudix (nucleoside diphosphate-linked moiety X)-type motif 5 mRNA	NM_014142	6.15
DERL2	<i>H. sapiens</i> carcinoma-related gene (F-LANA), mRNA	NM_016041	6.19
WDR12	<i>H. sapiens</i> WD repeat domain 12 mRNA	NM_018256	6.45
MGC3130	<i>H. sapiens</i> hypothetical protein MGC3130 mRNA	NM_024032	6.71
WDR36	<i>H. sapiens</i> T-cell activation WD repeat protein mRNA	NM_139281	6.85
CSF1R	<i>H. sapiens</i> colony stimulating factor 1 receptor	NM_005211	7.02
TRIP13	<i>H. sapiens</i> thyroid hormone receptor interactor 13 mRNA	NM_004237	7.51
KIAA1715	<i>H. sapiens</i> KIAA1715 mRNA	NM_030650	8.09
MAPRE2	<i>H. sapiens</i> microtubule-associated protein RP/EB family, member 2 mRNA	NM_014268	8.68
DKFZp564J157	<i>H. sapiens</i> DKFZp564J157 protein mRNA	NM_018457	12.07

ცხრილი №1



სურათი 4

KIF14-ის (A) და ARHGDIβ-ის (B) რნმ-ისა და ცილის ექსპრესია ნერვულ კლონებში QRT-PCR-ისა და იმუნობლოტ ანალიზის (ქვედა პანელი) გამოყენებით. KIF14-ის (C) და ARHGDIβ-ის (D) რნმ-ის ექსპრესია ნორმალურ პანკრეასის ქსოვილში (n=20), ქრონიკულ პანკრეატიტში (n=20) და პდა-ის ქსოვილში (n=58) QRT-PCR-ის გამოყენებით. პორიზონტალური ხაზებით აღნიშნულია საშუალო ექსპრესიის დონე.

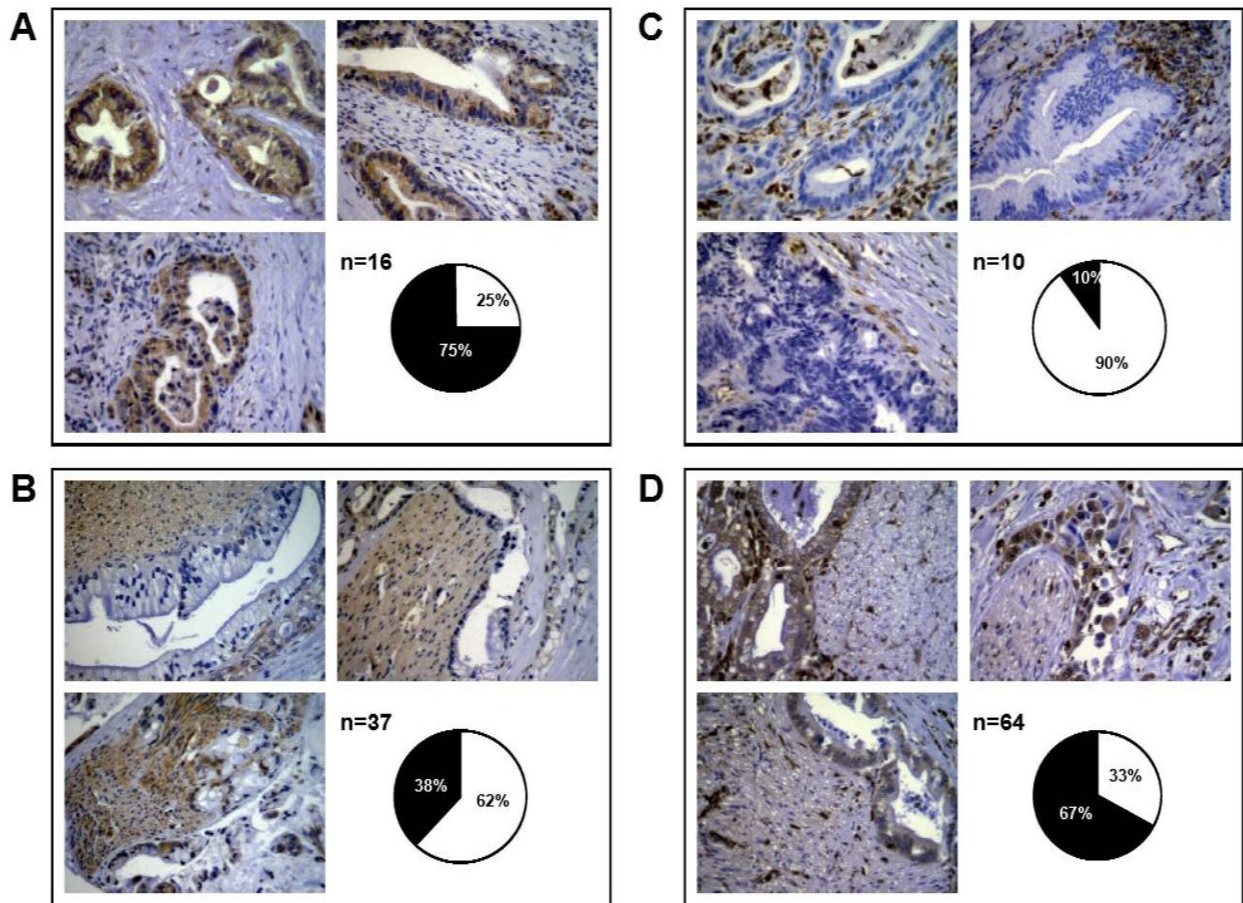
შემდგომ ჩვენ მოვახდინეთ KIF14-ის და ARHGDI β -ის ექსპრესიის დადგენა პანკრეასის ნორმალურ თუ დაავადებულ ქსოვილებში. ექსპერიმენტმა გვიჩვენა ორივე, KIF14-ის და ARHGDI β -ის მნიშვნელოვნად მომატებული რნმ-ის რაოდენობა ქრონიკული პანკრეატიტისა და პანკრეასის კიბოს ქსოვილში (სურათი 4CD).

ჩვენ აგრეთვე გამოვიკვლიეთ KIF14-ის ექსპრესია და ლოკალიზაცია ნერვული ინვაზიის არსებობისას პანკრეასის ქსოვილებში. KIF14-ი მნიშვნელოვნად იყო მომატებული იმ კიბოს უჯრედებში რომლებიც არ განიცდიდნენ ნერვულ ინვაზიას (სურათი 5A). ამის საპირისპიროდ, KIF14-ის ექსპრესია დაქვეითებული იყო იმ პანკრეასის კიბოს უჯრედებში რომლებიც ჩაზრდილნი იყვნენ ნერვებში (გამოკვლეული ნიმუშების 62%) (სურათი 5B). ეს ცვალებადობა არის სტატისტიკურად მნიშვნელოვანი “ფიშერის ზუსტი ტესტის” მიხედვით ($p < 0.05$).

ARHGDI β -ის ექსპრესია პრედომინანტულად ინიშნებოდა ანთებით და სტრომულ უჯრედებში (სურათი 5C) რაც ნაწილობრივ ხსნის ARHGDI β -ის რნმ-ის მომატებული ექსპრესიის ფაქტს პანკრეასის კიბოს ქსოვილში (სურათი 4D). ARHGDI β -ის ექსპრესია არ ინიშნებოდა უმრავლესობა პანკრეასის კიბოს უჯრედებისა რომლებსაც არ ჰქონდათ კონტაქტი ნერვებთან (სურათი 5C). მიუხედავად ამისა ARHGDI β -ის ექსპრესია ნათლად იყო გამოხატული იმ კიბოს უჯრედებში (გამოკვლეული ნიმუშების 67%) რომლებიც ინვაზირებდნენ ნერვებში (სურათი 5D). ეს ექსპრესიის ცვალებადობაც KIF14-ის მსგავსად ნერვებში ინვაზიურ და არაინვაზიურ უჯრედებს შორის იყო სტატისტიკურად ძალიან მნიშვნელოვანი (ფიშერის ტესტი $P < 0.001$).

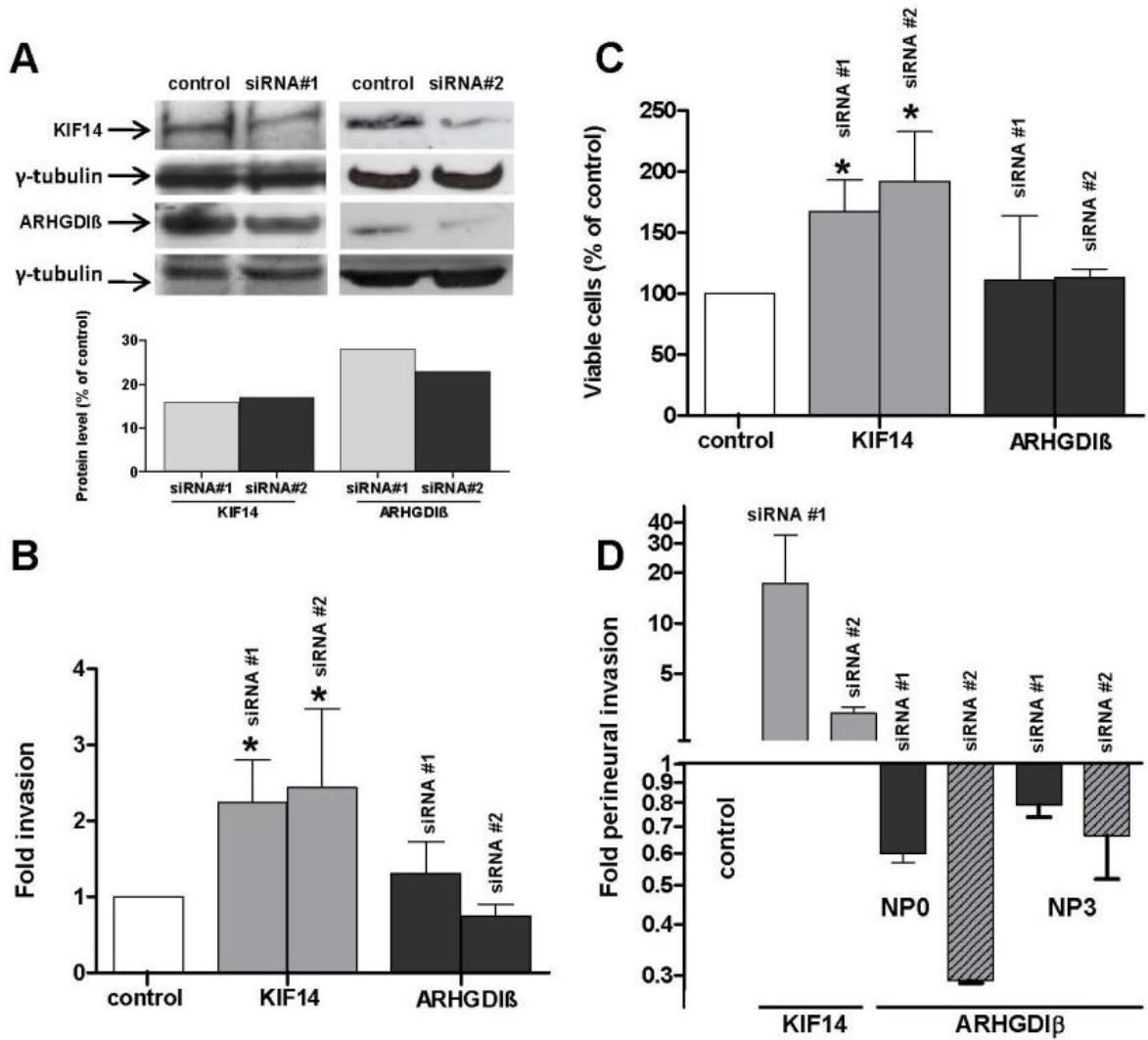
KIF14-ისა და ARHGDI β -ის ფუნქციური დახასიათება T3M4 პანკრეასის კიბოს უჯრედებში

იმისათვის რომ დაგვედგინა KIF14-ისა და ARHGDI β -ის ფუნქციური მნიშვნელობა პანკრეასის კიბოს უჯრედებში, ვაწარმოვეთ ამ პროტეინების ენდოგენური ექსპრესიის დაუნ-რეგულაცია T3M4 უჯრედებში სი-რნმ-ის მეშვეობით (სურათი 6A). ბაზალურმა ინვაზიურობამ KIF14-ის დაუნ-რეგულაციის შემდეგ საგრძნობლად მოიმატა (2.23 ± 0.57 ჯერ, და 2.44 ± 1.03 ჯერ ($p < 0.05$) ამ უჯრედებში.



სურათი 5

იმუნოჰისტოქიმიური ანალიზი პანკრეასის კიბოს ქსოვილებისა ნერვული ინვაზიის გარეშე (A, C) და ნერვული ინვაზიით (B, D). შესრულებულია KIF14-ის (A, B) და ARHGDIβ-ის (C, D) სპეციფიური ანტისხეულების მეშვეობით. გრაფიკები გამოსახავენ დადებითად და ნეგატიურად შეღებილი ნიმუშების პროცენტულ თანაფარდობას თითოეულ ჯგუფში. KIF14 და ARHGDIβ პოზიტიური კიბოს უჯრედები ნაჩვენებია A და D პანელზე. ნეგატიური KIF14 და ARHGDIβ-ის ექსპრესია ნაჩვენებია B და C პანელზე შესაბამისად.



სურათი 6

KIF14-ის და ARHGDIβ-ის ექსპრესიის დაუნ-რეგულაციის მაჩვენებელი იმუნობლოტი და დენსიტომეტრული ანალიზი 2 სხვადასხვა სი-რნმ-ის მოლეკულის გამოყენებით (A). ინვაზიის (B), ანოიკის (C), და ნერვული ინვაზიის (D) ექსპერიმენტი სი-რნმ-ით ტრანსფექციური T3M4 უჯრედების შესადარებლად საკონტროლო ტრანსფექციასთან.

თუმცა, ARHGDI β -ის ექსპრესიის დაქვეითებამ არ გამოიწვია მნიშვნელოვანი ცვლილებები ინვაზიურობის მიხედვით (1.30 ± 0.42 ჯერ; 0.75 ± 0.15 ჯერ) (სურათი 6B).

შემდეგ ჩვენს მიერ გაანალიზებულ იქნა სუსპენზია-დამოკიდებული სიცოცხლისუნარიანობა (ანოიკის) ტრანსფექცირებული უჯრედებისა. ამ ექსპერიმენტმა უჩვენა მნიშვნელოვნად გაზრდილი სიცოცხლისუნარიანობა KIF14-დაქვეითებულ უჯრედებში ($167.2 \pm 25.82\%$ და $191.9 \pm 40.64\%$ კონტროლთან შეფარდებით) 72 საათის შემდეგ ექსპერიმენტის დაწყებიდან ($p < 0.05$). ARHGDI β -ის ექსპრესიის დაქვეითებამ არ გამოიწვია შესამჩნევი ცვლილებები T3M4 უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაში (სურათი 6C).

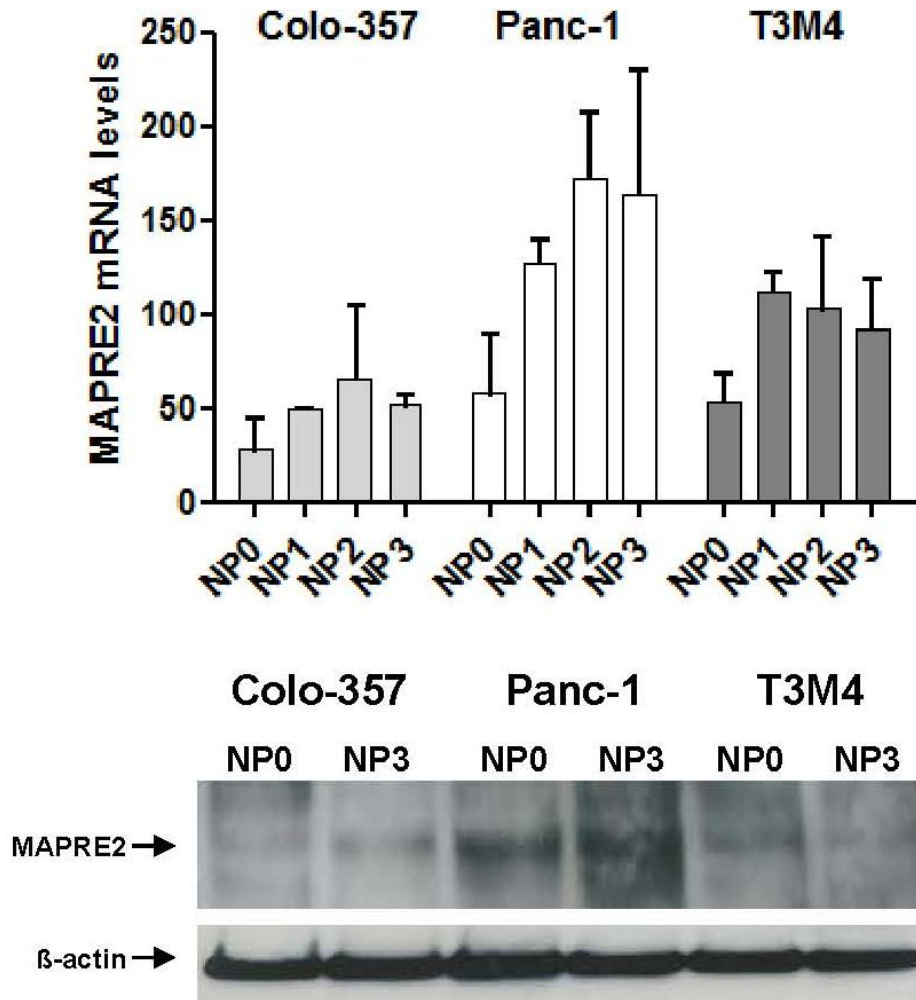
საბოლოოდ, ჩვენ ვაწარმოვეთ ნერვული ინვაზიურობის ანალიზი T3M4-ის KIF14-და ARHGDI β -ტრანსფექცირებული უჯრედების ანალიზი, იმავე სი-რნმ-ის მოლეკულების გამოყენებით რომლებიც გამოვცადეთ ბაზალური ინვაზიურობის დადგენისას. ადამიანის ციტოკერატინ-19 (ცკ19) იქნა გამოყენებული როგორც მარკერი ეპითელური (კიბოს) უჯრედებისათვის. ნერვებისა და კიბოს უჯრედების ერთობლივი ინკუბაციის შემდეგ, ნერვები (კამერიდან ამოღების შემდეგ) გაყინულ იქნა თხევად აზოტში, რის შემდეგაც განიცადა ჰომოგენიზაცია და მოხდა რნმ-ის იზოლაცია. ამ ნერვულ ექსტრაქტებში ცკ19-ის ექსპრესია აღრიცხულ იქნა QRT-PCR-ანალიზის გამოყენებით. აღნიშნულმა ექსპერიმენტმა გამოავლინა უფრო მეტი ცკ19-ის ექსპრესია იმ ნერვებში რომლებმაც განიცადეს ინკუბაცია KIF14-დაქვეითებულ უჯრედებთან, შესაბამისად გამოვლინდა რომ უფრო მეტმა KIF14-დაქვეითებულმა უჯრედმა განიცადა ინვაზია ნერვებში (სურათი 6D). საპირისპიროდ ამისა, ARHGDI β -ტრანსფექცირებულმა უჯრედებმა გამოავლინეს ურო ნაკლები ნერვული ინვაზიის უნარი რადგანაც ცკ19 ექსპრესია ნერვულ ჰომოგენატებში ბევრად ნაკლები იყო საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით (სურათი 6D). ეს დადასტურდა აგრეთვე ARHGDI β -ტრანსფექციით ნერვ-ინვაზიურ NP3 უჯრედული კლონისა, რომელმაც აგრეთვე გამოავლინა შესუსტებული ნერვული ინვაზიურობა კონტროლთან შედარებით (სურათი 6D).

MAPRE2–ის ფუნქციური დახასიათება პერინერვეული ინვაზიის დროს.

ერთ-ერთი გენი რომელიც აგრეთვე ნანახი იქნა ჩვენი მიკრო-ერვის მეშვეობით და რომელიც მოყვანილია ცხრილ №1-ში არის MAPRE2. ქვანტიტატიური QRT-PCR-ისა და იმუნობლოტინგის მეშვეობით დადასტურდა რომ MAPRE2-ის ექსპრესია მართლაც მომატებულია NP3 უჯრედებში NP0 კლონებთან შედარებით (სურათი 7).

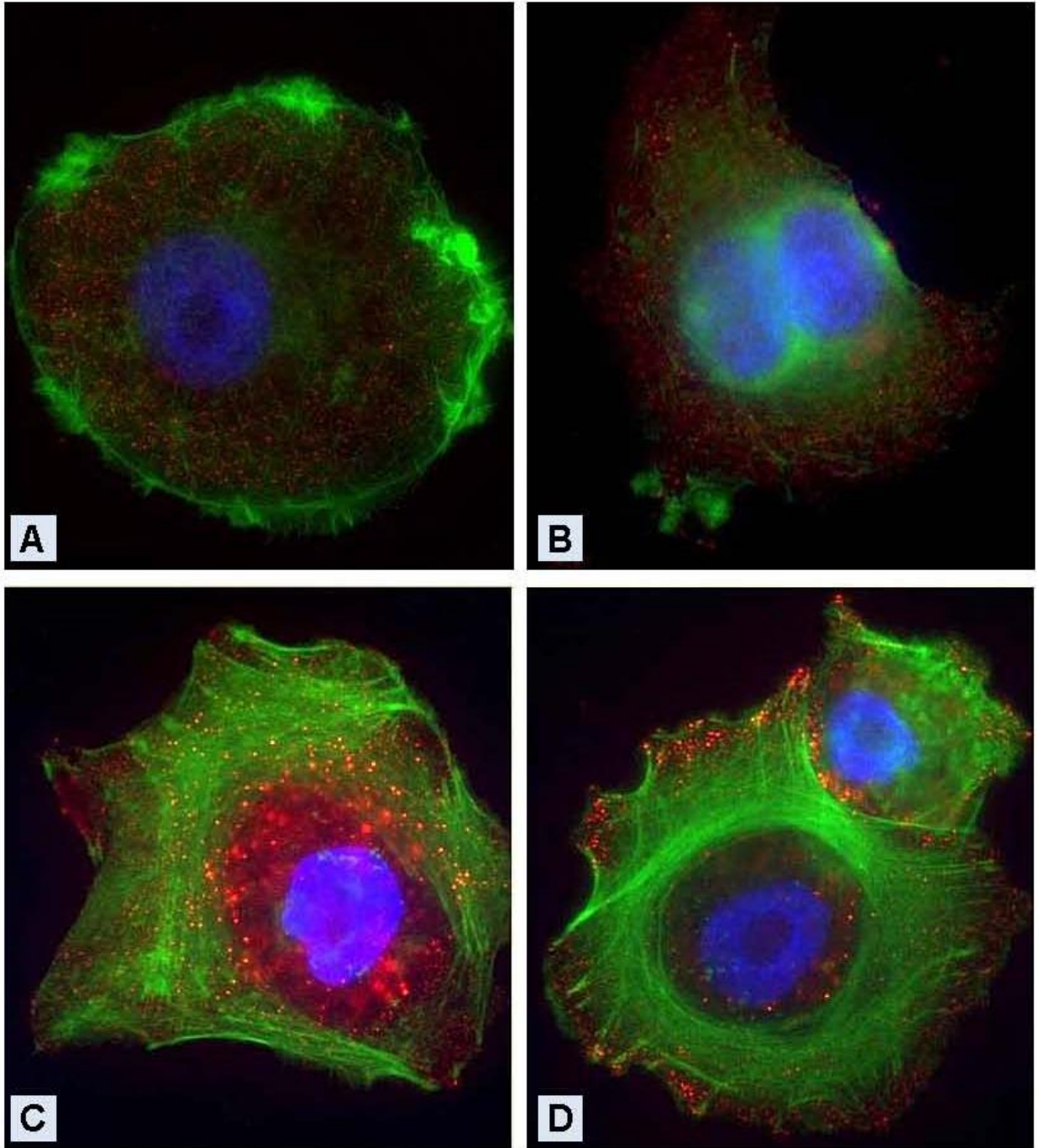
შემდგომ ჩვენ გამოვიკვლიეთ MAPRE2–ის ლოკალიზაცია და ციტოსკელეტარული აქტინის ექსპრესია ნერვ-ინვაზიურ უჯრედებში იმუნოფლუორესცენციული შედეგის მეთოდით. ამ ანალიზმა უჩვენა მომატებული, გრანულარულ-ციტოპლაზმური ექსპრესია MAPRE2–ისა ჭარბი პერი-ნუკლეარული ლოკალიზაციით NP3 უჯრედებში. დამატებით დადგინდა რომ, MAPRE2 ავლენს თანა-ლოკალიზაციას ფილამენტურ აქტინთან ამ უჯრედებში. ამასთანავე აქტინი წარმოდგენილი იყო უფრო მეტად ორგანიზებული სახით და წარმოქმნიდა კორტიკალურ და ტრანსვერსულ ბოჭკოვან ძაფისებურ ფორმაციებს. (სურათი 8AB). საპირისპიროდ ამისა, NP0 კლონებში აქტინის ექსპრესია შეინიშნებოდა ძირითადად უჯრედის აპიკალურ ნაწილებში და აკუმულირებული იყო ფილოპოდიას მაგვარ სტრუქტურებში (სურათი 8CD).

ჩვენ აგრეთვე შევეცადეთ დაგვედგინა MAPRE2–ის ექსპრესია ადამიანის პანკრეასის ქსოვილებში. QRT-PCR-ის გამოყენებით დადგინდა ამ გენის ექსპრესიის შემცირება პანკრეასის კიბოს ქსოვილებში ნორმალურ პანკრეასთან შედარებით. რაც შეეხება ქრონიკულ პანკრეატიტს, ამ ანალიზმა არ უჩვენა მნიშვნელოვანი სხვაობა MAPRE2–ის ექსპრესიისა ნორმალურ პანკრეასის ქსოვლითან შედარებით (სურათი 9A). ჩვენ შევადარეთ გამოკვლეული, პანკრეასის კიბოთი დაავადებული პაციენტების სიცოცხლისხანგრძლივობა MAPRE2–ის ექსპრესიის ხარისხთან. ამ გამოკვლევამ გამოავლინა ტენდენცია რომ, მომატებული MAPRE2–ის ექსპრესია მაჩვენებელი იყო ამ პაციენტების უფრო უარესი სიცოცხლისუნარიანობისა (სურათი 9B).



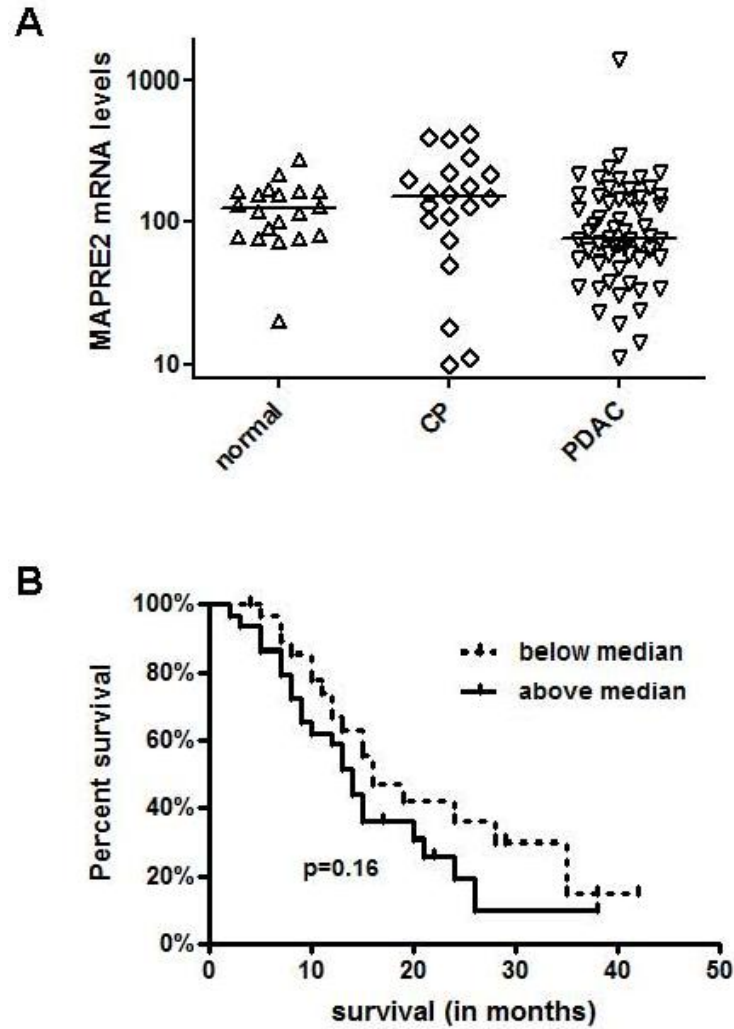
სურათი 7

MAPRE2-ის რნმ-ისა და ცილის ექსპრესია ნერვ-ინვაზიურ კლონებში QRT-PCR-ისა და იმუნობლოტ ანალიზის (ქვედა პანელი) გამოყენებით.



სურათი 8

იმუნოფლუორესცენციული შეღებვა NP0 (A,B) და NP3 (C,D) უჯრედებისა. წითელი ფერი: MAPRE2, მწვანე: აქტინი, ლურჯი: ბირთვი.



სურათი 9

(A) MAPRE2-ის რნმ-ის ექსპრესია ნორმალურ პანკრეასის ქსოვილში (n=20), ქრონიკულ პანკრეატიტში (n=20) და პანკრეასის კიბოს ქსოვილში (n=58) QRT-PCR-ის გამოყენებით. ჰორიზონტალური ხაზებით აღნიშნულია საშუალო ექსპრესიის დონე.

(B) პლა დაავადებული პაციენტების სიცოცხლისუნარიანობის სტატისტიკური მაჩვენებელი MAPRE2-ის ექსპრესიის მიხედვით (წყვეტილი ხაზი: დაბალი ექსპრესია, გაბმული ხაზი: მაღალი ექსპრესია).

დასკვნები

აღნიშნულ კვლევაში, ჩვენს მიერ ახლად შემუშავებული *ex-vivo* პერინერვული ინვაზიის მოდელის მეშვეობით ჩვენ წარმოვადგინეთ და დავადასტურეთ პანკრეასის ნერვ-ინვაზიური უჯრედული ხაზების ტრანსკრიპციული უნიკალურობა. შედეგად რიგი ამ მეთოდით აღმოჩენილი გენებისა უფრო დეტალურად იქნა გამოკვლეული, რამაც დაადასტურა მათი მნიშვნელობა ნერვულ ინვაზიაში.

პერინერვული ინვაზია, როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ წარმოადგენს სპეციფიურ გზას ავთვისებიანი უჯრედების ორგანოს გარეთ გაგრძელებისა და მოიაზრება ერთ-ერთ მნიშვნელოვან ფაქტორად პანკრეასის სიმსივნის ლოკალური რეციდივისა რეზექციის შემდეგ. რაღათქმაუნდა პნი აგრეთვე გულისხმობს ტკივილის სინდრომს, რომელიც აღვნიშნებათ პანკრეასის სიმსივნით დაავადებულ პაციენტთა უმეტესობას.

სადღეისოდ ნავარაუდევია პერინერვული ინვაზიის განვითარების 3 მექანიზმი:

პნი-ის მექანიკური კონცეფცია მოიცავს კიბოს უჯრედების პენეტრაციას მკვრივი დესმოპლაზიური სიმსივნური ქსოვილიდან ნაზი კონსისტენციის პერინერვულ მიკრო-გარემოში.

მეორე კონცეფცია გულისხმობს კიბოს უჯრედების სწრაფვას სისხლისა და ლიმფური მომარაგებით მდიდარ პერინერვულ ქსოვილში, ჰიპოქსიური და საკვები ნივთიერებებით ღარიბი სიმსივნური ქსოვილიდან.

მესამე ნეიროტროფული კონცეფცია დაფუძნებულია იმ ფაქტზე რომ, რიგი ნეირო-სპეციფიკური მოლეკულებისა რომელნიც გამოიყოფა პერინერვული ქსოვილის მიერ, წარმოადგენს ქიმიო-ატრაქტიულ ნივთიერებას კიბოს უჯრედებისათვის და შესაძლებელია სწორედ ეს იყოს მიზეზი მათი ინტენსიური ინვაზიისა პერინერვულ ქსოვილში.

მიუხედავად სხვადასხვა დაკვირვებებისა რომლებიც მხარს უჭერენ აღნიშნულ კონცეფციებს, მოლეკულური მექანიზმები და ფაქტორები რომლებიც ჩართულნი არიან პლა-ის უჯრედების პნი-ში სადღეისოდ ცნობილი არ არის.

ჩვენ აქ წარმოვადგინეთ ახალი პანკრეასის კიბოს პნი-ს მოდელი, ex-vivo მიდგომითა და 3 სხვადასხვა პანკრეასის კიბოს უჯრედული ხაზის გამოყენებით. დადგინდა რომ, ვირთავას ნერვები ინარჩუნებდნენ თავიანთ მორფოლოგიას 3 კვირაზე მეტი ხანგრძლივობით სტანდარტული უჯრედული კულტივირების პირობებში. უფრო მეტიც, პერინერვული უჯრედები (ფიბრობლასტები) გამოირჩეოდნენ მაღალი სიცოცხლისუნარიანობით და პროლიფერაციის უნარით. ჩვენი შედეგები ამას გარდა ამტკიცებს რომ, ნერვების ქსენო-წარმოშობა არ აბრკოლებდა კიბოს უჯრედების მათში ინვაზიისა და მიგრაციის ინტენსივობას, შესაბამისად შეიძლება დავასკვნათ რომ კიბოს უჯრედთა და ნერვების ურთიერთქმედება არ არის დამოკიდებული ორგანიზმულ სახესხვაობაზე.

ჩვენ დავადგინეთ რომ ARHGDI β -ის, KIF14-ისა და MAPRE2-ის ექსპრესიის ცვლილებები დაკავშირებულია პანკრეასის კიბოს პერინერვულ ინვაზიასთან. როგორც სჩანს ARHGDI β -ს ენიჭება სპეციფიური როლი პანკრეასის კიბოს პნი-ში, განსხვავებით KIF14 ისაგან, რომელიც უფრო მონაწილეობს როგორც ბაზალურ ასევე პერინერვულ ინვაზიაში ამ ავთვისებიანი დაავადების დროს. MAPRE2-ს მონაწილეობა პანკრეასის კიბოს პნი-ში, განისაზღვრება ციტოსკელეტარული ცილების ორგანიზაციის დაბრკოლებით. აღნიშნული ცილების მოლეკულური და ფუნქციური თვისებების დადგენამ განამტკიცა ჩვენი ექსპერიმენტული მიდგომის საიმედოობა. ამ გენების, როგორც თერაპიულ სამიზნეთ გამოყენებამ სავსებით შესაძლებელია გამოიწვიოს პერინერვული ინვაზიის ბლოკირება რაც სამომავლოდ შესაძლოა გახდეს იმედის მომცემი თერაპიული მიდგომა პანკრეასის კიბოს მკურნალობის დროს.

დღემდე შემუშავებულ პნი მოდელებს ახასიათებთ შემდეგი უარყოფითი მხარეები: ისინი ძირითადად დანერგილნი არიან ლაბორატორიული თავგების ორგანიზმში და ჩვენი მოდელისგან განსხვავებით ხასიათდებიან მნიშვნელოვნად დიდი ვარიაბელობით, რომელთა სტანდარტიზაცია პრაქტიკულად შეუძლებელია.

ჩვენი პნი-ის მოდელი წარმოადგენს გამოსადეგ, სტანდარტიზირებულ მეთოდს ნერვულ ინვაზიასთან დაკავშირებული ფაქტორების იდენტიფიკაციისათვის და ხელს უწყობს ამ ფენომენის უკეთეს გაანალიზირებას.

1. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2009*. CA Cancer J Clin, 2009. **59**(4): p. 225-49.
2. Welsch, T., J. Kleeff, and H. Friess, *Molecular pathogenesis of pancreatic cancer: advances and challenges*. Curr Mol Med, 2007. **7**(5): p. 504-21.
3. Dai, H., et al., *Enhanced survival in perineural invasion of pancreatic cancer: an in vitro approach*. Hum Pathol, 2007. **38**(2): p. 299-307.
4. Conlon, K.C., D.S. Klimstra, and M.F. Brennan, *Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors*. Ann Surg, 1996. **223**(3): p. 273-9.
5. Sperti, C., et al., *Survival after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas*. Br J Surg, 1996. **83**(5): p. 625-31.
6. Tsiotos, G.G., M.B. Farnell, and M.G. Sarr, *Are the results of pancreatectomy for pancreatic cancer improving?* World J Surg, 1999. **23**(9): p. 913-9.
7. Liu, B. and K.Y. Lu, *Neural invasion in pancreatic carcinoma*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2002. **1**(3): p. 469-76.
8. Noto, M., et al., *Pancreas head carcinoma: frequency of invasion to soft tissue adherent to the superior mesenteric artery*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(8): p. 1056-61.
9. Mitsunaga, S., et al., *Detail histologic analysis of nerve plexus invasion in invasive ductal carcinoma of the pancreas and its prognostic impact*. Am J Surg Pathol, 2007. **31**(11): p. 1636-44.
10. Esposito, I., et al., *Most pancreatic cancer resections are R1 resections*. Ann Surg Oncol, 2008. **15**(6): p. 1651-60.
11. Abiatari, I., et al., *Hsulf-1 regulates growth and invasion of pancreatic cancer cells*. J Clin Pathol, 2006. **59**(10): p. 1052-8.
12. Abiatari, I., et al., *Moesin Dependent Cytoskeleton Remodeling Is Associated with an Anaplastic Phenotype of Pancreatic Cancer*. J Cell Mol Med, 2009.
13. Li, J., et al., *Glypican-1 antisense transfection modulates TGF-beta-dependent signaling in Colo-357 pancreatic cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **320**(4): p. 1148-55.
14. Zhang, W., et al., *Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN/CD147) in pancreatic neoplasm and pancreatic stellate cells*. Cancer Biol Ther, 2007. **6**(2): p. 218-27.
15. Abdollahi, A., et al., *Transcriptional network governing the angiogenic switch in human pancreatic cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(31): p. 12890-5.
16. Abiatari, I., et al., *The microtubule-associated protein MAPRE2 is involved in perineural invasion of pancreatic cancer cells*. Int J Oncol, 2009. **35**(5): p. 1111-6.
17. Abiatari, I., et al., *Consensus Transcriptome Signature of Perineural Invasion in Pancreatic Carcinoma*. Mol Cancer Ther, 2009.