

## MOLEKULINIO IR LĄSTELINIO IMUNITETO TYRIMAI BIOLOGINIUISE MODELIUISE IN VITRO IR IN VIVO

**1. Programos vykdytojas** - Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras

**Norminiai etatai skirti programai** - 9

### **2. Programos tikslai:**

Gauti naujų mokslo tyrimais pagrįstų žinių reikalingų inovatyvios medicinos technologijų bei biotechnologijų plėtrai.

Tyrimų principas - kompleksiskumas, apimantis molekulinis ir ląstelinius imuniteto tyrimus biomodeliuose *in vitro* ir *in vivo*, laboratorinių gyvūnų ir alternatyvių tyrimo metodų taikymas žmogaus ligų modeliavimui, naujų biologiškai aktyvių medžiagų bei ląstelių biologinio poveikio tyrimams, antikūnų kūrimas ir taikymas bioanalitinių test-metodų kūrimui ir tobulinimui.

Pagrindinės tyrimų kryptys:

- autoimuninių, alerginių, onkologinių ligų ląstelių ir molekulinis imuniteto mechanizmų tyrimai;
- biologiškai aktyvių medžiagų, imunomoduliatorių tyrimai ląstelių kultūrose ir biomodeliuose *in vivo*;
- nanotechnologinių metodų taikymas biomediciniuose tyrimuose.

### **3. Programos uždaviniai:**

1. Tirti imuninės sistemos ląstelių (dendritinių ląstelių, natūralių kilerių, natūralių kilerinių T limfocitų, citotoksiškių T limfocitų, mieloidinės kilmės supresorinių ląstelių, citokinų) funkcionavimo mechanizmus biologiniuose modeliuose, tikslu surasti diagnostikai vertingus biožymenis, bei giliau pažinti patologinius procesus. **(520 tūkst. Eur).**

Panaudojant *in vivo* optinio vaizdinimo metodus, biologiniuose modeliuose bus tiriami veiksniai nuo kurių priklauso efektorinių T limfocitų proliferacija ir migracija į pakenkimo židinių. Bus atliktas pelių T limfocitų donorių ląstelių, kokybės įvertinimo ir kultivavimo/stimuliacijos metodikos paruošimas.

Bus atliekamas adaptacinės imunoterapijos metodologijos paruošimas, imuninės sistemos parametrų tyrimas eksperimentinės terapijos laike. Optimalių imuniteto parametrų stebėsenai parinkimas ir vertinimas, kuriamos adaptacinės T ląstelių terapijos technologijos biomodeliuose.

Bus tiriami T reguliacinių limfocitų subpopuliacijų kiekybiniai skirtumai biomodeliuose normoje ir adaptacinės imunoterapijos metu pažeidimo židinyje ir periferiniame kraujyje. Bus įvertintas Treg funkcinis aktyvumas/gebėjimas slopinti CD8<sup>+</sup> T limfocitų IFN $\gamma$  sekreciją. Imuninės sistemos ląstelių kiekybinės charakteristikos bus tiriamos naudojant TissueGnostics skaitmeninės mikroskopijos platformą ir TissueFAXS programinę įrangą. Imuninės sistemos ląstelių funkcinės charakteristikos bus tiriamos naudojant ELISPOT metodiką.

2. Su G baltymais asociuotų receptorių ir jų ligandų (melatonino) funkcijų įtakos imuninės sistemos ląstelėms (tęstiniai tyrimai), bei humoralinio ir ląstelinio imuniteto virusinių (parvovirus B19 bei Candida mielių) infekcijų atvejais tyrimai. **(390 tūkst. Eur).**

Mokslo literatūroje aprašyta labai daug G-baltymais asociuotų receptorių, kurių funkcijos dar nėra galutinai ištytos. Daugumos tokių receptorių detali ekspresija bei funkcijos imuninės sistemos ląstelėse yra nežinomos. Todėl vienas iš uždavinių yra tyrinėti su G baltymais asociuotų receptorių ir jų ligandų funkcijas imuninės sistemos ląstelėse. Vienas iš tokių ligandų yra melatoninas. Melatoninas sintetinamas tamsiu paros metu, o šviesa jo sintezę inhibuoja). Melatoninas reguliuoja cirkadinius ritmus ląstelių ciklą, ląstelių proliferaciją, apoptozę, citoskeleto reorganizaciją, pasižymi antioksidantiniu, imunomoduliaciniu poveikiu. Jau nustatyta, kad melatonino sintezės sutrikimai yra susiję su vėžiniais susirgimais bei

autoimuninėmis ligomis (Carrillo-Vico, Guerrero et al. 2005). Melatoninas veikia ląsteles per 3 tipų receptorius: membraninius MT1 ir MT2, citozolinį MT3/Q2 ir branduolinius receptorius ROR $\alpha$ , ROR $\beta$ , ROR $\gamma$  (Hardeland, Cardinali et al. 2011). Tačiau apie tai, kurie receptoriai už kurias melatonino funkcijas yra atsakingi moduluojant imuninę atsaką yra tyrimų stadijoje. Bus tiriama melatonino įtaka granulocitų migracijai į infekcijos vietas, melatonino receptorių raiška, o taip pat jo poveikis fagocitinių ląstelių deguonies ir azoto laisvų radikalų produkcijai bei fagocitozei. Bus atliekami alerginio kontaktinio dermatito imunologinių mechanizmų tyrimai bei potencialių molekulių ir ląstelių biožymenų paieška.

3. Gamtinių imunomoduliatorių (pagrindiniai beta gliukanų) tyrimai *in vivo* ir *in vitro* modelinėse sistemose, tikslu sudaryti optimalią biologiškai/farmakologiškai veiksmingą beta gliukanų „vaisto“ kompoziciją. **(445 tūkst. Eur)**.

Bus toliau vykdoma gamtinių biologiškai aktyvių junginių paieška ir panaudojimo galimybių imunomoduliacijai laboratorinių gyvūnų modeliuose tyrimas, atliekama fotometrinių imunoglobulinų charakteristika, tiriamas augalinių preparatų moduliacinis poveikis uždegimui bei imuniniam atsakui ir oksidaciniam stresui, tiriamas polisacharidų (skirtingo molekulinio svorio beta-gliukanų) poveikis pelių makrofagams ir dendritinėms ląstelėms *in vitro* ir *in vivo*. Tam tikslui įgyvendinti bus naudojami kserimentiniai-biologiniai modeliai, atliekamas jų gausinimas standartizavimas

4. Imuninių biologinių jutiklių, skirtų antigeno ir antikūno sąveikos registravimui, ir fermentinių biologinių jutiklių, skirtų realiuose mėginiuose esančių analizių nustatymui (pvz.: gliukozės) kūrimas bei tobulinimas. **(300 tūkst. Eur)**

Didelis dėmesys bus skiriamas kryptingo antikūnų imobilizavimo paviršiuje technologijoms, taip siekiant padidinti imuninio jutiklio jautrį. Taip pat bus siekiama sukurti jautrius ir patogius vartotojui gliukozės jutiklius, panaudojant skirtingai modifikuotus paviršius, imobilizuotus red-oks tarpininkus bei įvairius fermentų imobilizavimo metodus (tęstiniai tyrimai).

#### 4. Metodologinis tyrimų pagrindimas:

- Liuceferazę ekspresuojantys limfocitai bus aktyvinami *in vitro* ir *in vivo*. Panaudojant magnetines mikrogranules, bus išskiriamos atskiros limfocitų subpopuliacijos, kurios bus suleidžiamos imunodeficitinėms RAG<sup>-/-</sup> pelėms su autoimuniniais ar navikiniais pažeidimais.

- Planuojamuose tyrimuose numatoma gauti daugiau žinių apie imuninės sistemos ląstelių subtipų dalyvavimą ligų patogenezėje. Imuninės sistemos ląstelių migracijos ir proliferacijos *in vivo* tyrimuose bus naudojamos Rag2 pelės. Rag2 pelėse yra mutotas rekombinaciją aktyvuojantis genas 2 (Rag2). Šiose pelėse negali vykti V(D)J persitvarkymas, todėl nesubręsta nei T, nei B limfocitai. Rag2 pelės bus naudojamos kaip imuninės sistemos ląstelių recipientai tirti šių ląstelių funkcinėms savybėms. Imuninės sistemos ląstelių migracija ir proliferacija *in vivo* bus tiriama naudojant bioluminescentinio vaizdinimo metodus.

- Ląstelių ir organų vaizdinimas *in vivo*, naudojant IVIS vaizdinimo sistema.

- Su G baltymais asocijuotų receptorių tyrimams bus naudojami eksperimentiniai gyvūnai (BALB/c pelės, Lewis žiurkės). Bus naudoti molekulinės biologijos, ląstelių kultūrų bei imunologiniai metodai. Prietaisai: boksas, CO2 inkubatorius, tēmės-citometrai, ląstelių sorteris, DNR ir baltymų elektroforezės aparatai, PCR įranga, multiskanas ir pan.

- Alerginio kontaktinio dermatito diagnostikai skirtų žymenų paieškai bus tiriami citokinai bei metabolitai ligonių ir sveikų žmonių kraujo serume. Taip pat bus naudojami eksperimentiniai gyvūnų modeliai.

- Programos vykdymui bus taikomi šiuolaikiški tyrimų metodai bei priemonės įvardinti žemiau:

- genetiniai (PGR);
- klinikiniai;
- hematologiniai;

- biocheminiai;
- imunologiniai metodai: imunofermentinis metodas (ELISA, ELISPOT), imunoelektroforezė, imunodifuzija;
- patomorfologiniai, histologiniai metodai;
- audinių kultūros, šviesinė ir fluorescencinė mikroskopija, spektrofotometrija;
- stereomikroskopija;
- T ir B limfocitų funkcinio aktyvumo tyrimai;
- NK ir NKT limfocitų funkcinio aktyvumo tyrimai;
- Mieloidinės kilmės supresorinių ląstelių bei supresorinių receptorių tyrimai;
- dendritiniu lasteliu brandinimo ir aktyvinimo tyrimai;
- dendritiniu lasteliu imunogeninių ir tolerogeninių savybių tyrimai;
- monokloninių ir polikloninių antikūnų kūrimas
- srautinė citometrija;
- Western blotingas;
- ląstelių kultūros;

Elektrodo paviršiaus modifikavimas skirtingais metodais, giminingos sąveikos (imuniniai biologiniai jutikliai) ar analitės buvimo biologiniuose mėginiuose (pvz. serume) (fermentiniai biologiniai jutikliai) registravimas optiniai bei elektrocheminiais metodais. Darbe bus naudojamas UV-vis spektrofotometras, elektrocheminė aparatūra bei paviršiaus plazmonų rezonanso įrenginys. Bus tiriami tiesioginiai ir netiesioginiai analitės nustatymo metodai, siekiant sukurti kuo jautresnę analizinę sistemą, skirtą analičių nustatymui biologiniuose mėginiuose.

## 5. Tyrimų etapai ir jų charakteristika:

5.1. Imuninės sistemos ląstelių (dendritinių ląstelių, natūralių kilerių, natūralių kilerinių T limfocitų, citotoksinių T limfocitų, mieloidinės kilmės supresorinių ląstelių ir kt.) diferenciacijos ir funkcinį savybių tyrimai biologiniuose modeliuose. I-as etapas 2017 - 2019 m.

Ataptyvinės imunoterapijos metodologijos paruošimas, imuninės sistemos parametru tyrimas eksperimentinės terapijos laike. Optimalių imuniteto parametru stebėsenai parinkimas ir vertinimas II-etapas 2019 - 2021 m.

T reguliaciniais limfocitais (Treg) vadinami CD4<sup>+</sup> ir CD8<sup>+</sup> T limfocitai, kurie slopina kitų imuninės sistemos ląstelių (T ląstelių pagalbininkų, citotoksinių T limfocitų, B limfocitų, NK ląstelių, dendritinių ląstelių, makrofagų) funkcijas, išskirdami citokinus (pvz., IL-10, TGFβ) ar tiesioginio kontakto metu. Imuninį atsaką slopinančiu poveikiu pasižymintiems (imunosupresiniam) limfocitams būdinga tam tikrų nespecifinių žymenų raiška, iš kurių paminėtini CD25 (IL-2 receptoriaus  $\alpha$  grandinė), FoxP3. *forkhead helix box P3*), GITR (angl. *glucocorticoid – induced tumor necrosis factor receptor*), CD103 ( $\alpha\beta7$  integrinas), CTLA-4 (angl. *cytotoxic T lymphocyte late antigen*) ir kt. Įvairių tyrimų rezultatai rodo, kad imunosupresiniu poveikiu pasižymintys Treg limfocitai atlieka itin svarbų vaidmenį autoimuninių, imunodeficitinių bei alerginių ligų patogenezėje, taip pat dalyvauja reguliuojant alotransplantato atmetimo reakcijas bei slopinant priešnavikinį imuninį atsaką (Arosa FA. 2002, André S. et al. 2009, Focosi D. et al. 2010).

Ankstesnių metų tyrimų rezultatai (Juršėnaitė J. et. al. 2015; Sudzius G. et. al. 2015) parodė, kad imuniteto žymenų vertinimas imunoterapijos bei patologijų atvejais duoda naudingą mokslinę ir praktinę informaciją biomedicinos mokslui.

5.2. Su G baltymais asocijuotų receptorių ir jų ligandų (melatonino) funkcijų tyrimas imuninės sistemos ląstelėse: 2017-2021 m.m.

Be plačiai žinomų G-baltymais asocijuotų citokinų receptorių, paskutiniiais metais yra aprašyti receptoriai, kurie aktyvuojasi fosfolipidais, lipidais, nukleotidais, neuropeptidais, mažos molekulinės masės augalinės kilmės molekulėmis ar net pakitusiu pH. Kai kurių receptorių ligandai visiškai nežinomi. Daugumos tokių receptorių funkcijos ir detali ekspresija imuninės sistemos ląstelėse yra mažai žinoma ar visiškai nežinoma. Vienas tokių ligandų yra melatoninas.

Melatonino vaidmuo imuninei sistemai IMC tiriamas jau keletą metų. Nustatyta, kad

melatoninas, veikdamas per MT2 receptorių, moduliuoja antikūnų produkciją ir, kad melatonino koncentracija kraujo serume imunizacijos metu yra labai svarbi antikūnų susidarymui (Cernysiov, Gerasimcik et al. 2010), bei imuninės sistemos ląstelių migracijai į uždegimo vietą (Cernysiov, Mauricas et al. 2011). Buvo iširta melatonino receptorių raišką užkrūčio liaukos, kaulų čiulpų ląstelėse, B bei T limfocituose ir nustatyta, kad melatonino receptorių raiška priklauso nuo cirkadinio laiko, o kai kurių (pvz., MT1 ir MT2) receptorių raiška priklauso nuo melatonino koncentracijos serume. (Cernysiov, Bozaite et al. 2014, Cernysiov, Bozaite et al. 2014). Buvo nustatyta, kad melatoninas inhibuoja granulocitų migraciją, veikdamas per MT2 ir MT3 receptorius (Mauricas, Girkontaite, 2015). Atlikti pirminiai alerginio kontaktinio dermatito biožymenų tyrimai (Zinkevičienė A. et al. 2015, 2016 m.).

Esminiai darbų etapai:

I-as etapas 2017-2019 m.

Alerginio kontaktinio dermatito molekulinį ir ląstelinių biožymenų tyrimas.

Melatonino įtakos imuninės sistemos ląstelių adhezijai, migracijai, citokinų produkcijos imuninio atsako laike tyrimas.

II-as etapas 2019-2021 m.

Melatonino įtakos onkologinių ar autoimuninių ligų patogenezėi tyrimas

Melatonino ir jo receptorių raiškos imuninėse ląstelėse senėjimo laike tyrimai.

Naujų ir esamų laikmečių svarbių biomolekulių funkcijų imuninei sistemai tyrimai

5.3. Gamtinių imunomoduliatorių tyrimai *in vivo* ir *in vitro* modelinėse sistemose. Eksperimentiniai-biologiniai modeliai ir jų standartizavimas

Laboratorinių gyvūnų, kaip modelio, naudojimas glaudžiai susijęs su biologijos, medicinos, veterinarijos mokslų raida. Šių mokslo sričių moksliniuose tyrimuose naudojami: linijinės pelės BALB/c, CBA, DBA/2, CC57W, C57Bl/6J inbridinginių linijų, Wistar, Lewis populiacijos žiurkės, jūrų kiaulytės, triušiai išauginti mūsų centre.

Eksperimentų kokybė su jais priklauso nuo gyvūnų genotipo ir fenotipo, todėl nuolat atliekami genetiniai, klinikiniai, hematologiniai, imunologiniai, biocheminiai gyvūnų tyrimai. Reciprokinės izotransplantacijos metodu ir PGR metodais vertinamas inbridinginių gyvūnų genotipas, skaičiuojami inbridingo koeficientai, vedama linijų geneologija.

Biomodelių panaudojimas *in vitro* ir *in vivo* modelinėse sistemose:

1. Biologiškai aktyvių medžiagų, imunomoduliatorių tyrimai *in vivo* modelinėse sistemose (2017-2021 m.)

2. Ląstelių kultūrų panaudojimas biologiškai aktyvių medžiagų tyrimams (alternatyvių tyrimo metodų taikymas) (2017-2021 m.):

- imunomoduliacinėmis savybėmis pasižyminčių medžiagų tyrimai ląstelių kultūrose;

- ląstelių kultūrų panaudojimas ląstelių proliferacijos, diferenciacijos ir žūties mechanizmų tyrimams.

5.4. Biologinių jutiklių skirtų antígeno ir antikūno sąveikos registravimui kūrimas bei tobulinimas, atliekant kryptingą antikūnų imobilizavimą paviršiuje. Modifikuojant elektrodą fermentiniam biologiniam jutikliui, didelis dėmesys skiriamas tinkamų red-oks tarpininkų parinkimui bei fermento imobilizavimui. Geriausi biologiniai jutikliai bus iširti biologiniuose mėginiuose. 2017-2021 m.m.

I-as etapas 2017-2020 m.m.

Imuninių ir fermentinių biologinių jutiklių kūrimas.

II-as etapas 2020-2021 m.m.

Imuninių ir fermentinių biologinių jutiklių tyrimas biologiniuose mėginiuose.

## 6. Numatomi rezultatai (nurodyti kokie laukiami rezultatai)

- Remiantis tyrimų duomenimis sieksime įvertinti citotoksinių, dendritinių ir supresorinių reguliacinių ląstelių kiekybinius skirtumus bei jų imuninį atsaką slopinančias savybes (supresorinius receptorius) patologijų atvejais, lyginant su sveikais individais.
- Iširtas melatonino (ir galimai kitų ligandų) vaidmuo moduluojant imuninį atsaką.
- Tikimasi surasti alerginio kontaktinio dermatito diagnostikai vertingą žymenį.

- Pateikiami standartizuoti biomodeliai eksperimentams *in vivo*.
- Iširti nauji preparatai (sudaryti beta gliukanų pagrindu bendradarbiaujant su UAB „Biocentras“) išaiškintos jų imunomoduliacinės, priešartritinės, priešvėžinės savybės.
- Sukurti imuninių ir fermentinių biologinių jutiklių modeliai. Įvertintas jų tinkamumas analizei biologiniuose mėginiuose. Iširtas biologinių jutiklių jautris, nustatymo bei aptikimo ribos, stabilumas ir galimybė panaudoti daugkartiniams matavimams.
- Planuojame gautus rezultatus publikuoti ISI Web of Science sąrašo žurnaluose su citavimo indeksu po 3-4 straipsnius metuose.
- Plėtojamos biologijos krypties doktorantūros studijos, numatoma 4-6 doktorantai. Planuojama, kad šios programos rezultatų pagrindu bus apginta iki 4 mokslo daktaro disertacijų.

#### **7. Rezultatų sklaidos priemonės (rezultatų skelbimas, viešinimas ir populiarinimas)**

- Pranešimai bei dalyvavimas tarptautinėse mokslinėse konferencijose (ne mažiau kaip po 3 pranešimus kasmet).
- Programos vykdytojai aktyviai dalyvaus Lietuvos imunologų draugijos veikloje, viešindami savo veiklos rezultatus draugijos organizuojamuose renginiuose.
- Rezultatų sklaidos veikla apims ir kitas įprastas priemones: mokslo populiarinimo straipsnius populiarioje spaudoje, pasisakymus žiniasklaidai ir pan.

#### **8. Preliminarus programos lėšų paskirstymas (tūkst. Eur)**

Eil. Nr.	Išlaidų pavadinimas	2017 metais	2018 metais	2019 metais	2020 metais	2021 metais	Visai programai (suma)
1.	Programai skirti norminiai etatai, lėšos	9 etatai 86,3	9 etatai 86,3	9 etatai 86,3	9 etatai 86,3	9 etatai 86,3	431,5
2.	Kitos lėšos planuojamos programai vykdyti (iš kitų, institutui skirtų valstybės biudžeto bazinio finansavimo lėšų)	284,7	284,7	284,7	284,7	284,7	1 423,5
	Iš viso	371	371	371	371	371	1 855

#### **9. Programos trukmė 2017 - 2021 metai**

**10. Programos vadovas** dr. Mykolas Mauricas, Imunologijos skyriaus vedėjas, vyriausiasis mokslo darbuotojas, Tel.: (8 5) 2469248; E. paštas: [mykolas.mauricas@imcentras.lt](mailto:mykolas.mauricas@imcentras.lt)