

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

**ԴԱՎԹՅԱՆ ԱՐՓԻՆԵ ԱՐԱՅԻՎԻ**

ԲՆԱԿԱՆ ԻՄՈՒՆ ՊԱՏԱՍԽԱՆԻ ԽԹԱՆՄԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ  
ՀԱԿԱՌԻՌՈՒՑՔԱՅԻՆ ԻՄՈՒՆ ՊԱՏԱՍԽԱՆԻ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ԵՎ  
ՄԵՏԱՍՏԱԶՆԵՐԻ ԶԱՐԳԱՑՄԱՆ ՎՐԱ ԿՐԾՔԱԳԵՂՁԻ ՔԱՂՅԿԵՂԻ  
ՀԵՏՎԻՐԱՀԱՏԱԿԱՆ ՄՈՂԵԼՈՒՄ

Գ.00.06 - «Վիրուսաբանություն, իմունաբանություն» մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի  
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

**ՄԵՂՄԱԳԻՐ**

ԵՐԵՎԱՆ - 2015

---

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

**ДАВТЯН АРПИНЕ АРАИКОВНА**

ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯЦИИ ЕСТЕСТВЕННОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА  
РЕГУЛЯЦИЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУННОГО ОТВЕТА И РАЗВИТИЕ  
МЕТАСТАЗОВ НА ПОСТОПЕРАЦИОННОЙ МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности  
03.00.06 - «Вирусология, иммунология»

ЕРЕВАН - 2015

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԱՆ Ա.Բ. Սլեքսանյանի անվան համաճարակաբանության, վիրուսաբանության և բժշկական մակաբույծաբանության ԳՀԻ-ում:

Գիտական ղեկավար՝ կ.գ.դ. Տ.Կ. Դավթյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ բ.գ.դ., պրոֆ. Վ.Ա. Մկրտչյան  
կ.գ.թ. Ա.Գ. Սուքիասյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ «Մոլեկուլային կենսաբանության  
ինստիտուտ»

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2015թ. դեկտեմբերի 25-ին ժամը 16:00-ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուլքյան փողոց, 14, հեռ/ֆաքս (374 10) 65 41 80:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2015թ. նոյեմբերի 25-ին:

Մասնագիտական խորհրդի  
գիտական քարտուղար, կ.գ.թ. Գ.Ե. Ավետիսովա

---

Тема диссертации утверждена в НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии имени А.Б. Алексаняна МЗ РА.

Научный руководитель: д.б.н. Т.К. Давтян

Официальные оппоненты: д.м.н., проф. В.А. Мкртчян  
к.б.н. А.Г. Сукиасян

Ведущая организация: «Институт молекулярной биологии» НАН РА

Защита диссертации состоится 25 декабря 2015 г. в 16:00 часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел/факс (374 10) 65 41 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Автореферат разослан 25 ноября 2015г.

Ученый секретарь специализированного совета, к.б.н.

Г.Е. Аветисова

**Թեմայի արդիականությունը.** Կրծքագեղձի քաղցկեղը չարորակ նորագոյացություններով հիվանդությունների ընդհանուր կառուցվածքում գրավում է երկրորդ տեղը, զիջելով միայն թոքի քաղցկեղին, իսկ կանանց մոտ առաջին տեղը, կազմելով 19,5%: Հայաստանում կրծքագեղձի քաղցկեղի տեսակարար կշիռը տատանվում է 12-14,4%-ի սահմաններում: Ամեն տարի մեր հանրապետությունում արձանագրվում են կրծքագեղձի քաղցկեղով 750-850 առաջնային հիվանդներ, և ինչպես աշխարհի շատ երկրներում, Հայաստանում նույնպես նկատվում է հիվանդության ցուցանիշների աճ: Ներկայումս գոյություն ունեցող բուժման հիմնական եղանակներն են՝ վիրահատական միջամտությունը, ճառագայթումը, քիմիոթերապիան: Հիվանդության վաղ փուլերում արձանագրվում է բուժման բարձր արդյունավետություն, իսկ ուշ փուլերում պատկերը հակառակն է, հիվանդների ճնշող մեծամասնության մոտ ի հայտ է գալիս հիվանդության կրկնողություն ու մետաստազների առաջացում, որն էլ ի վերջո հանգեցնում է մահվան: Իմունոթերապիան համարվում է քաղցկեղի բուժման խոստումնալից ուղղություններից մեկը, որի միջոցով ակտիվացված իմունային բջիջները կարող են «հայտնաբերել և ոչնչացնել» ուռուցքային բջիջները:

Ցավոք սրտի, բազմաթիվ իմունոթերապեվտիկ միջամտություններ, որոնք դրական արդյունք են տվել նախակլինիկական հետազոտությունների փուլում, տապալվել են կամ շատ աննշան արդյունքներ են տվել կլինիկական հետազոտության փուլում (Rosenberg et. al., 2004): Դա պայմանավորված է մի քանի խնդիրներով: Գլխավոր խնդիրներից մեկն է առաջնային ուռուցքի կամ մետաստազների առկայությամբ պայմանավորված իմուն համակարգի սուպրեսիան: Քաղցկեղով հիվանդ մարդկանց, ինչպես նաև կենդանիների քաղցկեղային տարբեր մոդելների վրա ցույց են տրված իմուն համակարգի սուպրեսորային ակտիվությամբ բջջային պոպուլյացիաների (MDSC- միելոիդային ծագման սուպրեսորային բջիջներ, Tregs-T կարգավորիչ բջիջներ, U2 մակրոֆագեր) տոկոսային և բացարձակ քանակի աճ արյան մեջ և ամենատարբեր օրգաններում (Oikhanud et al., 2009; Sinha et al., 2005; Youn et al., 2008): Այս պայմաններում, երբ իմուն համակարգի ակտիվությունը ճնշված է, հակաուռուցքային թերապիան չի տալիս ցանկալի արդյունք:

Մյուս կարևոր խնդիրն այն է, որ կենդանիների շատ քիչ քաղցկեղային մոդելներ կան, որոնք առավելագույնս արտահայտում են մարդու մոտ հիվանդության ծագման և զարգացման փուլերը (Rosenberg et. Al., 2004): Մկների կրծքագեղձի քաղցկեղի 4Պ1 մոդելը պատկանում է դրանց թվին և քաղցկեղի զարգացման օրինաչափություններով, սպոնտան կերպով մետաստազներ առաջացնելու կարողությամբ նմանվում է մարդկանց մոտ զարգացող կրծքագեղձի քաղցկեղին: Միլլերի և կոլեգաների կողմից ցույց է տրվել, որ 4Պ1 բջջային գծի կրծքագեղձի կարցինոման օժտված է ուժեղ ուռուցքաառաջացնող հատկությամբ և թույլ իմունոգենությամբ:

Այս մոդելի մյուս կարևոր առավելությունը և առանձնահատկությունը կայանում է նրանում, որ, ինչպես մարդկանց մոտ, այն սպոնտան կերպով մետաստազներ է առաջացնում, որոնք հեմատոգեն կամ լիմֆոգեն ճանապարհներով տարածվում են և ախտահարում են տարբեր օրգաններ՝ թոքեր,

փայծաղ, ոսկրեր, ուղեղ և այլն: Առաջնային ուռուցքի հեռացումից հետո մկները վախճանվում են մետաստազային ախտահարումից: Այն բավականին լավ ուսումնասիրված մոդել է և շատ հետազոտողների կողմից օգտագործում է հակաուռուցքային թերապիաների փորձարկման համար: Չնայած կատարված մեծածավալ հետազոտությունների, (Aslakson and Miller, 1992; H Heppner et al., 2000; Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 2001) այս մոդելը ուսումնասիրված չի հետվիրահատական երկարաժամկետ կտրվածքում: Քանի որ քաղցկեղի բուժման գլխավոր մեթոդը ուռուցքի վիրահատական հեռացումն է, չափազանց կարևոր է կատարել հետվիրահատական փուլում իմունային համակարգի էֆֆեկտորային և սուպրեսորային բջջային պոպուլյացիաների երկարաժամկետ դինամիկ փոփոխությունների նկարագրությունը և դրան զուգահեռ մետաստազների զարգացման հետազոտությունը: Կրծքագեղձի քաղցկեղի կենդանական մոդելի վրա փորձարկվող բուժական միջամտության արդյունավետությունը գնահատելու համար, նպատակահարմար է որպես թիրախ դիտարկել մետաստատիկ ուռուցքային բջիջները, քանի որ մարդկանց մոտ որպես կանոն առաջնային ուռուցքը վիրահատական միջամտությամբ հեռացվում է և հիվանդների մահվան պատճառ են հանդիսանում առավելապես մետաստատիկ բջիջները: Այդ պատճառով առանձնակի հետաքրքրություն է ներկայացնում կրծքագեղձի 4Ց1 մոդելի վրա հետազոտել ուռուցքի վիրահատական հեռացումից հետո մետաստազների քանակի փոփոխությունը, ինչպես նաև գնահատել իմունաբանական սուպրեսորային և էֆֆեկտոր բջջային պոպուլյացիաների քանակական փոփոխությունները: Կենդանական մոդելի վրա իմունաբանական պոպուլյացիաների և մետաստազների առաջխաղացման հետվիրահատական դինամիկ փոփոխությունների հետազոտությունը և վիճակագրական հավաստի օրինաչափությունների արձանագրումը շատ կարևոր կողմնորոշիչ նշանակություն կարող են ունենալ ցանկացած տեսակի թերապևտիկ միջամտություններ կատարելիս ինչպես նախակլինիկական այնպես էլ կլինիկական փորձարկումներ իրականացնելիս:

Այս աշխատանքի մեջ ցույց է տրված, որ Immunomax® (IMM) հանդիսանում է TLR4 ազոնիստ: Այն ոչ տոկսիկ, բուսական ծագման ուժեղ իմունոխթանիչ է, որը ԱՊՀ 5 երկրներում, այդ թվում Հայաստանում, նշանակվում է ինֆեկցիոն հիվանդությունների ժամանակ եվ արդյունավետ լինելու դեպքում հեշտությամբ կարող է կիրառվել կլինիկական փորձարկումների համար

Հակաուռուցքային թերապիաների մեջ TLR4-ի դասական ազոնիստ հանդիսացող ԼՊՄ-ի կիրառումը, սահմանափակվում է նրա տոկսիկությամբ: Այս տեսանկյունից արդիական է այս աշխատանքի շրջանակներում կատարված TLR4-ի ազոնիստ հանդիսացող բուսական ծագման իմունոխթանիչ՝ IMM-ի հակաուռուցքային արդյունավետության գնահատումը կրծքագեղձի քաղցկեղի հետվիրահատական մոդելի վրա:

**Հետազոտության նպատակն է** ուսումնասիրել առաջնային ուռուցքի հեռացման ազդեցությունը հետվիրահատական փուլում մետաստազների ու իմուն համակարգի էֆֆեկտոր և կարգավորիչ բջջային պոպուլյացիաների դինամիկ փոփոխության վրա և գնահատել IMM-ի իմունոխթանիչի հակաուռուցքային ազդեցությունը հետվիրահատական մոդելի վրա:

## **Խնդիրները**

Վերոնշյալ նպատակին հասնելու համար առաջադրվել են հետևյալ խնդիրները

1. 4Թ1 բջջային գծի կիրառմամբ փորձարական կենդանիների մոտ մոդելավորել առաջնային ուռուցքի առաջացումը և գնահատել նախավիրահատական շրջանում թոքերում մետաստազների առաջացումը և մկների կենսունակությունը, ինչպես նաև ուսումնասիրել իմունային էֆֆեկտոր և սուպրեսոր պոպուլյացիաների քանակական տեղաշարժերը:
2. Գնահատել հետվիրահատական շրջանում ակտիվացած CD4, CD8 լիմֆոցիտների և սուպրեսորային MDSC, Treg-ների քանակի փոփոխության դինամիկական փայծաղում:
3. Պարզել հետվիրահատական շրջանում մկների թոքերում մետաստատիկ կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների փոփոխության դինամիկական և բնութագրել իմունային թերապիայի «Հնարավորության պատուհան» ժամանակահատվածը:
4. Ուսումնասիրել հետվիրահատական ժամանակահատվածում IMM-ի ազդեցությունը՝ գնահատելով մկների թոքերում կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների քանակը, մկների կենսունակությունը և փայծաղում, թոքերում էֆֆեկտորային և սուպրեսորային բջիջների քանակական տեղաշարժը:

## **Աշխատանքի գիտական նորույթը**

Առաջին անգամ 4Թ1 կրծքագեղձի քաղցկեղի մկնային մոդելի վրա երկարաժամկետ դինամիկայում ուսումնասիրվել է ուռուցքի վիրահատական հեռացման ազդեցությունը իմունային համակարգի սուպրեսորային և հակաուռուցքային էֆֆեկտոր բջիջների քանակության փոփոխման վրա:

Առաջին անգամ պարզաբանվել է, որ 4Թ1 ուռուցքակիր մկների մոտ միելոիդային սուպրեսորային բջիջների քանակությունը թոքերում և փայծաղում ուռուցքի աճին զուգընթաց կտրուկ կերպով հավաստիորեն աճում է ի համեմատ ոչ ուռուցքակիր մկների:

Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ հետվիրահատական ժամանակաշրջանում, ի համեմատ վիրահատության 0 օրվան տեղի է ունենում MDSC քանակության աստիճանական նվազում՝ հետվիրահատական 6րդ օրը հասնելով նվազագույն դրսևորման , որից հետո դիտարկվում է աստիճանական աճ՝ 30-33րդ օրերին արձանագրելով առավելագույն ցուցանիշը:

Առաջին անգամ հայտնաբերվել է, որ ուռուցքակիր մկների մոտ ուռուցքի չափերի մեծացման հետ (3.5-5 մմ և 10-15 մմ) հավաստիորեն նվազում է ակտիվացած CD4 և CD8 էֆֆեկտորային բջիջների քանակը փայծաղում:

Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ հետվիրահատական ժամանակաշրջանում ի համեմատ օր 0-ի ակտիվացած էֆֆեկտորային բջիջների տոկոսային քանակությունը հավաստի աճում է մինչև հետվիրահատական 17-20-րդ օրերը, այնուհետև դիտարկվում է բջիջների քանակության աստիճանական նվազում, միաժամանակ թոքերում դիտարկվում է կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների քանակության հավաստի դինամիկ աճ: Կենսունակության ցուցանիշը ուռուցքի վիրահատական հեռացման արդյունքում էականորեն չի բարելավվում և բոլոր

փորձարական կենդանիները, ինչպես ստուգիչ՝ ուռուցքակիր կենդանիները, վախճանվում են:

Առաջին անգամ պարզվել է, որ բուսական ծագման ոչ տոկսիկ IMM իմունոստիմուլյատորը հանդիսանում է TLR4 ազոնիստ և դրսևորում է արտահայտված հակաուռուցքային արդյունավետությունը *in vivo* պայմաններում:

### **Աշխատանքի կիրառական նշանակությունը**

4թ1 ուռուցքակիր մկների վրա կատարված հետազոտության արդյունքում՝ հետվիրահատական ժամանակահատվածում արձանագրված սուպրեսորային և հակաուռուցքային էֆֆեկտոր բջիջների դինամիկ փոփոխությունների օրինաչափությունների բացահայտումը շատ կարևոր կողմնորոշիչ նշանակություն կարող է ունենալ իմունային համակարգի հակաուռուցքային բջիջների ակտիվացմանն ուղղված դեղամիջոցների ազդեցության արդյունավետությունը գնահատման և արդյունավետության բարձրացման համար:

TLR4 ազոնիստ հանդիսացող IMM իմունոխթանիչի հակաուռուցքային արդյունավետության տվյալները նոր հնարավորություններ են ստեղծում կլինիկական փորձարկումներում վերջինիս կիրառման համար՝ որպես ադյուվանտ իմունոթերապևտիկ միջամտություններում համադրելով ավանդական բուժման սխեմաների հետ: Լրացուցիչ հետաքրքրություն ունի նաև IMM- ազդեցությունը սուպրեսորային MDSC տոկոսային քանակության նվազման վրա: Կարևոր է հասկանալ ազդեցության մեխանիզմները, ինչը հնարավորություն կտա թիրախային օգտագործել վերջինս՝ միելոիդային սուպրեսորային բջիջների ազդեցությունը չեզոքացնելու համար:

**Աշխատանքի նախաքննությունը:** Աշխատանքը նախաքննություն է անցել ՀՀ ԱՆ Ա.Բ. Ալեքսանյանի անվան համաձարակաբանության, վիրուսաբանության և բժշկական մակաբուժաբանության գիտահետազոտական ինստիտուտում:

**Գիտական հրապարակումները:** Ատենախոսության թեմայով գիտական հրապարակումները երեքն են:

**Ատենախոսության կառուցվածքը:** Ատենախոսությունը շարադրված է համակարգչային տեքստի 109 էջում, պարունակում է 20 նկար, 7 աղյուսակ, 1 գրաֆիկ, բաղկացած է հետևյալ բաժիններից՝ ներածություն, գրական ակնարկ, հետազոտության նյութն ու մեթոդները, ստացված արդյունքների շարադրում և քննարկում, եզրակացություններից, օգտագործված գրականության ցանկից (135), հապավումների ցանկից:

**Աշխատանքի կատարման վայրը:** Աշխատանքը կատարվել է ԱՄՆ-ի Կալիֆորնիա նահանգի, Հանտինգտոն Բիչ քաղաքի Մոլեկուլային բժշկության ինստիտուտում:

## **ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹՆ ՈՒ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ**

**Մկներ** Աշխատանքում օգտագործվել են 8-10 շաբաթական h2d հապլոտիպով BALB/c մկներ: ձեռք են բերվել Ջեկսոն լաբորատորիայից (Sacramento, CA): Կենդանիներ պահվել են հատուկ ջերմաստիճանային և լուսային կայուն ռեժիմով սենյակներում: Կենդանիների խնամքը կարգավորվում է Ազգային առողջապահության ինստիտուտի կողմից սահմանված կարգով և կենդանիների

խնամքի ինստիտուցիոնալ կոմիտեի (IACUC) հաստատած պրոտոկոլով, Իրվայնի Կալիֆորնիայի համալսարանում:

**Բջջային գծեր** HEK-Blue® գենային ինժեներիայի միջոցով մոդիֆիկացիայի ենթարկված HEK 293 բջջային գծի հավաքածու է (InvivoGen, ԱՄՆ): Վերջիններս կայուն էքսպրեսիայի են ենթարկում որևէ TLR գեն և NF-κB-կախյալ SEAP (սաղմնային ալկալին ֆոսֆատազը), հաղորդիչ գենը: SEAP գենի էքսպրեսիան հայտնաբերվում է հատուկ QUANTI-Blue™ կամ HEK-Blue™ լուծույթներով: Այս աշխատանքի մեջ օգտագործվել են HEK-Blue-hTLR2/CD14, HEK-Blue-TLR3, HEK-Blue-TLR4/CD14-MD2, HEK-Blue-TLR5, HEK-Blue-TLR7, HEK-Blue-TLR8, HEK-Blue-TLR9 բջիջներ, որոնք համապատասխանաբար էքսպրեսիայի են ենթարկում TLR 2,3,4,5,7,8 կամ 9 գեները:

**Ուռուցքային բջիջների աճեցում և ներարկումը:** 4Ց1 բիջները աճեցվել են RPMI-10, 10% շիճուկի միջավայրում: Ուռուցքային բջիջներ սուսպենզիան (1.5x10<sup>6</sup>բջիջ 50մլլ-ում) զգուշորեն ներարկվել է կրծքագեղձի մաշկի տակ: Ուռուցքի տրամագծի (ՈԻՏ) արժեքը սահմանվել է որպես ուռուցքի 2 իրար ուղղահայաց ամենաերկար չափումների (a, b) բազմապատիկը քառակուսի արմատի տակ √ab: Ուռուցքի տրամագիծը՝ 2-3, 3,5-5, 10-15մմ-ի հասնելիս, մկների կյանքը ընդհատվել է և փայծաղն ու թոքերը հեռացվել են հետագա հետազոտությունների համար(Mkrtichyan et al., 2008):

**Մետաստատիկ թեստ:** Թոքերը ստերիլ պայմաններում հեռացվել են, քայքայվել կոլագենազ VI-ի միջոցով (1մգ/մլ ՖԱԼ) 4°C, 75րոպե: Այնուհետև անցկացվել է 70մկմ քամիչի միջով, բջիջները լվացվել են ՖԱԼ-ով և 14 օր աճեցվել 6-թիոգուանին պարունակող բջջային միջավայրում (RPMI-1640): 4Ց1-ի գաղութները ֆիքսվել են մեթանոլով և ներկվել 0,03% մեթիլեն կապույտի լուծույթով, հաշվվել է ուռուցքային բջիջների կապույտ գաղութների քանակը(Mkrtichyan et al., 2008):

**Մկների թոքերից մոնոնուկլեար բջիջների անջատումը** Մկները անեստեզիայի և էֆտանազիայի են ենթարկվել 40մգ/կգ նեմբուրալի միջոցով, այնուհետև սառը ՖԱԼ-ով ենթարկվել են թոքերի տրանսկարդիալ պերֆուզիայի: Թոքերը ասեպտիկ պայմաններում հեռացվել են մոնոնուկլեար բջիջների անջատման համար: Հաջորդիվ ենթարկվել են քայքայման կոլագենազ VI-ի: Թոքային մոնոնուկլեար բջիջները անջատվել են գրադիենտային ցենտրիֆուգման եղանակով՝ օգտագործելով Ֆիկոլ (խտությունը 1.077գ/լ)(Ghochikyan et al., 2014a):

**Ուռուցքի վիրահատական հեռացում** Վիրահատությունը կատարվել է մկներին իզոֆլուրանով անեստեզիայի ենթարկելուց հետո: Ցավազրկման համար մեջքի հատվածում ներարկվել է կետոպրոֆեն (6մգ/կգ): Վիրահատական հատվածը հաջորդաբար ախտազերծվել է բետադին վիրահատական մածուկով, այնուհետև 85%-անոց իզոպրոպանոլով, ախտազերծման գործընթացը կրկնվել է 3 անգամ: Ուռուցքը հեռացվել է բուրձ կտրման եղանակով: Վերքը փակվել է չժանգոտվող սեղմակներով: Մկները տեղափոխվել են չոր և տաք մակերես և գտնվել հսկողության ներքո հետվիրահատական վերականգնողական շրջանում: Մաշկը իրար միացնող սեղմակները հեռացվել են 10-14-րդ օրերում: Ապահովվել է մկների հետվիրահատական 100 % կենսունակությունը: 5 %-ի մոտ ի հայտ է եկել երկրորդային ուռուցք, այդ մկները հեռացվել են փորձից (Ghochikyan et al., 2014b):

**Քանակական հոսքային ցիտոֆյուրիմետրիայի միջոցով մակերեսային և ներբջջային մարկերների որոշումը** Մկների փայծաղները հեռացվել են ասեպտիկ

պայմաններում: Մոնոնուկլեար բջիջները անջատվել են ստանդարտ եղանակով: Մեկ անգամ ՖԱԼ-ով լվանալուց հետո բջջային նստվածքին ավելացվել է 3մլ էրիթրոցիտների քայքայման լուծույթ: Մակերեսային մարկերներով ներկումը կատարվել է CD4-vioblu, CD8-PE, CD3-PerCP, CD69-FITC, GR1-FITC, CD11b-APC, առնետի IgG2a(κ)-FITC իզոտիպ ստուգիչ , հայկական դաշտամկան IgG-FITC իզոտիպ ստուգիչ, առնետի IgG2a(κ)-PE իզոտիպ ստուգիչ , հակամարմիններով՝ ըստ արտադրողի տեխնիկական ցուցումների, 20ր +4°C-ում կատարվել է ինկուբացիա: Ներբջջային ներկման համար բջիջները մշակվել են 100մկլ IC (ebioscience) լուծույթով՝ բջջաթաղանթի թափանցելիության մեծացման համար: Այնուհետև ներկվել են են Foxp3-FITC հակամարմնով: Տվյալները մշակվել են FlowJo 7.6.5 ծրագրային փաթեթով(Ghochikyan et al., 2014b):

**In vitro պայմաններում NF-kB ակտիվացման որոշումը:** NF-kB տրանսկրիպցիոն գործոնի ակտիվացումը գնահատվել է HEK293-կապույտ բջիջների միջոցով: Հայտնի TLR գենի էքսպրեսիայով HEK293 բջիջները ինկուբացվում են տարբեր TLR լիգանդների կամ IMM-ի առկայությամբ 5% CO<sub>2</sub>, 37°C-ի պայմաններում: NF-kB տրանսկրիպցիոն գործոնից կախված սադմային ալակալին ֆոսֆատազ(SEAP) գենի ակտիվացումը գնահատվում է արտազատված սպիտակուցի ֆերմենտային ակտիվության որոշմամբ (Tukhvatulin et al., 2013):

**Մաթեմատիկական անալիզներ և տվյալների վիճակագրական մշակում:** Մտացված տվյալների մաթեմատիկական անալիզը կատարվել է OriginPro ծրագրով: Բոլոր վիճակագրական տվյալները մշակվել են օգտագործելով GraphPad Prism 5,0 ծրագրային փաթեթը: Խմբերի միջև վիճակագրական հավաստի տարբերությունը սահմանվել է Թ- թեսթով (P<0.05, համարվում է հավաստի): Կենսունակության կորերը կազմվել են և համեմատվել են օգտագործելով Լոգ-Ռենք (Մանթել-Կոքս) թեսթը:

## ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ

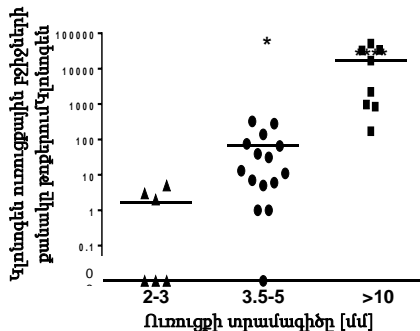
### **Գլուխ 1. Կրծքագեղձի քաղցկեղի 4Ց1 մոդելի նկարագրությունը:**

4Ց1 կրծքագեղձի քաղցկեղի մոդելը մի քանի սկզբունքային չափանիշներով բավարարում է կրծքագեղձի քաղցկեղի կենդանական մոդելներին ներկայացվող պահանջներին, այն է՝ հեմատոգեն, լիմֆոգեն ճանապարհներով սպոնտան կերպով մետաստազներ է առաջացնում ամենատարբեր օրգաններում՝ ընդհուպ մինչև ախտահարելով կենտրոնական նյարդային համակարգը և ոսկորները: 4Ց1 ուռուցքային բջիջները օժտված են ուժեղ ուռուցքաառաջացնող հատկությամբ և թույլ իմունոգենությամբ: Իր այս հատկություններով նմանակելով մարդկանց մոտ զարգացող հիվանդության ազդեսիվ ընթացքը, այն անփոխարինելի է դառնում նախակլինիկական հետազոտություններ իրականացնելու և հակաուռուցքային ազդեցության արդյունավետության գնահատման համար: Այս պատճառով վերջինիս համակողմանի ուսումնասիրությունը նախավիրաբախատական և հետվիրաբախատական ժամանակահատվածներում արդիական և կարևոր նշանակություն ունի: Այս հետազոտության սահմաններում 4Ց1 բջջային գծի կիրառմամբ փորձարական կենդանիների մոտ մոդելավորվել է առաջնային ուռուցքի առաջացումը և գնահատվել է նախավիրաբախատական շրջանում թոքերում մետաստազների առաջացումը և մկների կենսունակությունը: Բուժական



միջամտության ազդեցությունը մետաստազների վրա գնահատելու համար անհրաժեշտ է գտնել առաջնային ուռուցքի այն չափը որի ժամանակ բոլոր մկների մոտ հայտնաբերվում են մետաստազներ օրգաններում: Այդ նպատակով առանձնացվել է երեք խումբ՝ առաջինը՝ 2-3մմ ուռուցքի տրամագծով (ՌԻՏ) մկները, երկրորդը՝ 3.5-5մմ, երրորդ խումբ  $>10$ մմ: Ուռուցքակիր մկների մոտ ցույց է տրվել կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների քանակությունը թոքերում, ինչպես նաև իմունային սուպրեսոր բջիջների և էֆֆեկտոր T բջիջների քանակական փոփոխությունները փայծաղում և թոքերում՝ կախված ուռուցքի չափերից: 2-3մմ ուռուցքի տրամագծով 6 մկներից միայն 3-ի մոտ են թոքերում հայտնաբերվել մետաստազներ (նկար 1): 3.5-5մմ ուռուցքի տրամագծի ունեցող 15 մկներից միայն մեկի մոտ թոքերում կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջներ չեն հայտնաբերվել, իսկ 3րդ խմբի բոլոր մկների թոքերում հայտնաբերվել են մետաստազներ:

**Նկար 1** Կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների քանակը ուռուցքակիր մկների թոքերում



Հավաստիությունը հաշվարկվել է Անովա համմեմատության թեստով

Հաջորդիվ ուսումնասիրվել է ուռուցքակիր մկների թոքերում և փայծաղում իմունոսուպրեսորային MDSC-իների և Treg-ների բջջային պոպուլյացիաների քանակական հարաբերակցությունները և դրանց փոփոխման օրինաչափությունները: Ինչպես ցույց է տրված աղուսյակ 1-ում 2-3մմ ուռուցքակիր մկների փայծաղում MDSC-իների տոկոսային քանակությունը չի տարբերվում ստուգիչ՝ ոչ ուռուցքակիր մկներից: Միևնույն ժամանակ նույն կենդանիների թոքերում միելոիդային սուպրեսորային բջջային պոպուլյացիայի քանակությունը հավաստիորեն բարձր է ոչ ուռուցքակիր մկների համապատասխան ցուցանիշից: 3.5-5մմ ուռուցքակիր մկների մոտ MDSC-իների քանակությունը փայծաղում և թոքերում 3,5 և 5 անգամ բարձր է ոչ ուռուցքակիր մկների համապատասխան ցուցանիշներից: Այդ թիվը շարունակում է աճել ուռուցքի մեծացմանը զուգահեռ,  $>10$ մմ ուռուցքակիր մկների մոտ կազմելով փայծաղում և թոքերում ամբողջ մոնոնուկլեար բջիջների 40% և 64% համապատասխանաբար (աղյուսակ1): Գոյություն ունի դրական կորելյացիա ուռուցքի չափերի և թոքերում ( $R = 0.97$ ,  $***P < 0.001$  և  $R = 0.91$ ,  $***P < 0.001$ ) ու փայծաղում ( $R = 0.9813$ ,  $***P < 0.001$  և  $R = 0.94$ ,  $***P < 0.001$ ) MDSC-իների բացարձակ թվի և տոկոսային քանակության միջև համապատասխանաբար: Ուռուցքակիր և առանց ուռուցքի մկների փայծաղում Treg

բջջային պոպուլյացիայի տոկոսային քանակությունների միջև տարբերություն չի արձանագրվել (աղյուսակ 1): Հակառակ պատկերն է դիտվում թոքերում՝ Treg բջջային պոպուլյացիաների տոկոսային քանակություն ի տարբերություն ստուգիչ մկների, հավաստիորեն աճում է՝ 2-3մմ- 2.8%, 3.5-5մմ- 3.7%, իսկ 10-15մմ ուռուցքով մկների մոտ հասնում է 8,7%-ի (աղյուսակ 1):

**Աղյուսակ 1 Սուպրեսոր բջջիների քանակությունը ուռուցքակիր մկների մոտ**

( <i>%</i> ) Սուպրեսորային բջջիներ		Ոչ ուռուցքակիր	Ուռուցքակիր		
			2-3 mm	3.5-5mm	10-15 mm
MDSC	Փայծաղ	2.4±0.17 n=21	2.7±0.3 <sup>ns</sup> n=18	8.3±0.38 <sup>***</sup> n=22	40±1.04 <sup>***</sup> n=12
	Թոքեր	2.9±0.63 n=12	5.3±0.48* n=7	15±1.4 <sup>***</sup> n=14	64±1.9 <sup>***</sup> n=9
Tregs	Փայծաղ	9.5±0.31 n=21	10±0.3 <sup>ns</sup> n=11	9.5±0.23 <sup>ns</sup> n=22	9.5±0.32 <sup>ns</sup> n=12
	Թոքեր	1.7±0.3 n=12	2.8±0.95 <sup>ns</sup> n=6	3.7±0.63 <sup>**</sup> n=6	8.7±1.7 <sup>***</sup> n=7

Հավաստիությունը հաշվարկվել է t թեստով ոչ ուռուցքակիր մկների նկատմամբ

**Աղյուսակ 2 Ակտիվացած էֆֆեկտոր բջջիների քանակությունը ուռուցքակիր մկների մոտ**

( <i>%</i> ) Ակտիվացած էֆֆեկտոր բջջիներ		Ոչ ուռուցքակիր	Ուռուցքակիր		
			2-3 մմ	3.5-5մմ	10-15 մմ
ակտիվացված CD4	Փայծաղ	2.9±0.15 n=20	3.4±0.14* n=11	2.0±0.085 <sup>***</sup> n=19	2.1±0.15 <sup>**</sup> n=8
	Թոքեր	1.5±0.51 n=7	1.6±0.78 <sup>ns</sup> n=7	4.1±0.6 <sup>**</sup> n=6	1.5±0.23 <sup>ns</sup> n=8
ակտիվացված CD8	Փայծաղ	2.6±0.13 n=20	2.4±0.081 <sup>ns</sup> n=11	2.0±0.078 <sup>***</sup> n=19	2.1±0.15 <sup>ns</sup> n=8
	Թոքեր	0.75±0.35 n=7	2.8±1.3 <sup>ns</sup> n=7	6.2±1.5 <sup>**</sup> n=6	3.8±0.98* n=8

Հավաստիությունը հաշվարկվել է t թեստով ոչ ուռուցքակիր մկների նկատմամբ

\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, ns-վիճակագրորեն ոչ հավաստի:

Ակտիվացված լիմֆոցիտները որոշվել են CD69 մակերեսային մարկերով: 2-3մմ ուռուցքի տրամագծով ուռուցքակիր մկների մոտ ակտիվացված CD4 բջջային պոպուլյացիան փայծաղում հավաստիորեն բարձր է ոչ ուռուցքակիր մկների մոտ արձանագրված համապատասխան ցուցանիշից: Ուռուցքի մեծացմանը զուգընթաց՝ 3.5-5մմ, 10-15մմ ուռուցքակիր մկների մոտ նկատվում է այդ ցուցանիշի հավաստի նվազում համեմատած ստուգիչ՝ ոչ ուռուցքակիր մկների հետ (ոչ ուռուցքակիր մկներ՝ 2.9±0.15 , ուռուցքակիր 3.5-5մմ՝ 2.0±0.085 10-15մմ՝ 2.1±0.15) (աղյուսակ 2): CD8 բջջիների տոկոսային քանակությունը 2-3մմ ՈՒՏ-ով մկների մոտ չի տարբերվում ստուգիչ մկներից, ուռուցքի աճին համապատասխան փոքրանում է՝ հասնելով նվազագույնին 3.5-5մմ ուռուցքակիր մկների մոտ (ուռուցքակիր 3.5-5մմ՝ 2.0±0.78, ոչ ուռուցքակիր՝ 2.6±0.13 P<0.01<sup>\*\*\*</sup>) (աղյուսակ 2):

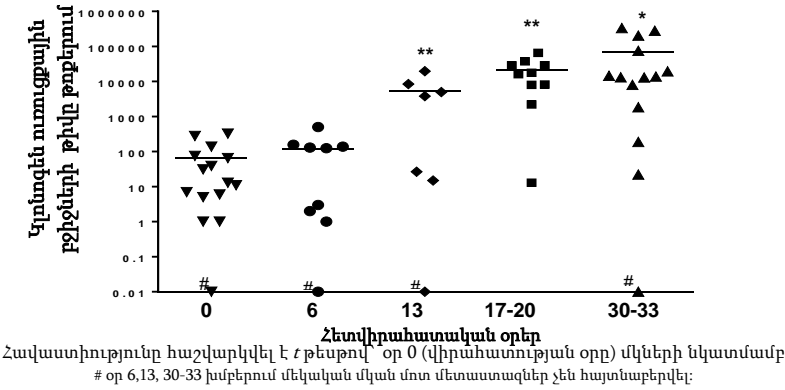
Այսպիսով մեր կատարած հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ ուռուցքի աճին զուգընթաց մկների մոտ թոքերում հայտանբերվող կլոնառաջացնող ուռուցքային

բջիջների քանակը ավելանում է, դրան գուցահեռ տեղի է ունենում նաև թոքերում և փայծաղում իմունոսուպրեսորային միելոիդային բջջային պոպուլյացիայի դրամատիկ աճ: Ուռուցքի առաջիադացման հետ T-կարգավորիչ սուպրեսորային բջջային պոպուլյացիայի քանակական աճ է դիտարկվում թոքերում, իսկ փայծաղում այդ ցուցանիշը մնում է անփոփոխ՝ չտարբերվելով ոչ ուռուցքակիր մկներից: Միաժամանակ, իմուն համակարգի էֆֆեկտորային հակաուռուցքային CD8 և CD4 բջիջների քանակի հավաստի նվազում է արձանագրվում ուռուցքակիր մկների փայծաղի մոնոնուկլեար բջջային պոպուլյացիայում:

**Գլուխ 2 Հետվիրահատական մոդելի նկարագրությունը:**

Կրծքագեղձի քաղցկեղի հետվիրահատական մոդելի ուսումնասիրության համար, հարկավոր է ի սկզբանե արձանագրել առաջնային ուռուցքի այն չափ, որի ժամանակ մետաստազները արդեն տարածված կլինեն տարբեր օրգաններում և մեթոդի զգայունությունը հնարավորություն կտա դրանք հայտնաբերել: Ուռուցքի, պայմանականորեն փոքր, միջին և մեծ չափերով մկների մոտ՝ հետազոտելով մետաստազների թոքերում տարածվելու քանակական օրինաչափությունները, արձանագրեցինք, որ միջին չափի՝ 3,5-5մմ\*\* ուռուցքի տրամագծով ուռուցքակիր մկների 93%-ի մոտ հայտնաբերվում են մետաստազներ: Ուռուցքի այս չափը ընտրվել է վիրահատական միջամտությամբ առաջնային ուռուցքի հեռացման և մետաստատիկ մոդելի վրա հետազոտություններ կատարելու համար: BALB/c 3.5-5մմ ուռուցքակիր մկները ենթարկվել են ուռուցքի վիրահատական հեռացման և համապատասխանաբար հետվիրահատական 0,2,4,6, 13, 17- 20, 30-33 օրերին մկների կյանքը ընդհատվել է և կատարվել են տարբեր հետազոտությունները: Կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների քանակը թոքերում հետազոտվել է վիրահատության օրը՝ օր 0 և ուռուցքի վիրահատական հեռացումից 6, 13, 17-20, 30-33 օր հետո (նկար 2): Ինչպես երևում է նկարից կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների քանակը թոքերում հետզհետե հավաստիորեն աճում է (հետվիրահատական 0, 6, 13, 17-20, 30-33-երորդ օրերին համապատասխանաբար՝ 67±27, 118±53ns, 5274±2680\*\*, 21301±6271\*\*\*, 69742±30556\*), վկայելով այն մասին, որ ուռուցքի հեռացումը չի խոչընդոտում մետաստազների զարգացմանը և իմունային բջիջները չեն կարողանում հայտնաբերել և ոչնչացնել միկրոմետաստատիկ ուռուցքային բջիջներին (Ghochikvan et al.. 2014a):

**Նկար 2** Կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջները հետվիրահատական մկների թոքերում



Բուննոտուարեաք MDSC-ների պոպուլյացիան հետազոտվել է ուռուցքի վիրահատական հեռացման տարբեր ժամանակահատվածներում ընդգրկելով օր 0-ից (վիրահատության օրը) մինչև օր 30-33 հետվիրահատական ժամանակաշրջան (աղյուսակ 3): 3.5-5մմ ուռուցքակիր մկների մոտ MDSC-ի տոկոսային քանակությունը հավաստիորեն բարձր է համեմատած ոչ ուռուցքակիր մկների հետ: Հետաքրքիր է արձանագրել, որ վիրահատությունից հետո նկատվում է MDSC-իների քանակության աստիճանական նվազում: Հետվիրահատական 2րդ օրվա մկների մոտ այս ցուցանիշը ( $7.2 \pm 0.63, n=15$ ) դեռևս հավաստիորեն չի տարբերվում վիրահատության 0 օրվանից ( $8.2 \pm 0.38, n=22$ ): Սկսած հետվիրահատական 4րդ օրվանից MDSC-ների քանակությունը հավաստիորեն նվազում է, հետվիրահատական 6րդ օրը այս ցուցանիշը ( $3.5 \pm 0.26, n=15, ***P$ ) հավաստի կերպով նվազագույնն է ուսումնասիրված հետվիրահատական ամբողջ ժամանակահատվածում (աղյուսակ 3): Հետվիրահատական 6-րդ օրվա մկների 53 %-ի մոտ MDSC-ների քանակությունը ցածր է կամ հավասար ոչ ուռուցքակիր մկների մոտ արձանագրված համապատասխան ցուցանիշի միջին արժեքից: Հետվիրահատական 13րդ օրվանից հետո մկների մոտ նկատվում է հակառակ գործընթացը՝ փայծաղում MDSC-իների քանակությունը սկսում է բարձրանալ ( $5.5 \pm 0.5, n=7, ***P$ ), չնայած, որ դեռ մնում է հավաստիորեն ցածր ի համեմատ օր 0-ի համապատասխան ցուցանիշից: 17-20րդ օրը MDSC-իների քանակը ( $12 \pm 2.3, n=15, *P$ ) փայծաղում հավաստիորեն բարձր է 3.5-5մմ ուռուցքակիր մկների համապատասխան ցուցանիշից, 30-33րդ օրերը՝ աճման օրինաչափությունը պահպանվում է, հասնելով հետվիրահատական ժամանակաշրջանում այս ցուցանիշի առավելագույն արժեքին ( $15 \pm 4, n=9, *P$ ): Սուպրեսորային Treg-ների քանակությունը, ինչպես ուռուցքակիր մկների այնպես էլ հետվիրահատական մկների մոտ չի տարբերվում ոչ ուռուցքակիր մկների մոտ գրանցված արդյունքներից:

**Աղյուսակ 3 Հետվիրահատական օրերում MDSC և Treg-ների քանակության փոփոխությունները փայծաղում**

%	Ոչ-ուռուցքակիր	Հետվիրահատական օրեր						
		0	2	4	6	13	17-20	30-33
<b>MDSC</b>	$2.4 \pm 0.1^{***}$ <i>n=21</i>	$8.3 \pm 0.3$ <i>n=22</i>	$7.2 \pm 0.6^{ns}$ <i>n=15</i>	$5.4 \pm 0.9^{**}$ <i>n=12</i>	$3.5 \pm 0.2^{***}$ <i>n=15</i>	$5.5 \pm 0.5^{***}$ <i>n=7</i>	$12 \pm 2.3^*$ <i>n=15</i>	$15 \pm 4^*$ <i>n=9</i>
<b>Treg</b>	$9.5 \pm 0.3^{ns}$ <i>n=22</i>	$9.5 \pm 0.2$ <i>n=22</i>	$8.5 \pm 0.4^{ns}$ <i>n=14</i>	$10.1 \pm 0.4^{ns}$ <i>n=11</i>	$9.8 \pm 1.4^{ns}$ <i>n=6</i>	$8.7 \pm 0.3^{ns}$ <i>n=7</i>	$9.9 \pm 0.3^{ns}$ <i>n=15</i>	$9.5 \pm 0.8^{ns}$ <i>n=9</i>

Հավաստիությունը հաշվարկվել է t թեստով՝ օր 0-ի նկատմամբ

Հաջորդիվ ուսումնասիրել ենք ակտիվացված CD4 և CD8 պոպուլյացիաների փոփոխությունը ուռուցքի վիրահատական հեռացումից հետո ընկած ժամանակահատվածում (աղյուսակ 4): Ինչպես երևում է աղյուսակ 4-ից, օր 0 ում ակտիվացված CD4 բջջային պոպուլյացիայի տոկոսային քանակությունը ( $2.0 \pm 0.08, n=19, ***P$ ) հավաստիորեն ցածր է ոչ ուռուցքակիր մկների մոտ արձանագրված համապատասխան ցուցանիշից: Հետվիրահատական 2րդ օրը նկատվում է աճ

( $2.9 \pm 0.11$ ,  $n=14$ , \*\*\*P), որն արժեքայես չի տարբերվում ոչ ուռուցքակիր մկների համապատասխան ցուցանիշից ( $2.9 \pm 0.15$ ,  $n=20$ ) , այդ աճը շարունակվում է, հասնելով առավելագույն արժեքին օր 6ին ( $3.9 \pm 0.23$ ,  $n=6$ ) և 13ին ( $3.9 \pm 0.13$ ,  $n=7$ ) , ապա սկսում է նվազել օր 17-ից ( $3.6 \pm 0.25$ ,  $n=15$ ) մինչև օր 33 ( $2.5 \pm 0.14$ ,  $n=9$ ), բայց մնում է հավաստիորեն բարձր օր 0ից (աղյուսակ 4): Ակտիվացած CD8-ի փոփոխությունը կատարվում է նույն սկզբունքով և հաջորդականությամբ, այն տարբերությամբ, որ ակտիվացած ակտիվացած CD8 պոպուլյացիան հետվիրահատական 30-33-երորդ օրերին նվազում է ( $1.8 \pm 0.2$ ,  $n=9$ ), ` մոտենալով օր 0-ի ցուցանիշին (աղյուսակ 4): Այսպիսով, հետվիրահատական շրջանում իմունային բջջային պոպուլյացիաները քանակական դինամիկ փոփոխությունների են ենթարկվում, մասնավորապես MDSC-իները քանակապես միառժամանակ նվազում են՝ հասնելով նայիվ մկների ցուցանիշին, թոքերում մետաստազների աճին զուգընթաց վերջիններիս քանակական գերակայությունը վերահաստատվում է: Ի հակառակ սրա ակտիվացած էֆֆեկտորային CD4, CD8 բջջային պոպուլյացիաները ժամանակավորապես՝ քանակական աճ են արձանագրում:

**Աղյուսակ 4**

**Հետվիրահատական օրերում ակտիվացած T լիմֆոցիտների քանակության փոփոխությունը**

(%) CD69+	Ոչ ուռուցքակ իր	Հետվիրահատական օրեր						
		0	2	4	6	13	17-20	30-33
<b>CD4</b>	$2.9 \pm 0.1^{***}$ $n=20$	$2.0 \pm 0.8$ $n=19$	$2.9 \pm 0.1^{**}$ $n=14$	$3.3 \pm 0.1^{***}$ $n=12$	$3.9 \pm 0.2^{***}$ $n=6$	$3.9 \pm 0.1^{***}$ $n=7$	$3.6 \pm 0.2^{***}$ $n=15$	$2.5 \pm 0.1^*$ $n=9$
<b>CD8</b>	$2.6 \pm 0.1^{***}$ $n=20$	$2.0 \pm 0.7$ $n=19$	$2.7 \pm 0.1^{***}$ $n=14$	$3.1 \pm 0.2^{***}$ $n=12$	$2.9 \pm 0.1^{**}$ $n=6$	$3.0 \pm 0.09^*$ $n=7$	$2.5 \pm 0.1^{***}$ $n=15$	$1.8 \pm 0.2^{ns}$ $n=9$

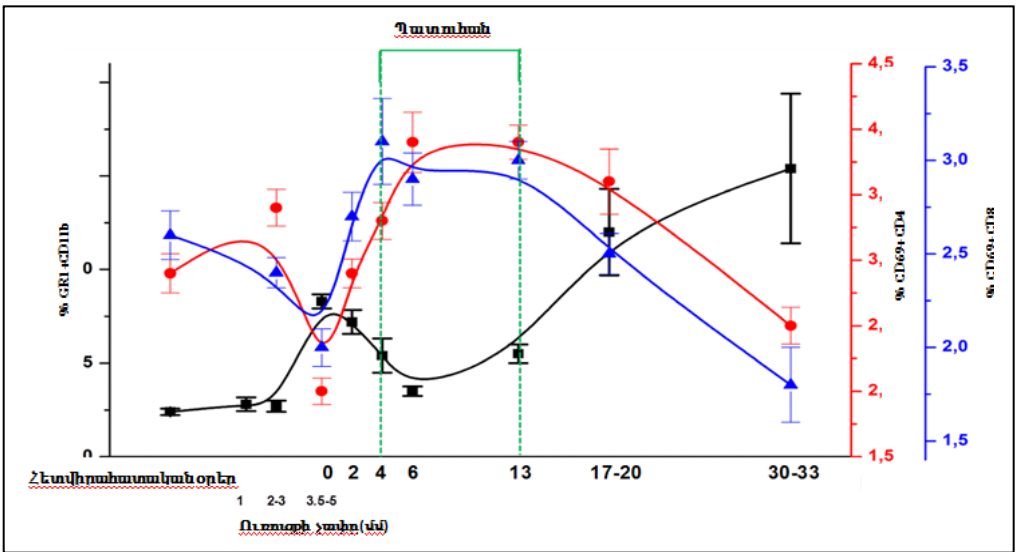
Հավաստիությունը հաշվարկվել է *t* թեստով՝ օր 0-ի նկատմամբ

**Իմունոթերապիայի «հնարավորության պատուհան»-ի նկարագրությունը:**

Բազմաթիվ հետազոտողների կողմից ցույց է տրվել, որ ուռուցքակիր կենդանիների ու մարդկանց մոտ առկա է ուռուցքով պայմանավորված իմունոսուպրեսիա, ինչի պայմաններում իմունոթերապիայի միջամտությունները ցանկալի արդյունավետություն չեն դրսևորում: Վերջիններիս արդյունավետությունն ապահովելու համար արդիական ու սկզբունքային նշանակություն ունի պարզել, թե առաջնային ուռուցքի հեռացումից հետո, առկա մետաստատիկ ախտահարման պայմաններում ինչպես և ինչ փոփոխությունների են ենթարկվում իմունոսուպրեսորային պոպուլյացիաները: Այդ նպատակով 4Թ1 կրծքագեղձի քաղցկեղի կենդանական մոդելի վրա կատարվել է հետվիրահատական ամբողջ ժամանակահատվածի իմունային տարբեր պոպուլյացիաների քանակական դինամիկ տեղաշարժերի ուսումնասիրություն: Հետազոտությունները կատարվել են հետվիրահատական 0, 2, 4, 6, 13, 17-20 և 30-33երերդ օրերին, արձանագրվել է, որ MDSC-իների քանակությունը 4, 6, 13րդ օրերում հավաստի ցածր է ի համեմատ օր 0-ի: Ժամանակային այս միջակայքը օր 4ից մինչև 13, կարող է համարվել այն «պատուհանը», որը բնորոշվում է սուպրեսորային MDSC-ների հավաստի ցածր

քանակությամբ: Ակտիվացած CD4 բջիջների քանակությունը հետվիրահատական 2րդ օրվանից մինչև 30-33րդ օրերը հավաստի բարձր է ի համեմատ օր 0-ի: Արձանագրվել է նաև ակտիվացած CD8 բջիջների քանակության աճ՝ հետվիրահատական 2րդ օրվանից մինչև 17-20րդ օրերը: Իմուն համակարգի վերոնշյալ սուպրեսորային և էֆֆեկտորային բաղադրիչների քանակական տվյալները վերադրվել են, նպատակ ունենալով հասկանալ այդ իմունային բջիջների միջև կապը և ուռուցքի վիրահատական հեռացման ազդեցությունը վերջիններիս վրա: Տվյալների վերադրման և մաթեմատիկական անալիզի արդյունքում արձանագրվում է, որ հետվիրահատական ժամանանակահատվածում (օր 0-33) տարբերակվում է այսպես կոչված «հնարավորության պատուհան» ժամանակային տիրույթը, որտեղ ուռուցքով պայմանավորված իմունոսուպրեսիան առժամանակ տեղի է տալիս, փոխարենը ակտիվացած T լիմֆոցիտների քանակությունը ավելանում է:

**Նկար 3 Իմունոթերապիայի «հնարավորության պատուհան»**



Ուռուցքակիր օրգանիզմներին բնորոշ ընդհանուր իմունոսուպրեսիայի պայմաններում այսպիսի «պատուհան»-ի առկայությունը իրական հնարավորություն կարող է դառնալ լրացուցիչ ակտիվացմամբ իմունային համակարգի հակաուռուցքային գործառույթների վերականգնման և այդպիսով հակաուռուցքային իմունոթերապևտիկ միջամտությունների արդյունավետության բարձրացման հարցում:

Ժամանակային այդ տիրույթի ճշգրիտ սահմանները որոշելու համար տվյալները ենթարկվել են մաթեմատիկական անալիզի: Փորձարարական տվյալները պոլինոմիալ ֆունկցիայի միջոցով մոտարկվել են: Մաթեմատիկական վերլուծությունների արդյունքում հաստատվել է MDSC-ի նվազման և ակտիվացած T բջիջների քանակի աճի տիրույթները 95% դեպքերում: Վերջիններս գրանցվել են MDSC-ի, ակտիվացած CD4-ի, CD8-ի համար համապատասխանաբար 2.4 - 13.3, 1.8 -

26.1 և 2.1- 16.8 օրերի միջև: Բոլոր երեք ֆունկցիաներում նշանակալի փոփոխությունների համընկման տիրույթը հաստատվել է 2.4-13.3-րդ օրերի միջև ընկած ժամանակահատվածը: Նկար 3-ում ներկայացված է ուռուցքակիր մկների մոտ 3 իմունային պոպուլյացիաների քանակական տեղաշարժերի վերադրման գրաֆիկական պատկերը, նախավիրահատական և հետվիրահատական փուլերում:

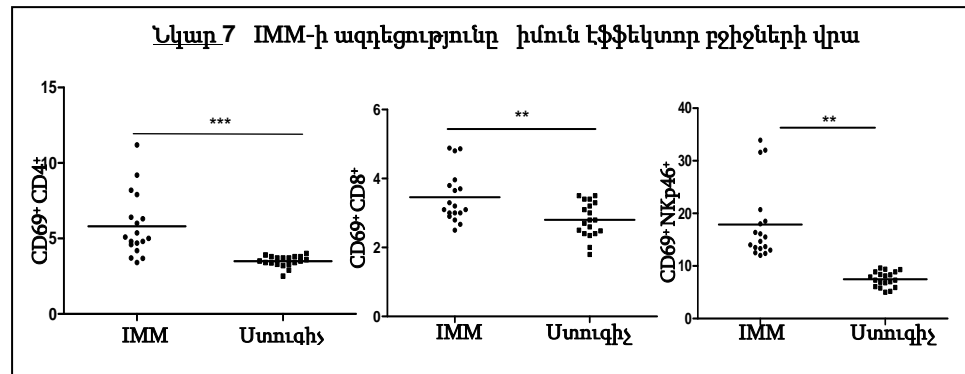
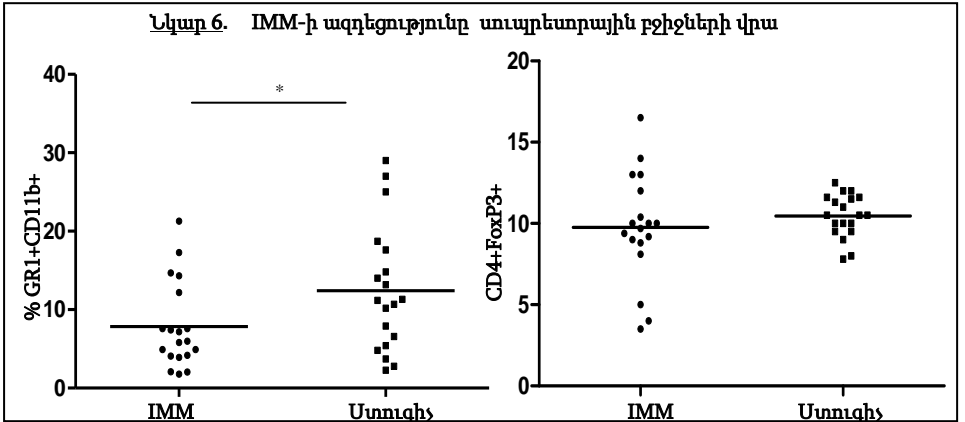
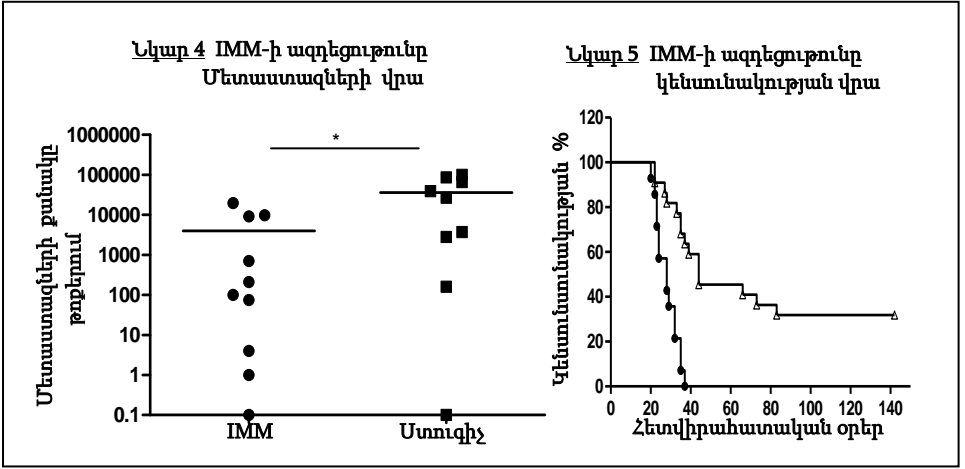
### **Գլուխ 3. IMM -ի ազդեցությունը իմուն համակարգի և մետաստազների զարգացման վրա հետվիրահատական մոդելում**

Այս հետազոտության մեջ իրականացվել է է IMM իմունոխթանիչի հակաուռուցքային ազդեցության ուսումնասիրություն 4Թ1 կենդանական հետվիրահատական մոդելի վրա: Այն ոչ տոկսիկ՝ կարտոֆիլից անջատված պոլիսախարիդ է: Հադիսանում է գրանցված իմունոխթանիչ դեղամիջոց 5 ԱՊՀ երկրներում, այդ թվում նաև Հայաստանում: Ըստ դեղամիջոցի օգտագործման ցուցումների նշանակվում է զանազան բակտերիալ, վիրուսային ինֆեկցիաների դեպքում՝ որպես ընդհանուր իմուն համակարգի ուժեղ խթանիչ: ([http://www.gepon.ru/immmax\\_intro.htm](http://www.gepon.ru/immmax_intro.htm)): Ելնելով դրանից կարելի է ենթադրել, որ IMM -ը ունակ է ակտիվացնել ուռուցքի առկայությամբ պայմանավորված սուպրեսիայի ենթակված իմունային համակարգը և նպաստել հակաուռուցքային իմուն պատասխանի ձևավորմանը: Հաջողության դեպքում կարող է որպես ադյուվանտ կիրառվել հակաուռուցքային իմունային թերապիաներում: 4Թ1 կրծքագեղձի քաղցկեղի հետվիրահատական մոդելի վրա *in vivo* պայմաններում կատարվել են IMM-ով փորձարկումներ: BALB/c մկներին ներարկվել են 4Թ1 ուռուցքային բջիջները: Կենդանիների մոտ ուռուցքը հազիվ շոշոփելի դառնալուն պես (>1մմ), մկները ներարկվել են 100մկգ IMM-ով կամ ՖԱԼ-ով: ՈՒՏ-ն 3.5-5մմ-ի հասնելուն պես կատարվել է ուռուցքի վիրահատական հեռացումը: Հետվիրահատական 6րդ և 13րդ օրերը կատարվել է փորձարկվող դեղամիջոցի՝ երկրորդ և երրորդ՝ վերջին ներակումը: Հետվիրահատական 20րդ օրը, ինչպես ստուգիչ այնպես էլ փորձարկային բոլոր մկների թոքերում հայտնաբերվել են մետաստազներ: Կարևոր է նշել, որ 3 անգամ իմունոխթանիչի ներարկում ստացած մկների մոտ մետաստազների քանակը թոքերում ի համեմատ ստուգիչ մկների հավաստիորեն ցածր է (\*P<0.05) (նկար 4): Հաջորդիվ ուսումնասիրել ենք իմունոխթանիչի ազդեցությունը մկների կենսունակության վրա: Ներարկումները կատարվել են հետևյալ սխեմայով՝ ուռուցքը շոշափելի դառնանուն պես, հետվիրահատական 6-րդ, 13-երորդ օրերը, այնուհետև շաբաթը մեկ՝ մինչև հետվիրահատական 78-երորդ օրը:

Կենսունակության դիտարկման արդյունքում պարզվել է, որ փորձարկային մկների կենսունակության ցուցանիշը ի համեմատ ստուգիչ մկների հավաստի բարելավվել է (\*P<0.05) (նկար 5): Հետվիրահատական 37-երորդ օրը, երբ բոլոր ստուգիչ մկները զոհվել էին մետաստազներից, փորձարարական մկների 63 տոկոսը դեռ կենդանի էին, իսկ 31 տոկոսը լիովին առողջացել էին, այն դեպքում երբ բոլոր ստուգիչ մկները մետաստազային ախտահարումից վախճանվել էին:

Միաժամանակ ուսումնասիրվել է IMM-ի ազդեցությունը իմունային տարբեր բջջային պոպուլյացիաների վրա (ակտիվացված լիմֆոցիտների՝ CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>CD8, CD69<sup>+</sup>nKp46<sup>+</sup> և սուպրեսորային MDSC, Treg-ների): Կարևոր է փաստել, որ փորձարարական մկների մոտ արձանագրվել է MDSC-իների քանակի ոչ կտրուկ

բայց հավաստի անկում, ի համեմատ ստուգիչ մկների (7,86±1,26% , 12,43±1,84 % , \*P), Treg պոպուլյացիայի քանակության տարբերություն չի դիտարկվել (նկար 6):

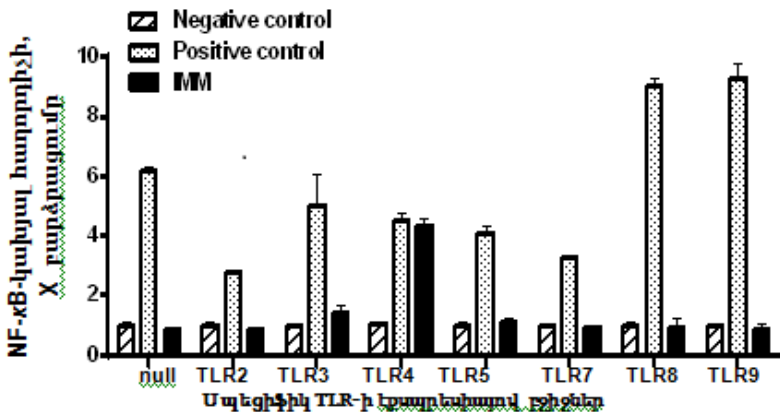


Հավաստիությունը հաշվարկվել է t թեստով՝ օր 0-ի նկատմամբ \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001



IMM-ը ակտիվացնում է բնածին իմուն պատասխանը, մասնավորապես խթանում պրոբոբրոքային ցիտոկինների արտադրությունը, NO-ի արտադրությունը մակրոֆագերի և մոնոցիտների կողմից, խթանում NK բջիջների ցիտոտոկսիկությունը (Ataullakhanov R. et. al., 2010): Ուսումնասիրելով IMM-ի ազդեցությունը իմուն համակարգի էֆֆեկտորային լիմֆոցիտների վրա արձանագրել ենք, որ փորձառական մկների մոտ ակտիվացած CD4 ( $6,19 \pm 0,53$ ,  $3,88 \pm 0,14$  \*\*\*), CD8 ( $3,45 \pm 0,17$ ,  $2,77 \pm 0,11$  \*\*\*), NK ( $7,86 \pm 1,26$ ,  $12,43 \pm 1,84\%$  \*\*\*), բջիջների տոկոսային քանակները ստուգիչ մկների հետ համեմատած՝ հավաստիորեն բարձր են (նկար 7): Այսպիսով IMM-ը ակտիվացնում է իմուն համակարգի էֆֆեկտորային CD4, CD8, NK բջիջներին և ի հակառակ դրան՝ նվազեցնում MDSC-իների քանակությունը: Հիմնվելով այս, ինչպես նաև վերոնկարագրված ակտիվացած իմունային էֆֆեկտորային բջիջների տվյալների վրա առաջ քաշվեց վարկած, որ IMM-ով ակտիվացման մեխանիզմում ներգրավված են TLR ընկալիչները: Ստուգելու համար կատարվել է հետազոտություն HEK-Blue տարբեր բջջային գծերի վրա: Տարբեր TLR-ների կայուն տրանսֆեկցիայով HEK Blue բջիջները (TLR-2, 3, 4, 5, 7, 8, 9) ինկուբացիայի են ենթարկվել IMM-ի ներկայությամբ, NF- $\kappa$ B-ի ակտիվացում դիտարկվել է միայն hTLR-4 HEK Blue բջիջների դեպքում (նկար 8):

**Նկար 8** IMM իմունոխթանիչը TLR4 ազնիստ



Միաժամանակ նաև ցույց է տրվել, որ NF- $\kappa$ B ակտիվացումը կոնցենտրացիոն կախվածություն ունի Immunomax®-ից, ինչը վկայում է այն մասին, որ վերջինս հանդիսանում է սպեցիֆիկ լիգանդ տվյալ ընկալիչի համար: Հիմնվելով այս փորձերի արդյունքում ստացված տվյալների վրա պարզ դարձավ, որ Immunomax® -ով իմունային համակարգի ակտիվացման գործընթացում ներգրավված է TLR-4 ընկալիչը:

### Ամփոփում

Տվյալ աշխատության մեջ 40<sup>1</sup> կրծքագեղձի քաղցկեղի կենդանական մոդելի վրա ցույց է տրված նախավիրահատական և հետվիրահատական ընթացքում իմունային բջիջների քանակական փոփոխությունները, ինչպես նաև IMM իմունոխթանիչի ազդեցության հակաուռուցքային արդյունավետությունը: Առաջնային ուռուցքի տարբեր չափերով պայմանականորեն՝ փոքր (1-2մմ), միջին (3.5-5մմ) և մեծ (10-15մմ), կենդանիների մոտ ուսումնասիրվել է իմունոսուպրեսորային և էֆֆեկտորային լիմֆոցիտների քանակական

տեղաշարժերը թոքերում և փայծաղում, ինչպես նաև կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների քանակությունը թոքերում: Յույց է տրվել, որ 4Թ1 ուռուցքակիր մկների մոտ մետաստազների և MDSC-իների քանակությունը դրական կախվածության մեջ է առաջնային ուռուցքի չափից:

Հետվիրահատական օրերին (օր 0, 2, 4, 6, 13, 17-20, 30-33) կատարվել է թոքերում մետաստազների և փայծաղում իմունոսուպրեսորային (MDSC, Treg), էֆֆեկտորային (ակտիվացած CD4, CD8) քանակական տեղաշարժերի, ինչպես նաև թոքերում կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների քանակության ուսումնասիրություն: Հետազոտության արդյունքում արձանագրվել է, որ ուռուցքի հեռացումը չի խոչընդոտում մետաստազների զարգացմանը, ինչը հաստատվում է նաև կենսունակության դիտարկման ժամանակ:

Հետվիրահատական մկների մոտ հետազոտության արդյունքները ցույց են տվել, որ MDSC-ները քանակապես միառժամանակ նվազում են՝ հասնելով նայիվ մկների ցուցանիշին, այնուհետև թոքերում մետաստազների աճին զուգընթաց վերականգնվում է 4Թ1 ուռուցքակիր մկներին բնորոշ սուպրեսորների բարձր քանակությունը: Ի հակառակ սրա, ակտիվացած էֆֆեկտորային CD4, CD8 բջջային պոպուլյացիաները ժամանակավորապես քանակական աճ են արձանագրում:

Այսպիսով հետվիրահատական ժամանակահատվածում (օր 0-33) տարբերակվում է այսպես կոչված «Հնարավորության պատուհան» ժամանակային տիրույթը, որտեղ ուռուցքով պայմանավորված իմունոսուպրեսիան առժամանակ տեղի է տալիս, փոխարենը ակտիվացած T լիմֆոցիտների քանակությունը ավելանում է: Ուռուցքակիր օրգանիզմներին բնորոշ ընդհանուր իմունոսուպրեսիայի պայմաններում այսպիսի «պատուհան»-ի առկայությունը իրական հնարավորություն կարող է դառնալ լրացուցիչ ակտիվացմամբ իմունային համակարգի հակաուռուցքային գործառնությունների վերականգնման և այդպիսով հակաուռուցքային իմունոթերապևտիկ միջամտությունների արդյունավետության բարձրացման հարցում: Ժամանակային այդ տիրույթի ճշգրիտ սահմանները որոշելու համար տվյալները ենթարկվել են մաթեմատիկական անալիզի, արդյունքում հաստատվել է 2.4-13.3-րդ օրերի միջև ընկած ժամանակահատվածը:

4Թ1 քաղցկեղի հետվիրահատական մոդելի վրա իրականացվել է IMM իմունոխթանիչի *in vivo* փորձարկումներ: Հաշվի առնելով հետվիրահատական փուլում կենդանիների մոտ ժամանակավորապես ի հայտ եկող հակաուռուցքային իմունային բջիջների ակտիվացած կարգավիճակը, ներարկումները կատարվել են առաջնային ուռուցքի հեռացումից հետո 6-երորդ և 13-երորդ օրերին: Մկների մոտ արձանագրվել է թոքերում մետաստազների քանակի հավաստի նվազում և կենսունակության ցուցանիշի հավաստի բարելավում: Փորձարարական մկների 31 տոկոսը լիովին առողջացել էին: IMM իմունոխթանիչը ակտիվանցում է նաև էֆֆեկտորային CD4, CD8, NK բջիջներին և ի հակառակ դրան՝ նվազեցնում սուպրեսորային միելոիդային բջիջների քանակությունը: Յույց է տրվել, որ IMM-ով իմունային համակարգի ակտիվացման գործընթացում ներգրավված է TLR-4 ընկալիչը:

## Եզրակացություններ

1. 4Թ1 ուռուցքակիր մկների թոքերում մետաստազների և փայծաղում ու թոքերում MDSC-իների քանակությունը կախված է առաջնային ուռուցքի չափից՝ ուռուցքի մեծացման հետ աճում է վերջիններիս քանակությունը:
2. Հետվիրահատական շրջանում իմունային բջջային պոպուլյացիաները ենթարկվում են քանակական դինամիկ փոփոխությունների՝ MDSC-ների քանակությունը միառժամանակ նվազում է, հասնելով ոչ ուռուցքակիր մկների ցուցանիշին, այնուհետև մետաստազների քանակության աճին զուգընթաց վերկանգնվում է ուռուցքակիր կենդանիներին բնորոշ բարձր քանակությունը:
3. Հետվիրահատական շրջանում ակտիվացած CD4 և CD8 ների քանակությունը ժամանակավորապես աճում է և համապատասխանաբար նվազում ուռուցքային բջիջների առաջխաղացմանը զուգընթաց:
4. Նախավիրահատական և հետվիրահատական մկների իմունային բջիջների քանակական տվյալների վերադրման և մաթեմատիկական անալիզի արդյունքում հետվիրահատական շրջանում տարբերակվել է իմունային թերապիայի «Հնարավորության պատուհան» ժամանակային տիրույթը, որը բնորոշվում է ուռուցքով պայմանավորված իմունոսուպրեսիայի նահանջով:
5. 4Թ1 կրծքագեղձի հետվիրահատական մոդելի վրա ցույց է տրվել, որ IMM իմունոխթանիչը հանդիսանում է TLR-4 ազոնիստ և ցուցաբերում է հակաուռուցքային արդյունվետություն:

## Ա.Ա. Դավթյանի ատենախոսության թեմայով հրատարակված աշխատանքների ցուցակը

1. Ghochikyan, A., Pichugin, A., Bagaev, A., **Davtyan, A.**, Hovakimyan, A., Tukhvatulin, A., Davtyan, H., Shcheblyakov, D., Logunov, D., Chulkina, M., et al. Targeting TLR-4 with a novel pharmaceutical grade plant derived agonist, Immunomax®, as a therapeutic strategy for metastatic breast cancer. (2014). J. Transl. Med. 12:322. (<http://www.translational-medicine.com/content/12/1/322>)
2. Ghochikyan, A., **Davtyan, A.**, Hovakimyan, A., Davtyan, H., Poghosyan, A., Bagaev, A., Ataulakhanov, R.I., Nelson, E.L., and Agadjanyan, M.G. Primary 4T1 tumor resection provides critical “window of opportunity” for immunotherapy. (2014). Clin. Exp. Metastasis 31, 185–198.
3. **Davtyan A.** Inhibition of T lymphocytes nonspecific proliferation by myeloid derived suppressor cells. (2014). Medical science of Armenia 54 (2), pp. 76-80.

**The effect of natural immune system's stimulation on the regulation of antitumor immune response and on the development of metastasis in murine breast cancer model**

**SUMMARY**

**Keywords:** *4T1 breast cancer model, immunosuppression, "Window of opportunity" for immunotherapy, immunostimulator*

In this report, using the 4T1 murine mammary tumor model, we characterize for the first time the dynamic longitudinal changes in immunosuppressive and effector components of the immune system before and after resection of an established orthotopic primary tumor with a defined natural history of developing lung metastases.

More specifically, we analyzed number of clonogenic tumor cells, immunosuppressor and activated immune effector cells in mice with different tumor sizes. We established that there is a positive correlation between tumor size and number of metastases and immunosuppressor MDSC cells in lungs and spleen of tumor bearing mice.

As an optimal tumor size for doing primary tumor surgical resection was chosen 3.5-5mm, timepoint when almost all mice (93%) already had metastases in lungs. As it was expected, although tumor resection did slightly prolong survival, it did not affect the ultimate development of metastatic disease since animals with resected tumors or intact primary tumors eventually died by day 47 and 43.

We evaluated changes of absolute numbers and frequencies of MDSC, regulatory T cells (Treg), as well as activated CD4 and CD8 positive T cells in spleens and, in some studies, lungs of 4T1 tumor-bearing mice and mice after primary tumor resection. Following primary resection, MDSC population was gradually decreased. The frequency and the absolute number of MDSCs reached a minimum on the sixth day and then began to rise again. At day 13, the frequency of MDSC was still significantly lower than at day 0, but reached and surpassed the day 0 (surgical resection) level at days 17–20 and beyond, yielding values that were significantly higher than at day 0. Importantly, it was observed an increase in frequency of activated CD4 and CD8 cells in the spleens of mice after primary tumor resection. At the day of surgery (0 day, 3.5–5 mm tumorbearing mice), the frequency of activated CD4 cells population was significantly lower than that in tumor-free mice. Two days after tumor resection, the frequency of activated CD4 cells matched that of tumor-free control mice and continued to rise reaching a maximum level at days 6–13. Later on (17-20, 30-33) CD4 cell population decreased. A similar pattern was observed in case of activated CD8.

To better understand the relationship between suppressor and effector components of immune system we outlined and overlaid the changes in the levels of MDSC and activated effector cells frequency in a spleens of mice at different time points before and after the tumor removal. To define an appropriate region that meets the requirements of the lowest level of MDSC and the highest percent of activated T cells in the spleen, these data were mathematically analyzed.

We established that primary resection of an orthotopic tumor had created a "window of opportunity" with decreased tumor-associated immune suppression that existed for approximately 10 days. The biological region "window" was defined according to the statistically significant difference between experimental values measured after removal of

the tumor (days 2–31) in comparison to those measured on day 0, right before removal of the tumor. According to these data, we may conclude that the time period between days 3 and 13

could be optimal for immunotherapeutic intervention “window of opportunity” with the most optimal period being between 7 and 10 days post resection of the primary tumor.

This window of opportunity likely occurs in humans providing a rationale and parameters for integration and testing of immunotherapeutic strategies in this critical “window of opportunity” to combat the development of metastatic disease. This suggests that additional activation of the immune system by immunostimulatory agents during this period may enhance anti-tumor immunity and potentially eradicate micro-metastatic disease in this stringent model.

Here we investigate the capacity of a potent immunostimulatory compound Immunomax® (IMM) to enhance anti-tumor immunity and control of micro-metastatic disease in the 4T1 post resection metastatic breast cancer model. Immunomax® injections significantly prolonged overall survival and cured 31% of mice.

IMM significantly increased the percent of activated CD69+ NK cells, CD69+CD4+, and CD69+CD8+ T cells, and decreased the percent of MDSC in spleens of treated mice. Percent of Treg cells remained unchanged. Using NF- $\kappa$ B/SEAP reporter gene assay it was shown that pharmacological grade IMM is acting as a TLR-4 agonist.

**Давтян Арпине Араиқовна**

**Влияние стимуляции естественного иммунного ответа на регуляцию  
противоопухолевого иммунного ответа и развитие метастазов на постоперационной  
модели рака молочной железы**

**РЕЗЮМЕ**

**Ключевые слова:** *4T1 модель опухоли молочной железы, иммуносупрессия, «окно возможности» для иммунотерапии, иммуностимулятор*

На 4T1 животной модели опухоли молочной железы в предоперационный и постоперационный период были исследованы количественные изменения иммуносупрессивных и активированных эффекторных клеточных популяций, а также колониеобразующих опухолевых клеток в легких.

На мышцах с разными размерами первичной опухоли (1-2мм, 3.5-5мм, 10-15мм) были показаны изменения иммуносупрессивных и эффекторных клеточных популяций в легких и селезенке, а также количество колониеобразующих опухолевых клеток в легких. В результате исследования было показано, что у 93% мышей, с размером опухоли 3.5-5мм, в легких обнаруживаются метастазы. Данный размер был выбран в качестве критерия для удаления опухоли и дальнейшего исследования постоперационной 4T1 модели. Было показано, что у 4T1 опухоленосных мышей с увеличением размера опухоли, количество супрессорных MDSC в селезенке и легких увеличивается, а количество активированных эффекторных клеток, наоборот, уменьшается.

В постоперационный период (день 0, 2, 4, 6, 13, 17-20, 30-33) в селезенке и легких мышей были исследованы количественные изменения супрессорных MDSC и активированных эффекторных CD4, CD8 клеток, а также колониеобразующих клеток в

легких. Результаты исследований показали, что на 6-ой день количество MDSC постепенно и временно уменьшается, достигая минимального значения равного показателям наивных мышей.

Обнаружено, что даже на 13-й день количество MDSC достоверным образом ниже показателя 0-го дня, а на 17-20-й день достигает и превышает его. Важно отметить, что в противоположность этому, количество активированных эффекторных клеток CD4, CD8 кратковременно (4-17-й день) увеличивается по сравнению с показателем 0-го дня (день удаления опухоли, 3,5-5 мм опухоленосные мыши). С 17-20-й день, как и в случае популяции MDSC, количество активированных CD4 начинает падать. Динамика обратного восстановления количества супрессорных клеток и уменьшения эффекторных совпадает со временем резкого увеличения количества колониобразующих опухолевых клеток в легких.

Для понимания соотношения между супрессорными и эффекторными компонентами иммунной системы мы наложили графики данных, полученные в результате исследования 4T1 модели в предоперационный (размер первичной опухоли 1-2мм, 2-3мм, 3,5-5мм) и постоперационный период (день 0-33). С целью определения временного участка, который характеризовался бы низким уровнем супрессорных MDSC и высоким количеством противоопухолевых эффекторных Т лимфоцитов, был выполнен математический анализ полученных данных.

В результате анализа данных был обнаружен так называемый период «окно возможности» для иммунотерапии, который сохраняется в течение 10 дней (с 3-го по 13-й день). Биологическое «окно» определяется в результате выявления статистически достоверных различий между экспериментальными показателями у мышей в 0-й день с показателями после удаления опухоли (2-33-й день).

В условиях известной иммуносупрессии, наблюдаемой как на различных моделях животных с опухолью, так и у пациентов с онкологическими заболеваниями, существование временного отрывка, «окно возможности», может оказаться наиболее оптимальным периодом для осуществления иммунотерапевтической интервенции. С целью определения точных границ окна возможностей был проведен математический анализ с использованием программы OriginPro. Результаты показали, что промежуток времени с 3-го по 13-й день является периодом, который характеризуется наименьшей супрессивной активностью иммунной системы.

Для определения противоопухолевой эффективности IMM иммуномодулятора на постоперационной модели 4T1 были проведены *in vivo* эксперименты. На основании результатов данного эксперимента выявлено статистически достоверное продление продолжительности жизни экспериментальных мышей, 31% которых полностью выздоравливает.

Далее, было продемонстрировано влияние IMM на супрессорные и эффекторные клетки иммунной системы. Результаты анализа показали, что количество миелодных супрессорных клеток статистически достоверным образом уменьшается. В случае Т регуляторных клеток, разница между контрольными и экспериментальными мышами не наблюдается. В противоположность супрессорным клеткам, под воздействием IMM резко увеличивается количество активированных противоопухолевых CD4, CD8 и NK клеток. К тому же, с помощью НЕК-Blue™ и NF-κB/SEAP системы было показано, что IMM действует как TLR4 агонист.