

ՀՀ ԱՆ Ա.Բ. ԱԼԵՔՍԱՆՅԱՆԻ ԱՆՎԱՆ ՀԱՄԱՃԱՐԱԿԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ,
ՎԻՐՈՒՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԲԺՇԿԱԿԱՆ ՄԱԿԱԲՈՒԾԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԳՀԻ

Դավթյան Արփինե Արայիկի

Բնական իմուն պատասխանի խթանման ազդեցությունը
հակաուռուցքային իմուն պատասխանի կարգավորման և մետաստազների
զարգացման վրա կրծքագեղձի քաղցկեղի հետվիրահատական մոդելում

Ատենախոսություն

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

Գիտական ղեկավար

կ.գ.դ. Դավթյան Տիգրան Կամոյի

ք. Երևան

2015

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ.....4

Գլուխ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

1.1 Կրծքագեղձի քաղցկեղ և բուժման ժամանակակից եղանակները.....13

1.2 Ուռուցքով պայմանավորված իմունոսուպրեսիա.....29

1.3 4Թ1 Կրծքագեղձի քաղցկեղի մկնային մոդել.....44

Գլուխ 2. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹՆ ՈՒ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

2.1 Մկներ.....47

2.2 Բջջային գծեր.....47

2.3 Ուռուցքային բջիջների աճեցում և ներարկում.....48

2.4 Մետաստատիկ թեստ.....49

2.5 Մկների թոքերից մոնոնուկլեար բջիջների անջատում.....49

2.6 Ուռուցքի վիրահատական հեռացում.....50

2.7 Հոսքային ցիտոլյուրիմետրիայով բջջային մարկերների որոշում.....50

2.8 *In vitro* պայմաններում NF-kB ակտիվացման որոշում.....51

2.9 Մաթեմատիկական անալիզներ.....52

2.10 Տվյալների վիճակագրական մշակում.....53

Գլուխ 3. ԿՐԾՔԱԳԵՂՁԻ ՔԱՂՑԿԵՂԻ 4Թ1 ՄՈՂԵԼԻ ՆԿԱՐԱԳՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

3.1 Առաջնային ուռուցքի չափը և կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջները թոքերում....54

3.2 Իմունոսուպրեսոր բջջային պոպուլյացիաները ուռուցքակիր մկների մոտ..... 57

3.3 Ակտիվացած T լիմֆոցիտները ուռուցքակիր մկների մոտ.....61

Գլուխ 4. ՀԵՏՎԻՐԱՀԱՏԱԿԱՆ ՄՈՂԵԼԻ ՆԿԱՐԱԳՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

4.1 Կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների որոշումը թոքերում.....64

4.2 Ուռուցքի վիրահատական հեռացման ազդեցությունը մկների կենսունակության վրա66

4.3 Իմունոսուպրեսորային բջջային պոպուլյացիաները 4ժ1 հետվիրահատական մոդելում.....67

4.4 Ակտիվացած T-լիմֆոցիտները 4ժ1 հետվիրահատական մոդելում.....70

4.5 Իմունոթերապիայի «Հնարավորության պատուհան»-ի նկարագրությունը.....72

Գլուխ 5. IMMUNOMAX® -Ի ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԻՄՈՒՆ ՀԱՄԱԿԱՐԳԻ ԵՎ ՄԵՏԱՍՏԱԶՆԵՐԻ ԶԱՐԳԱՑՄԱՆ ՎՐԱ ՀԵՏՎԻՐԱՀԱՏԱԿԱՆ ՄՈՂԵԼՈՒՄ

5.1 IMMUNOMAX®-ի հակաուռուցքային ազդեցությունը.....79

5.2 IMMUNOMAX®- TLR4 ազոնիստ.....85

Գլուխ 6. ԱՄՓՈՓՈՒՄ.....88

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ.....96

ՕԳՏԱԳՈՐԾՎԱԾ ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՑԱՆԿ.....97

ՀԱՊԱՎՈՒՄՆԵՐԻ ՑԱՆԿ.....109

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% (Ghochikyan et al., 2014): 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 (ՀՀ առողջապահության նախարարություն):

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, ինչն էլ ի վերջո հանգեցնում է մահվան:

Իմունոթերապիան համարվում է քաղցկեղի բուժման խոստումնալից ուղղություններից մեկը, որի շնորհիվ ակտիվացված իմունային բջիջները կարող են «հայտնաբերել և ոչնչացնել» ուռուցքային բջիջներին:

Ցավոք սրտի, բազմաթիվ իմունոթերապևտիկ միջամտություններ, որոնք դրական արդյունք են տվել նախակլինիկական (C et al., 2012; Olkhanud et al., 2009; Sinha et al., 2005a; Youn et al., 2008a) հետազոտությունների փուլում, տապալվել են, կամ շատ աննշան արդյունքներ են արձանագրել կլինիկական հետազոտության փուլում: Դա պայմանավորված է մի քանի խնդիրներով: Գլխավոր խնդիրներից մեկն է առաջնային ուռուցքի կամ մետաստազների

առկայությամբ պայմանավորված իմուն համակարգի սուպրեսիան: Քաղցկեղով հիվանդ մարդկանց, ինչպես նաև քաղցկեղի կենդանական 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, ինչն ուղղակիորեն փոխկապակցված է ուռուցքի չափի կամ մետաստազների քանակի հետ: 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):

Ներկայումս հակաուռուցքային տարբեր իմունոթերապիաների համար օգտագործվող կենդանական մոդելների զարգացման ուղղությունները մշակվել են ըստ հետևյալ սկզբունքների.

1. Գենետիկորեն մոդիֆիկացված կամ չմոդիֆիկացված ուռուցքային բջիջներ, որոնք իմպլանտացիայի են ենթարկվում գենետիկորեն չմոդիֆիկացված կամ մոդիֆիկացված գեներով (տրանսգեն) մկների մեջ:

2. Մարդու ուռուցքային բջջային գծեր՝ ներարկված իմունոդեֆիցիտ մկների մեջ (օրինակ՝ SCID մկների)

3. Կենդանիների մոտ քիմիական նյութերի կամ վիրուսների ազդեցությամբ խթանվում է ուռուցքի առաջացումը:

4. Որևէ թիրախային գենի էքսպրեսիայի՝ դրական կամ բացասական կարգավորմամբ տրանսգեն կենդանիների բազմացումը:

Չնայած որ այս կենդանական մոդելներ շատ կարևոր նշանակություն են ունեցել և այժմ էլ ունեն մարդկանց մոտ ուռուցքների առաջացման և զարգացման հիմնական սկզբունքները հասկանալու համար, դրանցից շատ քչերն են միայն,

որ քաղցկեղի զարգացման օրինաչափություններով, սպոնտան կերպով մետաստազներ առաջացնելու կարողությամբ նմանվում են մարդկանց մոտ զարգացող կրծքագեղձի քաղցկեղին:

Մկների կրծքագեղձի քաղցկեղի 4Թ1 մոդելը պատկանում է դրանց թվին (Aslakson and Miller, 1992; H Heppner et al., 2000):

Միլլերի և կոլեգաների կողմից ցույց է տրվել, որ 4Թ1 բջջային գծի կրծքագեղձի կարցինոման օժտված է ուժեղ ուռուցքառաջացնող հատկությամբ: Կրծքագեղձի և դրան անմիջականորեն հարող մաշկի միջև ընկած հատվածում 4×10^3 ուռուցքային բջիջներ ներարկելիս ձևավորվում է առաջնային ուռուցք: Վերջինս ներարկումից 11-26 օր հետո արդեն շոշափելի է լինում, իսկ 40-69-երորդ օրերը ուռուցքի տրամագիծը հասնում է թույլատրելի առավելագույնին՝ 14-16մմ, որի ժամանակ մկների կյանքը ընդհատվում է: Բջիջների ավելի մեծ քանակ ներարկելու դեպքում ուռուցքը շոշափելի է դառնում ավելի վաղ (Ghochikyan et al., 2014a):

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 տարբեր օրգաններ՝ թոքեր, փայծաղ, ոսկրեր, ուղեղ և այլն (H Heppner et al., 2000; Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 2001): 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, (Danna et al., 2004; Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 2001; Youn et al., 2008a) 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:

Հաջորդիվ, նկարագրված հետվիրահատական մոդելի վրա ուսումնասիրվել է TLR4 ազոնիստ *Immunomax®*-ի (IMM) հակաուռուցքային արդյունավետությունը և ազդեցությունը իմունային էֆֆեկտոր, սուպրեսոր բջջային պոպուլյացիաների վրա:

IMM-ը ոչ տոկսիկ, բուսական ծագման ուժեղ իմունոխթանիչ է, որը ԱՊՀ մի շարք երկրներում (Ռուսաստանի Դաշնություն, Հայաստանի Հանրապետություն, Ղազախստան և այլն) նշանակվում է ինֆեկցիոն հիվանդությունների ժամանակ եվ արդյունավետ լինելու դեպքում հեշտությամբ կարող է կիրառվել կլինիկական փորձարկումների համար:

Բազմաթիվ հետազոտություններում ցույց է տրված, որ TLR4 ընկալիչը էքսպրեսիայի է ենթարկվում ինչպես իմունային այնպես էլ ուռուցքային բջիջների վրա, հարկ է նշել որ այս ընկալիչի ազոնիստի կիրառումը որպես հակաուռուցքային միջոց կարող է հանդես գալ որպես «երկսայր թուր»՝ ունակ ակտիվացնելու ոչ միայն իմունային, այլ նաև ուռուցքային բջիջները: Ըստ գրականության մեջ առկա որոշ տվյալների այս ընկալիչի դասական ազոնիստ հանդիսացող ԼՊՄ-ը (լիպոպոլիսախարիդ) ցուցաբերում է ինչպես հակաուռուցքային, այնպես էլ ուռուցքախթանիչ ազդեցություն (Ahmed et al., 2012; Mai et al., 2013):

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 4Թ1

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 կոդմորոշիչ նշանակություն կարող է ունենալ ցանկացած տեսակի թերապևտիկ միջամտություններ կատարելիս, ինչպես նախակլինիկական այնպես էլ կլինիկական փորձարկումներ իրականացնելիս:

Հակաուռուցքային թերապիաների մեջ TLR4-ի դասական ազոնիստ հանդիսացող LՊՄ-ի կիրառումը, սահմանափակվում է նրա տոկսիկությամբ, այդ պատճառով առանձնակի կարևոր նշանակություն ունի ալտերնատիվ ուղղությունների զարգացումը: Այս տեսանկյունից արդիական է TLR4-ի ազոնիստ հանդիսացող իմունիթանիչ 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 իմունոթանիչի հակաուռուցքային ազդեցությունը հետվիրահատական մոդելի վրա:

Խնդիրները

Վերոնշյալ նպատակին հասնելու համար մեր առջև դրել ենք հետևյալ խնդիրները:

4Թ1 բջջային գծի կիրառմամբ մոդելավորել առաջնային ուռուցքի առաջացումը փորձարական կենդանիների մոտ և գնահատել նախավիրահատական շրջանում թոքերում մետաստազների առաջացումը և մկների կենսունակությունը, ինչպես նաև ուսումնասիրել էֆֆեկտորային և սուպրեսորային պոպուլյացիաների քանակական փոփոխությունները:

Գնահատել հետվիրահատական շրջանում ակտիվացած CD4, CD8 լիմֆոցիտների և սուպրեսորային MDSC, Treg-ների քանակի փոփոխության դինամիկան փայծաղում:

Պարզել հետվիրահատական շրջանում մկների թոքերում մետաստատիկ կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների փոփոխության դինամիկան և բնութագրել իմունային թերապիայի «Հնարավորության պատուհան» ժամանակահատվածը:

Ուսումնասիրել հետվիրահատական ժամանակահատվածում IMM-ի ազդեցությունը՝ գնահատելով մկների թոքերում կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների քանակը և մկների կենսունակությունը, փայծաղում և թոքերում էֆֆեկտորային և սուպրեսորային բջիջների քանակական տեղաշարժը:

Աշխատանքի գիտական նորույթը

Այս աշխատության մեջ 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-իների 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 հավաստիորեն դինամիկ աճ: Կենսունակության ցուցանիշը ուռուցքի վիրահատական հեռացման արդյունքում էականորեն չի բարելավվում և բոլոր փորձարարական կենդանիները, ինչպես ստուգիչ՝ ուռուցքակիր կենդանիները, վախճանվում են:

Առաջին անգամ պարզվել է, որ բուսական ծագման ոչ տոկսիկ IMM իմունոխթանիչը հանդիսանում է TLR4 ազոնիստ և դրսևորում է արտահայտված հակաուռուցքային արդյունավետություն *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 գնահատման և բարձրացման համար:

TLR4 ազոնիստ հանդիսացող IMM իմունոխթանիչի հակաուռուցքային ազդեցություն տվյալները նոր հնարավորություններ են ստեղծում կլինիկական փորձարկումներում վերջինիս կիրառման համար՝ որպես ադյուվանտ իմունոթերապևտիկ միջամտություններում համադրելով ավանդական բուժման սխեմաների հետ:

Լրացուցիչ հետաքրքրություն ունի նաև IMM-ի 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

Ատենախոսության հիմնական դրույթները զեկուցվել են միջազգային գիտաժողովում (Immunology fair 2012): Աշխատանքը նախաքննություն է անցել ՀՀ ԱՆ «ԱԲ Ալեքսանյանի անվան համաճարակաբանության վիրուսաբանության և բժշկական մակաբուժաբանության ԳՀԻ» գիտական խորհրդի 2015 թվականի հոկտեմբերի 27-ին կայացած նիստի ժամանակ:

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 հետազոտության նյութն ու մեթոդները, ստացված արդյունքների շարադրում և դրանց ամփոփում, եզրակացություններից և օգտագործված գրականության ցանկից (135) և հապավումների ցանկից:

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

Գլուխ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

1.1 Կրծքագեղձի քաղցկեղ և բուժման ժամանակակից եղանակները

Ամեն տարի աշխարհում 12,7 մլն մարդու մոտ քաղցկեղ է ախտորոշվում, ավելի քան 7,6 միլիոն մարդ մահանում է այդ հիվանդությունից (Cancer Facts & Figures 2013): Կանանց շրջանում ամենահաճախ հանդիպողը կրծքագեղձի քաղցկեղն է, որին հաջորդում է արգանդի վզիկի չարորակ նորագոյացությունը: Ամբողջ աշխարհում քաղցկեղով հիվանդների թիվն աճում է անասելի չափերով: Քաղցկեղ հիվանդությունը տարածված է ինչպես զարգացած, այնպես էլ նոր զարգացող երկրներում: Վիճակագրությունը փաստում է, որ 1995 թվականին 100.000 կին բնակչից քաղցկեղով հիվանդները 33-ն էին, այսօր այդ թիվը կրկնապատկվել է: Հիվանդությունն ունի նաև երիտասարդացման միտում: ՀՀ առողջապահության ազգային ինստիտուտի տեղեկատվական վերլուծական կենտրոնի տվյալներով՝ ուռուցքաբանական հիվանդություններից մահացության ցուցանիշների ամենամյա աճը հանրապետությունում կազմում է 2-3%: Ներկայումս գոյություն ունեն կրծքագեղձի քաղցկեղի բուժման մի քանի հիմնական եղանակներ: Դրանք են վիրահատական հեռացումը, քիմիոթերապիա, ճառագայթային, հորմոնային թերապիան: 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: Վիրահատական հեռացումը լինում է կրծքի պահպանմամբ, մասնակի կամ ամբողջական հեռացմամբ: Քիմիոթերապիայի ժամանակ օգտագործվում են տարբեր քիմիական միացություններ, որոնք ազդում են բաժանվող բջիջների վրա: Տարբերում են տեղային, երբ դեղամիջոցը անմիջականորեն ներարկվում է ուռուցքակիր օրգանի մեջ կամ համակարգային քիմիոթերապիա՝ ողնուղեղային հեղուկի մեջ:

Ճառագայթային թերապիայի ժամանակ կիրառվում է բարձր չափաբաժնով ռենտգենային ճառագայթներ ուռուցքային բջիջներին սպանելու կամ դրանց աճը կանխելու համար: Արտաքին ճառագայթման ժամանակ հատուկ սարքերով ուռուցքի ուղղությամբ ճառագայթներ են ուղղվում: Իսկ ներքին թերապիայի ժամանակ օգտագործվում են հատուկ ասեղներ, ռադիոակտիվ հատիկներ, որոնք տեղադրվում են ուռուցքի մոտ: Արտաքին կամ ներքին ճառագայթային թերապիայի ընտրությունը կատարվում է կախված ուռուցքի տեսակից և զարգացման աստիճանից: Հորմոնային թերապիան կիրառվում է այն դեպքում, երբ ուռուցքի աճը էստրոգեն կախվածություն ունի: Այս դեպքում կատարվում է ձվարանների հեռացում, կամ կիրառվում են արոմաստազ ինհիբիտորներ, որոնց միջոցով կանխվում է անդրոգենի փոխակերպումը էստրոգենի: Թիրախային թերապիան ուռուցքի վրա առավելապես թիրախային ներգործությունն է, առանց նորմալ բջիջներին վնասելու: Թիրախային թերապիան հիմնականում իրականացվում է մոնոկլոնալ հակամարմիններով (իմունային թերապիա): Այս աշխատության մեջ մի փոքր ավելի մանրամասն կանդրադառնանք իմունային թերապիային:

Իմունային թերապիան նպատակ ունի ակտիվացնել և վերականգնել իմուն համակարգի ուռուցքային բջիջներին հայտնաբերելու և ոչնչացնելու ունակությունը: Իմունոթերապիան ներառում է բուժման մի քանի մոտեցումներ, որոնցից յուրաքանչյուրին բնորոշ է հակաուռուցքային իմուն պատասխանի խթանման որոշակի մեխանիզմներ: Իմունային թերապիան հաստատված է, որպես հիմնական բաղադրիչ մաս շատ հակաուռուցքային բուժման սխեմաներում. Ներկայումս լայնորեն կիրառվող իմունոթերապիայի տեսակներն են (Mellman et al., 2011):

1. Մոնոկլոնալ հակամարմիններ
2. Ցիտոկիններ
3. Անցակետային ինհիբիտորներ
4. Թերապևտիկ ուռուցքային պատվաստանյութեր

Ժամանակակից իմունային թերապիաները

Ուռուցքների վրա կատարվում է տարբեր սպիտակուցների էքսպրեսիա, որոնք իմուն համակարգի կողմից ճանաչվում են որպես օտարածին մասնիկներ: Ցույց է տրված, որ ուռուցքի անտիգենների ճանաչմանն ուղղված հակամարմինները մեծ հաջողություններ ունեն հակաուռուցքային թերապիաներում մինչև օրս կիրառած դեղամիջոցների շարքում (Guo et al., 2013):

Կլինիկայում քաղցկեղի բուժման համար հաստատված են 9-ը մոնոկլոնալ հակամարմիններ, որոնք ճանաչում են վեց ուռուցք-սպեցիֆիկ սպիտակուցներ: 1990թվականից սկսած ավելի քան 20 մոնոկլոնալ հակամարմիններ օգտագործվում են որպես թերապևտիկ ագենտներ (Cheson and Leonard, 2008; Curran et al., 2007; Slamon et al., 2001; Weiner et al., 2010): Չորս մոնոկլոնալ հակամարմիններ- Թրասթուգումաբ, Ցետուքսիմաբ, Փանիթումաբ, Բեվացիգումաբ հաստատվել են սուլիդ ուռուցքների բուժման համար: Ցետուքսիմաբ, Փանիթումաբ հակամարմինները անմիջականորեն կապվում են Էպիդերմալ աճի գործոնի ընկալիչների (EGFR) հետ: Թրասթուգումաբը կապվում է Էպիդերմալ աճի գործոնի ընկալիչների ընտանքին պատկանող մեկ այլ՝ HER2/neu ընկալիչներին (Weiner et al., 2010) EGFR ընկալիչները կարևոր դեր ունեն Էպիթելիալ ուռուցքների աճը խթանող ազդանշանը հաղորդելու գործում: Այդ գործընթացը կանխելու համար, բացի մոնոկլոնալ հակամարմիններից օգտագործվում են նաև բազմաթիվ հատուկ տրանսդուկցիոն ազդանշանի փոխանցման ինհիբիտորներ (Temkin and Fleming, 2009): Թրասթուգումաբը երկրորդ հակամարմինն էր, որ թույլատրվեց կիրառել որպես հակաքաղցկեղային դեղամիջոց: Այն կիրառվել է որպես մոնոթերապևտիկ միջոց, ինչպես նաև համատեղված Պակլիտաքսել քիմիոթերապևտիկ դեղամիջոցի հետ ինվազիվ HER2/neu դրական կրծքագեղձի բուժման համար: Հայտնի է, որ կրծքագեղձի ինվազիվ քաղցկեղով հիվանդների 20-30 տոկոսն է միայն HER2/neu դրական: Թրասթուգումաբի կիրառման արդյունքները հետևյալն են՝ մոնոթերապիայի դեպքում, հիվանդների 11-26%-ի մոտ է գրանցվում պատասխանի

արձանագրում, այս ցուցանիշը բարելավվել է՝ հասնելով 50% -ի, երբ օգտագործվել է քիմիոթերապիայի հետ համատեղ, միայն քիմիոթերապիայի դեպքում՝ 32% (Hudis, 2007)

Բեվազիզումաբը հակաուռուցքային թերապիաներում կիրառվող միակ մոնոկլոնալ հակամարմինն է, որն անուղղակի կերպով է ազդում չարորակ ուռուցքային բջիջների վրա: Վերջինս կապվում է վասկուլյար էնդոթելիալ աճի գործոնին (VEGF), որը հանդիսանում է կարևոր միջնորդ մուլեկուլ ուռուցքի անգիոգենեզի ապահովման համար: Ճնշելով անգիոգենեզի գործընթացը՝ մասնակիորեն խաթարվում է ուռուցքային բջիջների սնուցումը և թթվածնի մատակարարումը, դրանով իսկ խոչընդոտվում է ուռուցքի աճը: Այնուամենայնիվ ուռուցքի կենսագործունեությունը դրանից մասնակիորեն է չեզոքացվում (Cohen et al., 2007): Բեվազիզումաբը որոշակի արդյունավետությամբ կիրառվել է որոշ սոլիդ ուռուցքների դեմ, մասնավորապես՝ թոքային կարցինոմայի, մետաստատիկ աղիքային քաղցկեղի, HER2/neu-բացասական կրծքագեղձի քաղցկեղի, ենթաստամոքսային գեղձի քաղցկեղի:

Հակամարմինների հակաուռուցքային արդյունավետությունը կապված է վերջիններիս կողմից գործի դրվող մի քանի մեխանիզմների ակտիվացմամբ:

Հակամարմինները կարող են ակտիվացնել կոմպլեմենտը, որի հետևանքով հակամարմնով պատված բջջաթաղանթի վրա գոյանում են անցքեր, ինչն էլ հանգեցնում է ուղղակի ցիտոտոկսիկության: Որոշ հետազոտությունների համաձայն Ռիտուկսիմաբի հակաուռուցքային արդյունավետությունը պայմանավորված է կոմպլեմենտով միջնորդավորված ցիտոտոկսիկությամբ (Gaetano et al., 2003): Հակամարմինները կարող են ակտիվացնել նաև բնածին իմուն համակարգի բջիջներին՝ նեյտրոֆիլներին, մոնոցիտներին և բնական քիլլերներին՝ կապվելով վերջիններիս վրա առկա Fc ընկալիչների հետ (FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIC, FcγRIII), ինչի հետևանքով խթանվում է հակամարմիններով պայմանավորված բջջային ցիտոտոկսիկությունը (ADCC): FcγRI ընկալիչներ չունեցող սրանսագեն ուռուցքակիր մկների մոտ Ռիտուկսիմաբ և

Թրասթուրուցում արհեստականորեն հակամարմիններով բուժման ժամանակ արձանագրվում է ուռուցքի կայունությունը, ինչը վկայում է այն մասին, որ IgG1 հակամարմինների ճանաչումը FcγRII ընկալիչների կողմից շատ կարևոր է դրանց ներգործության և հակաուռուցքային արդյունավետության համար (Cartron and Rossi, 2009): Մոնոկլոնալ հակամարմիններից մի քանիսը ճնշում են ներընթաց ազդանշանի փոխանցումը, այդպիսով խաթարելով ուռուցքի զարգացման համար կարևոր նշանակություն ունեցող սպիտակուցների սինթեզը: Այդ թվին են պատկանում Ցետուքսիմաբ, Փանիթումաբ (խոչընդոտում են EGFR-ի միացումը իր ընկալիչին, կանխելով վերջինս դիմերիզացումը և ազդանշանի փոխանցումը (Shan et al., 2000):

Չնայած, այս հակամարմինների ազդեցության մեխանիզմները ամբողջովին ուսումնասիրված չեն, այդուհանդերձ պարզ է, որ դրանցից յուրաքանչյուրը կարող է կարևոր դեր ունենալ իմունային համակարգի հակաուռուցքային ակտիվության ապահովման հարցում:

Անցակետային ինհիբիտորներ

Իմունային համակարգի ակտիվացումը կախված է բազմաթիվ ստուգիչ կետերից, այսպես կոչված «իմունաբանական արգելակներից»: Դրանց միջոցով կարգավորվում է իմունային պատասխանը՝ սահմանափակելով առողջ բջիջների նկատմամբ իմունային պատասխանի ձևավորումը (Pardoll, 2012): Ուռուցքային բջիջները հաճախ խուսափում են իմունային պատասխանից այս «իմունաբանական արգելակների» միջոցով: Վերջիններիս թվին են պատկանում CTLA-4 և PD-1 մոլեկուլները, որոնք ուռուցքային թերապիաներում դիտարկվում են որպես թիրախային մոլեկուլներ (Hodi et al., 2010; Sharma et al., 2011): CTLA-4 կոնհիբիտորային ընկալիչ է, որն էքսպրեսիայի է ենթարկվում T-բջիջների վրա: Վերջինս կապվում է անտիգեն ներկայացնող բջիջների B7 ընտանիքին պատկանող CD80 կամ CD86-ի մոլեկուլների հետ և ի հակառակ կոստիմուլյատորային CD28-ի, ճնշում է T-բջիջների ակտիվացումը, այդպիսով խոչընդոտելով հակաուռուցքային իմունային պատասխանի ձևավորմանը: Ցույց

է տրված, որ որոշ ուռուցքների առկայության պայմաններում CTLA-4 մեծ քանակությամբ էքսպրեսիայի է ենթարկվում T բջիջների վրա: CTLA-4-ը կարևոր նշանակություն ունի T լիմֆոցիտների ֆունկցիայի կարգավորման մեջ, ինչն ակնհայտ է տրված CTLA-4^{-/-} մկների վրա, որոնք ի տարբերություն ստուգիչ՝ CTLA-4^{+/+} մկների մահանում են ագրեսիվ լիմֆոպրոլիֆերատիվ հիվանդությունից (Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995):

Այսպիսով չեզոքացնելով հակաուռուցքային իմուն պատասխանի ձևավորմանը խոչընդոտող գործոնները հնարավոր է կարգավորել ուռուցքի աճի և տարածման անկառավարելի ընթացքը: Այս սկզբունքի հիման վրա մշակված և իրականացվող իմունային թերապիաները ցույց են տվել հակաուռուցքային արդյունավետություն, ինչպես նախակլինիկական այնպես էլ կլինիկական հետազոտության փուլերում: Դրանց խմբին է պատկանում Իպիլիմումաբը մարդկային հակա-CTLA-4 IgG₂ մոնոկլոնալ հակամարմինը (Hodi et al., 2010; Topalian et al., 2012): Կլինիկական հետազոտության 3րդ փուլում այս հակամարմնի փորձարկումը վերջին փուլի մետաստատիկ մելանոմայով հիվանդների վրա խոստումնալից հակաուռուցքային արդյունավետություն է ցույց տվել: Մասնավորապես, հիվանդների 10%-ի մոտ արձանագրվել է կենսունակության ցուցանիշի հավաստի բարելավում (Hodi et al., 2010; Wolchok et al., 2009): Չնայած դրական արդյունքներին, այն ցուցաբերում է կողմնակի տոկսիկ ազդեցությունը, ինչը, ամենայն հավանականությամբ, աուտոիմուն բորբոքային պրոցեսների հետևանք է:

PD-1 հանդիսանում է մեկ այլ իմունային ստուգման կետ, որը մեծապես էքսպրեսիայի է ենթարկվում որոշ ուռուցքների վրա: Այդպիսիք են մելանոման, ձվարանների քաղցկեղը, գլիոբլաստոման, երիկամային, լյարդի ուռուցքային բջիջները և այլն: Ուռուցքային բջիջների վրա PD-L1-ի էքսպրեսիան կապվում է բուժման ոչ խոստումնալից ելքի կանխատեսման հետ: Անտիգեն ներկայացնող բջիջների վրա էքսպրեսիայի ենթարկվող PD-L1 (B7-H1) լիգանդը կապվելով T-բջիջների վրա առկա PD-1 ընկալիչի հետ հանգեցնում է T բջջային ընկալիչի

ազդանշանային ուղու որոշ կարևոր մոլեկուլների դեֆոսֆորիզացման՝ SHP2 ֆոսֆատազների միջոցով, ինչը խոչընդոտում է պրոբոբոբրային ցիտոկինների արտադրությանը, բջջային ցիկլի զարգացմանը և կենսունակության մոլեկուլների սինթեզի խափանմանը՝ ի վերջո հանգեցնելով T բջիջների ապոպտոզի: Նույն կերպ, ուռուցքային բջիջների վրա էքսպրեսիայի ենթարկվող B7-H1 լիգանդը կապվելով T-բջիջների PD-1-ի հետ ճնշում է վերջիններիս էֆֆեկտորային գործառույթները: Մոնոկլոնալ PD-1 հակամարմինների ներարկմամբ չեզոքացվում է PD-L1 ինհիբիցիոն լիգանդի և PD-1 ընկալիչի միացումը, այդպիսով կանխվում է T-բջիջների ապակտիվացումը և վերականգնվում է հակաուռուցքային էֆֆեկտորային ֆունկցիան: Մոնոկլոնալ PD-1 հակամարմինների նախակլինիկական և կլինիկական փորձարկումները ցույց են տվել, որ չնայած ուռուցքային բջիջների իմունոսուպրեսոր հատկությունների չեզոքացմանը, հակաուռուցքային ազդեցությունը ցանկալի արդյունքների չի հանգեցնում՝ միաժամանակ ի հայտ է գալիս ատոտոիմուն ռեակցիաների հետևանք հանդիսացող օրգանիզմի ընդհանուր թունավորում (Sznol and Chen, 2013): Կենսաբանական և կլինիկական հետազոտությունների տեսանկյունից կարևոր է պարզել, արդյոք ուռուցք ինֆիլտրացիա եղած T բջիջների էֆֆեկտորային գործառույթը վերականգնելու համար բավարար է միայն մեկ ինհիբիտորային ընկալիչի չեզոքացումը, թե հարկավոր կլինի միաժամանակ մի քանի ինհիբիտորային ընկալիչների համատեղ արգելափակում:

Ցիտոկիններ

Ցիտոկինները իմունային բջիջների կողմից արտազատվող կամ բջջային մակերեսին էքսպրեսիայի ենթարկվող իմունոկարգավորիչ նշանակություն ունեցող սպիտակուցներ են: Արդյունավետ հակաուռուցքային իմունիտետի ձևավորման հարցում ցիտոկինների նշանակալի դերակատարությունը ցույց է տրվել գենետիկական մոդիֆիկացման ենթարկված առաջին և երկրորդ տիպի ինտերֆերոններից զուրկ մկների վրա, որոնց մոտ արձանագրվել են սպոնտան

ուռուցքառաջացման հավաստիորեն բարձր հաճախականությունն ի համեմատ նորմալ կենդանիների (Kaplan et al., 1998; Picaud et al., 2002; Shankaran et al., 2001): Ներկայումս դեղերի և սննդանյութերի վերահսկման ամերիկյան կոմիտեի կողմից իմունային թերապիաներում կիրառման համար հաստատված են 2 ցիտոկիններ՝ ինտերլեյկին-2 և ինտերֆերոն- α (Bachmann and Oxenius, 2007): Ինչպես հայտնի է ինտերլեյկին-2 հանդիսանում է T բջիջների աճի խթանման գործոնը, որը կապվելով T բջիջների ընկալիչների հետ խթանում է վերջիններիս պրոլիֆերացիան (բազմացումը), ցիտոկինների շարունակական արտազատումը և տարբեր իմունային բջիջների ակտիվացումը (Dorak, 2002): Բարձր դոզայով IL2 թերապիայի արդյունքում երիկամային կարցինոմայով և մետաստատիկ մելանոմայով հիվանդների 4-6% -ի մոտ արձանագրվել է կենսունակության ցուցանիշի բարելավում (Bachmann and Oxenius, 2007): Ինտերֆերոն- α -ն պատկանում է I-ին տիպի ինտերֆերոններին և ունի բազմակի ազդեցություն իմունային բջիջների վրա: Լայնորեն կիրառվում է հատկապես հակավիրուսային թերապիաներում, իսկ հակաուռուցքային թերապիաներում՝ ավելի հազվադեպ: Մասնավորապես, հաջողությամբ փորձարկվել է ոչ մետաստատիկ մելանոմայով հիվանդների վրա՝ ցուցաբերելով 16% ընդհանրական պատասխան (ցույց է տալիս ուռուցքային բջիջների քանակության նվազմամբ հիվանդների տոկոսային քանակությունը), 5% ամբողջական պատասխան (երբ քաղցկեղային հիվանդության բոլոր նշանները անհետանում են) (Kirkwood et al., 1996): Ինտերֆերոն- α հաջողությամբ կիրառվել է նաև երիկամային կարցինոմայի բուժման մեջ (Motzer et al., 2002): Չնայած դրական արդյունքներին, ցիտոկիններով բուժումը օրգանիզմում տոկսիկ ռեակցիաների առաջացման պատճառ է հանդիսանում, ինչը սահմանափակում է վերջիններիս կիրառումը: Այսպիսով ցիտոկինների բազմապրոֆիլ և հաճախ իրար հակառակ՝ իմունոխթանիչ և իմունոսուպրեսոր ազդեցությունը իմունային համակարգի բջիջների վրա, խնդիրներ է ստեղծում արդյունավետ հակաուռուցքային իմուն պատասխանի ձևավորման համար:

Թերապևտիկ իմունային պատվաստանյութեր

Ի տարբերություն իմունային կանխարգելիչ պատվաստանյութերի, որոնք որպես կանոն առողջ մարդկանց են պատվաստվում, թերապևտիկ քաղցկեղային պատվաստանյութերը նախատեսված են ուռուցքակիր հիվանդների համար՝ նպատակ ունենալով իմուն համակարգի խթանման միջոցով՝ ոչնչացնել ուռուցքային բջիջներին (Lollini et al., 2006):

Իմուն համակարգի տարբեր բջջային և հումորալ կարգավորման մեխանիզմների միջոցով իրականացվում է ուռուցքային բջիջների թիրախային ոչնչացում՝ շրջանցելով նորմալ բջիջներին:

1891թ-ին Վիլյամ Բուլիի կողմից իմուն համակարգը խթանելու առաջին փորձը արվեց՝ սարկոմայով հիվանդներին *Streptococcus pyogenes* և *Serratia marcescens*-ի (Coley's Toxin) թուլացված բակտերիաների ներուռուցքային ներարկումներ կատարելով (McCarthy, 2006): Այսպիսի փորձարկում կատարելու միտքը ծագել էր, երբ սարկոմայով հիվանդների մոտ *Streptococcus pyogenes* բակտերիայով պայմանավորված ինֆեկցիայի (Էրիսպելաս) առկայության պայմաններում, դիտարկվել էր ուռուցքի սպոնտան ռեմիսիա: Չնայած հիվանդների մոտ արձանագրված որոշակի դրական արդյունքների, գիտական շրջաններում հոռետեսությամբ էին մոտենում այս աշխատանքին: Այսօր ժամանակակից իմունաբանությունը ցույց է տվել, որ ընդհանուր առմամբ մոտեցումը ճիշտ էր: Օրինակ միզապարկի քաղցկեղի բուժման համար հաստատված է և կիրառվում է միկոբակտերիալ ծագման bacillus Calmette-Guérin (BCG) պատվաստանյութը, (Lamm et al., 1991; van der Meijden et al., 2003; Morales et al., 1976): Չնայած գոյություն ունեցող բազմաթիվ խնդիրների, արդյունավետ հակաուռուցքային պատվաստանյութի ստեղծման մարտահրավերը, շարունակում է մնալ արդիական և օրակարգային: Ներկայումս բազմաթիվ հակաուռուցքային թերապևտիկ պատվաստանյութեր զարգացման, մշակման փուլում են կամ նախակլինիկական և կլինիկական փորձարկման փուլերում են: ԱՄՆ սննդի և դեղորայքի վերահսկման կոմիտեն

(FDA) հաստատել է 2 կանխարգելիչ պատվաստանյութեր, Հեպատիտ B վիրուսի դեմ, որը կարող է առաջացնել լյարդի քաղցկեղ, մյուսը՝ մարդկանց պապիլոմավիրուսի դեմ, որը հանդիսանում է կանանց մոտ արգանդի վզիկի քաղցկեղների առաջացման դեպքերի 70%-ի պատճառը:

Կախված կազմավորման ձևից և բաղադրությունից պատվաստանյութերը կարելի է դասակարգել հետևյալ հիմնական տեսակների՝ բջջային պատվաստանյութեր (իմունային կամ ուռուցքային բջիջներ), սպիտակուց/պեպտիդային պատվաստանյութեր և գենետիկ (ԴՆԹ, ՌՆԹ և վիրուսային) պատվաստանյութեր:

Պատվաստանյութեր ուռուցքային բջիջներից

Առևտուրով քաղցկեղային պատվաստանյութերը ստանում են հիվանդից անջատված ուռուցքային բջիջներից: Պատվաստանյութերի այս տեսակը առաջինն էր, որ կիրառվեց հակաուռուցքային թերապիաների փորձարկումների մեջ (Hanna and Peters, 1978): Քաղցկեղային բջիջները, որպես կանոն ենթարկվում են ճառագայթման և համատեղվում են իմունոխթանիչ ադյուվանտի հետ (BCG, LPS և այլն) այնուհետև ներարկվում այն նույն հիվանդին, որից վերցվել են ուռուցքային բջիջները (Berger et al., 2007; Harris et al., 2000; Maver and McKneally, 1979): Առևտուրով պատվաստանյութերը փորձարկվել են տարբեր քաղցկեղների վրա՝ ներառյալ թոքային քաղցկեղը (Nemunaitis and Nemunaitis, 2003; Rüttinger et al., 2007; Schulof et al., 1988) աղիքային քաղցկեղը (Hanna et al., 2001; de Weger et al., 2012), մելանոմա (Baars et al., 2002; Berd et al., 1990), երիկամային բջիջների քաղցկեղը (Antonia et al., 2002; Fishman et al., 2008) և շագանակագեղձի քաղցկեղը (Berger et al., 2007): Ապասկտիվացված ուռուցքային բջիջների պատվաստանյութերի հիմնական առավելությունն այն է, որ ուռուցքային անտիգենների ամբողջ սպեկտրը հասանելի է դառնում հիվանդի իմունային համակարգին: Թերությունը կայանում է նրանում, որ պատվաստանյութի պատրաստման համար ուռուցքային բջիջների որոշակի քանակ է անհրաժեշտ,

ինչը սահմանափակում է լայնածավալ կիրառումը, քանի որ հասանելի կարող է լինել միայն որոշ տեսակի քաղցկեղների որոշակի զարգացման փուլերում:

Դենդրիտիկ բջիջների պատվաստանյութեր

Դենդրիտիկ բջիջները պրոֆեսիոնալ անտիգեն ներկայացնող բջիջներ են, որոնք ծայրամասային հյուսվածքներում կլանում են օտարածին մասնիկները, մշակում և MHC մոլեկուլների միջոցով լիմֆային հանգույցներում ներկայացնում *naïve* T լիմֆոցիտներին (Banchereau and Steinman, 1998; Timmerman and Levy, 1999): Դենդրիտիկ բջիջների բացառիկ դերը ադապտիվ և բնածին իմունիտետների միջև անմիջական կապի ստեղծումն է: Սա է պատճառը, որ իմունային թերապիաներում անտիգեն սպեցիֆիկ իմունային պատասխան ստանալու համար ուղղակի կամ անուղղակի կերպով ակտիվացվում են դենդրիտիկ բջիջները: Ցույց է տրվել, որ դենդրիտիկ բջիջների տարբեր տեսակները պատասխանատու են որոշակի T- բջջային պատասխանի ձևավորման համար և անտիգենի ներկայացումը վերջիններիս միջոցով ոչ միշտ է հանգեցնում իմուն համակարգի ակտիվացմանը (Maldonado-López et al., 1999; Pulendran et al., 1999): T բջիջների ակտիվացման համար սկզբունքային նշանակություն ունի կոստիմուլյատորային մոլեկուլների (CD80, CD86, CD40) միջոցով երկրորդային ազդանշանի փոխանցումը, ինչպես նաև համապատասխան ցիտոկինների սինթեզ, որոնք կուղղորդեն Th1/Tc1 իմունային պատասխանի ձևավորումը (Frankenberger and Schendel, 2012): Հակառակ դեպքում էֆֆեկտորային T լիմֆոցիտների ակտիվացում տեղի չի ունենում, խթանվում է վերջիններիս աներգիան և ակտիվանում է սուպրեսորային T կարգավորիչ բջջային պոպուլյացիան՝ այդպիսով ձևավորելով իմուն հանդուրժողականություն (Bonifaz et al., 2004; Hawiger et al., 2001; Idoyaga et al., 2008): Դենդրիտիկ բջիջների պատվաստանյութերը, որպես կանոն, ստանում են հիվանդների ծայրամասային արյունից անջատելով մոնոցիտներ, որոնք *ex vivo* պայմաններում աճեցվում են համապատասխան ցիտոկինների և ուռուցքային անտիգենի առկայությամբ: Հասունացման համար դենդրիտիկ բջիջները

լրացուցիչ կերպով ակտիվացվում են որևէ ադյուվանտով TNF-alpha, LPS, և այլն: Դենդրիտիկ բջիջների համար որպես անտիգեն կարող են ծառայել ուռուցքից անջատված սպիտակուցներ, պեպտիդներ, ամբողջական ուռուցքային բջիջներ, ԴՆԹ/ՌՆԹ/վիրուս (Banchereau and Steinman, 1998; Murphy et al., 1996; Schuler-Thurner et al., 2002; Steele et al., 2011):

Առավել տպավորիչ է 2010թ-ին ամերիկյան FDA-ի կողմից հաստատված իմունային բջիջների վրա հիմնված մետաստատիկ շագանակագեղձի քաղցկեղի բուժմանն ուղղված Provenge™ պատվաստանյութի հակաուռուցքային արդյունավետությունը (Cheever and Higano, 2011): Provenge™-ը հիվանդների ծայրամասային արյունից անջատված և *ex vivo* պայմաններում աճեցված անտիգեն ներկայացնող բջիջներ են, որոնք բեռնվել են PAP-շագանակագեղձի անտիգենով: Այս պատվաստանյութով իմունիզացիաների արդյունքում հավաստիորեն բարելավվում է կենսունակության ցուցանիշը՝ 25.8 ամիս ի հակառակ 21.7 ամսվա (Longo, 2010):

Դենդրիտիկ բջիջների մի շարք պատվաստանյութեր կլինիկայում փորձարկվել են շագանակագեղձի քաղցկեղով, մելանոմայով, երիկամային կարցինոմայով, գլխումայով հիվանդների մոտ (Kantoff et al., 2010; Okada et al., 2011; Romano et al., 2011; Small et al., 2000): Չնայած նվազագույն կողմնակի ազդեցությունների և ցուցաբերած խոստումնալից հակաուռուցքային արդյունավետության, դենդրիտիկ բջիջներով պատվաստանյութերի կիրառումը քանակական սահմանափակումներ ունի՝ կապված պատվաստանյութի պատրաստման համար հիվանդից ամեն անգամ արյուն վերցնելու անհրաժեշտության հետ:

TLR ազոնիստները հակաուռուցքային թերապիաներում. TLR- ընկալիչներ

Իմունոխթանիչ ադյուվանտները առաջնային նշանակություն ունեն իմուն համակարգի ակտիվացման համար: Հակաուռուցքային իմունային պատասխանի ձևավորման համար ուռուցքային անտիգենների կիրառումը՝ անկախ բնույթից (պեպտիդ, սպիտակուց կամ ԴՆԹ/ՌՆԹ-ի մոլեկուլ) անհրաժեշտ է համադրել

իմունային աղյուվանտի հետ, հակառակ պարագայում անտիգենները ցուցաբերում են շատ թույլ արտահայտված իմունոգենություն: Օրինակ, այլումինիումի աղերը (Ալում) երկար տարիներ հաջողությամբ կիրառվում են զանազան իմունային թերապիաներում հիմնականում՝ որպես հումորալ իմուն պատասխանի խթանիչներ, սակայն այն արդյունավետ չի բջջային իմուն պատասխանի խթանման համար: Բնածին իմունիտետի ակտիվացմանը հաջորդում է ադապտիվ իմուն պատասխանի ձևավորումը: Աղյուվանտները նշանակալից դերակատարություն ունեն բնածին իմուն պատասխանի խթանման, ինչպես նաև դրան հաջորդող ադապտիվ իմուն համակարգի ձևավորման գործում: Բնածին իմուն պատասխանի իրականացման առաջին քայլը՝ օտար մասնիկների ճանաչողությունը կատարվում է բազմաթիվ տրասնմեմբրան կամ այսպես կոչված հետքային ընկալիչների միջոցով: TLR-ները պատկանում են հետքային ճանաչողության ընկալիչների ընտանիքին (Medzhitov et al., 1997): Դրանց միջոցով օտարածին մարմինների առկայությամբ պայամանվորված մոլեկուլային մասնիկները (pathogen associated molecular patterns) բացահայտվում են և պիտակվում են որպես էդալիսին: Դրանք էվոլյուցիոն տեսանկյունից պահպանողական մոլեկուլներ են՝ հիմնականում ընդհանուր շատ բակտերիաների, վիրուսների, պրոտոզոաների, սնկերի համար, կատարում են օրգանիզմի նորմալ կենսագործունեության ապահովման կարևորագույն գործառույթներ (Janeway and Medzhitov, 2002): Օրինակ, լիպոպոլիսախարիդը գրամ բացասական բակտերիաների բջջապատի հիմնական և կարևոր բաղադրիչն է և հանդիսանում է TLR4-ի դասական ազոնիստը: Բակտերիալ ֆլագելայի բաղադրիչ Ֆլագելինը TLR5 ազոնիստ է, չմեթիլացված բակտերիալ և վիրուսային CpG ԴՆԹ՝ ներբջջային TLR9-ազոնիստ: Վիրուսային մեկշղթայանի ՌՆԹ՝ TLR7 ,TLR8, երկշղթայանի ՌՆԹ՝ TLR3 ազոնիստ (Takeda et al., 2003):

TLR-ընկալիչների կողմից իրենց համապատասխան լիգանդների ճանաչումը ակտիվացնում է ներբջջային ազդանշանային ուղին, որը և

հանգեցնում է պրոբոբոբային ցիտոկինների և քեմոկինների ակտիվացմանը, 1-ին խմբի ինտերֆերոնների՝ $IFN\alpha$, $IFN\beta$, սինթեզին և դենդրիտիկ բջիջների հասունացմանը՝ ինչը ընդհանուր առմամբ խթանում է բնածին իմուն համակարգը (Kawasaki and Kawai, 2014):

Բոլոր TLR-ները ունեն ամինո-տերմինալային՝ լեյցինով հարուստ հատվածներ, որոնց միջոցով իրականացվում է համապատասխան լիգանդների ճանաչումը, իսկ կարբոքսիլային հատվածում TIR (Toll-interleukin-1 receptor) դոմեյն, որի միջոցով փոխանցվում է ներբջջային ազդանշանը: Մի փոքր մանրամասն քննարկենք TLR4-ի միջոցով ազդանշանի փոխանցման ուղին:

Բոլոր TLR-ները բացի TLR3ից օգտագործում են MyD88 ուղին, ինչի արդյունքում ակտիվանում է NF-kB տրանսկրպցիոն գործոնը և համապատասխանաբար խթանվում է բոբոբային ցիտոկինների սինթեզը:

IRAK1, IRAK4 and TRAF6 ադապտորային մոլեկուլներ (սպիտակուցային մոլեկուլներ, որոնք ԱԵՖ-անկախ կառուցվածքային տարածական փոփոխությունների ենթարկվելով, հանդես են գալիս որպես ազդանշանի փոխանցողներ) տեղակայված են MyD88-ից ներքև, TIRAP ադապտորային մոլեկուլով միջնորդավորված ակտիվացումը նույնպես իրականացվում է MyD88-ուղու միջոցով: TRIF ադապտորային մոլեկուլը ներգրավված է TLR3 և TLR4 ազդանշանի փոխանցման ուղիներում: Սա MyD88 ուղուց անկախ ակտիվացում է, որի շնորհիվ կատարվում է IRF3 տրանսկրպցիոն գործոնի սինթեզ և դրանից էլ կախված մի շարք գենների ակտիվացում, մասնավորապես՝ $IFN-\beta$ -ի (Kawai and Akira, 2010; Kawasaki and Kawai, 2014):

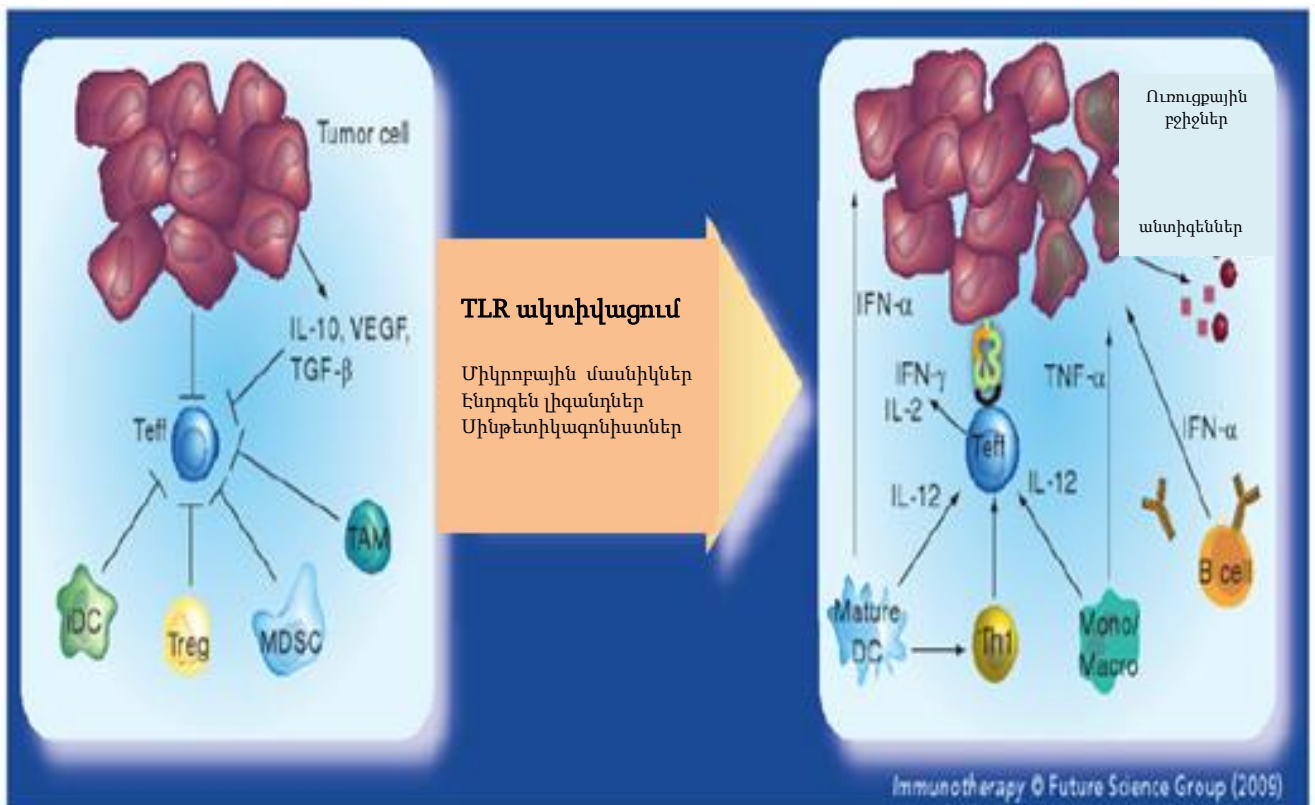
Օտարածին մասնիկները ճանաչվում են անտիգեն ներկայացնող բջիջների վրա առկա TLR ընկալիչների միջոցով և ազդանշանը ադապտորային մոլեկուլների միջոցով փոխանցվում է կորիզ, ակտիվանում են համապատասխան տրանսկրպցիոն գործոնները, TLR4-ի պարագայում դրանք են NF-kB, IRF3, IRF5, որոնք էլ ակտիվացնում են պրոբոբոբային IL1, IL6, IL12, $IFN\beta$ -I ցիտոկինների սինթեզը (Ko-Jiunn, 2006): Վերջիններս կարևոր

նշանակություն ունեն իմունային պատասխանի ուղղվածության ձևավորման հարցում: Մասնավորապես, IL12-ի ազդեցությամբ անտիգեն ներկայացնող բջիջները՝ այդ թվում դենդրիտիկ բջիջները հասունանում են: Բջջային մակերեսին էքսպրեսիայի են ենթարկվում MHCII և կոստիմուլյատորային մոլեկուլները՝ CD80, CD86, CD40, ինչպես նաև տեղի է ունենում CCR7-ի դրական կարգավորում և բջիջների տեղաշարժը լիմֆային հանգույցներ: Ինչպես հայտնի է T-բջիջների ակտիվացման և պրոլիֆերացիայի համար՝ անտիգենի ներկայացմանը զուգահեռ, անհրաժեշտ է երկրորդային ազդանշանի ապահովումը կոստիմուլյատորային մոլեկուլների միջոցով (CD80, CD86, CD40): Այսպիսով իմուն պատասխանը ուղղորդվում է Th1 իմունային պատասխանի ձևավորման կողմը՝ ներգրավելով անտիգեն սպեցիֆիկ CD4 Th բջիջները, ցիտոտոկսիկ CD8, NK բջիջները: IL6 ցիտոկինը նպաստում է անտիգեն սպեցիֆիկ T-բջիջների ակտիվացմանը՝ ճնշելով T կարգավորիչ բջիջներին: Առաջին խմբի ինտերֆերոնների սինթեզը TLR4-ի ակտիվացման ժամանակ ևս շատ կարևոր նշանակություն ունի: Այն հեշտացնում է անտիգենի խաչաձև ներկայացման պրոցեսը, հիշողության T-բջիջների պրոլիֆերացիան, կանխում է T-բջիջների ապոպտոզը, նպաստում դենդրիտիկ բջիջների հասունացման գործընթացին ինչպես նաև NK-երի ակտիվացմանը:

Հաշվի առնելով TLR4-ի և ընդհանրապես TLR ազոնիստների բազմակողմանի ազդեցությունը բնածին և ադապտիվ իմուն պատասխանի վրա՝ վերջիններս իրավամբ համարվում են խոստումնալից և լայնորեն կիրառվում են ուռուցքային իմունոթերապիաներում՝ հիմնականում որպես ադյուվանտներ համակցվելով սպեցիֆիկ անտիգենի հետ, ավելի հազվադեպ կիրառվում են նաև մոնոթերապիաներում: Ստորև սխեմատիկ ներկայացված է (նկար 1) թե ինչպես են ուռուցքային բջիջները VEGF, IL10, TGFb ցիտոկինների անուղղակի կամ ուղղակի ներգործությամբ ճնշում էֆֆեկտորային T բջջային պոպուլյացիային: Տարբեր ազոնիստների միջոցով (միկրոբային մասնիկներ, էնդոգեն լիզանոններ, սինթետիկ մոլեկուլներ) TLR ընկալիչների ակտիվացմամբ

կատարվում է անտիգեն ներկայացնող բջջային պոպուլյացիաների (դենդրիտիկ բջիջներ, մակրոֆագեր, մոնոցիտներ, B-լիմֆոցիտներ) ակտիվացում և հասունացում, ինչի շնորհիվ հաջորդիվ ձևավորվում է հակաուռուցքային ադապտիվ իմունիտետ:

Նկար 1 . TLR ազոնիստների իմունային մակարդակով ներգործությունը ուռուցքի և դրա միկրոմիջավայրի վրա



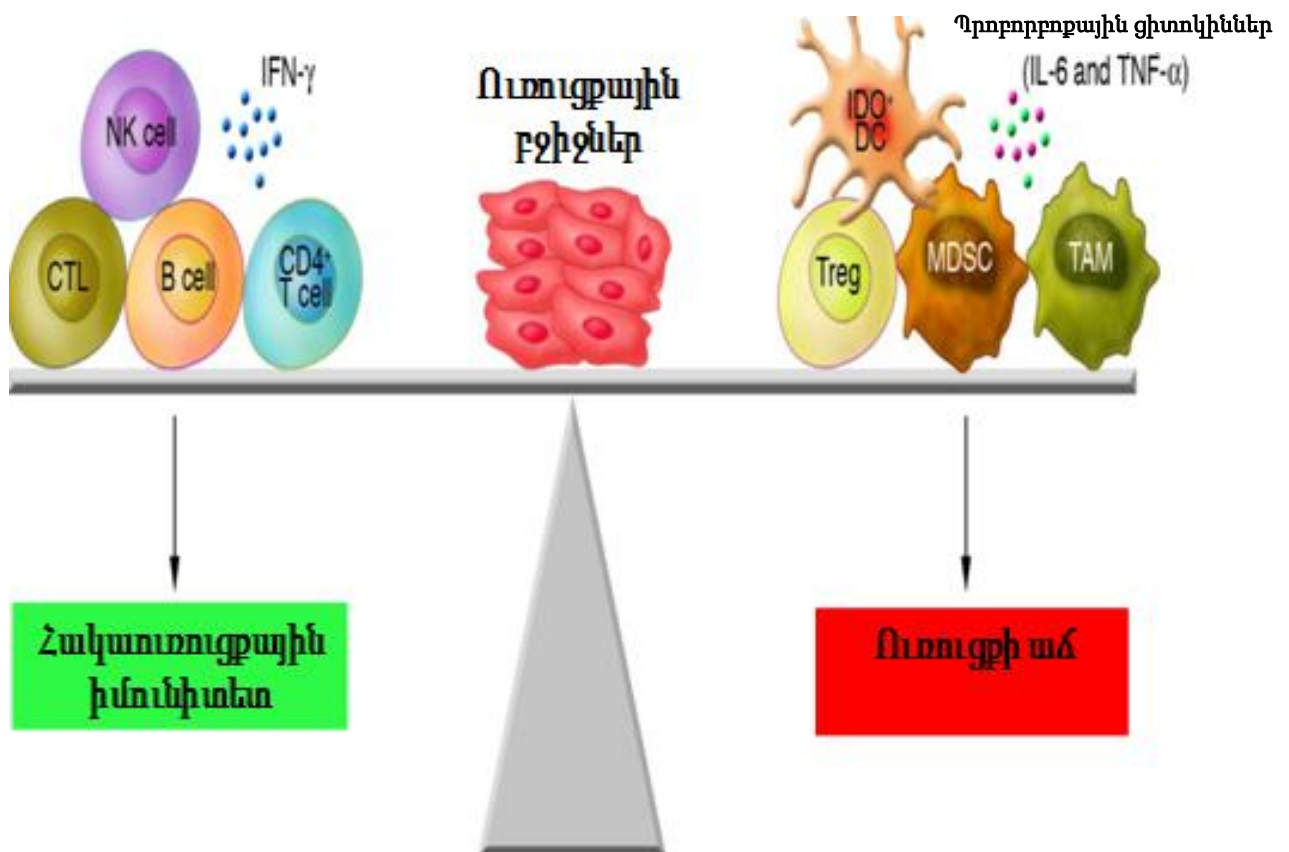
TLR ազոնիստները լայնորեն կիրառվում են ժամանակակից իմունոթերապևտիկ դեղամիջոցների կազմում: Օրինակ *Calmette–Guerin* բացիլը, որպես ադյուվանտ կիրառվում է բջջային պատվաստանյութերի հետ համատեղ ադիքային քաղցկեղի և չարորակ մելանոմայի բուժման համար: Մոնոֆոսֆորիլ Լիպիդ Ա հանդիսանում է TLR4 ազոնիստ և լայնորեն օգտագործվում են որպես ադյուվանտ: Այն 1984 թվականին ստացել են ԼՊՄ-ի մոդիֆիկացիայի եղանակով, ի տարբերություն ԼՊՄ-ի ցիտոտոկսիկ չէ: Հաստատված է Եվրոպայում՝ որպես հեպատիտ Բ պատվաստանյութի ադյուվանտ (B vaccine Fendrix™) , HPV (Cervarix™), նաև Stimuvax® վակցինաների մասն է կազմում (թոքի քաղցկեղի

թերապիա) (Butts et al., 2005) և այլն: CpG օլիգոդեօքսինուկլեոտիդները կարճ հաջորդականություններ են՝ կազմված են CpG հատվածներից և հանդիսանում են TLR9-ի ագոնիստ: Դրանք հաջողությամբ կիրառվել են հակաուռուցքային վակցինաների հետ որպես ադյուվանտ Montanide ISA 51-ի կազմում (Speiser and Romero, 2005):

1.2 Ուռուցքով պայմանավորված իմունոսուպրեսիա

Ուռուցքի միկրոմիջավայրում իմունոսուպրեսիվ մեխանիզմների ակտիվացումը իմունային թերապիաների ցուցաբերած ոչ բավարար հակաուռուցքային արդյունավետության հիմնական պատճառներից մեկն է: Իմունոսուպրեսիան իրականացվում է հիմնականում հետևյալ սուպրեսորային բջջային պոպուլյացիաների միջոցով՝ միելոիդային սուպրեսորային բջիջներ, T կարգավորիչ բջիջները և այսպես կոչված ուռուցքի հետ ասոցացված մակրոֆագեր (նկար 2):

Նկար 2 Իմունոսուպրեսիվ և հակաուռուցքային էֆֆեկտոր պոպուլյացիաներ



Միելոիդային սուպրետորային բջիջներ (MDSC)

Առաջին անգամ MDSC-ները նկարագրվել են որպես CD34 դրական բջիջներ, որոնք իրականացնում են իմունային պատասխանի սուպրեսիա և մեծ քանակությամբ հայտնաբերվում են գլխի և վզի կարցինոմայով հիվանդների ծայրամասային արյան մեջ (A. Schmidt Pak, 1995; Young et al., 1999): Հետագայում մի քանի կլինիկական հետազոտություններում ցույց է տրվել, որ կրծքագեղձի քաղցկեղով հիվանդների մոտ MDSC-ների քանակությունը ծայրամասային արյան մեջ բարձր է առողջ մարդկանց հետ համեմատած: Ավելին հիվանդների մոտ MDSC-իների տոկոսային քանակությունը գտնվում է դրական կորելյացիայի մեջ մետաստազների քանակի հետ (Diaz-Montero et al., 2009a; Ghochikyan et al., 2014b): Միելոիդային պոպուլյացիաների քանակի մեծացում է նկատվում նաև բազմաթիվ քաղցկեղային մկնային մոդելների վրա, ինչպիսիք են օրինակ 4T1(կրծքագեղձի քաղցկեղ), EL-4 (լիմֆոմա), CT25 (աղիքային քաղցկեղ), LLC(թոքային քաղցկեղ), B16 (մելանոմա), MethA, M37, C3, ANV (Youn et al., 2008a): MDSC-ները կուտակվում են ոսկրածուծում, փայծաղում, լյարդում, լիմֆային հանգույցներում, ծայրամասային արյան մեջ, ինչպես նաև սոլիդ ուռուցքների մեջ: Այսպիսով MDSC-իների քանակական աճ է դիտարկվել տարբեր ուռուցքակիր մկնային մոդելների վրա ու քաղցկեղով հիվանդ մարդկանց մոտ: MDSC-ների կուտակումը կախված է ուռուցքի կողմից կամ ուռուցքի միկրոմիջավայրում գտնվող սեփական բջիջների կողմից արտադրվող բազմաթիվ գործոններով (Marigo et al., 2008; Sinha et al., 2005b; Youn et al., 2008): Ցույց է տրված, որ MDSC-ները կուտակվում են նաև ի պատասխան բակտերիալ (Delano et al., 2007) և պարազիտար ինֆեկցիաների (Brys et al., 2005), քեմոթերապիայի, էքսպերիմենտալ ճանապարհով ստեղծված աուտոիմուն պրոցեսների ինչպես նաև ընկճախտի ժամանակ(Makarenkova et al., 2006):

MDSC-ները չհասունացած միելոիդային բջիջներ են, հանդիսանում են դենդրիտիկ բջիջների, մակրոֆագերի կամ գրանուլոցիտների նախորդները: Քաղցկեղի կենդանական մոդելներում միելոիդային սուպրետորային բջիջները

նկարագրվում են իրենց մակերեսին GR1, CD11b մոլեկուլների էքսպրեսիայով: GR1 ներառում է մակրոֆագերի և նեյտրոֆիլների մարկերները՝ Ly6C, Ly6G, իսկ CD11b հանդիսանում է միայն մակրոֆագերին բնորոշ մարկեր: Ըստ կորիզային մորֆոլոգիայի տարբերում են միելոիդային սուպրեսորային բջիջների 2 ենթապոպուլյացիա՝ մոնոցիտիկ և գրանուլոցիտիկ: Մոնոնուկլեար MDSC-ները համարվում են «մոնոցիտիկ» և սովորաբար ունենում են CD11b⁺, Ly6C^{+/-} և Ly6G-ի մեծաքանակ էքսպրեսիայով ֆենոտիպ, բազմակորիզավոր MDSC-ները՝ «գրանուլոցիտ/ նեյտրոֆիլանմաններ» և ունենում են CD11b⁺, Ly6C⁺ և Ly6G-ի ցածրաքանակ էքսպրեսիայով ֆենոտիպ (Youn et al., 2008):

Քաղցկեղով հիվանդների մոտ MDSC-ները, որպես կանոն, նկարագրվում են հետևյալ մարկերներով՝ CD11b⁺CD33⁺CD34⁺CD14⁻HLA-DR⁻: Միելոիդային սուպրեսորային բջիջները ճնշում են իմուն համակարգը՝ ազդելով և ձեռքբերովի և բնածին իմուն պատասխանների վրա: Տարբեր կենդանական մոդելներում և քաղցկեղով հիվանդների մոտ դիտարկվել է MDSC-իների առկայությամբ պայմանավորված T-բջջային պրոլիֆերացիայի և ցիտոտոկսիկության խափանում: T բջջային ընկալիչի (TCR) գենետիկական մոդիֆիկացիայով մկների փայծաղի մոնոնուկլեար բջիջները այդ մոդիֆիկացիային համապատասխան սպեցիֆիկ անտիգենի առկայությամբ և ուռուցքակիր մկների MDSC-ների հետ ինկուբացիայի ենթարկելիս արձանագրվում է CD4 և CD8 T լիմֆոցիտների ակտիվացման և պրոլիֆերացիայի ձախողում (Mazzoni et al., 2002; Sinha et al., 2005): Մարդկանց ծայրամասային արյունից անջատված MDSC-իների ֆունկցիոնալ ակտիվությունը փորձարկվել է ոչ սպեցիֆիկ՝ CD3 և CD28 հակամարմիններով, այս պարագայում ցույց է տրվել, որ միելոիդային սուպրեսորային բջիջները ճնշում են նաև T-բջիջների ոչ սպեցիֆիկ ակտիվացումը: Մի շարք աշխատություններում *in vivo* պայմաններում ցույց է տրված միելոիդային սուպրեսորային բջիջների ֆունկցիոնալ չեզոքացում տարբեր քիմիական կամ կենսաբանական ակտիվությամբ դեղամիջոցներով, ինչպես օրինակ քեմոթերապեվտիկ

դեղամիջոց Gemcitabine-ը (Hanh et al., 2009), GR1+ հակամարմինները (Sinha et al., 2005b): MDSC-իների ֆունկցիոնալ չեզոքացումը հանգեցնում է իմունային էֆֆեկտոր բջիջների՝ T լիմֆոցիտների և բնական քիլերների ակտիվության վերականգնմանը, ինչն էլ իր հերթին նպաստում է իմունոթերապևտիկ միջամտության արդյունավետության բարձրացմանը:

Մկների վրա կատարված *in vivo* հետազոտություններում ցույց է տրված, որ MDSC-իների կուտակման համար պատասխանատու գեների, ինչպիսիք են STAT3, STAT6 (Kortylewski et al., 2005; Sinha et al., 2005a) 1CD1d (Terabe et al., 2006) ապասկտիվացումը բերում է T բջիջների ֆունկցիաների վերականգնմանը, արդյունքում ուռուցքի և/կամ մետաստազների առաջխաղացման նվազմանը: Կախված տարիքից քաղցկեղի առաջացման բարձր ռիսկը մեծահասակների մոտ կապվում է նաև MDSC-իների բարձր քանակի հետ (Grizzle et al., 2007): Այս օրինաչափությունը դիտարկվել է նաև կենդանական մոդելների վրա, մասնավորապես ցույց է տրվել, որ տարեց մկների մոտ փոխպատվաստված ուռուցքների զարգացման հավանականությունը բարձր է ի համեմատ երիտասարդ մկների (Grizzle et al., 2007):

MDSC-ները խթանում են ուռուցքի աճն ու զարգացումը՝ ուղղորդելով իմունային պատասխանը 2րդ տիպի զարգացմամբ, որի ժամանակ առավելապես արտադրվում են 2րդ խմբի ցիտոկին IL10 (Sinha et al., 2007) և ընդհակառակը ճնշվում է մակրոֆագների կողմից արտադրվող 1-ին խմբի ցիտոկին IL12, որը ինչպես նշվել է խթանում է դենդրիտիկ բջիջների հասունացումը և այլ հակաուռուցքային մեխանիզմները:

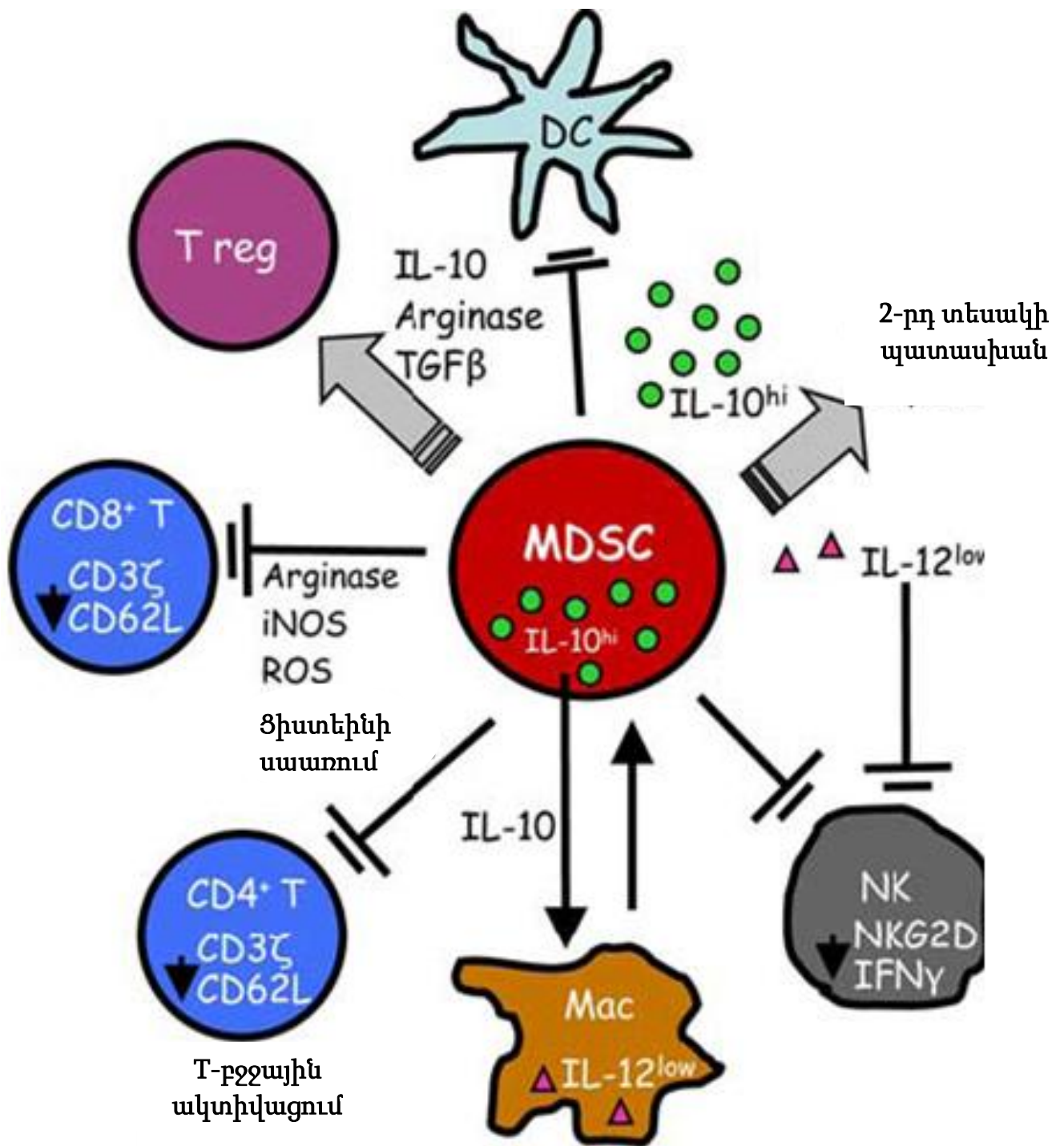
MDSC-իների կողմից NK բջիջների ֆունկցիաների ճնշմանը վերաբերվող տվյալները հակասական են: Մի խումբ հետազոտողների կողմից ցույց է տրված, որ MDSC-ները չեզոքացնում են բնական քիլերների ցիտոտոկսիկությունը՝ խաթարելով վերջիններիս կողմից IFN μ -ի արտադրությունը: Դա հնարավոր է միայն MDSC-իների և NK բջիջների միջև ուղղակի կապի ստեղծման դեպքում՝ NKG2D ընկալիչի էքսպրեսիան ճնշելու միջոցով (Nefedova et al., 2005; Xiao et al.,

2015): Հետազոտողների մեկ ուրիշ խումբ ցույց է տվել, որ MDSC-ների բջջային մակերեսին դիտարկվում է Rael-ի էքսպրեսիա, որը հանդիսանում է լիգանդ NKG2D-ի համար և ակտիվացնում է NK բջիջներին: Ամենայն հավանականությամբ, ստացված տվյալների միջև տարբերությունները կարող են բացատրվել MDSC-իների տարբեր սուբպոպուլյացիաների առկայությամբ, ինչը մեկ անգամ ևս վկայում է, որ MDSC-ները հանդիսանալով չհասունացած միելոիդային բջիջների հետերոգեն պոպուլյացիա՝ կախված արտաքին միկրոմիջավայրի գործոններից կարող են հանդես գալ տարբեր սուպրեսորային մեխանիզմներով: Այսպիսով բնածին իմունիտետը խաթարվում է մակրոֆագերի կողմից IL12 արտադրությունը ճնշելու և MDSC-իների կողմից IL10 արտադրությունը խթանելու միջոցով, մյուս կողմից էլ NK բջիջների ցիտոտոկսիկությունը ճնշելով:

T-բջիջների սուպրեսիան իրականացվում է մի քանի տարբեր մեխանիզմներով՝ պայամանավորված MSDC-իների պոպուլյացիաների հետերոգենությամբ: Ուռուցքային բջիջների կողմից արտադրվող GMSCF-ի ազդեցությամբ այս սուպրեսորային բջիջները կուտակվում են լիմֆային օրգաններում, որտեղ անմիջականորեն ճնշում են ալլոանտիգենների առկայությամբ պայամանավորված T և B բջիջների պրոլիֆերացիան, ինչպես նաև ցիտոկինների սինթեզը: Այս գործընթացը իրականացվում է արգինազի և թթվածնի ակտիվ միացությունների (ROS) արտադրման, ցիստեին անփոխարինելի ամինաթթվի միջավայրից սպառելու միջոցով, ինչպես նաև MDSC-ների կողմից արտազատվող են IL10 և TGFB ցիտոկինների ազդեցությամբ Treg-ների ակտիվացման շնորհիվ: Ցույց է տրված, որ T բջիջների ընկալիչի նիտրացման միջոցով խափանվում է անտիգեն սպեցիֆիկ պրոլիֆերացիան (Marigo et al., 2008; Serafini et al., 2008): Այսպիսով այս տվյալները հիմք են տալիս ասել, որ միելոիդային սուպրեսորային բջիջները կարևոր դեր ունեն իմուն համակարգի համապատասխան բջջային պոպուլյացիաների հակաուռուցքային գործառույթների իրականացումը խաթարելու, ճնշելու գործում: Նկար 3-ում ցույց

Է տրված MDSC-իների կողմից իրականացվող հակաուռուցքային իմուն պատասխանի ձևավորմանն ուղղված իմունոսուպրեսիվ մեխանիզմները:

Նկար 3 MDSC-իների սուպրեսորային ակտիվության իրականացման մեխանիզմները



T-կարգավորիչ բջիջները (Tregs)

Ուռուցքային միկրոմիջավայրում նկարագրված և իմունային թերապիաների ձախողման պատճառ հանդիսացող մեկ այլ իմունոսուպրեսոր գործառույթներով բջջային պոպուլյացիա են կազմում T-կարգավորիչ բջիջները: Ուռուցքի միկրոմիջավայրը խթանում է Treg-ների ակտիվացումը, զարգացումը, կազմավորումը և ներգրավում է ուռուցքի աճի և տարածմանը նպաստող տարբեր պրոցեսների մեջ (Liu et al., 2008; Salama et al., 2009): Treg-ները նկարագրվում են որպես T բջիջների պոպուլյացիա, որ ազդելով այլ բջիջների վրա ճնշում են իմուն պատասխանը (McHugh et al., 2002; Shevach, 2001): Հայտնի է, որ նայիվ CD4 բջիջները տարբերակվում են T-helper բջիջների Th1, Th2, Th9, Th17 և Tregs: Th1, Th2, Th9, Th17 մեծապես ներգրավված են օրգանիզմը ներբջջային պատոզեններից և արտաբջջային մակարոյծներից պաշտպանության ուղղված ադապտիվ իմուն պատասխանի ձևավորման մեջ: Ի հակառակ սրա, Treg բջջային պոպուլյացիան առաջնային նշանակություն ունի իմուն համակարգի հանդուրժողականության ձևավորման և վերոնկարագրված CD4 բջիջների կողմից ակտիվացրած իմուն պատասխանի և բորբոքային պրոցեսների սահմանափակման հարցում (Zheng, 2013): Ցույց է տրված, որ Treg-ների չեզոքացման արդյունքում գրանցվել է հակաուռուցքային իմունոթերապիայի արդյունավետության բարձրացում: Treg-ները CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ բջիջներ են: FoxP3 ներբջջային մարկեր է, որը հանդիսանում է ԴՆԹ-ին կապվող սրանսկրիպցիոն գործոն՝ ներգրավված Treg-ների ձևավորման և գործառնապես կայանալու հարցում: Ըստ ծագման բնույթի տարբերում են Treg –ների 2 տեսակ՝ դասական համարվող, թիմուսում ձևավորվող բնական Treg-ներ (nTregs -natural Tregs), և ձեռքբերովի Treg -ներ (iTregs-inducible): Բնական T կարգավորիչ բջիջները կազմում են ընդհանուր լիմֆոցիտների 5-10%: iTreg-ները ձևավորվում են ծայրամասային արյան մեջ նայիվ T-լիմֆոցիտներից կամ nTreg-ներից՝ տարբեր գործոնների ազդեցությամբ, մասնավորապես IL10, TGFb-ի (Riley et al., 2009; Walker et al., 2003): Թիմուսում ձևավորվող բնական Treg-ները բնորոշվում

են Foxp3-ի կայուն էքսպրեսիայով, ի հակառակ դրա ծայրամասային արյան մեջ ձևավորվող iTreg-ներին բնորոշ է Foxp3-ի էքսպրեսիայի անկայուն բնույթ: Սա վկայում է այն մասին, որ iTreg-ները համապատասխան գործոնների, պայմանների առկայությամբ ունակ են փոխակերպվելու ավանդական CD4 Th բջիջների: *In vitro* պայմաններում iTreg-ները ստացվում են ավանդական T (Tconv) բջիջների TCR ակտիվացումից՝ IL-2 և TGF- β մասնակցությամբ: iTreg-ների մոտ Foxp3-ի էքսպրեսիան TGF β կախվածություն ունի, ինչով վերջիններս տարբերվում են բնական T կարգավորիչ բջիջներից: Սա լրացուցիչ կերպով հաստատվել է նաև *in vivo* փորձերի արդյունքում՝ TGF β -/- մկների մոտ դիտարկելով nTreg-ների նորմալ քանակություն և ֆունկցիոնալ ակտիվություն (Waight et al., 2015): 4 θ 1 ուռուցքակիր մկների առաջնային ուռուցքների մեջ հայտնաբերվել են մեծ քանակությամբ Tregs, CD4 և CD8 բջիջներ: Ուռուցքի մեջ հայտնաբերված Treg բջիջները պրոլիֆերացիայի չեն ենթարկվում նույնիսկ IL2-ի ներկայության պայմաններում, միևնույն ժամանակ ցուցաբերելով ուժեղ սուպրեսիվ ակտիվություն: Ցույց է տրված, որ վերջիններիս ներկայությամբ CD4 հելփեր բջիջները դառնում են աներզիկ, իսկ CD8 բջիջների պրոլիֆերատիվ և ցիտոտոկսիկ ակտիվությունը ճնշվում է: Treg -ների չեզոքացման արդյունքում վերականգնվում է T լիմֆոցիտներին բնորոշ էֆֆեկտոր ակտիվությունը (Corthay, 2009; Winstead and Khoruts, 2007):

Կախված հիվանդության տեսակից, զարգացման փուլից ակտիվանում են խիստ որոշակի T կարգավորիչ բջիջների սուբպոպուլյացիաներ ըստ այդմ կատարվում է նաև սուպրեսորային ազդեցության սպեցիֆիկ մեխանիզմի ակտիվացում: Որպես կանոն, բնական Treg-ները կանխում են համակարգային օրգան-սպեցիֆիկ աուտոիմունիտետը, իսկ թիմուսից դուրս ձևավորվող Treg-ները կարգավորում են Th2 իմուն պատասխանը սնկային և բակտերիալ ինֆեկցիաների, բորբոքային գործընթացների ժամանակ (McLachlan et al., 2009; Rubtsov et al., 2008): Treg-ների դեպի տարբեր օրգաններ ինֆիլտրացիան, մեծամասամբ, կարգավորվում է քեմոկինների ընկալիչների տարբերակված

էքսպրեսիայի միջոցով: Այսպես օրինակ, CXCR4 և CCR7 ընկալիչների էքսպրեսիա ունեցող nTreg-ները տեղաշարժվում են դեպի ողնուղեղ և երկրորդային լիմֆոիդ օրգաններ: CCR6 և CCR4 քեմոկինների միջոցով Treg-ները ուղղորդվում են դեպի մաշկ և թոքեր (Tellem et al., 2001; Kleinewietfeld et al., 2005): Տարբեր մկնային մոդելների վրա ցույց է տրված, որ Treg-ների չեզոքացումը խոչընդոտում է ուռուցքի առաջխաղացմանը: Այդ նպատակով կիրառվում են հակա-CD25 հակամարմինները, որոնք կարող են չեզոքացնել նաև այլ՝ պոտենցիալ հակաուռուցքային արդյունավետությամբ իմունային էֆֆեկտոր բջիջներին (Olkhanud et al., 2009): Treg-ների թերապևտիկ չեզոքացումը կլինիկական փուլում կարող է լինել ոչ արդյունավետ, քանի որ դեռևս հայտնի չեն սպեցիֆիկ մեխանիզմներ միայն Treg-ներին չեզոքացնելու համար:

Treg-ների կողմից իրականացվող սուպրեսիայի մեխանիզմները

Treg-ները կարող են արտազատել սուպրեսորային ցիտոկիններ, որոնց միջոցով ուղղակի կերպով ինհիբիցիայի են ենթարկում էֆֆեկտորային T բջիջներին և միելոիդային բջիջներին: Treg-ների մակերեսին կատարվում է CD25-ի (IL2 ընկալիչի շղթան) էքսպրեսիա, ինչի շնորհիվ կապում է IL2 և բջջային միկրոմիջավայրում ստեղծվում է IL2-ի պակասորդ, որն էլ հանգեցնում է Bim-միջնորդավորված ապոպտոզի: Ակտիվացած Foxp3+ Treg բջիջները կարող են ցուցաբերել ցիտոտոկսիկ ակտիվություն և ինչպես CD8 բջիջները, անմիջականորեն սպանել էֆֆեկտոր բջիջներին գրանզիմի միջոցով: Ակտիվացած T կարգավորիչ բջիջների մակերեսին տեղի է ունենում տարբեր տեսակի մոլեկուլների էքսպրեսիա, ինչպիսին է օրինակ գալեկտին1, որը կապվելով էֆֆեկտոր T լիմֆոցիտների ընկալիչներին սահմանափակում, խափանում է բջջային ցիկլը: Treg-ների սուպրեսորային այս բոլոր մեխանիզմները կիրառելի են նաև ադապտիվ իմուն համակարգի, այդ թվում նաև անտիգեն ներկայացնող բջիջների ֆունկցիաները խափանելու համար:

Նկարագրված են մի քանի մեխանիզմներ, որոնցով Treg-ները ազդում են անտիգեն ներկայացնող բջիջների վրա: Treg-ների վրա առկա է CTLA-4 ընկալիչի

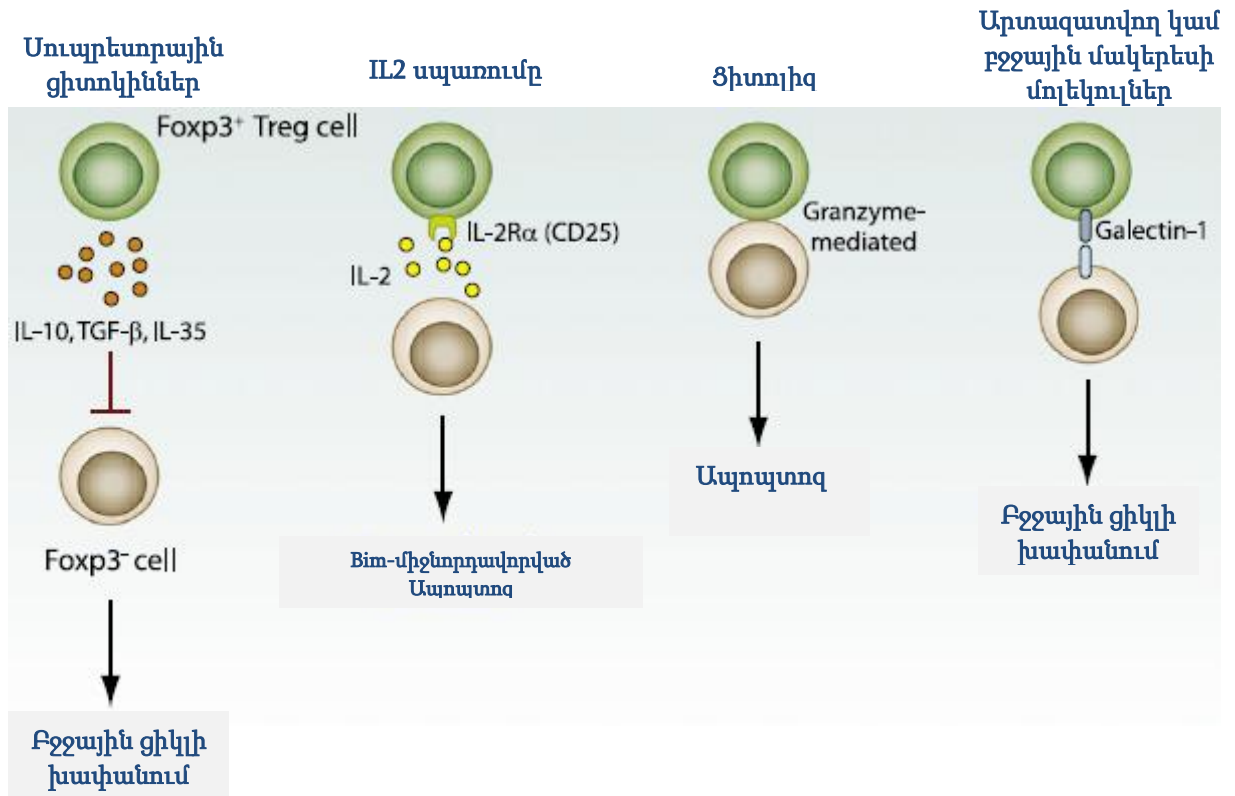
Էքսպրեսիա, որը ի տարբերություն CD28-ի, կապվելով դենդրիտիկ բջիջների վրա CD80 և CD86 կոստիմուլյացիոն մոլեկուլների հետ հանգեցնում է այս մոլեկուլների հետագա էքսպրեսիայի ճնշմանը՝ խաթարելով դենդրիտիկ բջիջների հետագա հասունացումը և նայիվ T լիմֆոցիտներին ակտիվացնելու կարևորագույն գործառույթը: Կոստիմուլյացիոն մոլեկուլների էքսպրեսիայի խաթարման մեխանիզմը ցույց է տրված ինչպես մկների այնպես էլ մարդկանց դենդրիտիկ բջիջների վրա (Enk, 2005):

Մեկ այլ բջջային մակերեսի անտիգեն կարևոր դերակատարություն ունի դենդրիտիկ բջիջների սուպրեսիայի գործում, դա LAG-3 (CD223)-ն է՝ CD4-ի հոմոլոգը որ կապվում է չհասունացած դենդրիտիկ բջիջների MHC II մոլեկուլների հետ, որի հետևանքով ITAM ազդանշանային ուղով ինհիբիցիոն հրահանգ է տրվում դենդրիտիկ բջիջներին և կանխում վերջիններիս հասունացումը (Liang et al., 2008): Քանի որ ակտիվացած T լիմֆոցիտների մակերեսին նույնպես առկա են MHC II մոլեկուլները, Treg-ների վրա առկա LAG-3-ի միջոցով իրականացվում է նաև էֆֆեկտոր T լիմֆոցիտներին սուպրեսիան: Նկար 4 –ում ներկայացված է սուպրեսիայի մեխանիզմները:

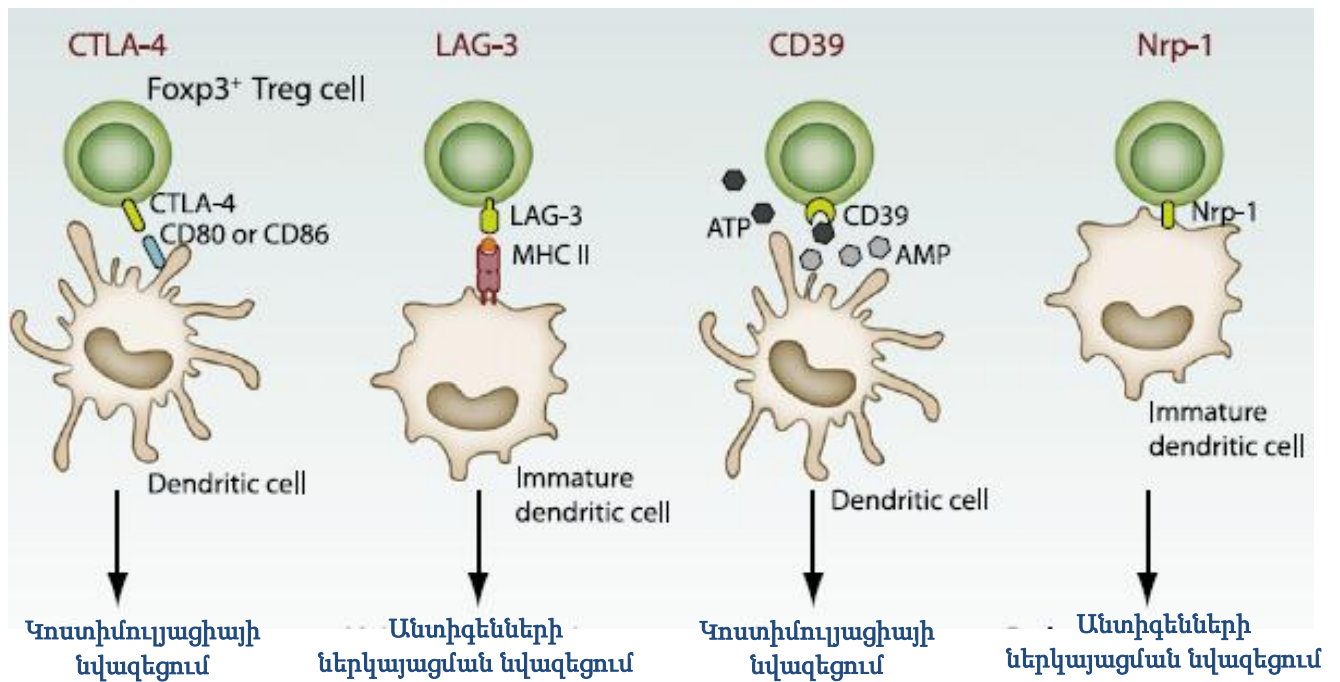
Ուռուցք-ասոցացված մակրոֆագեր (TAMs)

Ծայրամասային արյան մեջ շրջանառվող մոնոցիտները հյուսվածքներում, սովյալ միկրոմիջավայրի գործոններից կախված տարբերակվում են մակրոֆագերի՝ օժտված ուրույն բջջային մարկերների էքսպրեսիայով և համապատասխան գործառնական ակտիվությամբ (Mosser and Edwards, 2008): Մարդկանց և կենդանիների ուռուցքներում հայտնաբերվում են մեծ քանակությամբ մակրոֆագերի բջջային պոպուլյացիա: Ցույց է տրված, որ դրանք ուռուցքային միկրոմիջավայր են հասնում տարբեր ցիտոկինների և քեմոկինների ազդեցությամբ ինչպիսին են օրինակ CSF-1 and CCL2 (Fran Balkwill, 2001; Mantovani et al., 2002): Մակրոֆագերի ֆենոտիպը կախված է վերջիններիս անատոմիական դիրքից և ֆիզիոլոգիական կամ պաթոլոգիական բնութագրից:

Սկար 4 Treg-ների կողմից էֆֆեկտոր FoxP3⁻ բջիջների ֆունկցիայի սուպրեսիայի հիմնական մեխանիզմները



Treg-ների կողմից անտիգեն ներկայացնող բջիջների ֆունկցիայի սուպրեսիայի հիմնական մեխանիզմները



Ընդհանրապես տարբերում են մակրոֆագերի 2 խումբ՝ դասական եղանակով ակտիվացած մակրոֆագեր՝ Մ1 և ալտերնատիվ եղանակով ակտիվացած

մակրոֆագեր՝ Մ2: Մ1 մակրոֆագերը, բակտերիալ մասնիկների և/կամ INF γ -ի ազդեցությամբ ակտիվանալով՝ արտադրում են մեծ քանակությամբ պրոբոբոբային ցիտոկիններ՝ IL12, IL23, ցիտոտոկսիկ հանդիսացող՝ ռեակտիվ թթվածնի միացություններ, ազոտի օքսիդ (NO), բջջային մակերեսին էքսպրեսիայի են ենթարկվում մեծ քանակությամբ MHC մոլեկուլներ (Mantovani et al., 2004): Ակտիվացած Մ1 մակրոֆագերը ընդունակ են ոչնչացնել օտարածին մասնիկներին և ուռուցքային բջիջներին: Ի տարբերություն սրա, Մ2 մակրոֆագերը արտադրում են մեծ քանակությամբ IL10, բայց ոչ IL12, էքսպրեսիայի են ենթարկում կլանիչ ընկալիչները, և ցուցաբերում են հակաբոբոբային և հյուսվածքների վերականգնողական գործառույթներ: Ուռուցքի միկրոմիջավայրում կուտակվող մակրոֆագերը ֆենոտիպորեն և գործառնապես մեծապես նման են Մ2 մակրոֆագերին: Մի քանի աշխատություններում ցույց է տրված, որ վերջիններիս կուտակման պայմաններում ակտիվանում է անգիոգենիկ գործոնների սինթեզն ու արտազատությունը, ինչպես օրինակ VEGF, թրոմբոցիտներից անջատված էնդոթելիալ բջիջների աճի խթանման գործոնը: Ուռուցքի հետ ասոցացված մակրոֆագերը կուտակվում են թթվածնի ոչ բավարար քանակությամբ ապահովված հատվածներում: Հիպոկսիայի (թթվածնի անբավարարության) պայմաններում այս բջիջներում տեղի է ունենում պրոանգիոգենիկ տրանսկրիպցիոն գործոնների ակտիվացում և որպես վերջնական արդյունք սինթեզվում են անգիոգենեզի ընթացքն ապահովող մի շարք մոլեկուլներ՝ VEGF, TNF- α , TGF β and CXCL8: TAM-երը ուռուցքի միկրոմիջավայրի գործոնների ազդեցությամբ խթանում են հակաուռուցքային իմունային պատասխանի ձևավորումը, միաժամանակ նպաստում են ուռուցքի առաջխաղացմանը և տարածմանը: Այսպիսով հակաուռուցքային թերապիաների կայացման համար կարևոր է նաև այս սուպրեսորային բջջային պոպուլյացիայի չեզոքացումը կամ վերափոխումը հակաուռուցքային ֆենոտիպի:

Հակաուռուցքային իմուն պատասխանի ձևավորումը

Ժամանակակից պատկերացումներով, արդյունավետ հակաուռուցքային իմունային պատասխանի ձևավորման համար իմունային համակարգի կողմից իրակացվում են հետևյալ 3 հիմնական քայլերը: Առաջին քայլը դենդրիտիկ բջիջների կողմից ուռուցքին բնորոշ անտիգենների կլանումն է, ինչը կարող է իրականացվել *in situ*, էկզոգեն ճանապարհով կամ էլ ներարկվել թերապևտիկ դենդրիտիկ բջիջների պատվաստանյութերի ձևով: Որպես ուռուցքային անտիգեններ կարող են հանդես գալ որոշակի գործոնների ազդեցությամբ (վիրուսային ինֆեկցիաների, քիմիական միացությունների) մուտացիայի ենթարկված գեների սպիտակուցներ, ոչ մուտացված գեների սպիտակուցներ, որոնք բնորոշ են որոշակի ուռուցքային բջիջներին (ուռուցք-թեսթիս անտիգենները): Նորմալ բջիջների մոտ էքսպրեսիայի բացակայությամբ կամ սահմանափակ քանակությամբ էքսպրեսիայի ենթարկվող մոլեկուլներ (p53, ras), անտիգեններ, որոնք բնորոշ են միայն սաղմնային զարգացման փուլին (կարցինոէմբրիոնիկ անտիգեններ): Դենդրիտիկ բջիջները կլանելով ուռուցքային անտիգենները, կատարում են պեպտիդների պրոցեսինգ, վերջնական արդյունքում անտիգենը MHC ընկալիչների կազմում ներկայացվում է բջջային մակերեսին: Միաժամանակ անտիգենի հանդիպելիս դենդրիտիկ բջիջները ստանում են համապատասխան ակտիվացման ազդանշան, ինչի շնորհիվ տարբերակվում, հասունանում են և ի հակառակ իմուն հանդուժողականության ձևավորմանը խթանում են իմուն պատասխանը: Ակտիվացման ազդանշանները կարող են ապահովվել էկզոգեն ճանապարհով, ինչպես օրինակ TLR լիգանդների կամ ակտիվացման ընկալիչների ազոնիստ հանդիսացող հակամարմիններով (CD40) կամ էնդոգեն ճանապարհով, երբ ապոպտոտիկ կամ նեկրոտիկ ուռուցքային բջիջները արտազատում են հատուկ մոլեկուլներ (մեծ շարժունակությամբ սպիտակուցային մոլեկուլներ) , որոնց շնորհիվ ապահովում է դենդրիտիկ բջիջների իմունային հասունացումը:

Հաջորդիվ, հասուն դենդրիտիկ բջիջները՝ մակերեսին MHC մոլեկուլների միջոցով ներկայացված ուռուցքային անտիգեններով, քեմոտակսիսի եղանակով հասնում են լիմֆային օրգանները, որտեղ վերջիններս ունակ են ակտիվացնել համապատասխան T-բջջային պատասխան, NK, NKT բջիջներին, ինչպես նաև հակամարմինների առաջացումը: Այս ամբողջ գործընթացում առանձնակիորեն կարևոր է ադյուվանտների միջոցով ապահովել դենդրիտիկ բջիջների հասունացումը, հակառակ դեպքում դենդրիտիկ բջիջները կարող են խթանել Treg բջջային պոպուլյացիան, այդպիսով խաթարել հակաուռուցքային իմունային պատասխանի ձևավորումը:

Լիմֆային հանգույցներում դենդրիտիկ բջիջների կողմից ստանալով ակտիվացման առաջնային (MHC I/II-անտիգեն և TCR փոխազդեցություն) և երկրորդային ազդանշանները (CD80/ CD86 և CD28) նայիվ ուռուցք-սպեցիֆիկ T բջիջները ակտիվանում են, բազմանում, արյան շրջանառությամբ, հասնում ուռուցքի միկրոմիջավայր, որտեղ կարող են ցուցաբերել ցիտոտոկսիկ ակտիվությունը և թիրախային կերպով ոչնչացնել ուռուցքային բջիջներին: Այս փուլում է որ իմունային սուպրեսիան առավել մեծ մարտահրավերներ է ստեղծում իմունային թերապիաների համար: Իմուն համակարգի T բջջային պատասխանը շատ կարևոր դեր ունի անմիջական կերպով ուռուցքային բջիջներին հայտնաբերելու և ոչնչացնելու գործում: Մկների մոդելների վրա, ինչպես նաև մարդկանց մոտ ցույց է տրված որ իմուն T բջիջների տրանսֆերը հանգեցնում է ուռուցքի զարգացման և աճի կանխարգելմանը, իսկ հակամարմինների ներարկումը նման արդյունավետություն չի ցուցաբերում (Schreiber et al., 2011): Էնդոգեն CD8 բջիջների չեզոքացումը խոչընդոտում է հակաուռուցքային ինչպես կանխարգելիչ այնպես էլ թերապևտիկ արդյունավետությանը: Ուռուցքի և ալլոգրաֆթների իմունաբանական մերժման փուլում մեծ քանակությամբ T բջիջների կուտակումներ են հայտնաբերվում վերջիններիս միկրոմիջավայրում: CD8 բջիջների ակտիվացումը կախված է այլ բջջային պոպուլյացիաների ակտիվացումից, մասնավորապես CD4 և անտիգեն

ներկայացնող բջիջներից և վերջիններիս միջև փոխադարձ կապերի ստեղծումից: Այս երևույթը կոչվում է իմունաբանական կամրջի ստեղծում: Այսպիսով, չնայած ուռուցքային բջիջներին թիրախային կերպով ոչնչացնող էֆֆեկտոր բջիջները հիմնականում CD8 լիմֆոցիտներն են, վերջնական ցանկալի արդյունքին հասնելու համար հարկավոր է ընդհանուր բջջային իմուն պատասխանի ակտիվացումը:

Ս. Ռոզենբերգը կազմավորված ուռուցքի ոչնչացման համար նշում է հետևյալ 3 կարևոր սկզբունքները (Rosenberg et al., 2004):

1. Բավարար քանակությամբ իմունային բջիջներ, որոնք *in vivo* պայմաններում բարձր ավիդությամբ կճանաչեն ուռուցքային բջիջների անտիգենները :

2. Վերոնշյալ հատկություններով բջիջները պետք է տեղաշարժվեն և ինֆիլտրացվեն ուռուցքի ստրոմա:

3. Անհրաժեշտ է, որ ուռուցքի միջավայրում գտնվող իմունային բջիջները լինեն ակտիվացած վիճակում, որպեսզի ունակ լինեն իրականացնել համապատասխան էֆֆեկտորային մեխանիզմները, ինչպիսիք են լիզիսը, ցիտոկինների արտազատումը և այլն:

T բջիջները պետք է լինեն համապատասխան ակտիվացման և դիֆերենցման փուլում, որպեսզի կարողանան պայքարել ուռուցքի աճի ու զարգացման դեմ: Ցույց է տրված, որ ուռուցքի անտիգենին համապատասխանող T բջիջների ընկալիչների գենային մոդիֆիակցիայով մկների մոտ (TCR տրանսգեն), որոնց բոլոր T լիմֆոցիտները տեսականորեն ունակ են ճանաչել օտարածին ուռուցքային բջիջներին, չարորակ գոյացությունների աճն ու զարգացումը չի կանխվում: Սա լրացուցիչ կերպով ցույց է տալիս, որ միայն ուռուցք սպեցիֆիկ անտիգենին համապատասխանող T լիմֆոցիտների առկայությունը բավարար չէ ուռուցքի դեմ պայքարելու համար: Պատճառները բազմազան և բազմաբնույթ են՝ T լիմֆոցիտների ոչ բավարար քանակությունը ուռուցքի միկրոմիջավայրում, ուռուցքի ցածր իմունոգենությունը, ավիդություն,

հանդուրժողականության մեխանիզմները՝ ներառյալ աներգիան, իմունոսուպրեսորային մեխանիզմները:

Այս բոլոր խնդիրների համակարգային դիտարկման և հաղթահարման դեպքում միայն հարավոր կլինի էֆֆեկտիվ հակաուռուցքային իմուն պատասխան ձևավորել (Marincola et al., 2000; Speiser et al., 1997):

1.3 4Թ1 Կրծքագեղձի քաղցկեղի մկնային մոդել

Կրծքագեղձի քաղցկեղի մեր պատկերացրած իդեալական *in vivo* մոդելը պետք է բավարարի որոշակի չափանիշների: Առաջինը այն պետք է ամփոփի ամբողջ հիստոպաթոլոգիական սպեկտրը և կրծքի նեոպլասիայի տարասեռությունը: Այն նաև պետք է վերարտադրի հիվանդության երկարատև զարգացումը, ներառելով զարգացման ուղղությունների փոփոխականությունը: Բացի այդ հիմք դառնա հասկանալու բջջային և մոլեկուլային գործընթացները և նրանց միջև փոխադարձ կապը, ինչը էական նշանակություն ունի հիվանդության ուսումնասիրության համար: Նաև փորձարարական առումով հարմար և գնային առումով մատչելի լինի: Չնայած որ գոյություն ունեն մարդու կրծքի քաղցկեղի բազմաթիվ բջջային գծեր, ոչ մեկը կատարելապես չի արտահայտում մարդու մետաստատիկ հիվանդության սպեկտրը: Տարբեր լաբորատորիաներում ստացել են առնետների և մկների կրծքագեղձի ուռուցքային բջիջների սուբպոպուլյացիաները, որոնք տարբերվում են մետաստազներ առաջացնելու ունակություններով: Ընդհանուր առմամբ դրանց մի մասը օժտված են բարձր մետաստատիկ ունակություններով, մյուսները՝ ոչ: Մետաստատիկ պրոցեսը քայլերի որոշակի հաջորդականություն է ենթադրում, որ պետք է անցնեն ուռուցքային բջիջները մինչև մետաստազներ առաջացնելը: Ոչ մետաստատիկ ուռուցքային բջիջները չեն կարողանում կատարել բոլոր փուլերը, մինչդեռ մետաստատիկ բջիջները հենց դրանով են առանձնանում: Ոչ-մետաստատիկ տարբերակների առաջացման պատճառները անհայտ են և այդպիսով մետաստազներ առաջացնելու ձախողման մեխանիզմները՝ անորոշ:

4Թ1 կրծքագեղձի կարցինոման ուռուցքային բջջային գիծ է, որն առաջին անգամ անջատվել է Ֆրեդ Միլլերի և կոլեգաների կողմից (Aslakson and Miller, 1992): Այն աճեցվում է BALB/c մկների կամ կուլտուրային թասիկների մեջ համապատասխան միջավայրում: Այս բջջային կայուն գիծը ստացել են հետևյալ կերպ: Balb/cfC3H մկան մոտ սպոնտան կերպով աճած կրծքագեղձի ուռուցքից անջատվել են ուռուցքի 4 սուբպոպուլյացիոն գծեր՝ 67, 168, 66 և 410.4: Համար 410.4 ուռուցքից *in vitro* պայմաններում աճեցվել են բջջային 4 ենթատեսակներ, որոնցից մեկն էլ 4Թ1ն, այն ընդունակ էր հեմատոգեն ճանապարհով հեռավոր մետաստազներ առաջացնել տարբեր օրգաններում (Dexter et al., 1978): 4Թ1-ը սելեկցիայի է ենթարկվել առանց մուտագենեզի, 6-թիոգունինի նկատմամբ ցուցաբերվող ռեզիստենտության հիման վրա: Այն օժտված է բարձր ուռուցքագեղձային և ինվազիվությամբ: Կրծքագեղձի և դրանից վերև մաշկի միջև ընկած հատվածում սկսած 4×10^3 քանակի ուռուցքային բջիմջներ ներակելիս ձևավորվում է առաջնային ուռուցք, որը ներարկումից 11-26 օր հետո արդեն շոշափելի է լինում, իսկ 40-69-երորդ օրերը, ուռուցքի տրամագիծը հասնում է թույլատրելի առավելագույնին՝ 14-16մմ, որի ժամանակ մկների կյանքը ընդհատվել է: Բջիջների ավելի մեծ քանակ ներարկելու դեպքում ուռուցքը շոշափելի է դառնում ավելի վաղ ժամկետներում: Ի տարբերություն շատ մկնային մոդելների BALB/c մկներից ստացված 4Թ1 կրծքագեղձի ադենոկարցինոման, շատ հասկություններով նման է մարդու մոտ զարգացող կրծքագեղձի քաղցկեղին: Ինչպես մարդկանց մոտ, 4Թ1 ուռուցքակիր մկների մոտ առաջնային ուռուցքը ճիշտ անատոմիական տեղում է զարգանում, ժամանակի ընթացքում սպոնտան կերպով մետաստազները ախտահարում են ամբողջ օրգանիզմը: Ինչպես մարդկանց մոտ զարգացող կրծքագեղձի քաղցկեղի պարագայում, 4Թ1 ուռուցքակիր մկների մոտ նույնպես մետաստազները հայտնաբերվում են առավելապես և հիմնականում լիմֆային հանգույցներում, թոքերում, լյարդում, ուղեղի, ոսկրածուծի, ոսկորների, ծայրամասային արյան մեջ: 4Թ1-ը այն խիստ եզակի քաղցկեղի կենդանական մոդելներից է, որն

ընդունակ է մետաստազներ առաջացնել նաև ոսկորներում: Կանանց 24-77%-ի մոտ մետաստազները առաջին հերթին հայտնաբերվում են թոքերում, իսկ 22-62% հիվանդների մոտ՝ լյարդում: Ի համեմատ սրա 4Թ1 ուռուցքակիր BALB/c մկների 95%-ի մոտ թոքերում, >75%-ի մոտ լյարդում: Հիվանդության զարգացման ավելի ուշ փուլերում մետաստազներ են հայտնաբերվում նաև կենտրոնական նյարդային համակարգում 40% մկների և 30% մարդկանց մոտ: Բացի վերոնկարագրվածից, 4Թ1 ունի մի քանի փորձարարական առանձնահատկություն, որն այն դարձնում է համարյա իդեալական մոդել իմունոթերապևտիկ միջամտություններ իրականացնելու և հակաուռուցքային արդյունավետությունը գնահատելու համար: Առաջինը, որ այն կայուն է 6-թիոգուանինի նկատմամբ, ինչի շնորհիվ հնարավոր է դառնում վերջինիս նույնիսկ փոքր քանակների որոշումը, նախքան դա հնարավոր կլիներ տեսողական կամ այլ մեթոդներով արձանագրել: Շատ կարևոր է նաև այն որ ուռուցքային բջիջներ առանց դժվարությունների կարելի է ներարկել կրծքագեղձի մեջ, որը հանդիսանում է վերջինների համար ճիշտ անատոմիական տեղը: Ուռուցքային բջիջների ճիշտ ներարկման դեպքում կարելի է վիրահատական միջամտությամբ հեռացնել ի հայտ եկած առաջնային ուռուցքը և հաջորդիվ շարունակել փորձարկումները՝ դիտարկելով որպես կրծքագեղձի քաղցկեղի հետվիրահատական մետաստատիկ մոդել: Թոքերում մետաստազների որոշումը հնարավորություն է տալիս ճշգրիտ գնահատել վերջիններիս տարածումը և ընդհանուր պատկերացում կազմել հիվանդության տարածման ու զարգացման մասին: Պատճառն այն է, որ մետաստազների առկայությունը թոքերում միշտ նախորդում և հաջորդում է այլ օրգաններում դրանց հայտնաբերմանը: 4Թ1 մոդելի բոլոր այս առանձնահատկությունների շնորհիվ այն համարվում է կատարյալին մոտ՝ նախակլինիկական փորձարկումների իրականացման համար (Danna et al., 2004; Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 2001):

Գլուխ 2. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹՆ ՈՒ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

2.1 Մկներ

8-10 շաբաթական h2d հապլոտիպով BALB/c մկները ձեռք են բերվել Ջեկսոն լաբորատորիայից (Sacramento, CA): Կենդանիներ պահվել են հատուկ դրա համար նախատեսված սենյակներում, որտեղ ապահովվում է ջերմաստիճանային և լուսային կայուն ռեժիմ: Կենդանիների խնամքը կարգավորվում է Ազգային առողջապահության ինստիտուտի կողմից սահմանված կարգով և կենդանիների խնամքի ինստիտուցիոնալ կոմիտեի (Institutional Animal Care and Use Committee) հաստատած պրոտոկոլով (IACUC), Իրվայնի Կալիֆորնիայի համալսարանում (UCI):

2.2 Բջջային գծեր

HEK-Blue® գենային ինժեներիայի միջոցով մոդիֆիկացիայի ենթարկված HEK 293 բջջային գծի հավաքածու է (InvivoGen, USA): Վերջիններս կայուն էքսպրեսիայի են ենթարկում որևէ TLR գեն և NF-κB-կախյալ SEAP (սաղմնային ալկալին ֆոսֆատազ), հաղորդիչ գենը: SEAP գենի էքսպրեսիան հայտնաբերվում է հատուկ QUANTI-Blue™ կամ HEK-Blue™ (InvivoGen) 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: Բջիջները պահվել և օգտագործվել են ըստ արտադրողի (InvivoGen, USA) ցուցումների: Օգտագործվել է ամբողջական DMEM-ի միջավայր (10% հորթի արյան շիճուկ, 50 Մ/մլ պենիցիլին, 50 մկգ/մլ ստրեպտոմիցին, 2 մլՄ α-գլյուտամին):

2.3 Ուռուցքային բջիջների աճեցում և ներարկում

Ուռուցքային 4Թ1 բջիջները տրամադրել է դոկտոր Ֆրեդ Միլլերը (WSU, Detroit, MI): Սառեցված բջիջները հեղուկ ազոտի միջից հանելուց հետո աճեցվել են RPMI-10, 10% շիճուկի միջավայրում, ադիեզիվ կուլտուրային բջիջների համար նախատեսված թասիկներում: Բջիջները հավաքվել են ստանդարտ տրիպսինիզացիայի միջոցով՝ 0.25% տրիպսինի պարունակությամբ ֆոսֆատ-ադային լուծույթում կատարվել է 3-5 րոպե ինկուբացիա, կուլտուրային թասիկից պոկված բջիջները հավաքվել են 50մլ սրվակի մեջ: Տրիպսինի հետագա ազդեցությունը չեզոքացվել է 0.5% հորթի շիճուկի ալբումին պարունակող ֆոսֆատ-ադային լուծույթով լվալով: Այնուհետև բջիջները լուծվել են առանց շիճուկի RPMI1640-ի մեջ՝ 1.5×10^4 բջիջ 50մլ-ում խտությամբ: Մկներին ուռուցքային բջիջների ներարկումը կատարվել է բջջային սուսպենզիայի պատրաստումից հետո 1-2 ժամվա ընթացքում, որպեսզի ապահովվի 4Թ1 բջիջների 90%-ից բարձր կենսունակությունը (Mkrtichyan et al., 2008):

Նախապես պատրաստված ուռուցքային բջիջների սուսպենզիան զգուշորեն ներարկվել է կրծքագեղձի մաշկի տակ: Գործընթացը կատարվել է մկներին իզոֆլյուրանով անեստեզիայի ենթարկելուց հետո:

Ուռուցքի տրամագծի (ՈԻՏ) արժեքը որոշվում է հետևյալ կերպ. գնահատվում է ուռուցքի 2 իրար ուղղահայաց ամենաերկար չափումների (a, b) բազմապատիկը քառակուսի արմատի տակ \sqrt{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: Մկների մյուս խումբը վիրահատական միջամտության է ենթարկվել, հեռացվել է 3,5-5մմ տրամագծով առաջնային ուռուցք: Այս խմբի մկները զոհաբերվել են վիրահատությունից հետո 2,4,6,13,17-20,30-33 օրերում:

2.4 Մետաստատիկ թեստ

Թոքերում կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջները հետազոտվել են հետևյալ կերպ: Թոքերը ստերիլ պայմաններում հեռացվել են , քայքայվել կոլագենազ VI-ի միջոցով (1մգ/մլ ֆոսֆատ-ադային լուծույթում) 4°C, 75րոպե՝ հորիզոնական պտույտներ կատարող հարթակի վրա: Այնուհետև անցկացվել է 70մկմ քամիչի միջով, բջիջները լվացվել են ֆոսֆատ-ադային լուծույթում և 14 օր աճեցվել 6-թիոզուանին պարունակող բջջային միջավայրում (RPMI-1640, 10% FBS): 4Թ1-ի գաղութները ֆիքսվել են մեթանոլով և ներկվել 0,03% մեթիլեն կապույտի լուծույթով: Առանձին հետազոտողների կողմից հաշվվել է ուռուցքային բջիջների կապույտ գաղութների քանակը (Ghochikyan et al., 2014b):

2.5 Մկների թոքերից մոնոնուկլեար բջիջների անջատում

Մկները անեստեզիայի և էֆտանազիայի են ենթարկվել 40մգ/կգ նեմբուրալի միջոցով, փայծաղները անմիջապես վերցրել ենք հետագա հետազոտությունների համար, այնուհետև մկները սառը ֆոսֆատ-ադային լուծույթով ենթարկվել են թոքերի տրանսկարդիալ պերֆուզիայի: Այնուհետև թոքերը ասեպտիկ պայմաններում հեռացվել են մոնոնուկլեար բջիջների անջատման համար: Թոքերից մոնոնուկլեար բջիջները անջատելու համար, վերջիններս ենթարկվել են քայքայման կոլագենազ VI-ի միջոցով 4°C, 75րոպե՝ հորիզոնական պտույտներ կատարող հարթակի վրա: Այնուհետև անցկացվել է 70մկմ-անոց քամիչի միջով, բջիջները լվացվել են 1x HBSS-ով: Թոքային մոնոնուկլեար բջիջները անջատվել են գրադիենտային ցենտրիֆուգման եղանակով՝ օգտագործելով ֆիկոլ (Sigma) (խտությունը 1.077գ/լ): Առանձնացված բջիջները լվացվել են 1x HBSS-ով, հաշվվել հետագա հոսքային ցիտոֆլյուրոմետրով (MacsQuant cytometer (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). անալիզների ենթարկվելու համար (Ghochikyan et al., 2014c):

2.6 Ուռուցքի վիրահատական հեռացում

Բոլոր վիրահատական գործիքները ձեռք են բերված Roboz ընկերությունից: Վիրահատությունը կատարվել է մկներին իզոֆլյուրանով անեստեզիայի ենթարկելուց հետո: Ցավազրկման համար մեջքի հատվածում ներարկվել է կետոպրոֆեն (6մգ/կգ): Տեսանելիությունը ապահովելու համար կատարվել է ուռուցքին հարող հատվածի մազահեռացում: Վիրահատական հատվածը հաջորդաբար ախտազերծվել է բետադինի վիրահատական մածուկով, այնուհետև 85%-անոց իզոպրոպանոլով, ախտազերծման գործընթացը կրկնվել է 3 անգամ: Ուռուցքը հեռացվել է ախտազերծված վիրահատական գործիքներով՝ օգտագործելով բութ կտրման եղանակը: 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., 2014d):

2.7 Հոսքային ցիտոֆլյուրիմետրիայով բջջային մարկերների որոշում

Մկների փայծաղները հեռացվել են ասեպտիկ պայմաններում: Մոնոնուկլեար բջիջները անջատվել են ստանդարտ եղանակով, ամբողջական փայծաղը մամլվել է 10մլ-անոց ներարկիչով կուլտուրային թասիկի մեջ և խառնվել մինչև համասեռ բջջային սուսպենզիա ստանալը: Մեկ անգամ ֆոսֆատ-աղային լուծույթում (PBS) լվանալուց հետո բջջային նստվածքին ավելացվել է 3մլ էրիթրոցիտների քայքայման լուծույթ (Sigma Audlrich)՝ վերջիններից ազատվելու համար: Անջատված բջիջները լվացվել են 2 անգամ 1xPBS-ի լուծույթով, այնուհետև տրիպան կապույտով ներկվել են և Գարյայեվի խցիկի մեջ հաշվվել մանրադիտակի տակ: 1×10^6 բջիջները մշակվել են ֆլյուրիմետրիկ ներկերով նշված հակամարմիններով հետագա հետազոտությունների ենթարկվելու համար:

Փայծաղի կամ թոքերի մոնոնուկլեար բջիջները լուծվել են 0,1% հորթի արյան շիճուկի ալբումին (BSA) , 0,1% նատրիում ազիդի բուֆերացված ֆիզիոլոգիական լուծույթում: Մակերեսային մարկերներով ներկումը կատարվել է CD4-vioblue, 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: Ակտիվացված CD4, CD8 բջիջները հաշվվել են որպես CD69+ բջիջների տոկոսային հարաբերակցությունը ընդհանուր CD4+, CD8+ բջիջների մեջ:

Ներբջջային ներկման համար բջիջները մշակվել են 100մկլ IC (ebioscience) լուծույթով՝ բջջաթաղանթի թափանցելիության մեծացման համար: Բջիջները ինկուբացվել են 30րոպե սենյակային ջերմաստիճանում, մթության մեջ, կամ մինչև 24 ժամ +4 C-ում: Այնուհետև մշակվել են Foxp3-FITC հակամարմնով կամ համապատասխան իզոտիպ ստուգիչ հակամարմնով: Treg բջիջների տոկոսային քանակությունը որոշվել է որպես Foxp3+ բջիջների տոկոսային քանակությունը CD4+ բջիջների մեջ: Տվյալները մշակվել են FlowJo 7.6.5 ծրագրային փաթեթով:

2.8 *In vitro* պայմաններում NF-kB ակտիվացման որոշում

NF-kB տրանսկրիպցիոն գործոնի ակտիվացումը գնահատվել է HEK293-կապույտ բջիջների միջոցով: Հայտնի TLR գենի էքսպրեսիայով HEK293 բջիջները 96-ակնանի կուլտուրային թասիկների մեջ՝ 2×10^4 բջիջ քանակությամբ դրվում են ինկուբացիայի 18 ժամ 37°C , 5% CO₂-ի պայմաններում: Այնուհետև բջիջները ինկուբացվում են տարբեր TLR լիգանդների կամ IMM-ի առկայությամբ 5% CO₂, 37°C-ի պայմաններում: Ինկուբացիայի ավարտից հետո կուլտուրային թասիկներից հավաքվում է վերբջջային հեղուկը: Հեղուկը ցենտրիֆուգվում է 2 րոպե 14000xg-ի պայմաններում, այնուհետև էնդոգեն ֆոսֆատազների ակտիվությունը չեզոքացնելու նպատակով 5 րոպե պահվում է

65°C ջերմաստիճանային պայմաններում և ըստ արտադրողի ցուցումների ավելացվում է համապատասխան քանակով SEAP լուծույթը (0.5 Մ կարբոնատ, pH 9.8/0.5 մՄ MgCl₂) , ինկուբացվում է 37°C, 10 րոպե: NF-kB տրանսկրպցիոն գործոնից կախված սաղմնային ալակալին ֆոսֆատազ (SEAP) գենի ակտիվացումը գնահատվում է արտազատված սպիտակուցի ֆերմենտային ակտիվության որոշմամբ: Այդ նպատակով 4:1 հարաբերակցությամբ ավելացվում է սաղմնային ալակալին ֆոսֆատազի սուբստրատը՝ p-նիտրոֆենիլֆոսֆատ (Sigma-Aldrich): Ռեակցիոն խառնուրդի օպտիկական խտությունը չափվել է 405նմ (405A) ալիքի երկարության տակ Wallac 1420 սպեկտրոֆոտոմետրի միջոցով (Perkin Elmer, USA): Սաղմնային ալակալին ֆոսֆատազի ակտիվությունը հաշվվում է միլիմիավորներով (mU) միլիլիտրում (Tukhvatulin et al., 2013) :

2.9 Մաթեմատիկական անալիզներ

Փայծաղում ամենացածր MDSC և Treg-ների մակարդակի և ամենաբարձ ակտիվացած T-բջջերի տոկոսային քանակությանը համապատասխանող ժամանակային հատվածը սահմանելու համար մենք կատարել ենք ստացված տվյալների մաթեմատիկական անալիզ օգտագործելով OriginPro ծրագիրը: Հետաքրքրական տիրույթում (0-ից 33-րդ օր) փորձարարական տվյալները որոշակի ճշգրտությամբ վերագրվել են $\sum_{i=0}^N a_i x^i$ տեսքն ունեցող բազմանդամ ֆունկցիային, որտեղ գործակիցները սահմանված են վիճակագրության OLS մեթոդով և $\frac{1}{SD^2}$ արժեքով, որտեղ SD-ն փորձարարական տվյալների ստանդարդ շեղումն է: Բազմանդամի կարգը 3 է (N=3): Լոկալ մաքսիմում և մինիմում արժեքները հաշվվել են օգտագործելով ֆունկցիայի մաքսիմում և մինիմում արժեքների որոշման Նյուտոնյան Մեթոդը: Այնուհետև էքստրեմումի կետում ֆունկցիայի վարիացիան սահմանվել է հիմնվելով փորձարարական տվյալների վրա այն պայմանի դեպքում, երբ բազմանդամի x արգումենտի դեպքում ֆունկցիան սխալանք չունի: Ֆունկցիայի այն տիրույթը, որը համապատասխանում

է էքստրեմումի արժեքների սխալանքին սահմանվել է հետևյալ կերպ-
[$x_{left}; x_{right}$]: $F(x) = Extr + Var_{Extr}$ որտեղ $Extr$ -ը էքստրեմումի կետում ֆունկցիայի
արժեքն է, իսկ Var_{Extr} -ը էքստրեմումի կետում ֆունկցիայի արժեքի սխալանքն է:

2.10 Տվյալների վիճակագրական մշակում

Բոլոր վիճակագրական տվյալները մշակվել են օգտագործելով GraphPad Prism 5,0 ծրագրային փաթեթը: Խմբերի միջև վիճակագրական հավաստի տարբերությունը սահմանվել է չգույգված Թ- թեսթով ($P < 0.05$, համարվում է հավաստի):

Կենսոնակության կորերը կազմվել են և համեմատվել են օգտագործելով Լոգ-Ռենք (Մանթել-Կոքս) թեսթը. Խմբերի միջև կապը սահմանվել է օգտագործելով Փիրսոնի կորելյացիոն գործակիցը:

Գլուխ 3. ԿՐԾՔԱԳԵՂՁԻ ՔԱՂՑԿԵՂԻ 4Թ1 ՍՈՂԵԼԻ ՆԿԱՐԱԳՐՈՒԹՅՈՒՆ

3.1 Առաջնային ուռուցքի չափը և կլոնառաջացնող ուռուցքային բջջերը թոքերում

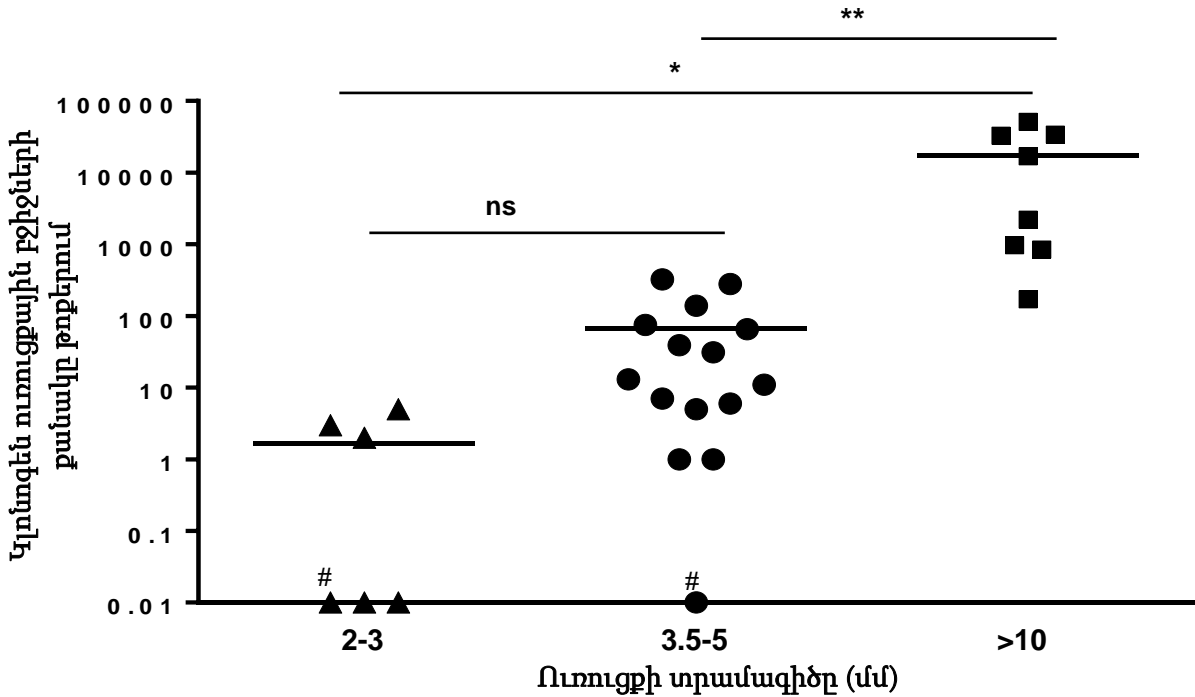
4Թ1 կրծքագեղձի քաղցկեղի մոդելը մի քանի սկզբունքային չափանիշներով բավարարում է կրծքագեղձի քաղցկեղի կենդանական մոդելներին ներկայացվող պահանջներին, այն է՝ հեմատոգեն, լիմֆոգեն ճանապարհներով սպոնտան կերպով մետաստազներ է առաջացնում ամենատարբեր օրգաններում՝ ընդհուպ մինչև ախտահարելով կենտրոնական նյարդային համակարգը և ոսկորները: 4Թ1 ուռուցքային բջջերը օժտված են ուժեղ ուռուցքառաջացնող հատկությամբ և թույլ իմունոգենությամբ: Իր այս հատկություններով նմանակելով մարդկանց մոտ զարգացող հիվանդության ազդեցիկ ընթացքը, այն անփոխարինելի է դառնում նախակլինիկական հետազոտություններ իրականացնելու և հակաուռուցքային ազդեցության արդյունավետության գնահատման համար: Այս պատճառով վերջինիս համակողմանի ուսումնասիրությունը նախավիրահատական և հետվիրահատական ժամանակահատվածներում արդիական և կարևոր նշանակություն ունի: Այս հետազոտության սահմաններում 4Թ1 բջջային գծի կիրառմամբ փորձարական կենդանիների մոտ մոդելավորվել է առաջնային ուռուցքի առաջացումը և գնահատվել է նախավիրահատական շրջանում թոքերում մետաստազների առաջացումը և մկների կենսունակությունը: Այդ նպատակով աճեցվել են 4Թ1 ուռուցքային բջջերը և 1.5×10^4 քանակությամբ բջջեր ներարկվել են BALB/c մկներին: Ուռուցքի ի հայտ գալը և աճի դինամիկան արձանագրելու համար պարբերաբար կատարվել է մկների զննում: Բոլոր կենդանիների մոտ ուռուցքը շոշոփելի է դառնում 5-7-երորդ օրերի ընթացքում: Ուռուցքը սահմանված կարգով չափվել է, արդյունքները

համապատասխանաբար գրանցվել են: 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 մենք առանձնացրել ենք փորձարարական երեք խումբ՝ առաջինը՝ 2-3մմ ուռուցքի տրամագիծ ունեցող մկները, երկրորդը՝ 3.5-5մմ, երրորդ խումբ մկների մոտ ուռուցքի չափը գերազանցում է 10մմ: Հարկ է նշել, որ ըստ կենդանիների խնամքի և օգտագործման ինստիտուցիոնալ կոմիտեի կանոնակարգի (IACUC) 15մմ-ը ուռուցքի այն առավելագույն չափն է, որի ժամանակ դեռևս թույլատրելի է ուռուցքակիր մկների վրա հետագա փորձարկումները շարունակել: Կենդանիների կյանքը ընդհատելուց հետո թոքերը և փայծաղը ասեպտիկ պայմաններում վերցվել են և կատարվել համապատասխան հետազոտություններ: Ուռուցքակիր մկների մոտ ցույց է տրվել կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների քանակությունը թոքերում, ինչպես նաև իմունային սուպրեսոր բջիջների և էֆֆեկտորային T բջիջների քանակական փոփոխությունները փայծաղում և թոքերում՝ կախված ուռուցքի չափերից: 2-3մմ ուռուցքի տրամագծով 6 մկներից միայն 3-ի մոտ են թոքերում հայտնաբերվել կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջներ թոքերում (նկար 5): 3,5-5մմ ուռուցքի տրամագիծ ունեցող 15 մկներից միայն մեկի մոտ թոքերում կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջներ չեն հայտնաբերվել, իսկ 10 և ավելի ուռուցքի տրամագիծ ունեցող բոլոր մկների թոքերում մետաստազներ հայտնաբերվել են: 2-3մմ ուռուցքի տրամագծով մկների թոքերում կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների քանակության միջին արժեքը 1.7 ± 0.84 , $n=6$ է, 3.5-5 մմ-ով մկների մոտ՝ 67 ± 26 , $n=15$ է, իսկ 10-15 մմ ՈԻՏ-ով մկների մոտ 17390 ± 6965 , $n=8$: (նկար 5): Այսպիսով մեր փորձերի արդյունքում հաստատվեց, որ թոքերում մետաստազների քանակությունը կապված է առաջնային ուռուցքի չափի հետ: Ավելին՝ գոյություն ունի դրական կորելյացիա մկների ուռուցքի չափի և

թոքերում առկա մետաստազների քանակության միջև ($r=0.74$; $***P=0.0006$, $n=17$)
(նկար 6):

Նկար 5

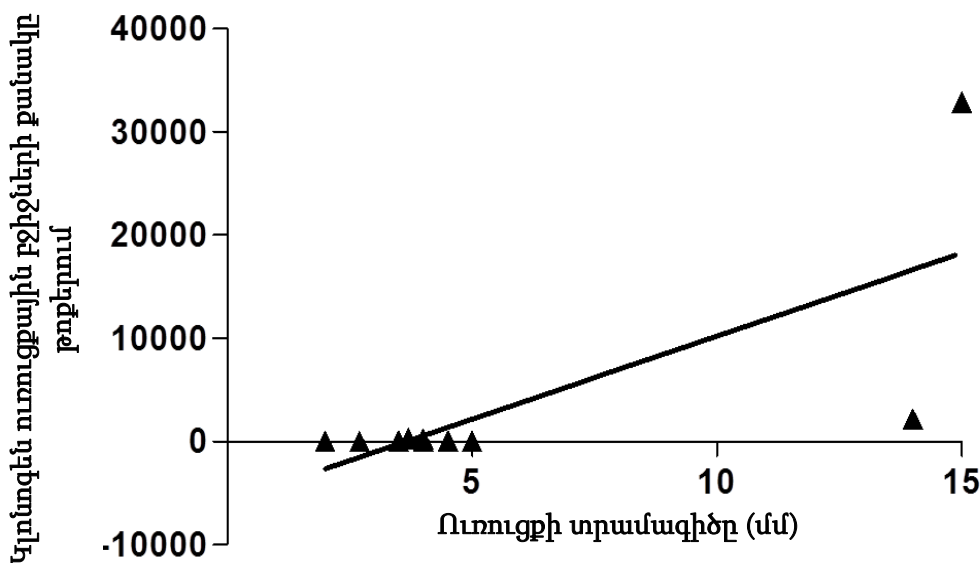
Կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների քանակը ուռուցքակիր մկների թոքերում



Հավաստիությունը հաշվարկվել է Անովա համեմատության թեստով * $P<0.05$, ** $P<0.01$,
*** $P<0.001$, ns- վիճակագրորեն ոչ հավաստի

Նկար 6

Ուռուցի չափի և թոքերում մետաստազների քանակության միջև ուղիղ համեմատական կապ



Վիճակագրական վերլուծությունը կատարվել է Փիրսոնի կորելյացիոն թեստով ($r=0.74$; $***P=0.0006$, $n=17$)

3.2. Իմունոսուպրեսոր բջջային պոպուլյացիաները ուռուցքակիր մկների մոտ

Հաջորդիվ ուսումնասիրվել է ուռուցքակիր մկների թոքերում և փայծաղում իմունոսուպրեսորային MDSC-իների և Treg-ների բջջային պոպուլյացիաների քանակական հարաբերակցությունները և դրանց փոփոխման օրինաչափությունները: Մկների փայծաղից և թոքերից անջատվել են մոնոնուկլեար բջջային պոպուլյացիաները: Վերջիններս մշակվել են համապատասխան հակամարմիններով և հետազոտվել հոսքային ցիտոֆյուրիմետրի միջոցով:

Ինչպես ցույց է տրված աղյուսակ 1-ում 2-3մմ ուռուցքակիր մկների փայծաղում MDSC-իների տոկոսային քանակությունը չի տարբերվում ստուգիչ՝ ոչ ուռուցքակիր մկներից: Միննույն 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, >10մմ ուռուցքակիր մկների մոտ կազմելով փայծաղում և թոքերում ամբողջ մոնոնուկլեար բջիջների 40% և 64% համապատասխանաբար(աղյուսակ1): Ուռուցքակիր և առանց ուռուցքի մկների փայծաղում Treg բջջային պոպուլյացիայի տոկոսային քանակությունների միջև տարբերություն չի արձանագրվել : Հակառակ պատկերն է դիտվում թոքերում՝ Treg բջջային պոպուլյացիաների տոկոսային քանակությունը ի տարբերություն ստուգիչ մկների, հավաստիորեն աճում է՝ 2-3մմ- 2.8%, 3.5-5mm- 3.7%, իսկ 10-15մմ ուռուցքով մկների մոտ հասնում է 8,7%-ի (աղյուսակ 1, նկար 7):

Աղյուսակ 1

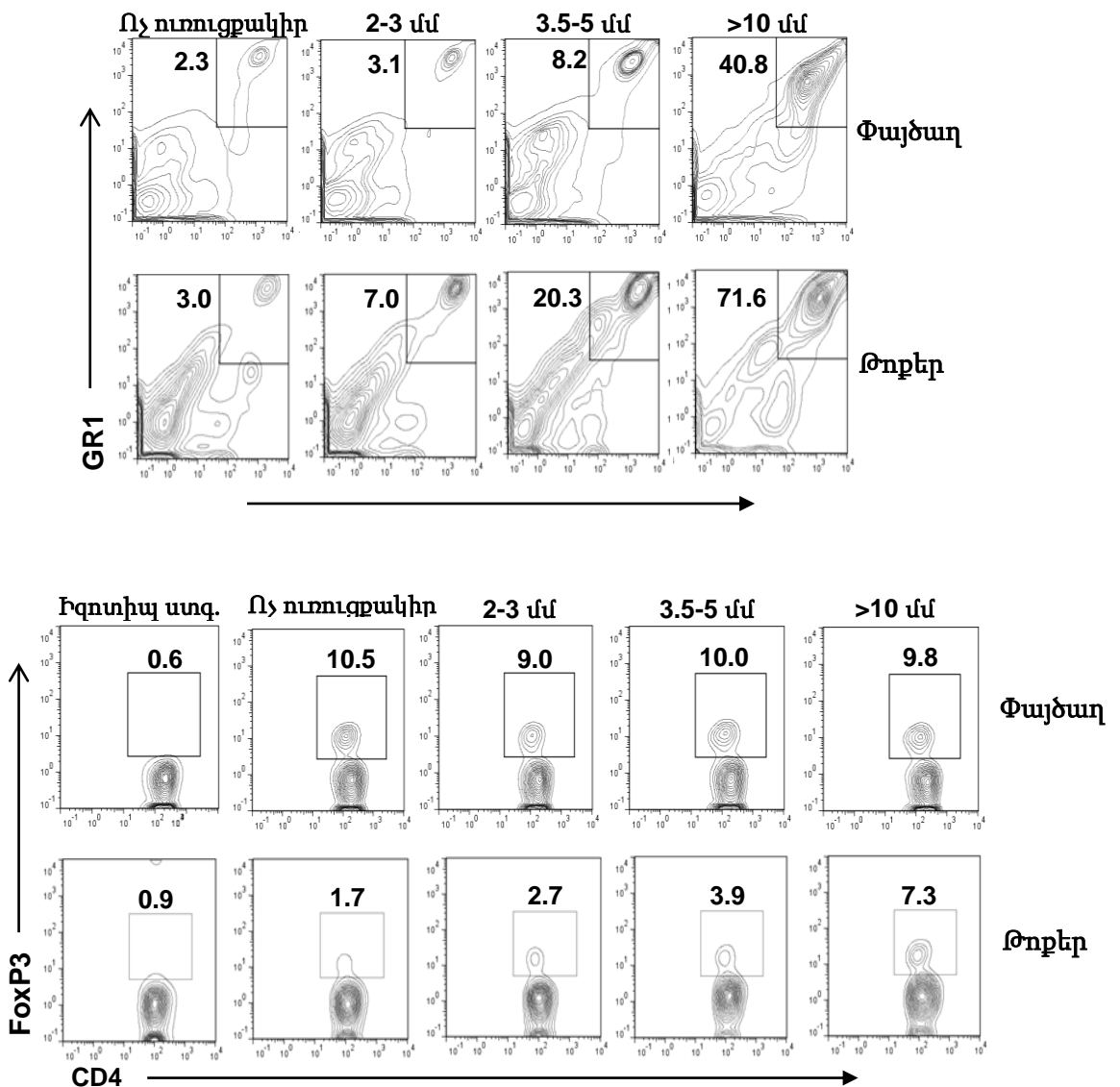
Ուռուցքակիր մկների թոքերում և փայծաղում սուպրեսոր բջիջների քանակությունը

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

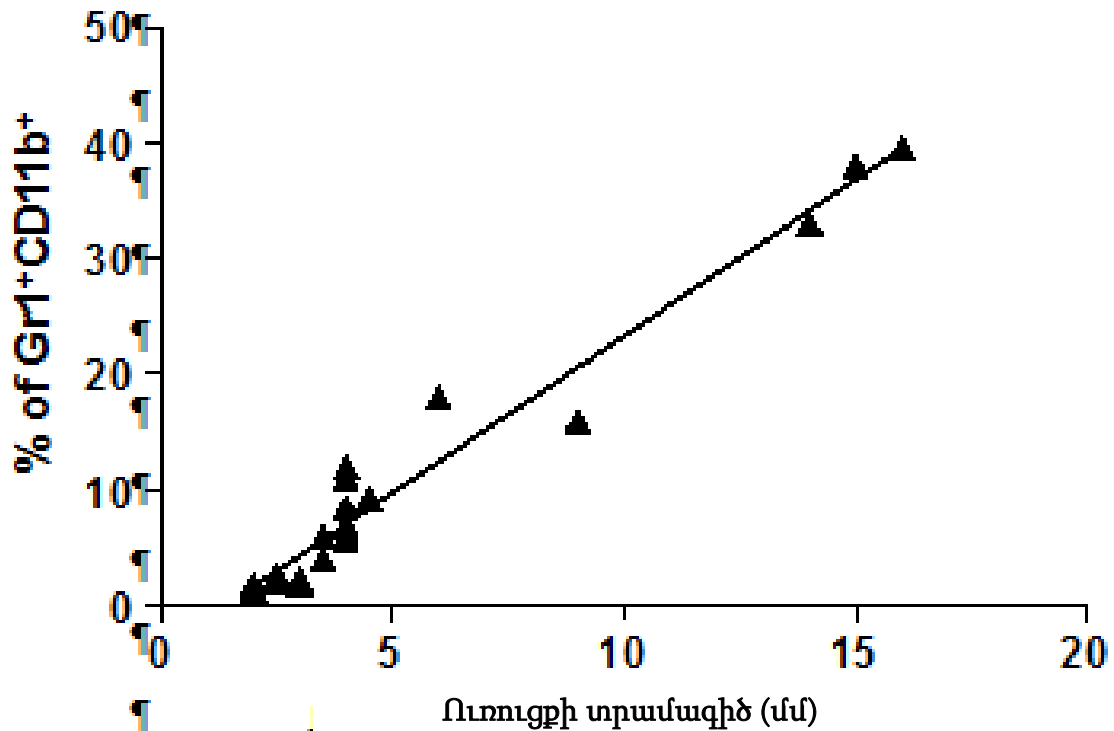
Հավաստիությունը հաշվարկվել է t թեստով ոչ ուռուցքակիր մկների նկատմամբ *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ns- ոչ հավաստի:

Նկար 7

Ուռուցքակիր մկների թոքերում և փայծաղում սուպրեսոր բջիջների քանակությունն արտահայտող ցուցանմուշային պատկերները



Նկար 8 Ուռուցքի չափի և փայծաղում MDSC-իների քանակության միջև ուղիղ համեմատական կապը



Վիճակագրական վերլուծություն կատարվել է Փիրսոնի կորելյացիոն թեստով ($r=0.98$; $***P<0.0001$, $n=25$)

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: Նկար 8-ում ներկայացված է ուռուցքի չափի և միելոիդային սուպրեսորային բջիջների քանակության միջև ուղիղ համեմատական կապը:

Մենք նաև արձանագրել ենք փայծաղում և թոքերում մոնոնուկլեար բջիջների ընդհանուր քանակի մեջ MDSC-իների բացարձակ թվի հավաստի աճ (աղյուսակ 2): Այսպիսով մեր տվյալները ցույց տվեցին, որ փորձարարական կենդանիների մոտ ուռուցքի առկայությունը, հետագա զարգացումն ու աճը անմիջականորեն ազդում են տարբեր օրգաններում իմունոսուպրեսորային բջջային պոպուլյացիաների քանակական առաջխաղացմանը:

Աղյուսակ 2

Ուռուցքակիր մկների փայծաղում և թոքերում MDSC, Treg և փայծաղի մոնոնուկլեար բջիջների բացարձակ քանակը

Փայծաղում Սուպրեսորային բջիջներ բացարձակ քանակը ($\times 10^3$)	Ոչ ուռուցքակիր	Ուռուցքակիր		
		2-3 մմ	3.5-5մմ	10-15 մմ
MDSC	779 \pm 4	1141 \pm 235 ^{ns}	4529 \pm 994*	41916 \pm 1861**
Tregs	656 \pm 26.7	1397 \pm 105***	1343 \pm 258*	912 \pm 54*
Փայծաղում բջիջների բացարձակ քանակը	30000 \pm 1000	54600 \pm 4600	56000 \pm 11049	99375 \pm 4204

Թոքերում բջիջներ բացարձակ քանակը ($\times 10^6$)	Ոչ ուռուցքակիր	Ուռուցքակիր		
		2-3 մմ	3.5-5մմ	10-15 մմ
MDSC	11 \pm 3.7	37 \pm 7.3*	92 \pm 16**	1477 \pm 149***
Tregs	0.7 \pm 0.1	0.54 \pm 0.14 ^{ns}	1.1 \pm 0.36 ^{ns}	2.34 \pm 0.62*
Absolute number of PMC in lungs	614 \pm 127	672 \pm 76.7	654 \pm 61.3	2266 \pm 207

Հավաստիությունը հաշվարկվել է *t* թեստով ոչ ուռուցքակիր մկների նկատմամբ *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ns- վիճակագրորեն ոչ հավաստի:

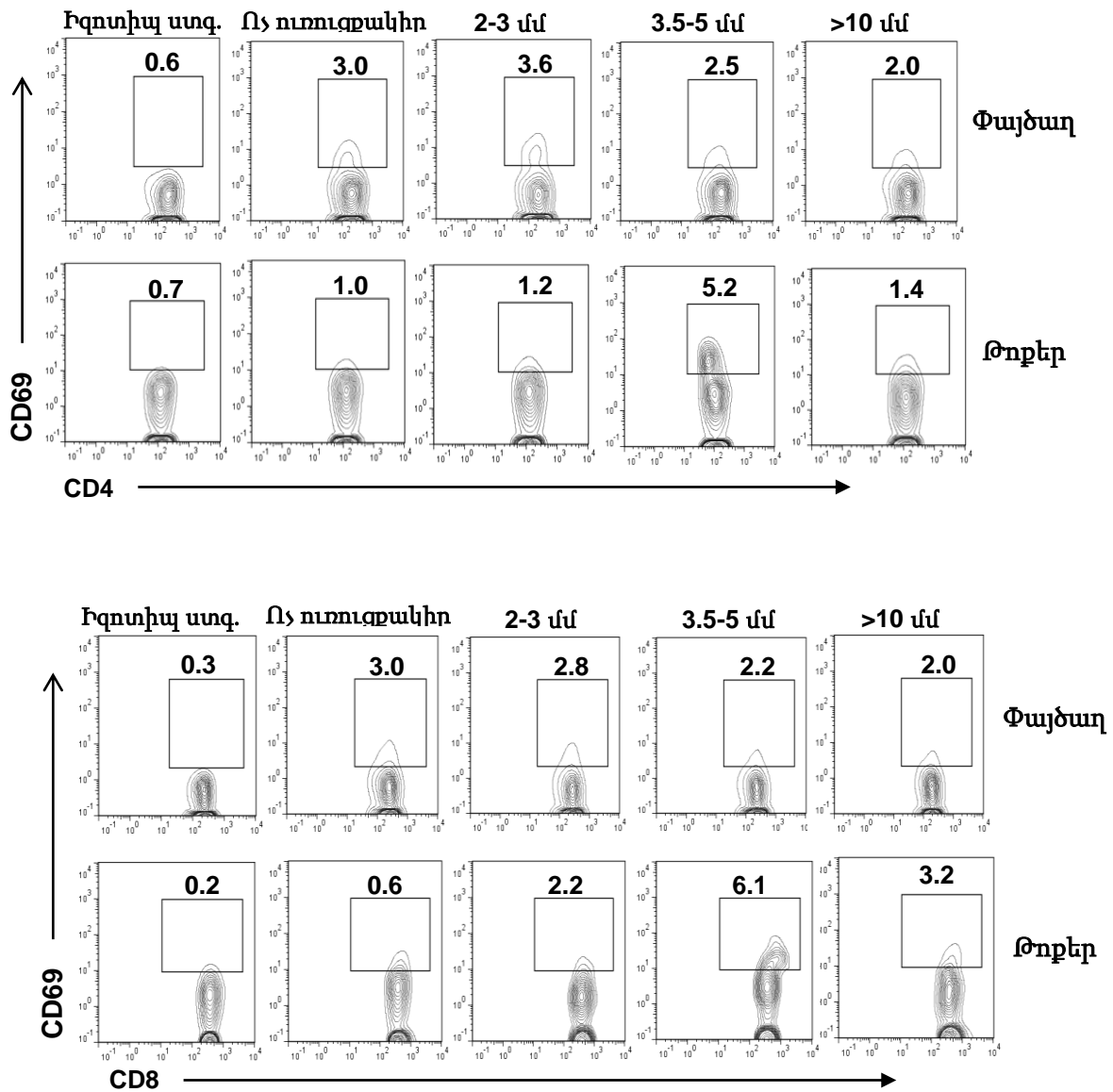
Աղյուսակ 3

Ուռուցքակիր մկների թոքերում և փայծաղում ակտիվացած էֆֆեկտոր բջիջների քանակությունը

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

Հավաստիությունը հաշվարկվել է *t* թեստով ոչ ուռուցքակիր մկների նկատմամբ *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ns-վիճակագրորեն ոչ հավաստի:

Նկար 9 Ուռուցքակիր մկների թոքերում և փայծաղում ակտիվացած էֆֆեկտոր բջիջների քանակության ցուցանանուշային պատկերները



Ցուցանանուշային պատկերները մշակվել են FlowJo 7.6.5 ծրագրով:

3.3 Ակտիվացած T լիմֆոցիտները ուռուցքակիր մկների մոտ

Ուռուցքակիր մկների մոտ ուսումնասիրվել է ակտիվացված T լիմֆոցիտների քանակական տեղաշարժերը՝ կախված ուռուցքի չափերից (աղյուսակ 3, նկար 9): Ակտիվացված լիմֆոցիտները որոշվել են CD69 մակերեսային մարկերով, որը լիմֆոցիտների ակտիվացման գործընթացում ամենավաղ ի հայտ եկող բջջային մակերեսի գլխոպրոտեինն է: 2-3մն 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 vs ուռուցքակիր 3.5-5մմ՝ 2.0 ± 0.085 10-15մմ՝ 2.1 ± 0.15 ,) (աղյուսակ3, նկար 9):

Մենք նաև ցույց ենք տվել, որ գոյություն ունի հավաստի հակառակ կորելյացիա ակտիվացված CD4 բջիջների և ուռուցքի չափի միջև ($R = -0.66$, $***P = 0.0002$, $n=9$): CD8 բջիջների տոկոսային քանակությունը 2-3մմ ՈԻՏ-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 $P<0.01^{***}$) (աղյուսակ3, նկար 9): Թոքերում՝ ակտիվացված CD4 (ուռուցքակիր 2-3մմ՝ 1.6 ± 0.78^{ns} , ուռուցքակիր 3.5-5մմ՝ $4.1\pm 0.6^{**}$, ուռուցքակիր >10 մմ՝ 1.5 ± 0.23^{ns} ի հակառակ ոչ ուռուցքակիր՝ 1.5 ± 0.51) և CD8-երի (ուռուցքակիր 2-3մմ՝ 2.8 ± 1.3^{ns} , ուռուցքակիր 3.5-5մմ՝ $6.2\pm 1.5^{**}$, ուռուցքակիր >10 մմ՝ $3.8\pm 0.98^*$, ոչ ուռուցքակիր՝ 0.75 ± 0.35) տոկոսային քանակությունը ի հակառակ փայծաղի նույն ժամանակաշրջանի՝ 3.5-5մմ ՈԻՏ-ով մկների մոտ հավաստի աճ է ցույց տալիս, ինչը այնուհետ սկսում է նվազել ուռուցքի մեծացման հետ (աղյուսակ3, նկար 9): Այսպիսով մեր կատարած հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ ուռուցքի աճին զուգընթաց մկների մոտ թոքերում հայտնաբերվող կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների քանակը ավելանում է, դրան զուգահեռ տեղի է ունենում նաև թոքերում և փայծաղում իմունոսուպրեսորային միելոիդային բջջային պոպուլյացիայի դրամատիկ աճ:

Ուռուցքի առաջխաղացման 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: Գոյություն ունի դրական

հավաստի կորելյացիա առաջնային ուռուցքի չափերի և թոքերում մետաստազների քանակության միջև, փայծաղում սուպրետորային MDSC-իների քանակության միջև, ինչպես նաև հավաստի հակառակ կորելյացիա ուռուցքի չափերի և ակտիվացած էֆեկտորային բջիջների միջև:

Գլուխ 4. ՀԵՏՎԻՐԱՀԱՏԱԿԱՆ ՄՈՂԵԼԻ ՆԿԱՐԱԳՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

4.1 Կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների որոշումը թոքերում

Կրծքագեղձի քաղցկեղի բուժման ավանդական եղանակները (ուռուցքի վիրահատական հեռացում, քիմիոթերապիա, ճառագայթային թերապիա) հիվանդության ախտորոշման ուշ փուլերում՝ մեծածավալ մետաստազային ախտահարման պայմաններում ցանկալի հակաուռուցքային արդյունավետություն չեն դրսևորում: Այդ պատճառով շատ կարևոր է գտնել բուժման նոր մեթոդներ, որոնք թույլ կտան հայտնաբերել և ոչնչացնել միկրոմետաստատիկ ուռուցքային բջիջները: Կրծքագեղձի քաղցկեղի կենդանական շատ քիչ մոդելներ են, որ կրկնօրինակում են մարդու մոտ մետաստազների զարգացման և առաջխաղացման օրինաչափությունները: Շատ կարևոր է կրծքագեղձի բուժմանն ուղղված իմունոթերապևտիկ կամ այլ բնույթի դեղամիջոցների հակաուռուցքային ազդեցության արդյունավետության նախակլինիկական փորձարկումները իրականացնել այնպիսի մոդելների վրա, որոնք առավելագույնս նմանվում են մարդու մոտ զարգացող հիվանդությանը: Այդ դեպքում կարող ենք ենթադրել, որ նախակլինիկական փորձարկումներում արձանագրված արդյունքները առավել մեծ հավանականությամբ կկրկնվեն կլինիկական փորձարկումների փուլում:

Հաշվի առնելով սա, մենք կարևորել ենք 4Թ1 կրծքագեղձի քաղցկեղի կենդանական մոդելի ուսումնասիրությունը առաջնային ուռուցքի հեռացումն իրականացնելուց հետո՝ մասնավորապես իմունային սուպրեսոր և էֆֆեկտոր բջջային պոպուլյացիաների և մետաստատիկ ուռուցքային բջիջների քանակական փոփոխությունների դինամիկայի արձանագրումը: 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:

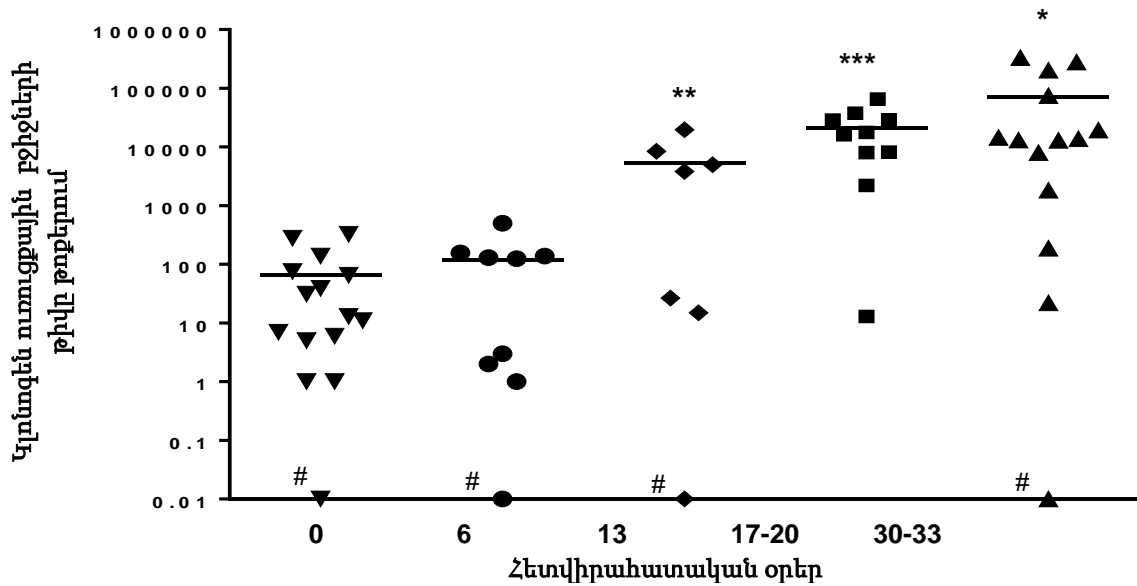
Ուռուցքի, պայմանականորեն փոքր, միջին և մեծ չափերով մկների մոտ՝ հետազոտելով մետաստազների թոքերում տարածվելու քանակական օրինաչափությունները, արձանագրեցինք, որ միջին չափի՝ 3,5-5մմ ուռուցքի տրամագծով ուռուցքակիր մկների 93%-ի մոտ հայտնաբերվում են մետաստազներ: Ուռուցքի այս չափը ընտրվեց վիրահատական միջամտությամբ առաջնային ուռուցքի հեռացման և մետաստատիկ մոդելի վրա հետազոտություններ կատարելու համար: BALB/c մկներին ներարկվել են 1.5×10^4 4Թ1 բջիջներ, ներարկումից 5-7 օր հետո ուռուցքը դառնում է շոշափելի, 11-14-երորդ օրերը ուռուցքի տրամագիծ հասնում է 3.5-5մմ-ի: Վերջիններս ենթարկվում են ուռուցքի վիրահատական հեռացման, համապատասխանաբար հետվիրահատական 0,2,4,6, 13, 17- 20, 30-33 օրերին մկների կյանքը ընդհատվում է և կատարվում 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 10):

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 ± 53^{ns} , $5274 \pm 2680^{**}$, $21301 \pm 6271^{***}$, $69742 \pm 30556^*$), վկայելով այն մասին, որ ուռուցքի հեռացումը չի խոչընդոտում մետաստազների զարգացմանը և իմունային բջիջները չեն կարողանում հայտնաբերել և ոչնչացնել միկրոմետաստատիկ ուռուցքային բջիջները:

Նկար 10

Կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիները հետվիրահատական մկների թոքերում

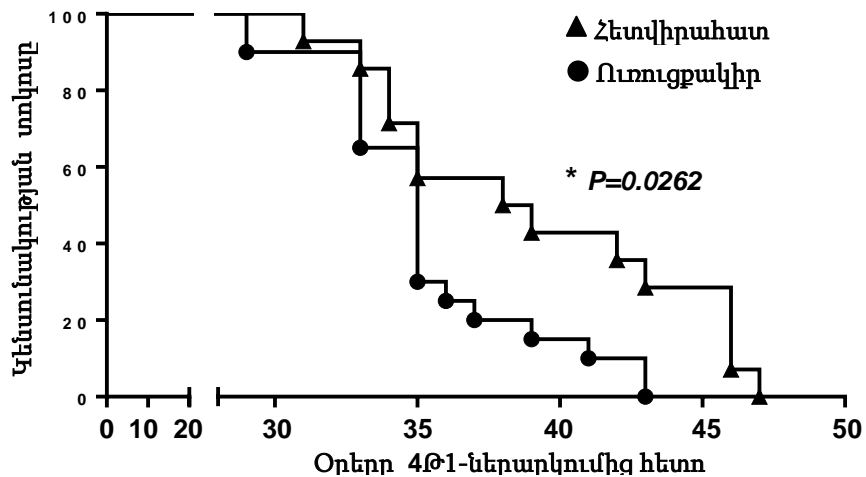


Հավաստիությունը հաշվարկվել է t թեստով՝ օր 0 (վիրահատության օրը) մկների նկատմամբ * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns- վիճակագրորեն ոչ հավաստի: # օր 6, 13, 30-33 խմբերից յուրաքանչյուրում մեկական մկան մոտ մետաստազներ չեն հայտնաբերվել:

4.2 Ուռուցքի վիրահատական հեռացման ազդեցությունը մկների կենսունակության վրա

Փորձարարական մկների մոտ 4Թ1 առաջնային ուռուցքի չափը 3.5-5մմ տրամագծի հասնելիս կատարվել է ուռուցքի վիրահատական հեռացում, այնուհետև կենդանիների մոտ դիտարկվել է կենսունակության ցուցանիշը: Ստուգիչ խմբի մկների մոտ առաջնային ուռուցքը չի հեռացվում: Վիրահատության ենթարկված և չենթարկված (ուռուցքակիր) մկների կենսունակության միջին արժեքների միջև դիտարկվել է մի փոքր տարբերություն (նկար 11): Ուռուցքակիր մկների կյանքի միջին տևողությունը 35 օր է, այն դեպքում, երբ ուռուցքի վիրահատական հեռացման ենթարկված մկների կյանքի միջին տևողությունը 38,5օր ($P < 0.05$). Ուռուցքակիր կենդանիները սկսել են վախճանվել ուռուցքային բջիջների ներարկումից 29 օր հետո և օր 43ին արդեն ոչ մի կենդանի մուկ կենդանի չէր մնացել: Վիրահատության ենթարկված մկները վախճանվել են սկսած օր 31ից, իսկ օր 47ին ոչ մի մուկ ողջ չի մնացել:

Նկար 11 Ուռուցքակիր և հետվիրահատական մկների կենսունակության կորերը



Կենսունակության կորերը կազմվել և համեմատվել են օգտագործելով Լոգ-Ռենք (Մանթել-Կոքս) թեստը, *P=0.0262

Այսպիսով փորձարարական կենդանիների մոտ ուռուցքի վիրահատական հեռացումը չնայած մի փոքր բարելավում է կենսունակության ցուցանիշը, բայց ի վերջո մկների իմունային համակարգը չի կարողանում պայքարել միկրոմետաստատիկ ուռուցքային բջիջների հետ, ինչն էլ հանգեցնում է կենդանիների անժամանակ վախճանին: BA1B/c մկների կյանքի տևողությունը մոտավորապես 500-600 օր է՝ կախված պահման պայմաններից:

4.3 Իմունոսուպրեսորային բջջային պոպուլյացիաները 4Թ1

հետվիրահատական մոդելում

Իմունոսուպրեսոր MDSC-ների պոպուլյացիան հետազոտվել է ուռուցքի վիրահատական հեռացման տարբեր ժամանակահատվածներում՝ ընդգրկելով օր 0-ից (վիրահատության օրը) մինչև օր 30-33 հետվիրահատական ժամանակաշրջան (աղյուսակ 4 նկար12): 3.5-5մ ուռուցքակիր մկների մոտ MDSC-ի տոկոսային քանակությունը հավաստիորեն բարձր է համեմատած ոչ ուռուցքակիր մկների հետ: Հետաքրքիր է արձանագրել, որ վիրահատությունից հետո նկատվում է MDSC-ների քանակության աստիճանական նվազում: Հետվիրահատական 2րդ օրվա մկների մոտ այս ցուցանիշը ($7.2 \pm 0.63, n=15$)

դեռևս հավաստի չի տարբերվում վիրահատության 0 օրվանից ($8.2 \pm 0.38, n=22$) այն է՝ 3.5-5մմ ուռուցքակիր մկներից: Սկսած հետվիրահատական 4րդ օրվանից միելոիդային սուպրետորային բջիջների 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 4): Հետվիրահատական 6-րդ օրվա մկների 53 տոկոսի մոտ միելոիդային սուպրետորային բջիջների 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 միելոիդային սուպրետորային բջիջների քանակը ($12 \pm 2.3, n=15, *P$) փայծաղում հավաստիորեն բարձր է 3.5-5մմ ուռուցքակիր մկների համապատասխան ցուցանիշից, 30-33րդ օրերը MDSC-իների աճման օրինաչափությունը պահպանվում է՝ հասնելով հետվիրահատական ժամանակաշրջանում այս ցուցանիշի առավելագույն արժեքին ($15 \pm 4, n=9, *P$): Նաև արձանագրվել է ուղիղ համեմատական կապ հետվիրահատական մկների մոտ փայծաղում MDSC-իների տոկոսային քանակի և թոքերում կլոնոգեն ուռուցքային բջիջների միջև ($R=0.77, ***P<0.001$): Հաջորդիվ հետվիրահատական տարբեր ժամանակահատվածներում ուսումնասիրվել է T-կարգավորիչ իմունային բջիջների քանակական փոփոխությունը փայծաղի մոնոնուկլեար բջջային պոպուլյացիայում (աղյուսակ 4, նկար 12): Սուպրետորային այս բջիջների տոկոսային քանակությունը ինչպես ուռուցքակիր մկների այնպես էլ հետվիրահատական մկների մոտ չնայած ուռուցքի չափերի մեծացմանը և թոքերում մետաստազների թվի ավելացմանը, չի տարբերվում ոչ ուռուցքակիր

մկների մոտ գրանցված արդյունքներից: Այսպիսով ուռուցքակիր և հետվիրահատական մկների մոտ համապատասխանաբար ուռուցքի չափերի և թոքերում մետաստազների քանակի մեծացմանը զուգընթաց Treg-ների տոկոսային քանակությունը մնում է անփոփոխ և չի տարբերվում *naive* մկների մոտ համապատասխան ցուցանիշից, իսկ ահա Treg-ների բացարձակ քանակը հավաստիորեն բարձր է հետվիրահատական օր 0-ին, 30-33ին և ուռուցքակիր 2-3մմ, 3.5մմ, 10-15մմ ուռուցքի տրամագծով մկների մոտ ի համեմատ ոչ ուռուցքակիր մկների համապատասխան ցուցանիշի (աղյուսակ 2): Սա բացատրվում է նրանով որ ուռուցքի զարգացումը ուղեկցվում է ընդհանուր լեյկոմոխո ռեակցիայով և հաստատուն տոկոսային քանակության պայմաններում արձանագրվում է Treg-ների բացարձակ թվի աճ:

4.4 Ակտիվացած T-լիմֆոցիտները 4Ց1 հետվիրահատական մոդելում

Հաջորդիվ մենք ուսումնասիրել ենք ակտիվացված CD4 և CD8 պոպուլյացիաների փոփոխությունը ուռուցքի վիրահատական հեռացումից հետո ընկած ժամանակահատվածում (աղյուսակ 5, նկար 13): Ինչպես երևում է աղյուսակ 5-ից, օր 0 ում ակտիվացված CD4 բջջային պոպուլյացիայի տոկոսային քանակությունը (2.0 ± 0.08 , $n=19$, $***P$) հավաստիորեն ցածր է ոչ ուռուցքակիր մկների մոտ արձանագրված համապատասխան ցուցանիշից: Հետվիրահատական 2րդ օրը նկատվում է աճ (2.9 ± 0.11 , $n=14$, $***P$), որն արժեքապես չի տարբերվում ոչ ուռուցքակիր մկների համապատասխան ցուցանիշից (2.9 ± 0.15 , $n=20$) , այդ աճը շարունակվում է, հասնելով առավելագույն արժեքին օր 6ին (3.9 ± 0.23 , $n=6$) և 13ին (3.9 ± 0.13 , $n=7$) , ապա սկսում է նվազել օր 17-ից (3.6 ± 0.25 , $n=15$) մինչև օր 33 (2.5 ± 0.14 , $n=9$), բայց մնում է հավաստիորեն բարձր օր 0ից (աղյուսակ 5): Ակտիվացած CD8-ի փոփոխությունը կատարվում է նույն սկզբունքով և հաջորդականությամբ, այն է՝ օր 0-ում (2.0 ± 0.078 , $n=19$ $***P$), հավաստիորեն ցածր է ոչ ուռուցքակիր մկների մոտ արձանագրված համապատասխան

ցուցանիշից(2.6 ± 0.13 , $n=20$), հետվիրահատական շրդ օրը նկատվում է աճ (2.7 ± 0.13 , $n=14$), արժեքապես հավասարվելով ոչ ուռուցքակիր մկների համապատասխան ցուցանիշին, աճի միտումը շարունակվում է՝ հասնելով առավելագույն արժեքին օր 6-13 (2.9 ± 0.14 , $n=6$ և 3.0 ± 0.98 , $n=7$): Ի տարբերություն ակտիվացած CD4 պոպուլյացիայի, ակտիվացած CD8 պոպուլյացիան հետվիրահատական 30-33-երորդ օրերին նվազում է (1.8 ± 0.2 , $n=9$), մոտենալով օր 0-ի ցուցանիշին (աղյուսակ 5): Այսպիսով մեր հետազոտությունների արդյունքում պարզ դարձավ, որ հետվիրահատական շրջանում իմունային բջջային պոպուլյացիաները քանակական դինամիկ փոփոխությունների են ենթարկվում, մասնավորապես՝ միելոիդային սուպրեսորային բջիջները քանակապես միառժամանակ նվազում են՝ հասնելով նայիվ մկների ցուցանիշին, այնուհետև թոքերում մետաստազների աճին զուգընթաց վերջիններիս քանակական գերակայությունը վերահաստատվում է: Ի հակառակ սրա ակտիվացած էֆֆեկտորային CD4, CD8 բջջային պոպուլյացիաները ժամանակավորապես՝ քանակական աճ են արձանագրում:

4.5 Իմունոթերապիայի «Հնարավորության պատուհան»-ի

նկարագրությունը:

Կրծքագեղձի քաղցկեղի ավանդական բուժման եղանակները մետաստատիկ ուռուցքային բջիջների դեմ պայքարում մեծամասամբ անարդյունվետ են: Իմունոթերապիան նպատակաուղղված է թիրախային կերպով ոչնչացնելու մետաստատիկ ուռուցքային բջիջներին: Բազմաթիվ հետազոտողների կողմից ցույց է տրվել, որ ուռուցքակիր կենդանիների ու մարդկանց մոտ առկա է ուռուցքով պայմանավորված իմունոսուպրեսիա, ինչի պայմաններում իմունոթերապևտիկ միջամտությունները ցանկալի արդյունավետություն չեն դրսևորում: Հակաուռուցքային իմունոթերապևտիկ միջամտությունների 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 30-33երորդ օրերին: Ստացված տվյալների վերլուծության արդյունքում պարզվել է, որ ուռուցքի վիրահատական հեռացումից հետո փայծաղում MDSC-իների քանակությունը ժամանակավորապես հավաստիորեն նվազում է, իսկ ակտիվացած CD69+CD4+ և CD69+CD8+ T լիմֆոցիտների քանակությունը հավաստի աճում է (աղյուսակ 4,5): 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 օր 30-33 րդ օրերը հավաստի բարձր է ի համեմատ օր 0-ի: Արձանագրվել է նաև ակտիվացած CD8 բջիջների քանակության աճ՝ հետվիրահատական 2րդ օրվանից մինչև 17-20րդ օրերը:

Հաջորդիվ 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 ուռուցքի վիրահատական հեռացումից հետո ընկած 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: Ուռուցքակիր օրգանիզմներին բնորոշ ընդհանուր իմունոսուպրեսիայի պայմաններում այսպիսի «պատուհանը»- 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:

Մոտարկման արդյունքները: Փորձարարական տվյալները պոլինոմիալ ֆունկցիայի միջոցով մոտարկվել են: $\sum_{i=0}^N a_i x^i$ Որտեղ գործակիցները որոշվել են նվազագույն քառակուսիների մեթոդով (ordinary least squares) մեթոդով: Գործակիցները գտնելու համար օգտագործվել է Mathematica 8.0 ծրագիրը (Wolfram reseach, USA) կիրառվել է գծային մոդելի համապատասխանեցում (LinearModel Fit) ֆունկցիան: Ֆունկցիայի բանաձևն է $a_0 + a_1x + a_2x^2 + a_3x^3$ Ֆունկցիայի օպտիմիզացումը կատարվել է հետևյալ կերպ.

$$\sum_i^N \left[\sum_{k=0}^3 a_k (t^i)^k - Data(t^i) \right]^2 \frac{1}{SD^2(t^i)}$$

Աղյուսակում 6-ում ցույց են տրված այդ

ֆունկցիայի գործակիցները և վերջիններիս սխալմունքները

Ժամանակային տիրույթը, որտեղ ֆունկցիան հավաստիորեն նվազում կամ աճում է (Մոտարկման հիման վրա կատարված մաթեմատիկական անալիզներ)

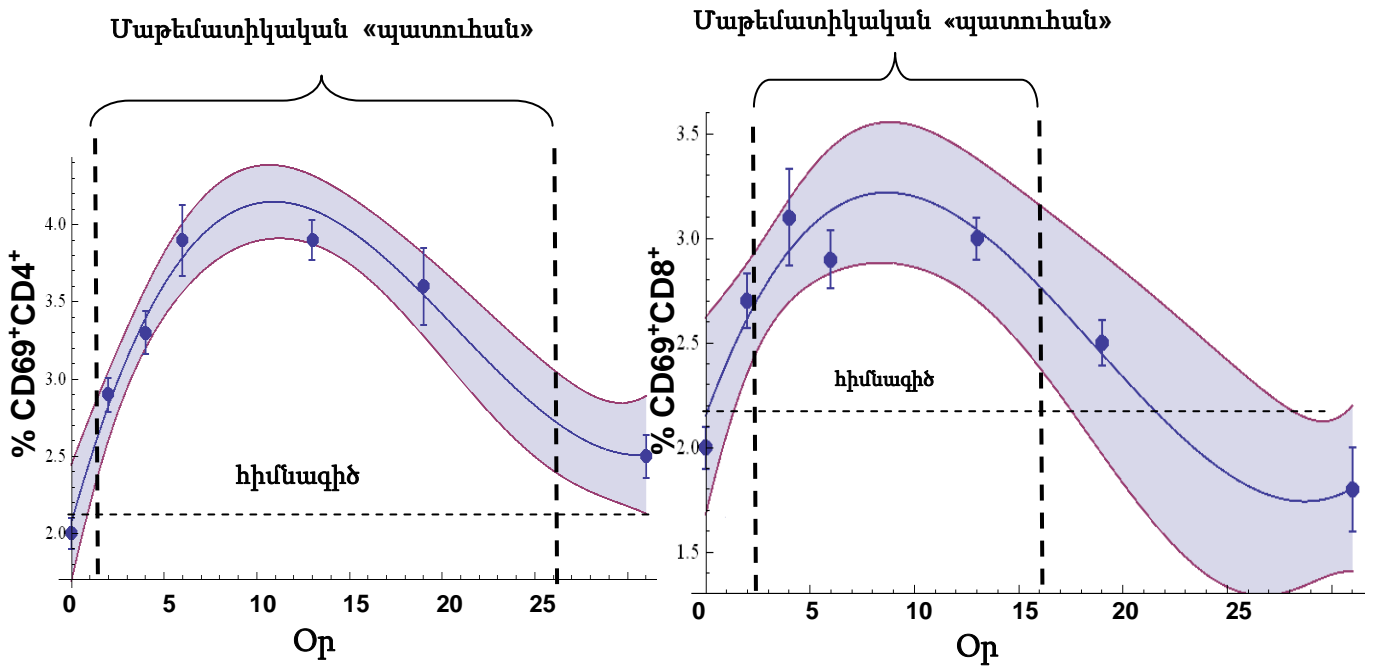
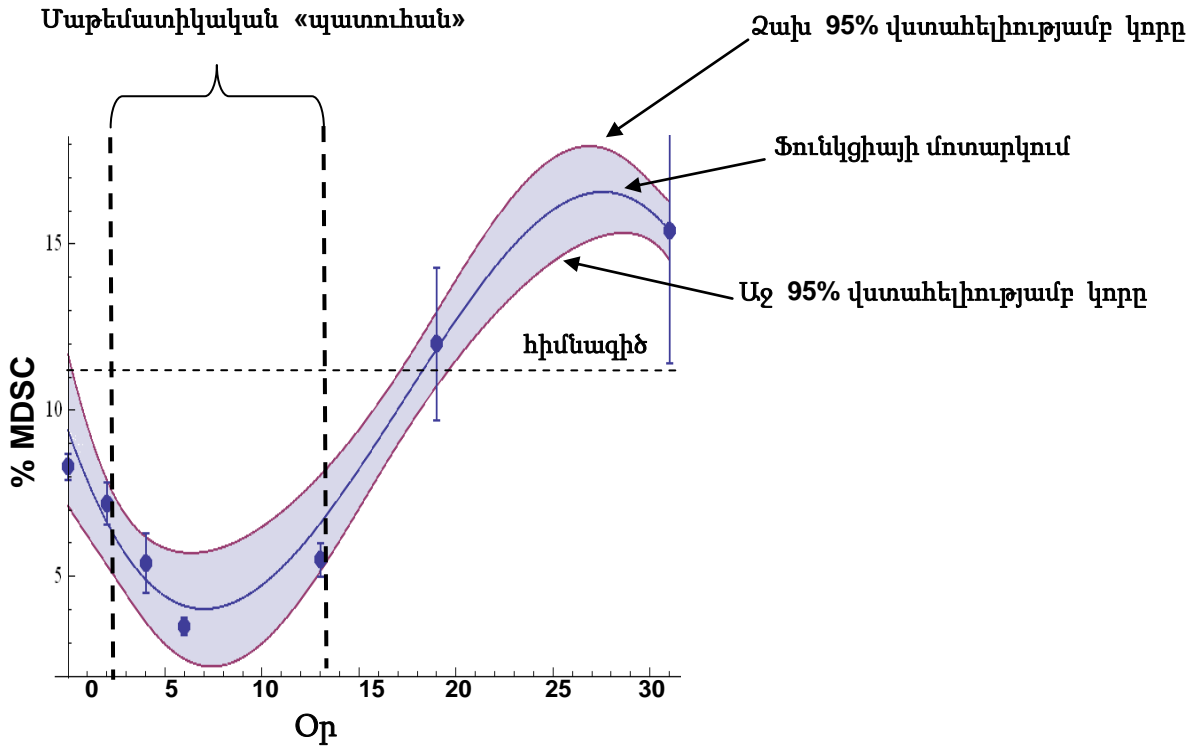
Ֆունկցիայի մոտարկումը կատարվել է վերոգրված բանաձևի հիման վրա իսկ ֆունկցիայի կորը ստացվել է օգտագործելով Mathematica 8.0 plugins (Wolfram reseach, USA).

Աղյուսակ 6 Ֆունկցիայի լավագույն համապատասխանեցման գործակիցներ

<i>Տվյալները</i>		<i>Լավագույն համապատասխանեցման գործակիցները</i>	<i>Գործակիցների սխալմունքները</i>
% MDSC	a_0	9.405	0.968
	a_1	-1.677	0.368
	a_2	0.149	0.0278
	a_3	-0.00288	0.000549
% CD69 ⁺ CD4 ⁺	a_0	2.0678	0.161
	a_1	0.4325	0.0549
	$a_2 a_3$	-0.0268	0.0043
		0.000431	0.000088
% CD69 ⁺ CD8 ⁺	a_0	2.1512	0.2002
	a_1	0.2737	0.0737
	a_2	-0.02055	0.000366
	a_3	0.000366	0.00013

Մոտարկված ֆունկցիայի օր 0-ի արժեքը ընդունվում է որպես տեսական հիմնագծի արժեք (նկար 14): Ֆունկցիայի 95% վստահելի միջակայքերը և սխալմունքները ներկայացված են մոխրագույն հատվածներով. X-առանցքի վրա ներկայացված են օրերը ֆունկցիայի կորի սկիզբն ու վերջը համապատասխանում են ամենավաղ և ամենաուշ կետերին՝ համապատասխանաբար օր 0 և 30-33 : Y-առանցքի արժեքներն են % MDSC կամ % CD69⁺CD4⁺ կամ % CD69⁺CD8⁺, որոնք նույնպես տարբերվում են տեսական հիմնագծից (օր 0) 95 տոկոս վստահելիությամբ: Հատվածի սկիզբն ու վերջը նշված է ուղղահայաց կետագծերով, որով տարբերանշվում է «հնարավորության պատուհան»-ի տեսական սահմանները:

Նկար 14 Մաթեմատիկական «պատուհան»



Մաթեմատիկական վերլուծությունների արդյունքում հաստատվել է MDSC-ի նվազման և ակտիվացած T քիմիոկինների քանակի աճի տիրույթներ 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 (աղյուսակ 7):

Աղյուսակ 7 Ֆունկցիաների աճի կամ նվազման միջակայքերը

<i>Ֆունկցիա</i>	<i>Էքստրեմումի արժեքը (X-առանցք, Օր)</i>	<i>Ֆունկցիայի նվազման կամ աճի միջակայքը (95% վստահելիություն)</i>
% MDSC	7.0	(2.4 - 13.3)
% CD69 ⁺ CD4 ⁺	10.9	(1.8 - 26.1)
% CD69 ⁺ CD8 ⁺	8.6	(2.1 - 16.8)
Ընդհանուր վերածածկման տիրույթը	-	(2.4 - 13.3)

Բոլոր երեք ֆունկցիաներում նշանակալի փոփոխությունների համընկման տիրույթը հաստատվել է 2.4-13.3-րդ օրերի միջև ընկած ժամանակահատվածը: Հիմնվելով այս տվյալների վրա կարող ենք եզրակացնել, որ իմունոթերապևտիկ միջամտությունների համար հարմար է 3-րդից 13-րդ օրը ընկած ժամանակահատվածը (նկար 15), ընդ որում ամենից օպտիմալ ժամանակը ուռուցքի հեռացումից հետո 7-ից մինչև 10-րդ օրը ընկած ժամանակահատվածը: Նկար 15-ում ներկայացված է ուռուցքակիր մկների մոտ 3 իմունային պոպուլյացիաների (MDSC-ի, ակտիվացած CD4⁺, CD8⁺ – ի) քանակական տեղաշարժերի գրաֆիկական վերադրման պատկերը, նախավիրահատական և հետվիրահատական փուլերում:

**Գլուխ 5. IMMUNOMAX® -ի ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԻՄՈՒՆ
ՀԱՄԱԿԱՐԳԻ ԵՎ ՄԵՏԱՍՏԱԶՆԵՐԻ ԶԱՐԳԱՑՄԱՆ ՎՐԱ
ՀԵՏՎԻՐԱՀԱՏԱԿԱՆ ՄՈԴԵԼՈՒՄ**

5.1 IMMUNOMAX® -ի հակաուռուցքային ազդեցությունը

Մեր փորձերի արդյունքում պարզ դարձավ, որ 4Թ1 ուռուցքակիր մկների ուռուցքի վիրահատական հեռացումը չնայած մի փոքր բարելավում է մկների կենսունակության ցուցանիշը, բայց չի կանխարգելում մետաստազների առաջխաղացումը, ինչն էլ հանդիսանում է կենդանիների մահվան պատճառ: Այս հետազոտության մեջ մենք ուսումնասիրել ենք *Immunomax*® (IMM) իմունոխթանիչի հակաուռուցքային ազդեցությունը 4Թ1 կենդանական հետվիրահատական մոդելի վրա:

Այն ոչ տոկսիկ՝ կարտոֆիլից անջատված պոլիսախարիդ է: Հադիսանում է գրանցված իմունոխթանիչ դեղամիջոց Ռուսաստանի դաշնությունում և չորս այլ ԱՊՀ երկրներում, այդ թվում նաև Հայաստանում: Ըստ դեղամիջոցի օգտագործման ցուցումների նշանակվում է զանազան բակտերիալ, վիրուսային ինֆեկցիաների դեպքում՝ որպես ընդհանուր իմուն համակարգի ուժեղ խթանիչ: (Ghochikyan et al., 2014d):

Ելնելով դրանից ենթադրեցինք որ IMM -ը կարող է ակտիվացնել ուռուցքով պայմանավորված սուպրեսիայի վիճակում գտնվող 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: Ուռուցքակիր կենդանիները պատահականության սկզբունքով բաժանվել են 2 խմբի՝ ստուգիչ և փորձարարական: Կենդանիների մոտ ուռուցքը հազիվ

շոշոփելի դառնալուն պես (>1մմ), մկները ներարկվել են 100մկգ IMM-ով կամ բուֆերացված ֆիզիոլոգիական լուծույթով: Ուռուցքային բջիջների ներարկումից 10-14օր հետո, երբ ուռուցքի տրամագիծը հասել է 3.5-5մմ-ի, կատարվել է ուռուցքի վիրահատական հեռացումը: Հետվիրահատական 6րդ և 13րդ օրերը կատարվել է փորձարկվող դեղամիջոցի՝ երկրորդ և երրորդ՝ վերջին ներարկումը (գրաֆիկ 1): Համապատասխանաբար ֆիզիոլոգիական լուծույթի ներարկումներ ստացել են նաև ստուգիչ մկները: Հետվիրահատական 20-երորդ օրը բոլոր կենդանիների կյանքը ընդհատվել է, փայծաղը և թոքերը ասեպտիկ պայմաններում վերցվել են հետագա անալիզների համար: Մեր հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ հետվիրահատական 20րդ օրը, ինչպես ստուգիչ այնպես էլ փորձարկային բոլոր մկների թոքերում հայտնաբերվում 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 16):

Այսպիսով փորձարարական մկների մոտ արձանագրելով թոքերում մետաստազների թվի հավաստի նվազում, հաջորդիվ ուսումնասիրել ենք իմունոխթանիչի ազդեցությունը մկների կենսունակության վրա: 4Թ1 ուռուցքակիր մկները այս դեպքում նույնպես առաջին ներարկումը ստացել են ուռուցքը շոշափելի (ՈԻՏ 0.5-1մմ) դառնալուն պես: Ուռուցքի չափերը 3.5-5մմ հասնելուն պես կատարվել է վերջինիս վիրահատական հեռացում: Վիրահատությունից հետո իմունոխթանիչով կամ ֆիզիոլոգիական լուծույթով ներերակային ներարկումները կատարվել են շաբաթը մեկ միջակայքով՝ մինչ հետվիրահատական 69-երորդ օրը (նկար 17): Մկների կենսունակությունը դիտարկվել է մինչ 142րդ օրը: Կենսունակության դիտարկման արդյունքում պարզվեց, որ փորձարկային մկների կենսունակության ցուցանիշը ի համեմատ ստուգիչ մկների հավաստի բարելավվել է (*P<0.05) (նկար 17): Հետվիրահատական 37-երորդ օրը, երբ բոլոր ստուգիչ մկները զոհվել էին մետաստազներից, փորձարարական մկների 63 տոկոսը դեռ կենդանի էին:

Միջին կենսունակության արժեքը ստուգիչ մկների մոտ 28 է, իսկ փորձարարական մկների մոտ՝ 44: Փորձարարական մկների 31 տոկոսը լիովին առողջացել էին, այն դեպքում երբ ստուգիչ բոլոր մկները մետաստազային ախտահարումից վախճանվել էին:

Արձանագրելով IMM -ի դրական հակաուռուցքային ազդեցությունը , այն է՝ թոքերում կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների քանակի հավաստի նվազումը և մկների կենսունակության ցուցանիշի հավաստի բարելավում, ուսումնասիրել ենք, թե ինչ քանակական տեղաշարժեր են տեղի ունենում իմունային տարբեր բջջային պոպուլյացիաներում (ակտիվացված լիմֆոցիտների՝ CD69⁺CD4⁺, CD69⁺CD8, CD69⁺nKp46⁺ և սուպրեսորային՝ MDSC, Treg-ների), իմունոխթանիչի Յանգամյա ներարկման պայմաններում (գրաֆիկ 1):

Կարևոր է փաստել, որ իմունոխթանիչով բուժման կուրս անցած մկների փայծաղում արձանագրվել է միելոիդային սուպրեսորային բջիջների քանակի ոչ կտրուկ բայց հավաստի անկում, ի համեմատ ստուգիչ մկների (7,86±1,26% ի հակառակ 12,43±1,84 %, *P) (նկար 18): Ստուգիչ և փորձառական մկների միջև սուպրեսորային T-կարգավորիչ բջջային պոպուլյացիայի քանակության տարբերություն չի դիտարկվել (նկար 18):

Հաջորդիվ ուսումնասիրել ենք IMM-ի ազդեցություն է իմուն համակարգի էֆֆեկտորային լիմֆոցիտների վրա: Հետազոտության արդյունքները ցույց տվեցին, որ փորձառական մկների մոտ ակտիվացած CD4 (6,19±0,53 ի հակառակ 3,88±0,14 ***P), CD8 (3,45±0,17 ի հակառակ 2,77±0,11 ***P) NK (17,78±1,59 ի հակառակ 7,47±0,33% ***P) բջիջների տոկոսային քանակները ստուգիչ մկների հետ համեմատած՝ հավաստիորեն բարձր են (նկար19): Միաժամանակ հետազոտել ենք նաև սուպրեսորային MDSC և Treg-ների և ակտիվացված CD4, CD8, NK-ների տոկոսային քանակությունը փորձառական և ստուգիչ մկների թոքերում: Հավաստի տարբերություններ ստուգիչ և փորձառական մկների միջև չեն արձանագրվել (նկար 19):

Այսպիսով մեր փորձարկումների արդյունքում պարզ դարձավ, որ IMM իմունոխթանիչը ակտիվացնում է իմուն համակարգի էֆֆեկտորային CD4, CD8, NK բջիջներին և ի հակառակ դրան՝ նվազեցնում սուպրեսորային միելոիդային բջիջների քանակությունը: Կարևոր է նաև նշել, որ փայծաղում իմուն համակարգի էֆֆեկտորային և սուպրեսորային պոպուլյացիաների փոփոխությունները՝ սուպրեսոր պոպուլյացիաների քանակական նվազում և ակտիվացած էֆֆեկտորների աճը, համապատասխանում է թոքերում արձանագրված ուռուցքային կլոնառաջացնող բջիջների քանակության նվազման հետ: Բջջային պոպուլյացիաների այսպիսի փոփոխությունները խոստումնալից կարող են լինել կլինիկական փորձարկումների փուլում ուռուցքային բջիջներով պայմանավորված իմուն համակարգի ընկճվածության վերափոխման և հակաուռուցքային բջջային մեխանիզմների ակտիվացման խնդրում:

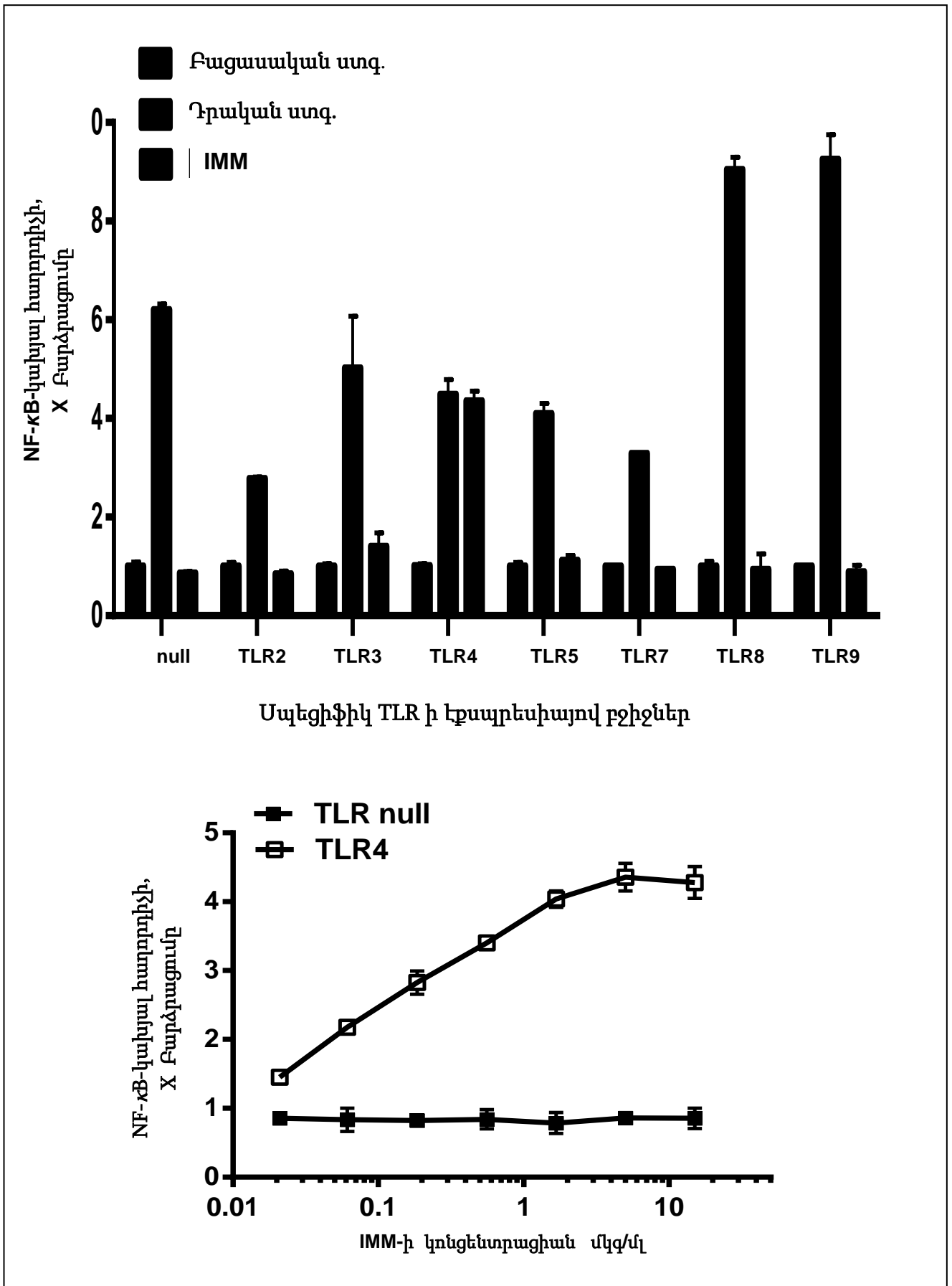
5.2 IMMUNOMAX® - TLR4 ազոնիստ

Հայտնի է, որ IMM-ը ակտիվացնում է բնածին իմուն պատասխանը, մասնավորապես խթանում պրոբոբոբային ցիտոկինների արտադրությունը, NO-ի արտադրությունը մակրոֆագերի և մոնոցիտների կողմից, խթանում NK բջիջների ցիտոտոկսիկությունը (Ataullakhanov et al., 2010): Հիմնվելով այս, ինչպես նաև վերոնկարագրված ակտիվացած իմունային էֆֆեկտորային բջիջների տվյալների վրա առաջ քաշվեց վարկած, որ IMM-ով ակտիվացման մեխանիզմում ներգրավված են TLR ընկալիչները:

Այս վարկածը ստուգելու համար կատարվել է հետազոտություն HEK-Blue (Invivogen) տարբեր բջջային գծերի վրա: HEK-Blue բջջային գիծը ընդհանուր առմամբ բնորոշվում է մարդու TLR-2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 ընկալիչներից որևէ մեկի անհատական կայուն էքսպրեսիայով և SEAP հաղորդիչ գենի առկայությամբ, որի տրանսկրիպցիան կարգավորվում է NF-κB կախյալ պրոմոտորի միջոցով:

TLR ընկալիչները համապատասխան լիգանդով խթանելիս տեղի է ունենում NF-κB տրանսկրպցիոն գործոնի ակտիվացում, որը կապվելով SEAP

Նկար 20 TLR-միջնորդավորված NF-Kb-ի որոշումը



հաղորդիչ գենի պրոմոտորի հետ ակտիվացում է վերջինիս սինթեզը: Այսպիսով TLR ընկալիչը իր համապատասխան լիգանդի հետ կապվելիս տեղի է ունենում այսպես կոչված հաղորդիչ գենի սպիտակուցի՝ սադմնային ակլային ֆոսֆատազի սինթեզ և արտազատում բջջային սուպերնատանտ: Սադմնային ակլային ֆոսֆատազայի կողմից համապատասխան սուբստրատի հիդրոլիզի ռեակցիայի շնորհիվ անուղղակի կերպով գնահատվում է TLR ընկալիչների սպեցիֆիկ ակտիվացումը:

Տարբեր TLR-ների կայուն տրանսֆեկցիայով HEK Blue բջիջները (TLR-2, 3, 4, 5, 7, 8, 9) ինկուբացիայի են ենթարկվել IMM-ի ներկայությամբ է, NF-κB- ի ակտիվացում դիտարկվել է միայն hTLR-4 HEK Blue բջիջների դեպքում նկար16: Միաժամանակ նաև ցույց է տրվել, որ NF-κB ակտիվացումը կոնցենտրացիոն կախվածություն ունի IMM-ից , ինչը վկայում է այն մասին, որ վերջինս հանդիսանում է սպեցիֆիկ լիգանդ տվյալ ընկալիչի համար (նկար 20): Հիմնվելով այս փորձերի արդյունքում ստացված տվյալների վրա արձանագրել ենք , որ IMM-ով իմունային համակարգի ակտիվացման գործընթացում ներգրավված է TLR-4 ընկալիչը:

Գլուխ 6. ԱՄՓՈՓՈՒՄ

Կրծքագեղձի քաղցկեղը աշխարհում ամենատարածվածն է կանանց շրջանում: Ըստ համաշխարհային առողջապահական կազմակերպության տվյալների 2011թին ամբողջ աշխարհում կրծքագեղձի քաղցկեղից մահացել է 508000 կին: Չնայած որ կրծքագեղձի քաղցկեղը համարվում է զարգացած երկրների հիվանդություն, ախտորոշված հիվանդությունների 50 տոկոսը և մահվան ելքերի 58 տոկոսը գրանցվել է զարգացող երկրներում: Հայաստանում ըստ վիճակագրության յուրաքանչյուն 14-րդ կին ունի կրծքագեղձի քաղցկեղ: Ըստ վիճակագրական տվյալների ամբողջ աշխարհում կրծքագեղձի քաղցկեղից բուժման տոկոսը մեծապես տատանվում է՝ Հյուսիսային Ամերիկայում, Շվեդիայում, Ճապոնիայում այդ թիվը կազմում է 80 տոկոս, զարգացող երկրներում մոտ 60 տոկոս, իսկ ցածր եկամուտներով երկրներում՝ 40 տոկոսից քիչ (CancerFacts&Figures 2013): Բուժման արդյունավետությունը հիմնականում կապված է հիվանդության վաղ ախտորոշման հետ, երբ լիմֆատիկ հանգույցները և օրգանները միկրոմետաստատիկ քաղցկեղային բջիջներով դեռևս ախտահարված չեն կամ ախտահարումը փոքրամասշտաբ է: Այս դեպքում առաջնային ուռուցքի վիրահատական հեռացումը, քիմիոթերապիան, ճառագայթային թերապիան մեծամասամբ տալիս են դրական արդյունքներ: Հիվանդության ուշ փուլերում, չնայած որ առաջնային ուռուցքը վիրահատական միջամտությամբ հեռացվում է, գոյություն ունեցող բուժման մեթոդներով հնարավոր չի լինում պայքարել մետաստազների դեմ: Հայտնի է նաև, որ քիմիոթերապիան և ճառագայթային թերապիան ունեն երկարաժամկետ թունավոր կողմնակի ազդեցությունը, ինչը զգալիորեն վատացնում է հիվանդների կյանքի որակը: Ներկայումս գոյություն չունի այնպիսի մեթոդ որ թույլ կտա ճշգրիտ կանխորոշել մետաստազների զարգացման ռիսկը, այդ պատճառով կանանց 80% ստանում են ադյուվանտային քիմիոթերապիա, չնայած որ միայն 40 տոկոսի մոտ է ի հայտ գալիս մետաստազների

կրկնողություն (Weigelt and Reis-Filho, 2010): Այսպիսով շատ կարևոր է գտնել բուժման նոր՝ ավելի արդյունավետ ու անվտանգ եղանակներ, որոնք թույլ կտան թիրախային կերպով հայտնաբերել ու ոչնչացնել քաղցկեղային բջիջներին: Այս տեսանկյունից խոստումնալից է համարվում իմունոթերապիան: Բուժման արդյունավետ իմունոթերապևտիկ միջոցների մշակումը կապված է մի շարք կարևոր խնդիրների լուծման հետ: Դրանցից են՝ ուռուցքով պայամանավորված իմուն համակարգի ընկճվածության հաղթահարումը և հակաուռուցքային իմունային էֆֆեկտոր բջիջների ակտիվացում: Կարևոր խնդիր է նաև իմունոթերապևտիկ դեղամիջոցի նախակլինիկական փորձարկումներն իրականացնելիս կրծքագեղձի քաղցկեղի կենդանական մոդելի ընտրությունը: Սակավաթիվ կենդանական մոդելներ են, որ կրկնօրինակում են մարդու մոտ առաջացող մետաստազների սպոնտան բնույթը: Այս տեսակետից 4Թ1 կրծքագեղձի քաղցկեղի մոդելը անփոխարինելի է: Առաջին անգամ 4Թ1 ուռուցքային բջիջները անջատել և որպես կայուն բջջային գիծ նկարագրել է Ֆրեդ Միլերը և իր խումբը (Aslakson and Miller, 1992; Dexter et al., 1978): 4Թ1 բջիջները անջատվել են H2d հապլոտիպով ուռուցքակիր BALB/cCF3CH մկներից, որոնք սպոնտան կերպով ուռուցքներ առաջացնալու նախատրամադրվածություն (հակվածություն) ունեն: Հետագայում Ռոզենբերգի և իր խմբի կողմից ցույց է տրվել, որ մկների կրծքագեղձի մեջ 4Թ1 բջիջներ ներարկելիս ի հայտ է գալիս առաջնային ուռուցքը, իսկ հետավոր օրգաններում՝ մասնավորապես թոքերում, լյարդում, լիմֆային հանգույցներում, ոսկրերում, գլխուղեղում, ծայրամասային արյան մեջ, հայտնաբերվում են մետասաստազներ (Ghochikyan et al., 2014a): Ինչպես արդեն նշվել է սպոնտան կերպով մետասաստազներ առաջացնելու ունակությամբ է, որ 4Թ1-ը մեծ առավելություն ունի որպես կրծքագեղձի քաղցկեղի կենդանական մոդել և լայնորեն կիրառվում է հետազոտողների կողմից ամենատարբեր թերապիաների փորձարկումների համար: Ներկայումս գոյություն ունեցող կրծքագեղձի քաղցկեղի բուժման մեթոդներից առաջնայինը վիրահատական միջամտությունն է, որին զուգահեռ կամ համատեղ կատարվում

է քիմիոթերապիա, ճառագայթային թերապիան: Սա է պատճառը, որ մենք կարևորել ենք 4Թ1 կրծքագեղձի քաղցկեղի հետվիրահատական մոդելի ուսումնասիրությունը երկարաժամկետ կտրվածքում: Մասնավորապես կատարել ենք իմունային տարբեր բջջային պոպուլյացիաների ակտիվության և քանակական տեղաշարժերի ուսումնասիրություն, արձանագրել մետաստազների առաջխաղացման դինամիկան ինչպես նաև հետազոտել կենդանիների կենսունակության վրա վիրահատական հեռացման ազդեցությունը: Կրծքագեղձի քաղցկեղի կենդանական մոդելի հետվիրահատական փուլում իմունային բջջային պոպուլյացիաների դինամիկ փոփոխությունների դիտարկումն ու ստացված արդյունքները կարող են կարևոր կողմնորոշիչ նշանակություն ունենալ նախակլինիկական փորձարկումների փուլից կլինիկական փորձարկումների անցնելու և կենդանիների վրա ստացված արդյունքներ մարդկանց մոտ վերստանալու տեսանկյունից: Մենք կարևորել ենք նաև բուսական ծագման պոլիսախարիդ հանդիսացող IMM-ի հակաուռուցքային ազդեցության ուսումնասիրությունը վերոնկարագրված կրծքագեղձի քաղցկեղի 4Թ1 հետվիրահատական մոդելի վրա, հաշվի առնելով վերջինիս ոչ տոկսիկ բնույթը և բակտերիալ, վիրուսային հիվանդությունների բուժման ժամանակ ցուցաբերած ուժեղ իմունոմոդուլյար ազդեցությունը: Հարկ է նշել նաև, որ այն հաջողությամբ կիրառվել է Գերմանիայում շագանակագեղձի քաղցկեղի բուժման կլինիկական փորձարկումների շրջանակում (Ataullakhanov et al., 2010): Այս աշխատության մեջ ցույց ենք տվել, որ մկների մոտ ուռուցքի չափսերի և թոքերում մետաստազների թվի մեծացմանը զուգընթաց աճում է միելոիդային սուպրեսոր բջիջների տոկոսային և բացարձակ քանակը թոքերում և փայծաղում: Ուռուցքի վիրահատական հեռացումից հետո նկատվում է միելոիդային սուպրեսորային բջիջների քանակի աստիճանական նվազում: Չնայած MDSC - ների քանակության հավաստի անկմանը, այն չի հասնում ստուգիչ՝ ոչ ուռուցքակիր մկների մոտ արձանագրված համապատասխան ցուցանիշին: Միննույն ժամանակ հետվիրահատական 4,6,13րդ օրերը այս ցուցանիշը

հավաստի ցածր է օր 0-ի արժեքից: Սկսած 17-20երորդ օրերից թոքերում մետաստազների քանակի ավելացմանը զուգընթաց MDSC -ների քանակը կտրուկ աճում է (աղյուսակ 4): Այսպիսով արձանագրում ենք, որ ուռուցքի վիրահատական հեռացումը հանգեցնում է MDSC-իների քանակի դինամիկ փոփոխության: Հետազոտողների տարբեր խմբերի կողմից ցույց է տրված միելոիդային սուպրեսորային բջիջների քանակության աճ 4Ց1 ուռուցքակիր մկների ինչպես լիմֆոիդ, այնպես էլ պարենխիմալ օրգաններում՝ լյարդում, թոքերում ողնուղեղում, ծայրամասային(Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 2001; Younos et al., 2011) արյան: Կրծքագեղձի քաղցկեղով հիվանդների ծայրամասային արյան մեջ նույնպես ցույց է տրված սուպրեսորային ակտիվությամբ չհասունացած միելոիդային բջիջների քանակական աճ: Ավելին, արյան մեջ հայտնաբերված MDSC-ների քանակը գտնվում է դրական կորելյացիայի մեջ օրգանիզմում մետաստատիկ ախտահարման մասշտաբների հետ (Diaz-Montero et al., 2009a): Գրականության մեջ կան տվյալներ որոնցում ցույց է տրված, որ ուռուցքային գործոնների բացակայության պայմաններում չհասունացած միելոիդային բջիջները վերածվում են հասուն դենդրիտիկ բջիջների և մակրոֆագերի (Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Narita et al., 2009): Մասնավորապես ցույց են տրված մեխանիզմները , որոնց շնորհիվ ուռուցքի հեռացումը կարող է հանգեցնել MDSC-իների քանակության վերաբաշխման և հակաուռուցքային իմունային բջիջների ակտիվացման հնարավորության ստեղծմանը: Մեր հետազոտությունները ցույց տվեցին որ փայծաղում ուռուցքի մեծացմանը զուգահեռ T կարգավորիչ բջիջների քանակությունը չի տարբերվում ոչ ուռուցքակիր՝ ստուգիչ մկների համապատասխան ցուցանիշից: Ի հակառակ դրա, թոքերի մոնոնուկլեար բջջային պոպուլյացիայում Treg-ների քանակությունը ի համեմատ ստուգիչ մկների հավաստի փոխվում է, ուռուցքի մեծացման հետ արձանագրվում է հավաստի աճ: Հետվիրահատական շրջանում, ինչպես և կանխատեսելի էր, մետաստազային ախտահարման մեծացմանը զուգահեռ, փայծաղում Treg-ների տոկոսային քանակի փոփոխություն չի

արձանագրվում: Հետվիրահաստական 20րդ օրը, երբ թոքերում կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների և միելոիդային սուպրեսորային բջիջների թիվը կտրուկ աճում է, Treg-ների տոկոսային քանակություն չի տարբերվում ստուգիչ մկներից: Ուռուցքի մեծացմանը զուգահեռ՝ Treg-ների տոկոսային քանակության փոփոխման դինամիկայի տարբերությունները թոքերում և փայծաղում հիմք են սալիս ենթադրել, որ միկրոմետաստատիկ 4Թ1 բջիջները ապահովում են Treg-ների սպեցիֆիկ ինֆիլտրացիա թոքերում: Մասնավորապես, ցույց է տրված որ 4Թ1 ուռուցքակիր մկների թոքերում կատարվում է T կարգավորիչ բջիջների սպեցիֆիկ ինֆիլտրացիա՝ CCR4+/MDC-իների միջոցով: Թոքերում մետաստազներ առաջացնելու ունակությունը բնորոշ է առավելապես CCR4 ընկալիչի էքսպրեսիա ունեցող ուռուցքային բջիջներին (Olkhanud et al., 2009): Կրծքագեղձի մեջ զարգացող առաջնային ուռուցքը ակտիվացնում է թոքերում TARC/CCL17 և MDC/CCL22 քեմոկինների էքսպրեսիան: Այս քեմոկինների ազդեցությամբ CCR4 դրական ինչպես իմունային այնպես էլ ուռուցքային բջիջները ուղղորդվում են դեպի թոքեր: Ինչպես ցույց է տրված այս հետազոտության մեջ CCR4-միջնորդավորված քեմոտաքսիսը բավարար չէ թոքերում մետաստազներ առաջացնելու համար, քանի որ թոքերում ուռուցքային բջիջները ոչնչացվում են NK բջիջների միջոցով: Թոքերում մետաստազների տարածման համար կարևոր նշանակություն ունեն CCR4⁺ Treg բջիջները, որոնք բետա-գալակտոզիդ-կապող սպիտակուցի միջոցով ոչնչացնում են NK բջիջներին (Biragyn et al., 2013): Treg բջիջներով պայմանավորված իմուն սուպրեսիան իրականացվում է հիմնականում անմիջական բջջային կապով կարգավորվող ազդեցության մեխանիզմներով՝ ինչպիսիք են FasL, գալեկտին-1/βGBP և պերֆորին/գրանզիմ չնայած որ հայտնի են նաև լուծելի գործոններով՝ մասնավորապես IL-10, TGFβ ազդեցության մեխանիզմներ նույնպես (Diaz-Montero et al., 2009b; Ostrand-Rosenberg, 2010; Rubtsov et al., 2008) : Մեկ ուրիշ խմբի կողմից ցույց է տրված, որ Treg-ների չեզոքացումը CD25 հակամարմինների

ներարկմամբ, ոչ մի ազդեցություն չի ունենում ուռուցքի աճի և մկների կյանքի տևողության վրա (Rosenberg et al.; 2002):

Ընդհանուր առմամբ գրականության մեջ առկա 4Թ1 կրծքագեղձի քաղցկեղի կենդանական մոդելի վրա արձանագրված Treg-ների հետ կապված տվյալները իրարամերժ են: Այս աշխատության մեջ մենք նաև ուսումնասիրել ենք ակտիվացած և ընդհանուր T-լիմֆոցիտների դինամիկ փոփոխությունը թոքերում և փայծաղում: T լիմֆոցիտների բացարձակ թիվը աճում է ուռուցքի մեծացմանը զուգահեռ, ուռուցքի հեռացումից հետո նկատվում է քանակական անկում, այնուհետև նորից աճ է արձանագրվում հետվիրահատական 30-33րդ օրերին, երբ մետաստազների քանակը թոքերում կյանքի հետ անհամատեղելիորեն բարձր է: Փայծաղում ակտիվացած CD4 և CD8 բջիջների բացարձակ թիվը օր 0-ում և հետվիրահատական մնացած օրերին հավաստիորեն չի տարբերվում ոչ ուռուցքակիր մկների համապատասխան ցուցանիշից (աղյուսակ 2): Ի հակառակ դրա, տոկոսային քանակությունը օր 0-ում հավաստիորեն նվազում է համեմատած ոչ ուռուցքակիր մկների հետ (աղյուսակ 3), իսկ հետվիրահատական օրերին նկատվում է դինամիկ աճ համեմատած օր 0-ի հետ, այս աճը կանգ է առնում ապա սկսած 17-20 օրից ակտիվացած CD4-երի քանակությունը սկսում է նվազել: Ակտիվացած T-լիմֆոցիտների տոկոսային քանակության փոփոխությունը այս դեպքում նույապես համապատասխանում է թոքերում մետաստազների թվի փոփոխությանը՝ մետաստազների թվի ավելացման զուգընթաց նկատվում է ակտիվացած էֆֆեկտոր բջիջների տոկոսային քանակի անկում:

Մենք մաթեմատիկական վերլուծության ենք ենթարկել ստացված տվյալները, որպեսզի նկարագրենք այսպես կոչված «հնարավորության պատուհան» ժամանակահատվածը, որում 4Թ1 ուռուցքով պայամանավորված իմուն համակարգի սուպրեսիան ժամանակավորապես նահանջում է, ինչը կարող է հնարավորություն տալ իմուն համակարգի էֆֆեկտոր բջջային պոպուլյացիաներին արդյունավետորեն պայքարել ուռուցքային բջիջների դեմ:

Այս ժամանակահատվածը նկարագրվում է սուպրեսորային բջիջների՝ այն է MDSC-ների տոկոսային և բացարձակ քանակի նվազմամբ և դրան զուգընթաց ակտիվացած CD4 և CD8 բջջային պոպուլյացիաների քանակի ավելացմամբ:

Հաջորդիվ, վերոնկարագրված հետվիրահատական մոդելի վրա կատարել ենք IMM իմունոխթանիչի փորձարկումը: Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ փորձառական մկների մոտ ի համեմատ ստուգիչ մկների, հետվիրահատական 20րդ օրը արձանագրվել է հավաստիորեն ցածր կլոնառաջացնող ուռուցքային բջիջների քանակ թոքերում, իսկ կենսունակության ցուցանիշը հավաստիորեն բարելավվում է (նկար 16,17): Սրան զուգահեռ նաև արձանագրվել է փայծաղում ակտիվացած իմունային էֆֆեկտոր (CD4, CD8, NK) պոպուլյացիաների տոկոսային քանակության հավաստի աճ և ի հակառակ դրա, սուպրեսորային միելոիդային պոպուլյացիայի քանակության հավաստի նվազում (նկար 18,19):

Իմունոխթանիչի ազդեցության մեխանիզմներ հասկանալու համար HEK2blue բջիջների վրա իրականացված փորձերի արդյունքում պարզ դարձավ, որ IMM իմունոխթանիչ հանդիսանում է TLR4 ազոնիստ:

Գրականությունից հայտնի է որ TLR ընկալիչներ առկա են ոչ միայն իմունային բջիջների այլ նաև ուռուցքային բջիջների վրա (Kelly et al., 2006): Իմունային բջիջների վրա այս ընկալիչների խթանումը ակտիվացնում է հակաուռուցքային իմուն պատասխանի մի շարք կարևորագույն մեխանիզմներ այդ թվում՝ խթանվում է դենդրիտիկ բջիջների հասունացումը, IL12, INF γ -ի սինթեզ: Միաժամանակ ուռուցքային բջիջների վրա այս ընկալիչների ակտիվացումը կարող է նպաստել չարորակ նորագոյացությունների կենսագործունեության ու առաջխաղացմանն ուղղված մեխանիզմների ակտիվացմանը, ինչպիսիք են օրինակ իմունոսուպրեսիան, անգիոգեներզը, անկանոն պրոլիֆերացիան, ապոպտոզի ճնշումը (Oblak and Jerala, 2011): Ցույց է տրված, որ LPS-ի առկայությամբ աճեցված 4Ց1 բջիջները մկներին ներարկելիս՝ դիտարկվում է ուռուցքի աճի դանդաղում (Nair et al., 2009): Մեկ ուրիշ

հետազոտության արդյունքում պարզվել է, որ TLR4-ի դասական ազոնիստ՝ LPS-ի ներերակային ներարկման պայմաններում մկների մոտ նկատվում է ուռուցքի խթանում և թոքերում մետաստազների քանակության աճ:

Հետազոտողների մի ուրիշ խմբի կողմից ցույց է տրված, որ 4Ց1 ուռուցքային բջիջները TLR4-/- մկներին ներարկելիս, ուռուցքի հավաստի կտրուկ աճ է արձանագրվել, ինչը վկայում է, որ TLR4 ընկալիչները կարևոր դեր ունեն կրծքագեղձի քաղցկեղի և մետաստազների զարգացումը կանխելու գործընթացում (Ahmed et al., 2012):

Այսպիսով TLR4-ի խթանումը հանդիսանում է երկսայր սուր, որը կարող է ունենալ ինչպես հակաուռուցքային այնպես էլ պրոուռուցքային ազդեցություն՝ խթանելով ուռուցքային բջիջների առաջխաղացումը:

Մեր հետազոտությունների արդյունքում պարզ դարձավ որ IMM-ը ցուցաբերում է առավելապես հակաուռուցքային ազդեցություն: Հարկ է նշել, որ IMM-ի հակաուռուցքային արդյունավետությունը արձանագրվել է հետվիրահատական մոդելի հնարավորության պատուհանի ժամանակահատվածում, երբ իմունոսուպրեսիան ուռուցքային միջավայրում հնարավոր նվազագույն դրսևորումն ունի: Հաշվի առնելով IMM իմունոխթանիչի մկնային հետվիրահատական մոդելի վրա ցուցաբերած հակաուռուցքային ազդեցության տվյալները, ինչպես նաև վերջինիս ոչ տոկսիկ բնույթը, այն կարող է որպես ադյուվանտ արդյունավետորեն կիրառվել հակաուռուցքային իմունային թերապիաներում:

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 ժամանակվորապես 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 IMM իմունոխթանիչը հանդիսանում է TLR-4 ազոնիստ և ցուցաբերում է հակաուռուցքային արդյունվետություն:

ՕԳՏԱԳՈՐԾՎԱԾ ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՑԱՆԿ