

А.В. Ефремов, М.Е. Тулеутаев, И.А. Кривошапкин,  
Е.Н. Самсонова, И.Д. Сафронов

## Изменение параметров гуморального иммунитета у животных с карциносаркомой Walker 256 после воздействия общей гипертермии (43,5°C)

Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск

**Резюме.** Исследованы показатели гуморального иммунитета у крыс с карциносаркомой Walker 256 при действии общей гипертермии (43,5°C). Установлено, что действие общей гипертермии на организм животных опухоленосителей сопровождается разнонаправленными изменениями параметров гуморального иммунитета как в сторону их понижения, так и повышения в различные сроки постгипертермического периода. Так, в период с 3-х по 7-е сутки постгипертермического периода в крови у крыс с карциносаркомой Walker 256 по сравнению с данными контрольных животных наблюдается достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение уровней циркулирующих иммунных комплексов на 27,9 и 21,8% соответственно. У животных с карциносаркомой Walker 256, подвергшихся сеансу общей гипертермии, на 7-е сутки постгипертермического периода содержание иммуноглобулина А в сыворотке крови относительно контрольных значений достоверно ( $p < 0,05$ ) снизилось на 22,5%, на 14-е сутки – на 24,5%. В изменении содержания иммуноглобулина М отмечалась разнонаправленная динамика: на 1-е сутки постгипертермического периода отмечалось его снижение на 25,7%, на 3-и сутки, наоборот, повышение на 17% ( $p < 0,05$ ). В остальные дни (7–14-е сутки) достоверных различий между экспериментальной и контрольной группами по содержанию иммуноглобулина М не отмечено. Сходная тенденция наблюдалась и для иммуноглобулина G, когда его содержание в крови крыс с карциносаркомой Walker 256, подвергшихся воздействию ОГ, в 1-е сутки уменьшалось на 20,6%, а на 3-и и 7-е сутки увеличилось по сравнению с данными контрольной группы на 24,6 и 35,4% соответственно ( $p < 0,05$ ). К окончанию эксперимента (14-е сутки) изучаемый показатель вернулся к контрольным значениям. Такие изменения могут являться следствием активации эндогенных регуляторных систем, определяющих иммунную реактивность организма.

**Ключевые слова:** карциносаркома Walker 256, гуморальный иммунитет, общая гипертермия, постгипертермический период, эндогенные регуляторные системы, иммунная реактивность организма, циркулирующие иммунные комплексы, иммуноглобулины.

**Введение.** В последние годы расширились показания к клиническому использованию общей гипертермии (ОГ) в диапазоне 42,5–44,0°C как самостоятельного метода или в сочетании с лучевой и химиотерапией в лечении злокачественных опухолей и их метастазов [5, 9, 14]. Эффективность гипертермии показывают результаты задержки опухолевого роста в различных тканях в виде уменьшения числа жизнеспособных клеток, наличия очагов некробиоза и дистрофии, нарушения микроциркуляции и других изменений. Включение гипертермии в схемы комплексного лечения новообразований повышает положительный исход в несколько раз, особенно при резистентных формах опухолевых заболеваний [7, 8].

Среди клинически значимых эффектов гипертермии отмечается ее способность вызывать иммуномодулирующие эффекты [6]. Обнаружено, что ОГ оказывает влияние на состояние гуморального иммунитета. Так, после ОГ (+41,8°C) достоверно возрастали уровни интерлейкинов (ИЛ) ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и фактор некроза опухолей  $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ) в сыворотке крови. Хотя содержание С-реактивного

белка, INF $\gamma$ , ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-11, ИЛ-12 существенно не изменилось [13]. Уменьшение миелосупрессии при проведении химиотерапии после гипертермии объясняют увеличением концентрации ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, и ФНО $\alpha$  в крови, вызывающих индукцию ИЛ-3 и GM-CSF в костном мозге [11].

Можно предположить, что ОГ остается одним из эффективных модификаторов иммунитета, но клиническому применению ОГ должно предшествовать ее экспериментальное моделирование с целью более полного и детального изучения иммуномодулирующих аспектов влияния высокой температуры на организм животных опухоленосителей.

**Цель исследования.** Изучить особенности изменения параметров гуморального звена иммунитета у крыс с карциносаркомой Walker 256 после сеанса общей гипертермии (43,5°C).

**Материалы и методы.** Исследования проведены на 90 крысах-самцах линии Wistar массой 180–200 г и возрастом 2,5 мес. Работа с животными выполнялась согласно директивам Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации. Контроль-

ную группу составили 15 интактных крыс, экспериментальную – 75 животных.

Для экспериментального опухолевого роста использовали перевиваемый штамм карциномы Walker 256, поддерживаемый *in vivo* в лаборатории физиологической генетики Научно-исследовательского института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск). Суспензию клеток Walker 256 вводили крысам в мышцу бедра ( $10^6$  клеток в 0,1 мл 0,9% раствора NaCl).

Способ моделирования искусственной ОГ у мелких лабораторных животных [4] основывался на разогревании крысы в резервуаре универсального водного термостата «BWT-U», предназначенного для точного поддержания установленной температуры в диапазоне от 25°C до 100°C. Уровень ОГ, при котором прекращали разогрев животных, определялся ректальной температурой 43,5°C (стадия теплового удара). Время разогревания животного было индивидуальным, не зависело от исходной температуры тела, массы и составляло не более 17 мин. Забор крови для исследования параметров клеточного иммунитета выполнялся на 1, 3, 7 и 14-е сутки после сеанса ОГ.

Определение параметров гуморального иммунитета (иммуноглобулины (Иг) ИгА, ИгМ и ИгG) проводилось с использованием проб-систем «Bethyl Laboratories» (Соединенные Штаты Америки). Результаты регистрировали на планшетном спектрофотометре «Multiskan Spectrum» (Финляндия) в единицах оптической плотности при 450 нм (фильтр 620–650 нм). Концентрацию Иг (мг/мл) в пробах определяли по калибровочным графикам. Уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) оценивали, используя жидкостную преципитацию 4% ПЭГ-600.

Полученные количественные данные обрабатывали с использованием методов статистики [3], уровень значимости различий средних величин оценивали на основании t-критерия Стьюдента для уровня достоверности 95% ( $p < 0,05$ ).

**Результаты и их обсуждение.** Показано, что в период с 3-х по 7-е сутки постгипертермического периода наблюдается достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение уровней ЦИК в крови у крыс с карциномой Walker 256 (соответственно на 27,9 и 21,8%) по сравнению с данными контрольных животных. В остальные сроки наблюдения исследуемый параметр гуморального

звена иммунитета не отличался от аналогичного показателя в группе контроля (табл.).

У животных с карциномой Walker 256, подвергшихся сеансу ОГ, на 7-е сутки постгипертермического периода содержание ИгА в сыворотке крови относительно контрольных значений достоверно ( $p < 0,05$ ) снизилось на 22,5%, на 14-е сутки – на 24,5%. В изменении содержания ИгМ отмечалась разнонаправленная динамика: на 1-е сутки постгипертермического периода отмечалось снижение уровня иммуноглобулина в крови на 25,7%, на 3-и сутки, наоборот, повышение на 17% ( $p < 0,05$ ). В остальные дни (7–14-е сутки) достоверных различий между экспериментальной и контрольной группами по содержанию ИгМ не отмечено. Сходная тенденция наблюдалась и для ИгG, когда его содержание в крови крыс с карциномой Walker 256, подвергшихся воздействию ОГ, в 1-е сутки уменьшалось на 20,6%, а на 3-и и 7-е сутки увеличилось по сравнению с данными контрольной группы на 24,6 и 35,4% соответственно ( $p < 0,05$ ). К окончанию эксперимента (14-е сутки) изучаемый показатель вернулся к контрольным значениям.

Таким образом, после ОГ (43,5 С) на фоне снижения в крови уровней ИгМ, ИгG на 1-е сутки, а ИгА на 7-14-е сутки, у животных-опухоленосителей отмечается увеличение содержания ЦИК и ИгМ, ИгG на 3–7-е сутки постгипертермического периода. Это можно расценивать как ответную реакцию на гипертермию со стороны регуляторных систем организма, определяющих его иммунную реактивность.

Полагаем, что в процессе опухолевого роста при угнетении или отсутствии киллерного эффекта (CD8+) Т-лимфоцитов деструкция трансформированных злокачественных клеток может осуществляться за счет цитотоксичности, опосредованной гуморальными антителами [1]. Хотя роль гуморального звена в противоопухолевой защите организма не до конца ясна. Считается, что противоопухолевые антитела (ИгG:ИгМ) в одних случаях оказывают защитное действие, в других – способствуют прогрессии злокачественных опухолей [10, 12]. Опухолеспецифические антитела связываются с антигенами опухолевых клеток, однако фонового уровня комплемента часто недостаточно для развития антителозависимого лизиса опухолевых клеток. Этому, в частности, может способствовать высокая экспрессия на опухолевых клетках молекул, препятствующих цитолитическому

Таблица

**Динамика параметров гуморального иммунитета у экспериментальных животных после воздействия общей гипертермии,  $M \pm m$**

| Показатель | Контрольная группа | Экспериментальные животные после общей гипертермии, сутки |              |             |             |
|------------|--------------------|-----------------------------------------------------------|--------------|-------------|-------------|
|            |                    | 1-е                                                       | 3-и          | 7-е         | 14-е        |
| ЦИК, у. д. | 21,8±1,79          | 22,04±1,88                                                | 27,89±2,319* | 26,56±2,07* | 20,22±1,68  |
| ИгА, мг/мл | 0,49±0,031         | 0,42±0,029                                                | 0,48±0,034   | 0,38±0,031* | 0,37±0,028* |
| ИгМ, мг/мл | 0,78±0,062         | 0,58±0,044*                                               | 0,91±0,051*  | 0,88±0,062  | 0,73±0,071  |
| ИгG, мг/мл | 5,2±0,39           | 4,13±0,32*                                                | 6,48±0,51*   | 7,04±0,53*  | 4,88±0,39   |

**Примечание:** \* – различия по сравнению с контрольной группой,  $p < 0,05$ .

действию комплемента. Считается, что опсонизация опухолевых клеток антителами в определенных случаях приводит к блокаде опухолевых антигенов и недоступности их для рецепторов (CD8+) Т-лимфоцитов. Другой механизм защиты опухоли связан со сбрасыванием опухолевыми клетками со своей поверхности комплексов антиген-антитело [2].

**Заключение.** Увеличение уровней ЦИК, ИгМ и ИгГ в крови после ОГ (43,5 С) может являться отражением иммуномодулирующего эффекта гипертермии, направленного на индукцию секреции опухолеспецифических антител к антигенам карциносаркомы Walker 256 с целью сдерживания прогрессии опухолевого процесса.

#### Литература

1. Агеенко, А. Иммуитет и терапия экспериментальных опухолей / А. Агеенко, С.П. Гордиенко. – Кишинев: Штиинца, 1982. – 310 с.
2. Барышников, А.Ю. Взаимоотношение опухоли и иммунной системы организма / А.Ю. Барышников // Практическая онкология. – 2003 – Т. 4, № 3. – С. 127–130.
3. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М., 1999. – 275 с.
4. Ефремов, А.В. Способ экспериментального моделирования общей гипертермии у мелких лабораторных животных / А.В. Ефремов [и др.] // Патент 2165105 Российская Федерация. Опубликовано 12.10.2001 г.
5. Ильин, Н.В. Лучевая терапия рака пищевода на основе применения электромагнитной гипертермии / Н.В. Ильин [и др.] // Мед. радиол. и радиац. безопасность. – 2010. – № 5. – С. 31–34.
6. Исмаил-заде, Р.С. Иммуномодулирующее действие препаратов интерлейкина-2 и интерферона-альфа в комбинации с сеансами общей гипертермии на этапах интенсивной химиотерапии у детей с далеко зашедшими злокачественными новообразованиями / Р.С. Исмаил-заде [и др.] // Мед. иммунология. – 2006. – Т. 8, № 4. – С. 561–566.
7. Карев, И.Д. Общая гипертермия (42–43,4°С) в лечении больных с саркомой мягких тканей / И.Д. Карев, А.И. Карева, А.А. Родина // Онкология. – 2003. – № 3. – С. 226–230.
8. Киншт, Д.Н. Общая управляемая гипертермия: теория, практика, моделирование процессов / Д.Н. Киншт. – Владивосток: Дальнаука, 2006. – 192 с.
9. Bull, J.M. Fever-range whole-body thermal therapy combined with cisplatin, gemcitabine, and daИЛy interferon-alpha: a description of a phase I–II protocol / J.M. Bull [et al.] // Int. J. Hyperthermia. – 2008. – Vol. 24 (8). – P. 649–662.
10. Habal, N. AncerVax, an allogeneic tumor cell vaccine, induces specific humoral and cellular immune responses in advanced colon cancer / N. Habal [et al.] // Ann. Surg. Oncol. – 2001. – Vol. 8 (5). – P. 389–401.
11. Katschinski, D.M. Whole body hyperthermia cytokine induction: a review, and unifying hypothesis for myeloid protection in the setting of cytotoxic therapy / D.M. Katschinski [et al.] // Cytokine Growth Factor Rev. – 1999. – Vol. 10 (2). – P. 93–97.
12. Ravindranath, M.H. Ratio of IgG:IgM antibodies to sialyl Lewis(x) and GM3 correlates with tumor growth after immunization with melanoma-cell vaccine with different adjuvants in mice. International journal of cancer / M.H. Ravindranath [et al.] // Journal international du cancer. – 1998. – № 75 (1). P. 117–24.
13. Robins, H.I. Whole body hyperthermia induction of soluble tumor necrosis factor receptors: implications for rheumatoid diseases / H.I. Robins // J. Rheumatol. – 1999. – Vol. 26 (12). – P. 2513–2516.
14. Wust, P. Feasibility and analysis of thermal parameters for the whole-body-hyperthermia system Iratherm-2000 / P. Wust, H. Riess // Int. J. Hyperthermia. – 2000. – Vol. 16, № 4. – P. 325–339.

A.V. Efremov, M.E. Tuleutaev, A.I. Krivoshepin, E.N. Samsonova, I.D. Safronov

#### Changing humoral immunity in animals with carcinosarcoma Walker 256 after exposure to whole body hyperthermia (43,5°С)

**Abstract.** Abstract humoral immunity in rats with Walker carcinosarcoma 256 under the influence of general hyperthermia (43,5°С) is assessed. It was found that the effect of whole body hyperthermia in animals with tumors accompanied by opposite changes of parameters of humoral immunity in both the downward and increase in different periods posthyperthermal period. Thus, in the period from the 3d to the 7th day of posthyperthermal period in the blood of rats with Walker carcinosarcoma 256 in comparison with the data of the control animals observed a significant ( $p < 0,05$ ) increase in the levels of circulating immune complexes by 27,9 and 21,8% respectively. In animals with carcinosarcoma Walker 256 exposed to the general session of hyperthermia on the 7th day posthyperthermal period immunoglobulin A content in serum from control values significantly ( $p < 0,05$ ) decreased by 22,5%, on the 14th day – by 24,5%. The change in the content of immunoglobulin M was observed multidirectional dynamics: on the 1st day period posthyperthermal noted its decline by 25,7%, on the third day, on the contrary, increased by 17% ( $p < 0,05$ ). In the remaining days (7–14 days) significant differences between the experimental and control groups on M immunoglobulin content were observed. A similar trend was observed for immunoglobulin G, when its concentration in blood of rats with Walker 256 carcinosarcoma exposed to exhaust gas at day 1 was reduced by 20,6%, while the 3rd and 7th day increased, as compared with the control group data at 24,6 and 35,4%, respectively ( $p < 0,05$ ). By the end of the experiment (day 14) studied parameters returned to control values. Such changes may be the result of activation of endogenous regulatory systems that determine the immune reactivity of the organism.

**Key words:** Walker carcinosarcoma 256, humoral immunity, total hyperthermia, posthyperthermal period, the endogenous regulatory system, the immune reactivity, circulating immune complexes, immunoglobulins.

Контактный телефон: +7-913-985-43-62; e-mail: eav48@yandex.ru