

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

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

Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск

Резюме. Анализируется динамика изменения параметров иммунитета и апоптоза у животных с карциносаркомой Walker 256 после воздействия общей гипертермии (43,5°C). Установлено, что особенности иммуномодулирующего и апоптозстимулирующего действия гипертермии (43,5°C) на животных – опухоленосителей заключаются в следующем: эффект гипертермии проявляется ростом количества лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD20⁺) на 7-е сутки и снижением к 14-м суткам эксперимента. На фоне временного повышения лимфоцитов Th 1-го типа отмечается более стойкое увеличение содержания интерферона- γ , что является отражением активности клеточных иммунных реакций организма в ответ на гипертермию. Кроме того, обнаружено повышение уровней экспрессии проапоптотических белков Bcl-2 и снижение уровня экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 в постгипертермическом периоде. Так, показатели экспрессии белка Bcl-2 в клетках карциносаркомы Walker 256 на 7-е и 14-е сутки постгипертермического периода стали достоверно ($p < 0,05$) выше соответственно в 2,05 и 2,15 раза по сравнению с исходным состоянием. Экспрессия уровня белка Bcl-2 была также выше соответствующего показателя до сеанса гипертермии (43,5°C), на 7-е и 14-е сутки в 3,52 и 1,69 раза соответственно ($p < 0,05$). Полагаем, что гипертермия как методика, не связанная с прямым термическим повреждением опухолевой ткани, способна оказывать иммуномодулирующий и апоптозстимулирующий эффекты.

Ключевые слова: карциносаркома Walker 256, иммунитет, апоптоз, общая гипертермия, иммуномодулирующее и апоптозстимулирующее действие гипертермии, постгипертермический период, проапоптотические белки, животные-опухоленосители.

Введение. Современные методы терапии злокачественных опухолевых заболеваний не всегда достигают должного результата [5]. Поэтому все большее внимание приобретают альтернативные способы воздействия на злокачественный клеточный рост. Одним из таких способов регуляции активности опухолевого процесса может являться гипертермия. Ее использование в лечении опухолевых заболеваний в последнее время вызывает повышенный интерес в силу своей эффективности и общедоступности [4].

Известно, что злокачественные опухоли обладают иммунодепрессивным эффектом на иммунологическую реактивность организма, преодолеть который методами традиционной терапии не всегда возможно. Устойчивая противоопухолевая протекция достигается за счет индукции как CD8⁺ Т-клеточного, так и гуморального ответа [9]. Показано, что интерферон- γ (IFN- γ) является важным цитокином, ответственным за развитие клеточных иммунных реакций, его уровни в крови имеют большое значение при оценке иммунного статуса при канцерогенезе. [13].

Показано, что процессы гиперплазии регулируются факторами роста и апоптозом. Механизм запуска последнего в гиперплазированной ткани может осуществляться через CD95-рецептор [17]. Считается, что апоптоз принадлежит к одному из механизмов гибели злокачественных клеток, и что его модуляция может изменять резистентность опухоли к терапии [1]. Поэтому важной задачей в этих условиях является поиск путей направленной коррекции иммунитета и стимуляции апоптоза опухолевых клеток. Показано, что гипертермия способна индуцировать апоптоз в опухолевых клетках, а также значительно усиливать противоопухолевое действие химиотерапевтических средств [15]. Имеются данные об иммуномодулирующих свойствах гипертермии [12], в связи с чем целесообразно исследовать характер перестройки иммунной системы и активности апоптоза у животных – опухоленосителей при воздействии общей гипертермии.

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

Материалы и методы. Исследования проведены на 75 крысах-самцах линии Wistar массой 180–200 г и возрастом 2,5 мес. Работа с животными выполнялась согласно директивам Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. 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). Через 5 суток после перевивки опухоли, когда ее объем достигал $2,5 \pm 0,5$ см³, животных подвергали воздействию ОГ.

Способ моделирования искусственной ОГ у мелких лабораторных животных [3] 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 иммунитета и апоптоза выполнялся перед ОГ (исходное состояние), а также на 7-е и 14-е сутки после сеанса ОГ.

Иммунологическое исследование проводилось путем определения моноклональных антител (MAT) к CD3, CD4, CD8, CD16 и CD20 антигенам (LifeSpan BioSciences и MyBioSource, Inc.) в реакции иммунной флуоресценции с учетом результатов на люминесцентном микроскопе «AXIO SCOPE A1 LED» фирмы «Carl Zeiss» (Германия). Концентрацию IFN- γ в сыворотке крови определяли с использованием тест-системы «ProCon IF-gamma» общества с ограниченной ответственностью «Протеиновый контур», используя иммуноферментный анализ.

Состояние апоптоза опухолевых клеток Walker 256 анализировали по уровню экспрессии белков семейства Bcl-2 на парафиновых срезах с помощью непрямого стрептавидин-авидинового метода [6]. Для выявления Bcl-2 и Bad использовали мышиные моноклональные антитела (BD Biosciences), для выявления Вах применяли кроличьи поликлональные антитела (BD Biosciences). Выраженность экспрессии антигенов в опухолевых клетках оценивали по интенсивности иммуногистохимического окрашивания по программе «Axio Vision 4.7.1» фирмы «Carl Zeiss» (Германия) и блока автоматических измерений. В программу вычислений вводили значение процента площади позитивно окрашиваемых опухолевых элементов.

Полученные количественные данные обрабатывали с использованием методов статистики [2], уровень

значимости различий средних величин оценивали на основании t-критерия Стьюдента для уровня достоверности 95% ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение. Установлено, что содержание CD3⁺-лимфоцитов в крови у крыс с карциномой Walker 256 на 7-е сутки постгипертермического периода достоверно ($p < 0,05$) превосходит исходный уровень на 11,1%, хотя к 14-м суткам наблюдения эти различия исчезают. Аналогичная ситуация наблюдается и при анализе уровней CD4⁺, CD8⁺ и CD20⁺-лимфоцитов, когда увеличение содержания изучаемых лимфоцитов отмечается на 7-е сутки эксперимента при последующем снижении на 14-е сутки постгипертермического периода (табл. 1).

Таблица 1

Динамика параметров иммунитета у животных с карциномой Walker 256 после воздействия общей гипертермии, $M \pm m$

Показатель	Сроки обследования животных		
	Исходное состояние	7-е сутки после ОГ	14-е сутки после ОГ
CD3 ⁺ -лимфоциты, %	52,4 $\pm$ 2,10	58,0 $\pm$ 2,33*	51,4 $\pm$ 2,54
CD4 ⁺ -лимфоциты, %	26,4 $\pm$ 2,15	31,5 $\pm$ 2,06*	26,5 $\pm$ 1,95
CD8 ⁺ -лимфоциты, %	16,1 $\pm$ 1,25	18,8 $\pm$ 1,11*	17,6 $\pm$ 1,23
CD16 ⁺ -лимфоциты, %	10,5 $\pm$ 0,90	10,1 $\pm$ 0,87	8,2 $\pm$ 0,77
CD20 ⁺ -лимфоциты, %	12,1 $\pm$ 0,90	14,8 $\pm$ 1,57*	11,5 $\pm$ 0,88
IFN- γ , пкг/мл	7,01 $\pm$ 0,89	14,1 $\pm$ 1,21*	12,0 $\pm$ 1,32*

Примечание: * – различия по сравнению с исходным состоянием, $p < 0,05$.

Рассчитанный дополнительно показатель иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8) не выявил значимых различий. Подобная закономерность отмечалась и для содержания CD16⁺-лимфоцитов в крови в группе животных с карциномой Walker 256, подвергшихся воздействию ОГ.

Установлено, что концентрация IFN- в сыворотке крови животных с карциномой Walker 256 после ОГ на 7-е и 14-е сутки постгипертермического периода превышает исходные результаты соответственно в 2,04 и 1,71 раза ($p < 0,05$). Таким образом, особенности иммуномодулирующего влияния гипертермии (43,5°C) на животных – опухоленосителей заключаются в следующем: эффект ОГ проявляется ростом количества лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD20⁺) на 7-е сутки и снижением к 14-м суткам эксперимента. На фоне временного повышения после ОГ лимфоцитов Th 1-го типа отмечается более стойкое повышение содержания IFN- γ , что является отражением активности клеточных иммунных реакций организма в ответ на гипертермию.

Полагаем, что иммунологические сдвиги при гипертермии зависят прежде всего от температурного режима. A. Dieing et al. [11] показали, что в режиме гипертермии (41,8°C) происходит апоптоз различных субпопуляций лимфоцитов. После

гипертермии (42,3°C) снижается уровень CD8⁺ и CD5⁺-лимфоцитов, а уровень CD4⁺-лимфоцитов не изменяется [14]. В то же время включение гипертермии в терапию саркомы SCCVII у мышей линии СЗН не приводит к увеличению числа CD3⁺ и CD8⁺-лимфоцитов [18]. Кроме того, при гипертермии часто встречается абскопальный эффект, что связано, вероятно, с интенсивной стимуляцией иммунной системы при массивной экспрессии опухолевых антигенов, вызванной повышением мембранной проницаемости при термическом воздействии [19].

При воздействии ОГ возрастает уровень экспрессии проапоптотических белков Bad и Bax. Так, показатели экспрессии белка Bad в клетках карциносаркомы Walker 256 на 7-е и 14-е сутки постгипертермического периода стали достоверно ($p < 0,05$) выше соответственно в 2,05 и 2,15 раза по сравнению с исходным состоянием. Экспрессия уровня белка Bax была также выше соответствующего показателя до сеанса гипертермии (43,5°C), на 7-е и 14-е сутки в 3,52 и 1,69 раза соответственно ($p < 0,05$), таблица 2.

Таблица 2

Динамика параметров апоптоза клеток карциносаркомы Walker 256 у животных после воздействия общей гипертермии, % (M±m)

Показатель	Сроки обследования животных		
	Исходное состояние	7-е сутки после ОГ	14-е сутки после ОГ
Bcl-2	20,9±1,55	13,3±1,5*	9,1±1,41*
Bad	33,1±2	67,8±3,6*	71,0±1,7*
Bax	20,1±2	70,9±5*	34,0±1,6*

Примечание: * – различия по сравнению с исходным состоянием, $p < 0,05$.

Высвобождение этих белков происходит при повышении проницаемости мембран митохондрий под контролем белков семейства Bcl-2/Bax, которые непрерывно взаимодействуют друг с другом, находясь в динамическом равновесии между гомо- и гетеродимерами [10]. Уровень экспрессии Bcl-2 в клетках карциносаркомы Walker 256 у крыс при воздействии ОГ на 7-е и на 14-е сутки эксперимента был достоверно ниже исходных показателей в 1,57 и 2,29 раза соответственно ($p < 0,05$). Следовательно, особенностью термического воздействия на опухолевую ткань является проапоптотический эффект, который может носить и отсроченный характер. Подтверждением этого могут являться данные N. Meggyeshazi et al. [16], которые экспериментально установили, что апоптотическое повреждение клеток опухоли после однократной термической процедуры прогredientно нарастает в течение 3-х суток. При этом важное значение отводится стимуляции экспрессии белков HSP и p53, что сопровождается высокой системной иммунностью апоптотической реакции [7, 8].

Заключение. Поскольку гипертермия сегодня понимается как методика, не связанная с прямым термическим повреждением опухолевой ткани, то можно утверждать, что гипертермия способна оказывать иммуномодулирующий и апоптозстимулирующий эффекты.

Литература

1. Владимирская, Е.Б. Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста / Е.Б. Владимирская, А.А. Масчан, А.Г. Румянцев // Гематол. трансфузиол. – 1997. – № 5. – С. 4–9.
2. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М., 1999. – 275 с.
3. Ефремов, А.В. Патент 2165105 Российская Федерация. Способ экспериментального моделирования общей гипертермии у мелких лабораторных животных / А.В. Ефремов [и др.] // Опубликовано 12.10.2001.
4. Курпешев, О.К. Гипертермические методы лечения / О.К. Курпешев // Онкология: национальное руководство. – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2008. – С. 438–447.
5. Северин, Е.С. Проблемы и перспективы современной противоопухолевой терапии / Е.С. Северин, А.В. Родина // Успехи биологической химии, 2006. – Т. 46. – С. 43–64.
6. Эллиниди, В.Н. Практическая иммуногистохимия: метод. реком. / В.Н. Эллиниди, Н.В. Аникиев, Н.А. Максимов. – СПб., 2002. – 207 с.
7. Andocs, G. Oncothermia treatment induced immunogenic cancer cell death / G. Andocs [et al.] // Oncothermia J. – 2013. – № 9. – P. 28–37.
8. Andocs, G. Upregulation of heat shock proteins and the promotion of damage-associated molecular pattern signals in a colorectal cancer model by modulated electrohyperthermia / G. Andocs [et al.] // Cell Stress Chaperones. – 2015. – Vol. 20 (1). – P. 37–46.
9. Bos, R. CD4⁺ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8⁺ T lymphocytes / R. Bos, L.A. Sherman // Cancer Research. – 2010. – Vol. 70 (21). – P. 8368–8377.
10. Chinaiyn, A.M. Molecular ordering of the cell death pathway - Bcl-2 and Bcl-X(L) function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases / A.M. Chinaiyn // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271. P. 4573–4576.
11. Dieing, A. Whole body hyperthermia induces apoptosis in subpopulation of blood lymphocytes / A. Dieing [et al.] // Immunobiology. – 2003. – Vol. 207 (4). – P. 265–273.
12. Fuggetta, M.P. In vitro effect of hyperthermia on natural cell-mediated cytotoxicity / M.P. Fuggetta [et al.] // Anticancer Res. – 2000. – Vol. 20 (3A). P. 1667–1672.
13. Kalos, M. Biomarkers in T cell therapy clinical trials / M. Kalos // J. Transl. Med. – 2011. – № 9. – P. 138.
14. Kearns, R.J. The effects of extracorporeal whole body hyperthermia on the functional and phenotypic features of canine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) / R.J. Kearns [et al.] // Clin. Exp. Immunol. – 1999. – Vol. 116 (1). – P. 188–192.
15. Luchetti, F. Hyperthermia triggers apoptosis and affects cell adhesiveness in human neuroblastoma cells / R.J. Kearns [et al.] // Histol. Histopathol. – 2003. – Vol. 18 (4). – P. 1041–1052.
16. Meggyeshazi, N. DNA fragmentation and caspase-independent programmed cell death by modulated electrohyperthermia / N. Meggyeshazi [et al.] // Strahlenther Onkol. – 2014. – Vol. 190 (9). – P. 815–822.
17. Peter, M.E. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer / M.E. Peter [et al.] // Cell Death Differ. – 2015. – Vol. 22 (4). – P. 549–559.

18. Qin, W. Modulated electro-hyperthermia enhances dendritic cell therapy through an abscopal effect in mice / W. Qin [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2014. – Vol. 32 (6). – P. 2373–2379.
19. Yoon, S.M. Case of abscopal effect with metastatic non-small-cell lung cancer / S.M. Yoon, J.S. Lee // *Oncothermia J.* – 2012. – № 5. – P. 53–57.

A.V. Efremov, M.E. Tuleutayev, I.D. Safronov, E.N. Samsonova, I.A. Krivoschapkin, D.L. Kolodin, E.V. Ovsyanko

Changing immunity and apoptosis in animals with carcinosarcoma Walker 256 after exposure to whole body hyperthermia (43,5°C)

Abstract. *The dynamics of immune parameters changes and the apoptosis in animals with carcinosarcoma Walker 256 after exposure to whole body hyperthermia (43,5°C) is analyzed. It was found that the features of immunomodulatory and apoptosis modulatory effects of hyperthermia (43,5°C) in animals with tumors are as follows: the effect of hyperthermia is manifested by increasing number of lymphocytes (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and CD20⁺) on day 7 and decreasing to 14 th day of the experiment. Against the backdrop of a temporary increase of lymphocytes Th 1-type notes a persistent increase of interferon- γ , which is a reflection of the activity of the cellular immune reactions of the body in response to hyperthermia. Furthermore, it was found the increasing of expression levels of pro-apoptotic protein Bad, Bax and decreasing of level of expression of the protein Bcl-2 anti-apoptotic in posthyperthermal period. For example, protein expression indicators in Bad carcinosarcoma Walker 256 cells at the 7th and 14th day posthyperthermal period were significantly ($p < 0,05$) higher, respectively, 2,05 and 2,15 times as compared with the initial state. The expression of Bax protein level was also higher than the corresponding figure before the session of hyperthermia (43,5°C), on the 7th and 14th day in 3,52 and 1,69 times, respectively ($p < 0,05$). We assume that hyperthermia as the method that is not related to the direct thermal damage to the tumor tissue is capable to provide immunomodulatory and apoptosis modulatory effects.*

Key words: Walker carcinosarcoma 256, immunity, apoptosis, total hyperthermia, immunomodulatory and apoptosis modulatory effects of hyperthermia, posthyperthermal period, pro-apoptotic protein, tumor-bearing animals.

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