

## ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК В КРОВИ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ ОБЩЕЙ ГИПЕРТЕРМИИ

**Иван Алексеевич КРИВОШАПКИН, Анатолий Васильевич ЕФРЕМОВ, Елена Николаевна САМСОНОВА, Мария Геннадьевна ПУСТОВЕТОВА, Ольга Николаевна ЛОГАЧЕВА, Сергей Николаевич АЛЕКСЕЕНКО**

*ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России  
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52*

В настоящем исследовании определялось содержание лимфоцитов CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+ у 60 крыс-самцов линии Вистар. Отмечалось снижение количества иммунокомпетентных клеток на 1-е сутки пост-гипертермического периода с восстановлением к 3-м суткам. Далее количество лимфоцитов CD3+, CD4+, CD20+ продолжало повышаться. Содержание лимфоцитов CD8+ и CD16+ оставалось в пределах контрольных значений.

**Ключевые слова:** иммунокомпетентные клетки, лимфоциты CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+, общая гипертермия.

На современном этапе развития медицины активно разрабатываются новые диагностические и терапевтические технологии, приборы и другая медицинская техника, которые успешно внедряются в практическую деятельность клиник для лечения различных заболеваний [7, 13].

В настоящее время гипертермия, как локальная, так и общая, находится в центре внимания врачей различного профиля, особенно онкологов [5, 11]. Локальная гипертермия в форме термо-радио-, термохимио- и терморadioхимиотерапии применяется при лечении онкологических больных в самостоятельном виде или в качестве неoadъювантной и адъювантной терапии, именно ей посвящено подавляющее большинство исследований. Что касается общей (системной) и особенно сочетанной или комбинированной гипертермии, то эти методики пока используются в немногочисленных онкологических клиниках. Между тем в искусственной управляемой гипертермии в сочетании с химиотерапией и лучевой терапией скрыты немалые резервы, в частности,

при многокомпонентном лечении больных с далеко зашедшими злокачественными новообразованиями (первичные местнораспространенные, рецидивные и/или метастатические опухоли), а также с локализованными, но крайне неблагоприятными формами заболевания [3, 12].

В научной литературе идет активная дискуссия о механизмах действия локальной и общей гипертермии на организм человека и ее влиянии на патогенез различных заболеваний [4, 10]. Состояние общей гипертермии тела представляет собой один из вариантов тяжелого стресса, адаптация к которому лежит за пределами физиологических возможностей организма. Характер развития стресс-реакции во многом определяется функциональным состоянием лимфоидной ткани, макрофагов и ретикулоэндотелиальной системы [1, 2].

Клинические и экспериментальные работы, посвященные влиянию общей гипертермии на организм человека, проводились в подавляющем большинстве случаев в диапазоне температур 37–

*Кривошапкин И.А. – аспирант кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии, e-mail: decoivan@yandex.ru*

*Ефремов А.В. – д.м.н., проф., член-кор. РАМН, зав. кафедрой патологической физиологии и клинической патофизиологии, e-mail: AVE 48@yandex.ru*

*Самсонова Е.Н. – д.м.н., проф., зав. учебной частью кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии, e-mail: Elena-samsonova@mail.ru*

*Пустоветова М.Г. – д.м.н., проф. кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии*

*Логачева О.Н. – аспирант кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии*

*Алексеевко С.Н. – аспирант кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии*

42 °С. Вместе с тем известно, что гибель опухолевых клеток происходит только при температуре более 43 °С [14].

Поскольку основными областями применения общей гипертермии являются онкология и клиника инфекционных болезней, то наибольший интерес представляют вопросы влияния гипертермии на состояние иммунной системы. Одним из методов изменения количества и функциональной активности иммунокомпетентных клеток может стать общая гипертермия. Поэтому представлялось интересным изучить содержание лимфоцитов CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+ после воздействия общей гипертермии, что и явилось целью настоящего исследования.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 60 крысах-самцах линии Вистар массой 220–230 г, содержащихся в условиях вивария в соответствии с требованиями приказов «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев» от 06.04.1973 № 1045-73, а также от 10.10.1983 № 1179 МЗ СССР, от 19.06.2003 № 267 МЗ РФ, «Правилами по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных», утвержденными МЗ СССР (1977) и МЗ РСФСР (1977), принципами Европейской конвенции (Страсбург, 1986) и Хельсинкской декларации всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996). Кормление животных осуществляли согласно установленному рациону с применением комбикорма для лабораторных крыс и мышей «ПроКорм» производства акционерного общества «БиоПро» (заводской артикул Р-22; ГОСТ Р 50258-92) (Россия). Разогревание животных до 43,5 °С проводили в соответствии со «Способом экспериментального моделирования общей гипертермии у мелких лабораторных животных» [8]. Животных забивали методом декапитации под эфирным наркозом на 1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки после общей гипертермии. В группу контроля вошли 7 интактных крыс этой же породы. В качестве материала исследования использовали периферическую кровь.

Исследование клеточного звена иммунной системы проводили путем определения моноклональных антител к следующим маркерам: CD3+ (клон G4.18, 1:100, FITC, зеленый; cat. № LS-C58677; LifeSpan BioSciences, США), CD4+ (клон OX-35, 1:100, Alexa567, красный; cat. № LS-C106953; LifeSpan BioSciences), CD8+ (клон OX-8, 1:100, FITC, зеленый; cat. № LS-C45150; LifeSpan BioSciences); CD16+ (клон FCR4G8; cat. № MBS673332; MyBioSource,

США) на люминесцентном микроскопе AXIO SCOPE A1 LED (Carl Zeiss MicroImaging GmbH 07740 Jena, Германия).

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение ( $M$ ), ошибку среднего арифметического значения ( $m$ ), и представляли в виде  $M \pm m$ . Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Воздействие высокой температуры на организм млекопитающих, как и многих других стресс-факторов, вызывает значительные изменения нейроэндокринной и иммунной систем, метаболических и обменных процессов на молекулярном, клеточном и тканевом уровне. В механизме развития стрессовой реакции главную роль играет длительное и значительное повышение концентрации катехоламинов и глюкокортикоидов. Катехоламины и глюкокортикоиды усиливают метаболическое и физиологическое (в частности, мембранотропное) действие друг друга, поэтому вряд ли возможно в полной мере дифференцировать патологические изменения, обусловленные отдельным влиянием их высоких концентраций. Тем не менее если содержание катехоламинов в крови возрастает в первые же секунды стрессового воздействия, то гиперкортицизм требует для своего развития как минимум 1 ч. Гиперкортицизм, особенно длительный, обуславливает выраженную инволюцию и деструкцию тимико-лимфатической системы, угнетает костно-мозговое кроветворение, тормозит механизмы клеточного и гуморального иммунитета, киллерную активность Т-лимфоцитов. Выход из иммунодепрессии начинается только через несколько дней [9].

У животных контрольной группы содержание лимфоцитов в периферической крови составило  $(2,57 \pm 0,18) \times 10^9/\text{л}$ . При изучении влияния общей гипертермии на содержание лимфоцитов в сыворотке крови отмечено, что на 1-е сутки постгипертермического периода изучаемый показатель уменьшился на 28 % и составил  $(1,88 \pm 0,14) \times 10^9/\text{л}$ . На 3-и сутки эксперимента содержание лимфоцитов в сыворотке крови животных  $((2,35 \pm 0,33) \times 10^9/\text{л})$  не отличалось от контрольных значений. Период с 7-х по 14-е сутки наблюдения характеризовался повышением содержания лимфоцитов в сыворотке крови: на 7-и сутки – на 24 %  $((3,18 \pm 0,23) \times 10^9/\text{л})$ , на 14-е сутки – на 38 %  $((4,39 \pm 0,51) \times 10^9/\text{л})$ .

Таблица

Динамика содержания субпопуляций лимфоцитов в крови у экспериментальных животных после применения общей гипертермии, % ( $M \pm m$ )

Срок исследования	Субпопуляция лимфоцитов				
	CD3+	CD4+	CD8+	CD20+	CD16+
Контроль	59,9 ± 2,6	31,7 ± 2,72	18,41 ± 1,44	14,03 ± 1,36	9,11 ± 1,03
Гипертермия:					
1-е сутки	48,42 ± 2,01*	26,48 ± 1,41*	15,25 ± 1,32*	11,17 ± 1,05*	7,28 ± 0,83*
3-и сутки	63,54 ± 1,98	29,34 ± 2,07	19,56 ± 1,50	13,38 ± 1,22	7,41 ± 1,04*
7-е сутки	71,28 ± 2,51*	38,19 ± 2,34*	18,79 ± 1,08	17,09 ± 1,77*	8,34 ± 1,63
14-е сутки	62,41 ± 3,02	35,76 ± 2,54*	17,23 ± 1,12	16,74 ± 1,34*	8,87 ± 1,76

Примечание. \* – отличие от величины соответствующего показателя группы контроля статистически значимо при  $p < 0,05$ .

Результаты исследования содержания субпопуляций лимфоцитов в периферической крови животных после общей гипертермии представлены в таблице. При анализе содержания лимфоцитов CD3+ в крови у экспериментальных животных были выявлены следующие изменения. На 1-е сутки наблюдения величина показателя статистически значимо снижалась, на 7-е сутки повышалась, в остальные сроки не отличалась от контрольных значений. Динамика содержания лимфоцитов CD4+ была следующей: в 1-е сутки постгипертермического периода оно уменьшалось на 20 %, на 3-и сутки не отличалось от контрольных значений, на 7-е сутки было максимально увеличено и к окончанию эксперимента (14-е сутки) несколько снизилось, в то же время оставаясь выше контрольных значений. При анализе содержания лимфоцитов CD8+ в крови экспериментальных животных в постгипертермическом периоде обнаружено его уменьшение на 1-е сутки, в остальные сроки наблюдения изучаемый показатель достоверно не отличался от контрольных значений.

У животных, подвергшихся воздействию общей гипертермии, в 1-е сутки наблюдения отмечалось снижение содержания лимфоцитов CD20+ в крови, на 3-и сутки изучаемый показатель не отличался от контрольных значений, с 7-х по 14-е сутки содержание лимфоцитов CD20+ было повышено. Содержание лимфоцитов CD16+ было снижено с 1-х по 3-и сутки постгипертермического периода, в остальные сроки наблюдения не отличалось от контрольных значений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на 1-е сутки после воздействия общей гипертермии отмечается уменьшение содержания в крови относительного и абсолютного количества иммунокомпетентных клеток. Значительное снижение количества лим-

фоцитов в ранние сроки постгипертермического периода связано, по-видимому, с тем, что повышенные концентрации глюкокортикоидов при термическом стрессе вызывают апоптоз лимфоидных элементов [6], а катехоламины способствуют хоумингу лимфоцитов в ткани. К 3-м суткам после воздействия общей гипертермии относительное и абсолютное количество CD3+, CD4+, CD8+, CD16+ и CD20+ возвращалось к контрольному уровню. Это связано с рекрутированием лимфоцитов из костного мозга, где происходит интенсивное восстановление количественного и качественного состава клеток. Далее относительное и абсолютное количество лимфоцитов CD3+, CD4+, CD20+ продолжало возрастать, что может быть вызвано поступлением в кровь продуктов клеточной деструкции и внутриклеточных антигенов с последующей стимуляцией иммунной системы. Относительное содержание лимфоцитов CD8+ и CD16+ оставалось в пределах контрольных значений, но при этом абсолютное содержание данных субпопуляций лимфоцитов также повышалось.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Л.И., Горанчук В.В., Столярова Н.А. и др. Метаболические и функциональные особенности срочной реакции организма человека на перегревание // Бюл. эксперим. биол. мед. 1999. (1). 19–23.
2. Баллюзек Ф.В., Баллюзек М.Ф., Виленский В.И. и др. Управляемая гипертермия. СПб.: Невский Диалект. 2001. 123 с.
3. Бирюков А.В., Хубулава Г.Г., Ларин И.А. и др. Операционная изолированная химиогипертермическая перфузия легкого с удалением легочных метастазов // Вестн. хирургии. 2010. (4). 12–16.
4. Литвицкий П.Ф. Нарушения теплового баланса организма: гипертермия, гипертермические реакции, тепловой удар, солнечный удар // Вопр. соврем. педиатрии. 2010. (1). 96–102.

5. Мардынский Ю.С., Курпешев О.К., Медведев В.С., Максимов С.А. Комбинированное лечение больных раком полости рта с использованием «условно-динамического» режима фракционирования лучевой терапии и локорегионарной гипертермии // Сибирское мед. обозрение. 2011. (1). 80–83.

6. Новиков В.С., Горанчук В.В., Шустов Е.Б. Физиология экстремальных состояний. СПб.: Наука, 1998. 247 с.

7. Осинский С.П. Гипертермия в клинической онкологии: современное состояние проблемы (по итогам 20-й ежегодной конференции Европейского общества гипертермической онкологии) // Онкология. 2002. 4. (4). 288–292.

8. Пат. 2165105 РФ. Способ экспериментального моделирования общей гипертермии у мелких лабораторных животных / А.В. Ефремов, Ю.В. Пахомова, Е.А. Пахомов и др.; опублик. 12.10.2001.

9. Симакова И.В. Особенности эндокринно-метаболического статуса у крыс в динамике общей

искусственной гипертермии: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2005.

10. Старченко В.В. Лихорадка и гипертермия // Новая аптека. 2009. (10). 24–27.

11. Шельгин Ю.А., Рыбаков Е.Г., Ревельский И.А., Алексеев М.В. Обоснованность применения интраоперационной внутритазовой химиотерапии в сочетании с гипертермией при лечении рака прямой кишки // Вопр. онкол. 2011. (2). 173–178.

12. Pech M., Wieners G., Freund T., Dudeck O. et al. MR-guided interstitial laser thermotherapy of colorectal liver metastases: efficiency, safety and patient survival // Eur. J. Med. Res. 2007. 12. (4). 161–168.

13. Peer A.J., Grimm M.J., Zynda E.R., Repasky E.A. Diverse immune mechanisms may contribute to the survival benefit seen in cancer patients receiving hyperthermia // Immunol. Res. 2010. 46. (1–3). 137–154.

14. Repasky E.A., Lee M. Complex effects of hyperthermia on the immune system and implications for cancer therapy // Abstract ICHO. 2008. 9.

## **DYNAMICS OF IMMUNOCOMPETENT CELLS IN BLOOD OF EXPERIMENTAL ANIMALS FOLLOWING THE APPLICATION OF THE GENERAL HYPERTHERMIA**

**Ivan Alekseevich KRIVOSHAPKIN, Anatoliy Vasil'evich EFREMOV, Elena Nikolaevna SAMSONOVA, Mariya Gennad'evna PUSTOVETOVA, Olga Nikolaevna LOGACHEVA, Sergey Nikolaevich ALEKSEENKO**

*Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia  
630091, Novosibirsk, Krasnyi av., 52*

The determination of CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+ lymphocytes content in 60 male rats Wistar has been carried out. The decrease in number of immunocompetent cells has been revealed in the first day of post-hypothermic period with the restoration to the third day. Hereafter the number of Cd3 +, CD4 +, Cd20 + cells continued to rise. The content of CD4 + and CD16 + cells remained within the reference values.

**Key words:** immunocompetent cells, CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+ lymphocytes, general hyperthermia.

*Krivoshapkin I.A. – postgraduate student of the chair for physiopathology and clinical physiopathology, e-mail: decoivan@yandex.ru*

*Efremov A.V. – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of the RAMS, head of chair for physiopathology and clinical physiopathology, e-mail: AVE 48@yandex.ru*

*Samsonova E.N. – doctor of medical sciences, professor, head of curriculum of the chair for physiopathology and clinical physiopathology, e-mail: Elena-samsonova@mail.ru*

*Pustovetova M.G. – doctor of medical sciences, professor of the chair for physiopathology and clinical physiopathology*

*Logacheva O.N. – postgraduate student of the chair for physiopathology and clinical physiopathology*

*Alekseenko S.N. – postgraduate student of the chair for physiopathology and clinical physiopathology*