

УДК 615.365

Т. С. Монтаг, Ю. О. Уманський

ВПЛИВ СПІЛЬНОГО ЗАСТОСУВАННЯ 7S АНТИТІЛ АНТИТИМОЦИТАРНОЇ СІРОВАТКИ І ЦИКЛОФОСФАНУ НА РІСТ ПЕРЕЩЕПНОЇ ПУХЛИНИ У ЩУРІВ

Антиретикулоцитотоксична сироватка (АЦС), запропонована О. О. Богомольцем для стимуляції системи сполучної тканини [1], містить антитіла проти цілого ряду клітин активної мезенхіми і, крім того, проти безклітинних елементів стромы і судин. Внаслідок цього АЦС не може бути специфічним стимулятором для малих лімфоцитів, які виконують основні функції в імунному захисті організму при пухлинному рості [16]. Антілімфоцитарна сироватка (АЛС), антигеном для якої є гетерогенні лімфоцити, у великих дозах спричиняє виразний імунодепресивний ефект [11, 17]. Літературні дані по застосуванню малих доз АЛС за принципом АЦС для стимуляції імунних процесів зовсім нечисленні [5, 10].

В зв'язку з тим, що імунодепресивна активність АЛС обумовлена 7S антитілами [11], ми одержали гетерогенні АЛС і АТС та порівняли в експерименті вплив малих доз *IgG* цих сироваток на приживлення і ріст перещепної пухлини Герена у щурів [7]. Наші дані вказують, що 7S антитіла АТС у дозі 0,0005—0,00005 мл стимулюють специфічну активність лімфоцитів, маючи здатність різко зменшувати процент прищеплення пухлин у щурів, середню вагу пухлин і підвищувати процент гальмування ($T\%$) пухлинного росту.

Нечисленні літературні дані свідчать [12], що залежно від імунного статусу реципієнта одна і та ж сироватка в однаковій дозі може стимулювати ріст пухлин або пригнічувати його, що важливо в плані використання АЛС з терапевтичною метою самостійно або в поєднанні з хіміотерапією. Останнє питання ще не висвітлене у літературі. Однак в зв'язку з тим, що в експериментальній та клінічній онкології хіміотерапія посідає одне з перших місць [9], і ряд хіміопрепаратів мають вибірково лімфоцитотоксичну дію, питання спільного застосування імунно- та хіміотерапії викликає значний інтерес.

Одним з найбільш популярних хіміопрепаратів в онкологічній практиці є циклофосфан (ЦФ), якому властива низька токсичність при високій протипухлинній активності [4, 13]. Введення в організм ЦФ завжди супроводжується зменшенням кількості лімфоцитів у периферичній крові [3]. Однак вплив його на імунну компетентність лімфоїдних клітин вивчений недостатньо.

Ми намагалися з'ясувати, чи стимулюють малі дози 7S антитіл АТС імунну систему організму з перещепною пухлиною на фоні ЦФ — ідеального імунодепресора.

Методика досліджень

Антигеном для АТС служили тимоцити молодих щурів лінії Вістар кросбредного розведення нашого віварію. Продуцентами сироватки були кролики шиншила вагою 2,0—2,5 кг, яких імунізували в підколінний лімфатичний вузол живими тимоцитами в кількості $250 \cdot 10^6$ — $300 \cdot 10^6$. Через місяць тварин імунізували повторно, а ще через вісім днів забирали кров. Одержані сироватки на колонці з сефадексом $G=200$ розподіляли на макро- і мікроглобуліни (7S і 19S антитіла), запаювали в ампули і зберігали при -20°C .

Білим безпородним щурам перещеплювали $1 \cdot 10^6$ клітин пухлини Герена і проводили курс лікування ЦФ у дозі 10,0, 5,0 і 2,5 мг/кг. Курс складався з 10—12 ін'єкцій.

У I серії дослідів лікування ЦФ починали, коли пухлини тільки з'являлись і були розміром із зернину, у II і III серіях — коли пухлини в діаметрі досягали в середньому 10 мм. На початку курсу два рази вводили мікроглобулін АТС. В усіх серіях тварин забивали в той день, коли у контрольній групі гинула перша тварина. Пухлини виділяли і зважували. Обчислювали процент прищеплення і середню вагу пухлин, процент гальмування їх росту. У III серії проводився підрахунок лейкоцитів у периферичній крові щурів. Одержані дані підлягали варіаційно-статистичній обробці, після чого вони були представлені у вигляді середньо-геометричних значень.

Результати досліджень

З таблиці видно, що у I серії дослідів у всіх дослідних групах було 100% прищеплення пухлини. Повне розсмоктування пухлин спостерігалось у тварин, яким проводився курс лікування ЦФ в середній терапевтичній дозі 10,0 мг/кг. У групі тварин, які одержували тільки IgG АТС, одна пухлина повністю розсмокталась, а середня вага розвинутих пухлин була в сім раз менша, ніж у контролі. $T\%$ у цій групі становить 84,0. В інших дослідних групах, де мікроглобулін АТС вводили разом з ЦФ, майже повне розсмоктування пухлин спостерігалось не тільки там, де застосовувався ЦФ у дозі 10 мг/кг, але і в тих групах, де доза ЦФ була в два рази меншою. $T\%$ у цих групах майже дорівнює 100,0 (див. таблицю). У II та III серіях дослідів лікування тварин розпочинали тоді, коли пухлини у діаметрі досягали приблизно 10 мм. Виявилось, що в тих дослідних групах II серії, де ЦФ вводили в дозі 5,0—2,5 мг/кг на фоні 7S антитіл АТС, спостерігалось зниження середньої ваги пухлин у порівнянні з контролем лише в 1,5—2 рази, тоді як у III дослідній групі, тварини якої одержували тільки IgG АТС, пухлини були в чотири рази менші, а $T\%$ становив 73,4 (рис. 1).

У III серії дослідів спостерігалась аналогічна картина: найменша середня вага пухлин і найвищий $T\%$ був у тій дослідній групі тварин, де

Вплив спільного застосування 7S антитіл АТС та циклофосфану на перещепну пухлину Герена у щурів серія I, перещеплено $1 \cdot 10^6$ пухлинних клітин; ($M \pm m$)

Досліджувані показники	I Контроль	II 10 мг/кг ЦФ	III 7 АТС № 1 (0,0005 мл)	IV 10 мг/кг ЦФ + 7S АТС № 2 (0,00025 мл)	V 5 мг/кг ЦФ + 7S АТС № 2 (0,00025 мл)	VI 5 мг/кг ЦФ + 7S АТС № 4 (0,00005 мл)
Процент перещеплення	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Середня вага пухлини	$16,0 \pm 4,02$	—	$2,4 \pm 0,78$	0,3	0,2	0,2
Процент гальмування росту ($T\%$)	—	100 %	84 %	98 %	98,7 %	98,7 %

Примітка. Оскільки в IV, V та VI групах усі пухлини, крім однієї, розсмоктались, дані статистичній обробці не підлягали.

застосовувався тільки IgG АТС. ЦФ у дозі 5,0 мг/кг дуже незначною мірою уповільнював пухлинний ріст, але в поєднанні з 7S антитілами АТС ця ж доза ЦФ пригнічувала ріст пухлин ще меншою мірою (рис. 2).

Щодо кількості лейкоцитів у периферичній крові щурів (рис. 3), то в дослідній групі, де застосовувався тільки мікроглобулін АТС, як і в контролі, кількість лейкоцитів поступово наростала і на 24 добу після перещеплення приблизно у 2,5 рази перевищувала свій початковий рівень. ЦФ у дозі 5,0 мг/кг не спричиняв виразного впливу на лейко-

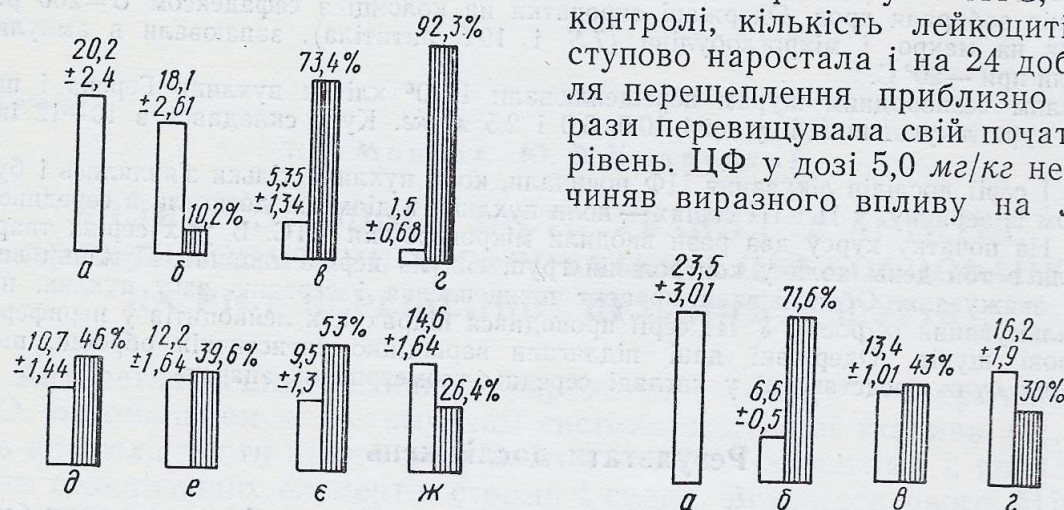


Рис. 1. Зміна показників росту перещепної пухлини Герена у щурів при спільному застосуванні циклофосфану (ЦФ) і мікроглобуліну АТС (7S АТС).

Серія II, перещеплено $1 \cdot 10^6$ пухлинних клітин. а — контроль, б — нормальна кроляча сироватка, в — 0,00005 мл 7S АТС № 4, г — 10 мг/кг ЦФ, д — 5 мг/кг ЦФ + 0,0005 7S АТС № 2, е — 2,5 мг/кг ЦФ + 0,0005 7S АТС № 2, ж — 5 мг/кг ЦФ, з — 2,5 мг/кг ЦФ. Білі стовпці — середня вага пухлин, заштриховані — процент гальмування росту пухлин. У всіх групах приживлення пухлин 100%.

Рис. 2. Основні показники росту перещепної пухлини Герена у щурів при спільному застосуванні циклофосфану (ЦФ) та мікроглобуліну АТС (7S АТС).

Серія III, перещеплено $1 \cdot 10^6$ пухлинних клітин. а — контроль, б — 0,0005 мл 7S АТС № 1, в — 5 мг/кг ЦФ, г — 5 мг/кг ЦФ + 0,0005 мл 7S АТС № 1.

цити, тоді як ця ж доза ЦФ разом з IgG АТС на протязі всього курсу лікування призводила до помірної лейкопенії, яка зникала під кінець курсу лікування.

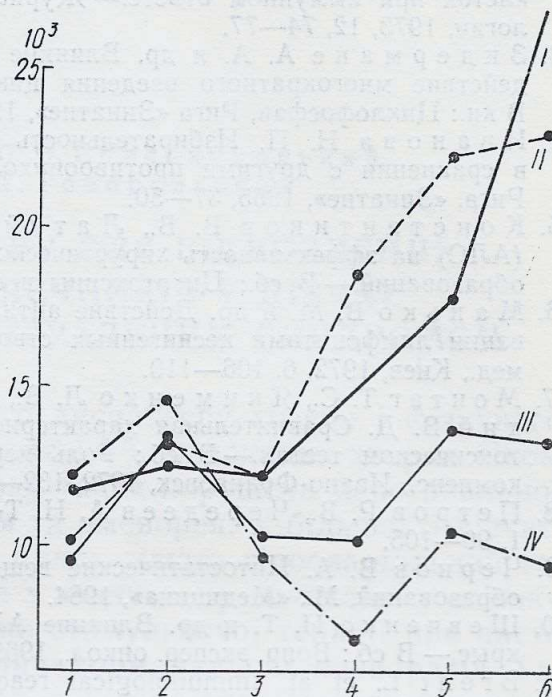
Обговорення результатів досліджень

Відомо, що інгібітори пухлинного росту по-різному впливають на малі лімфоцити [3, 6, 9]. Деякі з них, наприклад імуран і 6-меркаптопурин, є тільки мітостатиками і не спричиняють токсичної дії на лімфоцити, тоді як ЦФ, мітостатична властивість якого проявляється лише в дуже високих дозах (100 мг/кг), має різко виражену лімфотоксичну дію в середніх терапевтичних дозах [2, 3, 13]. Вважають, що ЦФ є ідеальним імунодепресором [8]. Це продемонстровано в цікавому експерименті, де ЦФ, проявляючи токсичний вплив на лімфоцити, блокував необхідні для імунної відповіді кооперативні процеси між Т- і В-клітинами як на рівні клітин-попередників, так і на рівні зрілих антитілопродуцентів. У цих дослідах було продемонстровано, що ЦФ усуває синергізм між лімфоцитами і стовбуровими клітинами кісткового мозку. ЦФ також усуває пригнічення стовбурних клітин кісткового мозку несингенними лімфоцитами [6] і пригнічує стимуляцію лімфоцитів у мікст-культурах, викликану різними стимуляторами, у тому числі і АЛТ [14]. Лімфоцити щурів, оброблені ЦФ, неспроможні стимулюватись алогенними клітинами у мікст-культурі [15]. Так само препарат впливає на лімфо-

цити периферичної крові людини [19]. Мабуть і в наших дослідах, де під впливом 7S антитіл АТС відбувається стимуляція лімфоцитів *in vivo*. ЦФ усуває цей стимулюючий ефект. Але це пояснення спроможне тільки для тих серій дослідів, в яких лікування ЦФ починалось у процесі виразного росту пухлини. При лікуванні зовсім дрібних пухлин (І серія) спільне застосування стимулятора та імунодепресора викликало різке пригнічення пухлинного росту, тому в цьому випадку говорити про те, що ЦФ усуває стимулюючий вплив мікроглобуліну АТС на Т-клітини, не можна. Можливо, при

Рис. 3. Кількість лейкоцитів у периферичній крові щурів з перещепною пухлиною Герена при спільному застосуванні циклофосфану (ЦФ) та 7S антитіл антицимочитарної сироватки.

I — контроль, II — 7S АТС, III — 5 мг/кг ЦФ, IV — 5 мг/кг ЦФ+7S АТС, 1 — початковий фон; 2 — на початку терапії; 3 — після трьох ін'єкцій ЦФ та двох ін'єкцій 7S АТС; 4 — після шести ін'єкцій ЦФ; 5 — після дев'яти; 6 — після 12 ін'єкцій.



зовсім дрібних пухлинах лімфатична система менш доступна для ЦФ, оскільки вона ще не вражена специфічним пухлинним імунодепресором.

В умовах стимуляції Т-лімфоцитів 7S антитілами АТС з одного боку, та імунодепресивного впливу зростаючої пухлини з іншого боку, ЦФ проявляє лімфоцитотоксичну дію не тільки на В-клітини, а й на клітини-кіллери. Підтвердженням цьому можуть служити досліді, проведені на моделі гомотрансплантації шматочка шкіри у курчат, де під впливом ЦФ не тільки, але й уповільнювалось утворення антитіл знижувалась активність реакцій клітинного імунітету [18].

Особливу увагу ми приділяємо тому факту, що в дослідних групах тварин, які одержували лише IgG АТС, спостерігалось різке зменшення середньої ваги пухлин у процесі вираженого росту, чого не було при спільному застосуванні 7S антитіл АТС та ЦФ. Цей факт підтверджує думку, що на фоні імунодепресії, викликаній зростаючою пухлиною стимулятор лімфоцитів IgG АТС потенціює лімфотоксичну властивість ЦФ, внаслідок чого настає знищення стимулюючого ефекту мікроглобуліну АТС. Очевидно, результатом потенціювання можна пояснити також лейкопенію при спільному використанні 7S антитіл АТС і ЦФ у дозі 5,0 мг/кг, оскільки в контролі така ж доза ЦФ лейкопенії не викликала.

Пригнічення клітинних реакцій імунітету під впливом ЦФ демонструється зниженням активності реакції трансплантат проти хазяїна у щурів та мишей при переносі лімфоїдних клітин, які були оброблені ЦФ [19].

Отже, в умовах нашого досліді спільне застосування стимулятора лімфоцитів 7S антитіл АТС та імунодепресора з вибірковою лімфотоксичною дією — ЦФ не викликало істотного пригнічення пухлинного росту. На нашу думку, це пов'язано з тим, що на фоні імунодепресивного впливу пухлини ЦФ здатний повніше реалізувати лімфотоксичну дію щодо стимульованої мікроглобуліном АТС лімфоїдної системи.

Л і т е р а т у р а

1. Богомолец А. А. О цитотоксической стимуляции функций физиологической системы соединительной ткани.—Мед. журн. АН УРСР, 1938, 8, 2, 301—309.
2. Горохов А. А., Чередеев А. Н. Влияние циклофосфана на взаимодействие клеток при иммунном ответе.—Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 1973, 12, 74—77.
3. Зидермане А. А. и др. Влияние циклофосфана на гемопоэз. Сообщ. II. Воздействие многократного введения циклофосфана на лейкопоэз крыс и мышей.—В кн.: Циклофосфан, Рига «Зинатне», 1965, 59—66.
4. Иванова Н. П. Избирательность противоопухолевого действия циклофосфана в сравнении с другими противоопухолевыми препаратами.—В кн.: Циклофосфан, Рига, «Зинатне», 1965, 37—50.
5. Константинов В. В., Латий Н. П. Влияние антилимфоидной сыворотки (АЛС) на эффективность хирургического и лучевого лечения злокачественных новообразований.—В сб.: Цитотоксины в совр. мед., Киев, 1972, 6, 129—134.
6. Манько В. М. и др. Действие антилимфоцитарной сыворотки на эффект инактивации лимфоцитами несингенных стволовых клеток.—В сб.: Цитотоксины в совр. мед., Киев, 1972, 6, 106—110.
7. Montag T. S., Якименко Л. В., Дедков И. П., Черный В. А., Безверхий В. Д. Сравнительная характеристика АЛС и АТС в серологическом и цитотоксическом тестах.—В сб.: Роль нервн. сист. в возникн. патол. процессов и их компенс., Ивано-Франковск, 1972, 132—133.
8. Петров Р. В., Чередеев А. Н. Т- и В-лимфоциты.—Усп. совр. биол., 1974, 77, 1, 90—105.
9. Чернов В. А. Цитостатические вещества в химиотерапии злокачественных новообразований, М., «Медицина», 1964.
10. Шевченко И. Т. и др. Влияние АЛС на развитие индуцированных опухолей у крыс.—В сб.: Вопр. exper. онкол., 1969, 4, 189—192.
11. Brent L. et al. Immunological reactivity of lymphoid cells after treatment with antilymphocytic serum.—Nature, 1967, 215, 5109, 1461—1465.
12. Bremberg S. et al. Effect of heterologous antilymphoid cell serum on tumor isografts and viral leukemogenesis.—Canc. Res., 1967, 27, 11, p. 1, 2113—2118.
13. Brock N., Hohorst H. The study on the metabolism of endoxan.—Oncol. si Radiol., 1967, 1, 49—53.
14. Devlin R. G. et al. The effects of cyclophosphamide and cyclophosphamide plus acetylcysteine on the in vivo—in vitro mixed lymphocyte reaction.—Transplant., 1974, 17, 1, 70—74.
15. Guttman R. D. Membrane properties and functional activity of lymphocytes from cyclophosphamide—pretreated rats.—J. Immunol., 1974, 112, 4, 1594—1601.
16. Hellström K. E., Hellström I. Cellular immunity against tumor antigen. Adv. Canc. Res., 1970, 12, 1, 167—223.
17. Nagaja H. Antilymphocyte serum or antithymus serum.—Arch. Intern. Med., 1970, 125, 3, 499—502.
18. Rouse B. T., Szenberg A. Functional and morphological observations on the effect of cyclophosphamide on the immune response of the chicken.—Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci., 1974, 52, p. 6, 873.
19. Whitehouse M. W. et al. Lymphocyte deactivation by alkylating metabolites of cyclophosphamide. Agents and action, 1974, 4, 2, 117—124.

Відділ імунології канцерогенезу
Інституту проблем онкології АН УРСР

Надійшла до редакції
16.III 1976 р.

T. S. MONTAG, M. A. UMANSKIY

EFFECT OF COMBINED APPLICATION OF 7S ANTIBODIES OF ANTITHYMOCYTIC SERUM AND CYCLOPHOSPHANE ON THE TRANSPLANTED TUMOUR GROWTH IN RATS

Summary

The antilymphocytic (ALC) and antithymocytic (ATC) sera in large doses have a pronounced immunodepressive effect. To stimulate the immune processes in a tumour-bearing organism these sera were used in small doses according to the principle of ACS in experimental oncology. A combined application was studied for ATS 7S antibodies and cyclophosphane, and inhibitor of the tumour growth with a selective lymphocytic action. No considerable inhibitory effect of such a combination on the tumour was determined.