

БИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

Научная статья

УДК 616.5-006.81:612.017.1:612.08

DOI: 10.17816/pmj404141-146

ИНДУКЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА, ВЫЗВАННАЯ РАСТВОРОМ G-01, У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ С ПЕРЕВИТОЙ МЕЛАНОМОЙ (B-16)

Р.М. Гарайшин¹, Ш.П. Кзыргалин¹, Р.Р. Китапова¹,*

Д.А. Костромина², Д.Р. Гарайшина¹, Т.Р. Залеев¹

¹Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа,

²Республиканский клинический онкологический диспансер, г. Уфа, Россия

INDUCTION OF IMMUNE RESPONSE CAUSED BY G-01 SOLUTION IN LABORATORY ANIMALS WITH TRANSPLANTED MELANOMA (B-16)

R.M. Garaishin¹, Sh.R. Kzyrgalin¹, R.R. Kitapova¹,*

D.A. Kostromina², D.R. Garaishina¹, T. R. Zaleev¹

¹Bashkir State Medical University, Ufa,

²Republican Clinical Oncological Dispensary, Ufa, Russian Federation

© Гарайшин Р.М., Кзыргалин Ш.П., Китапова Р.Р., Костромина Д.А., Гарайшина Д.Р., Залеев Т.Р., 2023

тел. +7 917 794 52 79

e-mail: garaishin@list.ru

[Гарайшин Р.М. (*контактное лицо) – ассистент кафедры онкологии с курсами онкологии и патологической анатомии ИПО, кандидат медицинских наук, ORCID: 0000-0001-6690-4086; Кзыргалин Ш.П. – ассистент кафедры онкологии с курсами онкологии и патологической анатомии ИПО, кандидат медицинских наук, ORCID: 0000-0001-9721-108X; Китапова Р.Р. – доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии, кандидат фармакологических наук, ORCID: 0000-0001-9911-5665; Костромина Д.А. – врач-онколог, ORCID: 0000-0002-3076-850X; Гарайшина Д.Р. – студентка IV курса педиатрического факультета, ORCID: 0000-0002-9971-071x; Залеев Т.Р. – студент IV курса лечебного факультета].

© Garaishin R.M., Kzyrgalin Sh.R., Kitapova R.R., Kostromina D.A., Garaishina D.R., Zaleev T. R., 2023

tel. +7 917 794 52 79

e-mail: garaishin@list.ru

[Garaishin R.M. (*contact person) – Assistant, Department of Oncology with Courses of Oncology and Pathological Anatomy, ORCID: 0000-0001-6690-4086; Kzyrgalin Sh.R. – Candidate of Medical Sciences, Assistant, Department of Oncology with Courses of Oncology and Pathological Anatomy, ORCID: 0000-0001-9721-108X; Kitapova R.R. – Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor, Department of Pharmacology with Course of Clinical Pharmacology, ORCID: 0000-0001-9911-5665; Kostromina D.A. – oncologist, ORCID: 0000-0002-3076-850X; Garaishina D.R. – fourth-year student, Pediatric Faculty, ORCID: 0000-0002-9971-071x; Zaleev T.R. – fourth-year student, Medical Faculty].

Цель. Изучить свойства иммунного ответа раствором G-01 на примере меланомы (B-16).

Материалы и методы. Опыты проведены на потомстве разнополых BALB/c возрастом 8 недель. Группы потомства по полу не разделялись. В работе использовали 20 % раствор G-01, вводимый по 0,5 мл подкожно 2 раза в день в течение двух суток с наличием адъюванта (гидроксида алюминия). В первом эксперименте раствор использовался как профилактическое средство. Во втором как лечебное, применяемое на 6-е сутки после перевивки меланомы (B-16).

Результаты. В первом эксперименте, спустя месяц после проведенной схемы терапии (профилактической) раствором G-01 была произведена попытка перевивки меланомы (B-16) подкожно 10 мышам основной группы. Группу контроля составили 6 мышей. Через три недели обнаружен рост образования в правой подмышечной области у 2 мышей в основной группе. Образование в течение последующих трех недель регрессировало. В группе контроля меланома перевилась 5 мышам из 6, с последующим развитием заболевания и летальным исходом в среднем на 60-е сутки заболевания. Во втором эксперименте – анализировались две группы по 10 животных в каждой: контрольная и основная. Опухоль перевилась в 100 % случаев в обеих группах. Вводимый раствор на 6-е сутки после перевивки меланомы (B-16) на рост опухоли не действует. Погибли мыши в обеих группах. Средняя продолжительность жизни в обеих группах составила 36 и 38 суток соответственно. Статистически значимых различий в группах не выявлено.

Выводы. Установленная перспектива использования раствора G-01 в медицине как профилактическое средство природного происхождения. Данный метод индукции иммунного ответа раствором G-01 может быть использован для профилактики развития солидной опухоли меланомы B-16. Вводимый подкожно 20 % раствор G-01 по 0,5 мл о 2 раза в день в течение двух суток на 6-е сутки после перевивки на меланому не действует.

Ключевые слова. Раствор G-01, перевивная опухоль, меланома (B-16).

Objective. To study the properties of the immune response with G-01 solution at the example of melanoma (B-16).

Material and methods. Experiments were conducted on the offspring of heterosexual BALB/c aged 8 weeks. Groups of offspring were not separated by sex. In the work, a 20 % solution of G-01 was used, administered subcutaneously 0.5 ml 2 times a day for 2 days with the presence of an adjuvant (aluminum hydroxide). In the first experiment, the solution was used as a prophylactic drug, in the second – as a therapeutic one, which was used on the 6th day after the transplantation of melanoma (B-16).

Results. In the first experiment, one month after the applied treatment scheme (prophylactic) with G-01 solution, an attempt was made to transplant the melanoma (B-16) subcutaneously to 10 mice of the main group. The control group consisted of 6 mice. After 3 weeks, an increase in the neoplasm of the right axillary region was detected in 2 mice of the main group. The neoplasm regressed during the next 3 weeks. In the control group, melanoma transferred in 5 out of 6 mice, with subsequent development of the disease and fatal outcome on average on the 60th day of the disease. In the second experiment, two groups (10 animals each) were analyzed: control and main. The tumor transferred in 100 % of cases in both groups. The injected solution on the 6th day after the transplantation of melanoma (B-16) did not affect the growth of the tumor. Mice died in both groups. The average duration of life in both groups was 36 and 38 days, respectively. There were no statistically significant differences in the groups.

Conclusions. The prospect of using G-01 solution in medicine as a preventive agent of natural origin was established. This method of inducing an immune response with G-01 solution can be used to prevent the development of a solid tumor of melanoma B-16. The subcutaneously injected 20 % solution of G-01 – 0.5 ml 2 times a day for 2 days – has no effect on melanoma on the 6th day after the transplantation.

Keywords. G-01 solution, transferred tumor, melanoma (B-16).

ВВЕДЕНИЕ

Плазматическая мембрана участвует в межклеточных контактах, воспринимает, усиливает и передает внутрь клетки сигналы внешней среды. С плазматической мембраной связаны многие ферменты, катализирующие биохимические реакции [1]. Среди множества ферментов практически каждого метаболического пути различают ключевые, или регуляторные, ферменты, активность которых может изменяться в зависимости от потребности клетки в конечном продукте метаболического пути. Регуляторные ферменты расположены, как правило, в начале или в месте разветвления метаболического пути. Углеводные компоненты, находящиеся на поверхности клеток, служат своеобразной маркировкой при выработке иммунного ответа [2]. Нарушения, связанные с метаболизмом углеводов, могут быть показательными для иммунной системы организма.

Основой вышеперечисленных мероприятий является феномен иммунологической памяти. Несмотря на то, что как клинический феномен он известен с древних времен, клеточные и молекулярно-генетические механизмы иммунологической памяти до настоящего времени до конца не изучены. Целый ряд параметров: химическая природа антигена, доза антигена, входные ворота, влияние антигена на другие системы организма оставляют место для научного подхода [3].

Поскольку иммунотерапевтические подходы к профилактике онкологических заболеваний разнообразны и специфичны, нашей задачей явилась разработка метода универсального иммунного ответа, обладающего влиянием на клетки опухоли через запрограммированную клеточную гибель – апоптоз.

Цель исследования – изучить свойства иммунного ответа раствором G-01 на примере меланомы (B-16).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Опыты проведены на разнополых мышах BALB, полученных из питомника п. Чишмы Штамм опухоли меланомы B-16, приобретен в лаборатории комбинированной терапии опухолей, Банке опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Опыты проведены на потомстве разнополых BALB/с возрастом 8 недель. Группы потомства по полу не разделялись. Спонтанных регрессий в группах контроля не наблюдалось. Животных содержали в стандартных условиях на естественном питании в соответствии с действующими нормами содержания экспериментальных животных. Все манипуляции на животных проводили согласно международным этическим и научным стандартам планирования и выполнения исследований на животных [4]. Стерилизация соединения проводилась под давлением через мембранные фильтры диаметром до 20 Нм. В качестве средства воздействия на родительские особи использовался моносахарид гексоза. Рабочий шифр: G-01.

В работе использовали 20 % раствор G-01, вводимый по 0,5 мл подкожно 2 раза в день в течение двух суток с наличием адьюванта (гидроксида алюминия). В первом эксперименте раствор использовался как профилактическое средство, во втором – как лечебное, применяемое на 6-е сутки после перевивки меланомы (B-16).

Статистическая обработка: полученные в ходе исследования медико-биологические данные обрабатывались с применением программы Statistica 7 (Stat Soft) версии 6.0. Сопоставление частотных характеристик качественных показателей проводилось с помощью непараметрических метода – точного критерия Фишера (для малых групп). При множественных сравнениях – с соответствующими поправками. Доверительные

интервалы для частотных показателей рассчитывались с использованием точного критерия Фишера. Для изучения взаимосвязи иммунотерапии и частоты летальных исходов в группах сравнения был рассчитан коэффициент корреляции для номинальных переменных, основанный на статистике «Хи-квадрат», применимый к таблицам сопряженности (2×2), и коэффициент сопряженности признаков Пирсона (C), характеризующий связь номинальных переменных для многопольных таблиц сопряжения [1; 3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения эксперимента превентивный курс терапии проведен мышам Balb/c разного пола и разной весовой категории. Спустя месяц после проведенной оптимальной схемы терапии была произведена попытка перевивки меланомы подкожно 10 мышам основной группы. Группу контроля составили 6 мышей. Через три недели обнаружен рост образования в правой подмышечной области у 2 мышей в основной группе. Образование в течение последующих трех недель регрессировало. В группе контроля меланома перевилась 5 мышам из 6, с последующим развитием заболевания и летальным исходом в среднем на 60-е сутки заболевания.

Следующие попытки перевивки меланомы B-16 проводились раз в месяц (рис. 1), периодически проявлялся рост образований с последующей регрессией в основной группе и 100 % случаев перевивки с последующим летальным исходом в группе контроля.

Через 7 месяцев в основной группе выявлен рост B-16 у одной беременной мыши из 10, после родов мышь умерла. Через 8 месяцев в основной группе выявлен рост B-16 у 4 из 10 мышей. Из них 2 беременные самки и 2 самца. У самцов образование регрессировало. Самки погибли через месяц.

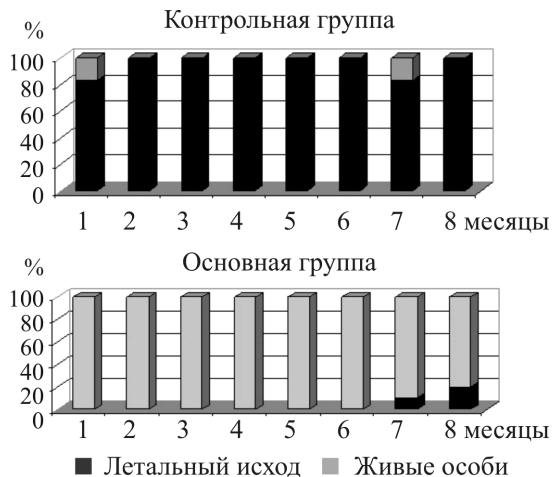


Рис. 1. Частота летальных исходов в основной и контрольной группах

Частота летальных исходов в основной и контрольной группах экспериментальных животных за период наблюдения, %

Исследуемая группа	Летальный исход есть	Летального исхода нет	Всего
Основная группа, абс. (%)	3 (3,75)	77 (96,25)	80 (100)
Группа контроля, абс. (%)	46 (95,8)	2 (4,2)	48 (100)

Учитывая, что летальные случаи встречались в основной группе только через 7 месяцев после начала иммунокорригирующей терапии, частота неблагоприятных исходов в сравниваемых группах была проанализирована в целом за 8 месяцев наблюдения (таблица).

Частота летальных исходов в группах животных за период наблюдения была достоверно выше в группе контроля по сравнению с таковой в группе ($\chi^2 = 103,8$; $p < 0,0005$).

Отношение шансов (OR) неблагоприятного исхода в основной группе к шансам группы контроля составило 0,0021 (0,21 %), 95 % ДИ [0,0006; 0,0131], это свидетельствует,

что неблагоприятный исход выше в группе контроля.

Анализ коэффициента корреляции ϕ для номинальных переменных, основанного на статистике «Хи-квадрат» и соответственно применимый к таблицам сопряженности (2×2), показал, что

$$\phi = \sqrt{\frac{\chi^2}{n}} = \sqrt{\frac{103,8}{128}} = 0,9 \quad (p < 0,001),$$

где n – общая сумма частот по ячейкам (число животных, взятых в анализ за период наблюдения). Связь считается установленной, если значение коэффициента находится в пределах от 0,5 до 1,0.

Рассчитанный показатель характеризует сильную взаимосвязь между проведением иммунокоррекции и частотой неблагоприятных исходов.

Для наглядности нами было произведено исследование подкожно-жировой клетчатки (рис. 2) правой подмышечной области 5 мышей Balb/c основной группы через 6 месяцев после перевивки и спустя 7 месяцев после индукции иммунного ответа раствором G-01.



Рис. 2. Остаточная пигментация в области подкожной инъекции меланомы (В-16) через 6 месяцев после перевивки в основной группе

По данным литературы продолжительность иммунитета у мыши длительностью в 6 месяцев приблизительно равняется 5–6 го-

дам жизни человека [5]. Мы можем предположить, что проводимая нами индукция иммунного ответа у человека может продолжаться до 5–6 лет, что соответствует иммунитету после вакцинации от таких инфекций, как столбняк, гепатит и т.д.

Курс терапии раствором G-01 мышью с перевитой меланомой. Терапия мышам Balb/c начата на 6-е сутки после подкожной перевивки меланомы. Анализировались две группы – контрольная и основная. Опухоль перевилась в 100 % случаев.

Погибли мыши в обеих группах. Средняя продолжительность жизни в обеих группах составила 36 и 38 суток соответственно. Статистически значимых различий в группах не выявлено. За все время эксперимента после введения раствора G-01 нами не наблюдались какие-либо осложнения, возникающие при применении вакцин, разработка которых основана на свойствах адаптивного иммунитета.

Выводы

1. Неспецифическая стимуляция иммунной противоопухолевой реакции является обязательным условием противоопухолевого иммунитета, индуцируемого раствором G-01.

2. Иммунная память на примере перевитой меланомы действует в течение минимум 6 месяцев. В последующие месяцы наблюдается постепенное снижение толерантности к перевиваемой опухоли.

3. Вводимый подкожно 20 % раствор G-01 по 0,5 мл о 2 раза в день в течение двух суток на 6-е сутки после перевивки на меланому не действует.

Таким образом, данный метод индукции иммунного ответа раствором G-01 может быть использован для профилактики развития солидной опухоли меланомы В-16 у животных.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Мейл Д. Иммунология: пер. с англ. М.: Логосфера 2007; 568.
2. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. М.: Медицина 2000; 432.
3. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISICA. М.: МедиаСфера 2002; 312.
4. Трещалина Е.М. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения. М.: Практическая медицина 2005; 270.
5. Гареев Е.М. Основы математико-статистической обработки медико-биологической информации. Уфа 2009; 346.

REFERENCES

1. Mail D. Immunology. Translated from English. Moscow: Logosphere, 2007; 568 (in Russian).

2. Khabitov R.M., Ignatieva G.A., Sidorovich I.G. Immunology. Moscow: Medicine 2000; 432 (in Russian).
3. Rebrova O.Y. Statistical analysis of medical data. Application of the STATISICA application software package. Moscow: Mediasphere 2002; 312 (in Russian).
4. Treshchalina E.M. Antitumor activity of substances of natural origin. Moscow: Practical medicine 2005; 270 (in Russian).
5. Gareev E.M. Fundamentals of mathematical and statistical processing of biomedical information. Ufa 2009; 346 (in Russian).

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов равноценен.

Поступила: 24.03.2023

Одобрена: 15.04.2023

Принята к публикации: 10.05.2023

Просьба ссылаться на эту статью в русскоязычных источниках следующим образом: Индукция иммунного ответа, вызванная раствором G-01 у лабораторных животных с перевитой меланомой (B-16) / Р.М. Гарайшин, Ш.Р. Кзыргалин, Р.Р. Китапова, Д.А. Костромина, Д.Р. Гарайшина, Т.Р. Залеев // Пермский медицинский журнал. – 2023. – Т. 40, № 4. – С. 141–146. DOI: 10.17816/pmj404141-146

Please cite this article in English as: Garaishin R.M., Kzyrgalin Sh.R., Kitapova R.R., Kostromina D.A., Garaishina D.R., Zaleev T.R. Induction of immune response caused by G-01 solution in laboratory animals with transplanted melanoma (B-16). *Perm Medical Journal*, 2023, vol. 40, no. 4, pp. 141-146. DOI: 10.17816/pmj404141-146