

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УЛЬТРАЗВУКА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ОСТРОНАПРАВЛЕННОГО ИММУНИТЕТА

© 2018 г. В.А. Буц, К.П. Скибенко

*Национальный научный центр «Харьковский физико-технический институт»,
61108, Харьков, ул. Академическая, 1, Украина*

*Радиоастрономический институт АН Украины, 61002, Харьков, ул. Краснознаменная, 4, Украина
Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, 61022, Харьков, пл. Свободы, 4, Украина*

E-mail: vbuts@kipt.kharkov.ua

Поступила в редакцию 17.10.17 г.

После доработки 06.02.18 г.

Предлагается простой способ создания остронаправленного иммунитета. Показано, что под действием ультразвука малой и средней интенсивности имеется возможность сорвать антигены с поверхности клеток (поверхностные антигены). Найдено, что иммуногенность этих поверхностных антигенов не меньше, чем иммуногенность интактных клеток. Эти результаты дают возможность для создания специфического, остронаправленного иммунитета против тканей и клеток, с поверхности которых были получены поверхностные антигены, в частности, остронаправленного иммунитета против злокачественных опухолей.

Ключевые слова: ультразвук, эритроциты, поверхностные антигены, агглютинация, иммуногенность.

В настоящее время наблюдается оживление интереса к исследованиям в направлении создания антиопухолевых вакцин (см., например, работы [1,2]). Особые надежды в этих исследованиях возлагаются на новые ДНК- и РНК-технологии. В наиболее активных направлениях исследований тем или иным способом конструируются опухолевые антигены. В других случаях разыскиваются микроорганизмы, антигенные свойства которых близки по своим характеристикам опухолевым антигенам. Другим интересным направлением в борьбе с опухолями является использование ультразвука. В настоящее время основное внимание обращается на использование сфокусированного ультразвука большой интенсивности (см., например, [3,4]). Воздействие такого ультразвука на опухоль приводит к ее разрушению за счет либо теплового эффекта, либо в результате механического разрушения клеток опухоли. В экспериментах с таким ультразвуком во многих случаях происходило разрушение не только самой опухоли, но и подавление роста метастазов. Последний результат объясняется тем, что разрушенные клетки опухоли выделяют в кровоток опухолевые антигены, которые приводят к активизации иммунной системы. В работе [1] автор обращал внимание на тот факт, что со-

временные исследования, связанные с созданием антиопухолевых вакцин, во многом возрождают известные старые направления. Это же замечание относится и к использованию ультразвука при борьбе с опухолями.

Действительно, аналогичные исследования проводились в бывшем Советском Союзе в конце пятидесятых годов прошлого столетия (см. работы [5–7]). В частности, были проведены эксперименты, в рамках которых ультразвуковое излучение большой интенсивности (до 235 Вт/см^2) с частотой 1,5 МГц направляли на опухоль в пробирке. Клетки были полностью разрушены. Из полученного материала выделяли разнообразные фрагменты, которыми производили иммунизацию животных. В некоторых случаях наблюдали положительный результат в отношении создания противоопухолевого иммунитета. Однако полученные результаты были неустойчивыми. Ясно, что идеальным было бы получить не просто фрагменты разрушенных опухолевых клеток, а только те антигены, которые находятся на поверхности опухолевых клеток и только по которым иммунная система организма может распознать опухоль. Остальные антигены – это вредный балласт. В настоящее время аналогичные исследования проводятся в МГУ имени М.В. Ломоносова на базовой кафедре НИЦ «Курчатовский институт» – кафедре общей физики и молекулярной

Таблица 1. Титры реакции агглютинации между озвученными (\mathcal{E}_0) и неозвученными (\mathcal{E}) бараньими эритроцитами и антителами, находящимися в сыворотке крови каждой группы мышей

Эритроциты	Сыворотка крови и группа							
	ЭЖ (контроль)	ЭЖ ₀	Э ₀ Ж ₀	Э ₀ Ж	Э _{0т} Ж	Ж ₀	Ж	Ж _{0т}
	1	2	3	4	5	6	7	8
Э	++++	++++	++++	–	+++	++++	–	+
Э ₀	–	–	– (+)	+++	+	–	–	–

электроники физического факультета. Во всех перечисленных выше случаях выделить нужную фракцию антигенов (поверхностных антигенов) практически невозможно. Однако известно, что механизмы действия ультразвука на физические и биологические объекты не ограничиваются их простым тепловым действием, их механическим давлением на границы раздела сред и кавитацией. В действительности имеется большое разнообразие других физических, химических и биологических механизмов (см., например, работы [8,9]). В частности, представляется возможным не просто разрушить клетки опухоли с помощью ультразвука, но и, не разрушая клетки, снять с их поверхности только поверхностные антигены. По этой причине нами была проведена серия экспериментальных исследований по использованию ультразвука малой и средней интенсивности с целью выделения поверхностных антигенов. Эти антигены можно использовать для иммунизации. Они легко доступны клеткам иммунной системы, а их иммуногенность, как будет показано ниже, не уступает иммуногенности клеток. Результаты части проведенных экспериментальных исследований содержатся в данной работе. В первом разделе описаны результаты получения поверхностных антигенов с поверхности бараньих эритроцитов (см. также работу [10]). Показано, что иммуногенность этих поверхностных антигенов не уступает иммуногенности нативных бараньих эритроцитов. Во второй части приведены результаты подавления роста клеток аденокарциномы Эрлиха. В заключение сформулированы наиболее важные результаты и некоторый их анализ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для эксперимента готовили суспензию трижды отмытых физиологическим раствором бараньих эритроцитов с концентрацией 10^7 клеток/мл. Эту суспензию делили на две неравные части. Первая часть оставалась без изменений, на вторую воздействовали ультразвуком. Основные эксперименты проводили при интенсивности ультразвукового излучения $0,5\text{--}1\text{ Вт/см}^2$

в течение 5 мин. Частота ультразвука составляла 2 МГц.

Озвученную и неозвученную части клеточной суспензии центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об/мин. Таким образом, получали четыре компонента: Э – неозвученные эритроциты; Э₀ – озвученные эритроциты; Ж – надосадочная жидкость, полученная после центрифугирования неозвученных эритроцитов; Ж₀ – надосадочная жидкость, полученная после центрифугирования озвученных эритроцитов. Кроме того, часть озвученной суспензии центрифугировали по истечении одного часа после озвучивания. При этом было получено еще два компонента, которые обозначим как Э_{0т} и Ж_{0т}. Из этих шести компонент были приготовлены восемь различных смесей: ЭЖ, ЭЖ₀, Э₀Ж₀, Э₀Ж, Э_{0т}Ж, Ж₀, Ж, Ж_{0т}. Число эритроцитов в первых пяти смесях было такое же, как и в контроле – 10^7 клеток/мл. Каждой из этих суспензий проводили внутрибрюшинную иммунизацию десяти белых беспородных мышей. После иммунизации сыворотку крови животных каждой группы исследовали на реакцию агглютинации с озвученными и неозвученными эритроцитами. Следует отметить, что используемые в данной серии экспериментов интенсивности ультразвука не приводили к разрушению эритроцитов. Результаты исследований представлены в табл. 1, в которой указаны титры реакции агглютинации между озвученными (\mathcal{E}_0) и неозвученными (\mathcal{E}) бараньими эритроцитами и антителами, находящимися в сыворотке крови каждой группы мышей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По данным, приведенным в табл. 1, легко видеть, что вся совокупность полученных результатов полностью объясняется, если предположить следующее:

1) под действием ультразвука малой интенсивности с поверхности клеток происходит срыв антигенов, которые переходят в жидкость, окружающую клетки;

Таблица 2. Торможение роста опухоли после воздействия на клетки аденокарциномы Эрлиха ультразвуковыми полями

Клеточная взвесь	Доза облучения, Вт/см ²	Число жизнеспособных клеток, %	Число ядерных клеток в 1 мл	Средний вес солидных опухолей, мг	Среднее увеличение асцитных клеток на десятые сутки (разы)	Дисперсия
Контроль	0,1–1,0	92	10 ¹¹	220	35	65
Опыт		90	10 ¹¹	82	22	10

2) с течением времени часть этих антигенов возвращается на поверхность эритроцитов;

3) структура антигенов и их иммуногенность под действием ультразвука малой и средней интенсивности не меняется.

Наиболее важный вывод, который следует из полученных результатов, заключается в том, что под действием ультразвука малой и средней интенсивности с поверхности клеток происходит срыв антигенов, которые с помощью центрифугирования легко отделяются от клеток. При этом их иммуногенность не меньше, чем иммуногенность незвученных клеток. Похоже, что сформулированный вывод не зависит от типа клеток.

Реакция агглютинации озвученных и незвученных эритроцитов с антителами, находящимися в сыворотке крови четвертой группы мышей, показывает, что уже в течение 5 мин под действием ультразвука интенсивностью 0,5...1 Вт/см² произошло освобождение определенного слоя поверхностных антигенов и открылся новый антигенный слой. Этот слой более устойчив к воздействию ультразвука. Для выяснения его устойчивости было проведено исследование иммуногенности эритроцитов, подвергнутых озвучиванию в течение 20 мин при интенсивности ультразвука 3 Вт/см². Было показано, что иммуногенность этих эритроцитов мало отличается от иммуногенности эритроцитов, озвученных при малой интенсивности ультразвука ($I = 0,5 \text{ Вт/см}^2$, $t = 5 \text{ мин}$).

Обращает на себя внимание практическое отсутствие реакции агглютинации между озвученными эритроцитами и антителами в крови третьей группы животных. Исходя из компонентов, которыми проводили иммунизацию ($\text{Э}_0\text{Ж}_0$), можно было ожидать наличие антител как на незвученные, так и на озвученные эритроциты. Отсутствие реакции на озвученные эритроциты можно объяснить тем, что за время рассасывания вводимой суспензии большинство антигенов заняли освободившиеся места на поверхности эритроцитов и «прикрыли» освободившийся антигенный слой. Подтверждением этого вывода являются результаты реакции агглютинации между бараньими эритроцитами и антителами сыворотки крови мышей, иммуни-

зированных озвученными эритроцитами $\text{Э}_{от}\text{Ж}$ (пятая группа) и иммунизированных надосадоочной жидкостью $\text{Ж}_{от}$ (восьмая группа). Уменьшение титра реакции в этих группах также легко объясняется тем, что поверхностные антигены, сорванные ультразвуком с поверхности эритроцитов, имеют тенденцию возвращаться на свои места.

Использование ультразвука для создания иммуниста против опухолевых клеток аденокарциномы Эрлиха. Естественно предположить, что бараньи эритроциты не являются единственными клетками, с поверхности которых могут быть с помощью ультразвука сорваны антигены. Такое воздействие ультразвука, вероятно, характерно для любых клеток. Можно ожидать, что иммуногенность сорванных антигенов будет также высока, как и у поверхностных антигенов бараньих эритроцитов. Поставленные эксперименты с опухолевыми клетками аденокарциномы Эрлиха подтверждают эти предположения.

В проводимых экспериментах клетки аденокарциномы Эрлиха облучали ультразвуком интенсивностью 0,1–1 Вт/см² с частотой 2 МГц в течение 2–5 мин и вводили беспородным белым мышам по 0,3 мл подкожно для получения солидной формы опухоли и по 1 мл внутривентриально для асцитной формы. Животных распределяли на группы. Контрольной группе вводили клеточную взвесь аденокарциномы Эрлиха, не подвергавшуюся озвучиванию. Концентрация клеток в клеточной взвеси во всех группах составляла 10⁷ клеток/мл.

Перед инокуляцией высчитывали процент жизнеспособных клеток методом суправитальных красителей. Прививаемость клеток определяли по числу ядерных клеток в 1 мл асцитной жидкости, извлекаемой из брюшной полости подопытных животных на десятые сутки с момента инокуляции. Интенсивность роста солидных опухолей определяли по их весу также на десятые сутки. Результаты этих экспериментов показали, что происходит существенное торможение роста опухоли после воздействия на клетки аденокарциномы Эрлиха ультразвуковыми

Таблица 3. Результаты статистической обработки экспериментов с солидной формой опухоли

Группа	Жизнеспособность клеток, %	Число ядерных клеток в миллилитре	Среднее увеличение числа асцитных клеток на 10-е сутки, разы	Средний вес солидных опухолей на 15-е сутки (мг)	Коэффициент вариации V	Относительная ошибка ϵ , %	Дисперсия
I (КЖ)	95	$4 \cdot 10^7$	36	682	39,1	30	270
II ($K_0Ж_0$)	96	$4 \cdot 10^7$	24	305,4	4,9	4	17,9
III (КЖ $_0$)	94	$4 \cdot 10^7$	29	225,3	8	6	14,8
IV ($K_0Ж$)	97	$4 \cdot 10^7$	21	139	15	12	23,7

полями. Из табл. 2 видно, что рост солидных опухолей затормозился более чем в два с половиной раза. Эти результаты явились основанием для продолжения работы.

Схема экспериментов была усложнена. Озвученные и интактные клетки аденокарциномы Эрлиха центрифугировали для получения четырех фракций: надосадочной жидкости ($Ж_0$) и клеток (K_0) озвученного асцита, надосадочной жидкости ($Ж$) и клеток (K) интактного асцита.

После центрифугирования клетки дважды отмывали физиологическим раствором. Затем готовили взвеси клеток, в которых перекрестно заменяли надосадочные жидкости озвученного и неозвученного асцита. Таким образом, было получено четыре «сорта» клеточной взвеси:

I – интактные контрольные клетки аденокарциномы Эрлиха (КЖ);

II – озвученный асцит аденокарциномы Эрлиха ($K_0Ж_0$);

III – интактные клетки плюс надосадочная жидкость озвученного асцита (КЖ $_0$);

IV – озвученные клетки плюс надосадочная жидкость неозвученного асцита ($K_0Ж$).

Эти клеточные взвеси вводили четырем группам беспородных белых мышей методом, описанным выше. Следует отметить, что процент жизнеспособных озвученных клеток аденокарциномы Эрлиха не отличался от контрольного и составлял 95–97%. Результаты экспериментов приведены в табл. 3.

Для обработки результатов использовали следующие статистические характеристики: дисперсию σ , коэффициент вариации V и относительную ошибку эксперимента ϵ . Эти величины вычисляли по следующим формулам:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}; \quad V = \frac{\sigma}{\bar{x}} 100\%; \quad \epsilon = \frac{k\sigma}{\sqrt{N}\bar{x}} 100\%,$$

где N – число животных в опытных группах (≥ 10); $\bar{x} \equiv \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$ – средний вес опухоли, k – численный коэффициент, в нашем случае $k \approx 2$.

В табл. 3 приведены результаты обработки экспериментов с солидной формой опухоли. Из нее видно, что коэффициент вариации V для всех групп не превышает 40%. Это говорит о нормальном законе распределения исследуемых величин (весов опухолей) и о возможности статистической обработки результатов. Из табл. 3 следует, что эффект торможения роста опухоли наблюдается во всех опытных группах. При этом подавление более существенно для солидной формы опухолей, чем для асцитной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сформулируем наиболее важные результаты описанных выше экспериментальных исследований:

1. Наиболее важным результатом является доказательство того, что ультразвук малой и средней интенсивности может быть использован для получения поверхностных антигенов с разнообразных клеток. Следует, однако, определить ультразвук малой и средней интенсивности. В рамках настоящих исследований под таким ультразвуком понимается ультразвук вне режима кавитации. При этом при увеличении интенсивности ультразвука необходимо увеличивать частоту ультразвука. Именно так в настоящих исследованиях была выбрана частота 2 МГц. Следует заметить, что в настоящее время нам до конца не ясен механизм (причина)

освобождения поверхностных антигенов с поверхности клеток. Наиболее вероятными являются силы Стокса, а также радиационные силы. По нашим оценкам, такие силы в рамках проведенных экспериментов могут разрывать химические связи типа простых С–С-связей (79,3 ккал/моль). Однако используемая в эксперименте интенсивность ультразвука оказывается недостаточной для разрыва двойных С=С-связей (140,5 ккал/моль).

2. Принципиально важным оказался факт, что иммуногенность этих поверхностных антигенов не уступает иммуногенности самих клеток, т.е. число специфических антител, вырабатываемых организмом на введение поверхностных антигенов, примерно такое же, как и число той же специфичности антител, которые появляются после введения в организм клеток. Отметим, что если мы хотим выработать остро направленную реакцию, то введение в организм только поверхностных антигенов, безусловно, предпочтительнее, так как при обычной иммунизации вместе с клетками вводится большое количество других, в некоторых случаях более «сильных» антигенов, наличие которых в силу эффекта конкуренции ослабляет иммунный ответ на нужные антигены, на поверхностные антигены. По этой же причине использование ультразвука большой интенсивности ($I > 3 \text{ Вт/см}^2$), когда в поле ультразвуковой волны возникают кавитационные пузырьки, приводящие к разрушению клеток, должно быть менее эффективным. Это соображение в настоящее время особенно существенно, так как после успешных экспериментов с интенсивными ультразвуковыми полями попытки повлиять на рост злокачественных опухолей с помощью ультразвука в основном идут по пути повышения его интенсивности [3,4].

3. Выше мы видели, что эритроциты барана и человека, а также клетки аденокарциномы Эрлиха обладают как минимум двумя антигенными слоями. Первый слой легко удаляется с помощью ультразвука умеренной интенсивности. Второй же на такие поля практически не реагирует. Можно ожидать, что большинство клеточных структур обладают такой структурой. В этом случае можно рассчитывать на достаточно простой способ получения поверхностных антигенов от таких клеток, в частности, на получение поверхностных антигенов от микробных клеток. В этом случае эти поверхностные антигены дадут идеальный материал для вакцинации. Отметим также, что поверхностные антигены могут быть использованы для ранней диагностики некоторых опухолей.

4. Можно представить себе следующую схему использования ультразвука для борьбы с

уже образовавшейся опухолью. Опухоль или опухолевые клетки удаляются из организма. Затем из этих клеток с помощью ультразвука малой или средней интенсивности приготавливают взвесь поверхностных антигенов, которую и вводят в организм для выработки остро направленного иммунитета. Возможны, конечно, бесконечные усложнения и вариации этой схемы, например, с добавлением адъювантов, дополнительной неспецифической стимуляцией иммунной системы и т.д.

5. Отметим, что влияние докавитационного ультразвука не ограничивается рассмотренными в настоящей статье механизмами. Действительно, как отмечено в работе [11], опухолевые клетки имеют больший электрический потенциал, чем нормальные клетки. Как отмечено в этой работе, недостаточность иммунного ответа даже при большом количестве чужеродных опухолевых клеток может быть связана с наличием этого повышенного потенциала опухолевых клеток. Такой потенциал затрудняет столкновение и распознавание этих клеток иммунокомпетентными клетками. С помощью ультразвука малой и средней интенсивности можно уменьшить кулоновский потенциал клеток. В наших предварительных экспериментах мы наблюдали заметное уменьшение подвижности во внешнем электрическом поле озвученных бараньих эритроцитов и клеток аденокарциномы Эрлиха по сравнению с неозвученными. Однако количественные закономерности изменения потенциала, его механизм и динамика не были изучены. Уменьшение кулоновского потенциала опухолевых клеток, как уже указывалось выше, позволяет усилить иммунный ответ на эти клетки. Уменьшение же потенциала нормальных клеток – эффект отрицательный, так как, например, для клеток крови может приводить к их агрегации и, как следствие, к возникновению тромбов.

Авторы благодарны А.А. Цуцаевой за многочисленные обсуждения результатов и за полезные советы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Mullard, *Nat. Rev. Drug Discov.* **15** (10), 663 (2016). doi:10.1038/nrd.2016.201.
2. L. M. Kranz, M. Diken, and H. Haas, *Nature* **534**, 396 (2016). doi:10.1038/nature18300.
3. P. B. Rosnitskiy, P. V. Yuldashev, O. A. Sapozhnikov, et al., *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Contr.* **64** (2), 374 (2017).
4. Zh. Hu, X. Y. Yang, Y. Liu, et al., *J. Translat. Med.* **5**, 34 (2007). doi:10.1186/1479-5876-5-34.

5. К. П. Балицкий, И. Г. Векслер, О. Е. Придатко и др., *Ультразвук в терапии злокачественных опухолей* (Наук. думка, Киев, 1977).
6. А. К. Буров и Г. Д. Андреевская, Докл. АН СССР **106** (3), 445 (1956).
7. Н. П. Дмитриева, Бюл. эксперим. биологии и медицины, **44** (11), 81 (1957).
8. И. Е. Эльпинер, *Биофизика ультразвука* (Наука, М., 1973).
9. S. Pinamohti, P. E. Gallenga, and V. Mazzeo, *Ultrasound Med Biol.* **8** (6), 631 (1982).
10. В. А. Буц и К. П. Скибенко, *Биофизика* **36**, 863 (1991).
11. G. A. Girric and K. D. Bagshawe, *Lancet*, **1** (7492), 708 (1967).

Use of Ultrasound for Eliciting a Targeted Immune Response

V.A. Buts and K.P. Skibenko

*National Science Center "Kharkiv Institute of Physics and Technology",
ul. Akademicheskaya 1, Kharkiv, 61108 Ukraine*

*Institute of Radio Astronomy, National Academy of Sciences of Ukraine,
ul. Krasnoznamennaya 4, Kharkiv, 61002 Ukraine*

V.N. Karazin Kharkiv National University, pl. Svobody 4, Kharkiv, 61022 Ukraine

A simple method for eliciting a targeted immune response is proposed. It is shown that under the impact of low- and moderate-intensity ultrasound, it is possible to disrupt antigens from the cell surface (surface antigens). It is found that the immunogenicity of these surface antigens is not less than the immunogenicity of intact cells. These results imply that there is an opportunity to elicit a specific, highly targeted immune response against tissues and cells from the surface of which surface antigens were captured, in particular, to elicit a targeted immune response against malignant tumors.

Keywords: ultrasound, erythrocytes, surface antigens, agglutination, immunogenicity