

УДК:612.017.1:591.481.1:616

*Н.М. Грегірчак,
канд. техн. наук,
О.П. Бабій*

*Національний університет
харчових технологій*

Є.Г. Шпак, м. н. с.

*Інститут експериментальної
патології, онкології та
радіобіології ім. Р.Є. Кавецького*

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ
ПРОТИПУХЛИННИХ ВАКЦИН
НА ОСНОВІ КУРЯЧИХ
ЕМБРІОНАЛЬНИХ БІЛКІВ
ТА БІЛОКВІСНИХ МЕТАБОЛІТІВ
BACILLUS SUBTILIS B-7025
НА КЛІТИННУ ЛАНКУ ІМУНІТЕТУ
У МИШЕЙ З КАРЦИНОМОЮ
ЛЕГЕНІ ЛЬЮІС**

*На моделі Карциноми легені Льюїса вивчали протипухлинну активність ксеногенних і гомологічних вакцин виготовлених на основі білоквісних продуктів життєдіяльності *Bacillus subtilis* B-7025 з молекулярною масою 18,5 та 70 кДа. Був виявлений зв'язок між динамікою росту пухлин у мишей, імунізованих препаратами вакцин, та цитотоксичною активністю лімфоцитів та макрофагів. Результати роботи являються основою для подальших досліджень впливу вакцини на гуморальну ланку імунітету та можливості створення протипухлинної препарату на основі даних глікопротеїдів та курячих ембріональних білків.*

Ключові слова: ад'юванти, протипухлинні аутовакцини, пухлиноасоційовані антигени, карцинома легені Льюїса, проліферація, апоптоз.

Терапія пухлин є складною, а при злоякісних формах, не завжди вирішуваною проблемою. Одним з головних методів боротьби з нею є використання хіміотерапії, яке передбачає прямий цитотоксичний вплив на патологію. Впровадження в онкологічну практику різних схем комбінованого та комплексного лікування із застосуванням нових хіміопрепаратів дозволило підвищити ефективність традиційних методів і домогтися, в окремих випадках, повної ремісії, що, однак, не змінило ситуації в цілому. Показники загальної смертності від раку практично не знизилися, при цьому, значну питому вагу займають метастатичні форми захворювання [1,3,5]. Часто загибель хворого, на тлі успішно вилікуваного первинного пухлинного вузла, обумовлена метастазами, які вже існують на момент постановки діагнозу. Тобто, в переважній більшості випадків, системна хіміотерапія, що застосовується для запобігання і контролю метастазів, не призводить до бажаного ефекту [2,3].

Існуюче положення ставить перед дослідниками складну задачу з пошуку принципово нових методів і схем лікування злоякісних новоутворень. В останні роки зростає інтерес дослідників до методів біотерапії, а саме імунотерапії онкологічних хворих [3]. Остання має кілька напрямків, у тому числі використання цитокінів, моноклональних антитіл та специфічних протипухлинних вакцин. Використання протипухлинних вакцин є дуже перспективним, основане на використанні пухлинно асоційованих антигенів (ПАА), яке базується на формуванні специфічних реакцій протипухлинного імунітету. Слід зазначити, що більшість пухлин антигенів мають низьку імуногенність, що призводить до необхідності пошуку різних способів підвищення ефективності протипухлинних вакцин [4]. Одним із шляхів підвищення імунної відповіді на антигени є використання адювантів, спектр яких є досить широким. Тим не менш, вплив ад'ювантів на імуногенність пухлинних антигенів і динаміку неспецифічних і специфічних протипухлинних відповідей залишається все ще не визначеним.

© Н.М. Грегірчак, О.П. Бабій, Є.Г. Шпак, 2012

Раніше, основне завдання вчених, які вивчали допоміжні речовини було використовувати їх для стимуляції гуморального імунітету. Аджуванти були включені до складу протипухлинних вакцин або використовувались у тварин для індукції синтезу імуноглобуліну. Було виявлено, що багато з них здатні стимулювати клітинний імунітет і підходять для використання в якості частини протипухлинних вакцин. Тим не менш, вплив допоміжних речовин на імуногенність ПАА та динаміку неспецифічних і специфічних протипухлинних відповідей залишається відкритим [5]

У попередніх дослідженнях впливу імунізації тварин пухлиноносіїв вакцинами на основі курячих ембріональних білків та адьювантів різного біологічного походження було показано, що серед усіх запропонованих речовин найкращими імуномодулюючими властивостями володіють білоквмісні метаболіти *B. subtilis* В-7025 з молекулярною масою 18,5 та 70 кДа. Тому саме ці компоненти з фільтрату культуральної рідини *B. subtilis* В-7025 були обрані нами для подальших досліджень на експериментальній моделі карциноми легені Льюїс.

Дослідження впливу протипухлинних вакцин на основі курячих ембріональних білків та білоквмісних метаболітів *Bacillus subtilis* В-7025 на клітинну ланку імунітету у мишей з карциномою легені Льюїс

В експерименті були використані самці мишей Balb / с лінії 2 — 2,5 місяці, та середньою масою 18 — 20 г, отримані з віварію Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології НАН України. В якості моделі пухлинного росту була використана карцинома легень Льюїсу.

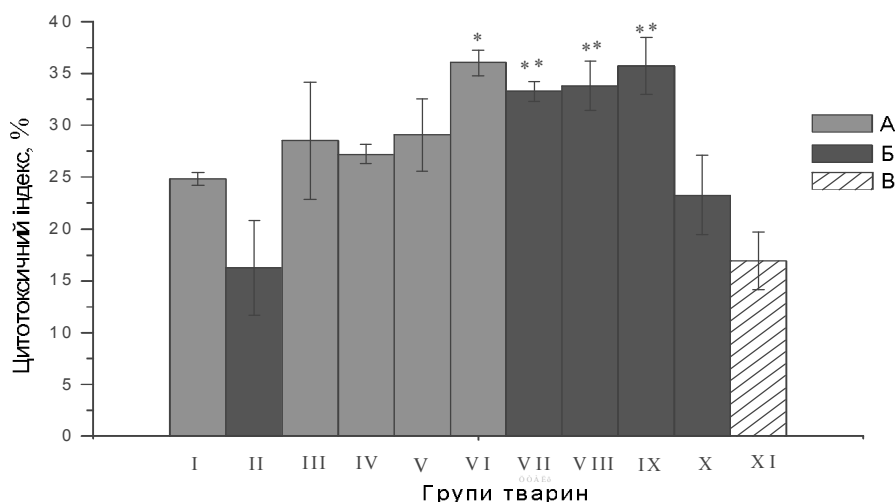


Рис.1. Вплив імунізації протипухлинними вакцинами на показники цитотоксичної активності лімфоцитів імунізованих мишей із карциномою легені Льюїс на 34 добу після перещеплення пухлинних клітин (n=10 у кожній групі).

А. Тварини без хірургічного видалення пухлини: I — невакциновані тварини; III, IV — групи тварин, імунізовані вакциною на основі ПК та БМ *B. subtilis* В-7025 з молекулярною масою 18,5 або 70 кДа, відповідно; V, VI — групи тварин, імунізовані вакциною на основі КЕБ з БМ *B. subtilis* В-7025 з молекулярною масою 18,5 або 70 кДа, відповідно.

Б. Тварини, яким проводили хірургічне видалення пухлини: II — контрольна група тварин з проведеною операцією; VII, VIII — групи тварин, імунізовані вакциною на основі ПК та БМ *B. subtilis* В-7025 з молекулярною масою 18,5 або 70 кДа, відповідно; IX, X — групи тварин, імунізовані вакциною на основі КЕБ з БМ *B. subtilis* В-7025 з молекулярною масою 18,5 або 70 кДа, відповідно.

В. XI — інтактні тварини

Примітка: * — $p < 0,05$ у порівнянні з контролем пухлинного росту, ** — $p < 0,05$ у порівнянні з контролем операції БМ — білоквмісний метаболіт, ПК — пухлинні клітини карциноми легені Льюїс

Для індукції пухлин, клітини карциноми легені Льюїс вводили внутрішньом'язево (в/м) в праву задню кінцівку в дозі 1×10^6 кл / мишу в 0,3 мл фізичного розчину всім групам тварин, крім інтактної.

Тварини були розділені на 10 груп по 10 тварин у кожній. Мишам груп II, VII, VIII, IX, X під ефірним наркозом хірургічно видаляли пухлини. Вакцинацію мишей проводили двічі з інтервалом в 2 діб підшкірно в об'ємі 0,3 мл і в концентрації вакцини 0,3 мг / мл. Імунологічні показники вимірювали на 34-у добу після перещеплення ПК.

Вакцини виготовляли за стандартною методикою розробленою Затулою [44]. До курячого ембріонального екстракту білка в концентрації 0,3 мг / мл була додана необхідна концентрація ад'ювантів. Після змішування компонентів суміш інкубували в термостаті протягом двох годин при температурі $+37^\circ\text{C}$.

Імунологічне обстеження тварин включало: визначення цитотоксичної активності та антигілозалежної цитотоксичної активності лімфоцитів і макрофагів, кооперативної цитотоксичної активності ефекторних клітин; кооперативної антителозависимої клітинної цитотоксичності лімфоцитів і макрофагів; імуноферментний аналіз освічених специфічних антитіл.

При визначенні цитотоксичної активності лімфоцитів (рис.1) було встановлено, що у мишей з карциномою легені Льюїс, використання вакцини на основі КЕБ у сукупності з білоквісними метаболітами *B. subtilis* B-7025 з молекулярною масою 70 кДа (група VI) значно підвищує даний показник на $11,19 \pm 0,26\%$, у порівнянні

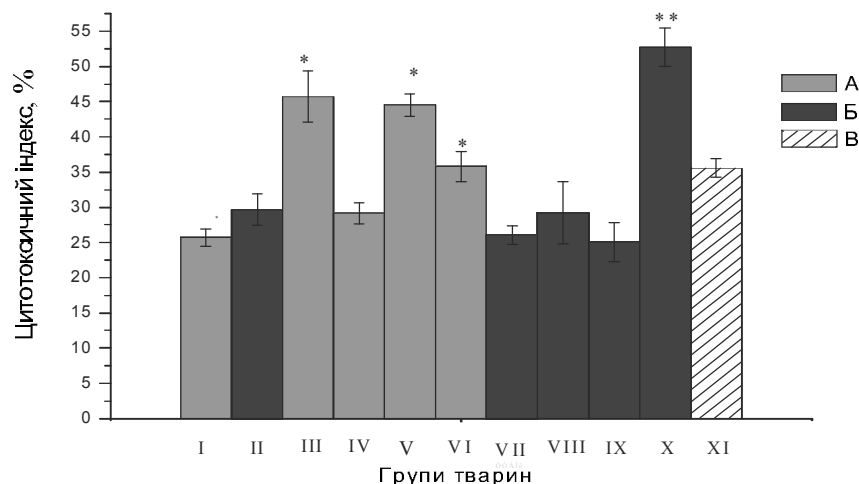


Рис. 2. Вплив імунізації протираковими вакцинами на показники цитотоксичної активності макрофагів імунізованих мишей з карциномою легені Льюїс на 34 добу після перещеплення ракових клітин (n=10 у кожній групі).

А. Тварини без хірургічного видалення пухлини: I — невакциновані тварини; III, IV — групи тварин, імунізовані вакциною на основі ПК та БМ *B. subtilis* B-7025 з молекулярною масою 18,5 або 70 кДа, відповідно; V, VI — групи тварин, імунізовані вакциною на основі КЕБ з БМ *B. subtilis* B-7025 з молекулярною масою 18,5 або 70 кДа, відповідно.

Б. Тварини, яким проводили хірургічне видалення пухлини: II — контрольна група тварин з проведеною операцією; VII, VIII — групи тварин, імунізовані вакциною на основі ПК та БМ *B. subtilis* B-7025 з М.М. 18,5 або 70 кДа, відповідно; IX, X — групи тварин, імунізовані вакциною на основі КЕБ з БМ *B. subtilis* B-7025 з М.М. 18,5 або 70 кДа, відповідно.

В. XI — інтактні тварини

Примітка: * — $p < 0,05$ у порівнянні з контролем ракового росту, ** — $p < 0,05$ у порівнянні з контролем операції БМ — білоквісний метаболіт, ПК — ракові клітини карциноми легені Льюїс

з контролем пухлинного росту ($24,84 \pm 0,0642$ %). Підвищення цитотоксичної активності лімфоцитів також спостерігали у груп мишей III та V на $3,67 \pm 3,638$ та на $4,25 \pm 3,505$ % відповідно. При імунізації прооперованих мишей вакцинами, на основі пухлинних клітин та білоквмісного метаболіту *B. subtilis* В-7025 з молекулярною масою 18,5 або 70 кДа, КЕБ у сукупності з білоквмісними метаболітами *B. subtilis* В-7025 з молекулярною масою 18,5 кДа, спостерігали позитивний вплив на цю ланку імунітету у порівнянні з контролем проведеної операції.

Отже, за значеннями цитотоксичної активності лімфоцитів можна зробити висновок, що у мишей з пухлинами найкраще стимулює вказаний показник вакцина, яка складається з КЕБ та білоквмісного метаболіту *B. subtilis* В-7025 з молекулярною масою 70 кДа. У мишей з видаленими пухлинами найбільш ефективним є застосування вакцини — КЕБ з білоквмісними метаболітами *B. subtilis* В-7025 з молекулярною масою 18,5 кДа. Дані результати, мають першочергове значення у блокуванні пухлинного процесу.

Дослідження цитотоксичної активності макрофагів (рис.2) показало, що переважно у мишей всіх груп відбувалось стимулювання цитотоксичної активності макрофагів. Особливо спостерігалось підвищення рівня цитотоксичності макрофагів, порівняно з контролем пухлинного росту ($25,72 \pm 0,11$ %), у мишей груп III та V на $9,53 \pm 0,08$ % та на $8,64 \pm 0,13$ % відповідно, де використовувались вакцини на основі білоквмісного метаболіту *B. subtilis* В-7025 з молекулярною масою 18,5 кДа, як з пухлинними клітинами так і курячими ембріональними білками у складі. У випадку хірургічного видалення пухлини, найбільші показники спостерігали у групі X ($42,46 \pm 1,66$ %). Після видалення пухлини та застосування вакцини на основі пухлинних клітин та білоквмісного метаболіту *B. subtilis* В-7025 з молекулярною масою 18,5 кДа, реєстрували зменшення показників цитотоксичної активності макрофагів у порівнянні з контрольними тваринами після операції на $3,45 \pm 0,13$ %. Отже, в групі X спостерігали найвищі показники цитотоксичності.

За показниками цитотоксичної активності макрофагів можна встановити, що застосування вакцин, до складу яких входять білоквмісний метаболіт *B. subtilis* В-7025 з молекулярною масою 18,5 кДа як із пухлинними клітинами, так і з курячими ембріональними білками у своєму складі, призводять до значної позитивної модуляції макрофагів. При хірургічному видаленні пухлини, найбільш ефективними виявилось застосування вакцини на основі КЕБ у сукупності з білоквмісним метаболітом *B. subtilis* В-7025 з молекулярною масою 70 кДа (група X), тоді як негативний вплив на даний показник спостерігали при використанні вакцини, яка складається з пухлинних клітин та білоквмісного метаболіту *B. subtilis* В-7025 з молекулярною масою 18,5 кДа.

Висновки. У мишей з карциномою легені Льюїс застосування вакцини на основі курячих ембріональних білків та білоквмісного метаболіту *B. subtilis* В-7025 з молекулярною масою 18,5 кДа сприяє посиленню клітинної цитотоксичності лімфоцитів в 2 рази та макрофагів в 1,5 рази, порівняно з відповідними показниками контрольних тварин з пухлинами. Показано, що найбільш ефективною щодо впливу на клітинну фракцію імунної системи у прооперованих мишей з карциномою легені Льюїс була вакцина на основі курячих ембріональних білків та білоквмісного метаболіту *B. subtilis* В-7025 з молекулярною масою 70 кДа. Це виражалось у зростанні цитотоксичної активності макрофагів у 2 рази, порівняно з відповідними показниками контрольних тварин з хірургічно видаленою пухлиною.

ЛІТЕРАТУРА

1. Aucouturier J. The use of oil adjuvants in therapeutic vaccines // Vaccine. — 2006. — № 24. — P. 2 — 45.
2. Mesa C., Fernandez L.E. Challenges facing adjuvants for cancer immunotherapy // Immunol. Cell. Biol. — 2004. — V. 82, № 6. — P. 644-650.

3. *Herlyn D.* Advances in cancer vaccine development // *Ann. Med.* — 1999. — № 31. — P. 66 — 78.
4. *Cox J.C.* Adjuvants — a classification and review of their modes of action // *Vaccine.* — 1997. — № 15. — P. 248 — 256.
5. *Lee W.C., Wang H.C., Hung C.F.* Vaccination of advanced hepatocellular carcinoma patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells: a clinical trial // *J. Immunother.* — 2005. — V. 28, № 5. — P. 496-504.

*Н.Н. Грегирчак, О.П. Бабий,
Е.Г. Шпак*

Исследование влияния противоопухолевых вакцин на основе куриных эмбриональных белков и белок содержащих метаболитов *Bacillus subtilis* B-7025 на клеточное звено иммунитета у мышей с карциномой легкого льюис

*На модели карциномы легкого Льюиса изучали противоопухолевую активность ксеногенных и гомологичных вакцин изготовленных на основе белок содержащих продуктов жизнедеятельности *Bacillus subtilis* B-7025 с молекулярной массой 18,5 и 70 кДа. Была обнаружена связь между динамикой роста опухолей у мышей, иммунизированных препаратами вакцин, и цитотоксической активностью лимфоцитов и макрофагов. Результаты работы являются основой для дальнейших исследований влияния вакцины на гуморальное звено иммунитета и возможности создания противоопухолевых препаратов на основе данных гликопротеидов и куриных эмбриональных белков.*

Ключевые слова: адьюванты, противоопухолевые вакцины, опухоль ассоциированные антигены, Карцинома легких Левиса, пролиферация, апоптоз.

*N. Grehirschak, O. Babiy,
E. Shpak*

Research of influence of anticancer vaccines based on chick embryonic proteins and protein containing metabolites *Bacillus subtilis* B-7025 on cellular immunity in mice with Lewis lung carcinoma

*Antitumor activity of xenogeny and homologous vaccines prepared with the use of protein containing metabolites of *Bacillus subtilis* B-7025 with molecular weight 18.5 and 70 kDa were studied on Lewis lung carcinoma. The relation of tumour growth dynamics in mice that received vaccines injections with cytotoxic activity of lymphocytes and macrophages was revealed. It is shown that the most effective vaccine in influencing cellular fraction of the immune system operated mice with Lewis lung carcinoma was the one based on chicken embryonic protein and metabolite *B. subtilis* B-7025 with molecular weight 70 kDa. Those results can be used for further studies of the impact on humoral immunity and for potential production of anticancer vaccines based on glycoproteins and chicken embryonic proteins.*

Key words: adjuvants, cancer vaccines, tumour associated antigens, Lewis lung carcinoma, proliferation, apoptosis.

e-mail: jimp@ukr.net

Надійшла до редколегії 24.04.2012 р.