

районе искусственных лесонасаждений. Унікальність генофонда кожної реликтовий популяції потребує підвищення їх охораняемого статусу з можливим створенням національного парку в Кременецькому холмогор'є і Малому Полес'є.

1. Коршиков И. И., Калафат Л. А., Пирко Я. В., Великоридько Т. И. Популяционно-генетическая изменчивость сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в основных лесорастительных районах Украины // Генетика. – 2005. – **41**, № 2. – С. 216–228.
2. Davis B. J. Disk electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1964. – **121**. – P. 404–427.
3. Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Naturalist. – 1972. – **106**. – P. 283–292.
4. Prakash S., Lewontin R. C., Hubby T. L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. 4. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura* // Genetics (US). – 1969. – **61**. – P. 841–858.
5. Животовский Л. А. Популяционная биометрия. – Москва: Наука, 1991. – 271 с.
6. Swofford D. L., Selander R. B. BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics // J. Hered. – 1981. – **72**, No 4. – P. 281–283.

Донецький ботаничний сад НАН України

Поступило в редакцію 18.04.2008

УДК 612.017.1.579.861.2

© 2008

В. В. Позур, Л. М. Сківка, Г. П. Потебня

Вплив аутовакцини на основі пептидоглікану *Staphylococcus aureus* Wood 46 на динаміку росту експериментальних пухлин у мишей

(Представлено академіком НАН України В. Ф. Чехуном)

The effect of peptidoglycan from Staphylococcus aureus Wood 46 and cancer autovaccine supplemented with PG on the growth of experimental tumors in mice is investigated. It is shown that bacterial peptidoglycan both alone and as a part of the cancer autovaccine inhibits the growth of tumors. The cancer autovaccine with PG had the most suppressive effect on the Lewis lung carcinoma growth: tumor sizes in experimental animals were by 37% smaller than those in control.

Використання аутовакцин посідає одне з провідних місць в структурі імунотерапевтичних методів лікування онкологічних патологій [1, 2]. Цей методичний підхід спрямований на активацію специфічного протипухлинного імунітету і забезпечує профілактику метастазів і рецидивів злякисного новоутворення [3]. З метою підвищення імуногенності вакцинних препаратів в онкології як ад'юванти найчастіше використовують ліганди toll-like рецепторів, які здебільшого являють собою компоненти бактеріальних клітин. Це так звані патогенасоційовані мікробні структури (PAMS) [4]. Вакцини на основі аутологічних пухлинних клітин та лектину *B. subtilis* АВ-56 вже багато років успішно застосовуються в імунотерапії онкохворих для профілактики рецидивів та метастазів злякисних пухлин [5].

Пептидоглікан (муреїн, глікопротеїд) (ПГ) — головний універсальний і невід'ємний компонент клітинної стінки фактично всіх бактерій [6]. ПГ різних видів бактерій неоднакові

за амінокислотним складом міжланцюгових пептидних містків [7]. Пептидогліканам бактерій притаманні ад'ювантні властивості як у гуморальній, так і клітинній відповідях, як до розчинних, так і до нерозчинних корпускулярних антигенів [8]. ПГ та їхнім похідним властива імуномодуляторна активність [9]. При застосуванні *in vivo* ПГ індукує рекрутинг нейтрофілів у місце введення і активує ефектори природного імунітету [10]. Спрямованість та інтенсивність дії ПГ залежить від їх антигенних структурних особливостей та дози [7]. Численні дані літератури свідчать про те, що ПГ та їхні синтетичні аналоги з імуномодуляторними властивостями можуть мати важливе прикладне значення як неспецифічні імуностимулятори, а також використовуватись як ад'ювантні компоненти для імунотерапії патологій людини і тварин, пов'язані з функціональними розладами імунної системи [11, 12]. Відомі спроби використання імуогенного потенціалу ПГ та його похідних в імунотерапії злоякісних експериментальних пухлин [11]. При окремих типах пухлин ПГ клітинної стінки бактерій сповільнювали ріст первинних злоякісних новоутворень [13]. Застосування препаратів ПГ у терапії слабоімуогенних пухлин спричиняло гальмування процесу метастазування у дослідних тварин [14]. Структури клітинних стінок різних бактерій, які містять ПГ, можуть виявляти протипухлинну дію і відновлювати пригнічений клітинний імунітет у онкологічних хворих [14, 15].

У даному повідомленні наведено результати дослідження впливу ПГ з клітинної стінки *Staphylococcus aureus* Wood 46 та протипухлинної аутовакцини з введеним до її складу ПГ на ріст експериментальних пухлин у мишей.

У дослідах використовували мишей-самок лінії Balb/c розводки віварію Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України та лінії C57/Black розводки віварію біологічного факультету Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, віком 2–3 міс., середньою масою 24–26 г. Карциному легені Льюїс та саркому-37 (штами люб'язно надані Клітинним банком ліній з тканин людини та тварин ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України) перещеплювали підшкірно в область крижового відділу по 0,2 мл суспензії пухлинної тканини з концентрацією клітин $5 \cdot 10^5$. Динаміку росту пухлин оцінювали за зміною об'єму первинної пухлини і розраховували за формулою $V = 1/6\pi ((d_1 - d_2)/2)^3$, а також за індексом модуляції середньої тривалості життя (ІМ СТЖ = (дослід – контроль)/контроль · 100%). Статистичну обробку даних проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента. Бактеріальний ПГ отримували з клітин *S. aureus* Wood 46, з колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології та загальної імунології КНУ ім. Тараса Шевченка. Для приготування 1 мл вакцини на основі лектину до $1 \cdot 10^7$ пухлинних клітин додавали лектин у концентрації 0,06–0,5 мг/мл, інкубували 2 год при 37 °С, готову вакцину зберігали при –18...–20 °С. ПГ погано розчинний у водних розчинах. У зв'язку з цим використовували гомогенну суспензію ПГ, створену шляхом ультразвукової обробки — 60 с при 25 кГц на дезінтеграторі УЗДН-2Т. Оброблений ультразвуком ПГ у концентрації 250 мкг/мл зберігали при –18...–20 °С. Для приготування 1 мл вакцини на основі ПГ до $1 \cdot 10^7$ пухлинних клітин додавали гомогенізовану суспензію ПГ у концентрації 250 мкг/мл, інкубували 2 год при 37 °С, готову вакцину зберігали при –18...–20 °С. Вакцини та ПГ вводили підшкірно в область крижового відділу по 0,3 мл 5 разів двічі на тиждень, починаючи з наступного дня після перещеплення пухлин. Тварини були розділені на чотири групи: I — контрольні тварини-пухлиноносії; II — тварини-пухлиноносії, які отримали вакцину на основі лектину; III — тварини-пухлиноносії, які отримали вакцину на основі ПГ у концентрації 250 мкг/мл; IV — тварини-пухлиноносії, які отримали ПГ у концентрації 250 мкг/мл.

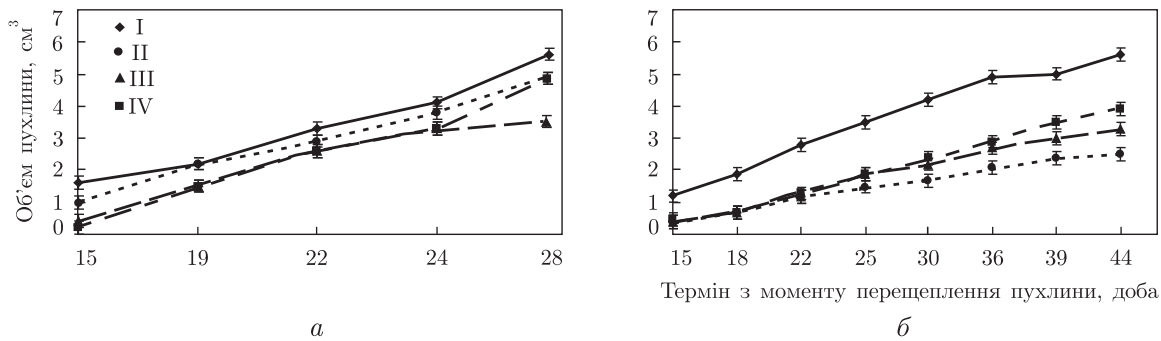


Рис. 1. Вплив протипухлинних аутовакцин різного складу та ПГ на ріст карциноми легені Льюїс (а) і саркоми-37 (б) у мишей.

I — контрольні тварини-пухлиноносії; II — тварини-пухлиноносії, які отримали вакцину на основі лектину; III — тварини-пухлиноносії, які отримали вакцину на основі ПГ; IV — тварини-пухлиноносії, які отримали ПГ у дозі 4 мкг/г

Як свідчать результати досліджень, введення ПГ як самостійно, так і у складі протипухлинної аутовакцини спричиняло гальмування росту карциноми легені Льюїс у дослідних тварин (рис. 1). Стійкість такого ефекту зберігалася на всіх етапах росту експериментальної пухлини. Порівняльний аналіз розмірів первинних пухлин у тварин різних груп на момент закінчення експерименту (28-ма доба) показав, що у тварин-пухлиноносіїв, які отримали вакцину на основі лектину та суспензію ПГ, середній об'єм пухлини був на 13% меншим від інтактного контролю пухлинного росту. Необхідно зазначити, що ступінь гальмування пухлинного росту у тварин цих груп у порівнянні з контрольними пухлиноносіями на різних термінах пухлинного процесу був неоднаковим. Протягом дослідного періоду розмір пухлин у мишей, яким вводили вакцину на основі ПГ, був у середньому на 37% меншим у порівнянні з групою контрольних тварин-пухлиноносіїв.

Найбільш виразний гальмівний ефект на розвиток карциноми легені Льюїс чинила протипухлинна аутовакцина на основі ПГ.

Динаміка росту саркоми-37 при введенні тваринам досліджуваних препаратів була де-що іншою. На початкових етапах пухлинного процесу введення всіх досліджуваних речовин приводило до гальмування росту пухлини (рис. 2). На 15-ту добу після перещеплення середній об'єм пухлин у тварин усіх дослідних груп був втричі меншим у порівнянні з контролем пухлини. У міру розвитку пухлини супресивний вплив досліджуваних препаратів поступово диверсифікувався. Найбільш виразним він був у тварин, що отримали вакцину на основі лектину. На момент закінчення експерименту (44-та доба) середній об'єм пухлин у цій групі тварин був на 56% меншим у порівнянні з групою контрольних тварин-пухлиноносіїв. У групі тварин, що отримали вакцину на основі ПГ, середній об'єм пухлин був на 42% меншим, а в групі тварин, що отримали ПГ, — на 31% меншим у порівнянні з групою контрольних тварин-пухлиноносіїв.

Таким чином, найбільш істотним пригнічення росту саркоми-37 було при використанні вакцини на основі лектину. Препарати ПГ по відношенню до цієї пухлини виявились менш ефективними.

Аналіз середньої тривалості життя в групах тварин з різними типами пухлин свідчить про те, що досліджувані препарати по-різному впливали на даний показник (табл. 1). У випадку карциноми легені Льюїс при введенні вакцини на основі лектину і вакцини на основі

Таблиця 1. Показники середньої тривалості життя у тварин з перещепленими експериментальними пухлинами

Варіант досліджу	Карцинома легені Льюїс		Саркома-37	
	СТЖ, доба	ІМ СТЖ, %	СТЖ, доба	ІМ СТЖ, %
Контрольні тварини-пухлиноносії	43,0	—	44,4	—
Тварини-пухлиноносії, які отримали вакцину на основі лектину	46,0	+6,9	88,3	+98,0
Тварини-пухлиноносії, які отримали вакцину на основі ПГ	46,2	+7,4	65,3	+47,0
Тварини-пухлиноносії, які отримали ПГ у дозі 4 мкг/г	33,0	-23,0	77,4	+74,3

ПГ ІМ СТЖ неістотно збільшувався на 6,9 і 7,4% відповідно, а у випадку ПГ — знижувався на 23%. ІМ СТЖ у тварин із саркомою-37 під впливом досліджуваних речовин був значно вищим. У групі тварин, яким вводили вакцину на основі лектину, він був найвищим і становив 98%. Введення ПГ та вакцини на основі ПГ також обумовлювало збільшення СТЖ на 74 та 47% відповідно.

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що ПГ *S. aureus*, застосований як самостійно, так і у складі протипухлинної аутовакцини, здатний чинити супресивний вплив на ріст експериментальних пухлин у мишей. Різний ступінь гальмівного ефекту препаратів ПГ при різних типах пухлин, імовірно, може бути наслідком особливостей формування протипухлинного імунітету на пухлини різного походження, а також результатом різної реакції самих пухлинних клітин на ПГ.

Відомо, що *S. aureus* є одним з основних етіологічних факторів інфекційних ускладнень в онкології. Зважаючи на це, видоспецифічний ПГ може розглядатись як перспективний ад'ювант у складі протипухлинних вакцин, який паралельно з активацією протипухлинного імунітету, забезпечує формування імунітету проти *S. aureus* з метою профілактики інфекцій стафілококової етіології.

1. Waterstone A. M., Gumbrell L., Bratt T. et al. Phase I study of TNFalpha AutoVaccine in patients with metastatic cancer // Cancer Immunol. Immunother. – 2005. – **54**, No 9. – P. 848–857.
2. Potebnya G. P., Safronova L. A., Lisovenko H. S. et al. Influence of probiotic subalin on efficiency of anti-tumor vaccine // Microbiol. Z. – 2006. – **68**, No 6. – P. 51–58.
3. Aksoy M., Erdem S., Dincol G. et al. Clinical observations showing the role of some factors in the etiology of multiple myeloma // Acta Haematol. – 1984. – **71**, No 2. – P. 116–120.
4. Leonhartsberger N., Ramoner R., Puts T. et al. Antigen-independent immune responses after dendritic cell vaccination // Cancer Immunol. Immunother. – 2007. – **56**, No 6. – P. 897–903.
5. Потєбня Г. П., Диденко Г. В., Рыбалко С. Л., Хуторной С. В. Противоопухолевая активность гликопротеидов *B. subtilis* АВ-56, *S. aureus* и противоопухолевых аутовакцин, приготовленных на их основе // Укр. химиотерапевт. журн. – 2002. – № 1. – С. 44–47.
6. Vonesa I. G. The role of peptidoglycan in pathogenesis // Curr. Opin. Microbiol. – 2005. – **8**, No 1. – P. 46–53.
7. Позур В. К. Імунобіологічна активність бактеріальних пептидогліканів. – Київ: Фітосоціоцентр, 2002. – 236 с.
8. Lin E., Nguyen A., Russell R. G., Pollard J. W. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy // Exp. Med. – 2001. – **193**. – P. 727–740.
9. Myhre A. E., Stuestol J. F., Wang J. E. et al. Organ injury and cytokine release caused by peptidoglycan are dependent on the structural integrity of the glycan chain // Infect. and Immun. – 2004. – **72**, No 3. – P. 1311–1317.

10. Kumar A., Zhang J., Yu F. S. Innate immune response of corneal epithelial cells to *S. aureus* infection: role of peptidoglycan in stimulating proinflammatory cytokine secretion // Invest. Ophthalmol. Vis. – 2004. – **45**, No 10. – P. 3513–3522.
11. Kato I., Canzian F., Plummer M., Franceschi S. et al. Polymorphisms in Genes Related to Bacterial Lipopolysaccharide / Peptidoglycan Signaling and Gastric Precancerous Lesions in a Population at High Risk for Gastric Cancer // Dig. Dis. Sci. – 2007. – **52**, No 1. – P. 254–261.
12. Nitta Y., Sugita T., Ikuta Y., Murakami T. Inhibitory effect of liposomal MDP-Lys on lung metastasis of transplantable osteosarcoma in hamster // Oncol. Res. – 2000. – **12**, No 1. – P. 25–31.
13. Srividya S., Roy R. P., Basu S. K., Mukhopadhyay A. Selective activation of antitumor activity of macrophages by the delivery of muramyl dipeptide using a novel polynucleotide-based carrier recognized by scavenger receptors // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 2000. – **268**, No 3. – P. 772–777.
14. Yoo Y. C., Saiki I., Sato K., Azuma I. MDP-Lys(L18), a lipophilic derivative of muramyl dipeptide, inhibits the metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumours in mice // Vaccine. – 1994. – **12**, No 2. – P. 160–175.
15. Karpoff H. M., Jarnagin W., Delman K., Fong Y. Regional muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine administration enhances hepatic immune function and tumor surveillance // Surgery. – 2000. – **128**, No 2. – P. 213–218.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка
Інститут експериментальної патології,
онкології та радіобіології
ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ

Надійшло до редакції 20.02.2008

УДК 579.842.1/.2:579.252

© 2008

Ж. Ю. Сергеева, Ф. И. Товкач

Распространение внехромосомных кольцевых ДНК у *Erwinia carotovora*

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины И. Г. Скрипалем)

The study of a plasmid composition of 54 Erwinia carotovora's strains of different origins shows that 30% of these strains contain different extrachromosomal DNAs. These genetic elements belong to four discrete size classes. For the first time, the correlation of strains' plasmid maintenance and their belonging to a certain ecological niche is shown, and their sensibility to bacteriophages is studied. The restriction analysis of plasmids from the most widespread class detects a homology of E. carotovora's extrachromosomal elements. Any correlation between strains' plasmid maintenance and the killer activity of carotovoricines of E. carotovora's strains is not found.

Причастность таких автономных генетических элементов, как плазмиды и бактериофаги, к патогенности разнообразных микробов является неоспоримым научным фактом современной бактериологии. Тем не менее у важной фитопатогенной бактерии *Erwinia*