

Г.П. Потебня
 І.М. Восійкова
 Н.Л. Черемшенко
 Г.С. Лісовенко
 Н.В. Трохименко
 В.Н. Базась
 Л.П. Дідківська
 О.М. Караман
 З.Д. Савцова

Інститут експериментальної
 патології, онкології
 і радіобіології
 ім. Р.Є. Кавецького
 НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: протипухлинна
 вакцина, субалін, ефективність,
 доклінічне вивчення.

ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ПРОТИПУХЛИННОЇ ВАКЦИНИ ПРОБІОТИЧНИМ ПРЕПАРАТОМ СУБАЛІН

Резюме. У роботі наведені результати доклінічного вивчення ефективності оригінальної схеми комплексного застосування протипухлинної вакцини (ПВ), виготовленої з пухлинних клітин за допомогою лектинової фракції, виділеної з фільтрату культуральної рідини *V. subtilis* B-7025, і пробіотичного препарату субалін. Переваги запропонованої схеми виявлялись у збільшенні латентного періоду виходу пухлин, гальмуванні їх росту та подовженні тривалості життя мишей з пухлинами порівняно із застосуванням ПВ у монорежимі. Імунологічними ефектами комплексного застосування ПВ і субаліну у експериментальних тварин було підвищення активності цитотоксичних Т-лімфоцитів у пізні терміни пухлинного росту, позитивний вплив на динаміку активності макрофагів та стабілізації продукції цитокінів (ФНП- α , ІЛ-1 та ІЛ-2). Отримані результати свідчать про перспективність клінічної апробації комбінованих схем введення ПВ з субаліном.

ВСТУП

Тривають активні дослідження, спрямовані на розробку засобів імунотерапії пухлин, у тому числі протипухлинних вакцин (ПВ) [1–3]. Не меншу увагу привертають дослідження цитокінів, які здатні оптимізувати протипухлинні реакції організму при застосуванні в якості ад'ювантів та/або препаратів супроводу [4]. Одним з важливих регуляторів механізмів неспецифічної резистентності є інтерферон (ІФ); зокрема відомо, що введений *per os* ІФ-альфа впливає майже на всі ланки імунної відповіді [5, 6]. Результатами експериментальних та клінічних досліджень обґрунтовано використання ІФ-альфа в якості засобу для оптимізації комплексного лікування, зниження метастатичного ризику та підвищення якості життя хворих онкологічного профілю [7–9]. Виходячи з викладеного, доцільним і обґрунтованим є вивчення ефектів комбінованого застосування ІФ і активної специфічної імунізації [10, 11].

Метою даної роботи було доклінічне вивчення ефективності комбінованої схеми введення ПВ, виготовленої з аутологічних пухлинних клітин за допомогою цитотоксичного лектину (ЦЛ) *V. subtilis* B-7025, і пробіотичного препарату субаліну. Оригінальна технологія виготовлення ПВ з аутологічних пухлинних клітин за допомогою ЦЛ *V. subtilis* B-7025 була розроблена в ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. На основі результатів доклінічного вивчення і 3 фаз клінічного випробування ПВ Державною службою лікарських засобів і виробів медичного призначення МОЗ України було підтверджено, що досліджувана вакцина відповідає вимогам державних та міжнародних стандартів і дозволена до медичного застосування в Україні, та видано Сертифікат про державну реєстрацію медичного імунобіологічного препара-

ту (№ 411/03-300200000 від 9 грудня 2003 р.). Препарат субалін відносять до пробіотиків нового покоління, основою якого є рекомбінантний штам бактерій *V. subtilis* 2335/105, у який вбудовано ген синтезу ІФ-альфа людини [12]. При використанні субаліну важливим моментом є те, що синтез ІФ здійснюється бактеріями, які вводять перорально в шлунково-кишковий тракт [13]. Здатність субаліну індукувати продукцію ІФ та інших цитокінів (ФНП-альфа, ІЛ-1, ІЛ-2), стимулювати спонтанну і мітоген-індуковану проліферацію лімфоцитів, а також активність природних кілерних клітин (ПКК) і макрофагів (Мф) [14, 15], підвищувати ефект як хіміопрепаратів, так і вакцинотерапії [16, 17], його помірна протипухлинна і антиметастатична активність [18] визначають доцільність детального дослідження цього пробіотика в якості ад'юванта.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди проводили на мишах-самцях ліній BALB/c і C57Bl (2,5 міс, 20–22 г, розводки віварію ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України) згідно з Правилами роботи з лабораторними тваринами на стандартних моделях пухлинного росту (саркоми-37 і карциноми легені Льюїс). Саркому-37 (С-37) або карциному легені Льюїс (КЛЛ) прищеплювали мишам у стегновий м'яз (по $1,5 \times 10^5$ та $4,5 \times 10^5$ живих пухлинних клітин відповідно). Введення ПВ та субаліну здійснювали за терапевтичною схемою окремо або комбіновано згідно зі схемою експерименту (табл. 1).

ПВ готували з клітин асцитної форми С-37 або з подрібненої тканини КЛЛ з розрахунку 10^7 пухлинних клітин (або 0,1 г тканини для КЛЛ) на 1 мл розчину ЦЛ (0,5 мг/мл), який виділяли з культуральної рідини *V. subtilis* B-7025 після її вирощування на модифікованому середовищі Гаузе [19]. ПВ вво-

Схема експерименту по вивченню ефективності комбінованого застосування ПВ та субаліну на моделях саркоми-37 та КЛЛ

Штам модельної пухлини	Група мишей	ПВ		Субалін	
		доза, шлях введення	термін введення, дб	доза, шлях введення	термін введення, дб
С-37 (1,5 x 10 ⁵ , в/м)	«ПВ»	0,3 мл, п/ш	1, 4, 7, 11, 15	–	–
	«Субалін»	–	–	2,5 x 10 ⁸ КУО, <i>per os</i>	1, 3, 6, 10, 14
	«ПВ + субалін»	0,3 мл, п/ш	1, 4, 7, 11, 15	2,5 x 10 ⁸ КУО, <i>per os</i>	1, 3, 6, 10, 14
	«Контроль прищеплення»	–	–	–	–
КЛЛ (4,5 x 10 ⁵ , в/м)	«ПВ»	0,3 мл, п/ш	1, 4, 8, 11, 15	–	–
	«Субалін»	–	–	1,0 x 10 ⁸ КУО, <i>per os</i>	1, 4, 8, 11, 15
	«ПВ + субалін»	0,3 мл, п/ш	1, 4, 8, 11, 15	1,0 x 10 ⁸ КУО, <i>per os</i>	1, 4, 8, 11, 15
	«Контроль прищеплення»	–	–	–	–

дили 5-кратно, підшкірно (п/ш), в однакових дозах (0,3 мл), на 1-шу, 4-ту, 7-му (8-му), 11-ту і 15-ту добу після прищеплення пухлини. Мишам контрольних груп у відповідні строки вводили фізіологічний розчин хлориду натрію.

Препарат субалін був наданий для досліджень співробітниками відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України [20]. Розчин субаліну готували *ex tempore* і вводили *per os*, 5-разово. Схема його введення залежала від модельної пухлини: при прищепленні С-37 вводили по 2,5 x 10⁸ колонієутворюючих одиниць (КУО) на 1-шу, 3-тю, 6-ту, 10-ту, 14-ту добу після прищеплення пухлини (перше введення за 3 год до ПВ, решта — за 24 год до ПВ); КЛЛ — по 10⁸ КУО, кожного разу за 2 год до введення ПВ. У попередніх дослідженнях продемонстровано, що саме такі дози субаліну найбільш ефективні щодо використаних модельних пухлин [18].

Оцінку ефективності лікування проводили за величиною латентного періоду (ЛП), індексом гальмування росту пухлин (ІГРП) та показниками середньої тривалості життя (СТЖ) дослідних тварин.

Імунологічне обстеження мишей включало визначення цитотоксичної активності Т-лімфоцитів (ЦТЛ), Мф та ПКК у цитотоксичних тестах *in vitro* [21]; цитохімічної активності перитонеальних Мф за допомогою НСТ-тесту [22]; рівня продукції перитонеальними Мф фактора некрозу пухлин (ФНП) з використанням ФНП-чутливої культури клітин L-929 [23], рівня продукції ІЛ-1 прилипаючою та ІЛ-2 не прилипаючою фракціями спленоцитів (Сн) за допомогою стандартних радіометричних методів [24, 25]. Дослідження імунологічних показників у мишей з С-37 проводили на 10-ту, 21-шу та 58-му добу, з КЛЛ — на 28-му та 45-ту добу після прищеплення пухлини.

Математичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента [26], розра-

хунки та побудову графіків виконували з використанням програми Microsoft Excel. Порівнюючи тварин контрольної і дослідних груп за показниками ЛП і СТЖ, додатково обраховували індекси модуляції (ІМ) кожного з показників [27].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження тривалості ЛП та СТЖ тварин в обох серіях досліджень свідчать про значну перевагу комбінованого застосування ПВ і субаліну перед використанням цих препаратів у монорежимі (табл. 2).

У мишей з С-37, яким вводили ПВ + субалін, ЛП складав 21,9 ± 3,9 доби і перевищував аналогічні показники при окремому використанні ПВ (в 1,7 раза, 0,05 < p < 0,1) або субаліну (майже в 2,0 рази, p < 0,05). Подібні закономірності відзначали і при аналізі СТЖ. Зокрема, у тварин, яким вводили ПВ і субалін за комбінованою схемою, остання сягала 80,8 ± 4,3 доби, що майже вдвічі (на 98%) перевищувало контрольний показник, а також вірогідно відрізнялася від такої мишей, які одержували ПВ або субалін у монорежимі (в 1,4 і 1,7 раза відповідно, p < 0,05). Комбіноване застосування ПВ та субаліну призводило до більш значного гальмування росту пухлини порівняно з групою тварин, яка одержувала тільки ПВ (ІГРП 80 і 64% відповідно, p < 0,01) (рисунок).

Слід підкреслити, що у мишей, які одержували тільки субалін, ІГРП складав лише 36%, а СТЖ майже не перевищувала показник «контролю прищеплення». Вивчення в динаміці протипухлинної цитотоксичності ефекторів клітинного імунітету дозволило виявити деякі відмінності між контрольною і дослідними групами (табл. 3). Зокрема, встановлено, що цитотоксична активність (ЦТА) Мф у тварин, які одержували ПВ або ПВ + субалін, виявляє тенденцію до збільшення на 10-ту добу пухлинного росту; на 21-шу добу цей показник вірогідно збільшений порівняно з групою «контроль прищеплення» у всіх дослідних тварин (у серед-

Таблиця 2

Порівняння ЛП та СТЖ мишей з різними модельними пухлинами

Модельна пухлина	Група мишей	ЛП, дб			СТЖ, дб		
		X ± m	t	ІМ, %	X ± m	t	ІМ, %
С-37	«ПВ»	13,2 ± 1,4	3,9*	+72,1	59,1 ± 2,2	5,5*	+44,6
	«Субалін»	11,2 ± 1,2	2,9*	+46,0	47,2 ± 2,1	1,9	+15,4
	«ПВ + субалін»	21,9 ± 3,9	3,7*	+185,1	80,8 ± 4,3	8,1*	+97,7
	«Контроль прищеплення»	7,7 ± 0,4	–	–	40,8 ± 2,5	–	–
КЛЛ	«ПВ»	11,1 ± 1,3	1,4	+13,5	53,7 ± 4,0	2,8*	+35,0
	«Субалін»	10,1 ± 0,9	0,9	+3,2	40,2 ± 1,3	0,5	+1,0
	«ПВ + субалін»	12,9 ± 1,5	2,6*	+31,5	57,5 ± 3,3	4,1*	+44,4
	«Контроль прищеплення»	9,0 ± 0,8	–	–	39,8 ± 1,8	–	–

*p < 0,05 порівняно з відповідним показником контрольної групи.

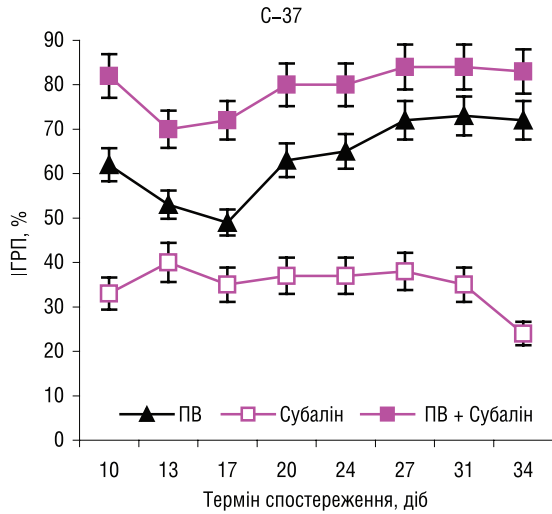


Рисунок. ІГРП у мишей, які отримували досліджувані препарати, порівняно з «контролем прищеплення»

ньому у 3,6 раза). Аналогічним чином змінювалась і активність ПКК (на 10-ту, 21-шу добу), проте достовірних відмінностей між контрольною і дослідними групами не зафіксовано в жодний з термінів дослідження. Найбільш виразною особливістю комбінованої дії ПВ з субаліном було збереження високої активності ЦТЛ у термінальні строки пухлинного росту (58-ма доба).

Таблиця 3

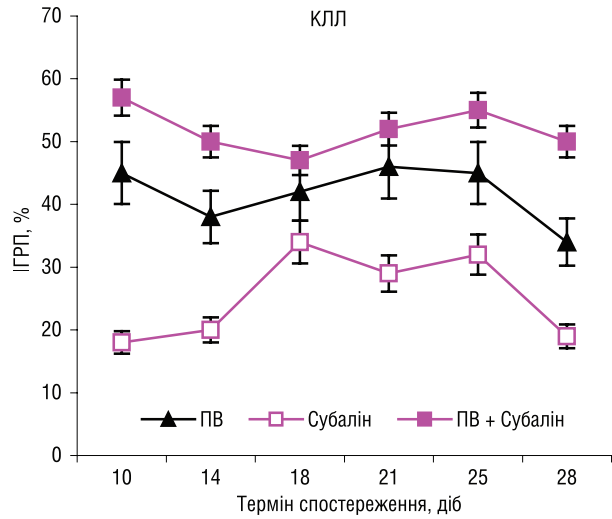
Цитотоксична активність клітин-ефекторів протипухлинного імунітету у мишей з С-37

Показник	Термін дослідження, доба	Група мишей			
		«ПВ»	«Субалін»	«ПВ + субалін»	«Контроль прищеплення»
Цитотоксична активність Мф (індекс цитотоксичності (ІЦ), %)	10	22,9 ± 7,7	9,1 ± 5,1	22,1 ± 6,6	17,4 ± 6,8
	21	45,4 ± 8,9*	41,2 ± 4,3*	37,9 ± 7,4*	11,5 ± 5,2
	58	21,6 ± 7,2	6,5 ± 4,0	2,5 ± 1,8	—
Активність ЦТЛ (ІЦ, %)	10	—	—	—	—
	21	26,1 ± 6,7	32,1 ± 8,8	36,6 ± 2,3*	22,2 ± 5,9
	58	13,5 ± 6,0	7,1 ± 5,3	27,1 ± 1,9**,**	—
Активність ПКК (ІЦ, %)	10	34,1 ± 8,1	22,7 ± 5,4	35,1 ± 6,7	20,1 ± 7,2
	21	13,9 ± 6,4	23,9 ± 8,4	6,5 ± 2,2	4,8 ± 1,8
	58	20,0 ± 4,3	24,8 ± 5,7	14,5 ± 6,5	—

* $p < 0,05$ порівняно з «контролем прищеплення»; ** $0,05 < p < 0,1$ порівняно з групою «ПВ», *** $p < 0,05$ порівняно з групою «Субалін».

У мишей з КЛЛ, які отримували ПВ і субалін в комбінованому режимі, показники ЛП та СТЖ не відрізнялися від таких у тварин, які отримували тільки ПВ, і достовірно перевищували зазначені показники у мишей групи «контроль прищеплення» (у 1,4 і 1,4 раза відповідно, $p < 0,05$) (див. табл. 2).

При аналізі динаміки росту КЛЛ на 10-ту–28-му добу після прищеплення пухлини (див. рисунок) при комбінованому застосуванні ПВ з субаліном відзначено вірогідне зростання середнього ІГРП порівняно з використанням ПВ у монорежимі (52 і 42% відповідно, $p < 0,05$). У мишей, які одержували тільки субалін, ЛП та СТЖ не перевищували показників «контролю прищеплення», а ІГРП КЛЛ був найменшим — 25%. Проаналізовано також зміни імуннологічних показників у тварин з КЛЛ, які отримували зазначені препарати (табл. 4).



Таблиця 4
Активність клітин-ефекторів протипухлинного імунітету у мишей з КЛЛ на 28-му добу пухлинного росту

Група мишей	ІЦ, %		Активність Мф у НСТ-тесті, опт. од.
	ПКК	ЦТЛ	
«ПВ»	43,2 ± 2,3 ^{1,2}	7,8 ± 4,5 ^{3,4}	0,176 ± 0,015 ³
«Субалін»	43,1 ± 2,9 ^{1,2}	2,9 ± 1,5 ^{3,4}	0,217 ± 0,014 ³
«ПВ + субалін»	12,8 ± 4,9 ³	30,6 ± 4,0 ³	0,300 ± 0,005 ^{1,3}
«Контроль прищеплення»	35,5 ± 2,6 ¹	24,5 ± 13,8	0,393 ± 0,013 ¹
«Інтактний контроль»	6,4 ± 2,0	2,0 ± 1,2	0,219 ± 0,007

¹ $p < 0,05$ порівняно з інтактним контролем; ² $0,05 < p < 0,1$; ³ $p < 0,05$ порівняно з «контролем прищеплення»; ⁴ $p < 0,05$ порівняно з групою «ПВ + субалін».

Фонові значення активності ефекторів протипухлинної резистентності (інтактний контроль) були: для Мф — 0,219 опт. од., для ПКК — 6,4 ± 2,0%, для ЦТЛ — 2,0 ± 1,2%. У групі «контроль прищеплення» на 28-му добу пухлинного процесу ЦТА ПКК та Мф вірогідно перевищувала показники інтактного контролю; показник активності ЦТЛ мав високу гетерогенність ($m > 50\% M$), тому його підвищення порівняно з інтактними тваринами не є статистично достовірним. Функціональні характеристики імунної системи тварин дослідних груп значною мірою залежали від того, який препарат було використано. У мишей, які отримували ПВ або субалін окремо, відзначали суттєву активацію ПКК порівняно з обома контрольними групами, у той час як показники активності ЦТЛ та Мф не відрізнялися суттєво від таких у інтактному контролі і були вірогідно нижчими, ніж у «контролі прищеплення». При комбінованому застосуванні ПВ та субаліну виявляли вірогідну активацію ЦТЛ та Мф і тенденцію до підвищення активності ПКК порівняно з інтактним контролем. Порівняно з «контролем прищеплення» активність ПКК і Мф була вірогідно нижчою, активність ЦТЛ мала тенденцію до підвищення.

Враховуючи роль цитокінів у формуванні як неспецифічної, так і специфічної клітинної імунної відповіді [28, 29] та відомості про механізм дії ПВ, виготовленої з аутологічних пухлинних клітин за допомогою ЦЛ *B. subtilis B-7025* [27, 30], досліджували рівень продукції ФНП, ІЛ-1 і ІЛ-2 у тварин контрольних і дослідних груп.

При визначенні рівня ФНП встановлено, що у інтактних тварин титр ФНП складав $2,6 \pm 0,4 \log_2$, ІЦ Сн у розведенні 1 : 2 — $119,1 \pm 20,4\%$ (табл. 5).

Таблиця 5
Продукція ФНП у мишей з КЛЛ на 28-му добу пухлинного росту

Група мишей	Титр активності, \log_2	ІЦ, %			
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16
«ПВ»	$1,13 \pm 0,29$	$127,5 \pm 20,2$	$23,6 \pm 8,8$	0	0
«Субалін»	$< 1,0$	$23,6 \pm 10,9$	0	0	0
«ПВ + субалін»	$2,0 \pm 0,41$	$121,9 \pm 19,5$	$65,7 \pm 14,7$	$9,5 \pm 9,0$	0
«Контроль прищеплення»	$1,25 \pm 0,31$	$75,3 \pm 15,4$	$49,4 \pm 23,3$	0	0
«Інтактний контроль»	$2,6 \pm 0,40$	$119,1 \pm 20,4$	$107,9 \pm 7,7$	$62,9 \pm 6,8$	$6,7 \pm 2,1$

У мишей групи «контроль прищеплення» аналогічні показники вірогідно знижені ($p < 0,05$). У тварин, які отримували субалін у монорежимі, вони були суттєво нижчими навіть за значення «контролю прищеплення»; при використанні ПВ у монорежимі титр ФНП на рівні «контролю прищеплення», а ІЦ — на рівні інтактного контролю. При використанні ПВ з субаліном титр ФНП і ІЦ Сн у розведенні 1 : 2 були практично такими ж, як і в інтактних тварин. Слід також зазначити, що Сн інтактних тварин проявляли достовірну цитотоксичність у розведеннях 1 : 2—1 : 8, після введення субаліну — 1 : 2, ПВ або ПВ + субаліну — 1 : 4.

У табл. 6 наведені дані щодо продукції *in vitro* ІЛ-1 та ІЛ-2 спленоцитами мишей з КЛЛ. Встановлено, що на 28-му добу пухлинного росту у мишей групи «контроль прищеплення» титр активності ІЛ-1 був на рівні показника інтактних тварин і складав $2,0 \log_2$. Індекс стимуляції (ІС) дещо перевищував показники інтактного контролю: в розведенні 1 : 2 — $3,2 \pm 0,3$ ($0,05 < p < 0,01$), в 1 : 4 — $2,4 \pm 0,4$. Титри активності Сн спленоцитів мишей, які одержували ПВ з субаліном за комбінованою схемою або ПВ у монорежимі, достовірно не відрізнялися від таких в обох контрольних групах, ІС в розведенні Сн 1 : 2 мав тенденцію до зменшення порівняно з «контролем прищеплення». У мишей, які отримували лише субалін, титр активності ІЛ-1 і ІС були найнижчими ($p < 0,05$ порівняно з контрольними групами).

У цей же термін спостереження рівень продукції *in vitro* ІЛ-2 лімфоцитами тварин групи «контроль прищеплення» був суттєво вищим за показники інтактного контролю (у 2,3 раза, $p < 0,05$) (див. табл. 6).

Таблиця 6
Продукція *in vitro* ІЛ-1 та ІЛ-2 спленоцитами мишей з КЛЛ на 28-му добу пухлинного росту

Група мишей	Продукція ІЛ-1 моноцитами/макрофагами			Продукція ІЛ-2 Т-лімфоцитами
	Титр активності, \log_2	ІС, %		Титр активності, \log_2
		1 : 2	1 : 4	
«ПВ»	$1,3 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,4$	$< 1^*, **$
«Субалін»	$< 1,0$	$1,5 \pm 0,1^*, **$	$1,4 \pm 0,3$	$< 1^*, **$
«ПВ + субалін»	$1,0 \pm 0,6$	$2,4 \pm 0,3^{**}$	$1,9 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,01^{**}$
«Контроль прищеплення»	$2,0 \pm 0,0$	$3,2 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,4$	$3,57 \pm 0,08^*$
«Інтактний контроль»	$2,4 \pm 0,4$	$2,5 \pm 0,04$	$2,3 \pm 0,1$	$1,54 \pm 0,07$

* $p < 0,05$ порівняно з «інтактним контролем»; ** $p < 0,05$ порівняно з «контролем прищеплення».

У мишей, які отримували ПВ або субалін у монорежимі титри ІЛ-2 були $< 1 \log_2$, ($p < 0,05$ порівняно з обома контрольними групами). У мишей, які одержували ПВ у комбінації з субаліном, титр ІЛ-2 був суттєво нижчий за такий у «контролі прищеплення» та не відрізнявся від показника «інтактного контролю».

На нашу думку, заслуговує уваги, що у 20% мишей, які отримували ПВ і субалін за комбінованою схемою, пухлини не розвинулися взагалі (у інших групах прищеплення КЛЛ — 100%). Результати імунологічного дослідження цих тварин показали, що на 45-ту добу після прищеплення КЛЛ (коли всі тварини «контролю прищеплення» вже загинули) зберігалася суттєва активація клітин-ефекторів як неспецифічного (ІЦ ПМК $11,6 \pm 4,2$ проти $3,1 \pm 1,1\%$ у інтактних мишей, $0,05 < p < 0,1$; активність пулу Мф у НСТ-тесті $0,273$ проти $0,219$ опт. од. у інтактних тварин), так і специфічного (ІЦ ЦТЛ $26,4 \pm 7,2$ проти $2,1 \pm 1,4\%$ у інтактних мишей, $p < 0,05$) захисту, що, очевидно, і забезпечило стійкий проти-пухлинний ефект.

Таким чином, ранні стадії росту С-37 відбувалися у мишей груп «ПВ» і «ПВ + субалін» на фоні активації (порівняно з «контролем прищеплення») Мф і ПМК, у мишей групи «субалін» — активації тільки ПМК, що співпадає з мірою подовження латентного періоду в кожній з груп. Гальмування росту С-37 в усіх дослідних групах обумовлене, вірогідно, як активацією ефекторів неспецифічної резистентності (10-та—21-ша доба), так і формуванням специфічної цитотоксичної Т-клітинної відповіді. Остання була найвищою у групі мишей «ПВ + субалін», що добре узгоджується з найбільшим відсотком гальмуванням (див. рисунок). Максимальне подовження СТЖ у цій групі можна зв'язати з високою ЦТА Т-лімфоцитів у віддалені строки росту пухлин (21-ша—58-ма доба). Співставлення динаміки активності ЦТЛ у дослідних групах мишей дозволяє припустити, що у тварин групи «ПВ + субалін» гальмується розвиток пов'язаної з пухлинним ростом супресії Т-лімфоцитів.

На моделі КЛЛ підвищення дії ПВ при комбінованому використанні з субаліном за сукупністю показників ефективності було менш вираженим, що, можливо, пов'язане з властивостями клітин КЛЛ: резистентністю до дії ПМК і низькою імуногенністю [31]. Оскільки переважна більшість пухлин людини також має низьку імуногенність, особливої уваги заслуговує суттєве збільшення середнього ІГРП у мишей цієї групи, що, вірогідно, пов'язано з достовірною активацією специфічної імунної відповіді (див. табл. 4).

На 28-му добу показники продукції досліджених цитокінів (ФНП, ІЛ-1 і ІЛ-2) у мишей з КЛЛ, які отримували ПВ і субалін за комбінованою схемою, практично не відрізнялися від таких у інтактних тварин, у той час як в інших групах знижувались або підвищувалися з різним ступенем вірогідності. Це свідчить

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

про більш тривале збереження збалансованості механізмів регуляції як моноцитарної, так і лімфоцитарної ланок імунної системи при комбінованому впливі ПВ і субаліну порівняно з їх дією в монорежимі. Слід також зазначити, що в усіх дослідних групах показники активності Мф в НСТ-тесті і продукції ІЛ-1 були нижчими, ніж в «контролі прищеплення». Це можливо розцінити як позитивний прогностичний чинник, оскільки при вивченні механізмів дії ПВ, виготовленої з аутологічних пухлинних клітин за допомогою ЦЛ *B. subtilis* 7025, було виявлено сильну від'ємну кореляцію між гіперактивацією Мф у динаміці пухлинного росту і антиметастатичною дією вакцини [32]. Як відомо, гіперактивація Мф призводить до зміни їх функційного стану: з ефекторів реакцій неспецифічного імунітету вони перетворюються на їх супресори.

Таким чином, отримані результати дозволяють зробити висновок про перспективність комплексного застосування ПВ і пробіотичного препарату субалін, основою якого є рекомбінантний штам бактерій, що містить ген ІФ-альфа людини. Імуномодуючі властивості субаліну забезпечують вірогідне покращання ефективності вакцинотерапії експериментальних пухлин (у тому числі модельної метастазуючої пухлини — карциноми легені Льюїс). Враховуючи, що ПВ та субалін дозволені до клінічного використання в Україні, розроблену комбіновану схему застосування цих препаратів можна рекомендувати до клінічних випробувань.

ЛІТЕРАТУРА

1. Rosenberg S. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001; **411** (6835): 380–4.
2. Балдуева ІА. Противоопухолевые вакцины. *Практ онкол* 2003; **4** (3): 157–66.
3. Berzofsky JA, Terabe M, Oh S, *et al.* Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest* 2004; **113** (11): 1515–25.
4. Mesa C, Fernandez LE. Challenges facing adjuvants for cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol* 2004; **82** (6): 644–50.
5. Белоцкий СМ, Спивак НЯ. Интерфероны: биологические и клинические эффекты. Киев, 2006: 287 с.
6. Воронцова АЛ. Иммунотропное действие интерферонов и перспективы его клинического применения. *Иммунол и алергол* 2004; **1**: 69–70.
7. Воронцова АЛ, Кудрявец ЮИ. Интерферон как важный элемент оптимизации лечения онкологических больных. *Онкология* 2000; **2** (1–2): 16–20.
8. Kirkwood J. Cancer immunotherapy: The interferon- α Experience. *Semin Oncol* 2002; **29** (3), suppl 7: 18–26.
9. Жильчук ВЄ, Воронцова АЛ, Кудрявец ЮИ та ін. Вплив неоад'ювантної інтерферонотерапії на патоморфоз та імунохімічні особливості раку молочної залози. *Онкологія* 2005; **7** (2): 157–60.
10. Vaishampayan U, Abrams J, Darrach D, *et al.* Active immunotherapy of metastatic melanoma with allogeneic melanoma lysates and interferon alpha. *Clin Cancer Res* 2002; **8** (12): 3696–701.
11. Dillman RO, Wiemann M, Nayak SK, *et al.* Interferon-gamma or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor administered as adjuvants with a vaccine of irradiated autologous tumor cells from short-term cell line cultures: a randomized phase

2 trial of the cancer biotherapy research group. *J Immunother* 2003; **26** (4): 367–73.

12. Патент № 26068 Україна «Профілактичний біопрепарат субалін» / ВВ Смирнов (UA), СР Резник (UA), ІБ Сорокулова (UA), ЛС Сагдахчієв (RU), ВА Петренко (RU), АА Лычов (RU), ВА Белявская (RU), ІВ Тимофеев (RU); Опубл 30.04.99, Бюл (2).

13. Сорокулова ІЮ, Белявская ВА, Масычева ВИ, Ильичев АА. Рекомбинантные пробиотики: проблемы и перспективы использования для медицины и ветеринарии. *Вестн РАМН* 1997; **3**: 46–9.

14. Чердынцева НВ, Белявская ВА, Литвяков НВ и др. Влияние микробиотика субалина на функциональную активность и экспрессию цитокинов иммунокомпетентными клетками крови здоровых лиц. *Иммунол* 2001; (6): 54–8.

15. Белявская ВА, Игнатъев ГГ, Чердынцева НВ, Литвяков НВ. Адьювантные свойства рекомбинантного пробиотика субалина, продуцирующего интерферон. *Журн микробиол* 2001; (6): 77–82.

16. Чердынцева НВ, Литвяков НВ, Смольянинов ЕС и др. Модуляция противоопухолевой активности циклофосфана рекомбинантным пробиотиком субалином. *Вопр онкол* 1997; **43** (3): 313–6.

17. Потебня ГП, Сафронова ЛА, Черемшенко НЛ та ін. Вплив пробиотика субаліну на ефективність протипухлинної вакцини. *Мікроб журн* 2006; **68** (6): 51–8.

18. Литвяков НВ, Чердынцева НВ, Белявская ВА и др. Роль макрофагов в реализации антибластомного действия рекомбинантного пробиотика субалина. *Вопр онкол* 2001; **47** (1): 86–9.

19. Potebnya GP, Tanasienko OA, Titova GP, *et al.* Specificity and biological activity of cytotoxic lectins synthesized by *Bacillus subtilis* B-7025. *Exp Oncol* 2002; **24** (2): 150–2.

20. Сорокулова ІБ, Рыбалко СН, Руденко АА и др. Пробиотик субалин — принципиально новый подход к лечению бактериальных и вирусных инфекций. Киев, 2006. 36 с.

21. Рыкова МП, Спирадзе ИВ, Зедгенидзе МС, и др. Новая высокочувствительная техника тестирования нормальных киллеров. *Иммунол* 1981; (3): 88–90.

22. Передерий ВГ, Земсков АМ, Бычкова НГ, Земсков ВМ. Иммуный статус, принципы его оценки и коррекции иммунных нарушений. Киев, 1995: 61–2.

23. Fisch H, Gifford G. In vitro production of rabbit macrophage tumor cell cytotoxin. *Int J Cancer* 1983; **32** (1): 105–12.

24. Haskova V, Kaslik J, Matl I, Matejckova M. New technique of circulating immunocomplex estimation in human sera. *Cas Lek Cesk* 1977; **116** (14): 436–7.

25. Лимфоциты. Методы / Под ред Дж Клауса / Москва: Мир, 1990. 395 с.

26. Лакин ГФ. Биометрия. Москва: Высшая школа, 1980: 293 с.

27. Савцова ЗД, Усач ОМ, Восікова ІМ та ін. Особливості впливу протипухлинних вакцин (серія ІЕПОР), виготовлених за різними технологіями, на ефекторні реакції специфічного і неспецифічного імунітету. *Наукові записки НАУКМА. Серія: Біологія та екологія (Національний університет «Києво-Могилянська академія»)*, 2001; **19**: 26–31.

28. Возианов АФ, Бутенко АК, Зак КП. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. Киев: Наукова думка, 1989. 320 с.

29. Бережная НМ, Чехун ВФ. Иммунология злокачественного роста. Киев: Наук думка, 2005. 792 с.

30. Федосова НІ, Усач ОМ, Юдіна ОЮ та ін. Вплив протипухлинних аутовакцин на активність макрофагів. *Наукові записки НАУКМА. Серія: Біологія та екологія (Національний університет «Києво-Могилянська академія»)*, 2002; **20**: 441–4.

31. Усач ОМ. Особливості впливу вакцин, виготовлених на основі пухлинних клітин за різними технологіями, на

специфічні і неспецифічні реакції протипухлинного імунітету (експериментальні дослідження). [Дис ... канд біол наук]. Київ, 2003. 172 с.

32. Федосова НІ, Усач ОМ, Мельник ТВ та ін. Визначення кореляційних зв'язків між впливом протипухлинних вакцин серії ІЕПОР на дискретні імунологічні показники та ефективністю вакцинотерапії. Наукові записки НаУКМА. Серія: Біологія та екологія (Національний університет «Києво-Могилянська академія»), 2003; 22: 388–92.

SUBALIN PROBIOTIC PREPARATION INCREASES THE EFFICIENCY OF CANCER VACCINE

G.P. Potebnya, I.M. Voeykova, N.L. Cheremshenko, G.S. Lisovenko, N.V. Trokhimenko, V.N. Basas, L.P. Didkivska, O.M. Karaman, Z.D. Savtsova

Summary. *The paper presents the results of preclinical studies on evaluation of efficacy of the unique complex treatment scheme by cancer vaccine (CV), derived from cancer cells exposed to B. subtilis B-7025 cytotoxic lectins, and probiotic agent subalin. The advantages*

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
of the tested scheme include increase of tumor latent growth period, inhibition of tumor growth, and prolonged survival of mice with established tumors, as compared with CV used alone. Immunologic effects of complex CV and subalin application were evident by the enhancement of T lymphocyte cytotoxic activity on late stages of tumor growth, positive effect on macrophages activity dynamics, and stabilization of cytokines production (TNF- α , IL-1 and IL-2). The obtained results propose the perspectives of future clinical trials of CV combined with subalin.

Key Words: cancer vaccine, subalin, efficacy, preclinical trial.

Адреса для листування:

Потебня Г.П.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України