

О. А. Танасієнко, Г. П. Потебня, З. М. Олевінська,
член-кореспондент НАН України М. Я. Співак

Індукція синтезу інтерферону, обумовлена лектином бактеріального походження

*Вивчали вплив цитотоксичного лектину *Bacillus subtilis* B-7025 на продукцію сироваткового інтерферону (ІНФ) у інтактних тварин та в динаміці пухлинного росту у мишей з прищепленою саркомою 37. Показано, що введення мишам-пухлиноносцям бактеріального лектину стимулює продукцію та вихід ІНФ у кров. У мишей дослідних груп рівень сироваткового ІНФ зростає уже в перші години після введення лектину, при цьому спостерігається прямо пропорційна залежність його титрів від застосованої дози препарату. Максимальний показник титру ІНФ у мишей цих груп перевищував контрольні значення у тварин із пухлиною у 8–32 рази. Порівняння показників інтерферонового статусу з лейкоцитарною формулою крові виявило, що викликане лектином зростання рівня сироваткового ІНФ співвідноситься з підвищенням у периферичній крові вмісту моноцитарних та гранулоцитарних клітин.*

Серед численних цитокінів, які здійснюють регуляторні функції організму, важливе місце займають інтерферони (ІНФ), які неспецифічно підвищують резистентність організму при вірусній інфекції, беруть участь у міжклітинних взаємодіях та збереженні гомеостазу організму. Важливу роль відіграє система ІНФ і в протипухлинному імунітеті. ІНФ здатний впливати на перебіг пухлинного процесу кількома шляхами: справляє пряму цитотоксичну дію на трансформовані клітини та активує у них апоптоз, викликає антипроліферативний, диференціюючий та імунорегуляторний ефекти [1, 2], а також пригнічує реплікацію онкогенних вірусів [3]. Крім того, під впливом ІНФ відбувається прозапальна активація імунокомпетентних клітин [4], що надзвичайно важливо для онкологічних хворих, оскільки ця відповідь у них є зниженою.

Відомо, що інтерфероногенна активація в організмі може бути досягнута як за рахунок його екзогенного введення, так і в результаті стимуляції його синтезу. Досвід використання препаратів екзогенного ІНФ свідчить про їх ефективність при лікуванні ряду інфекційних та злоякісних захворювань [1–4]. Проте використання таких препаратів у клінічній практиці часто обмежується їх алергенністю, токсичністю, високою ціною. Подібних недоліків позбавлені ендогенні ІНФ, продукція яких здійснюється за допомогою препаратів-індукторів [5]. Їх активність пов'язана не тільки з індукцією власного ІНФ, але й з імуностимулюючою та імунокорегуючою дією при імунодефіцитних станах, який часто виникає при злоякісному процесі. Активаторами синтезу імунного ІНФ можуть виступати Т-клітинні мітогени, специфічні антигени, лектини, бактеріальні мікроорганізми і віруси.

Синтез ІНФ в організмі можна активувати рослинними лектинами, які здатні стимулювати секрецію та вихід імунних ІНФ як у системі *in vitro*, так і *in vivo*. Такі властивості характерні зокрема для лектинів омели, які посилюють синтез ІНФ при інкубації їх з Т-лімфоцитами. Вважається, що синтез даного класу ІНФ під впливом лектинів опосередковує стимулюючу дію цитотоксичної активності природних кілерних клітин [6]. Лектини поси-

люють також продукцію ІНФ в культурі мононуклеарних клітин периферичної крові людини. Стимулюючий ефект на продукцію ІНФ при пухлинному рості виявляють лектини рослини *Arbus precatorius*, що було встановлено у мишей із лімфомою Дальтона [7]. ІНФ гальмує ангиогенез, що було використано в клініці для терапії таких злоякісних новоутворень, як рак нирки та сечового міхура [8].

Що стосується лектинів бактеріального походження, то літературні відомості з цього питання вкрай обмежені. Показано, що лектини *Bacillus subtilis* 668 здатні стимулювати продукцію ІНФ [9]. Нами із культуральної рідини продуктивного бактеріального штаму *B. subtilis* В-7025 виділений лектин, який виявляє цитотоксичність щодо пухлинних клітин різного гістогенезу та протективний протипухлинний ефект на мишах з прищепленими пухлинами [10, 11]. Для даного бактеріального лектину показаний імуномодулюючий вплив на певні ланки імунної системи тварин [12, 13].

Метою даних досліджень було вивчення впливу цитотоксичного лектину (ЦЛ) *B. subtilis* В-7025 на продукцію сироваткового ІНФ крові інтактних тварин та в динаміці пухлинного росту мишей з прищепленою саркомою 37.

Матеріали і методи. У досліджах використовували мишей-самок лінії Balb/c віком 2–2,5 місяці, середньою масою 20–23 г розводки віварію Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Тварин утримували в стандартних умовах віварію з вільним доступом до води та корму. Як експериментальну модель пухлинного росту використовували саркому 37.

Сироватку крові, зібраної із хвостової вени тварин, отримували стандартним методом центрифугування при 1500 об/хв протягом 15 хв.

Титр ІНФ у крові визначали на первинній культурі мишачих фібробластів L-929 стандартним методом за гальмуванням цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту (ВВС) [14]. Суспензію культури клітин у повному середовищі RPMI-1640 вносили в лунки 96-лункового планшета по 100 мкл. Клітини інкубували при 37 °С у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO₂ (5%) протягом 18 год. Після цього в лунки із сироваткою експериментальних тварин (за винятком лунок “контроль клітин”) вносили по 100 мкл попередньо відтитрованого ВВС у дозі ТЦД50/0,1 мл. У лунки контролю клітин вносили по 100 мкл середовища. Клітини інкубували протягом 24 год при 37 °С в атмосфері 5% CO₂ до повного прояву цитопатичної дії ВВС у лунках “контроль вірусу”. Облік результатів проводили в мікропланшетах під інвертованим мікроскопом. За титр сироваткового ІНФ вважали розведення, при якому спостерігався захист 50% клітин від цитопатичної дії ВВС [14].

Для дослідження впливу лектину *B. subtilis* В-7025 на продукцію сироваткового ІНФ у інтактних мишей та пухлиноносіїв застосовували дози препарату 2,5 та 5,0 мг/кг маси тварин. Лектин вводили на наступну добу після прищеплення пухлинних клітин. Рівень продукції раннього ІНФ визначали в динаміці через 1, 3, 6 та 24 год.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики.

Результати досліджень та їх обговорення. Вже протягом перших годин після введення лектину інтактним мишам титри сироваткового ІНФ в обох дослідних групах мишей, які отримували різні концентрації лектину, зростали. При цьому відмічено чітку закономірність між титрами ІНФ та застосованою дозою бактеріального лектину (рис. 1). На 1-шу годину після ін'єкцій лектину інтактним мишам титр ІНФ в обох дослідних групах зростав у чотири рази порівняно з контролем. У групі мишей, яким вводили ЦЛ у дозі 5,0 мг/кг, на 3-тю годину цей показник досягав максимальних значень і відповідно у 16 і 8 разів

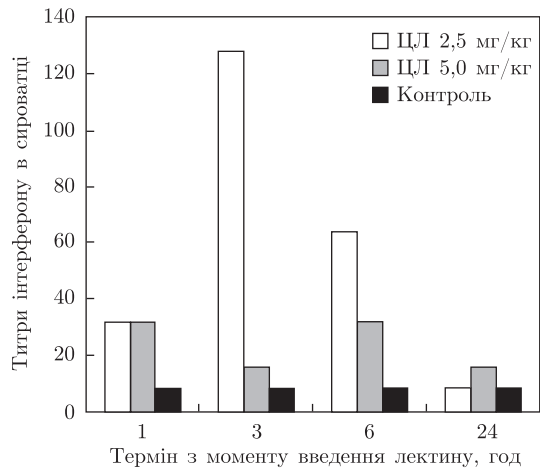


Рис. 1. Титри інтерферону в сироватці крові інтактних мишей при введенні різних концентрацій бактеріального лектину

перевищував значення титру ІНФ контролю та мишей, які отримували вдвічі нижчу дозу лектину. Однак, починаючи з 6-ї години після введення ЦЛ, рівень ІНФ у мишей обох дослідних груп поступово знижувався і на 24-ту годину практично досягав рівня контрольного показника.

При дослідженні впливу лектину на продукцію ІНФ у мишей із прищепленою саркомою 37 препарат вводили через добу після прищеплення пухлинних клітин. Необхідно відзначити, що прищеплення пухлинних клітин практично не призводило до активації синтезу ІНФ. Як видно з табл. 1, у мишей із пухлиною (III група) титр ІНФ на наступну добу після прищеплення пухлинних клітин збільшувався лише вдвічі порівняно з титром інтактних мишей (IV група), а ще через добу він повертався до контрольних рівнів.

Натомість введення мишам-пухлиноносцям бактеріального лектину супроводжувалось значним підвищенням титрів ІНФ у крові. У мишей обох дослідних груп рівень сироваткового ІНФ зростав уже в перші години після введення ЦЛ. При цьому спостерігалась прямо пропорційна залежність титру ІНФ від дози введенного лектину. У мишей, які одержували дозу лектину 5 мг/кг маси, рівень ІНФ був найвищим протягом всього досліджуваного періоду і досягав максимуму на 6-ту годину після введення лектину, не знижуючись навіть на 24-ту годину. Максимальний показник титру ІНФ у мишей цієї групи перевищував контрольні значення тварин із пухлиною в 32 рази. При застосуванні вдвічі меншої дози лектину на 3-тю год після його введення титр ІНФ також був вищим порівняно з контрольною групою. Однак вже через добу після введення лектину рівень ІНФ зменшувався майже до контрольних показників (див. табл. 1).

Важливо саме те, що активація лектином синтезу ІНФ у мишей з пухлиною перевищувала таку в інтактних мишей і на 6–24-ту годину досягала максимальних значень. Титри ІНФ у сироватці пухлиноносців перевищували такі в індукованих лектином інтактних мишей у 4 рази (256 проти 64). Це свідчить про те, що у мишей-пухлиноносців введення лектину більш виразно мобілізує імунну відповідь організму за рахунок синергічної дії лектину та різних типів клітин імунокомпетентних органів.

Оцінюючи показники інтерферонового статусу, слід враховувати, що при багатьох патологічних станах у периферичній крові може змінюватись кількість лейкоцитів. У зв'язку

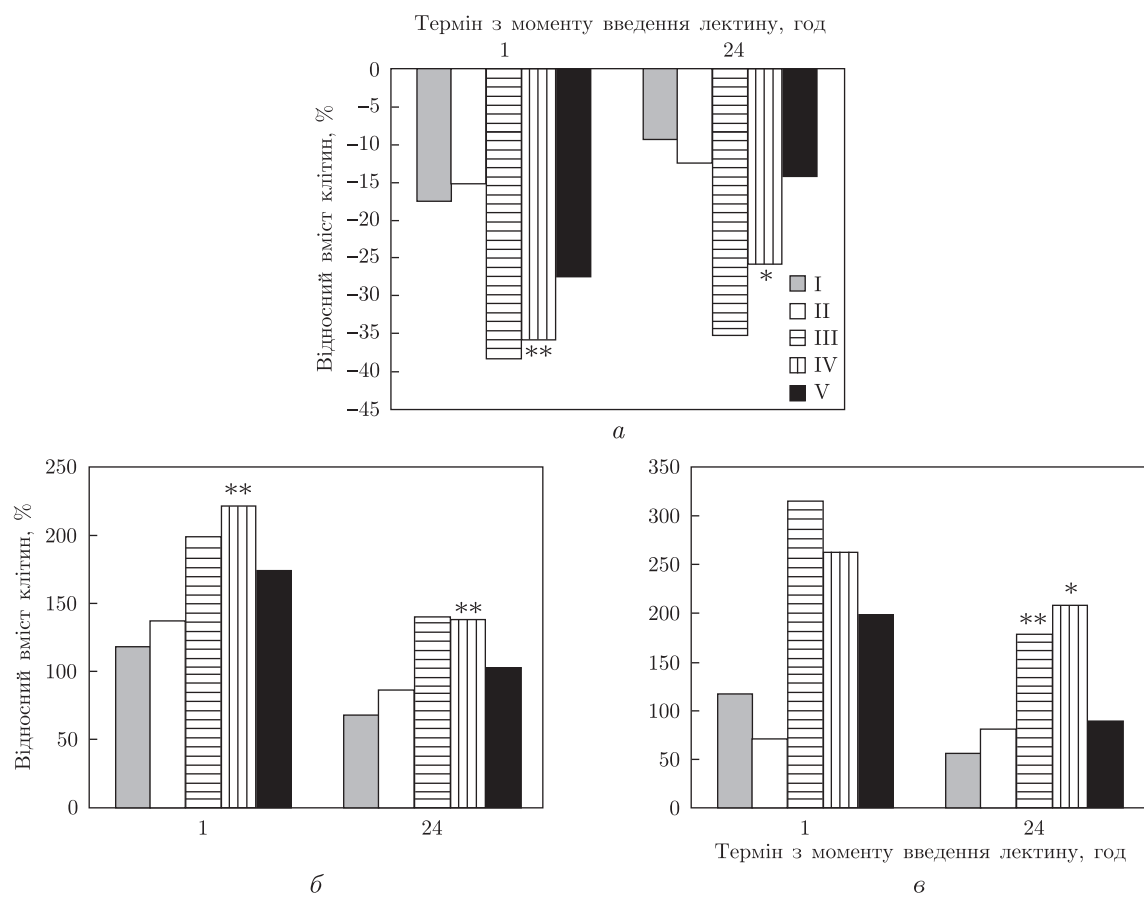


Рис. 2. Зміни лейкоцитарної формули крові під впливом бактеріального лектину у мишей в нормі та з прищепленою саркомою 37 (а — лімфоцити, б — моноцити, в — гранулоцити).

I, II — групи мишей, яким вводили ЦЛ у дозі 2,5 та 5,0 мг/кг маси відповідно;

III, IV — групи мишей, яким після прищеплення пухлини вводили ЦЛ у дозі 2,5 та 5,0 мг/кг маси відповідно; V — контрольні миші з прищепленою саркомою 37.

* $p < 0,05$ порівняно з показниками V групи. ** $0,1 < p < 0,05$ порівняно з показниками V групи

з цим рекомендується проводити аналіз продукції ІНФ одночасно з оцінкою лейкоцитарної формули крові [15]. Необхідно відзначити, що за даними гематограми у всіх дослідних групах загальне число лейкоцитів у крові зменшувалося вже на 1-шу годину після введення лектину до 35% порівняно з інтактним контролем, головним чином за рахунок зниження абсолютного вмісту лімфоцитарних клітин (рис. 2). Їх низький рівень майже не змінювався і через 24 год після введення лектину. Водночас як абсолютний, так і відносний вміст

Таблиця 1. Титри ІНФ у сироватці крові мишей з прищепленою саркомою 37 при введенні різних концентрацій бактеріального лектину

Номер групи	Група	Доза лектину, мг/кг маси	Титр ІНФ через			
			1 год	3 год	6 год	24 год
I	ЦЛ	2,5	16	64	64	16
II	ЦЛ	5,0	128	128	256	256
III	Контроль _{пухл}	—	16	16	8	8
IV	Контроль _{інт}	—	8	8	8	8

моноцитів та гранулоцитарних клітин у периферичній крові тварин зростає. При введенні лектину після прищеплення пухлинних клітин кількість моноцитів на першу годину достовірно підвищувалася в 2 рази, а гранулоцитів — у 3 рази відносно інтактного контролю, причому високий рівень їх вмісту спостерігався і на 24-ту годину: у випадку моноцитів він все ще був достовірно вищим на 35% та удвічі вищим для гранулоцитів ($p < 0,05$) порівняно з контрольними тваринами. Достовірної різниці між групами мишей із саркомою 37, що отримували різні дози лектину, не спостерігалось (див. рис. 2).

У інтактних мишей відзначалася подібна реакція, проте її рівень був нижчим порівняно з групами тварин із пухлиною. Достовірне подвоєння числа моноцитів та гранулоцитів у мишей I та II груп відмічалось при застосуванні різних доз ЦЛ. На 24-ту годину у мишей, яким вводили ЦЛ у дозі 2,5 мг/кг (I група) відносний вміст гранулоцитів та моноцитів зменшувався у два рази. При введенні ЦЛ у дозі 5,0 мг/кг (II група) кількість моноцитів зменшувалася на 50% від попередніх значень, тоді як кількість гранулоцитів залишалася на тому ж рівні (див. рис. 2). Результати досліджень свідчать про те, що зростання рівня сироваткового ІНФ, викликане бактеріальним лектином, чітко співвідноситься з підвищенням у периферичній крові вмісту моноцитарних та гранулоцитарних клітин.

Таким чином, позаклітинні цитотоксичні лектини з *B. subtilis* B-7025 є сильними індукторами синтезу природного ІНФ, який відіграє одну з ключових ролей у протипухлинному захисті організму.

1. Белоцкий С. М., Спивак Н. Я. Интерфероны: биологические и клинические эффекты. – Киев: Фитосоцицентр, 2006. – 288 с.
2. Goodbourn S., Didcock L., Randall R. E. Interferons: cell signaling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures // J. Gen. Virol. – 2000. – **81**. – P. 2341–2364.
3. Воронцова А. Л., Кудрявец Ю. И. Интерферон как важный элемент оптимизации лечения онкологических больных // Онкология. – 2003. – **5**, № 2. – С. 155–160.
4. Лазаренко Л. Н., Спивак Н. Я., Михайленко О. Н. и др. Папилломавирусная инфекция и система интерферона. – Киев: Фитосоцицентр, 2008. – 288 с.
5. Малащенко И. К., Тазулахова Є. Б., Дитковський Н. А. Интерфероны и индукторы их синтеза // Терапевт. архив. – 1998. – № 11. – С. 35–39.
6. Mueller E. A., Anderer F. A. Viscum album oligosaccharide activating human natural cytotoxicity is an interferon gamma inducer // Cancer Immunol. Immunother. – 1990. – **32**, No 4. – P. 221–227.
7. Bhutia S. K., Mallick S. K., Maiti T. K. In vitro immunostimulatory properties of Abrus lectins derived peptides in tumor bearing mice // Phytomedicine. – 2009. – **16**, No 8. – P. 776–782.
8. Воронцова А. Л., Безденежних Н. О., Жильчук В. Є., Кудрявец Ю. Й. Пригнічення інтерферон-альфа експресії VEGF в пухлинних клітинах та його рівня в сироватці крові онкологічних хворих // Урологія. – 2009. – № 3. – С. 48–52.
9. Kishko Y. G., Vasilenko M. I., Podgorsky V. C., Kovalenko E. A. Lectin of *Bacillus subtilis* sp. as overinducer of g-interferonogenesis // Мікробіол. журн. – 1997. – **59**, No 6. – С. 20–26.
10. Потебня Г. П., Танасієнко О. А., Тітова Г. П. та ін. Спосіб підвищення протипухлинної резистентності організму // Патент на винахід № 93275, Україна. – 2011, Бюл. № 2.
11. Танасієнко О. А., Тітова Г. П., Рудик М. П., Потебня Г. П. Індукція протипухлинної резистентності у мишей цитотоксичним лектином бактеріального походження // Мікробіологія і біотехнологія. – 2010. – № 2. – С. 59–66.
12. Танасієнко О. А., Рудик М. П., Позур В. В., Потебня Г. П. Influence of bacterial lectins on some reactions of nonspecific immunity in mice during tumor development // Exp. Oncol. – 2010. – **32**, No 4. – P. 254–257.
13. Танасієнко О. А., Рудик М. П., Тітова Г. П., Потебня Г. П. Вплив різних схем застосування бактеріальних лектинів на реакцію лімфоїдних органів мишей в процесі пухлинного росту // Доп. НАН України. – 2010. – № 11. – С. 162–172.
14. Современные методы диагностики вирусных респираторных инфекций и их терапии с использованием препаратов интерферона: Метод. рекомендации / Под. ред. А. Ф. Модзелевского, Н. С. Дяченко, Н. Я. Спивака. – Киев, 1994. – 18 с.

15. Григорян С. С., Иванова А. И., Еришов Ф. И. Определение интерферонов статуса в цельной крови у людей при массовых обследованиях. – Москва, 1989. – 23 с.

Институт експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького
НАН України, Київ
Институт мікробіології та вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

Надійшло до редакції 26.06.2012

О. А. Танасиенко, Г. П. Потебня, З. М. Олевинская,
член-корреспондент НАН Украины **Н. Я. Спивак**

Индукция синтеза интерферона, обусловленная лектином бактериального происхождения

Изучали влияние цитотоксического лектина Bacillus subtilis B-7025 на продукцию сывороточного интерферона (ИНФ) у интактных животных и в динамике опухолевого роста у мышей с привитой саркомой 37. Показано, что введение мышам-опухоленосителям бактериального лектина стимулирует продукцию и выход ИНФ в кровь. У мышей опытных групп уровень сывороточного ИНФ увеличивается уже в первые часы после введения лектина, при этом наблюдается прямо пропорциональная зависимость его титров от использованной дозы препарата. Максимальный показатель титра ИНФ у мышей этих групп превышал таковой у животных с опухолью в 8–32 раза. При сравнении показателей интерферонов статуса с лейкоцитарной формулой крови установлено, что вызванное лектином увеличение уровня сывороточного ИНФ соотносится с повышением в периферической крови содержания моноцитарных и гранулоцитарных клеток.

О. А. Tanasienko, G. P. Potebnya, Z. M. Olevinska,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **M. Ya. Spivak**

Induction of interferon synthesis caused by bacterial lectin

We have investigated the effects of cytotoxic lectin Bacillus subtilis B-7025 on the serum interferon (INF) production in intact animals and the dynamics of tumor growth in mice inoculated with sarcoma 37. It is shown that the administration of bacterial lectin to tumor-bearing mice stimulates the INF production and its release into blood. We have observed a significant dose-dependent increase of the serum INF level in experimental mice since the first hours after the lectin's administration. The maximum serum INF titer of mice of these groups exceeded the control values by 8–32 times. It is shown also that an elevation of the serum INF level caused by lectin correlates with increasing the number of monocytes and granulocytes in peripheral blood.