

УДК: 616-006-085:615.371:612.017.1:57.084

*Савцова З. Д., Усач О. М., Юдіна О. Ю., Федосова Н. І., Євстрат'єва Л. М.,
Воейкова І. М., Лісовенко Г. С., Потебня Г. П.*

ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ НАДМАЛИХ ТА АЛОПАТИЧНИХ ДОЗ ПРОТИПУХЛИННОЇ АУТОВАКЦИНИ У МИШЕЙ З КАРЦИНОМОЮ ЛЬЮЇС

*Наведено відомості про вплив алопатичних та гомеопатичних доз вакцини, виготовленої з пухлинних клітин шляхом їх обробки фільтратом культуральної рідини росту *Vac. subtilis* 7025, на ріст і метастазування карциноми легені Льюїс, специфічні та неспецифічні реакції протипухлинного імунітету, продукцію *in vitro* неприлипаючою фракцією спленоцитів ПЛ-2.*

Уже досить давно відомі імунопотенціююча та протипухлинна й антиметастатична дії низьких доз модифікаторів біологічних реакцій та малих (не цитотоксичних) доз хіміотерапевтичних

препаратів, наприклад, циклофосфаміду [1-3]. Питання щодо вивчення ефектів дії надмалих доз біологічно активних речовин залишається актуальним і на сьогодні [4, 5]. Не меншу увагу при-

вертають і дослідження, присвячені Імунотерапії пухлин, зокрема розробці протипухлинних вакцин, які б індукували ефективну імунну відповідь проти залишкових (у разі оперативного втручання) або метастатичних пухлинних клітин [6-8].

В ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України розроблено оригінальну методику приготування протипухлинної аутовакцини з клітин пухлини з використанням фільтрату культуральної рідини (ФКР) росту *Bac. subtilis* 7025 [9]. Застосування такої вакцини в експерименті призводило до значного посилення протипухлинної резистентності організму [10-12]; при клінічному використанні — супроводжувалось зниженням частоти виникнення рецидивів і метастазів та збільшенням 3-річної виживаності хворих розповсюдженим колоректальним раком [13], зниженням частоти виникнення рецидивів і збільшенням 5-річної виживаності хворих на рак легені III А-стадії [14]. Встановлено, що виражена протипухлинна та антиметастатична активність такої вакцини зумовлена активацією на ранніх етапах пухлинного процесу всіх типів лімфоцитів-ефекторів протипухлинних реакцій (ПК, ЦТЛ, ефекторів АЗКЦ), а також макрофагальної ланки протипухлинної резистентності [12,15], що збігається з індукцією ЛАК-феномену та зі значною активацією в ранні терміни спостереження продукції ПК та МФ таких цитокінів, як ІЛ-2, ІЛ-1 та ФНП відповідно [16]. Також було показано, що ефективність аутологічної вакцини, виготовленої з пухлинних клітин за допомогою ФКР росту *Bac. subtilis* 7025, у мишей $C_{57}BL/6$ значною мірою залежить від схеми та дози її застосування [15]. Тому досить логічним, на нашу думку, було б порівняльне дослідження дії такої вакцини в алопатичних та гомеопатичних дозах на специфічні та на неспецифічні ланки протипухлинного імунітету, а також на продукцію спленоцитів ІЛ-2, які відіграють важливу роль в активації клітинної імунної відповіді, у формуванні ЛАК-феномену [15, 17, 18], а також входить до комплексу природних цитокінів, який активує макрофагальну ланку імунітету [19].

Отже, метою даної роботи стало вивчення в процесі експерименту антиметастатичної та імунологічної дії надмалих доз протипухлинної вакцини, що використовується для імунотерапії при злоякісних новоутвореннях.

Матеріали та методи

Досліди проводили на статевозрілих мишах-самках лінії $C_{57}BL/6$ віком 2,5 міс., розведення віварію ШПОР НАН України, на моделі метастазуючої пухлини - карциноми легені Льюїс (КЛЛ).

Імунізацію досліджуваною вакциною, виготовленою з пухлинних клітин із використанням ФКР росту *Bac. subtilis* 7025, проводили після оперативного видалення первинної пухлини або ж у неоперованих тварин. Використовували алопатичні та гомеопатичні дози препарату (розведення 6С (10^{-12}) за сотенною шкалою згідно із §4 Гомеопатичної фармакопеї шляхом послідовних розведень). Приготування вакцини, схему введення (в алопатичній дозі), методику перешеплення пухлин, проведення операції, оцінку ефективності вакцинації детально описано раніше [12, 15, 16].

Імунологічне обстеження тварин проводили на 18-, 38- та 45-ту добу пухлинного процесу. Контролем в імунологічних дослідженнях слугували інтактні тварини, а також невакциновані миші, яким було перешеплено КЛЛ, тієї ж лінії, статі та віку. Спленоцити, природні кілери (ПК) із селезінки, макрофаги (МФ) із перетонеального змиву, сироватку крові (СК) отримували рутинними методами [20, 21]. Оцінювали цитотоксичну активність ПК, цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ), МФ, СК та вплив останньої на активність ефекторів специфічного (антитілозалежна клітинна цитотоксичність - АЗКЦ) та неспецифічного (рівень природного цитолізу - ПК + СК) протипухлинного клітинного імунітету; також визначали спонтанну продукцію *in vitro* неприлипаючої фракцією спленоцитів ІЛ-2. Всі методи дослідження детально описані раніше [12,15,16, 22]. Статистичну обробку результатів проводили з використанням t -критерію Стьюдента та критерію Пірсона (χ^2) [23].

Результати дослідження

Застосування гомеопатичних доз вакцини у прооперованих мишей призводило до зменшення частоти рецидивів та гальмування росту рецидивних пухлин порівняно як з невакцинованими, так і з імунізованими алопатичними дозами вакцини мишами. Частота виникнення рецидивів у групі мишей, яким вводили гомеопатичні дози вакцини, була суттєво меншою, ніж при застосуванні алопатичних доз ($14,3 \pm 9,4$ проти $46,2 \pm 13,8$ %, $p < 0,05$) (табл. 1). У цій групі тварин також спостерігали збільшення індексу інгібіції метастазування (ІМ) - $77,2$ проти $22,5$ % відповідно, зменшення кількості (відповідно в 2,5 і 3 рази порівняно з тваринами, у яких застосували алопатичні дози, і з невакцинованими) та об'єму (в 9,0 та 20,2 рази відповідно) метастазів (рис. 1). Тобто використання гомеопатичних доз протипухлинної вакцини мало значно більший

Таблиця 1. Перебіг пухлинного процесу у прооперованих імунізованих та неімунізованих мишей $C_{57}Bl$

Група тварин	Частота виникнення пухлин, %	Частота виникнення рецидивів, %	Розмір рецидивних пухлин на 38-му добу, мм	Кількість мишей, що загинули протягом терміну спостереження, %
Вакцинація алопатичними дозами	$93,3 \pm 6,2^1$ (13/13) ²	$46,2 \pm 13,8$ (6/13) ²	$1751,4 \pm 432$	$71,4 \pm 17,1$ (5/7) ²
Вакцинація гомеопатичними дозами	$93,7 \pm 5,9^1$ (14/14) ²	$14,3 \pm 9,4^3$ (2/14) ²	332,7	$37,5 \pm 17,4$ (3/8) ²
Невакциновані тварини	$95,0 \pm 4,8^1$ (18/18) ²	$36,4 \pm 14,5$ (4/11) ²	$1537,0 \pm 400$	$40,0 \pm 21,9$ (2/5) ²

¹ Розраховано з поправкою Ван дер Вардена.

² У чисельнику — кількість тварин, які мають досліджувану ознаку, в знаменнику — кількість тварин у групі.

³ $p < 0,05$ порівняно з групою мишей, яким вводили вакцину в алопатичних дозах.

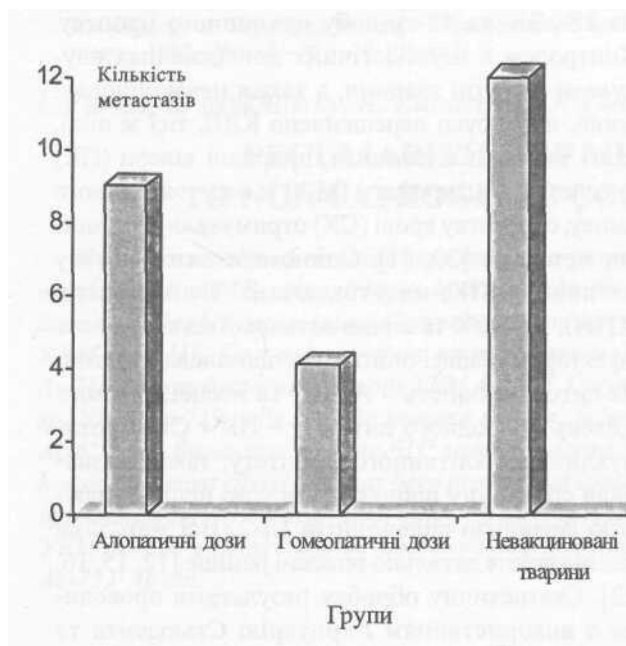


Рис. 1. Кількість метастазів на 38-45-ту добу пухлинного росту у прооперованих вакцинованих та невакцинованих мишей

позитивний вплив на перебіг пухлинного процесу у прооперованих мишей, ніж застосування цієї вакцини в алопатичних дозах.

У групах невакцинованих мишей та імунізованих алопатичними дозами вакцини всі тварини з рецидивами загинули протягом 10 діб після закінчення вакцинації. Тому в усіх групах проведено імунологічне обстеження мишей без рецидивів. Незважаючи на більш виражений антиметастатичний ефект, за таких умов не виявлено підвищення цитотоксичної активності ПК, ЦТЛ, МФ на 29-ту добу після операції (45-та доба пухлинного процесу, через 14 діб після закінчення вакцинування) у тварин, імунізованих гомеопатичними дозами вакцини (табл. 2). Можливо, що для визначення імунологічних механізмів гальмування розвитку рецидивів і метастазів у прооперованих тварин при застосуванні гомеопатичних доз вакцини, виготовленої з використанням ФКР росту *Vac. subtilis* 7025, потрібне дослідження протягом вакцинального процесу або безпосередньо після нього.

Таблиця 2. Зміни імунологічних показників у вакцинованих та невакцинованих мишей $C_{57}Bl$ після оперативного видалення первинної пухлини

Індекс цитотоксичності, %	Інтактний контроль	Доба пухлинного росту			
		18-та	45-та		
		Невакциновані миші	Вакцинація алопатичними дозами	Вакцинація гомеопатичними дозами	Невакциновані миші
ПК	$25,2 \pm 3,2$	$2,2 \pm 2,0^1$	$17,5 \pm 2,5$	$10,8 \pm 1,3^{1,3}$	$13,1 \pm 2,4^1$
ЦТЛ	$3,1 \pm 2,0$	$8,1 \pm 2,1$	$2,2 \pm 2,0$	0 ± 0^3	$4,3 \pm 3,2$
ПК + сироватка	$31,1 \pm 2,7$	$33,4 \pm 3,9$	$19,0 \pm 2,3^1$	$10,6 \pm 1,6^{1,2,3}$	$25,4 \pm 2,9$
АЗКЦ	$3,1 \pm 3,1$	$12,2 \pm 3,1$	$1,3 \pm 1,0$	$1,0 \pm 0,9$	0 ± 0
Сироватки крові: мішені ККЛ	$15,4 \pm 5,6$	$3,0 \pm 2,3$	$2,6 \pm 1,9$	$1,3 \pm 1,0^1$	$2,1 \pm 1,1$
мішені К-562	$25,0 \pm 4,5$	$28,1 \pm 4,7$	$17,3 \pm 1,3$	$12,4 \pm 1,8^1$	$12,4 \pm 3,1$
Макрофагів: мішені ККЛ	$15,7 \pm 3,5$	$1,3 \pm 0,8^1$	0 ± 0^1	0 ± 0^1	0 ± 0^1
мішені К-562	$43,0 \pm 4,5$	$15,2 \pm 5,3^1$	$12,7 \pm 1,7^1$	$6,8 \pm 3,7^1$	$8,7 \pm 1,6^1$

¹ $p < 0,05$ порівняно з інтактним контролем.

² $p < 0,05$ порівняно з невакцинованими тваринами.

³ $p < 0,05$ порівняно з групою, вакцинованою алопатичними дозами.

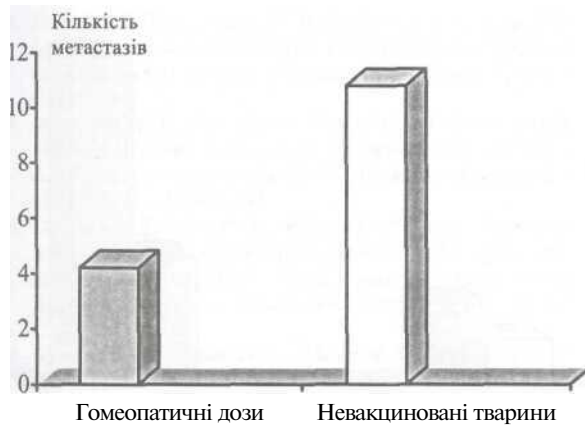


Рис. 2. Кількість метастазів на 38-45-ту добу пухлинного росту у неоперованих невакцинованих мишей та тварин, які отримували вакцину в гомеопатичній дозі

За наявності первинної пухлини (у неоперованих тварин) застосування гомеопатичних доз вакцини (з 16-ї по 31-шу добу пухлинного росту) не супроводжувалось зменшенням розмірів пухлин. На 38-му добу пухлинного росту останні досягали $1691,7 \pm 33,5 \text{ мм}^3$ у групі тварин, яким вводили вакцину, та $1379,2 \pm 108,0 \text{ мм}^3$ у групі невакцинованих мишей. Проте в цей термін у тварин, імунізованих гомеопатичними дозами протипухлинної вакцини, відзначали тенденцію до зменшення частоти метастазування ($44,4 \pm 16,6$ проти $83,3 \pm 15,2 \%$), кількості ($4,2 \pm 2,2$ проти $10,8 \pm 2,2$) та об'єму ($7,7 \pm 4,9$ проти $44,6 \pm 19,1 \text{ мм}^3$) метастазів (рис. 2); ПМ становив $80,5 \%$. Середня тривалість життя імунізованих і неімунізованих мишей суттєво не відрізнялась, але в контрольній групі більшість (80 %) тва-

рин загинула до 40-ї доби пухлинного росту, а в дослідній - 66,7 % прожили 45-60 діб. Під час дослідження цитотоксичної активності ефекторів специфічного й неспецифічного імунітету на 38-му добу після перещеплення КЛЛ у контрольних та імунізованих мишей спостерігали суттєве збільшення активності ПК і ЦТЛ ($p < 0,05$) порівняно з аналогічними показниками на 18-ту добу (табл. 3). У групі вакцинованих гомеопатичною дозою тварин відзначали тенденцію до підвищення Щ ЦТЛ (в 1,6 раза), АЗКЦ (в 1,3 раза) та суттєве збільшення Щ МФ ($p < 0,05$) порівняно з показниками невакцинованих (див. табл. 3). Отримані результати дозволяють припустити, що процес метастазування у неоперованих мишей, імунізованих гомеопатичними дозами протипухлинної вакцини, уповільнюється внаслідок імунологічно опосередкованого механізму.

При дослідженні активності ІЛ-2 показано, що в оперованих невакцинованих тварин на 18-ту добу пухлинного процесу суттєво збільшувалась продукція ІЛ-2 (індекс модуляції (ІМ) $37,5 \%$ порівняно з інтактними мишами, $p < 0,05$); далі у міру прогресування пухлинного процесу спостерігали її зниження (на 45-ту добу спостереження $p < 0,05$). У групі тварин, яким після операції вводили вакцину в алопатичних дозах, динаміка й рівні продукції ІЛ-2 були такими ж, як і в групі невакцинованих мишей — вірогідне зниження росту ($p < 0,05$) на 45-ту добу. При введенні гомеопатичних доз вакцини продукція ІЛ-2 не мала вірогідного зниження порівняно з показниками на 18-ту добу пухлинного процесу (рис. 3, а).

У неоперованих тварин застосування гомеопатичних доз вакцини призводило до вірогідного

Таблиця 3. Зміни імунологічних показників неоперованих мишей С₃В₁, імунізованих гомеопатичними дозами протипухлинної вакцини, виготовленої з використанням ФКР росту *Bac. subtilis* 7025, та невакцинованих

Індекс цитотоксичності, %	Інтактний контроль	Доба пухлинного росту		
		18-та	38-ма	
		Невакциновані миші	Вакцинація гомеопатичними дозами	Невакциновані миші
ПК	$25,2 \pm 3,2$	$16,7 \pm 3,3$	$41,7 \pm 7,8^2$	$50,3 \pm 7,8^{1,2}$
ЦТЛ	$3,1 \pm 2,0$	$0,7 \pm 0,4$	$25,6 \pm 9,6^2$	$16,1 \pm 4,4^{1,2}$
ПКК + сироватка	$31,1 \pm 2,7$	$27,1 \pm 2,8$	$47,2 \pm 4,3^{1,2}$	$51,2 \pm 3,6^{1,2}$
АЗКЦ	$3,1 \pm 3,1$	$9,3 \pm 2,7$	$24,4 \pm 6,5^1$	$18,9 \pm 8,2$
Сироватки крові: мішені ККЛ мішені К-562	$15,4 \pm 5,6$	$3,4 \pm 2,0$	$23,2 \pm 7,1^2$	$18,1 \pm 10,9$
	$25,0 \pm 4,5$	$41,5 \pm 2,4^1$	$29,9 \pm 8,7$	$46,3 \pm 6,7$
Макрофагів: мішені ККЛ мішені К-562	$1,3 \pm 0,8$	$5,7 \pm 2,9$	$22,7 \pm 8,6^1$	$24,0 \pm 5,3^{1,2}$
	$43,0 \pm 4,5$	$38,1 \pm 4,9$	$50,7 \pm 5,3^3$	$25,1 \pm 8,1$

¹ $p < 0,05$ порівняно з інтактними тваринами.

² $p < 0,05$ порівняно з невакцинованими тваринами на 18-ту добу пухлинного росту.

³ $p < 0,05$ порівняно з невакцинованими тваринами на 38-му добу пухлинного росту.

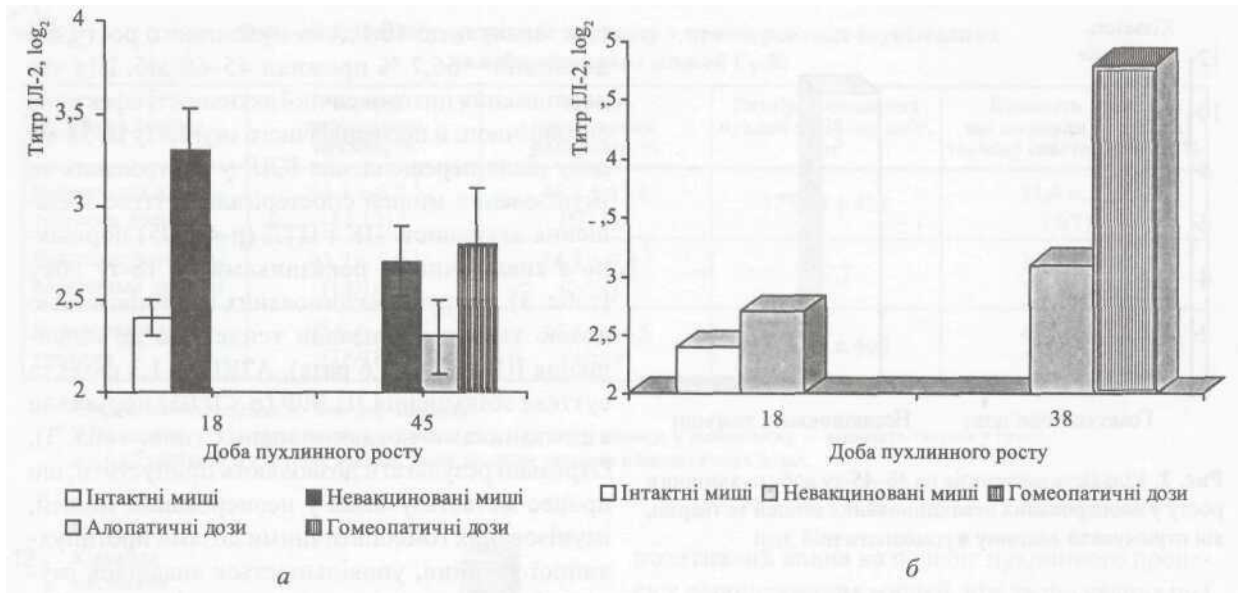


Рис. 3. Вплив алопатичних і гомеопатичних доз протипухлинної вакцини на продукцію *in vitro* ІЛ-2 спленцитами оперованих (а) і неоперованих (б) мишей $C_{57}Bl$

підвищення продукції ІЛ-2 порівняно як з інтактним контролем ($4,8 \pm 0,1$ проти $2,4 \pm 0,1 \log_2$, $p < 0,05$), так і з невакцинованими тваринами ($4,8 \pm 0,1$ проти $3,1 \pm 0,4 \log_2$, $p < 0,05$) на 38-му добу пухлинного росту (рис. 3). Одержані результати свідчать, що застосування вакцини, виготовленої з пухлинних клітин із використанням ФКР росту *Bac. subtilis* 7025, в гомеопатичних дозах дає змогу підтримувати продукцію ІЛ-2 на більш сприятливому для гальмування росту рецидивів та метастазів рівні. Особливий інтерес викликає те, що цей феномен спостерігається і за наявності в організмі значної пухлинної маси (неоперовані тварини).

Таким чином, встановлено, що за умов як збереження первинної пухлини, так і після її оперативного видалення застосування дослідженої протипухлинної вакцини в гомеопатичних дозах дозволяє досягти кращого ефекту, ніж введення алопатичних доз такої ж вакцини. Видаються перспективними подальші дослідження у цьому напрямі з метою обґрунтування використання вакцин, виготовлених на основі пухлинних клітин за допомогою продуктів життєдіяльності мікроорганізму *Bac. subtilis* 7025, у гомеопатичних дозах у хворих онкологічного профілю, в тому числі й тих, які не підлягають радикальній операції.

- Ozer H. Effects of alkylating agents on immunoregulatory mechanisms biological response // Cancer-1985- Vol. 3-Р. 95-130.
- Киселева Е. Т., Солякова Т. И., Луговская Н. Ю., Коновалова Н. П. Повышение эффективности химиотерапии экспериментальных рецидивировующих опухолей // Эксперим. онкология. - 1991. - № 5- С. 52-55.
- Потебня Г. П., Загадчук Н. Л., Литвиненко А. А., Кейсевич Л. В. Использование фитоадаптогенов для усиления противоопухолевой активности вакцин // Архив онкологии. - 1996. - № 1- С. 130-131.
- Vaishampayan U., Abrams J., Darrach D. et al. Active immunotherapy of metastatic melanoma with allogeneic melanoma lysates and interferon alpha // Clin. Cancer Res.- 2002.- Vol. 8.- № 12.- Р. 3696-3701.
- Ruble H., Coze S., Plantaz D. et al. Localised and unresectable neuroblastoma in infants: excellent outcome with low-dose primary chemotherapy // Br. J. Cancer.- 2003.- Vol. 89- № 9.- Р. 1605-1609.
- Nawrosccki S., Mackiewicz A. Genetically modified tumor vaccines - where we are today // Cancer Treat. Rev.- 1999.- Vol. 25.- № 1.- Р. 29-46.
- Барышников А. Ю. Противоопухолевые вакцины // Всерос. науч.-практ. конф. - М., 2002. - С. 12.
- ван ден Эртвег А. Д. М., Шепер Р. Д., Пинедо Г. М. Специфическая иммунотерапия онкологии: вызов следующему

тысячелетию // Материалы III ежегодной рос. онкол. конф.- СПб.- 1999.- <http://www.rosoncweb.ru/library/index.htm#conf>.

- Пат. 1667 України, МПК А 61 К 35/12. Спосіб одержання протипухлинної вакцини / Затула Д. Г., Ситечко В. К., Лісовенко Г. С. та ін.; ШПОР НАНУ- №3478519/28-14; Заявл. 26.07.82; Опубл. 25.10.94; Бюл. № 3.- С. 42.
- Потебня Г. П., Семерніков В. А., Лісовенко Г. С. та ін. Новий етап у створенні протиракових вакцин // Шляхи та перспективи розвитку експериментальної онкології в Україні.- К.: ДІА, 2001.- С. 104-114.
- Потебня Г. П., Загадчук Н. Л., Савцова З. Д., Литвиненко А. А. Протипухлинна активність вакцин, одержаних за допомогою фільтрату культуральної рідини *Bac. mesentericus* АВ-56 або антибіотика АВ-56 // Клін. хірургія.- 1998.- № 1.- С. 37-38.
- Савцова З. Д., Усач О. М., Воейкова І. М. та ін. Особливості впливу протипухлинних вакцин (серія ШПОР), виготовлених за різними технологіями, на ефекторні реакції специфічного і неспецифічного імунітету // Наукові записки НаУКМА.- 2001.- Т. 19.- С. 26-31.
- Колесник Е. А., Потебня Г. П., Кикоть В. А. и др. Противоопухолевая аутовакцина в лечении больных распространенным колоректальным раком // Онкология.- 1999.- № 2.- С. 104-108.

14. Потєбня Г. П., Смолянка И. И., Лисовенко Г. С. и др. Эффективность иммунотерапии аутовакциной в лечении больных раком легкого // Онкология.— 2000.— Т. 2—3.— С. 191-194.
15. Федосова Н. Л., Усач О. М., Юдина О. Ю. та ін. Вплив протипухлинних аутовакцин на активність макрофагів // Наукові записки НаУКМА. Біологія та екологія.— 2002.— Т. 20.— С. 441-444.
16. Савцова З. Д., Усач О. М., Юдина О. Ю. и др. Сопоставление эффективности вакцин серии ИЭПОР с динамикой продукции ФНО, ИЛ-1, ИЛ-2 у мышей с карциномой Льюиса // Эксперим. онкология.— 2002.— Т. 24.— № 4.— С. 295-300.
17. Grimm E. A., Mazumder A., Zhang H. S., Rosenberg S. A. Lymphokine-activated killer cell phenomenon: lysis of natural killer cell resistant fresh solid tumor cells by interleukin-2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes // J. Exp. Med.- 1982- Vol. 155.- P. 1823-1841.
18. Возианов А. Ф., Бутенко А. К., Зак К. П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства- К.: Наук, думка, 1998.- 320 с.
19. Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В., Соколова Е. В., Титовец Р. Е. Цитокины в регуляции противоопухолевой активности макрофагов; экспериментальное обоснование адоптивной макрофаготерапии при злокачественном росте // Иммунология.- 1995.-№ 3,- С. 52-54.
20. Hokland M., Heron L., Berg K., Hokland P. Natural killer cell activity correlates with the amount of beta 2-microglobulin on human peripheral blood lymphocytes // Cel. Immunol.- 1982.- Vol. 72.-№ 1.-P.40-51.
21. Pietrangelli C. E., Scamene E., Edelsen P. Measurement of S'-nucleotidase in mouse peritoneal macrophages in listeriosis // In. Immunity- 1988.- Vol. 32- № 3- P. 1206-1210.
22. Лимфоциты. Методы / Под ред. Дж. Клауса.- М.: Мир, 1990.- 395 с.
23. Лакин Г. Ф. Биометрия.- М.: Высш. школа, 1980.- 290 с.

Z. Savtsova, O. Usach, O. Yudina, N. Fedosova, L. Evstratyeva, I. Voyekova,
G. Lisovenko, G. Potebnya

COMPARATIVE STUDY OF EFFECTIVENESS OF SUPERSMALL AND ALLOPATHIC DOSES OF ANTICANCER AUTOVACCINE IN MICE WITH LEWIS CARCINOMA

*Evidences are presented about influence of allopathic and homeopathic vaccines, prepared from tumor cells by treatment with filtrate of growth cultural media of *Bac. subtilis* 7025 on development and metastasing of Lewis lung carcinoma; on specific and non-specific reactions of anti-tumor immunity; on in vitro production of IL-2 by non-adhesion splenocyte fraction.*