**УДК 616-006.06-092.19 : 576.8.095**

*Караман О. М., Мельник Т. В., Федосова Н. L, Воєйкова І. М., Савцова З. Д.*

# ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ЛЕКТИНІВ *BACILLUS SUBTILIS* 7025 ТА ВИГОТОВЛЕНИХ ЗА ЇХНЬОЮ ДОПОМОГОЮ ПРОТИПУХЛИННИХ ВАКЦИН НА ОРГАНИ ІМУННОЇ СИСТЕМИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

*У статті наведено дані про вплив пектинів B. subtilis 7025, культивованої на різних середовищах, та· вакцин, виготовлених на основі обробки клітин карциноми Льюїс цими пектинами, на первинні та вторинні органи імунної системи експериментальних тварин. Цитотоксичний вплив вакцин порівняно з пектинам був більш однотипний та менш виражений. На відміну від лектинів, різницю у цитотоксичному впливі вакцин залежно від середовища культивування B. subtilis 7025 практично не виявлено. Показано, що одним з механізмів дії досліджуваних вакцин може бути індукція компенсаторної реакції імунної системи у відповідь на лімфотоксичний вплив лектинів.*

Од::им із стратегічних напрямів імунотерапії пухлинної хвороби є розробка протипухлинних ьакцин, які призначені для індукції ефективної імунної відповіді проти залишкових або метастатичних пухлинних клітин. В ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України була розроблена оригінальна методика приготування протипухлинних вакцин з клітин аутологічної пухлини за допомогою фільтрату культуральної рідини (ФКР) росту *B. subtilis* АВ-56. Ефективність використання таких вакцин у клініці вже була досліджена [1; 2]. Однак виготовлені за цією технологією вакцини мали пзвні недоліки, серед яких, зокрема, і високе антигенне навантаження на організм (в тому числі «баластними» продуктами життєдіяльності *B. subtilis* АВ-56) та труднощі стандартизації. Тому надалі було запропоновано використовувати не цільний ФКР мікроорганізму, а лише його лектинову фракцію, яка є основним діючим агентом ФКР при приготуванні вакцини [3]. Методом аналітичної селекції було одержано новий високопродуктивний щодо лектинів штам *B. subtilis* АВ-56 -*B. subtilis* 7025 і запропоновано культивувати його не на МПБ, а на синтетичних живильних середовищах (середовище Гаузе), які сприяють максимальному синтезу біологічно активних речовин мікроорганізмами.

Лектини, які продукує *B. subtilis* 7025, мають молекулярну масу 26 000 Да і три поліпептидні І ланцюги (молекулярна маса кожного 8300 Да), що утворюють між собою асоціати або ж перебувають у розчині, вірогідно, у вигляді тримеру' [4]. У складі лектинів виявлено 6 цукрів: арабінозу (60 %), глюкозу, галактозу, манозу, фукозу і рамнозу. Амінокислотний аналіз одержаних лектинів показав високий вміст дикарбонових кислот, тирозину і відсутність основних амінокислот - лізину та аргініну. Також до складу лектинів *B. subtilis* 7025 входять глутамінова та аспарагінова амінокислоти, фенілаланін і лейцин.

Виділені лектини характеризуються високою спорідненістю до фруктози-1,6-дифосфату, М-гліко-

© *Караман О. М., Мельник Т. В., Федосова Н. L, Воейкова І. М., Савцова З. Д.,* 2004

колілнейрамінової, N-ацетилнейрамінової D-глюкуронової кислот - інгібуючі дози реакції гемаглютинації (РГА) становлять 0,05 мМ, 1,9, 7,5 і 7,5 мМ відповідно [5].

За впливом на пухлинні клітини *in vitro* ($1{,}0 \cdot 10^7$ ПК) лектини виявляють залежно від концентрації цитолітичну або цитотоксичну дію. При вивченні протипухлинної активності *in vivo* в експерименті спостерігається гальмування пухлинного росту та подовження тривалості життя тварин на 50-90 % [3; 6]. Водночас вплив лектинів, продукованих *B. subtilis* 7025, на імунну систему залишався нез'ясований. Тому метою нашої роботи стало порівняльне вивчення впливу лектинів, виділених з ФКР росту *B. subtilis* 7025, культивованої на різних середовищах, та відповідних їм вакцин на імунокомпетентні органи експериментальних тварин.

## Методика досліджень

Досліди проводили на мишах-самицях лінії $C_{57}$BI віком 2,5 міс., розведення віварію ШПОР ім. Р. Є. Кавецького ПАНУ. Культивування *B. subtilis* 7025 та виділення лектинової фракції ФКР здійснювали, як описано в [4]. В роботі використовували вакцини, одержані шляхом обробки клітин карциноми Льюїс (КЛЛ) лектиновою фракцією ФКР росту *B. subtilis* 7025, культивованої на МПБ (вакцина МПБ) чи середовищі Гаузе (вакцина Гаузе) за методикою, описаною [4]. Лектини та відповідні їм вакцини вводили тваринам підшкірно тричі з інтервалом у 7 діб у наростаючих дозах (0,5, 0,75 та 1 мл/мишу).

Забір імунокомпетентних органів проводили після другої та третьої вакцинацій. Оцінювали вплив лектинів та відповідних їм вакцин на загальну клітинність, життєздатність клітин кісткового мозку (КМ), тимуса, селезінки і лімфовузлів (ЛВ) та субпопуляційний склад КМ і ЛВ. Підраховували клітини у камері Горяєва при суправітальному забарвленні трипановим синім. Мазки КМ забарвлювали за Паппенгеймом, препарати ЛВ готували за методом Штокінгера і Келльнера [7]. Математичну обробку результатів проводили з використанням /-критерію Ст'юдента [8].

## Результати дослідження та їх обговорення

Після закінчення курсу введення жоден із препаратів не викликав статистично суттєвої зміни кількості та життєздатності клітин досліджуваних органів. Проте можна відзначити різні тенденції в динаміці дії лектинів залежно від середовища культивування *B. subtilis* 7025. Ефекти введення вакцин були більш тотожними.

Жоден із досліджуваних препаратів не викликав достовірних змін у загальній кількості клітин КМ. Заданими спостережень, що динаміка впливу вакцин після другого введення була більш однотипною, ніж динаміка впливу лектинів (зокрема, після введення обох вакцин та «лектину, МПБ» спостерігали тенденцію до підвищення загальної клітинності КМ, а після введення «лектину, Гаузе» - до зменшення цього показника). Слід відзначити, що після введення вакцини така тенденція була меншою, ніж після введення відповідних лектинів. Після третього введення виявлено тенденцію до зменшення клітинності КМ мишей, які одержували «лектин, МПБ», «лектин, Гаузе» та «вакцину, Гаузе» (рис. 1). Дослідження клітинного складу КМ дозволило пов'язати таку відмінність з впливом лектинів на гранулоцитарний росток КМ. При введенні «лектину, МПБ» вміст гранулоцитарних елементів, що диференціюються, складав $32{,}9 \pm 7{,}5$ проти $24{,}5 \pm 1{,}9$ % у контролі, «лектину, Гаузе» - $17{,}6 \pm 1{,}5$ % (порівняно з контролем $\rho < 0{,}05$, з «лектином, МПБ» - $0{,}05 < \rho < 0{,}1$). Натомість введення всіх препаратів виявляло тенденцію до підвищення вмісту в КМ бластних клітин. В сукупності такі зміни можуть свідчити про подразнення гранулоцитарного ростка КМ та розвитку компенсаторної відповіді на таке подразнення. Після третього введення ефект зберігався, але спостерігався зсув складу гранулоцитарного ростка КМ у бік зрілих гранулоцитів.

Досліджуючи тимус, спостерігали зменшення клітинності цього органу після другого введення «лектину, МПБ» і «вакцини, МПБ» (рис. 2). Життєздатність тимоцитів достовірно зменшувалась при дії «лектину, МПБ», але не вакцини. Ефект введення «лектину або вакцини, Гаузе» був протилежний: всі перелічені показники збільшувались (обидва показники клітинності при засто-

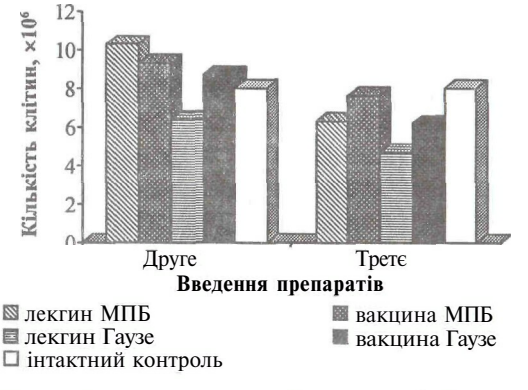


Рис. 1. Показники загальної клітинності кісткового мозку вакцинованих мишей

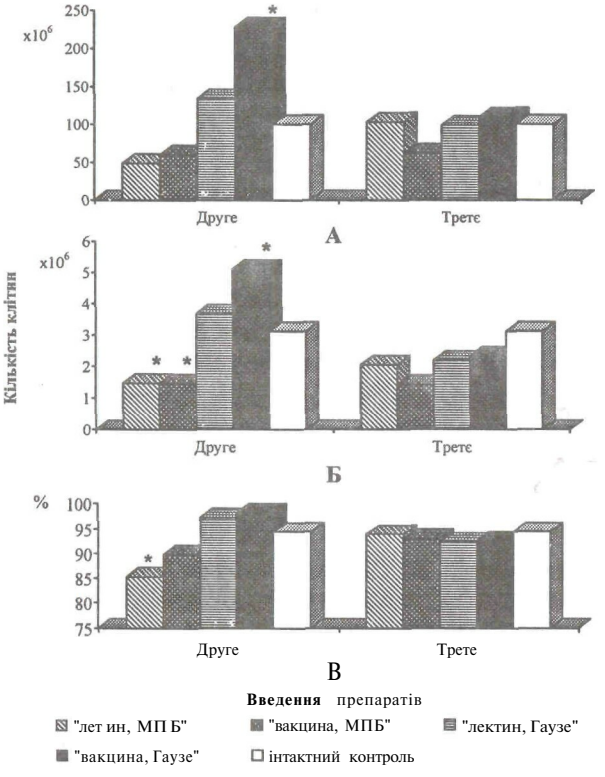


Рис. 2. Зміни характеристик тимусу у відповідь на вакцинацію:
А - загальна клітинність, Б - клітинність на 1 мг маси органу, В - % життєздатних клітин ('р < 0,05 порівняно з показниками інтактного контролю)

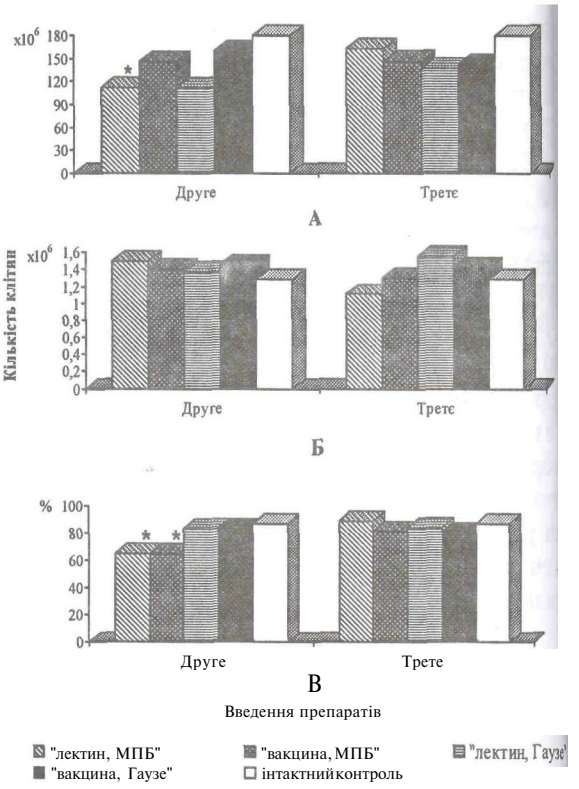


Рис. 3. Зміни характеристик селезінки:
А - загальна клітинність, Б - клітинність на 1 мг маси органу, В - % життєздатних клітин ("р < 0,05 порівняно з показниками інтактного контролю)

суванні вакцини - статистично вірогідно). Різниця при порівнянні «лектин, МПБ-лектин, Гаузе», «вакцина, МПБ-вакцина, Гаузе» за всіма показниками була достовірною (р < 0,05). Після третього введення жоден із параметрів суттєво не відрізнявся від параметрів інтактного контролю. Достовірної відмінності між досліджуваними групами тварин також не спостерігалось.

Після другого введення обох лектинів та «вакцини, МПБ» достовірно зниженою була загальна клітинність селезінки (рис. 3). Кількість клітин на 1 мг маси, вірогідно, не змінювалась; життєздатність спленоцитів статистично суттєво знижувалась при введенні «лектину і вакцини, МПБ». Після третього введення жоден із показників у жодній з груп не відрізнявся від показників інтактного контролю.

Показники ЛВ ні після другого, ні після третього введень досліджуваних препаратів не мали достовірних відмінностей від інтактного контролю. Дослідження клітинного складу ЛВ (рис. 4) показало, що під впливом обох вакцин достовірно, порівняно з інтактним контролем, підвищувався відносний вміст зрілих Т-лімфоцитів (після третього введення), бластів і великих лімфоцитів (після другого та третього введень), а після третього введення «вакцини, МПБ» - також і абсолютний вміст цих клітин (р < 0,05). Відносний вміст В-лімфоцитів під дією обох вакцин знижувався достовірно, абсолютний вміст - на рівні тенденції.

Лектини впливали на субпопуляційний склад лімфоцитів ЛВ аналогічним чином, але ефекті їх використання був менш вираженим: зміни відносного вмісту зрілих Т- і В-лімфоцитів -на! рівні тенденції. Водночас абсолютний вміст зрілих Т-лімфоцитів і бластів після третього вве-1 дення «лектину, МПБ» зростав вірогідно (порівняно з інтактним контролем р < 0,05) і перевищував такий після введення «лектину, Гаузе» (0,05 <р< 0,1).

Таким чином, як для лектинів, одержаних із ФКР росту *B. subtilis* 7025, культивованої на різних середовищах, так і для відповідних їм вакцин характерний певний лімфотоксичний вплив, який виявлявся у транзиторному зменшенні клітинності основних органів імунної системи (КМ, ЛВ, тимуса, селезінки), зменшенні кількості зрілих форм у клітинному складі КМ та ЛВ.

Як лектини, так і вакцини здійснюють лімфотоксичний вплив у межах компенсаторних можливостей організму, про що свідчить наявність

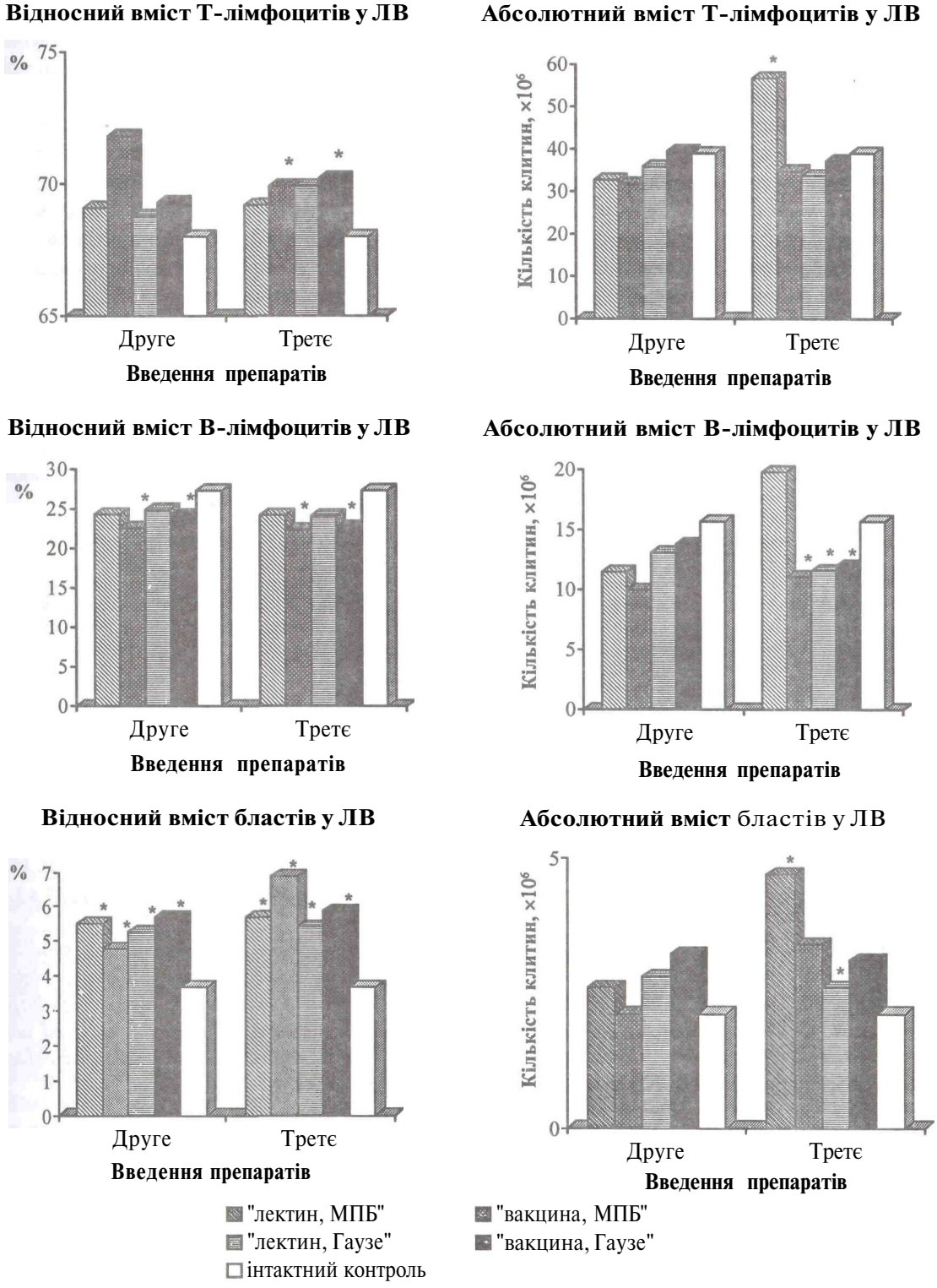


Рис. 4. Зміни клітинного складу периферичних лімфатичних вузлів у динаміці вакцинації мишей $C_{57}Bl$ (*$p < 0,05$ порівняно з показниками інтактного контролю)

компенсаторної реакції на токсичний вплив препаратів (збільшення відносного та абсолютного вмісту менш диференційованих форм у КМ та ЛВ).

Враховуючи доведену на сьогодні можливість активації імунної системи під час розвитку її компенсаторної реакції на лімфотоксичне порушення [4; 9], можна припустити, що одним із механізмів дії досліджуваних вакцин може бути індукція компенсаторної реакції імунної системи у відповідь на лімфотоксичний вплив лектинів, що входять до складу вакцин.

За сукупністю та вираженістю змін у клітинності та/або складі КМ, тимуса, селезінки і ЛВ можна припустити, що дещо більшу імунотоксичність (але в межах компенсаторних можливостей організму дослідних тварин) має «лектин, МПБ».

Одержані дані вказують на певні відмінності впливу на імунну систему лектинів, виділених з ФКР росту *B. subtilis* 7025, залежно від того, на якому середовищі вирощували цей мікроорганізм. Такувідмінністьможнапоясниттирізнимспіввідношенням зв'язаних з мембраною та позаклітинних лектинів, продукованих *B. subtilis* 7025 частковоюзміноюїхспецифічностідовуглеводів або синтезом різних ізоформ лектинів залежних від середовища культивування мікрорганізму Водночас ефекти вакцин, виготовлених за допомогою цих лектинів, практично ідентичні. Одержані дані дозволяють припустити, що ефект лектипових вакцин є результатом впливу на імунну системукомплексів«лектин+пухлиноасоційовані антигени», а на сумацією імунологічних ефектів кожного з компонентів.


1. *Колесник Е. А., Потебня Г. П., Кикоть В. А.* и др. Противоопухолевая аутовакцина в лечении больных с распространенным колоректальным раком // Онкология.- 1999.- № 2.- С. 104-108.
2. *Потебня Г. П., СмоланкаН. Н., ЛисовенкоГ. С.* и др. Эффективностьиммунотерапииаутовакциной прилечении больных раком легкого//Онкология-2000-Т. 2-№3.-С. 191-195.
3. *Танасієнко О. А., Потебня Г. П., Сидоренко М. В., ШляховенкоЛ. М.* Вплив протипухлинного антибіотика з *B. Mezentericus* АВ-56 на імуногенність пухлинних клітин // Доп. НАНУ- 1999.- № 6.- С. 192-196.
4. *Потебня Г. П.* Розробка та покращення ефективності протипухлинних аутовакцин, виготовлених на основі продуктів синтезу *B. subtilis:* Дис…. д-ра. мед. наук.-К., 2003-418 с.
5. *Potebnia G. R, Tanasienko O. A., Titova G. P.* et al. Specificity and Biological Activity of Cytotoxic Lectins Synthesized by *Bacillussubtilis* B-7025 // Experim. Oncol.- 2002- Vol. 24- P. 150-152.
6. *Усач О. М., Танасиенко О. А., Юдина О. Ю., Потебня Г. Ц Савцова З. Д.* Биологические свойстваи эффективность противоопухолевых вакцин, приготовленных с использование» продуктов *метаболизма Bacillussubtilis* 7025, культивируемой на различных средах // Экспериментальная онкология.-] 2002.-Т. 24-№ 1-С. 76-79.
7. *Bekkum D. W. van, Moat B. et al.* Attempt sat identification of| hemopoetic system cell in mouse//Blood- 1971.- V. 38.-№5.· P. 547-559.
8. *Лакин Г. Ф.* Биометрия- М.: Высшая школа, 1980-290с. I
9. Биологические методы лечения онкологических заболеваний/ Подред. В. Девита, С. Хеллмана, С. А. Розенберга.- М.: МеJ дицина, 2002- 839 с.



*O. Karaman, T. Melnyk, N. Fedosova, I. Voyejkova, Z. Savtsova*


## FEATURES OF INFLUENCE OF THE LECTINS PRODUCED BY *BACILLUS* I *SUBTILIS* 7025, AND ANTICANCER VACCINES, MADE WITH THEIR HELpl ON IMMUNE SYSTEM ORGANS OF THE EXPERIMENTAL ANIMALS


*In the article the data about influence on immune system organs of the lectins, produced by B. subtilis 7025, and vaccines made by processing of the Luis carcinoma cells with such lectins depend of different medium were demonstrated The more uniform and the less pronounced cytotoxic effect ofthe vaccines, comparing with lectins, was shown. No different in cytotoxic activity ofvaccines depends ofdifferent mediums was detected, unlike in effects of the lectins. There was shown that compensatory reaction of the organism against cytotoxic influence of the lectines can be one ofthe mechanisms ofanticancer vaccines' action.*