

Федосова Н. І., Усач О. М., Мельник Т. В., Перепнихатка Н. П.,
Євстрат'єва Л. М., Савцова З. Д.

ВИЗНАЧЕННЯ КОРЕЛЯЦІЙНИХ ЗВ'ЯЗКІВ
МІЖ ВПЛИВОМ ПРОТИПУХЛИННИХ ВАКЦИН СЕРІЇ ІЕПОР
НА ДИСКРЕТНІ ІМУНОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ
ТА ЕФЕКТИВНІСТЮ ВАКЦИНОТЕРАПІЇ

*У статті наведено відомості про ефективність та вплив на активність ефекторів специфічної і неспецифічної ланок протипухлинного імунітету вакцин, виготовлених з клітин аутологічної пухлини шляхом їх обробки фільтратом середовища росту *Vac. subtilis* 7025, лектиновою фракцією такого фільтрату або протеолітичними ферментами мікробного походження. Визначено кореляційні зв'язки між: модуляцією досліджених показників та частотою виникнення пухлин (на ранніх етапах пухлинного росту) або гальмуванням процесу метастазування (на пізніх етапах) при різних схемах застосування вакцин.*

Розробка найрізноманітніших технологій виготовлення протипухлинних вакцин, вивчення механізмів їх дії, а в ряді випадків і їх клінічні випробування вийшли за останні 10 років на чільне місце в проблемі імунотерапії пухлин [1, 2]. Поряд з розробкою вакцин, в яких використовують генетично модифіковані пухлинні клітини, ДС, рекомбінантні пухлинні антигени, амінокислотні послідовності, тривають дослідження та клінічні випробування вакцин першого покоління, які виготовлені на основі аутологічних пухлинних клітин або їх лізатів та містять весь спектр асоційованих з пухлиною антигенів [3]. В останні роки запропоновано різні технології приготування таких вакцин, у тому числі й з використанням біологічно активних речовин мікробного походження [1, 4, 5]. В ШПОР НАН України розроблено оригінальні методики приготування протипухлинних вакцин з клітин аутологічної пухлини з використанням фільтрату культуральної рідини (ФКР) росту *Bac. subtilis 7025*, очищеної лектинової фракції цього ФКР та на основі глікопептидних комплексів пухлинних клітин [6-8]. У клінічних випробуваннях показано позитивний ефект (поліпшення виживаності) при застосуванні першої зі згаданих вакцин в комплексному лікуванні хворих на поширений колоректальний рак [9] та рак легені [10]. На сьогодні ще недостатньо вивчені механізми впливу названих вакцин на специфічні та неспецифічні протипухлинні реакції системи імунітету. Особливості такого впливу слід враховувати при розробці оптимальних схем клінічного застосування цих вакцин.

Виходячи з викладеного, метою нашої роботи було доклінічне вивчення особливостей впливу аутологічних протипухлинних вакцин серії ІЕПОР на активність ефекторів лімфоїдної та моноцитарної ланок імунної системи та обґрунтування показників для моніторингу ефективності вакцинотерапії.

Методика досліджень

Досліди проводили на статевозрілих мишах-самках лінії C₅₇BL віком 2,5 міс, розведення віварію ІЕПОР НАН України на моделі метастазуючої пухлини - карциноми легені Льюїс (КЛЛ). Культивування *B. subtilis 7025*, виділення лектинвмісних фракцій ФКР, приготування протипухлинних вакцин з клітин карциноми Льюїс здійснювали, як описано [11, 12]. Застосовували вакцини, виготовлені з клітин аутологічної пухлини з використанням ФКР росту *Bac. subtilis 7025* (вакцина 1), очищеної лектинової фракції цього ФКР (вакцина 2), на основі глікопептидних комплексів пухлинних клітин (вакцина 3). Проведено дві серії експериментів: у першій з них мишей іму-

нізували до перещеплення клітин КЛЛ, у другій - після оперативного видалення первинної пухлини. У першому випадку вакцини вводили підшкірно триразово з інтервалом 7 діб у зростаючих дозах (0,5, 0,75, 1 мл/мишу). Через 3 тижні після останньої імунізації перещеплювали клітини КЛЛ ($2,5 \times 10^5$ клітин/мишу). У другій серії досліджень первинні пухлини видаляли на 16-ту добу після перещеплення, імунізацію починали з 18-ї доби. Вакцини вводили підшкірно двічі на тиждень п'ятиразово (по 0,3; 0,3; 0,3; 0,5; 0,5 мл/мишу). Контролем в обох серіях експерименту були невакциновані миші, яким було перещеплено КЛЛ. Ефективність вакцинації оцінювали за індексом інгібіції метастазування (ІМ).

Імунологічне обстеження тварин включало визначення активності макрофагів (МФ), природних кілерів (ПКК), цитотоксичних лімфоцитів (ЦТЛ), АЗКЦ, сироватки крові в цитотоксичних тестах *in vitro* радіометричним методом; цитохімічної активності МФ у НСТ-тесті; рівня продукції МФ *in vitro* фактора некрозу пухлин (ФНП) за допомогою біологічного методу з використанням ФНП-чутливої культури клітин L-929; рівня продукції ІЛ-2 лімфоцитами селезінки. Дослідження проводили за загальноприйнятими методиками, які детально описано раніше [13, 14, 15]. Математичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стюдента та коефіцієнтів кореляції (r) [16].

Результати досліджень

Показано, що динаміка цитотоксичної активності ефекторів природної резистентності та продукції досліджуваних цитокінів при застосуванні аутологічних протипухлинних вакцин серії ІЕПОР узгоджуються з даними про ефективність цих вакцин. Активація згаданих вище протипухлинних реакцій у ранні строки після перещеплення клітин КЛЛ мишам, які отримували вакцину 1 та 3 за профілактичною схемою, зумовлювала зменшення частоти прищеплення пухлин відповідно на 26,1 та 12,0 %. Проте в подальшому динаміка досліджених показників поступово наближалась до такої у невакцинованих тварин. На цьому тлі ІМ для вакцини 1 становив 50 % ($p < 0,05$), вакцини 3 - 29 % ($0,05 < p < 0,1$). При застосуванні вакцини, виготовленої з використанням очищеної лектинової фракції ФКР росту *Bac. subtilis 7025* (вакцина 2), спостерігали збереження функціонального резерву ПКК і МФ та фізіологічного балансу цитокінів практично протягом усього дослідження. Такій динаміці протипухлинних реакцій відповідав більш вираже-

ний віддалений ефект (ІМ при профілактичній вакцинації 75 % ($p < 0,05$); при терапевтичній - гальмування росту рецидивів, ІМ 80,3 %).

Наступним етапом роботи стало визначення кореляційних зв'язків між модуляцією показників, що характеризують специфічну і неспецифічну ланки протипухлинного імунітету, та частотою виникнення пухлин (на ранніх етапах пухлинного росту) або гальмуванням процесу метастазування (на пізніх етапах) при різних схемах застосування вакцин. За умов профілактичної вакцинації спостерігали позитивну кореляцію модуляції всіх досліджуваних параметрів на ранніх етапах пухлинного росту з показниками гальмування прищеплення пухлин. За рівнем кореляційного зв'язку можна скласти такий ряд: активність ПКК, специфічна цитотоксичність сироватки, продукція ФНП МФ та ІЛ-2 спленоцитами, АЗКЦ, активність ЦТЛ - сильний кореляційний зв'язок; цитотоксична активність МФ - виражений; неспецифічна цитотоксичність сироватки - кореляції немає (табл. 1). У пізніші терміни між активністю ПКК, ЦТЛ, АЗКЦ, рівнем продукції ФНП та ІЛ-2, специфічною цитотоксичністю сироватки та гальмуванням процесу метастазування (ІМ) зберігалася позитивна кореляція. Але її рівень дещо зменшувався: зберігався сильний кореляційний зв'язок між ефектом вакцинації та продукцією ФНП, ІЛ-2 і цитотоксичністю сироватки. Рівень кореляції з активністю ЦТЛ та АЗКЦ знижувався до помірної. Цитотоксична активність МФ та неспе-

цифічна цитотоксичність сироватки мали сильну негативну кореляцію з ІМ.

При застосуванні вакцин за терапевтичною схемою кореляційні зв'язки імунологічних ефектів з ІМ залежали від наявності рецидивів пухлин (тобто від об'єму пухлинної маси в організмі). На 7-му добу після закінчення вакцинації у тварин з рецидивами спостерігали позитивну кореляцію ІМ з показниками спонтанної продукції ФНП та ІЛ-2 (сильна або помірні), активністю ЦТЛ (виражена), ПКК (помірна), АЗКЦ (слабка) (див. табл. 1). Кореляція між ІМ та цитотоксичністю сироватки була вираженою негативною. Між ІМ та цитотоксичною активністю МФ кореляції не спостерігали. У пізніші терміни (14-та доба після закінчення вакцинації) відмічено зростання з помірної до вираженої кореляції з активністю ПКК, до сильної кореляції - з продукцією ІЛ-2. Кореляційний зв'язок з активністю ЦТЛ знижувався з вираженого до помірної. Кореляція між ІМ та рівнем продукції ФНП МФ, неспецифічною цитотоксичністю сироватки залишалася на тому ж рівні (сильна позитивна та виражена негативна відповідно). Не спостерігалась кореляція між ІМ та активністю АЗКЦ і цитотоксичністю МФ. За відсутності рецидивів у віддалені терміни (14-та доба після закінчення вакцинації) відзначено сильну позитивну кореляцію між ІМ та активністю ЦТЛ; виражену позитивну - між ІМ та специфічною цитотоксичністю сироватки, рівнем продукції ІЛ-2 спленоцитами, продукцією ФНП МФ. Негативним був

Таблиця 1. Кореляція (r) між змінами дискретних імунологічних параметрів при використанні за різними схемами вакцин серії ІЕПОР та антиметастатичною ефективністю останніх

Показник	Профілактична схема		Терапевтична схема		
	7-ма доба пухлинного росту	36-та доба пухлинного росту	тварини з рецидивами		тварини без рецидивів
			7-ма доба після закінчення вакцинації	14-та доба після закінчення вакцинації	14-та доба після закінчення вакцинації
<i>Лімфоцитарна панка:</i>					
активність ПКК	0,999	0,661	0,491	0,623	-0,166
активність ЦТЛ	0,715	0,370	0,536	0,395	0,805
АЗКЦ	0,791	0,341	0,191	0,033	0,508
продукція ІЛ-2 спленоцитами	0,831	0,890	0,456	0,923	0,722
<i>Цитотоксична активність сироватки крові:</i>					
специфічна	0,999	0,999	-0,779	-0,669	0,632
неспецифічна	0,157	-0,824	-0,656	-0,528	-0,780
<i>Моноцитарна ланка:</i>					
цитотоксичність МФ для клітин-мішеней КЛЛ	не визн.	не визн.	-0,375	-0,223	0,998
цитотоксичність МФ для клітин-мішеней К-562	0,562	-0,819	-0,084	0,075	-0,895
цитохімічна активність МФ	0,046	0,754	-0,920	-0,971	-0,994
продукція ФНП	0,873	0,990	0,992	0,960	0,716

кореляційний зв'язок ПМ з активністю ПМК (від слабкого до вираженого в різних дослідках) та МФ (сильний), а також неспецифічною цитотоксичністю сироватки (виражений). Тобто підвищення у прооперованих тварин без рецидивів пухлини активності ПМК, МФ (цитотоксичної або цитохімічної) та неспецифічної цитотоксичності сироватки можна розцінити як незадовільні прогностичні ознаки щодо розвитку метастазів.

Визначення цитотоксичної активності протипухлинних ефекторів та продукції ними цитокінів *in vitro* потребують спеціального матеріального забезпечення, культивування клітин, досить тривалі й трудомісткі. Для оцінки функціонального стану моноцитів/макрофагів у практиці клінічних лабораторій досить широко використовують інші методики, зокрема НСТ-тест. Тому нами було додатково проведено порівняльний аналіз можливості використання для моніторингу ефективності вакцин серії ШПОР не тільки показників цитотоксичності МФ та продукції ними ФНП, а й результатів НСТ-тесту. Як уже зазначено вище (див. табл. 1), при використанні вакцин за обома схемами між ПМ та цитотоксичністю МФ спостерігали сильну негативну кореляцію ($r = -0,819$ - профілактична схема; $r = -0,895$ - терапевтична). Модуляція продукції ФНП мала відповідно сильну або виражену позитивну кореляцію з ПМ - $r = 0,990$ (профілактична схема вакцинації) та $r = 0,716$ (терапевтична схема). При зіставленні ПМ з модуляцією даних НСТ-тесту спостерігали виражену кореляцію цих показників ($r = 0,754$) при профілактичній вакцинації, сильну ($r = -0,994$) - при терапевтичній. Показник НСТ мав позитивну кореляцію з ПМ при профілактичній вакцинації і негативну - при терапевтичній. Тобто підвищення цього показника з високою чутливістю відображає ріст в організмі навіть поодиноких пухлинних осередків за умов видалення основної маси пухлинних клітин. Порівняння індексів модуляції дискретних характеристик МФ показало, що при профілактичній вакцинації між змінами показників

НСТ-тесту та цитотоксичної активності, НСТ та рівнем продукції ФНП, а також продукції ФНП та цитотоксичності МФ спостерігається сильна кореляція ($r = 0,994$, $r = 0,839$, $r = 0,891$ відповідно). При терапевтичній схемі вакцинації також виявлено сильний кореляційний зв'язок між усіма досліджуваними показниками: $r = 0,938$ - НСТ-цитотоксичність, $r = -0,789$ - НСТ-ФНП, $r = -0,953$ - ФНП-цитотоксичність). Таким чином, зміни результатів НСТ-тесту корелюють (переважно сильна кореляція) з модуляцією цитотоксичної активності та продукції ФНП, що дає змогу досить коректно прогнозувати (використовуючи тільки цей тест) характер змін власне протипухлинних реакцій макрофагів.

Висновки

1. Для моніторингу ефективності застосування вакцин серії ІЕПОР слід оцінювати не тільки показники, що характеризують специфічні реакції протипухлинного імунітету, як це є традиційним при використанні більшості вакцин [17], а й зміни активності ефекторів неспецифічної ланки: ПМК, МФ.

2. Моніторинг імунологічних показників доцільно проводити не тільки в динаміці вакцинального процесу чи після його закінчення, а й у більш віддалені від вакцинації строки.

3. Позитивними прогностичними показниками є також збільшення після вакцинації рівня продукції мононуклеарами ФНП та ІЛ-2 без додаткової стимуляції *in vitro*.

4. За умов відсутності рецидивів і метастазів у прооперованих тварин у віддалені від вакцинації терміни більшість досліджуваних імунологічних показників повертається до меж лінійної норми. Підвищення активності ПМК, МФ (цитотоксичної або цитохімічної) та неспецифічної цитотоксичності сироватки є негативною прогностичною ознакою, яка може вказувати на початок прогресування пухлинного процесу (активацію латентних метастазів).

1. Berd D. Cancer vaccines: reborn or just recycled? // *Seminars Oncol.*- 1998.- V. 25.- № 6.- P. 605-610.
2. Chan A. D., Morton D. L. Active immunotherapy with allogeneic tumor cell vaccines: present status // *Seminars Oncol.*- 1998.- V. 25.- № 6.- P. 611-622.
3. Nawrocki S., Mackiewicz A. Genetically modified tumor vaccines - where we are today // *Cancer Treat Rev.*- 1999.- V. 25.- № 1.- P. 29-46.
4. Horig #., Kaufman H. L. Current issues in cancer vaccine development // *Clin. Immunol.*- 1999.- V. 92.- № 3.- P. 211-223.
5. Шляховенко В. А. Современные подходы к созданию противоопухолевых вакцин // *Experim. Oncol.*- 2000.- № 3 (22).- С. 99-109.

6. Танасієнко О. А., Потєбня Г. П., Сидоренко М. В., Шляховенко В. О. Вплив протипухлинного антибіотика з *Bac. mezentericus AB-56* на імуногенність пухлинних клітин // *Доп. НАНУ*- 1999.- № 6.- С 192-195.
7. Загадарчук Н. Л. Експериментальне обґрунтування методів підвищення ефективності протипухлинної вакцини, одержаної за допомогою продуктів метаболізму *Bac. Mesentericus AB-56*: Дис. ... канд. біол. наук.- К., 1997.- 143 с.
8. Бихунов В. Л. Иммуногенные свойства препаратов из опухолевых клеток, обработанных продуктами микробного синтеза: Автореф. дис. ...канд. мед. наук.- К., 1985.- 20 с.
9. Колесник Е. А., Потєбня Г. П., Кикоть В. А. и др. Противоопухолевая аутовакцина в лечении больных с распростра-

- ненным колоректальним раком // Онкологія.-1999.- № 2.- С 104-108.
10. *Потебня Г. Я., Смоланка И. И., Лисовенко Г. С.* и др. Эффективность иммунотерапии аутовакцины при лечении больных раком легкого // Онкология.-2000.-Т. 2-№ 3.-С. 191-194.
 11. *Затула Д. Г., Танасиенко О. Л., Хомяк О. Г.* и др. Выделение и очистка антибиотика бактериальной природы, обладающего противоопухолевой активностью//Химиотерапия опухолей в СССР.- 1986.- № 44.- С. 204-208.
 12. *Затула Д. Г., Танасиенко О. А., Хомяк О. Г., Ситенко В. К., Загадарчук Н. Л., Сядро Т. А., Завальнюк А. К., Лисовенко Г. С.* Спосіб отримання речовини з протипухлинною активністю. Пат. 19910, МПКС12 Р21/00.-ІЕПОР НАНУ УА-№3507803/28-14.-Заяв. 26.10.82. Опубл. 25.12.97. Бюл.№ 6.
 13. *Саецова 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.
 14. *Саецова З. Д., Усач О. М., Юдіна О. Ю.* и др. Сопоставление эффективности вакцин серии ИЭПОР с динамикой продукции ФНО, ИЛ-1, ИЛ-2 у мышей с карциномой Льюис // Эксперим. онкол.- 2002.- Т. 24.- № 4.- С. 295-300.
 15. *Федосова Н. /., Усач О. М., Юдіна О. Ю.* та ін. Вплив протипухлинних аутовакцин на активність макрофагів // Наукові записки НаУКМА. Серія: Біологія та екологія.- Національний університет «Києво-Могилянська академія».- 2002.- Т. 20.- С. 441-444.
 16. *Лакін Г. Ф.* Биометрия- М.: Высшая школа, 1980.- 290 с.
 17. *Mosca P. J., Hobeika A. C, Clay T. M.* et al. Direct detection of cellular immune responses to cancer vaccines // Surgery.- 2001.- V. 129.- № 3.- P. 248-254.

N. Fedosova, O. Usach, T. Melnik, N. Perepnyhatka, L. Evstratyeva, Z. Savtsova

DEFINITION CORRELATION BETWEEN INFLUENCE OF ANTITUMOR VACCINES OF SERIES IEPOR ON DISCRETE IMMUNOLOGICAL PARAMETERS AND EFFICIENCY OF VACCINOTHERAPY

The data about efficiency and influence on activity of effectors of specific and nonspecific antitumor immunity of the vaccines made of the cells of an autologous tumor by their processing by a filtrate of the environment of growth Bac. subtilis 7025, lectin fraction of such filtrate or proteolytic enzymes of a microbic origin were given. Correlation between modulation of the investigated parameters and frequency of occurrence of tumours (at early stages of tumoral growth) or inhibition of metastatic process (at late stages) at different scheme of application of vaccines were determined.