 Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

**ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ім. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО**

## **МАЗУР ОЛЬГА ВІКТОРІВНА**

**УДК: 616-006.04:615.371:616-006.48**

**ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ**

**ЕФЕКТИВНОСТІ ГЛІКОПЕПТИДНИХ ВАКЦИН**

**НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ МОДЕЛЯХ**

**ІНТРАКРАНІАЛЬНОГО ЗЛОЯКІСНОГО РОСТУ**

14.01.07 – онкологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

## дисертації на здобуття наукового ступеня

## кандидата медичних наук

## Київ-2009

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України та ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова АМН України».

Наукові керівники: – доктор медичних наук, професор

Шляховенко Володимир Олексійович,

головний науковий співробітник відділу біохімії пухлинного росту Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України;

– доктор медичних наук

Главацький Олександр Якович,

провідний науковий співробітник відділу нейроонкології

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова АМН України».

**Офіційні опоненти:**

**–** доктор медичних наук, професор

**Мʼясоєдов Дмитро Володимирович,**

професор кафедри онкології Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика МОЗ України;

**–** доктор медичних наук

**Фільчаков Феодосій Вікторович,**

завідувач науково-дослідної лабораторії клінічної імунології ДУ «Національний інститут раку».

Захист відбудеться 10 червня 2009 року о 1500 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.155.01 в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (03022, м. Київ, вул. Васильківська, 45).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Автореферат розісланий « 9 » травня 2009 року.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради,

кандидат біологічних наук Л.М. Шлапацька

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Лікування хворих на злоякісні пухлини головного мозку – це надзвичайно важлива, соціально значима і далека до свого розв’язання проблема. На сьогодні вона залишається актуальною, що обумовлено як зростаючою захворюваністю, так і недостатньою ефективністю лікування.

В Україні, як і в інших країнах світу, спостерігається поступове зростання частоти первинних уражень головного мозку (у ≈ 50% випадків – гліоми), наближаючись до 5 випадків на 100 тис. населення (Розуменко В.Д., 2002;   
Зозуля Ю.П., 2007; Шалімов С.О., Федоренко З.П., 2007). Частота метастатичного ураження головного мозку (ГМ) також зростає – за останні 10 років з 8,3 до   
54,6 випадків на 100 тис. населення в країнах Європи (Noel G., 2006; Guillamo J.S.   
еt al., 2008; Sung S.L. еt al., 2008). Як відомо, меланома входить до групи злоякісних новоутворень, які досить часто метастазують у ГМ. Частота її метастазування за даними різних авторів складає від 15 до 40% (Dudley M.E. еt al., 2001; Tsao H. еt al., 2004; Guzel A. еt al., 2009).

Останніми роками зростає інтерес дослідників до методів біотерапевтичного лікування, зокрема імунотерапії хворих онкологічного профілю (Потебня Г.П. та ін., 2004; Шляховенко В.О. та ін., 2004; Dearden C.E., 2007; [Faneca H. еt al.,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17296164?ordinalpos=39&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum) 2007; [Märten A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18474022?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum)., 2008; [Van de Velde A.L. еt al.,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18390412?ordinalpos=10&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum) 2008; [Cheever M.A.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18364014?ordinalpos=21&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum), 2008; Schmitz F. еt al., 2008). Серед існуючих імунотерапевтичних стратегій чільне місце посідає використання цитокінів, моноклональних антитіл і протипухлинних вакцин. Одним із перспективних імунотерапевтичних підходів є застосування протипухлинних вакцин, виготовлених на основі пухлиноасоційованих антигенів (ПАА), дія яких ґрунтується на формуванні специфічних реакцій протипухлинного імунітету (Hodge J.W. et al., 2006; [Malyankar U.M.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17558745?ordinalpos=124&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum), 2007; [Hung C.F. еt al.,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18363994?ordinalpos=31&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum) 2008; [Hung C.F. еt al.,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18363994?ordinalpos=31&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum) 2008; [Sundstedt A. еt al.,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18279798?ordinalpos=45&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum) 2008; [Wu A. еt al.,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18049330?ordinalpos=53&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum) 2008). Слід зауважити, що більшість ПАА характеризуються низькою імуногенністю, що зумовлює необхідність пошуку різноманітних шляхів підвищення ефективності протипухлинних вакцин. Одним із них є посилення імунної відповіді на ПАА за рахунок їх модифікації та поєднаного застосування ад’ювантів. Водночас питання щодо створення протипухлинних вакцин з пухлинної тканини головного мозку та ефективності їх застосування вивчалося лише деякими авторами (Главацький О.Я., 2001; Toda M., 2004; Zalutsky M.R., 2005) і залишається відкритим. Саме цій проблемі присвячена дана робота, яка мала за мету розробку вакцин на основі глікопептидів пухлинної тканини (ГПВ) головного мозку, дослідження безпечності їх застосування та протипухлинних властивостей як при самостійному введенні, так і у поєднанні з ад’ювантом – комплексом водорозчинних вітамінів: аскорбінової кислоти та водорозчинної форми вітаміну К(вікасол, К3). Такий підхід до проблеми є тим більш обґрунтованим, що імуномодулюючі ефекти даного комплексу водорозчинних вітамінів уже були доведені іншими дослідниками (Bystrova N.A. et al., 2000;Verrax J. et al., 2003; Taper H.S. et al., 2004; Jamison J.M.et al., 2004; GilloteauxJ. et al., 2006). Дослідження цих авторів показали, що застосування у певному співвідношенні зазначених вище вітамінів супроводжується вираженими імуномодулюючими та протипухлинними ефектами.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами і темами.** Робота виконана у відділі біохімії пухлинного росту Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (ІЕПОР НАН України) відповідно до напрямку науково-дослідних робіт Інституту за темами: „Розробити нові підходи до підвищення ефективності протипухлинних вакцин” (2001–2003 рр., № державної реєстрації – 0101U000784); „Визначення ролі ад’ювантів та імуномодуляторів в реалізації дії протипухлинних вакцин” (2004–2006 рр., № державної реєстрації – 0104U000589) та „Особливості функціонування онкогенному” (2002–2006 рр., № державної реєстрації – 0102U003228), що проводилася у рамках цільової наукової програми НАН України „Фізіолого-біохімічні та молекулярно-генетичні основи функціонування живих систем і розробка принципів керування ними”. А також відповідно до напрямку науково-дослідних робіт Інституту нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова АМН України за темами: „Вивчити модулюючий та апоптичний вплив злоякісних пухлин головного мозку різного генезу на імунну систему та розробити способи активації протипухлинного імунітету” (2004–2006 рр., № державної реєстрації — 0104U000409); „Дослідити порушення протипухлинної ланки імунної системи при злоякісних пухлинах головного мозку та їх корекцію біологічними і імуномодулюючими чинниками” (2007–2009 рр., № державної реєстрації – 0107U001191). Робота була підтримана додатковою стипендією Президії НАН України (2004–2005 рр.).

**Мета дослідження.** Розробити технологію отримання глікопептидних вакцин з пухлинної тканини, дослідити безпечність їх застосування та протипухлинну ефективність на моделях інтракраніального злоякісного росту.

Завдання дослідження.

1. Розробити глікопептидну протипухлинну вакцину на основі глікопептидів з пухлинної тканини ГМ та охарактеризувати її основні фізико-хімічні властивості.
2. Дослідити безпечність застосування ГПВ на експериментальних тваринах.
3. Вивчити протипухлинну ефективність ГПВ на моделі перещепленої злоякісної гліоми щурів 101.8 при застосуванні різних схем вакцинації.
4. Дослідити протипухлинну ефективність ГПВ на моделі інтракраніального пухлинного росту меланоми В16.
5. Експериментально обґрунтувати можливість підвищення ефективності протипухлинної дії ГПВ шляхом застосування ад’юванта – комплексу водорозчинних вітамінів С та К3.

*Об’єкт дослідження.* Оригінальні глікопептидні вакцини, виготовлені на основі пухлинних клітин..

*Предмет дослідження.* Протипухлинна ефективність та безпечність застосування глікопептидних протипухлинних вакцин, можливість посилення її дії та деякі імунологічні ефекти застосування ГПВ.

*Методи дослідження.* Біохімічні – виділення, очищення та електрофоретична характеристика компонентів глікопептидних вакцин; експериментальної онкології; імунологічні – визначення функціональної активності макрофагів у НСТ-тесті, цитотоксичної активності лімфоцитів, вмісту циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові; цитологічні – дослідження змін в пухлинних клітинах, викликаних дією комплексу водорозчинних вітамінів; біофізичні – дослідження поверхневого потенціалу імунокомпетентних клітин; методи статистичної обробки та аналізу результатів дослідження.

**Наукова новизна.** Вперше створена оригінальна ГПВ із пухлинної тканини головного мозку. Досліджена протипухлинна ефективність нової ГПВ на моделях інтракраніального пухлинного росту порівняно з іншими моделями пухлинного росту. Експериментальними дослідженнями доведена доцільність та ефективність застосування ГПВ як самостійного протипухлинного засобу, а також можливість підвищення її ефективності шляхом поєднаного застосування з ад’ювантом – комплексом водорозчинних вітамінів на різних моделях, у тому числі інтракраніального пухлинного росту. Доведена безпечність застосування та розроблено ефективні схеми і дози введення ГПВ при вакцинотерапії злоякісних пухлин головного мозку в експерименті.

**Практичне значення.** Вперше створено протипухлинні вакцини на основі фракції глікопептидів, одержаних із тканини пухлин ГМ. Дані вакцини виявилися безпечними та ефективними в експериментах *in vivo* при лікуванні тварин з інтракраніальним ростом модельних пухлин. Показано, що протипухлинна ефективність ГПВ може бути підвищена шляхом застосування ад’юванту – комплексу водорозчинних вітамінів. Експериментально обґрунтована доцільність застосування ГПВ на моделях інтракраніального росту пухлин. Ці результати є важливою складовою у розробці імунотерапевтичних підходів до лікування хворих з пухлинами ГМ та обґрунтовують перспективність проведення клінічного випробування ГПВ у складі комплексного лікування цих хворих. Дані щодо динаміки змін в імунній системі тварин з пухлинним процесом, які відбуваються під впливом вакцинації, можуть бути використані при розробці схем вакцинотерапії, а також для моніторингу ефективності клінічного застосування таких вакцин.

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем виконано інформаційний пошук, проведено аналіз джерел науково-медичної інформації за темою дисертації; розроблено схеми одержання ГПВ із тканини пухлин головного мозку. Автором дисертації особисто розроблено схеми експериментів, здійснено приготування ГПВ, вакцинації та спостереження за тваринами, дослідження імунологічних показників у тварин в процесі вакцинотерапії. Особисто проведено аналіз первинного матеріалу, статистичне опрацювання та теоретичне узагальнення результатів роботи, сформульовано основні наукові положення та висновки дисертації.

**Апробація результатів дисертації.** Результати дисертаційної роботи були викладені та обговорені на: VI конференції молодих онкологів України „Сучасні проблеми експриментальної та клінічної онкології” (Київ, 2003); III з’їзді онкологів та радіологів країн СНД (Мінськ, 2004); I Всеукраїнській науково-практичній конференції „Вітчизняні протипухлинні препарати: аналіз сьогодення та погляд в майбутнє” (Київ, 2004); V Українській конференції молодих вчених, присвяченій пам’яті академіка В.В. Фролькіса (Київ, 2004); VII конференції молодих онкологів України „Сучасні проблеми експриментальної та клінічної онкології” (Київ, 2006), XI з’їзді онкологів України (Судак, 2006), **2nd Congress** „**Immune-Mediated Diseases: from Theory to Therapy”** (Moscow, Russia, 2007), V Львівсько-Люблінській конференції з експериментальної та клінічної біохімії (Львів, 2008), XII Конгресі Світової Федерації Українських лікарських товариств (Івано-Франківськ–Київ–Чикаго, 2008), 19th European Students Conference Charite (Berlin, Germany, 2008).

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 15 наукових праць: 3 статті у провідних фахових виданнях, рекомендованих ВАК України, 10 тез; отримано 1 деклараційний патент України на винахід та 1 деклараційний патент на корисну модель.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота, обсягом 187 сторінок, складається з вступу, огляду літератури, 5 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків і списку використаних літературних джерел, який включає 281 найменування, в тому числі 230 – англійською мовою. Робота ілюстрована 24 рисунками та 31 таблицею.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ**

**Матеріали та методи дослідження**. Представлені в роботі дані одержані на експериментальному матеріалі. Дослідження проводили на мишах ліній C57Bl/6 та нелінійних мишах (обох статей, віком 8–10 тижнів, масою 18–20 г), щурах – нелінійних та лінії Вістар (обох статей, віком 1–1,5 міс., масою 55–75 г), а також кролях породи шиншила (обох статей, віком 10–12 міс., масою 1,5–2 кг), які були одержані з розплідника віварію ІЕПОР НАН України. Утримання тварин та робота з ними здійснювались відповідно до загальноприйнятих міжнародних правил проведення робіт з експериментальними тваринами.

Для створення експериментальних модельних систем злоякісного росту нами були використані штами пухлин, одержані із Національного банку культур тканин ІЕПОР НАН України, зокрема меланома В16 (В16), карцинома легені Льюїс, карциносаркома Уокер, карцинома Герена та рак Ерліха (РЕ). Штам гліоми 101.8 був люб’язно наданий співробітниками Інституту нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова АМН України. Пухлинні клітини (ПК) гліоми 101.8 перещеплювали інтрацеребрально (1,0 х 106 ПК/тварину), меланоми В16 – інтрацеребрально (2,5 х 105 ПК/тварину) та підшкірно (5 х 105 ПК/тварину), підшкірно вводили також ПК карциносаркоми Уокер (5 х 105 ПК/тварину), карциноми Герена (5 х 105 ПК/тварину) та РЕ (3 х 105 ПК/тварину). При оцінці протипухлинного ефекту ГПВ у всіх групах тварин визначали показники виживаності  (%) та середньої тривалості життя (СТЖ), розраховували гальмування росту пухлини та збільшення тривалості життя (ЗТЖ) (Трещалина Е.М., 2005).

Для приготування вакцин були використані наступні методи: осадження білків сульфатом амонію (Скоупс Р., 1985) та йонообмінна хроматографія на ДЕАЕ-целюлозі (Barnard E. A., 1975). Білковий склад отриманих вакцин контролювали за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі із застосуванням додецилсульфату натрію. Морфологічні зміни в ПК, викликані дією комплексу водорозчинних вітамінів (С та К3),

визначали мікроскопічно у фіксованих цитопрепаратах, забарвлених за методом Романовського-Гімза (Козинец Г. И., 1998).

ГПВ виготовляли з пухлинної тканини ГМ тварин у випадку інтракраніального пухлинного росту за модифікованим методом (Шляховенко В.О., 2004). В експериментах *in vivo* ГПВ в об’ємі 25 мкл/тварину вводили інтрацеребрально на другу добу після перещеплення ПК, один раз на тиждень, всього три ін’єкції. Підшкірно ГПВ вводили за тією ж самою схемою з розрахунку 0,2 мл/тварину. Були застосовані різні схеми застосування ГПВ.Імунологічні показники визначалися на   
3-, 6- та 9-у добу після початку імунізації. В усіх дослідах тваринам контрольних груп в режимах, аналогічних до описаних вище, вводився підшкірно та інтрацеребрально фізіологічний розчин хлориду натрію.

Вивчення безпечності застосування ГПВ проводилося згідно з вимогами Державного фармакологічного центру МОЗ України (методичні рекомендації). Вивчалася гостра та хронічна токсичність ГПВ, місцевоподразнююча дія, пірогенні та алергізуючі властивості, тератогенна й ембріотоксична дія ГПВ на експериментальних тваринах.

Цитотоксичну активність (ЦТА) лімфоцитів визначали *in vitro* з використанням мікроскопічного тесту (Фільчаков Ф.В., 1998). Як клітини-мішені (КМ) використовувалися ПК, гомологічні до перещеплених. Метаболічну активність перитонеальних макрофагів оцінювали у НСТ-тесті (Передерий В. Г., 1995). Крім того, в сироватці крові тварин оцінювався вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) (Фролов В. М., 2002). Для дослідження особливостей генерування пухлинними клітинами супероксидних радикал-аніонів було застосовано хемілюмінесцентний метод. Ступінь генерації активних форм кисню ПК визначали за рівнем люмінесценції з індикатором посилення люцигеніном (Земсков В.М., 1988). Електрокінетичний потенціал імунокомпетентних клітин у здорових тварин та тварин з пухлинами досліджувався методом клітинного електрофорезу (Богуславский Л.И., 1978; Иенсен Г.Л., 1979).

Для визначення середньоквадратичної похибки та достовірності отриманих даних використовувалася комп’ютерна програма GraphPad Instat. Математична обробка результатів проводилася з використанням *t*-критерію Ст’юдента. Виживаність тварин аналізували за допомогою тесту Каплана-Мейєра.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Одержання, характеристика глікопептидних вакцин та обгрунтування застосування ад’ювантного комплексу вітамінів.** Проведена експериментальна робота складалася з трьох етапів. На першому етапі необхідно було одержати із ПК різного гістогенезу, локалізованих у головному мозку, ГПВ та дослідити їх основні фізико-хімічні властивості. Для розробки ГПВ нами було обрано декілька методів, зокрема метод осадження білків сульфатом амонію та наступне фракціонування за допомогою йонообмінної хроматографії. Отримана при цьому фракція була насичена глікопептидами з молекулярною масою 50 кДа в кількості, достатній для приготування ГПВ і проведення експериментів, саме вона була використана нами для подальшої роботи.

ГПВ є високоочищеним стандартизованим глікопептидом з молекулярною масою 50 кДа, отриманим із пухлинної тканини шляхом протеолітичного гідролізу та наступного фракціонування. Залежно від гістогенезу пухлини, з якої готують ГПВ, до її складу найвірогідніше входять декілька антигенів. Для аналізу одержаної фракції глікопептидів і оцінки її можливої гетерогенності було застосовано метод електрофорезу у поліакриламідному гелі з подальшим виявленням пептидних компонентів та глікозидних залишків (рис.1).

|  |  |
| --- | --- |
| **50 кДа**  **1 2 3 4**  all4_rev.tif | **Рис. 1.** Електрофоретичний профіль глікопептидної вакцини, виготовленої на  основі пухлинних клітин гліоми 101.8:   1. вихідний гомогенат пухлинних клітин; 2. очищений препарат (забарвлення Кумассі яскраво-голубим); 3. очищений препарат (PAS-реакція); 4. очищений препарат (реакція з альціановим синім). |

У складі виготовленої ГПВ найбільш вираженим і постійним є основний компонент з молекулярною масою 50 кДа. Крім цього найбільш вираженого компоненту, ГПВ містила ще декілька менш виражених компонентів, які не завжди відображалися на електрофореграмах. При зберіганні ГПВ у запаяних ампулах під шаром консерванту (етанол) при температурі (4–8) 0С протягом 24 міс. постійність її складу не змінюється. При повторному електрофоретичному дослідженні в 12,5% поліакриламідному гелі через 6, 12 та 24 міс. помітних змін в електрофоретичному профілі ГПВ не спостерігалось. Дозування ГПВ здійснювали відповідно до кількості ПК, з яких виготовлена вакцина (клітинний еквівалент), що визначали за кількістю ДНК, яка вивільнялась із матеріалу після протеолітичного руйнування ПК. З метою підсилення дії застосованої в експериментальних дослідженнях ГПВ на наступному етапі роботи нами був використаний ад’ювант, що представляє собою систему з двох вітамінів – аскорбінової кислоти і водорозчинної форми вітаміну К(вікасол, К3) у співвідношенні 100:1. Із літератури відомо (Verrax J. et al., 2003; Taper H.S. et al., 2004), що при поєднанні цих вітамінів створюється система, яка генерує активні форми кисню. Важливо, що реакція відбувається всередині клітин живого організму, при цьому активуються деякі біологічні процеси. З огляду на це, нами було досліджено ступінь генерації активних форм кисню ПК під впливом вітамінів С та К3, що визначали за рівнем люмінесценції з індикатором посилення люцигеніном. З даних, наведених на рис. 3, видно, що інкубація клітин карциноми Ерліха окремо з вітаміном С посилювала генерацію активного кисню на 86% щодо контрольного рівня, в той час, як вітамін К3 вірогідно не впливав на даний показник. Проте інкубація пухлинних клітин уже з поєднанням цих вітамінів в одну систему вірогідно посилює рівень люмінесценції на 150% порівняно з контролем (рис. 2).

|  |  |
| --- | --- |
| Варіанти впливу  Інтенсивність люмінесценції, % | **Рис. 2.** Вплив комплексу вітамінів С і К3 на генерацію активних форм кисню в клітинах карциноми Ерліха  *Примітки*:  1. \*p<0,05 – порівняно з контролем;  2. (С+К3) – поєднане застосування вітамінів С та К3. |

У цитопрепаратах, виготовлених із клітин карциноми Ерліха, що зазнали комплексного впливу вітамінів С та К3,нами було виявлено морфологічні зміни, що характеризуються значним збільшенням розмірів клітин, втратою чіткості контурів ядерної оболонки, зміною текстури хроматину та набування клітинами вигляду зіркоподібних структур, що узгоджується з даними інших авторів (Verrax J. et al., 2003). Ці зміни в клітинах отримали назву „автошизису”.

**Вивчення безпечності застосування глікопептидної протипухлинної вакцини.** У серіїдосліджень вивчалася гостра та хронічна токсичність розробленої нами ГПВ на мишах та щурах. Інтервал досліджуваних доз складав 104 ̶ 4×106 клітинних еквівалентів ПК. Загальнотоксична дія ГПВ оцінювалася за летальністю та деякими фізіологічними показниками і поведінковими реакціями досліджуваних тварин. При встановленні гострої токсичності в діапазоні випробуваних доз не спостерігалося загибелі жодної тварини як безпосередньо після введення, так і у більш віддалені терміни. Різниці в реакціях мишей та щурів на введення ГПВ як у самок, так і у самців не виявлено. В кінці спостережень тварин під наркозом забивали та досліджували їхні внутрішні органи. Патологічних змін у тканинах та органах після введення ГПВ не виявлено. Внаслідок проведених досліджень гострої токсичності зроблено висновок, що ГПВ, введена внутрішньошкірно та підшкірно, практично нетоксична і її LD50 знаходиться за межею досліджуваних доз. Під час проведення експериментальних досліджень з вивчення хронічної токсичності не було відзначено жодних відхилень у зовнішній поведінці та фізіологічних реакціях експериментальних тварин. Введення ГПВ суттєво не змінювало кількісні показники клітин лейкоцитарного ряду, однак відзначався незначний зсув їх вліво, починаючи з наступної доби після введення ГПВ. Загальна кількість лейкоцитів зростала повільніше і тільки через 2 тижні вірогідно була вищою за вихідні дані. Слід зазначити, що через 30 діб після початку введення ГПВ всі показники крові нормалізувалися. При вивченні біохімічних показників тварин, через 2 тижні після останнього введення їм ГПВ, суттєвих змін у функціональному стані печінки та нирок не відзначалося. Ці показники вірогідно не відрізнялися від вихідних. ГПВ не впливає на вміст гемоглобіну в еритроцитах та їх кількість у периферичній крові (р>0,05). При мікроскопічному дослідженні гістологічних препаратів у всіх дослідних тварин не знайдено жодних структурних змін у тканинах при лікуванні різними дозами ГПВ. У частини фолікулів селезінки відмічаються ознаки активації у вигляді розширення зони реактивного центру. Спостерігається помірно виражена гіперплазія окремих фолікулів та перебудова тканини селезінки за рахунок міграції лімфоїдних елементів у периферичні відділи.

Вивчення алергізуючої дії вакцини проводилося згідно з вимогами методичних рекомендацій Державного фармакологічного центру МОЗ України, використовуючи ряд тестів. З метою оцінки алергічних реакцій негайного типу проводили шкірну пробу. Місцевоподразнююча дія суспензії ГПВ вивчалася в тому ж інтервалі доз при аплікації на шкіру щурів та кролів у випадку одноразового, 3-х та 15-ти разовому щоденному нанесенні. При оцінці даної проби в усі терміни спостереження в жодній із дослідних груп не зафіксовано гіперемії шкіри. Була проведена також кон’юнктивальна проба. При оцінці реакції кон’юнктиви, проведенній негайно, через 30 хв, 4, 6 та 24 години після закапування суспензії ГПВ під повіку шляхом обстеження ока за допомогою лупи з 10-ти кратним збільшенням, нами встановлено, що реакція кон’юнктиви була негативною у всіх тварин. Узагальнені результати наших досліджень, проведених на мишах, вказують, що ГПВ в межах досліджуваних доз не викликає алергічних реакцій негайного типу.

Реакцію гіперчутливості уповільненого типу (РГУТ) вивчали на нелінійних мишах. Аналіз отриманих даних свідчить про те, що інтенсивність РГУТ під впливом ГПВ залежно від дози змінювалася несуттєво. При введенні доз даної вакцини 104 та 4×106 клітинних еквівалентів РГУТ підвищувалася до 12,1% та 13,5% відповідно. Ці показники статистично значимо не відрізнялись від показників контрольних тварин (р>0,05). Інтенсивність РГУТ при введенні аналогічних доз ГПВ самцям і самкам вірогідно не відрізнялася. При проведенні нами досліджень з вивчення пірогеннних властивостей ГПВ виявилося, що при вимірюванні температури шкіри кролів досліджувані показники практично не відрізнялися між собою у різних кролів та не перевищували вихідних показників у середньому більш ніж на 0,6 оС, як при одноразовому, так і при курсовому триразовому введенні ГПВ протягом 3-х діб, що свідчить про те, що вакцина не має пірогенних властивостей.

Узагальнюючи проведену серію досліджень, необхідно відзначити, що в гострих і хронічних дослідах при одноразовому і тривалому внутрішньошкірному введенні ГПВ в дозі 104 – 4×106 клітинних еквівалентів на тварину, не виявлено негативного впливу ГПВ на показники периферичної крові, поведінкових реакцій тварин, не змінювалась частота дихання, антитоксична функція печінки, не змінювався діурез. Вакцина не має алергогенних властивостей, подразнюючої дії на шкіру та слизову оболонку ока, а також ембріотоксичних, тератогенних та пірогенних властивостей. При внутрішньошкірному введенні ГПВ у широкому діапазоні доз не відзначалося будь-яких токсичних проявів, відхилень у поведінкових реакціях та фізіологічному стані лабораторних тварин.

Одержані дані дозволяють стверджувати, що розроблена ГПВ при одно- та багаторазовому застосуванні є безпечною і не є токсичною.

**Дослідження ефективності застосування ГПВ при інтракраніальному пухлинному рості.** Проведення досліджень було розпочато з пошуку оптимальної схеми застосування та дози ГПВ. На моделі перещепленої щурам злоякісної гліоми 101.8 досліджувалась ефективність трьох доз: 2,5×105, 5×104  і 104 клітинних еквівалентів ПК. Вакцина вводилась щурам один раз на тиждень, підшкірно та інтрацеребрально в об’ємі 0,2 мл та 25 мкл фізіологічного розчину відповідно. Вплив вакцинотерапії оцінювався на підставі показника виживаності тварин. Контрольну групу представляли тварини, які не отримували ніякої терапії, окрім фізіологічного розчину, введеного за тією ж схемою підшкірно та інтрацеребрально відповідно. З урахуванням мети та поставлених завдань було розроблено схему, яка включала декілька напрямків експериментальних досліджень. Перший напрямок полягав у вивченні на моделі інтракраніального пухлинного росту протипухлинної ефективності оригінальної ГПВ в залежності від дози та способу введення. Другий напрямок – дослідження можливості підвищення ефективності ГПВ шляхом поєднаного застосування її у відібраній дозі з ад’ювантом. В процесі вакцинотерапії досліджувались також деякі імунологічні ефекти, викликані дією даних вакцин на організм тварин з модельними пухлинами різного гістогенезу.

У результаті проведених нами досліджень встановлено, що використання ГПВ виявилось ефективним на всіх випробуваних моделях, в тому числі на моделях інтракраніального пухлинного росту (табл. 1, рис. 3).

*Таблиця 1*

**Показники середньої тривалості життя та збільшення тривалості життя мишей з різними модельними пухлинами при застосуванні ГПВ**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Модель  пухлин-  ного росту | Перещеплення  пухлинних клітин | Введення вакцини | Доза  ГПВ,  кліт. екв.-в1 | Показник | Контроль  пухлин-  ного  росту | ГПВ |
| Гліома  101.8 | інтрацеребрально | інтрацеребрально | 104 | СТЖ, діб | 35,0 ± 2,7 | 41,0 ± 3,1\* |
|  |  | ЗТЖ, % | - | 17,1 |
| підшкірно | 104 | СТЖ, діб | 35,0 ± 2,5 | 38,0 ± 2,3 |
|  |  | ЗТЖ, % | - | 8,6 |
| Меланома  В16 | інтрацеребрально | інтрацеребрально | 104 | СТЖ, діб | 13,7 ± 3,8 | 27,7 ± 8,0\* |
|  |  |  | ЗТЖ, % | - | 102,2 |
| підшкірно | підшкірно | 104 | СТЖ, діб | 28,7 ± 2,1 | 35,4 ± 7,3 |
|  |  |  | ЗТЖ, % | - | 23,3 |

Примітки:

1. \*р<0,05 порівняно з контролем;
2. 1кліт. екв.-в – клітинних еквівалентів ПК.

Проведені *in vivo* попередні дослідження протипухлинної дії різних доз та способів введення ГПВ, виготовленої із пухлинних клітин гліоми 101.8, показали, що вона виявляє протипухлинну дію в діапазоні всіх використаних доз. Були досліджені різні дози (104–2,5×105 клітинних еквівалентів) та способи введення (підшкірний, інтрацеребральний) ГПВ за умов інтракраніального росту гліоми 101.8. Дози 5×104 та 2,5×105 мали менш виражений вплив. Однак, у випадку застосування дози ГПВ – 104 клітинних еквівалентів та інтрацеребрального способу введення вакцини, протипухлинний ефект був більш виражений: ЗТЖ вакцинованих тварин з гліомою 101.8 становило 17,1%. Саме ця підібрана доза за умови інтрацеребрального введення використовувалася в подальших дослідженнях. В експериментах *in vivo* на моделі меланоми В16 було показано, що ГПВ, виготовлена із ПК, має виражену протипухлинну дію – вірогідно подовжує СТЖ вакцинованих тварин (на 23,3% – при підшкірному рості та на 102,2% – при інтракраніальному рості меланоми В16 (р<0,05)).



**Рис. 3.** Динаміка виживаності мишей з інтракраніальним ростом меланоми В16 при застосуванні ГПВ

Дані дослідження є етапом доклінічного вивчення протипухлинної ефективності ГПВ. В цих дослідженнях була, принаймні, частково відтворена клінічна ситуація, коли імунотерапію призначають з метою лікування метастатичного ураження головного мозку та попередження метастазування чи виникнення і поширення рецидивів після видалення пухлини головного мозку.

На моделі інтракраніального росту меланоми В16 встановлено (табл. 2), що розвиток пухлини у контрольних невакцинованих мишей супроводжується зниженням активності мононуклеарних лімфоцитів. У процесі пухлинного росту відбувалося короткочасне підвищення (р<0,05), а потім різке зниження активності мононуклеарних лімфоцитів порівняно з такою в інтактних тварин. Використання ГПВ призводило до нормалізації даного показника порівняно з таким у групі тварин з пухлинами (р<0,01) та інтактними тваринами.

*Таблиця 2*

**Цитотоксична активність1 мононуклеарних лімфоцитів у вакцинованих ГПВ2 мишей С57Вl/6 з інтрацеребрально трансплантованою меланомою В16 (ЦТІ, %)**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Групи | Порядковий номер ін’єкції / Доба після перещеплення пухлини | | |
| 1/3 | 2/6 | 3/9 |
| Інтактні тварини (n=5) | 24,3±2,5 | | |
| Контроль – тварини (n=15) з перещепленою меланомою В16 | 15,0±0,5 | 24,5±7,6\* | 13,3±2,6 |
| Вакциновані ГПВ тварини (n=15) | 14,9±1,9 | 21,2±3,4\*\* | 22,9±3,2\*\*/## |

Примітки:

1. 1 визначали цитотоксичний індекс (ЦТІ);

2. \*р<0,05,\*\*р<0,01 порівняно з 1-ю ін’єкцією;

3. ##р<0,01 порівняно з попередньою ін’єкцією у контрольних тварин з перещепленою меланомою В16;

4. 2доза ГПВ – 104 клітинних еквівалентів ПК.

Наступним етапом роботи було вивчення можливого підвищення ефективності ГПВ шляхом попереднього впливу низьких температур ( –195,8 °C) на пухлинну тканину *in vivo* або поєднаного застосування в якості ад’юванта системи з двох вітамінів С і К3. Триразове введення модифікованого варіанту ГПВ (кріовакцина) щурам з карциносаркомою Уокер супроводжувалося гальмуванням росту пухлини на 20%. Протипухлинна ефективність ГПВ самостійно та в комплексі з відібраним ад’ювантом вивчалася на моделі інтракраніального росту меланоми В16 (рис. 4, табл. 3).

Термін після перещеплення пухлини, доба

-⯁- Контроль

---- ГПВ1

-⯅- С+К3

-○- ГПВ + (C + К3)

Виживаність,%

**Рис. 4**. Ефективність ГПВ при її поєднаному застосуванні з комплексом вітамінів у мишей з інтракраніальним ростом меланоми В16

Примітки:

1. 1ГПВ – доза 104 клітинних еквівалентів ПК;
2. (С+К3) – поєднане застосування вітамінів С та К3.

*Таблиця 3*

**Виживаність мишей з інтракраніальним ростом меланоми В16   
при поєднаному застосуванні ГПВ та комплексу вітамінів**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Групи  (кількість тварин у групі) | СТЖ, діб | ЗТЖ, % |
| Контроль (n=10) | 10,0 ± 1,4 | – |
| ГПВ (n=10) | 29,2 ± 9,4 \* | 191,7 |
| С + К3 (n=10) | 19,0 ± 6,9 | 90,0 |
| ГПВ + (С + К3) (n=10) | 31,2 ± 8,7 \* | 211,7 |

Примітки:

1. 1ГПВ – дозе 104 клітинних еквівалентів

2. \*p<0.01 порівняно з контролем;

3. (С + К3) – поєднане застосування вітамінів С та К3.

Встановлено, що специфічна імунотерапія ГПВ призводить до збільшення СТЖ експериментальних тварин. За результами досліджень поєднане застосування ад’юванту (комплекс вітамінів С та К3) та ГПВ певною мірою посилює протипухлинний ефект останньої, що проявляється в збільшенні СТЖ тварин порівняно з такими, яким вводилася тільки ГПВ (СТЖ 31,2 ± 8,7 та 29,2 ± 9,4 діб, відповідно).

Наступним фрагментом роботи було вивчення деяких імунологічних показників у тварин в процесі вакцинотерапії ГПВ. Результати дослідження впливу ГПВ окремо та в комплексі з вітамінами С та К3 показали суттєві відмінності у показниках цитотоксичної активності лімфоцитів тварин із інтракраніальним ростом меланоми В16 (рис. 5). Більш того, нами відслідкована динаміка величини цитотоксичного індексу після кожного наступного введення ГПВ в монорежимі та разом із комплексом вітамінів. Так, при аналізі впливу ГПВ на ЦТА лімфоцитів було встановлено максимальний модулюючий ефект після третього введення. Показники цитотоксичного індексу лімфоцитів тварин, які отримували лише комплекс вітамінів, дещо перевищували такі у контрольній групі, але суттєво не відрізнялись від показників інтактних тварин. При поєднаному застосуванні ГПВ та вітамінів С і К3 відмічена достовірно позитивна зміна рівня ЦТА лімфоцитів вже після першого введення досліджуваного комплексу.

Зазначимо, що нами не виявлено суттєвих змін у інших імунологічних показниках (функціональна активність макрофагів та кількість циркулюючих імунних комплексів) у експериментальних тварин в динаміці вакцинотерапії.

**Рис. 5.** Цитотоксична активність лімфоцитів інтактних мишей та мишей з трансплантованою інтрацеребрально меланомою В16 за умов впливу на них 1-, 2- та 3-го введення комплексу вітамінів С і К3 (А), глікопептидної вакцини (Б) та їх поєднання (В).

Примітки:

1. \*p<0,05;

2. \*\*\*р<0,001 –порівняно з тваринами з перещепленими пухлинами;

3. #p<0,05 – порівняно з інтактними мишами;

4. +p<0,05, +++p<0,001 – порівняно з 1-м введенням.

Враховуючи наведені вище результати можна стверджувати, що розроблена ГПВ є нетоксичною, виявляє протипухлинну активність щодо пухлин, локалізованих у головному мозку, ефективність застосування якої може бути посилена поєднаним застосуванням з комплексом вітамінів С та К3.

**ВИСНОВКИ**

В роботі на моделях інтракраніального пухлинного росту обгрунтовано доцільність використання розробленої глікопептидної протипухлинної вакцини (ГПВ) та встановлено підвищення її протипухлинної ефективності за допомогою комплексу вітамінів С та К3.

1. На основі фракції глікопептидів з молекулярною масою 50 кДа, виділених з пухлинних клітин головного мозку, створено оригінальну протипухлинну вакцину.
2. Доведена безпечність та показана відсутність загальнотоксичної, місцевоподразнюючої, алергізуючої, тератогенної та ембріотоксичної дії ГПВ.
3. На моделі експериментального інтракраніального пухлинного росту – злоякісної гліоми 101.8 – встановлено, що ГПВ є найбільш ефективною в дозі 104 клітинних еквівалентів пухлинних клітин при триразовому інтрацеребральному введенні.
4. Застосування ГПВ у тварин з інтракраніальним пухлинним ростом меланоми В16 призводить до збільшення середньої тривалості життя тварин дослідної групи у порівнянні з контрольною (29,2 ± 9,4 та 10,0 ± 1,4 діб відповідно); (р<0,01).
5. Показано, що композиція з водорозчинних вітамінів С та К3 підвищує протипухлинний ефект ГПВ та може бути використана для активації системи протипухлинного захисту.

**СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Протипухлинна аутовакцина на основі глікопептидів пухлинних клітин / Шляховенко В.О., Мосієнко В.С., Козак В.В., Яніш Ю.В., Олішевський С.В., Мазур О.В., Артамонова А.Б. // Онкология. – 2004. – Т.6, № 3.– С. 180–184. *(Особистий внесок здобувача: підібрано і проаналізовано наукову літературу щодо вакцинотерапії, імунотерапії злоякісних новоутворень, проведено серію експериментальних досліджень, підготовлено статтю до друку)*.
2. Кузьменко О.П. Вплив традиційної та модифікованої низькими температурами глікопептидних вакцин на пухлинний процес в експерименті /   
   Кузьменко О.П., Мазур О.В. // Проблеми кріобіології. – 2005. – Т.15, № 11. – С.519–522. *(Особистий внесок здобувача: проведено планування схеми експерименту, виготовлення модифікованої глікопептидної протипухлинної вакцини, підготовку зразків для електрофоретичного дослідження, здійснено імунізацію тварин та отримання лімфоїдних органів, підготовлено статтю до друку)*.
3. Мазур О.В. Виживаність та деякі імунологічні показники у щурів із злоякісними гліомами головного мозку при різних способах застосування глікопептидної аутовакцини / Мазур О.В., Главацький О.Я., Шляховенко В.О. // Український морфологічний альманах. – 2006, № 3. – С.41–45. *(Особистий внесок здобувача: проведено планування схеми експерименту, здійснено виготовлення вакцини, імунізацію тварин та визначення кількісного рівня циркулюючих імунних комплексів, проаналізовано та проведено математичну обробку результатів, підготовлено статтю до друку)*.
4. Деклараційний патент на корисну модель В61Н15/00, А61К31/00, А61К35/74 № 70240. A. Україна. «Спосіб імунізації глікопептидною протипухлинною аутовакциною» / Олішевський С.В., Мазур О.В., Шляховенко В.О., Главацький О.Я. (Україна); – № 2006 01520; Заявл. 14.02.2006; Опубл. 15.08.2006: Бюл. № 8. *(Особистий внесок здобувача: проведено планування експерименту, виготовлення вакцини, імунізацію тварин, аналіз та математичну обробку результатів, брала участь в оформленні заявки на патент).*
5. Деклараційний патент на винахід 70240 А, А61К35/12. Україна. «Спосіб одержання протипухлинної аутовакцини» / Шляховенко В.О., Тащієв Р.К., Ель-Карім Ашраф Авад, Мосієнко В.С., Олішевський С.В., Мазур О.В.,   
   Абраменко І.В. (Україна); – № 2003 1213219; Заявл. 31.12.2003; Опубл. 15.09.2004: Бюл. № 9. *(Особистий внесок здобувача: проаналізовано наукову літературу стосовно впливу низьких температур на пухлинну тканину, імунний статус пухлиноносія, проведено виготовлення модифікованої глікопептидної протипухлинної вакцини, підготовку зразків для електрофоретичного дослідження, брала участь в оформленні заявки на корисну модель)*.
6. Застосування протипухлинної аутовакцини як один з можливих підходів в імунотерапії хворих з пухлинами нервової системи / Мазур О.В.,   
   Олішевський С.В., Шляховенко В.О., Разуменко В.Д., Главацький О.Я., Лісяний М.І. // Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології: Тези VI конференції молодих онкологів України, 4–5 грудня 2003 р., Київ, Україна. – С. 33.
7. Мазур О.В. Протипухлинна аутовакцина – перспективи застосування у хворих з пухлинами нервової системи / Мазур О.В., Олішевський С.В. // V українська конференція молодих вчених, присвячена пам’яті академіка В.В. Фролькіса: Тези доповідей, 23 січня 2004 р., Київ, Україна. – С. 110–112.
8. Новые пути иммунотерапии опухолей нервной системы / Шляховенко В.А., Мазур О.В., Олишевский С.В., Разуменко В.Д., Главацкий А.Я., Лисяный Н.И. // ІІІ съезд онкологов и радиологов стран СНГ: Сб. матер., Т.1., 25–28 мая   
   2004 г. – Минск (Беларусь). – С. 263–264.
9. Применение комплекса витаминов С и К3 в экспериментальной иммунотерапии злокачественных опухолей / Козак В.В., Яниш Ю.В., Олишевский С.В., Мазур О.В., Дружина Н.А., Шляховенко В.А. // Вітчизняні протипухлинні препарати: аналіз сьогодення та погляд в майбутнє: Матер.   
   І Всеукраїнської науково-практичної конференції, 14–15 жовтня 2004 р., Київ, Україна. – С. 31–32.
10. Специфическая иммунотерапия гликопептидной аутовакциной на модели метастатического поражения головного мозга / Мазур О.В., Олишевский С.В, Козак В.В., Шляховенко В.А., Главацкий А.Я., Швед В.В. // Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології: Тези VII конференції молодих онкологів України, 2–3 лютого 2006 р., Київ, Україна. – С. 63.
11. Протипухлинні вакцини та ад’юванти: експериментальні дослідження і перспективи застосування в клінічній практиці. / Олішевський С.В., Шляховенко В.О., Мазур О.В., Козак В.В., Яніш Ю.В. // Матер. XI з’їзду онкологів України, Судак, 2006. – С.33.
12. Mazur O.V. Prosperities of glycopeptide cancer autovaccine application in neurooncology / Mazur O.V., Shlyakhovenko V.A. // **2nd Congress «Immune-Mediated Diseases: from Theory to Therapy”.** – Moscow (Russia), September 10th–14th, 2007. **Abstracts of the Congress.** –Journal of the association of pediatric allergists and immunologists of Russia, 2007; 11 (Suppl. 2): 50–51.
13. Efficacy of immunotherapy in mice with brain metastases / Mazur O.V., Shlyakhovenko V.O., Olishevsky S.V. Kozak V.V., Glavacky O.Ya. //   
    V Львівсько-Люблінська конференція з експериментальної та клінічної біохімії. Тези доповідей, 15-16 травня 2008 р., Львів, Україна.– С.47–48.

14. Перспективні підходи підвищення ефективності протипухлинної глікопептидної вакцини в експерименальній імунотерапії пухлин /   
Мазур О.В., Козак В.В., Главацький О.Я., Шляховенко В.О. // XII Конгрес Світової Федерації Українських лікарських товариств. Тези доповідей,   
25–28 вересня 2008 р., Івано-Франківськ – Київ–Чикаго. – С.393–394.

15. The estimate of efficacy of glycopeptide autovaccine using in cancer immunotherapy in combination with vitamin C and K3 complex and other adjuvants. / Mazur O.V., Shlyakhovenko V.O., Olishevsky S.V. Kozak V.V.,  
Glavacky O.Ya. // Аbstract of 19th European Students’ Conference. Charite Virchow-Klinikum, Medical Faculty of the Humboldt University, 29 September –   
3 Oktober, Berlin (Germany), 2008. – P. 69.

**АНОТАЦІЯ**

**Мазур О. В. Дослідження протипухлинної ефективності глікопептидних вакцин на експериментальних моделях інтракраніального злоякісного росту.** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.07 – онкологія. – Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ – 2009.

Дисертація присвячена розробці глікопептидних вакцин, вивченню безпечності їх застосування та протипухлинної ефективності на експериментальних моделях інтракраніального злоякісного росту. У результаті проведених досліджень з пухлинної тканини головного мозку була виділена та охарактеризована глікопептидна фракція з молекулярною масою 50 кДа. Глікопептидна протипухлинна вакцина (ГПВ) є високоочищеним глікопептидом, отриманим із пухлинної тканини шляхом протеолітичного гідролізу та наступного фракціонування методом йонної хроматографії, що виявляє певну імуномодулюючу та протипухлинну активність.

Дослідження протипухлинної дії вакцин, розроблених на основі глікопептидів пухлинних клітин, показало їх ефективність в експериментах *in vivo* на різних моделях злоякісного росту (гліома 101.8, меланома В16, карциносаркома Уокер та рак Ерліха). Доведена безпечність, показана відсутність загальнотоксичної, місцевоподразнюючої, алергізуючої дії ГПВ.

Вперше була запропонована композиція з водорозчинних вітамінів С та К3 для посилення протипухлинного ефекту ГПВ. Вищевказана композиція вітамінів може бути використана для активації систем протипухлинного захисту та стимуляції імунної відповіді. При аналізі імунологічних ефектів, викликаних ГПВ, було встановлено, що реалізація протипухлинної дії вакцин найвірогідніше відбувається на фоні підвищення рівня цитотоксичних реакцій, опосередкованих клітинами лімфоцитарного ряду.

**Ключові слова:** гліома, метастазуюча меланома, протипухлинна глікопептидна вакцина, протипухлинний ефект.

**АННОТАЦИЯ**

**Мазур О. В. Исследование противоопухолевой еффективности гликопептидных вакцин на экспериментальных моделях интракраниального злокачественного роста.** – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.07 – онкология. – Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, Киев – 2009.

Диссертация посвящена разработке и изучению противоопухолевых гликопептидных вакцин на экспериментальных моделях интракраниального злокачественного роста. В результате проведенных исследований были разработаны и охарактеризованы гликопептидные противоопухолевые вакцины.

Гликопептидная вакцина (ГПВ) представляет собой высокоочищенный гликопептид, полученный из опухолевой ткани путем протеолитического гидролиза и последующего фракционирования методом ионной хроматографии. ГПВ обладает иммуномодулирующим и противоопухолевым свойствами.

Доказана безопасность, показано отсутствие общетоксического, местнораздражающего, аллергизирующего действия ГПВ. При исследовании безопасности применения ГПВ был использован широкий интервал доз (104 – 4×106 клеточных эквивалентов опухолевых клеток (ОК)).

В острых и хронических экспериментах при однократном и длительном введении ГПВ в дозе 104 – 4×106 клеточных эквивалентов на животное, не выявлено негативного влияния на показатели периферической крови, поведенческие реакции животных, не изменялась частота дыхания, антитоксическая функция печени, не изменялся диурез. ГПК не имеет аллергогенных свойств, не раздражает слизистую оболочку глаза, не вызывает раздражающего действия на кожу, а также не обладает эмбриотоксическими, тератогенными и пирогенными свойствами. В результате проведенных исследований острой токсичности сделан вывод, что ГПВ, введенная внутрикожно и подкожно, практически нетоксична и её LD50 находится вне зоны исследованных доз.

Изучение противоопухолевого действия вакцин на основе гликопептидов опухолевых клеток показало их эффективность в экспериментах *in vivo* на разных моделях интракраниального злокачественного роста (глиома 101.8, меланома В16). Исследование противоопухолевого действия различных доз и способов введения ГПВ, изготовленной из опухолевых клеток глиомы 101.8, показало наличие противоопухолевого эффекта у ГПВ в диапазоне всех использованных доз. Были исследованы различные дозы (104–2,5×105 клеточных эквивалентов ОК) и способы введения (подкожный, интрацеребральный). В случае использования дозы ГПВ – 104 клеточных эквивалентов ОК и интрацеребрального способа её введения, противоопухолевый еффект был наиболее выраженный. Увеличение продолжительности жизни вакцинированных животных с глиомой 101.8 составило 17,1%. Нами впервые для усиления противоопухолевого эффекта ГПВ была предложена композиция из водорастворимых витаминов С и К3 в определенном соотношении. Исследована противоопухолевая эффективность совместного применения ГПВ и вышеуказанных витаминов, которая оказалась выше, чем при использовании ГПВ в монорежиме. Показано, что композиция из водорастворимых витаминов может быть использована для активации системы противоопухолевой защиты и стимуляции иммунного ответа. Анализируя иммунологические эффекты, вызванные ГПВ, было установлено, что реализация противоопухолевого действия вакцины с наибольшей вероятностью происходит на фоне повышения уровня цитотоксических реакций, опосредованных клетками лимфоцитарного ряда.

**Ключевые слова:** глиома, метастазирующая меланома, противоопухолевая гликопептидная вакцина, противоопухолевый эффект.

**ANNOTATION**

**Mazur O. V.  Study of the cancer glycopeptide vaccines antitumor efficacy on the experimental models of intracranial malignant growth.** – Manuscript.

Thesis for the Candidate of Medical Sciences Degree in speciality 14.01.07 – oncology. – R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv – 2009.

Thesis is devoted to cancer glycopeptide vaccines development and studying of their antitumor effect of on the experimental models of intracranial malignant growth. Using brain tumor tissues cancer glycopeptide vaccines (СGV) were prepared and characterized. It was shown that СGV is a highly purified glycopeptide, which is prepared using tumor tissues proteolytic hydrolysis following gradient fraccionation. СGV possesses immunomodulating and antitumor activity, as was demonstrated in experiments *in vivo*.

Vaccines prepared on the basis of cancer cells glycopeptides demonstrated antitumor efficacy in experimental models of malignant growth including glioma 101.8, melanoma В16, Walker carcinosarcoma and Ehrlih carcinoma). СGV application safety and absence of overall toxicity, local irritation, allergic actions have been shown.

Composition from the water soluble vitamins С and К3 for potentiation of antitumor effect of СGV, which can be used for activating the systems of antitumor defence and stimulation of immune respons, was first offered. Analysis of mechanism of СGV antitumor effect showed that it based on increasing of the level of lymphocytic cytotoxic reactions.

**Key words:** antitumor effect, cancer glycopeptide vaccine, glioma, metastatic melanoma.

 Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>