**Потебня Григорій Платонович. Розробка та підвищення ефективності протипухлинних аутовакцин, виготовлених на основі продуктів синтезу B.subtilis: дисертація д-ра мед. наук: 14.01.07 / АМН України; Інститут онкології. - К., 2003**

|  |  |
| --- | --- |
|

|  |
| --- |
| Потебня Г.П. Розробка та підвищення ефективності протипухлинних аутовакцин, виготовлених на основі продуктів синтезу B.subtilis. - Рукопис.Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.01.07 - онкологія. - Інститут онкології АМН України, Київ, 2003.Дисертація присвячена проблемі конструювання протипухлинних аутовакцин (ПАВ) за допомогою продуктів синтезу B.subtilis та підвищення їх протипухлинної ефективності. Створено протипухлинну аутовакцину на основі пухлинних клітин та лектину, виділеного з B.subtilis 7025. Виявлено, що ад'ювантна складова ПАВ пов'язана саме з дією виділеного лектину. Проведено детальне вивчення молекулярно-біологічної характеристики цього лектину. На основі багаточисельних експериментів показано, що одержана вакцина за протипухлинною ефективністю, відсутністю побічної дії, можливістю стандартизації, впливом на специфічну та неспецифічну ланки протипухлинного імунітету переважає традиційну вакцину. Доведено, що протипухлинну активність вакцини можна підвищити за рахунок її кон'югації з сингенними еритроцитами та спільного використання з такими імуномодуляторами як бластен, настоянка жень-шеню, екстракт елеутерококу та ультразвуковий гомогенат мікробної культури B.megaterium H. Показано, що використання ПАВ в комплексній терапії хворих на рак легені, молочної залози та колоректальний рак значно збільшує 5-річне виживання хворих. Вивчено механізм дії ПАВ в експериментальних та клінічних умовах. |

 |
|

|  |
| --- |
| 1. В результаті виконання дисертаційної роботи було розроблено оригінальну технологію виготовлення протипухлинної вакцини (ПАВ) на основі аутологічних пухлинних клітин за допомогою лектинів B.subtilis , обгрунтовано шляхи оптимізації технології виготовлення ПАВ; в експериментальних дослідженнях розроблено схеми введення ПАВ в монорежимі та в комбінації з фітоадаптогенами або імуномодулятором пробіотичного походження, застосування яких підвищує ефективність вакцинації; в клінічних дослідженнях доведено ефективність застосування ПАВ в комплексній терапії хворих на колоректальний рак, рак легені та рак молочної залози; в експериментальних та клінічних дослідженнях вивчено вплив досліджуваних ПАВ на характеристики специфічної і неспецифічної ланок імунної системи. Сукупність одержаних результатів обгрунтовує застосування ПАВ, виготовлених на основі пухлинних клітин за допомогою продуктів життєдіяльності B.subtilis, в комплексному лікуванні хворих онкологічного профілю для підвищення результатів лікування.
2. Шляхом селекції виділено новий штам B.subtilis 7025, який синтезує більш значні концентрації лектину, ніж B.subtilis АБ-56. На даний штам одержано сертифікат, його задепоновано в депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України. Відпрацьований режим культивування B.subtilis 7025, який забезпечує максимальний вихід цитотоксичних по відношенню до пухлинних клітин речовин.
3. Розроблено спосіб одержання з культурального середовища B.subtilis 7025 речовини з протипухлинною активністю. Встановлено, що отримані препарати являють собою лектини з високою цитотоксичною активністю in vitro та вуглеводною специфічністю щодо фруктозо-1,6-дифосфату, N-ацитилнейрамінової, гліколілнейрамінової, D-глюкуронової кислот та D-глюкозаміну. На основі амінокислотного аналізу зроблено висновок, що бактеріальна культура B.subtilis 7025 синтезує як мінімум два близьких за фізико-хімічними характеристиками кислих цитотоксичних лектини (ЦЛ); нативна молекула ЦЛ має молекулярну масу 26000 Д і складається з трьох поліпептидних ланцюгів з молекулярними масами 8300 Д.
4. Розроблено технологію виготовлення ПАВ за допомогою ЦЛ та показано більш високу (в порівнянні з вакциною на основі фільтрату культуральної рідини - ФКР) її ефективність в профілактичних і терапевтичних експериментах на стандартних моделях пухлинного росту (саркома-37, рак Ерліха, лімфома ОН-2, лімфосаркома ОН-3, лейкоз NK/Ly, меланома В16, КЛЛ). При імунізації оперованих мишей С57Bl вакцинами, отриманими з клітин карциноми легені Льюїс за допомогою ЦЛ і ФКР, було показано, що вона проявляє і більш виражений антиметастатичний ефект (індекс інгібіції метастазування 75% і 50 % відповідно).
5. Розроблено технологію одержання протипухлинних аутовакцин на основі мембран ПК, що дає можливість значно знизити антигенне баластне навантаження на імунну систему (при сумарному введенні 1,5 мг білку порівняно з 15,0-18,0 мг білку при застосуванні вакцини, виготовленої на основі цілих пухлинних клітин). В профілактичних та терапевтичних експериментах з карциномою легені Льюїс у мишей і карциномою Герена у щурів показана антиметастатична та протипухлинна ефективність такої вакцини.
6. Показано, що ПАВ здатні індукувати перехресну резистентність до різних перещепних пухлин (саркома-37, рак Ерліха, лімфома ОН-2, лімфосаркома ОН-3, лейкоз NK/Ly), що має важливе значення для приготування алогенних ПВ при неможливості одержати пухлинний матеріал. При введенні імунізованим мишам гомологічних ПК пухлини не перещеплювались у 89-92% тварин; при введенні гетерологічних ПК захисний ефект вакцин також був достатньо вираженим - 58-85% (p>0,05 порівняно з імунізацією гомологічними вакцинами), СТЖ перевищувала відповідні показники в контрольній групі в 1,6-2 рази.
7. Одним з методів підвищення ефективності вакцинації може бути використання розчинних антигенів ПАВ, кон‘югованих з сингенними еритроцитами. На моделі асцитної пухлини миші (В-лімфоїдного походження) в профілактичному і терапевтичному експериментах одержано дані про більш виражену протипухлинну активність кон‘югованих антигенів ПАВ, ніж некон‘югованих (збільшення СТЖ); зареєстровано здатність кон‘югованих антигенів індукувати у тварин протипухлинну резистентність в більш ранні строки, навіть за умов однократної імунізації.
8. Показано, що комплексне використання ПАВ з імуномодуляторами (настоянка жень-шеню, екстракт елеутерококу, пробіотичний препарат з Lactobacillus Delbrueckii - бластен) підвищує ефективність лікування тварин з пухлинами. Зокрема, ефективність подавлення пухлинного росту (до 60%) і метастазування карциноми легені Льюїс (індекс інгібіції метастазування досягав 75%) значно зростає при сумісній імунізації ПАВ і тривалому застосуванні низьких доз офіцинальних фітоадаптогенів. На моделі солідної форми саркоми-37 у мишей BALB/c і меланоми В-16 у мишей C57Bl показано, що при комплексному лікуванні ПАВ і бластеном зареєстровано більш значне гальмування пухлинного росту і подовження тривалості життя тварин, ніж при ізольованому використанні ПАВ.
9. Використання ПАВ при комбінованому лікуванні хворих на колоректальний рак та рак легені поліпшує показники 5-річного виживання хворих. У пацієнтів з аденокарциномою ободової кишки, вакцинованих в післяопераційному періоді, в порівнянні з хворими, яким проведене тільки оперативне лікування, при стадії пухлинного процесу T3-4N0М0 воно відповідно дорівнювало 88,37 і 74,44% (загальне) та 79,67 і 63,91% (безрецидивне); при наявності метастазів в регіонарні лімфатичні вузли (T3-4N1-2M0) відповідні показникі дорівнювали 57,14 і 46,67% та 28,57 і 30,0%. У хворих на рак прямої кишки більш виражений ефект досягнуто при T3-4N1-2M0 стадії захворювання: показники загального виживання складали 43,7 і 28,72% (p<0,05), безрецидивного - 34,4 і 19,14% відповідно. При ІІІА стадії раку легені в усі строки спостереження відзначено статистично вірогідне подовження загального виживання хворих, 5-річний показник в порівнянні з контрольною групою складав 39,8+8,4 і 10,6+2,6% (р<0,05).
10. Показано, що використання ПАВ в ад‘ювантному режимі у хворих на рак молочної залози не менш ефективне, ніж використання в таких випадках ад‘ювантної поліхіміотерапії. Включення ПАВ в схему комплексного лікування хворих сприяє благоприємному протіканню післяопераційного періоду, при цьому досягається збільшення загального 5-річного виживання в порівнянні з групою, яка одержувала ад'ювантну поліхіміотерапію (79,71 і 62,89% відповідно) та покращується якість життя лікованих пацієнток при зменшенні курсів хіміотерапії.
11. За даними експериментальних імунологічних досліджень та клінічних імунологічних спостережень можна вважати, що ефективність досліджених вакцин ґрунтується на активації різних типів ефекторів цитотоксичних протипухлинних реакцій: макрофагів, цитотоксичних Т-лімфоцитів, ефекторів антитілозалежної клітинної цитотоксичності, природних кілерних клітин, а також на підвищенні специфічної цитотоксичності сироватки, на активації продукції низки цитокінів: ФНП, ІЛ-1,-2, a-інтерферону. Особливістю дії вакцини, виготовленою за допомогою ЦЛ, виявленою в експериментальних дослідженнях, є більш тривала активація продукції ФНП, ІЛ-1 і ІЛ-2.
 |

 |