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

## ДІДЕНКО ГЕННАДІЙ ВАСИЛЬОВИЧ

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

**РОЗРОБКА ПРОТИПУХЛИННИХ АУТОВАКЦИН НА ОСНОВІ БІЛОКВМІСНИХ МЕТАБОЛІТІВ *B.subtilis В-7025* ТА ЇХ ВПЛИВ НА ОКРЕМІ РЕАКЦІЇ ПРОТИПУХЛИННОГО ІМУНІТЕТУ**

**(експериментальні дослідження)**

14.01.07 – онкологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

## дисертації на здобуття наукового ступеня

## кандидата біологічних наук

## Київ-2008

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

**Науковий керівник –** доктор медичних наук

**Потебня Григорій Платонович,**

завідувач відділу конструювання засобів біотерапії раку Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

**Офіційні опоненти** **–** доктор медичних наук, професор

**Савцова Зоя Дмитрівна,**

професор кафедри природничих наук Національного університета «Києво-Могилянська академія»;

**–** доктор біологічних наук, професор

**Орел Валерій Еммануїлович,**

керівник лабораторії медичної фізики та біоінженерії ДУ «Національний інститут раку» МОЗ України.

Захист відбудеться “22” жовтня 2008 року об1500годині 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 “22” вересня 2008 року.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради,

кандидат біологічних наук Л.М. Шлапацька

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність проблеми.** На сьогодні питання профілактики та лікування хворих на злоякісні новоутворення залишаються актуальними, що обумовлено як високою захворюваністю, так і недостатньою ефективністю терапії. В останні роки зростає інтерес дослідників до методів біотерапії, 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). Остання має декілька напрямків, серед яких чільне місце посідають використання цитокінів, моноклональних антитіл та специфічних протипухлинних вакцин. Одним із перспективних підходів є застосування протипухлинних вакцин, виготовлених на основі пухлиноасоційованих антигенів (ПАА), дія яких ґрунтується на формуванні специфічних реакцій протипухлинного імунітету ([Phillips N. C. еt al.,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3263200?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum) 1988; Slovin S. F. et al., 2005; 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 мають низьку імуногенність, що зумовлює необхідність пошуку різноманітних шляхів підвищення ефективності протипухлинних вакцин. Одним із них є посилення імунної відповіді на ПАА за рахунок їх модифікації продуктами мікробного синтезу ([Lonsdorf A. S. еt al.,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14530311?ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum) 2003; [Akhmatova N. K. еt al.,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17163136?ordinalpos=42&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum) 2006; [Wansley E. K. еt al.,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18594015?ordinalpos=7&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum) 2008; [Galsky M. D. еt al.,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18362364?ordinalpos=4&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum) 2008; [Fensterle J. еt al.,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18084243?ordinalpos=95&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum) 2008). Ефективними в даному напрямку виявились, зокрема, продукти метаболізму мікроорганізму *B. subtilis В-7025* (Потебня Г. П. 2003), який є продуктом селекції штаму *B. mesentericus АБ-56* (Затула Д. Г. и др., 1961). Використання вакцин, виготовлених з аутологічних пухлинних клітин та фільтрату культуральної рідини (ФКР) *B. subtilis В-7025* дозволило збільшити виживаність хворих на рак шлунка, легені, молочної залози, ободової та прямої кишки (Колесник Е. А. и др., 1999; Зайчук В. В. и др., 2006; Скляр С. Ю., 2006; Потебня Г. П. и др., 2007). Водночас питання впливу окремих складових ФКР *B. subtilis В-7025* на імуногенність ПАА, а також на динаміку неспецифічних і специфічних протипухлинних реакцій організму залишалось відкритим. Тому актуальним і перспективним напрямком подальшого дослідження стало виділення і характеристика компонентів мікробного синтезу *B. subtilis В-7025*, які проявляють цитотоксичну дію на пухлинні клітини і мають імунотропну активність, з метою вдосконалення і стандартизації технології конструювання протипухлинних вакцин.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами і темами.** Робота виконана у відділі імуномодуляції Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України у відповідності з напрямком науково-дослідних робіт Інституту за темами: «Дослідити механізми лікувально-профілактичної дії протипухлинної вакцини та модифікаторів активності ферментів для підвищення протипухлинної резистентності організму» (1998–2000 рр., державний реєстраційний номер 0198U001091), «Розробити нові підходи для підвищення ефективності протипухлинних вакцин» (2001–2003 рр., державний реєстраційний номер 0101U00784), «Фундаментальне обґрунтування нових підходів по удосконаленню протипухлинних аутовакцин, виготовлених за допомогою компонентів *B. subtilis B-7025*» (2004–2006 рр., державний реєстраційний номер 0104U000590).

**Мета дослідження.** Виділити з фільтрату культуральної рідини *Bacillus subtilis В-7025* окремі компоненти мікробного синтезу, які проявляють цитотоксичну дію на пухлинні клітини та мають імунотропні властивості, сконструювати за їх допомогою вакцини та дослідити їх протипухлинну ефективність.

**Задачі дослідження.**

1. Підібрати оптимальний метод поділу ФКР *В. subtilis B-7025* на окремі фракції та оцінити цитотоксичну дію одержаних компонентів на пухлинні клітини.
2. Відібрати компоненти ФКР з високою цитотоксичною активністю та дослідити їх імунотропні та протипухлинні властивості.
3. Cконструювати, використовуючи виділені білоквмісні складові ФКР *В. subtilis B-7025,* протипухлинні вакцини, дослідити їх ефективність та вплив на окремі реакції протипухлинного імунітету на різних моделях пухлинного росту.
4. Провести порівняльну оцінку імунологічних ефектів, викликаних вакцинами, виготовленими із застосуванням білоквмісних метаболітів *В. subtilis   
   В-7025,* на різних експериментальних моделях пухлинного росту.

*Об’єкт дослідження:* окремі компоненти ФКР 10-добового росту мікроорганізму *В. subtilis B-7025* та протипухлинні вакцини, виготовлені з їх використанням.

*Предмет дослідження:* імунотропні властивості цитотоксичних компонентів ФКР *В. subtilis B-*7025, протипухлинна активність та механізми дії вакцин, сконструйованих на їх основі.

*Методи дослідження.* Біохімічні – виділення, очистка та електрофоретична характеристика компонентів ФКР *В. subtilis B-7025*; цитологічні – дослідження структурних змін в пухлинних клітинах, викликаних дією цитотоксичних компонентів; імунологічні – визначення функціональної активності основних клітинних ефекторів специфічного та неспецифічного протипухлинного захисту (макрофаги, лімфоцити, їх кооперативна взаємодія) та аналіз гуморальної ланки імунної відповіді (рівні IgG-антитіл і середньомолекулярних циркулюючих імунних комплексів в сироватці крові, цитотоксична активність сироватки); методи експериментальної онкології – визначення ефективності розроблених вакцин на моделях пухлинного росту; методи статистичної обробки та аналізу результатів дослідження – оцінка достовірності одержаних даних за допомогою t-критерія Ст’юдента, визначення коефіцієнта кореляції Спірмена.

**Наукова новизна.** Вперше з ФКР *B. subtilis В-7025* було виділено два цитотоксичні компоненти, збагачені протеїном з мол. масою 18,5 кДа та 70 кДа. Встановлено, що цитотоксична дія обох компонентів проявляється за рахунок некротизуючого впливу на пухлинні клітини. Водночас показано, що компонент з мол. масою 18,5 кДа реалізує цитотоксичну активність за рахунок протеолітичної дії на пухлинні клітини, а цитотоксична дія компоненту з мол. масою 70 кДа проявляється, скоріш за все, за рахунок його зв’язування з мембраною пухлинної клітини і «злущування» протеїнів з її поверхні. Встановлено імуноад’ювантні властивості компонента з мол. масою 70 кДа, які обумовлюють стимуляцію реакцій гуморального імунітету у інтактних тварин та у тварин з модельним пухлинним процесом. Вакцини, сконструйовані на основі компонентів з мол. масою 18,5 кДа та мол. масою 70 кДа і пухлинних клітин, вірогідно збільшують виживаність імунізованих тварин з перещепленими модельними пухлинами різного гістогенезу. Вперше показано, що реалізація протипухлинної дії випробовуваних вакцин відбувається за рахунок активації антитілозалежної цитотоксичної дії клітин макрофагального та лімфоцитарного ряду на термінальних стадіях пухлинного процесу та відміни блокуючої дії аутологічної сироватки на прояв активністі ефекторними клітинами. На основі кореляційного аналізу встановлено, що динаміка імунологічних ефектів, викликаних застосуванням вакцин, відрізняється при дослідженні антитілозалежної цитотоксичності лімфоцитів та цитотоксичної активності макрофагів, що, ймовірно, і зумовлює різницю їх протипухлинної дії.

**Практичне значення.** Впершеотримано дві оригінальні вакцини, які були сконструйовані з використанням очищених продуктів метаболізму мікроорганізму *В. subtilis B-7025* та пухлинних клітин. Дані вакцини виявились ефективними в експериментах *in vivo* при лікуванні тварин з перещепленими модельними пухлинами. Використання охарактеризованих нами цитотоксичних компонентів ФКР, дозволить стандартизувати технологію виготовлення вакцин, суттєво зменшить антигенне навантаження цих вакцин на організм та забезпечить більшу специфічність при формуванні імунної відповіді, порівняно з вакцинами на ФКР. Отримані методом електрофорезу дані про зміни в пептидному профілі виготовлених вакцин можуть бути використані при розробці технології приготування вакцин. Дані щодо динаміки змін в імунній системі тварин з пухлинним процесом, які відбуваються під впливом вакцинації, можуть бути використані при розробці схем імунотерапії і її моніторингу при клінічному застосуванні таких вакцин.

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем особисто була сформульована мета роботи, поставлені основні завдання та підібрані методи дослідження, які необхідні для виконання поставлених задач. Зібрана та проаналізована сучасна наукова література за темою дисертації; відпрацьована методика відбору та аналізу цитотоксичних речовин мікробного походження; самостійно сплановані та проведені експериментально-онкологічні і імунологічні дослідження. Зроблено аналіз отриманих даних. Особисто проведено узагальнення результатів дослідження та сформульовано основні наукові положення та висновки дисертації.

**Апробація результатів дисертації.** Результати дисертаційної роботи були представлені на: II з’їзді онкологів країн СНД «Онкология 2000» (Київ, 2000);   
IV Республіканській науково-практичній конференції молодих онкологів України «Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології» (Київ, 2001);   
VІІ міжнародній конференції молодих онкологів «Сучасні проблеми експериментальної і клінічної онкології» (Київ, 2006); ХІ з`їзді онкологів України (Судак, 2006); IV з’їзді онкологів і радіобіологів СНД (Баку, 2006); IV міжнародному з’їзді «International conference of young researchers» (Кишинів, 2006); VII онкологічній конференції   
«VII young oncologists conference with international participation» (Київ, 2007).

**Публікації.** За результатами дисертації опубліковано 14 наукових робіт, в тому числі 7 статей у провідних фахових журналах, рекомендованих ВАК України.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота, обсягом 187 сторінок, складається з вступу, огляду літератури, 5 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку літератури, який включає 281 першоджерела, в тому числі 230 зарубіжних. Робота ілюстрована 81 рисунком та 32 таблицями.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ**

**Матеріали та методи дослідження**. Представлені в роботі дані одержані на експериментальному матеріалі. Дослідження проводили на мишах ліній C57Bl/6, С3Н, Balb/c та неімбредних мишах (самці віком 2,5-3,5 міс., масою 19-21 г), які були одержані з розплідника віварію ІЕПОР НАН України. Утримання мишей та робота з ними здійснювались у відповідності до загальноприйнятих міжнародних правил проведення робіт з експериментальними тваринами. В експериментальних дослідженнях були використали наступні моделі пухлинного росту: саркома 37 (S37), лімфолейкоз мишей L1210 (L1210), метастазуюча карцинома легені Льюїс (КЛЛ) та рак Ерліха (РЕ). Пухлинні клітини (ПК) КЛЛ, S37 та РЕ перещеплювали внутрішньом’язево (1х106 ПК/тварину); ПК L1210 вводили внутрішньочеревинно (5х105 ПК/тварину).

Для виділення цитотоксичних (ЦТ) компонентів з ФКР *Bacillus subtilis В-7025* (10-а доба культивування) були використані наступні методи: етанольна преципітація (Curling J. M.,1980), іонообмінна хроматографія на ДЕАЕ-целюлозі (Barnard E. A., 1975), колонкова хроматографія з ТOY0PEARL G10 та осадження білків сульфатом амонію (Скоупс Р., 1985). Білковий склад отриманих фракцій (Фр) контролювали за допомогою SDS-електрофорезу; їх цитотоксичну активність визначали *in vitro* за забарвленням ПК 0,4 % розчином трипанового синього. Морфологічні зміни в ПК, викликані цитотоксичною дією Фр, визначали у фіксованих цитопрепаратах, забарвлених за методом Романовського-Гімза (Козинец Г. И., 1998).

Протипухлинні вакцини (ПВ) виготовляли з використанням отриманих білоквмісних цитотоксичних компонентів ФКР за стандартним методом (Затула Д. Г., 1977), виходячи із співідношення 0,3мг/мл компоненту на 30х106 ПК в 1 мл вакцини. В експериментах *in vivo* ПВ (або її компоненти) в об’ємі 0,3 мл/тварину вводили на другу добу після перещеплення ПК підшкірно раз на тиждень, протягом 3-х тижнів. ЦТ компоненти вводили за тією ж схемою із розрахунку 0,1 мг/тварину. Імунологічні показники визначали на 7-, 14- та 21-у (або 28-у) добу після початку імунізації. В усіх дослідах тваринам контрольної групи в режимах, аналогічних до описаних вище, вводили підшкірно фізіологічний розчин хлориду натрію.

У всіх групах тварин визначали показники виживаності (%) та середньої тривалості життя (СТЖ). Цитотоксичну активність (ЦТА) лімфоцитів (Лц), макрофагів (Мф), кооперативну ЦТА Мф та Лц, а також антитілозалежну цитотоксичність (АЗЦ) вказаних ефекторів визначали *in vitro* з використанням МТТ-тесту (Ohno M., 1991; Stanojkovic T. P., 2005; Дворщенко О. С., 2007). В якості клітин-мішеней (КМ) використовували ПК гомологічні перещепленим. Цитохімічну активність перитонеальних Мф оцінювали у НСТ-тесті (Передерий В. Г., 1995). Рівень антитіл (Ат) у сироватці крові визначали методом імуноферментного аналізу (Диденко Г. В., 2003). Крім того, в сироватці крові оцінювали вміст середньомолекулярних циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) (Фролов В. М., 2002).

Аналізуючи результати імунологічних досліджень, оцінювали як абсолютні величини відповідних показників, так і індекси їх модуляції (ІМ) відносно аналогічних показників мишей контрольних груп: ІМ=[(Д-К)/К] х100 %. Вплив сироватки визначали за індексом потенціювання: ІП=[(АЗЦЛц/Мф-ЦТАЛц/Мф)/ ЦТАЛц/Мф] х100 %. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали використовуючи *t*–критерій Ст’юдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при *p*<0,05. Кореляційний зв’язок між отриманими даними оцінювали за коефіцієнтом кореляції Спірмена (Г. Ф. Лакин, 1980).

**Результати досліджень та їх обговорення**

Проведена експериментальна робота складалась з двох етапів. На першому етапі необхідно було одержати з ФКР *B. subtilis В-7025* окремі компоненти, які проявляли б цитотоксичну дію на ПК різного гістогенезу, і дослідити їх біохімічні та імунотропні властивості. Після апробації ряду методів, що перелічені вище, нами було обрано метод осадження білків сульфатом амонію, оскільки отримані при цьому фракції були насичені окремими протеїнами в кількості, достатній для приготування ПВ і проведення експериментів. Всі інші апробовані методи мали певні недоліки (низький вихід білоквмісних компонентів, недостатній рівень поділу на окремі компоненти) і були відкинуті. Для подальшої роботи нами було відібрано два ЦТ-компоненти ФКР – фракції, насичені білком з мол. масою 18,5 кДа (компонент (18,5 кДа)) і білком з мол. масою 70 кДа (компонент (70 кДа)). Було встановлено, що обидва компоненти викликають *іn vitro* некротичну загибель ПК, але різняться за терміном її розвитку: ПК гинули після 2-х год. інкубації з компонентом (18,5 кДа) і після 3-4-х год. при культивуванні з компонентом   
(70 кДа). Виявлені також певні відмінності у механізмі дії цих компонентів на ПК. Так, під дією компонента (18,5 кДа) ПК збільшувались в розмірі, їх ядра полярно зміщувались, мебрана клітини залишалася гладкою, майже без змін Дія компонента (70 кДа) на ПК супроводжувалась утворенням додаткових структур на поверхні ПК без особливих змін у об’ємі клітин. Встановлено, що даний компонент зв’язується з мембраною ПК; в подальшому під його впливом відбувається «злущування» білків з поверхні ПК (рис. 1), що має принципове значення при конструюванні ПВ, оскільки до розчину відходять майже всі поверхневі протеїни мембран ПК.

Компонент (18,5 кДа) має протеолітичну активність, яку можна заблокувати інгібітором серинових протеаз PMSF (рис. 2). Скоріш за все, ця властивість є одним із головних чинників, який обумовлює цитотоксичну активність даного компонента. Водночас, слід зауважити що, як відомо, протеолітичне розщеплення поверхневих пептидів ПК може підвищувати їх імуногенність за рахунок демаскування антигенних детермінант, що полегшує презентацію і розпізнавання антигенів відповідними клітинами імунної системи (Плейфер Д., 2002).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Рис. 1.** Електрофореграма білків мембран ПК саркоми 37:   1. до інкубації з компонентом (70 кДа); 2. після інкубації з компонентом (70 кДа) протягом 1 год.; 3. білковий спектр розчинної складової суміші, отриманої після інкубації ПК з компонентом (70 кДа) протягом 1-ї год. | | |
|  | | **Рис. 2.** Електрофоретичне дослідження протеолітичної дії компонента (18,5 кДа):  **1**- БСА, **2**-БСА+трипсин,  **3**-БСА+трипсин +  інгібітор (PMSF),  **4**-трипсин,  **5**- БСА+компонент (18,5 кДа),  **6**- БСА+компонент (18,5 кДа) +інгібітор (PMSF),  **7**- компонент (18,5 кДа). |

Пептидний профіль вакцин, виготовлених із застосуванням виділених компонентів також мав свої відмінності (рис. 3).

|  |  |
| --- | --- |
|  | **Рис. 3.** Електрофоретичний профіль вакцин, виготовлених на основі клітин S37 та компонентів, отриманих з ФКР *B. subtilis B-7025*:   1. вакцина з компонентом (18,5 кДа), 2. вакцина з компонентом (70 кДа), 3. протеїни мембран клітин S37. |

В експериментах *in vivo* було показано, що ПВ, виготовлені з ПК S37 та цитотоксичних компонентів, мають виражену протипухлинну дію – достовірно подовжують СТЖ вакцинованих тварин (на 42,3 % – при застосуванні ПВ з компонентом (18,5 кДа) та на 53,9 % – при застосуванні ПВ з компонентом   
(70 кДа)). ПВ, виготовлені з використанням інших білоквмісних компонентів ФКР, такою властивістю не володіли.

На інтактних тваринах було показано, що отримані компоненти мають виражену імунотропну активність. Компонент (70 кДа) здатний суттєво зменшувати (р<0,05) ЦТА і АЗЦ клітин макрофагального та лімфоцитарного ряду, а також кооперативний вплив цих ефекторів на клітини-мішені. Модулююча дія компонента (18,5 кДа) менш виражена та має протилежну спрямованість порівняно з дією компонента (70 кДа).

На тваринах з перещепленим раком Ерліха показано, що самі компоненти мають лише незначну (статистично не достовірну) протипухлинну дію. На цій же моделі пухлинного росту встановлено (табл. 1), що розвиток пухлини у контрольних невакцинованих мишей призвів до зниження активності майже всіх імунних реакцій (за винятком спонтанного НСТ-тесту) порівняно з такими у інтактних тварин. Використання компоненту (18,5 кДа) призводило до збільшення АЗЦ Мф, а компоненту (70 кДа) – до стимуляції антитілозалежних реакцій, опосередкованих клітинами макрофагального та лімфоцитарного ряду.

*Таблиця 1*

**Порівняння впливу цитотоксичних компонентів ФКР на імунні реакції мишей з перещепленим раком Ерліха (7-а доба дослідження)**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| ІМ (%) порівняно з показниками інтактних тварин | | | |
|  | Контроль перещеплення | Компонент (18,5 кДа) | Компонент  (70 кДа) |
| ЦТА Лц | –16,23 | -12,04 | -4,90 |
| АЗЦ Лц | -20,37 | -20,05 | **50,06** |
| ЦТА Мф | -57,88 | -53,52 | -25,415 |
| АЗЦ Мф | -24,09 | **34,89** | **53,77** |
| ЦТА «Лц+Мф» | -56,90 | -45,52 | -35,64 |
| АЗЦ «Лц+Мф» | -23,63 | **2,71** | -27,36 |
| НСТ (спонтанний) | **43,16** | **27,62** | **11,26** |

Проведені *in vivo* попередні дослідження протипухлинної дії окремих фракцій вакцини, виготовленої з використанням компоненту (70 кДа), показали, що протипухлинну дію має лише розчинна фракція ПВ (РФ): СТЖ вакцинованих тварин з саркомою 37 збільшується на 42,9 %. Корпускулярна фракція ПВ (КФ) подібного впливу не справляла. Імунологічні ефекти впливу РФ проявлялися у стимуляції: АЗЦ Лц (р<0,05) – протягом всього експерименту (на 7-, 14- та 21-у добу); ЦТА Мф – на термінальних стадіях процесу (21-а доба) (р<0,05) та кооперативної АЗЦ Мф та Лц – на 14- та 21-у добу (р<0,05). Також встановлено, що введення РФ відміняло блокуючий ефект аутологічної сироватки у всіх типах антитілозалежних реакцій на 21-у добу дослідження, що співпадало з активацією синтезу антитіл класу IgG (р<0,05) на даний термін дослідження.

На другому етапі досліджень необхідно було визначити протипухлинну дію вакцин, виготовлених на основі цитотоксичних компонентів, та дослідити і співставити імунологічні ефекти, викликані дією даних вакцин на організм тварин з модельними пухлинами різного гістогенезу. Нами було встановлено, що використання обох типів ПВ виявилось ефективним на всіх випробуваних моделях (табл. 2).

Водночас використання ПВ у мишей з лімфолейкозом L1210 виявилось менш ефективним і тому наводити картину імунологічних змін, викликаних дією ПВ, в даній серії дослідів ми вважаємо недоцільним.

*Таблиця 2*

**Показники СТЖ та збільшення тривалості життя (ЗТЖ) мишей з різними модельними пухлинами, при застосуванні ПВ**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Модель пухлинного росту | Показник | Контроль  пухлинного  росту | ПВ з компонентом (18,5 кДа) | ПВ з компонентом  (70 кДа) |
| рак Ерліха | СТЖ, діб | 37,80±2,70 | 46,8±4,1 | 50,10±3,20\* |
| ЗТЖ, % | - | 23,80 | 32,53 |
| КЛЛ | СТЖ, діб | 27,22±0,78 | 35,78±0,78\* | 40,50±2,30\* |
| ЗТЖ, % | - | 31,44 | 48,78 |
| Саркома 37 | СТЖ, діб | 28,00±2,76 | 40,00±5,23\* | 49,00±5,95\* |
| ЗТЖ, % | - | 42,85 | 75,00 |
| Лімфолейкоз  L 1210 | СТЖ, діб | 15,25±1,07 | 20,00±0,00\* | 20,00±0,00\* |
| ЗТЖ, % | - | 31,14 | 31,14 |

Примітка. \* – р<0,05 порівняно з контролем.

В подальшому будуть проаналізовані імунологічні ефекти, викликані ПВ, на трьох експериментальних моделях: саркомі 37, раку Ерліха та карциномі легень Льюїс.

При вивченні впливу аутологічної сироватки на прояв ЦТА Лц (табл. 3) було встановлено, що додавання сироватки давало позитивний результат майже на всіх етапах дослідження та на всіх моделях пухлинного росту. Єдиним виключенням були дані, отримані на 14-у добу у тварин з перещепленим раком Ерліха. В даний термін спостерігали гальмівну дію сироватки на прояв ЦТА Лц при використанні обох типів ПВ. Відмічено, що використання ПВ відміняло блокуючу дію сироватки на термінальних стадіях процессу (21-а доба – для саркоми 37 та раку Ерліха; 28-а доба – для КЛЛ).

*Таблиця 3*

**Вплив аутологічної сироватки на цитотоксичу**

**активність лімфоцитів (ІП, %)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Група | Доба пухлинного росту | Саркома 37 | КЛЛ | рак Ерліха |
| Контроль перещеплення | 7 | -2,52 | - | - |
| 14 | **+7,74** | **+71,85** | -20,96 |
| 21 | -9,92 | **+8,73** | -28,7 |
| 28 | - | -16,96 | - |
| ПВ з компонентом (18,5 кДа) | 7 | **+1,98** | - | - |
| 14 | **+47,07** | **+92,13** | -5,59 |
| 21 | **+42,70** | **+12,78** | **+12,67** |
| 28 | - | **+1,68** | - |
| ПВ з компонентом (70 кДа) | 7 | **+6,05** | - | - |
| 14 | **+20,57** | **+59,52** | -7,72 |
| 21 | **+18,92** | **+8,14** | **+12,82** |
| 28 | - | **+6,28** | - |

Примітка. «-» – показник не визначали.

При дослідженні впливу сироватки на ЦТА Мф (табл. 4) ми спостерігали майже таку ж закономірність. Різницю відмічали лише в тому, що використання ПВ з компонентом (18,5 кДа) на 21-у добу не відміняло блокуючої дії сироватки на прояви ЦТА Мф на моделі КЛЛ, тоді як використання ПВ з компонентом (70 кДа) було ефективним на всіх етапах дослідження.

*Таблиця 4*

**Вплив аутологічної сироватки на цитотоксичну**

**активність макрофагів (ІП, %)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Група | Доба пухлинного росту | Саркома 37 | КЛЛ | рак Ерліха |
| Контроль перещеплення | 7 | **+2,56** | - | - |
| 14 | -15,85 | **+97,80** | **+115,54** |
| 21 | **+20,05** | -3,98 | -21,80 |
| 28 | - | -23,85 | - |
| ПВ з компонентом (18,5 кДа) | 7 | -4,18 | - | - |
| 14 | **+2,62** | **+39,41** | **+53,97** |
| 21 | **+134,60** | -3,04 | **+25,24** |
| 28 | - | **+1,49** | - |
| ПВ з компонентом (70 кДа) | 7 | -4,68 | - | - |
| 14 | **+18,35** | **+189,83** | **+51,43** |
| 21 | **+55,07** | **+12,95** | **+63,98** |
| 28 | - | **+3,98** | - |

Примітка. «-» – показник не визначали.

При дослідженні потенціюючого впливу сироватки на кооперативну ЦТА (табл. 5) Мф та Лц на різних моделях пухлинного росту ми отримали закономірність, що й у двох попередніх тестах. Добре виражений потенціюючий ефект сироватки починає проявлятись на 14-у добу. На термінальних стадіях дослідження (21- або 28-а доба) у контрольній групі спостерігали блокуючу дію сироватки, а використання ПВ її скасовувало.

*Таблиця 5*

**Вплив аутологічної сироватки на кооперативну цитотоксичну активность лімфоцитів та макрофагів (ІП, %)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Група | Доба пухлинного росту | Саркома 37 | КЛЛ | рак Ерліха |
| Контроль перещеплення | 7 | **+1,09** | - | - |
| 14 | -9,74 | **+47,24** | **+28,25** |
| 21 | -0,07 | **+7,52** | -4,95 |
| 28 | - | -5,87 | - |
| ПВ з компонентом (18,5 кДа) | 7 | -5,41 | - | - |
| 14 | **+34,36** | **+96,76** | **+50,11** |
| 21 | **+33,76** | **+4,77** | **+30,89** |
| 28 | - | **+4,64** | - |
| ПВ з компонентом (70 кДа) | 7 | -4,06 | - | **-** |
| 14 | **+13,55** | **+50,52** | **+33,96** |
| 21 | **+29,23** | **+3,57** | **+34,42** |
| 28 | - | **+8,96** | - |

Примітка. «-» – показник не визначали.

Таким чином, на основі отриманих даних можна зробити висновок, що використання ПВ призводило до гальмування накопичення в динаміці пухлинного росту розчинних факторів у сироватці крові, які здатні зменшувати/блокувати цитотоксичну дію Лц, Мф та їх кооперативну активність. Навпаки, на 14- та 21-у добу при додаванні сироватки до тест-систем спостерігали активацію АЗЦ Лц, АЗЦ Мф і АЗЦ «Мф+Лц». Ступінь впливу досліджених ПВ на АЗЦ Лц був практично однаковим, а на АЗЦ Мф більшою мірою впливала ПВ з компонентом (70 кДа).

Було проведено також порівняльний аналіз впливу розроблених вакцин на функціональну активність клітин-ефекторів протипухлинних реакцій.

При аналізі модулюючого впливу ПВ на ЦТА Лц (рис. 4) було встановлено, що використання ПВ стимулювало ЦТА Лц до 14-ї доби після перещеплення ПК. На 21-у добу спостерігали стимулюючу дію при використанні обох ПВ у тварин з КЛЛ та при використанні ПВ з компонентом (70 кДа) у тварин з саркомою 37.



\*– р < 0,05 порівняно з контролем

**Рис. 4.** Модуляція вакцинами цитотоксичної активності Лц.

При дослідженні модулюючого впливу ПВ на АЗЦ Лц (рис. 5) було показано, що вакцинація призводила до значних позитивних змін у активності Лц у всі терміни дослідження та на всіх моделях пухлинного росту.



\* – р < 0,05 порівняно з контролем

**Рис. 5.** Модуляція вакцинами антитілозалежної цитотоксичності Лц.

Максимальний модулюючий ефект ПВ на ЦТА Мф (рис. 6) проявлявся на 14-у добу дослідження у тварин з КЛЛ при використанні ПВ з компонентом (18,5 кДа) та на моделі раку Ерліха при використанні обох вакцин. У тварин із саркомою 37 спостерігали негативну модуляцію ЦТА Мф вакцинами протягом майже всього терміну спостереження. На 21- та 28-у добу пухлинного росту спостерігали позитивну модуляцію ЦТА Мф вакцинами лише на моделі КЛЛ.



\* – р < 0,05 порівняно з контролем

**Рис. 6.** Модуляція вакцинами цитотоксичної активності Мф.

Модулюючий вплив ПВ, на показники АЗЦ Мф (рис. 7), проявлявся майже у повному віддзеркалюванні даних, отриманих при дослідженні ЦТА Мф. Так, максимальну позитивну модуляцію АЗЦ Мф спостерігали на 21-у добу пухлинного росту у всіх вакцинованих групах тварин та на 28-у добу на моделі КЛЛ. На початкових етапах встановлено негативну модуляцію показників АЗЦ Мф.



\* – р < 0,05 порівняно з контролем

**Рис. 7.** Модуляція вакцинами антитілозалежної цитотоксичності Мф.

При аналізі модулюючого ефекту ПВ на кооперативну ЦТА клітин макрофагального та лімфоцитарного ряду мишей (рис. 8) встановлено, що вакцинація призводила до негативної модуляції даної активності на 14-у добу на всіх моделях пухлинного росту. На 21-у добу спостерігали позитивну модуляцію у випадках використання ПВ з компонентом (70 кДа) на моделі саркоми 37 та при використанні обох типів ПВ у тварин з перещепленою КЛЛ.



\* – р < 0,05 порівняно з контролем

**Рис. 8.** Модуляція вакцинами кооперативної цитотоксичності Мф та Лц.

При аналізі впливу ПВ на кооперативну АЗЦ ефекторних клітин (рис. 9) було встановлено, що використання вакцин призводить до позитивної модуляції даної активності на всіх випробуваних моделях, починаючи з 21-ї доби.



\* – р < 0,05 порівняно з контролем

**Рис. 9.** Модуляція вакцинами кооперативної антитілозалежної цитотоксичної активності Мф та Лц.

На основі кореляційного аналізу одержаних результатів було встановлено, що динаміка імунологічних ефектів, викликаних застосуванням обох вакцин, у більшості випадків була однотипною: ЦТА Лц – ρ=0,62, р=0,1; АЗЦ Мф – ρ=0,8, р=0,01; ЦТА «Мф+Лц» – ρ=0,64, р=0,05; АЗЦ «Мф+Лц» –ρ=0,66, р=0,043). Але за динамікою впливу на реакції АЗЦ Лц (ρ=0,21, р=0,6) і ЦТА Мф (ρ=0,31, р=0,45) досліджені ПВ суттєво відрізнялися, що, скоріш за все, й зумовило різницю їх протипухлинної дії.

Аналізуючи отримані дані, можна зробити висновок, що одним із позитивних і, на нашу думку, головних моментів терапії розробленими вакцинами є те, що вакцинація здатна підтримувати, а в деяких випадках і стимулювати на термінальних стадіях процесу антитілозалежні реакції, опосередковані клітинами лімфоцитарного та макрофагального ряду. Це має принципове значення при використанні вакцин в клініці в період, коли спостерігається виражена імуносупресія.

**ВИСНОВКИ**

Робота присвячена проблемі імунотерапії злоякісних новоутворень, а саме пошуку активних цитотоксичних компонентів ФКР *B. subtilis В-7025*,конструюванню з їх використанням протипухлинних вакцин та порівняльному вивченню впливу даних вакцин на імунні реакції тварин з модельним пухлинним процесом.

1. Вперше з фільтрату культуральної рідини *B. subtilis В-7025* виділено та охарактеризовано дві активні білоквмісні фракції, які проявляють цитотоксичну дію на пухлинні клітини – компонент (18,5 кДа) та компонент (70 кДа).

2. Показано, що компонент (18,5 кДа) реалізує цитотоксичну активність за рахунок протеолітичної дії, а компонент (70 кДа) – за рахунок зв’язування з мембраною пухлинних клітин та «злущування» з її поверхні білків. Обидва компоненти викликають некротичну загибель пухлинних клітин.

3. Встановлено, що отримані компоненти мають імуномодулюючі властивості при імунізації інтактних тварин та тварин з модельним пухлинним процесом. Крім того, компонент (70 кДа) має виражені імуноад’ювантні властивості, що проявляється у активації антитілопродукуючої функції організму.

4. Вакцини, сконструйовані на основі пухлинних клітин та цитотоксичних компонентів ФКР (18,5 кДа та 70 кДа), виявились ефективними у експериментах *in vivo* на моделях епітеліальних та сполучнотканинних злоякісних пухлин; їх використання подовжувало середню тривалість життя тварин від 23,8 % до 75,0 %.

5. Протипухлинна дія розроблених вакцин проявляється за рахунок суттєвого підвищення (р<0,05) антитілозалежних реакцій, опосередкованих клітинами лімфоцитарного та макрофагального ряду, та пов’язана з відміною ефекту блокуючої дії аутологічної сироватки на пізніх етапах пухлинного росту.

6.  На основі кореляційного аналізу було встановлено, що динаміка імунологічних ефектів, викликаних застосуванням вакцин, в більшості випадків була однотипною: ЦТА Лц (ρ=0,62); АЗЦ Мф (ρ=0,8); кооперативна ЦТА «Мф+Лц» (ρ=0,64); кооперативна АЗЦ «Мф+Лц» (ρ=0,66). Але за динамікою впливу на реакції АЗЦ Лц (ρ=0,21 та ЦТА Мф (ρ=0,31) досліджені ПВ суттєво відрізнялися, що, скоріш за все, і зумовило різницю їх протипухлинної дії.

**СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Модуляция антигенных свойств опухолевых клеток с помощью продуктов метаболизма Bac. mesentericus АБ-56 / Г. П. Потебня, В. А. Семерников, С. В. Хуторной, Г. С. Лисовенко, Г. В. Диденко, Е. А. Колесник // Эксп. онкология. – 1999. – Т. 21, № 3–4. – С. 223–227. *(Особистий внесок дисертанта: проведення імуноферментного аналізу, статистична обробка отриманих даних).*
2. Влияние противоопухолевой аутовакцины на некоторые показатели иммунного статуса больных с аденокарциномой прямой кишки / Г. П. Потебня, В. А. Семерников, С. В. Хуторной, Г. С. Лисовенко*,* Е. А. Колесник, Е. В. Тележинская, Г. В. Диденко, В. А. Шляховенко // Эксп. онкология. – 2001. – Т. 23, №  3. – С. 189–192. *(Особистий внесок дисертанта: проведення хроматографічного поділу пептидних екстрактів, отриманих з поверхні пухлинних клітин, проведення імуноферментного аналізу, статистична обробка отриманих даних).*
3. Противоопухолевая активность гликопротеидов Bacillus subtilis AB-56, Staphylococcus aureus и противоопухолевых вакцин, приготовленных на их основе / Г. П. Потебня, Г. В. Диденко, С. Л. Рыбалко, С. В. Хуторной // Укр. хіміотерапевтичний журнал. – 2002. – № 1. – С. 44–47. *(Особистий внесок дисертанта: планування схеми експерименту, виділення цитотоксичного компоненту з ФКР В. subtilis* *АВ-56*, *конструювання вакцин з його використанням; порівняння протипухлинних ефектів, викликаних застосуванням вакцин (сконструйованих з використанням ЦТ-компонентів, отриманих від різних мікроорганізмів) у тварин з пухлиною; статистичний аналіз результатів експерименту).*
4. Potebnya G. P. Evaluation of effectiveness of antitumor vaccines obtained with the use of metabolic products of Bacillus subtilis AB-56 / G. P. Potebnya, S. V. Khutornoy, G. V. Didenko // Exp. Oncol. – 2002. – Vol. 24, № 3. – P. 225–228. (*Особистий внесок дисертанта: виділення цитотоксичного компоненту з ФКР В. subtilis* *АВ-56, конструювання вакцин з його використанням, дослідження протипухлинних ефектів, викликаних даною вакциною, у тварин з пухлиною; статистичний аналіз результатів експерименту).*
5. The modifiсation of cancer vaccine prepared on the base of metabolic products of B. subtilis 7025 with the use of sorbents and automacrophages / G. V. Didenko, O. S. Dvorshchenko, G. S. Lisovenko, N. G. Kovalenko, G. V. Potebnya, V. V. Kikot, V. K. Pozur, A. A. Golub // Exp. Oncol. – 2003. –Vol. 25., N. 2. – P. 116–118. (*Особистий внесок дисертанта: конструювання комплексних вакцин, з використанням наносорбентів в якості носія для вакцин, планування експерименту, виконання всіх його частин (дослідження протипухлинних ефектів, викликаних застосуванням комплексних вакцин), статистичний аналіз результатів експерименту).*
6. Протипухлинна активність вакцин, виготовлених на основі ембріональних тканин та бактеріального глікопротеїду / Г. П. Потебня, Г. В. Діденко, О. С. Дворщенко, Г. С. Лісовенко, М. Г. Потебня, І. А. Вотякова, С. В. Василовська // Доповіді НАН України. – 2006. – № 4. – С. 172–177. (*Особистий внесок дисертанта: планування експерименту, дослідження впливу вакцин на основі компоненту B. subtilis 7025* *на показники імунної системи, статистичний аналіз результатів експерименту).*
7. Протипухлинні властивості позаклітинної фруктозо-1,6-біфосфатази Bacillus subtilis 668 і препарату, виділеного з культуральної рідини Bacillus subtilis В-7025 / Г. В. Діденко, О. С. Дворщенко, О. В. Ястребова, М. Г. Потебня, Л. П. Панченко, І. Г. Скрипаль // Мікробіологічний журнал. – 2007. – Т. 69, № 3. –   
   С. 68–73. (*Особистий внесок дисертанта: дослідження цитотоксичних властивостей* фруктозо-1,6-біфосфатази, *отриманої від B. subtilis 668, та порівняння її дії з ефектом цитотоксичних сполук, отриманих від B. subtilis В-7025, планування та проведення всіх експериментальних досліджень, статистичний аналіз результатів експерименту).*
8. Влияние специфической иммунотерапии на показатели иммунного статуса у больных колоректальным раком / Г. П. Потебня, В. А. Семерников, Е. А. Колесник, В. А. Кикоть, Г. С. Лисовенко, С. В. Хуторной, Г. В. Диденко // Онкология 2000:   
   II съезд онкологов стран СНГ., 23–26 мая 2000 г. : тезисы докл. – Эксп. онкология. – 2000. – Т. 22, suppl. – № 754.
9. Діденко Г. В. Конструювання протипухлинних вакцин за допомогою компонентів синтезу Вас. subtilis AB-56 / Г. В. Діденко // Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології: IV Республіканська наук.-прак. конф. молодих онкологів України, 21–23 бер. 2001 р. : тезиси докл. – К., 2001. – С. 4.
10. Протипухлинна дія ембріональних вакцин, виготовлених на основі продуктів метаболізму B. subtilis 7025 / Г. В. Діденко, О. С. Дворщенко, О. П. Карпенко, М. Г. Потебня // Современные проблемы экспериментальной и клинической онкологи : VІІ междунар. конф. молодых онкологов, 2–3 фев. 2006 г.: тезисы докл. – К., 2006. – С. 29.
11. Дворщенко О. С. Модифікація протипухлинної аутовакцини, виготовленої на основі глікопротеїду B. subtilis В-7025 за допомогою нанокомпозитів аеросилу/ О. С. Дворщенко, Г. В. Діденко, Г. П. Потебня / матеріали ХІ з’їзду онкологів України, 29 трав. – 02 черв. 2006 р.: – Судак, 2006. – С. 25.
12. Противоопухолевая активность аутовакцины на основе гликопротеида B. subtilis B-7025 после модификации нанокомпозитами аеросила / О. С. Дворщенко, Г. В. Диденко, Г. П. Потебня, О. А. Голуб // материалы IV сьезда онкологов и радиологов СНГ, 28 сент. – 01 окт. 2006 г. – Баку, 2006. – С. 40.
13. Ястребова Е. В. Цитотоксическая активность внеклеточных фруктозо-1,6-бифосфатазы Bacillus subtilis 668 и гликопротеида Bacillus subtilis B-7025 / Е. В. Ястребова, Г. В. Диденко, О. С. Дворщенко // IV International conference of young researchers, 10 nov. 2006 у. scientific abstr. – Kishinev, 2006. – P. 58.
14. Діденко Г. В. Вивчення механізмів дії продуктів метаболізму мікроорганізму B. subtilis B-7025, на пухлинні клітини і можливість створення на їх основі протипухлинних аутовакцин / Г. В. Діденко, О. С. Дворщенко // Современные проблемы экспериментальной и клинической онкологии: VІІІ конф. молодых онкологов с междунар. участием, 26–27 апр. 2007 г. : тезисы докл. – К., 2007. – С. 22.

**АНОТАЦІЯ**

**Діденко Г. В. Розробка протипухлинних аутовакцин на основі білоквмісних метаболітів *B. subtilis В-7025* та їх вплив на окремі реакції протипухлинного імунітету (експериментальні дослідження).** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.01.07 – онкологія. – Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, 2008.

Дисертація присвячена пошуку активних цитотоксичних компонентів в фільтраті культуральнї рідини (ФКР) *B. subtilis В-7025*,конструюванню з їх використанням протипухлинних вакцин та порівняльному вивченню впливу даних вакцин на імунні реакції тварин з модельним пухлинним процесом.

У результаті проведених досліджень вдалося виділити та охарактеризувати дві фракції ФКР *B. subtilis В-7025*, які були збагачені окремими білками і проявляли цитотоксичну дію на пухлинні клітини в тестах *in vitro* – компонент (18,5 кДа) та компонент (70 кДа). Дані компоненти відрізняються за біохімічними характеристиками, впливом на пухлинні клітини та пептидним профілем вакцин (ПВ), виготовлених з їх використанням. Дослідження протипухлинної дії вакцин, сконструйованих на основі вищезгаданих компонентів, показало їх ефективність в експериментах *in vivo* на різних моделях пухлинного росту (саркома 37, КЛЛ, лімфолейкоз мишей L1210 та рак Ерліха). При аналізі імунологічних ефектів, викликаних ПВ, було встановлено, що реалізація протипухлинної дії вакцин відбувається за рахунок високого рівня антитілозалежних реакцій (р<0,05), опосередкованих клітинами лімфоцитарного та макрофагального ряду, які проявляються як результат відміни блокуючої дії сироватки на пізніх етапах дослідження (21-а доба).

На основі кореляційного аналізу одержаних результатів було встановлено, що динаміка імунологічних ефектів, викликаних застосуванням вакцин в більшості випадків була однотипною (ЦТА Лц ρ=0,62; АЗЦ Мф ρ=0,8; кооперативна ЦТА Мф і Лц ρ=0,64; кооперативна АЗЦ Мф і Лц ρ=0,66). Але за динамікою впливу на реакції (АЗЦ Лц ρ=0,21; ЦТА Мф ρ=0,31) суттєво відрізнялися, що, скоріш за все, і зумовило різницю їх протипухлинної дії.

**Ключові слова:** вакцинотерапія пухлин, пухлинні клітини, продукти життєдіяльності *Bacillus subtilis В-7025*, цитотоксична активність, ефективність, імунологічні показники.

**АННОТАЦИЯ**

**Диденко Г. В. Разработка противоопухолевых аутовакцин на основе белоксодержащих метаболитов *B. subtilis В-7025* и их влияние на отдельные реакции противоопухолевого иммунитета (экспериментальные исследования).** – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.07 – онкология. – Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, 2008.

Диссертация посвящена поиску активных цитотоксических компонентов в фильтрате культуральной жидкости (ФКЖ) *B. subtilis В-7025*, конструированию с их использованием противоопухолевых вакцин и сравнительному изучению влияния данных вакцин на иммунные реакции животных с модельным опухолевым процессом.

Основные задачи исследования состояли в подборе оптимального метода для выделения из культуральной жидкости *Bacillus subtilis В-7025* белоксодержащих компонентов; отборе из них тех, которые обладали бы высокой цитотоксической активностью по отношению к опухолевым клеткам и конструировании с их использованием противоопухолевых вакцин; исследовании эффективности сконструированных вакцин на различных экспериментальных моделях опухолевого роста; проведении сравнительной оценки иммунных эффектов, вызванных влиянием данных вакцин на организм животных с опухолевым процессом.

В результате проведенных исследований удалось выделить и охарактеризовать две фракции с ФКЖ *B. subtilis В-7025*, обогащенные отдельными протеинами и проявляющие цитотоксическое действие на опухолевые клетки в тестах *іn vitro* – компонент (18,5 кДа) и компонент (70 кДа). Эти компоненты отличались по своим биохимическим характеристикам, влиянием на опухолевые клетки и белковым профилем вакцин (ПВ), изготовленных с их использованием. Оба компонента вызывали некротические изменения в опухолевых клетках при их совместной инкубации в системе *in vitro*. Было показано, что компонент (18,5 кДа) обладает протеолетической активностью и, скорее всего, за счёт этого и проявляются его цитотоксические свойства. При изучении действия компонента (70 кДа) на опухолевые клетки было установлено, что он связывается с их поверхностью и вызывает «слущивание» поверхностных протеинов. При тестирование данных компонентов в экспериментах *in vivo,* было показано, что они обладают незначительным противоопухолевым действием, которое проявляется за счёт активации АЗЦ Мф – в случае с компонентом (18,5 кДа) и активации АЗЦ Мф и АЗЦ Лц – в случае с компонентом (70 кДа). Исследования противоопухолевого действия вакцин, сконструированных с использованием вышеуказанных компонентов, показали их эффективность в экспериментах *in vivo* на различных моделях опухолевого роста (саркоме 37, КЛЛ, лимфолейкозе мышей L1210 и раке Эрлиха). Вакцины, изготовленные с использованием компонента (70 кДа), оказалась более эффективными, поскольку их применение приводило к увеличению средней продолжительности жизни животных от 31,1 % до 75,0 %, тогда как применение вакцин, с компонентом (18,5 кДа) приводило к увеличению этого показателя от 23,8 % до 42,9 %. При анализе иммунных эффектов, индуцированных вакцинотерапией у животных с перевитыми опухолями, было показано, что использование вакцин приводило к торможению накопленных в динамике опухолевого роста растворимых факторов в сыворотке крови, которые уменьшали/блокировали цитотоксическое действие Лц, Мф и кооперативную активность этих эффекторов. Напротив, на 14- и 21-е сутки добавление сыворотки к тест-системе активировало (р<0,05) АЗЦ Лц, АЗЦ Мф и их кооперативную АЗЦ. Уровень влияния исследуемых ПВ на АЗЦ Лц был практически одинаковым, но на АЗЦ Мф в большей степени влияла ПВ с компонентом (70 кДа).

На основе корреляционного анализа полученных результатов было показано, что динамика иммунных эффектов, вызванных использованием вакцин в большинстве случаев была однотипной (ЦТА Лц ρ=0,62; АЗЦ Мф ρ=0,8; кооперативная ЦТА Мф и Лц ρ=0,64; кооперативная АЗЦ Мф і Лц ρ=0,66). Но по динамике влияния на реакции АЗЦ Лц (ρ=0,21) и ЦТА Мф (ρ=0,31) существенно отличалась, что, скорее всего, и обусловило разницу их противоопухолевого действия.

**Ключевые слова:** вакцинотерапия опухолей, опухолевые клетки, продукты жизнедеятельности *Bacillus subtilis В-7025*, цитотоксическая активность, эффективность, иммунологические показатели.

**ANNOTATION**

**Didenko G. V. The designing of antitumor vaccines on the basis of protein-containing metabolites of *B. subtilis В-7025* and their effects on the separate reactions of anti-tumor immunity (experimental study).** – Manuscript.

Thesis for a Candidate of Biological Sciences Degree; speciality 14.01.07 – Oncology. – R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2008.

The dissertation is devoted to search of the active cytotoxic components in the filtrate of culture liquid (FCL) of *B. subtilis В-7025*, to designing of antitumor vaccines on the basis of these components, and to comparative study of the influence of these vaccines on immune reactions in animals with the induced tumor growth.

As a result of the investigations it was obtained two cytotoxic components of FCL and it was shown the cytotoxic action of these components (18,5 kDa and 70 kDa) on tumor cells revealed with *іn vitro* cytotoxicity tests. The efficiency of the vaccines on various models of tumor growth (sarcoma 37, LLC, L1210 and Ehrlich’s cancer) in the experiments *in vivo* has been shown. The analysis of immune effects induced by vaccine therapy was suggested that realization of vaccines’ antineoplastic action is carried out due to a high level of antibody-dependent reactions mediated by the cells of macrophagal (Mc) and lymphoid (Lc) branches. The observed reactions were considered as a result of removal or blocking action of the serum at the terminal stages of experiment (the 21-st day).

The correlation analysis of the obtained data has been shown that dynamics of the immune effects caused with the use of vaccines in the most cases was similar (CA Lc ρ=0,62; ADC Mc ρ=0,8; cooperative ADC Ms and Lc ρ=0,64; cooperative ADC Mc and Lc r=0,66). But the dynamical parameters of influence on the reactions of Lc ADC (ρ=0,21) and Ms CA (ρ=0,31) essentially differed that most likely causes the differences in their antineoplastic action.

**Key words:** vaccine therapy of tumors, tumor cells, *Bacillus subtilis В-7025* products of vital activity, cytotoxic action, efficiency, immunological indices.

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