

Г.П. Потебня¹
 Г.В. Диденко¹
 С.Л. Рыбалко²
 С.В. Хуторной¹

¹Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии, Киев

²Институт эпидемиологии и инфекционных болезней, Киев

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ГЛИКОПРОТЕИДОВ *BACILLUS SUBTILIS* AB-56, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АУТОВАКЦИН, ПРИГОТОВЛЕННЫХ НА ИХ ОСНОВЕ

Ключевые слова: *B. subtilis* AB-56, аутовакцина, противоопухолевая активность, цитотоксичность, гликопротеид, *S. aureus*, нейраминидазная активность.

Резюме. Из культуральной жидкости микроорганизма *B. subtilis* AB-56 выделен гликопротеид, обладающий цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток саркомы-37. Аутологичная вакцина, приготовленная на основе этого вещества, обладает выраженным противоопухолевым действием. При лечении мышей линии *Balb/c*, привитых саркомой-37, отмечена значительная задержка роста опухоли и увеличение средней продолжительности жизни животных. Сравнение терапевтического эффекта данного препарата с гликопротеидом *S. aureus*, выделенного аналогичным способом, а также вакцин, приготовленных на основе этих препаратов, подтверждает специфичность действия препарата *B. subtilis* AB-56 на опухолевые клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Вакцины на основе аутологичных опухолевых клеток (ОК), обработанных культуральной жидкостью микробной культуры *B. subtilis* AB-56, уже много лет успешно используются в иммунотерапии рецидивов и метастазов злокачественных опухолей [1, 2]. В целях повышения противоопухолевой эффективности этих вакцин, стандартизации их приготовления возникла необходимость выделить активный компонент из культуральной жидкости данного микроорганизма, обладающий цитотоксическими свойствами в отношении ОК и свободный от балластных веществ. В работе охарактеризован гликопротеид, продуцируемый культурой *B. subtilis* AB-56, выделенный по сходной методике, с ранее полученным нейраминином из *S. aureus*, сравнивается их нейраминидазная и гемагглютинирующая активность, а также цитотоксическое действие на клетки саркомы-37.

Анализируется противоопухолевая резистентность мышей линии *Balb/c*, привитых саркомой-37 и получавших противоопухолевую аутовакцину, приготовленную на основе выделенных гликопротеидов, а также цельного фильтрата *B. subtilis* AB-56.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на мышах-самцах линии *Balb/c* разведения вивария Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины. Возраст животных — 2 мес, масса — 18–20 г. В качестве модели использовали ОК саркомы-37 (штамм, пассируемый по общепринятой методике в лаборатории штаммов опухолей ИЭПОР им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины). В эксперименте использовали гликопротеиды, выделенные из *B. subtilis* AB-56 и *S. aureus*, а также противоопухолевые аутовакцины, приготовленные на их основе.

Гликопротеиды из культуральной жидкости выделяли с помощью вакуум-концентрации, 3-разовой этанольной преципитации с дальнейшим хроматографическим разделением на колонке с акрылекс S-200 [3]. Качественные реакции на протеины и углеводы определяли с помощью Кумасси-голубого и Шифф-реактива. Изучение белкового состава проводили методом SDS-электрофореза в 12% ПААГ. Сахарный состав изучали методом газожидкостной хроматографии. У выделенных гликопротеидов *in vitro* изучали нейраминидазную активность [4], ток-

сическое действие на опухолевые клетки [5], а также гемагглютинирующие свойства [6].

Противоопухолевые аутовакцины готовили путем обработки клеток саркомы-37 указанными выше гликопротеидами по стандартной методике [2]. Мышам подкожно прививали ОК саркомы-37 в количестве $1 \cdot 10^6$ клеток на мыш. Через 24 ч после прививки опухоли проводили лечение животных как аутовакцинами, приготовленными на основе указанных гликопротеидов, так и чистыми препаратами гликопротеидов. Препараты вводили подкожно в количестве 3 г в 0,3 мл с интервалом 7 дней между прививками на протяжении 4 нед. Животным контрольной группы в те же дни делали инъекции изотонического раствора натрия хлорида.

Противоопухолевую активность препаратов оценивали по изменению объема опухоли, а также по индексу модуляции средней продолжительности жизни.

Результаты экспериментов обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента и коэффициента корреляции [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из культуральной жидкости *B. subtilis* AB-56 выделено сложное вещество гликопротеидной природы (соотношение белка к углеводам 1:10) с белковым компонентом массой 70–80 кДа (ГП-AB). Углеводный состав представлен на рис. 1. Наиболее высоким содержанием в процентном отношении представлена арабиноза — 62%.

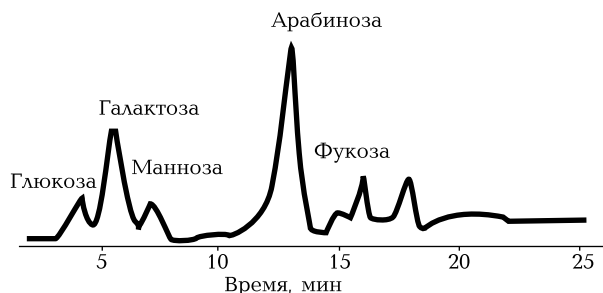


Рис. 1. Углеводный состав гликопротеида, выделенного из культуральной жидкости *B. subtilis* AB-56

В отличие от гликопротеида, выделенного из штамма 392 *S. aureus*, это вещество не ингибирует нейраминидазную активность вирусов гриппа [4]. На основе проведенных исследований мы не можем отнести это вещество к классу лектинов, так как оно не агглютинирует эритроциты мыши, барана и человека. Установлено, что полученный гликопротеид (ГП-AB) обладает ярко выраженным токсическим действием на клетки саркомы-37. Так, в концентрации $10 \mu\text{г}/\text{мл}$ 10^6 опухолевые клетки саркомы-37 гибнут в течение 2 ч. Поэтому данную концентрацию использовали для приготовления противоопухолевой аутовакцины. Гликопротеид,

выделенный из *S. aureus* (ГП-S), аналогичными свойствами не обладает.

Результаты исследования динамики роста саркомы-37, трансплантированной мышам линии *Balb/c* и получавших инъекции гликопротеидов ГП-AB, ГП-S, культуральной жидкости *B. subtilis* AB-56 (ФАВ), а также аутологичных вакцин, приготовленных на основе этих препаратов и ОК, свидетельствуют о большей эффективности вакцинного препарата ГП-AB + ОК по сравнению с традиционной вакциной ФАВ + ОК (рис. 2 и 3).

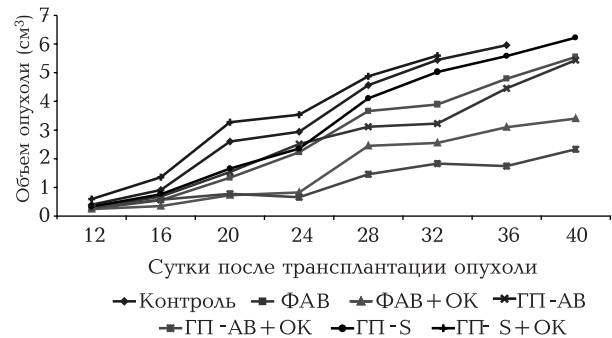


Рис. 2. Динамика роста саркомы-37 у мышей линии *Balb/c*, получавших подкожно инъекции изучаемых препаратов и противоопухолевые аутовакцины



Рис. 3. Индекс модуляции (ИМ) объема саркомы-37 (%) у животных, получавших подкожно инъекции изучаемых препаратов и противоопухолевые аутовакцины

Несмотря на то, что вначале (на 16-е сутки) отмечается более выраженное торможение роста опухоли при применении ФАВ + ОК (ИМ составил $-61,75\%$ против $-37,47\%$ препарата ГП-AB + ОК), в дальнейшем наблюдается значительное торможение роста опухоли у животных, леченных препаратом ГП-AB + ОК. Так, на 24-е сутки ИМ в группе ГП-AB + ОК составил $-77,64\%$, в группе ФАВ + ОК — $48,72\%$. Эта динамика сохранялась до окончания эксперимента (80-е сутки).

Однако инъекции вакцины, полученной с помощью гликопротеида стафилококка (ГП-S + ОК), способствовали значительной стимуляции

опухолевого роста уже на 12-е сутки (ИМ составил +49,5%). Следует отметить, что в дальнейшем ИМ приблизился к показателям у животных контрольной группы. Возможно, этот эффект связан с антинейраминидазной активностью стафилококкового нейраминаина.

Следует отметить, что сами препараты ФАВ, ГП-АВ, ГП-S также тормозят рост опухоли. Более выраженное торможение наблюдается при применении ГП-АВ и ФАВ. ИМ на 32-е сутки при их введении составил –40,77 и –28,64% соответственно. Сходство динамики роста опухоли свидетельствует о некоторой терапевтической эффективности препаратов ФАВ и ГП-АВ, выделенного из ФАВ.

При применении гликопротеида стафилококка ГП-S в это же время ИМ объема опухоли составил –7,7%, который к концу опыта приблизился к показателям у животных контрольной группы.

Анализ СПЖ в группах животных, получавших противоопухолевые вакцины (таблица), свидетельствует о том, что вакцина ГП-АВ+ОК обладает такой же эффективностью, как и вакцина ФАВ+ОК. ИМ составили соответственно +124,2 и +116,7%. Это указывает на то, что вакцина ГП-АВ+ОК усиливает иммуногенность опухолевых антигенов. Возможно, этот эффект связан с необычно высоким содержанием арабинозы.

Таблица

Средняя продолжительность жизни мышей с саркомой-37, леченных гликопротеидами *S. aureus* и *B. subtilis* АВ-56, а также противоопухолевыми аутовакцинами, приготовленными на их основе

Препарат	Количество животных	СПЖ, сутки	t	p	ИМ СПЖ, %
ФАВ	9	50,1±7,3	2,56	<0,05	+51,8
ФАВ+ОК	9	71,5±12,4	3,06	<0,01	+116,7
ГП-АВ	8	52,4±7,8	2,01	>0,05	+58,8
ГП-АВ+ОК	8	74,0±11,9	3,39	<0,01	+124,2
ГП-S	8	48,7±3,2	1,98	>0,05	+47,6
ГП-S+ОК	8	30,2±4,3	1,5	>0,05	-8,5
Контроль	10	33,0±2,2			

Обозначения: ФАВ — фильтрат культуральной жидкости *B. subtilis* АВ-56; ГП-АВ — гликопротеид, выделенный из *B. subtilis* АВ-56; ГП-S — гликопротеид, выделенный из *S. aureus* (штамм 392); СПЖ — средняя продолжительность жизни; ОК — опухолевые клетки.

В группах животных, леченных только препаратами ФАВ, ГП-АВ, ГП-S, также наблюдается увеличение СПЖ. Однако в этих группах ИМ был значительно ниже и составил +51,8, +58,8 и +47,6% соответственно. По-видимому, это связано с неспецифическим адьювантным действием углеводсодержащих биополимеров.

Таким образом, можно сделать вывод, что подобно аутологичной вакцине на основе ФАВ, вакцина, приготовленная с помощью выделенного из ФАВ гликопротеида, значительно повы-

шает противоопухолевую резистентность леченных животных. По сравнению с культуральной жидкостью *B. subtilis* АВ-56, вакцинный препарат ГП-АВ+ОК более гомогенен и содержит меньше балластных веществ, что свидетельствует о целесообразности его применения в терапии опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Затула Д.Г. (1985) Микроорганизмы, рак и противоопухолевый иммунитет. Наук. думка, Киев, 213 с.
2. Потебня Г.П., Семерников В.А., Лисовенко Г.С., Хуторной С.В., Тарасова Т.А. (1998) Противоопухолевая эффективность вакцин, полученных из мембран опухолевых клеток и продуктов жизнедеятельности *B. mesentericus* АВ-56. Эксперим. онкология, 20(2): 143–147.
3. Фролов А.Ф., Шапиро А.В., Рыбалко С.А. (1982) Авторское свидетельство № 924949 от 04.10.82. Способ получения ингибитора нейраминидазы.
4. Rybalko S., Shapiro A. (1995) The influenza virus neuraminidase inhibitor produced by *S. aureus*. Биополимеры и клетка, 15(6): 550–556.
5. Айзенман Б.Е., Мангрик Т.П., Швайгер М.О., Киприанова Е.А. (1960) Быстрый метод выявления *in vitro* поврежденных и мертвых клеток карциномы Эрлиха. Антибиотики, 3: 97–102.
6. Кэтти Д. (1991) Антитела. Методы. Мир, Москва, 280 с.
7. Лакин Г.Р. (1990) Биометрия. Высш. шк., Москва, 352 с.

ПРОТИПУХЛИННА АКТИВНІСТЬ ГЛІКОПРОТЕЇДІВ *VACILLUS SUBTILIS* АВ-56, *STARHYLOCOCCLUS AUREUS* ТА ПРОТИПУХЛИННИХ АУТОВАКЦИН, ПРИГОТОВЛЕНИХ НА ЇХ ОСНОВІ

Г.П. Потебня, Г.В. Діденко, С.Л. Рыбалко, С.В. Хуторний

Резюме. Із культуральної рідини мікроорганізму *B. subtilis* АВ-56 виділено глікопротеїд, який виявляє цитотоксичну активність по відношенню до пухлинних клітин саркоми-37. Аутологічна вакцина, приготовлена на основі даної речовини, має виражену протипухлинну дію. При лікуванні мишей лінії *Balb/c*, прищеплених саркомою-37, відзначається значна затримка росту пухлини і збільшення середньої тривалості життя тварин. Порівняння терапевтичного ефекту даного препарату з глікопротеїдом *S. aureus*, виділеного аналогічним способом, а також вакцин, приготовлених на основі цих препаратів, підтверджує специфічність дії препарату *B. subtilis* АВ-56 на пухлинні клітини.

Ключові слова: *B. subtilis* АВ-56, аутовакцина, протипухлинна активність, цитотоксичність, глікопротеїд, *S. aureus*, нейрамінідазна активність.

**ANTITUMOR ACTIVITY OF GLYCOPROTEINS OF
BACILLUS SUBTILIS AB-56,
STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND
ANTITUMOR VACCINES, DEVELOPED ON THE
BASIS OF THESE SUBSTANCES**

**G.P. Potebnya, G.V. Didenko,
S.L. Rybalko, S.V. Khutorniy**

Summary. There was isolated a glycoprotein with sarcoma-37 cells cytotoxic properties from cultural fluid of *B. subtilis* AB-56. Autologous vaccine, developed from this substance, causes pronounced antitumor effect. While using this vaccine in treatment of *Balb/c* mice with inoculated sarcoma-37, we registered a tumor grows inhibition and extended mean survival of rodents. A compa-

rison of the efficacy of this vaccine with the one, containing *S. aureus* glycoprotein, and other vaccines, prepared on the basis of these substances support the specificity of antitumor activity of *B. subtilis* AB-56 glycoproteid.

Key words: *B. subtilis* AB-56, autovaccine, antitumor activity, cytotoxicity, glycoprotein, *S. aureus*, neuraminidase activity

Адрес для переписки:

Потебня Григорий Платонович
03022, Киев, ул. Васильковская, 45
Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины