ЕФЕКТИВНІСТЬ КОМПЛЕКСНОГО ЗАСТОСУВАННЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ ВАКЦИНИ ТА ІМУНОМОДУЛЮЮЧОГО ПРЕПАРАТУ БЛАСТОЛЕН

Г.П. Потебня, Г.С. Лісовенко, В.С. Мосієнко, В.Г. Лісовенко

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології, Київ

Резюме. В експерименті вивчено ефективність комплексного застосування імуномодулюючого препарату бластолен на основі *Lactobacillus Delbrueckii* разом з протипухлинною вакциною (ПВ), виготовленою із сингенних пухлинних клітин за допомогою продуктів синтезу мікробної культури *B. subtilis* АВ-56. На моделі солідної форми саркоми-37 у мишей лінії BALB/c та меланоми В-16 у мишей лінії С57Bl встановлено доцільність використання бластолену у комплексі з ПВ, причому значна перевага належить схемі введення бластолену за 3 год до ПВ.

Ключові слова: *протипухлинна вакцина, імуномодулюючий ефект, бластолен, B. subtilis AB-56.*

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНЫ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ПРЕПАРАТА БЛАСТОЛЕН

Г.П. Потебня, Г.С. Лисовенко, В.С. Мосиенко, В.Г. Лисовенко

Резюме. В эксперименте изучали эффективность комплексного применения иммуномодулирующего препарата на основе *Lactobacillus Delbrueckii* и противоопухолевой вакцины (ПВ), приготовленной из сингенных опухолевых клеток с помощью продуктов синтеза микробной культуры *B. subtilis* АВ-56. В терапевтических экспериментах на модели солидной формы саркомы-37 у мышей линии BALB/c и меланомы В-16 у мышей линии С57Bl установлена целесообразность использования бластолена в комплексе с ПВ, причем существенное преимущество наблюдалось при схеме введения бластолена за 3 ч до ПВ.

Ключевые слова: *противоопухолевая вакцина, иммуномодулирующий эффект, бластолен, B. subtilis AB-56.*

EFFICIENCY OF COMPLEX APPLICATION OF ANTITUMOR VACCINE AND BLASTOLEN AS IMMUNOMODULATOR

G.P. Potebnia, G.S. Lisovenko, V.S. Mosienko, V.G. Lisovenko

Summary. We have studied the effectiveness of complex application of immunomodulator blastolen, derived from *Lactobacillus Delbrueckii* and antitumor vaccine, prepared from syngenic tumor cells (AV). AV was obtained using the products *B. subtilis* AB-56 synthesis. The expediency of complex use of blastolen and AV have been confirmed on the model of the solid form of a sarcoma-37 of BALB/c mice and the melanoma B-16 in C57Bl mice. Thus the essential advantage was observed when blastolen was injected 3 hours prior to AV.

Key words: *antitumor vaccine, immunomodulator, blastolen, B. subtilis AB-56.*

Адреса для листування: *Потебня Григорій Платонович*
03022, Київ, вул. Велика Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України

ВСТУП

Останніми роками в науковій літературі з'явилась значна кількість даних про використання в клінічній та експериментальній онкології імуномодулюючих препаратів, виготовлених з *Lactobacillus Delbrueckii* [1–4]. Встановлено, що вони здатні впливати на продукцію деяких цитокінів: інтерлейкінів (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12), γ-інтерферону, α-TNF [3, 5–8], підвищувати лімфопроліферативні реакції на мітогени [5], стимулювати Th1 — клітини-хелпери, регулювати рівень IgE сироватки крові [7, 9], знижувати рівень лейкопенії [3, 4] тощо. В деяких дослідженнях [5–8] препарати на основі *L. Delbrueckii* застосовували у тварин з трансплантованими або хімічно-індукованими пухлинами (P388D1, Meth A fibrosarcoma, Colon 26), при цьому спостерігали значне гальмування пухлинного росту, яке автори пояснюють посиленням системних імунних реакцій та модифікацією функції Т-лімфоцитів у тварин — носіїв пухлини.

В усіх вищезгаданих дослідженнях препарати на основі *L. Delbrueckii* уводили мишам ізольовано, без антигенів пухлинних клітин. Тому ми вважали за доцільне вивчити в експерименті ефективність комплексного застосування імуномодулюючого препарату бластолену разом з протипухлинною вакциною (ПВ), виготовленою із сингенних пухлинних клітин за допомогою продуктів синтезу мікробної культури *B. subtilis* АВ-56, яка впливає як на специфічні протипухлинні імунні реакції [10], так і на неспецифічну резистентність — відповідь на гетерологічний тест-антиген [11].

Таблиця 1

Схема експерименту з вивчення ефективності комплексного застосування ПВ та бластолену

Дослід	Група	Трансплантація пухлини (0-й день)		ПВ		Бластолен	
		Штам пухлини	Доза, шлях введення	Доза, шлях введення	Термін введення	Доза	Термін введення
I	1-ша	Саркома-37	$3 \cdot 10^6$ п/ш	0,3 мл п/ш	1-ша, 4-та, 9-та доба	2 мкг	1-ша, 9-та доба
	2-га	- // -	- // -	0,3 мл п/ш	1-ша, 4-та, 9-та доба	*	
	3-тя	- // -	- // -	*		2 мкг	1-ша, 9-та доба
	4-та	- // -	- // -	*		*	
II	1-ша	Саркома-37	$3 \cdot 10^6$ п/ш	0,2 мл п/ш	1-ша, 4-та, 9-та доба	2 мкг	1-ша, 9-та доба
	2-га	- // -	- // -	0,2 мл п/ш	1-ша, 4-та, 9-та доба	2 мкг	3-тя, 11-та доба
	3-тя	- // -	- // -	0,2 мл п/ш	1-ша, 4-та, 9-та доба	*	
	4-та	- // -	- // -	*		2 мкг	1-ша, 9-та доба
	5-та	- // -	- // -	*		2 мкг	3-тя, 11-та доба
	6-та	- // -	- // -	*		*	
III	1-ша	Меланома В-16	$3 \cdot 10^5$ в/м	0,2 мл п/ш	1-ша, 4-та, 9-та доба	2 мкг	1-ша, 9-та доба
	2-га	- // -	- // -	0,2 мл п/ш	1-ша, 4-та, 9-та доба	*	
	3-тя	- // -	- // -	*		2 мкг	1-ша, 9-та доба
	4-та	- // -	- // -	*		*	

* Препарати не вводили.

Пробіотичний препарат бластолен (Бластен, «Ензим», Україна), виготовлений на основі плазматичних мембран молочнокислих бактерій *L. Delbrueckii,* — ефективний імуномодулятор з широким спектром дії [12]. Важливо, що істотну позитивну модуляцію специфічної і неспецифічної ланок імунної системи спричинювали дози препарату, які практично не впливають на такі вихідні характеристики лімфоїдних органів, як клітинність і проліферативна активність. Тривалу позитивну імуномодуляцію автори відзначали навіть після введення бластолену у дозі 0,000013 $ЛД_{50}$, яка для мишей складала близько 7 г/кг. Тому в подальших експериментах ми використовували саме цю дозу, що дорівнювала 2 мкг/тварину.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди проведені на моделі солідної форми саркоми-37 у мишей-самок лінії BALB/c (2—2,5-місячного віку з масою 18—20 г) і меланоми В-16 у мишей-самок лінії C57Bl (2-місячного віку з масою 18—20 г). У кожній групі було по 8—10 тварин. Трансплантацію пухлини проводили в 0-й день: в I і II дослідах мишам прищеплювали під шкіру (п/ш) спини по 3{106 живих клітин саркоми-37, в III досліді — в стегновий м'яз по 3·105 живих клітин меланоми В-16.

В усіх експериментах ПВ вводили п/ш на 1-шу, 4-ту і 9-ту добу, разова доза в I досліді складала 0,3 мл, у II і Ш дослідах — 0,2 мл. Для виготовлення ПВ з клітин саркоми-37 використовували співвідношення 10^7 пухлинних клітин в 1 мл фільтрату культуральної рідини (ФКР) *B. subtilis* АВ-56 (I дослід) або 10^7 пухлинних клітин в 1 мл розчину комплексного препарату (0,15 мг/мл), який виділяли з ФКР (II дослід). ПВ з меланоми В-16 готували з подрібненої пухлинної тканини та ФКР в об'ємному співвідношенні 1:9 (Ш дослід). У I досліді кожний раз ПВ готували *ex tempore* перед введенням дослідним тваринам, у II і Ш дослідах ПВ готували заздалегідь і зберігали у замороженому стані.

Розчин бластолену готували кожний раз *ex tempore*, разова доза складала 2 мкг в 0,2 мл ізотонічного розчину. Препарат вводили п/ш на 1-шу і 9-ту добу за 3 год до використання ПВ з іншого боку спини, або на 3-тю та 11-ту добу в 2-й і 5-й групах II досліду. Мишам контрольних груп перещеплювали пухлину і на 1-шу, 4-ту, 9-ту добу уводили ізотонічний розчин (0,2 мл). Загальна схема експерименту представлена в табл. 1.

В експерименті вивчали динаміку перещеплення і росту пухлин та середню тривалість життя (СТЖ) дослідних тварин. Для оцінки впливу досліджуваних факторів на СТЖ використовували індекс модуляції (ІМ):

ІМ (%) = (дослід − контроль) / контроль · 100.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою методів варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента.

Таблица 2

СТЖ мишей з саркомою-37 і меланомою В-16, яким вводили ПВ і бластолен

Пухлина	Група	Лікування	СТЖ, діб (X±m)	ІМ,%
Саркома-37 (I дослід)	1-ша	ПВ + бластолен	89,40±6,71*	+184,70
	2-га	ПВ	80,60±9,65*	+156,72
	3-тя	Бластолен	60,40±8,12*	+92,43
	4-та	Контроль (ізотонічний розчин)	31,40±2,91	
Саркома-37 (II дослід)	1-ша	ПВ + бластолен (1-ша схема)	65,86±3,55*	+115,93
	2-га	ПВ + бластолен (2-га схема)	45,75±4,47*	+50,00
	3-тя	ПВ	41,20±2,11*	+35,08
	4-та	Бластолен (1-ша схема)	36,02±2,44	+18,10
	5-та	Бластолен (2-га схема)	35,16±1,88	+15,28
	6-та	Контроль (ізотонічний розчин)	30,50±2,48	
Меланома В-16 (III дослід)	1-ша	ПВ + бластолен	67,12±4,89*	+77,28
	2-га	ПВ	47,04±5,43	+24,25
	3-тя	Бластолен	41,60±2,39	+9,88
	4-та	Контроль (ізотонічний розчин)	37,86±2,15	

* $p<0,05$ порівняно з відповідним контролем.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати, отримані в I досліді, свідчать про значну ефективність комплексного застосування ПВ і бластолену. У мишей 1-ї групи пухлини з'являлись значно пізніше, ніж в контрольній групі. Так, на 16-ту добу після перещеплення пухлин, коли у тварин 1-ї групи пухлин ще не було, в контрольній групі їх відзначали у 60% тварин, на 30-ту добу пухлини зареєстровано відповідно у 20 і 100% тварин. У мишей 2-ї групи, яким вводили тільки ПВ, ці показники були дещо гірші. В цілому, на 50-ту добу експерименту (через 20 діб після загибелі всіх тварин контрольної групи) пухлини виявляли у 60, 80 і 83% мишей 1-ї, 2-ї і 3-ї груп I досліду відповідно. Слід підкреслити, що при комплексному застосуванні ПВ і бластолену зареєстровано більш значне гальмування пухлинного росту, ніж при ізольованому використанні ПВ і бластолену (рисунок 1, А). Такі самі закономірності були відзначені і при аналізі даних про загибель та СТЖ піддослідних мишей (табл.2). При використанні тільки бластолену теж значно покращувався показник СТЖ, ІМ в порівнянні з таким у тварин контрольної групи досягав +92,43%. Отже, отримані на терапевтичній моделі з саркомою-37 результати дозволили зробити висновок про перспективність розроблення ефективних схем комплексного застосування ПВ з бластоленом.

У II досліді використовували 2 схеми введення бластолену: 1) як і в попередньому досліді, за 3 год до 1-го та 3-го введення ПВ (1-ша та 9-та доба після трансплантації пухлини); 2) через 2 доби після 1-го і 3-го введення ПВ (відповідно 3-тя та 11-та доба). Результати, отримані В.С. Мосієнко і співавторами [12], свідчать про те, що стимуляція клітинного імунітету (реакцій гіперчутливості сповільненого типу та бласттрансформації лімфоцитів) під впливом бластолену у дозі 0,000013 $ЛД_{50}$ після 7-ї доби змінюється зниженням рівня цих реакцій. Тому при подальшому введенні бластолену ми сподівались досягти більш значного гальмування пухлинного росту за рахунок стимуляції клітинних реакцій імунітету у тварин – носіїв пухлини.

При вивченні динаміки пухлинного росту встановлено, що і в цьому експерименті при комплексному застосуванні ПВ з бластоленом спостерігалося його гальмування в порівнянні з контрольною групою (рис. 1, Б), при цьому ефект 1-ї схеми введення бластолену, всупереч попереднім сподіванням, був найбільш значним ($p<0,05$). Аналіз СТЖ у дослідних тварин свідчить про істотну перевагу саме групи тварин, яка одержувала бластолен за 3 год до 1-го і 3-го введення ПВ (див. табл. 2). Незважаючи на значну різницю в порівнянні з показниками контрольної групи, СТЖ у тварин 1-ї групи суттєво ($p<0,05$) відрізнялась від такої у тварин 2-ї групи, яким бластолен

Таблиця 3

Динаміка ІМ об'єму пухлини у мишей з меланомою В-16, яким вводили ПВ і бластолен (III дослід), %

Лікування	Доба після трансплантації пухлини					
	14-та	19-та	21-ша	23-тя	26-та	30-та
ПВ + бластолен	-85,39	-76,77	-79,70	-78,10	-60,28	-48,75
ПВ	-78,65	-74,54	-68,78	-56,11	-50,31	-35,67
бластолен	-5,62	-2,63	-17,71	-16,50	-12,94	+3,38

вводили за іншою схемою, та у мишей 3-ї групи, яким вводили тільки ПВ; ІМ відповідно дорівнював +115,93; +50,00 і +35,08%.

При випробуванні різних схем введення препарату на основі *Lactobacillus* L-137 мишам лінії DBA/2 з пухлиною P388D1 також виявлена перевага використання препарату в 1-й день після трансплантації пухлини [8]. На відміну від інших схем у цьому випадку встановлено значне збільшення продукції IL-12.

При вивченні протипухлинної дії тільки бластолену (4-та і 5-та групи II досліду) при застосуванні 1-ї та 2-ї схем введення істотної різниці зареєстровано не було ($p>0,05$), тому можна зробити попередній висновок про те, що термін введення бластолену має значення при його використанні разом з ПВ, яка вливає на специфічний протипухлинний імунітет. Слід відзначити, що в цьому досліді ефект від введення тільки ПВ або в комплексі з бластоленом був дещо нижчим в порівнянні з

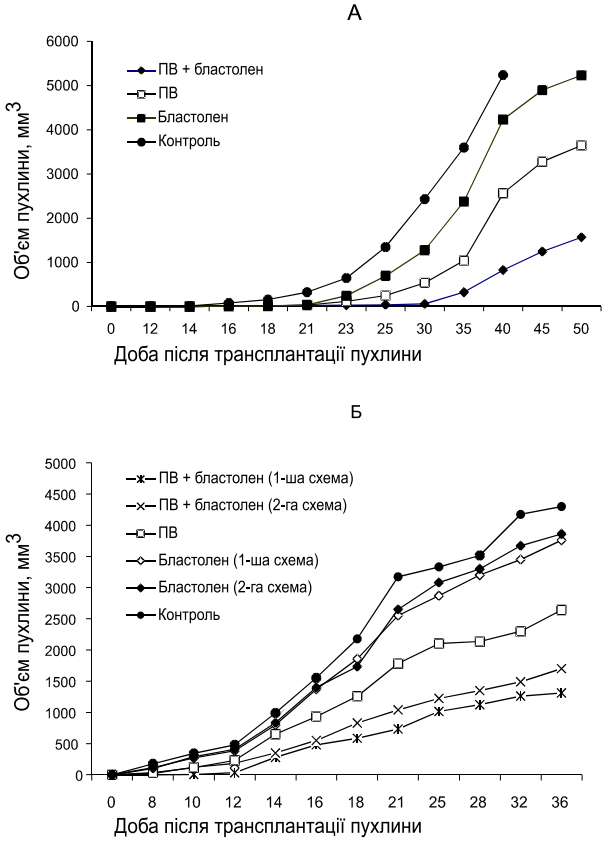

Рисунок 1. Динаміка росту пухлин у мишей з саркомою-37, яким вводили ПВ і бластолен: А – I дослід, Б – II дослід

попереднім, що може бути обумовлено як більш низькою дозою ПВ, так і виготовленням її не *ex tempore* і зберіганням у замороженому стані. З'ясування цих питань потребує подальшого дослідження.

Отже, в експериментах на моделі солідної форми саркоми-37 визначена доцільність використання бластолену в комплексі з ПВ, причому значна перевага належить схемі застосування бластолену за 3 год до 1-го і 3-го введення ПВ.

Результати, отримані в III досліді на іншій моделі — меланомі В-16, цілком підтверджують зроблені висновки: у мишей, яким вводили ПВ і бластолен, також одержано найкращі результати (табл. 3), пухлини з'являлися пізніше, ріст їх був більш повільним у порівнянні з тими тваринами, яким вводили тільки ПВ чи бластолен. У 40 и 20% мишей 1-ї і 2-ї груп III досліду відповідно пухлини взагалі не прищепились. У даному випадку використаний варіант ПВ при самостійному застосуванні у мишей з меланомою В-16 був малоефективним, ІМ СТЖ складав лише +24,25%, а різниця СТЖ від такого показника в контрольній групі не була статистично значущою (див. табл. 2). Застосування тільки бластолену також неістотно впливало на ріст меланоми В-16 на відміну від саркоми-37 (ІМ = +9,88%). Тим більш переконливими є результати про значну ефективність їх комплексного застосування — ІМ СТЖ складав +77,28%, показник СТЖ суттєво відрізнявся від такого в контрольній групі і в групі мишей, яким вводили тільки ПВ ($p<0,05$).

Таким чином, результати проведених досліджень дозволяють зробити висновок про перспективність комплексного застосування ПВ і імуномодулюючого препарату бластолен в імунотерапії злоякісних пухлин. Для цього важливим є подальше визначення механізмів позитивної синергічної дії даних препаратів.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Костюк О.П., Чернишова Л.І., Волоха А.П.* (1997) Сучасні уявлення про вплив лактобактерій на імунну систему організму людини. Фізіол. журн., 43(3–4): 106–115.
2. *Rao C.V., Sanders M.E., Indranie C., Simi B., Reddy B.S.* (1999) Prevention of colonic preneoplastic lesions by the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFMTM in F344 rats. Int. J. Oncol., 14(5): 939–944.
3. *Савцова З.Д., Шпильова С.І., Тарутінов В.І., Рогацька В.П., Меньок Т.А., Нікольський І.С.,*

Мосієнко В.С., Шинкаренко Л.М., Чехун В.Ф. (2000) Імунокорекція за допомогою імуномодулятора з *Lactobacillus Delbrueckii* в комплексному лікуванні хворих на рак молочної залози II–IV стадії. Онкология, 2(4): 267–271.

4. *Шпилевая С.И., Тарутинов В.И., Мосиенко В.С., Рогацкая В.П., Пономарев И.О., Шинкаренко Л.М., Чехун В.Ф.* (2000) Коррекция лейкопении с помощью нового пробиотического иммуномодулятора (продукт *Lactobacillus Delbrueckii*) в комбинированном лечении больных раком молочной железы. Онкология, 2(1–2): 83–86.
5. *Kato I., Endo K., Yokokura T.* (1994) Effects of oral administration of *Lactobacillus* casei on antitumor responses induced by tumor resection in mice. Int. J. Immunopharmacol., 16(1): 29–36.
6. *Matsuzaki T., Hashimoto S., Yokokura T.* (1996) Effects on antitumor activity and cytokine production in the toracic cavity by intrapleural administration of *Lactobacillus casei* in tumor-bearing mice. Med. Micribiol. Immunol. (Berl.), 185(3): 157–161.
7. *Matsuzaki T., Yamazaki R., Hashimoto S., Yokokura T.* (1998) The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. J. Dairy Sci., 81(1): 48–53.
8. *Murosaki S., Muroyama K., Yamamoto Y., Yoshikai Y.* (2000) Antitumor effect of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 through restoration of impaired interleukin-12 production in tumor-bearing mice. Cancer Immunol. Immunother., 49(3): 157–164.
9. *Yasui H., Shida K., Matsuzaki T., Yokokura T.* (1999) Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek, 76(1–4): 383–389.
10. *Затула Д.Г., Лисовенко Г.С., Завальнюк А.К.* (1982) Влияние активной специфической иммунизации на противоопухолевую цитотоксичность мышей-опухоленосителей. Иммунология, 5: 44–48.
11. *Потебня Г.П., Лисовенко Г.С., Кейсевич В.Л., Литвиненко А.А.* (1997) Иммунный ответ к гетерологичному антигену у мышей, получавших противоопухолевую вакцину. Клін хірургія, 11–12: 69–71.
12. *Мосієнко В.С., Мосієнко М.Д., Савцова З.Д., Даниленко В.С., Волкова М.Ю., Шинкаренко Л.М., Щеглова Н.А., Восп'яков В.Г., Свідро О.В., Меньок Т.А.* (1999) Бластен — новий вітчизняний імуномодулятор біологічного походження. Журн. АМН України, 5(1): 79–86.