

УДК 616-006.04:615.37:57.083.34

©М. П. Рудик, О. А. Танасієнко, Є. Г. Шпак, Г. П. Потебня
 Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького
 НАН України, Київ
 Навчально-науковий центр "Інститут біології"
 Київського національного університету імені Тараса Шевченка

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОДУКЦІ АНТИТІЛ ДО ЛЕКТИНУ *BACILLUS SUBTILIS* B-7025 У МИШЕЙ В НОРМІ ТА ПРИ ПУХЛИННОМУ РОСТІ

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОДУКЦІ АНТИТІЛ ДО ЛЕКТИНУ *BACILLUS SUBTILIS* B-7025 У МИШЕЙ В НОРМІ ТА ПРИ ПУХЛИННОМУ РОСТІ – Вивчено рівень антитіл, специфічних до цитотоксичного лектину з культуральної рідини *Bacillus subtilis* B-7025, у здорових мишей та мишей із карциномою Ерліха. Титр специфічних антитіл IgG в сироватці крові здорових мишей, визначений за допомогою імуноферментного аналізу, був досить високим при різних способах введення лектину. У мишей із пухлинним ростом превентивне введення лектину не супроводжувалося антитілоутворенням, однак у терапевтичній схемі його введення відзначались високі рівні антилектинових антитіл. Отримані дані свідчать, що у мишей із раком Ерліха знижується гуморальна імунна відповідь на антиген, введений до прищеплення пухлинних клітин, але можна посилювати, застосовуючи лектин з терапевтичною метою.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКЦИИ АНТИТЕЛ К ЛЕКТИНУ *BACILLUS SUBTILIS* B-7025 У МЫШЕЙ В НОРМЕ И ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ – Изучен уровень антител, специфических к цитотоксическому лектину из культуральной жидкости *Bacillus subtilis* B-7025, у здоровых мышей и мышей из карциномой Эрлиха. Титр специфических антител IgG в сыворотке крови здоровых мышей, определенный с помощью иммуноферментного анализа, был высоким при различных схемах введения лектина. У мышей из опухолевым ростом превентивное введение лектина не сопровождалось антителообразованием, однако в терапевтической схеме его введения определялись высокие уровни антилектиновых антител. Полученные данные указывают, что у мышей с раком Эрлиха понижается гуморальный иммунный ответ на антиген, введенный до прививки опухолевых клеток, и его можно усилить, используя лектин с терапевтической целью.

INVESTIGATION OF PRODUCTION OF ANTIBODIES AGAINST *BACILLUS SUBTILIS* B-7025 LECTIN IN HEALTHY MICE AND MICE WITH TUMOR – The level of antibodies against the cytotoxic lectin from *Bacillus subtilis* B-7025 cultural fluid in healthy mice and mice with transplanted Ehrlich's carcinoma was studied. The antilectin IgG titre in healthy mice serum determined by ELISA was sufficiently elevated by various schemes of lectin application. The preventive application of lectin for mice with tumor was not accompanied with specific antibody produce, but enhanced levels of the antilectin antibodies were detected upon therapeutic scheme of lectin use. The obtained data indicate that humoral immunity to antigen injected before tumor cell transplantation is reduced in mice with Ehrlich's carcinoma, but it could be possible to enhance it by therapeutic application of lectin.

Ключові слова: цитотоксичний лектин, карцинома Ерліха, гуморальний імунітет, специфічні антитіла.

Ключевые слова: цитотоксический лектин, карцинома Эрлиха, гуморальный иммунитет, специфические антитела.

Key words: cytotoxic lectin, Ehrlich's carcinoma, humoral immunity, specific antibodies.

ВСТУП Важливу роль антитіл у протипухлинному імунітеті довів Р. В. Петров [7]. Він встановив, що специфічні до антигенів пухлин антитіла з одного боку

можуть проявляти захисний ефект, проте в інших випадках вони здатні стимулювати ріст пухлини. Це відбувається через те, що одним із механізмів уникнення пухлиною імунного нагляду є "маскування" за допомогою антитіл. Саме тому на сьогодні вважається, що роль неспецифічних клітинних чинників організму є важливою у протипухлинній імунній відповіді [10]. У той же час, при деяких онкологічних захворюваннях відбувається зниження реакції гуморального специфічного імунітету та синтезу антитіл в цілому, що, як встановлено, асоційовано із прогресією пухлинного росту та небезпекою розвитку супровідних інфекційних ускладнень [18, 11]. Тому можливість модулювати специфічну ланку імунної системи при пухлинному рості є важливим аспектом застосування протипухлинної терапії.

Бактеріальні токсини було визнано як найпотужніші ад'юванти при використанні їх у складі вакцин. Такими, наприклад, є лабільний токсин *Bordetella pertussis* та холерний токсин (ХТ), термолабільний ентеротоксин *E. coli*, коклюшний токсин, *zonula occludens* токсин (zot) продукований *Vibrio cholerae*, котрі здатні підвищувати імуногенність специфічних компонентів вакцин та посилювати антитілоутворення у організмі на введений одночасно антиген. Недавніми дослідженнями було виявлено, що лектини рослинного походження здатні активувати специфічний гуморальний імунітет в якості імуномодуляторних речовин та лише у деяких з них виявлена протипухлинна активність. Вплив лектинів на імунну систему включає активацію фагоцитарних клітин, природних кілерних клітин, Т- та В-клітинної відповіді, підвищення синтезу цитокінів. Доведено, що деякі лектини посилюють синтез специфічних антилектинових антитіл, а також антитіл до гетерологічного антигену. Так, показано, що лектини *Griffonia simplicifolia* та аглютиніни пшеничних висівок стимулюють синтез специфічних антитіл класу G до кон'юговано із ними пероксидази хрому. Подібно до цього лектин омели викликає у мишей продукцію специфічних імуноглобулінів (IgA у секретах слизових, IgG1, IgG2a, IgG2b – у сироватці крові) вже після другої імунізації інтраназальним шляхом. При застосуванні його одночасно із овальбуміном, лектин омели стимулює також продукцію антиовальбумінових антитіл. Також лектини омели апробовані як індуктори антитілоутворення до глікопротеїну вірусу простого герпесу. В онкологічних хворих введення препаратів лектинів омели також генерувало високі титри специфічних антилектинових антитіл IgG1 та IgG3 [12]. Таким чином, припускається, що даний лектин здатний індукувати антигенспецифічну гуморальну відповідь та може бути використаний для посилення

гуморально імунно відповіді при патологічних станах. Однак застосування бактеріальних токсинів-лектинів та деяких рослинних лектинів (типу рибосомних інактиваторів) у клініці є проблематичним, оскільки обмежується х токсичними властивостями.

Лектин, виділений із культурально рідини сапрофітно бактері *Bacillus subtilis* B-7025, відомий як компонент протипухлинних вакцин виробництва ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького [6, 17]. Даний лектин характеризується цитотоксичною дією проти злоякісних клітин та здатний підвищувати х імуногенність. Показано, що застосування вакцин на основі лектину посилює антиліозалежні реакції імунно системи, такі як протипухлинна активність сироватки крові, антиліозалежна клітинна цитотоксичність, індукує накопичення антиліоутворюючих клітин в селезінці, розеткоутворюючих клітин у відповідь на гетерологічний тест-антиген, що свідчить про активацію гуморально імунно відповіді [8, 1]. Однак можливість даного лектину генерувати утворення специфічних до нього антитіл залишається не дослідженою. Зважаючи на вищесказане, метою нашого дослідження стало визначення титрів специфічних антилектинових антитіл у інтактних мишей та в мишей при пухлинному рості, імунізованих лектином *Bacillus subtilis* B-7025.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ У роботі дотримувались міжнародних рекомендацій щодо проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин згідно з Європейською конвенцією. У досліджах використовували мишей-самиць лінії Balb/c віком 2–2,5 місяці, середньо маси 21–25 г розводки віварію Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Тварин утримували в стандартних умовах віварію з вільним доступом до води та корму.

Бактеріальний лектин (БЛ) було виділено із культурально рідини штаму *B. subtilis*, задепонованого в колекції Інституту мікробіології та вірусології НАН України за № B-7025 [5]. Для дослідження утворення специфічних антитіл БЛ вводили підшкірно (п/ш) або внутрішньовенно (в/в) триразово з інтервалом 7 днів бустерним способом, використовуючи зростаючі дози: 0,02, 0,04 і 0,06 мг/тварину. Контрольним тваринам вводили фізіологічний розчин за аналогічною схемою. Титр антитіл у сироватці крові визначали з використанням методу ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) на 1 та 3 тижень після імунізації лектином. Сироватку отримували стандартним методом [4] з периферійно крові мишей.

Антиліоутворення на лектин у мишей-пухлиноносів вивчали на експериментальній моделі раку Ерліха. Мишам лінії Balb/c в м'яз стегна прищеплювали по $0,5 \times 10^6$ пухлинних клітин (ПК) раку Ерліха. Тваринам із прищепленою пухлиною вводили лектин в дозі 0,02 мг/тварину з інтервалом через добу шестикратно п/ш та в/в (відповідно першо та друго груп – терапевтична схема). Інтактним мишам третьої групи (профілактична схема) п/ш вводили БЛ у тій же дозі з інтервалом через добу чотирикратно, після чого на наступну добу прищеплювали ПК. Контрольним тваринам із пухлиною вводили п/ш фізіологічний розчин. Сироватки крові для дослідження відбирали на 14 добу після прищеплення пухлини.

Імуноферментний аналіз проводили у 96-ти лункових плоскодонних планшетах [4]. Антиген БЛ вносили в концентрації 20 мкг/мл у карбонат-бікарбонатному буфері (pH=9,4). У реакції використовували кон'югат антитіл кози проти мишачих імуноглобулінів (IgG), мічений пероксидазою хрому (Dakocytomation, Данія). Для проявлення реакції вносили розчин хромоген-субстрату у цитратному буфері (pH=5,4), що містив 0,5 мг/мл ортофенілєндіаміну (DiaProphMed, Україна) і 0,013 % перекису водню (Фаргомед, Україна). Реакцію реєстрували, вимірюючи оптичну густину розчину при довжині хвилі 545 нм на мікроплейтфотометри типу "Reader" (МП "Лаботек", Латвія).

Для визначення вірогідності показників відмінності між дослідом та контролем використовували t-критерій Стьюдента [9]. Достовірними вважали відмінності при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА Х ОБГОВОРЕННЯ В експериментах на інтактних мишах лінії Balb/c нами було застосовано підшкірний та внутрішньовенний способи імунізації лектином. За даними літератури [4], підшкірний спосіб імунізації для бактеріальних похідних є ефективнішим для стимулювання продукції специфічних антитіл. У наших дослідженнях показано, що імунізація бактеріальним лектином викликала утворення високих титрів специфічних до нього антитіл класу G при обох способах введення (рис. 1). Вже на сьому добу титр специфічних IgG у сироватці крові мишей при підшкірному введенні БЛ (рис. 1, А) становив 1:1024, тоді як при внутрішньовенному (рис. 1, Б) способі він складав удвічі вищі показники. Такий рівень антитіл зберігався і на 21 добу після першо імунізації у групі із п/ш введенням лектину, тоді як у групі з в/в його введенням титр антитіл зменшувався до показників тварин з п/ш імунізацією.

Для тварин із пухлинним процесом, яким вводили лектин за різними схемами, спостерігалась кардинально відмінна ситуація. Так, титри специфічних проти лектину антитіл залежали від моменту його введення. Якщо лектин вводили до прищеплення пухлинних клітин (третьа група), рівень антитіл у сироватці крові на 14 добу пухлинного росту не відрізнявся від контрольних значень, тоді як введення лектину після прищеплення пухлини призводило до активації антиліоутворення. Титр антитіл у мишей-пухлиноносів, як і у дослідів із інтактними мишами, також залежав від способу введення лектину. Так, при підшкірних ін'єкціях (перша група) він досягав значення 1:64, а при в/в (друга група) – вдвічі менших значень (рис. 2). Як видно, титри антитіл у мишей з пухлиною були значно меншими, порівняно з титрами інтактних тварин, що можна пояснити застосуванням бустерно імунізації у другому випадку, як найефективнішого методу для отримання високих титрів специфічних імуноглобулінів. З іншого боку, розвиток пухлинного процесу може пригнічувати синтез специфічних до лектину антитіл за рахунок різних супресорних механізмів. Незважаючи на це, введення лектину одразу після прищеплення пухлини стимулювало синтез антилектинових антитіл.

Хоча роль гуморально ланки імунно системи у протипухлинній резистентності досі обговорюється, очевидно, що при певних видах пухлин спостерігається

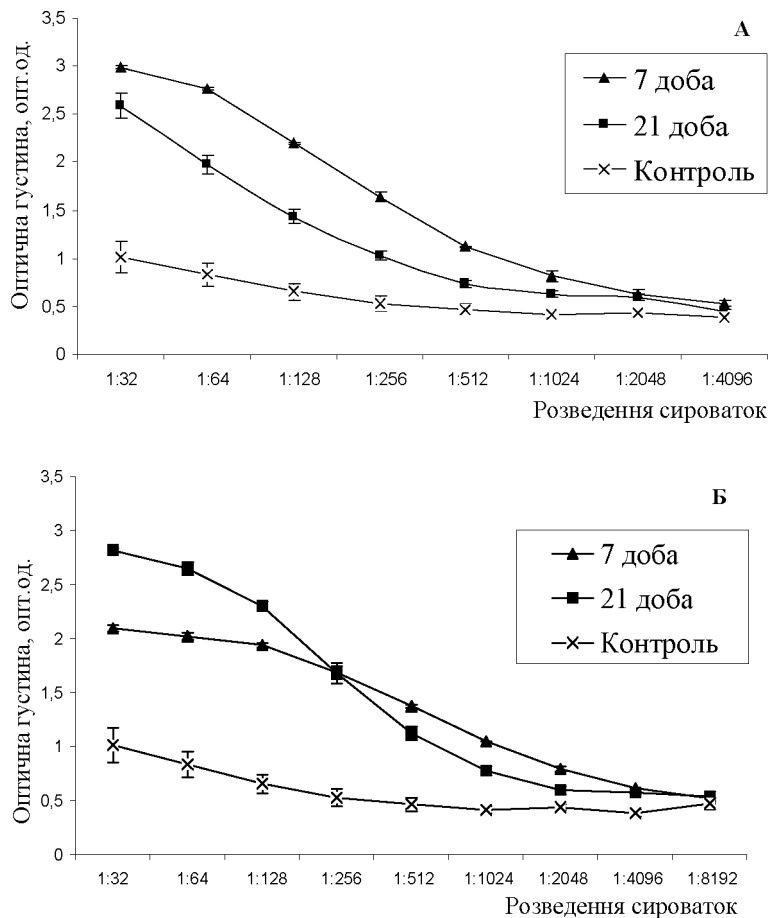


Рис. 1. Показники рівня антитіл до лектину *Bacillus subtilis* B-7025 в інтактних мишей у різні терміни з моменту першо імунізації та при різних способах його введення:
 А – підшкірне введення лектину; Б – внутрішньовенне введення лектину.

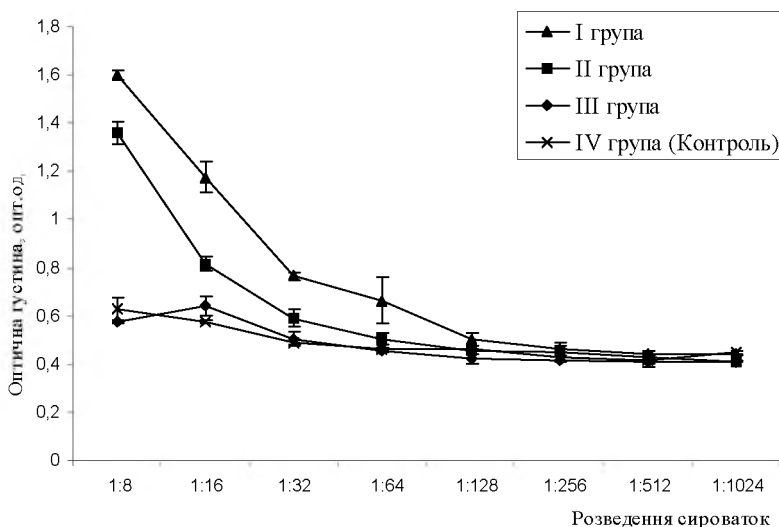


Рис. 2. Показники рівня антитіл до лектину *Bacillus subtilis* B-7025 при різних способах його введення у мишей із раком Ерліха на 14 добу з моменту прищеплення пухлини.
 Примітки: 1. Перша група – тварини, яким вводили БЛ п/ш 6-разово після прищеплення пухлини;
 2. Друга група – тварини, яким вводили БЛ в/в 6-разово після прищеплення пухлини;
 3. Третя група – тварини, яким вводили БЛ п/ш 4-разово до прищеплення пухлини;
 4. Четверта група – контрольні інтактні тварини.

гальмуючий вплив на антитілогенез, тому постає необхідність його активації [13, 16]. За даними літератури, лектини володіють здатністю активувати гуморальну специфічну ланку імунної системи [14, 15]. Вони викликають утворення специфічних IgG та секреторних імуноглобулінів А на слизових оболонках. В якості ад'ювантів деякі із лектинів посилюють антитілогенез на введений одночасно із ними антиген [15]. Лектини омели є одними із найсильніших ад'ювантів для слизових серед лектинів рослинного походження, які здатні індукувати високі титри специфічних сироваткових IgG та специфічних IgA в слизових. Серед речовин бактеріального походження сильними активаторами антитілогенезу є токсини, які виступають чинниками патогенності мікроорганізмів. Щодо бактеріальних лектинів, то інформацію про їх здатність викликати синтез специфічних антитіл майже відсутня.

При застосуванні цитотоксичного лектину було виявлено, що за допомогою бустерно імунізації підшкірним та внутрішньовенним способом введення можна отримати високі титри специфічних до лектину IgG у крові. За умов застосування лектину на тлі пухлинного процесу в організмі рівень антитіл до лектину був дещо нижчим. Профілактичне введення лектину до прищеплення пухлинних клітин не викликало синтезу специфічних антитіл у титрах, що могли бути зареєстровані. Це може бути пов'язано із особливостями впливу пухлини на гуморальну ланку специфічного імунітету. Адже розвиток пухлинного процесу в організмі, як видно, призводить до порушення процесу антитілогенезу у відповідь на введення БЛ, що продемонстровано у випадку превентивного його застосування. Незважаючи на це, тривале введення лектину в терапевтичній схемі може відновлювати синтез імуноглобулінів у організмі із пухлиною, що свідчить про активацію гуморально ланки імунної системи. У попередніх дослідженнях нами було показано, що лектин із *Bacillus subtilis* В-7025 також здатний стимулювати клітини ефектори неспецифічного імунітету у мишей із пухлиною. Даний лектин не проявляє токсично дії на організм. Враховуючи показаний нами імуномодулюючий та протипухлинний ефект лектину [2, 3], можна припустити, що стимулювання гуморально ланки специфічного імунітету на рівні з клітинною, є важливим механізмом імуномодулюючої дії лектинів *Bacillus subtilis* при пухлинному рості.

ВИСНОВОК Цитотоксичний лектин *Bacillus subtilis* В-7025 проявляє стимулюючий вплив на специфічну гуморальну імунну відповідь. Він здатний генерувати утворення специфічних антитіл IgG як в інтактних мишей, так і у мишей з прищепленою пухлиною, та утримувати їх титр у сироватці крові тварин на високому рівні протягом тривалого часу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Биологические свойства и эффективность противоопухолевых вакцин, приготовленных с использованием продуктов метаболизма *Bacillus subtilis* 7025, культивируемой на различных средах / О. М. Усач, О. А. Танасієнко, О. Ю. Юдина [та ін.] // Эксперим. онкология. – 2002. – Т. 24, № 1. – С. 76–79.
2. Вплив бактеріального лектину на реакцію лімфо дних органів в процесі пухлинного росту при різних схемах застосування / О. А. Танасієнко, М. П. Рудик, Г. П. Тітова [та ін.] // Доповіді НАН України. – 2010. – № 11.
3. Вплив цитотоксичного лектину *Bacillus subtilis* В-7025 на імунологічну реактивність мишей у процесі пухлинного росту / М. П. Рудик, О. А. Танасієнко, Г. П. Тітова [та ін.] // Клінічна та експериментальна патологія. – 2010. – № 2. – С. 149–152.
4. Егоров А. М. Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров. – М. : Высш. школа, 1991. – 288 с.
5. Патент України № 59483 : МПК А61Р 35/00. Цитотоксичний лектин з протипухлинною активністю / Потебня Г. П., Танасієнко О. А., Лісовенко Г. С. та ін. власник патенту Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. – № 2001075155; заявл. 19.07.2001; опубл. 15.09.2003, Бюл. № 9.
6. Патент України 88842 : МПК А61К 35/12. Спосіб одержання протипухлинної аутовакцини / Потебня Г. П., Лісовенко Г. С., Черемшенко Н. Л., Танасієнко О. А., Чехун В. Ф. ; власник патенту Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. – № а200807969; заявл. 15.06.2001; опубл. 15.07.2003, Бюл. № 7.
7. Петров Р. В. Иммунология / Р. В. Петров. – М. : Медицина, 1987. – 415 с.
8. Потебня Г. П. Використання цитотоксичних лектинів бактеріального походження в імунотерапії експериментальних пухлин / Г. П. Потебня, О. А. Танасієнко, Г. С. Лісовенко, З. Д. Савцова // Структура і біологічна активність бактеріальних біополімерів; за ред. В. К. Позура. – К. : Ки вський університет, 2003. – С. 235–304.
9. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных / О. Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2002. – 312 с.
10. Evans C. Review article: immune suppression and colorectal cancer / C. Evans, A. G. Dalgleish, D. Kumar // Aliment. Pharmacol. Ther. – 2006. – № 8. – P. 1163–1177.
11. Immune parameters in multiple myeloma patients: influence of treatment and correlation with opportunistic infections / P. Schutt, D. Brandhorst, W. Stellberg [et al.] // Leuk. Lymphoma. – 2006. – № 8. – P. 1570–1582.
12. In vivo-induction of antibodies to mistletoe lectin-1 and viscotoxin by exposure to aqueous mistletoe extracts: a randomised double-blinded placebo controlled phase I study in healthy individuals / R. Klein, K. Classen, P.A. Berg [et al.] // Eur. J. Med. Res. – 2002. – Vol. 7, № 4. – P. 155–163.
13. Kormosh N. Effect of a combination of extract from several plants on cell-mediated and humoral immunity of patients with advanced ovarian cancer / N. Kormosh, K. Laktionov, M. Antoshechkina // Phytother. Res. – 2006. – № 5. – P. 424–425.
14. Mistletoe lectins enhance immune responses to intranasally co-administered herpes simplex virus glycoprotein D2 / E. C. Lavelle, G. Grant, A. Pusztaï [et al.] // Immunology. – 2002. – Vol. 107, № 2. – P. 268–274.
15. Mucosal immunogenicity of plant lectins in mice / E. C. Lavelle, G. Grant, A. Pusztaï [et al.] // Immunology. – 2000. – Vol. 99, № 1. – P. 30–37.
16. Pandey J.P. Immunoglobulin Allotypes Influence Antibody Responses to Mucin 1 in Patients with Gastric Cancer / J. P. Pandey, P. J. Nietert, S. von Mensdorff-Pouilly // Cancer Res. – 2008. – № 11. – P. 4442–4446.
17. Potebnya G. Antitumor efficacy of autovaccines prepared from chemoresistant tumor cells with the use of lectin of *B. subtilis* В-7025 / G. Potebnya, N. Cheremshenko, G. Lisovenko // Exp. Oncol. – 2007. – Vol. 29, № 4. – P. 277–280.
18. Two cases of bacterial meningitis accompanied by thalidomide therapy in patients with multiple myeloma: is thalidomide associated with bacterial meningitis? / S. Pasa, A. Altintas, T. Cil [et al.] // Int. J. Infect. Dis. – 2009. – № 1. – P. 19–22.

Отримано 06.09.11