

УДК: 616-006.04:615.372

О.А. Танасієнко¹, М.П. Рудик², Г.П. Тітова¹, Г.П. Потебня¹

¹Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України, вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна, тел.: +38 (044) 257 90 54, e-mail: iris@onconet.kiev.ua

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна, тел.: +38 (044) 521 32 31, e-mail: rosiente@gmail.com

ІНДУКЦІЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ У МИШЕЙ ЦИТОТОКСИЧНИМ ЛЕКТИНОМ БАКТЕРІАЛЬНОГО ПОХОДЖЕННЯ

*На моделях експериментальних пухлин – саркоми 37, раку Ерліха та метастазуючої карциноми легені Льюїс – вперше виявлено превентивний протипухлинний ефект цитотоксичного лектину, виділеного із культуральної рідини *Bacillus subtilis* В-7025. Введення лектину інтактним мишам викликає у них протипухлинну резистентність до прищеплених пухлинних клітин, в результаті чого гальмується ріст пухлин та збільшується тривалість життя тварин. Передопераційне введення лектину мишам з прищепленою карциномою легені Льюїс викликає у прооперованих мишей значний антиметастатичний ефект. Одержані результати свідчать про опосередкований активуючий ефект цитотоксичного лектину на систему протипухлинного імунітету мишей.*

Ключові слова: цитотоксичний лектин, експериментальні пухлини, превентивний ефект.

Провідна роль у специфічних процесах розпізнавання молекул і клітин належить вуглеводзв'язуючим білкам — лектинам, які є складовими будь-якої біологічної системи і мають широкий спектр біологічної активності. Ключові механізми біорозпізнавання на різних рівнях організації живих організмів здійснюються завдяки здатності лектинів специфічно і зворотно взаємодіяти з глікокон'югатами, не призводячи до порушення структури останніх. Участь лектинів в процесах регуляції різноманітних міжклітинних взаємодій, які обумовлюють пізнавання біополімерних сполук, вже доведена [9], але молекулярні механізми, які лежать в їх основі, до цього часу невідомі.

Механізм дії лектинів на пухлинні клітини також до кінця не вивчений. Відомо, що біологічні реакції, які проходять за участю лектинів, розділяють на два типи. Перший являє собою взаємодію лектинів з відповідними вуглеводними рецепторами на мембранах пухлинних клітин,

© О.А. Танасієнко, М.П. Рудик, Г.П. Тітова, Г.П. Потебня, 2010



що призводить до реакції аглютинації. За процесом розпізнавання відбувається низка складних метаболічних перетворень в клітині і відповідь організму на дію лектину. Якщо реакції первинного типу доволі добре вивчені для різних типів клітин і лектинів, то дослідження реакцій другого типу тільки починають проводитися. Сигнальна дія бактеріальних лектинів, яка сприяє підвищенню імунореактивності організму, може суттєво впливати на хід пухлинного процесу: не тільки стабілізувати пухлинний процес після хірургічного видалення пухлини, але й протидіяти виникненню і поширенню метастатичного процесу.

Цитотоксичний лектин, виділений із культуральної рідини штаму сапрофітного мікроорганізму *Bacillus subtilis* В-7025 [11], відомий своїми унікальними властивостями не тільки позбавляти пухлинні клітини різного гістогенезу життєздатності, але й модифікувати їх таким чином, що останні набувають властивостей протипухлинних вакцин [2]. Введення їх в організм тварин викликає специфічну протипухлинну відповідь, результатом чого є збільшення середньої тривалості життя останніх. Протипухлинні вакцини можуть застосовуватися в клініці для попередження рецидивів та метастазів у прооперованих онкологічних хворих [4]. В той же час протипухлинний потенціал одержаного лектину, як самостійного препарату, повною мірою ще не вивчений. Тому метою даної роботи було дослідження превентивної протипухлинної дії цитотоксичного лектину, виділеного із продуктів синтезу бактеріальної культури *B. subtilis* В-7025, як основної складової протипухлинної вакцини.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень був цитотоксичний лектин (ЦЛ), виділений із культуральної рідини бактеріального штаму *B. subtilis* № В-7025, задепонованого в колекції Інституту мікробіології та вірусології НАН України [10]. Препарат лектину одержували за розробленим нами методом [11].

Дослідження проводили на мишах самках ліній Balb/c та С57В1 2—2,5-місячного віку масою 20—24 г на моделях саркоми 37, раку Ерліха та метастазуючої карциноми легені Льюїс. Досліди проводили за такою схемою: дослідним інтактним мишам підшкірно 4 рази через день вводили лектин у дозах від 1,0 до 10,0 мг/кг маси. Через добу після останнього введення лектину дослідним і контрольним тваринам у м'яз стегна прищеплювали по $0,5 \cdot 10^6$ пухлинних клітин (ПК) саркоми 37 або раку Ерліха. Результати досліду оцінювали, беручи до уваги динаміку росту пухлин, відсоток гальмування росту пухлин (ГРП) та середню тривалість життя (СТЖ). Для порівняльної оцінки впливу досліджуваного лектину на СТЖ використовували індекс модуляції (ІМ) цього показника [1].

В дослідах на метастазуючій карциномі легені Льюїс суспензію клітин в дозі $3,5 \cdot 10^5$ клітин перещеплювали в подушечку стопи миші. За 3 доби до операційного видалення пухлини дослідним мишам підшкірно один раз на добу вводили цитотоксичний лектин у дозі 0,05 мг на мишу, а



контрольним тваринам — фізіологічний розчин. Через добу після останнього введення лектину кінцівку з пухлиною видаляли у місці колінного суглоба під гексеналовим наркозом в стерильних умовах. Мишей забивали при розвинутому метастатичному процесі і оцінювали антиметастатичну ефективність лектину за відсотком мишей, у яких метастази в легенях не були виявлені, за кількістю та об'ємом метастазів на одну мишу та індексом гальмування метастазування (ІГМ) [3]. Результати дослідів оброблені статистично з використанням t критерію Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення

Дослідження динаміки росту солідної саркоми 37 у дослідних мишей, яким вводили ЦЛ до прищеплення пухлини, показало, що впродовж усього часу спостереження ріст пухлин у мишей дослідних груп гальмувався на 60–70% по відношенню до контролю (рис. 1).

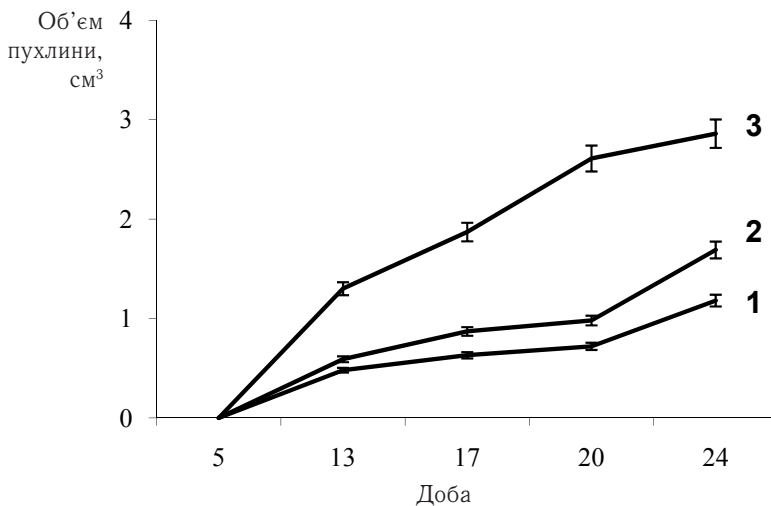


Рис. 1. Динаміка росту солідної саркоми 37 у мишей лінії Balb/c, яким до прищеплення пухлинних клітин вводили цитотоксичний лектин 1, 2 — відповідно 0,05 та 0,1 мг лектину; 3 — контроль.

Fig. 1. Growth dynamics of the solid form of sarcoma-37 in Balb/c mice treated with cytotoxic lectin before tumour transplantation

1 — lectin at the dose of 0.05 mg, 2 — lectin at the dose of 0.1 mg, 3 — untreated control.

СТЖ мишей цих груп значно перевищувала таку контрольних тварин і залежала від дози ЦЛ, яку одержували тварини (табл. 1). При введенні лектину в дозах 0,05 та 0,1 мг на мишу СТЖ в обох дослідних групах була майже однаковою і достовірно вищою ніж у контрольних мишей. При підвищенні дози ЦЛ до 0,2 мг на мишу спостерігали тенденцію до погіршення результату, що виявлялося у зниженні вірогідності відмінностей між дослідом і контролем майже вдвічі. Так, індекс модуляції

СТЖ, який при введенні 0,05 мг лектину складав 54,9% проти 24,1% при введенні 0,2 мг препарату.

Таблиця 1

Вплив лектину на тривалість життя мишей лінії Balb/c з прищепленою саркомою 37

Table 1

Influence of lectin on average survival time of Balb/c mice with transplanted sarcoma-37

Варіант	К-сть мишей	Доза і шлях введення лектину, мг/мишу	Середня тривалість життя мишей, дні	ІМ, %
ЦЛ+ПК	7	0,20, підшкірно	73,0 ± 5,7*	24,1
Контроль	7	-	58,8 ± 1,7	-
ЦЛ+ПК	10	0,10, внутрішньо-черевинно	64,2 ± 4,2**	51,4
	10	0,05, підшкірно	65,7 ± 3,1***	54,9
Контроль	10	-	42,4 ± 3,9	-

Примітка: тут і в табл. 2 і 3 дані достовірні відносно контролю, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

На експериментальній моделі раку Ерліха досліджені і відпрацьовані кількісні оптимальні умови кратності попередніх ін'єкцій лектину, при яких у мишей досягається максимальний превентивний протипухлинний ефект.

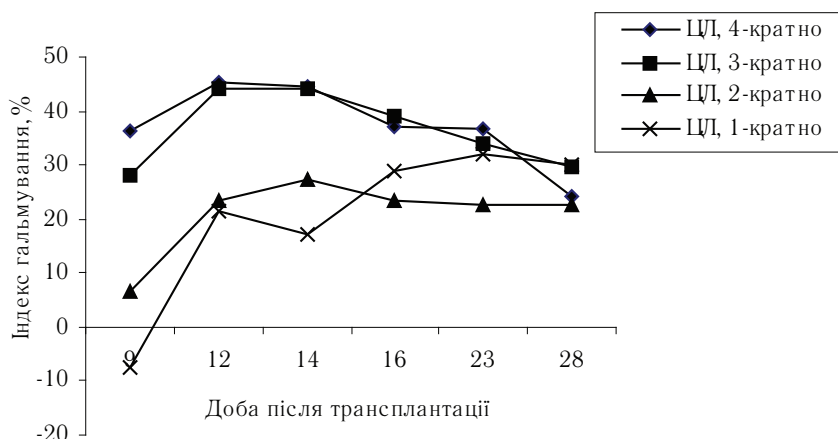


Рис. 2. Гальмування росту солідного раку Ерліха у мишей лінії Balb/c лектином в залежності від кратності ін'єкцій

Fig. 2. Growth inhibition of Ehrlich solid tumour in Balb/c mice depending on multiplicity of preventive cytotoxic lectin injections



Одержані результати (рис. 2) свідчать про чітку залежність гальмування росту аденокарциноми у мишей від кількості ін'єкцій цитотоксичного лектину, особливо на ранніх етапах пухлинного росту (9–16 доба). На етапі розвинутого пухлинного процесу об'єми пухлин у всіх дослідних групах виходили на плато і були майже ідентичними між собою, але на третину відставали від об'єму контрольних мишей: ГРП на 28 добу складало 22–30%.

ГРП у мишей дослідних груп корелює з тривалістю життя останніх (табл. 2). Так, при профілактичному 3- та 4-кратному підшкірному введенні мишам 0,02 мг лектину (1,0 мг/кг маси) ГРП було практично однаковим протягом росту пухлини і складало 36–45%, а СТЖ цих мишей була вірогідно вищою за контрольні показники. В той же час при 1- та 2-кратному профілактичному введенні тих самих доз лектину ГРП було у два рази нижчим за попередні значення, а показники СТЖ, хоч і перевищували контрольні, але були статистично невірогідними. Найбільш ефективним можна вважати 3–4-кратне профілактичне застосування цитотоксичного лектину, при якому спостерігається максимальне гальмування росту пухлини та подовження тривалості життя мишей.

Таблиця 2

Превентивний протипухлинний ефект лектину у мишей лінії Balb/c з прищепленим раком Ерліха

Table 2

The preventive antitumour effect of lectin in Balb/c mice with transplanted *Ehrlich* tumour

Варіант	К-сть мишей	К-сть введень лектину	ГРП, %	Середня тривалість життя мишей, дні
ЦЛ+ПК	7	4-кратно	40,0	54,3 ± 1,7*
ЦЛ+ПК	8	3-кратно	39,8	49,1 ± 1,7*
ЦЛ+ПК	9	2-кратно	20,7	50,1 ± 2,4
ЦЛ+ПК	7	1-кратно	8,4	47,4 ± 2,9
Контроль	10	0	-	43,0 ± 2,6

Для оцінки превентивної дії лектину також була використана експериментальна модель карциноми легені Льюїс, яка найбільш адекватно відображає особливості природного процесу метастазування і вважається найбільш наближеною до клінічної практики [7]. Результати, одержані на моделі метастазуючої карциноми легені Льюїс мишей свідчать про суттєвий вплив лектину на формування та розвиток метастазів в легенях після хірургічного видалення пухлини (табл. 3).

Таблиця 3
Вплив лектину на середню тривалість життя мишей лінії C57Bl з метастазуючою карциномою легені Льюїс

Table 3
Influence of lectin on average survival time of C57Bl mice with metastatic Lewis lung carcinoma

Варіант	К-сть мишей	К-сть мишей без метастазів, %	К-сть метастазів на мишу	Об'єм метастазів на мишу, мм ³
ЦЛ+ПК	7	42,8	3,4±2,2*	101,6±42,2*
Контроль	6	16,6	10,2±2,8	267,6±61,3

Як видно з таблиці 3, введення лектину перед операцією викликає у мишей виражений антиметастатичний ефект: у 42,8% мишей метастазів в легенях не виявлено, а у решти — кількість метастазів у 3 рази, а їх об'єм у 2,6 рази були менші порівняно з контролем. Індекс гальмування метастазування в дослідній групі порівняно з контролем становив 62%.

Таким чином, на експериментальних моделях пухлинного росту виявлено превентивний протипухлинний та антиметастатичний ефект цитотоксичного лектину із *B. subtilis* В-7025. Подовження тривалості життя мишей із прищепленими саркомою 37 або раком Ерліха та гальмування метастазування у оперованих мишей із карциномою легені Льюїс свідчать, скоріш за все, про значний вплив цитотоксичного лектину на систему протипухлинного імунітету мишей. Одержані нами результати та літературні дані з профілактичного застосування рослинного лектину із *Aloe vera* для превентивного протипухлинного ефекту у мишей з асцитним раком Ерліха [5], а також клінічні випробування протипухлинної та антиметастатичної дії лектинів омели [8], можливість блокування адгезії пухлинних клітин за допомогою лектинів [6] свідчать про перспективність цих досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Потебня Г.П., Лісовенко Г.С., Мосієнко В.С., Лісовенко В.Г. Ефективність комплексного застосування протипухлинної вакцини та імуномодуючого препарату бластолен // Укр. хіміотерап. журн. — 2002. — 14, № 2. — С. 60–64.
2. Структура і біологічна активність бактеріальних біополімерів / За ред. В.К. Позура. — К.: Київський університет, 2003. — 305 с.
3. Чердынцева Н.В., Кокорев О.В., Коновалова Н.П., Кагія В.Т. Усиление цитотоксической и цитостатической активности спленоцитов и макрофагов радиосенсибилизатором АК-2123 у мышей с карциномой Льюис при терапии циклофосфаном // Эксперим. Онкол. — 1997. — 19, № 4. — С. 333–337.
4. Чорний В.О., Потебня Г.П., Кірсенко О.В., Лісовенко Г.С., Розумій Д.О., Осинський Д.С., Танасієнко О.А. Імунологічні зміни у хворих на рак шлунка



після введення протипухлинної аутологічної вакцини // Онкологія. — 2003. — 5, № 2. — С. 171—172.

5. Akev N., Turkay G., Can A., Gurel A., Yildiz F., Yardibi H., Ekiz E.E., Uzun H. Tumour preventive effect of Aloe vera leaf pulp lectin (Aloctin I) on Ehrlich ascites tumours in mice // *Phytother. Res.* — 2007. — 21, № 11. — P. 1070—1075.

6. Beuth J., Ko H.L., Pulverer G., Uhlenbruck G., Pichlmaier H. Importance of lectins for the prevention of bacterial infections and cancer metastases // *Glycoconj. J.* — 1995. — 12, № 1. — P. 1—6.

7. Gorelik E., Segal S., Shapiro J., Katzav S., Ron Y., Feldman M. Interactions between the local tumor and its metastases // *Cancer. Metastasis. Rev.* — 1982. — 1, № 1. — P. 83—94.

8. Ma Y.H., Cheng W.Z., Gong F., Ma A.L., Yu Q.W., Zhang J.Y., Hu C.Y., Chen X.H., Zhang D.Q. Active Chinese mistletoe lectin-55 enhances colon cancer surveillance through regulating innate and adaptive immune responses // *World J. Gastroenterol.* — 2008. — 34, № 14. — P. 5274—5281.

9. Sharon N., Lis H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2001. — 491. — P. 1—16.

10. Пат. № 56348, Україна, МПК 7 C12N 1/20. Штам бактерій *Bacillus subtilis* — продуцент протипухлинних цитотоксичних речовин / Г.П. Потебня, Г.С. Лісовенко, Н.Л. Черемшенко, О.А. Танасієнко, В.Ф. Чехун. — № 2001042565; Заявл. 17.04.2001; Опубл. 15.05.2003. Бюл. № 5.

11. Пат. № 59483, Україна, МПК 7 C07K 14/32. Цитотоксичний лектин з протипухлинною активністю / Г.П. Потебня, О.А. Танасієнко, Г.С. Лісовенко, Н.Л. Черемшенко, В.Ф. Чехун. — № 2001075155; Заявл. 19.07.2001; Опубл. 15.09.2003. Бюл. № 9.



О.А. Танасієнко¹, М.П. Рудик², Г.П. Тітова¹, Г.П. Потебня¹

¹Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии имени Р.Е. Кавецкого НАН Украины, ул. Васильковская, 45, Киев, 03022, Украина, тел.: +38 (044) 257 90 54, e-mail: iris@onconet.kiev.ua

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 64, Киев, 01033, Украина, тел.: +38 (044) 521 32 31, e-mail: rosiente@gmail.com

ИНДУКЦИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ У МЫШЕЙ ЦИТОТОКСИЧЕСКИМ ЛЕКТИНОМ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Реферат

На моделях экспериментальных опухолей — саркомы 37, рака Эрлиха и метастазирующей карциномы легкого Льюис — впервые выявлено превентивный противоопухолевый эффект цитотоксического лектина, выделенного из культуральной жидкости *Bacillus subtilis* B-7025. Введение лектина интактным мышам вызывает у них противоопухолевую резистентность к привитым опухолевым клеткам, в результате чего тормозится рост опухолей и увеличивается продолжительность жизни животных. Предоперационное введение лектина мышам с привитой карциномой легкого Льюис вызывает у прооперированных мышей значительный антиметастатический эффект. Полученные результаты свидетельствуют об опосредованном активирующем эффекте цитотоксического лектина на систему противоопухолевого иммунитета животных.

К л ю ч е в ы е с л о в а : цитотоксический лектин, экспериментальные опухоли, превентивный эффект.

О.А. Tanasienko¹, M.P. Rudyk², G.P. Titova¹, G.P. Potebnya¹

¹R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NASU, 45, Vasylykivska str., Kyiv, 03022, Ukraine, tel.: +38 (044) 257 90 54, e-mail: iris@onconet.kiev.ua

²T.G. Shevchenko Kyiv National University, 64, Volodymirska str., Kyiv, 01033, Ukraine, tel.: +38 (044) 521 32 31, e-mail: rosiente@gmail.com

INDUCTION OF ANTICANCER RESISTANCE IN MICE TREATED WITH LECTIN OF BACTERIAL ORIGIN

Summary

The preventive antitumor effect of cytotoxic lectin isolated from culture medium *Bacillus subtilis* B-7025 on the models of experimental tumours sarcoma-37, *Ehrlich* carcinoma and metastatic Lewis lung carcinoma was firstly shown. The injection of lectin to intact mice leads to stimulation of anticancer resistance to transplanted tumour cells, tumour growth inhibition and increasing of animal survival. Presurgical injection of lectin to Lewis lung carcinoma bearing mice was found to result in the substantial antimetastatic effect in surgical treated mice. Our results prove that cytotoxic lectin has mediate activating influence on antitumour immunity of animals.

К e y w o r d s : cytotoxic lectin, experimental tumours, preventive effect.

