

# Вплив традиційної та модифікованої низькими температурами глікопептидних вакцин на пухлинний процес в експерименті

О.П. КУЗЬМЕНКО, О.В. МАЗУР

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, м. Київ

На сьогоднішній день в онкології велика увага приділяється пошуку можливостей створення протипухлинних вакцин, які, поряд з застосуванням традиційних протипухлинних методів, могли б покращити результати лікування онкологічних хворих.

Одним із перспективних методів лікування злоякісних пухлин є їх кріодеструкція, яка може супроводжуватись зміною протипухлинної резистентності організму. В літературі є велика кількість публікацій, присвячених дослідженням впливу кріодеструкції первинної пухлини на процеси метастазування. Одні автори вказували, що кріодеструкція первинної пухлини може призводити до гальмування розвитку метастатичних уражень [1-3]. Інші приводили результати досліджень, де після кріодеструкції первинної пухлини процес метастазування збільшувався [4-6]. Але і перші і другі відмічали суттєвий вплив кріодеструкції на імунні процеси, які виникали при резорбції продуктів кріонекрозу пухлинної тканини.

Раніше нами було вивчено вплив кріонекрозу первинної пухлини на розвиток віддалених та регіонарних метастазів у мишей  $C_{57}BL$  з карциномою легень Льюїс і у щурів з карциномою Герена. Кріодеструкцію пухлини здійснювали до температур 10-15°C на межі між пухлинною та здоровою тканиною. Вплив здійснювали на 10-12 добу після перещеплення. У мишей, яким ампутували кінцівку з замороженою карциномою Льюїс, ступінь метастазування в легені був значно більшим, ніж у тварин без вилучення замороженої пухлини. Кріодеструкція нормальних тканин суттєво не впливала на метастазування. Це свідчить, що антиметастатичний ефект кріохірургії реалізується при наявності кріонекрозу пухлинної тканини та носить специфічний характер. Хірургічне видалення замороженої карциноми Герена у пацюків супроводжувалось меншою частотою метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів, чим у тварин без вилучення замороженої пухлини. Таким чином, кріонекроз пухлинної тканини може призводити до гальмування віддаленого метастазування, але в той же час збільшувати метастазування в регіонарні лімфатичні вузли за

рахунок пригнічення їх функціональної активності великою кількістю продуктів кріонекрозу.

Одержані дані послужили обґрунтуванням для виготовлення та дослідження протипухлинної дії вакцин із пухлинної тканини після її кріодеструкції.

Мета досліджень – провести порівняльний аналіз протипухлинної дії глікопептидної вакцини та вакцини, одержаної із замороженої пухлини (“кріовакцини”).

## Матеріали та методи

Дослідження проведені на 50 щурах та 70 мишах лінії  $C_{57}BL$  з перещепною пухлиною карциносаркоми Уокер та карциноми легень Льюїс. Перещеплення виконували введенням 1млн. клітин карциносаркоми Уокер у 0,3 мл ізотонічного фізіологічного розчину та 500 тис. клітин карциноми легень Льюїс у 0,1 мл ізотонічного фізіологічного розчину під шкіру гомілки.

Вакцину виготовляли за методом, розробленим у відділі ензимології пухлин ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького, за рахунок ферментативного гідролізу з наступним хроматографічним фракціонуванням [7-8]. Вакцину вводили тваринам під шкіру спини в об'ємі 0,2 мл через добу, на четверту та сьому добу після перещеплення пухлин. Вакцини були розділені на декілька груп. Одну групу складала вакцини, виготовлені з інтактною пухлини, а другу групу – вакцини, виготовлені з пухлин, які були заморожені *in vivo* до температур -10...-15°C за допомогою кріоаплікатора.

Проведено декілька серій експериментів. В першій серії мишам з карциномою легень Льюїс вводили вакцину і “кріовакцину” в концентрації 10 та 100 тисяч еквівалент/клітин. В другій серії щурам з карциносаркомою Уокер вводили вакцину і “кріовакцину” в концентрації 10 та 50 тисяч еквівалент/клітин. Контролем служили тварини, які одержували такий же об'єм фізіологічного розчину. Мишей та щурів забивали методом декапітації на 28 та 16 добу відповідно після перещеплення пухлин. Вимірювали масу первинної пухлини, масу регіонарних лімфатичних вузлів (у щурів), кількість та об'єм метастазів у легенях.

## Результати та обговорення

Встановлено, що вакцинація мишей з карциномою легень Льюїс, як із використанням звичайної глікопептидної вакцини, так і “кріовакцини” не

Адреса для кореспонденції: Кузьменко О.П., Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, вул. Васильківська, 45, м. Київ, Україна 03022

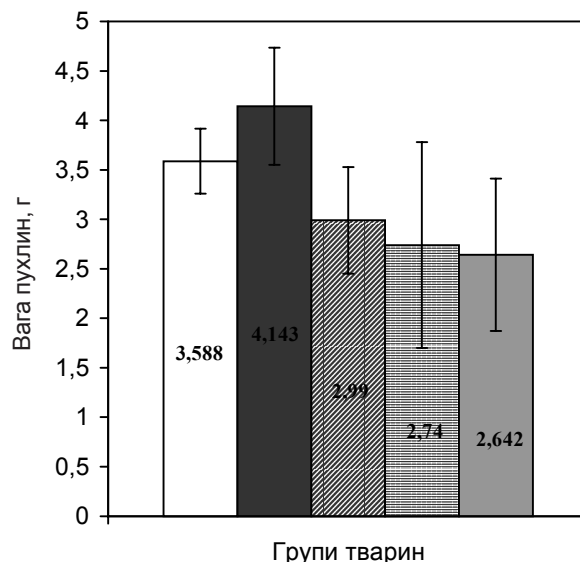
приводило до гальмування росту первинної пухлини. Навпаки, відмічалась тенденція до стимуляції росту пухлини, незалежно від типу вакцини та її дози (рис. 1, 2). Найбільший процент стимуляції росту первинної пухлини спостерігався у мишей, яким вводили “кріовакцину” в дозі 100 тисяч еквівалент/клітин, а найменший процент – у тварин з використанням глікопептидної вакцини в дозі 100 тисяч еквівалент/клітин.

При аналізі результатів метастатичного ураження у мишей з карциною легень Льюїс встановлено, що найбільші показники цього процесу відмічались у дослідних групах. На рис. 3 і 4 представлені дані по кількості та об’єму метастазів у тварин дослідних та контрольних груп. З діаграм видно, що використання “кріовакцин”, як і звичайних глікопептидних вакцин супроводжується дещо більшими показниками метастазування порівняно з контролем. Так, найбільші показники метастатичного процесу спостерігались в групі тварин з використанням “кріовакцини” в дозі 10 тисяч еквівалент/клітин. Звертає увагу і те, що середня кількість метастазів у мишей всіх груп (за винятком групи, де використовували “кріовакцину” в дозі 10 тисяч еквівалент/клітин) була практично однаковою, в той час, як об’єм метастазів поступово зменшувався від 48,6 мм<sup>3</sup> при кріо 10 тисяч еквівалент/клітин до 16,9 мм<sup>3</sup> в контролі.

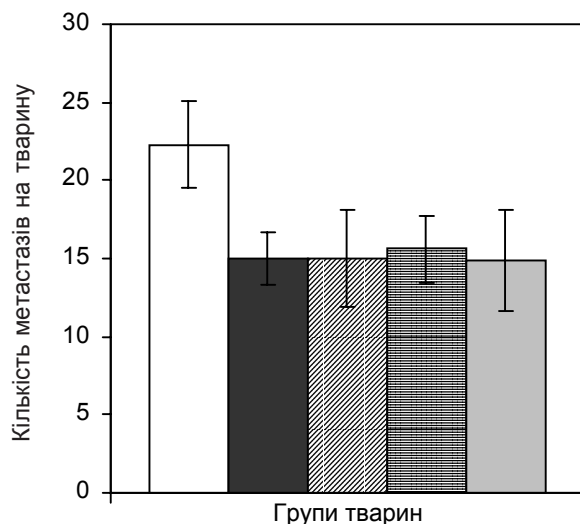
В другій серії експериментів проводили дослідження по впливу “кріовакцин” і звичайних глікопептидних вакцин на розвиток карциносаркоми Уокер у щурів. Застосування “кріовакцини” та глікопептидної вакцини в дозі 50 тисяч еквівалент/клітин призводило до гальмування росту первинної пухлини більш, ніж на 20%. Використання кріо- та глікопептидної вакцини в дозі 10 тисяч еквівалент/клітин супроводжувалось стимулюванням пухлинного процесу відповідно на 9 та 30%.

Відомо, що карциносаркома Уокер може метастазувати в регіонарні лімфатичні вузли [9, 10]. В зв’язку з цим було цікаво дослідити вплив вакцинації на масу регіонарних лімфатичних вузлів щурів. Маса регіонарних лімфатичних вузлів збільшувалась в усіх дослідних групах порівняно з контролем.

Найбільша маса регіонарних лімфатичних вузлів відмічалась при використанні “кріовакцин” незалежно від їх дози. Використання звичайних глікопептидних вакцин також призводило до збільшення маси регіонарних лімфатичних вузлів порівняно з контролем. Важливим, на нашу думку, є і той факт, що “кріовакцина” в дозі 50 тисяч еквівалент/клітин гальмує розвиток первинної пухлини, але значно збільшує масу регіонарних лімфатичних вузлів. Таке збільшення маси регіонарних лімфатичних вузлів, на наш погляд, не



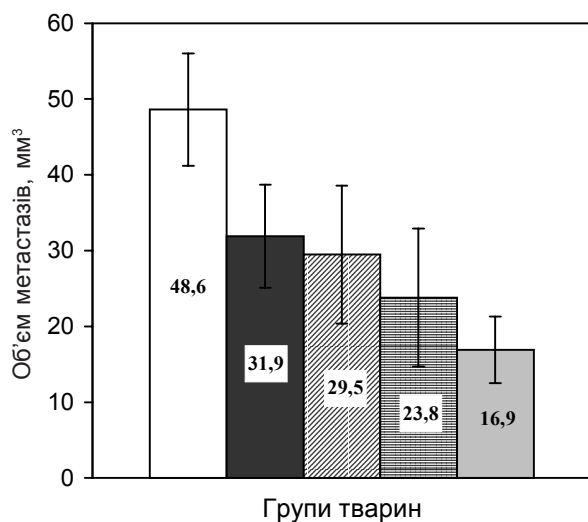
**Рис. 1.** Вивчення ефективності вакцинотерапії на моделі карциноми легень Льюїс: □ – кріо-10; ■ – кріо-100; ▨ – ГП-10; ▩ – ГП-100; ▭ – контроль. Примітки: ГП – традиційна глікопептидна вакцина; кріо – модифікована (низькими температурами) глікопептидна вакцина; контроль – введення фізіологічного розчину, цифри показують кількість тисяч еквівалент/клітин.



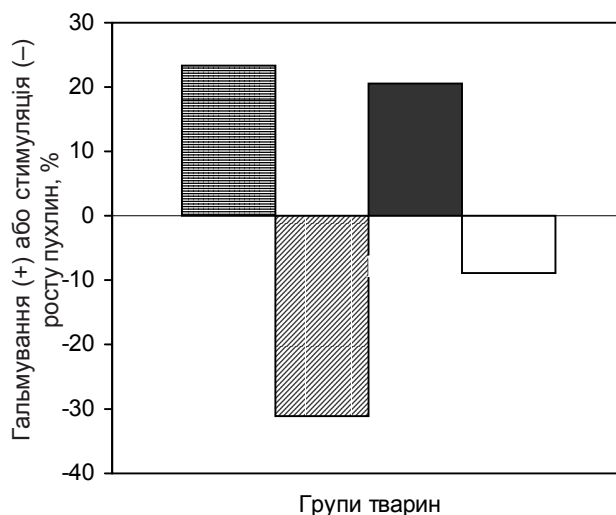
**Рис. 2.** Вплив вакцинотерапії на кількість метастазів карциноми легень Льюїс: □ – кріо-10; ■ – кріо-100; ▨ – ГП-10; ▩ – ГП-100; ▭ – контроль. Примітки: див. рис. 1.

може бути за рахунок реактивного лімфаденіту на введення пухлинних клітин під час перещеплення, а, імовірно, виникає в зв’язку з проліферацією клітин карциносаркоми Уокер.

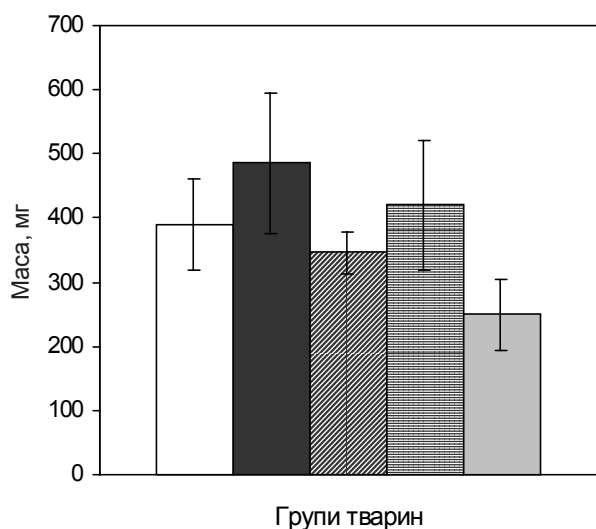
Таким чином, в наших дослідженнях було показано, що звичайна глікопептидна вакцина і “кріовакцина” в досліджуваних дозах та схемах вакцинації могла призводити до стимулювання пухлинного процесу у мишей з карциною легень Льюїс та щурів з карциносаркомою Уокер. Важливим, на наш погляд, – є те, що вакцинація по різному впливала на пухлини різного гістогенезу:



**Рис. 3.** Вплив вакцинотерапії на об'єм метастазів карциноми легень Льюїс: □ – крио-10; ■ – крио-100; ▨ – ГП-10; ▩ – ГП-100; ■ – контроль. Примітки: див. рис. 1.



**Рис. 4.** Ефективність вакцинотерапії у щурів з карциносаркомою Уокер: □ – крио-10; ■ – крио-50; ▨ – ГП-10; ▩ – ГП-50. Примітки: див. рис. 1.



**Рис. 5.** Маса регіонарних лімфатичних вузлів у тварин після використання різних вакцин: □ – крио-10; ■ – крио-100; ▨ – ГП-10; ▩ – ГП-100; ■ – контроль. Примітки: див. рис. 1.

стимулювала розвиток первинної карциноми Льюїс і віддалене метастазування, а при дозах 50 тисяч еквівалент/клітин гальмувала розвиток карциносаркоми Уокер, хоча і збільшувала масу регіонарних лімфатичних вузлів (метастазів).

Слід відмітити, що дозозалежний протипухлинний ефект при використанні глікопептидної вакцини якісно відрізнявся від дії “кріовакцини”. Так, при збільшенні дози глікопептидної вакцини з 10 тисяч до 100 тисяч еквівалент/клітин у мишей з карциномою Льюїс спостерігалась тенденція до зменшення стимуляції пухлинного росту з 13,2 до 3,7% відповідно. При використанні “кріовакцини” в таких же дозах відмічалось збільшення стимуляції пухлинного росту з 40,5 до 56,8%. При цьому

об'єм та кількість метастазів карциноми Льюїс дещо зменшувались, а в групах з використанням глікопептидної вакцини практично не відрізнялись. В умовах карциносаркоми Уокер збільшення дози глікопептидної вакцини з 10 до 50 тисяч еквівалент/клітин супроводжувалось зміною стимуляції пухлинного росту з 31,3% до гальмування на 23,3%. При використанні “кріовакцини” спостерігалась якісно така сама картина: доза вакцини в 10 тисяч еквівалент/клітин стимулювала ріст первинної пухлини на 8,7%, а 50 тисяч еквівалент/клітин гальмувала цей процес на 24,1%.

Отримані нами результати протипухлинної дії глікопептидних та модифікованих низькими температурами вакцин вказують на необхідність пошуку шляхів оптимізації доз та термінів вакцинації.

## Література

1. Joosten J.J., Muijen G.N., Wobbes T., Ruers T.J. In vivo destruction of tumor tissue by cryoablation can induce inhibition of secondary tumor growth: an experimental study // *Cryobiology.* – 2001. – Vol. 42, N1. – P. 49-58.
2. Soanes W.A., Ablin R.J., Gonder M.J. Remission of Metastatic Lesions Following Cryosurgery in Prostatic Cancer: Immunologic Considerations // *J. Urol.* – 1970. – Vol. 104. – P. 154-159.
3. Hoffman N.E., Coad J.E., Swanlund D.J., Bischof J.C. Investigating the cause and effect of the cryoimmunology phenomenon in the Copenhagen rat // *Cryobiology.* – 2001. – Vol.42,1. – P. 59-68.
4. Shibata T., Yamashita T., Suzuki K. et al. Enhancement of experimental pulmonary metastasis and inhibition of subcutaneously transplanted tumor growth following cryosurgery // *Anticancer Res.* – 1998. – Vol. 18, N6A. – P. 4443-4448.
5. Matsumura K., Misao A., Saji S. et al. Antitumor immunity in the relatively early period after cryosurgery. *Experimental*

- study using rat's metastasizing mammary tumor // *Nippon Geka Gakkai Zasshi.*– 1983.– Vol. 84, N11.– P. 1130-1137.
6. *Shibata T., Suzuki K., Yamashita T. et al.* Immunological analysis of enhanced spontaneous metastasis in WKA rats following cryosurgery // *Anticancer Res.*– 1998.– Vol. 18, N4A.– P. 2483-2486.
  7. *Шляховенко В.А.* Современные подходы к созданию противоопухолевых вакцин // *Experim. Oncol.*– 2000.– Vol. 22, N3.– P. 99-109.
  8. *Патент 7 А 61К 38/01, 38/17, 35/12; № 57608 Україна.* Спосіб одержання протипухлинної аутовакцини / *В.А.Шляховенко, Г.П. Потебня, В.С. Мосієнко, В.В. Козак, Л.І. Загоруйко, Ю.В. Яниш, В.А. Милиневська, В.Ф. Чехун.*– № 200002797.– Заявл. 14.02.2000.– Опубл. 16.06.2003.– Бюл. №6.– С. 1.24
  9. *Киселева Н.С.* Экспериментальные модели метастазирования опухолей: Автореф. дис. ... д-ра мед.наук.– М., 1978.–40 с.
  10. *Кузьменко А.П.* Особенности метастазирования при низкотемпературных, ультразвуковых и оперативных воздействиях на первичный очаг в эксперименте: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Киев, 1987.– 16 с.