



УДК 616-006.04:615.37:57.083.3

© 2010

О. А. Танасієнко, М. П. Рудик, Г. П. Тітова, В. В. Позур,  
Г. П. Потебня

## Вплив бактеріального лектину на реакцію лімфоїдних органів у процесі пухлинного росту при різних схемах застосування

*(Представлено членом-кореспондентом НАН України М. Я. Співаком)*

*Досліджували вплив різних схем застосування цитотоксичного лектину (ЦЛ), виділеного з *Bacillus subtilis* B-7025, на масові показники та клітинність лімфоїдних органів мишей у процесі пухлинного росту. Показано, що профілактичне введення ЦЛ інтактним мишам ініціює активацію клітин імункомпетентних органів та стимулює протипухлинну імунну відповідь, що зумовлює гальмування пухлинного процесу. Введення мишам ЦЛ після перещеплення пухлини сприяє нормалізації клітинних показників імункомпетентних органів, зниженню супресивної дії пухлинного росту в організмі у віддалені терміни пухлинного процесу. Найбільш вагомий вплив на показники лімфоїдних органів має поєднання профілактичного та терапевтичного застосування ЦЛ, при якому спостерігаються найбільш позитивні при пухлинному рості зрушення в їх загальній реакції.*

В останній час зростає зацікавленість дослідників до лектинів як до поліфункціональних білків. Широкий спектр дії лектинів та їх різноманітна вуглеводна специфічність дозволяють використовувати ці біологічно активні речовини в різноманітних галузях біології та медицини, у тому числі і в онкології. Великий інтерес в терапії злоякісних пухлин виявляється до лектинів з протипухлинною та імуномодулюючою активністю [1, 2]. Так, одержані з омели білої лектини іскадор та лектинол застосовують у комплементарній медицині для лікування хворих на деякі злоякісні пухлини [3]. У цьому напрямі досліджуються багато інших лектинів рослинного походження та з грибів, які не виявляють токсичної дії, але мають імуномодулюючі властивості [4, 5].

Вплив лектинів бактеріальної природи на процеси пухлинного росту почали досліджувати відносно недавно. В онкологічній практиці відсутній досвід використання цих біополімерів як самостійних препаратів. Лектини, що продукуються сапрофітними бактеріями

штаму *Bacillus subtilis* В-7025, є одними з основних компонентів даного мікроорганізму, що визначає його біологічну активність.

Як встановлено нами раніше [6, 7], виділені лектини виявляють аглютинуючу та цитотоксичну активність щодо трансформованих клітин різного походження. При взаємодії цитотоксичних лектинів (ЦЛ) з пухлинними клітинами (ПК) відбувається зв'язування їх з поверхневими рецепторами, що сприяє модифікації пухлиноасоційованих антигенів та підвищенню їх імуногенності. Це стало основою для розробки і створення протипухлинних вакцин, які застосовуються в імунотерапії прооперованих онкологічних хворих для запобігання у них рецидивам та метастазам [8, 9].

Крім того, нами був встановлений превентивний протипухлинний ефект ЦЛ *B. subtilis* В-7025 на експериментальних пухлинних моделях різного гістогенезу [10]. З огляду на це ми поставили за мету оцінити вплив різних схем застосування ЦЛ, які поєднують як профілактичне, так і терапевтичне його введення, на реакцію лімфоїдних органів у інтактних мишей та в процесі пухлинного росту.

**Матеріали і методи.** Об'єктом досліджень були лектини, виділені з культуральної рідини бактеріального штаму *B. subtilis* В-7025, задепонованого в колекції Інституту мікробіології та вірусології НАН України за № В-7025 [11]. Препарати лектинів одержували за розробленим нами методом [12]. Досліди проводили на 2–2,5-місячних мишах-самках лінії ВаВ/с за такою схемою. Дослідним інтактним мишам підшкірно через 1–2 доби 3–4 рази вводили ЦЛ у дозі 0,1 мг на тварину. Наступного дня після останнього введення лектину дослідним і контрольним тваринам в м'яз стегна прищеплювали по 0,5 млн ПК саркоми 37. Дослідних тварин з профілактичною схемою введення лектину розділили на дві групи: мишам I групи продовжували вводити лектин з терапевтичною метою, а контрольним та мишам II дослідної групи вводили фізіологічний розчин (ФР). Імунологічні показники вивчали у дослідних тварин за добу до прищеплення та на 7-му і 34-ту добу після перещеплення пухлини, а у контрольних мишей-пухлиноносіїв відповідно на 7-му та 34-ту добу. Реакцію лімфоїдних органів (пахових лімфовузлів, селезінок та тимусів) оцінювали за масовим індексом, який розраховували за співвідношенням маса органа/загальна маса тварини, а також за відносним вмістом лімфоїдних клітин [13]. Ефективність протипухлинної дії лектину оцінювали за динамікою росту пухлини та середньою тривалістю життя (СТЖ) тварин. При оцінці впливу досліджуваних лектинів враховували також індекс гальмування пухлини (ІГП) та індекс модуляції (ІМ) СТЖ.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Оцінка масових та клітинних показників лімфоїдних органів відображає загальний стан імунної реактивності на рівні організму. Оскільки реакція імунокомпетентних органів залежить від багатьох чинників та процесів у організмі, її оцінювали, враховуючи стадії розвитку пухлинного процесу. Відхилення показників лімфоїдних органів виявлялися вже після превентивного курсу ЦЛ інтактним мишам. Після 4-кратного введення бактеріального ЦЛ (табл. 1) спостерігали вірогідне зниження відносної клітинності лімфатичних вузлів при практично однакових масових показниках, що, найімовірніше, можна пояснити міграцією лімфоїдних клітин, активованих лектином-антигеном, до місця локалізації пухлинного процесу.

Масовий індекс селезінок при однакових показниках клітинності цього органа на 26,5% був вищим, ніж у інтактних мишей. Як бачимо, під впливом лектину селезінка перебуває в стані транзиторної спленомегалії, рівень якої, за даними літератури [14], пропорційний рівню активації імунної відповіді. На масові та клітинні показники лейкоцитів тимуса мишей лектин у ці терміни не впливав (див. табл. 1).

У динаміці пухлинного росту масові та клітинні показники лімфоїдних органів дослідних мишей мобільно реагували, як на введення ЦЛ, так і на пухлину. На 6-ту добу після перещеплення саркоми 37 маса лімфовузлів мишей II дослідної групи залишалась на рівні показників інтактних тварин та мишей з пухлиною, тоді як клітинність мала тенденцію до збільшення. Масовий індекс лімфовузлів мишей, які отримували лектин до і після прищеплення саркоми 37 (I дослідна група), перевищував цей показник у тварин усіх інших груп, але вірогідним був лише відносно мишей-пухлиноносіїв. Клітинність лімфовузлів тварин усіх трьох груп була практично однаковою і не відрізнялась від такої інтактних мишей (табл. 2.).

На 34-ту добу масовий індекс лімфовузлів мишей II дослідної групи зменшувався практично вдвічі порівняно з аналогічним показником мишей обох контрольних груп з одночасним зниженням їх клітинності. На фоні падіння клітинності лімфовузлів мишей II дослідної

Таблиця 1. Вплив цитотоксичного лектину *B. subtilis* В-7025 на масові та клітинні показники лімфоїдних органів інтактних мишей

Група мишей	Масовий індекс, $n \cdot 10^3$	ІМ, %	Відносна клітинність, $n \cdot 10^6$	ІМ, %
Лімфатичні вузли				
ЦЛ	$0,33 \pm 0,06$	—	$0,87 \pm 0,06^*$	37,4
Контроль	$0,44 \pm 0,08$	—	$1,39 \pm 0,22$	—
Селезінка				
ЦЛ	$0,81 \pm 0,04^*$	26,5	$1,48 \pm 0,19$	—
Контроль	$0,64 \pm 0,02$	—	$1,57 \pm 0,19$	—
Тимус				
ЦЛ	$0,22 \pm 0,01$	—	$2,04 \pm 0,15$	—
Контроль	$0,28 \pm 0,04$	—	$1,93 \pm 0,18$	—

\*  $P < 0,05$  порівняно з інтактним контролем.

Таблиця 2. Вплив цитотоксичного лектину *B. subtilis* В-7025 на масові та клітинні показники лімфоїдних органів мишей у процесі пухлинного росту

Група мишей	6-та доба росту пухлини		34-та доба росту пухлини	
	Масовий індекс, $n \cdot 10^3$	Відносна клітинність, $n \cdot 10^6$	Масовий індекс, $n \cdot 10^3$	Відносна клітинність, $n \cdot 10^6$
Лімфатичні вузли				
ЦЛ → ПК → ЦЛ	$0,62 \pm 0,10^{**}$	$1,53 \pm 0,08$	$0,42 \pm 0,04$	$1,29 \pm 0,19^{**}$
ЦЛ → ПК → ФР	$0,46 \pm 0,06$	$1,74 \pm 0,21$	$0,22 \pm 0,03^{*,**}$	$0,81 \pm 0,17$
Контроль ПК	$0,36 \pm 0,04$	$1,73 \pm 0,22$	$0,42 \pm 0,03$	$0,80 \pm 0,11^*$
Інт. контроль	$0,44 \pm 0,08$	$1,39 \pm 0,22$	$0,44 \pm 0,08$	$1,39 \pm 0,22$
Селезінка				
ЦЛ → ПК → ЦЛ	$1,08 \pm 0,12^*$	$0,83 \pm 0,14^*$	$1,23 \pm 0,16^*$	$0,82 \pm 0,22^{*,**}$
ЦЛ → ПК → ФР	$1,05 \pm 0,01^*$	$0,74 \pm 0,13^*$	$1,37 \pm 0,16^*$	$0,46 \pm 0,10^{*,**}$
Контроль ПК	$1,30 \pm 0,18^*$	$0,77 \pm 0,09^*$	$1,37 \pm 0,24^*$	$0,20 \pm 0,04^*$
Інт. контроль	$0,64 \pm 0,02$	$1,57 \pm 0,19$	$0,64 \pm 0,02$	$1,57 \pm 0,19$
Тимус				
ЦЛ → ПК → ЦЛ	$0,11 \pm 0,02^*$	$1,46 \pm 0,13^*$	$0,16 \pm 0,01^{*,**}$	$2,28 \pm 0,31$
ЦЛ → ПК → ФР	$0,22 \pm 0,03^{**}$	$1,12 \pm 0,26^*$	$0,12 \pm 0,08$	$1,12 \pm 0,22^{**}$
Контроль ПК	$0,11 \pm 0,03^*$	$1,29 \pm 0,19^*$	$0,12 \pm 0,02^*$	$2,08 \pm 0,19$
Інт. контроль	$0,22 \pm 0,04$	$1,93 \pm 0,18$	$0,22 \pm 0,04$	$1,93 \pm 0,18$

\*  $P < 0,05$  порівняно з інтактним контролем. \*\*  $P < 0,05$  порівняно з контролем пухлини.

групи та мишей-пухлиноносіїв терапевтичне введення лектину тваринам I дослідної групи сприяло нормалізуючому ефекту навіть у віддалені строки пухлинного процесу, знижуючи супресивну дію пухлинного росту в організмі.

На 6-ту добу розвитку пухлинного процесу спостерігали пригнічення як маси, так і клітинності тимуса у мишей I дослідної групи та контрольних мишей-пухлиноносіїв відносно відповідних показників інтактних мишей. У той же час збереження маси тимуса у мишей II дослідної групи на рівні інтактних тварин, а клітинність на рівні мишей-пухлиноносіїв умовно можна розглядати як активацію тимоцитів. Це є позитивним показником при пухлинному рості, оскільки тимус є важливим регулятором клітинного і гуморального імунітету, постачальником регуляторних клітин та біологічно активних медіаторів. У віддалені строки пухлинного росту терапевтичне введення лектину мишам I дослідної групи справляло нормалізуючий вплив на тимус, що виявлялося в достовірному зростанні як маси органа на 36% порівняно з контролем пухлини, так і відносного вмісту лімфоїдних клітин на 50%. У мишей II дослідної групи маса тимуса зменшувалась при незмінній клітинності цього органа.

Що стосується масових показників селезінки дослідних мишей та мишей-пухлиноносіїв, то на 6-ту добу після перещеплення саркоми 37 вони достовірно не відрізнялись між собою, але маса селезінки мишей цих груп щодо інтактного контролю вірогідно збільшувалась (див. табл. 2). На фоні підвищення маси селезінки у дослідних мишей та пухлиноносіїв їх клітинність відносно інтактного контролю різко зменшувалася, що може бути пов'язане з мобілізацією імунокомпетентних клітин у процесі імунної відповіді на пухлину. Закономірності рівня масових показників селезінки мишей обох дослідних груп і контрольних тварин з пухлиною зберігалися і на 34-ту добу, а їх клітинність, крім мишей I дослідної групи, зменшувалась у процесі росту пухлини порівняно з такою інтактних тварин. Проте профілактичне і комбіноване введення лектину до і після прищеплення пухлини запобігало падінню вмісту лімфоїдних клітин у селезінці цих мишей: відносна клітинність селезінки мишей I і II дослідних груп у 4 та 2 рази перевищувала таку контрольних мишей-пухлиноносіїв. Отже, профілактичне і комбіноване застосування лектину утримує доволі високі показники клітинності селезінки порівняно з пухлинним контролем, що свідчить про активацію проліферативних процесів спленоцитів цього органа у дослідних мишей.

Активація протипухлинного імунного захисту організму мишей позитивно позначилась на показниках їх пухлинного росту і СТЖ. Протягом усього періоду спостереження відбувалось гальмування пухлинного росту і вірогідне збільшення СТЖ у мишей обох дослідних груп (рис. 1, табл. 3). ІПП у мишей I дослідної групи на 28-му добу пухлинного росту становив 66%, II групи — 50,5%, а ІМ СТЖ — 69,5 та 41,6% відповідно.

Таким чином, бактеріальний лектин при введенні інтактним мишам ініціює активацію клітин імунокомпетентних органів і стимулює захисний імунітет, за рахунок чого стримується розвиток пухлинного процесу на початковій стадії. Введення мишам лектину до

Таблиця 3. Середня тривалість життя мишей з прищепленою саркомою 37 при профілактичному та комбінованому застосуванні бактеріального лектину

Група мишей	К-сть мишей	Доза (мг на тварину) і метод ведення лектину	СТЖ, $M \pm m$	T	ІМ, %
ЦЛ → ПК → ЦЛ	8	0,2 до і 0,05 після введення ПК, п/ш	85,1 ± 9,3*	3,6	69,5
ЦЛ → ПК → ФР	7	0,2, п/ш	71,1 ± 4,5*	4,1	41,6
Контроль	8	—	50,2 ± 2,3	—	—

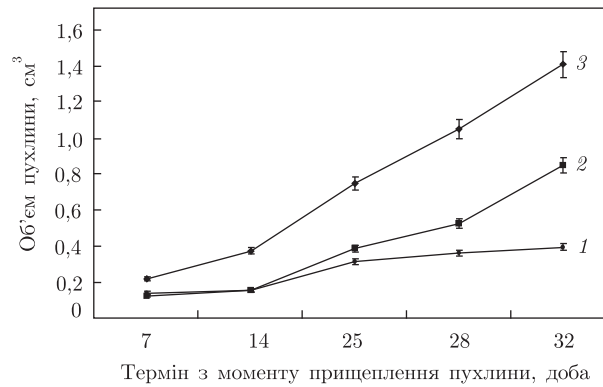


Рис. 1. Вплив комбінованого застосування лектину на ріст саркоми 37 у мишей: 1 — введення ЦЛ до і після прищеплення ПК; 2 — введення ЦЛ до прищеплення ПК; 3 — контроль

і після перещеплення пухлини сприяє нормалізації клітинних показників імунокомпетентних органів, зниженню супресивної дії пухлинного росту в організмі та активації протипухлинної імунної відповіді у більш віддалені терміни пухлинного росту.

1. Hajtó T., Hostanska K., Berki T. et. al. Oncopharmacological Perspectives of a Plant Lectin (*Viscum album* Agglutinin-I): Overview of Recent Results from *In vitro* Experiments and *In vivo* Animal Models, and Their Possible Relevance for Clinical Applications // *Alternat Med.* – 2005. – **2**, No 1. – P. 59–67.
2. Bhutia S. K., Mallick S. K., Maiti T. K. In vitro immunostimulatory properties of Abrus lectins derived peptides in tumor bearing mice // *Phytomedicine.* – 2009. – **16**, No 8. – P. 776–782.
3. Ma Y. H., Cheng W. Z., Gong F. et. al. Active chinese mistletoe lectin-55 enhances colon cancer surveillance through regulating innate and adaptive immune responses // *World J. Gastroenterol.* – 2008. – **14**, No 34. – P. 5274–5281.
4. Zhao C., Sun H., Tong X. et. al. An antitumor lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita* // *Biochem. J.* – 2003. – **374**. – P. 321–327.
5. Li Y. R., Liu Q. H., Wang H. X., Ng T. B. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus* // *Peptide.* – 2004. – **25**, No 1. – P. 7–10.
6. Potebnya G. P., Tanasienko O. A., Titiva G. P. et. al. Specificity and biological activity of cytotoxic lectins synthesized by *Bacillus subtilis* B-7025 // *Exp. Oncol.* – 2002. – **24**, No 2. – P. 150–152.
7. Потєбня Г. П., Танасієнко О. А., Лісовенко Г. П., Тітова Г. П. Ефективність протипухлинних вакцин на основі цитотоксических лектинів бактеріального походження // *Укр. химиотерапевт. журн.* – 2002. – № 4. – С. 29–32.
8. Чорний В. О., Потєбня Г. П., Кірсенко О. В. та ін. Імунологічні зміни у хворих на рак шлунка після введення протипухлинної аутологічної вакцини // *Онкологія.* – 2003. – **5**, № 2. – С. 171–172.
9. Гриневич Ю. А., Тофан А. В., Завальнюк А. К. та ін. Влияние протипухлинной аутовакцины на иммунный статус больных раком желудка // *Эксперим. онкология.* – 1991. – **13**, № 4. – С. 216–219.
10. Танасієнко О. А., Тітова Г. П., Рудик М. П., Потєбня Г. П. Індукція протипухлинної резистентності мишей цитотоксичними лектинами бактеріального походження // *Мікробіологія і біотехнологія.* – 2010. – № 2. – С. 59–66.
11. Потєбня Г. П., Лісовенко Г. С., Черемієнко Н. Л. та ін. Штам бактерій *Bacillus subtilis* – продуцент протипухлинних цитотоксичних речовин // Пат. № 56348 від 15.05.2003; Бюл. № 5.
12. Потєбня Г. П., Танасієнко О. А., Лісовенко Г. С. та ін. Цитотоксичний лектин з протипухлинною активністю // Пат. України № 5947 від 15.09.2003; Бюл. № 9.
13. Kozłowska E., Kopec-Szlezak J., Drela N. et al. Sensitivity of mouse lymphoid and nonlymphoid organs to Silesian air pollutants // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 1997. – **37**, No 1. – P. 10–16.

14. *Jeneway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.* Immunology: the immune system in health and disease. – 5<sup>th</sup> ed. – New York; London: Garland Publishing, 2002. – 732 p.

*Інститут експериментальної патології, онкології  
та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ  
Київський національний університет  
ім. Тараса Шевченка*

*Надійшло до редакції 31.03.2010*

**O. A. Tanasienko, M. P. Rudyk, G. P. Titova, V. V. Pozur, G. P. Potebnya**

**Influence of bacterial lectin on the reaction of lymphoid organs during the tumor growth process by different treatment modes**

*Influence of different schemes of application of cytotoxic lectin isolated from Bacillus subtilis B-7025 on the weight indices and the cellularity of lymphoid organs in mice during the tumor growth is investigated. The preventive administration of cytotoxic lectin to intact mice has a stimulative effect on the immunocompetent organs, lead to the activation of the anticancer resistance system and tumor growth inhibition. The treatment of mice with lectin after the tumor transplantation caused the normalization of cellular indices of lymphoid organs and a decreased suppressive effect of tumors on the host immune response in the distant stages of tumor growth. The combination of preventive with therapeutic CL administration has the most significant influence on the indices of lymphoid organs and leads to the most positive changes in their general reaction.*