

УДК 615.377.3:371

Г. Потебня, д-р мед. наук, Н. Трохименко, асп.,
В. Позур, д-р біол. наук

СПОСОБИ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ПРОТИПУХЛИННИХ ВАКЦИН

Проаналізовано дані літератури про можливість підсилення ефективності протипухлинних вакцин за рахунок цитокінів та пробіотичних препаратів. З'ясовано механізми їх дії та обґрунтування рекомендацій щодо застосування в клінічній практиці.

The literature data about the ability improvement of cancer autovaccine efficacy by cytokines and probiotics preparations were analysed. It has been elucidated the action and substantiation of recommendations to using in clinical practice.

Останнім часом значно зріс інтерес дослідників до використання специфічної та неспецифічної імунотерапії та імунопрофілактики пухлин. Досягнення молекулярної біології та генної інженерії дали можливість одержувати високоочищені антигени пухлинних клітин у препаративних кількостях, що зумовило новий поштовх у розвитку досліджень протипухлинних вакцин (ПВ). У той же час стало зрозумілим, що наявність пухлиноспецифічних чи пухлиноасоційованих антигенів і ПВ, створених на їх основі, не забезпечують повноцінної імунної відповіді, необхідної для ерадикації пухлинних клітин. Сучасні дані свідчать про те, що в реалізації протипухлинної імунної відповіді бере участь велика кількість допоміжних чинників: костимулюючих молекул, факторів адгезії, цитокінів і т.п. Реалізації протипухлинної відповіді на пухлинний ріст заважають розвиток толерантності або паралічу імунної системи під впливом надлишку пухлинних антигенів, пригнічення продукції деяких компонентів комплексу гістосумісності, зміни спектру цитокінів і т.п. Тому з'ясування цих важливих положень протипухлинного імунітету є важливою умовою розробки нових перспективних підходів до вакцинотерапії раку.

Конструювання ПВ, вивчення механізму їх дії та обґрунтування рекомендацій щодо застосування в клінічній практиці є, безумовно, пріоритетним напрямком сучасної медичної науки і буде сприяти розробці більш ефективних методів лікування онкологічних захворювань людини і створенню принципово нових протипухлинних засобів, які дозволять суттєво подовжити тривалість та якість життя онкологічних хворих.

Сучасний стан специфічної імунотерапії пухлинних захворювань можна визначити як завершення того початкового періоду, коли потрібно було довести можливість її застосування в онкології. На даний час вже показані позитивні результати застосування ПВ щодо пухлин різного гістогенезу. Крім того, цей метод є порівняно безпечним, на відміну від хіміотерапії, застосування якої супроводжується вираженими побічними ефектами. Кількість клінічних випробувань ПВ суттєво зросла за останні роки, і на сьогодні ефективність різного виду вакцин вивчається в десятках широкомасштабних досліджень. На даний час, для деяких ПВ завершується III фаза клінічних випробувань, і вже в недалекому майбутньому активна імунотерапія стане стандартним методом і частиною комплексного лікування онкологічних хворих.

Проте, на жаль, оптимізм імунологів та отримані експериментальні дані багато в чому не підтверджуються реальними клінічними ефектами та не виправдовують затрачених зусиль. Навіть найбільш технологічно складні та економічно затратні ПВ на практиці виявляються малоефективними [8], тому дослідження в сфері конструювання ПВ залишаються актуальними.

Головним завданням при створенні ПВ є підвищення імуногенності антигену, який входить до її складу, чи посилення специфічної імунної відповіді на нього. Подальший прогрес вакцинотерапії пухлинної хвороби, безумовно, буде пов'язаний з розширенням спектру іден-

тифікованих пухлинних антигенів та створенням імуногенних форм, які змогли б подолати імунологічну толерантність організму. Однак, перспективи цього методу особливо залежать від створення нових, більш ефективних ад'ювантів. Тому фундаментальні дослідження, які пов'язані зі з'ясуванням механізмів розвитку протипухлинної імунної відповіді, і нові технологічні прийоми дозволять розробити більш ефективні та універсальні засоби специфічної імунотерапії пухлинної хвороби. Завданням майбутніх досліджень є також розробка систем транспортування лікарських форм, які б забезпечили формування максимального рівня імунної відповіді.

Результати експериментальних та клінічних досліджень ефективності вітчизняної ПВ для профілактики рецидивів та метастазів показали її стимулюючий вплив на активність клітинного і гуморального імунітету [5]. Проте аналіз сучасних даних щодо застосування в онкологічній практиці ПВ свідчить про неможливість досягнення високого ступеня профілактичної і терапевтичної ефективності лікування хворих за допомогою засобів імунотерапії. Практично всі специфічні ПВ діють ефективніше при використанні їх з ад'ювантами різного походження (RANES, DETOX, БЦЖ, цитокіни та ін. імуномодулятори).

Було показано, що протипухлинна аутовакцина (ПАВ), створена на основі препарату глікопротеїдної природи, який виділений з фільтрату культуральної рідини *B.subtilis* B-7025 і проявляє цитотоксичну дію щодо пухлинних клітин, має ряд переваг перед вакциною, виготовленою традиційним шляхом, оскільки позбавлена баластних речовин, які викликають побічні ефекти, і дозволяє стандартизувати процес виготовлення вакцини. Оскільки виділений глікопротеїд проявляє імуноад'ювантні властивості (підвищує імунну відповідь на такі онкофетальні антигени, як раково-ембріональний антиген та α -фетопротейн), то доцільним було дослідити його модифікуючі властивості щодо ембріональних антигенів, які можуть експресуватися в пухлинах різного гістогенезу і здатні істотно впливати на хід пухлинного процесу. Це відкриває перспективи використання їх як універсальних специфічних імуногенів, які при застосуванні з відповідними ад'ювантами можуть стати основою для створення алогенної або ксеногенної протипухлинної вакцини [6].

Для удосконалення технології біотерапії пухлинної хвороби особливо важливим є розуміння функцій та механізмів дії цитокінів, які сприяють залученню імунокомпетентних клітин до необхідних імунних реакцій, та посилюють здатність Т-лімфоцитів елімінувати злоякісні клітини. Тому біологічні модифікатори імунної відповіді (ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-12, ІНФ, ГМ-КСФ та ін.) часто використовуються в технологіях створення вакцин.

В найпростішому варіанті, такі цитокіни вводяться разом з антигеном та стимулюють локальну імунну відповідь на нього [9]. Проте, суттєві відмінності у фармакокінетиці цих компонентів і, передусім, короткий період напівжиття цитокінів стають на перешкоді одержання

адекватного ефекту від застосування такої комбінації. Тому гени, що експресують цитокіни вводять до складу ДНК-вакцин; в цьому випадку відбувається експресія вибраного імуностимулюючого білка, інколи одночасно з пухлинним антигеном [10]. Зокрема, інтратуморальне введення плазмиди, яка кодує ІЛ-2, ІЛ-12 чи ІНФ, викликає довготривале локальне зростання концентрації цих білків в пухлинній тканині. Це викликає стимуляцію специфічної протипухлинної відповіді і дозволяє уникнути токсичних проявів, які виникають при системному введенні таких препаратів [11].

Комбінація пухлино-асоційованих антигенів, представлених у формі живих, але опромінених у летальних дозах, пухлинних клітин, за наявності високих локальних концентрацій цитокінів, які продукуються цими ж клітинами, може суттєво підвищити імунну відповідь та викликати індукцію цитолітичних Т-лімфоцитів передусім в місці ін'єкції вакцини, та, в подальшому, в пухлинній тканині, за рахунок міграції туди цих клітин [12, 13]. Проте, крім технологічної складності, пов'язаної з одержанням матеріалу від кожного хворого, виведення клітинної лінії, процедури трансфекції, селекції трансфєкованих клітин, що потребує складного обладнання та допоміжних технологій, існують також труднощі, пов'язані із стандартизацією одержаного клітинного матеріалу та тривалістю процедури.

Дещо спрощує процедуру використання алогенних трансфєкованих клітинних ліній, які можуть вводити хворому окремо, чи в комбінації з аутологічними пухлинними клітинами, або їх лізатом. Оскільки, як уже згадувалось раніше, існує проблема відповідності антигенного профілю вакцини та пухлинних клітин хворого, додавання пухлинного матеріалу хворого суттєво виправляє цей недолік.

В цьому випадку алогенні стабільно-трансфєковані клітини фактично виконують роль лікарської форми, яка тривало і стабільно підвищує локальну концентрацію цитокінів і, відповідно, стимулює імунну відповідь на нього. Рекombінантні вакцини з використанням різноманітних цитокінів проходять клінічні випробування уже декілька років. В них використовують, як правило, алогенні та аутологічні пухлинні клітини чи фібробласти, трансфєковані генами цитокінів.

Підставою для введення до складу вакцин ІЛ-2 є його відомі протипухлинні властивості та здатність при системному введенні впливати на ключові механізми регуляції Т-клітинної імунної відповіді. Застосування алогенних чи аутологічних пухлинних меланомних клітин, трансфєкованих геном ІЛ-2, призводило до зростання кількості специфічних цитолітичних Т-лімфоцитів у деяких хворих, що в окремих випадках супроводжувалось клінічним ефектом [14]. Подібні результати одержані і при трансфекції цим геном аутологічних клітин у хворих з колоректальною та нирковою карциномою. В інших експериментах та клінічних дослідженнях показано, що введення пухлинних клітин, трансфєкованих геном ГМ-КСФ, індукувало потужну специфічну, тривалу протипухлинну відповідь, яка корелювала з позитивним клінічним ефектом при меланомі [15].

Клінічні випробування таких вакцин розпочаті при пухлинах нирки, підшлункової залози, передміхурової залози та ін. Трансфекція клітин карциноми нирки геном ІЛ-4 викликала виражену імунну відповідь на них та супроводжувалась розвитком пухлинно-специфічної імунної відповіді, опосередкованої CD8⁺ Т-клітинами, які були активні також відносно клітин, які не експресували ІЛ-4. Алогенні меланомні клітини, які секретують цей інтерлейкін, також посилюють специфічну Т-клітинну антимеланомну імунну відповідь [16].

Досліджується можливість застосування цього підходу для лікування меланоми з використанням генів ІНФ- α , ІЛ-6 та ІЛ-12.

ІНФ є одним з ключових модуляторів імунної відповіді; він впливає на процеси розпізнавання антигену, диференціювання, залучення, а також на функціональну активність імунокомпетентних клітин. Встановлено, що ІНФ має прямий вплив на ріст і диференціювання пухлини, та є індуктором апоптозу. Найбільший інтерес для вивчення становлять ефекти ІНФ, пов'язані із підвищенням імуногенності пухлини та зміною її чутливості до цитотоксичної та стимулюючої дії Т-лімфоцитів [1].

ІНФ є потужним індуктором експресії генів головного комплексу гістосумісності (і класу I, і класу II). Саме ця властивість, окрім інгібуючого росту та непрямого імуномодулюючого впливу, є однією з причин застосування ІНФ при вакцинації [17]. Преклінічні дослідження на мишах показали, що ІНФ- γ потенціює імунну реакцію при вакцинотерапії меланоми, проте, ефект ІНФ при вакцинації антигенами меланоми в клінічних умовах вивчений недостатньо.

На користь доцільності застосування ІНФ разом із ПВ свідчать факти високої клінічної протипухлинної активності ІНФ при метастатичній меланомі, та зростаюча кількість даних про позитивний вплив цього цитокіну на подовження безрецидивного періоду у хворих з високим ризиком після резекції пухлини [18]. Механізми синергічної дії вакцини та ІНФ, ймовірно, будуть відрізнятися залежно від складу вакцини та тих імунних реакцій, які забезпечують ефект імунізації.

В чисельних роботах показано, що найбільшу стабільність протипухлинної дії має ІНФ- α [1, 14]. Результати експериментальних та клінічних досліджень обґрунтовують використання ІНФ- α в якості елемента оптимізації комплексного лікування, спрямованого на зниження метастатичного ризику та підвищення якості життя онкохворих [19, 20].

Роль ІНФ в складі комбінацій з іншими біологічними агентами чи хіміопрепаратами стала предметом інтенсивних досліджень. Особлива увага надається вивченню ефектів, які виявляє ІНФ при застосуванні разом з активною специфічною імунізацією. Введений перорально ІНФ- α має ефективний терапевтичний та імуномодулюючий вплив, завдяки дії на всі ланки імунної відповіді. Проте, для перорального введення цитокіну необхідний захист від деградуючого впливу травних секретів [2]. Оригінальним методом доставки ІНФ є використання живого бактеріального вектора – *B. subtilis*. В бактеріальних клітинах клоновано ген ІНФ- α , при цьому рекombінантний штам має здатність продукувати ІНФ при пероральному введенні в організм [3].

Відомо, що рекombінантний ІНФ- α є одним з перших цитокінів, який з успіхом використовується в клінічній практиці при вірусних захворюваннях та імунодефіцитних станах. ІНФ є одним з ключових факторів активації механізмів неспецифічної резистентності. Крім того, дуже важливим моментом є те, що синтез ІНФ здійснюється бактеріями, які вводять перорально в шлунково-кишковий тракт. Такий спосіб введення ІНФ має ряд переваг порівняно з парентеральним надходженням відомих препаратів ІНФ. При цьому знижується імунна відповідь по відношенню до ІНФ, який виробляється бактеріями в кишечнику, збільшується термін його дії, а також не спостерігається побічної дії препарату.

Велику увагу приділяють розробці імуномодуляторів на основі різних штамів мікроорганізмів, які мають протипухлинну активність. Такі препарати використовують в онкології для підвищення ефективності протипухлин-

ної хіміо- та променевої терапії, зниження їх небажаної токсичної дії, або з метою запуску чи активації механізмів, які здатні еліминувати злоскісні клітини з організму чи запобігати їх розвитку.

На основі рекомбінантного штаму сконструйований пробіотичний препарат субалін, який здійснює доставку ІНФ до імунокомпетентних клітин пейєрових бляшок та епітеліальних клітин слизових оболонок. Препарат субалін відносять до пробіотиків нового покоління. Його основою є рекомбінантний штам бактерій *B. subtilis* 2335/105, який містить ген синтезу універсального антивірусного агента α -інтерферону людини. Препарат характеризується високою антагоністичною активністю по відношенню до широкого спектру патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів та вірусів. Проведені всебічні випробування безпечності (включаючи гістологічне вивчення різних органів і тканин) препарату субаліну на лабораторних та сільськогосподарських тваринах довели, що при різних способах введення (в тому числі і парентеральному) в дозах, які значно перевищують рекомендовані до застосування, ні культура, ні препарат не викликають у тварин патологічних змін [7].

Останнім часом прийшли до висновку, що в загальній стратегії ведення онкологічних хворих необхідно застосовувати пробіотики – препарати, створені для нормалізації мікробіоценозів. Пробиотики бактеріальної природи мають безперечну перевагу, їх номенклатура достатньо широка, вони відрізняються один від одного штамми мікроорганізмів, і, відповідно, різним набором біологічних властивостей. Проте, впровадження пробіотиків перебуває на початковому етапі клінічного дослідження.

Термін "пробиотики" використовують для позначення природних ад'ювантів – живих мікроорганізмів, введення яких в організм сприяє підтриманню і відновленню біологічного балансу його нормальної мікрофлори і проявляє на нього позитивний вплив. Пробиотики застосовують для захисту організму від несприятливих екологічних умов, порушень обміну речовин, при гострих та хронічних захворюваннях і дисфункціях шлунково-кишкового тракту. Більшість пробіотиків, що існують сьогодні на фармацевтичному ринку, призначені для лікування і профілактики дизбактеріозів шлунково-кишкового тракту та санації ротової порожнини.

Використання пробіотиків в комплексній системі лікування онкологічних хворих є доцільним не тільки з точки зору нормалізації мікрофлори, а й тому, що в процесі життєдіяльності пробіотики синтезують специфічний комплекс метаболітів, які складають основу сукупного лікувального ефекту. Більшість пробіотиків мають імунокорегуючі властивості, тому в зарубіжній літературі мають назву "імунопробиотики".

Імуномодулятори на основі мікроорганізмів почали використовувати в онкології як для підвищення ефективності протипухлинної хіміо- та променевої терапії, зниження їх небажаної токсичної дії, так і з метою активації специфічних механізмів, які здатні еліминувати

злоскісні клітини з організму чи запобігти їх розвитку [4]. Але механізм дії пробіотиків, а також умови, при яких доцільне їх використання, треба ще ретельно вивчати.

Висновки. Виявлені властивості цитокінів та пробіотичних препаратів а саме – імуномодельюча активність, протипухлинна і антиметастатична дія – дозволяє розглядати перспективним для подальшої оцінки можливості їх застосування в комплексній терапії злоскісних новоутворень, особливо в поєднанні з вакцинотерапією.

1. Воронцова А.Л., Кудрявец Ю.И. Интерферон как важный элемент оптимизации лечения онкологических больных // Онкология 2000; № 1–2. – С. 16–20.
2. Беляевская В.А., Игнатъев Г.Г., Чердынцев Н.В., Литвяков Н.В. Адьювантные свойства рекомбинантного пробиотика субалина, продуцирующего интерферон. Журн. микробиол. 2001. – С. 77–82.
3. Сорокулова И.Ю., Беляевская В.А., Масычева В.И., Ильичев А.А. Рекомбинантные пробиотики: проблемы и перспективы использования для медицины и ветеринарии. Вестн. РАМН. – 1997; С. 46–49.
4. Воробьев А.А., Германович М.П., Петров Л.Н. Предпосылки и перспективы применения пробиотиков в комплексной терапии онкологических больных. Вopr. Онкологи. – 2004; № 3. – 361–365.
5. Потебня Г.П., Смолянка И.И., Лисовенко Г.С. и др. Эффективность иммунотерапии аутовакциной при лечении больных раком легкого. Онкол. – 2000; №2: С. 191–194.
6. Потебня Г.П., Діденко Г.В., Деорщенко О.С., Лисовенко Г.С., Потебня М.Г., Вотякова І.А., Василевська С.В. Протипухлинна активність вакцини, виготовлених на основі ембріональних тканин та бактеріального глюкотеїду. ДАН. – 2006. – № 4. – С. 172–177.
7. Потебня Г.П., Софронова Л.А., Черемшенко Н.Л., Лисовенко Г.С., Сорокулова І.Б., Трохименко Н.В., Танасієнко О.А., Бомбін А.В. Підвищення ефективності протипухлинної аутовакцини рекомбінантним препаратом субалін. Журн. микробиол. – 2006; № 5: С. 51–58.
8. Yannelli J.R., Wroblewski J.M. On the road to a tumor cell vaccine. Vaccine. – 2004; № 1. – P. 97–113.
9. Slingluff C.L. Jr, Petroni G.R., Yamashchikov G. V. et al. Phase 1 trial of a melanoma vaccine with gp 100 peptide and tetanus helper peptide in adjuvant. // J Clin Oncol. 2004; № 22. – P. 4474–4485.
10. Liu M, Acres B, Bailoul J-M, et al. Gene-based vaccines and immunotherapeutics. PNAS 2004; 101(suppl.2). – P. 567–571.
11. Hoffman D.M., Figlin R.A. Intratumoral interleukin 2 for renal-cell carcinoma by direct gene transfer of a plasmid DNA/DMRIE/DOPE lipid complex // World J Urol. 2000; 18 № 2. – P. 152–156.
12. Soliffer R., Hodi F., Haluska F., et al. Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma // J Clin Oncol 2003; № 17. – P. 343–350.
13. Salgia R., Lynch T., Skarin A., et al. Tumor der lunge and des mediasti nums drucklegung des manuals mit // J Clin Oncol 2003; № 4. – P. 624–30.
14. Palmer K., Moore J., Everard M., et al. Therapy with autologous, IL-2 sekreting tumor cells in patiens with malignant melanoma // Hum Gene Ther. 1999; № 8. – P. 1261–1268.
15. Weber J., Sondak V., Scotland R., et al. Granulocyte- macrophage-colony-stimulating factor added to a multipptide vaccine for resected stage 2 melanoma // Cancer 2003; № 1. – P. 186–200.
16. Arienti F., Belli F., Napolitano F., et al. Cancer immunol immunother // Hum Gene Ther. 1999; № 18. – P. 2907–2916.
17. Kirkwood J. Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience. Semin Oncol. 2002; № 3, suupl. 7. – P. 18–26.
18. Anton P., Kirchner H., Jonas U., Atzpodien J. Cytokines and tumor vaccination. Cancer Biother Radiopharm. 1996; № 5. – P. 315–318.
19. Kirkwood J.M. Ibrahim J.G., Sosman J.A., et al. High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage 2b-3 melanoma: results of intergroup trial E 1694/S9512/c509801 // J Clin Oncol. 2001; № 9. – P. 2370–2380.
20. Kirkwood J., Ibrahim J. Lawson D., et al. High-dose interferon alfa-2b does not diminish antibody response to GM2 vaccination in patients with resected melanoma: results of the multicenter eastern cooperative oncology group phase 2 trial E2696 // J Clin Oncol. 2001; № 5. – P. 430–6.

Надійшла до редколегії 14.11.06

А. Кривенда, асп.

МОДИФІКОВАНЕ СЕРЕДОВИЩЕ БОЛДА ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ДІАТОМЕЙ

Розроблено модифікацію поживного середовища Болда для культивування діатомових водоростей в умовах неспеціалізованих колекцій мікроводоростей. Середовище апробовано на штаммах 7 родів Bacillariophyta, виділених з прісноводних та ґрунтових біотопів.

The modification of Bold Basal Medium for diatoms cultivation in microalgae unspecialized cultures collection was developed. The medium was examined on 7 Bacillariophyta genera strains which were isolated from freshwater and terrestrial habitats.

Вступ. Діатомові водорості широко використовуються в визначенні екологічної якості вод та моніторингу

стану водних екосистем. Зокрема, в країнах ЄС обов'язковим елементом аналізу якості вод є розрахунок так

© Кривенда А., 2007