

12. Sartor G., Hallbrucker A., Mayer E. Characterizing the secondary hydration shell on hydrated myoglobin, hemoglobin, and lysozyme powders by its vitrification behavior on cooling and its calorimetric glass-liquid transition and crystallization behavior on reheating // *Biophys. J.* – 1995. – **69**, No 6. – P. 2679–2694.
13. Meryman H. T., Williams R. J., Douglas M. S. Freezing injuring from “solution effects” and its prevention by natural or artificial cryoprotection // *Cryobiology.* – 1977. – **14**, No 3. – P. 287–302.
14. Горобченко О. А., Мошко Ю. А., Николов О. Т. и др. Влияние режимов замораживания на диэлектрические свойства сыворотки кордовой крови // *Пробл. криобиологии.* – 2004. – № 2. – С. 4–10.
15. Mudd J. B., Dawson P. J., Santrock J. Ozone does not react with human erythrocyte membrane lipids // *Arch. Biochem. and Biophys.* – 1997. – **347**, No 2. – P. 251–258.

*Институт проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, Харьков*

Поступило в редакцию 03.04.2007

УДК 616-006:57.083.3

© 2007

**О. С. Дворщенко, Г. В. Діденко, О. І. Чередарчук, М. Г. Потєбня,
І. А. Вотякова, О. А. Голуб**

Моделювання ксеногенних клітинних систем на твердих фазах з використанням пухлиноасоційованих та ембріональних антигенів і їх застосування в протипухлинній терапії

(Представлено членом-кореспондентом НАН України В. Л. Ганулом)

The tumor cell surface (sarcoma 37) was modeled on a solid phase (aerosil) with xenogene antigens of embryonal liver of the early period of gestation. The antitumor action of obtained preparations were investigated in therapeutic experiments. It was established that the best survival rate was observed at the complex application of sarcoma 37 antigens and liver antigens of the early period gestation sorbed on aerosil. It was determined that the preparations on the basis of sarcoma 37 antigens and embryonal liver antigens of the early period gestation after immunization of mice activated the cytotoxic reactions of macrophage and lymphocyte cell lines.

Перші повідомлення про лікування різних захворювань ембріональними субстанціями належать до початку ХХ століття. У 1930-х рр. в протипухлинній терапії вперше були застосовані гомогенати й екстракти з ембріональних тканин та органів. Було показано [1], що під впливом введених ембріональних гомогенатів селезінки й тимуса в онкологічних хворих гальмувався ріст пухлин, а в деяких випадках відбувалося розсмоктування новоутворень. Використання екстрактів ембріональних тканин було не менш ефективним [2]. Але при застосуванні гомогенатів (корпускулярні антигени) задіюється занадто широкий спектр антигенів, а при використанні екстрактів (розчинні антигени) сильніше активується гуморальна ланка імунної відповіді, роль якої в протипухлинному імунітеті далеко не однозначна.

Раніше нами були розроблені та досліджені протипухлинні вакцини на основі гомогенатів ембріональних тканин та бактеріальних глікопротеїдів, що виступали як модифікатори ембріональних антигенів та ад'юванту [3, 4]. На даному етапі роботи ми використовували екстракти, отримані з пухлинних та ембріональних клітин. Для більш значної активації

клітинної ланки імунної відповіді ми застосували сорбцію поверхневих антигенів на корпускулах оксиду кремнію (аеросил). Тому метою дослідження було змоделювати поверхню клітини на твердій фазі (аеросил), використовуючи пухлинні антигени в комплексі з ксеногенними ембріональними антигенами та дослідити їх протипухлинну дію. Для моделювання ксеногенних клітинних систем ми одночасно сорбували на аеросилі повний спектр поверхневих антигенів саркоми 37 (S37) і антигенів ембріональної печінки до 7-го тижня гестації (Sp), що, на нашу думку, повинно привести до підсилення протипухлинного імунітету шляхом активації клітинної ланки імунної відповіді і створення депо антигену.

Методи дослідження. Поверхневі антигени (S37 або Sp) виділяли таким шляхом. До 10^6 клітин S37 або Sp додавали 1 мкг ЕДТА і інкубували при активному перемішуванні 1 год. Після інкубації клітини центрифугували 15 хв при 600 g і відбирали надосад, який утримував поверхневі антигени відповідної тканини. В надосаді визначали концентрацію білка за методом Лоурі [5] і доводили її до 5 мг/мл шляхом діалізу проти ПЕГ 15000.

Для моделювання ксеногенних клітинних систем поверхневі антигени сорбували на аеросилі. Були розроблені такі моделі: аеросил з антигенами саркоми 37 (Ae{S37}); аеросил з антигенами ембріональної печінки (Ae{Sp}); аеросил з антигенами саркоми 37 і ембріональної печінки (Ae{S37 + Sp}); аеросил (Ae); контроль.

При виготовленні комплексних ксеногенних клітинних систем з використанням і антигенів S37 і антигенів Sp на 2 мг аеросилу сорбували по 5 мг білка (поверхневих антигенів) обох типів клітин. Як контроль використовували моделі з сорбованими на аеросилі антигенами тільки S37 або Sp і готували із співвідношення 5 мг білка (поверхневі антигени S37, або Sp) на 2 мг аеросилу.

Досліди проводили на нелінійних мишах-самцях розводки віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, віком 2 міс., масою 18–20 г, за терапевтичною схемою. Тваринам перещеплювали в стегновий м'яз 10^6 клітин S37, лікування починали через 3 доби після перещеплення пухлини. Препарати в об'ємі 0,3 мл вводили триразово підшкірно в області шиї з інтервалом у 7 діб з розрахунку 2 мг аеросилу на весь курс терапії. Тваринам контрольних груп у ті ж строки робили ін'єкції фізіологічного розчину та аеросилу.

Лімфоїдні клітини отримували методом градієнтного центрифугування суспензії клітин селезінки на фікол-верографіні ($\rho = 1,077$) [6]. Клітини перитонеального ексудату (макрофаги) одержували з черевної порожнини мишей без попереднього стимулювання.

Кількість життєздатних ефекторних клітин (ЕК) (лімфоцити або макрофаги) підраховували в камері Горяєва з використанням 0,4% розчину вітального барвника трипанового синього. Кількість живих клітин після виділення становила не менше 95%. Виділені ЕК і клітини-мішені (КМ) (клітини аутологічної S37) ресуспендували в середовищі Хенкса без барвника з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки і 40 мкг/мл гентаміцину.

Основою для розробки постановки всіх нижченаведених типів клітинних реакцій були методи, описані в [7, 8].

Цитотоксичну активність ЕК визначали за допомогою МТТ-тесту. 100 мкл суспензії клітин S37 у концентрації $3 \cdot 10^4$ кл./лунку наносили на планшет, після чого вносили 100 мкл суспензії ЕК (лімфоїдні або макрофагальні клітини) у концентрації $1 \cdot 10^5$ кл./лунку. Співвідношення КМ : ЕК — 1 : 3. Інкубували в термостаті 18 год в 5% CO_2 , при 100% вологості і 37 °С. Після закінчення інкубації в лунки додавали 20 мкл розчину МТТ у концентрації 5 мг/мл і інкубували 4 год в 5% CO_2 , при 100% вологості і 37 °С, відмивали двічі фізіологічним розчином при 4000 хв^{-1} 15 хв. Після останнього відмивання додавали 120 мкл КОН

(2 моль/л) і 140 мкл 50% розчину ДМСО. Після розчинення утвореного МТТ-формазану оптичну густина вимірювали при $\lambda = 540$ нм на автоматичному microELISA reader. Усі проби були в триплетах. Результати розраховували за формулою

$$\frac{OG_e + OG_m - OG_{e+m}}{OG_e + OG_m} \cdot 100\%,$$

де OG_e — оптична густина в лунках з клітинами-ефекторами; OG_m — оптична густина в лунках з клітинами-мішенями; OG_{e+m} — оптична густина в дослідних серіях.

Рівень антитілозалежної цитотоксичності лімфоцитів і макрофагів визначали таким чином. 100 мкл суспензії клітин S37 у концентрації $3 \cdot 10^4$ кл./лунку наносили на планшет, після чого вносили 10 мкл сироватки крові, отриманої у тварин з тієї ж групи, і інкубували 45 хв в 5% CO_2 , при 100% вологості і 37 °С. Після інкубації вносили 100 мкл суспензії ЕК (лімфоїдні або макрофагальні клітини) у концентрації $1 \cdot 10^5$ кл./лунку і інкубували в термостаті 18 год в 5% CO_2 , при 100% вологості і 37 °С. Співвідношення КМ : ЕК — 1 : 3. Після закінчення інкубації в лунки додавали 20 мкл розчину МТТ у концентрації 5 мг/мл і інкубували 4 год за таких самих умов, відмивали двічі фізіологічним розчином при 4000 хв^{-1} 15 хв. Після останнього відмивання додавали 120 мкл КОН (2 моль/л) і 140 мкл 50% розчину ДМСО. Після розчинення утвореного МТТ-формазану оптичну густина вимірювали при $\lambda = 540$ нм. Усі проби були в триплетах. Результати розраховували за формулою

$$\frac{OG_e + OG_m - OG_{e+m+c}}{OG_e + OG_m} \cdot 100\%,$$

де OG_e — оптична густина в лунках з ефекторами; OG_m — оптична густина в лунках з мішенями; OG_{e+m+c} — оптична густина в серіях з додаванням сироватки.

Для вивчення кооперації лімфоцитів і макрофагів 100 мкл суспензії клітин S37 у концентрації $3 \cdot 10^4$ кл./лунку наносили на планшет, після чого вносили 100 мкл суспензії лімфоїдних клітин і 100 мкл макрофагальних клітин у концентрації $1 \cdot 10^5$ кл./лунку. Співвідношення КМ : ЕК — 1 : 3. Інкубували в термостаті 18 год в 5% CO_2 , при 100% вологості і 37 °С. Після закінчення інкубації в лунки додавали 20 мкл розчину МТТ у концентрації 5 мг/мл і інкубували 4 год в 5% CO_2 , при 100% вологості і 37 °С, відмивали двічі фізіологічним розчином при 4000 хв^{-1} 15 хв. Після останнього відмивання додавали 120 мкл КОН (2 моль/л) і 140 мкл 50% розчину ДМСО. Після розчинення утвореного МТТ-формазану оптичну густина вимірювали при $\lambda = 540$ нм на автоматичному microELISA reader. Усі проби були в триплетах. Результати розраховували за формулою

$$\frac{OG_{e1} + OG_{e2} + OG_m - OG_{e1+e2+m}}{OG_{e1} + OG_{e2} + OG_m} \cdot 100\%,$$

де OG_{e1} — оптична густина в лунках з лімфоїдними клітинами; OG_{e2} — оптична густина в лунках з макрофагальними клітинами; OG_m — оптична густина в лунках з клітинами-мішенями; $OG_{e1+e2+m}$ — оптична густина в дослідних серіях.

З метою вивчення антитілозалежної кооперації лімфоцитів і макрофагів 100 мкл суспензії клітин S37 у концентрації $3 \cdot 10^4$ кл./лунку наносили на планшет, після чого вносили 10 мкл сироватки крові, отриманої у тварин з тієї ж групи і інкубували 45 хв в 5% CO_2 , при 100% вологості і 37 °С. Після інкубації вносили 100 мкл суспензії лімфоїдних клітин і 100 мкл макрофагальних клітин у концентрації $1 \cdot 10^5$ кл./лунку. Інкубували в термостаті

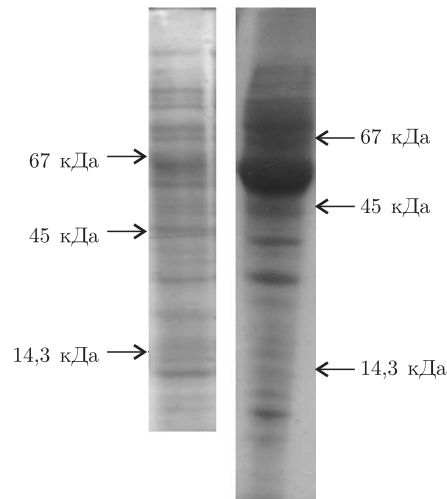


Рис. 1. Електрофореграма антигенних змивів печінкової тканини раннього періоду гестації (1) і саркоми 37 (2), отриманих за допомогою ЕДТА-екстракції

18 год в 5% CO₂, при 100% вологості і 37 °С. Після закінчення інкубації в лунки додавали 20 мкл розчину МТТ у концентрації 5 мг/мл і інкубували 4 год за таких самих умов, відмивали двічі фізіологічним розчином при 4000 хв⁻¹ 15 хв. Після останнього відмивання додавали 120 мкл КОН (2 моль/л) і 140 мкл 50% розчину ДМСО. Після розчинення утвореного МТТ-формазану оптичну густина вимірювали при λ = 540 нм. Усі проби були в триплетах. Результати розраховували за формулою

$$\frac{OG_{e1} + OG_{e2} + OG_M - OG_{e1+e2+m+c}}{OG_{e1} + OG_{e2} + OG_M} \cdot 100\%,$$

де OG_{e1} — оптична густина в лунках з лімфоїдними клітинами; OG_{e2} — оптична густина в лунках з макрофагальними клітинами; OG_M — оптична густина в лунках з клітинами-мішенями; $OG_{e1+e2+m+c}$ — оптична густина в дослідних серіях з додаванням аутологічної сироватки.

Розділення поверхневих антигенів проводили за методом Леммлі [9] у поліакриламідному 10% гелі. Для оцінки результатів електрофорезу використовували програму TotalLab 1.10.

Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики [10]. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за *t*-критерієм Стюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при $p < 0,05$. Розрахунки та побудову графіків виконували з використанням прикладної програми “Origin 7.0”.

Результати досліджень та їх обговорення. При використанні для виділення поверхневих антигенних ембріональних та пухлинних клітин методом ЕДТА-екстракції змивається майже весь спектр антигенів з поверхні клітин: у випадку клітин Sp отримано до 22 треків на електрофореграмі з молекулярною масою від 0,4 до 116 кДа, у випадку клітин S37 — до 23 треків на електрофореграмі з молекулярною масою від 0,39 до 98,8 кДа (рис. 1), і в достатній концентрації. Клітини залишаються цілими і їх внутрішній вміст не потрапляє в супернатант. Антигени не потребують додаткового очищення і можуть бути одразу використані для сорбції.

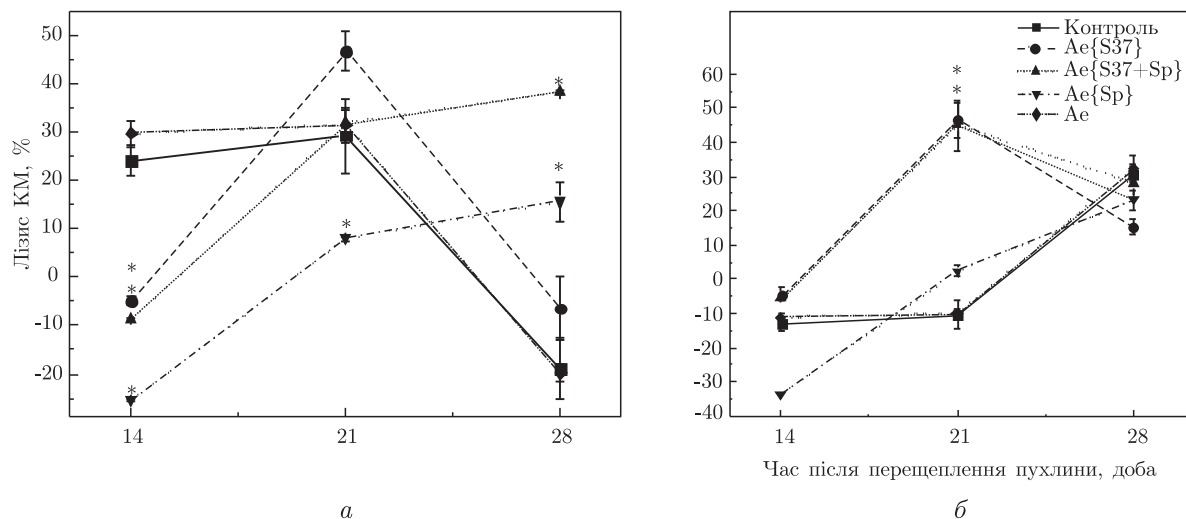


Рис. 2. Вплив ксеногенних моделей на цитолітичну активність (а) та антитілозалежну цитотоксичність (б) лімфоцитів.

* — $p < 0,05$

За даними дослідження, виживаність тварин з прищепленою S37 у контрольній і Ae групах становила 42 доби, у групах, що отримували ін'єкції Ae{S37} і Ae{Sp}, — 84 і 70 діб відповідно. Найкраща виживаність тварин відмічалася у групі, яка отримувала комплексно сорбовані на аеросилі антигени (Ae{S37 + Sp}), — 112 діб.

Цитотоксична активність лімфоцитів (ЦТЛ) у групах, які отримували ін'єкції Ae{S37}, Ae{S37 + Sp} і Ae{Sp}, на 14-ту добу була значно нижчою за контроль (24,19%) і мала від'ємні значення: -4,9, -8,6 і -25,34% відповідно, а на 21-шу добу підвищувалася до значень 46,83, 31,93 і 8,02% відповідно проти 29,13% у контролі (рис. 2, а). На 28-му добу в контрольній групі і в групі Ae{S37} лізіс КМ лімфоїдними клітинами набував від'ємних значень і становив -18,91 і -6,55% відповідно, а в групах Ae{S37 + Sp} і Ae{Sp} підвищувався і становив 38,32 і 15,66% відповідно. В Ae групі відмінностей від контрольних значень не відмічалось протягом усього періоду спостереження. Таким чином, динаміка розвитку ЦТЛ у групах, які отримували комплекси Ae{Sp} і Ae{S37 + Sp}, збігається, але введення до системи антигенів S37 сприяє посиленню ефекту.

Внесення в середовище інкубації лімфоцитів з КМ аутологічної сироватки (див. рис. 2, б) в контрольній групі до 21-ї доби викликало зниження антитілозалежного лізису лімфоцитами (АЗКЦ) КМ порівняно з ЦТЛ у цій групі, але на 28-му добу відбувалося підсилення АЗКЦ до 30,7% (ЦТЛ -18,91%). При внесенні аутологічної сироватки АЗКЦ знижувався порівняно з ЦТЛ у групі тварин, які отримували комплекс Ae{S37 + Sp} (28,16% проти 38,32%), але підсилювався в групах, які отримували комплекси Ae{S37} (15,28% проти -6,55%) і Ae{Sp} (23,21% проти 15,66%), на 28-му добу (див. рис. 2). Динаміка зміни АЗКЦ в Ae групі повторювала таку в контрольній групі.

Дослідження цитотоксичної активності макрофагів (ЦАМ) показало, що у всіх групах має місце однакова динаміка розвитку процесу (рис. 3, а). Так, на 21-шу добу відмічався спад ЦАМ, а на 28-му добу — її підсилення. Встановлено, що на 21-шу добу в групах, які отримували комплекси Ae{S37} і Ae{S37 + Sp}, ЦАМ була нижчою (9,62, 2,43% відповідно), а в групі, яка отримувала комплекс Ae{Sp}, — вищою (29,3%), ніж у контрольній групі (16,92%).

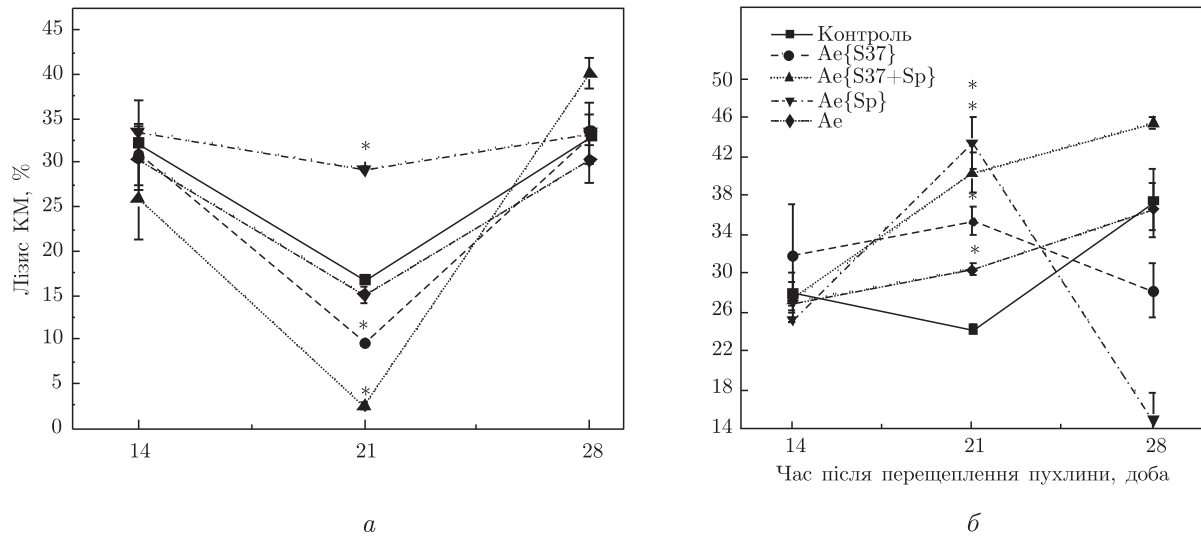


Рис. 3. Вплив ксеногенних моделей на цитотоксичну активність (а) та антитілозалежну цитотоксичність (б) макрофагів.
* — $p < 0,05$

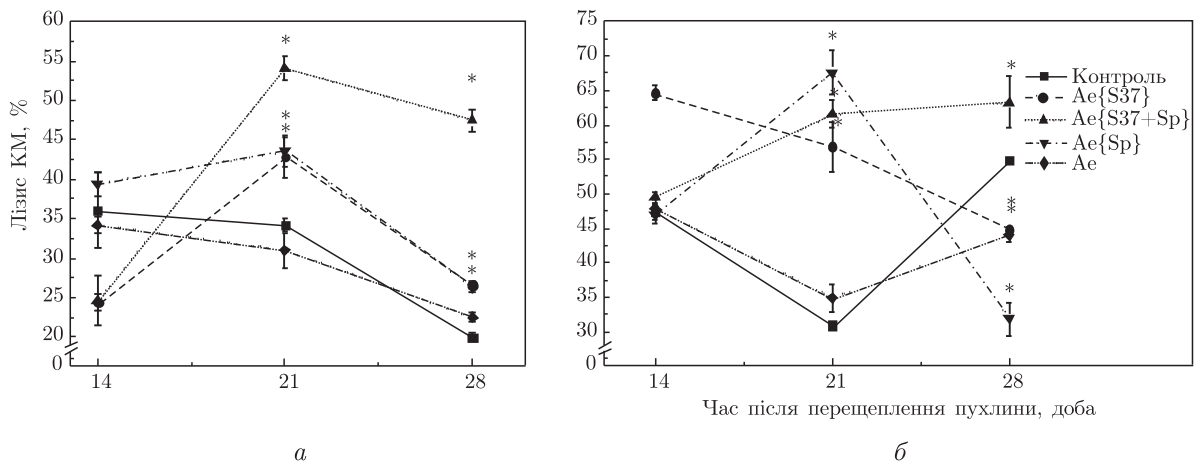


Рис. 4. Вплив на кооперативну взаємодію клітин макрофагального та лімфоїдного рядів (а) і введення до системи макрофаг/лімфоцит/КМ аутологічної сироватки (б).
* — $p < 0,05$

Антитілозалежна макрофагальна активність (АЗМА) (див. рис. 3, б) при додаванні до системи макрофаг/КМ аутологічної сироватки підвищувалася на 21-шу добу в групах, які отримували комплекси Ae{S37} (35,39%), Ae{S37 + Sp} (40,28%), Ae{Sp} (43,36%) і Ae (30,44%) порівняно з контролем (24,4%). На 28-му добу в групах, які отримували Ae{S37} і Ae{Sp} комплекси, АЗМА пригнічувалась (28,23 і 14,95% лізису КМ відповідно), а в групі, що отримувала Ae{S37 + Sp} комплекс, — підвищувалась (45,44%) порівняно з контролем (37,5%).

За результатами дослідження кооперативного цитотоксичного ефекту макрофагів та лімфоцитів (рис. 4, а) по відношенню до аутологічних КМ встановлено, що до 21-ї доби в групах, які отримували Ae{S37} і Ae{Sp} комплекси, лізіс КМ був нижчий, або не відрізнявся від контролю. Але в групі, яка отримувала комплекс Ae{S37 + Sp}, кооперативний

цитотоксичний ефект макрофагів та лімфоцитів до КМ був вищим за такий у контрольній групі і становив 54 і 47,37% проти 37,14 і 20,05% відповідно на 21-шу і 28-му добу. В Ае групі вірогідних змін порівняно з контролем не відмічалось.

Введення до системи макрофаг/лімфоцит/КМ аутологічної сироватки підвищило кооперативний цитотоксичний ефект (див. рис. 4, б) ефекторних клітин на 21-шу добу в групах, які отримували комплекси Ае{S37}, Ае{S37 + Sp} і Ае{Sp}, до значень 56,87, 61,5 і 67,57% відповідно проти 30,91% у контролі. На 28-му добу відсоток лізису КМ в контрольній групі становив 54,93%, в Ае{S37 + Sp} групі — 63,27%, в групах Ае{S37}, Ае{Sp} і Ае — 44,78, 31,86 і 44,02% відповідно.

Таким чином, отримані нами результати свідчать про те, що Ае{S37+Sp} комплекс є потужним імуностимулятором з вираженою протипухлинною активністю. При застосуванні Ае{S37 + Sp} комплексу відсоток виживаності тварин з перещепленою пухлиною сарком 37, після вакцинації, найвищий. При цьому висока активність ефекторних клітин зберігається до 28-ї доби, у той час як у групах з гіршою виживаністю активність клітинних реакцій спадає. Сорбція антигенів саркоми 37 та антигенів печінки раннього періоду гестації активує клітинну цитотоксичність на 21-шу та 28-му добу спостереження, більшою мірою впливаючи на лізис ПК клітинами макрофагального ряду, а лімфоцити посилюють цитотоксичний ефект.

1. *Fichera G.* Letzte Beobachtungen und neue Tatsachen ueber die Versuche einer biologischen Behandlung der boesartigen Geschwuelste // *Z. Krebsforsch.* Н. I. – 1932. – Bd. 36.
2. *Maisin, Wassiliadis, Picard.* Essais d'organotherapie et de metallotherapie des cancers de la peau chez l'homme // *Bull. Assoc. franç. étude cancer.* – 1932. – 21, No 4. – P. 254.
3. *Потебня Г. П., Діденко Г. В., Дворценко О. С., Лісовенко Г. С., Потебня М. Г., Вотякова І. А., Василовська С. В.* Протипухлинна активність вакцин, виготовлених на основі ембріональних тканин та бактеріального глікопротеїду // *Доп. НАН України.* – 2006. – № 4. – С. 172–177.
4. *Діденко Г. В., Дворценко О. С., Потебня М. Г.* Исследование эффективности вакцин на основе эмбриональных тканей и гликопротеида *B. subtilis* В-7025 в эксперименте // *IV Съезд онкологов и радиологов СНГ.* – Баку, 2006. – С. 41.
5. *Филипович Ю. Б.* Практикум по общей биохимии. – Москва: Просвещение, 1975. – С. 75–76.
6. *Лэфковитс И., Пернис Б.* Методы исследований в иммунологии. – Москва: Мир, 1981. – С. 256–264.
7. *Ohno M., Abe T.* Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6) // *J. Immunol. Methods.* – 1991. – 145. – P. 199–203.
8. *Juranic Z. D., Neskovic-Konstantinovic Z., Stanojkovic T. P. et al.* The antitumor immune response in HER-2 positive, metastatic breast cancer patients // *J. Transl. Med.* – 2005. – No 3. – P. 13.
9. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – 227. – P. 680–685.
10. *Лажин Г. Ф.* Биометрия. – Москва: Высш. шк., 1980. – С. 293.

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

Надійшло до редакції 27.03.2007