

І. А. Болюх, Г. В. Діденко, Є. Г. Шпак, О. П. Кузьменко,
Г. С. Лісовенко, Г. П. Потебня

Роль БТШ-пептидних комплексів у конструюванні протипухлинних вакцин

(Представлено членом-кореспондентом НАН України В. Г. Ніколаєвим)

Одним із шляхів підвищення протипухлинної ефективності аутологічної вакцини є введення до її складу ксеногенного матеріалу, збагаченого білками теплового шоку (БТШ). Доведено антигенну гомологію БТШ з молекулярною масою 70 кДа, виділених із ксеногенної ембріональної та аутологічної пухлинної тканини. Досліджено протипухлинну ефективність вакцин, сконструйованих за допомогою БТШ-пептидних комплексів різного генезу. Дані вакцини за рівнем гальмування росту пухлинного вузла та антиметастатичним ефектом виявилися більш ефективними, ніж вакцини, виготовлені за традиційною технологією.

Імунотерапія пухлин має досить тривалу історію, але й досі не вирішені питання, важливі для практичного застосування протипухлинних вакцин (ПВ) — це імунологічна толерантність організму до пухлинних антигенів [1], а також поява і накопичення в організмі онкологічного хворого низки порушень системи імунобіологічного нагляду [2, 3]. Одним з успішних шляхів ефективного впровадження вакцинотерапії в онкологічну практику є поєднане застосування разом з ПВ імунотропних речовин природного походження [4], серед яких особливе місце займають білки теплового шоку (БТШ).

БТШ мають унікальні імуномодуючі властивості — по-перше, до них є рецептори на поверхні антигенпрезентуючих клітин, по-друге, вони, як шаперони, беруть участь у формуванні МНС-пептидних комплексів у пухлинних і антигенпрезентуючих клітинах. Крім того, вони стабілізують пухлинні антигени, утворюючи з ними міцні комплекси. При пухлинному процесі комплекси БТШ з пептидами клітини перебувають в клітинах практично постійно. Це дає підставу розглядати БТШ, з одного боку, як потужні стимулятори специфічної імунної відповіді, з іншого — як носії пухлинних антигенів [5]. Вплив високої температури (42–44 °С) на пухлинні клітини (ПК) призводить до підвищення експресії в них БТШ і, як наслідок, до підвищення імуногенності пухлинних антигенів, що стало основою для використання БТШ у різних технологіях виготовлення ПВ [6].

Ще одним способом підвищення ефективності ПВ є включення до її складу екстрактів ксеногенних ембріональних тканин, які містять велику кількість речовин, здатних стимулювати імунокомпетентні клітини [7]. Основними компонентами цих екстрактів є онкофетальні антигени, подібні до антигенів пухлин різного генезу. На нашу думку, можливість додавання ксеногенного матеріалу, збагаченого БТШ, до складу аутологічної ПВ посилить її імуногенність та дасть змогу створити більш ефективну вакцину.

Курячі ембріональні протеїни (КЕП) є зручним об'єктом для створення ксеногенної ПВ завдяки доступності матеріалу та відсутності в ньому патогенних для людини вірусів [8]. У попередніх дослідженнях нами було показано, що білкові екстракти з курячого ембріона (7-ї доби гестації) в імуноблот-тесті реагують із сироватками крові тварин з модельним

пухлинним процесом. Це стало підґрунтям для дослідження екстрактів з курячих ембріонів на наявність в них БТШ, адже спроба пошуку альтернативних джерел отримання БТШ для конструювання ефективних ПВ є важливою і актуальною задачею сучасної онкології.

Ми ставили за мету дослідити антигенну гомологію БТШ із ксеногенної ембріональної та аутологічної пухлинної тканини і вивчити протипухлинну ефективність вакцин, виготовлених за допомогою БТШ-пептидних комплексів, виділених з тканин різного генезу.

Об'єкти і методи дослідження. Дослідження проведені на мишах лінії C₅₇B1 (самці, 2,5 міс.) розводки віварію Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Утримання мишей та робота з ними здійснювались у відповідності до міжнародних прийнятих правил поводження з експериментальними тваринами. Для відтворення пухлинних моделей використовували клітини раку Ерліха (РЕ) та карциноми легені Льюїс (КЛЛ), які вводили мишам внутрішньом'язово в праву задню кінцівку в дозі $1 \cdot 10^6$ клітин в 0,3 мл фізіологічного розчину NaCl.

Індукцію БТШ у пухлинній тканині проводили шляхом прогрівання пухлини (до 1 см в діаметрі) при $43,0 \pm 0,30$ °C з експозицією 1 год на експериментальному генераторі (434 МГц, "Istok", Російська Федерація). Пухлинний матеріал одержували через 24 год після гіпертермії — в оптимальний термін накопичення БТШ у тканині [9]. Для виділення білкових екстрактів з пухлинної та ембріональної тканин використовували метод висолювання білків сульфатом амонію; для поділу отриманих білкових екстрактів на окремі складові використано методи колонкової хроматографії на Sephacryl S-100 [10] та іонообмінної хроматографії з використанням ДЕАЕ-целюлози [11]. Білковий склад фракцій оцінювали за допомогою SDS-електрофорезу (метод Леммлі). Відбір фракцій здійснювали за наявністю в них БТШ з молекулярною масою 70 кДа (БТШ-70), вміст даних білків підтверджували методом імуноблот-тесту з використанням моноклональних антитіл до БТШ-70 фірми ENZO (США).

За допомогою продукту синтезу *Bacillus subtilis B-7025* (бактеріального метаболіту з молекулярною масою 70 кДа (БМ70), який має цитотоксичну дію по відношенню до пухлинних клітин у системі *in vitro* [12], та білкових екстрактів з пухлин, які зазнали впливу гіпертермії і без неї, а також з екстракту КЕП сконструйовано ряд вакцин. ПВ готували, виходячи із розрахунку за білком (0,3 мг екстракту ПК або КЕП та 0,3 мг відповідного БМ70 *B. subtilis B-7025* на 1 мл вакцини). Імунізацію тварин починали на 2-гу добу після перещеплення пухлини, проводили чотириразово (2-га, 5-та, 12-та та 19-та доба), разова доза ПВ становила 0,2 мг (0,8 мг на весь курс вакцинації).

У першому експерименті на пухлинній моделі РЕ було сформовано групи: 1 — контроль пухлинного росту; 2 — вакцина на основі екстракту ПК (без гіпертермії) та БМ70; 3 — вакцина на основі екстракту ПК (підданих гіпертермії) та БМ70; 4 — вакцина на основі екстракту КЕП та БМ70.

В експерименті на моделі КЛЛ формували такі групи: 1 — контроль пухлинного росту; 2 — очищені БТШ-пептидні комплекси, отримані з КЕП; 3 — очищені БТШ-пептидні комплекси, отримані з КЛЛ; 4 — вакцина на основі очищених БТШ-пептидних комплексів, отриманих з КЕП та БМ70; 5 — вакцина на основі очищених БТШ-пептидних комплексів, отриманих з КЛЛ та БМ70; 6 — вакцина на основі очищених БТШ-пептидних комплексів, отриманих з КЕП, КЛЛ та БМ70.

Порівняння впливу ПВ на перебіг пухлинного процесу оцінювали за показниками росту первинного вузла, виживаністю тварин та гальмуванням розвитку метастазів. Розраховували індекси інгібіції метастазування в порівнянні з відповідним контролем.

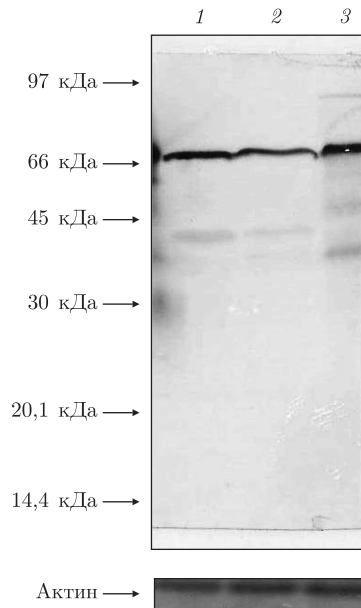


Рис. 1. Імуноблот-тест рівня БТШ-70 в ЕДТА-екстрактах, отриманих з пухлини (РЕ) після (1) і до (2) гіпертермії та ембріональних тканин курки (3)

Результати та їх обговорення. Перший етап роботи полягав у дослідженні наявності та визначенні рівня БТШ-70 в екстракті КЕП (7-ї доби гестації), а також порівнянні їх рівня з таким в ЕДТА-екстрактах ПК після гіпертермії. Варто зазначити, що попередньо нами було підтверджено наявність БТШ-70 у ЕДТА-екстрактах з клітин РЕ та показано, що гіпертермія пухлин сприяє збільшенню рівня БТШ-70 у 1,46 раза [13].

Методом імуноблот-тесту при дослідженні рівня БТШ-70 в ЕДТА-екстрактах КЕП виявлено досить високий його показник, що значно перевищував (у 1,68 раза) відповідний рівень у ЕДТА-екстрактах тканин РЕ, які попередньо піддавалися локальній гіпертермії (рис. 1). Ці дані можуть слугувати переконливим доказом доцільності використання ембріональних тканин курки як зручного джерела отримання БТШ-70 при конструюванні ПВ.

За допомогою продукту мікробного синтезу *B. subtilis B-7025* (БМ70) та білкових екстрактів пухлин (РЕ), які зазнали впливу гіпертермії та без неї, а також екстракту з курячих ембріонів (КЕП) нами було сконструйовано ряд вакцин. Важливим завданням було проаналізувати можливі зміни, які виникають під дією бактеріального метаболіту в білковому профілі екстрактів, та зміни рівня БТШ. Встановлено, що БМ70 не чинить негативного впливу на структурність та функціональну активність білків ПК і не призводить до істотного зменшення кількості БТШ-70 у всіх проаналізованих екстрактах (рис. 2).

При порівнянні протипухлинної активності сконструйованих ПВ встановлено, що вакцина на основі пухлинної тканини після гіпертермії та вакцина на основі КЕП має більш виражений протипухлинний ефект порівняно з вакциною, виготовленою на основі екстракту РЕ (без гіпертермії), що виявлялося в затримці розвитку первинної пухлини. Виживаність тварин, яким проводили вакцинацію, становила 90% (вакцина на основі ПК після гіпертермії) та 60% (вакцина на основі КЕП), що значно перевищує показники контролю, де виживаність становила всього 20%.

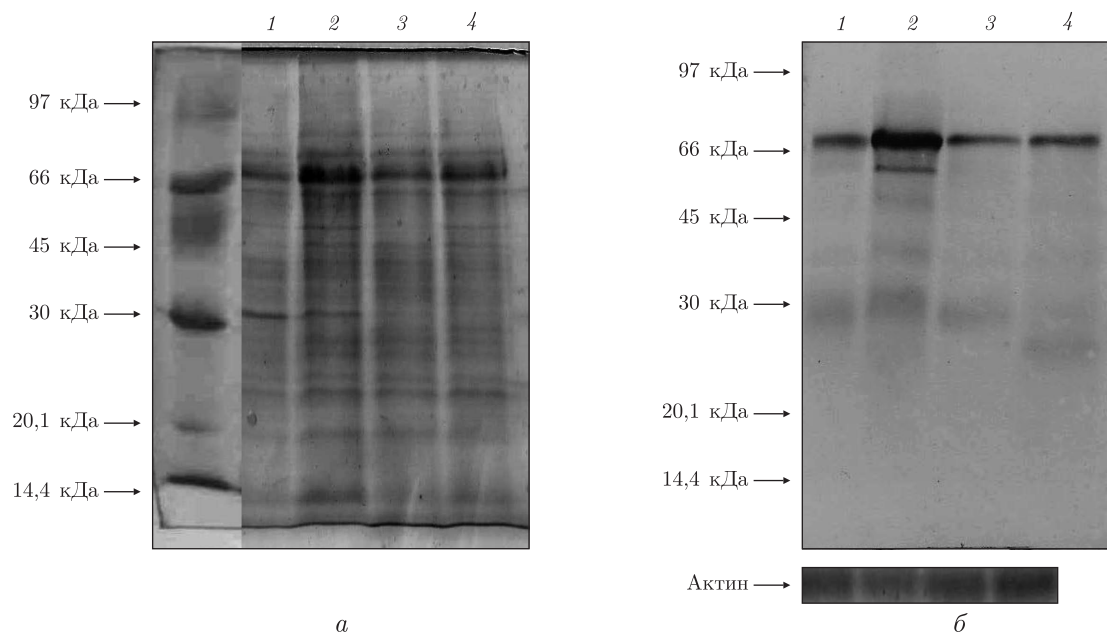


Рис. 2. Електрофореграми (а) та імуноблот-тест (б) змін білкового профілю екстрактів тканини РЕ під дією продукту мікробного синтезу *B. subtilis B-7025*: 1, 2 — до та після гіпертермії; 3, 4 — до та після гіпертермії з додаванням БМ70 *B. subtilis B-7025*

В рамках даного дослідження ми вважали доцільним визначити рівень БТШ-70 у зразках сироватки крові та пухлинної тканини тварин, які отримували різні варіанти вакцин. Досліджувані матеріали відбирали по закінченні експерименту (24-та доба після перещеплення пухлини). Встановлено, що у вакцинованих мишей, в яких зареєстровано виражений протипухлинний ефект, БТШ-70 в сироватці крові був практично відсутнім. На підставі цього можна зробити попереднє припущення, що рівень БТШ-70 в сироватці крові може зменшуватися при ефективній протипухлинній терапії. Також в ЕДТА-екстрактах пухлинних тканин, отриманих від тварин, яким проводили вакцинотерапію, спостерігалось значне зниження рівня БТШ-70 порівняно з його рівнем у мишей контрольної групи, що може слугувати маркером ефективності застосування протипухлинної терапії.

Переконавшись у перспективності застосування вакцин, створених за допомогою БТШ-пептидних комплексів, отриманих із ксеногенного та аутологічного матеріалу, ми вважали доцільним сконструювати та перевірити протипухлинну ефективність вакцини, створеної шляхом одночасного комбінованого використання БТШ-пептидних комплексів різного генезу. Тому наступний етап роботи складався з отримання очищених БТШ-пептидних комплексів з пухлинної тканини (КЛЛ) та екстракту курячих ембріонів. Для оцінки ступеня очищення білкових фракцій, збагачених комплексами “БТШ-пептид”, що є основним показником якості продукту, використовували методи електрофоретичного розділення та імуноблот-тесту (рис. 3).

Протипухлинну ефективність вакцин, виготовлених за допомогою очищених БТШ-пептидних комплексів з пухлинної та ембріональної тканин та БМ70 *B. subtilis B-7025* як ад’юванту, оцінювали на моделі КЛЛ (рис. 4). Терапію починали на другу добу після перещеплення КЛЛ та проводили за стандартною схемою. Мишей було поділено на групи, що отримували як чисті БТШ-пептидні комплекси, одержані з екстракту КЕП або клітин

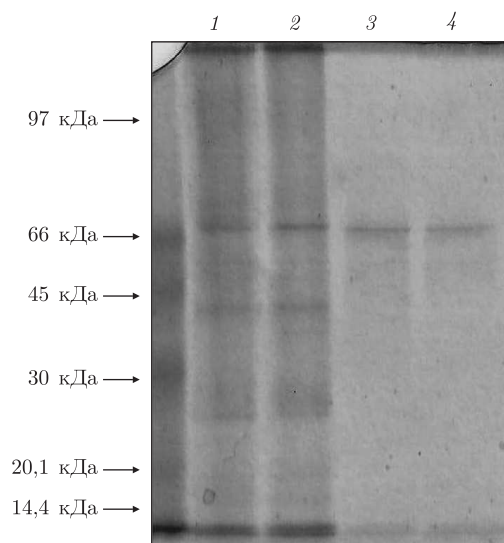


Рис. 3. Електрофореграма білкових екстрактів КЛЛ та екстракту курячих ембріонів до та після очищення: 1 – екстракт КЕП; 2 – екстракт КЛЛ після гіпертермії; 3 – екстракт КЕП після очищення; 4 – екстракт КЛЛ після очищення

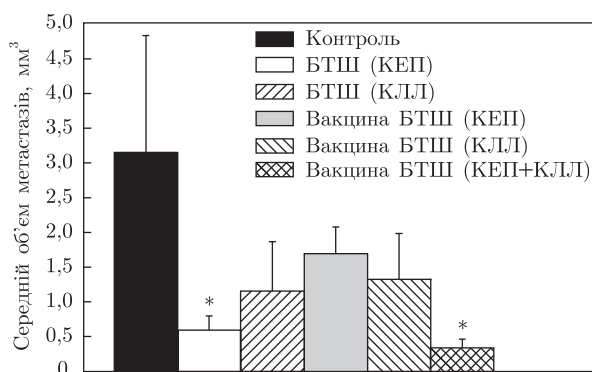


Рис. 4. Об'єм метастазів у тварин з перещепленою карциномою легені Льюїс (на 27-му добу), які одержували БТШ з аутологічної пухлинної тканини (КЛЛ) і ксеногенної ембріональної тканини (КЕП) або вакцини, виготовлені на їх основі за допомогою бактеріального ад'юванту

КЛЛ, так і вакцини, виготовлені на їх основі. Одна з груп одержувала ПВ, яка одночасно містила БТШ-пептидні комплекси з аутологічної пухлинної та ксеногенної ембріональної тканини.

З'ясувалося, що більш значимим терапевтичним ефектом характеризувалася саме вакцина, виготовлена на основі поєднання БТШ-комплексів, отриманих з ембріональної та пухлинної тканин, що менше виявлялося в гальмуванні росту первинного пухлинного вузла, однак антиметастатичний ефект був значно вираженим (див. рис. 4). Частота метастазування КЛЛ у легені після використання зазначеної вакцини зменшувалася до 17,5% ($p < 0,05$). Відповідні показники в контрольній групі становили 100%.

При аналізі даних середньої кількості та об'єму метастазів КЛЛ в легенях було встановлено, що застосування вакцин, виготовлених на основі аутологічних та ксеногенних БТШ-комплексів спричиняло істотне зменшення вказаних показників порівняно з невакци-

нованим контролем. Індекс інгібіції метастазування при застосуванні комбінованої вакцини був найвищим і становив 95,9%.

Таким чином, вакцина, сконструйована на основі аутологічних та ксеногенних БТШ-комплексів та БМ70 *B. subtilis B-7025*, характеризується статистично вірогідним гальмуванням кількості та частоти метастазування КЛЛ.

Згідно з результатами досліджень, білки, отримані з екстракту курячих ембріонів, є гомологічними за активними сайтами до БТШ-70, одержаних з пухлинної тканини після гіпертермічної обробки. При цьому рівень БТШ-70 в ембріональній тканині був значно вищим. Перевірка ефективності ПВ показала, що найбільш ефективною є вакцина, сконструйована на основі поєданого використання БТШ-пептидних комплексів (з ембріональної та пухлинної тканини), до яких додавали БМ70 *B. subtilis B-7025*. Отримані дані свідчать про перспективність подальшого дослідження даного типу вакцин, а саме застосування їх в різних схемах та на різних експериментальних моделях пухлинного росту.

1. Зуева Е. Б., Тунова Т. А., Зурочка В. А., Зурочка А. В. Определение параметров иммунной системы и уровней онкомаркеров у больных с различными синдромами иммунопатологии // Мед. иммунология. – 2011. – **13**, № 4–5. – С. 456–457.
2. Березная Н. М., Чехун В. Ф. Иммунология злокачественного роста. – Киев: Наук. думка, 2005. – 791 с.
3. Marigo I., Dolcetti L., Serafini P. et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells // Immunol. Rev. – 2008. – **222**. – P. 162–179.
4. Dubensky T. W. Jr., Reed S. G. Adjuvants for cancer vaccines // Semin. Immunol. – 2010. – **22**, No 3. – P. 155–161.
5. Шевцов М. А. Иммуномодулирующие свойства рекомбинантного белка теплового шока HSP в терапии опухолей головного мозга: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.03.04 / Ин-т цитологии РАН. – Санкт-Петербург, 2013. – 24 с.
6. Шевцов М. А., Хачатрян В. А., Маргулис Б. А. Применение белков теплового шока в клинической онкологии // Соврем. онкология. – 2012. – **14**, № 1. – С. 63–68.
7. Corocleanu M. A possible “universal” cancer vaccine that might cause an immune response against emerging cancer cells that originate from any tissue // Med. Hypotheses. – 2008. – **70**. – P. 381–383.
8. Пат. на корисну модель № 77647(UA). Спосіб одержання протипухлинної вакцини / Г.П. Потєбня, Г.В. Діденко, О.П. Кузьменко, Є.Г. Шпак, Г.С. Лісовенко, Н.Л. Черемшенко, Т.В. Симчич, В.Ф. Чехун. – Опубл. 25.02.2013, Бюл. № 4.
9. Осинский С. П. Гипертермия в клинической онкологии: современное состояние проблемы // Онкология. – 2002. – **4**, № 4. – С. 288–292.
10. Скоупс Р. Методы очистки белков. – Москва: Мир, 1985. – 358 с.
11. Barnard E. A. Hexokinase from yeast // Meth. Enzymol. – 1975. – No 42. – P. 6–20.
12. Діденко Г. В., Кузьменко О. П., Шпак Є. Г., Тавровська І. А., Надірашвілі М. А., Блюм І. О., Потєбня Г. П. Оптимізація методів виділення, електрофоретична характеристика та протипухлинна ефективність цитотоксичних метаболітів із фільтрату культуральної рідини *Bacillus subtilis B-7025* // Доп. НАН України. – 2012. – № 7. – С. 185–190.
13. Болюх І. А., Діденко Г. В., Шпак Є. Г., Кузьменко О. П., Лісовенко Г. С., Потєбня Г. П. Експериментальне обґрунтування застосування білків теплового шоку у вакцинотерапії злоякісних новоутворень // Клін. онкологія. – 2013. – № 2(10). – С. 143–146.

И. А. Болюх, Г. В. Диденко, Е. Г. Шпак, А. П. Кузьменко, Г. С. Лисовенко,
Г. П. Потебня

Роль БТШ-пептидных комплексов в конструировании противоопухолевых вакцин

Одним из путей повышения противоопухолевой эффективности аутологичной вакцины является введение в ее состав ксеногенного материала, обогащенного белками теплового шока (БТШ). Доказана антигенная гомология БТШ с молекулярной массой 70 кДа из ксеногенной эмбриональной и аутологичной опухолевой ткани. Исследована противоопухолевая эффективность вакцин, сконструированных с помощью БТШ-пептидных комплексов различного генеза. Данные вакцины по уровню торможения роста опухолевого узла и антиметастатическому эффекту оказались более эффективными, чем вакцины, изготовленные по традиционной технологии.

I. A. Boliukh, G. V. Didenko, E. G. Shpak, A. P. Kusmenko, G. S. Lisovenko,
G. P. Potebnya

Role of HSP-peptide complexes in the design of antitumor vaccines

One of the ways to improve the efficacy of autologous cancer vaccine is adding the xenogenic material enriched with heat shock proteins (HSP) to its formula. This paper describes the antigenic homology HSP with MM 70 kDa from xenogenic embryonal and autologous tumor tissues and the investigation of the antitumor efficacy of vaccines designed on the basis of HSP-peptide complexes of various geneses. These vaccines are found out to be more effective in terms of retardation of the growth of a tumor node and the antimetastatic effect than vaccines produced under the traditional technology.