

ЛИТВЯКОВ НИКОЛАЙ ВАСИЛЬЕВИЧ

**МЕХАНИЗМЫ ИММУНОТРОПНОГО И АНТИБЛАСТОМНОГО  
ДЕЙСТВИЯ ИНТЕРФЕРОНА, ВВОДИМОГО ПЕРОРАЛЬНО С  
ПОМОЩЬЮ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВЕКТОРА**

03.00.13 – физиология

14.00.16 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой  
степени кандидата биологических наук

Работа выполнена в Томском государственном университете и НИИ онкологии  
Томского научного центра СО РАМН

Научные руководители

доктор биологических наук, профессор

Гриднева Вера Ивановна

доктор биологических наук, профессор

Чердынцева Надежда Викторовна

Официальные оппоненты

доктор биологических наук, профессор

Суханова Галина Алексеевна

доктор биологических наук, профессор

Ветлугина Тамара Парфеновна

Ведущая организация НИИ физиологии СО РАМН г. Новосибирск

Защита состоится \_\_\_\_\_ в \_\_\_\_\_ часов, на заседании  
диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном  
медицинском университете (634050, г. Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке  
Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск, пр. Ленина,  
107)

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Бражникова Н.А.

### Общая характеристика работы

Актуальность. Входными воротами для большинства инфекций являются покровы слизистых трактов (желудочно-кишечного (ЖКТ), урогенитального, легочного). Индукция местного (локального) иммунного ответа является важной составляющей эффективной защиты организма от проникновения патогенных микробов во внутреннюю среду. Создание регионарного иммунитета в слизистой ЖКТ в ответ на поступление патогена является одним из первых этапов специфического ответа организма, предшествующих генерализованному иммунному ответу. В силу физиологической общности иммунной системы слизистых, стимуляция иммунокомпетентных клеток в ЖКТ приводит к активации иммунной системы других слизистых трактов (Хаитов Р.М. и др., 1997, Сетдикова Н.Х. и др., 1994, Беляков И. М., 1997). В последние годы показана эффективность иммунизации с помощью пероральных вакцин, ведутся исследования по созданию пероральных препаратов интерферонов (ИФН), интерлейкинов, гормонов и других биологически активных веществ (Воробьев А.А., 1993, 1996, 1999, Cummins J.M. et al, 1994, Zielenska W. et al, 1994 и др.).

Показано, что перорально вводимый человеческий ИФН 1 типа оказывает терапевтическое действие при аутоиммунных процессах вирусной этиологии и различных вирусных инфекциях, при этом следует отметить его высокую эффективность не только у людей, но и у различных видов животных (Cummins J.M. et al. 1995, 93, Tovey M.G. et al., 1999, Zielenska W., et al., 1993, Weiss R.C. et al, 1999, Brod S.A. et al, 1995, Beilharz M.W., et al., 1997, Georgiades J.A., 1993). Отмечается, что не высокие, а именно низкие дозы орально вводимого интерферона оказывают терапевтический и иммуномодулирующий эффекты на местном и системном уровне. Эти сведения дают основания полагать, что ИФН- $\alpha$ , доставляемый к ассоциированной со слизистой кишечника иммунокомпетентной ткани, воспроизводит физиологическую роль эндогенного ИФН, продуцируемого в организме в ответ на патогенное воздействие (Beilharz M.W., et al., 1997, Tompkins W.A., 1999). Интерферон, появляющийся в просвете кишечника при пероральном введении, реализует свою биологическую активность через контактное взаимодействие с рецепторами эпителиальных клеток слизистой и иммунокомпетентных клеток пейеровых бляшек. Полагают, что результатом этого взаимодействия является продукция эндогенного ИФН 1 типа и 2 типа ( $\gamma$ -ИФН) и обеспечение локального цитокинового микроокружения для формирования  $T_{H1}$  иммунного ответа (Beilharz M.W., et al., 1997, Tough D.F., et al., 1996, Tovey M.G. et al., 1999). Однако имеющиеся в литературе сведения по этому вопросу не дают четкого представления о механизмах системного терапевтического и иммуномодулирующего действия интерферона при его пероральном введении.

Разработка оральных форм интерферона продиктована необходимостью защиты лекарственной субстанции от деградирующего влияния протеолитического содержимого секретов слизистых трактов, при этом используются таблеточные, инкапсулированные и липосомальные формы. Альтернативным способом доставки интерферона к слизистым поверхностям

являются препараты на основе живых рекомбинантных бактерий, продуцирующих интерферон. В НИКТИ БАВ ГНЦ ВБ «Вектор» получен рекомбинантный штамм *B.subtilis* 2335pMBM105, в который введена генетическая информация, кодирующая синтез ИФН- $\alpha$  человека. На основе этого штамма, способного продуцировать интерферон- $\alpha$  *in vitro* и *in vivo* в тонком кишечнике, создан пробиотический препарат субалин (Белявская В.А., 1992, Сорокулова И.Б. и др.1996). Показано, что при пероральном введении субалин сохраняет антибактериальную активность исходной культуры и при этом оказывает значительно более выраженный противовирусный эффект. Терапевтическая эффективность субалина в отношении целого ряда вирусов, различающихся по патогенности, тропности, путям проникновения в организм, чувствительности к интерферону и другим защитным факторам организма, свидетельствует о широком спектре механизмов реализации его действия, которые практически не исследованы. Изучение механизмов системного действия интерферона, доставляемого к слизистой кишечника препаратом субалин, позволит дополнить наши представления о механизмах терапевтической эффективности перорально вводимого интерферона, а также о физиологической роли эндогенного ИФН, продуцируемого в кишечнике. Известно, что ИФН играет важную роль в патогенезе злокачественных новообразований, осуществляя как прямое противоопухолевое действие путем регуляции экспрессии онкогенов и пролиферации опухолевых клеток, так и модуляцию взаимодействия иммунной системы хозяина с опухолью. Есть сведения о способности ИФН повышать эффективность цитостатической терапии опухолей (Воронцова А.Л. и др., 1983, Novelli F. и др., 1996) и оказывать противоопухолевый эффект при введении *per os* (Tovey M.G., et al., 1999), что делает актуальным изучение антибластомной активности субалина.

Цель исследования. Оценка иммунотропной и противоопухолевой активности субалина, осуществляющего мукозальную доставку ИФН- $\alpha$ , и исследование механизмов его действия.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние субалина на иммунологические параметры и функциональную активность иммунокомпетентных клеток интактных животных.
2. Оценить механизмы иммунобиологического действия субалина.
3. На моделях экспериментальных злокачественных опухолей оценить противоопухолевую активность субалина, его способность модулировать эффективность цитостатической терапии и определить влияние субалина на процесс образования химически – индуцированных опухолей.
4. Исследовать иммуноопосредованные механизмы антибластомного и химиомодулирующего действия субалина.

Научная новизна. Впервые дана комплексная характеристика механизмов действия интерферона, вводимого перорально с помощью бактериального вектора, на различных уровнях: системном (иммунотропные эффекты и терапевтическое действие, включающее его противоопухолевую и антиметастатическую активность), органном (центральные и периферические

органы иммунной системы), клеточном (функциональная активность иммунокомпетентных клеток различных органов), молекулярном (продукция регуляторных цитокиновых молекул). Впервые выявлена противоопухолевая и антиметастатическая активность рекомбинантного пробиотика – суперпродуцента ИФН, а также показана его способность при пероральном введении повышать эффективность цитостатической терапии экспериментальных опухолей. Впервые охарактеризованы иммуноопосредованные механизмы противоопухолевого и химиомодулирующего действия ИФН-продуцирующего пробиотика; показана важная роль Мф и Т-лимфоцитов в реализации указанных эффектов.

Научно-практическая значимость. Полученные данные вносят вклад в развитие представлений о физиологической роли  $\alpha$ -ИФН, продуцируемого в кишечнике, и механизмах развития системных реакций организма при пероральном введении интерферона. Результаты работы углубляют и расширяют современные представления о механизмах терапевтической и иммуномодулирующей активности ИФН 1 типа при их пероральном использовании. Изучены механизмы иммуотропного действия пробиотика, продуцирующего человеческий  $\alpha$ -ИФН, что дает теоретическую базу для его патогенетически обоснованного применения.

Положения, выносимые на защиту

1. Пероральное введение ИФН, с помощью бактерий препарата субалин стимулирует функциональную активность неспецифических и специфических иммунокомпетентных клеток-эффекторов периферических органов иммунной системы.
2. Под действием экзогенного интерферона, доставляемого бактериями субалина к слизистой кишечника клетки иммунной системы организма синтезируют ИФН, который запускает продукцию комплекса эндогенных цитокинов, опосредующих взаимодействие иммунной системы кишечника и иммуноцитов периферических органов иммунитета.
3. Субалин способен оказывать ингибирующий эффект на процесс канцерогенеза и существенно повышает эффективность цитостатической терапии опухолей.
4. Антибластомное и химиомодулирующее действие субалина обусловлено противоопухолевой активацией клеток-эффекторов системы иммунитета и увеличением чувствительности клеток метастатических колоний к действию цитостатического препарата.

Апробация работы. Основные положения работы доложены и обсуждены на 4, 5, 7, 9-ой международной конференции «СПИД, рак и родственные проблемы» (С-Петербург, 1996, 1997, 1999, 2001), XXXVII международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 1999), на международной научной конференции студентов и молодых ученых «Современные проблемы фундаментальной и клинической медицины» СГМУ (Томск, 1999), на конференции «Региональные проблемы экологии и природопользования» (Томск, 1999), юбилейной конференции НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН «Проблемы современной онкологии» (Томск, 1999), XXXIX международной научной студенческой конференции «Студент и научно-

технический прогресс» (Новосибирск, 2001), 1 и 2-м конгрессе молодых ученых «Научная молодежь на пороге XXI века» (Томск, 2000,2001), на конференции «Актуальные проблемы инфектологии и паразитологии (Томск, 2001), на конференциях молодых ученых ТГУ «Старт в науку» (Томск, 1997, 1998), на итоговых конференциях НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН 1997 – 2001 гг., на международной конференции «Цитокины. Воспаление. Иммуитет» (С.-Петербург, 2002).

Публикации. По материалам работы опубликовано 25 печатных работ, из них 6 статей в центральной печати, 1 статья в зарубежном журнале и 13 публикаций в материалах международных конференций.

### **Материалы и методы**

Животные. В работе были использованы половозрелые мыши обоего пола в возрасте 8 - 14 недель, массой 16-22 г., разводки питомника НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН, следующих линий: BALB/c (H-2d), C57Bl/6j (H-2b), CBA/CaLac (H-2k), DBA/2j (H-2d), гибриды F1 CBAxС57Bl/6j, а также мыши BALB/c, несущие мутацию "nude", характеризующиеся врожденным отсутствием тимуса. Всего в экспериментах использовано 533 мыши.

Линии опухолевых клеток. Гематогенно-метастазирующая карцинома легких Льюис (LLC) солидный и асцитный варианты, асцитный вариант карциномы Эрлиха, клетки мастоцитомы Р-815 и клетки эритромиелолейкоза К-562, пассируемые общепринятыми методами.

Препараты. Субалин мышам вводили перорально с помощью зонда по  $5 \cdot 10^8$  микробных клеток (что соответствует 10 мг лиофилизированного препарата) в 0,5 мл воды, один раз в сутки, в течение 1-22 дней в зависимости от целей эксперимента. Циклофосфамид (Цф) использовали как стандартный цитостатический препарат в терапии экспериментальных опухолей. Мышам Цф вводили внутрибрюшинно в дозе 60 мг/ кг на 3-е и 7-е сутки после трансплантации опухоли (Балицкий К.П., 1991). Для элиминации клона чувствительных опухолевых клеток при длительном пассировании с циклофосфановой нагрузкой его использовали в дозе 100 мг/кг (по такой же схеме). Каррагенан использовался для ингибирования функциональной активности макрофагов *in vivo*, его вводили внутрибрюшинно в дозе 2 мг/ мышь в 0,5 мл физ. раствора на 1-е, 6-е и 11-е сутки после трансплантации опухоли (Гольдберг Е.Д. и др., 1992).

Оценка противоопухолевого и антиметастатического действия препаратов. Динамика роста опухолей оценивалась по изменению объема, который определяли по формуле Millar I.L.et al. (1980). Противоопухолевое влияние оценивали по торможению роста опухоли (ТРО):  $TPO = (V_o - V_k) / V_k \times 100\%$ , где  $V_k$  – объем опухоли в контроле,  $V_o$  – объем опухоли в опыте. Для оценки антиметастатического действия вычисляли индекс ингибиции метастазирования (ИИМ, %) и индекс торможения роста метастазов (ТРМ, %) по формулам:  $ИИМ = (A_k \cdot B_k - A \cdot B) / A_k \cdot B_k \times 100\%$ , где  $A_k, A$  – процент мышей с метастазами в контрольной и опытной группах,  $B_k, B$  – количество метастатических колоний в легких.  $ТРМ = (S_k - S_o) / S_k \times 100\%$ , где  $S_k, S_o$  – средняя площадь метастатических колоний в контрольной и опытной группах в  $мм^2$ .

Получение иммунокомпетентных клеток. Макрофаги получали, разделяя перитонеальный экссудат в градиенте плотности перколла по методу Hester R.V. et al. (1981). Спленциты получали общепринятым методом (Гольдберг Е.Д. и др., 1992). Для экспериментов использовали суспензии, содержащие 90-95% жизнеспособных клеток.

Тестирование функциональной активности иммунокомпетентных клеток.

Активность естественных киллерных клеток (ЕК клеток) определяли по их мембранотоксическому действию на клетки-мишени эритромиелолейкоза К-562 с использованием  $H^3$ -уридина (Рыкова М.Н. и др., 1981). Индекс мембранотоксичности вычисляли по формуле:  $ИМТ = (1 - O/K) * 100\%$ , где O – количество импульсов в опытных лунках, K – количество импульсов в лунках, где инкубировались одни клетки-мишени. Мембранотоксическую активность ЕК клеток селезенки выражали также в литических единицах (ЛЕ). За одну ЛЕ принимали такое количество клеток – эффекторов, которое лизует 30% клеток – мишеней (Гольдберг Е.Д. и др., 1992).

Цитостатическую активность макрофагов и спленцитов определяли по их способности подавлять пролиферацию клеток-мишеней мастоцитомы Р-815 и асцитного варианта LLC по методу Gadiot (1982) в модификации И.В. Богдашина (1989).

Цитолитическую активность макрофагов определяли по методу В.И. Селедцова и др. (1987) с использованием в качестве клеток-мишеней асцитного варианта LLC. Связывающую активность макрофагов оценивали по методу Adams D.O. et al. (1981), основанному на способности макрофагов образовывать конъюгаты с мечеными радиоактивными изотопами опухолевыми клетками-мишенями. В качестве клеток-мишеней использовали клетки мастоцитомы Р-815 и асцитного варианта LLC.

Пролиферативную активность лимфоцитов селезенки мышей оценивали в реакции бластной трансформации (Хоробрых В.В. и соавт., 1984) В качестве митогена, селективно стимулирующего Т-клетки, использовали фитогемагглютинин (ФГА, «Sigma») в конечной концентрации 20 мкг/мл, для стимуляции В-лимфоцитов – липополисахарид (ЛПС, «Sigma») в конечной концентрации 20 мкг/мл. Для активации лимфоцитов с хелперной или супрессорной активностью использовали конканавалин А (Кон-А «ПАНЭКО», Москва) в концентрации 10 и 20 мкг/мл соответственно.

Активность естественных супрессорных клеток определяли по подавлению пролиферации спленцитов, индуцированной Кон-А (Fu U.X. et al., 1991).

Математические методы. Характер взаимодействия применяемых агентов оценивали с помощью формулы Jackson R. Harrar A. (1979). Ожидаемый эффект сочетанного применения =  $A + (100 - A) * B / 100$ , где A – эффект первого воздействия, B – эффект второго воздействия. Если реальный эффект равен ожидаемому эффекту или превосходит его, то делают вывод о синергичном действии агентов. Для каждой выборки вычисляли среднее арифметическое, среднее квадратичное отклонение и среднюю квадратичную ошибку. Достоверность различий между выборками оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона – Манна – Уитни.

## Результаты и обсуждение

### *Оценка влияния субалина на клетки-эффекторы неспецифической резистентности.*

Субалин обладает высокой противовирусной активностью в отношении вируса гриппа, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, вируса венесуэльского энцефаломиелимита лошадей (ВЭЛ), при этом его эффективность существенно выше, чем у исходного штамма *V. subtilis* (Белявская В.А., 1992, Сорокулова И.Б. и др., 1997, Масычева В.И. и др., 1998). Эти вирусы различаются по патогенности, тропности к различным органам и путям проникновения в организм, чувствительности к интерферону и другим защитным факторам организма, поэтому терапевтическая эффективность субалина в отношении этих вирусов свидетельствует о широком спектре механизмов реализации его противовирусного действия, которые связаны с его способностью продуцировать ИФН- $\alpha$  в просвете тонкой кишки в непосредственной близости к лимфоидной ткани кишечника. Принимая во внимание важную роль неспецифических клеточных реакций в защите от вирусной инфекции, целесообразно полагать, что одним из механизмов реализации противовирусной активности субалина является активация клеток-эффекторов системы естественной цитотоксичности (ЕЦТ), а именно ЕК клеток и макрофагов (Мф).

Мы оценили динамику естественной киллерной активности (ЕКА) спленоцитов у мышей линии СВА, получавших субалин *per os* в течение 8 дней. Как видно на рисунке 1, введение субалина приводит к пику активности ЕК клеток на 2-й день и вызывает дополнительное повышение активности ЕК клеток селезенки на 8-е сутки, т.е. динамика ЕКА опытной группы носит циклический характер с периодом 6 дней и двумя максимумами на 2-е и 8-е сутки от начала введения субалина. Если учитывать, что время рециклинга ЕК клеток составляет примерно 7 суток, то очевидно, что повышение ЕКА спленоцитов мышей опытной группы на 1-е и 2-е сутки обеспечивается активацией субалином существующей в селезенке популяции ЕК клеток, а на 8-е сутки манифестируется ЕКА новой популяции.

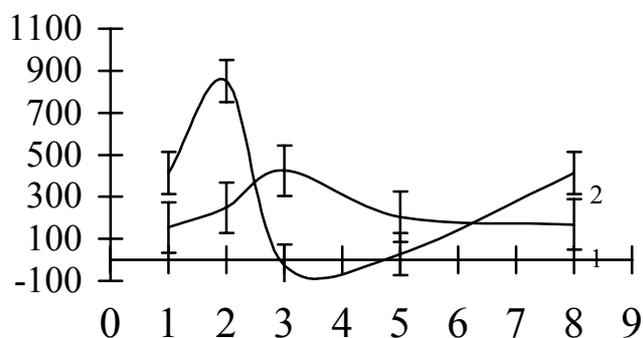


Рисунок 1. – Влияние субалина на активность естественных киллерных клеток селезенки мышей линии СВА.

Примечание: по оси абсцисс – сутки введения субалина; по оси ординат – активность естественных киллерных клеток селезенки, выраженная в литических единицах, ЛЕ; 1 – Контроль группа мышей, получавших перорально 0,5 мл воды 1 раз в сутки; 2 – Субалин группа мышей, получавших перорально субалин по  $5 \cdot 10^8$  микробных клеток в 0,5 мл воды 1 раз в сутки.

Одной из важных функций макрофагов является их способность подавлять пролиферацию опухолевых клеток (цитостатическое действие) или лизировать опухолевые клетки (цитотоксическое действие). Тестирование активности Мф в цитостатическом тесте отражает их противоопухолевый потенциал, т.е.

способность подавлять пролиферацию и лизировать опухолевые клетки при помощи цитокинов и цитотоксических факторов. Мы показали, что при курсовом (10-ти дневном) введении субалина более чем в 3 раза увеличивается цитостатическая активность перитонеальных макрофагов мышей C57Bl/6 (рис.2).

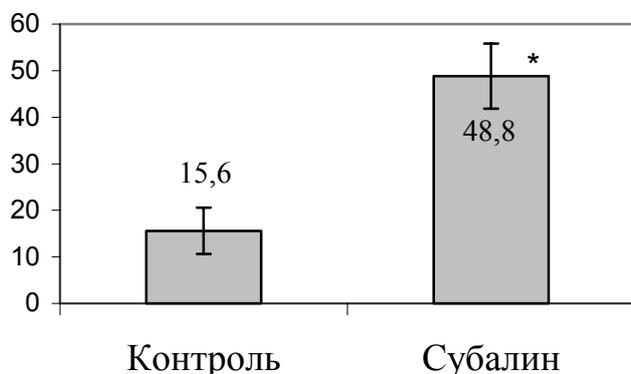


Рисунок 2. – Антипролиферативная активность перитонеальных макрофагов мышей C57Bl/6 после курсового введения субалина.

Примечание: по оси ординат – цитостатическая активность макрофагов по отношению к тест клеткам-мишеням мастоцитомы P-815, %; \* - различия достоверны с контролем ( $p < 0,05$ ).

Это может быть обусловлено как стимуляцией продукции цитокинов и других цитотоксических факторов, так и усилением способности макрофагов к связыванию с клеткой-мишенью, необходимого для акта цитолиза. Связывание Мф с опухолевыми клетками зависит от наличия рецепторов межклеточной адгезии на поверхности макрофагов, таких как CD54, CD29/CD49d, LFA-1, CD11b/18, CD11c/18, и лигандов этих рецепторов на поверхности опухолевых клеток (Александров А.В. и др., 1997, Балицкий К.П., 1991).

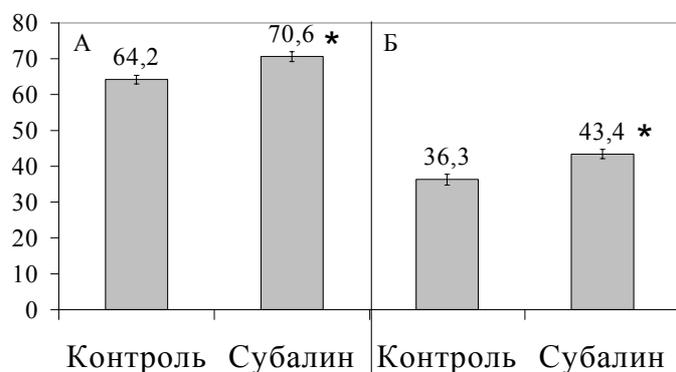


Рисунок 3. – Способность макрофагов мышей C57Bl/6, получавших субалин, связывать опухолевые клетки-мишени.

А – Связывание Мф с клетками мастоцитомы P-81. Б – Связывание Мф с сингенными клетками асцитного варианта LLC.

Примечание: по оси ординат индекс связывания макрофагов с клетками-мишенями, %; \* - различия достоверны с контролем ( $p < 0,05$ )

Наши исследования показали, что при введении субалина возрастает способность перитонеальных макрофагов связываться не только с аллогенными клетками-мишенями мастоцитомы P-815 (рис.3А), но также и с сингенными клетками-мишенями LLC (рис.3 Б.), что свидетельствует о способности субалина повышать экспрессию рецепторов межклеточной адгезии на поверхности макрофагов. В то же время, субалин не влияет на экспрессию адгезионных молекул на мембранах опухолевых клеток, так как мы не выявили уменьшения способности клеток-мишеней LLC связываться с макрофагами (данные не представлены). Это дает основание полагать, что увеличение связывания Мф с опухолевыми клетками при введении субалина обусловлено его влиянием на макрофаги, а не на клетки опухоли.

Таким образом, увеличение способности Мф связываться с клетками-мишенями является одним из механизмов стимуляции субалином их цитостатической активности.

Селезенка содержит практически все субпопуляции иммунокомпетентных клеток. Их цитостатическое действие связано с продукцией растворимых факторов – цитокинов: ИФН, ИЛ – 1, 2, 4, 6, 8, ФНО –  $\alpha$ , и др. (Кетлинский С.А. и др., 1995; Фрейдлин И.С., 1995), лизосомальных ферментов и синтезом иммуноцитами короткоживущих токсических факторов, таких как оксид азота, активные формы кислорода, продукты окисления арахидоновой кислоты (Маянский А.Н. и соавт., 1989; Маянский Д.Н. и соавт., 1990). Мы показали, что цитостатическая активность спленоцитов мышей С57В1/6, получавших субалин, увеличивается на 5-е сутки введения препарата (рис. 4), в то время как на 3-и сутки изменения антипролиферативной активности спленоцитов не отмечено (данные не представлены).

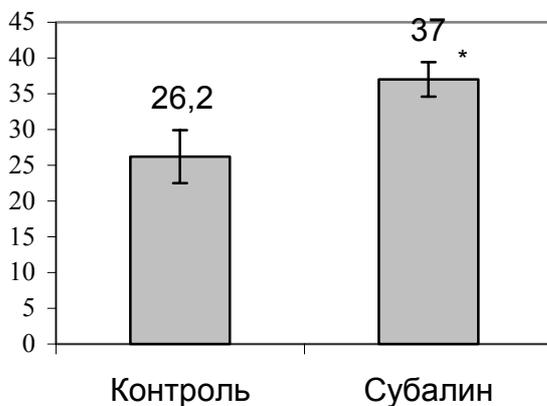


Рисунок 4. – Цитостатическая активность спленоцитов мышей С57В1/6, получавших субалин.

Примечание: по оси ординат – индекс цитостаза спленоцитов (%); \* - различия достоверны с контролем ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, пероральное введение интерферона с помощью бактерий субалина приводит к системной активации клеток-эффекторов ЕЦТ периферических органов иммунной системы, удаленных от ЖКТ. Субалин значительно стимулирует мембранотоксическую активность ЕК клеток селезенки мышей и антипролиферативную активность спленоцитов, повышает цитостатическую активность перитонеальных макрофагов, увеличивая при этом их способность к связыванию с клетками опухоли.

#### ***Действие субалина на эффекторы специфического иммунитета***

Одним из показателей функционального состояния эффекторов специфического иммунитета является их способность пролиферировать под действием митогенов, которая определяется в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ). Способность к пролиферации Т – и В – лимфоцитов определяет полноценность специфического иммунного ответа на антигены и необходима для формирования клона клеток памяти (Манько В.М. и др., 1997; Болдырева М.Н. и соавт., 1989; Хайтов Р.М., 2000).

Мы показали, что у мышей С57В1/6 после 5-ти кратного введения субалина наблюдается значительная стимуляция спонтанной и митоген – индуцированной пролиферации Т – и В – лимфоцитов селезенки (рис. 5).

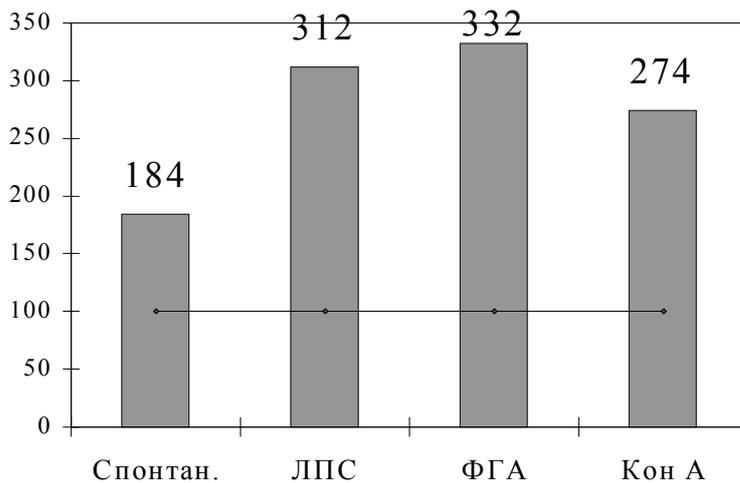


Рисунок 5 – Пролиферативная активность лимфоцитов селезенки мышей C57Bl/6, получавших субалин.

Примечание: по оси ординат величина пролиферативной активности спленоцитов мышей группы «субалин», выраженная в % по отношению контролю; различия с контролем достоверны для всех групп; Спонтанная – пролиферация спленоцитов без добавления митогенов, ЛПС – с добавлением липополисахарида; ФГА – с добавлением фитогемагглютинаина; Кон А – с добавлением конканавалина А.

Ранее нами были получены данные о пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови здоровых добровольцев, которые получали субалин в течение 7 дней. При этом не было выявлено существенного изменения спонтанной пролиферации, тогда как ответ лимфоцитов на ФГА был существенно усилен к 7-м суткам и сохранял высокий уровень до 14-го дня, т.е. через неделю после окончания приема субалина (Чердынцева Н.В. и соавт., 2001).

Для исследования влияния субалина на специфическую активность лимфоцитов мы использовали реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), которая позволяет оценить специфическую активность Th1 CD4+ клеток, а именно их способность формировать антиген – специфические клоны клеток памяти при сенсibilизации антигеном, и функциональную активность клеток памяти при повторной встрече с антигеном (Плейфэр Дж., 1998, Хаитов Р.М. и соавт., 1999).

Мышам C57Bl/6 субалин начинали вводить за двое суток до сенсibilизации эритроцитами барана и продолжали в течение 5 дней вплоть до введения разрешающей дозы антигена. Схема эксперимента предполагала оценить совокупный эффект влияния препарата как на стадию сенсibilизации – процесс образования клона антиген-специфических Т – лимфоцитов, так и на стадию разрешения – способность этих лимфоцитов при встрече с антигеном продуцировать провоспалительные и хемотаксические цитокины.

Было выявлено, что субалин достоверно увеличивает индекс реакции гиперчувствительности замедленного типа (рис.6.), что свидетельствует об усилении образования клона антиген – специфических Th1 CD4+ клеток и стимуляции их функциональной активности.

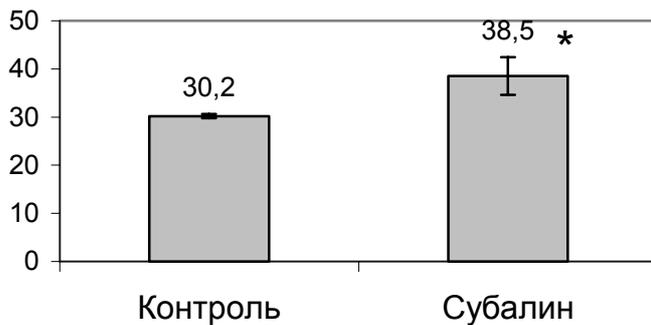


Рисунок 6 – Реакция ГЗТ у мышей C57Bl/6, получавших субалин.

Примечание: по оси ординат индекс реакции, %; \* - различия достоверны с контролем ( $p < 0,05$ )

Таким образом, пероральное введение интерферона с помощью бактерий препарата субалин приводит к системной активации клеток-эффекторов ЕЦТ и специфического звена иммунитета периферических органов иммунной системы, удаленных от ЖКТ, т.е. затрагивает все звенья иммунитета. Эти данные согласуются с представлениями о физиологической общности иммунной системы, при этом одним из первых органов, который отвечает на пероральное введение субалина, является селезенка, что обусловлено важной иммунобиологической ролью этого органа в периферической иммунной системе, в котором сходятся все пути миграции иммунокомпетентных клеток, и происходит созревание и дифференцировка многих популяций иммуноцитов. Остается открытым вопрос, как интерферон, продуцируемый бактериями субалина в кишечнике, оказывает столь мощное иммуностропное действие на уровне всей иммунной системы организма.

#### ***Механизмы иммуностропного действия субалина.***

Рядом исследователей было показано, что ИФН, вводимый орально в терапевтических дозах, действует локально в кишечнике не проникая в кроток, и АПК, макрофаги, Т-лимфоциты и ЕК клетки слизистой кишечника могут вырабатывать эндогенный  $\alpha$  – и  $\gamma$  – ИФН, в количествах, достаточных для создания цитокинового микроокружения, индуцирующего дифференцировку  $T_H$  1 типа и ЕК клеток, с помощью фактора ISG-15, ИЛ-18 и путем регуляции экспрессии рецепторов к ИЛ-12 (ИЛ-12  $\beta_1/\beta_2$ ) (Georgiades J.A. 1993, Lawson C.M., Veilharz M.W. 1999, Tovey M.G. et al 1999, Salasar-Mather T. et al., 1996). Tompkins W.A. (1999) предположила, что Т хелперные лимфоциты и ЕК клетки слизистой ЖКТ, дифференцированные и активированные под действием орально вводимого интерферона и эндогенного интерферона, мигрируют в периферические органы иммунной системы и слизистые оболочки и синтезируют цитокины, модулирующие активность иммунокомпетентных клеток этих органов. Белявской В.А. (1992) было показано, что  $\alpha$ -ИФН, продуцируемый бактериями субалина в кишечнике, также не проникает в кроток и его действие осуществляется локально на уровне слизистой кишечника. Тем не менее он индуцирует в организме мышей эндогенный  $\alpha$ -ИФН и  $\gamma$ -ИФН системно, в то время как бактерии исходного (не рекомбинантного) штамма не обладают такими свойствами. Уже в 1-2-е сутки после введения субалина титр  $\alpha$  – и  $\gamma$  – ИФН в сыворотке крови мышей достигает 160 МЕ/мл (80 МЕ/мл  $\alpha$ -ИФН и 80 МЕ/мл  $\gamma$ -ИФН). Эти данные согласуются с результатами, полученными Takayama S. et al.

(1997) о том, что при оральном введении  $\alpha$  – ИФН индуцирует синтез  $\alpha$ -интерферона не только на местном уровне в слизистой кишечника, но и системно. Продуцируемый клетками организма ИФН может активировать клетки-эффекторы периферических органов иммунной системы. Это подтверждается нашими данными: активность ЕК клеток селезенки мышей после 2-х введений субалина превышает активность ЕК клеток мышей контрольной группы более чем в 2,5 раза, но если спленциты мышей контрольной группы обработать реафероном перед инкубацией с клетками-мишенями (в дозе 160 МЕ/мл, которая соответствует концентрации ИФН в сыворотке крови мышей, получавших субалин), то их ЕК активность повышается до уровня таковой у мышей, получавших субалин *in vivo* (рис. 7).

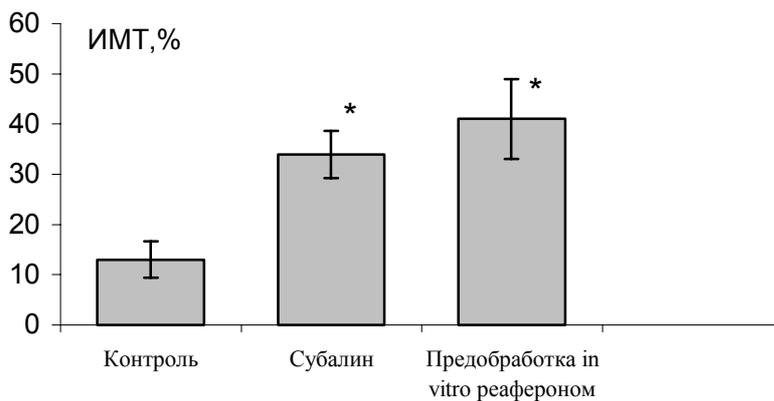


Рисунок 7. – Активность ЕК клеток селезенки мышей С57В1/6, получавших субалин и предобработанных *in vitro* реафероном в концентрации 160 МЕ/мл.

Примечание: \* - различия достоверны с контролем ( $p < 0,05$ ); по оси ординат – индекс мембранотоксичности киллерных клеток, %

У мышей линии BALB/c, не вырабатывающих эндогенный интерферон в ответ на субалин (Белявская В.А. 1992), не происходит активации ЕК клеток селезенки (данные не представлены). Таким образом, полученные данные свидетельствует о возможности активации клеток-эффекторов периферических органов иммунной системы эндогенным ИФН, который индуцируется при введении субалина.

$T_{H1}$ -лимфоциты и ЕК клетки под действием субалина могут мигрировать из слизистой кишечника в периферические органы системы иммунитета, например, в селезенку. Так, уже на 1-3-е сутки после введения субалина наблюдается значительное повышение клеточности селезенки мышей (табл. 1), и это не связано со стимуляцией пролиферации кроветворных клеток костного мозга, которая под действием субалина увеличивается только на 5-е сутки (рис. 8).

Таблица 1 - Изменение клеточности селезенки мышей при пероральном введении субалина ( $\bar{X} \pm m$ ).

Линия мышей	Группа	Клеточность селезенки, $\times 10^6$				
		1-е сутки	3-е сутки	5-е сутки	8-е сутки	10-е сутки
С57В1	Контроль	Н/о	166,4 $\pm$ 5,6	96,0 $\pm$ 8,4	Н/о	130,8 $\pm$ 8,5
	Субалин	Н/о	219,2 $\pm$ 15,6*	127,2 $\pm$ 6,8*	Н/о	205,6 $\pm$ 5,5*
СВА	Контроль	110,4 $\pm$ 8,3	155,6 $\pm$ 7,2	146,0 $\pm$ 12,0	176,8 $\pm$ 9,9	Н/о
	Субалин	148,4 $\pm$ 12,4*	182,0 $\pm$ 10,7*	196,4 $\pm$ 6,4*	212,8 $\pm$ 12,2*	Н/о

Примечание: \* - различия достоверны с контролем; Н/о - данные не определяли.

Мы предполагаем, что именно иммунокомпетентные клетки слизистой кишечника, стимулируя клетки крови и селезенки, запускают системную продукцию эндогенного ИФН, так как ранее нами было показано, что титр ИФН в сыворотке крови неуклонно повышается, начиная с первых суток введения субалина (Чердынцева Н.В., 1999). Такое экспоненциальное повышение титра ИФН свидетельствует о том, что синтез эндогенного ИФН регулируется по принципу положительной обратной связи и достаточно даже слабого воздействия, например, продукции цитокинов иммунными клетками слизистой кишечника, мигрировавшими в кровотоки, чтобы произошел запуск работы такой системы. Значительное повышение концентрации ИФН в крови уже в первые сутки введения субалина обеспечивает стимуляцию синтеза других цитокинов и клетки крови приобретают способность к продукции таких провоспалительных цитокинов, как ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-4 и ИЛ-2. На 3-й день введения субалина эта способность достигает максимального уровня и впоследствии снижается (Чердынцева Н.В. и соавт., 2001). На 5-е сутки отмечен синтез цитостатических цитокинов спленоцитами, на что указывает их способность к антипролиферативному действию на опухолевые клетки-мишени (рис. 4).

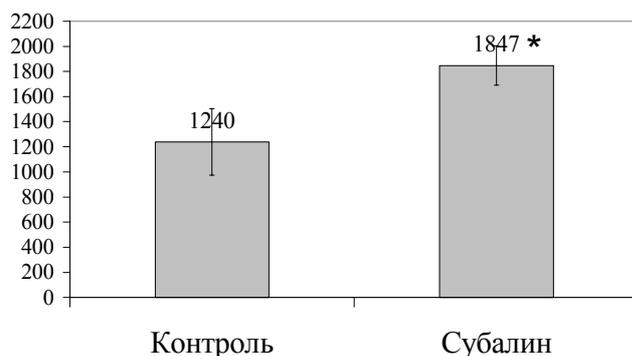


Рисунок 8. – Влияние субалина на пролиферацию клеток костного мозга мышей C57Bl/6.

Примечание: по оси ординат – уровень включения  $^3\text{H}$ -Тимидина в ДНК клеток костного мозга; \* - различия достоверны с контролем ( $p < 0,05$ ); мыши контрольной группы получали воду.

Регуляция синтеза эндогенного ИФН по принципу положительной обратной связи обеспечивается благодаря взаимно-индуцирующей активности  $\alpha$  – и  $\gamma$  – ИФН. Так,  $\alpha$ -ИФН, синтезируемый макрофагами и АПК, способен активировать синтез  $\gamma$ -ИФН Т-хелперными лимфоцитами и ЕК клетками, и наоборот (Ярилин А.А., 1997). Благодаря этому и возникает система  $\alpha$ -интерферон- $\gamma$ -интерфероновых взаимодействий с положительной обратной связью, которую способны активировать стимулированные под действием орального ИФН Т-лимфоциты и ЕК клетки слизистой кишечника. Эта система объединяет ИСС ЖКТ и иммунокомпетентные клетки крови и периферических органов. Работа системы интерферон-интерфероновых взаимодействий приводит к быстрому нарастанию в крови титра  $\alpha$ - и  $\gamma$ -ИФН, запускающих цитокиновый каскад и формирующий комплекс эндогенных цитокинов (КЭЦ), в который входят  $\alpha$ -ИФН,  $\gamma$ -ИФН, ФНО –  $\alpha$ , ИЛ – 1 $\beta$ , ИЛ – 4 и ИЛ – 2. КЭЦ активирует ЕК клетки селезенки на 1-е сутки введения субалина, усиливает созревание и дифференцировку ЕК клеток, что отражается в манифестации активности новой популяции на 8-е сутки введения субалина, стимулирует цитостатическую активность спленоцитов и перитонеальных макрофагов, усиливает

пролиферативную активность Т – и В – лимфоцитов, увеличивает созревание и функциональную активность клона антиген – специфических Т – лимфоцитов.

Известно, что нормальная работа любой системы, в том числе и иммунной, обеспечивается взаимодействием факторов, осуществляющих как позитивную, так и негативную регуляцию функционирования ее элементов. Приведенные выше результаты дают представления о механизмах стимуляции эффекторов системы иммунитета под действием субалина, однако остается открытым вопрос о его влиянии на супрессорные звенья. Считается, что универсальными клетками, регулирующими иммунные реакции являются Т-супрессорные лимфоциты (CD8+), которые продуцируют цитокины (например, ИЛ-6), ингибирующие иммунный ответ и тем самым, завершая его (Черешнев В.А. и соавт., 2001). Однако наши исследования показали, что субалин не оказывал влияния на активность Т-супрессоров (данные не представлены). Последние десятилетия внимание исследователей привлекают, так называемые естественные супрессорные клетки (ЕСК), которые обладают широкой иммуносупрессорной активностью. Иммуносупрессорная функция ЕСК проявляется в ингибировании иммунного ответа (Michelson J.D. et al., 1988, Saffran D.C. et al., 1991), пролиферативного ответа как Т - , так и В-лимфоцитов на антигенный или митогенный стимулы (Holda J.H. et al., 1990, Hoskin D.W. et al., 1992, Maes L.Y. et al., 1988), образования цитотоксических Т-лимфоцитов (Jamamoto H. et al., 1994, Sykes M. et al., 1988). Мы оценивали влияние субалина на активность ЕСК костного мозга по ингибированию Кон-А – индуцированной пролиферации лимфоцитов.

Как видно на рисунке 9, субалин более чем в 1,3 раза повышает ингибирующую активность ЕСК костного мозга. ЕСК мышей, получавших субалин в течение 5-ти дней, эффективно тормозят пролиферацию Т-хелперных лимфоцитов селезенки, которые являются одними из основных эффекторов, участвующих в реализации системных иммунотропных эффектов субалина. Вероятно, именно эти клетки являются основными регуляторами иммунных реакций, возникающих при введении субалина. Во взрослом организме основным местом локализации ЕСК является костный мозг, однако они обнаруживаются и в селезенке и за счет высокой миграционной активности способны мигрировать в другие периферические органы иммунной системы (Yoshida T. et al., 1991). Мы предполагаем, что ЕСК, активированные КЭЦ, мигрируют из костного мозга в селезенку и другие периферические иммунокомпетентные органы, где регулируют функциональную активность иммуноцитов.

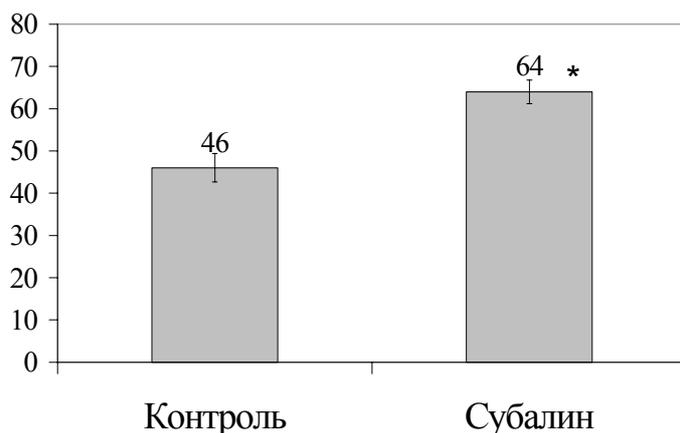


Рисунок 9. – Активность естественных супрессорных клеток костного мозга мышей С57В1/6, получавших субалин .  
Примечание: по оси ординат – индекс ингибирования Кон-А – индуцированной пролиферации спленоцитов, %; \* - различия достоверны с контролем ( $p < 0,05$ ).

Кроме этого мы выявили еще один механизм регуляции активности ЕК клеток при введении субалина, связанный с активностью макрофагов. Как уже указывалось, мы не зарегистрировали активации субалином ЕК клеток селезенки мышей на 3-е и 5-е наблюдения (рис.1) и это может быть обусловлено истощением зрелого пула ЕК клеток; с другой стороны известно, что макрофаги способны регулировать активность ЕК клеток (Филатова Н.А. и др., 1989, Uchida A. et al., 1984). Полученные нами данные о разнонаправленном изменении активности макрофагов (снижение) и ЕК клеток (повышение), при введении каррагенана мышам, получавшим субалин в течение 10 дней (рис.10), свидетельствуют о том, что макрофаги осуществляют регуляцию мембранотоксической активности ЕК клеток при введении субалина по механизму отрицательной обратной связи.

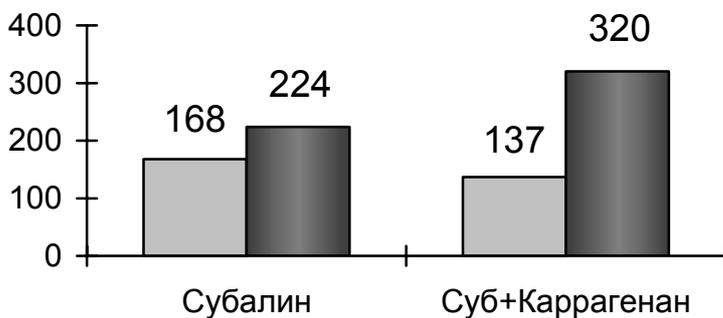


Рисунок 10. – Цитостатическая активность перитонеальных макрофагов и мембранотоксическая активность ЕК клеток селезенки мышей, получавших субалин и каррагенан.

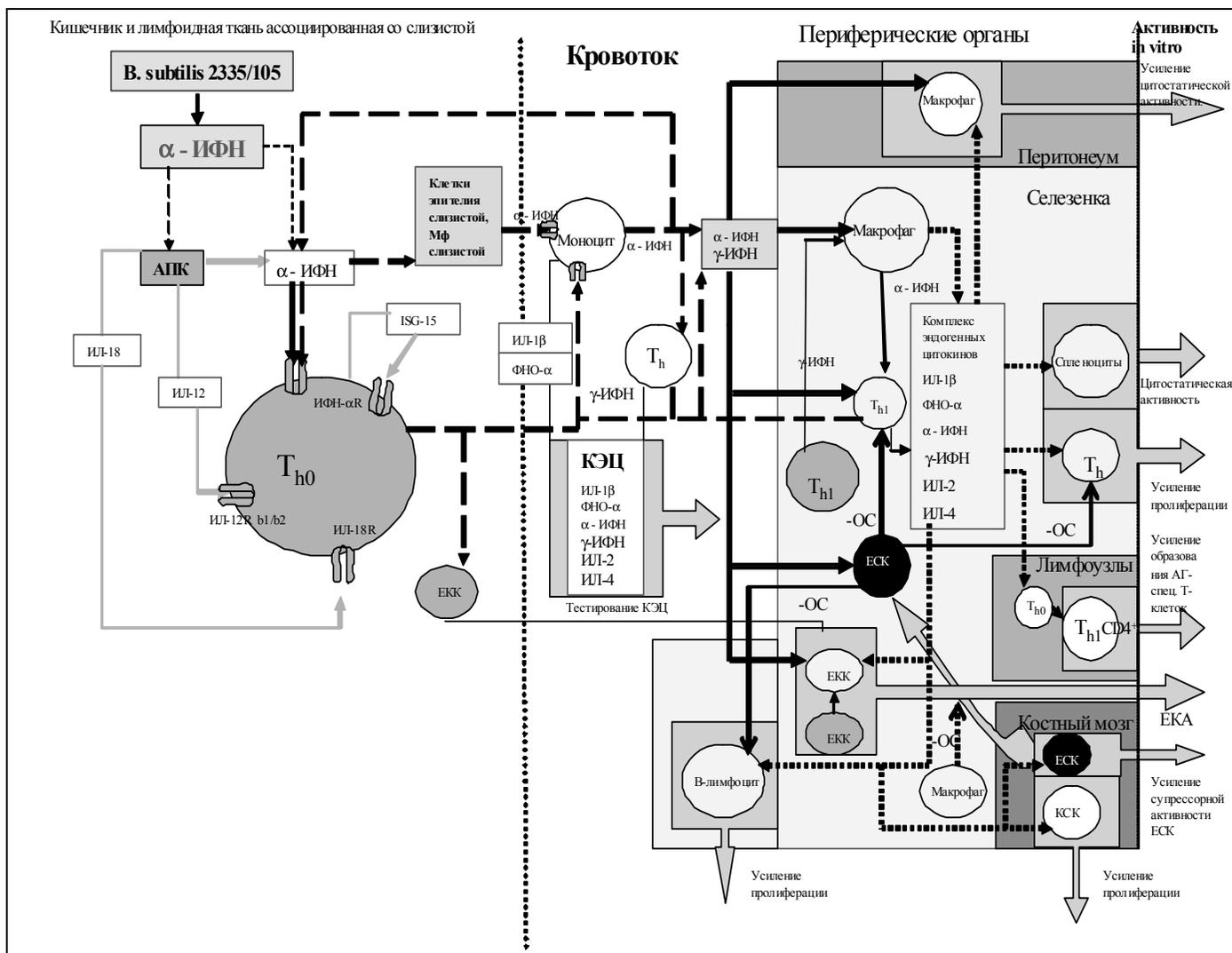
■ - мембранотоксическая активность ЕК клеток по отношению к клеткам эритромиелолейкоза К-562;

□ - антипролиферативная активность перитонеальных макрофагов по отношению к клеткам карциномы легких Льюис;

по оси ординат - изменение показателей в группе по отношению к контролю (мышь, получавшие воду),%; каррагенан мышам вводили внутривентриально в дозе 2 мг/кг на 2 и 6-е сутки от начала эксперимента.

Наши представления о механизмах взаимодействия иммунной системы слизистой кишечника и периферических органов иммунитета при пероральном введении интерферона с помощью бактерий субалина отражены на рисунке 11.

Таким образом, интерферон, продуцируемый бактериями субалина в кишечнике, индуцирует комплекс эндогенных цитокинов, который стимулирует функциональную активность как специфических, так и неспецифических клеток-эффекторов периферических органов системы иммунитета. Физиологическая связь между иммунной системой слизистой кишечника и периферическими органами иммунитета осуществляется благодаря интерферон-интерфероновой системе, активация которой запускается иммунокомпетентными клетками, мигрирующими из слизистой кишечника под действием интерферона, продуцируемого бактериями субалина. Подобные взаимоотношения очевидно также возникают под действием орально вводимого ИФН или ИФН, синтезируемого АПК кишечника при контакте с патогенами.



**УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ**

— первичный индукционный сигнал ИФН, продуцируемый бактериями субалина;  
 — интерферон-интерфероновая система с положительной обратной связью;  
 — вторичный индукционный сигнал – эндогенный  $\alpha$ - и  $\gamma$ -ИФН;  
 — паракринная активация иммунокомпетентных клеток периферических органов иммунной системы под действием комплекса эндогенных цитокинов; **тонкие сплошные стрелки** – регуляция активности иммунокомпетентных клеток, осуществляемая по принципу отрицательной обратной связи макрофагами и естественными супрессорными клетками.  
 Серые кружки – клетки иммунной системы слизистой ЖКТ  
 Квадрат со стрелкой – тестирование активности *in vitro*  
 Th0 – Т-хелпер 0 типа (предшественник)  
 Th1 – Т-хелпер 1 типа  
 Th2 – Т-хелпер 2 типа  
 ЕКК – естественная киллерная клетка  
 АПК – антигенпрезентирующая клетка  
 КСК – кроветворная стволовая клетка  
 ЕСК – естественная супрессорная клетка

Рисунок 11. – Механизм активации иммунокомпетентных клеток периферических органов иммунной системы при пероральном введении субалина.

### ***Противоопухолевое и химиомодулирующее действие субалина.***

Согласно современным представлениям о механизмах канцерогенеза, иммунологические факторы неспецифической и специфической природы играют важную роль в патогенезе опухолей и способны регулировать развитие опухолевого процесса. ИФН как ключевой цитокин, обеспечивающий взаимодействие и регуляцию неспецифического и специфического звеньев иммунитета, способен модулировать взаимоотношения организма и опухоли. Интерфероны могут повышать противоопухолевую активность эффекторных клеток системы иммунитета, оказывать прямое цитотоксическое и цитостатическое действие на опухолевые клетки, модифицировать состояние опухолевых клеток посредством ограничения их генетической нестабильности, регуляции реакций на ростовые факторы, потенцирования иммуногенности, подавления ангиогенеза и т. п. (Кинзирский А.С. 1995, Авдеев Г.И., и др., 1985, Славина Е.Г., 1984). Многие препараты интерферона и его индукторов с успехом применяются для терапии злокачественных новообразований и наиболее эффективны при злокачественных заболеваниях кроветворной и лимфоидной тканей, кожных опухолей различных локализаций и этиологии (Baron S. et al., 1992, Гаврилова И.Е., 1993, Авдеев Г.И. и др., 1985, Ершов Ф.И. 1996). Субалин является препаратом интерферонового ряда и в предыдущем разделе нами была показана его способность на системном уровне стимулировать функциональную активность эффекторов системы ЕЦТ и специфического иммунитета. Это делает целесообразным исследование противоопухолевых свойств субалина. В этой связи мы оценили противоопухолевую и антиметастатическую активность субалина на модели солидной метастазирующей опухоли.

Как показали наши исследования, субалин замедляет рост карциномы легких Льюис (LLC) в среднем на 35 %, ингибирование процесса метастазирования LLC составило 50 %, а торможение роста метастатических колоний 85,8%. Полученные нами данные позволяют говорить лишь об умеренной противоопухолевой и антиметастатической активности субалина, что, согласно экспериментальным критериям отбора противоопухолевых препаратов, принятых в СССР и США не дает основания рассматривать его как перспективный цитостатический препарат (Софьина З.Г. и др., 1979, Акимов А.А. и соавт., 1994). Однако, ИФН – продуцирующая активность субалина и его стимулирующее влияние на различные звенья противоопухолевой защиты организма делают целесообразным исследование способности субалина модулировать эффективность цитостатической терапии. Мы оценили эффективность его совместного применения с цитостатиками в лечении экспериментальных опухолей у мышей.

В группе мышей, получавших циклофосфан (ЦФ) и субалин, отмечается наиболее выраженное торможение роста первичного опухолевого узла -  $79,0 \pm 1,9\%$  по сравнению с  $52,0 \pm 5,3\%$  в группе «ЦФ» ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

При этом было отмечено уменьшение частоты метастазирования (процент животных с метастазами) и его интенсивности (среднее число легочных метастазов на мыш) и, соответственно, повышение индекса ингибиции метастазирования (ИИМ) до 98% по сравнению с 80% в группе «ЦФ» (табл.3). Эти данные указывают на выраженный цитотоксический эффект (т. е. способность предотвращать

появление метастазов) комбинации препаратов.

Таблица 2. - Влияние сочетанного применения ЦФ и субалина на рост карциномы легких Льюис у мышей C57B1/6.

Группы	Торможение роста опухоли (ТРО), % (дни)**							Среднее ТРО, %	Масса опухоли, г
	9**	10	11	12	13	14	15		
Контроль	—	—	—	—	—	—	—	—	2.24±0.33.
ЦФ	59	62	67	42	47	46	40	52.0±5,3	0.96±0.24
ЦФ-Суб	73*	86*	83*	83*	76*	77*	73*	79,0±1,9*	0,82±0.18

Примечание: во всех группах различия с контролем достоверны; \* — различия достоверны с группой ЦФ ( $p < 0,05$ ); \*\* - дни после трансплантации LLC.

Таблица 3. – Влияние сочетанного использования ЦФ и субалина на метастазирование карциномы легких Льюис у мышей C57B1/6.

Группа	% животных с метастазами	Среднее число метастазов	Средняя площадь метастазов, мм <sup>2</sup>	ИИМ, %	ТРМ, %
Контроль	100	19,4±5,0	3.5±1.3		-
ЦФ	75	5,0±3,0	0,3±0,4	80,5	90,6
ЦФ+Суб	29*	1,0±0,4*	0,1±0,1*	98,5*	98,8*

Примечание: во всех группах различия с контролем достоверны; \* — различия достоверны с группой ЦФ ( $p < 0,05$ )

Существенное снижение суммарной площади метастатических колоний в легких и увеличение индекса торможения роста метастазов (ТРМ) в группе «ЦФ+Суб» (см. табл. 3.), свидетельствуют о высоком цитостатическом действии (т.е. способности ингибировать рост уже имеющихся метастазов) сочетания этих препаратов по сравнению с монотерапией циклофосфаном. Анализ полученных данных, с помощью формулы Jackson R., Harrap A. (1979) свидетельствует о синергичном характере взаимодействия субалина и ЦФ в их антиметастатической активности.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о способности субалина оказывать умеренное противоопухолевое и антиметастатическое действие и увеличивать эффективность цитостатической терапии злокачественных опухолей.

Описанные ранее и в настоящей главе свойства субалина, а именно — его иммуномодулирующая активность, противоопухолевое и антиметастатическое действие, способность повышать эффективность цитостатической терапии, — позволяют рассматривать его как модификатор биологических реакций и делают перспективной оценку возможности его применения в мультимодальной терапии злокачественных новообразований.

### ***Механизмы антибластомного и химиомодулирующего действия субалина***

Принимая во внимание сложную природу препарата субалин, который представляет собой микробные клетки, продуцирующие интерферон, и обладает интерферогенной активностью, нельзя однозначно указать действующее начало этого препарата, оказывающее антибластомное действие. Мы оценили противоопухолевую активность субалина на модели карциномы Эрлиха у мышей линии BALB/c. Мыши линии BALB/c характеризуются низкой способностью вырабатывать эндогенный интерферон при введении субалина (Белявская В.А и др. 1996) и на данной модели эндогенный ИФН, как эффекторное начало субалина, не работал. Мы сравнивали противоопухолевую активность субалина и биоспорина – пробиотика на основе исходного штамма *B. subtilis*, не обладающего интерферон-продуцирующей и интерферогенной активностью. Таким образом, в данном эксперименте мы могли оценить влияние только одного эффекторного механизма субалина, а именно - продуцируемого *B. subtilis* 2335/105 рекомбинантного  $\alpha$ -2-ИФН. Отсутствие противоопухолевого эффекта субалина и биоспорина на данной модели дает основания полагать, что противоопухолевый и антиметастатический эффект субалина, полученный нами на модели LLC у мышей C57Bl/6, опосредуется эндогенным ИФН, запускающим продукцию эндогенных цитокинов и системные клеточные реакции организма.

Нам не удалось выявить ингибирующего действия субалина на рост карциномы легких Льюис, перевитой бестимусным мышам nude, что свидетельствует о вовлечении Т-системы в его антибластомный эффект. При этом очевидно определяющим моментом является дефицит продукции Т-лимфоцитарного  $\gamma$ -ИФН, необходимого для работы  $\alpha$ -интерферон –  $\gamma$ -интерфероновой системы, осуществляющей, по нашему мнению, взаимодействие иммунной системы слизистой кишечника и периферических органов системы иммунитета, при пероральном введении субалина, и развитие системных иммунотропных эффектов. Можно полагать, что важную роль в реализации антибластомного действия субалина играет его системная иммунотропная активность, в частности, способность активировать макрофаги и ЕК, которым принадлежит важная роль в противоопухолевой защите организма (Дейчман Г.Г., 1984, Славина Е.Г., 1983, Black P. et al., 1993, Markovic S. et al., 1991).

У мышей с карциномой легких Льюис, получавших субалин, отмечено существенное усиление цитостатической и цитолитической активности перитонеальных макрофагов в отношении клеток этой опухоли (табл. 4.), что непосредственно указывает на участие макрофагов в реализации антибластомного действия субалина.

Если ингибировать функциональную активность макрофагов у мышей с помощью каррагенана, отмечается существенная стимуляция интенсивности метастазирования и увеличение размеров метастатических колоний в легких по сравнению с показателями животных, которым вводили только субалин и не ингибировали активность макрофагов (рис. 12). Эти результаты дают основания считать, что антиметастатическое действие субалина обусловлено противоопухолевой активацией макрофагов.

Таблица 4. - Цитотоксическая активность перитонеальных макрофагов и ЕК клеток селезенки мышей С57В1/6 с карциномой легких Льюис, получавших субалин. ( $\bar{X} \pm m$ )

Группа	ИЦС Мф % (клетки-мишени Р-815)	ИЦС Мф % (клетки-мишени LLC)	ИЦЛ Мф % (клетки-мишени LLC)	ИМТ ЕК клеток, %	Литическая активность ЕК клеток, ЛЕ
	15-е сутки	10-е сутки	10-е сутки	10-е сутки	10-е сутки
Контроль	41,6±9,4	37,6±6,0	30,3±2,0	10,0±1,8	119±26
Субалин	66,9±2,0 *	62,2±5,4 *	37,8±1,4 *	22,4±4,5*	536±99*

Примечание: \*- различия достоверны с контролем ( $p < 0,05$ ); ИЦС – индекс цитостазиса; ИЦЛ – индекс цитолитизиса; ИМТ – индекс мембранотоксичности.

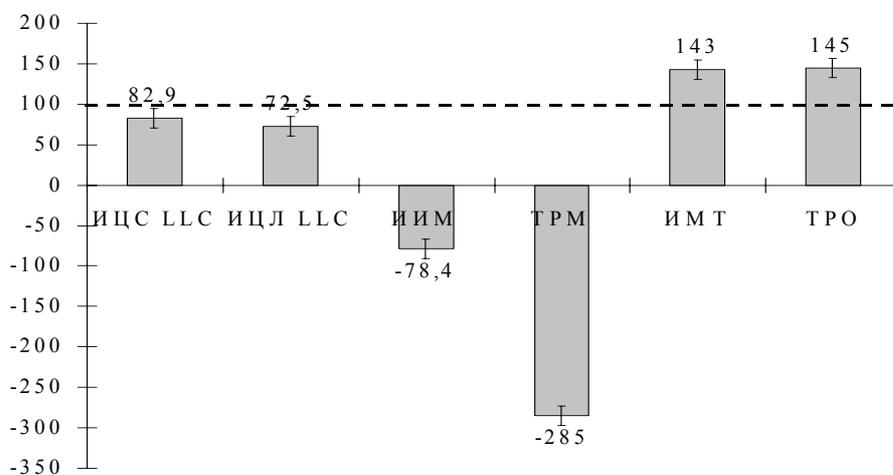


Рисунок 12. – Влияние каррагенана на метастазирование LLC и противоопухолевую активность макрофагов и ЕКК у мышей, леченных субалином.

Примечание: по оси ординат значение индексов опытных групп в % от контроля; контроль - мыши, получавшие субалин; ИЦС (ИЦЛ) LLC - индекс цитостатической (цитолитической) активности перитонеальных макрофагов по отношению к клеткам - мишеням LLC; ИИМ - индекс ингибции метастазирования, отражающий частоту и интенсивность метастазирования LLC (отрицательный знак ИИМ указывает на стимуляцию частоты и интенсивности метастазирования); ТРМ - индекс торможения роста метастазов, отражающий изменение размеров метастатических колоний в легких (отрицательный знак ТРМ указывает на увеличение размеров относительно контрольной группы); ИМТ - индекс мембранотоксической активности ЕК клеток селезенки; ТРО - индекс торможения роста первичного опухолевого узла LLC.

Курсовое введение субалина мышам с карциномой легких Льюис привело на 10-е сутки к существенному повышению клеточности селезенки, естественной киллерной активности спленоцитов, и, как следствие - общей литической активности селезенки (табл. 4.). Интересен тот факт, что стимуляция метастазирования LLC при введении ингибитора макрофагов мышам, леченных субалином, сочетается с ингибцией роста первичной опухоли (рис.12) и это ассоциировано с повышением ЕКА спленоцитов на фоне снижения активности Мф. Эти данные дают основания полагать, что ингибирующее действие субалина на рост первичной опухоли обусловлено противоопухолевой активацией ЕК клеток. В целом представленные данные свидетельствуют, что антибластомное действие

субалина связано с активацией макрофагов и естественных киллеров. Эти механизмы могут вносить вклад в усиление противоопухолевого и антиметастатического эффекта при сочетанном использовании циклофосфана и субалина. Наши исследования показали, что субалин изменял функциональное состояние перитонеальных макрофагов мышей с карциномой легких Льюис, подвергавшихся цитостатической терапии, восстанавливая их способность оказывать антипролиферативное действие на опухолевые клетки-мишени, которая практически отсутствовала у макрофагов мышей, леченных циклофосфаном (данные не представлены).

Синергичный характер взаимодействия субалина и Цф позволяет предполагать возможность повышения чувствительности опухолевых клеток к Цф под действием ИФН, продуцируемого субалином. Для проверки этого предположения мы получили штамм циклофосфан-резистентной карциномы легких Льюис. LLC пассировали на мышах, которым вводили циклофосфан по общепринятой схеме в дозе 100 мг/кг. После 13-ти пассажей клетки карциномы легких Льюис оказались полностью не чувствительными к Цф. Длительная циклофосфановая нагрузка привела к клональной селекции популяции опухолевых клеток и элиминации чувствительного клона клеток. На следующем этапе мы сравнили противоопухолевое действие на циклофосфан - резистентную опухоль комбинации препаратов субалина и циклофосфана и субалина. В группе «Цф+субалин» отмечено существенно большее ингибирование образования (ИИМ) и роста (ТРМ) метастатических колоний Цф - резистентной опухоли в легких (табл. 5).

Таблица 5. – Метастазирование циклофосфан – резистентной опухоли при совместном введении ЦФ и субалина ( $\bar{X} \pm m$ ).

Группа	Среднее число метастазов	Средняя площадь метастазов, мм <sup>2</sup>	ИИМ, %	ТРМ, %
Контроль	82,5±4,34	1,509±0,588	-	-
ЦФ	64,0±13,7	1,077±0,529	22,4	28,6
ЦФ+Субалин	35,2±6,44* **	0,379±0,023* **	57,4* **	74,9* **
Субалин	58,0±3,30*	0,699±0,050*	28,5	53,7*

\*-различия достоверны с контролем ( $p < 0,05$ ), \*\* - различия достоверны с группами ЦФ и Субалин ( $p < 0,05$ ).

Цф, изначально не оказывающий антиметастатического эффекта на клетки резистентной LLC, в комбинации с субалином начинает проявлять антиметестатическое действие. Это свидетельствует о том, что субалин повышает чувствительность клеток метастатических колоний к циклофосфану, т.е. проявляет химиосенсибилизирующие свойства.

Таким образом, одним из механизмов модуляции субалином антиметастатической активности циклофосфана, является его способность повышать чувствительность метастатических клеток к цитостатику.

Полученные результаты дают основания полагать, что антибластомное действие субалина связано с активацией макрофагов и натуральных киллеров и невозможно без участия системы Т-лимфоцитов. Способность субалина повышать эффективность цитостатической терапии связана с его противоопухолевым и антиметастатическим действием и определяется теми же механизмами. Наряду с

иммунологическими механизмами важную роль в увеличении субалином антиметастатической активности циклофосфана играет повышение чувствительности опухолевых клеток к его действию, а также способность субалина восстанавливать эффекторные функции макрофагов, с цитотоксической активацией которых связана его антиметастатическое действие. Не исключено и прямое антипролиферативное действие эндогенного ИФН и других цитокинов на опухолевые клетки и модификация их мембранных структур.

Широкий спектр иммунобиологической активности субалина, его антибактериальные и противовирусные свойства, способность при пероральном введении оказывать системные иммуностропные эффекты, позволяют рассматривать субалин как перспективное иммуномодулирующее средство при лечении иммунодефицитных состояний, различных заболеваний инфекционной природы. Несомненную перспективность представляет собой дальнейшее изучение субалина с целью его использования в комплексной терапии рака, в качестве препарата интерферонового ряда, обладающего такими преимуществами, как способность к суперпродукции ИФН, безынекционный путь введения, практическое отсутствие побочных реакций, возможность длительного постоянного или дробного курсового использования.

## ВЫВОДЫ

1. Введение субалина перорально повышает активность естественных киллеров и цитостатических эффекторов селезенки, цитостатическое действие перитонеальных макрофагов, стимулирует пролиферативную активность Т – и В – лимфоцитов, ускоряет формирование антиген – специфического клеточно–опосредованного иммунного ответа.
2. Физиологическая связь между иммунной системой слизистой желудочно-кишечного тракта и периферическими органами иммунитета, при оральном введении субалина, осуществляется благодаря способности продуцируемого им интерферона индуцировать в организме синтез эндогенного интерферона и комплекса цитокинов, которые вызывают системную активацию иммунокомпетентных клеток.
3. Субалин умеренно ингибирует рост и метастазирование перевивных злокачественных опухолей, существенно повышает эффективность их цитостатической терапии, а также замедляет возникновение и развитие химически – индуцированных новообразований.
4. Антибластомное действие субалина связано с активацией макрофагов и естественных киллеров и невозможно без участия системы Т-лимфоцитов. Антиметастатическая активность субалина преимущественно обусловлена активацией макрофагов к цитотоксическому действию, а его ингибирующее действие на рост первичного опухолевого узла ассоциировано с противоопухолевой активацией ЕКК.
5. Способность субалина повышать эффективность цитостатической терапии связана с его активирующим действием на эффекторы неспецифической резистентности и увеличением чувствительности клеток метастатических колоний к циклофосфану.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Cherdyntseva N., Belyavskaya V., Litvyakov N., Schepetkin I., Makarkin N. The prospects for using a recombinant probiotic subalin in treatment of cancer. /5<sup>th</sup> International expert forum «On immunotherapy and gene therapy».-Jerusalem, 1996.-P.143.
2. Чердынцева Н.В., Щепеткин И.А., Литвяков Н.В., Белявская В.А. Рекомбинантные сапрофиты в терапии злокачественных новообразований. /Материалы 4-ой международной конференции «СПИД, рак и родственные проблемы».-С-Петербург, 1996.-С.97.
3. Чердынцева Н.В., Литвяков Н.В., Масычева В.И., Смольянинов Е.С., Белявская В.А. Модуляция противоопухолевой активности циклофосфана рекомбинантным пробиотиком субалином./Материалы 5-ой международной конф. «СПИД, рак и родственные проблемы».-С-Петербург, 1997.- С.172.
4. Чердынцева Н.В., Литвяков Н.В., Смольянинов Е.С., Белявская В.А., Масычева В.И. Модуляция противоопухолевой активности циклофосфана рекомбинантным пробиотиком субалином.//Вопросы онкологии.-1997.-Т.43.-№3.-С.313-316.
5. Литвяков Н.В., Белявская В.А., Бабышкина Н.Н., Чердынцева Н.В. Некоторые механизмы противоопухолевого действия субалина- микробиотика, продуцирующего альфа2- интерферон./ Материалы юбилейной конференции «Медико-биологические аспекты нейро-гуморальной регуляции».- Томск, 1997.- С.33-34.
6. Tcherdyntseva Nadejda Victorovna, Smoljaninov Eugeny S., Litvjakov Nikolay V., Kokorev Oleg V., Kuznetsova Aksana A. The improvement of cytostatic drugs efficacy by biological response modifiers of different origin./17<sup>th</sup> International Cancer Congress.- Rio de Janeiro, Brazil, 1998. - P. 44.
7. Чердынцева Н.В., Литвяков Н.В., Белявская В.А., Сорокулова И.В., Смольянинов Е.С. Основные механизмы антибластного действия субалина - пробиотика продуцирующего альфа2-интерферон./Материалы 6-ой международной конф. «СПИД, рак и родственные проблемы». С.-Петербург, 1998.- Т.2.-№2.-С.56-57.
8. Tcherdyntseva N.V., Litvjakov N.V., Belyavskaya V.A., Smolyaninov E.S., Sorokulova I.V. Probiotic Drug Subalin Modulates the Antitumor Activity of Cyclophosphamide. //Sensitization Newsletter.- 1998.- Vol.5. - №3. – P. 3 – 7.
9. Чердынцева Н.В., Литвяков Н.В., Смольянинов Е.С., Белявская В.А. Влияние рекомбинантного пробиотика субалина на функциональную активность иммунокомпетентных клеток.//БЭБиМ.- 1999.-Т.127.- Приложение 1.-С.67-70.
10. Литвяков Н.В. Иммунологические механизмы антибластного и химомодулирующего действия рекомбинантного пробиотика субалина./Материалы XXXVII международной научной студенческой конференции «Студент и научно- технический прогресс».- Новосибирск.- 1999.- Биология. – ч. 1.- С.72-73.
11. Литвяков Н.В. Иммунологические механизмы антибластного и химомодулирующего действия рекомбинантного пробиотика субалина./Материалы международной научной конфер. Студентов и молодых ученых «Современные проблемы фундаментальной и клинической медицины».- СГМУ, Томск, 1999.- С.22-23.
12. Чердынцева Н.В., Литвяков Н.В., Белявская В.А., Малиновская Е.А., Кокорев О.В., Кусмарцева И.Н., Афримзон Е.А. Продукция цитокинов иммунокомпетентными клетками крови здоровых лиц под влиянием субалина и саназола./Материалы 7-ой международной конф. «СПИД, рак и родственные проблемы» 1999.- С.-Петербург.- С.183.
13. Чердынцева Н.В., Литвяков Н.В., Белявская В.А., Малиновская Е.А., Кокорев О.В., Кусмарцева И.Н., Афримзон Е.А. Продукция цитокинов иммунокомпетентными клетками крови здоровых лиц под влиянием субалина и саназола./Материалы юбилейной конференции НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН г. Томск «Проблемы современной онкологии» 1999.- С.329-330

14. Ильиных И.С. Литвяков Н.В. Иммуномодулирующее действие рекомбинантного пробиотика субалина.//Материалы конфер. «Региональные проблемы экологии и природопользования» 1999, Томск. – С.121-123.
15. Чердынцева Н.В.,Смолянинов Е.С., Литвяков Н.В., Кокорев О.В., Малиновская Е.А., Кузнецова А.А. Роль системы иммунитета в реализации противоопухолевого действия модификаторов биологических реакций различной природы.//Экспериментальная онкология.- 2000.-Т.22.- С.166.
16. Литвяков Н.В., Чердынцева Н.В., Ильиных И.С., Белявская В.А., Смолянинов Е.С. Влияние ИФН – продуцирующего пробиотика на противоопухолевую активность иммунокомпетентных клеток мышей.// Материалы 8-ой международной конф. «СПИД, рак и родственные проблемы» 2000.- С.-Петербург.- С.84. рус. С.185. англ.
17. Литвяков Н.В., Чердынцева Н.В., Белявская В.А., Малиновская Е.А., Ильиных И.С., Смолянинов Е.С. Роль макрофагов в реализации антибластомного действия рекомбинантного пробиотика субалина. //Вопросы онкологии.- 2001.-Т.47.- №1.- С.86-89.
18. Литвяков Н.В. Механизмы иммуотропного и антибластомного действия интерферона, вводимого перорально с помощью бактериального вектора.//Сборник статей второго конгресса молодых ученых «Научная молодежь на пороге XXI века» 2001, Томск. – С.213-214.
19. Крамаренко И.С., Литвяков Н.В. Влияние рекомбинантного пробиотика субалина на пролиферации. Лимфоцитов и опухолевых клеток.// Материалы XXXIX международной научной студенческой конференции «Студент и научно- технический прогресс»2001, Новосибирский ун-т, Новосибирск.- Биология. - часть 1.- С.69-70.
20. Литвяков Н.В. Механизмы иммуотропного и иммунобластомного действия ИФН, вводимого перорально с помощью бактериального вектора.// Материалы 1 межд. научн. конф. молодых ученых и студентов, “Актуальные вопросы соврем. биологии и биотехнологии”. 2001, Ун-т им. Аль-Фараби, Алматы,- С. 193-194.
21. Белявская В.А.,Чердынцева Н.В., Литвяков Н.В.,Игнатьев Г.Г.,Смолянинов Е.С.,Крамаренко И.С. Противоинфекционная активность рекомбинантного пробиотика субалина, продуцирующего человеческий альфа- интерферон./Актуальные проблемы инфектологии и паразитологии: Материалы первой Международной юбилейной конференции, посвященной 110-летию со дня открытия проф. К.Н. Виноградовым сибирско двуустки у человека.- Томск, 2001.- С. 86.
22. Белявская В.А., Игнатьев Г.Г., Чердынцева Н.В., Литвяков Н.В. Адьювантные свойства рекомбинантного пробиотика, продуцирующего интерферон.// ЖМЭИ.- 2001.- №6.- С.77-82.
23. Чердынцева Н.В., Литвяков Н.В., Кокорев О.В., Кузнецова А.А., Малиновская Е.А., Смолянинов Е.С. Роль системы иммунитета в противоопухолевой активности модификаторов биологических реакций различной природы.// Сибирский онкологический журнал.- 2002.- №1.- С. 56-61.
24. Чердынцева Н.В., Белявская В.А., Литвяков Н.В., Кусмарцева И.Н., Афримзон Е.А., Смолянинов Е.С. Влияние микробиотика субалина на функциональную активность и экспрессию цитокинов иммунокомпетентными клетками здоровых лиц.// Иммунология.-2001.- №6.- С. 54-57.
25. Чердынцева Н.В.,Литвяков Н.В., Белявская В.А.,Масычева В.И. Пероральное использование интерферона: терапевтический эффект и механизмы действия.// Материалы международной конференции «Цитокины. Воспаление. Иммунитет» Москва, 2002.-С.55-56.

