

О.М. Караман  
 Н.І. Федосова  
 А.В. Чумак  
 Н.Л. Черемшенко  
 Є.В. Коваль  
 І.М. Тодор  
 Т.В. Симчич  
 І.М. Восійкова  
 О.О. Круць  
 Г.В. Діденко

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

**Ключові слова:** цисплатин,  
 карцинома Герена,  
 хіміорезистентність, лектин  
 бактеріального походження,  
 протипухлинна ефективність.

## ПРОТИПУХЛИННА ЕФЕКТИВНІСТЬ ЛЕКТИНУ *V. SUBTILIS* IMB B-7724 У ЩУРІВ З ЧУТЛИВОЮ ТА РЕЗИСТЕНТНОЮ ДО ЦИСПЛАТИНУ КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА

**Мета:** дослідити протипухлинну ефективність позаклітинного лектину *V. subtilis* IMB B-7724 в монорежимі або в комбінації з цисплатином у щурів з чутливою або з резистентною до цисплатину карциномою Герена (КГ). **Об'єкт і методи:** експериментальні дослідження проведено на щурах лінії Wistar; у якості моделей пухлинного росту використовували чутливий та резистентний до цисплатину штами КГ. Лікування тварин, яке розпочинали на 7-й день пухлинного росту, включало імунотерапію в монорежимі або поєднання імунотерапії з подальшою (на 14-й день пухлинного росту) хіміотерапією. У якості засобу імунотерапії використовували лектин *V. subtilis* IMB B7724, хіміотерапії — цисплатин. Оцінку протипухлинного ефекту застосованих терапевтичних схем проводили за стандартними параметрами пухлинного росту: об'єм пухлинного вузла, виживаність тварин з пухлиною, гальмування росту пухлини (ГРП), час подвоєння об'єму пухлини (ЧПОП), частка тварин з регресією пухлинного вузла (ЧР). Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Показник виживаності тварин оцінювали за методом Каплана — Майєра. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при  $p < 0,05$ . **Результати:** проведення імунотерапії мало виражену протипухлинну ефективність незалежно від чутливості пухлинного штаму КГ до цисплатину. Разом з тим, у щурів із чутливою КГ найбільш виражені показники протипухлинної ефективності серед застосованих схем мала група з поєднаним застосуванням імунотерапії з подальшою хіміотерапією: ГРП = 99,9%; ЧПОП<sub>21-29; 29-36</sub> = -0,91; -3,57; ЧР<sub>36</sub> ≥ 55,6%. У щурів з резистентною КГ — група, у якій застосовували імунотерапію в монорежимі: ГРП = 100,0%; ЧПОП<sub>21-29; 29-36</sub> = 0; 0; ЧР<sub>36</sub> ≥ 66,7%. **Висновки:** імунотерапія за допомогою лектину *V. subtilis* IMB B-7724 забезпечує виразний протипухлинний ефект за умов її проведення в монорежимі при хіміорезистентній до цисплатину модельній пухлині. За умов чутливої до цисплатину модельної пухлини доцільно проводити імунотерапію лектином у поєднанні з цисплатином.

Протипухлинні засоби на основі платини, зокрема цисплатин (Цп), — одні з найбільш часто використовуваних хіміотерапевтичних препаратів при лікуванні хворих зі злоякісними новоутвореннями (ЗН) різних локалізацій, таких як сечовий міхур, яєчник, голова та шия, легеня, яєчко, шийка та тіло матки, стравохід, молочна залоза тощо. Ці препарати демонструють протипухлинну активність як при монотерапії, так і в поєднанні з іншими хіміопрепаратами, променевою терапією та імунотерапією [1].

За даними Національного канцер-реєстру України, у 2019 р. ЗН репродуктивних органів жінок вхо-

дили до основних 10 нозологічних форм в загальній структурі захворюваності та смертності від ЗН жіночого населення України [2]. Зокрема, ЗН тіла матки (питома вага становить 9,5%) в структурі захворюваності займають третє місце, а в структурі смертності (питома вага — 5,7%) — дев'яте. Слід відмітити, що серед жінок вікової категорії 30–54 роки питома вага ЗН тіла матки зросла (порівняно з показниками 2018 р.) і становила 9,0%. Серед хворих зі ЗН тіла матки з первинно встановленим діагнозом 49,7% проводять комбіновану та комплексну терапію, до якої в переважній більшості випадків

включають і препарати платини. Відомо, що у пацієнок з рецидивами цього захворювання актуалізується питання підбору лікарських засобів для медикаментозної терапії у разі резистентної до препаратів платини пухлини. Саме тому залишаються актуальними і важливими дослідження, що спрямовані на розробку протипухлинних ліків чи засобів імунотерапії з метою подолання лікарської резистентності.

На сьогодні вже з'ясовано низку молекулярних механізмів формування резистентності до Цп, які є достатньо складними і зазвичай пов'язані з наступними особливостями (але не обмежуються такими): зменшення внутрішньоклітинного накопичення сполук платини; збільшення відновлення пошкоджень ДНК; інактивація апоптозу; активація епітеліально-мезенхімального переходу; зміна метилювання ДНК, профілю мікроРНК, характеристик стовбурових клітин раку та експресії шаперонів, що відповідають на стрес, тощо [3]. Враховуючи феномен гетерогенності злоякісної пухлини, стає очевидним, що формування резистентності може відбуватися як за одним із зазначених механізмів, так і в разі їх комбінації, або ж іншими, іще не визначеними шляхами. Зокрема, залежний від глікозилювання механізм формування стійкості до Цп був показаний на клітинних лініях раку яєчника (Pa-1, OV4, A278), коли під тривалим впливом низьких доз Цп відбиралися клітинні клони з підвищеною експресією бета-галактозаміду-альфа-2,6-сіалілтрансферази 1 (Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1 — ST6Gal-1), що забезпечує сіалілювання рецепторів поверхневих мембран [4]. В експериментах *in vivo* було показано, що резистентні до дії Цп клітини карциноми легені Льюїс змінюють свою імуногенність порівняно із чутливими до цього цитостатика клітинами. Зокрема, попереднє введення мишам з резистентним до Цп штамом карциноми легені Льюїс протипухлинної вакцини, що виготовлена із застосуванням хіміорезистентних пухлинних клітин та цитотоксичного лектину *B. subtilis B-7025*, сприяло більш вираженому протипухлинному ефекту порівняно з вакциною, виготовленою за такою ж технологією, але з хіміочувливих пухлинних клітин [5].

Відомо, що аберантне глікозилювання глікопротеїнів або гліколіпідів поверхневих мембран притаманне клітинам більшості пухлин і його часто називають «відмінною ознакою раку». При цьому найбільш відомими та частими модифікаціями глікокон'югатів поверхневих мембран є фукозилювання (перенесення залишків фукози до олігосахаридів, зв'язаних з білками або ліпідами) та сіалілювання (перенесення залишків сіалової кислоти у кінцеву позицію гліканових ланцюгів), що пов'язані з активністю таких ферментів, як фукозилтрансферази та сіалілтрансферази [6]. У результаті проведеного за допомогою бази даних GEPiA (*gepia.cancer-pku.cn*) аналізу рівнів експресії 20 сіалілтрансфераз у пухлинних тканинах основних локалізацій (усього 31 вид пухлин)

було встановлено, що підвищені рівні характерні для підгруп ST3Gal та ST6GalNAc; причому найвищий показник було зафіксовано для ферменту ST6GalNAc6 [7]. На сьогодні показано, що експресія ST6Gal має прогностичне значення при пухлинному процесі. Зокрема, дослідження прогностичної та предиктивної ролі ST6Gal1 у хворих на рак яєчника показали, що високі рівні мРНК ST6Gal1 суттєво корелювали з лімфосудинною інвазією та нижчою виживаністю таких хворих; висока експресія білка ST6Gal1 була пов'язана з розвиненою стадією, віддаленими метастазами та зменшенням безрецидивного періоду [8]. На сьогодні відомо, що сіалові кислоти відіграють важливу роль у прогресії та метастазуванні пухлини, уникненні пухлинними клітинами імунного нагляду, пухлинному неоангіогенезі тощо [9, 10]. З іншого боку, наявність на поверхневих рецепторах пухлинних клітин сіалових кислот зумовлює перспективність застосування таких засобів імунотерапії, як лектини — поліфункціональні білки, що проявляють високу вуглеводну специфічність і протипухлинну активність [11]. Відомо, що протипухлинна дія лектинів може реалізовуватися шляхом прямого впливу на пухлинні клітини через такі механізми, як апоптоз, аутофагія, інгібування проліферації, або ж опосередковано, шляхом впливу на клітинну ланку протипухлинної резистентності [12–14].

У якості сировинних джерел для отримання лектинів найчастіше використовують різноманітні рослини, гриби, бактерії [11–14]. Серед бактерій, що продукують лектини, на особливу увагу заслуговують представники роду *Bacillus*, які здатні накопичувати позаклітинні лектини в середовищі росту, що значно спрощує технологічний процес їх одержання. На сьогодні вже отримано лектини з протипухлинною активністю з культуральної рідини таких штамів: *B. subtilis 316M*, *B. polymyxa 102 КДУ*, *B. subtilis B-7014* [15]. В Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (ІЕПОР) з культуральної рідини росту бактерії *B. subtilis B-7025* було отримано лектин [16], що характеризується певною цитотоксичною активністю щодо пухлинних клітин. Цей лектин було використано в технології приготування протипухлинної аутовакцини, про яку вже згадувалося вище [5]. Разом з тим зазначені лектини не можуть забезпечити необхідний рівень протипухлинної та цитотоксичної активності, яка значною мірою залежить від штаму-продуцента. Тому пошук нових штамів, що продукують лектин, постійно продовжується.

В ІЕПОР з культуральної рідини штаму-продуцента лектинів *B. subtilis IMB B-7724* було одержано позаклітинний лектин, який характеризується високою спорідненістю до N-ацетілнейрамінової (1,9 мМ) та N-гліколілнейрамінової (7,5 мМ) сіалових кислот, D-глюкуронової кислоти та фруктозо-1,6-дифосфату, а також проявляє досить високу цитотоксичну активність щодо клітин пухлин різного гістогенезу [17].

Враховуючи викладені вище дані щодо підвищення сіалідування поверхневих рецепторів під час формування хіміорезистентності (у тому числі і до Цп) та важливість пошуку нових терапевтичних засобів для лікування хворих з рецидивами після застосування платини, було вибрано зручну та адекватну модель пухлинного росту — карциному Герена (КГ). Цю модель було отримано в 1934 р. шляхом перещеплення спонтанної аденокарциноми матки щура лінії Wistar [18]. В ІЕПОР отримано резистентний до Цп штаб КГ та вивчено його морфологічні і біохімічні особливості [19]. Було показано, що під час формування резистентності в пухлинних клітинах КГ активуються системи окисного фосфорилування та глутатіонової системи детоксикації, а також ускладнюється морфологічна організація цих клітин, що свідчить про підвищення ступеня диференціації [19]. Пізніше було встановлено низку пов'язаних з обміном ендogenous заліза змін, що виникають у пухлинній тканині КГ з різною чутливістю до Цп в динаміці росту модельної пухлини. Так, у чутливих до Цп пухлинах, незалежно від фази росту, відмічали підвищений ступінь метилування промотора гена *tfr1* (рецептор трансферину 1-го типу), низькі показники експресії мікроРНК-133а, -200b та -320. У резистентних до Цп пухлинах також визначалися високий ступінь метилування промотора гена *tfr1*, підвищена експресія мікроРНК-133а та знижена експресія мікроРНК-122, а також високий рівень феритину в пухлинній тканині [20].

Враховуючи все викладене, **метою роботи** було дослідити протипухлинну ефективність позаклітинного лектину *B. subtilis* IMB B-7724 в монорежимі або в комбінації з Цп у щурів з різною за чутливістю до Цп КГ.

## ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Wistar віком 2,5 міс з масою тіла 180–200 г розведення віварію ІЕПОР. Під час проведення досліджень тварини перебували в стандартних умовах віварію з природним режимом освітлення, на повноцінному раціоні харчування з вільним доступом до їжі та води. Утримання тварин та робота з ними здійснювалися відповідно до національних та міжнародних вимог щодо поводження з тваринами, що використовуються в наукових цілях [21, 22]. Усі тварини перед залученням у дослідження проходили попередній 10-добовий карантин.

**Моделі пухлинного росту.** У якості моделей пухлинного росту використовували два різних за чутливістю до Цп штаби КГ — чутливий (вихідний штаб) та резистентний (отриманий, як описано у [19]). Пухлинні клітини обох штабів одержували з Банку клітинних ліній з тканин людини та тварин ІЕПОР. Перещеплення пухлинних клітин проводили підшкірно в тазову ділянку спини в кількості  $1 \cdot 10^6$  клітин у фізіологічному розчині NaCl. На 7-й день після прищеплення КГ тварин розпо-

діляли на групи та розпочинали відповідну терапію. Підшкірне прищеплення КГ та початок введення препаратів (на 7-му добу після прищеплення) проводили відповідно до [23].

**Групи тварин.** Окремо для кожного штабу КГ (чутливого (ч) та резистентного (р)) було сформовано наступні 4 групи: контроль пухлинного росту (КПР-ч або КПР-р) — щури з пухлиною, яким не проводили терапію; «Лектин» — щури з пухлиною, яким проводили імунотерапію бактеріальним лектином у монорежимі; «Лектин + Цп» — щури з пухлиною, яким проводили комплексне лікування, що включало імунотерапію бактеріальним лектином та хіміотерапію з використанням Цп; «Цп» — щури з пухлиною, яким проводили хіміотерапію Цп в монорежимі.

**Терапевтичні засоби та схеми експерименту.** У якості засобу імунотерапії використовували позаклітинний лектин *B. Subtilis* IMB B-7724 [17], який на 7-му добу після прищеплення КГ розпочинали вводити підшкірно, в ділянку спини, по 0,2 мг/тварину в 0,2 мл фізіологічного розчину NaCl, щоденно, протягом 5 діб.

Хіміотерапія, яку розпочинали на 14-й день після прищеплення КГ, включала внутрішньоочеревинне введення ін'єкцій Цп (Ebewe, Австрія) в дозі 1,2 мг/кг, 1 ін'єкція щоденно протягом 5 діб.

**Оцінка протипухлинного ефекту.** Протипухлинний ефект проведених терапевтичних схем оцінювали за стандартними параметрами пухлинного росту: об'єм пухлинного вузла, виживаність тварин з пухлиною, частка тварин з регресією пухлинного вузла.

Об'єм пухлини розраховували за формулою трьохосового еліпсоїду:

$$V = \frac{4}{3} \pi \times a \times b \times c, \text{ де}$$

$\pi$  — стала, що рівна 3,14;

a, b, c — півосі еліпсоїду в мм.

Також обраховували показник гальмування росту пухлини (ГРП, %) на 21-шу та 29-ту доби пухлинного росту [23] та час подвоєння об'єму пухлини (ЧПОП, %) [24] за наступними формулами:

$$\text{ГРП} = \frac{V_{\text{к}} - V_{\text{д}}}{V_{\text{к}}} \times 100\%, \text{ де}$$

$V_{\text{к}}$ ,  $V_{\text{д}}$  — середній показник об'єму ( $\text{мм}^3$ ) в контрольній та дослідній групах відповідно.

$$\text{ЧПОП} = \frac{[\ln 2 \times \Delta T]}{[\ln \left( \frac{X_2}{X_1} \right)]} \times 100\%, \text{ де}$$

$X_1$ ,  $X_2$  — середній показник об'єму пухлини на час спостереження  $T_1$  та  $T_2$  відповідно;  $\Delta T = T_2 - T_1$ .

**Статистичну обробку результатів** проводили з використанням GraphPad Prism 8.0.1 (Graphpad Software Inc., США) за загальноприйнятими методами варіаційної статистики [25]. Показник виживаності тварин оцінювали за методом Каплана — Майєра. Вірогідність різниці між контрольними

та дослідними групами оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками за  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

Вихід пухлин становив  $95,7 \pm 1,4\%$  для КГ-ч та  $83,3 \pm 1,3\%$  для КГ-р штамів.

Кількість щурів в експериментальних групах, а також показник тривалості життя нелікованих та лікованих тварин з пухлинами представлені в табл. 1. Як видно, проведення імунотерапії або хіміотерапії в монорежимі або у їх поєднанні не справляло суттєвого впливу на тривалість життя тварин з пухлиною незалежно від хіміочутливості пухлинного штаму.

**Таблиця 1**

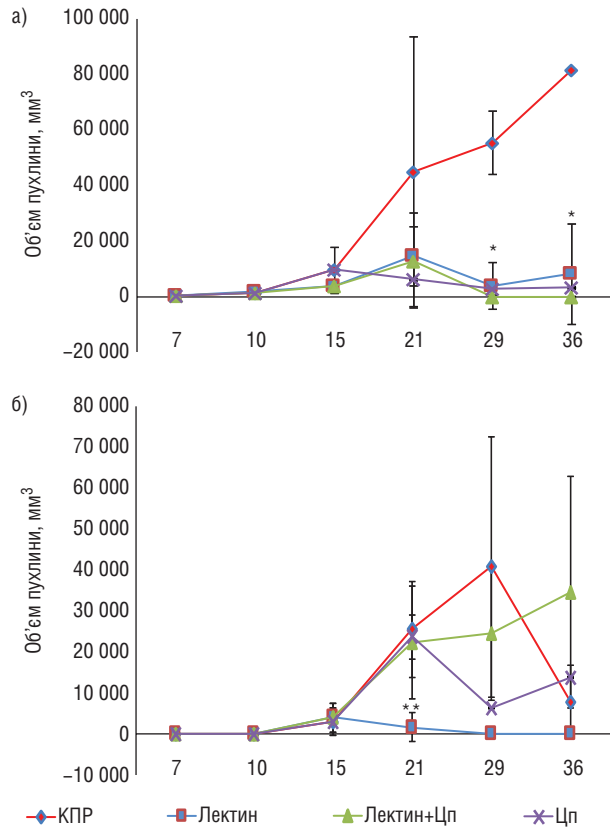
**Показники тривалості життя тварин з чутливими та резистентними до Цп пухлинами**

Група тварин	КГ-ч		КГ-р	
	N	ТЖ, діб	N	ТЖ, діб
КПР	5	$32,8 \pm 6,6$	7	$33,5 \pm 5,6$
Лектин	8	$33,5 \pm 6,1$	9	$36,0 \pm 0,0$
Лектин + Цп	9	$33,9 \pm 5,7$	9	$34,2 \pm 5,0$
Цп	5	$36,0 \pm 0,0$	3	$28,3 \pm 7,1$

Примітка: N – кількість тварин у групі; ТЖ – тривалість життя.

Результати дослідження кінетики росту КГ та вплив проведеного лікування на об'єм пухлини представлені на рис. 1. Як видно, введення лектину в монорежимі або ж у поєднанні з Цп у щурів з КГ-ч більше ніж втричі ( $p < 0,05$ ) зменшувало об'єм пухлин починаючи з 21-ї доби (див. рис. 1а). При цьому ріст пухлин гальмувався на 67,4 та 71,7% на 21-шу добу та на 93,2 та 99,9% на 29-ту добу відповідно (табл. 2). У щурів з КГ-р, яким вводили лектин в монорежимі, починаючи з 21-ї доби відмічали суттєве гальмування росту пухлини, ГРП становив 93,7 та 100,0% на 21-шу та 29-ту добу відповідно (див. рис. 1б, табл. 2).

Оцінка ЧПОП показала, що пухлинні клітини в пухлинному вузлі в динаміці росту КГ незалежно від чутливості до Цп характеризувалися поступовим зменшенням проліферативного потенціалу, особливо на 21–29-ту добу спостереження (табл. 3). Введення лектину щурам з КГ-ч вже на 10–15-ту добу спостереження мало протипухлинний вплив: спостерігалось більше ніж 2-кратне збільшення часу подвоєння об'єму пухлини. У подальшому моно-



**Рис. 1.** Кінетика росту чутливої (а) та резистентної (б) КГ у нелікованих щурів та тварин, яким проводили імуно- та/або хіміотерапію \* $p < 0,05$ , \*\* $0,05 < p < 0,1$  порівняно з показниками відповідного контролю пухлинного росту). Примітка: різке зменшення об'єму пухлини на 36-ту добу у нелікованій групі контрольних тварин з КГ-р пов'язане із загибеллю тварин з великими пухлинами та наявністю некрозів в пухлинах тварин, що залишилися живими в цей термін обстеження.

терапія лектином забезпечувала протипухлинний вплив лише на 21–29-ту добу, а поєднання імунотерапії з хіміотерапією — починаючи з 21-ї доби спостереження з відстроченим ефектом на період 29–36-ї доби (див. табл. 3). Слід відмітити, що введення Цп в монорежимі проявляло виразний протипухлинний ефект (показник ЧПОП набував від'ємного значення) у період з 15- до 29-ї доби (тобто під час та протягом тижня після введення цитостатика), після чого реєстрували поступове відновлен-

**Таблиця 2**

**Показник ГРП (%) чутливої та резистентної до Цп КГ залежно від проведеного лікування в пізні терміни спостереження**

Вид лікування	21-ша доба				29-та доба			
	КГ-ч		КГ-р		КГ-ч		КГ-р	
	Об'єм пухлини, мм³	ГРП, %	Об'єм пухлини, мм³	ГРП, %	Об'єм пухлини, мм³	ГРП, %	Об'єм пухлини, мм³	ГРП, %
Без лікування	$44983,4 \pm 43415,4$	—	$25559,0 \pm 11646,9$	—	$55275,8 \pm 11246,4$	—	$40840,4 \pm 31692,6$	—
Імунотерапія лектином	$14669,1 \pm 10654,8$	67,4	$1607,9 \pm 1528,5^*$	93,7	$3765,5 \pm 2339,3$	93,2	0,0	100
Імунотерапія лектином + хіміотерапія Цп	$12737,1 \pm 11096,9$	71,7	$22241,9 \pm 13728,3$	13,0	$27,9 \pm 18,4$	99,9	$23771,2 \pm 5377,0$	40,2
Хіміотерапія Цп	$6163,0 \pm 5403,5$	86,3	$24415,4 \pm 16200,7$	7,0	$2818,0 \pm 1043,0$	94,9	$6330,2 \pm 0,1$	84,5

\* $p < 0,05$  порівняно з показником нелікованих тварин у відповідний термін спостереження

ня проліферативного потенціалу пухлинних клітин: від'ємне значення показника ЧПОП ставало додатним (див. табл. 3). У щурів з КГ-р монотерапія цитостатиком забезпечувала протипухлинну дію через тиждень після останнього введення препарату (показник ЧПОП набував від'ємного значення), причому поступове відновлення проліферативного потенціалу пухлинних клітин спостерігали вже після 29-ї доби. У групі поєднаного використання лектину та Цп на пізніх стадіях пухлинного процесу фіксували протипухлинну дію з більш повільним, ніж у групі «Цп-р», відновленням проліферативного потенціалу клітин. Монотерапія лектином призводила до виразного протипухлинного ефекту вже на 15-ту добу спостереження, після чого спостерігали регресію пухлинного вузла (див. табл. 3).

Таблиця 3

Час подвоєння об'єму пухлин (дні) у щурів контрольної та дослідних груп з чутливою та резистентною до Цп КГ

Група тварин	Доби спостереження			
	10–15	15–21	21–29	29–36
<b>Хіміочутлива КГ</b>				
КПР-ч	1,83	2,71	26,91	10,66
Лектин-ч	<b>4,65</b>	2,96	<b>-4,08</b>	5,44
Лектин + Цп-ч	<b>3,39</b>	3,29	<b>-0,91</b>	<b>-3,57</b>
Цп-ч	1,73	<b>-9,16</b>	<b>-7,09</b>	<b>42,91</b>
<b>Хіміорезистентна КГ</b>				
КПР-р	1,14	1,94	11,83	-2,56
Лектин-р	1,05	<b>-4,49</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Лектин + Цп-р	0,97	2,44	59,47	11,95
Цп-р	1,27	2,01	<b>-4,19</b>	5,25

Показник частки тварин з регресією пухлинного вузла на 36-ту добу в групах тварин з КГ-ч, що отримували лектин, становив щонайменше 50,0% (у разі застосування в монорежимі) та щонайменше 55,6% (за поєднання із Цп) проти 0 та 40,0% в групах «КПР-ч» та «Цп-ч», відповідно (табл. 4). У цей термін спостереження у щурів з КГ-р, що отримували лектин в монорежимі, відмічали регресію первинної пухлини щонайменше у 66,7% випадків, а у тварин групи «Лектин + Цп-р» — лише щонайменше у 9,1%. Слід відмітити, що відповідно до [23] про стійку ремісію можна говорити, коли спостереження за тваринами проводилося більше 70 діб. У нашому дослідженні спостереження за експериментальними тваринами проводили лише до 36-ї доби включно, після чого дослідження з етичних міркувань було припинено. У зв'язку з цим у нашому дослідженні можна відмітити лише факт наявності регресії, а оцінка стійкості останньої потребує повторного дослідження.

Таблиця 4

Кількість (%) тварин з регресією пухлинного вузла

Група тварин	Доба пухлинного росту		
	21	29	36
КПР-ч	0,0	0,0	0,0
Лектин-ч	<b>≥12,5</b>	<b>≥25,0</b>	<b>≥50,0</b>
Лектин + Цп-ч	<b>≥44,4</b>	<b>≥55,6</b>	<b>≥55,6</b>
Цп-ч	<b>≥20,0</b>	<b>≥40,0</b>	<b>≥40,0</b>
КПР-р	0,0	0,0	0,0
Лектин-р	<b>≥44,4</b>	<b>≥55,6</b>	<b>≥66,7</b>
Лектин + Цп-р	0,0	0,0	<b>≥9,1</b>
Цп-р	0,0	0,0	0,0

Отримані дані щодо виразного протипухлинного ефекту лектину співпадають з показниками оціненої за методом Каплана — Майєра загальної виживаності щурів із чутливою та резистентною КГ контрольної та дослідних груп (рис. 2). Так, на 36-ту добу спостереження загальна виживаність щурів з КГ-ч для групи «КПР» становила 40%, розрахована за методом Каплана — Майєра медіана загальної виживаності — 36 діб. Для груп «Лектин», «Лектин + Цп» та «Цп» щурів з КГ-ч загальна виживаність становила 83: 86 та 100%, відповідно; медіани не досягнуто в жодній з лікованих груп (див. рис. 2а). У щурів з КГ-р загальна виживаність для групи «КПР» становила 33%, медіана загальної виживаності — 27 діб; для груп «Лектин», «Лектин + Цп» та «Цп» — 100; 67 та 33% відповідно; медіана — не досягнута в групах, у яких застосовували лектин, та становила 27 діб у групі, в якій тваринам вводили Цп в монорежимі (див. рис. 2б). Отже, за умови чутливості пухлини до хіміопрепарату доцільно проводити хіміотерапію в монорежимі або ж у поєднанні з бактеріальним лектином, а у разі набуття пухлиною резистентності (особливо набутої при виникненні рецидиву захворювання) доцільно проводити імунотерапію бактеріальним лектином у монорежимі.

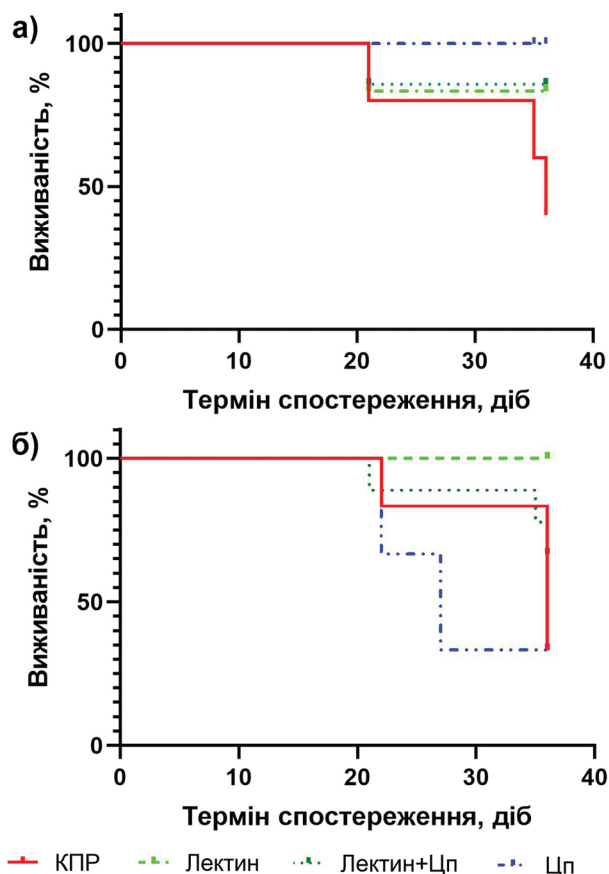


Рис. 2. Загальна виживаність тварин з чутливою до Цп (а) або з резистентною до Цп (б) КГ залежно від використання лектину в монорежимі або в комплексній терапії з Цп. Криві виживаності за методом Каплана — Майєра, log-rank критерій  $p = 0,004$  (а),  $p = 0,85$  (б)

Отже, незалежно від чутливості пухлинного штаму КГ до Цп застосування лектину призвело до гальмування пухлинного росту. Разом з тим найвиразнішу протипухлинну ефективність було виявлено при застосуванні лектину в монорежимі у щурів з КГ-р. Це може бути пов'язано як з прямою дією лектину на пухлинні клітини, так і з його імуніопосередкованим впливом. Про більшу чутливість до дії лектину, якому притаманна висока спорідненість до сіалових кислот [17], резистентних до Цп клітин порівняно з чутливими свідчать дані щодо підвищення активності сіалілтрансфераз при формуванні резистентності та підвищенні сіалілування поверхневих рецепторів [3, 4, 7]. Щодо імуніопосередкованого впливу, то в роботі [5] більший протипухлинний ефект, що спостерігали при застосуванні протипухлинної аутовакцини, що виготовлена з резистентних до Цп клітин та лектину бактерії *B. subtilis B-7025*, пов'язували з підвищенням цитотоксичної активності макрофагів та природних кілерних клітин. Про активувальний вплив лектинів різного походження на клітини моноцитарно-макрофагального та лімфоцитарного ряду свідчать численні роботи [12–14, 26]. Разом з тим, це припущення потребує проведення дослідження з оцінкою впливу досліджених схем лікування на клітинну та гуморальну ланки протипухлинної резистентності у щурів з чутливою або резистентною до Цп КГ.

## ВИСНОВКИ

Імуноterapia лектином *B. subtilis IMB B-7724* забезпечує виразний протипухлинний ефект за умови проведення в монорежимі у щурів з хіміорезистентною до Цп КГ та у поєднанні з Цп у щурів з чутливою до Цп модельною пухлиною.

Робота виконувалася в рамках НДР «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин» (0117U002034) за фінансової підтримки Цільової програми наукових досліджень Відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології Національної академії наук України «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів» (2017–2021).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Ghosh S. Cisplatin: the first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem* 2019; **88**: 102925.
- Cancer in Ukraine, 2019–2020. Incidence, mortality, prevalence and other relevant statistic. *Bull Natl Cancer Register Ukr*; Kyiv, 2021; 22: [http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL\\_22](http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_22). (in Ukrainian)
- Zhu H, Luo H, Zhang W, *et al*. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Des Devel Ther* 2016; **10**: 1885–95.
- Schultz MJ, Swindall AF, Wright JW, *et al*. ST6Gal-I sialyltransferase confers cisplatin resistance in ovarian tumor cells. *J Ovarian Research* 2013; **6**: 25. doi:10.1186/1757-2215-6-25.
- Potebnya G, Cheremshenko N, Lisovenko G, *et al*. Antitumor efficacy of autovaccines prepared from chemoresistant tumor cells with the use of lectin of *B. subtilis* B-7025. *Exp Oncol* 2007; **29** (4): 277–80.
- Munkley J, Elliott DJ. Hallmarks of glycosylation in cancer. *Oncotarget* 2016; **7** (23): 35478–89.
- Yue Zhangab, Ruohan Wangab, Ying Fengc, Fang Maab. The role of sialyltransferases in gynecological malignant tumors. *Life Sciences* 2020; **263**: 118670. doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118670.
- Wichert B, Milde-Langosch K, Galatenko V, *et al*. Prognostic role of the sialyltransferase ST6GAL1 in ovarian cancer. *Glycobiology* 2018; **28** (11): 898–903. doi.org/10.1093/glycob/cwy065.
- Xiaoman Zhou, Ganglong Yang, Feng Guan. Biological functions and analytical strategies of sialic acids in tumor. *Cells* 2020; **9** (273); doi:10.3390/cells9020273.
- Dobie C, Skropeta D. Insights into the role of sialylation in cancer progression and metastasis. *Brit J Cancer* 2020; doi.org/10.1038/s41416-020-01126-7.
- Antonyuk VO. Lectins and their raw sources. Lviv: PE «Quart», 2005. 554 p. (in Ukrainian).
- Nathan Sharon HL. Lectins: functions. Springer: Science & Business Media, 2007: 333–66.
- Pervin MKY, Isemura M, Nakamura Y. Plant lectins in therapeutic and diagnostic cancer research. *Int J Plant Biol Res* 2015; **3**: 1–6.
- Karaman OM, Fedosova NI, Voeikova IM, *et al*. Perspectives of using lectins for cancer diagnostic and treatment. *Oncologia* 2018; **20** (1): 10–6. (in Ukrainian).
- Podgorsky VS, Kovalenko EA, Karpova IS, *et al*. Extracellular lectins of saprophytic strains of bacteria of the genus *Bacillus* (review). *Applied Biochem Microbiol* 2014; **50** (3): 256–63.
- Potebnya GP, Tanasienko OA, Cheremshenko NL, *et al*. Means to receive the substances with antitumor activity. Patent № 59472 Ukraine; Publ 15.09.2003; Bull № 9 (In Ukrainian).
- Cheremshenko NL, Fedosova NI, Hetman KI, *et al*. Cytotoxic lectin with antitumor activity. Utility model patent № 141944 (UA)/(Ukraine); Publ. 12.05.2020, Bull №9. (in Ukrainian).
- Experimental evaluation of anticancer drugs in the USSR and the USA. Eds. Z.P. Sofyina, A.B. Syrkin, A. Goldin, A. Klein. M: Medicine, 1979. 296 p. (in Russian).
- Yurchenko OV, Todor IN, Tryndyak VP, *et al*. Resistance of Guerin's carcinoma cells to cisplatin: biochemical and morphological aspects. *Exp Oncol* 2003; **25**: 64–8.
- Lukianova NYu, Borikun TV, Demash DV, *et al*. Changes in the range of metalloproteins and their regulatory factors in growth dynamic of sensitive and resistant Guerin carcinoma. *Oncologia* 2016; **18** (4): 247–54. (In Ukrainian)
- Law of Ukraine No. 3447-IV. On the protection of animals from cruelty.
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (OJ L 276, 20.10.2010, p. 33).
- Sharykina NO, Shlyakhovenko VO, Mosienko VS, *et al*. Preclinical study of specific activity of antitumor drugs. In: Preclinical studies of drugs (guidelines). Ed. OV Stefanova. K: Avitsena, 2001: 361–70.
- Li J, Xia T, Yang X, *et al*. Malignant solitary pulmonary nodules: assessment of mass growth rate and doubling time at follow-up CT. *J Thorac Dis* 2018; **10** (Suppl 7): S797-S806.
- Sidenko AB, Vishnyakov VV, Isaev SM. Theory of statistics. M: MAX-Press, 2011. 343 p. (in Russian)
- Symchych TV, Fedosova NI, Chumak AV, *et al*. Functions of tumor-associated macrophages and macrophages residing in remote anatomical niches in Ehrlich carcinoma bearing mice. *Exp Oncol* 2020; **42** (3): 197–203.

## ANTI-TUMOR EFFICACY OF *B. SUBTILIS* IMV B-7724 LECTIN IN RATS BEARING CISPLATIN-SENSITIVE AND CISPLATIN-RESISTANT GUÉRIN'S CARCINOMA

O.M. Karaman, N.I. Fedosova, A.V. Chumak,  
N.L. Cheremshenko, E.V. Koval, I.N. Todor,  
T.V. Symchych, I.M. Voyeykova, O.O. Kruts',  
H.V. Didenko

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,  
Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine,  
Kyiv, Ukraine

**Summary. Aim:** to investigate anti-tumor efficacy of extracellular *B. subtilis* IMV B-7724 lectin alone or in combination with cisplatin in rats bearing cisplatin-sensitive or cisplatin-resistant Guérin's carcinoma.

**Object and methods:** in the experiments, Wistar rats were used. Cisplatin-sensitive (CIS) and -resistant strains of Guérin's carcinoma (GC) were used as models of tumor growth. The treatment of the tumor-bearing animals began on day 7 of tumor growth and included immunotherapy or a combination of immunotherapy with subsequent (on day 14 of tumor growth) chemotherapy. The lectin of *B. subtilis* IMV B-7724 was applied as means of immunotherapy; cisplatin was used in the schemes including chemotherapy. The antitumor effect of the applied therapeutic schemes was evaluated according to standard parameters of tumor growth: tumor volume, survival rate, tumor growth inhibition (TGI), tumor volume doubling time (TVDT), frequency of animals with tumor regression (FTR). The statistical analysis of the results was conducted according to the generally accepted methods

of variation statistics. The survival rate of the animals was estimated by the Kaplan — Meier method. The difference was considered as significant at  $p < 0.05$ . **Results:** regardless of the sensitivity of the tumor strain to cisplatin, immunotherapy had a pronounced antitumor effect. It is worth mentioning that in the rats bearing cisplatin-sensitive GC, the most notable antitumor efficacy was registered in the group which underwent the combined treatment (immunotherapy followed by chemotherapy):  $TGI = 99.9\%$ ;  $TVDT_{21-29; 29-36} = -0.91; -3.57$ ;  $FTR_{36} \geq 55.6\%$ . On the contrary, in the rats bearing cisplatin-resistant GC the most significant results were in the group receiving immunotherapy only:  $TGI = 100.0\%$ ;  $TVDT_{21-29; 29-36} = 0; 0$ ;  $FTR_{36} \geq 66.7\%$ . **Conclusions:** applied as a means of immunotherapy to rats bearing cisplatin-resistant experimental tumor, *B. subtilis* IMV B-7724 lectin demonstrated a pronounced antitumor effect. In the case of cisplatin-sensitive experimental tumor, it is preferable to combine immunotherapy with cisplatin.

**Key Words:** cisplatin, Guérin's carcinoma, chemoresistance, bacterial lectin, anti-tumor efficacy.

### Адреса для листування:

Караман О.М.  
03022, Київ, вул. Васильківська, 45  
Інститут експериментальної патології,  
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького  
НАН України  
E-mail: kmolga1977@gmail.com

Одержано: 8.10.2021