

О.О. Круць
А.В. Чумак
Н.І. Федосова
Т.В. Симчич
І.М. Восійкова
Г.В. Діденко

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

Ключові слова: імунотерапія,
хіміотерапія, карциносаркома
Уокер-256, макрофаги
M1 та M2.

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ФЕНОМЕНУ ПЛАСТИЧНОСТІ МАКРОФАГІВ ДЛЯ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ПРОТИПУХЛИННОЇ ТЕРАПІЇ

Мета: визначення показників функціональної активності перитонеальних макрофагів щурів з карциносаркомою Уокер-256 за різних режимів проти-пухлинної терапії та оцінка участі цих клітин у реалізації проти-пухлинного ефекту. **Об'єкт і методи:** дослідження проведені на щурах лінії Wistar з перещепленою карциносаркомою Уокер-256. При лікуванні тварин використовували доксорубіцин або цисплатину у монорежимі та при комбінованому застосуванні з ксеногенною проти-пухлинною вакциною (КПВ). КПВ одержували на основі антигенів ембріональної тканини курки та білок-вмісного метаболіту *B. Subtilis* 7025 з М.М. 70 кДа. Показники пухлинного росту та функціональної активності перитонеальних макрофагів оцінювали на 24-ту добу після перещеплення пухлини. **Результати:** за показниками пухлинного росту найбільш ефективним виявилось комбіноване застосування КПВ і доксорубіцину. У тварин цієї групи відмічали зменшення розміру пухлин порівняно з показниками групи КПВ (в 4,4 раза, $p < 0,05$), КПВ і доксорубіцину (в 1,9 раза). На 24-ту добу росту пухлини у невеликих тварин превалювали макрофаги типу M2; проведення хіміотерапії та/або імунотерапії сприяло збільшенню кількості макрофагів типу M1, про що свідчить суттєве підвищення продукції оксиду азоту (NO) та зниження аргіназної активності. Найбільш ефективним виявилось комбіноване застосування КПВ і доксорубіцину: рівень NO зростав у 1,6 раза, а активність аргінази знижувалася в 1,5 раза ($p < 0,05$ для обох показників порівняно з групою контролю пухлинного росту). Використання цисплатину як у монорежимі, так і в комбінації з КПВ не виявляло подібного ефекту. **Висновки:** на моделі карциносаркоми Уокер-256 найбільший проти-пухлинний ефект спостерігали при комбінованому застосуванні препаратів хіміо-та імунотерапії (КПВ + доксорубіцин). Такий ефект, вірогідно, був зумовлений суттєвим збільшенням кількості макрофагів з фенотипом M1, які виявляють проти-пухлинні властивості. Сильний негативний кореляційний зв'язок між показниками розміру пухлини та функціональної активності макрофагів з фенотипом M1 свідчить про значну роль цих клітин у гальмуванні пухлинного росту.

Відомо, що агресивний вплив на організм сучасних засобів хіміотерапії (ХТ) при лікуванні пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями супроводжується розвитком імуносупресії [1, 2]. Тому актуальним залишається питання підвищення ефективності застосування ХТ за рахунок корекції імуносупресивних станів. Підтримання функціональної активності ефекторів проти-пухлинного імунітету на належному рівні сприяє формуванню у пацієнта повноцінної імунної відповіді, що може запобігати виникненню метастазів та сприяти покращенню результатів лікування. Із цією метою поряд із застосуванням препаратів ХТ часто використовують імунотерапевтичні засоби, зокрема, цитокіни, синтетичні індуктори інтерферону, різні типи проти-пухлинних вакцин [3, 4].

Оскільки більшість хіміотерапевтичних агентів розглядається в якості імунодепресантів, комбінація імунотерапії (ІТ) і ХТ довгий час вважалася несумісною. Проте отримано дані, що хіміотерапевтичні агенти здатні посилити перехресну презентацію пухлинних антигенів, а також сприяти проникненню імунних клітин до пухлинної тканини. Тобто, комплексне застосування ІТ та традиційних методів терапії раку може запобігати розвитку стану імунної толерантності, активувати реакції проти-пухлинного імунітету та сприяти більш повній елімінації пухлинних клітин [5, 6].

Проведення ряду клінічних досліджень свідчить про значне підвищення терапевтичного ефекту у пацієнтів, яким застосовували ІТ перед проведенням

хіміотерапевтичного лікування порівняно з використанням лише хіміотерапевтичних засобів [7, 8]. Підтвердженій позитивний ефект включення різних стратегій ІТ у схеми лікування хворих на рак молочної залози [9, 10], шлунка [11], недрібноклітинний рак легені [12, 13], колоректальний рак [14, 15], меланому [16].

Одним з напрямків ІТ в онкології є використання різних типів протипухлинних вакцин. В Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук України одержано дані експериментальних досліджень щодо ефективності профілактики рецидивів та метастазів модельних пухлин за допомогою ксеногенної протипухлинної вакцини (КПВ) [17–19]. Протипухлинна ефективність такої вакцини реалізується шляхом подолання толерантності імунної системи до власних пухлинних антигенів завдяки антигенній подібності пухлинних та ембріональних білків, активації в першу чергу ефektorів природної ланки імунітету. Незалежне тестування даної вакцини в монорежимі підтвердило її протипухлинну ефективність у тварин з модельним пухлинним процесом [20]. Виникає питання щодо можливості та доцільності застосування вакцини в поєднанні з сучасними хіміотерапевтичними засобами. Більш детальне вивчення потребує і дослідження можливих механізмів реалізації протипухлинного ефекту при застосуванні такої схеми терапії, зокрема, визначення впливу на клітини моноцитарно-макрофагальної ланки імунітету. Тому метою нашого дослідження стало визначення показників функціональної активності перитонеальних макрофагів (Мф) щурів з карциносаркомою Уокер-256 за різних режимів протипухлинної терапії та оцінка участі цих клітин у реалізації протипухлинного ефекту.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили на щурах лінії Wistar (самки віком 2,5 міс та масою тіла 180–200 г) розведення віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук України. Під час проведення експерименту щурі перебували в стандартних умовах віварію з природним режимом освітлення, на повноцінному раціональному харчуванні. Утримання тварин і робота з ними здійснювалися відповідно до загальноприйнятих міжнародних правил проведення досліджень на експериментальних тваринах.

У якості моделі пухлинного росту використана карциносаркома Уокер-256. Враховуючи морфологічні характеристики та перебіг пухлинного процесу, цю пухлину можна розглядати як експериментальну модель раку молочної залози, яка дозволяє відтворювати процеси, що відбуваються послідовно на всіх стадіях канцерогенезу протягом нетривалого періоду часу [21]. Клітини карциносаркоми Уокер-256 одержано з Національного банку клітинних ліній та пухлинних штамів Інституту експериментальної пато-

логії, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук України. Перещеплення пухлинних клітин проводили підшкірно у пахову зону правої нижньої кінцівки у кількості 1×10^6 клітин у фізіологічному розчині NaCl.

На 7-му добу пухлинного росту починали лікування тварин, використовуючи доксорубіцин (Dox) або цисплатин (Cis) у монорежимі та при комбінованому застосуванні з КПВ за відповідними схемами. КПВ одержували на основі антигенів ембріональної тканини курки та білоквмісного метаболіту *B. Subtilis 7025* з М.М. 70 кДа за методом [22].

Характеристика груп та схеми застосування препаратів наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Характеристика груп щурів з карциносаркомою Уокер-256

Група	Кількість щурів, n	Схема введення препарату
Контроль пухлинного росту (КПР)	6	Тваринам контрольної групи вводили по 0,3 мл фізіологічного розчину NaCl
Dox	6	Внутрішньочеревно, 0,3 мл, 0,250 мг/тв., щоденно протягом 5 днів
Cis	6	Внутрішньочеревно, 0,3 мл, по 0,15 мг/тв., щоденно протягом 5 днів
КПВ	6	Підшкірно, 0,3 мл, по 0,2 мг/тв., на 7-му, 9-ту, 16-ту, 23-тю добу після перещеплення пухлини
КПВ + Dox	6	Поєднували схеми введення КПВ та Dox
КПВ + Cis	6	Поєднували схеми введення КПВ та Cis

На 24-ту добу пухлинного процесу тварин виводили з експерименту та оцінювали параметри пухлинного росту і ряд показників, що характеризують функціональну активність Мф.

Об'єм пухлини (V , см^3) розраховували за формулою:

$$V = \frac{3,14 \cdot d^3}{8},$$

де d — діаметр пухлини, см.

Індекс гальмування росту пухлини (ІГРП) розраховували за формулою:

$$\text{ІГРП} = \frac{V_{\text{контр}} - V_{\text{досл}}}{V_{\text{контр}}} \cdot 100\%,$$

де $V_{\text{контр}}$ — середній об'єм пухлини в контрольній групі, $V_{\text{досл}}$ — середній об'єм пухлини в дослідній групі.

Перитонеальні Мф отримували за методом [23], використовуючи ступінчасте центрифугування на подвійному градієнті густини фікол-урографіну (1,114 г/мл і 1,076 г/мл) протягом 15 хв при 250 г з наступним гіпотонічним лізисом домішок еритроцитів. У дослідженнях використовували кінцеву концентрацію $1 \cdot 10^6$ клітин/мл.

У пластикову мікропробірку відбирали 1 мл клітинної суспензії, інкубували при 37 °С протягом 24 год, осаджували методом центрифугування. Надосад використовували для оцінки мієлопероксидазної активності, рівня продукції оксиду азоту (NO).

Осад клітин використовували для визначення активності аргінази.

Метод визначення активності екзогенної пероксидази [24] базується на здатності пероксидази окислювати ортофенілєндіамін за наявності перекису водню при рН 5,0 і змінювати забарвлення субстратної суміші від безкольорової до жовтувато-коричневої. Для проведення тесту до 100 мкл дослідного зразка додають 100 мкл субстратної суміші (2 мг ортофенілєндіаміну, розчиненого в 10 мл цитратно-фосфатного буфера, рН 5,0) і перекису водню (кінцева концентрація 0,02%). У контрольну лунку додають хромоген та інкубаційне середовище. Через 5–10 хв, залежно від інтенсивності розвитку кольору, реакцію зупиняють додаванням 50 мкл 10% сірчаної кислоти. Інтенсивність забарвлення визначають спектрофотометрично при довжині хвилі 492 нм.

Продукцію Мф оксиду азоту на автоматичному microELISA reader (StatFax-2100, USA) визначали за реакцією Грісса [25]. До 150 мкл інкубаційного середовища додавали послідовно 75 мкл 1,5% розчину сульфаніламідів в 1N HCl і 75 мкл 0,15% розчину нафтілєтилєндіаміндихлориду в дистильованій воді. Після інкубації протягом 10 хв аналізували оптичну густину розчину при довжині хвилі 540 нм. Рівень NO оцінювали за калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартних розчинів нітриту натрію. Рівень NO представляли в ммоль $\text{NO}^2^-/10^6$ клітин.

Активність аргінази визначали за швидкістю утворення сечовини. Реакцію зупиняли додаванням суміші кислот ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_3\text{PO}_4:\text{H}_2\text{O}$). Для колориметричного визначення сечовини до суміші додавали α -ізонітрозопропіофенон та інкубували при 95 °C упродовж 30 хв, потім при 4 °C 30 хв. Концентрацію сечовини визначали спектрофотометрично при $\lambda = 550$ нм. Значення оптичної густини переводили в мікрограми, використовуючи калібрувальну криву, побудовану за розчинами сечовини відомої концентрації. Аргіназну активність розраховували за методикою [26].

Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики [27]. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за *t*-критерієм Ст'юдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На 24-ту добу росту пухлини показник виживаності в групі КПП становив 66,7%. За умов застосування хімотерапевтичного або імунотерапевтичного лікування смерті тварин не спостерігали в жодній групі. Проте відмічали суттєві відмінності в динаміці пухлинного росту між групами тварин, які отримували лікування за різними схемами: ХТ та ІТ в монорежимі або їх комбіноване застосування (рис. 1).

Середній розмір пухлин був найбільшим у щурів групи КПП і становив $155,6 \pm 29,9$ см³. Застосування в монорежимі як КПВ, так і Дох призводило до суттєвого зниження цього показника (в 2,2 раза, $p < 0,05$). Проте найбільш ефективним виявилось комбіноване застосування КПВ + Дох. У тварин цієї групи відмічали зменшення розміру пухлин порівняно з показниками груп КПП (у 4,4 раза, $p < 0,05$), а також КПВ і Дох (в 1,9 раза). Не спостерігали суттєвого впливу на динаміку пухлинного росту іншого засобу ХТ — Cis (як у монорежимі, так і при комбінованому застосуванні). Середній розмір пухлин у щурів групи КПВ + Cis перевищував показники групи КПВ + Дох у 2,8 раза ($p < 0,05$).

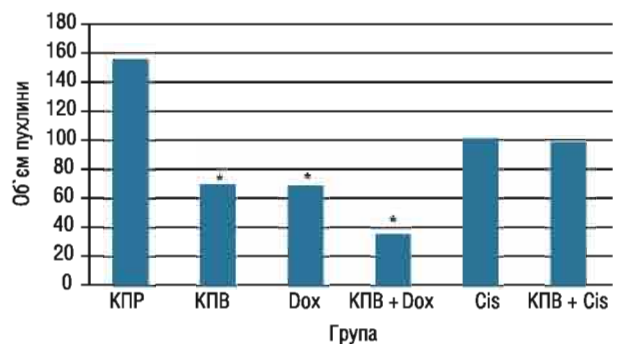


Рис. 1. Середній об'єм пухлин (см³) на 24-ту добу пухлинного росту. * $p < 0,05$ порівняно з групою КПП

Про найбільшу ефективність застосування комбінованої схеми КПВ + Дох свідчить і розрахований показник ІГРП, який склав 77,2%. Введення як КПВ, так і Дох у монорежимі не мало такого впливу — ІГРП становив 55,4 та 55,8% відповідно.

Тобто проведення вакцинотерапії сприяло посиленню ефекту ХТ та у разі застосування в якості хімотерапевтичного засобу Дох дозволяло досягти більш позитивних результатів лікування. Отримані дані свідчать про необхідність урахування моделі пухлинного росту та засобу ХТ при проведенні ІТ.

Про перспективність застосування імунотерапевтичних підходів (адаптивна і таргетна ІТ, цитокінотерапія, вакцинотерапія) у комплексному лікуванні пацієнток з раком молочної залози свідчать і результати ряду клінічних випробувань [9, 10, 28]. Показано, що використання аутовакцини в комплексному лікуванні пацієнток з раком молочної залози стадій I–III призводило до зниження частоти виникнення рецидивів та віддалених метастазів, підвищення показників виживаності, покращення якості життя хворих, а також сприяло зниженню частоти негативних проявів ХТ (зокрема мієлосупресії) [28].

Відомо, що клітинний склад пухлинної тканини неоднорідний та представляє собою сукупність як гетерогенних за своїми біологічними властивостями власне пухлинних клітин, так і клітин інших типів. Важливу роль у формуванні мікрооточення пухлини відіграють клітини імунної системи, у першу

чергу ті, що беруть участь у запальних процесах — Мф та нейтрофіли. Зокрема, на даний час відомо, що роль у пухлинному процесі Мф далеко неоднозначна. Ці клітини регулюють взаємодію пухлинних клітин з мікрооточенням упродовж усіх етапів пухлинного процесу та здатні набувати різних властивостей залежно від сигналів середовища їх функціонування. Залежно від тканинного мікрооточення Мф можуть набувати М1 або М2 фенотипів, що зумовлює їх прозапальну (М1) або протизапальну (М2) активність. Прозапальні Мф експресують індукційну NO-синтазу і CD40, продукують фактор некрозу пухлини альфа (tumor necrosis factor alpha — TNF α) і інтерлейкін (interleukin — IL)-6; протизапальні макрофаги експресують аргіназу і CD206, продукують трансформуючий фактор росту бета та IL-10 [29, 30].

Тому ми провели оцінку стану перитонеальних Мф за різними проявами їх функціональної активності (цитохімічна, аргіназа, продукція NO). Названі показники функціональної активності дозволяють визначити напрямок поляризації Мф у даний термін пухлинного росту та виділити субпопуляції, що превалюють — фенотип М1 (клітини з протипухлинними властивостями, сприяють гальмуванню росту пухлини) або М2 (клітини з пропухлинними властивостями).

Мф інтактних щурів характеризувалися високим рівнем продукції NO та низькою аргіназою активністю, про що свідчить показник співвідношення NO/arg, який становив 14,9 (табл. 2). У щурів групи КПП відмічали статистично недостовірне зменшення продукції оксиду азоту та підвищення активності аргінази перитонеальними макрофагами, що призводило до зменшення в 1,4 раза (порівняно з інтактними тваринами) співвідношення NO/arg. Тобто на 24-ту добу росту пухлини у нелікованих тварин превалювали макрофаги типу М2, які володіють пропухлинними властивостями. Застосування засобів ХТ або ІТ сприяло збільшенню кількості макрофагів типу М1, про що свідчить суттєве підвищення продукції NO та зниження аргіназої активності. При цьому найбільш ефективно виявилось комбіноване застосування КПВ + Дох: рівень NO зростав у 1,6 раза, а активність аргінази знижувалася в 1,5 раза ($p < 0,05$ для обох показників порівняно з групою КПП). Показник співвідношення NO/arg у цій групі перевищував аналогічні в інтактних щурів та тварин групи КПП в 1,6 та 2,4 раза відповідно. Використання в якості засобу ХТ Cis у монорежимі не впливало на зміни поляризації Мф, у той час як комбінація КПВ + Cis виявилася більш ефективною (співвідношення NO/arg становило 20,2 проти 10,3 в групі КПП, $p < 0,05$).

Таким чином, аналіз отриманих результатів показав, що на термінальних етапах росту аденокарциноми Уокер-256 серед перитонеальних Мф нелікованих щурів превалюють клітини з фенотипом М2 (з пропухлинними властивостями). Застосуван-

ня Дох призводило до поляризації Мф у клітини з фенотипом М1, у той час як використання Cis такого ефекту не мало. За умови використання імуномодулюючого засобу (КПВ) відмічали зміни поляризації Мф у бік фенотипу М1 незалежно від того, який препарат ХТ використовували.

Таблиця 2
Рівень продукції NO та активності аргінази перитонеальних макрофагів щурів з карциномою Уокер-256

Група	NO	Аргіназа	NO/arg
ІК	33,1 \pm 2,8	2,22 \pm 0,09	14,9
КПП	28,8 \pm 1,6	2,81 \pm 0,05	10,3
КПВ	36,3 \pm 0,8*	1,62 \pm 0,28*	22,4
Дох	42,1 \pm 0,8*	1,77 \pm 0,42	23,8
КПВ + Дох	46,2 \pm 1,2*	1,89 \pm 0,1*	24,4
Cis	34,1 \pm 3,7	2,46 \pm 0,03	13,9
КПВ + Cis	38,8 \pm 2,4*	1,92 \pm 0,25	20,2

* $p < 0,05$ порівняно з показниками групи КПП.

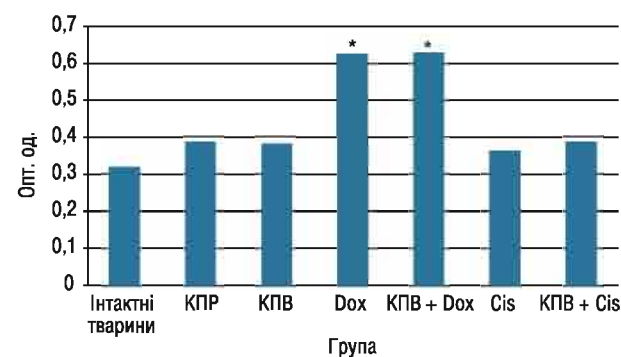


Рис. 2. Рівень продукції екзогенної пероксидази перитонеальними макрофагами. * $p < 0,05$ порівняно з групою КПП

Мієлопероксидаза — один із ключових ферментів фагоцитів, що відповідає за бактерицидну активність нейтрофілів і Мф [31]. При оцінці продукції екзогенної пероксидази перитонеальними Мф щурів з карциномою Уокер-256 найвищі рівні цього ферменту виявлені в супернатантах Мф тварин, яким вводили Дох у монорежимі або в комбінації з КПВ (в 1,6 раза більше порівняно з КПП, $p < 0,05$) (рис. 2). У всіх інших групах досліджуваний показник практично не відрізнявся від такого в нелікованих тварин. Такі дані свідчать про те, що при застосуванні режимів Дох або КПВ + Дох не відбувається пригнічення функціональної активності Мф. Об'єднуючи ці результати з даними щодо продукції NO, можна припустити, що застосування Дох у монорежимі чи в комбінації з КПВ запобігає поляризації Мф у бік фенотипу М2, що, ймовірно, є одним із факторів, який і зумовлює протипухлинний ефект у щурів з карциномою Уокер-256. При цьому більшу протипухлинну ефективність спостерігали при одночасному застосуванні ІТ та ХТ, а саме комбінації КПВ + Дох. Використання такого режиму, вірогідно, дозволяє підтримувати на належному рівні цитотоксичну активність ефекторів неспецифічного імунітету за рахунок превалювання Мф М1, які, як відомо, виявляють протипухлинні властивості. Виявлені кореляційні зв'язки між об'ємом пухлини та показниками функціональної активності Мф (табл. 3) підтверджують висловле-

не нами припущення. Так, було виявлено негативний кореляційний зв'язок між розміром первинного пухлинного вузла та показниками, що вказують на приналежність Мф до фенотипу М1: рівень NO та співвідношення NO/arg — сильний ($r = -0.92$, $p < 0,05$), активність мієлопероксидази — помірний ($r = -0,67$). У той же час кореляція з активністю аргінази, яка є характерною ознакою Мф з фенотипом М2, була сильною позитивною ($r = 0,82$).

Таблиця 3

Кореляційний зв'язок (r) між показниками об'єму пухлини та функціональної активності перитонеальних Мф

Показник	r
Рівень NO	-0,92
Активність аргінази	0,82
Співвідношення NO/arg	-0,92
Активність мієлопероксидази	-0,67

Таким чином, комбіноване застосування ХТ та ІТ може мати більший протипухлинний ефект, ніж використання їх у монорежимі. Проте такий ефект може залежати як від природи пухлини, так і від хіміотерапевтичного препарату, що потребує подальшого дослідження. Негативний кореляційний зв'язок між об'ємом пухлини та показниками функціональної активності Мф першого типу вказує на те, що поляризовані за цим типом Мф відіграють значну роль у стримуванні пухлинного росту. Отримані дані відкривають перспективу пошуку підходів щодо цілеспрямованої зміни фенотипу Мф з метою підвищення ефективності протипухлинної терапії.

ВИСНОВКИ

1. На моделі аденокарциноми Уокер-256 найвищу протипухлинну ефективність спостерігали при застосуванні комбінованої схеми терапії КПВ + Дох, про що свідчить розрахований показник ІГРП, який становив 77,2%.

2. На 24-ту добу росту пухлини в нелікованих тварин превалювали Мф з фенотипом М2. Комбіноване застосування КПВ + Дох сприяло поляризації Мф у клітини з фенотипом М1, про що свідчить суттєве зростання показника співвідношення NO/arg (відповідно в 1,6 та 2,4 раза порівняно з інтактними тваринами та щурами групи КПР).

3. Сильний негативний кореляційний зв'язок між показниками розміру пухлини та функціональної активності Мф з фенотипом М1 свідчить про значну роль цих клітин у гальмуванні пухлинного росту.

Робота виконана за підтримки Цільової програми наукових досліджень Відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології Національної академії наук України («Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин», номер держреєстрації 0117U002034, 2017–2021) та конкурсу науково-дослідних робіт молодих учених Національної академії наук України («Функціональна активність фагоцитуючих клітин як предиктор

ефективності протипухлинної дії доксорубіцину», номер держреєстрації 0119U102416, 2019–2020).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Andersen MH, Sorensen RB, Schrama D, *et al.* Cancer treatment: the combination of vaccination with other therapies. *Cancer Immunol Immunother* 2008; **57**: 1735–43.
- Menard C, Martin F, Apetoh L, *et al.* Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 2008; **57**: 1579–87.
- Riley RS, June CH, Langer R, Mitchell MJ. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov* 2019; **18** (3): 175–96.
- Ventola CL. Cancer immunotherapy. Part 2: efficacy, safety, and other clinical considerations. *P&T* 2017; **42** (7): 452–63.
- Apetoh L, Vegran F, Ladoire S, Ghiringhelli F. Restoration of antitumor immunity through selective inhibition of myeloid derived suppressor cells by anticancer therapies. *Curr Mol Med* 2011; **11**: 365–72.
- Apetoh L, Ladoire S, Coukos G, Ghiringhelli F. Combining immunotherapy and anticancer agents. *Ann Oncol* 2015; **26**(9): 1813–23.
- Schlom J, Arlen PM, Gulley JL. Cancer vaccines: moving beyond current paradigms. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 3776–82.
- Wheeler CJ, Das A, Liu G, *et al.* Clinical responsiveness of glioblastoma multiforme to chemotherapy after vaccination. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 5316–26.
- Garcia-Aranda M, Redondo M. Immunotherapy: a challenge of breast cancer treatment. *Cancers (Basel)* 2019; **11** (12): 1822.
- Mina LA, Lim S, Bahadur SW, Firoz AT. Immunotherapy for the treatment of breast cancer: emerging new data. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 2019; **11**: 321–8.
- Luhong Yang, Yanxia Wang, Huafeng Wang. Use of immunotherapy in the treatment of gastric cancer. *Oncol Lett* 2019; **18** (6): 5681–90.
- Corrales L, Scilla K, Caglevic C, *et al.* Immunotherapy in lung cancer: a new age in cancer treatment. *Adv Exp Med Biol* 2018; **995**: 65–95.
- Verovkina NO. Recent advances in immunotherapy in the treatment of cancer patients: the use of immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin oncol* 2018; **8** (4): 228–31. (in Ukrainian)
- Ganesh O, Stadler K, Cercek ZK, *et al.* Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019; **16**: 361–75.
- Tintelnot J, Stein A. Immunotherapy in colorectal cancer: available clinical evidence, challenges and novel approaches. *World J Gastroenterol* 2019; **25**(29): 3920–8.
- Ott PA, Hu Z, Keskin DB, *et al.* An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* 2017; **547**: 217–21.
- Symchych TV, Fedosova NI, Karaman OM, *et al.* Anticancer effect and immunologic response to xenogeneic embryonic proteins in mice bearing Ehrlich solid carcinoma. *Exp Oncol* 2017; **39** (1): 42–8.
- Symchych TV, Fedosova NI, Karaman OM, *et al.* The effects of early postoperative immunization with xenogeneic embryonic proteins on Lewis lung carcinoma model. *Exp Oncol* 2018; **40** (4): 275–81.
- Fedosova NI, Voeykova IM, Karaman OM, *et al.* Cytotoxic activity of immune cells following administration of xenogeneic cancer vaccine in mice with melanoma B-16. *Exp Oncol* 2015; **37** (2): 130–4.
- Kraško J, Zilionytė K, Darinskas A, *et al.* Post-operative unadjuvanted therapeutic xenovaccination with chicken whole embryo vaccine suppresses distant micrometastases and prolongs survival in a murine Lewis lung carcinoma model. *Oncology Letters* 2018; **15**: 5098–104.

21. **Aparecida do Amaral L, Santos MR, Oliveira de Souza GH.** Walker-256 tumor: experimental model, implantation sites and number of cells for ascitic and solid tumor development. *Brazilian Archives Biology and Technology* 2019; **62** (12): e19180284.
22. **Potebnya GP, Bolyukh IA, Didenko GV, et al.** Method of designing antitumor vaccine. (Pat. № 77647 UA). Publ. 27.08.2013. Bul. №16. (in Ukrainian).
23. **Kiseleva EP, Polevshchikov AV.** The method of automated accounting of the NST test. *Clin Lab Diagn* 1994; **4**: 27–9. (in Russian).
24. Enzyme-linked immunosorbent assay: *Ngo T., Lenhoff G* (eds). M.: Mir, 1988. 446 p. (in Russian).
25. Macrophages and dendritic cells. *Methods and Protocols. Neil E. Reiner* (eds). NY: Humana Press, 2009. 368 p.
26. **Shugaley VS, Kozina AS.** Urea content and arginase activity in rat organs during acclimatization to cold. *Fiziol journal USSR* 1977; **8**: 1199–202. (in Russian).
27. **Sidenko AB, Vishnyakov VV, Isaev SM.** Theory of statistics. M.: MAX-Press; 2011. 343 p. (in Russian).
28. **Zajciuk VV, Vereshchako RI, Cheshuk VE, et al.** Efficacy of combination of anticancer autovaccine with standard anticancer treatment in breast cancer (analysis of 10-year surveillance data). *Oncology* 2015; **17**(1): 47–54. (in Russian).
29. **Weigel E, Smith C, Liu PG, et al.** Macrophage polarization and its role in cancer. *J Clin Cell Immunol* 2015; **6**: 338. doi:10.4172/2155–9899.1000338
30. **Zhao C, Miranda AC, Sove RJ, et al.** A mechanistic integrativecomputational model of macrophage polarization: Implications in human pathophysiology. *PLoSComput Biol* 2019; **15**(11): e1007468. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007468>
31. **Dolgushin II, Mezentseva EA, Savochkina AY, Kuznetsova EK.** Neutrophil as a multifunctional relay in immune system. *Russian Journal of Infection and Immunity* 2019; **9**(1): 9–38. (in Russian).

PROSPECTS FOR USING THE PHENOMENON OF MACROPHAGES PLASTICITY TO EVALUATE THE EFFICIENCY OF CANCER THERAPY

**O.O. Kruts, A.V. Chumak, N.I. Fedosova,
T.V. Symchych, I.M. Voeykova, G.V. Didenko**

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

Summary. Objectives: determination of indicators of the functional activity of peritoneal macrophages: rats with Walker-256 carcinosarcoma under various regimens of antitumor therapy and assessment of the participation of macrophages in the implementation of the antitumor effect. **Object and methods:** the study was conducted in Wistar rats. Walker 256 carcinosarcoma was used as a

tumor growth model. For the treatment of animals doxorubicin or cisplatin were used both in monotherapy and in combined regimens with the xenogeneic antitumor vaccine (XAV). The XAV was prepared according to the method on the basis of antigens of chicken embryonic tissue and protein-containing metabolite of B. subtilis 7025 with molecular mass 70 kDa. The characteristics of tumor growth and functional activity of peritoneal macrophages were evaluated on day 24. Results: according to tumor growth characteristics, the most effective was the combined application of XAV + doxorubicin. The animals of this group were characterized by a decrease in tumor size comparing with XAV group (by 4.4 times, $p < 0.05$), XAV + cisplatin (by 1.9 times). On day 24 of the tumor growth in non-treated animals, type M2 macrophages predominated; chemotherapy and/or immunotherapy led to increase of type M1 macrophages that was supported by a significant increase in nitric oxide (NO) production and a decrease in arginase activity. The most effective was the combination XAV + doxorubicin: NO level increased by 1.6 and arginase activity decreased by 1.5 times ($p < 0.05$ for both parameters compared with XAV group). Cisplatin application both in monotherapy, and in the combination with XAV did not exert the similar effect. Conclusions: the most pronounced antitumor efficacy in Walker 256 carcinosarcoma model was seen at application of the combined chemotherapy and immunotherapy (regimen XAV + doxorubicin). This effect was probably due to a significant increase in the amount of of type M1 macrophages, which exhibit antitumor properties. The strong negative correlation between tumor size and macrophages functional activity with the M1 phenotype indicates a significant role for these cells in inhibiting tumor growth.

Key Words: immunotherapy, chemotherapy, carcinosarcoma Walker 256, M1 and M2 macrophages.

Адреса для листування:

Діденко Г.В.

Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
E-mail: gennadij_d@ukr.net

Одержано: 17.03.2020