

**Н.І. Федосова,
А.В. Чумак,
Н.Л. Черемшенко,
Т.В. Симчич,
О.М. Караман,
Д.О. Карабаєв,
І.М. Восійкова**

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

Ключові слова: макрофаги, M1 та M2 поляризація, функціональна активність, карцинома легені Льюїс, лектин *B. subtilis* IMB B-7724, цисплатин

DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2023.01.032>

ЗМІНИ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ МАКРОФАГІВ ЗА РІЗНИХ СХЕМ ВВЕДЕННЯ БАКТЕРІАЛЬНОГО ЛЕКТИНУ

Мета: дослідити протипухлинний ефект та вплив лектину *B. subtilis* IMB B-7724 в монорежимі або в комбінації з цисплатином на функціональну активність макрофагів тварин з метастазуючою модельною пухлиною. **Об'єкт і методи:** дослідження проведені на мишах лінії C57Bl/6J з карциномою легені Льюїс (КЛЛ). Оцінювали протипухлинний ефект та вплив на функціональну активність перитонеальних макрофагів лектину при його застосуванні в монорежимі та в комбінації з цисплатином. Функціональну активність перитонеальних макрофагів досліджували за рівнем продукції NO, аргіназою та цитотоксичною активністю. **Результати:** на моделі КЛЛ продемонстрована антиметастатична ефективність лектину *B. subtilis* IMB B-7724 при введенні його як у монорежимі, так і в комбінації з цисплатином. Зазначений ефект значною мірою обумовлений змінами функціональної активності макрофагів. У мишей з пухлинами, які не отримували лікування, превалювали макрофаги M2, про що свідчить суттєве ($p < 0,05$) пригнічення їх цитотоксичної активності та характерні зміни метаболізму аргінази. Особливості метаболізму L-аргініну та цитотоксичної активності перитонеальних макрофагів свідчать про збереження їх протипухлинної активності (поляризація в напрямку M1) на віддаленій стадії росту модельної пухлини. **Висновки:** у тварин з КЛЛ найбільш виражений протипухлинний ефект спостерігали за умови комбінованого застосування бактеріального лектину та цисплатину. Використання в якості засобу терапії лектину *B. subtilis* IMB B-7724 (як в монорежимі, так і в комбінації з цисплатином) забезпечувало збереження протипухлинної активності макрофагів та сприяло їх поляризації в напрямку M1 на термінальній стадії пухлинного росту.

Підвищення ефективності протипухлинної терапії залишається однією з найважливіших задач сучасної медицини. На сьогодні найчастіше проводять комбіноване або комплексне лікування пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями, яке передбачає одночасне застосування декількох методів. Одним із основних методів лікування онкологічних хворих залишається хіміотерапія. Головною метою включення хіміотерапії у схеми комбінованого протипухлинного лікування є досягнення максимальної циторедукції первинної пухлини або метастатичних вогнищ. Суттєвим обмеженням хіміотерапії є те, що цитостатичні препарати мають широкий спектр побічних ефектів, особливо при застосуванні їх у високих дозах [1, 2]. На сьогодні накопичені експериментальні та клінічні дані щодо участі імунної системи пацієнта в реалізації протипухлинного ефекту конвенціональної цитостатичної терапії. Показано, що модуляція імунної відповіді при використанні цитостатичних засобів може бути обумовлена як підвищенням антигенних властивостей пухлинних клітин, що сприяє їх розпізнаванню імунною системою, так

і безпосередньою активацією клітин-ефекторів імунної системи або зменшенням імуносупресорних впливів пухлинного мікрооточення [3, 4]. Для ряду засобів хіміотерапії, які широко використовують в клінічній практиці, показана здатність індукувати імуногенну загибель пухлинних клітин, запускаючи адаптивну імунну відповідь на пухлинні антигени [5, 6]. Тобто, ефективність протипухлинного лікування значною мірою залежить від функціонального стану та активності основних ефекторів як природного (природні кілерні клітини, макрофаги), так і адаптивного (Т-лімфоцити) імунітету, які є основними регуляторними клітинами пухлинного мікрооточення, що залучені в пухлинний процес з найбільш ранніх його етапів та відіграють значну роль у процесі розвитку і прогресування пухлини [7, 8].

Одним з найпоширеніших типів стромальних клітин у пухлині є макрофаги (Мф). Ці клітини володіють властивістю сприймати сигнали пухлинного мікрооточення і змінювати напрямок своєї поляризації від клітин з протипухлинними властивостями (M1) до клітин, що сприяють рос-

ту пухлини (M2), і навпаки. Мф M1 виконують функції імунного нагляду та презентації антигену, продуковані ними прозапальні цитокіни та хемокини сприяють реалізації протипухлинної імунної відповіді. Мф M2 мають значно меншу здатність презентувати антиген, відіграють важливу роль в імунній регуляції, знижуючи протипухлинну імунну відповідь за рахунок продукції інгібіторних цитокінів (таких, як IL-10 та/або TGF- β). Фенотип асоційованих з пухлиною Мф (ПАМ) тісно пов'язаний з динамікою росту пухлини та прогнозом захворювання. Зазвичай, серед ПАМ превалюють Мф M2 типу, які сприяють формуванню імуносупресивного мікросередовища. Пропухлинний ефект ПАМ обумовлений вивільненням ними ряду цитокінів, хемокинів, медіаторів запалення. Фактори, продуковані цими клітинами, стимулюють ангіогенез, сприяють міграції пухлинних клітин та створенню сприятливого середовища для подальшої їх колонізації, тим самим сприяючи росту пухлини та метастазуванню [9, 10].

Відомо, що ПАМ характеризуються високою пластичністю. Тобто, під впливом відповідних зовнішніх стимулів ці клітини здатні змінювати напрямок поляризації M1 $\leftrightarrow$ M2. Здатність Мф впливати на пухлинне мікрооточення через взаємодію з іншими клітинами та відповідні зміни їх кількості, активності та фенотипу у відповідь на проведення терапії робить Мф новою перспективною мішенню для протипухлинної терапії. Зокрема, пластичність Мф намагаються використовувати при розробці нових методів імунотерапії пацієнтів зі злоскісними новоутвореннями [11, 12].

Таким чином, розуміння принципово важливої ролі імунної системи у визначенні ефективності протипухлинної цитостатичної терапії відкриває перспективи для розвитку нових терапевтичних підходів до лікування пацієнтів зі злоскісними новоутвореннями за рахунок включення в комплексну схему лікування засобів імунотерапії. Вплив останніх спрямований на підтримання функціональної активності основних ефекторів протипухлинного імунітету та запобігання імуносупресії, що обумовлена як розвитком пухлинного процесу, так і впливом агресивних засобів цитостатичної протипухлинної терапії. Виходячи з цього, перспективними видаються терапевтичні стратегії, що спрямовані на “репрограмування” клітин імунної системи, призводять до нормалізації фенотипу і функціональних властивостей таких клітин. Що, як наслідок, сприяє розпізнаванню та знищенню трансформованих клітин імунною системою господаря, зменшуючи імуносупресивний вплив пухлинного мікрооточення [13]. Тому останнім часом значну увагу приділяють можливості підвищення ефективності протипухлинної терапії за рахунок поєднання засобів конвенціональної цитостатичної терапії та біотерапії.

Виходячи з викладеного, метою проведеного експериментального дослідження було дослідити протипухлинний ефект та вплив лектину *B. subtilis* IMB B-7724 в монорежимі або в комбінації з цисплатином на функціональну активність макрофагів тварин з метастазуючою модельною пухлиною.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведені на мишах ліній C57Bl/6J (самці, $n = 25$, віком 2,0–2,5 міс., масою 19,0–22,0 г), які були одержані з розплідника віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Тварини перебували в стандартних умовах віварію з природним режимом освітлення та на повноцінному раціоні харчування. Утримання мишей та робота з ними здійснювались відповідно до стандартних міжнародних правил з біологічної етики та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях [14].

В якості експериментальної моделі пухлинного росту використана карцинома легені Льюїс (КЛЛ), яка на сьогоднішній день вважається відтворюваною сингенною моделлю раку легені людини при проведенні доклінічних досліджень, зокрема при оцінці *in vivo* ефективності засобів хіміотерапії [15]. Пухлинні клітини одержували з Банку клітинних ліній з тканин людини та тварин ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Для перещеплення пухлин мишам ліній C57Bl/6J вводили клітини КЛЛ внутрішньом'язево у стегно в кількості 4×10^5 клітин/мишу.

При лікуванні мишей з пухлинами в якості засобу хіміотерапії використовували цисплатин (Ebewe, Австрія), засобу біотерапії — лектин *B. subtilis* IMB B-7724 [16]. Експериментальних тварин розділяли на 5 груп: “Інтактний контроль (ІК)” ($n = 5$) — інтактні миші цієї ж лінії, віку та статі; “Контроль пухлинного росту (КПР)” ($n = 5$) — миші з пухлинами, яким вводили 0,9% розчин NaCl; “Цисплатин” ($n = 5$) — миші з пухлинами, яким, починаючи з 2-ї доби після трансплантації пухлинних клітин, 5-разово вводили цисплатин (Ebewe, Австрія) (щоденно, внутрішньочеревно, по 0,0125 мг/мишу); “Лектин” ($n = 5$) — миші з пухлинами, яким, починаючи з 8-ї доби після трансплантації пухлинних клітин, 10-разово вводили лектин *B. subtilis* IMB B-7724 (через день, підшкірно, по 0,02 мг/мишу); “Лектин + Цисплатин” ($n = 5$) — миші з пухлинами, яким за описаними вище схемами вводили і лектин, і цисплатин.

Перебіг пухлинного процесу характеризували за стандартними показниками (частота перещеплення (%) пухлин, об'єм пухлин (мм³), кількість (n) та об'єм (мм³) легеневих метастазів).

Протипухлинний ефект оцінювали за індексом гальмування росту пухлини (ІГРП):

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

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

Для оцінки *антиметастатичного ефекту* розраховували індекс інгібування метастазування (ІМ) за формулою:

$$\text{ІМ} = \frac{A_k \cdot B_k - A \cdot B}{A_k \cdot B_k} \times 100\%,$$

де A_k і A — кількість тварин з метастазами в контрольній і дослідних групах відповідно; B_k і B — середня кількість метастазів в легенях тварин контрольної і дослідних груп, відповідно.

На 28-му добу пухлинного росту (термінальна стадія) проводили оцінку показників функціонального стану перитонеальних Мф. Перитонеальні Мф отримували, використовуючи метод ступінчастого центрифугування на подвійному градієнті густини з фікол-урографіном (1,114 г/мл і 1,076 г/мл) впродовж 15 хв при 250 g з наступним гіпотонічним лізисом домішок еритроцитів. Імунологічне дослідження включало оцінку визначення рівня продукції NO, активності аргінази (Arg), цитотоксичної активності. Тип поляризації Мф оцінювали за співвідношенням показників NO/Arg.

Продукцію NO (за кількістю NO_2^-) визначали спектрофотометричним методом при довжині хвилі збудження 550 нм з використанням реактиву Грісса (ACROS Organics, United Kindom) [17]. Рівень NO (в ммоль $\text{NO}_2^-/10^6$ клітин) визначали за калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартних розчинів нітриту натрію.

Активність Arg визначали за швидкістю утворення сечовини [17]. 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 концентрації сечовини до суміші додавали α -ізонітрозопропіофенон та інкубували при 95°C впродовж 30 хв, а потім 30 хв при 4°C. Концентрацію сечовини вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі збудження 550 нм. Аргіназну активність визначали за калібрувальною кривою, побудованою за розчинами сечовини відомої концентрації. Одна одиниця аргіназної активності — кількість ферменту, що гідролізує 1 ммоль аргініну за 1 хв. Дані виражали в од./ 10^6 клітин.

Цитотоксичну активність Мф визначали за стандартною методикою за допомогою МТТ-тесту [18]. В 96-лункові плоскодонні планшети вносили Мф (4×10^5 клітин/лунку) та пухлинні клітини

(2×10^4 клітин/лунку) в повному культуральному середовищі (RPMI, 10% ембріональної телячої сироватки, 1% антибіотика; всі реактиви Sigma, США). Планшети інкубували в термостаті протягом 18 год при 37°C, 5% CO_2 , 100% вологості. Після закінчення інкубації додавали 20 мкл розчину МТТ (5 мг/мл; Sigma, США) та інкубували 4 год. Планшети відмивали двічі 0,9% розчином NaCl при 4000 об/хв 15 хв. Для візуалізації реакції додавали 120 мкл КОН (2 моль/л) і 140 мкл 50% розчину ДМСО (Sigma, США). Оптичну густину вимірювали при $\lambda=540$ нм, використовуючи рідер MicroELISA (StatFax 2100, США). Результати розраховували за формулою:

$$\text{ІЩ} = \left[1 - \frac{\text{ОГ}_{\text{Мф+КЛЛ}} - \text{ОГ}_{\text{бланк}}}{\text{ОГ}_{\text{Мф}} + \text{ОГ}_{\text{КЛЛ}} - \text{ОГ}_{\text{бланк}}} \right] \times 100\%,$$

де $\text{ОГ}_{\text{Мф}}$ — оптична густина в пробах з Мф; $\text{ОГ}_{\text{КЛЛ}}$ — оптична густина в пробах з пухлинними клітинами; $\text{ОГ}_{\text{Мф+КЛЛ}}$ — оптична густина в дослідних серіях.

Статистичну обробку результатів проводили за загально прийнятими методами варіаційної статистики з використанням GraphPad Prism 8.0.1 (Graphpad Software Inc., США). Вірогідність різниці між контрольними та дослідними групами оцінювали за t-критерієм Стюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати оцінки протипухлинного ефекту лектину *B. subtilis* IMB B-7724 за умови застосування його в монорежимі або в комбінації з цисплатином представлені в *табл. 1*. Як видно з наведених даних, введення бактеріального лектину та цисплатину не впливало на частоту прищеплення КЛЛ — пухлини виникали у всіх дослідних тварин. У подальшому відмічали статистично достовірне ($p < 0,05$) гальмування росту пухлин у тварин, які отримували комбіноване лікування за допомогою обох препаратів. Суттєвих відмінностей в динаміці росту пухлин між групами тварин, які отримували лікування за різними схемами, не спостерігали. Проте, оцінка кількості та розміру метастазів в легенях контрольних і дослідних мишей з КЛЛ показала, що більш ефективним виявилось застосування комбінованої схеми лікування. У тварин цієї групи середній об'єм метастазів був статистично достовірно меншим порівняно з показниками як нелікованих мишей (в 4,3 раза, $p < 0,05$), так і пролікованих в монорежимі лектином (в 2,7 раза, $p < 0,05$) або цисплатином (в 2,8 раза, $p < 0,05$).

Для оцінки ефективності різних режимів застосування бактеріального лектину та цисплатину

Таблиця 1

Протипухлинна ефективність різних режимів застосування лектину *B. subtilis* IMB B-7724 та цисплатину

Показник	КПР	Лектин	Цисплатин	Лектин + цисплатин
<i>Показники пухлинного росту</i>				
Частота виходу пухлин, %	91,7 ± 7,9	91,7 ± 7,9	91,7 ± 7,9	91,7 ± 7,9
Розмір первинного пухлинного вузла, мм ³	3665,2 ± 84,0	2772,9 ± 321,1 ¹	2420,8 ± 210,4 ¹	2505,5 ± 376,7 ¹
<i>Показники метастазування</i>				
Частота метастазування, %	91,7 ± 7,9	91,7 ± 7,9	91,7 ± 7,9	91,7 ± 7,9
Середня кількість метастазів, п	11,3 ± 4,7	8,0 ± 5,0	10,3 ± 4,9	7,7 ± 2,0
Середній об'єм метастазів, мм ³	26,7 ± 9,8	16,8 ± 3,2	17,1 ± 1,6	6,2 ± 1,5 ^{1,2,3}

Примітки: ¹ — $p < 0,05$ порівняно з показником групи "КПР"; ² — $p < 0,05$ порівняно з показником групи "Лектин"; ³ — $p < 0,05$ порівняно з показником групи "Цисплатин".

були розраховані ІГРП (протипухлинний ефект) та ПМ (антиметастатичний ефект). За розрахованими показниками найбільш ефективною виявилась комбінована схема терапії (рис. 1).

Відомо, що в реалізації протипухлинної імунної відповіді значну роль відіграють реакції неспецифічного імунітету. Зокрема, Мф є одними з важливих ефекторів вродженого імунітету, що реагують на розвиток будь-якого патологічного процесу, зокрема онкологічного. Ці клітини регулюють взаємодію пухлинних клітин з мікрооточенням упродовж усіх етапів пухлинного процесу та здатні набувати різних властивостей залежно від сигналів оточуючого середовища. Визначення ряду показників функціональної активності Мф дозволяє визначити напрямок їх поляризації у даний термін пухлинного росту та виділити субпопуляції, що превалюють — з фенотипом М1 (клітини з протипухлинними властивостями, сприяють гальмуванню росту пухлини) або М2 (клітини з пропухлинними властивостями).

Оцінку поляризаційного стану Мф, отриманих з перитонеальної порожнини дослідних мишей,

проводили за визначенням особливостей метаболізму L-аргініну (рівня NO, активністю Arg): для Мф М1 характерним є підвищення продукції NO, а для Мф М2 — збільшення активності Arg. Аналіз отриманих даних свідчив про превалювання в популяції перитонеальних Мф інтактних мишей клітин з фенотипом М1. У нелікованих тварин групи "КПР" прогресування росту пухлини супроводжувалось поляризацією Мф в напрямку М2, про що свідчило статистично достовірне зниження на 28-му добу пухлинного росту показника продукції NO (в 1,1 раза порівняно з "ІК", $p < 0,05$) та зростання активності аргінази (в 1,1 раза порівняно з "ІК", $p < 0,05$) (табл. 2). Введення лектину *B. subtilis* IMB B-7724 в монорежимі призводило до нормалізації функціональної активності Мф: досліджувані показники поверталися практично до рівнів інтактного контролю. На рис. 2 представлені розраховані величини співвідношення показників продукції NO до активності Arg, які у інтактних мишей та тварин, яким вводили лектин в монорежимі, суттєво не відрізнялись, а у тварин групи "КПР" — були в 1,2 раза нижчими ($p < 0,05$).

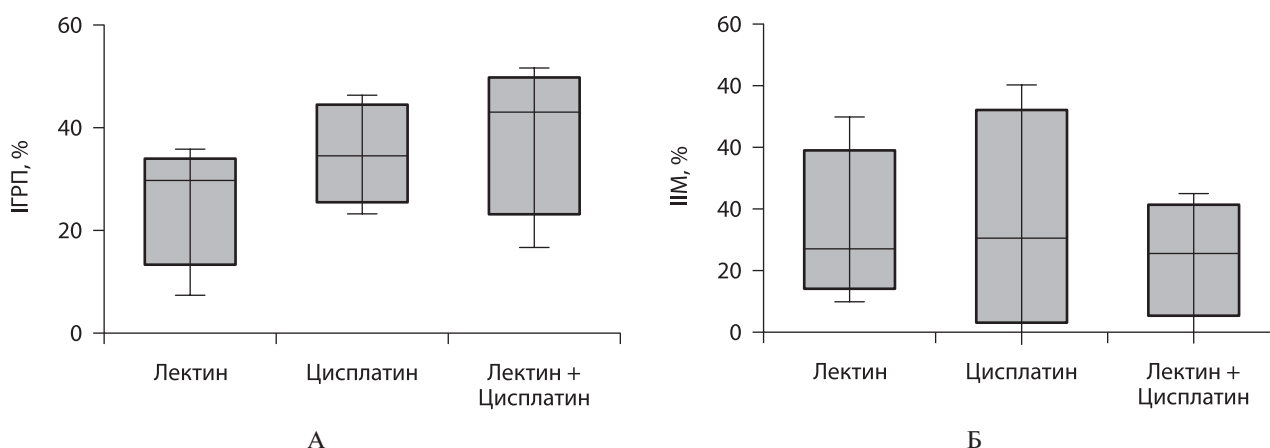


Рис. 1. Протипухлинний (А) та антиметастатичний (Б) ефекти лектину та цисплатину за різних режимів застосування

Особливості метаболізму L-аргініну у тварин дослідних та контрольних груп

Показник	Інтактні миші	КПР	Лектин	Цисплатин	Лектин + цисплатин
Рівень продукції NO, ммоль NO ²⁻ /10 ⁶ клітин	57,61 ± 0,09	53,00 ± 0,05 ¹	58,89 ± 0,06 ²	57,42 ± 0,21 ²	59,97 ± 0,09 ²
Активність Arg, од./10 ⁶ клітин	3,30 ± 0,05	3,64 ± 0,02 ¹	3,52 ± 0,04 ²	3,53 ± 0,6 ⁰	3,46 ± 0,08 ²

Примітки: ¹ — $p < 0,05$ порівняно з показником групи "ІК"; ² — $p < 0,05$ порівняно з показником групи "КПР".

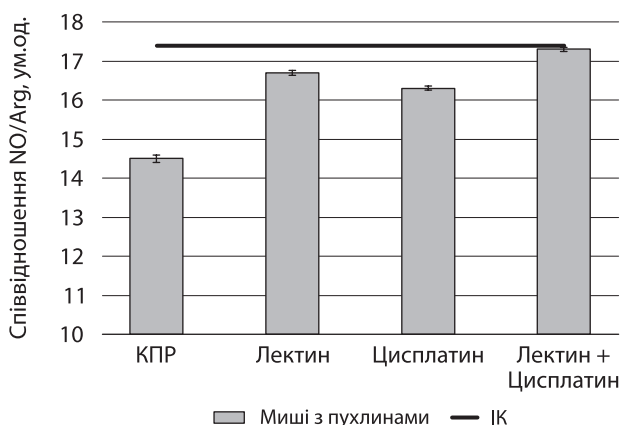


Рис. 2. Показники співвідношення NO/Arg в перитонеальних Мф мишей з КЛЛ за умови різних режимів застосування лектину та цисплатину

Найбільш виражений позитивний ефект спостерігали за умови комбінованого застосування лектину *B. subtilis* IMB B-7724 та цисплатину: на 28-му добу пухлинного росту порівняно з показниками нелікованих тварин відмічали суттєве збільшення продукції NO (в 1,1 раза, $p < 0,05$) (див. табл. 2) та підвищення співвідношення NO/Arg (в 1,2 раза, $p < 0,05$) (див. рис. 2).

Ще одним показником функціональної активності Мф, який дозволяє говорити про напрямок їх поляризації, є цитотоксична активність по відношенню до пухлинних клітин. На ранніх етапах росту пухлини специфічна цитотоксична актив-

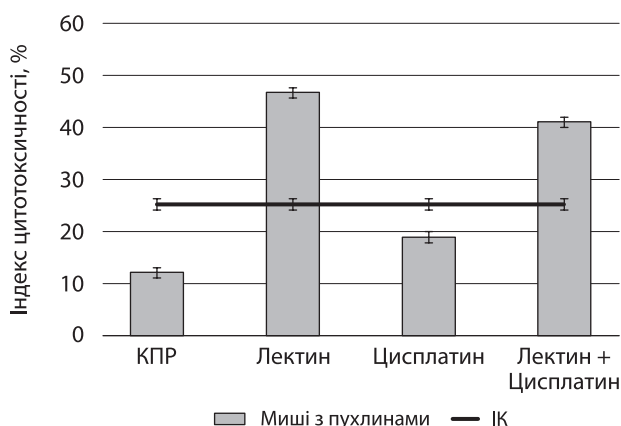


Рис. 3. Цитотоксична активність перитонеальних Мф мишей з КЛЛ та інтактних тварин

ність перитонеальних Мф суттєво не змінюється або спостерігають її зростання, що свідчить про формування повноцінної імунної відповіді на презентацію пухлинних антигенів [19]. Прогресування пухлинного процесу призводило до пригнічення активності перитонеальних Мф і на термінальній стадії росту пухлини (28-ма доба) у нелікованих тварин індекс цитотоксичності цих клітин суттєво знижувався (в 2,1 раза, $p < 0,05$ порівняно з інтактними мишами; рис. 3). За умови застосування бактеріального лектину в монорежимі на 28-му добу росту пухлини (повністю проведений курс лікування) індекс цитотоксичної активності Мф статистично достовірно перевищував відповідні показники не лише нелікованих, а й інтактних мишей: в 3,9 та 1,9 рази відповідно ($p < 0,05$). Останнє свідчить про превалювання в пулі перитонеальних Мф мишей, яким вводили лектин *B. subtilis* IMB B-7724 на тлі пухлинного росту, клітин з протипухлинними властивостями, тобто Мф М1. Схожі дані були отримані і при застосуванні комбінованої схеми лікування: цитотоксична активність перитонеальних Мф суттєво перевищувала показники інтактного контролю та контролю пухлинного росту (відповідно в 1,6 та 3,4 рази, $p < 0,05$). Застосування цисплатину в монорежимі такого ефекту не мало (див. рис. 3).

Отримані нами дані корелюють з результатами експериментальних досліджень щодо ролі ПАМ та зміни поляризації Мф на різних стадіях росту та метастазування злоякісних пухлин різного походження та локалізації [20–23]. Зокрема, при дослідженні складу стромальних клітин аденокарциноми легені, індукованої у мишей А/Ж за допомогою уретану, продемонстровані зміни поляризаційного стану альвеолярних Мф від неполяризованих клітин (Arg^{low}iNOS^{low}) у інтактних мишей до Мф М2 (Arg^{high}iNOS^{low}) через 24 тиж. після впливу канцерогену. На думку авторів, підвищення експресії Arg в макрофагах М2 призводить до зменшення продукції NO, який відповідає за цитотоксичний ефект по відношенню до пухлинних клітин, інгібує презентацію антигену іншим клітинам імунної системи та посилює здатність міелоїдних клітин-супресорів інгібувати проліферацію Т-клітин. Ці процеси сприяють пригніченню протипухлинної відповіді та посиленню росту пухлини [24].

Отримані дані співпадають і з результатами деяких клінічних досліджень, зокрема, в групі пацієнтів з недрібноклітинним раком легені (НДКРЛ) стадій I–III. Був проведений кореляційний аналіз між показниками розподілу та напрямку поляризації Мф в пухлинній тканині з показниками виживаності хворих. Автори відмітили, що Мф як М1, так М2 типу були локалізовані переважно в стромі пухлини. При цьому, в пухлинній тканині переважали Мф М2. Значна інфільтрація пухлинних островців Мф М1 була пов'язана із збільшенням показника загальної виживаності ($p < 0,05$); висока інфільтрація пухлинних островців і стромы Мф М2 — асоційована із його зниженням ($p < 0,05$) [11].

Кореляція між показниками виживаності хворих на рак легені та превалюванням серед ПАМ клітин відповідного фенотипу продемонстрована і в інших дослідженнях [25–27]. Так, у пацієнтів з НДКРЛ збільшення кількості асоційованих з пухлиною Мф М2 корелювало з поганим прогнозом та зниженням показника загальної виживаності, в той час як присутність у пухлинній тканині значної кількості Мф М1 була пов'язана з кращою загальною виживаністю хворих.

Таким чином, пластичність Мф, здатність змінювати свої властивості під впливом зовнішніх стимулів робить ці клітини цікавою мішенню для розробки більш ефективних схем лікування пацієнтів із злоякісними новоутвореннями. Отримані нами результати вказують на доцільність подальшого дослідження з цією метою лектину *B. subtilis* IMB B-7724.

ВИСНОВКИ

1. Введення лектину *B. subtilis* IMB B-7724 в монорежимі або в комбінації з цисплатином на тлі росту КЛЛ супроводжувалось протипухлинним та антиметастатичним ефектами. Найбільший ефект спостерігали при застосуванні комбінованої схеми лікування (лектин + цисплатин).

2. Застосування у тварин з КЛЛ в якості засобу терапії лектину *B. subtilis* IMB B-7724 забезпечувало збереження протипухлинної активності перитонеальних Мф та сприяло їх поляризації в напрямку М1 на віддалених стадіях росту модельної пухлини.

Робота виконана за підтримки Цільової програми наукових досліджень ВБФМБ НАН України (“Дослідження функціональної пластичності макрофагів за умов застосування засобів хіміо- та біо-терапії раку”, № держреєстрації 0118U005470).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Baxter-Holland M, Dass CR. Doxorubicin, mesenchymal stem cell toxicity and antitumour activity: implications for clinical use. *J Pharm Pharmacol* 2018; **70** (3): 320–7.
2. Wu J, Waxman DJ. Immunogenic chemotherapy: Dose and schedule dependence and combination with immunother-

- apy. *Cancer Lett* 2018; **419**: 210–221. doi: 10.1016/j.canlet.2018.01.050.
3. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, et al. Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents. *Cancer Cell* 2015; **28** (6): 690–714. doi: 10.1016/j.ccell.2015.10.012.
4. Rodrigues MC, Morais JAV, Ganassin R, et al. An overview on immunogenic cell death in cancer biology and therapy. *Pharmaceutics* 2022; **14** (8): 1564. doi: 10.3390/pharmaceutics14081564.
5. Ramakrishnan R, Assudani D, Nagaraj S, et al. Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. *J Clin Invest* 2010; **120** (4): 1111–24. doi: 10.1172/JCI140269.
6. Zhang L, Zhou C, Zhang S, et al. Chemotherapy reinforces anti-tumor immune response and enhances clinical efficacy of immune checkpoint inhibitors. *Front Oncol* 2022; **12**: 939249. doi: 10.3389/fonc.2022.939249.
7. Merlano MC, Denaro N, Galizia D, et al. How chemotherapy affects the tumor immune microenvironment: a narrative review. *Biomedicine* 2022; **10** (8): 1822. doi: 10.3390/biomedicine10081822.
8. Zheng X, Mansouri S, Krager A, et al. Metabolism in tumour-associated macrophages: a quid pro quo with the tumour microenvironment. *Eur Respir Rev* 2020; **29** (157): 200134. doi: 10.1183/16000617.0134-2020.
9. Xu Y, Wang X, Liu L, et al. Role of macrophages in tumor progression and therapy (Review). *Int J Oncol* 2022; **60** (5): 57. doi: 10.3892/ijo.2022.5347.
10. Lin Y, Xu J, Lan H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *J Hematol Oncol* 2019; **12** (1): 76. doi: 10.1186/s13045-019-0760-3.
11. Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, et al. Distribution of M1 and M2 macrophages in tumor islets and stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer. *BMC Immunol* 2018; **19** (1): 3. doi: 10.1186/s12865-018-0241-4.
12. Wei X, Nie S, Liu H, et al. Angiopoietin-like protein 2 facilitates non-small cell lung cancer progression by promoting the polarization of M2 tumor-associated macrophages. *Am J Cancer Res* 2017; **7** (11): 2220–33.
13. Pitt JM, Marabelle A, Eggermont A, et al. Targeting the tumor microenvironment: removing obstruction to anticancer immune responses and immunotherapy. *Ann Oncol* 2016; **27** (8): 1482–92. doi: 10.1093/annonc/mdw168.
14. Kozhemyakin YM, Khromov OS, Filonenko MA, Sayfutdinova HA. Guideline on management of laboratory animals and work with them. Kyiv: Avitsena, 2002. 179 p. (in Ukrainian)
15. Kellar A, Egan C, Morris D. preclinical murine models for lung cancer: clinical trial applications. *Biomed Res Int* 2015; **2015**: 621324. doi: 10.1155/2015/621324.
16. Fedosova NI, Cheremshenko NL, Hetman KI, et al. Physicochemical and cytotoxicity properties of *Bacillus subtilis* IMV B-7724 extracellular lectin. *Mikrobiol Z* 2021; **83** (1): 39–48. <https://doi.org/10.15407/mikrobiolj83.01.039>.
17. Reiner NE. Methods in molecular biology. Macrophages and dendritic cells. Methods and protocols. Preface. *Methods Mol Biol* 2009; **531**: v–vi. doi: 10.1007/978-1-59745-396-7.
18. Van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkoppele GJ, et al. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunol Met* 1994; **174** (1–2): 311–20.
19. Chumak AV, Fedosova NI, Cheremshenko NL, et al. Macrophage polarization in dynamics of Lewis lung carcinoma

- growth and metastasis. *Exp Oncol* 2021; **43** (1): 15–20. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no-1.15829.
20. Yoshida C, Kadota K, Ikeda T, *et al.* Tumor-associated macrophage infiltration is associated with a higher rate of tumor spread through air spaces in resected lung adenocarcinomas. *Lung Cancer* 2021; **158**: 91–6. doi: 10.1016/j.lungcan.2021.06.009.
 21. Rajtak A, Ostrowska-Leśko M, Żak K, *et al.* Integration of local and systemic immunity in ovarian cancer: Implications for immunotherapy. *Front Immunol* 2022; **13**: 1018256. doi: 10.3389/fimmu.2022.1018256.
 22. Almeida-Nunes DL, Mendes-Frias A, Silvestre R, *et al.* Immune tumor microenvironment in ovarian cancer ascites. *Int J Mol Sci* 2022; **23** (18): 10692. doi: 10.3390/ijms231810692.
 23. Pe KCS, Saetung R, Yodsurang V, *et al.* Triple-negative breast cancer influences a mixed M1/M2 macrophage phenotype associated with tumor aggressiveness. *PLoS One* 2022; **17** (8): e0273044. doi: 10.1371/journal.pone.0273044.
 24. Redente EF, Dwyer-Nield LD, Merrick DT, *et al.* Tumor progression stage and anatomical site regulate tumor-associated macrophage and bone marrow-derived monocyte polarization. *Am J Pathol* 2010; **176** (6): 2972–85. doi: 10.2353/ajpath.2010.090879.
 25. Sumitomo R, Hirai T, Fujita M, *et al.* M2 tumor-associated macrophages promote tumor progression in non-small-cell lung cancer. *Exp Ther Med* 2019; **18** (6): 4490–8. doi: 10.3892/etm.2019.8068.
 26. Cao L, Che X, Qiu X, *et al.* M2 macrophage infiltration into tumor islets leads to poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *Cancer Manag Res* 2019; **11**: 6125–38. doi: 10.2147/CMAR.S199832.
 27. Mei J, Xiao Z, Guo C, *et al.* Prognostic impact of tumor-associated macrophage infiltration in non-small cell lung cancer: a systemic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2016; **7** (23): 34217–28. doi: 10.18632/oncotarget.9079.

CHANGES IN THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF MACROPHAGES UNDER THE INFLUENCE OF BACTERIAL LECTIN APPLIED IN DIFFERENT SCHEMES

N.I. Fedosova, A.V. Chumak, N.L. Cheremshenko, T.V. Symchych, O.M. Karaman, D.O. Karabaiev, I.M. Voyeykova

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

Aim: to investigate the antitumor effect and the influence of *B. subtilis* IMV B-7724 lectin applied as a single therapy or in combination with cisplatin on various manifestations of macrophages functional activity during the growth of a metastasizing experimental tumor. **Materials and methods:** the study was performed on C57Bl/6J mice bearing Lewis lung carcinoma (LLC). The effect of the lectin applied as a single therapy or in combination with cisplatin on tumor growth and the functional activity of peritoneal macrophages were evaluated. The functional activity of peritoneal macrophages was studied by the level of NO production, arginase and cytotoxic activity. **Results:** there was demonstrated an antimetastatic efficacy of *B. subtilis* IMV B-7724 lectin applied in Lewis lung carcinoma model either as a single therapy or in combination with cisplatin. In all probability, this effect was grounded by the changes in macrophages functional activity. As it is evidenced by a significant ($p < 0.05$) sup-

pression of macrophages' cytotoxic activity and characteristic changes in arginase metabolism, M2 macrophages predominated in the control (untreated) tumor-bearing mice. The features of L-arginine metabolism and cytotoxic activity in peritoneal macrophages indicate the preservation of their antitumor activity (polarization toward M1 type) at the terminal stage of experimental tumor growth. **Conclusions:** in the animals bearing experimental tumor, the most pronounced antitumor effect was observed when the bacterial lectin was applied in combination with cisplatin. The use of *B. subtilis* IMV B-7724 lectin as a therapeutic agent (either as a single therapy or in combination with cisplatin) preserved the antitumor activity of macrophages and promoted their polarization toward M1 direction at the terminal stage of tumor growth.

Key words: macrophages, M1 and M2 polarization, functional activity, Lewis lung carcinoma, *B. subtilis* IMV B-7724 lectin, cisplatin

Адреса для листування:

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

Одержано: 26.12.2022