

Н.І. Федосова,
Н.Л. Черемшненко,
С.В. Гоголь,
А.В. Чумак,
Т.В. Симчич,
І.М. Восійкова,
О.О. Лихова,
В.Ф. Чехун

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

Ключові слова: аденокарци-
нома Ерліха, лектин *B. subtilis*
IMB B-7724, *B. animalis subsp.*
lactis BB-12, макрофаги,
функціональна активність.

DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2024.04.267>

ВПЛИВ МЕТАБОЛІТІВ *B. ANIMALIS* ТА *B. SUBTILIS* *IMB B-7724* НА ПОЛЯРИЗАЦІЙНИЙ СТАН МАКРОФАГІВ В ДОСЛІДЖЕННЯХ *IN VIVO*

Мета: вивчення впливу бактерій роду *Bifidobacterium* та позаклітинного метаболіту *B. subtilis IMB B-7724* на процес поляризації макрофагів мишей з модельним пухлинним процесом. **Об'єкт і методи:** дослідження проведені на мишах лінії Balb/c ($n = 52$). В якості експериментальної моделі використана аденокарцинома Ерліха (АКЕ). Починаючи з 2-ї доби після трансплантації пухлинних клітин тваринам дослідних груп вводили окремо лектин *B. subtilis IMB B-7724* (п/ш, по 1 мг/кг маси), *B. animalis subsp. lactis BB-12* (per os, по 7×10^5 КУО/мишу) або їх комбінацію. На 21- та 28-му доби росту пухлини визначали параметри функціональної активності макрофагів (Мф) за рівнем продукції NO, аргіназою (Arg) та цитотоксичною активністю. Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики. **Результати:** на термінальній стадії росту АКЕ серед Мф перитонеальної порожнини і пухлинної тканини превалювали клітини з фенотипом M2. Введення лектину *B. subtilis IMB B-7724* (як окремо, так і в комбінації з *B. animalis*) сприяло поляризації перитонеальних Мф в напрямку M1, про що свідчило зростання ($p < 0,05$) співвідношення NO/Arg в 5,2 раза (на 21-шу добу) та в 6,9 раза (на 28-му добу). Введення окремо *B. animalis* призводило до поляризації перитонеальних Мф до фенотипу M2, про що свідчить значне зростання ($p < 0,05$) активності Arg та зменшення показника NO/Arg порівняно з показниками як інтактних мишей, так і тварин інших дослідних груп. Аналогічним чином змінювалася поляризація Мф, отриманих з пухлинної тканини. **Висновок:** введення лектину *B. subtilis IMB B-7724* окремо або в комбінації з *B. animalis subsp. lactis BB-12* сприяло зміні поляризаційного стану Мф тварин з модельним пухлинним процесом. Незалежно від анатомічної ніші функціонування, серед Мф превалювали клітини з фенотипом та функціональними властивостями M1.

Застосування засобів біотерапії дозволяє підвищити ефективність специфічного лікування пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями за рахунок тривалого збереження активності основних ефекторів імунітету та формування протипухлинної імунної відповіді. Протипухлинні реакції організму (в першу чергу, природного імунітету) відіграють значну роль в запобіганні розвитку рецидивів та метастазів первинної пухлини. Тому ефективним може бути застосування в комплексному протипухлинному лікуванні засобів, що запобігають порушенню імунної відповіді внаслідок прогресування пухлинного процесу або агресивного впливу хіміо- та променевої терапії.

Серед нових напрямків біотерапії значну увагу науковців привертають методи, спрямовані на зміни поляризаційного стану макрофагів (Мф), які є одними з основних клітин-ефекторів протипухлинного імунітету, завдяки здатності цих клітин

до швидкої зміни свої функціональних властивостей в залежності від стимулів локального мікрооточення. Мікрооточення пухлини є складною екосистемою, яка включає різні популяції клітин і неклітинні компоненти, що здатні сприяти росту пухлини, інвазії, метастазуванню та, значною мірою, визначають відповідь на терапію [1–3]. Серед імунних клітин мікрооточення, саме асоційовані з пухлиною Мф (ПАМ) та продуковані ними фактори вважають найбільш суттєвими факторами, що впливають на прогресування або гальмування пухлинного процесу. ПАМ, які складають значну частину популяції імуніцитів, регулюють взаємодію пухлинних клітин з мікрооточенням протягом всіх етапів розвитку пухлини. За рахунок продукції ряду цитокінів Мф здатні посилювати або пригнічувати активність клітин-ефекторів як неспецифічного (природні кілерні клітини), так і специфічного (CD8⁺-, CD4⁺-лімфоцити) імунітету [4, 5].

Мф мають високий ступінь пластичності та демонструють здатність коригувати свій фенотип у відповідь на сигнали навколишнього середовища, що змінюються. Цей процес відомий як “поляризація” [6]. Зазвичай Мф поділяють на два типи: класично активовані М1 та альтернативно активовані М2. Ця класифікація базується на особливостях фенотипу та функціональних властивостях клітин. Макрофаги М1 мають прозапальні та імуностимулюючі властивості; активуються під впливом ліпополісахариду (lipopolysaccharide, LPS), інтерферону-гамма (interferon gamma, IFN- γ), фактору некрозу пухлини альфа (tumor necrosis factor α , TNF- α) та демонструють підвищену експресію антигенів головного комплексу гістосумісності II типу (МНС-II). Вони продукують оксид азоту (NO), активні форми кисню та азоту, які мають прямий вплив на клітини-мішені. Опосередкований вплив на пухлинні клітини обумовлений продукцією Мф М1 прозапальних факторів (інтерлейкін-1 (IL-1), IL-6 та IL-23), активацією Т-хелперів 1 типу (Th1). Мф М2 мають протизапальні та імуносупресивні властивості; можуть бути індуквані IL-4 та IL-13. Вони характеризуються високою експресією CD206 та сприяють диференціюванню Th2, секретуючи протизапальні цитокіни (такі як IL-10, TGF- β , Arg-1 і PGE2). Мф М2 відіграють важливу роль у ремоделюванні та регенерації тканин, загоєнні ран, ревааскуляризації, а також сприяють прогресуванню пухлини [7].

На ранніх стадіях формування пухлини більшість Мф мають класично активований фенотип М1 та виконують протипухлинну роль. В подальшому, під впливом сигналів мікросередовища, вони поступово поляризуються до Мф М2. ПАМ М2 сприяють прогресії пухлини та її метастазуванню через пряму імуносупресивну дію та/або через залучення інших типів імуносупресивних клітин (Treg, мієлоїдні супресивні клітини), а також шляхом моделювання позаклітинного матриксу пухлини або активації в пухлинних клітинах генів-супресорів (їх продуктів) [8, 9]. Водночас, слід враховувати особливу пластичність Мф М2, що дозволяє припустити можливість їх реполяризації в М1 за допомогою засобів біотерапії [10]. Детальне дослідження механізмів переключення М1 $\leftrightarrow$ М2 та пошук можливих шляхів регуляції процесу поляризації є одним із сучасних важливих напрямків оптимізації імунотерапії пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями.

Останніми роками зростає кількість досліджень щодо визначення ролі мікробіоти у виникненні та прогресуванні злоякісних пухлин [11, 12]. Нещодавні дослідження показали, що мікроорганізми відіграють значну роль у формуванні мікрооточення деяких пухлин. Було виявлено, що кишкова мікробіота та її метаболіти не лише підтримують гомеостаз кишківника, а й впливають на функцію-

нування імунних клітин, які інфільтрують пухлину. Дані, отримані в експериментальних та клінічних дослідженнях, свідчать про потенційний зв'язок між мікробіомом кишківника та мірооточенням пухлини, особливо у процесах регуляції ПАМ [13]. Зокрема, існують дані щодо пробіотичної реполяризації з протизапального стану макрофагів М2 у прозапальний стан М1. Було продемонстровано вплив *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* штам DWT1; CCM 7992 (LDB) та *Streptococcus thermophilus* штам DWT4; CCM 7992 (ST), а також пробіотичного коктейлю LDB-ST на зміну поляризованого стану М2 в М1 для мишачої макрофагальної клітинної лінії RAW 264.7 (*in vitro*) та перитонеальних і асоційованих з пухлиною Мф мишей (*ex vivo*, *in vivo*) [14].

Терапевтичні властивості (антиоксидантні, проапоптотичні, антипроліферативні), які можуть обумовлювати протипухлинну дію, продемонстровані і для представників *Bifidobacterium* spp. та *Bacillus* spp. [15, 16]. Хоча позитивні властивості цих мікроорганізмів добре відомі, їх роль у виникненні раку все ще є суперечливою, а конкретний механізм за допомогою якого вони можуть стимулювати протипухлинну імунну відповідь мало досліджений. Недостатньо вивченими також є питання можливості підсилення імунomodуючої дії шляхом одночасного застосування різних видів бактерій (або їх метаболітів). Тому метою даної роботи було вивчення впливу бактерій роду *Bifidobacterium* та позаклітинного метаболіту *B. subtilis* IMB B-7724 на процес поляризації макрофагів мишей з модельним пухлинним процесом.

ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведені на мишах лінії Balb/c (самки, $n = 20$), які були одержані з розплідника віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Вік тварин складав 2,0–2,5 міс., маса — 19,0–22,0 г. Тварини перебували у стандартних умовах віварію з природним режимом освітлення 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 [17].

В якості експериментальної моделі пухлини молочної залози використана солідна аденокарцинома Ерліха (АКЕ) [18]. Пухлинні клітини одержували з Банку клітинних ліній з тканин людини та тварин ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Для перешеплення пухлин клітини АКЕ вводили внутрішньом'язево в стегно (5×10^5 клітин/мишу).

Бактеріальний лектин. Продуцентом лектину є спороутворюючі грампозитивні сапрофітні бактерії штаму *B. subtilis* IMB B-7724 (задепонований у колекції Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ). Лектин отримували із культуральної рідини мікроорганізму як описано в [19]. Готовий лектин у вигляді ліофілізованого порошку зберігали при температурі -20°C , перед застосуванням розчиняли в фізіологічному розчині 0,9% NaCl. Лектин вводили мишам з АKE підшкірно, в дозі 1 мг/кг маси, через день, № 10.

Штам бактерій. В роботі використовували ліофілізовані клітини *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (Lek Pharmaceuticals, Любляна, Словенія). Біфідобактерії вводили мишам з АKE *per os*, по 7×10^5 КУО/мишу на введення, через добу, № 10.

Схема експерименту. Сформовано 5 груп експериментальних тварин: “Лектин” — миші з пухлинами, яким починаючи з 2-ї доби після трансплантації пухлинних клітин вводили лектин *B. subtilis* IMB B-7724 ($n=8$); “*B. animalis*” — миші з пухлинами, яким з 2-ї доби після трансплантації пухлинних клітин вводили *B. animalis* ($n=8$); “Лектин + *B. animalis*” — комбіноване введення мишам з АKE біфідобактерій та бактеріального лектину за описаними вище схемами ($n=8$); “Контроль пухлинного росту (КПР)” — миші з АKE, введення 0,9% NaCl ($n=8$); “Інтактний контроль” — миші тієї ж лінії, ваги та віку без перещеплення пухлини, введення 0,9% NaCl ($n=8$).

На 21-шу та 28-му доби росту пухлин визначали функціональну активність Мф, які отримували з перитонеальної порожнини та пухлинної тканини як детально описано в [20]. При отриманні Мф з пухлинної тканини додатково аналізували клітинний склад прилипаючої фракції шляхом оцінки активності кислій неспецифічної естерази в клітинах методом одночасного азотосполучення (за Mueller та сп.). Активність ферменту в цитоплазмі клітин, що мала характер дифузного чи гранулярного коричнево-червоного забарвлення, оцінювали за допомогою мікроскопу, що дозволило диференціювати Мф та пухлинні клітини.

Дослідження включали визначення рівня продукції NO, активності аргінази (Arg), розрахунок співвідношення цих показників (NO/Arg), а також оцінку специфічної цитотоксичної активності Мф, отриманих з перитонеальної порожнини та пухлинної тканини.

Цитотоксичну активність Мф по відношенню до сингенних пухлинних клітин визначали *in vitro* методом МТТ-тесту [21]. В 96-лункові плоскодонні планшети (“Applied Biosystems”, США) вносили по 100 мкл суспензії Мф (4×10^6 клітин/мл) та відповідних клітин-мішеней (КМ) (2×10^5 клітин/мл) у повному поживному середовищі. В контрольних лунках містились лише КМ, або лише Мф. Всі про-

би ставили в 3-х паралелях. Планшети інкубували в термостаті протягом 18 год. в стандартних умовах (37°C , 5% CO_2 , 100% вологості). Після закінчення інкубації додавали 20 мкл розчину МТТ (“Sigma”, США) з концентрацією 5 мг/мл, інкубували ще 4 год. Для візуалізації результатів реакції культуральне середовище видаляли, додавали 120 мкл КОН (2 моль/л) і 140 мкл 50% розчину ДМСО (“Serva”, США). Вимірювання оптичної густини проводили на мультилунковому спектрофотометрі StatFax 2100 (США) при $\lambda = 540$ нм з використанням диференційного фільтру при $\lambda = 630$ нм. Результати розраховували за формулою:

$$\text{Щ} = \frac{\text{ОГ}_{\text{Мф}} + \text{ОГ}_{\text{КМ}} - \text{ОГ}_{\text{Мф+КМ}}}{\text{ОГ}_{\text{Мф}} + \text{ОГ}_{\text{КМ}}} \cdot 100\%,$$

де $\text{ОГ}_{\text{Мф}}$ — оптична густина в пробах з клітинами-ефекторами; $\text{ОГ}_{\text{КМ}}$ — оптична густина в пробах з КМ; $\text{ОГ}_{\text{Мф+КМ}}$ — оптична густина в дослідних лунках.

Рівні продукції NO вимірювали за стандартною реакцією Гріса [22]. Суспензію Мф (1×10^6 клітин/мл) в повному поживному середовищі вносили по 200 мкл у 96-лункові планшети (“Applied Biosystems”, США), інкубували протягом 24 год за стандартних умов. Кожну пробу досліджували у 3 паралелях. Кількість NO визначали за накопиченням нітриту (як стабільного метаболіту NO) в реакції Гріса. Аліквоту культурального супернатанту (100 мкл) змішували з рівним об’ємом реагенту Гріса (“Acros Organics”, United Kindom) та інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі в темряві. Продукти реакції оцінювали на мультилунковому спектрофотометрі StatFax 2100 (США) при $\lambda = 550$ нм. Рівень NO визначали за калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартних розчинів нітриту натрію. Рівень NO виражали в ммоль $\text{NO}^2/10^6$ клітин.

Активність Arg визначали за швидкістю утворення сечовини [22]. Реакцію зупиняли додаванням суміші кислот (H_2SO_4 : H_3PO_4 : H_2O). Для колориметричного визначення сечовини до суміші додавали α -ізонітрозопропіофенон (“Sigma”, США) та інкубували упродовж 30 хв при 95°C та 30 хв — при 4°C . Концентрацію сечовини визначали спектрофотометрично при $\lambda = 550$ нм. Активність Arg розраховували за методикою [23]. Дані виражені в од./ 10^6 клітин. Одна одиниця аргіназної активності дорівнює кількості ферменту, що гідролізує 1 ммоль аргініну за 1 хв.

Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими 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 Стьюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати оцінки впливу *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 та лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на динаміку росту АКЕ докладно описані нами в статті [24]. Було показано, що введення лектину *B. subtilis* IMB B-7724, як окремо, так і в комбінації з *B. animalis*, призводило до суттєвого гальмування росту пухлин (відповідно на 55,0 та 50,5%), а також до збільшення тривалості життя (відповідно на 61,4 та 50,0%) порівняно з показниками нелікованих тварин з АКЕ. Застосування окремо *B. animalis* вираженого ефекту не мало.

Для пояснення можливих причин такого впливу було проведено імунологічне дослідження, яке включало оцінку змін поляризаційного стану Мф, отриманих з перитонеальної порожнини (пМф) та пухлинної тканини, після завершення повного курсу введення пробіотичних препаратів. Оцінити стан поляризації Мф на певних етапах пухлинного процесу дозволяє визначення особливостей катаболізму L-аргініну (рівні продукції NO та активність Arg). Розраховане за отриманими по-

казниками співвідношення NO/Arg свідчить про зміни напрямку поляризації M1↔M2: підвищений рівень продукції NO є характерним для Мф M1; збільшення активності Arg — для Мф M2.

Як показали результати дослідження, пМф інтактних мишей лінії Balb/c характеризувалися високим рівнем продукції NO ($30,0 \pm 2,1$ NO²-/10⁶ клітин) та низькою аргіназою активністю ($1,3 \pm 0,04$ од./10⁶ клітин). Показник співвідношення NO/Arg становив $20,6 \pm 3,1$ ум.од. У процесі росту пухлини у тварин, яким не проводили лікування, відбувалася поляризація пМф у напрямку M2. Про це свідчить суттєве зменшення порівняно з інтактним контролем на 28-му добу пухлинного росту рівнів продукції NO (до $13,7 \pm 3,9$ NO²-/10⁶ клітин, $p < 0,05$) на тлі збільшення активності Arg ($2,8 \pm 0,8$ од./10⁶ клітин, $p < 0,05$) (рис. 1, 2); показник співвідношення NO/Arg знижувався до $4,9 \pm 0,9$ ум.од. (рис. 3).

Введення тваринам з карциномою бактеріальних препаратів мало різноспрямований вплив на зміни функціонального стану пМф (див. рис. 1–3). Застосування лектину *B. subtilis* IMB B-7724 приз-

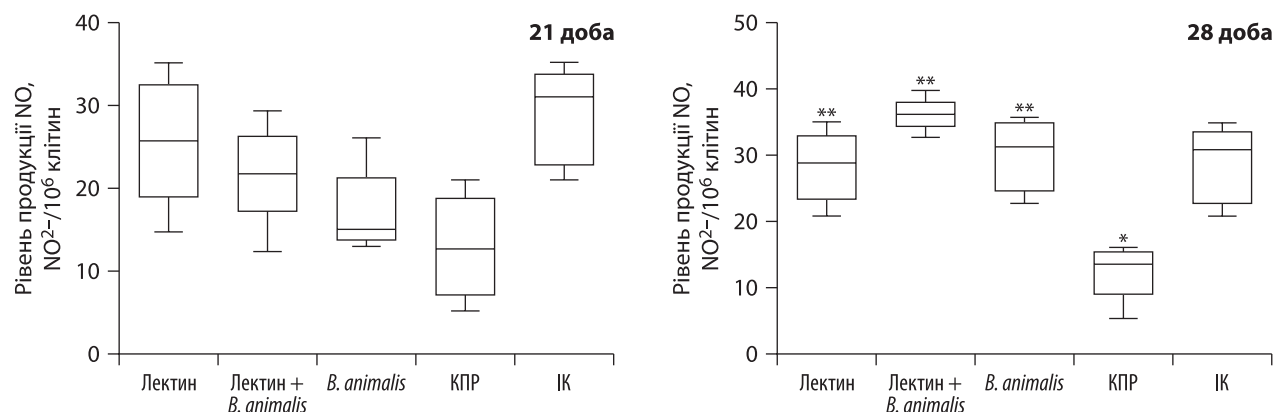


Рис. 1. Зміни рівнів продукції NO пМф мишей з АКЕ за умови введення *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 та лектину *B. subtilis* IMB B-7724. * — $p < 0,05$ порівняно з показником інтактного контролю; ** — $p < 0,05$ порівняно з показником групи КПР

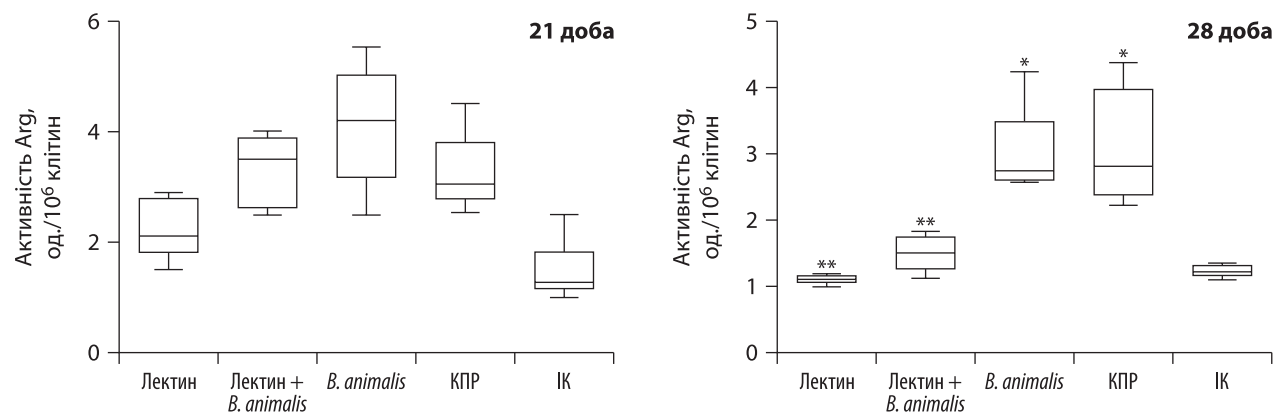


Рис. 2. Зміни активності Arg в пМф мишей з АКЕ за умови введення *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 та лектину *B. subtilis* IMB B-7724. * — $p < 0,05$ порівняно з показником інтактного контролю; ** — $p < 0,05$ порівняно з показником групи КПР

води́ло до збереження протягом всього періоду спостереження продукції NO та аргіназної активності на рівні інтактних мишей. Про поляризацію пМф в напрямку M1 свідчи́ло також зростання співвідношення NO/Arg: на 21-шу добу росту цей показник перевищував такий у нелікованих тварин у 5,2 раза ($p < 0,05$), на 28-му — у 6,9 раза ($p < 0,05$). Аналогічні результати отримані за умови комбінованого застосування лектину та *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12. Проте у тварин цієї групи активація Мф M1 була дещо менш вираженою: на 21-шу та 28-му доби показник співвідношення NO/Arg зроста́в відпові́дно в 3,6 та 4,4 раза порівняно з таким у мишей групи КПР, $p < 0,05$). Такий ефект, вірогідно, був обумовлений підвищеним рівнем аргіназної активності пМф тварин цієї групи. Тобто, за отриманими результатами можна зробити висновок, що введення лектину *B. subtilis* IMB B-7724 як окремо, так і в комбінації з *B. animalis* сприяло поляризації пМф у напрямку M1, що і обумовлювало протипухлинний ефект.

Введення окремо *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 мало протилежний ефект. На різні терміни росту АКЕ рівні співвідношення NO/Arg практично не відрізнялися від показників нелікованих тварин і були суттєво меншими ніж у інтактних мишей (див. рис. 3). Причиною даного ефекту також було значне зростання ($p < 0,05$) активності Arg: в 2,6 раза порівняно з показниками інтактних мишей; в 2,4 та 1,7 раза відпові́дно порівняно з показниками мишей які отримували лектин *B. subtilis* IMB B-7724 окремо та в комбінації з *B. animalis* (див. рис. 2). Тобто, введення *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 окремо призводило до поляризації пМф в напрямку клітин з протизапальними властивостями — Мф M2.

Отримані дані підтверджуються і результатами визначення специфічної цитотоксичної активності пМф. Хоча збільшення цитотоксичної активності пМф було виявлене у всіх мишей, які отримували бактеріальні препарати, найвищі її рівні характерні для груп тварин, яким вводили лектин *B. subtilis* IMB B-7724 окремо або в комбінації з *B. animalis* (рис. 4). Що може вказувати на тривале збереження клітин з фенотипом M1 в пулі пМф мишей цих груп.

На сьогодні переконливо показано, що переважування у пухлинній тканині ПАМ M2 є поганою прогностичною ознакою у хворих з солідними злоякісними пухлинами. Зокрема, результати клініко-патологічних досліджень демонструють, що накопичення ПАМ у тканині карциноми молочної залози людини корелює з негативним клінічним результатом та свідчить про прогресування пухлинного процесу. Показано, що ПАМ здатні індукувати ангиогенез, ремоделювати позаклітинний матрикс пухлини для сприяння інвазії, моделювати клітини раку молочної залози для ухилення від

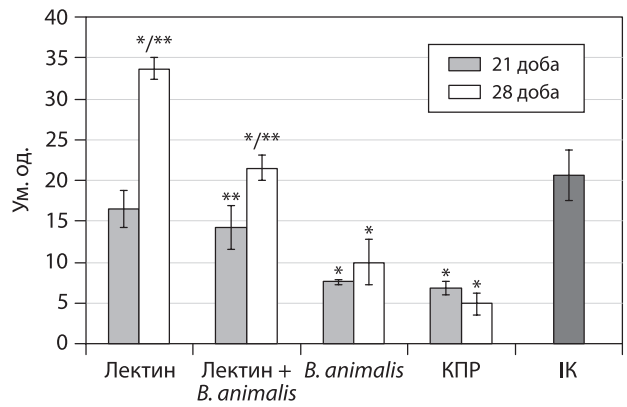


Рис. 3. Співвідношення NO/arg пМф мишей з АКЕ за умови введення *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 та лектину *B. subtilis* IMB B-7724. * — $p < 0,05$ порівняно з показником інтактного контролю; ** — $p < 0,05$ порівняно з показником групи КПР

імунної системи господаря та рекрутувати імуносупресивні лейкоцити в мікрооточення пухлини. Поряд з цим також обговорюється потенційна роль ПАМ в активації стовбурових клітин раку молочної залози [25, 26].

Враховуючи наведені вище відомості, наступним етапом нашого дослідження було визначення особливостей поляризаційного стану Мф, виділених з пухлинної тканини на термінальній стадії пухлинного росту, за показниками катаболізму L-аргініну та специфічною цитотоксичною активністю. Мф, отримані з пухлинної тканини мишей групи “КПР”, характеризувалися достатньо високим рівнем активності Arg ($1,8 \pm 0,04$ од./ 10^6 клітин) та низьким рівнем продукції NO ($13,8 \pm 2,1$ NO²⁻/ 10^6 клітин); показник співвідношення NO/Arg становив $7,5 \pm 1,0$ ум.од. У групах тварин, яким вводили лектин *B. subtilis* IMB B-7724 окремо або

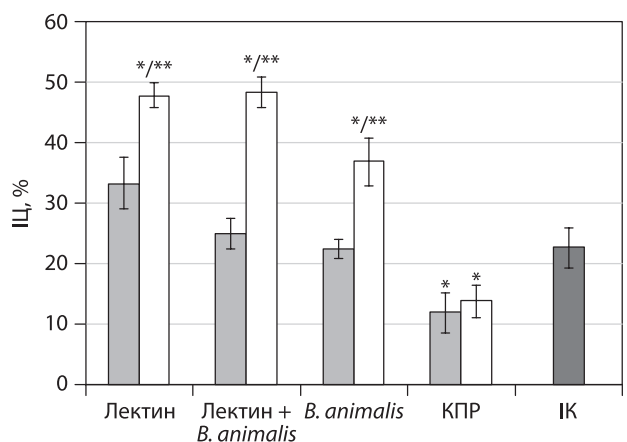


Рис. 4. Зміни цитотоксичної активності пМф мишей з АКЕ за умови введення *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 та лектину *B. subtilis* IMB B-7724. * — $p < 0,05$ порівняно з показником інтактного контролю; ** — $p < 0,05$ порівняно з показником групи КПР

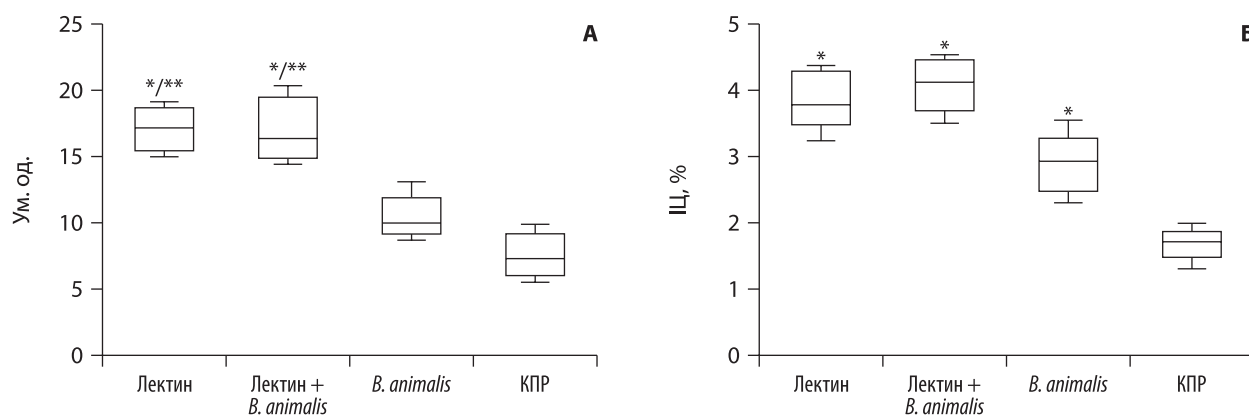


Рис. 5. Зміни функціональної активності Мф, виділених з пухлинної тканини на 28-му добу росту АКЕ: А — показник співвідношення NO/Arg (ум.од.); Б — індекс специфічної цитотоксичної активності (%). * — $p < 0,05$ порівняно з показником групи КПР; ** — $p < 0,05$ порівняно з показником групи *B. animalis*

у комбінації з *B. animalis* спостерігали суттєве ($p < 0,05$ порівняно з нелікованими мишами) збільшення рівнів продукції NO відповідно до $23,5 \pm 2,4$ та $21,6 \pm 2,3$ NO²⁻/10⁶ клітин, показники співвідношення NO/Arg при цьому зростали у 2,3 та 2,2 рази (рис. 5А). При застосуванні окремо *B. animalis* такого ефекту не відмічали, всі досліджені показники статистично достовірно не відрізнялись від таких у групі “КПР”.

Визначення специфічної цитотоксичної активності Мф, отриманих з пухлинної тканини, показало, що максимальне її збільшення відбувалося також за умови введення лектину *B. subtilis* IMB В-7724 окремо або у комбінації з *B. animalis*: індекси цитотоксичності склали відповідно $38,0 \pm 2,9$ та $41,3 \pm 4,1\%$ проти $17,3 \pm 3,5\%$ у групі КПР (рис. 5Б), що свідчить про превалювання в пулі Мф, виділених з пухлинної тканини, клітин М1 з протипухлинними властивостями. Вірогідно, це може бути однією з причин описаного нами раніше [24] гальмування росту пухлин у мишей цих груп.

Таким чином, результати нашого дослідження показали, що прогресування пухлини негативно впливало на функціонування резидентних Мф, видалених із різних анатомічних ніш (перитонеальної порожнини, пухлинної тканини). Незалежно від місця локалізації, до 28-ї доби пухлинного росту Мф втрачали протипухлинні властивості (про що свідчать показники цитотоксичної та аргіназної активності, рівні продукції NO) та набували фенотип М2, сприяючи прогресуванню пухлини. За умови введення лектину *B. subtilis* IMB В-7724 окремо або у комбінації з *B. animalis*, незалежно від анатомічної ніші функціонування, серед Мф превалювали клітини з фенотипом та функціональними властивостями М1. Тобто продемонстрований в [24] протипухлинний ефект може бути пов'язаний зі здатністю бактеріального лектину ремодулювати та підтримувати протягом тривалого часу на тлі росту пухлини поляризацію

Мф в напрямку прозапального стану М1. Така активація може здійснюватись як прямим шляхом (зв'язування лектину з TLR4 на поверхні Мф), так і опосередкованим (індукція продукції лімфоцитами IFN γ) [27]. В той же час, застосування лише *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 не призводило до реполяризації Мф М2 в М1.

Отримані нами результати підтверджуються даними експериментальних досліджень щодо імуномодуючих властивостей *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 [28–30]. *Bifidobacterium* BB-12 (BB-12) був депонований у банку клітинних культур Chr. Hansen у 1983 р., в даний час класифікується як *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 та є найбільш дослідженим штамом, який використовується у комерційних цілях. Супернатант *Bifidobacterium* містить безліч активних речовин (включаючи полісахариди, білки та жирні кислоти), які володіють антиоксидантними та імуномодуючими властивостями, що дозволяє використовувати ці бактерії в якості пробіотики для профілактики та лікування ряду захворювань [28]. Корелюють з нашими даними відомості про те, що *Bifidobacterium* має здатність до модуляції активності Мф — індукція продукції NO у “здорових” Мф та інгібування продукції NO в Мф, попередньо активованих за допомогою LPS [29]. Показано, що метаболіти *Bifidobacterium* BB-12 можуть сприяти реполяризації Мф М1 в Мф М2, впливаючи на експресію транскрипційних факторів — STAT1 (інгібіція експресії) та STAT6 (збільшення експресії) [28]. Відповідно відбувається і зміна цитокінового профілю цих клітин — збільшується продукція протизапального цитокіну IL-10 на тлі зменшення рівнів прозапальних цитокінів Th1 (IL-12 та IFN γ) [30].

З клінічної точки зору відомо, що виснаження штамів *Bifidobacterium* пов'язане з погіршенням здоров'я та підвищеною ймовірністю розвитку хронічних запальних захворювань кишківника. Застосування *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

ВВ-12 в якості пробіотики призводить до зменшення запального процесу, поліпшення стану пацієнтів [31, 32].

Таким чином, результати проведеного дослідження можуть бути використані при розробці нових підходів до лікування пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями шляхом впливу на поляризаційний стан макрофагів.

ВИСНОВКИ

1. Макрофаги, отримані з перитонеальної порожнини та пухлинної тканини нелікованих мишей з АКЕ, на 28-му добу пухлинного росту мали фенотип M2.

2. Введення лектину *B. subtilis* IMB B-7724 (як окремо, так і у комбінації з *B. animalis*) сприяло поляризації перитонеальних Мф в напрямку M1: співвідношення NO/Arg збільшувалось ($p < 0,05$) в 5,2 раза (на 21-шу добу) та в 6,9 раза (на 28-му добу) порівняно з даними у тварин, які не отримували бактеріальні препарати.

3. Введення окремо *B. animalis* subsp. *lactis* ВВ-12 призводило до поляризації перитонеальних Мф до фенотипу M2. Про що свідчило значне зростання ($p < 0,05$) активності Arg: у 2,6 раза порівняно з показниками інтактних мишей; у 2,4 та 1,7 раза відповідно порівняно з показниками мишей, які отримували лектин *B. subtilis* IMB B-7724 окремо та у комбінації з *B. animalis*.

4. Поляризація Мф, отриманих з пухлинної тканини, змінювалася аналогічно такій перитонеальних Мф: в напрямку M1 при введенні лектину *B. subtilis* IMB B-7724 (окремо та у комбінації з *B. animalis*) та в напрямку M2 при застосуванні окремо *B. animalis*.

Робота виконана в рамках НДР “Вивчення впливу представників лактобактерій, біфідобактерій та умовно-патогенних представників мікробіоти людини на особливості реалізації механізмів метаболічних порушень при пухлинному процесі” (№ держреєстрації 0121U113840).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- de Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: from cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell* 2023; **41** (3): 374–22. doi: 10.1016/j.ccell.2023.02.016.
- Bader JE, Voss K, Rathmell JC. Targeting metabolism to improve the tumor microenvironment for cancer immunotherapy. *Mol Cell* 2020; **78** (6): 1019–33. doi: 10.1016/j.molcel.2020.05.034.
- Zhou L, Zhao T, Zhang R, et al. New insights into the role of macrophages in cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2024; **15**: 1381225. doi: 10.3389/fimmu.2024.1381225.
- Xiang X, Wang J, Lu D, Xu X. Targeting tumor-associated macrophages to synergize tumor immunotherapy. *Signal Transduct Target Ther* 2021; **6** (1): 75. doi: 10.1038/s41392-021-00484-9.
- Cheng N, Bai X, Shu Y, et al. Targeting tumor-associated macrophages as an antitumor strategy. *Biochem Pharmacol* 2021; **183**: 114354. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114354.
- Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014; **41** (1): 14–20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.
- Lendeckel U, Venz S, Wolke C. Macrophages: shapes and functions. *ChemTexts* 2022; **8** (2): 12. doi: 10.1007/s40828-022-00163-4.
- Xu Y, Wang X, Liu L, Wang J, et al. Role of macrophages in tumor progression and therapy (Review). *Int J Oncol* 2022; **60** (5): 57. doi: 10.3892/ijo.2022.5347.
- Pittet MJ, Michielin O, Migliorini D. Clinical relevance of tumour-associated macrophages. *Nat Rev Clin Oncol* 2022; **19** (6): 402–21. doi: 10.1038/s41571-022-00620-6.
- Lu Y, Han G, Zhang Y, et al. M2 macrophage-secreted exosomes promote metastasis and increase vascular permeability in hepatocellular carcinoma. *Cell Commun Signal* 2023; **21**: 299. doi: 10.1186/s12964-022-00872-w.
- Hekmatshoar Y, Rahbar Saadat Y, Hosseiniyan Khatibi SM, et al. The impact of tumor and gut microbiotas on cancer therapy: Beneficial or detrimental? *Life Sci* 2019; **233**: 116680. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116680.
- Wei M-Y, Shi S, Liang C, et al. The microbiota and microbiome in pancreatic cancer: more influential than expected. *Mol Cancer* 2019; **18** (1): 97. doi: 10.1186/s12943-019-1008-0.
- Schmitt M, Greten FR. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nat Rev Immunol* 2021; **21** (10): 653–67. doi: 10.1038/s41577-021-00534-x.
- Guha D, Banerjee A, Mukherjee R, et al. A probiotic formulation containing *Lactobacillus bulgaricus* DWT1 inhibits tumor growth by activating pro-inflammatory responses in macrophages. *J Funct Foods* 2019; **56**: 232–45. doi: 10.1016/j.jff.2019.03.030.
- Akbaba M, Gökmen GG, Kışla D, Nalbantoğlu A. *In vivo* investigation of supportive immunotherapeutic combination of *Bifidobacterium infantis* 35624 and doxorubicin in murine breast cancer. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2023; **15** (4): 880–8. doi: 10.1007/s12602-021-09899-w.
- Ferdous UT, Shishir MA, Khan SN, Hoq MM. *Bacillus* spp.: Attractive sources of anti-cancer and anti-proliferative biomolecules. *Microbial Bioactives* 2018; **1** (1): 033–045. doi: 10.25163/microbioacts.11005B0408130818.
- European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes ETS 123. Protection of Vertebrate Animals, 18.III.1986. 48. <https://norecopa.no/media/2iydns5h/ets-123-original.pdf>.
- Radulski DR, Stipp MC, Galindo CM, Acco A. Features and applications of Ehrlich tumor model in cancer studies: a literature review. *Transl Breast Cancer Res* 2023; **4**: 22. doi: 10.21037/tbcr-23-32.
- Fedosova NI, Cheremshenko NL, Hetman KI, et al. Physicochemical and cytotoxicity properties of *Bacillus subtilis* IMV B-7724 extracellular lectin. *Mikrobiol Z* 2021; **83**: 39–48. doi: 10.15407/mikrobiolj83.01.039.
- Symchych TV, Chumak AV, Fedosova NI, 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. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-3.14928.
- 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 Methods* 1994; **174** (1–2): 311–20. doi: 10.1016/0022-1759(94)90034-5.
- 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.
23. Dovgiy RS, Shitikov DV, Pishel IN, *et al.* Functional state and metabolic polarization of splenic macrophages of old immunized mice. Problemy stareniya i dolgoletiya 2015; **24**: 147.
 24. Fedosova NI, Cheremshenko NL, Tikhonov VG, *et al.* Anti-tumor effectiveness of the combined application of bacteria of the genus *Bifidobacterium* and *B. subtilis* IMV B-7724 lectin. Oncology 2024; **26** (2): 133–8. doi: 10.15407/oncology.2024.02.133.
 25. Stavrou M, Constantinidou A. Tumor associated macrophages in breast cancer progression: implications and clinical relevance. Front Immunol 2024; **15**: 1441820. doi: 10.3389/fimmu.2024.1441820.
 26. Munir MT, Kay MK, Kang MH, *et al.* Tumor-associated macrophages as multifaceted regulators of breast tumor growth. Int J Mol Sci 2021; **22**: 6526. doi: 10.3390/ijms22126526.
 27. Chumak A, Shcherbina V, Fedosova N, Chekhun V. Polarization of macrophages of mice under the influence of lectin from *Bacillus Subtilis* IMB B-7724. EUREKA: Life Sciences 2021; (3): 3–10. doi: 10.21303/2504-5695.2021.001878.
 28. Zhang DY, Pan ZY, Yu XK, *et al.* *Bifidobacterium lactis* BB-12 attenuates macrophage aging induced by D-Galactose and promotes M2 macrophage polarization. J Immunol Res 2019; **2019**: 4657928. doi: 10.1155/2019/4657928.
 29. Zabłocka A, Jakubczyk D, Leszczyńska K, *et al.* Studies of the impact of the *Bifidobacterium* species on inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in murine macrophages of the BMDM cell line. Probiotics Antimicrob Proteins 2024; **16** (3): 1012–25. doi: 10.1007/s12602-023-10093-3.
 30. Burns P, Alard J, Hrdý J, *et al.* Spray-drying process preserves the protective capacity of a breast milk-derived *Bifidobacterium lactis* strain on acute and chronic colitis in mice. Sci Rep 2017; **7**: 43211. doi: 10.1038/srep43211.
 31. Prosberg M, Bendtsen F, Vind I, *et al.* The association between the gut microbiota and the inflammatory bowel disease activity: a systematic review and meta-analysis. Scand J Gastroenterol 2016; **51**: 1407–15. doi: 10.1080/00365521.2016.1216587.
 32. Nishino K, Nishida A, Inoue R, *et al.* Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease. J Gastroenterol 2018; **53**: 95–106. doi: 10.1007/s00535-017-1384-4.

EFFECT OF *B. ANIMALIS* AND *B. SUBTILIS* IMB B-7724 METABOLITES ON THE POLARIZATION STATE OF MACROPHAGES IN EXPERIMENTS IN VIVO

N.I. Fedosova, N.L. Cheremshenko, S.V. Gogol,
A.V. Chumak, T.V. Symchych, I.M. Voyeykova,
O.O. Lykhova, V.F. Chekhun

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

Summary. *Aim:* to investigate of the effect of bacteria of the genus *Bifidobacterium* and the extracellular metabolite *B. subtilis* IMV B-7724 on the process of macrophage polarization in mice with a model tumor. **Object and methods:** the study was conducted on Balb/c mice ($n = 52$). Ehrlich adenocarcinoma (ACE) was used as an experimental model. Starting from the 2nd day after the transplantation of tumor cells, animals of the experimental groups were treated with lectin of *B. subtilis* IMV B-7724 (s/c, 1 mg/kg of weight), *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (per os, 7×10^5 CFU/mouse) or their combination. On the 21st and 28th days of tumor growth, the parameters of the functional activity of macrophages (Mph) were determined by the level of NO production, arginase (Arg) and cytotoxic activity. Statistical processing of the results was performed using generally accepted methods of variational statistics. **Results:** at the terminal stage of ACE growth, cells with the M2 phenotype prevailed among the Mph of the peritoneal cavity and tumor tis-

sue. The introduction of the lectin of *B. subtilis* IMV B-7724 (both separately and in combination with *B. animalis*) promoted the polarization of peritoneal Mph to the M1 phenotype, as evidenced by an increase ($p < 0.05$) in the NO/Arg ratio by 5.2 times (on day 21) and by 6.9 times (on day 28). The introduction of *B. animalis* alone led to the polarization of peritoneal Mph to the M2 phenotype, as evidenced by a significant increase ($p < 0.05$) in Arg activity and a decrease in the NO/Arg index compared with the indicators of both intact mice and animals of other experimental groups. The polarization of Mph obtained from tumor tissue changed in a similar way. **Conclusions:** the introduction of lectin of the *B. subtilis* IMV B-7724 alone or in combination with *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 contributed to the change in the polarization state of Mphs of animals with a model tumor. Regardless of the anatomical niche of functioning, cells with the phenotype and functional properties of M1 prevailed among Mphs.

Keywords: Ehrlich adenocarcinoma, *B. subtilis* IMV B-7724 lectin, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, macrophages, functional activity.

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: dn2003@ukr.net

Одержано: 30.10.2024