

Ю.В. Степанов,
Ю.Р. Якишибаєва,
Д.Л. Колесник,
Г.І. Соляник

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

DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2024.01.044>

2-ДЕЗОКСИГЛЮКОЗА АКТИВУЄ ПРОТИЗАПАЛЬНУ ПОЛЯРИЗАЦІЮ ПЕРИТОНЕАЛЬНИХ МАКРОФАГІВ У МИШЕЙ З КАРЦИНОМОЮ ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС

Ключові слова: перитонеальні макрофаги, поляризація макрофагів, 2-дезоксиглюкоза, карцинома легені Л'юїс, продукція NO, активність аргінази

Мета: дослідити вплив 2-дезоксиглюкози у широкому діапазоні концентрацій на поляризацію перитонеальних макрофагів інтактних мишей лінії C57BL/6 та мишей з карциномою легені Л'юїс. **Об'єкт і методи:** в дослідженні використані перитонеальні макрофаги інтактних мишей лінії C57BL/6 та мишей з карциномою легені Л'юїс. Визначали рівень продукції оксиду азоту та активність аргінази спектрофотометричним методом, всі дослідження проведені *in vitro*. **Результати:** встановлено, що у перитонеальних макрофагів, отриманих з мишей з карциномою легені Л'юїс, збільшено продукцію NO порівняно з інтактними мишами. 2-дезоксиглюкоза в широкому діапазоні концентрацій (від 0,1 до 10,0 мМ) не впливає на продукцію оксиду азоту та активність аргінази в зразках перитонеальних макрофагів інтактних мишей лінії C57BL/6. У мишей з карциномою легені Л'юїс вплив 2-дезоксиглюкози в концентрації 10 мМ призводить до статистично достовірного (на 17%, $p < 0,05$) підвищення активності аргінази у перитонеальних макрофагах. **Висновки:** перитонеальні макрофаги мишей з карциномою легені Л'юїс на 21-шу добу росту пухлини мають прозапальний фенотип M1. Додавання 2-дезоксиглюкози у концентрації 10 мМ в середовище культивування сприяє зсуву поляризації макрофагів у фенотип M2.

Більшість сучасних методів лікування пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями спрямовані на знищення первинних пухлинних клітин, але останнім часом накопичилося багато даних про те, що в процесі поширення метастазів приймають участь незлоякісні клітини мікрооточення пухлини [1–3]. Основними компонентом пухлинного мікрооточення, зазвичай, є макрофаги, які називають пухлиноасоційованими макрофагами (ПАМ) [4–5]. Показано, що ПАМ, продукуючи цитокіни, фактори росту, інгібітори імунної відповіді та інші біологічно активні речовини, керують усіма етапами метастатичного каскаду, забезпечують успішне метастазування ракових клітин [6–7]. В результаті численних доклінічних досліджень щодо вивчення ролі ПАМ у метастазуванні розроблено низку препаратів, які здійснюють вплив на виживаність чи поляризацію цих клітин. Однак, отримані різними дослідницькими групами перспективні доклінічні результати не показали очікуваного ефекту при клінічних випробуваннях. В даний час жоден із запропонованих агентів, спрямованих на ПАМ, не отримав офіційного дозволу на клінічне застосування [8].

Пошук нових агентів, спрямованих на ПАМ, ускладнюється тим, що при представленні результатів клінічних досліджень не фіксуються дані, які характеризують їхній поляризаційний стан, про-

філь продукованих макрофагами цитокінів та інші ознаки, які могли б полегшити проведення наукових досліджень. Розуміння взаємозв'язку між ПАМ, первинною пухлиною та метастазами необхідні для розробки перспективних підходів у лікуванні раку. Для реалізації всього метастатичного каскаду злоякісні клітини мають виняткову метаболічну пластичність, здатну забезпечити їх адаптацію та виживання до умов, що постійно змінюються [9–10]. Однак, терапевтичні підходи, спрямовані тільки на пухлинні клітини, ймовірно, будуть недостатні для блокування метастазування без прямого ефективного впливу на ПАМ. У зв'язку з цим необхідно враховувати механізми, що є основою функціонування макрофагів. Зокрема, агенти, що пригнічують ріст пухлини, можуть також перепрограмувати макрофаги до клітин з функціональним фенотипом M2, які підтримують ріст злоякісно трансформованих клітин, сприяють виробленню їх резистентності до застосованого препарату та активують метастазування. Однією з сполук, дія якої досліджувалася як протипухлинний агент, є 2-дезоксиглюкоза (2-ДГ). 2-ДГ — визнаний антагоніст метаболізму глюкози, який стимулює апоптоз гіпоксичних ракових клітин [11], клітин стійких до хіміотерапії [12–13] та здатний інгібувати ангиогенез у первинній пухлині [14]. Однак, залишається маловивченим питання

впливу антагоніста метаболізму глюкози 2-ДГ, на функціональний фенотип макрофагів: запальний М1 (підтримується аеробним гліколізом) та протизапальний М2 (підтримується окислювальним фосфорилуванням).

Виходячи з вищесказаного, **метою даної роботи** було вивчення впливу 2-ДГ на функціональну поляризацію перитонеальних макрофагів інтактних мишей лінії C57BL/6 та мишей з карциномою легені Льюїс.

ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили на мишах-самках C57BL/6, вагою 20–22 г, віком 2 міс., отриманих з віварію Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Всі дослідження проводилися з дотриманням правил роботи з лабораторними тваринами відповідно до стандартних міжнародних правил з біологічної етики та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях. Експериментальних тварин розділяли на 2 групи: інтактні миші ($n = 5$) та миші, яким перещеплювали клітини карциноми легені Льюїс ($n = 5$).

Клітини карциноми легені Л'юїс (КЛЛ) для трансплантації тваринам культивували *in vitro* в стандартних умовах у повному культуральному середовищі RPMI 1640 (Biowest, Франція) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (Biowest, Франція), 40 мкг/мл гентаміцину (Здоров'я) у вологій атмосфері з 5% CO₂. Трансплантацію пухлинних клітин проводили рутинним шляхом внутрішньом'язової інюкуляції $1 \cdot 10^6$ клітин у 0,1 мл розчину Хенкса. Дослідження проводили на 21 добу зростання пухлини.

Макрофаги виділяли з перитонеального змиву наступним чином: в черевну порожнину тварин вводили по 3 мл холодного фізіологічного розчину 0,9% NaCl, після чого в стерильних умовах відбирали клітинну суспензію і черевну порожнину промивали ще тричі рівними обсягами холодного фізіологічного розчину — загальний об'єм отриманої суспензії клітин становив 10 мл. Отриману суспензію осаджували центрифугуванням протягом 10 хв при 1500 об./хв і ресуспендували клітини, що випали в осад, в холодному повному культуральному середовищі. Концентрацію клітин доводили до $1 \cdot 10^6$ /мл. Для отримання адгезивної фракції вносили 200 мкл отриманої клітинної суспензії на лунку 96-лункового планшета та інкубували протягом 1 год. при 37°C у вологій атмосфері з 5% CO₂. Після інкубації клітини, що не прикріпились до поверхні, видаляли 3-кратним промиванням чашок теплим фізіологічним розчином.

Як тест-агент використовували інгібітор гліколізу 2-ДГ (Sigma-Aldrich, США). Досліджуваний препарат розчиняли у повному культуральному

середовищі, додавали до отриманих зразків перитонеальних макрофагів у кінцевих концентраціях 0,1; 1,0; 10,0 мМ та інкубували 4 год при 37°C у вологій атмосфері з 5% CO₂.

Продукцію оксиду азоту (NO) оцінювали за концентрацією нітриту в середовищі культивування перитонеальних макрофагів після інкубації з 2-ДГ. Реактив Гриса (2% розчин сульфаніламіду (Sigma-Aldrich, США), 10% розчин фосфорної кислоти (Альфарус, Україна) та 0,2% розчин нафтилетилендіамін-дигідрохлориду (Sigma-Aldrich, США) у співвідношенні 1:1:1) додавали до середовища культивування клітин та інкубували протягом 10 хв при кімнатній температурі. Оптичну щільність хромофора, що утворився, вимірювали на планшетному спектрофотометрі (StatFax-2100 Awareness, США) при $\lambda = 545$ нм. Концентрацію оксиду азоту представлено в μM , яку розраховували за стандартною кривою.

Активність аргінази визначали по кількості сечовини, яка була утворена в результаті гідролізу аргініну. Клітини після інкубації з 2-ДГ лізували двократним заморожуванням. Після активації аргінази на водяній бані протягом 10 хв при 60°C додавали 0,5 М розчин аргініну та інкубували протягом 1 год при 37°C. Реакцію ферментації аргініну припиняли додаванням суміші H₂SO₄:H₃PO₄:H₂O у співвідношенні 1:3:7 до дослідних зразків та до стандартних розведень сечовини. Після інкубації з 9% розчином α -ізонітросорозпропіофенону (Sigma-Aldrich, США) на водяній бані протягом 1 год при 100°C вимірювали оптичну щільність отриманого хромофора на планшетному спектрофотометрі (StatFax-2100 Awareness, США) при $\lambda = 545$ нм. Концентрацію сечовини представлено в мкг/мл, яку розраховували за стандартною кривою.

Статистичний аналіз проводили, використовуючи описову статистику, параметричний *t*-критерій Стьюдента та непараметричний критерій Манна–Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Досліджено продукцію NO та активність аргінази у зразках перитонеальних макрофагів інтактних мишей та мишей з пухлинами. Макрофаги з черевної порожнини мишей на 21-шу добу пухлинного росту, продемонстрували нижчі рівні продукції NO та активності аргінази по відношенню до показників інтактних мишей (на 31,0 та 56,6%, відповідно, рис.). Можливо, це пов'язано із загальним зниженням доступності глюкози в тканинах мишей з пухлиною. Однак, розрахований показник співвідношення продукції NO до активності аргінази (NO/AA) складав для інтактних мишей 0,69 (див. *табл. 1*), а для мишей з пухлинами — 1,1 (*табл. 2*). Ці розрахунки показують, що у макрофагів, отриманих з черевної порожнини мишей з пухлинами, продукція NO збільшилася стосовно

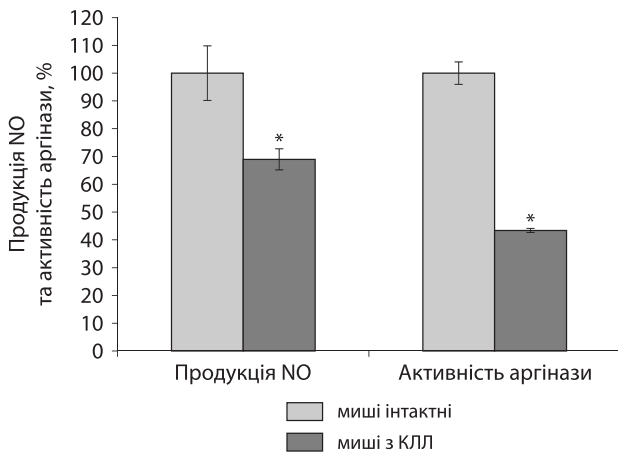


Рис. Продукція NO та активність аргінази в перитонеальних макрофагах інтактних мишей і мишей з карциною легені Льюїс. * — $p < 0,05$ у порівнянні з показниками інтактних мишей

активності аргінази. Дане спостереження можна характеризувати як поляризацію перитонеальних макрофагів мишей з КЛЛ в прозапальний фенотип M1.

Дослідження впливу блокатора аеробного гліколізу 2-ДГ на поляризацію перитонеальних макрофагів інтактних мишей показало, що в широкому діапазоні концентрацій (від 0,1 до 10,0 мМ) 2-ДГ не впливав на процес поляризації — були відсутні статистично достовірні зміни як рівнів продукції NO, так і активності аргінази (табл. 1).

Результати дослідження впливу 2-ДГ на поляризацію перитонеальних макрофагів мишей з КЛЛ представлені в табл. 2. Виявлено, що додавання 2-ДГ у середовище інкубації перитонеаль-

них макрофагів мишей з карциною легені Льюїс у низьких концентраціях 0,1 та 1,0 мМ не змінювало поляризаційний стан макрофагів. Додавання 2-ДГ у концентрації 10,0 мМ достовірно (на 17%, $p < 0,05$) підвищувало активність аргінази, без зміни рівня продукції NO (див. табл. 2), що можна розглядати, як зсув поляризації макрофагів до фенотипу M2, на відміну від макрофагів інтактних мишей.

Збалансований метаболізм глюкози необхідний для правильного функціонування макрофагів. Для будь-якого фенотипу макрофагів характерне гліколітичне розщеплення глюкози до пірувату. Надалі, залежно від зовнішніх стимулів піруват може перетворюватися в присутності кисню або в лактат (ефект Варбурга), або надходити в мітохондрії і піддаватися окислювальному фосфорилування (OXPHOS) [15–16]. Макрофаги демонструють посилення прозапальної реакції (фенотип M1), яка пов'язана з активацією аеробного гліколізу у відповідь на стимули, такі як ліпополісахарид або інші патогени (наприклад, ті що виділяються пухлиною при прогресії) [15, 17]. Поряд із посиленням аеробного гліколізу в прозапальних макрофагах M1 відбувається припинення окислення глюкози в циклі трикарбонових кислот та OXPHOS [17–18]. На відміну від запального фенотипу M1, проти-запальний фенотип макрофагів M2 вважається більш залежним від мітохондріального OXPHOS і мало залежить від аеробного гліколізу [18].

У наших експериментах ми досліджували вплив інгібітору гліколізу 2-ДГ щоб з'ясувати, як блокування гліколізу впливає на поляризацію макрофагів. Виявлено, що додавання інгібітору гліколізу 2-ДГ у низьких та високих концентраціях досто-

Таблиця 1

Продукція NO та активність аргінази в перитонеальних макрофагах інтактних мишей C57BL/6 після інкубації з 2-ДГ, $n = 5$

Маркер поляризації	Концентрація 2-ДГ, мМ			
	0,0	0,1	1,0	10,0
Продукція NO, μM	$1,74 \pm 0,17$	$1,55 \pm 0,11$	$1,58 \pm 0,05$	$1,61 \pm 0,06$
Концентрація мочевины, мкг/мл	$2,65 \pm 0,10$	$2,72 \pm 0,20$	$2,79 \pm 0,53$	$2,09 \pm 0,20$
Показник співвідношення NO/AA	$0,66 \pm 0,07$	$0,57 \pm 0,05$	$0,57 \pm 0,11$	$0,77 \pm 0,08$

Таблиця 2

Продукція NO та активність аргінази в перитонеальних макрофагах мишей C57BL/6 з карциною легені Льюїс після інкубації з 2-ДГ, $n = 5$

Маркер поляризації	Концентрація 2-ДГ, мМ			
	0,0	0,1	1,0	10,0
Продукція NO	$1,20 \pm 0,07$	$1,22 \pm 0,05$	$1,09 \pm 0,05$	$1,17 \pm 0,01$
Концентрація мочевины, мкг/мл	$1,15 \pm 0,02$	$1,33 \pm 0,09$	$1,29 \pm 0,09$	$1,34 \pm 0,08^*$
Показник співвідношення NO/AA	$1,04 \pm 0,06$	$0,92 \pm 0,05$	$0,84 \pm 0,05$	$0,87 \pm 0,05^*$

Примітка: * — $p < 0,05$ у порівнянні з концентрацією 2-ДГ 0 мМ.

вірно не впливало на поляризацію перитонеальних макрофагів інтактних мишей. Додавання 2-ДГ у високій концентрації до середовища інкубації макрофагів, отриманих з перитонеальної порожнини мишей з пухлинами, сприяє їх поляризації до M2 фенотипу. Проте, виходячи з важливості гліколізу для макрофагів M1, ми повинні були б спостерігати більш виражений ефект поляризації макрофагів до фенотипу M2 і при низьких концентраціях 2-ДГ. На основі цих даних можна припустити, що макрофаги можуть активно використовувати глюкозу як субстрат для підтримки свого функціонального фенотипу. Разом з тим макрофаги, ймовірно, мають додаткові метаболічні механізми (такі як глутаміноліз, захоплення жирних кислот), що підтримують необхідні інтермедіанти для забезпечення стабільності їх фенотипу, навіть в умовах додавання в середовище інкубації блокатора аеробного гліколізу 2-ДГ [19–21]. Для перевірки цього припущення, у подальших дослідженнях, бажано використовувати 2-ДГ в умовах обмеженого вмісту глутаміну та/або жирних кислот у середовищі інкубації. З іншого боку, макрофаги M1, що активно споживають глюкозу (та/або глутамін) для своєї поляризації, потрапляючи в оточення пухлини, де відзначається явний недолік цих субстратів, можуть втрачати здатність підтримувати заснований на аеробному гліколізі прозапальний фенотип. Ця обставина може розглядатися як додатковий фактор впливу пухлинного мікрооточення на поляризацію макрофагів у пропухлинний фенотип M2.

Пошук підходів до перепрограмування макрофагів залишається актуальним. Це вказує на потенційно важливий напрямок для розвитку протипухлинної терапії, зокрема використання імункомпетентних клітин, та вимагає подальшого вивчення цієї мети на моделях *in vitro* та *in vivo* для оптимізації лікування онкологічних хворих.

ВИСНОВКИ

1. Перитонеальні макрофаги мишей з карциномною легені Льюїса на 21-шу добу росту пухлини мають прозапальний фенотип M1.

2. Блокатор аеробного гліколізу 2-ДГ в широкому діапазоні концентрацій (від 0,1 до 10,0 мМ) не впливає на поляризацію перитонеальних макрофагів інтактних мишей.

3. Блокатор аеробного гліколізу 2-ДГ у концентрації 10,0 мМ достовірно підвищує (на 17%, $p < 0,05$) активність аргінази у перитонеальних макрофагах мишей з карциномною легені Льюїса, що можна розглядати як зсув поляризації до фенотипу M2.

Робота виконана в рамках НДР «Роль лактатдегідрогенази у виживаності та дисемінації метастатично активних клітин» (№ держреєстрації 0121U113838).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013; **19** (11): 1423–37. doi: 10.1038/nm.3394.
2. McAllister SS, Weinberg RA. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat Cell Biol* 2014; **16** (8): 717–27. doi: 10.1038/ncb3015.
3. Helm O, Held-Feindt J, Grage-Griebenow E, et al. Tumor-associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *Int J Cancer* 2014; **135** (4): 843–61. doi: 10.1002/ijc.28736.
4. Ruffell B, Affara NI, Coussens LM. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol* 2012; **33** (3): 119–26. doi: 10.1016/j.it.2011.12.001.
5. Singh S, Mehta N, Lilan J, et al. Initiative action of tumor-associated macrophage during tumor metastasis. *Biochimie Open* 2017; **4**: 8–18. doi: 10.1016/j.biopen.2016.11.002.
6. Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci* 2014; **105** (1): 1–8. doi: 10.1111/cas.12314.
7. Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell* 2015; **27** (4): 462–72. doi: 10.1016/j.ccell.2015.02.015.
8. Wang S, Yang Y, Ma P, et al. Landscape and perspectives of macrophage-targeted cancer therapy in clinical trials. *Mol Ther Oncolytics* 2022; **24**: 799–813. doi: 10.1016/j.omto.2022.02.019.
9. Ohshima K, Morii E. Metabolic reprogramming of cancer cells during tumor progression and metastasis. *Metabolites* 2021; **11** (1): 28. doi: 10.3390/metabo11010028.
10. Roda N, Gambino V, Giorgio M. Metabolic constrains rule metastasis progression. *Cells* 2020; **9**: 2081. doi: 10.3390/cells9092081.
11. Singh R, Gupta V, Kumar A, et al. 2-Deoxy-D-Glucose: A novel pharmacological agent for killing hypoxic tumor cells, oxygen dependence-lowering in Covid-19, and other pharmacological activities. *Adv Pharmacol Pharm Sci* 2023; **2023**: 9993386. doi: 10.1155/2023/9993386.
12. DeSalvo J, Kuznetsov JN, Du J, et al. Inhibition of Akt potentiates 2-DG — induced apoptosis via downregulation of UPR in acute lymphoblastic leukemia. *Mol Cancer Res* 2012; **10** (7): 969–78. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0125.
13. Xi H, Kurtoglu M, Lampidis TJ. The wonders of 2-deoxy-D-glucose. *IUBMB Life* 2014; **66** (2): 110–21. doi: 10.1002/iub.1251.
14. Singh S, Pandey S, Chawla AS, et al. Dietary 2-deoxy-D-glucose impairs tumour growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *Eur J Cancer* 2019; **123**: 11–24. doi: 10.1016/j.ejca.2019.09.005.
15. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, et al. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* 2010; **115** (23): 4742–9. doi: 10.1182/blood-2009-10-249540.
16. Van den Bossche J, Baardman J, Otto NA, et al. Mitochondrial dysfunction prevents repolarization of inflammatory macrophages. *Cell Rep* 2016; **17** (3): 684–96. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.008.
17. Freerman AJ, Johnson AR, Sacks GN, et al. Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *J Biol Chem* 2014; **289** (11): 7884–96. doi: 10.1074/jbc.M113.522037.
18. Wang F, Zhang S, Vuckovic I, et al. Glycolytic stimulation is not a requirement for M2 macrophage differentia-

- tion. Cell Metab 2018; **28** (3): 463–75.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2018.08.012.
19. **Jha AK, Huang SC, Sergushichev A, et al.** Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. Immunity 2015; **42** (3): 419–30. doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.005.
20. **Balsa E, Perry EA, Bennett CF, et al.** Defective NADPH production in mitochondrial disease complex I causes inflammation and cell death. Nat Commun 2020; **11** (1): 2714. doi: 10.1038/s41467-020-16423-1.
21. **Liu S, Yang J, Wu Z.** The Regulatory Role of α -Ketoglutarate Metabolism in Macrophages. Mediators Inflamm 2021; **2021**: 5577577. doi: 10.1155/2021/5577577.

2-DEOXYGLUCOSE PROMOTES ANTI-INFLAMMATORY POLARIZATION OF PERITONEAL MACROPHAGES IN MICE WITH LEWIS LUNG CARCINOMA

**Yu.V. Stepanov, Yu.R. Yakshibaeva,
D.L. Kolesnik, G.I. Solyanik**

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

Summary. Aim: to investigate the effect of 2-deoxyglucose at a wide range of concentrations on the polarization of peritoneal macrophages of intact mice C57BL/6 and mice with Lewis lung carcinoma. **Object and methods:** peritoneal macrophages obtained from intact female C57BL/6 mice and Lewis lung carcinoma-bearing mice have been used in the study. The level of production of nitric oxide and the activity of arginase of spectrophotometric method were determined, all studies were conducted in vitro. **Results:** 2-deoxyglucose does not affect nitric oxide production and arginase activity of peritoneal macrophages of intact mice. 2-deoxyglucose at a concentration of 10 mM significantly (by 17%, $p < 0.05$) increases arginase

activity in peritoneal macrophages of mice with Lewis lung carcinoma. **Conclusions:** it was revealed that peritoneal macrophages in mice with Lewis lung carcinoma on the 21st day of tumor growth had a pro-inflammatory M1 phenotype. The addition of 2-deoxyglucose at a concentration of 10 mM to the incubation medium of peritoneal macrophages obtained from mice with Lewis lung carcinoma promotes a switch in macrophage polarization to the M2 phenotype.

Keywords: peritoneal macrophages, macrophage polarization, 2-deoxyglucose, Lewis lung carcinoma, NO production, arginase activity

Адреса для листування:

Степанов Ю.В.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: oncologdopc@gmail.com

Одержано: 22.04.2024