

А.В. Чумак
Н.І. Федосова
Н.Л. Черемшенко
О.М. Караман
Т.В. Симчич

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

Ключові слова:

карциносаркома Уокера-256, хіміорезистентність, лектин бактеріального походження, доксорубіцин, макрофаги M1 та M2 типу.

ДОКЛІНІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ЛЕКТИНУ *V. SUBTILIS* IMB B-7724 НА ДИНАМІКУ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ МАКРОФАГІВ ПРИ ПЕРЕЩЕПЛЕННІ ЧУТЛИВОЇ АБО ХІМІОРЕЗИСТЕНТНОЇ МОДЕЛЬНОЇ ПУХЛИНИ

Мета: визначення показників функціональної поляризації перитонеальних макрофагів (Мф) щурів у динаміці росту різних за чутливістю до доксорубіцину штамів карциносаркоми Уокера-256 за умови застосування доксорубіцину або лектину *V. subtilis* IMB B-7724. **Об'єкт і методи:** експериментальні дослідження проведені на щурах лінії Wistar. В якості моделей пухлинного росту використано чутливий та резистентний до доксорубіцину (DOX) штами карциносаркоми Уокера-256. У якості засобу хіміотерапії використовували DOX, імунотерапії — лектин *V. subtilis* IMB B7724. Функціональний стан перитонеальних Мф оцінювали за показниками продукції оксиду азоту (NO) та активності аргінази (Arg), розраховували співвідношення NO/Arg. Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики. **Результати:** застосування засобу імунотерапії сприяло уповільненню росту пухлин незалежно від того, який за чутливістю до DOX штаму карциносаркоми Уокера-256 було перещеплено. На тлі росту резистентного до DOX штаму карциносаркоми Уокера-256 зниження здатності до продукції NO Мф та підвищення активності Arg були більш вираженими: співвідношення NO/Arg в 1,8 рази ($p < 0,05$) менше за показник інтактних щурів та в 1,3 рази менше за показник тварин з вихідним штамом карциносаркоми ($p < 0,05$). Застосування бактеріального лектину в якості засобу імунотерапії призводило до суттєвого збільшення продукції NO та зниження активності Arg перитонеальних Мф щурів з карциносаркомою незалежно від чутливості пухлин до хіміотерапії. **Висновки:** ріст карциносаркоми Уокера-256 супроводжується суттєвим пригніченням протипухлинної функціональної активності Мф. Цей ефект більш виражений у щурів з резистентним до DOX штамом пухлини. Введення лектину *V. subtilis* IMB B-7724 сприяє збереженню M1 функціонального фенотипу Мф до віддалених термінів пухлинного процесу незалежно від хіміорезистентності модельної пухлини.

Однією з головних причин недостатньої ефективності лікування хворих зі злоякісними пухлинами вважають резистентність пухлинних клітин до засобів хіміотерапії. Основною метою використання цього методу лікування є досягнення максимальної циторедукції первинної пухлини або метастатичних вогнищ за рахунок пригнічення неконтрольованої проліферації, індукції процесів апоптозу або некрозу злоякісно трансформованих клітин. Результат лікування цитостатиками залежить від біологічних особливостей пухлинних клітин, їх чутливості або стійкості до використаних терапевтичних засобів. При застосуванні цитостатиків, до яких пухлинні

клітини нечутливі, відбувається пригнічення протипухлинної резистентності організму (імуносупресія), що спричиняє ріст резистентних клонів трансформованих клітин і швидкий розвиток віддалених метастазів. Тому підвищення ефективності хіміотерапії включає і подолання множинної медикamentозної резистентності, і підвищення чутливості клітин пухлини до протипухлинних препаратів [1–3].

Терапевтична чутливість пухлин значною мірою залежить від складної взаємодії трансформованих клітин з різними компонентами мікросередовища пухлини. Клітинні компоненти мікрооточення включають мезенхімальні та ендотеліальні клітини,

асоційовані з пухлиною фібробласти та макрофаги (Мф). Останнім часом значну увагу приділяють ролі пухлиноасоційованих Мф (ПАМ) у формуванні протипухлинної відповіді. ПАМ вважають головним вродженим імунним компонентом мікросередовища солідних пухлин. Продукуючи різні фактори та впливаючи на інші імунні клітини, Мф беруть участь не тільки в розвитку хронічного запалення, але й у прогресуванні або стримуванні пухлинного процесу. Зокрема, такі фактори, як орнітин, фактор росту ендотелію судин (Vascular endothelial growth factor — VEGF), епідермальний фактор росту (Epidermal Growth Factor — EGF), і трансформуючий фактор росту β (Transforming growth factor β — TGF- β) стимулюють пухлинний процес, тоді як оксид азоту (NO), що утворюється в результаті активації індукованої NO-синтази (Inducible nitric oxide synthase — iNOS) в Мф, може інгібувати ріст пухлини [4]. Було продемонстровано, що Мф безпосередньо чи опосередковано залучені до кількох ключових процесів канцерогенезу, включаючи ангиогенез, інвазію, метастазування, регуляцію мікросередовища пухлини та виникнення терапевтичної стійкості [5, 6]. ПАМ виявляють виражену неоднорідність та фенотипову пластичність. Існує два основних напрямки фенотипової та функціональної поляризації Мф: класично активовані прозапальні Мф М1 з протипухлинними властивостями та альтернативно активовані протизапальні Мф М2, які спричиняють пухлинний процес. Альтернативно активовані Мф М2 можуть опосередковувати хіміорезистентність, секретуючи фактори росту та інгібуючи шляхи передачі сигналів клітинної смерті в клітинах пухлини, захищаючи їх від цитотоксичних ефектів хіміотерапії [7]. У більшості солідних пухлин ПАМ мають яскраво виражений фенотип М2. Однак також існують експериментальні дані, які свідчать про те, що ПАМ можуть поєднувати властивості Мф М1 та М2 або можлива реполяризація цих клітин [8–10]. Тому дослідження можливості зміни поляризації Мф видається перспективним як з наукової, так і клінічної точок зору.

На теперішній час однією з найбільш поширених в усьому світі (включаючи Україну) форм злоякісних новоутворень жінок є рак молочної залози (РМЗ). Зокрема, за даними Національного канцер-реєстру України за 2019–2020 рр., питома вага РМЗ в структурі захворюваності на злоякісні новоутворення жіночого населення України становила 20,3%, в структурі смертності — 20,1% [11]. Залежно від молекулярно-біологічних характеристик пухлинних клітин, при лікуванні хворих на РМЗ використовують хіміотерапію, гормонотерапію, імунотерапію чи їх комбінацію. Незважаючи на досягнення в дослідженні молекулярних механізмів виникнення та прогресування цього захворювання, розробка і впровадження цих методів, ефективність терапії залишається недостатньою. Однією з причин цього є хіміорезистентність пухлинних клітин (первинна чи набута). Для подолання проблеми резистентності

пропонують комбіноване використання різних терапевтичних опцій, зокрема, хіміопрепаратів та засобів імунотерапії.

Із переліку хіміотерапевтичних препаратів у стандартних схемах лікування при різних молекулярних підтипах РМЗ широко використовують доксорубіцин (DOX) [12–14]. Серед засобів, які можуть бути перспективними в лікуванні хворих з різноманітними злоякісними пухлинами, досліджуються лектини. Привертають увагу не лише цитотоксичні, а й імуномодулюючі властивості останніх, що дозволяє розглядати лектини як потенційні засоби імунотерапії [15–18].

Інформативною експериментальною моделлю, морфологічні характеристики та особливості перебігу якої подібні до таких у РМЗ людини є карциносаркома Уокера-256. Ця модель дозволяє послідовно відтворювати процеси, що відбуваються на всіх стадіях канцерогенезу протягом нетривалого періоду часу [19]. Пухлина характеризується швидким ростом, агресивністю, інвазивністю та здатністю до метастазування. Перебіг пухлинного процесу у щурів супроводжується значною резорбцією кісток і збільшенням ламкості скелету, що корелює з процесом метастазування у кістки людей, хворих на РМЗ [19, 20]. Було отримано резистентний до засобів хіміотерапії (зокрема DOX) штамп цієї пухлини, опубліковано результати досліджень щодо метаболічних змін (показники енергетичного обміну, вмісту K^+ і Mg^{++} в організмі і в пухлині) на тлі розвитку резистентної до DOX карциносаркоми Уокера-256, а також охарактеризовано роль клітин імунної системи у формуванні такої резистентності [21, 22]. Викладене зумовило вибір експериментальної моделі та загальний дизайн нашого дослідження.

Метою роботи стало визначення показників функціональної поляризації перитонеальних Мф щурів у динаміці росту різних за чутливістю до DOX штамів карциносаркоми Уокера-256 за умови застосування DOX або лектину *B. subtilis* IMB B-7724.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведені на щурах лінії Wistar (самки віком 2,5 міс та масою тіла 180–200 г). Тварини були надані віварієм Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук України. Під час проведення експерименту щури перебували в стандартних умовах віварію з природним режимом освітлення, на повноцінному раціоні харчування. Утримання тварин і робота з ними здійснювалися відповідно до загальноприйнятих міжнародних правил проведення досліджень на експериментальних тваринах [23].

У якості моделей пухлинного росту використано два різних за чутливістю до DOX штами карциносаркоми Уокера-256 — вихідний і резистентний. Пухлинні клітини обох штамів одержували з Банку клітинних ліній з тканин людини та тварин Інсти-

туту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук України. Резистентність пухлини було індуковано, як описано I.N. Todor et al. [22]. Перещеплення пухлинних клітин проводили у стежно правої задньої кінцівки в кількості 1×10^6 клітин у фізіологічному розчині NaCl.

Для кожного штаму карциносаркоми Уокера-256 були сформовані по 3 групи: «Контроль пухлинного росту» або «КПР» — неліквовані щури з пухлиною; «DOX» — щури з пухлиною, яким в якості засобу хіміотерапії вводили DOX; «Лектин» — щури з пухлиною, яким в якості засобу імунотерапії вводили лектин *B. Subtilis* IMB B-7724 [24–26].

Лікування тварин починали на 7-му добу пухлинного росту, використовуючи в монорежимі DOX (внутрішньочеревно, 0,250 мг/тварину в 0,3 мл фізіологічного розчину NaCl, щоденно, протягом 5 діб) або лектин *B. Subtilis* IMB B-7724 (підшкірно, по 0,2 мг/тварину в 0,2 мл фізіологічного розчину NaCl, щоденно, протягом 5 діб). Отримані результати порівнювали з даними інтактних щурів тієї ж лінії, віку і статі.

Проводили оцінку стандартних параметрів пухлинного росту (частота прищеплення пухлин, розмір первинного пухлинного вузла, виживаність тварин з пухлиною). Оцінку показників функціонального стану Мф, виділених з перитонеальної порожнини, проводили на 7-му та 22-гу добу пухлинного росту. Дослідження включало визначення рівня продукції NO та активності аргінази (Arg). Тип поляризації Мф визначали за співвідношенням показників NO/Arg.

Перитонеальні Мф отримували, використовуючи метод ступінчастого центрифугування на подвійному градієнті густини з фікол-урографіном (1,114 г/мл і 1,076 г/мл) протягом 15 хв при 250 г з наступним гіпотонічним лізисом домішок еритроцитів. Після цього 1 мл клітинної суспензії відбирали у пластикову мікропробірку, інкубували при 37 °C протягом 24 год, осаджували методом центрифугування. Надосад використовували для оцінки рівня продукції NO; осад клітин — для визначення активності Arg. У дослідженнях використовували кінцеву концентрацію 1×10^6 клітин/мл.

Продукцію NO (за кількістю NO^{2-}) визначали за методикою [20] з використанням реактиву Грісса (ACROS Organics, United Kindom). Облік результатів проводили спектрофотометричним методом при довжині хвилі збудження 550 нм. Рівень NO визначали за калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартних розчинів нітриту натрію. Рівень NO представляли в ммоль $\text{NO}^{2-}/10^6$ клітин.

Активність Arg визначали за швидкістю утворення сечовини [27, 28]. Реакцію зупиняли додаванням суміші кислот ($\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Для колориметричного визначення концентрації сечовини до суміші додавали α -ізонітрозопропіофенон та інкубували при 95 °C упродовж 30 хв, а потім при 4 °C 30 хв. Концентрацію сечовини визначали спектрофотометрично при довжині хвилі збудження 550 нм. Значення оптичної густини переводили в мікрограми, використовуючи калібрувальну криву, побудовану за розчинами сечовини відомої концентрації. Активність Arg розраховували за методикою R.S. Dovgii співавторів [29]. Одна одиниця аргіназної активності — кількість ферменту, що гідролізує 1 мкмоль аргініну за 1 хв. Дані представлені в од./ 10^6 клітин.

Статистичну обробку результатів проводили за загально прийнятими методами варіаційної статистики [30]. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Карциносаркома Уокера-256 розвинулася у 100% тварин незалежно від групи. В обох групах нелікованих щурів відмічали швидкий ріст пухлин, особливо за умови перещеплення резистентної до DOX карциносаркоми.

Як і слід було сподіватися, штами пухлини по-різному реагували на введення DOX. Так, на 22-гу добу пухлинного росту у щурів з вихідним штамом карциносаркоми, яким вводили DOX, об'єм пухлин був статистично достовірно меншим (на 61%, $p < 0,05$) порівняно з показником групи «КПР». У щурів з резистентними до DOX пухлинами проведення хіміотерапії було неефективним (рис. 1).

Натомість застосування лектину *B. subtilis* IMB B-7724 сприяло уповільненню росту пухлин незалежно від того, який за чутливістю до DOX штам карциносаркоми Уокера-256 було перещеплено: у щурів, яким вводили бактеріальний лектин, спостерігали статистично достовірне ($p < 0,05$) зменшення розміру первинного пухлинного вузла порівняно з тваринами контрольної групи (рис. 1).

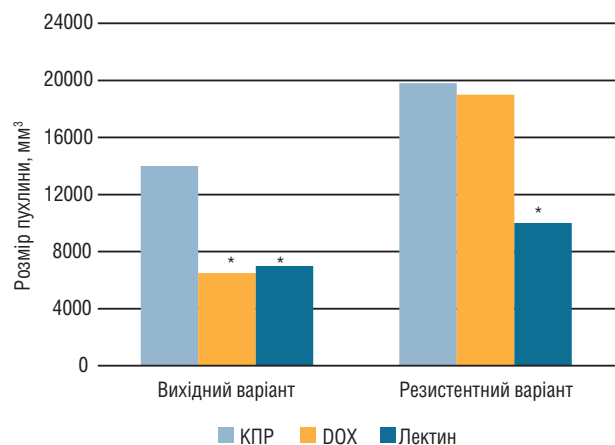


Рис. 1. Вплив DOX та лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на об'єм пухлин карциносаркоми Уокера-256 з різною чутливістю до цитостатиків. Примітка: * — достовірні відмінності ($p < 0,05$) порівняно з показниками відповідних груп КПР

Дослідження змін функціональної активності перитонеальних Мф на тлі росту пухлини включало визначення рівня продукції NO та оцінку ар-

гіазаної активності на 7-му та 22-гу добу пухлинного росту. Відомо, що метаболізм аргініну в Мф з різними функціональними властивостями (М1 та М2) суттєво відрізняється. Зокрема, експресований в Мф М1 фермент іNOS метаболізує аргінін до NO та цитруліну. У свою чергу, NO може бути метаболізований для подальшого виходу реактивних форм азоту, тоді як цитрулін може бути використаний для ефективного синтезу NO через цикл цитрулін — NO. Arg, яка експресується в Мф М2, гідролізує аргінін до орнітину та сечовини. Активація аргіназного шляху обмежує доступність аргініну для синтезу NO, а сам орнітин може бути додатково задіяний у важливих шляхах синтезу поліаміну та проліну, які необхідні для клітинної проліферації та відновлення тканин. Обидва метаболічні шляхи перехресно інгібують один одного на рівні відповідних продуктів розпаду аргініну, що і зумовлює більш точне визначення М1 або М2 поляризаційного статусу Мф [31].

Мф, отримані з перитонеальної порожнини інтактних щурів, характеризувалися високим рівнем продукції NO ($42,4 \pm 1,0$ ммоль $\text{NO}^2/10^6$ клітин) та низькою активністю Arg ($2,22 \pm 0,09$ од/ 10^6 клітин). Незалежно від того, який варіант карциносаркоми було перещеплено, на 7-му добу пухлинного росту за функціональною активністю Мф щурів з пухлинами практично не відрізнялися від таких у інтактних тварин. У щурів з чутливими до DOX пухлинами показник співвідношення NO/Arg становив $16,0$, з резистентними — $16,2$, у інтактних тварин — $19,1$.

На 22-гу добу пухлинного росту у нелікованих щурів з вихідним штамом карциносаркоми рівень продукції NO суттєво не змінювався і становив $41,03$ ммоль $\text{NO}^2/10^6$ клітин (рис. 2). У той час як показник активності Arg достовірно зростає ($2,81 \pm 0,05$ од/ 10^6 клітин проти $2,2 \pm 0,05$ од/ 10^6 клітин на 7-му добу, $p < 0,05$), що призводило до зменшення співвідношення NO/Arg в 1,1 разу порівняно з аналогічним показником на 7-му добу росту пухлини. Така динаміка показників функціональної активності свідчить, що в процесі росту пухлин у тварин цієї групи відбувалося поступове зменшення кількості Мф М1 та збільшення кількості клітин з фенотипом М2. Для тварин, яким вводили DOX, характерним було збереження популяції Мф з фенотипом М1 і на термінальних стадіях пухлинного процесу (рівень співвідношення NO/Arg в 1,6 разу перевищував такий у нелікованих щурів, $p < 0,05$). У групі тварин, яким вводили лектин, зазначені зміни були виражені більшою мірою. За рахунок підвищення синтезу NO та зниження активності Arg рівень співвідношення NO/Arg в цей термін становив $33,2$, перевищуючи відповідні показники групи КПП та інтактних щурів в 2,3 та 1,7 раза відповідно ($p < 0,05$) (рис. 2а).

У контрольних щурів з резистентним до DOX штамом карциносаркоми на 22-гу добу пухлинного росту спостерігали статистично достовірне зниження рівня продукції NO ($27,05$ ммоль $\text{NO}^2/10^6$ про-

ти $34,0 \pm 0,7$ ммоль $\text{NO}^2/10^6$ на 7-му добу, $p < 0,05$) та підвищення активності Arg ($2,5 \pm 0,01$ проти $2,1 \pm 0,01$ на 7-му добу, $p < 0,05$). Достовірної різниці за цими показниками між групами щурів, які отримали курс хіміотерапії з використанням DOX, та нелікованими тваринами (рис. 2б) не спостерігали. Потрібно відмітити, що застосування бактеріального лектину в якості засобу імунотерапії у цих тварин призвело до суттєвого підвищення продукції NO перитонеальних Мф порівняно з показниками тварин усіх досліджуваних груп (див. рис. 2б). Такі результати дозволяють говорити про превалювання у тварин цієї групи протягом усього терміну спостереження Мф з фенотипом М1.

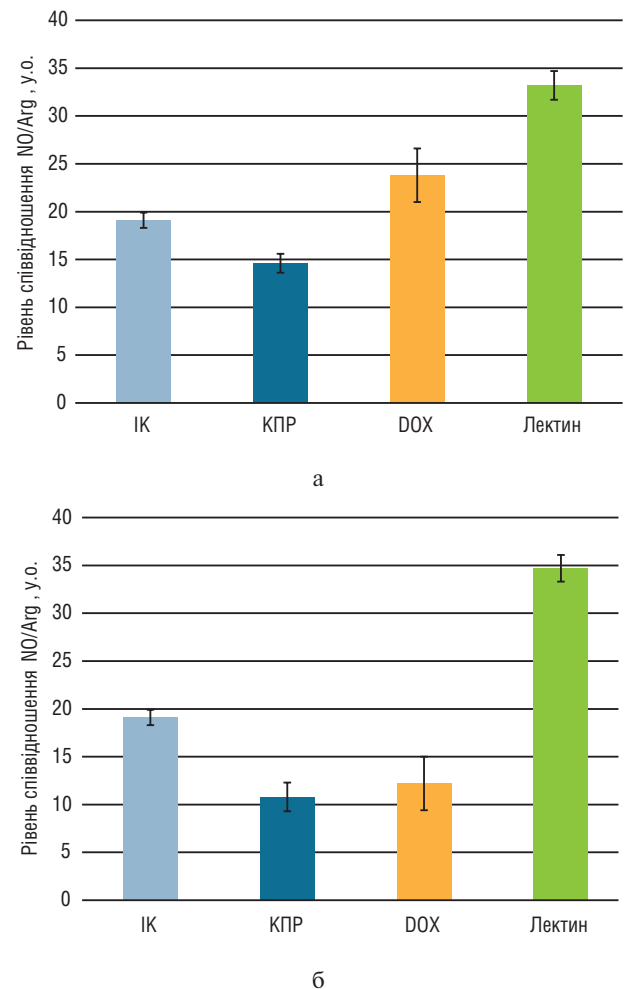


Рис. 2. Зміни показників функціональної активності перитонеальних Мф щурів з вихідним (а) та резистентним (б) до DOX штамми карциносаркоми Уокера-256 при введенні DOX або лектину *B. subtilis* IMB В-7724

Таким чином, отримані нами результати свідчать про поступову зміну функціональної поляризації перитонеальних Мф нелікованих щурів на пізніх термінах росту карциносаркоми Уокера-256. Розвиток пухлинного процесу супроводжувався поглибленням імуносупресії та збільшенням кількості Мф з пропухлинними властивостями (альтернативно активовані Мф М2). Такі зміни були більше виражені у щурів з резистентним до DOX штамом

карциносаркоми, який характеризується швидким та агресивним ростом пухлин. Введення лектину *B. subtilis* IMB В-7724 сприяло збереженню протягом всього терміну спостереження в пулі перитонеальних Мф клітин М1-типу, що володіють прозапальними (протипухлинними) властивостями незалежно від чутливості пухлин до хіміотерапії. Це, найімовірніше, сприяло гальмуванню росту первинної пухлини, яке спостерігали у щурів з карциносаркомою Уокера-256 незалежно від її штаму.

Виявлені кореляційні зв'язки між розміром первинного пухлинного вузла та показниками функціональної активності Мф підтверджують висловлені нами припущення (таблиця). Між розміром пухлин та показниками, що вказують на приналежність Мф до фенотипу М1 (рівень продукції NO та співвідношення NO/Arg) виявлений сильний негативний зв'язок ($p < 0,05$). У той же час кореляція з рівнем активності Arg, яка є характерною ознакою Мф з фенотипом М2, була сильною. Негативний кореляційний зв'язок між об'ємом пухлини та показниками функціональної активності Мф М1 вказує на те, що поляризовані за цим типом клітини відіграють значну роль у стримуванні пухлинного росту.

Таблиця

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

Показник	Вихідний штаму	Резистентний штаму
Рівень NO	-0,92	-0,81
Активність Arg	0,82	0,97
Співвідношення NO/Arg	-0,92	-0,88

Таким чином, отримані результати свідчать, що у щурів з карциносаркомою Уокера-256 в процесі росту пухлини відбувається суттєве пригнічення протипухлинної активності Мф. Такі зміни виражені більшою мірою у щурів з резистентним штамом цієї модельної пухлини, ніж у тварин з вихідним штамом. Результати застосування у тварин з пухлиною лектину *B. subtilis* IMB В-7724 окремо заслуговують на увагу. Після проведення імунотерапії рівень співвідношення NO/Arg, який вказує на тип поляризації Мф, у віддалені терміни росту пухлини (на 22-гу добу) статистично достовірно перевищував показники як контрольних щурів з пухлиною, так й інтактних тварин. Такі результати дозволяють говорити про превалювання у тварин (як з чутливим, так і, що дуже важливо, з резистентним до хіміотерапії штамми карциносаркоми) протягом усього терміну спостереження Мф з фенотипом М1. Механізми, за допомогою яких лектин впливав на функціональну активність Мф, залишаються недостатньо з'ясованими. Що лише вказує на необхідність подальшого вивчення впливу цього лектину як на Мф зокрема, так і на ефектори протипухлинного захисту в цілому.

Отримані нами результати співпадають з даними літератури щодо дослідження ролі ПАМ та зокрема, клітин з фенотипом М1 або М2, в прогресуванні пухлинного процесу. У ряді досліджень проде-

монстровано, що ПАМ можуть спричиняти рецидив пухлини після проведення хіміотерапії, ініціюючи фізіологічну регенеративну програму, яка є сприятливою під час загоєння ран, але негативно впливає у разі розвитку пухлини. Шляхи, відповідальні за промоторну функцію ПАМ після проведення хіміотерапії та розвитку хіміорезистентності, включають збільшення кількості Мф з імуносупресивними функціями, пропухлинну поляризацію в напрямку клітин з фенотипом М2, знижену цитотоксичну відповідь Т-клітин, активацію антиапоптогенних програм у злоякісних клітинах [9, 10]. Зокрема, наведено дані, що ПАМ, які спричиняють стійкість пухлини до DOX, мають високу експресію CD68, CD206, CD163, PD-L1, але низьку — CD80 і CD86. Крім того, ці Мф продукують імуносупресивні цитокіни (IL10 та TGF β), фактори, що спричиняють інвазію (MMP9, MMP13), проангіогенний фактор VEGF, що викликає ревазуляризацію. Це свідчить про переважання серед ПАМ клітин з пропухлинними властивостями — Мф М2-типу. Підвищена експресія PD-L1 обмежує реакцію пухлини на хіміотерапію шляхом пригнічення протипухлинних функцій цитотоксичних Т-клітин, що призводить до виживання та проліферації пухлинних клітин та формування хіміорезистентності [9]. Введення бактеріального лектину на тлі росту пухлини запобігало поляризації Мф в М2, а отже, ці та інші можливі пухлиностимулюючі ефекти проявлялися меншою мірою, що виразилося в значному інгібуванні росту пухлини. Тобто, розробка методів впливу на поляризацію Мф за допомогою лектину *B. subtilis* IMB В-7724 виглядає перспективною.

ВИСНОВКИ

1. Введення лектину *B. subtilis* IMB В-7724 мало виражений протипухлинний ефект у щурів з вихідним та резистентним до DOX штамми карциносаркоми Уокера-256: у тварин, яким вводили бактеріальний лектин, спостерігали статистично достовірне ($p < 0,05$) гальмування росту первинного пухлинного вузла порівняно з показниками контрольної групи.

2. На тлі росту резистентного до DOX штаму карциносаркоми Уокера-256 зниження здатності до продукції NO та підвищення активності Arg для перитонеальних Мф були більш вираженими, порівняно з вихідним штамом пухлини: співвідношення NO/Arg в 1,8 раза ($p < 0,05$) менше за показник інтактних щурів та в 1,3 рази менше за показник тварин з вихідним штамом карциносаркоми ($p > 0,05$).

3. Застосування бактеріального лектину в якості засобу імунотерапії запобігало поляризації Мф в М2 навіть у віддалені терміни (22-га доба) росту карциносаркоми Уокера незалежно від чутливості пухлини до хіміотерапії.

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

1. Ji X, Lu Y, Tian H, *et al.* Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures. *Biomed Pharmacother* 2019; **114**: 108800.
2. Christowitz C, Davis T, Isaacs A, *et al.* Mechanisms of doxorubicin-induced drug resistance and drug resistant tumour growth in a murine breast tumour model. *BMC Cancer* 2019; **19**: 757.
3. Micallef I, Baron B. Doxorubicin: an overview of the anti-cancer and chemoresistance mechanisms. *Ann Clin Toxicol* 2020; **3** (2): 1031.
4. Mills CD. Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages. *Front Immunol* 2015; **6**: 212.
5. Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell* 2015; **27** (4): 462–72.
6. Dudas J, Ladanyi A, Ingruber J, *et al.* Epithelial to mesenchymal transition: a mechanism that fuels cancer radio/chemoresistance. *Cells* 2020; **9** (2): 428.
7. Sun D, Luo T, Dong P, *et al.* M2-polarized tumor-associated macrophages promote epithelial-mesenchymal transition via activation of the AKT3/PRAS40 signaling pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Cell Biochem* 2020; **121** (4): 2828–38.
8. O'Sullivan T, Saddawi-Konefka R, Vermi W, *et al.* Cancer immunoeediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *J Exp Med* 2012; **209** (10): 1869–82.
9. Larionova I, Cherdyn'tseva N, Liu T, *et al.* Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoinmunology* 2019; **8** (7): 1596004.
10. D'Alterio C, Scala S, Sozzi G, *et al.* Paradoxical effects of chemotherapy on tumor relapse and metastasis promotion. *Semin Cancer Biol* 2020; **60**: 351–61.
11. Cancer in Ukraine, 2019–2020. Incidence, mortality, prevalence and other relevant statistic. *Bull Natl Cancer Register Ukr*; Kyiv, 2021; 22: http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_22. (in Ukrainian)
12. Pilco-Ferreto N, Calaf GM. Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. *Int J Oncol* 2016; **49** (2): 753–62.
13. Zhao M, Ding XF, Shen JY, *et al.* Use of liposomal doxorubicin for adjuvant chemotherapy of breast cancer in clinical practice. *J Zhejiang Univ Sci* 2017; **18** (1): 15–26.
14. Pritchard JE, Dillon PM, Conaway MR, *et al.* A mechanistic study of the effect of doxorubicin/adriamycin on the estrogen response in a breast cancer model. *Oncology* 2012; **83** (6): 305–20.
15. Santos JvdO, Porto ALF, Cavalcanti IMF. Potential application of combined therapy with lectins as a therapeutic strategy for the treatment of bacterial infections. *Antibiotics* 2021; **10** (5): 520.
16. Oliveira Brito PKM, Gonçalves TE, Fernandes FF, *et al.* Systemic effects in naïve mice injected with immunomodulatory lectin ArtinM. *PLoS One* 2017; **12** (10): e0187151.
17. Mishra A, Behura A, Mawatwal S, *et al.* Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunology. *Food Chem Toxicol* 2019; **134**: 110827.
18. Podgorskii VS, Kovalenko ÉA, Karpova IS, *et al.* Extracellular lectins from saprophytic strains of bacteria of the genus *Bacillus* (review). *Prikl Biokhim Mikrobiol* 2014; **50** (3): 256–63. (in Russian)
19. do Amaral LA, de Souza GHO, Santos MR, *et al.* Walker-256 tumor: experimental model, implantation sites and num-

ber of cells for ascitic and solid tumor development. *Braz Arch Biol Technol* 2019; **62** (12): e19180284.

20. Shenoy PA, Kuo A, Vetter I, Smith MT. The Walker 256 breast cancer cell-induced bone pain model in rats. *Front Pharmacol* 2016; **7**: 286.

21. Boroday NV, Chekhun VF. Morphological features of doxorubicin-resistant Walker 256 carcinosarcoma and response of mast cells. *Exp Oncol* 2018; **40** (1): 42–7.

22. Todor IN, Lukianova NYu, Shvets YuV, *et al.* Metabolic changes during development of Walker-256 carcinosarcoma resistance to Doxorubicin. *Exp Oncol* 2015; **37** (1): 19–22.

23. Kozhemyakin UM, Filonenko MA, Saifetdinova GA. Scientific and Practical Recommendations for Keeping Laboratory Animals and Working with Them. K: Avicenna 2002; 156 p (in Ukrainian).

24. Podgorsky VS. The method for the obtainment of bacterial lectin, specific to sialic acids (Pat. № 1791 UA). *Publ.* 23.01.1991. *Bul.* № 1. (in Ukrainian)

25. Fedosova NI, Cheremshenko NL, Hetman KI, *et al.* Physical-chemical and cytotoxic properties of *Bacillus subtilis* IMV B-7724 extracellular lectin. *Mikrobiol Z* 2021; **83** (1): 39–48.

26. Chumak A, Shcherbina V, Fedosova N, Chekhun V. Polarization of macrophages of mice under the influence of lectin from *Bacillus Subtilis* IMV B-7724. *EUREKA: Life Science* 2021; (3): 3–10.

27. 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.

28. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 1994; **174** (1–2): 231–5.

29. Dovgij RS, Shitikov, D.V., Pishel, I.N., *et al.* Functional state and metabolic polarization of splenic macrophages of old immunized mice. *Problemy stareniya i dolgoletiya* 2015; **24** (2): 147. (in Russian)

30. Sidenko AB, Vishnyakov VV, Isaev SM. Theory of statistics. M: MAX-Press, 2011. 343 p. (in Russian)

31. Rath M, Müller I, Kropf P. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front Immunol* 2014; **5**: 532.

PRECLINICAL INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF *B. SUBTILIS* IMV B-7724 LECTIN ON THE DYNAMICS OF MACROPHAGES FUNCTIONAL ACTIVITY AFTER TRANSPLANTATION OF CHEMOSENSITIVE OR CHEMORESISTANT EXPERIMENTAL TUMORS

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

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

Summary. Aim: to determine the indicators of peritoneal Mph's functional activity in rats in the dynamics of growth of different Walker carcinosarcoma 256 strains characterized by diverse sensitivity to doxorubicin under the use of doxorubicin or lectin *B. subtilis* INV B-7724. **Object and methods:** in the investigation, Wistar rats were used. Sensitive and doxorubicin-resistant (DOX) strains of Walker carcinosarcoma 256 were used as models of tumor growth. DOX was used as the means of chemotherapy; lectin of *B. subtilis* IMV B-7724 was applied as an immunotherapy. The functional state of peritoneal

macrophages (Mph) was assessed based on nitric oxide (NO) production and arginase (Arg) activity; the NO/Arg ratio was calculated. Statistical analyses of the results was done according to generally accepted methods of variation statistics. **Results:** Regardless of which strain of Walker carcinosarcoma 256 (wild type or DOX-chemoresistant) was transplanted, application of immunotherapy means impede the tumors growth. In the rats transplanted with the doxorubicin-resistant strain of carcinosarcoma Walker 256, decrease in the Mph's ability to produce NO and increase in arginase activity were the most pronounced: the NO/Arg ratio was 1.8 times ($p < 0.05$) lower than in the intact rats and 1.3 times lower ($p < 0.05$) comparing with the group of animals bearing the wild strain of the carcinosarcoma. In rats bearing carcinosarcoma, application of bacterial lectin as a means of immunotherapy led to a significant increase in NO production by peritoneal Mph and to a decrease in their Arginase activity independently of the tumor sensitivity to chemotherapy. **Conclusions:** the growth of

carcinosarcoma Walker 256 is accompanied with a significant inhibition of Mph antitumor activity. This effect is more pronounced in rats bearing the DOX-resistant strain of the tumor. Application of *B. subtilis* IMV B-7724 lectin helped to preserve Mph's type M1 functional phenotype till the late terms of tumor progression, regardless of the experimental tumor's chemoresistance.

Key Words: Walker carcinosarcoma 256, chemoresistance, bacterial lectin, doxorubicin, M1 and M2 type macrophages.

Адреса для листування:

Чумак А.В.

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

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

E-mail: immunomod@ukr.net

Одержано: 25.05.2021