

АНОТАЦІЯ

Чумак А.В. – Функціональна поляризація макрофагів при використанні лектину *B. subtilis* ІМВ В-7724 в процесі росту пухлин різного гістогенезу (експериментальне дослідження) – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія. – Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національна академія наук України. Київ, 2021.

Підвищенню ефективності лікування пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями, зокрема, пошуку та розробці нових засобів терапії, присвячена значна кількість сучасних досліджень. Перелік речовин з протипухлинною дією розширюється за рахунок препаратів природного походження, які володіють не лише цитотоксичною активністю, а й здатні активувати імунну відповідь пацієнта за наявності пухлинного росту. Метою застосування засобів імунотерапії є відновлення та підтримка на належному рівні активності основних ефекторів протипухлинного імунітету, а також формування повноцінної імунної відповіді на антигени пухлинних клітин. Відомо, що реакції протипухлинного імунітету відіграють значну роль в запобіганні розвитку рецидивів та метастазів первинної пухлини. Тому при комплексному лікуванні хворих на рак доцільним є застосування засобів, що запобігають пригніченню імунної відповіді при розвитку та прогресії пухлинного процесу або після впливу хіміо- та променевої терапії.

Найбільш перспективними ефекторами природного імунітету є макрофаги (МФ), завдяки їх здатності до швидкої зміни функціонального стану в залежності від стимулів, які вони отримують з локального мікрооточення. МФ розділяють на класично активовані або прозапальні (М1) та альтернативно активовані або протизапальні (М2). МФ відрізняються особливою пластичністю, що дозволяє припустити можливість їх реполяризації з М2 в М1 під впливом речовин природного походження.

Враховуючи вищезазначене, сучасні дослідження механізмів функціональної активності макрофагів при виникненні та прогресії пухлинного процесу обґрунтовують необхідність розробки M1-спрямованої поляризації цих клітин, що є одним із сучасних підходів протипухлинної імунотерапії.

Дисертаційна робота присвячена визначенню впливу лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на функціональну поляризацію макрофагів в процесі росту пухлин різного гістогенезу та обґрунтуванню доцільності його використання для розробки підходів до протипухлинної імунотерапії.

В процесі росту експериментальних модельних пухлин різного гістогенезу (карциноми легені Льюїс (КЛЛ) та аденокарциноми Ерліха (АКЕ)) встановлено зміну поляризаційного стану макрофагів, виділених з різних анатомічних ніш, від M1 (латентна стадія росту) до M2 (термінальна стадія). Показано, що на початковій стадії росту КЛЛ та АКЕ макрофаги, незалежно від їх гістогенетичного походження, характеризувалися ознаками M1, про що свідчить достовірне збільшення співвідношення продукції NO до активності Arg (NO/Arg) у порівнянні з аналогічними показниками інтактного контролю, а також збереження на рівні показників інтактних тварин цитотоксичної активності та продукції супероксидних радикалів. На термінальній стадії росту солідної пухлини АКЕ виявлено достовірне зниження в макрофагах перитонеальної порожнини та селезінки порівняно з показниками інтактних тварин, в макрофагах пухлинної тканини порівняно з показниками на 14-ту добу: співвідношення NO/Arg – в 2,1, 1,6 та 2,7 разу відповідно; продукції CP – в 3,4, 1,5 та 3,6 разу відповідно; цитотоксичної активності – в 1,5, 2,2 та 1,2 разу відповідно, що відповідає M2 стану поляризації макрофагів. На термінальній стадії росту КЛЛ про M2 поляризацію макрофагів, виділених з перитонеальної порожнини, селезінки та легені тварин, свідчило достовірне ($p < 0,05$) зниження співвідношення NO/Arg (в 2,8, 2,0 та 1,3 разу відповідно), продукції супероксидних радикалів (в 1,7 та 1,2 разу відповідно) та цитотоксичної активності (в 1,4 та 1,2 разу відповідно) порівняно з показниками інтактних тварин.

В якості речовини з імуномодуючими та протипухлинними властивостями ми використовували лектин *B. subtilis* IMB B-7724. Встановлено, що за фізико-хімічними властивостями лектин є глікопротеїном (білок – 86,0%, вуглеводи – 7,0%); в його амінокислотному складі преvalюють лейцин (15%) та ароматичні амінокислоти: тирозин (12%) і фенілаланін (11%); лектин має високу термостабільність, стійкий до зміни pH середовища та зберігання протягом тривалого часу. Лектин *B. subtilis* IMB B-7724 виявляв найвищу спорідненість до N-ацетілнейрамінової та N-гліколілнейрамінової кислот (мінімальні інгібуючі концентрації вуглеводів – 0,3 мМ), що дозволило віднести його до сіалоспецифічних сполук. Показано, що лектин *B. subtilis* IMB B-7724 володіє *in vitro* дозозалежною цитотоксичною активністю по відношенню до клітин лімфоцитарного та макрофагального ряду. Застосування лектину в цитотоксичній концентрації 2 мг/мл призводило до загибелі 65,9–90,2% клітин лімфоцитарного ряду та 85,0–85,3% МФ. Інкубація клітин з лектином в концентрації 0,1 мг/мл не викликала вираженого цитотоксичним ефекту, а при додаванні лектину в імуномодуючих концентраціях (0,05 та 0,02 мг/мл) загибелі клітин не спостерігось.

Показано, що лектин *B. subtilis* IMB B-7724 проявляв цитотоксичну активність *in vitro* по відношенню до пухлинних клітин різного гістогенезу. Показники IC₅₀ становили: для клітинних ліній: K-562 (0,29 мг/мл), MCF-7 (0,126 мг/мл), MDA-MB-231 (0,063 мг/мл), J-774 (0,077 мг/мл), A-549 (0,097 мг/мл), а для клітин, отриманих з пухлинної тканини експериментальних тварин значення IC₅₀ складали L1210 (0,25 мг/мл), АКЕ (0,35 мг/мл), КЛЛ (0,43 мг/мл), карциносаркоми Уокера 256 (0,40 мг/мл) та карциноми Герена (0,43 мг/мл) відповідно.

Лектин *B. subtilis* IMB B-7724 також виявляв протипухлинну дію в умовах *in vivo*. У мишей з АКЕ, яким вводили підшкірно лектин, відмічали суттєве збільшення латентного періоду виникнення пухлин (в 1,4 разу порівняно з нелікованими, $p < 0,05$), гальмування росту первинної пухлини

(індекс гальмування - 53,2%) та статистично достовірне збільшення тривалості життя тварин (в 1,8 разу порівняно з нелікованими, $p < 0,05$). В той час, як підшкірне введення лектину мишам з КЛЛ було менш ефективним (індекс гальмування росту пухлини складав 18,2%, а індекс інгібування метастазування – 36,0%).

Визначено, що під впливом імуномодуючих концентрацій бактеріального лектину відбувається суттєве збільшення в макрофагах співвідношення NO/Arg в бік зростання продукції NO, що є характерним для M1 фенотипу. Показано, що лектин *B. subtilis* IMB B-7724 також призводить до зростання в макрофагах співвідношення рівнів експресії мРНК STAT1/STAT6 (компонентів JAK-STAT сигнального шляху), яке достовірно не відрізняється від відповідних показників за сумісної дії LPS та IFN- γ (в 1,4 та 1,3 разу відповідно).

Вперше встановлено, що застосування *in vivo* лектину *B. subtilis* IMB B-7724 у мишей з АКЕ сприяло збереженню M1 стану перитонеальних макрофагів при розвитку і прогресії пухлин, про що свідчить достовірне збільшення порівняно з показниками тварин контрольної групи співвідношення NO/Arg (12,4 ум.од. проти 6,4 ум.од. відповідно) та цитотоксичної активності (38,5 проти 13,8%) на термінальній стадії пухлинного росту. Крім того, продемонстровано вплив лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на показники експресії мРНК STAT1, STAT6, IRF5 та IRF4, які опосередковують поляризаційний стан макрофагів, про що свідчить достовірне ($p < 0,05$) збільшення співвідношення рівнів експресії мРНК транскрипційних факторів STAT1/STAT6 (на 21-у добу в 2,7 разу) та IRF5/IRF4 (на 28-у добу в 4,9 разу) порівняно з показниками інтактних тварин.

На моделях АКЕ та КЛЛ нами вперше продемонстрований достовірний сильний негативний кореляційний зв'язок між рівнем NO/Arg та розміром первинного пухлинного вузла ($r = -0,76$ та $r = -0,9$ відповідно, $p < 0,05$), а також показниками об'єму і кількості метастазів на моделі КЛЛ ($r = -0,92$ та

-0,89 відповідно, $p < 0,05$). Протипухлинний ефект лектину *B. subtilis* IMB B-7724 пов'язаний з його здатністю ремодулювати поляризацію макрофагів в напрямку прозапального стану M1 на тлі росту АКЕ, про що свідчить виявлений сильний позитивний кореляційний зв'язок між індексом гальмування росту пухлин та рівнем NO/Arg ($r = 0,74$, $p < 0,05$).

Отже, в експериментальних системах *in vitro* та *in vivo* доведена доцільність використання лектину *B. subtilis* IMB B-7724 для модуляції функціональної поляризації макрофагів в нормі та за наявності пухлинного росту і обґрунтовано ефективність його використання для протипухлинної імунотерапії. Ідентифіковано особливості функціональної поляризації макрофагів в динаміці росту експериментальних пухлин різного гістогенезу. Найбільш суттєві зміни поляризації макрофагів (в напрямку M1→M2) встановлено в термінальній фазі росту КЛЛ та АКЕ. Результати проведеного дослідження свідчать про перспективність використання показників поляризаційного стану макрофагів для прогнозування ефективності застосування продуктів природного походження з імуномодулюючою дією при лікуванні хворих на рак.

Ключові слова: макрофаги, функціональний стан, M1 та M2 поляризація, лектин *B. subtilis* IMB B-7724.

SUMMARY

Chumak A.V. The functional polarization of macrophages by the influence of *B. subtilis* IMV B-7724 lectin in setting of growth of histogenetically different tumors (experimental study) – Qualifying scientific work preserving manuscript rights.

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in the field of 09 Biology in the speciality 091 – Biology. – R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv, 2021.

A huge amount of contemporary research is devoted to the improving of the effectiveness of cancer patients' treatment and especially to the search for the new therapies and theirs elaboration. The list of compounds with antitumor activity is expanding due to the investigation of new drugs of natural origin which possess not only cytotoxic activity but are able to activate the patient's immune response during tumor growth. The aim of immunotherapy is to restore and maintain the appropriate activity level of the main effectors of antitumor immunity as well as the formation of effective immune response to tumor cells' antigens. It is known that antitumor immune response makes a significant contribution to prevent the disease recurrence and metastasis spread of the primary tumor. Therefore, in the complex patients' treatment, it is advisable to apply drugs preventing the suppression of immune response during the tumor development and progression or after chemo- and radiation therapy.

The most promising effectors of natural immunity are macrophages (Mph) due to their ability to rapidly change theirs functional state depending on the stimuli they receive from the local microenvironment. Mph are divided into two subtypes: classically activated or pro-inflammatory (M1) and alternatively activated or anti-inflammatory (M2). Thanks to their plasticity, Mph can repolarize from M2 to M1 under the influence of compounds of natural origin. Considering the above-mentioned information, studies of the mechanisms of the Mph functional activity during the tumor development and progression justify the search for new

approaches for controlled polarization of tumor-associated Mph toward M1 type, which is one of the current approaches to antitumor immunotherapy.

The dissertation is devoted to the analysis of *B. subtilis* IMV B-7724 lectin influence on the Mph functional polarization during the growth of histogenetically different tumors as well as to the justification of the feasibility of lectin application in the development of new approaches to antitumor immunotherapy.

During the growth of experimental tumors of different histogenesis (Lewis lung carcinoma (LLC) and Ehrlich adenocarcinoma (EAC)), there was noticed the change of polarization state from M1 (latent growth stage) to M2 (terminal stage) in Mph isolated from different anatomical niches. At the initial stage of LLC and EAC growth, regardless of their histogenetic origin, Mph could be characterized as M1 that is evidenced by a significant increase in the ratio of NO production to Arginase activity (NO/Arg) compared with the intact mice Mph as well as by maintenance of their cytotoxic activity and superoxide radicals production on the level of the intact mice Mph. In the terminal stage of EAC growth, there was detected a significant decrease in some indicators in peritoneal and spleen Mph activity compering with the intact mice Mph as well as a decline in tumor-associated Mph indicators comparing to data on day 14 of tumor growth, namely: NO/Arg ratio by 2.1, 1.6 and 2.7 times; production of superoxide radicals by 3.4, 1.5 and 3.6 times; cytotoxic activity by 1.5, 2.2 and 1.2 times respectively. All these point to M2 features of Mph polarization. In the terminal stage of LLC growth, M2 polarization of Mph isolated from the peritoneal cavity, spleen and lungs was evident due to significant ($p < 0.05$) decrease in NO/Arg ratio (2.8, 2.0 and 1.3 times, respectively), superoxide radicals production (1.7 and 1.2 times, respectively) as well as cytotoxic activity (1.4 and 1.2 times, respectively) comparing with the intact animals.

B. subtilis IMV B-7724 lectin was used as a compound possessing immunomodulatory and antitumor properties. The study of the lectin physico-chemical properties revealed that it is glycoprotein containing 86.0% of protein and 7.0% of sugars. Leucine (15%) and aromatic amino acids tyrosine (12%) and

phenylalanine (11%) predominate in the lectin amino acid composition. *B. subtilis* IMV B-7724 lectin has high thermal and pH stability and long-term shelf-life. The lectin exhibited the highest sugar-binding specificity towards N-Acetylneuraminic and N-Glycolylneuraminic acids with minimal inhibitory concentration of 0.3 mM in both cases, which allowed to attribute it to sialospecific compounds. *B. subtilis* IMV B-7724 lectin has been shown to have dose-dependent cytotoxic activity against lymphocyte and macrophage cells *in vitro*. The application of the lectin at a cytotoxic concentration of 2 mg/ml resulted in the death of 65.9–90.2% of lymphocyte cells and 85.0–85.3% of Mph. The lectin added at a concentration of 0.1 mg/ml did not cause a pronounced cytotoxic effect; while added in immunomodulatory concentrations (0.05 and 0.02 mg/ml), cell death was not observed.

It was observed that *B. subtilis* IMV B-7724 lectin showed cytotoxic activity against tumor cells of different histogenesis *in vitro*. IC₅₀ values for cell lines were K-562 (0.29 mg/ml), MCF-7 (0.126 mg/ml), MDA-MB-231 (0.063 mg/ml), J-774 (0.077 mg/ml), A-549 (0.097 mg/ml). For cells derived from tumor tissue of experimental animals the IC₅₀ values were L1210 (0.25 mg / ml), EAC (0.35 mg/ml), LLC (0.43 mg / ml), carcinosarcoma Walker 256 (0.40 mg/ml) and carcinoma Guerin's (0.43 mg/ml).

B. subtilis IMV B-7724 lectin also demonstrated antitumor activity *in vivo*. In mice with EAC which were injected subcutaneously with the lectin, there was a significant increase in the latent period of tumors growth (1.4 times compared with untreated, $p < 0.05$), in the inhibition of primary tumor growth (inhibition index - 53.2%) and in life expectancy (1.8 times compared with untreated, $p < 0.05$).

Under the influence of immunomodulatory concentrations of the lectin, there was observed a significant increase in the NO/Arg ratio towards the increase in NO production, which is characteristic of M1 phenotype Mph. It was shown that *B. subtilis* IMV B-7724 lectin leads to an increase in STAT1/STAT6 mRNA expression ratio (components of JAK-STAT signaling pathway) in Mph which is

comparable with those induced by combined action of LPS and IFN- γ (in 1.4 and 1.3 times, respectively).

For the first time it was shown that administrated *in vivo* *B. subtilis* IMV B-7724 lectin contributed to the preservation of M1 polarization of peritoneal Mph in mice bearing EAC during the tumor development and progression that was evidenced by a significant increase in NO/Arg ratio comparing to the control animals (12.4 cu vs. 6.4 cu, respectively) and cytotoxic activity (38.5% vs. 13.8%) at the terminal stage of tumor growth. Moreover, the effect of *B. subtilis* IMV B-7724 lectin on STAT1, STAT6, IRF5 and IRF4 mRNA expression, which mediate Mph polarization, was demonstrated. That was evidenced by a significant ($p < 0.05$) increase in ratio of transcription factors mRNA expression: STAT1/STAT6 (on day 21 by 2.7 times) and IRF5/IRF4 (on day 28 by 4.9 times) compared with the intact animals.

In the AEC and LLC models, we demonstrated for the first time a significant strong negative correlation between the NO/Arg ratio and the tumor volume ($r = -0.76$ and $r = -0.9$, respectively, $p < 0.05$), as well as with the metastases volume and number in LLC model ($r = -0.92$ and $r = -0.89$, respectively, $p < 0.05$). During the growth of EAC, the antitumor effect of *B. subtilis* IMV B-7724 lectin is associated with its ability to remodulate the Mph polarization towards proinflammatory M1 type, as is evidenced by a strong positive correlation between tumor growth inhibition index and NO/Arg ratio ($r = 0.74$, $p < 0.05$).

Therefore, the feasibility of using *B. subtilis* IMV B-7724 lectin to modulate the functional polarization of Mph in normal conditions and during tumor growth was proved *in vitro* and *in vivo*, and its effectiveness in the antitumor immunotherapy was substantiated. The peculiarities of Mph functional polarization in the growth dynamics of histogenetically different experimental tumors have been identified. The most significant changes in the Mph polarization (in the M1 $\rightarrow$ M2 direction) were found during the terminal growth phase of LLC and EAC tumors. The results of the study show that the application of indicators of Mph

polarization to predict the effectiveness of natural origin products possessing immunomodulatory effects in the cancer patients' treatment is promising.

Keywords: macrophages, functional state, M1 and M2 polarization, *B. subtilis* IMV B-7724 lectin.