

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького Національна академія наук України

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЧУМАК АЛІНА ВІКТОРІВНА

УДК: 616-006.04:57.083.3:615.37

ДИСЕРТАЦІЯ

**ФУНКЦІОНАЛЬНА ПОЛЯРИЗАЦІЯ МАКРОФАГІВ ПРИ
ВИКОРИСТАННІ ЛЕКТИНУ *B. SUBTILIS* ІМВ В-7724 В ПРОЦЕСІ РОСТУ
ПУХЛИН РІЗНОГО ГІСТОГЕНЕЗУ
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)**

091 - Біологія

09 – Біологія

14.01.07 - Онкологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____Чумак А.В.

Науковий керівник роботи Чехун Василь Федорович, акад. НАН України, проф.,
д.м.н.

Київ – 2021

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 (M1) та альтернативно активовані або протизапальні (M2). МФ відрізняються особливою пластичністю, що дозволяє припустити можливість їх реполяризації з M2 в M1 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 імуномодулюючими 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 превалюють лейцин (15%) та ароматичні амінокислоти: тирозин (12%) і фенілаланін (11%); лектин має високу термостабільність, стійкий до зміни рН 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 імуномодулюючих 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 (0,43мг/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 перитоніальних 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* ІМВ В-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 природнього походження з імуномодуючою дією при лікуванні хворих на рак.

Ключові слова: макрофаги, функціональний стан, M1 та M2 поляризація, лектин *B. subtilis* ІМВ В-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 their 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 comparing 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

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

1. Караман ОМ, Федосова НІ, Воєйкова ІМ, Черемшенко НЛ, Іванченко АВ, Савцова ЗД. Перспективи використання лектинів для діагностики і лікування злоякісних новоутворень. Онкологія 2018; 1(72): 10-16.
2. Федосова НІ, Караман ОМ, Воєйкова ІМ, Іванченко АВ, Черемшенко НЛ, Круць ОО, Діденко ГВ. Оцінка цитотоксичної активності лектинподібної речовини *B. subtilis* 7724 в системі *in vitro*. Онкологія 2018; 20 №3(74): 218-224.
3. Karaman OM, Ivanchenko AV, Chekhun VF. Macrophages — a perspective target for antineoplastic Immunotherapy. Exp Oncol 2019; 41, 4: 282–290. DOI: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-41-no-4.13698.
4. Fedosova NI, Cheremshenko NL, Getman KI, Karaman OM, Symchych TV, Ivanchenko AV, Danyliuk OI, Voeykova IM, Didenko GV. Bioactivity of the *Bacillus subtilis* IMV B-7724 extracellular lectin. Mikrobiol. Z 2019; 81(4):107-117. DOI: <https://doi.org/10.15407/mikrobiolj81.04.107>.
5. Symchych TV, Fedosova NI, Chumak AV, Cheremshenko NL, Karaman OM, Burlaka AP, Voyeykova IM. 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.
6. Chumak AV, Fedosova NI, Shcherbina VM, Cheremshenko NL, Karaman OM, Chekhun VF. Influence of bacterial lectin on key regulatory links of functional activity of macrophages of mice with ehrlich carcinoma. Exp Oncol 2021; 3: 197-203. DOI: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no-3.16537.
7. 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.
8. Chumak AV, Fedosova NI, Cheremshenko NL, Symchych TV, Voyeykova IM, Chekhun VF. Macrophage polarization in dynamics of lewis lung carcinoma growth and metastasis. Exp Oncol 2021; 43, 15–20. DOI: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no-1.15829.

9. Fedosova NI, Cheremshenko NL, Hetman KI, Symchych TV, Chumak AV, Shliahovenko VO, Voyeykova IM, Didenko HV. Physicochemical and cytotoxicity properties of *Bacillus subtilis* IMB B-7724 extracellular lectin. Mikrobiol. Z 2021; 83(1): 39-48. <https://doi.org/10.15407/microbiolj83.01.039>.
10. Федосова НІ, Черемшенко НЛ, Симчич ТВ, Чумак АВ, Воєйкова ІМ. Оцінка гострої токсичності лектину *B. subtilis*. IMB B-7724. Фармакологія та лікарська токсикологія 2021; 15(2): 110-116.
11. Черемшенко НЛ, Федосова НІ, Гетьман КІ, Караман ОМ, Симчич ТВ, Іванченко АВ, Воєйкова ІМ, Чехун ВФ. Цитотоксичний лектин з протипухлинною активністю. Патент на корисну модель №141944 UA. Опубл. 12.05.2020, бюл. № 9/2020.
12. Іванченко АВ, Симчич ТВ, Федосова НІ, Черемшенко НЛ, Караман ОМ. Особливості поляризації макрофагів різних органів і тканин мишей з карциномою легені Льюїс. Тези науково-практичної конференції молодих вчених: «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», Київ, 4-5 лютого 2019. Онкологія 2019; 21, 1: 63-64.
13. Чумак А, Федосова Н, Симчич Т, Караман О, Черемшенко Н, Діденко Г. Дослідження функціонального стану макрофагів у мишей з експериментальними модельними пухлинами. XVI Міжнародна наукова конференція "Молодь і поступ біології", Львів, 27–29 квітня 2020 р.
14. Чумак А, Симчич Т, Караман О, Черемшенко Н, Федосова Н, Чехун ВФ. Функціональний стан резидентних макрофагів у мишей з модельним пухлинним процесом. XVIII Міжнародна наукова конференція «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки. BioScience Advances», Київ, травень 2020 р.
15. Чумак А, Симчич Т, Черемшенко Н, Федосова Н. Розробка нового методу імунотерапії раку за допомогою лектину *B. subtilis* IMB 7724. Матеріали науково-практичної конференції «Другий національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 175-річчю з дня народження І.І. Мечникова (за участю міжнародних спеціалістів)». Харків, 16-17 вересня 2020 року.

16. Чумак АВ, Федосова НІ, Караман ОМ, Черемшенко НЛ, Симчич ТВ, Воєйкова ІМ. Протипухлинна активність лектину *B.subtilis* ІМВ В-7724 у мишей з аденокарциномою Ерліха. XIV з'їзд онкологів та радіологів України. Київ, 30.09–02.10.2021.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	18
ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1	27
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	27
1.1 Фенотипова та функціональна характеристика макрофагів	27
1.2 Поляризація макрофагів в пухлинному осередку та їх роль в пухлинному процесі.....	34
1.3 Молекулярні механізми, задіяні в поляризації макрофагів.....	38
1.4 Сучасні підходи до перепрограмування пухлино-асоційованих макрофагів	43
1.5. Лектини як потенційні агенти зміни функціонального стану макрофагів	46
1.5.1 Біологічні функції лектинів	47
1.5.2 Лектини як речовини з протипухлинною дією	48
РОЗДІЛ 2	56
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	56
2.1 Експериментальні тварини.....	56
2.2 Моделі пухлинного росту	58
2.3. Клітинні лінії	59
2.4 Бактеріальний лектин	60
2.5 Схеми експериментів.....	60
2.5.1 Оцінка стану макрофагів за різними проявами функціональної активності в процесі росту модельних пухлин	60
2.5.2 Оцінка гострої токсичності лектину <i>B. subtilis</i> IMB B-7724 в системі <i>in vivo</i>	61

2.5.3 Оцінка впливу <i>in vivo</i> лектину <i>B. subtilis</i> IMB B-7724 на органи і клітини імунної системи.....	61
2.5.4 Визначення протипухлинної активності лектину <i>B. subtilis</i> IMB B-7724 у мишей з модельним пухлинним процесом.....	62
2.5.5 Вплив лектину <i>B. subtilis</i> IMB B-7724 на показники функціональної активності макрофагів мишей лінії Balb/c в процесі росту пухлини	62
2.6 Біохімічні, біофізичні та біологічні методи досліджень властивостей лектину <i>B. subtilis</i> IMB B-7724	63
2.6.1 Визначення молекулярної маси методом електрофорезу.....	63
2.6.2 Визначення хімічного складу	63
2.6.3 Виявлення домішок високомолекулярних сполук різних класів.....	63
2.6.4 Оцінка однорідності за спектрами поглинання в різному діапазоні випромінювання	64
2.6.5 Визначення амінокислотного складу.....	64
2.6.6 Визначення гемаглютинуючої активності	64
2.6.7 Визначення вуглеводної специфічності	65
2.6.8 Оцінка цитотоксичної активності лектину	65
2.6.9 Визначення рН та температурної стабільності лектину	66
2.7 Методи експериментальної онкології.....	66
2.7 Імунологічні методи дослідження.....	67
2.7.1 Дослідження імунокомпетентних органів експериментальних тварин ...	67
2.7.2 Виділення макрофагів з різних органів та тканин.....	68
2.7.3 Виділення лімфоїдних клітин	69
2.7.4 Визначення цитотоксичної активності макрофагів.....	70
2.7.5 Вимірювання продукції NO	70
2.7.6 Вимірювання активності аргінази.....	71

2.7.7 Оцінка швидкості продукції супероксидних радикалів.....	71
2.7.8 Реакція бласттрансформації лімфоцитів	71
2.8 Виділення РНК, синтез кДНК.....	72
2.9 Кількісна полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу	73
2.10 Математична та статистична обробка результатів	74
РОЗДІЛ 3	75
ОЦІНКА ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ МАКРОФАГІВ В ПРОЦЕСІ РОСТУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ПУХЛИН РІЗНОГО ГІСТОГЕНЕЗУ	75
3.1. Зміни функціонального стану макрофагів в процесі росту аденокарциноми Ерліха	76
3.2. Зміни функціонального стану макрофагів в процесі росту карциноми легені Льюїс.....	83
РОЗДІЛ 4	89
ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ТА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛЕКТИНУ <i>B. SUBTILIS</i> ІМВ В-7724	89
4.1 Фізико-хімічні характеристики лектину	89
4.2 Цитотоксична активність лектину <i>in vitro</i> по відношенню до клітин імунокомпетентних органів інтактних мишей.....	96
4.3 Стимулюючий вплив низьких концентрацій лектину <i>B. subtilis</i> ІМВ В-7724 на клітини імунної системи інтактних мишей	98
4.4 Оцінка токсичного впливу лектину <i>B.subtilis</i> ІМВ В-7724 в системі <i>in vivo</i>	100
4.5 Дослідження токсичного впливу лектину <i>B.subtilis</i> ІМВ В-7724 на органи імунної системи.....	103
РОЗДІЛ 5	108

ОЦІНКА ПОЛЯРИЗАЦІЇ МАКРОФАГІВ ІНТАКТНИХ МИШЕЙ ЗА УМОВИ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЕКТИНУ <i>B. SUBTILIS</i> IMB B-7724 <i>IN VITRO</i>	108
РОЗДІЛ 6	114
ВПЛИВ ЛЕКТИНУ <i>B. SUBTILIS</i> IMB B-7724 НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ ПОЛЯРИЗАЦІЮ МАКРОФАГІВ В ПРОЦЕСІ РОСТУ ПУХЛИН	114
6.1 Визначення протипухлинної активності лектину <i>B.subtilis</i> IMB B-7724 у мишей з модельним пухлинним процесом.....	114
6.2 Вплив лектину <i>B.subtilis</i> IMB B-7724 на показники функціональної активності макрофагів в процесі росту аденокарциноми Ерліха	116
6.3 Вплив лектину <i>B. subtilis</i> IMB B-7724 на показники рівнів експресії мРНК транскрипційних факторів IRF5/IRF4, STAT1/STAT6 у макрофагах в процесі росту аденокарциноми Ерліха	119
РОЗДІЛ 7	124
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	124
ВИСНОВКИ.....	134
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	137
ДОДАТОК Б	159

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

Arg – аргіназа (arginase)

ConA – конканавалін А (concanavalin A)

FBS – теляча ембріональна сироватка (fetal bovine serum)

GM-CSF, CSF2 – гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

IFN- γ – інтерферон- γ (interferon gamma)

IL – інтерлейкін (interleukin)

iNOS, NOS2 – індукцйбельна NO-синтетаза (inducible NO synthetase)

IRF – регуляторні фактори інтерферонів (interferon regulatory factors)

L1210 – клітинна лінія лімфоцитарної В-клітинної лейкемії миші

LD – летальна доза

LPS – ліпополісахарид (lipopolysaccharide)

MCF-7 – клітинна лінія аденокарциноми молочної залози людини з епітеліальним фенотипом

MDA-MB-231 клітинна лінія аденокарциноми молочної залози людини з агресивним мезенхімальним фенотипом

A-549 клітинна лінія недрібноклітинного раку легені людини

J-774 – пухлин-асоційовані макрофаги, виділені з гістіоцитарної саркоми миші лінії Balb/c

M-CSF, CSF1 – макрофагальний колонієстимулюючий фактор (macrophage colony-stimulating factor)

miRNA – мікро-РНК (microRNA)

NK-клітини – природні кілерні клітини (Natural killer cells)

МФ – макрофаги

NO – оксид азоту

PAMPs –патоген-асоційовані молекулярні патерни (pathogen-associated molecular patterns)

STAT – трансдуктори сигналу і активатори транскрипції (signal transducers)

TGF- β – трансформуючий фактор росту бета (transforming growth factor beta)
Th 1 – Т-хелпери 1 типу (T-helper 1)
Th 2 – Т-хелпери 2 типу (T-helper 2)
TLRs –Toll-like рецептори (Toll-like receptors)
TNF α – фактор некрозу пухлини α (tumor necrosis factor alpha)
Treg – Т-клітини (Regulatory T cells)
ТФ транскрипційний фактор
АКЕ –аденокарцинома Ерліха
СР – супероксидні радикали
ЕПР – електронно-парамагнітний резонанс
ІГРП – індекс гальмування росту пухлин
ІМ – індекс інгібування метастазування
ІЗТЖ – індекс збільшення тривалості життя
ІК – інтактний контроль
ІС індекс стимуляції
ІС₅₀ – концентрація речовини, за дії якої *in vitro* відмічають загибель 50% клітин-мішеней
ІЧ – інфрачервоне випромінювання
К-562 – хронічна мієлогенна лейкемія людини
КЛЛ – карцинома легені Льюїс
КМ – клітини-мішені
КПР – контроль пухлинного росту
мРНК – матрична РНК
ПАМ – пухлино-асоційовані макрофаги
ПЛВ – периферичні лімфатичні вузли
РГА – реакція гемаглютинації
СТЖ – середня тривалість життя
УФ – ультрафіолетове випромінювання

ВСТУП

Актуальність теми. Розробка нових засобів терапії, що спрямовані на підвищення ефективності лікування пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями, є предметом низки сучасних досліджень [1-4]. Перелік речовин з протипухлинною дією розширюється за рахунок препаратів природного походження, які володіють не лише цитотоксичною активністю, а й здатні оптимізувати імунну відповідь пацієнта. Метою застосування засобів імунотерапії є тривале підтримання на достатньому рівні активності основних ефекторів природного протипухлинного імунітету та формування повноцінного набутого імунітету у відповідь на розвиток пухлини. Відомо, що протипухлинні реакції організму (в першу чергу природного імунітету) відіграють значну роль в запобіганні розвитку рецидивів та метастазів первинної пухлини. Тому ефективним може бути застосування при комплексному лікуванні пацієнтів засобів, що запобігають порушенню імунної відповіді внаслідок прогресування пухлинного процесу або агресивного впливу хіміо- та променевої терапії [5, 6].

При дослідженні ефективності імунотерапії (біотерапії) найбільш перспективними ефекторами природного імунітету визначено макрофаги (МФ), завдяки їх пластичності, здатності до швидкої зміни функціонального стану в залежності від стимулів, які вони отримують з локального мікрооточення [7]. Розрізняють МФ, що були активовані класичним (М1) або альтернативним (М2) шляхами [8]. МФ субпопуляції М1 мають прозапальні (протипухлинні) властивості, МФ М2 – сприяють росту пухлини (пропухлинні властивості). Відомим є факт, що пухлини здатні сприяти переключенню МФ мікрооточення в М2 стан [9-11]. Водночас МФ відрізняються особливою пластичністю, що дозволяє припустити можливість їх реполяризації з М2 в М1 за допомогою засобів біотерапії. На сучасному етапі дослідники зазначають наявність «перехідних форм» МФ та необхідність комплексної оцінки популяції МФ з урахуванням джерел отримання, активаційних стимулів та різнопланових функціональних особливостей цих клітин [12]. Детальне дослідження механізмів

переключення $M1 \leftrightarrow M2$ та пошук можливих шляхів регуляції процесу поляризації є одним із сучасних важливих напрямків оптимізації імунотерапії пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями [13-15].

В якості можливих речовин з імуномодулюючими та протипухлинними властивостями увагу дослідників привертають лектини – глікопротеїни, що здатні до вибіркового зв'язування вуглеводів та вуглеводних компонентів глікокон'югатів різної природи. Високоспецифічне зв'язування із відповідними рецепторами на плазматичних мембранах клітин опосередковує цитотоксичний або стимулюючий вплив речовини. Механізми протипухлинної активності лектинів пов'язують як з прямою цитотоксичною дією на пухлинні клітини, так і з опосередкованим впливом внаслідок модулювання імунних реакцій [16-18]. На сьогодні більш детально описані властивості рослинних лектинів, проте всі досліджені речовини цієї групи є достатньо токсичними, їх цитотоксичний вплив поширюється не тільки на пухлинні клітини, але й на клітини здорових тканин. Лектини, продуковані бактеріями, досліджені значно меншою мірою. З точки зору біотехнологічного виробництва процес отримання бактеріальних лектинів значно простіший, придатний для стандартизації і може бути перспективним для подальшого практичного використання таких сполук. Враховуючи це, а також відомості про низьку токсичність бактеріальних лектинів, їх можна вважати перспективними в якості засобів з протипухлинними та імуномодулюючими властивостями. Ми припустили, що одним з таких засобів міг би бути лектин, отриманий нами з оригінального штаму *B. subtilis* IMB B-7724 за методом, який детально описано в [19, 20]. Таке припущення вимагало вивчення фізико-хімічних та біологічних властивостей цього лектину для обґрунтування доцільності використання лектину як перспективного засобу протипухлинної імунотерапії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Дисертаційна робота виконана у лабораторії онкоімунології та конструювання протипухлинних вакцин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України за темами науково-дослідних робіт: 2.2.5.417 «Дослідження функціональної пластичності макрофагів за умов

застосування засобів хіміо- та біотерапії раку» (номер державної реєстрації №0118U005470, 2019 – 2023 рр.); 2.2.5.434 «Лектин *B. subtilis* IMB 7724 як фактор макрофаг-спрямованої модуляції в оптимізації імунотерапії» (номер державної реєстрації 0120U102955, 2020 – 2025 рр.); № 2.2.5.411 «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин» (2017-2021 рр., номер державної реєстрації 0117U002034) та стипендії НАН України для молодих вчених «Розробка нового методу імунотерапії раку за допомогою лектину *B. subtilis* IMB B-7724» (2020-2022 рр.).

Мета дослідження: Визначити вплив лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на функціональну поляризацію макрофагів в процесі росту пухлин різного гістогенезу та обґрунтувати доцільність його використання для розробки підходів до протипухлинної імунотерапії.

Задачі дослідження:

1. Ідентифікувати показники функціональної поляризації (за цитотоксичною активністю, впливом на метаболізм L-аргініну, продукцію супероксидних радикалів) макрофагів різних анатомічних ніш в динаміці росту експериментальних пухлин різного гістогенезу.
2. Дослідити фізико-хімічні та біологічні властивості лектину *B. subtilis* IMB B-7724.
3. Дослідити вплив лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на показники функціональної активності макрофагів (продукції оксиду азоту, аргіназної активності) та рівень співвідношення NO/Arg в процесі росту пухлини *in vivo*.
4. Оцінити вплив лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на рівень експресії мРНК STAT1, STAT6 в макрофагах інтактних мишей та порівняти із відповідними показниками при дії класичних активаторів LPS та IFN- γ *in vitro*.
5. Визначити показники експресії мРНК транскрипційних факторів IRF5/IRF4 та STAT1/STAT6 у макрофагах, отриманих на різних стадіях росту аденокарциноми Ерліха у мишей, за умови впливу лектину *B. subtilis* IMB B-7724.

6. Дослідити зв'язок між показниками маркерів функціональної поляризації макрофагів та протипухлинної ефективності при використанні лектину *B. subtilis* IMB B-7724 в модельній системі *in vivo*.

7. Обґрунтувати ефективність використання лектину *B. subtilis* IMB B-7724 для модуляції функціонального стану макрофагів при рості експериментальних пухлин.

Об'єкт дослідження: клітини макрофагальної ланки імунної системи інтактних мишей та мишей з модельним пухлинним процесом (аденокарцинома Ерліха, карцинома легені Льюїс); експериментальні тварини (миші ліній Balb/c та C57Bl/6J); позаклітинний лектин *B. subtilis* IMB B-7724.

Предмет дослідження: показники функціональної активності макрофагів, виділених з різних анатомічних ніш (органів та тканин) інтактних мишей та тварин з експериментальними модельними пухлинами, в тому числі в умовах застосування лектину *B. subtilis* IMB B-7724.

Методи дослідження. Перещеплення та оцінку динаміки росту модельних пухлин здійснювали за стандартними методиками. Поляризаційний тип M1, M2 макрофагів, виділених з перитонеальної порожнини, селезінки, легенів та пухлинної тканини методом центрифугування на грандієті щільності (фіколу-урографін) з наступною адгезією на пластику, аналізували із використанням біохімічних методів (вимірювання продукції NO, активності аргінази), ЕПР-спектроскопії (оцінка швидкості продукції супероксидних радикалів (CP)); методом МТТ тесту (цитотоксична активність). Імунологічні методи: визначення абсолютної маси тимусу, селезінки, периферичних лімфатичних вузлів та показників їх клітинності (кількість життєздатних лімфоцитів за суправітального забарвлення трипановим синім). Вплив лектину на активність лімфоцитів периферичних лімфатичних вузлів оцінювали *in vitro*, за допомогою стандартної реакції бласттрансформації на Т-клітинний (конканавалін А, ConA) та В-клітинний (ліпополісахарид (Lipopolysaccharide, LPS) мітогени. Рівень експресії мРНК транскрипційних факторів STAT1, STAT6, IRF4, IRF5 в макрофагах оцінювали методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі,

підбираючи праймери з використанням ресурсів Primer Design and Search Tool та NCBI (розділ BLAST). Статистичний аналіз отриманих результатів включав оцінку достовірності розбіжностей (непараметричний U-критерій Mann-Whitney) та визначення кореляційних зв'язків (критерію Спірмена) за допомогою програмного забезпечення Prism Версії 8.0.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше 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 процесу і обґрунтовано ефективність його використання для протипухлинної імунотерапії.

Вперше ідентифіковано функціональну поляризацію макрофагів в динаміці росту експериментальних пухлин різного гістогенезу. Найбільш суттєві ознаки зміни поляризації макрофагів (в напрямку M1→M2) встановлено в термінальній фазі росту карциноми легені Льюїс та аденокарциноми Ерліха.

Встановлено, що бактеріальний лектин *B. subtilis* IMB B-7724 проявляє імуномодулюючу (щодо клітин лімфоцитарного та макрофагального ряду) та протипухлинну (по відношенню до пухлинних клітин різного гістогенезу) дію, що обґрунтовує доцільність використання цього лектину як перспективного засобу протипухлинної імунотерапії.

Вперше визначено, що імуномодулююча активність лектину *B. subtilis* IMB B-7724 асоційована зі станом функціональної поляризації макрофагів. Встановлено, що обумовлена *B. subtilis* IMB B-7724 поляризація макрофагів за M1 станом є IRF-залежною та опосередкована JAK-STAT – сигнальним шляхом, про що свідчить підвищення співвідношення рівнів експресії мРНК STAT1/STAT6 та IRF5/IRF4.

Практичне значення одержаних результатів.

Отримані фундаментальні дані розширюють існуючі уявлення про механізми змін функціональної активності клітин макрофагального ряду в процесі росту пухлин різного гістогенезу та свідчать про перспективу використання лектину *B. subtilis* IMB B-7724 для модуляції стану їх функціональної поляризації.

Вперше встановлено, що лектин *B. subtilis* IMB B-7724 володіє протипухлинною та імуномодуючою активністю, що обґрунтовує доцільність його використання для медикаментозної терапії злоякісних новоутворень.

Результати роботи експериментально обґрунтовують доцільність використання показників поляризаційного стану макрофагів для прогнозування ефективності терапевтичного застосування продуктів природного походження з імуномодуючою дією при лікуванні хворих на рак.

Запропоновано комплекс молекулярно-біологічних маркерів (співвідношення рівнів NO/Arg та експресії мРНК STAT1/STAT6 і IRF5/IRF4), що можуть бути використані для оцінки функціональної поляризації макрофагів в динаміці росту пухлин та при використанні імунотерапії.

Результати проведеного дослідження можуть бути впроваджені в навчальний процес ВНЗ України у лекціях студентам та аспірантам, присвячених сучасним досягненням біотехнологій у лікуванні злоякісних новоутворень.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є закінченим, самостійно виконаним дослідженням автора, має фундаментальне наукове та практичне значення. Спільно з науковим керівником попередньо було сформовано мету та завдання роботи, а на основі отриманих в ході роботи результатів проведено їх узагальнення та сформовано висновки. Дисертантом особисто проаналізовано наукові публікації за темою дисертації; вивчені в експерименті функціональні властивості макрофагів тварин з модельними пухлинами, а також протипухлинні та імуномодуючі ефекти застосування оригінального лектину *B. subtilis* IMB B-7724; проведені аналіз та статистична обробка результатів.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи представлені та обговорені на науково-практичних форумах різного рівня: конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (Київ, 4-5 лютого 2019); XVI Міжнародній науковій конференції "Молодь і поступ біології" (Львів, 27–29 квітня 2020 р); XVIII Міжнародній науковій конференції «Шевченківська весна: досягнення

біологічної науки /BioScience Advances» (Київ, травень 2020 р); науково-практичній конференції «Другий національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 175-річчю з дня народження І.І. Мечникова (за участю міжнародних спеціалістів)» (Харків, 16-17 вересня 2020 року); XIV з'їзд онкологів та радіологів України (Київ, 30.09–02.10.2021).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 16 наукових робіт, зокрема 10 статей, з яких 9, що належать до фахових видань із переліку затверджених МОН України та 1 в науковому виданні держави, що входить до Європейського Союзу; отримано 1 патент на корисну модель; 5 праць опубліковано в наукових збірниках і матеріалах міжнародних та українських наукових конференцій.

Обсяг та структура дисертації. Дисертацію викладено українською мовою на 162 сторінках комп'ютерного набору. Робота складається зі вступу, огляду літератури, розділу матеріалів і методів дослідження, 4 розділів результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків та списку використаних джерел, який включає 229 посилання, з яких 30 кирилицею. Текст супроводжується 17 рисунками і 20 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Фенотипова та функціональна характеристика макрофагів

Макрофаги (МФ) – високопластичні клітини імунної системи, які здатні швидко змінювати функціональну активність (поляризаційний стан) та виконувати функції як при фізіологічних, так і при патологічних (в тому числі, пухлинних) процесах, підтримуючи стійкість організму [10, 21].

З моменту відкриття фагоцитуючих клітин та введення терміну «макрофаги» І.І. Мечніковим (1887 р.) поглиблювалися та розширювалися відомості про походження, локалізацію в організмі та функції цих клітин. Тому підходи до їх класифікації поступово змінювались. В 1924 р. L. Aschoff ввів описовий термін «ретикулоендотеліальна система» для уніфікації клітин із загальною властивістю фагоцитозу. До останніх віднесли гістіоцити сполучної тканини, остеобласти кісткової тканини, клітини Купфера печінки, альвеолярні МФ легень, мікроглію нервової тканини, клітини Лангерганса шкіри, МФ ряду органів (лімфатичних вузлів, селезінки, кісткового мозку), тощо. В 1969 р. група дослідників запропонувала об'єднати всі фагоцитуючі мононуклеарні клітини та їх попередників в «систему мононуклеарних фагоцитів» [22]. Ця система включає промоноцити та їх попередники в кістковому мозку, моноцити периферичної крові, макрофаги в тканинах. Включення клітин в «систему мононуклеарних фагоцитів» засноване на схожості морфологічних характеристик, походженні, особливостях функціонування клітин. За цими критеріями з класифікації виключаються ретикулярні, дендритні, ендотеліальні клітини та фібробласти [23-25].

Відомим є виділення таких груп МФ, як резидентні тканинні та інфільтруючі, які походять від циркулюючих в крові моноцитів. До першої групи відносять клітини Купфера печінки, мікроглію і макрофаги черевної порожнини, легень, серця, червоної пульпи селезінки, кісткового мозку, які виконують

гомеостатичні функції у відповідних тканинах [26, 27]. Щодо походження тканинних макрофагів вважалось, що їх попередниками є мієлоїдні клітини кісткового мозку, з яких через послідовні етапи диференціювання утворюються циркулюючі моноцити крові. Останні безперервно мігрують в периферичні тканини, де диференціюються в макрофаги [28]. Але на сьогодні відомо, що частина популяції тканинних макрофагів з'являються ще під час ембріонального розвитку (походять з еритромієлоїдних попередників жовткового мішка) і підтримуються за рахунок локальної проліферації, а не екстравазації моноцитів [29]. Наприклад, показано, що резидентні макрофаги мозку, легень, печінки, черевної порожнини і селезінки не диференціюються з моноцитів, а беруть початок від ембріональних попередників [27, 30].

Диференціювання МФ з моноцитів периферичної крові було продемонстровано в експериментальних дослідженнях (переважно на мишах). За рівнем експресії лімфоцитарного антигену 6С (Ly6C) моноцити крові мишей були розділені на 2 групи: $Ly6C^{hi}$ і $Ly6C^{low}$. Моноцити, що мають високий рівень експресії Ly6C ($Ly6C^{hi}$), виконують прозапальну та антимікробну функції. Показано, що вони здатні транспортувати антигени в лімфатичний вузол і накопичуються в місцях запалення, де можуть диференціюватися в МФ або дендритні клітини (ДК) залежно від місцевого цитокінового середовища. Моноцити $Ly6C^{low}$ беруть участь у репарації пошкоджених внаслідок запалення тканин [31, 32]. Показано, що класичні моноцити («запальні» або $Ly6C^{hi}$ моноцити) є джерелом інфільтруючих МФ, які існують при патологічних умовах, в тому числі, і при пухлинних захворюваннях, атеросклерозі, порушеннях обміну речовин [33, 34].

Загалом, МФ – це велика гетерогенна популяція клітин, властивості та фенотип яких можуть відрізнятися залежно від типу тканини, в якій вони функціонують, а також від отриманих сигналів мікрооточення. Тому сучасна класифікація враховує окрім анатомічних ніш виділення, походження та ступеню диференціювання клітин, також і вплив активаційних сигналів, що дозволяє додатково виділити підтипи МФ [35]. В тканині, залежно від сигналів

мікрооточення, макрофаги завдяки своїй пластичності можуть набувати різні функціональні фенотипи: від ініціації прозапальних реакцій до припинення запалення та репарації тканин. Традиційно МФ розділяють на *класично активовані або прозапальні (M1)* та *альтернативно активовані або протизапальні (M2)* [35]. Розділення МФ на M1 та M2 ґрунтується на експресії певних поверхневих маркерів, продукованих факторах та функціях, що виконують ці клітини.

При реалізації вродженої імунної відповіді на патоген активація МФ відбувається внаслідок зв'язування патоген-асоційованих молекулярних патернів (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs,) з патерн-розпізнавальними рецепторами, зокрема з Toll-like рецепторами (Toll-like receptors, TLRs). Таким МФ притаманні деякі властивості M1 клітин: продукція прозапальних цитокінів та мікробоцидна активність [36]. Окремо виділяють так звані *M2-подібні макрофаги*, що мають деякі властивості M2 макрофагів [32]. Подальші результати досліджень молекулярних механізмів поляризації МФ в M1/M2 тип, розвиток нових методологічних підходів до їх ідентифікації призвели до необхідності перегляду загальноприйнятої класифікації. В 2014 р. вийшла робота Murray P.J., et al., в якій запропоновано класифікувати макрофаги з урахуванням джерел їх виділення, активаційних сигналів та загальноприйнятих досліджуваних маркерів активації, що дозволить більш коректно розділяти МФ на окремі підтипи, а також порівнювати отримані в різних лабораторіях дані [12].

Узагальнені та систематизовані дані щодо характеристики основних типів МФ (M1 та M2) з урахуванням результатів сучасних наукових досліджень представлені на Рисунку 1.1.1 [12, 35].

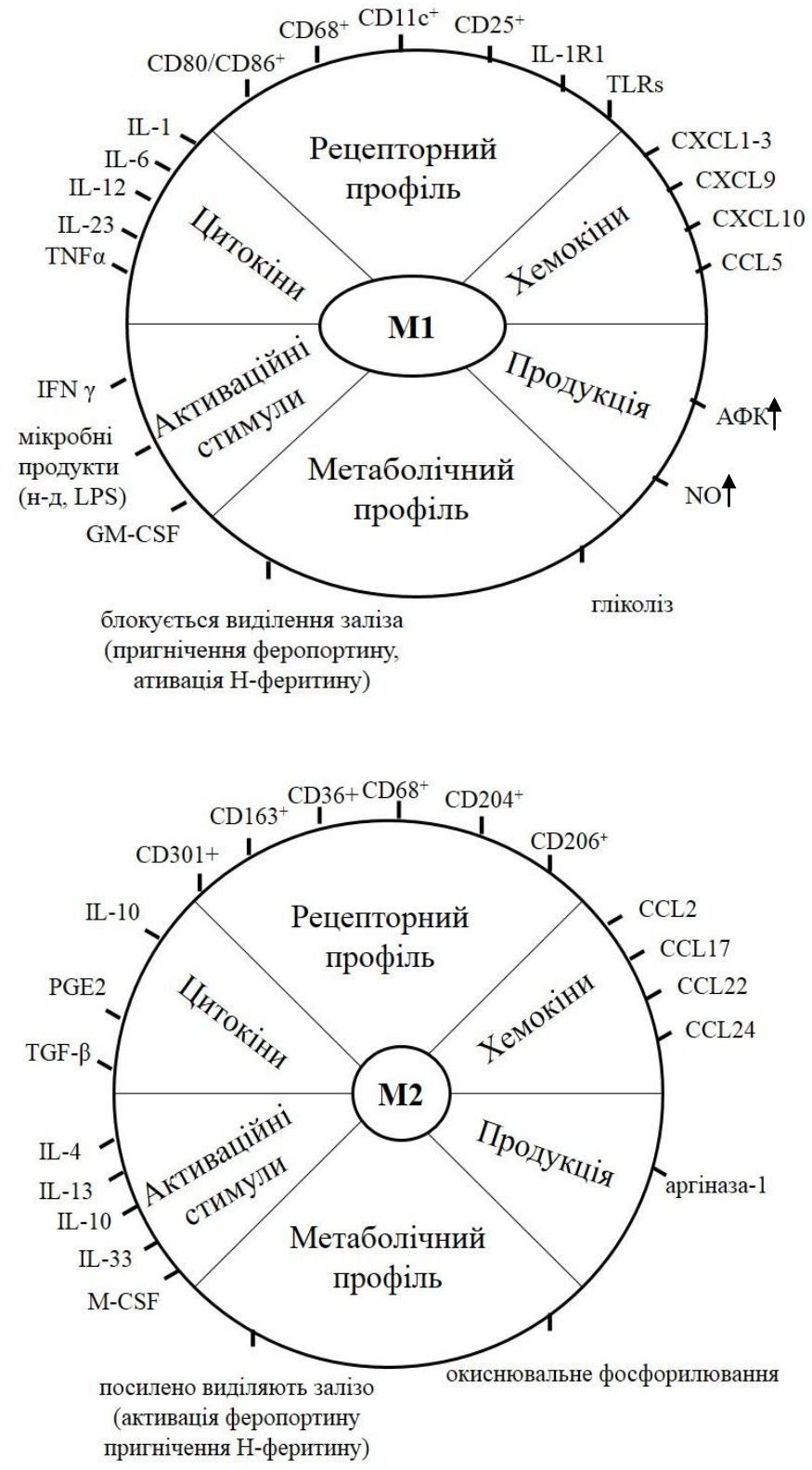


Рис. 1.1.1. Основні характеристики класично активованих (прозапальні) M1 та альтернативно активованих (протизапальні) M2 МФ.

Класичний шлях активації. Поляризація МФ до фенотипу M1 (CD68⁺, CD11c⁺, CD80/CD86⁺, CD25⁺ клітини) обумовлена дією цитокіну Т-хелперів 1 типу (T-helper 1, Th1) інтерферону-γ (Interferon gamma, IFN-γ), мікробних продуктів (ліпополісахарид (Lipopolysaccharide, LPS)) або гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF або CSF2). Ці клітини продукують переважно прозапальні цитокіни (IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 і фактор некрозу пухлин-α (Tumor necrosis factor alpha, TNFα)), призводячи до активації Th1 та природних кілерних клітин (Natural killer, NK). При цьому, активовані лімфоцити, продукуючи IFN-γ, в свою чергу сприяють подальшій поляризації МФ в M1 тип. МФ M1 характеризуються вираженим синтезом хемокінів CXCL1-3, CXCL9, CXCL10 і CCL5, що посилює активацію цитотоксичних Т-клітин та стійкість до внутрішньоклітинних патогенів і пухлин. Рецепторний репертуар МФ M1 включає IL-1R1, TLRs, CD80 і CD86 – корегулятори активації Т-клітин. Ці клітини мають високу здатність представляти антиген, а також продукувати активовані форми кисню (в тому числі супероксидні радикали (CP)) і оксид азоту (NO), підвищена продукція якого обумовлена збільшенням експресії індукцибельної NO-синтази (iNOS, NOS2) [35, 37]. МФ M1 характеризуються певними особливостями метаболізму заліза, фолатів та глюкози. Зокрема, в цих клітинах блокується виділення заліза (цей процес називається секвестрацією) шляхом пригнічення феропортину та активації Н-феритину, що сприяє посиленню бактеріостатичних ефектів [38]. Також, для МФ M1 характерний гліколітичний метаболізм [39]. Завдяки зазначеним характеристикам МФ M1 типу вважають клітинами з виразною мікробоцидною та протипухлинною дією.

Альтернативний шлях активації. Поляризація МФ до фенотипу M2 (CD68⁺, CD163⁺, CD204⁺, CD206⁺ клітини) обумовлена дією цитокінів IL-4, IL-13, IL-10, IL-33 та макрофагального колонієстимулюючого фактору (Macrophage colony-stimulating factor, M-CSF або CSF-1). Клітинами-продуцентами перелічених лімфокінів виступають Т-хелпери 2 типу (Th2), базофіли, клітини вродженого імунітету, що створюють необхідне для альтернативно активованих макрофагів

мікросередовище. M2 клітини зазвичай характеризуються здатністю продукувати у великій кількості протизапальні цитокіни (особливо IL-10) та в незначній кількості прозапальні цитокіни (зокрема, IL-12), а також COX-2, простагландин E2, хемокіни CCL2, CCL17, CCL22 та CCL24. Зазначені хемокіни залучають лімфоцити Th2 типу та регуляторні Т-клітини (regulatory T cells, Treg), які сприяють M2 поляризації. Для M2 клітин характерна висока експресія рецепторів манози (CD206), залишків галактози і N-ацетилглюкозаміну (CD301) та «рецепторів-мусорщиків» (CD36, CD163, stabilin 1). M2 секретують аргіназу-1, а також продукують компоненти позаклітинного матриксу та ферменти для його моделювання, зокрема, фібронектин, тенасцин С, матриксні металопротеїнази [39-42]. МФ M2 мають певні особливості в метаболізмі заліза та глюкози, які відрізняють їх від M1: підвищене виділення заліза через активацію феропортину та пригнічення Н-феритину і гемооксигенази, що призводить до посилення проліферації клітин тканин, які інфільтровані M2 [43]. Метаболізм в M2 клітинах відбувається шляхом превалювання окиснювального фосфорилування, що забезпечує тривале постачання енергії для виконання функцій цими клітинами. Зокрема, МФ M2 створюють протизапальне середовище, забезпечують процеси регенерації і заживлення ран, а за наявності пухлини сприяють її прогресуванню [40, 44]. За умови патологічного процесу, МФ M2 виконують профібротичну роль, секретуючи фактори з імуносупресивною дією, зокрема трансформуючий фактор росту бета (Transforming growth factor beta, TGF- β) і фактор росту тромбоцитів [44, 45].

Макрофаги M2 умовно класифікують на підвиди: M2a, M2b, M2c і M2d, які характеризуються унікальним профілем експресії генів, але однаково високою секрецією IL-10 та низькою секрецією IL-12 [46]. Формування підтипів МФ M2 залежить від активаційного стимулу: внаслідок дії IL-4 (або, у деяких випадках, IL-13) формується M2a підтип; вплив IL-1 або імунних комплексів у комбінації з LPS призводить до поляризації в M2b; дія IL-10 і глюкокортикоїдів активують фенотип M2c; IL-6 та M-CSF призводять до формування M2d, які ще називають пухлино-асоційованими МФ (ПАМ) [47]. МФ M2a характеризуються підвищеною

експресією маркерів CD206, CCL2, CCL17, CCL22, CCL24 і відіграють важливу роль у репарації та відновленні тканини, за рахунок секреції TGF- β , фібронектину, β IG-H3 та суб'єдиниці A фактора VIII. *МФ M2b* характеризуються експресією маркерів CCL1, TNFSF14 та CD86. Ці клітини контролюють силу імунної відповіді завдяки здатності секретувати прозапальні цитокіни (IL-1 β , IL-6, TNF α), а також протизапальний цитокін IL-10. *МФ M2c* ідентифікують за експресією CD163 та пов'язують з протизапальними і апоптотичними функціями, за рахунок секреції високих рівнів цитокінів TGF- β та IL-10. *МФ M2d*, асоційовані з пухлинами, можна диференціювати за наявністю маркерів VEGF та IL-10. Ці клітини характеризуються високою продукцією цитокіну IL-10 та незначною продукцією IL-12 та TGF- β . МФ підтипу *M2d* відомі як основні клітини мікрооточення пухлини, що відповідають за ангіогенез та метастазування [48]. Описана вище класифікація насьогодні не є остаточною і потребує детального обґрунтування.

Внаслідок одночасного впливу імунних комплексів з LPS та/або IL-1, глюкокортикоїдів, TGF- β і IL-10 або лише IL-10 може відбуватися поляризація в M2-подібні МФ. Останні характеризуються експресією CD163⁺, CD206⁺, а також здатністю продукувати у великій кількості IL-10, PTX3 (pentraxin 3), хемокіни CCL1, CCL16, CCL18, простагландин E2 та у незначній кількості IL-12, TNF, IL-6, IL-1 β і хемокін CCL3. Відмітимо, що перехідні стани активованих МФ (як-то M2-подібні або ж МФ з фенотипом M1 клітин за одночасної експресії генів M2 типу) виявляють в нормі на різних етапах розвитку організму (наприклад, в плаценті та ембріоні), а також при патологічних станах (ожиріння, вірусні та бактеріальні інфекції, гельмінтні інвазії, ревматоїдний артрит, онкологічні захворювання) [49]. В дослідженні [50] відмічено формування химерних M2-подібних МФ, які на стимуляцію TLR2-лігандами (але не TLR4-лігандами) відповідали секрецією прозапальних цитокінів та зниженням протизапальної активності без суттєвої зміни свого (характерного для M2 клітин) профіля поверхневих маркерів. В цьому дослідженні МФ M2 отримували шляхом впливу M-CSF на моноцити периферичної крові хворих з ревматоїдним артритом протягом 8-ми діб. В якості

лігандів для TLR2 та TLR4 використовували Pam3CysSerLys4 (Pam3) або LPS чи IFN- γ /LPS, відповідно. Профілем поверхневих маркерів для M1/M2 слугували: CD14⁺, CD163⁺, CD206⁺, CD86⁺, CD80⁺.

1.2 Поляризація макрофагів в пухлинному осередку та їх роль в пухлинному процесі

Пухлинне мікросередовище сприяє поляризації ПАМ в M2 тип, а за даними [47, 51] – в МФ підтипу M2d. Одним з механізмів перепрограмування є вплив факторів пухлинних клітин на білки сімейства NF- κ B. Зокрема, в роботі [52] показано, що пухлинні клітини можуть викликати в МФ порушення синтезу білка p65 і стимулювати накопичення інгібіторного комплексу p50/p50, який сприяє перепрограмуванню M1 клітин в M2. В процесі розвитку пухлини в осередок її росту залучаються нові МФ, які перепрограмовуються в M2 клітини. ПАМ M2 сприяють прогресії пухлини та її метастазуванню через пряму імуносупресивну дію та/або через залучення інших типів імуносупресивних клітин (зокрема, Treg, мієлоїдні супресивні клітини, тощо) [53], а також шляхом моделювання позаклітинного матриксу пухлини (за допомогою секреції факторів як при репарації тканин) або шляхом активації в пухлинних клітинах генів-супресорів (їх продуктів) за допомогою мікро-РНК (microRNA, miRNA) через виділення miRNAs-вмісних екзосом. Так, у роботі [54] показано, що отримані з тканини колоректального раку МФ M2 виділяли екзосоми, які містили miR-21-5p і miR-155-5p. В результаті додавання таких екзосом до пухлинних клітин спостерігали зниження експресії BRG1, який автори роботи визначають як ключовий фактор контролю гальмування метастазування клітин колоректального раку, оскільки його знижений рівень фіксували у метастатичних клітинах.

В дослідженні [55] на моделях *in vivo* (трансгенні миші MK2 KO) та *in vitro* (клітинні лінії людини: моноцити – U-937 та ендотеліоцити – HUVEC) продемонстровано, що серед ПАМ саме M2 поляризовані клітини сприяють пухлинній прогресії. Так, у мишей MK2 KO, які характеризуються тканиноспецифічною експресією p38/MAPKAP-кінази 2 (MK2), з хімічно

індукованою пухлиною прямої кишки спостерігали швидке прогресування пухлини та активніший пухлинний неоангіогенез у порівнянні з тваринами, функція МК2 яких була заблокована. Тобто, пригнічення p38/MAPKAP-кінази 2 (МК2) в макрофагах М2 призводить до їх поляризації в М1, а також до порушення М2-індукованого ангіогенезу.

На сьогодні переконливо показано, що наявність ПАМ типу М2 (але не М1) є поганою прогностичною ознакою у хворих з солідними злоякісними пухлинами. При цьому для визначення кількості ПАМ використовують різні маркери: загальний макрофагальний – CD68; М1-маркери – CD11c, CD86; М2-маркери – CD163, CD204, CD206 [56-58]. Зокрема, у роботі [59] при вивченні пухлинної тканини 62 хворих з нирково-клітинною карциномою було показано, що наявність CD163⁺ ПАМ асоціюється з поганим клінічним прогнозом (при однофакторному аналізі). Також встановлено, що пряме кокультивування *in vitro* отриманих МФ з пухлинними клітинами (лінії Сакі-1, АСНН, 786-0 та МАМІУА) призводило до стійкої активації STAT3 в останніх через зв'язування мембранного макрофагального колонієстимулюючого фактора (mM-CSF) на пухлинних клітинах з М-CSFR на ПАМ.

Інша група дослідників за допомогою імуногістохімічного аналізу оцінила у 80 хворих рівень інфільтрації тканини гепатоцелюлярної карциноми CD68⁺ ПАМ, серед яких визначали CD11c⁺прозапальні (М1) і CD206⁺ імуносупресивні (М2) МФ, а також показник щільності наявних ПАМ [60]. Було виявлено відсутність кореляції між наявністю в пухлині CD68⁺ МФ та показником загальної виживаності, а також відсутність залежностей між показниками щільності CD68, CD11c і CD206 ПАМ в пухлинній тканині та виживаності. Разом з тим, виявлено кореляційні зв'язки між наявністю CD11c⁺ (позитивна кореляція) або CD206⁺ (негативна кореляція) МФ та показником загальної виживаності. За допомогою багатфакторного регресійного аналізу методом Кокса було визначено, що наявність CD11c⁺ та CD206⁺ ПАМs є незалежними прогностичними факторами ($p < 0,001$, $p = 0,031$, відповідно). Виявлено, що наявність CD68⁺ клітин, а також низька експресія CD11c асоційовані лише зі стадією захворювання. На відміну від

цього, висока експресія CD206 асоційована з віком хворих, розміром пухлини, васкуляризацією, метастатичним статусом, стадією захворювання.

В роботі [61] досліджували фенотип (за CD68, CD86 і CD206) та щільність ПАМ в тканині гепатоцелюлярної карциноми 253 хворих. Виявлено, що наявність CD68⁺ ПАМ не пов'язана з клініко-патологічними характеристиками і прогнозом. Низький рівень інфільтрації пухлини CD86⁺ МФ і високий рівень інфільтрації CD206⁺ клітинами асоційовані з високим рівнем агресивності пухлинного процесу, зокрема з наявністю множинних пухлин та III-IV стадією прогресії, а також були пов'язані з низьким рівнем показника загальної виживаності ($p = 0,027$ і $p = 0,024$, відповідно). Автори зазначили, що результат одночасного аналізу кількості CD86⁺ і CD206⁺ клітин був більш значущим для оцінки загальної виживаності ($p = 0,011$) хворих з гепатоцелюлярною карциномою, ніж оцінка кожного з показників окремо. Крім того, показник співвідношення CD86⁺/CD206⁺ ПАМ мав прогностичне значення для загальної виживаності ($p = 0,002$) у α -фетопротейн негативних хворих. Дослідники припускають, що комбіноване визначення CD86 і CD206 ПАМ може стати перспективним прогностичним біомаркером при гепатоцелюлярній карциномі.

Результати аналізу вмісту МФ M1/M2 у пухлинах 80 хворих з недрібноклітинним раком легені (НДРЛ) стадій I-III були представлені в роботі [62]. МФ виявляли за допомогою імуногістохімічного подвійного забарвлення з використанням наступних маркерів: CD68/iNOS для M1, CD68/CD163 для M2. Окрім оцінки кількості та поляризації МФ враховували їх розташування: в пухлинних острівцях чи в пухлинній стромі. Автори відмітили, що інфільтрація МФ спостерігалася переважно в стромі пухлини. В пухлинних острівцях серед інфільтруючих МФ переважали M2. Було виявлено, що наявність МФ M1 в пухлинних острівцях, а також одночасна наявність МФ M2 в пухлинних острівцях та стромі є незалежними предикторами виживаності хворих з НДРЛ. Висока інфільтрація пухлинних острівців МФ M1 пов'язана із збільшенням показника загальної виживаності ($p < 0,05$); висока інфільтрація пухлинних острівці і стромі МФ M2 – із його зниженням ($p < 0,05$) [63].

В роботі [63] вперше визначено, що ангіопоедин-подібний білок 2 (Angptl2) сприяє M2 поляризації ПАМ, що в свою чергу призводить до прогресії пухлинного процесу. На клінічному матеріалі хворих з НДРЛ (стадій I-IV) було показано, що експресія Angptl2 на пухлинних клітинах аберрантно збільшена та позитивно корелює з кількістю ПАМ ($r = 0,5848$; $p < 0,01$), розміром пухлини ($p = 0,022$), стадією захворювання ($p = 0,037$) та зниженням показника 5-річної виживаності хворих. В експериментах *in vitro* (кокультивування МФ з пухлинними клітинами лінії людини недрібноклітинної карциноми легень; стимуляція МФ рекомбінантним Angptl2) та *in vivo* (nude BALB/c миші з пухлинами H1299 з гіперекспресією Angptl2) було визначено, що Angptl2 стимулює поляризацію ПАМ в M2 через активацію p65-NF- κ B шляху, а стимульовані Angptl2 ПАМ посилюють проліферацію, інвазію та міграцію клітин недрібноклітинної карциноми легень. Автори припускають, що білок Angptl2 може бути ефективною мішенню для перепрограмування ПАМ, використання якої дозволить підвищити ефективність лікування хворих з не дрібноклітинною карциномою легень.

Таким чином, існує достатня кількість переконливої інформації щодо важливості визначення фенотипу ПАМ для прогнозу перебігу захворювання, а також вибору подальшої терапевтичної тактики. Зокрема, виглядає доцільним вплив на пухлинне мікрооточення, зокрема, перепрограмування ПАМ та зміни їх властивостей з пропухлинних на протипухлинні. Разом з тим, необхідно враховувати відомості щодо так званих «перехідних форм» МФ. Питання щодо коректної ідентифікації МФ M1 та M2 типів у дослідженнях *in vivo* та *in vitro* розглядається в роботі [12]. Це важливо, оскільки активація і поляризація цих клітин пов'язана з суттєвими зсувами в експресії генів в залежності від активаційних стимулів, жоден з яких остаточно не визначає формування конкретної субпопуляції або активаційного стану МФ. Тобто, диференціювати МФ на M1/M2 лише за CD-маркерами, аналогічно оцінці субпопуляційного складу лімфоцитів, є недостатнім. Автори роботи зазначають необхідність враховувати при ідентифікації типів M1/M2 джерела отримання МФ, активаційні

сигнали, а також показники їх активності (аргіназна активність, продукція NO і АФК, експресія генів про- або протизапальних цитокінів, тощо). Досить інформативним у диференціальному визначенні M1/M2 поляризації МФ є оцінка рівня NO та аргіназної активності, оскільки відомо, що в МФ M1 та M2 відмінний метаболізм аргініну [64]. Зокрема, експресований в МФ M1 фермент iNOS метаболізує аргінін до NO та цитруліну. NO окислюється до реактивних форм азоту, тоді як цитрулін задіяний в синтезі NO через цикл цитрулін-NO. Аргіназа (Arginase, Arg), яка експресується в МФ M2, гідролізує аргінін до орнітину та сечовини. Шлях Arg обмежує доступність аргініну для синтезу NO, а сам орнітин може додатково включатись у шляхи синтезу поліамінів та проліну, які є важливими для клітинної проліферації та відновлення тканин. Обидва метаболічні шляхи аргініну перехресно інгібують один одного на рівні відповідних продуктів розпаду аргініну. Тому визначення рівня NO та аргіназної активності зумовлює коректність визначення поляризаційного статусу M1 або M2.

1.3 Молекулярні механізми, задіяні в поляризації макрофагів

Згідно проаналізованої літератури в молекулярних механізмах поляризації M1/M2 задіяні рецептори модуляторів запалення TLRs та їх ліганди, сигнальні молекули (фактори інтерферонів (Interferon regulatory factors, IRF), трансдуктори сигналу і активатори транскрипції (signal transducers and transcriptional activators, STAT), фактори транскрипції (NF- κ B, KLF), фактори гіпоксії (гіпоксія індуковані фактори, HIF1 α , HIF2 α), miRNA, тощо. Центральним в направленості поляризації МФ є сигнальний шлях передачі сигналу STAT/IRF. При цьому важливими для активації STAT/IRF шляху є первинні стимулюючі сигнали від TLRs, відповідних цитокінових рецепторів (IFN- α / β R, IFN- γ R, IL-10R, IL-4R α , IL-13R α 1), або рецепторів колонієстимулюючих факторів (CSF2R α) [47, 65].

Класичний шлях активації МФ M1 опосередкований впливом IFN- γ та/або LPS, а також GM-CSF на поверхневі рецептори IFN- γ R та/або TLR4, а також рецептор CSF2R α відповідно, через JAK-STAT сигнальний шлях. В результаті дії IFN- γ або/та LPS на відповідні рецептори МФ спостерігається підвищення

рівня експресії транскрипційного фактору (ТФ) STAT1 і активація транскрипції STAT1-залежних генів. Внаслідок зв'язування LPS із TLR4 відбувається активація TLR4-асоційованих адаптерних білків MyD88 і TRAK, що сприяє формуванню гетеродимеру NF- κ B-p65/p50. Відбувається активація транскрипції NF- κ B-p65/p50-залежних генів (зокрема ряду факторів гострої фази запалення (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12p40, COX2)) і регуляторних факторів інтерферонів (IRF): активація IRF3 і IRF5 запускає сигнальні каскади M1 поляризації (через TLR4) [66]. Сигнал від рецептору CSF2R α (при дії GM-CSF) призводить до поляризації макрофагів в M1 через активацію ТФ STAT5 [67-69].

Альтернативний шлях активації МФ опосередкований впливом цитокінів IL-4/IL-13 або IL-10 на поверхневі рецептори IL-4R α /IL-13R α 1 або IL-10R, відповідно. Внаслідок активації відповідних сигнальних шляхів відбувається експресія ТФ STAT6 та/або IRF4 (через IL-4R α) та STAT3/NF- κ B-p50/p50 (через IL-10R), їх транслокація у ядро, що й обумовлює напрямок поляризації МФ до клітин з властивостями M2 [12, 13, 70].

Тобто, для поляризованих МФ M1 характерна активація сигнального шляху STAT1, STAT5, IRF3 та/або IRF5. Для поляризованих МФ M2 – STAT3, STAT6 та/або IRF4. Зазначимо, що результатом взаємодії LPS та TLR4 є виражена секреція МФ ряду прозапальних цитокінів (IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF і IFN- β), хемокінів (CCL2, CXCL10, CXCL11), а також експресія молекул МНС; при стимуляції GM-CSF спостерігається нижчий рівень секреції прозапальних цитокінів [65].

Поляризація МФ супроводжується не лише змінами на рівні транскрипції генів, а й перебудовою метаболічних шляхів і зміною профілю секретованих МФ факторів. Маркером M1/M2 поляризації МФ за їх метаболічною активністю можуть бути особливості катаболізму L-аргініну. Зокрема, в результаті катаболізму L-аргініну в M1 макрофагах спостерігається утворення NO та цитруліну із залученням ферменту NOS2 [71]. Натомість в M2 макрофагах продуктами катаболізму L-аргініну є орнітин та сечовина за рахунок активації

Arg. Таким чином, показник співвідношення продукція NO / активність Arg (NO/Arg) свідчить про напрямок M1/M2 поляризації МФ [52, 72].

В поляризації МФ приймають участь і miRNAs, які представляють собою короткі некодуючі РНК довжиною приблизно 21–23 нуклеотиди та можуть регулювати експресію генів на посттранскрипційному рівні [73-75]. miRNAs відіграють ключову роль в різноманітних біологічних процесах, таких як ембріогенез, диференціювання, запалення, вірусні інфекції та канцерогенез. На сьогодні доведена важливість miRNAs для розвитку імунної системи та для формування імунної відповіді. Показано, що miRNAs беруть участь в регуляції імунітету, включаючи розвиток і диференціювання клітин імунної системи, продукцію антитіл і вивільнення медіатора запалення [65]. Щодо ролі miRNAs в поляризації МФ, то показано, що для M1 типу характерна підвищена експресія miRNA-125a, miRNA-125b, miRNA-127, miRNA-155, miRNA-378, а для M2 – miRNAlet-7c, miRNA-9, miRNA-21, miRNA-146, miRNA147, miRNA-187, miRNA-195 [12, 41, 66, 76-78]. В диференційному аналізі експресії miRNAs в МФ M1 та M2 серед 109 досліджених miRNAs було відібрано лише 8, для яких спостерігали більш, ніж 2-разове підвищення або зниження експресії. Так, у МФ M1, порівняно з M2, спостерігали більш, ніж 2-разове підвищення експресії miR-181a, miR-155-5p, miR-204-5p, miR-451 ($p < 0,05$) та зниження експресії miR-125-5p, miR-146a-3p, miR-143-3p і miR-145-5p (fold change < -2 , $p < 0,05$) (за даними qRT-ПІП). Ці дані свідчать про необхідність дослідження цілої низки miRNAs для розуміння їх ролі у поляризації МФ [79-81]. Далі буде наведена інформація щодо ролі лише деяких зі згаданих вище miRNAs, що задіяні в поляризації МФ, та мішеней їх дії.

Дія miR-125b полягає в інгібуванні IRF4, який є негативним регулятором активації прозапальних МФ. miRNA-125b асоціюється з покращеною презентацією антигену, підвищеною активацією Т-клітин і руйнуванням пухлини [82]. В роботі [83] показано, що надекспресія miR-125a в МФ призводить до підвищення секреції цими клітинами прозапальних цитокінів та продукції NO, що свідчить про M1 поляризацію, та регулювання експресії miR-125a/miR-99b, опосередковане сигнальним шляхом Notch. Іншою групою дослідників [84, 85]

продемонстровано, що передача сигналів через внутрішньоклітинний домен Notch1-NIC не тільки спрямовує поляризацію ПАМ в М1 клітини, але й за допомогою miR-125a протидіє їх пропукхлинній функції. Трансфекція МФ мишей miR-125a-міметиками призводила *in vitro* до збільшення їх фагоцитарної активності стосовно клітин лінії L1210 (лімфоцитарна В-клітинна лейкемія миші), а при одночасному підшкірному перещепленні таких трансфікованих МФ з клітинами карциноми легені Льюїс (КЛЛ) пригнічувала ріст останньої шляхом ремоделювання імунного мікросередовища. При цьому в пухлині та селезінці тварин з КЛЛ спостерігали зниження кількості $CD11b^{+}Ly6G^{+}$ МФ з одночасним підвищенням в пухлинній тканині та периферичних лімфатичних вузлах $CD3^{+}CD8^{+}$ -лімфоцитів. Автори роблять висновок, що miRNA-125a може бути мішенню для перепрограмування в пухлинних МФ М2 в М1 та відновлення їх протипухлинної дії.

Для формування функціонального фенотипу МФ М1, а також суттєвого збільшення продукції цими клітинами прозапальних цитокінів, необхідна посилена експресія miR-127, яка індукується при активації TLRs. Відсутність miR-127 зміщувала поляризацію в напрямку фенотипу М2 [85]. Ще однією з ключових молекул в М1/М2 поляризації МФ є miRNA-155, мішенню для якої слугує транскрипційний фактор C/EBP β (характерний для МФ М2). Показано, що надекспресія miR-155 призводить до формування М1, а її зниження – до М2 фенотипу [86]. Мішенню для miR-155 також може бути IL-13R α 1, пригнічення якого блокує індукований IL-13 фенотип М2 [87].

Для поляризації МФ М2 (на відміну від М1) важливі інші типи miRNAs. Зокрема показано [88], що miRNA let-7c експресується на більш високому рівні в М2, ніж у М1; причому стимуляція М2 клітин за допомогою LPS зменшувала експресію цієї miRNA. Гіперекспресія miRNA let-7c призводила до зниження вираженості фенотипу М1 з одночасною поляризацією в МФ М2, і навпаки. Було виявлено, що мішенню для let-7c слугує важливий у формуванні запальних реакцій ТФ C/EBP-d. Крім того, показано, що let-7c регулює бактерицидну і фагоцитарну активність МФ. miRNA-146a модулює поляризацію МФ через

сигнальний шлях Notch 1 або рецептор активуючий проліферацію пероксидом PPAR γ . Її гіперекспресія спостерігається в МФ М2 та призводить до підвищення експресії М2-маркерних генів (Arg1, CD206). В МФ М1 надмірна експресія miRNA-146a пов'язана зі зниженням продукції прозапальних цитокінів і iNOS [76]. В направленості поляризації МФ також показана роль miRNA-195. Зокрема, у МФ М2с типу (отриманих з моноцитів периферичної крові людини після стимуляції IL-10) спостерігали підвищений рівень цієї miRNA порівняно з МФ М1 (отриманими з моноцитів периферичної крові людини після стимуляції LPS). У МФ лінії THP-1, стимульованих *in vitro* LPS і IFN- γ , за надмірної експресії miRNA195 відмічали зниження рівнів TLR2, фосфорильованих форм кіназ p54 JNK, p46 JNK і p38 MAPK та рівнів IL-1 β , IL-6 і TNF α в супернатантах. Тобто, висока експресія miRNA195 асоційована із пригніченням прозапальної поляризації МФ М1 [89].

В роботі [90] показано, що поляризація МФ може контролюватися також регуляторною віссю PPAR γ /miRNA223. Встановлено, що при альтернативній активації МФ мішенями miRNA223 є білки Rasa1 і Nfat5 [89], а при активації класичним шляхом – прозапальний регулятор Pknox1, який, як зазначалось вище, опосередковував активацію прозапальних МФ М1 [55].

Крім факторів транскрипції IRF/STAT та miRNA на напрямок поляризації МФ може впливати, як вже згадувалось вище, гіпоксія (через HIF) [91, 92]. Так, цитокіни Th1 здатні індукувати HIF1 α , викликаючи активацію МФ М1, в той час як цитокіни Th2 активують HIF2 α , що сприяє активації МФ М2. Слід відмітити, що HIF1 і HIF2 здатні регулювати (активувати або пригнічувати) синтез NO, що в свою чергу, також визначає функціональну активність МФ [93].

Незалежно від первинної поляризації і ступеня диференціювання, МФ можуть змінювати свій фенотипово-функціональний стан у відповідь на сигнали мікрооточення. Важливість впливу мікрооточення для формування фенотипів МФ наведена в численних оглядових роботах [40, 54, 94]. Здатність МФ змінювати свій фенотипові/функціональний стан отримала назву *пластичність*, а сам процес – перепрограмування. Пластичність забезпечує виконання МФ своїх функцій як

при фізіологічних, так і при патологічних процесах. Слід відмітити, що МФ – це високопластичні клітини, які можна перепрограмувати за допомогою різних стимулів [50, 95]. Наприклад, було показано, що виділені від мишей з модельною пухлиною шлунку MFC перитонеальні МФ, які були ідентифіковані як M2, при стимуляції *in vitro* IL-12 і IFN- γ набувають властивості МФ M1 типу. Це призвело до появи протипухлинної активності у стимульованих МФ на відміну від клітин, які не зазнавали такої дії та були виділені від інтактних тварин чи тварин з пухлиною [52].

Таким чином, аналіз сучасних даних щодо молекулярних механізмів поляризації макрофагів вказує на існування не лише M1 та M2 типів МФ, але й M1- або M2-подібних химерних форм клітин, що підтверджує різноманітність (гетерогенність) макрофагальної субпопуляції, а також визначає необхідність багатогранного підходу (оцінка активаційних стимулів, експресії CD-маркерів, продукції цитокінів, хемокінів, NO, аргіназної активності, експресії тих чи інших генів) при ідентифікації макрофагів. Це особливо важливо при використанні ПАМ в якості прогностичних чинників перебігу пухлинного процесу, а також для підбору стратегічних підходів до перепрограмування в прозапальний тип власне макрофагів або їх мікрооточення, яке сприятиме формуванню M1 типу. Такий підхід в імунотерапії стане додатковим інструментом для підвищення ефективності лікування хворих зі злоякісними пухлинами.

1.4 Сучасні підходи до перепрограмування пухлино-асоційованих макрофагів

Як вже зазначалось вище, МФ широко представлені у більшості тканин та органів організму, відіграють важливу роль у вродженій імунній відповіді проти інфекційних агентів, процесах репарації і диференціюванні тканин, підтриманні гомеостазу. Функціонування МФ регулюється в більшій мірі за рахунок позаклітинних сигналів, тож не дивно, що стан мікрооточення тісно пов'язаний з поляризацією цих клітин. Така відома властивість МФ, як пластичність, забезпечує їх швидке реагування на зовнішні стимули та надає здатність поляризуватись у відповідь на певні сигнали (цитокіни, продукти обміну,

мікробні сигнали і т.і.) в M1 або M2 тип зі зміною функціональних та фенотипових характеристик. Зокрема, при виникненні злоякісного новоутворення ПАМ можуть виконувати протилежні функції, залежно від сигналів пухлинного мікрооточення: МФ M1 мають протипухлинні властивості, M2 – навпаки, сприяють прогресуванню пухлинного росту. Саме здатність ПАМ з пропухлинними функціями перепрограмуватись (з M2 в M1) робить їх цікавими мішенями для протипухлинної терапії [57, 96].

Досліджені різні чинники та механізми перепрограмування ПАМ: за допомогою агоністів TLRs, моноклональних антитіл (МкАт), цитокінів, miRNA. Зокрема, ліганд TLR7 (іміквімод) індукує ядерну транслокацію NF-κB в макрофагах J774A, що призводить до синтезу прозапальних білків: TNFα, IL-6, IL-12 та CCL2. Високу імуностимулюючу активність виявляли синтетичні неметильовані цитозингуанінові олігодезоксинуклеотиди (CpG-ODN), зв'язування яких відбувається за допомогою TLR9. CpG-ODN часто знаходять в геномах вірусів і бактерій. Показано, що результатом дії цих молекул є підсилення продукції МФ прозапальних цитокінів (TNFα, IL-6 та IL-12) завдяки активації транскрипційного фактору NF-κB. Комбінація CpG-ODN з іншими терапевтичними агентами, такими як МкАт проти CD40, мала багатообіцяючі результати щодо реполяризації ПАМ у доклінічних моделях експериментальної злоякісної гліоми [97]. Можливість локальної активації клітин вродженого імунітету та запобігання поляризації ПАМ до фенотипу M2 за допомогою використання синтетичних олігонуклеотидів CpG-ODN показана і в експериментальних дослідженнях на моделі меланоми B16 [98].

Окрім агоністів TLRs, для перепрограмування ПАМ можливе використання ряду хімічних сполук. Зокрема, виявлено, що флавоноїдоподібне з'єднання вадімезан (DMXAA), який був предметом чисельних доклінічних досліджень і клінічних випробувань, реполяризує МФ в фенотип M1 [99].

В експериментальних дослідженнях щодо механізмів активації МФ показано, що фермент фосфоінозитид-3-кіназа γ (PI3Kγ), яка в нормі контролює такі процеси як апоптоз, метаболізм, ріст і проліферацію клітин, також приймає

участь в активації імунної відповіді. Наслідком селективної делеції гена *PI3K γ* є активація NF- κ B із одночасним пригніченням ССААТ/енхансер-зв'язуючого білку С/EBP β в МФ. У поєднанні з анти-PD-L1 зниження рівню експресії *PI3K γ* сприяло регресії пухлини і збільшенню виживаності мишей з карциномами голови та ший, легенів, молочної залози [100]. Подібний результат було отримано при дослідженні ролі серин/треонінової протеїнкінази 1 (RIP1) в процесах активації ПАМ при аденокарциномі підшлункової залози [101].

Іншим шляхом перепрограмування ПАМ є використання МкАт проти CD40. В експериментальних та клінічних дослідженнях продемонстроване підвищення протипухлинної активності МФ при використанні таких МкАт. Зв'язування МкАт CD40 із відповідними рецепторами на плазматичній мембрані МФ призводило до посилення їх протипухлинної активності за рахунок збільшення секреції NO і TNF α . Експериментально доведено, що антитіла проти CD40 активують ПАМ і блокують пухлинний ріст на моделях карциноми підшлункової залози, гліоми і меланоми [102].

Проведено ряд досліджень щодо ролі miRNA в репрограмуванні ПАМ. miRNA-33 безпосередньо контролює поляризацію МФ шляхом впливу на енергетичний сенсор і ключовий інтегратор гомеостазу клітинної енергії – AMP-активовану протеїнкіназу, зменшуючи окислення жирних кислот і поляризуючи МФ в стан M1. *In vivo* використання анти-miRNA-33 на мишах з нокаутом рецепторів ліпопротеїдів низької щільності, що утримувались на високожировій дієті, призводило до накопичення FOXP3⁺ Treg-лімфоцитів та МФ M2. Надекспресія miRNA-125a-5p сприяла експресії маркерів M2, діючи на транскрипційний фактор KLF13, який бере участь в активації Т-лімфоцитів. Підвищена експресія miR-26a на моделі гепатоцелюлярної карциноми мишей пригнічувала ріст пухлини, що негативно корелює з експресією M-CSF та інфільтрацією МФ у тканини пухлини пацієнтів з гепатоцелюлярною карциномою M1 [99].

Показаний вплив гормонів тимусу на напрямок поляризації МФ. Було доведено, що тимозин альфа 1 (Ta1) активує імунну систему шляхом стимуляції

диференціювання Т-клітин, активації NK-клітин, дендритних клітин і МФ. Існують дослідження, в яких показано, що $T\alpha 1$ здатен активувати ПАМ М2 і перепрограмувати їх на прозапальні МФ М1, які продукують значну кількість IL-1, TNF α , АФК і NO. Як наслідок, спостерігали пригнічення росту пухлини та збільшення терміну виживаності у мишей з лімфомою Альтаса Далтона [103].

Значно меншою мірою досліджений вплив на поляризацію МФ продуктів бактеріального походження. Зокрема, в дослідженні *in vitro* продемонстрована здатність β -глюкану перепрограмувати імуносупресивні ПАМ в клітини з фенотипом М1, що володіють значною імуномодулюючою активністю. Цей процес супроводжувався зміною метаболізму МФ з посиленням гліколізу, циклу Кребса і утилізації глутаміну. Показано, що реполяризація ПАМ М2 в М1 під дією β -глюкана опосередкований залежним від лектинового рецептору С-типу (CLRs) dectin-1 канонічним шляхом Syk-Card9-Erk. В подальших дослідженнях *in vivo* на моделі КЛЛ продемонстровано, що пероральне введення мишам β -глюкану супроводжувалось активацією Т-клітинної відповіді, збільшенням серед ПАМ клітин з фенотипом М1 та, відповідно, значним гальмуванням росту пухлин [104].

Таким чином, пластичність МФ як здатність змінювати свої властивості під впливом зовнішніх стимулів робить ці клітини перспективною мішенню для спроб перепрограмування ПАМ в напрямку прозапального протипухлинного фенотипу, що визначає одну із стратегій сучасної імунотерапії.

1.5. Лектини як потенційні агенти зміни функціонального стану макрофагів

Речовини рослинного походження білкової природи, які здатні специфічно зв'язуватися з поверхневими рецепторами та аглютинувати клітини крові, раніше були відомі як «фітогемаглютиніни». З часом були описані гемаглютиніни, отримані з мікроорганізмів, водоростей, тканин тварин. В 1954 р. W.C. Boyd та E. Shapleigh запропонували новий термін – «лектин» (лат. *legere* – вибираю), який відображає основну властивість таких білків, яка не залежить від джерела їх отримання, специфічно зв'язувати певні вуглеводні компоненти, антигени на

поверхневій мембрані клітин [105]. Лектинами вважають глікопротеїни, що володіють здатністю до високоспецифічного зв'язування залишків вуглеводів, вуглеводних компонентів глікокон'югатів різної природи, але не володіють специфічною глікоферментативною активністю та мають неімунне походження. Вуглеводвмісний білок, незалежно від його походження, можна віднести до лектинів, якщо він відповідає таким критеріям: 1) зв'язує вуглеводи; 2) не є імуноглобуліном [106]. Лектини були знайдені у складі вірусів, бактерій, тканинах рослин, тварин та людини [107-109].

На сьогодні не існує єдиного підходу щодо класифікації лектинів, тому при характеристиці нових лектиноподібних речовин необхідно найбільш чітко та повно охарактеризовувати їх вуглеводну специфічність. Відома загальнодоступна база «Lectin Frontier DataBase (LfDB)» містить фундаментальну інформацію про детальні олігосахаридні особливості різних лектинів. Ця база постійно поповнюється, оновлюються дані про лектин-стандартні олігосахаридні взаємодії з точки зору констант дисоціації, для визначення яких використовується система фронтальної афінної хроматографії. За допомогою останньої сформовані кількісні характеристики таких взаємодій між іммобілізованими лектинами і 100 флуоресцентно міченими стандартними гліканами. Вважається, що система LfDB відіграє визначальну роль в дослідженнях лектинів [110].

1.5.1 Біологічні функції лектинів

Лектини – гетерогенна група специфічних білків, які виконують різноманітні біологічні функції, обумовлені їх здатністю до високоспецифічного розпізнавання певних вуглеводних структур.

Функції лектинів рослинного походження здебільшого полягають в участі у транспортуванні цукру або зберіганні вуглеводів, активації ферментативних процесів, міжклітинному розпізнаванні, взаємодії рослин із мікроорганізмами, формуванні відповіді на різні біотичні й абіотичні стресори. Лектини відіграють значну роль в процесах, пов'язаних із диференціацією, ростом і розвитком рослинного організму, інтеграцією його функцій [106].

Лектини тварин приймають участь в регуляції як внутрішньоклітинних процесів, так і в модуляції клітинних і клітинно-субстратних взаємодій. Показана роль цих білків в процесах передачі сигналу в клітині, поділу та диференціації клітин, міжклітинної адгезії, індукції апоптозу та ангіогенезу. Лектини регулюють орієнтацію глікопротеїнів на лізосоми клітин, кліренс сульфатного глікопротеїну, мієлінацію та регенерацію нейронів, взаємодію між сперматозоїдами та яйцеклітиною. Задіяні в формуванні імунної відповіді за рахунок участі в активації комплементу та фагоцитозу, контролю міграції лімфоцитів та впливу на їх мітогенну активність [111, 112].

Лектини мікроорганізмів (вірусів, грибів, водоростей, бактерій) грають важливу роль в розвитку та морфогенезі, адгезії та симбіозі, механізмах їх захисту [113, 114].

1.5.2 Лектини як речовини з протипухлинною дією

Високоспецифічна спорідненість до певних вуглеводів на поверхні клітин обумовлює широкий спектр біологічних властивостей лектинів, зокрема, участь в процесах міжклітинної взаємодії, ембріогенезу, розпізнавання патогенів. Експериментальними дослідженнями доведено, що лектини мають противірусні, антибактеріальні, фунгіцидні, імуномодуючі та протипухлинні властивості [115-119].

Протипухлинна активність лектинів може бути реалізована шляхом прямої (безпосередньо щодо пухлинних клітин) або опосередкованої (через модулювання імунних протипухлинних реакцій) цитотоксичної дії. Пряма цитотоксична дія обумовлена зв'язуванням лектину з цукровмісним рецептором на клітинній поверхні та індукцією каскаду внутрішньоклітинних процесів, наслідком яких є апоптоз, аутофагія, блокування клітинного циклу та інгібування проліферації пухлинних клітин. Широко визнано, що рослинні лектини впливають як на апоптоз, так і на аутофагію, модулюючи репрезентативні сигнальні шляхи, до яких залучені різні фактори: білки сімейства Bcl-2, сімейства каспаз, p53,

PI3K/Akt, ERK, BNIP3, Ras-Raf та ATG [120-122]. Ґрунтовно дослідженими і описаними в науковій літературі є механізми прямої цитотоксичної дії лектинів рослинного походження, зокрема, Конканаваліну А (ConA) (*Canavalia ensiformis*), рицину (*Ricinus communis*), лектину омели білої (*Viscum album L.*). Показано існування 2 можливих механізмів індукції апоптозу в пухлинних клітинах. Обидва механізми пов'язані з активацією каспаз – протеолітичних ферментів, що відносяться до цистеїнових протеаз та відіграють важливу роль в індукції процесів апоптозу та некрозу. Внутрішній (або мітохондріальний) шлях індукції апоптозу опосередкований зміною трансмембранного потенціалу мітохондріальної мембрани, що сприяє вивільненню цитохрому с, активації каспази 9 (ініціаторна), ефektorних каспаз 7 та 3, наступній фрагментації ДНК. Зовнішній шлях обумовлений зв'язуванням лектину з поверхневим рецептором та запуском каскаду хімічних реакцій, ініціаторами якого виступають каспази 8 і 10. Ще одним механізмом цитотоксичного впливу ConA та рицину є збільшення в пухлинних клітинах кількості АФК, що включають в себе іони кисню, вільні радикали і перекиси (органічні та неорганічні). Внаслідок дії рослинних лектинів кількість АФК в клітині стрімко збільшується, знижується рівень глутатіону, який здатен поглинати вільні радикали, що призводить до розвитку окисного стресу, активації каспаз та, в подальшому, до апоптозу [16, 17, 123]. Індукція апоптозу за участю каскаду каспаз була показана в дослідженнях *in vitro* з використанням клітинних ліній К-562 (хронічна мієлогенна лейкемія людини) та HeLa (рак шийки матки людини) [124]. В експериментах на культурі клітин Т-, В-лімфоцитів показано, що апоптоз, індукований *in vitro* лектином омели білої, обумовлений зниженням в клітинах рівня антиапоптичних білків Bcl-2, BCL-x. Значне збільшення вмісту АФК в клітинах гепатокарциноми Нер38 і мієлолейкозу людини лінії U937 спостерігали під впливом компоненту лектину омели – лектин-II [16, 18].

Відомо, що рицин та лектин омели білої можуть реалізувати цитотоксичний ефект також за рахунок порушення синтезу білка в клітині. Зокрема, ланцюг-А рицину у цитоплазмі за рахунок своєї N-глікозидазної активності зв'язує та

видаляє залишок аденіну (A4324) з послідовності GAGA в 28S рибосомальній РНК, що призводить до інактивації рибосом [125].

Іншим шляхом прямого цитотоксичного впливу лектинів на клітини є індукція аутофагії. Аутофагія – внутрішньоклітинний механізм, який включає розпад цитоплазматичних компонентів за участі лізосом і аутофагосом. В дослідженнях *in vitro* з використанням клітин гепатоми ML-1 було показано, що ConA після зв'язування з маннозою на поверхні гепатоциту інтерналізується в мітохондрії шляхом клатрин-опосередкованого ендоцитозу. Інтерналізація рослинного лектину призводила до значного зменшення потенціалу мітохондріальної мембрани через опосередкований фактором BNIP3 шлях, тобто процес аутофагії відбувався за участю білків Bcl2/BNIP3 або Beclin-1 [121, 126]. Лектин *Polygonatum cyrtonema* здатний ініціювати аутофагію і апоптоз через мітохондріально-опосередкований шлях АФК-р38-р53 в клітинах меланоми людини A375. Також було показано, що лектин тварин Annexin-5 викликає аутофагію і інгібує ендоцитоз [16].

Іншим важливим шляхом протипухлинної дії лектинів, з точки зору розробки засобів імунотерапії, є опосередкований – а саме модулюванням реакцій протипухлинного імунітету [17]. Імуномодуючі властивості лектинів обумовлені їх взаємодією з фрагментами гліканів на мембранах лімфоцитів, МФ, дендритних клітин та подальшою активацією ряду внутрішньоклітинних факторів, що контролюють процеси проліферації, диференціювання, міграції імунокомпетентних клітин, синтез ними цитокінів. Наслідком цих процесів є формування імунної відповіді на патогени або трансформовані клітини. Важливим є здатність лектинів регулювати імунну відповідь завдяки активації системи комплементу, яка належить до системи вродженого імунітету і забезпечує розпізнавання чужорідних білків. Лектин запускає процес активації системи комплементу, зв'язуючись з манозними вуглеводними залишками компонентів цієї системи [127-129].

Встановлено, що ендогенні і екзогенні лектини індукують перехід клітин зі стадії G2 в мітотичну стадію, тобто володіють мітогенною активністю щодо

різних субпопуляцій лейкоцитів, призводячи до їх бласттрансформації. Ще однією властивістю лектинів є здатність підсилювати продукцію клітинами імунної системи ряду цитокінів, що сприяє підвищенню Т-клітинної цитотоксичності [130, 131].

Більшість рослинних лектинів здатні впливати на активність МФ, НК-клітин, Т-лімфоцитів. Найчастіше спостерігають збільшення продукції цими клітинами таких цитокінів як IL-2, -6, -12, -15; TNF α та IFN- γ . Зокрема, в дослідженнях *in vivo* була продемонстрована здатність підсилювати продукцію IL-12 та IFN- γ спленоцитами мишей при дії рослинних лектинів, які мають спорідненість до ряду вуглеводів глікокаліксу: ConA (*Canavalia ensiformis*) зв'язування з α -маннозою; PNA (*Phaseolus vulgaris*) – з N-гліканами; PSA (*Pisum sativum*) – з N-гліканами, що містять α -зв'язану маннозу; WGA (*Triticum vulgaris*) – з нейраміновою кислотою та гліканами, що містять кінцевий GlcNAc або GlcNAc β 1-4GlcNAc [132].

Також встановлено, що деякі лектини рослинного походження можуть діяти як агоністи TLR рецепторів. Лектини рослинного походження SBA, ConA, PNA взаємодіють з глікозилізованими TLRs на МФ/ дендритних клітинах і індукують передачу сигналу і їх активацію [133]. Зокрема, ConA володіє імуномодулюючими властивостями завдяки підвищенню експресії різних TLRs на МФ через JNK, p38, NF- κ B-залежний сигнальний шлях [114]. TLRs є основними рецепторами вродженої імунної відповіді і при розпізнаванні PAMP різних бактерій активують імунну відповідь проти них. Лектин ConBr (виділений з *Canavalia brasiliensis* на 99% гомологічний з ConA) індукує вироблення цитокінів, таких як IL-2, IL-6, IFN- γ та продукцію NO, інгібує продукцію IL-10 мишачими спленоцитами [134].

Ряд лектинів може одночасно проявляти як пряму цитотоксичну (протипухлинну), так і імуномодулюючу дію. Найкраще такий ефект ілюструють властивості лектинів омели (*Viscum album coloratum* та *Viscum articulatum*). Лектини омели складаються з 2 ланцюгів. Ланцюг В селективно зв'язується з β -галактозидами на поверхні пухлинних клітин та забезпечує проникнення ланцюга А в цитоплазму. Ланцюг А володіє ферментативними властивостями та каталізує

гідроліз N-глікозидного зв'язку аденін-4324 в еукаріотичній 28S-рибосомній РНК, інгібує етап подовження біосинтезу білка та призводить до загибелі пухлинної клітини. Поряд з цим, взаємодія ланцюга В з гангліозидами на поверхні імунокомпетентних клітин призводить до стимуляції активності лімфоцитів, НК-клітин, збільшення продукції цитокінів та медіаторів запалення макрофагами. Культивування протягом 24 годин лектину ML-1 і rViscumin з культурою мононуклеарних клітин периферичної крові людини показало достовірне підвищення секреції ряду цитокінів: IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, ФНП- α , IFN- γ , GM-CSF [17, 18]. Тобто, виявлений тісний зв'язок між прямою цитотоксичністю шляхом індукції апоптозу пухлинних клітин та стимуляцією протипухлинної імунної відповіді внаслідок дії лектину.

Як видно з наведених вище даних протипухлинні властивості рослинних лектинів досить широко досліджені. Значно менше відомостей зустрічається в науковій літературі щодо властивостей [107, 135] і застосування в медичній практиці (зокрема, онкологічній) лектинів мікробного походження [136, 137]. З точки зору біотехнологічного виробництва, процес отримання позаклітинних бактеріальних лектинів значно простіший, доступний для подальшої стандартизації. Висока швидкість нарощення мікробної біомаси забезпечує отримання більшої кількості активної речовини порівняно з лектинами рослинного походження. Враховуючи це, а також відомості про низьку токсичність бактеріальних лектинів, їх можна вважати перспективними в якості засобів з протипухлинними та імуномодулюючими властивостями. На сьогодні вже продемонстровані протипухлинні властивості лектинів, які продукуються сапрофітними бактеріями родини *Bacillus*: *B. polymyxa* 102, *B. subtilis* 316M, *B. subtilis* 7025 та ін. [107, 135]. Показано, що більшість бактеріальних лектинів – термостабільні, металонезалежні глікопротеїни, стійкі до дії рН, зберігають активність та специфічність протягом тривалого часу. Позаклітинним лектинам сапрофітних штамів бацил притаманна рідкісна вуглеводна специфічність до сіалових кислот або їх похідних. Враховуючи, що злоякісно трансформовані клітини характеризуються надлишковою експресією сіалових кислот в структурі

поверхневих глікокон'югатів, сіалоспецифічні лектини можна розглядати в якості потенційних протипухлинних агентів. Тому цікавим і перспективним в цьому напрямку є дослідження імуномодулюючої та протипухлинної дії оригінального позаклітинного лектину іншого штаму родини *Bacillus* – *B. subtilis* IMB B-7724, а також оцінка в умовах контрольованого експерименту можливості використання цього лектину в якості імунотерапевтичного засобу в комплексній терапії солідних пухлин.

РЕЗЮМЕ

Макрофаги (МФ) – високопластичні клітини імунної системи, які здатні швидко змінювати функціональну активність (поляризаційний стан) та виконувати свої функції як при фізіологічних, так і при патологічних (в тому числі, пухлинних) процесах, підтримуючи стійкість організму [10, 21].

Сучасна класифікація МФ враховує окрім анатомічних ніш виділення, походження та ступеню диференціювання клітин, також і вплив активаційних сигналів, що дозволяє додатково виділити підтипи МФ [35]. Залежно від сигналів мікрооточення (цитокінів, колонієстимулюючих факторів, продуктів мікробного синтезу та ін), макрофаги завдяки своїй пластичності можуть набувати різні функціональні фенотипи: від ініціації прозапальних реакцій до припинення запалення та репарації тканин. Традиційно МФ розділяють на *класично активовані або прозапальні (M1)* та *альтернативно активовані або протизапальні (M2)* [35]. Водночас МФ M2 відрізняються особливою пластичністю, що дозволяє припустити можливість їх реполяризації в M1 за допомогою засобів біотерапії. На сучасному етапі дослідники зазначають наявність «перехідних форм» МФ та необхідність комплексної оцінки популяції МФ з врахуванням джерел отримання, активаційних стимулів та різнопланових функціональних особливостей цих клітин [12]. Детальне дослідження механізмів переключення $M1 \leftrightarrow M2$ та пошук можливих шляхів регуляції процесу поляризації є одним із сучасних важливих напрямків оптимізації імунотерапії пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями [13-15].

В якості речовин з імуномодулюючими та протипухлинними властивостями увагу дослідників привертають лектини – глікопротеїни, що здатні до вибіркового зв'язування вуглеводів та вуглеводних компонентів глікокон'югатів різної природи. Високоспецифічне зв'язування із відповідними рецепторами на плазматичних мембранах клітин опосередковує цитотоксичний або стимулюючий вплив речовини. Механізми протипухлинної активності лектинів пов'язують як з прямою цитотоксичною дією, так і з опосередкованим впливом на пухлинні клітини внаслідок модулювання імунних реакцій [16-18]. На сьогодні детально

описані властивості рослинних лектинів, проте всі досліджені речовини цієї групи є достатньо токсичними, їх цитотоксичний вплив поширюється не лише на пухлинні клітини, але й на клітини здорових тканин. Лектини, продуковані бактеріями, досліджені значно меншою мірою. З точки зору біотехнологічного виробництва процес отримання бактеріальних лектинів значно простіший, придатний для стандартизації і може бути перспективним для подальшого практичного використання таких сполук. Враховуючи це, а також відомості про низьку токсичність бактеріальних лектинів, їх можна вважати перспективними в якості засобів з протипухлинними та імуномодуючими властивостями. Ми припустили, що одним з таких засобів міг би бути лектин, отриманий нами з оригінального штаму *B. subtilis* IMB B-7724 за методом, який детально описано в [19, 20].

Таким чином, узагальнений аналіз сучасних даних наукової літератури переконливо свідчить про наявність феномену пластичності МФ в процесі пухлинного росту і перспективність розробки стратегії протипухлинної імунотерапії, яка була б спрямована на перепрограмування цих клітин в напрямку формування фенотипу M1 (з прозапальною та протипухлинною активністю). Потенційними агентами такої спрямованої зміни функціонального стану МФ можуть слугувати лектини, зокрема одержаний в ІЕПОР НАНУ ім. Р.Є. Кавецького оригінальний лектин з *B.subtilis* IMB B-7724.

Викладене аргументовує мету нашого дослідження: визначити вплив лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на функціональну поляризацію макрофагів в процесі росту пухлин різного гістогенезу та обґрунтувати доцільність його використання для розробки підходів протипухлинної імунотерапії.

Результати, які отримані при виконанні дисертаційного дослідження мають як фундаментальну, так і практичну значимість, оскільки є підґрунтям для подальших досліджень, спрямованих на використання показників поляризаційного стану макрофагів для прогнозу ефективності терапевтичного застосування продуктів мікробного походження за умов наявності пухлинної маси.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Експериментальні тварини

В дослідках використовували мишей ліній C57Bl/6J та Balb/c (віком 2–2,5 міс., масою 19–22 г) розводки віварію ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Під час проведення експериментів миші перебували в стандартних умовах віварію з природним режимом освітлення на повноцінному раціоні харчування. Утримання мишей та робота з ними здійснювались у відповідності до міжнародно прийнятих правил проведення робіт з експериментальними тваринами [138, 139]. Дослідження проводили на інтактних мишах та тваринах з перещепленими модельними пухлинами – аденокарциномою Ерліха (АКЕ) або карциномою легені Льюїс (КЛЛ). Всього було використано 234 миші лінії Balb/c та 168 мишей лінії C57Bl/6J (табл. 2.1.1).

Таблиця 2.1.1

Характер та об'єм проведених досліджень

Назва етапу дослідження	Лінія та стать експериментальних тварин	Характеристика групи	Кількість тварин в групі, n
Оцінка зміни функціонального стану МФ в процесі росту АКЕ	миші лінії Balb/c	інтактні	самки -12
		з перещепленими клітинами АКЕ (в/м, 5×10^5 клітин/мишу)	самки - 16
Оцінка зміни функціонального стану МФ в процесі росту КЛЛ	миші лінії C57Bl/6J	інтактні	самці - 12
		з перещепленими клітинами КЛЛ (в/м, 4×10^5 клітин/мишу)	самці -16
Оцінка гострої токсичності лектину <i>B. subtilis</i> IMB B-7724	миші лінії Balb/c	інтактні, введення 0,9% NaCl	самки – 12 самці – 12
		інтактні, одноразове введення 125, 250, 375, 500 мг/кг маси лектину (в/о, п/ш, <i>per os</i>).	самки – 36 самці – 36
	миші лінії C57Bl/6J	інтактні, введення 0,9% NaCl	самки – 12 самці – 12

		інтактні, одноразове введення 125, 250, 375, 500 мг/кг маси лектину (в/о, п/ш, <i>per os</i>).	самки – 36 самці – 36
Оцінка впливу <i>in vivo</i> лектину <i>B. subtilis</i> IMB B-7724 на органи і клітини імунної системи	миші лінії Balb/c	інтактні, введення 0,9% NaCl	самки - 8
		інтактні, одноразове введення 100 мг/кг лектину (п/ш та в/о)	самки - 8
		інтактні, одноразове введення 10 мг/кг лектину (п/ш та в/о)	самки - 8
	миші лінії C57Bl/6J	інтактні, введення 0,9% NaCl	самці -8
		інтактні миші, одноразове введення 100 мг/кг лектину (п/ш та в/о)	самці -8
		інтактні, одноразове введення 10 мг/кг лектину (п/ш та в/о)	самці -8
Оцінка протипухлинної активності лектину на моделі АКЕ	миші лінії Balb/c	з перещепленим штамом АКЕ (в/м, в стегно, 5×10^5 клітин/мишу), неліковані	самки -10
		з перещепленим штамом АКЕ, введення лектину <i>B. subtilis</i> IMB B-7724 (п/ш, по 1 мг/кг маси, 10-разово)	самки -10
Оцінка протипухлинної активності лектину на моделі КЛЛ	миші лінії C57Bl/6J	з перещепленим штамом КЛЛ (в/м, в стегно, 4×10^5 клітин/мишу), неліковані	самці - 10
		з перещепленим штамом КЛЛ, введення лектину <i>B. subtilis</i> IMB B-7724 (п/ш, по 1 мг/кг маси, 10-разово, через день)	самці - 10

Вплив лектину <i>B. subtilis</i> IMB B-7724 на показники функціональної активності МФ мишей лінії Balb/c в процесі росту АКЕ	миші лінії Balb/c	інтактні, введення 0,9% NaCl	самки - 12
		з перещепленим штамом АКЕ (в/м, в стегно, 5×10^5 клітин/мишу), введення 0,9% NaCl	самки - 12
		з перещепленим штамом АКЕ, введення лектину <i>B. subtilis</i> IMB B-7724 (п/ш, по 1 мг/кг маси, 10-разово, через день)	самки - 12
Оцінка поляризації макрофагів інтактних мишей за умови застосування лектину <i>B. subtilis</i> IMB B-7724 <i>in vitro</i>	миші лінії Balb/c	інтактні, отримання перитонеальних МФ для проведення досліджень <i>ex vivo</i>	самки - 30

Миші лінії C57Bl/6J (генотип – а, Н-2b). Частота виникнення спонтанних пухлин молочних залоз не перевищує 1%, частота спонтанних пухлин інших локалізацій низька [140].

Миші лінії Balb/c (генотип – b (Тугр 1b), c (Туг c), Н-2d) – частота виникнення спонтанних пухлин молочних залоз низька (до 5%). Спонтанні пухлини легень виникають у 25-30 % тварин. Сприйнятливі до хронічної пневмонії. Миші чутливі до онкогенних ретровірусів [140, 141].

2.2 Моделі пухлинного росту

У роботі було використано 2 експериментальні моделі пухлинного росту: АКЕ та КЛЛ. Штами пухлинних клітин були одержані з Клітинного Банку ліній з тканин людини і тварин ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Карцинома легені Льюїс виникла спонтанно як карцинома легені у миші лінії C57Bl/6J у 1951 р. Перещеплюється підшкірно або внутрішньом'язево на 12-14 доби пухлинного росту. Метастазує гематогенно в легені практично в 100%

випадків [142, 143]. Для перещеплення пухлин, клітини КЛЛ вводили мишам лінії C57Bl/6J внутрішньом'язево у стегно в кількості 4×10^5 клітин/мишу.

Аденокарцинома Ерліха виникла спонтанно у мишей-самиць в 1905 р. як аденокарцинома молочної залози, асцитний варіант був отриманий в 1932 р. [144]. Пухлина перещеплюється підшкірно, внутрішньом'язево або внутрішньоочеревинно на 8-12 доби пухлинного росту. Не метастазує. Перещеплюється незалежно від лінії мишей [145]. Для перещеплення пухлин клітини АКЕ вводили мишам лінії Balb/c внутрішньом'язево у стегно в кількості 5×10^5 клітин/мишу.

2.3. Клітинні лінії

Дослідження проводили з використанням перещеплювальних штамів та постійних клітинних ліній, які отримано з Клітинного банку ліній з тканин людини та тварин ІЕПОР ім.Р.Є.Кавецького НАН України. Зокрема: клітини асцитної і солідних пухлин мишей: L1210 (лімфоцитарна В-клітинна лейкемія миші), АКЕ та КЛЛ; клітинні лінії:

- 1) К-562 (хронічна мієлогенна лейкемія людини),
- 2) MCF-7 (гормон залежні, адгезивні клітини аденокарциноми молочної залози людини з епітеліальним фенотипом),
- 3) MDA-MB-231 (тричі негативні, адгезивні клітини аденокарциноми молочної залози людини з агресивним мезенхімальним фенотипом),
- 4) А-549 (клітини недрібноклітинного раку легені людини),
- 5) J-774 (пухлин-асоційовані макрофаги, виділені з гістіоцитарної саркоми миші лінії Balb/c).

Клітини культивували в пластмасових ємностях при 37°C у зволоженій атмосфері з 5% CO_2 в повному поживному середовищі RPMI 1640 ("Sigma", США), 10% сироватки ембріонів теляти ("Sigma", США), 40 мкг/мл гентаміцину ("Sigma", США).

2.4 Бактеріальний лектин

Продуктом лектину є спороутворюючі грампозитивні сапрофітні бактерії штаму *B. subtilis* IMB B-7724, задепонованого у колекції Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ) [146]. Лектин отримували із культуральної рідини мікроорганізму як описано [147]. Процес виділення і очищення активної речовини включав наступні етапи: осадження сульфатом амонію – проводили насичення (до 70%) сульфатом амонію, витримували при температурі +4⁰С протягом 20 год., центрифугування при 5000 об./хв.; діаліз осаду проти дистильованої води – проводили при температурі +4⁰С протягом 24–30 год.; звільнення від баластних термолабільних білків – при нагріванні до 70⁰С протягом 30 хв.; стерилізація через бактеріальний фільтр з розміром пор 0,2–0,45 мк; ліофілізація фільтрату в діапазоні температур від –32 до +24⁰С. Після очищення та ліофілізації речовина зберігається при -20⁰С у вигляді аморфного порошку бурого кольору.

2.5 Схеми експериментів

2.5.1 Оцінка стану макрофагів за різними проявами функціональної активності в процесі росту модельних пухлин

Проведені 2 серії досліджень з використанням експериментальних модельних пухлин: аденокарцинома Ерліха (АКЕ) та карцинома легені Льюїс (КЛЛ). Пухлини індукували внутрішньом'язевим введенням клітин АКЕ в кількості 5×10^5 клітин/тварину мишам лінії Balb/c (самки, вік 2 міс, маса 18–20 г) або клітин КЛЛ в кількості 4×10^5 клітин/тварину мишам лінії C57Bl/6J (самці, вік 2 міс, маса 18–20 г). Дослідження функціонального стану МФ та показників пухлинного росту проводили на 7-, 14-, 21- та 28-му доби пухлинного процесу. Оцінювали функціональну активність МФ, які отримували з перитонеальної порожнини (АКЕ, КЛЛ), селезінки (АКЕ, КЛЛ), пухлинної тканини (АКЕ), легень (КЛЛ). Дослідження включало визначення рівня продукції NO та активності Arg, розрахунок співвідношення цих показників (NO/Arg), оцінку специфічної

цитотоксичної активності (МТТ-тест) та швидкості продукції СР (методом ЕПР-спектроскопії). Контрольна група включала інтактних мишей відповідної лінії, віку та статі.

2.5.2 Оцінка гострої токсичності лектину *B. subtilis* IMB B-7724 в системі *in vivo*

Першим етапом дослідження *in vivo* стала оцінка параметрів гострої токсичності лектину *B. subtilis* IMB B-7724 за умови його однократного введення мишам ліній Balb/c та C57Bl/6J. Досліджено 3 способи введення речовини: підшкірний (п/ш), внутрішньоочеревинний (в/о) та пероральний (*per os*). При парентеральному (п/ш та в/о) введенні лектину використані наступні дози: 125, 250, 375, 500 мг/кг маси тварини. Перорально лектин вводили тільки у найбільшій дозі – 500 мг/кг. Підбір використаних доз базувався на результатах попередніх досліджень біологічних властивостей лектину, проведених *in vitro* та на підставі даних літератури щодо цитотоксичних властивостей та активності позаклітинних лектинів сапрофітних бактерій роду *Bacillus* [107]. Досліджуваний препарат вводили одноразово, в об'ємі 1 мл на мишу (в/о та п/ш), 0,8 мл на мишу (*per os*). Тваринам контрольної групи вводили фізіологічний розчин NaCl.

2.5.3 Оцінка впливу *in vivo* лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на органи і клітини імунної системи

Досліди проведені на інтактних мишах ліній Balb/c та C57Bl/6J. Досліджено два способи введення лектину: підшкірний (п/ш) та внутрішньоочеревинний (в/о). Речовину вводили одноразово в об'ємі 1 мл по 100 мг/кг або 10 мг/кг маси тварини. На 14-ту добу після введення лектину визначали показники маси та клітинності селезінки, тимусу, ПЛВ; маси печінки. Була проведена також оцінка впливу лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на показники функціональної активності клітин лімфоцитарного (відповідь на мітоген ConA) та макрофагального (цитотоксична активність) ряду.

2.5.4 Визначення протипухлинної активності лектину *B. subtilis* IMB B-7724 у мишей з модельним пухлинним процесом

В дослідженні використані 2 експериментальні моделі пухлинного росту: АКЕ (миші лінії Balb/c, самки) та КЛЛ (миші лінії C57Bl/6J, самці). Пухлинні клітини перещеплювали за стандартною методикою у м'язи стегна в 0,2 мл фізіологічного розчину NaCl: АКЕ – по $5,0 \times 10^5$ клітин/тварину, КЛЛ – по $4,0 \times 10^5$ клітин/тварину. Для кожної моделі пухлинного росту формували по 2 групи тварин: «Контроль пухлинного росту (КПР)» – неліковані миші з пухлинами ($n = 10$); «Лектин» – миші з пухлинами, яким починаючи з 2-ї доби після трансплантації пухлинних клітин вводили лектин *B. subtilis* IMB B-7724 (п/ш, 1 мг/кг маси (вага тварин 20 г), через день, загальний курс 10 введень) ($n = 10$). Перебіг пухлинного процесу (на моделях АКЕ і КЛЛ) характеризували за стандартними показниками (частота перещеплення (%)) та латентний період виходу пухлин, об'єм пухлин (мм^3), тривалість життя тварин з пухлинами), розраховували ІГРП. На моделі КЛЛ – додатково оцінювали показники метастазування.

2.5.5 Вплив лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на показники функціональної активності макрофагів мишей лінії Balb/c в процесі росту пухлини

Пухлини індукували внутрішньом'язевим введенням клітин АКЕ (миші лінії Balb/c, самки, вік 2 міс, маса 18–20 г) в кількості 5×10^5 клітин/мишу. Були сформовані наступні групи: «Інтактний контроль (ІК)» – інтактні миші ($n = 12$); «Контроль пухлинного росту (КПР)» – неліковані миші з пухлинами ($n = 12$); «Лектин» – миші з пухлинами, яким починаючи з 2-ї доби після трансплантації клітин АКЕ вводили лектин *B. subtilis* IMB B-7724 (п/ш, по 0,02 мг/мишу (1 мг/кг, вага тварин 20 г), через день, загальний курс 10 введень) ($n = 12$). Тваринам груп «КПР» та «ІК» за аналогічною схемою вводили фізіологічний розчин NaCl. Поляризацію перитонеальних МФ мишей лінії Balb/c оцінювали на 14-, 21- та 28-

му доби після трансплантації солідної АКЕ за показниками їх функціонального стану (рівні продукції NO, аргіназою та цитотоксичною активністю), а також за рівнями експресії мРНК транскрипційних факторів (STAT1, STAT6, IRF5, IRF4).

2.6 Біохімічні, біофізичні та біологічні методи досліджень властивостей лектину *B. subtilis* IMB B-7724

2.6.1 Визначення молекулярної маси методом електрофорезу

Білки розділяли в 15,0% DDC-поліакриламідному гелі ("BioRad", США) [148]. Електрофорез проводили у вертикальних пластинах за постійного струму ($U = 100$ В). Електрофореграми забарвлювали розчином, який містив 0,4% Кумасі ("Ferak", Німеччина), 45% етанолу і 10% оцтової кислоти. Оцінку результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення *TotalLab 1.10*. Для визначення молекулярної маси в якості контролю використовували набір стандартних маркерів білків відомої маси ("Sigma", США).

2.6.2 Визначення хімічного складу

Вміст білку (довжина хвилі 280 нм) [149] та *вуглеводів* (довжина хвилі 620 нм) [150] в зразках лектину визначали спектрофотометрично на приладі NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer ("Thermo-Scientific", США). *Вміст вуглецю, водню та азоту* виміряли на аналізаторі Perkin-Elmer 2400 CHNS (Perkin-Elmer Inc., США) згідно стандартних програм.

2.6.3 Виявлення домішок високомолекулярних сполук різних класів

При проведенні досліджень використовували якісні реакції на відповідні сполуки: білки – амідочорний 10Б, кумасі діамантовий синій ("Sigma-Aldrich", США); мукополісахариди і глікопротеїди – реактив Шиффа ("Lieca", Німеччина); мукополісахариди і нуклеопротеїди – толуїдиновий синій, ліпопротеїди – судан чорний В, ДНК – дифеніламін, РНК – метиленовий синій ("Sigma-Aldrich", США) [151].

2.6.4 Оцінка однорідності за спектрами поглинання в різному діапазоні випромінювання

Поглинання в *УФ* (ультрафіолетове випромінювання) *спектри* реєстрували за допомогою спектрофотометричного методу з використанням приладу NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer ("Thermo-Scientific", США) при довжині хвилі 280 нм. Виміри та оцінку результатів проводили згідно стандартних програм приладу.

ІЧ спектри записували в області $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$ на спектрометрі Perkin-Elmer FTIR System Spectrum BX ("Perkin-Elmer Inc.", США). Віднесення частот поглинання виконано у відповідності до баз даних [152].

2.6.5 Визначення амінокислотного складу

Вміст амінокислот визначали на амінокислотному аналізаторі Т339 (Чехія) в режимі гідролізатів за методом [153] з використанням стандартів ("Sigma", США). Оптичну щільність продукту реакції, яка кількісно прямо пропорційна концентрації речовини в розчині, виміряли при довжині хвилі 520 нм. Визначали вміст амінокислот в розрахунку на 100 мг зразка.

2.6.6 Визначення гемаглютинуючої активності

Оцінювали в реакції гемаглютинації (РГА) з використанням 2% суспензії оброблених трипсином і фіксованих альдегідом еритроцитів кроля методом двократних серійних розведень в полістирольних мікропланшетах з U-подібними лунками ("Nuclo", Німеччина) при кімнатній температурі [154]. Гемаглютинуючу активність визначали як останнє розведення, при якому спостерігається РГА, та виражали в титр⁻¹ РГА. В якості контролю аутоаглютинації еритроцитів використовували 2% суспензію еритроцитів у забуференому фізіологічному розчині за відсутності лектина.

2.6.7 Визначення вуглеводної специфічності

Проводили методом інгібування гемаглютинуючої активності після взаємодії лектину з рядом цукрів: D-галактозаміном, лактозою, D-глюкозою, D-глюкозаміном, фруктозо-1,6-дифосфатом, D-глюкуроною кислотою, N-ацетілнейраміною кислотою, N-гліколілнейраміною кислотою. Реакцію проводили у 96-лункових U-подібних планшетах ("Nuclon", Німеччина), використовуючи 2% суспензії нативних еритроцитів кроля [155].

2.6.8 Оцінка цитотоксичної активності лектину

Визначення *in vitro* цитотоксичної активності лектину проводили з використанням колориметричного методу – МТТ-тесту [156]. В якості клітин-мішеней (КМ) використовували пухлинні клітини або лімфоцити/МФ інтактних тварин. Суспензію КМ вносили на 96-лункові планшети ("Applied Biosystems", США) в концентрації 1×10^5 клітин/на лунку в 100 мкл повного поживного середовища RPMI-1640 ("Sigma", США), 10% сироватки ембріонів теляти (fetal bovine serum, FBS) ("Sigma", США), 40 мкг/мл гентаміцину ("Sigma", США)). Через 24 год. в лунки вносили лектин, інкубували за стандартних умов (при 37°C в 5% CO₂). В якості контролю використовували лунки лише з КМ. Всі проби ставили в 3-х паралелях. Після завершення інкубації в лунки вносили по 20 мкл розчину МТТ (3-[4,5 Dimetil thiazole 2 yl] 2,5 diphenyl tetrazolium bromide; Thiazolyl blue) ("Sigma", США) в концентрації 5 мг/мл та інкубували протягом 4 год в стандартних умовах. Для візуалізації результатів реакції культуральне середовище RPMI-1640 ("Sigma", США) видаляли і додавали 120 мкл КОН (2 моль/л) і 140 мкл 50% розчину диметилсульфоксиду ("Serva", США). Вимірювання оптичної густини проводили на мультилунковому спектрофотометрі StatFax 2100 (США) при довжині хвилі поглинання $\lambda=540$ нм з використанням диференційного фільтру при $\lambda=630$ нм. Індекс цитотоксичності (ІЦ) розраховували за формулою:

$$\text{ІЦ} = 1 - \frac{\text{ОГ}_{\text{КМ+Л}}}{\text{ОГ}_{\text{КМ}}} \times 100\%$$

де: OG_{KM+L} – оптична густина в лунках з КМ та лектином;

OG_{KM} – оптична густина в лунках з КМ без додавання лектину.

Показник IC_{50} (концентрація речовини, за дії якої *in vitro* відмічають загибель 50% клітин-мішеней) розраховували методом регресійного аналізу, за допомогою on-line сервісу, доступного за посиланням <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator-v1>.

2.6.9 Визначення рН та температурної стабільності лектину

Проводили за результатами визначення гемаглютинуючої активності лектину (концентрація 1 мг/мл), який попередньо піддавали діалізу (24 год, 20°C) в різних буферних розчинах в діапазоні значень рН від 6,0 до 9,0. Використовували наступні буферні розчини: 20 мМ ацетатний буфер (рН 6,0), 20 мМ фосфатний буфер (рН 6,5; 7,0), 20 мМ Трис-НСІ буфер (рН 7,5; 8,0; 8,5; 9,0) [157, 158].

Температурну стабільність оцінювали за результатами гемаглютинуючої та цитотоксичної активності лектину (в концентрація 1 мг/мл) після його інкубації протягом 1 год в діапазоні температур від 20 до 90°C (з кроком 10°C) [157, 158].

2.7 Методи експериментальної онкології

Перебіг пухлинного процесу (КЛЛ та АКЕ) характеризували за стандартними показниками [142]: латентний період появи пухлини, частота виникнення пухлин, розміри пухлинного вузла (об'єм в мм³) на 14-, 21-, 28-, 35-ту доби росту пухлин, середню тривалість життя тварин з пухлинами. Об'єм пухлини (V , см³) розраховували за формулою:

$$V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot a \cdot b \cdot c$$

π – стала, що рівна 3,14

a, b, c – півосі еліпсу, см.

Протипухлинний ефект оцінювали за розрахованими індексами гальмування росту пухлини (ІГРП) та збільшення тривалості життя (ІЗТЖ) тварин в експерименті.

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

де $V_{\text{контр}}$ – середній об'єм пухлини в контрольній групі, $V_{\text{досл}}$ – середній об'єм пухлини в дослідній групі

$$\text{ІЗТЖ} = \frac{\text{СТЖ}_{\text{дослід}} - \text{СТЖ}_{\text{контр}}}{\text{СТЖ}_{\text{контр}}} \times 100\%$$

де $\text{СТЖ}_{\text{дослід}}$ – середня тривалість життя в дослідній групі, $\text{СТЖ}_{\text{контр}}$ – середня тривалість життя в контрольній групі

Для метастазуючої пухлини (КЛЛ) додатково визначали кількість мишей в групі, які мали метастази в легенях, середню кількість метастазів на одну тварину, об'єм метастазів в мм³. Розраховували індекс інгібування метастазування (ІМ) за формулою:

$$\text{ІМ} = \frac{A_{\text{к}} \cdot B_{\text{к}} - A \cdot B}{A_{\text{к}} \cdot B_{\text{к}}} \cdot 100\%$$

де $A_{\text{к}}$ і A – кількість тварин з метастазами в контрольній і дослідній групах; $B_{\text{к}}$ і B – середня кількість метастазів в легенях тварин контрольної і дослідної груп, відповідно.

2.7 Імунологічні методи дослідження

2.7.1 Дослідження імунокомпетентних органів експериментальних тварин

Визначали абсолютну масу тимусу, селезінки, периферичних лімфатичних вузлів (ПЛВ) (2 пахвинних, 4 пахвових, всього – 6) та розраховували відносний показник маси (ВПМ) кожного з органів за формулою:

$$\text{ВПМ} = \frac{\text{маса органу (мг)}}{\text{маса тіла тварини(г)}}$$

Після цього перелічені вище органи розтирали в гомогенізаторі Поттера в поживному середовищі 199 з 10 % FBS ("Sigma", США). Клітини центрифугували при 1,5 тис. обертів/хв протягом 10 хв. Суспензію клітин, виділених з селезінки, додатково обробляли 0,83 % розчином NH_4Cl для лізису еритроцитів протягом 6 хв, після чого тричі відмивали від NH_4Cl в середовищі 199 (1,5 тис. об/хв, 10 хв). Підрахунок кількості життєздатних лімфоцитів, вилучених з кожного органу, проводили у камері Горяєва за стандартною методикою, використовуючи суправітальне фарбування трипановим синім ("Sigma", США) [159]. Додатково розраховували вміст клітин на 1 мг маси органу.

2.7.2 Виділення макрофагів з різних органів та тканин

Перитонеальні макрофаги. В черевну порожнину тваринам вводили 5 мл фізіологічного розчину NaCl з гепарином (5 од/мл). Проводили легкий масаж передньої стінки черевної порожнини, відбирали суспензію клітин, що утворилася. Виділені клітини двічі відмивали від гепарину (1,5 тис. об/хв, 10 хв.) в фізіологічному розчині NaCl . Підрахунок життєздатних клітин проводили у камері Горяєва за стандартною методикою, використовуючи суправітальне фарбування трипановим синім [159]. Осад ресуспендували в повному поживному середовищі (див. п. 2.6.8) для визначення цитотоксичної активності в концентрації 4×10^6 клітин/мл; для визначення рівня продукції NO та аргіназної активності – в концентрації 1×10^6 клітин/мл.

Макрофаги селезінки. Селезінку, отриману в асептичних умовах, розтирали в гомогенізаторі Поттера у поживному середовищі 199 з 10% FBS ("Sigma", США). Отриману суспензію клітин центрифугували при 1,5 тис. об/хв протягом 10 хв., осад ресуспендували в середовищі 199, наносили на градієнт щільності фікол-урографіну ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) ("Biowest", США). Центрифугували при 1,5 тис. об/хв (400g) протягом 40 хв та знімали виділену фракцію мононуклерів. Після відмивання (2-разове центрифугування в стандартному режимі в середовищі 199) виділені клітини ресуспендували в повному поживному середовищі (див. п. 2.6.8). Для подальшого розділення моноцитарних та лімфоїдних клітин, отримані

суспензії наносили на пластикові плоскодонні планшети та інкубували за стандартних умов в термостаті протягом 2 годин. Після чого надосад, в якому містяться переважно лімфоїдні клітини, що не здатні «прилипати» до пластикової поверхні, ретельно відмивали. Кінцева концентрація МФ, отриманих з селезінки становила 1×10^6 клітин/мл.

Легеневі макрофаги. Легені, отримані в асептичних умовах, розтирали в гомогенізаторі Поттера у поживному середовищі 199 з 10% FBS ("Sigma", США). Суспензію клітин центрифугували при 1,5 тис. об/хв протягом 10 хв., осад ресуспендували та проводили підрахунок життєздатних клітин. Після чого 1×10^6 клітин в повному поживному середовищі наносили на пластикові плоскодонні планшети для подальшого розділення прилипаючої та неприлипаючої фракції, як описано вище.

Макрофаги з пухлинної тканини. МФ отримували з пухлинної тканини за описом вище. В цій серії дослідження додатково аналізували клітинний склад прилипаючої фракції шляхом оцінки активності кислої неспецифічної естерази в клітинах методом одночасного азотосполучення (Mueller та співавтори). 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 [160].

2.7.3 Виділення лімфоїдних клітин

Вилучені лімфоїдні органи – тимус та ПЛВ – розтирали в гомогенізаторі Поттера в поживному середовищі 199. Суспензії клітин центрифугували при 1,5 тис. об/хв протягом 10 хв і ресуспендували осад в повному поживному середовищі. Підрахунок кількості життєздатних клітин проводили за стандартною методикою, використовуючи суправітальне фарбування трипановим синім [159].

2.7.4 Визначення цитотоксичної активності макрофагів

Методом МТТ-тесту [156] *in vitro* визначали цитотоксичну активність отриманих з різних ніш МФ по відношенню до сингенних пухлинних клітин АКЕ або КЛЛ.

Суспензію МФ з різних анатомічних ніш отримували як описано в п.п. 2.7.2. Після чого в 96-лункові плоскодонні планшети ("Applied Biosystems", США) вносили по 100 мкл суспензії МФ (4×10^6 клітин/мл) та відповідних КМ (2×10^5 клітин/мл) в повному поживному середовищі. В контрольних лунках містились лише КМ, або лише МФ. Всі проби ставили в 3-х паралелях. Планшети інкубували в термостаті протягом 18 год в стандартних умовах (37°C, 5% CO₂, 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 і 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:

$$ІЦ = \frac{ОГ_{МФ} + ОГ_{КМ} - ОГ_{МФ+КМ}}{ОГ_{МФ} + ОГ_{КМ}} \cdot 100\%$$

ОГ_{МФ} – оптична густина в пробах з клітинами-ефекторами;

ОГ_{КМ} – оптична густина в пробах з КМ;

ОГ_{МФ+КМ} – оптична густина в дослідних лунках.

2.7.5 Вимірювання продукції NO

Продукцію NO вимірювали за стандартною реакцією Гріса [161]. Суспензію МФ (2×10^5 клітин/лунка) в повному поживному середовищі вносили по 200 мкл у 96-лункові планшети ("Applied Biosystems", США). Планшети інкубували протягом 24 год за стандартних умов. Кожну пробу досліджували у 3 паралелях. Кількість NO кількісно 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 години при кімнатній температурі в темряві. Продукти реакції були колориметрично визначені 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 представляли в ммоль NO $^2/10^6$ клітин.

2.7.6 Вимірювання активності аргінази

Інкубацію МФ проводили як описано в п.п. 2.7.2. Активність Arg в МФ визначали за швидкістю утворення сечовини [161]. Реакцію зупиняли додаванням суміші кислот ($H_2SO_4:H_3PO_4:H_2O$). Для колориметричного визначення сечовини до суміші додавали α -ізонітропропіофенон ("Sigma", США) та інкубували при 95°C упродовж 30хв, а потім при 4°C 30хв. Концентрацію сечовини визначали спектрофотометрично при $\lambda=550$ нм. Значення оптичної густини переводили у мікрограми, використовуючи калібрувальну криву, побудовану за розчинами сечовини відомої концентрації. Активність Arg розраховували за методикою [162]. Одна одиниця аргіназної активності – кількість ферменту, що гідролізує 1 ммоль аргініну за 1 хв. Дані представлені од./10⁶ клітин.

2.7.7 Оцінка швидкості продукції супероксидних радикалів

Рівні продукції СР в зразках МФ вимірювали методом спектроскопії електронного-парамагнітного резонансу (ЕПР-спектроскопії) за технологією SpinTraps (уловлювача радикалів) з використанням TEMPONE-H (2,2,6,6-тетраметил-4-оксипіперидин) ("Sigma", США) при кімнатній температурі як описано [163]. Швидкості утворення супероксидних радикальних аніонів розраховували в нмоль/г свіжої тканини на хв.

2.7.8 Реакція бласттрансформації лімфоцитів

Функціональну активність лімфоцитів ПЛВ оцінювали *in vitro* за реакцією на поліклональні Т-клітинний (Con A, "Sigma", США) або В-клітинний (LPS

S. Typhimurium, "Sigma", США) мітогени за допомогою МТТ-тесту [135, 136]. Лімфоцити з ПЛВ отримували як описано в п.п. 2.7.3, доводили до концентрації 2×10^6 кл/мл та вносили по 200 мкл в лунки плоскодонного планшету. В частину лунок вносили по 10 мкл мітогену. Частину лунок з лімфоцитами залишали без мітогену – спонтанна реакція бласттрансформації (РБТЛ). Планшети інкубували протягом 24 год, реакцію оцінювали в МТТ-тесті. Для обліку результатів розраховували індекс стимуляції:

$$IC = \frac{OG_{\text{мітоген}}}{OG_{\text{спонтанна}}}$$

де $OG_{\text{мітоген}}$ та $OG_{\text{спонтанна}}$ – оптична густина в лунках з додаванням мітогену та без нього, відповідно.

2.8 Виділення РНК, синтез кДНК

Для виділення тотальної РНК з перитонеальних МФ 2×10^5 клітин ресуспедували в 1 мл лізуючого розчину TRIzol ("GibcoBRL", США), після чого додавали 400 мкл стерильної бідистильованої води (biH_2O), інтенсивно перемішували та інкубували 20 хв за кімнатної температури. Після інкубації лізати центрифугували при швидкості 12000 об/хв за температури $+4^\circ\text{C}$ протягом 20 хв. Надосадову рідину відбирали в окрему пробірку, змішували з ізопропанолом у співвідношенні 1:1 для преципітації РНК та інкубували 20 хв за кімнатної температури. Після центрифугування при швидкості 12000 об/хв за температури $+4^\circ\text{C}$ протягом 20 хв, осад РНК двічі відмивали в 500 мкл 75% етанолу з проміжним центрифугуванням між етапами промивки за тих самих умов. Надосадову рідину видаляли методом аспірації, а осад підсушували на льоду. На фінальному етапі осад РНК розчиняли у 20 мкл стерильної biH_2O , після чого визначали концентрацію виділеної РНК на NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer з використанням програмного забезпечення «NanoDrop 1000 v. 3.7» ("Thermo Scientific", США).

Для синтезу кДНК на основі отриманої РНК, готували ампліфікаційну суміш, що містила: 1-2 мкг РНК, 1 мкл праймеру oligo(dT)18, 2 мкл 10 мМ суміші

нуклеотидів (dNTP) (все від Thermo Scientific, USA) та biH_2O . Загальний об'єм реакції 14 мкл. Всі компоненти ретельно перемішували і ставили у апарат для ПЛР GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA). Використовували наступну програму: 65°C - 5хв, охолодження до +4°C. На другому етапі додавали до отриманого продукту 4 мкл буферного розчину, 1 мкл інгібітора РНК-аз, 1 мкл зворотної транскриптази (все 5 від Thermo Scientific, USA) та проводили процедуру ампліфікації за програмою: 42°C – 60 хв. Отримані зразки кДНК зберігали на -70 °C.

2.9 Кількісна полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу

Попередньо було підібрано праймери для постановки реакції, що проводили з використанням інтернет ресурсів Primer Design and Search Tool та NCBI (розділ BLAST), нуклеотидні послідовності яких наведено у таблиці 2.9.1.

Таблиця 2.9.1

Послідовності праймерів, використаних в дослідженні

Назва гену	Прямий праймер 5'→3'	Зворотній праймер 5'→3'
TBP	<i>CCAATGACTCCTATGACCCC</i>	<i>GTTGTCCGTGGCTCTCTTATTC</i>
IRF4	<i>GGATTGTTCCAGAGGAGCC</i>	<i>GGGCATAATCCCTCCAGCTC</i>
IRF5	<i>CCTCAGCCGTACAAGATCTACGA</i>	<i>GTAGCATTCTCTGGAGCTCTTCCT</i>
STAT1	<i>TCCTTCTGGCCTTGGATTGA</i>	<i>ACCGTTCCACCCATGTGAA</i>
STAT6	<i>AGATGAGGCTTTCCGGAGTCA</i>	<i>CCCATATCTGAGCTGAGTTGCA</i>

До реакційної суміші real-time PCR додавали 2мкл кДНК, 10 мкл 2X суміші SYBR® Green PCR Master Mix ("Applied Biosystems", USA), по 1 мкл праймерів (прямий і зворотній, концентрація 50 pM) відповідно до досліджуваного гену та деіонізовану воду до загального об'єму 20 мкл. Реакції real-time PCR ставили у триплетах в 96-лункових планшетах ("Applied Biosystems", США) на приладі Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Для всіх генів були використані наступні умови ампліфікації: (10 хв при 95 °C; (15 с при 95 °C, 40 с при 62 °C) x 40 циклів). Для нормалізації було використано ген ендogenous контролю *TBP* (TATA-box binding protein).

Відносний рівень експресії генів визначали за формулою $2^{-\Delta\Delta C_t}$, де C_T - середнє для триплікатів граничне значення циклу, яке нормалізували відповідно до C_T ендogenous контролю (ΔC_T). $\Delta\Delta C_t$ –показник відносної зміни рівня експресії гена, нормалізований до відповідних значень у контролі. Обрахунок результатів та їх графічне представлення проводили з використання програмного забезпечення GraphPad Prism8. Наведені дані виражені у відносних одиницях.

2.10 Математична та статистична обробка результатів

Математичну обробку результатів ($M \pm m$) проводили з використанням t -критерію Ст'юдента. Розрахунки середнього значення досліджуваних показників (M) та середньої помилки середньої арифметичної (m) виконані за допомогою програмного забезпечення Prism Версії 8.0. Для оцінки рівнів значимості відмінностей середніх значень між групами застосовували t -критерій Ст'юдента [164].

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою непараметричного U -критерію Mann-Whitney, а кореляційний аналіз (кореляція Спірмена) проводили за допомогою програмного забезпечення Prism Версії 8.0. Достовірними вважали відмінності з вірогідністю не менше 95% ($p < 0,05$).

РОЗДІЛ 3

ОЦІНКА ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ МАКРОФАГІВ В ПРОЦЕСІ РОСТУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ПУХЛИН РІЗНОГО ГІСТОГЕНЕЗУ

Широко відома захисна функція МФ в реалізації відповіді організму на розвиток ряду патологічних процесів. Загалом поляризовані макрофаги M1 мають потужну цитотоксичну активність щодо різних типів патогенів, інфікованих та трансформованих клітин тощо. Перепрограмування макрофагів M1 до типу M2 спричиняє втрату цитотоксичної активності [165]. При пухлинному рості МФ беруть участь у цитотоксичній елімінації пухлинних клітин, презентації пухлинно-асоційованих антигенів, регуляції імунних реакцій за рахунок продукції певних цитокінів, тощо. Проте, при оцінці ролі цих клітин в формуванні протипухлинного імунітету потрібно брати до уваги їх здатність змінювати напрямок поляризації залежно від отриманих сигналів мікрооточення. Крім протипухлинної функції, МФ часто легко виконують іншу – пропухлинну (можуть сприяти прогресуванню пухлинного процесу шляхом сприяння ангіогенезу, інвазії та метастазуванню) [165]. Отже, зміни поляризації МФ і, як наслідок, їх функції та роль у прогресуванні пухлини можуть бути використані в діагностиці та прогнозуванні онкологічних захворювань.

МФ складають найбільш розповсюджену частину лейкоцитів, що інфільтрують пухлину. Залежність функцій і поляризації ПАМ від локалізації в тканині пухлини (наприклад, нормальних або гіпоксичних областей) або під час прогресування пухлини досить добре вивчена [166, 167]. З іншого боку, до загального пулу МФ організму відносять різноманітні популяції тканинних МФ, які відрізняються за своїми функціями, поверхневими маркерами, реакцією на подразники та походженням [30, 168]. Тканина, з якої походять МФ, впливає на їх функції [169]. На сьогодні в науковій літературі дискутується питання про те, що деякі тканини і органи (легені, селезінка, черевна порожнина) мають різні резидентні субпопуляції МФ. Однак їх класифікація з чітким виділенням клітинних фенотипів M1 (класично активованих, прозапальних) та M2

(альтернативно активованих, протизапальних) не завжди є достовірною [170]. Механізми активації та поляризації МФ субпопуляцій M1 і M2 відносно добре описані в науковій літературі. Але залишається малодослідженим питання зміни функціональних властивостей МФ, виділених з різних органів і тканин, в процесі пухлинного росту. Тому першим етапом нашого дослідження стало вивчення змін поляризації та функцій МФ, виділених з дискретних анатомічних ніш мишей, на різних стадіях прогресування модельних пухлин в порівнянні з інтактними тваринами.

Дослідження функціонального стану МФ та показників пухлинного росту проводили на 7-, 14-, 21- та 28-му доби пухлинного процесу. Оцінювали функціональну активність МФ, які отримували з перитонеальної порожнини (АКЕ, КЛЛ), селезінки (АКЕ, КЛЛ), пухлинної тканини (АКЕ) та легень (КЛЛ). Дослідження включало визначення рівня продукції NO та активності Arg, розрахунок співвідношення цих показників (NO/Arg), оцінку специфічної цитотоксичної активності (МТТ-тест) та швидкості продукції СР (методом ЕПР-спектроскопії). Отримані результати порівнювали з даними інтактних мишей відповідної лінії, віку та статі.

3.1. Зміни функціонального стану макрофагів в процесі росту аденокарциноми Ерліха

Після перещеплення пухлинних клітин мишам лінії Balb/c пухлини виникали у всіх тварин в групі.

Таблиця 3.1.1.

Показники росту АКЕ у мишей лінії Balb/c

Показник	Доба (після введення пухлинних клітин) пухлинного росту			
	7	14	21	28
Розмір первинного пухлинного вузла, мм ³	397,6±30,9	1884,2±106,0	3464,7±156,2	5215,3±383,4

Латентний період виходу пухлин складав $5,4 \pm 0,1$ діб. Динаміка росту АКЕ протягом 28 діб спостереження була характерною для даної експериментальної моделі (таблиця 3.1.1).

З метою дослідження особливостей катаболізму L-аргініну, на різні доби росту пухлини визначали рівень продукції NO та активність Arg в МФ, отриманих з перитонеальної порожнини та селезінки. Розраховане за отриманими показниками співвідношення NO/Arg дозволяє говорити про зміни напрямку поляризації M1/M2 в різні терміни пухлинного процесу. МФ інтактних мишей лінії BALB/c, отримані з різних анатомічних ніш, характеризувались високим рівнем продукції NO та низькою аргіназою активністю: перитонеальні МФ – відповідно $54,0 \text{ NO}^2/10^6$ клітин та $4,0 \text{ од.}/10^6$ клітин; МФ селезінки – $59,2 \text{ NO}^2/10^6$ клітин та $3,82 \text{ од.}/10^6$ клітин. Показник співвідношення NO/Arg для перитонеальних МФ становив 13,5 ум.од., для МФ селезінки – 15,5 ум.од. (рис. 3.1.1).

У тварин дослідної групи на ранній стадії росту АКЕ показники співвідношення NO/Arg (див. рис. 3.1.1) для обох типів МФ (перитонеальної порожнини та селезінки) суттєво перевищували такі в групі інтактних тварин (34,4 та 36,7 відповідно). На 14- та 21-шу доби пухлинного росту відмічали зниження співвідношення NO/Arg МФ перитонеальної порожнини ($p < 0,05$) у 1,6 та 2,3 разу порівняно з ІК. В подальшому на 28-му добу спостерігали поступове зниження цього показника для обох типів МФ: перитонеальні – 6,4 ум.од., МФ селезінки – 13,4 ум.од ($p < 0,05$). Аналогічні зміни показників функціональної активності відмічали і при визначенні продукції NO та активності Arg МФ, виділеними з пухлинної тканини. На 14-ту добу росту пухлини показник співвідношення NO/Arg становив 38,4 ум.од, на 28-му добу відмічали його зниження в 2,7 разу ($p < 0,02$). Слід відмітити, що зміни показників співвідношення NO/Arg для обох типів МФ корелювали з розміром первинної пухлини – на термінальних стадіях пухлинного росту коефіцієнти кореляції становили $r = -0,76$ (перитонеальні МФ), $r = -0,88$ (МФ селезінки) та $r = -0,98$ (МФ пухлинної тканини).

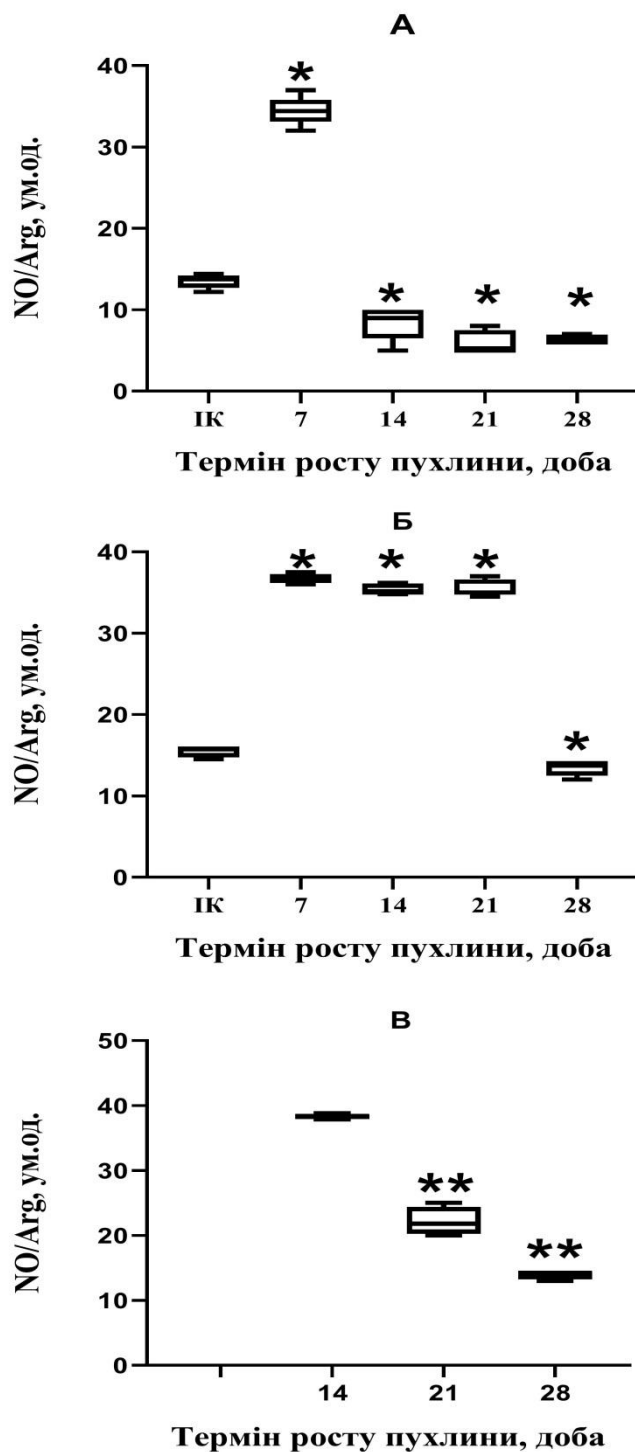


Рис. 3.1.1 Показники співвідношення NO/Arg для МФ виділених з перитонеальної порожнини (А), селезінки (Б) та пухлинної тканини (В) мишей Balb/c з АКЕ,

* – $p < 0,05$ порівняно з показником групи «ІК»

** – $p < 0,05$ порівняно з показником на 14-ту добу росту пухлини.



Рис. 3.1.2 Цитотоксична активність МФ, виділених з перитонеальної порожнини (А), селезінки (Б) та пухлинної тканини (В) мишей Balb/c з АКЕ,

* – $p < 0,05$ порівняно з показником групи «ІК»

** – $p < 0,05$ порівняно з показником на 14-ту добу росту пухлини.

Тобто, на ранніх стадіях росту пухлини, незалежно від локалізації, МФ мали фенотип М1, але по мірі прогресування пухлинного процесу (на термінальних стадіях пухлинного росту) відбувалася їх поступова поляризація до фенотипу М2. Важливим є те, що зміни поляризації макрофагів спостерігалися не тільки в пухлинній тканині, але й на системному рівні і не залежали від джерела виділення. Більш того, незважаючи на початкові відмінності у функціонуванні, зумовлені особливостями анатомічних ніш (рівень продукції NO МФ селезінки дещо перевищував такий для перитонеальних МФ), загальні зміни поляризації МФ з селезінки, перитонеальної порожнини, пухлинного вузла були подібні.

Описані дані підтверджуються результатами визначення цитотоксичної (до клітин АКЕ) та метаболічної (рівень продукції СР) активності МФ. Динаміка змін показників цитотоксичної активності МФ, отриманих на різні доби пухлинного росту з перитонеальної порожнини, селезінки та пухлинної тканини, наведена на рисунку 3.1.2. Індекс цитотоксичної активності перитонеальних МФ інтактних тварин становив 19,2%, МФ селезінки – 14,7%. На 7- та 14-ту доби після трансплантації пухлинних клітин цитотоксична активність МФ, отриманих як з перитонеальної порожнини (21,3 та 22,7% відповідно), так і з селезінки (12,6 та 12,2% відповідно), статистично достовірно не відрізнялась від такої у інтактних тварин. Прогресивний ріст пухлини (21- і 28-ма доби) викликав суттєве зниження цитотоксичної активності перитонеальних МФ (відповідно в 1,3 та в 1,5 разу, $p < 0,05$) порівняно з показником інтактних мишей. Ця картина була однаковою для МФ, отриманих як з селезінки, так і з перитонеальної порожнини (див. рис. 3.1.2).

Висока продукція СР є ще однією характерною рисою поляризованих МФ М1 [171]. Зокрема, за даними літератури після мікробної активації МФ М1 відбувається підвищення регуляції НАДФН, що призводить до збільшення утворення СР для знищення патогенних мікроорганізмів у фагосомах [172].

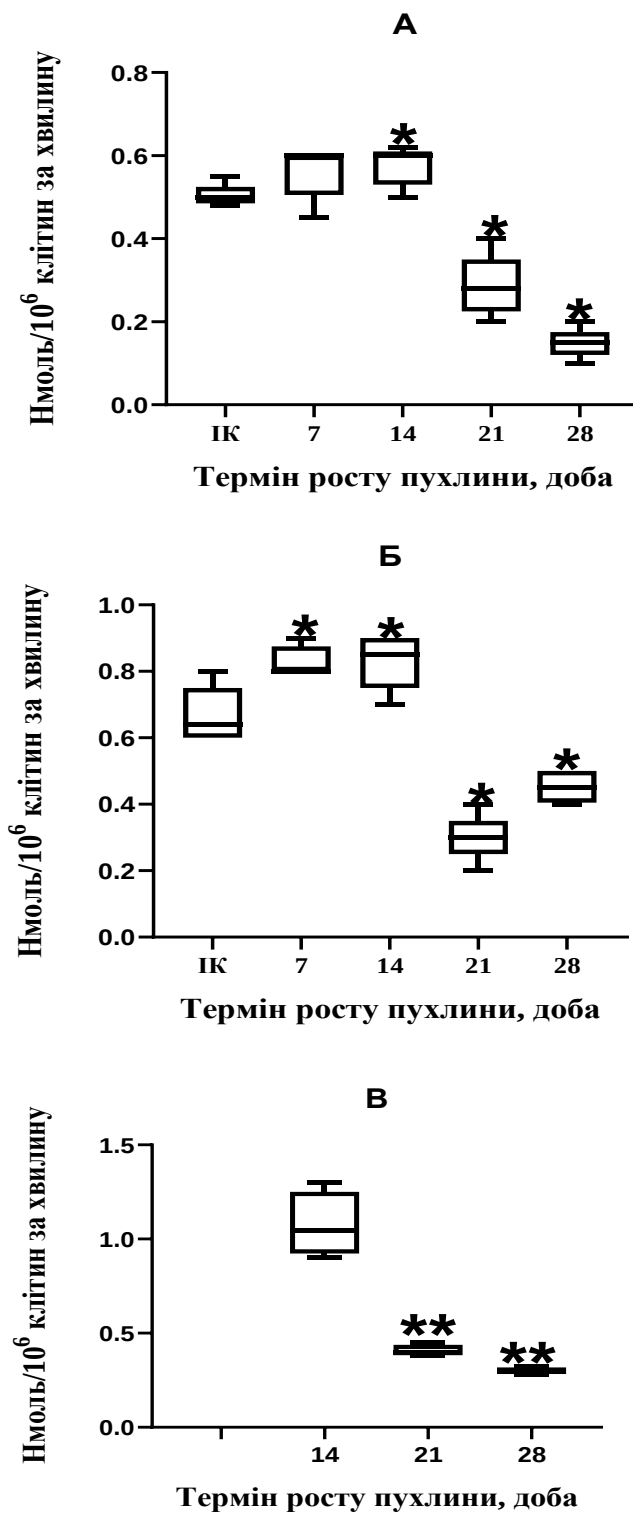


Рис. 3.1.3 Швидкість продукції СР МФ перитонеальної порожнини (А), селезінки (Б) та пухлинної тканини (В) мишей Balb/c з АКЕ,

* – $p < 0,05$ порівняно з показником групи «ІК»

** – $p < 0,05$ порівняно з показником на 14-ту добу росту пухлини.

За результатами наших досліджень на ранніх етапах росту пухлини (7- та 14-та доби) продукція СР МФ перитонеальної порожнини і селезінки знаходилась на рівні інтактного контролю (рис. 3.1.3). На 21-шу добу відбулося суттєве зниження рівнів продукції СР МФ, виділеними з перитонеальної порожнини (на 55,0%) та селезінки (на 45,0%), порівняно з показниками інтактних мишей. На 28-му добу продукція СР перитонеальними МФ продовжувала знижуватись: в 1,4 разу від попереднього показника та в 3,4 разу ($p < 0,05$) від рівня інтактних мишей. МФ селезінки дещо відновлювали здатність продукувати СР: рівень продукції зростав в 1,5 разу порівняно з показником попереднього терміну обстеження, проте залишався суттєво нижчим ($p < 0,05$) за показник інтактних мишей (див. рис 3.1.3).

Прогресування пухлинного процесу супроводжувалось суттєвим зниженням цитотоксичної активності та рівнів продукції СР МФ, отриманих з пухлинної тканини. На 28-му добу росту пухлини цитотоксична активність знижувалась в 1,2 разу, рівень продукції СР – в 3,6 разу порівняно з відповідними показниками, визначеними на 14-ту добу ($p < 0,03$), що свідчить, про поступову зміну поляризації МФ від М1 до М2.

Таким чином, виявлено, що на ранніх етапах росту пухлини відбувається активація МФ М1 на системному рівні, а на термінальних етапах пухлинного процесу – МФ з фенотипом М2. Такі зміни глибше виражені в популяції перитонеальних МФ. Отримані результати корелюють з даними наукової літератури щодо властивостей та можливості перепрограмування МФ в процесі розвитку злоякісних новоутворень [173, 174]. Потрібно відмітити, що більшість досліджень були спрямовані на вивчення властивостей саме ПАМ, в той час як вплив пухлини на функції резидентних МФ різних органів та тканин, віддалених від місця розташування злоякісного новоутворення, та їх поляризація в процесі росту пухлини є менш дослідженими. Зокрема, продемонстрована значна фенотипова та функціональна неоднорідність резидентних МФ, виділених з перитонеальної порожнини та селезінки, а також різна модель їх реакції на активаційні стимули під впливом сигналів пухлинного мікрооточення [168, 175].

Таким чином, результати нашого експерименту показали, що прогресування пухлини негативно впливало на функціонування резидентних МФ, видалених із різних анатомічних ніш – перитонеальної порожнини, селезінки, пухлинної тканини. Незалежно від місця локалізації, МФ поступово втратили свої протипухлинні властивості (про що свідчать показники цитотоксичної активності, рівні продукції NO та CP), набуваючи M2-подібного типу поляризації починаючи з 21-ї доби пухлинного росту. Фактори, які спричиняють зміни функціональних властивостей і фенотипу МФ, потребують подальшого дослідження.

3.2. Зміни функціонального стану макрофагів в процесі росту карциноми легені Льюїс

Для досліджень змін поляризації МФ протягом перебігу пухлинного процесу ми використовували МФ, виділені з перитонеальної порожнини, селезінки та легень мишей лінії C57Bl/6J. Схема експерименту та спектр досліджених параметрів аналогічні описаним в розділі 3.1.

Проводили аналіз стандартних показників росту (частота прищеплення пухлин, розмір первинного пухлинного вузла) та метастазування (кількість та об'єм метастазів в легенях) КЛЛ. Динаміка показників розміру первинної пухлини та метастазування в легені протягом 28 діб представлені в табл. 3.2.1. Латентний період виходу пухлин складав $9,3 \pm 1,2$ діб.

Таблиця 3.2.1.

Показники росту та метастазування КЛЛ у мишей лінії C57Bl/6J

Показник	Термін пухлинного росту			
	7	14	21	28
Розмір первинного пухлинного вузла, мм ³	-	77,0 $\pm$ 8,5	826,0 $\pm$ 270,1	1861,0 $\pm$ 238,8
Кількість метастазів, n	-	0,0 $\pm$ 0,0	4,3 $\pm$ 0,9	10,3 $\pm$ 0,3
Розмір метастазів, мм ³	-	0,0 $\pm$ 0,0	14,3 $\pm$ 0,9	41,2 $\pm$ 4,7

Для оцінки змін поляризації МФ, отриманих з перитонеальної порожнини, селезінки та легень, на різних етапах росту пухлини визначали рівень продукції

NO та активність Arg. МФ інтактних мишей лінії C57Bl характеризувались високим рівнем продукції NO та низькою аргіназною активністю: перитонеальні МФ – відповідно $53,76 \text{ NO}^2/10^6$ клітин та $2,1 \text{ од.}/10^6$ клітин; МФ селезінки – $58,3 \text{ NO}^2/10^6$ клітин та $2,175 \text{ од.}/10^6$ клітин; МФ легень – $57,8 \text{ NO}^2/10^6$ клітин та $2,08 \text{ од.}/10^6$ клітин. Показник співвідношення NO/Arg для перитонеальних МФ становив 25,6, для МФ селезінки – 26,8 та легень – 27,8 (рис. 3.2.1).

На тлі росту пухлин спостерігали однакову (незалежно від ніші виділення МФ) тенденцію до зміни показників співвідношення NO/Arg (див. рис. 3.2.1). На 14- та 28-му доби пухлинного росту відмічали зниження ($p < 0,05$ порівняно з ІК) показника співвідношення NO/Arg в популяціях перитонеальних МФ (8,84 ум.од. та 9,12 ум.од. проти 25,6 ум.од. відповідно) та МФ селезінки (10,3 ум.од. і 13,0 ум.од. проти 26,8 ум.од. відповідно). Слід відмітити, що на 21-шу добу пухлинного росту для МФ отриманих як з перитонеальної порожнини так і з селезінки, відбувалося статистично достовірне ($p < 0,05$) підвищення цього показника в 1,4 разу порівняно з ІК та в 3,9 разу порівняно з показником, отриманим на 14-ту добу. Іншу динаміку змін рівня продукції NO та активності Arg демонструвала популяція легеневих МФ. На 7- та 14-ту доби росту КЛЛ показник співвідношення NO/Arg становив 28,3 та 33,6, відповідно. На 21-, 28-му добу пухлинного росту значення співвідношення NO/Arg достовірно знижувалося ($p < 0,05$) в 1,2 та 1,3 разу порівняно з показником ІК, що пояснюється збільшенням аргіназної активності та статистично достовірним зниженням продукції NO (див. рис. 3.2.1).

Дослідження цитотоксичної активності МФ, виділених з перитонеальної порожнини та селезінки інтактних мишей, не виявило суттєвої різниці між цими показниками: індекси цитотоксичності складали 13,0 та 14,4% відповідно (рис. 3.2.2). У тварин з модельним пухлинним процесом динаміка змін цитотоксичної активності МФ, отриманих з різних органів, була дещо відмінною. Статистично достовірним було її збільшення ($p < 0,05$) порівняно з інтактним контролем лише на 7-му добу росту пухлини (див. рис. 3.2.1А). Цитотоксична активність МФ селезінки знижувалась на початкових етапах росту пухлини (на 14-ту добу в 1,4

разу нижче показника інтактних мишей, $p < 0,05$). В подальшому суттєвих змін цього показника не відмічали (див. рис 3.2.2).

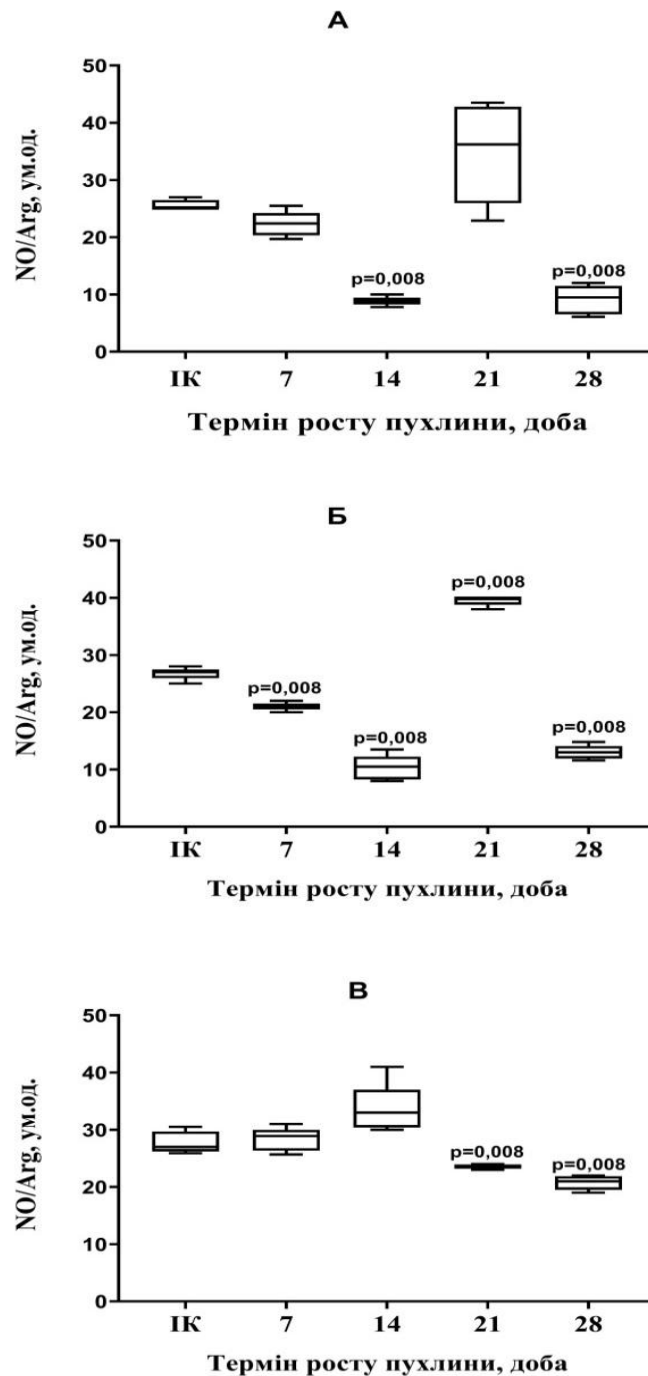


Рис. 3.2.1 Співвідношення NO/Arg для МФ виділених з перитонеальної порожнини (А), селезінки (Б) та легень (В) у мишей C57Bl/6J з КЛЛ, $p < 0,05$ порівняно з показником групи «ІК».

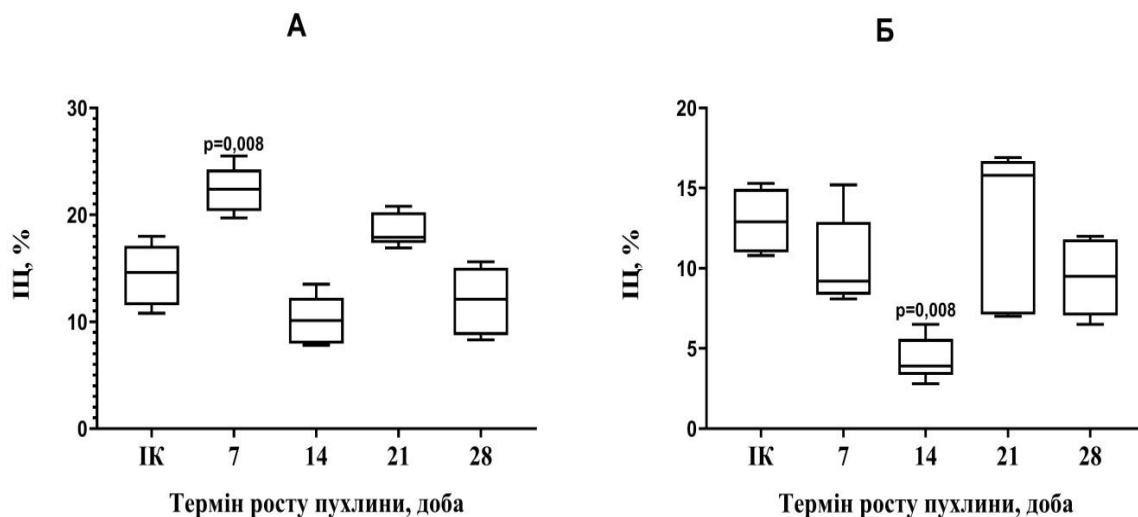


Рис. 3.2.2 Цитотоксична активність МФ, виділених з перитонеальної порожнини (А) та селезінки (Б) у мишей C57Bl/6J з КЛЛ.

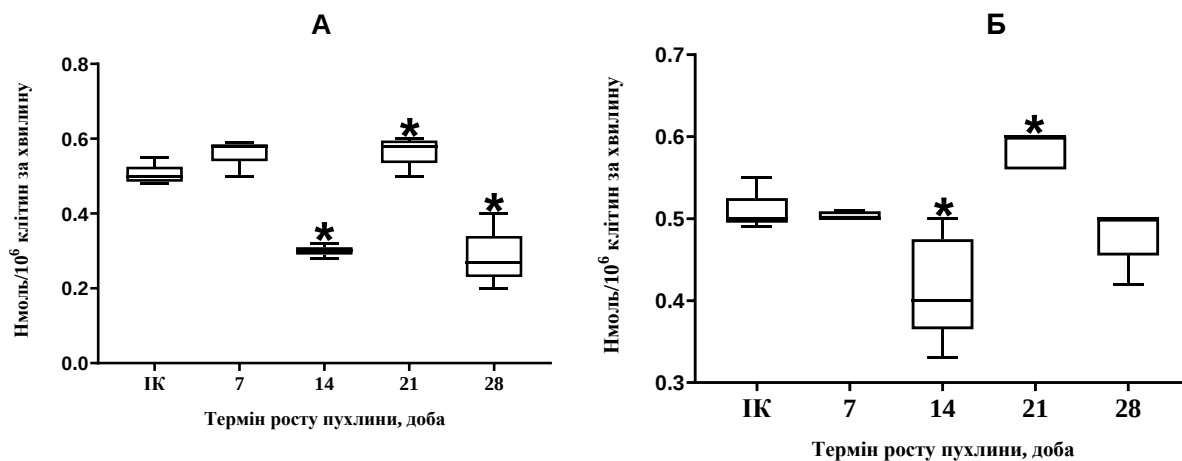


Рис. 3.2.3 Швидкість продукції СР МФ перитонеальної порожнини (А) та селезінки (Б) у мишей C57Bl/6J з КЛЛ,
* – $p < 0,05$ порівняно з показником групи «ІК».

Результати визначення рівня продукції СР методом ЕПР-спектроскопії наведені на рис. 3.2.3. Незалежно від того, з якої анатомічної ніші були виділені МФ (перитонеальної порожнини або селезінки), напрямок зміни їх метаболічної

активності співпадали із змінами цитотоксичної активності: зниження на 14-ту та 28-му доби, суттєве підвищення на 21-шу добу пухлинного росту.

Таким чином, аналіз динаміки показників, що характеризують функціональний стан МФ, виділених з різних анатомічних ніш (перитонеальної порожнини, селезінки та легень), свідчив про поступову зміну поляризації цих клітин на різних етапах росту КЛЛ. В популяціях МФ, отриманих з селезінки та перитонеальної порожнини, виявлені зміни продукції NO та активності Arg: на 7-ї та 21-шу доби росту КЛЛ переважали клітини з протипухлинними властивостями (M1), на 14- та 28-му доби – клітини з пропухлинними властивостями (M2). Виявлений сильний негативний кореляційний зв'язок між рівнем співвідношення NO/Arg МФ перитонеальної порожнини та розміром первинного пухлинного вузла ($r = -0,9$, $p < 0,05$). В популяції легневих МФ визначені показники функціональної активності свідчили про присутність на ранніх стадіях пухлинного процесу (до 14-ї доби) клітин з фенотипом M1, в подальшому (до 28-ї доби) – відбувалась їх поступова поляризація до клітин з фенотипом M2. Зміна функціональних характеристик легневих МФ (від клітин з протипухлинними до клітин з пропухлинними властивостями) корелює з процесом метастазування КЛЛ в легені, що підтверджено розрахованими коефіцієнтами кореляції Пірсона. Кореляційний зв'язок між показниками об'єму і кількості метастазів та рівнем продукції NO легневими МФ був сильний негативний ($r = -0,92$ та $-0,89$ відповідно, $p < 0,05$).

Таким чином, в процесі росту експериментальних модельних пухлин різного гістогенезу (АКЕ, КЛЛ) встановлено зміну поляризаційного стану виділених з різних анатомічних ніш макрофагів від M1 (латентна стадія росту) до M2 (термінальна стадія).

В процесі росту солідної АКЕ (миші лінії Balb/c) відмічали поступову зміну функціональної активності МФ отриманих з пухлини, селезінки та перитонеальної порожнини, від клітин з фенотипом M1 (на 7-му та 14-ту доби росту пухлини) до МФ M2 (на 21-шу та 28-му доби). На моделі КЛЛ у мишей лінії C57Bl/6J показано, що МФ з протипухлинними властивостями (M1) переважали

на 7-му і 21-шу, а з пропухлинними властивостями (M2) – на 14- та 28-у доби росту карциноми. В популяції МФ, виділених з легень, клітини з ознаками M1 переважали на 14-ту добу, в подальшому (21-ша та 28-ма доби) достовірно збільшувались функціональні прояви МФ з фенотипом M2.

Відмічені розбіжності в змінах функціональної активності перитонельних і селезінкових МФ у мишей з різними модельними пухлинами (лінійне пригнічення – у мишей лінії Balb/c з АКЕ та двофазні зміни (пригнічення на 14-ту та 28-му доби та статистично достовірна активація на 21-шу добу у мишей лінії C57Bl/6J з КЛЛ), вірогідно, обумовлені як особливостями досліджених модельних пухлин (АКЕ, КЛЛ), так і особливостями клітинної та гуморальної імунної відповіді мишей відповідних ліній. Активація МФ з різних анатомічних ніш тварин з КЛЛ на 14-ту (легені) та 21-шу доби (перитонеальна порожнина, селезінка) скоріш за все зумовлена розповсюдженням по організму пухлинних клітин з первинного вузла та формуванням метастазів у легенях. У тварин з АКЕ односпрямована зміна функціональної активності МФ може бути пояснена зростаючим впливом гуморальних чинників пухлини, надходження яких до організму збільшується зі збільшенням маси пухлини.

Існує також залежність між вихідними фізіологічними особливостями організму і його відповіддю на пухлинний процес. Відомо, що для мишей лінії Balb/c характерне превалювання гуморальної імунної відповіді, тоді як для мишей C57Bl/6J, навпаки, притаманні клітинні реакції імунної відповіді [176-179]. Тому, у тварин цієї лінії функціональна активність МФ, що є клітинами-ефекторами вродженого імунітету, може більш чутливо та динамічно реагувати на розвиток пухлинного процесу.

Результати досліджень, що описані в підрозділах 3.1-3.2, опубліковані у [180-184].

РОЗДІЛ 4

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ТА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛЕКТИНУ

B. SUBTILIS IMB B-7724

4.1 Фізико-хімічні характеристики лектину

Бактеріальний лектин, виділений з культуральної рідини штаму *B. subtilis* IMB B-7724, після ліофілізації має вигляд аморфного порошку бурого кольору, який добре розчиняється у воді, буферних розчинах (забуференому фізіологічному розчині, Трис-HCl), лугах (20% NaOH) та деяких органічних розчинниках (65 % етанол, 50% ацетон). Елементний склад речовини: вуглець – 34,00%, водень – 7,04%, азот – 16,61%, кисень – 42,35%.

Результати *дослідження хімічного складу* показали, що виділений лектин є глікопротеїном, який містить 86,0% білку та 7,0% вуглеводів. Дані, отримані в результаті проведення якісних реакцій на вміст речовин певних класів, свідчать про відсутність в досліджених зразках лектину речовин небілкової природи. Позитивні кольорові реакції з амідочорним 10Б і кумасі діамантовим синім вказують на наявність білків. Про відсутність домішок інших макромолекул свідчать негативні реакції суданом чорним В (ліпопротеїди), реактивом Шиффа (мукополісахаріди), толуїдиновим синім (мукополісахаріди, нуклеопротейди), дифеніламіном (ДНК) та метиленовим синім (РНК).

При *проведенні електрофоретичного дослідження* виявлено, що отримана речовина досить однорідна, містить білки з молекулярною масою 18,0 кДа, 20,0 кДа, 26 кДа та 45-50 кДа (рис. 4.1.1).

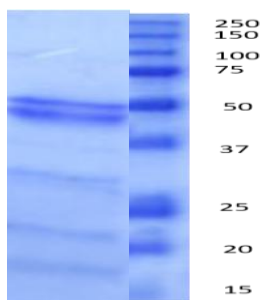


Рис. 4.1.1. Електрофореграма лектину *B. subtilis* IMB B-7724.

Визначення частот поглинання в ІЧ та УФ спектрах. Ефективну оцінку та контроль якості біологічних об'єктів проводять з використанням спектрометричних методів, які базуються на взаємозв'язку між атомно-молекулярною будовою досліджуваних речовин та діапазоном поглинання ними електромагнітних хвиль [185, 186]. Частоти поглинання в ІЧ діапазоні для білків, вуглеводів та ліпідів значно відрізняються, що пов'язано з обертонами основних коливальних частот зв'язків C–H, C=O, N–H, O–H, S–H та їх комбінацій [187]. Показано, що в ІЧ спектрі максимальні частоти поглинання зразків лектину *B. subtilis* IMB B-7724 обумовлені валентним коливанням атомів пептидних зв'язків і характерні саме для білків та пептидів: коливання груп C–H (616 см^{-1}); C–O (1067 см^{-1}); C=C (1386 см^{-1}); C–C (1530 см^{-1}); C=O та –NH (1650 см^{-1}); N–H (2957 см^{-1}), карбонільної групи –COOH (3409 см^{-1}), що підтвердило відсутність у складі отриманої речовини домішок небілкової природи.

Максимуми поглинання лектину *B. subtilis* IMB B-7724 в УФ спектрі відмічали при довжинах хвиль 230 та 280 нм.

Як відомо, УФ-поглинання білків в діапазоні 180–230 нм обумовлюють, головним чином, пептидні групи білкової молекули. Поглинання в діапазоні 230–300 нм зумовлюється наявністю ароматичних бокових ланцюжків залишків триптофану, тирозину, фенілаланіну. Характерні максимуми поглинання для цих амінокислот складають 265–295, 265–285 та 245–270 нм відповідно [188]. Тобто, в зразках отриманої нами речовини присутні лише молекули білка, в складі якого, вірогідно, значну частину складають ароматичні амінокислоти.

Визначення амінокислотного складу отриманого лектину підтвердило попередні висновки, зроблені на основі вивчення спектрофотометричних показників. В складі зразків лектину виявлено 15 амінокислот, серед яких превалювали лейцин (15%) та ароматичні амінокислоти – тирозин (12%) і фенілаланін (11%). Дещо меншим був вміст ізолейцину, аланіну і валіну (8–9%) (рис. 3). Вміст інших 9-ти амінокислот знаходився в межах 2–7%. Серед всіх виявлених амінокислот належать до нейтральних – 60,6%, до ароматичних – 22,5%, до основних – 11,0%, до кислих – 5,9%.

Вуглеводна специфічність лектину *B. subtilis* IMB B-7724. Однією з основних характеристик лектинів, виділених із різних організмів, є специфічність до взаємодії з різними цукрами. Дана властивість надає лектинам унікальності і служить основою для класифікації. Найвищу спорідненість лектин *B. subtilis* IMB B-7724 виявляв до двох типів сіалових кислот (N-ацетілнейрамінової та N-гліколілнейрамінової) та D-глюкуронової кислоти, значно меншу – до фруктозо-1,6-дифосфату (табл. 4.1.1). Інhibуюча дія інших цукрів (D-галактозамін, лактоза, D-глюкоза, D-глюкозамін) на процес аглютинації лектинів з еритроцитами кроля знаходилась на рівні неспецифічності.

Таблиця 4.1.1

Вуглеводна специфічність лектину *B. subtilis* IMB B-7724

Вуглеводи	Мінімальні інhibуючі РГА концентрації вуглеводів, мМ
N-ацетілнейрамінова кислота	0,3
N-гліколілнейрамінова кислота	0,3
D-глюкуронова кислота	0,9
Фруктозо-1,6-дифосфат	18,7

Тобто, отриманий бактеріальний лектин належить до сіалоспецифічних, як і більшість позаклітинних лектинів різних штамів *Bacillus subtilis* [107]. Ця властивість є особливо важливою при дослідженні протипухлинної активності речовини, оскільки саме сіалові кислоти у значній кількості представлені на поверхні більшості пухлинних клітин.

Визначення цитотоксичної активності лектину *B. subtilis* IMB B-7724 по відношенню до пухлинних клітин різного гістогенезу.

Наступний етап дослідження включав визначення та порівняння *in vitro* цитотоксичного впливу речовини на пухлинні клітини різного гістогенезу та видової приналежності. З цією метою ми використали клітини асцитної і солідних пухлин мишей: L1210, АКЕ та КЛЛ; клітини солідних пухлин щурів: карциносаркома Уокера 256 та карцинома Герена; клітинні лінії: К-562, МСF-7,

MDA-MB-231, J-774, A-549. Суспензію злоякісних клітин вносили в лунки 96-лункового планшету по 1×10^4 клітин на лунку в 100 мкл поживного середовища, додавали лектин в різних концентраціях (від 0,02 до 2,0 мг/мл) та інкубували за стандартних умов протягом 2 год. Оцінку цитотоксичного впливу проводили з використанням колориметричного методу МТТ-тесту. За отриманими даними розраховували індекси цитотоксичності для кожної концентрації та визначали IC_{50} – концентрація речовини, за дії якої відмічають загибель 50% клітин-мішеней.

Результати розрахунку IC_{50} для пухлинних клітин різного гістогенезу та походження представлені в таблицях 4.1.2 (клітини, отримані з пухлинної тканини експериментальних тварин, дослідження *ex vivo*) та 4.1.3 (постійні клітинні лінії, отримані з Клітинного банку ліній з тканин людини та тварин ІЕПОР, дослідження *in vitro*).

Таблиця 4.1.2

Цитотоксична активність лектину *B.subtilis* IMB B-7724 по відношенню до пухлинних клітин різного гістогенезу та походження

Клітини перещеплюваних штамів	L1210	АКЕ	КЛЛ	Карциносаркома Уокера 256	Карцинома Герена
IC_{50} , мг/мл	0,25	0,35	0,43	0,40	0,43

Таблиця 4.1.3

Цитотоксична активність лектину *B.subtilis* IMB B-7724 по відношенню до клітин різних ліній

Клітинні лінії	K-562	MCF-7	MDA-MB-231	J-774	A-549
Значення IC_{50} , мг/мл	0,29	0,126	0,063	0,077	0,097

Лектин виявляв неоднакову дозозалежну цитотоксичну активність по відношенню до пухлинних клітин різних ліній. В найменших концентраціях (0,02–0,05 мг/мл) він не мав цитотоксичного впливу на пухлинні клітини.

Додавання лектину в більших концентраціях призводило до пропорційного підвищення його цитотоксичної активності для всіх досліджених типів пухлинних клітин. Найбільш стійкими до дії лектину виявились клітини карциноми легені Льюїс та карциноми Герена: при інкубації протягом 2 год з лектином в найбільшій концентрації (2 мг/мл) ІЦ складав відповідно 81,0 та 84,8%, в той час як для пухлинних клітин інших ліній він коливався в діапазоні 91,0–95,0%. Більш чутливими виявились клітини ліній А-549, J-774, MDA-MB-231 та MCF-7 (рис. 4.1.2 та 4.1.3).

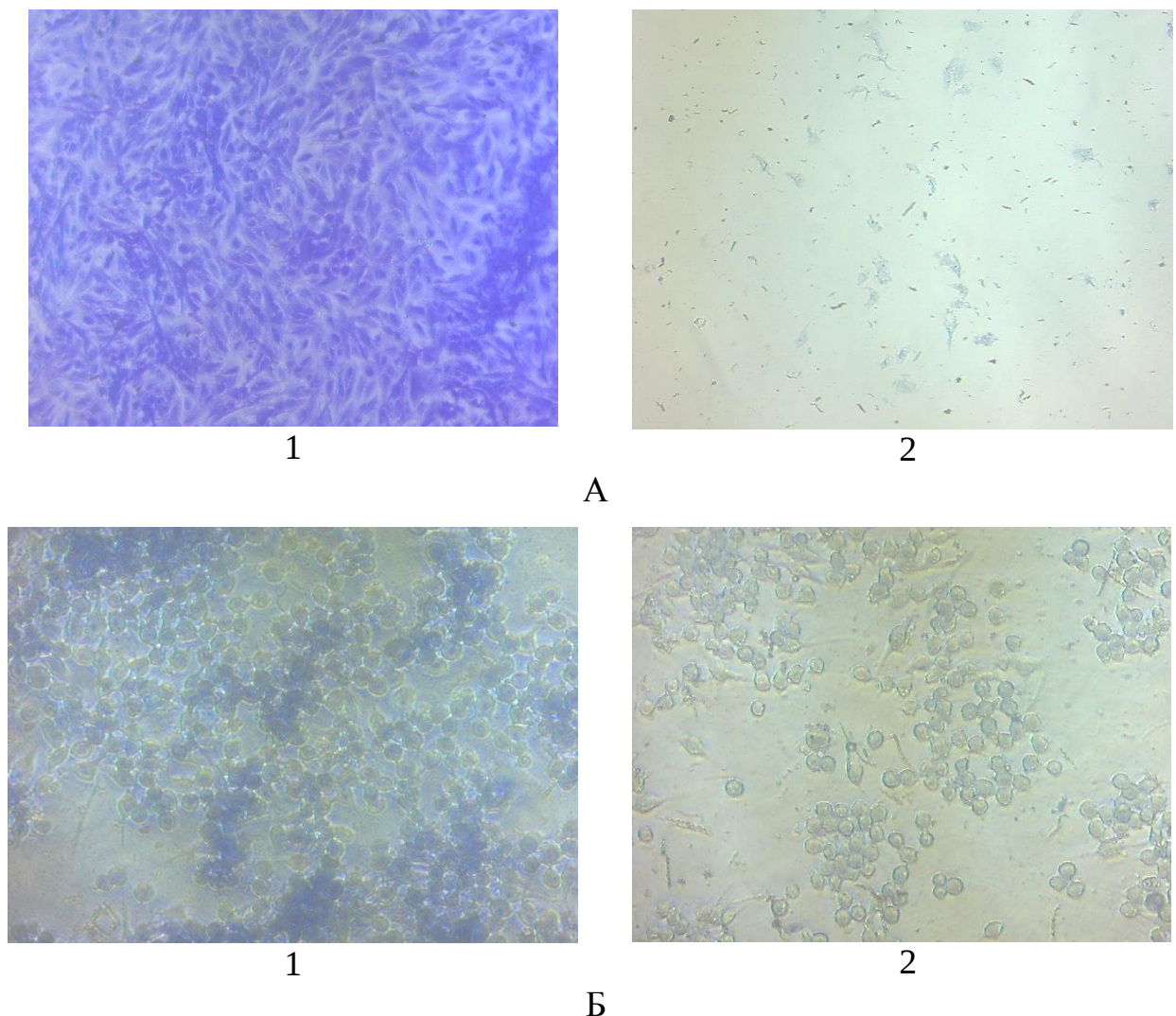
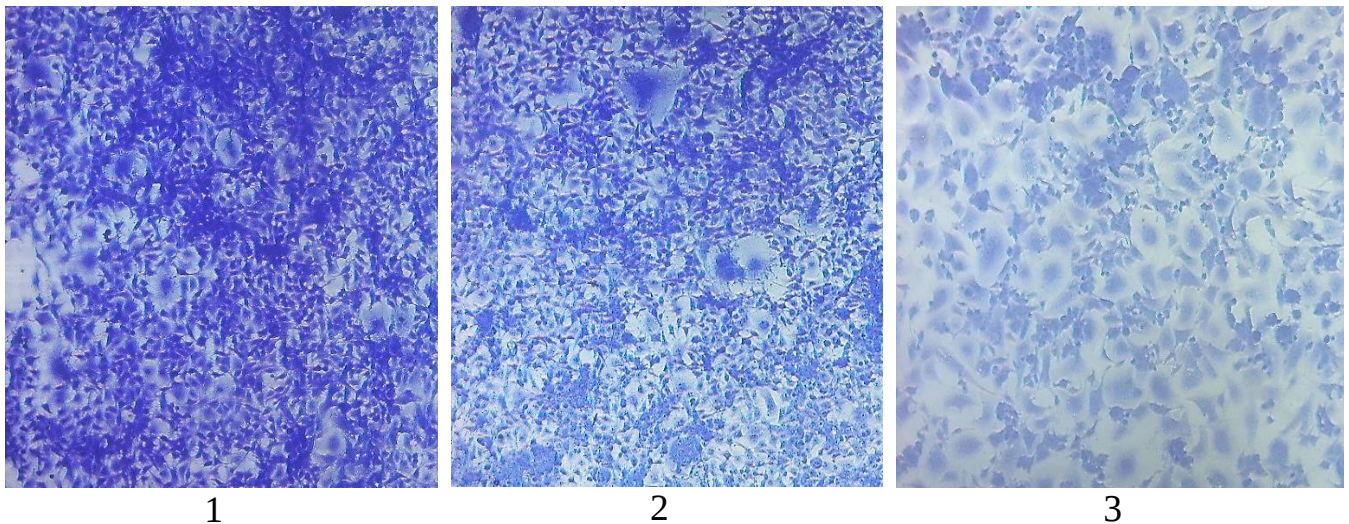
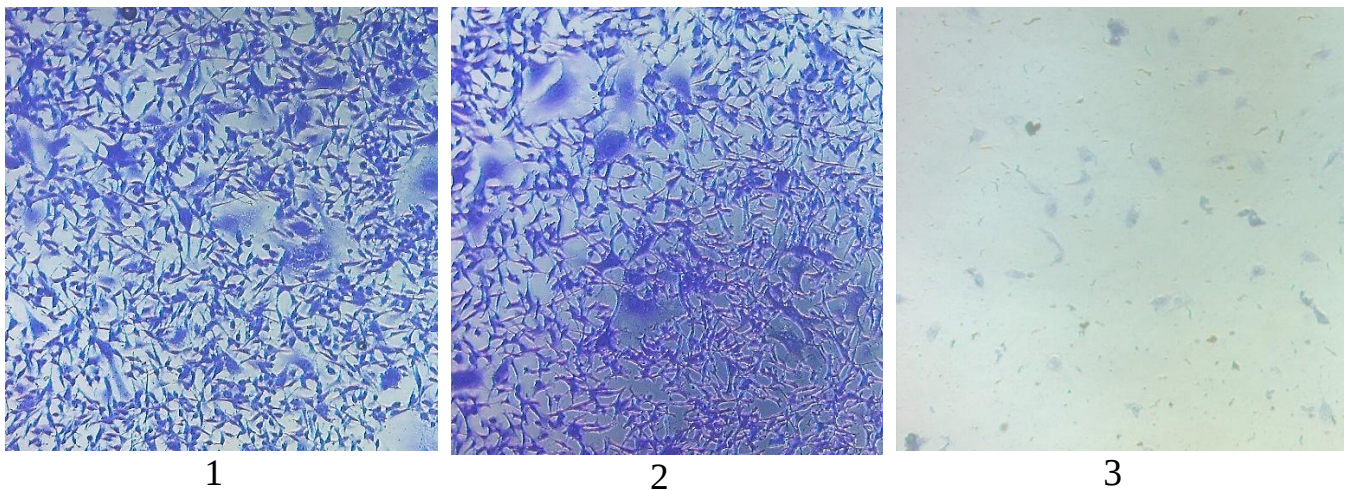


Рис.4.1.2 Цитотоксичний вплив бактеріального лектину на клітини ліній А549 (А) та J-774 (Б): 1 – контроль клітин; 2 – + 0,1 мг/мл лектину, збільшення x200 (А), 400 (Б).

При порівнянні цитотоксичної активності бактеріального лектину по відношенню до клітин раку молочної залози людини різних за злоякісним потенціалом виявилось, що клітини базального підтипу лінії MDA-MB-231 більш чутливі ніж клітини гормон-чутливої лінії MCF-7. Значення IC50 при дії лектину на клітини MDA-MB-231 було в 2 рази нижче, і становило 0,063 мг/мл порівняно з 0,126 для MCF-7 (див. рис. 4.1.3).



А



Б

Рис. 4.1.3. Цитотоксична дія різних концентрацій бактеріального лектину по відношенню до клітин ліній MCF-7 (А) та MDA-MB-231 (Б): 1 – контроль клітин, 2 – + 0,05 мг/мл лектину, 3 – + 0,1 мг/мл лектину, збільшення x200.

Оцінка стабільності лектину *B. subtilis* IMB B-7724. Важливою характеристикою будь-якої речовини, що може бути використана в якості терапевтичного агента, є стабільність до впливу різних факторів зовнішнього середовища та здатність зберігати свої біологічні властивості протягом тривалого часу. Для оцінки згаданих характеристик були проведені дослідження стабільності біологічної активності лектину *B. subtilis* IMB B-7724 при зміні температур (від 20 до 90°C) та рН середовища (від 6,0 до 9,0). В даній серії досліджень використовували лектин в концентрації 1 мг/мл. Прогрівання зразків лектину протягом 1 год. при температурі від 20 до 90°C не призводило до втрати ні гемаглютинуючої, ні цитотоксичної щодо клітин АКЕ активності (табл. 4.1.4).

Таблиця 4.1.4

Стійкість лектину *B. subtilis* IMB B-7724 до зміни температурного режиму

Температура, °C	Показники біологічної активності	
	гемаглютинуюча, титр ⁻¹ РГА	цитотоксична, %
20	1024	97,4±0,3
30	1024	97,6±0,4
40	1024	97,5±0,1
50	1024	97,5±0,1
60	1024	96,9±0,1
70	1024	96,8±0,3
80	1024	95,8±0,3
90	1024	95,9±0,1

Таблиця 4.1.5

Стійкість лектину *B. subtilis* IMB B-7724 до зміни рН середовища

рН	Показники біологічної активності	
	гемаглютинуюча, титр ⁻¹ РГА	цитотоксична, %
контроль	1024	97,6±0,9
6,0	1024	96,2±0,6
6,5	1024	96,4±0,5
7,0	1024	96,5±1,4
7,5	2048	97,0±0,5
8,0	2048	96,8±0,4
8,5	1024	95,9±1,1
9,0	1024	95,0±1,0

Зміна рН середовища в діапазоні від 6,0 до 8,0 також суттєво не впливала на показники біологічної активності досліджуваної речовини. Максимальну гемаглютинуючу активність (2048 титр⁻¹ РГА) лектину спостерігали при значеннях рН 7,5–8,0. Цитотоксична активність усіх досліджених зразків суттєво не відрізнялась від контрольних показників (табл. 4.1.5). Тобто, отриманий нами лектин є термостабільним і стійким до зміни рН середовища.

4.2 Цитотоксична активність лектину *in vitro* по відношенню до клітин імунокомпетентних органів інтактних мишей

Як відомо, застосування лектинів *in vivo*, у ролі цитотоксичних засобів щодо пухлинних клітин, обмежується їх токсичним впливом на клітини різних органів і тканин. З метою обґрунтування вибору концентрації діючої речовини для подальшого дослідження в системі *in vivo* ми оцінили ступінь токсичності (зокрема імунотоксичності) цього лектину для клітин організму інтактних експериментальних тварин.

Оцінили токсичний вплив (протягом 24 год) лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на лімфоцити тимусу і периферичних лімфатичних вузлів (ПЛВ), також на МФ перитонеальної порожнини та селезінки інтактних мишей лінії Balb/c.

Таблиця 4.2.1

Цитотоксична активність (ІЦ, %) лектину *B. subtilis* IMB B-7724 по відношенню до імунокомпетентних клітин інтактних мишей лінії Balb/c

Клітини	Концентрація лектину, мг/мл						
	2,0	1,0	0,5	0,2	0,1	0,05	0,02
Лімфоцити							
тимусу	90,2±3,2	86,7±1,6	68,6±1,6	68,4±5,7	42,8±5,7	0	0
ПЛВ	65,9±2,8	59,2±2,8	42,6±2,8	23,1±0,9	13,5±0,1	0	0
Макрофаги							
селезінки	85,3±0,1	85,2±1,3	70,2±0,6	59,9±2,8	16,8±4,8	0	0
перитонеальної порожнини	85,0±2,1	80,1±0,9	75,8±2,4	60,5±1,3	21,9±8,7	0	0

Як і при дії на пухлинні клітини, цитотоксичний вплив лектину на клітини імунної системи є дозозалежним. Застосування найбільшої концентрації (2 мг/мл) призводило до загибелі 65,9–90,2% клітин лімфоцитарного ряду та 85,0–85,3% МФ (табл. 4.2.1). Інкубація клітин з лектином в концентрації 0,1 мг/мл не супроводжувалась таким вираженим цитотоксичним ефектом, а при додаванні лектину в концентрації 0,05 та 0,02 мг/мл загибелі клітин-мішеней не спростерігали.

Потрібно зазначити, що цитотоксичний вплив бактеріального лектину дещо відрізняється для імунокомпетентних клітин різного походження (рис. 4.2.1). Найменш чутливими виявилися клітини ПЛВ ($IC_{50} = 1$ мг/мл), а найбільшу цитотоксичну активність бактеріальний лектин проявляв по відношенню до лімфоцитів тимусу ($IC_{50} = 0,07$ мг/мл). Цитотоксичний вплив лектину на МФ, отримані і з перитонеальної порожнини, і з селезінки виявився практично однаковим: IC_{50} складав 0,15 та 0,14 мг/мл відповідно.

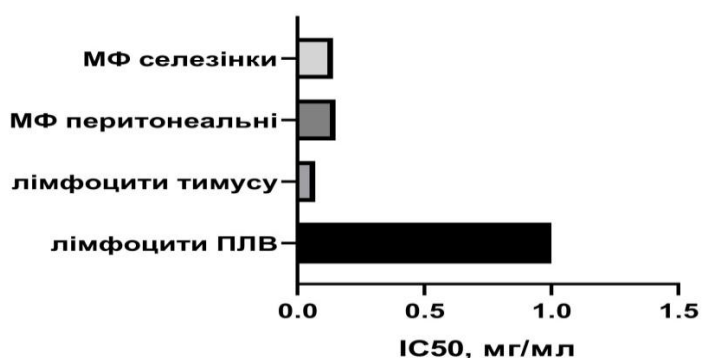


Рис. 4.2.1. Чутливість клітин різних органів імунної системи до цитотоксичної дії лектину *B. subtilis* IMB B-7724.

Отримані результати свідчать про відмінність впливу досліджуваної речовини на клітини лімфоцитарної та моноцитарно-макрофагальної ланок імунної системи. Вірогідно, різний ступінь чутливості клітин імунної системи до цитотоксичного впливу досліджуваного лектину зумовлений наявністю рецепторів певного виду на поверхні клітинної мембрани. Як відомо, кожен з лектинів має свою унікальну вуглеводну специфічність і може зв'язуватись з

певними рецепторами на мембранах клітин організму людини і тварин. Імунокомпетентні клітини несуть значну кількість лектинзв'язуючих рецепторів, які можуть як активувати клітини імунної системи, так і пригнічувати їх проліферацію або індукувати апоптоз останніх. Наприклад, показано, що біологічна роль рецепторів із залишками β D-галактози родини галектинів полягає у формуванні та регуляції імунного гомеостазу організму, а саме контроль за апоптозом Т-лімфоцитів і дозріванням В-лімфоцитів, регуляція процесів вродженого і набутого імунітету. Антигенрозпізнавальний рецептор антигенпрезентуючих клітин, МФ і моноцитів має складнішу будову, розпізнаючи не тільки відсутність свого (за наявності рецепторів до Cal β 1CalNac α (PNA+)), а також і наявність чужого антигену через манозний рецептор (Man+) [189].

4.3 Стимулюючий вплив низьких концентрацій лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на клітини імунної системи інтактних мишей

Як відомо, зв'язування лектинів різного походження з глікокон'югатами рецепторів клітинної поверхні ініціює каскад реакцій, що в кінцевому підсумку призводить до проліферації клітин-мішеней [130, 190]. Тому, наступним етапом нашої роботи було визначення можливого мітогенного впливу низьких концентрацій лектину *B. subtilis* IMB B-7724, які не призводили до загибелі клітин імунної системи, на проліферацію цих клітин. Вплив *in vitro* низьких концентрацій бактеріального лектину на проліферативну активність лімфоцитів ПЛВ інтактних мишей лінії Balb/c оцінювали за допомогою РБТЛ; на показники функціональної активності МФ – за інтенсивністю продукції NO та активністю Arg. Лектин додавали в концентраціях 0,02 та 0,05 мг/мл в лунки з суспензією лімфоцитів або МФ в повному поживному середовищі та інкубували протягом 48 год.

В таблиці 4.3.1 представлені результати порівняльного аналізу впливу бактеріального лектину та стандартних мітогенів на проліферативну активність лімфоцитів ПЛВ. Виявилось, що обидві досліджені концентрації лектину *B. subtilis* IMB B-7724 призводили до збільшення кількості лімфоцитів на 75-80%,

в порівнянні з контролем клітин. Отримані дані були подібні до показника мітогенної активності ліпополісахариду – мітогену бактеріального походження.

Таблиця 4.3.1

Стимулюючий вплив (ІС, %) лектину *B. subtilis* ІМВ В-7724 на лімфоцити периферичних лімфатичних вузлів інтактних мишей лінії Balb/C

Мітоген	Індекс стимуляції, %
Лектин 0,05 мг/мл	77,9±1,3
Лектин 0,02 мг/мл	76,4±1,0
Конканавалін А	128,5±2,4
Ліпополісахарид	77,0±1,7

Таблиця 4.3.2

Показники функціональної активності (NO/Arg) МФ інтактних мишей лінії Balb/C за умов впливу низьких концентрацій лектину *B. subtilis* ІМВ В-7724

Мітоген	МФ селезінки	МФ перитонеальної порожнини
Лектин 0,05 мг/мл	34,8	14,3
Лектин 0,02 мг/мл	32,4	18,6
Ліпополісахарид	32,2	18,2
Контроль (без мітогену)	15,5	13,5

Подібні результати отримані і для клітин макрофагальної ланки: інтенсивність продукції NO була дещо більшою під дією лектину в концентрації 0,02 мг/мл. В таблиці 4.3.2 представлені результати розрахунку співвідношення NO/Arg, за якими можна судити про превалювання процесів активації або пригнічення МФ селезінки та перитонеальної порожнини.

Таким чином, лектин *B. subtilis* ІМВ В-7724, в подальшому може бути досліджений в якості засобу як з цитотоксичною (протипухлинною), так і імуностимулюючою дією. Враховуючи дані щодо дозозалежної цитотоксичної дії лектину на клітини імунної системи необхідно було визначити клас токсичності досліджуваної речовини, обґрунтувати доцільність розширення доклінічних

досліджень, а також оцінити перспективність його використання в якості потенційного лікарського засобу.

4.4 Оцінка токсичного впливу лектину *B.subtilis* IMB B-7724 в системі *in vivo*

Першим етапом дослідження *in vivo* стала оцінка параметрів гострої токсичності лектину *B. subtilis* IMB B-7724 за умови його однократного введення мишам ліній Balb/c та C57Bl/6J. Досліджено 3 способи введення речовини: підшкірний (п/ш), внутрішньоочеревинний (в/о) та пероральний (*per os*). При парентеральному (п/ш та в/о) введенні лектину використані наступні дози: 125, 250, 375, 500 мг/кг маси тварини. Перорально лектин вводили тільки у найбільшій дозі – 500 мг/кг. Підбір використаних доз базувався на результатах попередніх досліджень біологічних властивостей лектину, проведених *in vitro* та на підставі даних літератури щодо цитотоксичних властивостей та активності позаклітинних лектинів сапрофітних бактерій роду *Bacillus* [107]. Досліджуваний препарат вводили одноразово, в об'ємі 1 мл на мишу (в/о та п/ш), 0,8 мл на мишу (*per os*). Тваринам контрольної групи вводили фізіологічний розчин NaCl.

Результати спостереження за тваринами протягом 14 діб показали, що введення *per os* найбільшої з досліджуваних доз (500 мг/кг) лектину *B. subtilis* IMB B-7724 не здійснювало токсичного впливу за всіма досліджуваними показниками незалежно від статі та лінії (Balb/c та C57Bl/6J) експериментальних тварин. У мишей всіх груп виживаність на 14-ту добу становила 100%, показники фізіологічного стану та поведінки залишались в межах норми, ознак інтоксикації не спостерігали. Тобто, LD₅₀ лектину *B. subtilis* IMB B-7724 при його введенні *per os* мишам обох ліній перевищує 500 мг/кг.

При п/ш введенні лектину *B. subtilis* IMB B-7724 загибелі тварин також не спостерігали в жодній з дослідних груп. Проте, короткочасним ефектом у мишей обох ліній при введенні лектину в дозі 500 мг/кг були ознаки нетривалого збудження, яке змінювалось зниженням рухливості, підвищенням частоти дихання, відмовою від їжі. Всі зазначені симптоми зникали протягом 2 год після введення лектину; при подальшому спостереженні за тваринами ознак

інтоксикації не реєстрували. Лектин в менших дозах (125, 250, 375 мг/кг) не викликав жодних клінічних проявів токсичності протягом всього терміну спостереження. Показники маси тіла тварин усіх досліджуваних груп не відрізнялись від таких у контрольних мишей (які не отримували лектин) і знаходились в межах $20,1 \div 22,5$ г. Таким чином, LD_{50} лектину *B. subtilis* IMB B-7724 при його введенні підшкірно мишам ліній Balb/c та C57Bl/6J також більше 500 мг/кг.

В/о введення лектину *B. subtilis* IMB B-7724 супроводжувалось токсичним впливом, ступінь вираженості та клінічні прояви якого залежали від дози введеної речовини. Клінічні симптоми інтоксикації дослідних тварин включали порушення координації рухів, часте поверхнєве дихання, тремор та судороги окремих скелетних м'язів. Незалежно від лінії та статі, при введенні максимальної дози (500 мг/кг) відмічали 100% загибель тварин в усіх групах протягом перших 2 діб. Застосування менших доз речовини (250 та 375 мг/кг) призводило до загибелі частини мишей (50% і 75% відповідно) в групах, введення лектину в дозі 125 мг/кг не супроводжувалось загибеллю тварин.

Показники виживаності та смертності у самців і самок мишей обох ліній при застосуванні відповідної дози речовини не відрізнялись, тому розрахунок показника LD_{50} проводили на всю групу в цілому. Для мишей ліній Balb/c та C57Bl/6J максимально переносима (LD_0) доза складала 125 мг/кг, найменша летальна доза (LD_{16}) – 132 мг/кг, летальна (LD_{100}) – 500 мг/кг. Результати розрахунку LD_{50} наведені в таблиці 4.4.1.

Аналіз отриманих показників свідчить про відсутність суттєвої відмінності між мишами ліній Balb/c та C57Bl/6J за чутливістю до впливу бактеріального лектину при в/о введенні. Значення LD_{50} у мишей лінії C57Bl/6J дещо нижче, проте, різниця не була статистично достовірною.

Таким чином, значення LD_{50} за умови в/о введення мишам суттєво не відрізнялись і складали 281,3 мг/кг (для лінії Balb/c) та 250,0 мг/кг (для лінії C57Bl/6J). Тобто, за показниками виживаності після однократного в/о введення

лектин *B. subtilis* IMB B-7724 можна віднести до IV класу токсичності (малотоксичні речовини) [191].

Таблиця 4.4.1

Показники гострої токсичності лектину *B. subtilis* IMB B-7724 за умови в/о введення

Параметри токсичності	Миші лінії	
	Balb/c	C57Bl/6J
LD ₀ , мг/кг	125	125
LD ₁₆ , мг/кг	132	132
LD ₁₀₀ , мг/кг	500	500
<i>Розрахунок LD₅₀ (мг/кг) за методом Кербера</i>		
LD ₅₀	281,3	250,0
Стандартна помилка LD ₅₀	49,3	46,6
Нижня довірча межа LD ₅₀	164,9	140,0
Верхня довірча межа LD ₅₀	397,6	360,0

В таблиці 4.4.2 наведені дані щодо зміни маси тіла мишей обох ліній за умови в/о введення бактеріального лектину. Показники маси тіла тварин протягом 14 діб спостереження суттєво не змінювались. Відмічали незначне зниження маси протягом перших 3 діб після введення лектину в дозах 250 та 375 мг/кг, але в подальшому цей показник нормалізувався.

При макроскопічному дослідженні внутрішніх органів мишей, що вижили на 14-ту добу після введення лектину, не виявили патологічних змін органів грудної та черевної порожнин. Ознак запалення або деструкції тканини не спостерігали, всі органи мали звичайний колір, консистенцію і масу, що свідчить про відсутність суттєвого токсичного впливу лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на організм експериментальних тварин при одноразовому в/о введенні в дозах, менших за 500 мг/кг. За умови застосування п/ш та перорального шляхів введення токсичний ефект був відсутній для всіх досліджуваних доз препарату.

Таблиця 4.4.2

Динаміка показників маси тіла (г) експериментальних тварин за умови в/о введення лектину *B. subtilis* ІМВ В-7724

Доза лектину, мг/кг	Доба після введення			
	0	3	7	14
Миші лінії Balb/c				
0 (контрольна група)	22,0±0,6	21,8±0,5	22,0±0,7	22,3±0,7
125	22,4±0,3	21,9±1,2	22,5±0,2	23,0±0,3
250	21,8±0,3	19,8±0,4	20,5±0,8	20,8±0,8
375	22,6±0,1	18,5±0,8	20,6±0,3	21,5±0,4
500*	21,6±0,3	—	—	—
Миші лінії C57Bl/6J				
0 (контрольна група)	21,0±0,7	20,6±0,6	21,3±0,3	22,8±0,4
125	20,4±0,7	20,8±0,6	21,6±0,8	22,2±1,0
250	20,5±0,7	18,4±0,7	19,0±0,5	20,3±1,1
375	21,3±0,9	17,3 ± 1,1	18,0±0,9	20,3±1,1
500*	21,8±0,5	—	—	—

Примітка: * – всі миші загинули протягом 2 діб після введення лектину

Оцінка параметрів гострої токсичності дозволяє віднести досліджуваний лектин *B. subtilis* ІМВ В-7724 до малотоксичних речовин. Отримані результати свідчать про доцільність проведення подальших доклінічних досліджень з метою розробки на основі даного бактеріального лектину нового терапевтичного засобу.

4.5 Дослідження токсичного впливу лектину *B.subtilis* ІМВ В-7724 на органи імунної системи

Досліди проведені на інтактних мишах ліній Balb/c та C57Bl/6J. Досліджено два способи введення лектину: підшкірний (п/ш) та внутрішньоочеревний (в/о). Речовину вводили одноразово в об'ємі 1 мл по 100 мг/кг або 10 мг/кг маси тварини. На 14-ту добу після введення лектину визначали показники маси та клітинності селезінки, тимусу ПЛВ та печінки.

Виявлені закономірності реакції з боку імунної системи на введення лектину *B.subtilis* ІМВ В-7724 були однаковими для мишей обох ліній. Не залежно від дози та способу введення речовини показник виживаності у всіх групах тварин

становив 100%. Одноразове введення лектину в дозі 100 мг/кг або 10 мг/кг маси тварини супроводжувалось помірно вираженим токсичним впливом на імунну систему мишей Balb/c (табл. 4.5.1) та C57Bl/6J (табл. 4.5.2).

Таблиця 4.5.1

Вплив лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на показники маси і клітинності імуноткомпетентних органів інтактних мишей лінії Balb/c

Показник	Інтактні миші	Одноразове введення лектину в дозі			
		100 мг/кг маси		10 мг/кг маси	
		в/о	п/ш	в/о	п/ш
Маса миші, г	22,9±1,4	22,1±0,6	23,1±0,9	21,2±1,6	23,8±1,5
Відносна маса,					
селезінки	6,20±0,60	13,8±1,01 ¹	9,94±2,64	12,17±0,4 ¹	7,5±1,49
тимусу	2,71±0,16	3,18±1,06	3,3±0,76	3,58±0,79	2,23±0,32
ПЛВ	2,62±0,21	1,57±0,31 ¹	1,98±0,48	1,68±0,24 ¹	2,06±0,61
печінки	56,8±0,7	76,5±2,7 ¹	72,0±1,4 ¹	65,8±6,1	55,2±4,8
Кількість клітин (x10 ⁶) на 1 мг маси:					
селезінки	1,26±0,11	0,55±0,11 ¹	0,50±0,21 ¹	0,62±0,18 ¹	0,62±0,12 ¹
тимусу	2,27±0,17	2,86±0,86	1,26±0,18 ¹	1,12±0,26 ¹	0,89±0,15 ¹
ПЛВ	1,09±0,08	0,39±0,07 ¹	0,61±0,09 ¹	0,70±0,20	1,79±0,11
Кількість життєздатних клітин (%):					
селезінки	83,8±1,4	80,2±10,3	83,1±5,0	83,3±2,7	85,4±1,6
тимусу	90,4±1,8	87,1±3,17	87,0±2,4	92,3±2,4	94,8±1,7
ПЛВ	87,9±2,3	65,3±0,7 ¹	65,5±0,6 ¹	72,9±2,3 ¹	82,5±1,9
Характеристика перитонеальних МФ					
загальна кількість клітин, x10 ⁶	3,3±0,3	2,7±1,4	5,3±0,2 ¹	2,8±1,4	5,5±0,8 ¹
кількість життєздатних клітин, %	95,5±4,0	86,1±2,9	89,7±2,2	88,7±1,8	92,0±1,6

1 – p < 0,05 порівняно з показниками інтактних мишей

Особливо вираженими зміни досліджуваних показників були при застосуванні лектину в дозі 100 мг/кг (незалежно від шляху введення) та в дозі 10 мг/кг за умови в/о введення. Відмічали збільшення відносної маси селезінки та печінки, зменшення відносної маси тимусу та периферичних лімфатичних вузлів; зменшення клітинності імуноткомпетентних органів та відсотку живих лімфоцитів.

Одноразове п/ш введення лектину в дозі 10 мг/кг не мало суттєвого впливу на досліджувані показники у мишей обох ліній. При застосуванні п/ш шляху введення речовини, незалежно від дози, відмічали суттєве збільшення кількості перитонеальних МФ.

Таблиця 4.5.2

Вплив лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на показники маси і клітинності імунотетентних органів інтактних мишей лінії C57Bl/6J

Показник	Інтактні миші	Одноразове введення лектину в дозі			
		100 мг/кг маси		10 мг/кг маси	
		В/О	П/К	В/О	П/К
Маса миші, г	20,8±1,1	19,5±1,2	20,1±0,7	20,2±1,5	21,4±0,4
Відносна маса,					
селезінки	5,60±0,60	8,50±2,41	7,83±2,50	7,69±2,34	4,93±0,2
тимусу	4,44±0,10	3,38±1,39	3,69±0,10 ¹	3,46±0,20 ¹	4,53±0,60
ПЛВ	2,23±0,20	1,48±0,64 ¹	1,92±0,13	1,49±0,10 ¹	2,55±0,10
печінки	63,1±5,3	78,1±2,1 ¹	68,5±4,2	65,9±3,5	59,4±4,4
Кількість клітин (x10 ⁶) на 1 мг маси:					
селезінки	1,85±0,18	0,58±0,10 ¹	0,76±0,13 ¹	0,62±0,11 ¹	0,98±0,12 ¹
тимусу	2,44±0,25	1,21±0,10 ¹	1,32±0,16 ¹	1,64±0,32	1,98±0,23
ПЛВ	1,42±0,10	0,99±0,44	0,88±0,10 ¹	1,01±0,30	1,45±0,50
Кількість життєздатних клітин (%):					
селезінки	93,8±2,4	81,3±4,3 ¹	85,6±2,3	88,6±5,4	95,0±2,1
тимусу	90,4±1,2	84,2±1,7 ¹	85,1±4,2	92,5±1,0	94,1±3,2
ПЛВ	93,2±1,3	72,1±5,1 ¹	70,8±5,9 ¹	82,7±3,3 ¹	83,8±4,5
Характеристика перитонеальних МФ					
загальна кількість клітин, x10 ⁶	2,7±0,5	1,3±0,8	8,3±0,9 ¹	2,4±0,9	7,5±0,4 ¹
кількість життєздатних клітин, %	94,5±3,7	91,1±5,1	97,3±2,3	94,8±0,6	96,8±3,5

1 – p < 0,05 порівняно з показниками інтактних мишей

Була проведена також оцінка впливу лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на показники функціональної активності клітин лімфоцитарного (відповідь на

мітоген ConA) та макрофагального (цитотоксична активність) ряду. Результати дослідження наведені в таблиці 4.5.3.

Таблиця 4.5.3.

Показники функціональної активності лімфоцитів і МФ інтактних мишей за умови впливу лектину *B. subtilis* IMB B-7724

Показник	Інтактні миші	Одноразове введення лектину в дозі			
		100 мг/кг маси		10 мг/кг маси	
		в/о	п/к	в/о	п/к
Відповідь лімфоцитів ПЛВ на ConA, індекс РБТЛ (%)					
миші лінії Balb/c	1,30±0,16	0,81±0,06 ¹	0,95±0,01	0,80±0,01 ¹	1,36±0,03
миші лінії C57Bl/6J	1,50±0,08	0,75±0,08 ¹	1,31±0,23	1,13±0,14	1,43±0,12
Цитотоксична активність перитонеальних МФ до клітин АКЕ, ІЦ (%)					
миші лінії Balb/c	25,6±1,9	18,2±2,2 ¹	24,0±1,3	23,1±1,1	27,2±1,9
миші лінії C57Bl/6J	18,4±1,3	10,5±2,8 ¹	16,9±2,1	15,5±1,3	19,4±1,9

Отримані результати свідчать, що статистично достовірне пригнічення активності як лімфоцитів, так і МФ відбувалося при одноразовому в/о введенні лектину в більшій дозі (100 мг/кг маси). Натомість застосування лектину в дозі 10 мг/кг маси не супроводжувалось імуносупресивним ефектом. Тому для подальших досліджень протипухлинної дії лектину *B. subtilis* IMB B-7724, опосередкованої через оптимізацію імунної відповіді на пухлинний процес, доцільне застосовування дози 10 мг/кг маси.

Підсумовуючи отримані результати можна сказати, що отримана з культуральної рідини *B. subtilis* IMB B-7724 активна речовина є глікопротеїном (білок – 86,0%, вуглеводи – 7,0%) та не містить домішів інших високомолекулярних сполук. Елементний склад: вуглець – 34,00%, водень – 7,04%, азот – 16,61%, кисень – 42,35%. Виявлена значна гемаглютинуюча активність свідчить про те, що отримана речовина є лектином. Лектин *B. subtilis* IMB B-7724 виявляв найвищу спорідненість до N-ацетілнейрамінової та N-гліколілнейрамінової кислот (мінімальні інгібуючі концентрації вуглеводів – 0,3 мМ), що дозволяє віднести його до сіалоспецифічних. В амінокислотному

складі лектину превалюють лейцин (15%) та ароматичні амінокислоти: тирозин (12%) і фенілаланін (11%). Позаклітинний бактеріальний лектин має високу термостабільність, стійкий до зміни рН середовища та зберігання протягом тривалого часу. За всіма зазначеними характеристиками отриманий нами лектин подібний до інших бактеріальних лектинів, виділених з різних штамів *Bacillus subtilis* [107, 135]. З точки зору біотехнологічного виробництва, процес отримання позаклітинного бактеріального лектину досить простий і можливий для стандартизації.

Лектин *B.subtilis* IMB B-7724 є малотоксичною речовиною, володіє імуномодулюючою активністю у інтактних мишей, виявляє цитотоксичну активність *in vitro* по відношенню до пухлинних клітин різного гістогенезу. Одержані результати дослідження властивостей лектину обґрунтовують доцільність подальшого вивчення зазначеної речовини з метою можливого застосування в якості засобу протипухлинної терапії.

Результати досліджень, описані в підрозділах 4.1-4.5 опубліковані у [19, 192-194].

РОЗДІЛ 5

ОЦІНКА ПОЛЯРИЗАЦІЇ МАКРОФАГІВ ІНТАКТНИХ МИШЕЙ ЗА УМОВИ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЕКТИНУ *B. subtilis* IMB B-7724 *IN VITRO*

Як вже відзначалось, МФ – високопластичні клітини, які здатні змінювати свій поляризаційний стан внаслідок дії ряду зовнішніх стимулів (цитокіни, фактори росту, продукти мікробного синтезу та ін). Визначення механізмів переключення МФ M1/M2 та пошук можливих шляхів регуляції процесу їх поляризації є одним із сучасних напрямків оптимізації імунотерапії. Відомо, що активація МФ класичним шляхом опосередкована впливом IFN- γ або/та LPS на поверхневі рецептори IFN- γ R/TLR4, подальша експресія STAT1-залежних генів обумовлює поляризацію до M1. Альтернативний шлях активації МФ опосередкований впливом IL-4 або IL-10 на поверхневі рецептори IL-4R α або IL-10R, відповідно. Внаслідок активації відповідних сигнальних шляхів відбувається експресія транскрипційних факторів STAT6 або STAT3, що обумовлює напрямок поляризації M2. Тому при дослідженні можливого механізму поляризації МФ інтактних мишей лінії Balb/C під впливом лектину *B. subtilis* IMB B-7724 була проведена оцінка функціонального стану макрофагів за визначенням рівнів продукції NO, активності Arg, рівнів експресії мРНК транскрипційних факторів STAT1 та STAT6. В якості контролю поляризації МФ інтактних мишей в напрямку M1 в поживне середовище культивування додавали IFN- γ (20 нг/мл) в комбінації з LPS (100 нг/мл); для поляризації в напрямку M2 – використовували IL-4. Термін інкубації складав 24 год В якості контрольних зразків при проведенні всіх досліджень використані відповідні показники МФ інтактних тварин, які не піддавались впливу стимулюючих факторів.

На першому етапі дослідження була проведена оцінка впливу *in vitro* лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на перитонеальні МФ інтактних мишей лінії Balb/c. Показано, що дія бактеріального лектину є дозозалежною (таблиця 5.1.).

Таблиця 5.1.

Активність лектину *B. subtilis* IMB B-7724 по відношенню до перитонеальних МФ інтактних мишей лінії Balb/c

Концентрація лектину, мг/мл	Цитотоксична активність (%) внаслідок інкубації протягом	
	2 год	24 год
2,0	86,1 ± 1,6	85,0 ± 2,1
1,0	82,1 ± 2,1	80,1 ± 0,9
0,5	60,4 ± 3,9	75,8 ± 2,4
0,2	54,4 ± 5,1	60,5 ± 1,3
0,1	25,4 ± 6,9	21,9 ± 4,7
0,05	0	0
0,02	0	0
IC ₅₀	0,155 ± 0,007	0,148 ± 0,005

IC₅₀ – концентрація речовини, за дії якої відмічають загибель 50% клітин-мішеней; Ц, % – індекс цитотоксичної активності

При застосуванні концентрацій від 0,1 до 2,0 мг/мл лектину *B. subtilis* IMB B-7724 спостерігали цитотоксичний вплив. Розрахунок IC₅₀ показав, що величина цитотоксичного ефекту не залежала від терміну впливу лектину. Показник IC₅₀ після 2 год сумісної інкубації з лектином становив 0,155 мг/мл; після 24 год інкубації – 0,148 мг/мл. Інкубація з лектином в менших дозах (0,05 та 0,02 мг/мл) не мала цитотоксичного ефекту. Враховуючи отримані результати, для подальших досліджень були обрані найменші концентрації речовини – 0,05 та 0,02 мг/мл.

Вплив лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на спрямованість поляризації МФ інтактних тварин оцінювали за визначенням рівня продукції NO, активністю Arg та розрахунком співвідношення цих показників (NO/Arg). При дії на МФ LPS в комбінації із IFN-γ спостерігали збільшення величини співвідношення NO/Arg в 1,3 разу порівняно з показником ІК (рис. 5.1), що характерно для M1 фенотипу. Натомість, наслідком впливу IL-4 було достовірне зниження показника співвідношення NO/Arg порівняно з ІК (в 1,9 разу), що свідчить про превалювання активності аргінази в процесі метаболізму L-аргініну та є ознакою M2 фенотипу. Отримані результати корелюють з даними літератури щодо

можливості зміни напрямку поляризації МФ за допомогою впливу LPS, IFN- γ , IL-4 та IL-10 [12, 71].

Додавання в середовище культивування макрофагів лектину *B. subtilis* IMB B-7724 в концентрації 0,02 мг/мл призводило до суттєвого збільшення продукції NO та зменшення активності Arg, що проявляється у зростанні величини співвідношення NO/Arg в 1,4 разу порівняно з ІК (18,6 ум.од. та 13,5 ум.од. відповідно) і практично не відрізняється від показника, отриманого при сумісній дії LPS + IFN- γ , що становив 18,1 ум.од. Інкубація МФ з лектином в концентрації 0,05 мг/мл не призводила до зміни показника величини співвідношення NO/Arg порівняно із ІК (див. рис. 5.1).

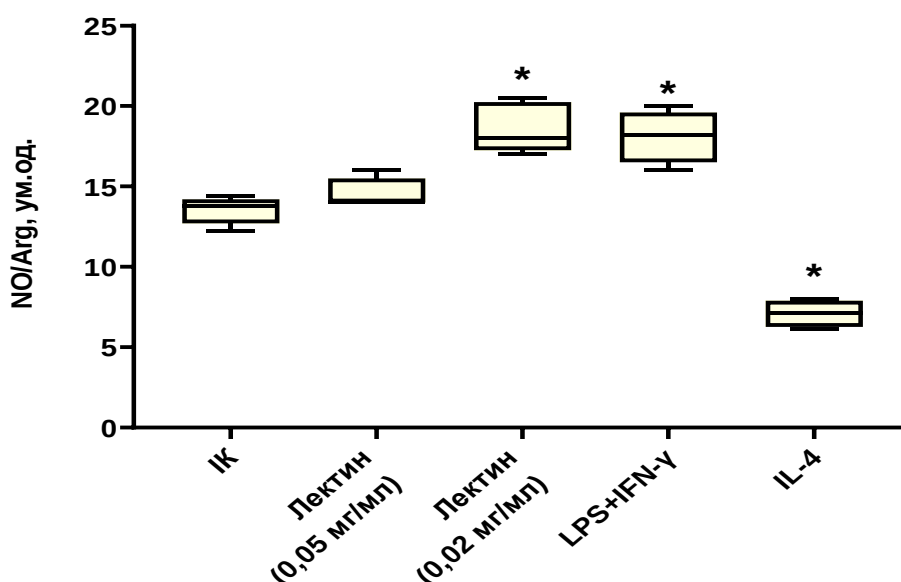


Рис. 5.1 Зміни співвідношення NO/Arg при дії різних стимулів на перитонеальні МФ інтактних мишей лінії Balb/C,

*– $p < 0,05$ порівняно з інтактним контролем.

Беручи до уваги однаковий ефект при сумісній дії LPS + IFN- γ та лектину в концентрації 0,02 мг/мл, про що свідчать показники співвідношення NO/Arg (відповідно 18,1 ум.од. проти 18,6 ум.од., $p > 0,1$), ми вирішили дослідити, чи подібні їх механізми дії. Для цього оцінили рівні експресії мРНК STAT1 та STAT6 у всіх експериментальних групах, оскільки відомо, що ці ТФ є регуляторами поляризації МФ у фенотипи M1 або M2, відповідно. Рівні експресії

мРНК STAT1 в МФ після їх коактивації з LPS + IFN- γ та лектином у концентрації 0,02 мг/мл були значно вищими порівняно з інтактним контролем – 1,52 ум.од. та 1,75 ум.од. проти 1 ум.од. відповідно (рис. 5.2, А). Натомість вплив лектину в концентрації 0,05 мг/мл не спричинив змін рівня експресії мРНК STAT1. Як і очікувалося, ми не спостерігали різниці в рівні експресії мРНК STAT6 після застосування LPS + IFN- γ та лектину в обох концентраціях, оскільки цей ТФ бере участь у поляризації M2, а не M1 (рис. 5.2, Б).

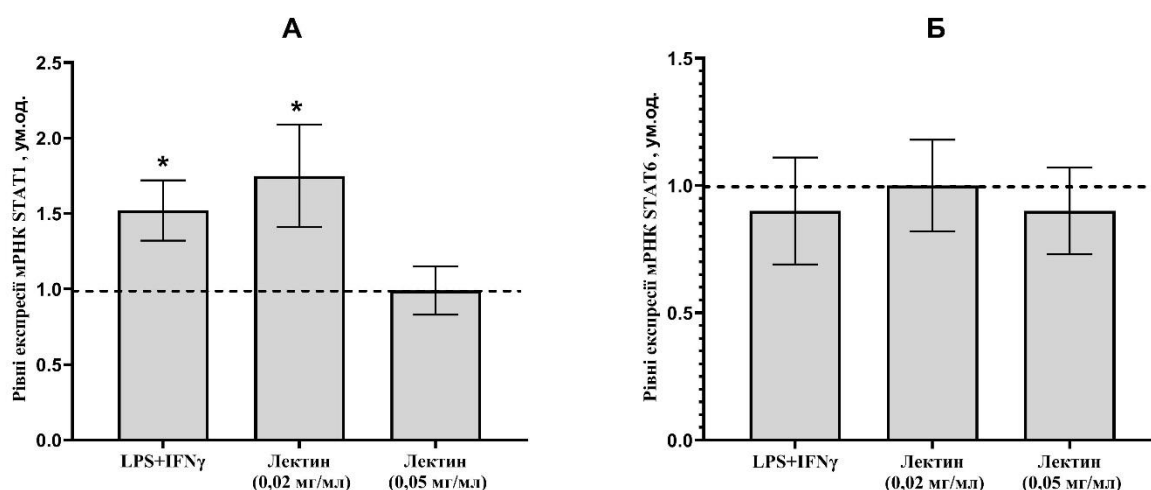


Рис. 5.2 Рівні експресії мРНК STAT1 (А) та STAT6 (Б) при дії різних стимулів на перитонеальні МФ інтактних мишей лінії Balb/C. Пунктирна лінія ілюструє рівень показника інтактного контролю.

* – $p < 0,05$ порівняно з інтактним контролем.

Подібно до співвідношення NO/Arg, аналіз співвідношення рівня експресії мРНК STAT1 до рівня експресії мРНК STAT6 (співвідношення STAT1/STAT6) дозволяє оцінити напрямок поляризації M1/M2 (12, 13, 70). Комбінований ефект LPS + IFN- γ , а також лектину в концентрації 0,02 мг/мл, призвів до значного збільшення співвідношення STAT1/STAT6 порівняно з інтактним контролем і був подібним до даних, що спостерігались при аналізі співвідношення NO/Arg (рис.5.3).

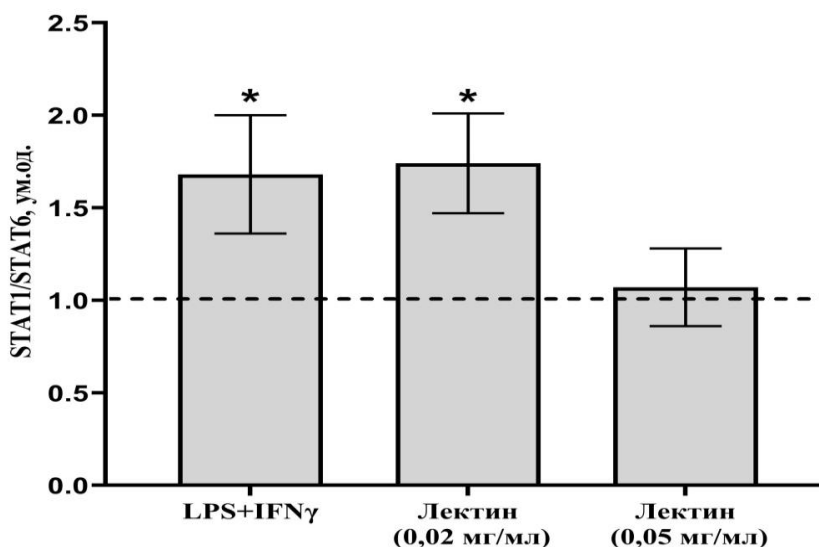


Рис. 5.3 Співвідношення STAT1/STAT6 в МФ під дією різних стимулів.

Пунктирна лінія ілюструє рівень показника інтактного контролю,

* – $p < 0,05$ порівняно з інтактним контролем.

За літературними даними відомо, що дія IFN- γ та/або LPS у МФ спричиняє підвищення регуляції експресії ферменту NOS2 (через STAT1-залежний шлях), який метаболізує L-аргінін до NO та цитруліну та є характерним для M1 фенотипу. Під дією IL-4 збільшується експресія ферменту аргінази, який гідролізує L-аргінін до орнітину та сечовини, що є характерною функціональною особливістю формування субпопуляції клітин з фенотипом M2 [12, 71]. Коли МФ поляризовані в напрямку M1, відбувається зміщення відношення NO/Arg у бік збільшення вироблення NO, ймовірно, внаслідок збільшення експресії NOS2 та зниження активності аргінази.

Таким чином вплив лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на перитонеальні МФ інтактних мишей лінії Balb/C *in vitro* є дозозалежним: $\geq 0,1$ мг/мл – цитотоксичний; 0,02 та 0,05 мг/мл – стимулюючий (за показниками функціональної активності). А також, при дії низьких концентрацій бактеріального лектину відбувається суттєве збільшення співвідношення NO/Arg в бік зростання продукції NO, що є характерним для МФ з фенотипом M1.

Лектин *B. subtilis* IMB B-7724 призводить до зростання співвідношення рівнів експресії мРНК STAT1/STAT6 – компонентів JAK-STAT сигнального шляху, в макрофагах, яке достовірно не відрізняється від відповідних показників за сумісної дії LPS та IFN- γ (в 1,4 та 1,3 разу відповідно).

Результати досліджень, описані в розділі 5, опубліковані у [195, 196].

РОЗДІЛ 6

ВПЛИВ ЛЕКТИНУ *B. subtilis* IMB B-7724 НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ ПОЛЯРИЗАЦІЮ МАКРОФАГІВ В ПРОЦЕСІ РОСТУ ПУХЛИН

Як було зазначено вище (розділ 1.5.2), високоспецифічне зв'язування лектинів з вуглеводними рецепторами на поверхні клітин (як нормальних, так і трансформованих) відіграє провідну роль в активації ряду внутрішньоклітинних процесів, які приводять до знищення клітини-мішені шляхом реалізації таких механізмів, як апоптоз, аутофагія, інгібування клітинної проліферації. Ця властивість лектинів може бути використана при розробці нових біотерапевтичних препаратів для підвищення ефективності протипухлинної терапії. Проте, важливою є не лише пряма цитотоксична дія лектину на пухлинні клітини, але й опосередкований вплив лектинів шляхом модулювання імунних реакцій. Зокрема показана здатність лектинів впливати на інтенсивність синтезу інтерферону, підсилювати активність НК-клітин та МФ за рахунок зв'язування із специфічними поверхневими вуглеводами, що призводить до зміни функціонального стану цих клітин [197-199]. Тому наступним етапом нашої роботи стало дослідження протипухлинної ефективності лектину *B.subtilis* IMB B-7724, а також його впливу на прояви функціональної активності МФ у мишей з модельним пухлинним процесом.

6.1 Визначення протипухлинної активності лектину *B.subtilis* IMB B-7724 у мишей з модельним пухлинним процесом

В цьому фрагменті досліджень також використані 2 моделі експериментального пухлинного росту: АКЕ, КЛЛ. Для кожної моделі формували по 2 групи тварин: «Контроль пухлинного росту (КПР)» – неліковані миші з пухлинами (n = 10); «Лектин» – миші з пухлинами, яким починаючи з 2-ї доби після введення пухлинних клітин вводили лектин *B. subtilis* IMB B-7724 (п/ш, 1 мг/кг маси (вага тварин 20 г), через день, загальний курс 10 введень) (n = 10). Перебіг пухлинного процесу (на моделях АКЕ і КЛЛ) характеризували за

стандартними показниками: частота перещеплення (%) та латентний період виходу пухлин, об'єм пухлин (мм³), тривалість життя тварин з пухлинами, розраховували ІГРП. На моделі КЛЛ додатково оцінювали показники метастазування.

Результати дослідження наведені в табл. 6.1.1. Незалежно від експериментальної пухлини застосування лектину *B.subtilis* ІМВ В-7724 не впливало на частоту прищеплення пухлин – пухлини виникали у всіх тварин. Проте аналіз показників, що характеризують подальший перебіг пухлинного процесу, свідчив про певні відмінності в ефективності застосування лектину *B.subtilis* ІМВ В-7724 у мишей з АКЕ та КЛЛ.

Таблиця 6.1.1

Протипухлинна ефективність лектину *B.subtilis* ІМВ В-7724

Показник	Експериментальна модель пухлинного росту			
	АКЕ		КЛЛ	
	«КПР»	«Лектин»	«КПР»	«Лектин»
Частота прищеплення пухлин, %	10/10	10/10	10/10	10/10
Частота метастазування, %	не метастазує	не метастазує	91,7±7,7 (10/10)	91,7±7,7 (10/10)
Латентний період виходу пухлин, діб	5,4±0,1	7,4±0,2 ¹	9,3±1,2	10,5±1,3
Розмір первинного пухлинного вузла на 35-ту добу (мм ³)	6279,6±816,9	3071,5±243,8 ¹	3472,9±270,6	2721,0±307,5
Середня тривалість життя з моменту перещеплення пухлинних клітин, діб	31,2±0,7	53,0±1,6 ¹	44,9±4,2	39,6±2,7
ІЗТЖ, %	•	78	•	3
ІГРП, %	•	53,2±1,4	•	18,2±1,8
ІІМ, %	не метастазує	не метастазує	•	36,0±4,5

¹ – p<0,05 порівняно з показником групи «КПР»

У мишей з АКЕ відмічали суттєве збільшення латентного періоду виникнення пухлин у тварин, яким вводили лектин (в 1,4 разу порівняно з нелікованими, p < 0,05). Для мишей групи «Лектин» характерними були

гальмування росту первинної пухлини та статистично достовірне збільшення тривалості життя тварин з пухлинами (в 1,8 разу порівняно з нелікованими, $p < 0,05$). Якщо на 42-гу добу пухлинного процесу в групі «КПР» не залишилося жодної тварини, застосування лектину дозволило збільшити тривалість життя частини мишей до 63–73 діб після перещеплення пухлинних клітин. ІГРП в групі тварин, яким вводили бактеріальний лектин, складав 53,2% (див. табл. 6.1.1). Отримані результати підтверджують протипухлинну ефективність лектину *B.subtilis* IMB B-7724 у мишей Balb/c на моделі АКЕ.

Введення лектину мишам з КЛЛ було менш ефективним. Як пухлини, так і метастази реєстрували у всіх тварин контрольної та дослідної груп. У тварин контрольної та дослідної груп показники росту первинної пухлини та метастазування суттєво не відрізнялися. ІГРП складав 18,2%, ПМ – 36,0%. Отримані дані свідчать про відсутність протипухлинного ефекту при застосуванні лектину *B.subtilis* IMB B-7724 у тварин з КЛЛ без видалення первинної пухлини (див. табл. 3.1.2).

Таким чином, застосування лектину *B.subtilis* IMB B-7724 виявилось більш ефективним на моделі неметастазуючої солідної АКЕ. Тому, для подальшого дослідження можливості зміни функціональних властивостей (перепрограмування) МФ під впливом бактеріального лектину нами була відібрана саме ця експериментальна модельна пухлина.

6.2 Вплив лектину *B.subtilis* IMB B-7724 на показники функціональної активності макрофагів в процесі росту аденокарциноми Ерліха

Оцінюючи вплив лектину *B.subtilis* IMB B-7724 на функціональну активність МФ, вивчали поляризацію перитонеальних МФ мишей лінії Balb/c на 14-, 21- та 28-му доби після трансплантації солідної АКЕ за комплексом показників: рівні продукції NO, аргіназна та цитотоксична активність.

На 14-ту добу росту пухлини у нелікованих мишей відмічали зменшення продукції NO перитонеальними МФ з одночасним збільшенням активності Arg, про що свідчить достовірне зниження в 1,6 разу співвідношення NO/Arg

порівняно з інтактними тваринами. Така тенденція зберігалась протягом всього періоду спостереження (рис. 6.2.1). В групі мишей, яким вводили лектин, рівень цього показника на 14-ту добу статистично достовірно ($p < 0,05$) перевищував такий в групі «КПР» (10,8 ум.од. проти 8,4 ум.од.), хоча і не досягав рівня інтактних мишей. В подальшому, на 21-шу та 28-му доби спостереження, рівень співвідношення NO/Arg для перитонеальних МФ мишей групи «Лектин» суттєво ($p < 0,05$) перевищував показники тварин групи «КПР» (13,8 ум.од. проти 6,0 ум.од. та 12,4 ум.од. проти 6,4 ум.од. відповідно) і зберігався на рівні інтактних мишей (див. рис. 6.2.1).

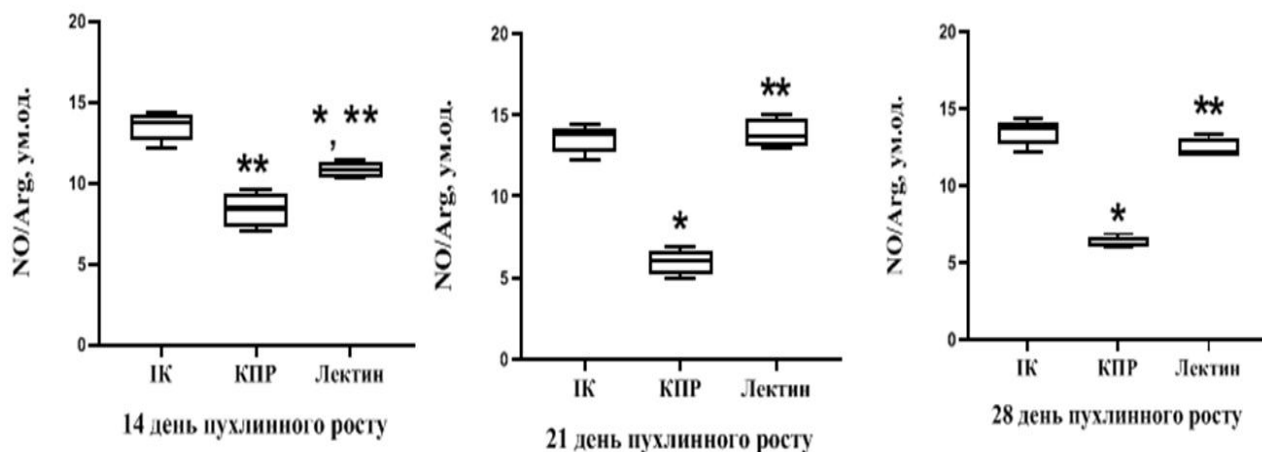


Рис. 6.2.1 Зміни співвідношення NO/Arg для перитонеальних МФ мишей Balb/c; * – $p < 0,05$ порівняно з показником групи «ІК», ** – $p < 0,05$ порівняно з показником групи «КПР».

Отримані результати свідчать, що застосування лектину *B. subtilis* IMB B-7724 сприяло збереженню вихідного функціонального стану перитонеальних МФ мишей з перещепленими пухлинами протягом всього періоду спостереження. Тобто, за умови введення лектину, не лише на початкових, але й на термінальних етапах росту пухлини в популяції перитонеальних МФ превалювали клітини з фенотипом M1.

Подібну динаміку відмічали і при дослідженні специфічної цитотоксичної активності перитонеальних МФ мишей з АКЕ на різні доби пухлинного росту (табл. 6.2.1).

Таблиця 6.2.1

Індекс специфічної цитотоксичної активності (%) перитонеальних макрофагів мишей Balb/c з карциномою Ерліха

Група	Доба після введення пухлинних клітин		
	14	21	28
Інтактний контроль	25,6±1,9		
КІР	25,0±4,1	16,9±1,4 ¹	13,8±0,5 ¹
Лектин	20,4±2,5	32,1±2,2 ^{1,2}	38,5±4,5 ^{1,2}

¹ р < 0,05 порівняно з показником групи «ІК»

² р < 0,05 порівняно з показником групи «КІР»

На ранніх етапах пухлинного росту не спостерігали суттєвих відмінностей між показниками специфічної цитотоксичної активності перитонеальних МФ мишей груп «КІР» та «Лектин». Починаючи з 21-ї доби експерименту в групі нелікованих тварин ці показники були суттєво нижчими (р < 0,05), порівняно з інтактними мишами. За умови застосування бактеріального лектину на 21-шу та 28-му доби росту пухлини (повністю проведений курс лікування) індекс цитотоксичної активності перитонеальних МФ статистично достовірно (р < 0,05) перевищував відповідні показники не лише нелікованих, а й інтактних мишей. Останнє теж може вказувати на тривале збереження клітин з фенотипом М1 серед перитонеальних МФ мишей, яким вводили лектин *B. subtilis* ІМВ В-7724.

Таким чином, застосування лектину *B. subtilis* ІМВ В-7724 у мишей з АКЕ сприяло збереженню М1 стану перитоніальних макрофагів протягом всього періоду спостереження, про що свідчить достовірне збільшення порівняно з показниками нелікованих тварин рівнів 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. Виявлений сильний кореляційний зв'язок між показником індексу гальмування росту пухлин та рівнем співвідношення NO/Arg (r = 0,74, р < 0,05).

6.3 Вплив лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на показники рівнів експресії мРНК транскрипційних факторів IRF5/IRF4, STAT1/STAT6 у макрофагах в процесі росту аденокарциноми Ерліха

Динаміку та напрямок виявлених змін оцінювали також за рівнем експресії мРНК транскрипційних факторів STAT та IRF на 21-шу та 28-му доби після введення пухлинних клітин, оскільки ці сигнальні молекули відомі як регулятори поляризації МФ до фенотипу M1 (STAT1 та IRF5) або M2 (STAT6 та IRF4) [67, 200, 201].

Оцінку напрямку поляризації МФ M1/M2 проводили за показниками співвідношення рівня експресії мРНК STAT1/STAT6 та IRF5/IRF4. На 21-шу добу після введення клітин АКЕ у мишей групи «Лектин» (повністю проведений курс лікування) відмічали значне збільшення показника STAT1/STAT6 порівняно з таким у групі «КПР» (7,14 ум.од. проти 2,65 ум.од., $p < 0,05$) (рис. 6.3.1 А). Тобто, зміни показників співвідношення STAT1/STAT6 в зразках МФ корелюють з показниками їх функціональної активності (продукція NO, цитотоксична активність). Натомість, в результаті впливу лектину *B. subtilis* IMB B-7724 показники співвідношення IRF5/IRF4 на 21-шу добу пухлинного росту не відрізнялись від таких у групі «КПР» (рис. 6.3.1 Б.).

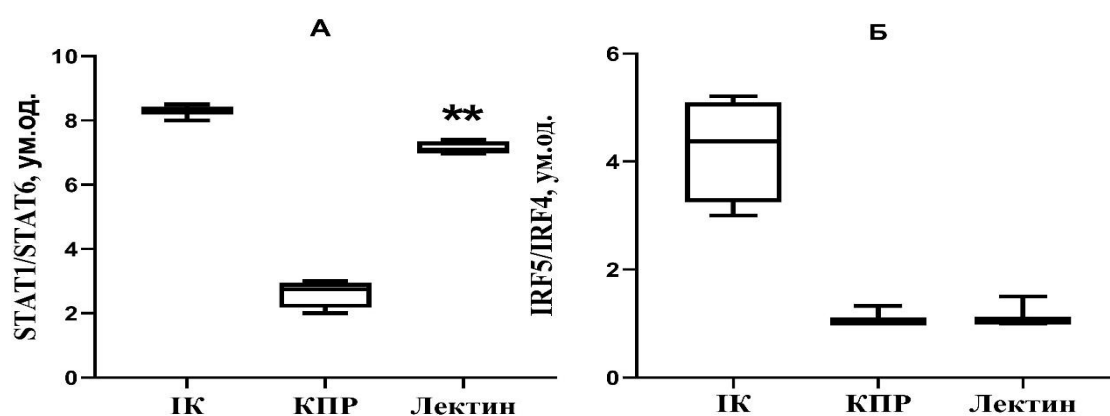


Рис. 6.3.1 Співвідношення рівнів експресії мРНК STAT1 / STAT6 (А) та IRF5/IRF4 (Б) перитонеальних МФ мишей Balb/c на 21-шу добу росту АКЕ;

**– $p < 0,05$ порівняно з показником групи «КПР».

Аналіз показників співвідношення рівня експресії STAT1/STAT6 та IRF5/IRF4 на 28-му добу після перещеплення АКЕ (7 діб після останнього введення лектину) виявив протилежну тенденцію. Зокрема, не встановлено достовірної різниці в показниках STAT1/STAT6 у групі мишей, які отримували лектин *B. subtilis* IMB B-7724, порівняно із показниками групи «КПР» (рис. 6.3.2 А). Натомість, співвідношення IRF5/IRF4 у МФ мишей, яким вводили лектин, достовірно перевищував такий показник у контрольних тварин групи «КПР» (5,2 ум.од. проти 1,07 ум.од., відповідно $p < 0,05$) (рис. 6.3.2 Б).

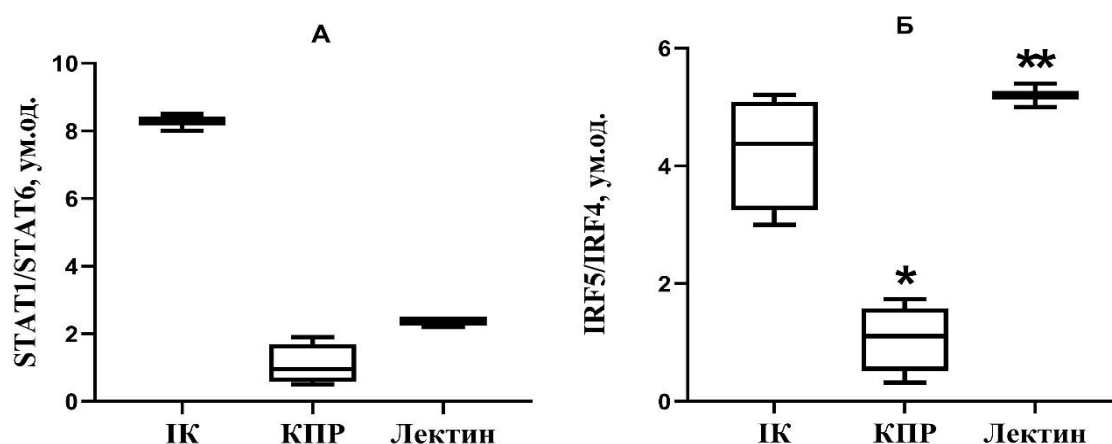


Рис. 6.3.2 Співвідношення рівнів експресії мРНК STAT1/STAT6 (А) та IRF5/IRF4 (Б) перитонеальних МФ мишей Balb/c на 28-шу добу після перещеплення АКЕ, *— $p < 0,05$ порівняно з показником групи «ІК», ** — $p < 0,05$ порівняно з показником групи «КПР».

Таким чином, результати оцінки функціональної активності перитонеальних МФ мишей, яким вводили бактеріальний лектин, свідчать про їх поступову поляризацію в напрямку М1. Аналіз рівнів експресії мРНК транскрипційних факторів STAT1/STAT6 та IRF5/IRF4 не є однозначним. Можна припустити, що на 21-шу добу після введення пухлинних клітин МФ поляризуються в напрямку М1 за рахунок активації транскрипційних факторів STAT1. Враховуючи, що iNOS синтаза належить до переліку мішеней дії STAT1, отримані нами високі показники співвідношення NO/Arg на 21-шу добу (за рахунок збільшення рівня

NO) в МФ мишей групи «Лектин» може бути пов'язано із впливом бактеріального лектину на рівень експресії STAT1. Що стосується термінальної стадії росту пухлини (28-ма доба), високі рівні співвідношення NO/Arg та збереження цитотоксичної активності МФ за умови застосування лектину *B. subtilis* IMB B-7724 також свідчать про превалювання МФ M1 типу. Поляризація клітин на цьому етапі, можливо, здійснюється за рахунок активації транскрипційних факторів сигнального шляху IRF.

Функції/дисфункції сигнального шляху IRF5 при аутоімунних і пухлинних захворюваннях тісно пов'язані з рівнем його експресії. У випадку аутоімунних захворювань поліморфізм в гені *IRF5* призводить до підвищеної експресії IRF5, тоді як за умови розвитку злоякісних новоутворень – експресія IRF5 часто пригнічується (або відсутня) в злоякісних клітинах в порівнянні з доброякісними [202]. При дослідженні особливостей експресії транскрипційних факторів сигнального шляху IRF5 в МФ, дендритних та NK-клітинах людини було виявлено, що IRF5 експресується на вищому рівні саме в МФ M1. Показана можливість активації сигнального шляху IRF5 в МФ під дією факторів запалення, зокрема, GM-CSF та IFN- α/β [203].

Цікаво зазначити, що серед факторів впливу на поляризацію МФ раніше було виділено і інший чинник мікробного походження – LPS. В результаті зв'язування LPS з TLR4 на МФ відбувається активація IRF5, що в подальшому обумовлює зростання рівня експресії IL-12, та інгібування IL-10 [175, 204]. Продемонстрований шлях активації МФ у відповідь на дію LPS через рецептор TLR4 та аутокринне вироблення IFN- β , який ініціює фосфорилування транскрипційних факторів STAT1 і STAT2, та сприяє поляризації МФ в напрямку M1 [205]. Тобто, одержані нами результати принципово співпадають з даними про механізм впливу на МФ найкраще вивченого класичного імуномодулятора мікробного походження.

Превалювання в популяції перитонеальних МФ у мишей з АКЕ, яким вводили лектин *B. subtilis* IMB B-7724, клітин з властивостями M1 може відбуватися як за рахунок безпосереднього зв'язування бактеріального лектину з

TLR4 на поверхні МФ, так і за рахунок впливу факторів пухлинного мікрооточення, зокрема, GM-CSF та IFN. З іншого боку, більшість клітин вродженого імунітету в процесі формування відповіді на інфекційні агенти або трансформовані клітини власного організму здатні до продукції IFN. Враховуючи відомості про інтерфероногенні властивості лектинів, продукованих близькими штамми *B. subtilis* [107], можна припустити, що досліджуваний нами лектин *B. subtilis* IMB B-7724 може підтримувати активацію МФ опосередкованим шляхом, індукуючи продукцію лімфоцитами IFN- γ . Вірогідно в цьому випадку можуть бути задіяні транскрипційні фактори сигнального шляху STAT. Як відомо, STAT1, що відповідає за поляризацію МФ в напрямку M1, активується у відповідь на дію IFN- α , IFN- γ та TLR [69]. Проте, механізми продемонстрованого нами активуючого впливу лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на перитонеальні МФ мишей з модельним пухлинним процесом потребують подальшого дослідження.

Таким чином, введення лектину *B. subtilis* IMB B-7724 мишам з солідною АКЕ супроводжувалось значною протипухлинною дією останнього: реєстрували статистично достовірне збільшення латентного періоду та тривалості життя мишей з пухлинами, сприяло гальмуванню росту пухлини протягом всього періоду спостереження. Застосування лектину *B. subtilis* IMB B-7724 сприяло збереженню вихідного функціонального стану перитонеальних МФ M1 у мишей з АКЕ протягом всього періоду спостереження (до 28-ї доби після перещеплення пухлини). За умови застосування лектину *B. subtilis* IMB B-7724 аналіз зміни рівня експресії мРНК STAT1, STAT6, IRF5 та IRF4, які опосередковують поляризаційний стан макрофагів у мишей з АКЕ свідчить, про достовірне ($p < 0,05$) збільшення співвідношень 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.

Отримані результати дозволяють припустити, що в системі *in vivo* здатність лектину *B. subtilis* IMB B-7724 змінювати поляризацію МФ в напрямку M1, підтримувати протягом тривалого часу індукцію значної кількості клітин з

прозапальними властивостями може бути використана для створення нових протипухлинних імунотерапевтичних засобів.

Результати досліджень, описані в підрозділах 6.1-6.2 опубліковані у [206-208].

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Тканинні МФ та моноцити крові складають систему моноклеарних фагоцитів і є основними клітинами системи вродженого імунітету, яким, окрім ефекторних притаманні і регуляторні функції, внаслідок чого здійснюється взаємозв'язок, регуляція та функціонування різних ланок неспецифічного та специфічного імунітету, зокрема і протипухлинного. МФ є першою лінією захисту і забезпечують безпосередню реакцію організму на проникнення чужорідного агента, а також беруть участь в запуску реакцій системи набутого імунітету. Згідно сучасних даних [10, 21, 35], МФ визначають як групу диференційованих клітин моноклеарно-фагоцитарної системи, які відіграють важливу роль у гомеостазі тканин, запаленні та забезпечують захист від інфекційних патогенних збудників, тощо. Багатогранність функцій цих клітин обумовлена експресією різноманітних поверхневих мембранних рецепторів, зокрема: активації моноцитів CD14; адгезії (селектини, інтегрини); фагоцитозу (лектинові, Fc-рецептори, рецептори очищення (scavenger-рецептори)); цитокінові і хемокінові рецептори активації; рецептори, що приймають участь у презентації антигену (головний комплекс гістосумісності 2-го класу, МНС II) [209]. За напрямком відповіді на активаційні сигнали розрізняють два основних функціональних стани МФ – M1 та M2. Функції та роль МФ цих двох видів достатньо вивчені при різних патологічних станах (травми, інфекційні процеси, злоякісний ріст, тощо). Щодо їх ролі у перебігу злоякісного процесу, показано, що МФ M1 проявляють імуностимулюючу та, відповідно, протипухлинну дію, а МФ M2 мають імуносупресивний та пропухлинний вплив. Причому поляризація МФ M1/M2 являється зворотнім процесом [210] та залежить від сигналів мікрооточення [211-213], що дає підставу говорити про високу пластичність цих клітин. В структурі пухлини, де значна частина клітин імунної системи представлена ПАМ [214], пухлинне мікрооточення спрямовує процес поляризації

МФ в напрямку клітин з фенотипом і властивостями М2. Переважання останніх в субпопуляції ПАМ асоційоване з несприятливим клінічним прогнозом [57, 215]. Значно меншою мірою в науковій літературі представлена інформація стосовно чутливості та направленості відповіді на сигнали пухлинного мікрооточення резидентних МФ, виділених з різних органів і тканин [168, 175].

Отримані нами результати на двох різних моделях пухлинного росту показали, що системний вплив пухлини на організм переважає вплив місцевих факторів тканини, з якої виділені клітини: незалежно від анатомічних ніш функціонування всі МФ в процесі пухлинного росту поступово втрачали свої цитотоксичні функції та набували пропухлинних властивостей (про що свідчить поступове зниження здатності до продукції NO та CP на тлі підвищення активності Arg). Дещо більшою мірою такі зміни були виражені в популяції перитонеальних МФ порівняно з МФ селезінки. Це видається закономірним, враховуючи дані про різну реакцію цих клітин на активаційні стимули під впливом сигналів пухлинного мікрооточення, а також значну фенотипову та функціональну неоднорідність резидентних МФ селезінки. Останні, як відомо, експресують більш високий рівень МНС-II та коstimулюючих молекул [175], тому виявляють вищу функціональну гетерогенність, ніж перитонеальні МФ [168].

Динаміка змін функціональної активності МФ перитонеальної порожнини та селезінки мишей ліній Balb/c та C57Bl/6J була дещо відмінною. Якщо на ранніх етапах пухлинного процесу ми відмічали активацію МФ і превалювання клітин з властивостями М1 у всіх тварин незалежно від моделі пухлинного росту, то на термінальних етапах процес поляризації в напрямку М2 мав певні особливості. Зокрема, у мишей лінії Balb/c на тлі розвитку АКЕ характерним є односпрямоване поступове зниження продукції NO, супероксидних радикалів, цитотоксичної активності та підвищення активності Arg, що свідчить про поляризацію цих клітин в напрямку М2, починаючи з 21-ї доби після перещеплення пухлин (термінальна стадія пухлинного росту). В той же час, у мишей лінії C57Bl/6J з КЛЛ за показником співвідношення NO/Arg, швидкістю продукції CP та

цитотоксичною активністю в популяціях МФ, виділених з селезінки та перитонеальної порожнини, клітини з протипухлинними властивостями (M1) переважали на 7-му і 21-шу, а з пропухлинними властивостями (M2) – на 14- та 28-у доби після введення клітин КЛЛ. Останнє може бути обумовлено як динамікою метастазування клітин КЛЛ, так і більш вираженою у мишей лінії C57Bl/6J активністю ефекторів клітинної ланки імунітету та їх чутливістю до сигналів мікрооточення. Як відомо, пухлинний процес супроводжується розвитком місцевого та системного запалення. Активація онкогенів призводить до експресії прозапальних факторів транскрипції в пухлинних клітинах (таких як NF- κ B, STAT3, HIF-1 α), які обумовлюють спектр продукції цитокінів, хемокінів та ферментів запалення в мікрооточенні пухлини, а також вплив цих факторів на імунну відповідь на рівні організму. Напрямок диференціювання МФ різних органів і тканин, знаходиться в специфічній залежності від отриманих сигналів місцевого мікрооточення – таких, як елементи пошкоджених клітин, цитокіни та хемокіни активованих лімфоцитів, мікробні продукти. Зокрема, активовані МФ M1 набувають здатності до секреції значної кількості прозапальних цитокінів (IL-1-бета, TNF, IL-12, IL-18 і IL-23), що сприяє залученню до імунної відповіді лімфоцитів (Th1 і Th17), задіяних в антигенспецифічних запальних реакціях [216-218]. Можливо, саме така поступова взаємна активація клітин лімфоцитарного та макрофагального ряду, що пов'язана зі змінами продукції гуморальних факторів, пояснює зафіксовану нами короткочасну активацію МФ M1 на 21-шу добу експерименту. В подальшому, завдяки збільшенню продукції цитокінів, що сприяють прогресуванню пухлини (IL-6, IL-17, IL-23, EGFR, TGF- β), на 28-му добу пухлинного процесу відбувається поляризація МФ до клітин з фенотипом M2. Аналіз показників функціональної активності легеневиx МФ мишей з КЛЛ свідчить про їх поступову поляризацію від клітин з проти- (M1) до клітин з пропухлинними (M2) властивостями.

Слід відмітити, що МФ вже давно привернули увагу дослідників в якості перспективних мішеней для імунотерапії хворих зі злоякісними пухлинами. В ранніх роботах щодо розробки імунотерапевтичних підходів з використанням

ПАМ увага приділялась переважно стратегіям блокування пропухлинної активності клітин М2. Але згодом спрямованість досліджень змінилася на пошук можливостей перепрограмування МФ М2 в М1 тип [44]. На сьогодні постійно з'являється нова інформація щодо молекулярних механізмів поляризації МФ, макрофагальних підтипів та/або перехідних станів, їх ролі у формуванні та спрямованості імунних реакцій при різних патологічних процесах, в тому числі при розвитку та прогресії злоякісних новоутворень. Розуміння особливостей поляризації МФ може стати підґрунтям для розробки М1-спрямованої поляризації цих клітин, що є одним із сучасних підходів протипухлинної імунотерапії.

Розробка нових методів терапії, спрямованих на підвищення ефективності лікування пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями, є предметом багатьох сучасних досліджень [1]. Перелік речовин з протипухлинною дією розширюється за рахунок препаратів природного походження, метою застосування яких є формування повноцінної імунної відповіді на антигени пухлинних клітин, відновлення та підтримка на належному рівні активності основних ефекторів вродженого пухлинного імунітету, що відіграють значну роль в запобіганні розвитку рецидивів та метастазів первинної пухлини [5, 219].

В якості речовин з імуномодулюючими та протипухлинними властивостями можуть бути використані лектини – глікопротеїни, що здатні до вибіркового зв'язування вуглеводів та вуглеводних компонентів глікокон'югатів різної природи. Високоспецифічне вибіркоче зв'язування лектинів з відповідними рецепторами на поверхневих мембранах клітин опосередковує цитотоксичний або стимулюючий вплив речовини. На сьогодні досить детально описані властивості рослинних лектинів, проте всі відомі на сьогодні рослинні лектини є достатньо токсичними речовинами, цитотоксичний вплив яких поширюється не тільки на пухлинні клітини, а й на клітини здорових тканин. Лектини, продуковані бактеріями, досліджені значно меншою мірою. Приймаючи до уваги їх низьку токсичність по відношенню до нормальних клітин та простоту отримання, бактеріальні лектини можуть виявитися перспективними засобами з протипухлинними та імуномодулюючими властивостями.

До одного з таких засобів можна віднести лектин, отриманий з культуральної рідини штаму *B. subtilis* IMB B-7724 (задепонованого у колекції Інституту мікробіології та вірусології (ІМВ) ім. Д.К. Заболотного НАН України під номером *Bacillus subtilis* IMB B-7724, Свідоцтво про первісне депонування штаму мікроорганізму від 12.03.2018) [220].

Даний лектин має високий ступінь очищення, не містить домішок речовин з ферментативною активністю, є малотоксичним для нормальних тканин організму. З точки зору біотехнологічного виробництва, процес його отримання позаклітинного бактеріального лектину досить простий і можливий для стандартизації. Дана речовина має високу спорідненість до сіалових кислот та володіє значною цитотоксичною активністю по відношенню до пухлинних клітин *in vitro* [19, 221, 222].

В дослідженнях *in vitro* та *in vivo* показані наявність імуномодуючого та протипухлинного ефектів лектину *B. subtilis* IMB B-7724, відсутність імунотоксичного впливу. Лектин *B. subtilis* IMB B-7724 виявляє цитотоксичну активність *in vitro* по відношенню до пухлинних клітин різного гістогенезу, а також володіє *in vivo* протипухлинною активністю при введенні тваринам з модельними пухлинами. Стимулюючий вплив бактеріального лектину продемонстрований по відношенню до клітин як лімфоцитарного, так макрофагального ряду. Тому, для подальших досліджень щодо можливості зміни функціональної активності та напрямку поляризації МФ в процесі пухлинного росту ми використали саме лектин *B. subtilis* IMB B-7724.

Нами доведено, що вплив *in vitro* лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на клітини імунної системи інтактних тварин залежить від використаної концентрації речовини. Зокрема, для перитонеальних МФ інтактних мишей лінії Balb/c спостерігали наступні ефекти: цитотоксичний – при застосуванні речовини в концентрації від 0,1 мг/мл і вище; стимулюючий – (за показниками функціональної активності) в концентраціях – 0,02 та 0,05 мг/мл. Суттєве зростання продукції NO та одночасне зменшення активності Arg, які відмічали при дії низьких концентрацій бактеріального лектину, є характерними ознаками

поляризації МФ у клітини з фенотипом M1. Вірогідно, внаслідок взаємодії лектину з вуглеводними структурами на поверхні клітин. Відомо, що активація МФ до прозапальних клітин з фенотипом M1 може бути опосередкована впливом IFN- γ або/та ліпополісахариду на відповідні рецептори клітинної мембрани (IFN- γ R або/та Toll-like receptor 4) через JAK-STAT сигнальний шлях. Як видно з даних літератури в результаті такої взаємодії відбувається підвищення рівня експресії транскрипційного фактору STAT1 і активація транскрипції STAT1-залежних генів. Крім того, наслідком зв'язування LPS із TLR4 є активація TLR4-асоційованих адаптерних білків MyD88 і TRAK, що сприяє формуванню гетеродимеру NF-kB-p65/p50 та індукція транскрипції NF-kB-p65/p50-залежних генів, зокрема ряду факторів гострої фази запалення (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12p40, COX2) [66-69]. Альтернативний шлях активації МФ опосередкований впливом цитокінів IL-4/IL-13 або IL-10 на поверхневі рецептори IL-4R α /IL-13R α 1 або IL-10R, відповідно. Наслідком такої взаємодії є експресія транскрипційних факторів STAT6 або STAT3/NF-kB-p50/p50 та їх транслокація у ядро, що обумовлює напрямок поляризації МФ до клітин з властивостями M2 [12].

Враховуючи наведені вище дані, нами був досліджений вплив лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на напрямок поляризації перитонеальних МФ мишей з модельним пухлинним процесом (АКЕ) та проаналізована роль в цьому процесі транскрипційних факторів сигнальних шляхів STAT та IRF.

Як і в попередніх дослідженнях [180] у нелікованих мишей з пухлинами відмічали поступову зміну функціональної активності перитонеальних МФ, які набували пропухлинних властивостей на термінальних стадіях пухлинного процесу. В той же час, як результати оцінки властивостей МФ мишей, яким вводили бактеріальний лектин, свідчили про їх поляризацію в напрямку M1 протягом всього періоду спостереження. Тобто, на 21- та 28-му доби після перещеплення експериментальних пухлин за умови застосування лектину *B. subtilis* IMB B-7724 відмічали збереження цитотоксичної активності, здатності до продукції СК та NO перитонеальними МФ мишей з пухлинами на рівні інтактних тварин. Про значну роль МФ в реалізації протипухлинного ефекту

бактеріального лектину свідчать виявлені кореляційні зв'язки між показниками пухлинного росту та функціональної активності цих клітин. Так, у нелікованих мишей з експериментальними модельними пухлинами виявлений сильний негативний кореляційний зв'язок між рівнем співвідношення NO/Arg (яке характеризує напрямок поляризації МФ) та розміром первинного пухлинного вузла – $r = -0,76$, $p < 0,05$ (АКЕ) та $r = -0,9$, $p < 0,05$ (КЛЛ), а також показниками об'єму і кількості метастазів на моделі КЛЛ ($r = -0,92$ та $-0,89$ відповідно). Застосування лектину *B. subtilis* IMB B-7724 супроводжувалось поляризацією макрофагів в напрямку прозапальних МФ М1, що, вірогідно сприяло уповільненню росту пухлин та збільшенню тривалості життя тварин з пухлинами. У мишей цієї групи виявлений сильний негативний кореляційний зв'язок між індексом гальмування росту пухлин та рівнем співвідношення NO/Arg ($r = -0,7$, $p < 0,05$).

Визначення у відповідних зразках МФ рівнів експресії мРНК транскрипційних факторів STAT1, STAT6, IRF5, IRF4 показало, що в процесі поляризації МФ на різних етапах пухлинного процесу можуть бути залучені різні сигнальні шляхи. На 21-шу добу після перещеплення експериментальної пухлини МФ поляризуються в напрямку М1, вірогідно, за рахунок експресії транскрипційних факторів STAT1 та активації iNOS (мішеней дії STAT1), що обумовлює суттєве підвищення показника співвідношення NO/Arg в цей термін. В той же час на 28-му добу експерименту поляризація МФ може бути обумовлена активацією транскрипційних факторів сигнального шляху IRF.

Відомо, що фактори сигнального шляху IRF залучені в розвиток патологічних процесів, пов'язаних з дисфункцією імунної системи [202]. При дослідженні особливостей експресії транскрипційних факторів IRF5 в клітинах імунної системи було виявлено, що IRF5 експресується на більш високому рівні в МФ з фенотипом М1 порівняно до такого у МФ М2. Подібні результати отримані і при дослідженні зміни поляризації МФ, виділених з кісткового мозку мишей C57Bl/6J, при дії *in vitro* GM-CSF, який відповідає за індукцію клітин в М1 тип. Інкубація МФ з GM-CSF призводила до суттєвого збільшення рівня експресії

мРНК IRF5 та білка IRF5, синтезу прозапальних цитокінів та експресії поверхневих маркерів МФ М1. Отримані результати підтвердили значимість IRF5 в якості маркера МФ з прозапальними властивостями [223]. Показана можливість активації сигнального шляху IRF5 в МФ під дією інших цитокінів, зокрема різних типів IFN [203].

Іншим шляхом активації транскрипційного фактору IRF5 є взаємодія TLR4 і бактеріального LPS на поверхні МФ. Показано, що в результаті реакції LPS з TLR4, відбувається активація IRF5, зростання рівня експресії IL-12, який теж є фактором класичного шляху активації МФ М1 [175, 204]. Окрім того, взаємодія LPS з TLR4 може ініціювати експресію факторів сигнального шляху STAT [205].

Враховуючи вищезазначене, можна припустити, що продемонстроване в наших дослідженнях на моделі АКЕ переважання в популяції перитонеальних МФ клітин з фенотипом М1 може відбуватися як за рахунок безпосереднього зв'язування бактеріального лектину з TLR4 на поверхні клітин, так і за рахунок впливу факторів пухлинного мікрооточення (фібробласти, ендотеліальні та імунокомпетентні клітини, деякі компоненти позаклітинного матриксу). Ключовими факторами впливу мікрооточення на процес поляризації МФ можуть бути цитокіни, зокрема, GM-CSF та IFN. Адже відомо, що GM-CSF продукується широким спектром неімунних типів клітин, включаючи фібробласти, кератиноцити і ендотеліальні клітини, у відповідь на певні стимули. Крім того, внаслідок активації процесів вродженого імунітету активовані Т- та В-лімфоцити, МФ, мастоцити, ендотеліальні клітини судин і фібробласти у відповідь на стимуляцію цитокінами здатні секретувати GM-CSF [224, 225]. У мишей GM-CSF продукується в основному епітеліальними клітинами легені і вродженими лімфоїдними клітинами, що присутні в кишківнику. Отже, GM-CSF відіграє ключову роль в диференціюванні МФ тканини легені і кишківника та контролює процес їх поляризації [226].

З іншого боку, більшість клітин вродженого імунітету в процесі формування відповіді на інфекційні агенти або трансформовані клітини власного організму здатні до продукції IFN. Важливим у формуванні протипухлинної

відповіді є здатність IFN типу I (IFN- α/β) регулювати ефекторні функції природного та адаптивного імунітету, впливаючи на активацію, диференціювання, міграцію різних типів імунних клітин: дендритних, NK, МФ, Т- та В-лімфоцитів [227]. IFN- β продукується фібробластами, лейкоцитарний IFN- α – лейкоцитами, особливо МФ та дендритними клітинами, які раніше називали «природними клітинами, які продукують IFN» [228]. Але подальші дослідження спростували відношення продукції IFN- α тільки до дендритних клітин. Дійсно, популяції клітин, що відповідають за продукцію IFN типу I, відмінні в залежності від типу патогену, його тканевого тропізму і шляху зараження [229].

Внаслідок прогресування пухлинного процесу за рахунок накопичення супресорних факторів відбувається пригнічення імунної відповіді, збільшується кількість клітин з протизапальними та пропухлинними властивостями, серед яких виділяють МФ M2. Саме такий ефект ми спостерігали у мишей Balb/c на віддалених термінах росту солідної АКЕ. На 28-му добу росту пухлини незалежно від ніші функціонування (виділені з перитонеальної порожнини, селезінки, пухлини) всі МФ за функціональними властивостями належали до M2 типу [180]. Введення мишам з карциномою лектину *B. subtilis* IMB B-7724 дозволило в цей термін пухлинного росту досягти превалювання на цей термін пухлинного росту МФ, які проявляють прозапальні властивості M1. Враховуючи відомості про інтерферогенні властивості лектинів, продукованих близькими штамми *B. subtilis* [107], можна припустити, що досліджуваний нами лектин *B. subtilis* IMB B-7724 може підтримувати активацію МФ не тільки прямим, а й опосередкованим шляхом, індукуючи продукцію IFN- γ Т-лімфоцитами-хелперами та NK клітинами. Вірогідно в цьому випадку можуть бути задіяні транскрипційні фактори сигнального шляху STAT. Як відомо STAT1, що відповідає за поляризацію МФ в напрямку M1, активується у відповідь на дію IFN- α , IFN- γ та TLR [69].

Висловлене вище припущення підтверджує результати наших досліджень щодо зміни поляризації МФ інтактних мишей лінії Balb/c *in vitro* під впливом лектину *B. subtilis* IMB B-7724 та цитокінів, які відомі як стандартні фактори

активації МФ за класичним (M1) або альтернативним (M2) шляхом. При дії низьких концентрацій бактеріального лектину зареєстровані зміни властивостей МФ (суттєве збільшення співвідношення NO/Arg в бік зростання продукції NO) що є характерними для клітин з фенотипом M1. При цьому зміни в МФ інтактних мишей зміни показника співвідношення рівня експресії мРНК STAT1/STAT6 під впливом *in vitro* лектину *B. subtilis* IMB B-7724 аналогічні змінам, виявленим при сумісній дії на МФ LPS та IFN- γ [195]. Отримані результати дозволяють припустити, що лектин *B. subtilis* IMB B-7724 має здатність змінювати поляризацію МФ в напрямку M1 не лише в умовах *in vitro*, а й на системному рівні (*in vivo*). Тому, здатність дослідженого лектину протягом тривалого часу підтримувати індукцію значної кількості клітин з прозапальними властивостями може бути використана для розробки підходів протипухлинної імунотерапії, а сам лектин *B. subtilis* IMB B-7724 – розширити арсенал нових природних протипухлинних імунотерапевтичних засобів.

ВИСНОВКИ

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. Перші позитивні результати репрограмування M2 в M1 макрофагів, отримані в експериментальних дослідженнях з використанням агоністів TLRs, моноклональних антитіл, цитокінів, miRNA, бактеріального β -глюкану тощо. В даному дисертаційному дослідженні для функціональної M1 поляризації макрофагів в процесі росту пухлин різного гістогенезу було використано лектин *B. subtilis* IMB B-7724, а визначення його впливу та обґрунтування доцільності використання стало метою роботи.

1. В процесі росту експериментальних модельних пухлин різного гістогенезу (АКЕ, КЛЛ) встановлено зміну поляризаційного стану виділених з різних анатомічних ніш макрофагів від M1 (латентна стадія росту) до M2 (термінальна стадія). Показано, що на початковій стадії росту АКЕ та КЛЛ макрофаги, незалежно від ніші виділення, виявляли властивості M1, про що свідчить достовірне перевищення співвідношення NO/Arg відповідних показників інтактного контролю, а також збереження на рівні показників інтактних тварин цитотоксичної активності та рівня продукції CP. 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.

2. За фізико-хімічними властивостями отримана з культуральної рідини *B. subtilis* IMB B-7724 активна речовина ідентифікована як малотоксичний сіалоспецифічний бактеріальний лектин, що володіє *in vitro* дозозалежною імуномодулюючою (щодо клітин лімфоцитарного та макрофагального ряду), цитотоксичною активністю (по відношенню до пухлинних клітин різного гістогенезу), а також протипухлинною дією *in vivo* (при введенні тваринам з експериментальними модельними пухлинами).

3. Застосування лектину *B. subtilis* IMB B-7724 у мишей з АКЕ сприяло збереженню М1 стану перитоніальних макрофагів протягом всього періоду спостереження, про що свідчить достовірне збільшення порівняно з показниками нелікованих тварин 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.

4. Показано, що лектин *B. subtilis* IMB B-7724 призводить до зростання співвідношення рівнів експресії мРНК STAT1/STAT6 – компонентів JAK-STAT сигнального шляху, в макрофагах, яке достовірно не відрізняється від відповідних показників за сумісної дії LPS та IFN- γ (в 1,4 та 1,3 разу відповідно).

5. Встановлено вплив лектину *B. subtilis* IMB B-7724 на показники експресії мРНК STAT1, STAT6, IRF5 та IRF4, які опосередковують поляризаційний стан макрофагів, у мишей з АКЕ, про що свідчить достовірне ($p < 0,05$) збільшення співвідношень 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 28-у добу в 4,9 разу) порівняно з показниками інтактних тварин.

6. Виявлено достовірний сильний негативний кореляційний зв'язок між рівнем NO/Arg та розміром первинного пухлинного вузла на моделях АКЕ та

КЛЛ ($r = -0,76$ та $r = -0,9$ відповідно, $p < 0,05$) і показниками об'єму і кількості метастазів на моделі КЛЛ ($r = -0,92$ та $-0,89$ відповідно, $p < 0,05$). Протипухлинний ефект лектину *B. subtilis* ІМВ В-7724 пов'язаний з його здатністю ремодулювати поляризацію макрофагів в напрямку прозапального стану М1 на тлі росту АКЕ, про що свідчить виявлений сильний позитивний кореляційний зв'язок між індексом гальмування росту пухлин та рівнем NO/Arg ($r = 0,74$, $p < 0,05$).

7. Обґрунтовано доцільність використання лектину *B. subtilis* ІМВ В-7724 для модуляції функціональних характеристик макрофагів при пухлинному рості та підвищення ефективності протипухлинної імунотерапії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Pan C, Liu H, Robins E, Song W, Liu D, Li Z, et al. Next-generation immuno-oncology agents: current momentum shifts in cancer immunotherapy. *Journal of hematology & oncology*. 2020;13(1):29.
2. Kim CG, Sang YB, Lee JH, Chon HJ. Combining Cancer Vaccines with Immunotherapy: Establishing a New Immunological Approach. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(15).
3. Bonaventura P, Shekarian T, Alcazer V, Valladeau-Guilemond J, Valsesia-Wittmann S, Amigorena S, et al. Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy. *Frontiers in immunology*. 2019;10:168.
4. Shi Y, Tomczak K, Li J, Ochieng JK, Lee Y, Haymaker C. Next-Generation Immunotherapies to Improve Anticancer Immunity. *Frontiers in pharmacology*. 2020;11:566401.
5. Ryspayeva DE, Ponomarova OV. Immunotherapy is the first line of advanced lung cancer: what is new in 2018. *Clinical oncology*. 2018;8.
6. Anderson NR, Minutolo NG, Gill S, Klichinsky M. Macrophage-Based Approaches for Cancer Immunotherapy. *Cancer research*. 2021;81(5):1201-8.
7. Leuti A, Talamonti E, Gentile A, Tiberi M, Matteocci A, Freseigna D, et al. Macrophage Plasticity and Polarization Are Altered in the Experimental Model of Multiple Sclerosis. *Biomolecules*. 2021;11(6).
8. Lv Q, Xing Y, Liu Y, Chen Q, Xu J, Hu L, et al. Didymin switches M1-like toward M2-like macrophage to ameliorate ulcerative colitis via fatty acid oxidation. *Pharmacological research*. 2021;169:105613.
9. Kimm MA, Klenk C, Alunni-Fabbroni M, Kastle S, Stechele M, Ricke J, et al. Tumor-Associated Macrophages-Implications for Molecular Oncology and Imaging. *Biomedicines*. 2021;9(4).
10. Petty AJ, Yang Y. Tumor-associated macrophages: implications in cancer immunotherapy. *Immunotherapy*. 2017;9(3):289-302.

11. Kim SH, Kim SJ, Park J, Joe Y, Lee SE, Saeidi S, et al. Reprogramming of Tumor-Associated Macrophages in Breast Tumor-Bearing Mice under Chemotherapy by Targeting Heme Oxygenase-1. *Antioxidants*. 2021;10(3).
12. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41(1):14-20.
13. Duan Z, Luo Y. Targeting macrophages in cancer immunotherapy. *Signal transduction and targeted therapy*. 2021;6(1):127.
14. Panzer SE. Macrophages in Transplantation: A Matter of Plasticity, Polarization, and Diversity. *Transplantation*. 2021. doi: 10.1097/TP.0000000000003804.
15. Nakagawa M, Karim MR, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Immunophenotypical Characterization of M1/M2 Macrophages and Lymphocytes in Cisplatin-Induced Rat Progressive Renal Fibrosis. *Cells*. 2021;10(2).
16. Yau T, Dan X, Ng CC, Ng TB. Lectins with potential for anti-cancer therapy. *Molecules*. 2015;20(3):3791-810.
17. Корман ДБ. Противоопухолевые свойства лектинов омелы белой. *Oncology*. 2020:1-33.
18. Mazalovska M, Kouokam JC. Plant-Derived Lectins as Potential Cancer Therapeutics and Diagnostic Tools. *BioMed research international*. 2020:1631394.
19. Черемшенко НЛ, Федосова НІ, Гетьман КІ, Караман ОМ, Симчич ТВ, Іванченко АВ, Воєйкова ІМ, Чехун ВФ. Цитотоксичний лектин з протипухлинною активністю Патент на корисну модель №141944 UA. Опубл. 12.05.2020;бюл. № 9/2020.
20. Черемшенко НЛ, Федосова НІ, Гетьман КІ, Караман ОМ, Симчич ТВ, Чумак АВ, Воєйкова ІМ, Чехун ВФ. Лектин бактеріального походження з протипухлинною та імуномодулюючою властивістю. Патент на винахід №а 2021 01974. Дата подання 14.04.2021.
21. Larionova I, Cherdyntseva N, Liu T, Patysheva M, Rakina M, Kzhyshkowska J. Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology*. 2019;8(7):1596004.

22. van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization*. 1972;46(6):845-52.
23. Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM, Randolph GJ, Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(6):453–60.
24. Cassado Ados A, D'Imperio Lima MR, Bortoluci KR. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Frontiers in immunology*. 2015;6:225.
25. Ricketts TD, Prieto-Dominguez N, Gowda PS, Ubil E. Mechanisms of Macrophage Plasticity in the Tumor Environment: Manipulating Activation State to Improve Outcomes. *Frontiers in immunology*. 2021;12:642285.
26. Chen B, Brickshawana A, Frangogiannis NG. The Functional Heterogeneity of Resident Cardiac Macrophages in Myocardial Injury CCR2(+) Cells Promote Inflammation, Whereas CCR2(-) Cells Protect. *Circ Res*. 2019;124(2):183-5.
27. Honold L, Nahrendorf M. Resident and Monocyte-Derived Macrophages in Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 2018;122(1):113-27.
28. Das A, Sinha M, Datta S, Abas M, Chaffee S, Sen CK, et al. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *Am J Pathol*. 2015;185(10):2596-606.
29. Lavin Y, Mortha A, Rahman A, Merad M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(12):731-44.
30. Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*. 2016;44(3):439-49.
31. Kratofil RM, Kubes P, Deniset JF. Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2017;37(1):35-42.
32. O'Rourke SA, Dunne A, Monaghan MG. The Role of Macrophages in the Infarcted Myocardium: Orchestrators of ECM Remodeling. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:101.

33. Liao X, Shen Y, Zhang R, Sugi K, Vasudevan NT, Alaiti MA, et al. Distinct roles of resident and nonresident macrophages in nonischemic cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115(20):E4661-E9.
34. Deng H, Sun Y, Zeng W, Li H, Guo M, Yang L, et al. New Classification of Macrophages in Plaques: a Revolution. *Curr Atheroscler Rep*. 2020;22(8):31.
35. Yao Y, Xu XH, Jin L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Frontiers in immunology*. 2019;10:792.
36. Feng Y, Mu R, Wang Z, Xing P, Zhang J, Dong L, et al. A toll-like receptor agonist mimicking microbial signal to generate tumor-suppressive macrophages. *Nat Commun*. 2019;10(1):2272.
37. Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J Hepatol*. 2014;60(5):1090-6.
38. Sukhbaatar N, Weichhart T. Iron Regulation: Macrophages in Control. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2018;11(4).
39. Сарбаева НН, Пономарева ВЮ, Милякова МН. Макрофаги: разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами. *Гены и Клетки*. 2016;1(11):9-17.
40. Сахно ЛВ, Шевела ЕЯ, Черных ЕР. Фенотипические и функциональные особенности альтернативно активированных макрофагов: возможное использование в регенеративной медицине. *Иммунология*. 2015;36:242–6.
41. Nielsen MC, Hvidbjerg Gantzel R, Claria J, Trebicka J, Moller HJ, Gronbaek H. Macrophage Activation Markers, CD163 and CD206, in Acute-on-Chronic Liver Failure. *Cells*. 2020;9(5).
42. Travnickova J, Nhim S, Abdellaoui N, Djouad F, Nguyen-Chi M, Parmeggiani A, et al. Macrophage morphological plasticity and migration is Rac signalling and MMP9 dependant. *Scientific reports*. 2021;11(1):10123.
43. Shakespear MR, Iyer A, Cheng CY, Das Gupta K, Singhal A, Fairlie DP, et al. Lysine Deacetylases and Regulated Glycolysis in Macrophages. *Trends in immunology*. 2018;39(6):473-88.

44. Sun YY, Li XF, Meng XM, Huang C, Zhang L, Li J. Macrophage Phenotype in Liver Injury and Repair. *Scand J Immunol.* 2017;85(3):166-74.
45. Zhang F, Wang H, Wang X, Jiang G, Liu H, Zhang G, et al. TGF-beta induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype. *Oncotarget.* 2016;7(32):52294-306.
46. Hao NB, Lu MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:948098.
47. Wang Y, Smith W, Hao D, He B, Kong L. M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds. *International immunopharmacology.* 2019;70:459-66.
48. Kim Y, Nurakhayev S, Nurkesh A, Zharkinbekov Z, Saparov A. Macrophage Polarization in Cardiac Tissue Repair Following Myocardial Infarction. *International journal of molecular sciences.* 2021;22(5).
49. Fujisaka S. The role of adipose tissue M1/M2 macrophages in type 2 diabetes mellitus. *Diabetology international.* 2021;12(1):74-9.
50. Quero L, Hanser E, Manigold T, Tiaden AN, Kyburz D. TLR2 stimulation impairs anti-inflammatory activity of M2-like macrophages, generating a chimeric M1/M2 phenotype. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):245.
51. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology.* 2002;23(11):549-55.
52. Liu H, Wu X, Gang N, Wang S, Deng W, Zan L, et al. Macrophage functional phenotype can be consecutively and reversibly shifted to adapt to microenvironmental changes. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(2):3044-53.
53. Lin Y, Xu J, Lan H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *Journal of hematology & oncology.* 2019;12(1):76.
54. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):436-44.

55. Suarez-Lopez L, Sriram G, Kong YW, Morandell S, Merrick KA, Hernandez Y, et al. MK2 contributes to tumor progression by promoting M2 macrophage polarization and tumor angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115(18):E4236-E44.
56. Лямина СВ, Шимшелашвили ШЛ, Калиш СВ, Малышева ЕВ, Ларионов НП, Малышев ИЮ. Изменение фенотипа и фенотипической пластичности альвеолярных макрофагов при заболеваниях легких, имеющих воспалительный компонент. *Пульмонология*. 2012;6:83-9.
57. Ковалева ОВ, Ефремов ГД, Михайленко ДС, Алексеев БЯ, Грачев АН. Роль макрофагов, ассоциированных с опухолью, в патогенезе почечно-клеточного рака. *Онкология* 1. 2017;13:20-6.
58. Genard G, Lucas S, Michiels C. Reprogramming of Tumor-Associated Macrophages with Anticancer Therapies: Radiotherapy versus Chemo- and Immunotherapies. *Frontiers in immunology*. 2017;8:828.
59. Komohara Y, Hasita H, Ohnishi K, Fujiwara Y, Suzu S, Eto M, et al. Macrophage infiltration and its prognostic relevance in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer science*. 2011;102(7):1424-31.
60. Shu QH, Ge YS, Ma HX, Gao XQ, Pan JJ, Liu D, et al. Prognostic value of polarized macrophages in patients with hepatocellular carcinoma after curative resection. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2016;20(6):1024-35.
61. Dong P, Ma L, Liu L, Zhao G, Zhang S, Dong L, et al. CD86(+)/CD206(+), Diametrically Polarized Tumor-Associated Macrophages, Predict Hepatocellular Carcinoma Patient Prognosis. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(3):320.
62. Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, Sitkauskiene B, Miliauskas S, Vaitkiene S, et al. Distribution of M1 and M2 macrophages in tumor islets and stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer. *BMC immunology*. 2018;19(1):3.
63. Wei X, Nie S, Liu H, Sun J, Liu J, Li J, et al. Angiopoietin-like protein 2 facilitates non-small cell lung cancer progression by promoting the polarization of M2

- tumor-associated macrophages. *American journal of cancer research*. 2017;7(11):2220-33.
64. Rath M, Muller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Frontiers in immunology*. 2014;5:532.
 65. Essandoh K, Li Y, Huo J, Fan GC. MiRNA-Mediated Macrophage Polarization and its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response. *Shock*. 2016;46(2):122-31.
 66. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Frontiers in immunology*. 2014;5:614.
 67. Horhold F, Eisel D, Oswald M, Kolte A, Roll D, Osen W, et al. Reprogramming of macrophages employing gene regulatory and metabolic network models. *PLoS Comput Biol*. 2020;16(2):e1007657.
 68. Huang X, Li Y, Fu M, Xin HB. Polarizing Macrophages In Vitro. *Methods in molecular biology*. 2018;1784:119-26.
 69. Piaszyk-Borychowska A, Szeles L, Csermely A, Chiang HC, Wesoly J, Lee CK, et al. Signal Integration of IFN-I and IFN-II With TLR4 Involves Sequential Recruitment of STAT1-Complexes and NFkappaB to Enhance Pro-inflammatory Transcription. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1253.
 70. Miao X, Leng X, Zhang Q. The Current State of Nanoparticle-Induced Macrophage Polarization and Reprogramming Research. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(2).
 71. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(8):641-54.
 72. Brune B, Courtial N, Dehne N, Syed SN, Weigert A. Macrophage NOS2 in Tumor Leukocytes. *Antioxidants & redox signaling*. 2017;26(18):1023-43.
 73. Acunzo M, Romano G, Wernicke D, Croce CM. MicroRNA and cancer--a brief overview. *Adv Biol Regul*. 2015;57:1-9.
 74. Li Z, Chao TC, Chang KY, Lin N, Patil VS, Shimizu C, et al. The long noncoding RNA THRIL regulates TNFalpha expression through its interaction with

hnRNPL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(3):1002-7.

75. Lv LL, Feng Y, Wu M, Wang B, Li ZL, Zhong X, et al. Exosomal miRNA-19b-3p of tubular epithelial cells promotes M1 macrophage activation in kidney injury. *Cell Death Differ*. 2020;27(1):210-26.

76. Huang C, Liu XJ, QunZhou, Xie J, Ma TT, Meng XM, et al. MiR-146a modulates macrophage polarization by inhibiting Notch1 pathway in RAW264.7 macrophages. *International immunopharmacology*. 2016;32:46-54.

77. Kim YK, Kim YS, Kim S, Kim YJ, Ahn Y, Kook H. Comprehensive evaluation of differentially expressed non-coding RNAs identified during macrophage activation. *Mol Immunol*. 2020;128:98-105.

78. Mao M, Xu Y, Zhang XY, Yang L, An XB, Qu Y, et al. MicroRNA-195 prevents hippocampal microglial/macrophage polarization towards the M1 phenotype induced by chronic brain hypoperfusion through regulating CX3CL1/CX3CR1 signaling. *Journal of neuroinflammation*. 2020;17(1):244.

79. Zhang Y, Zhang M, Zhong M, Suo Q, Lv K. Expression profiles of miRNAs in polarized macrophages. *Int J Mol Med*. 2013;31(4):797-802.

80. Yuan Zhang WY. Sphingosine kinase 2 plays a critical role in bile acid-induced cholestatic liver injury via regulating miR-155 and macrophage activation. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2020;34.

81. Jaiswal A, Reddy SS, Maurya M, Maurya P, Barthwal MK. MicroRNA-99a mimics inhibit M1 macrophage phenotype and adipose tissue inflammation by targeting TNFalpha. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(5):495-507.

82. Graff JW, Dickson AM, Clay G, McCaffrey AP, Wilson ME. Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes. *J Biol Chem*. 2012;287(26):21816-25.

83. Li Q, He X, Yu Q, Wu Y, Du M, Chen J, et al. The Notch signal mediates macrophage polarization by regulating miR-125a/miR-99b expression. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2019;47(1):833-43.

84. Zhao JL, Huang F, He F, Gao CC, Liang SQ, Ma PF, et al. Forced Activation of Notch in Macrophages Represses Tumor Growth by Upregulating miR-125a and Disabling Tumor-Associated Macrophages. *Cancer research*. 2016;76(6):1403-15.
85. Ying H, Kang Y, Zhang H, Zhao D, Xia J, Lu Z, et al. MiR-127 modulates macrophage polarization and promotes lung inflammation and injury by activating the JNK pathway. *Journal of immunology*. 2015;194(3):1239-51.
86. Zhang P, Wang H, Luo X, Liu H, Lu B, Li T, et al. MicroRNA-155 Inhibits Polarization of Macrophages to M2-Type and Suppresses Choroidal Neovascularization. *Inflammation*. 2018;41(1):143-53.
87. Hu J, Huang CX, Rao PP, Cao GQ, Zhang Y, Zhou JP, et al. MicroRNA-155 inhibition attenuates endoplasmic reticulum stress-induced cardiomyocyte apoptosis following myocardial infarction via reducing macrophage inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2019;857:172449.
88. Banerjee S, Xie N, Cui H, Tan Z, Yang S, Icyuz M, et al. MicroRNA let-7c regulates macrophage polarization. *Journal of immunology*. 2013;190(12):6542-9.
89. Bras JP, Silva AM, Calin GA, Barbosa MA, Santos SG, Almeida MI. miR-195 inhibits macrophages pro-inflammatory profile and impacts the crosstalk with smooth muscle cells. *PLoS One*. 2017;12(11):e0188530.
90. Ying W, Tseng A, Chang RC, Morin A, Brehm T, Triff K, et al. MicroRNA-223 is a crucial mediator of PPARgamma-regulated alternative macrophage activation. *J Clin Invest*. 2015;125(11):4149-59.
91. Нефедова НА, Давыдова СЮ. Роль сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и гипоксия индуцибельного фактора (HIF) в опухолевом ангиогенезе. *Современные проблемы науки и образования*. 2015;3.
92. He C, Carter AB. The Metabolic Prospective and Redox Regulation of Macrophage Polarization. *J Clin Cell Immunol*. 2015;6(6).
93. Lan J, Sun L, Xu F, Liu L, Hu F, Song D, et al. M2 Macrophage-Derived Exosomes Promote Cell Migration and Invasion in Colon Cancer. *Cancer research*. 2019;79(1):146-58.

94. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012;122(3):787-95.
95. Монастырская ЕЛ, Лямина СВ, Малышев ИЮ. М1 и М2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии. *Патогенез* 2008;6:31-9.
96. Лямина СВ, Малышев ИЮ. Поляризация макрофагов в современной концепции. *Формирования иммунного ответа*. 2014;10:930-5.
97. Jordan M, Waxman DJ. CpG-1826 immunotherapy potentiates chemotherapeutic and anti-tumor immune responses to metronomic cyclophosphamide in a preclinical glioma model. *Cancer letters*. 2016;373(1):88-96.
98. Le Noci V, Tortoreto M, Gulino A, Storti C, Bianchi F, Zaffaroni N, et al. Poly(I:C) and CpG-ODN combined aerosolization to treat lung metastases and counter the immunosuppressive microenvironment. *Oncoimmunology*. 2015;4(10):e1040214.
99. Daei Farshchi Adli A, Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Samandari-Rad S, Zarghami N. An overview on Vadimezan (DMXAA): The vascular disrupting agent. *Chemical biology & drug design*. 2018;91(5):996-1006.
100. Kaneda MM, Messer KS, Ralainirina N, Li H, Leem CJ, Gorjestani S, et al. Corrigendum: PI3Kgamma is a molecular switch that controls immune suppression. *Nature*. 2017;542(7639):124.
101. Pan Y, Yu Y, Wang X, Zhang T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Frontiers in immunology*. 2020;11:583084.
102. Fraternale A. BS, Magnani M. . Polarization and Repolarization of Macrophages. *Clinical & Cellular Immunology*. 2015;6.
103. Garaci E, Pica F, Sinibaldi-Vallebona P, Pierimarchi P, Mastino A, Matteucci C, et al. Thymosin alpha(1) in combination with cytokines and chemotherapy for the treatment of cancer. *International immunopharmacology*. 2003;3(8):1145-50.
104. Liu M, Luo F, Ding C, Albeituni S, Hu X, Ma Y, et al. Correction: Dectin-1 Activation by a Natural Product beta-Glucan Converts Immunosuppressive Macrophages into an M1-like Phenotype. *Journal of immunology*. 2016;196(9):3968.

105. Boyd WC, Shapleigh E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science*. 1954;119(3091):419.
106. Rudiger H, Gabius HJ. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate journal*. 2001;18(8):589-613.
107. Podgorskii VS, Kovalenko EA, Karpova IS, Sashchuk EV, Get'man EI. Extracellular lectins from saprophytic strains of bacteria of the genus *Bacillus* *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya*. 2014;50(3):256-63.
108. Coulibaly FS YB-B. Current status of lectin-based cancer diagnosis and therapy. *AIMS Mol Sci*. 2017;4(1–27).
109. Lam SK, Ng TB. Lectins: production and practical applications. *Applied microbiology and biotechnology*. 2011;89(1):45-55.
110. Hirabayashi J, Tatenno H, Shikanai T, Aoki-Kinoshita KF, Narimatsu H. The Lectin Frontier Database (LfDB), and data generation based on frontal affinity chromatography. *Molecules*. 2015;20(1):951-73.
111. Liu Y, Liu J, Pang X, Liu T, Ning Z, Cheng G. The roles of direct recognition by animal lectins in antiviral immunity and viral pathogenesis. *Molecules*. 2015;20(2):2272-95.
112. Dias Rde O MLS, Migliolo L, Franco OL. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. *Molecules*. 2015;20(1):519-41.
113. Varrot A, Basheer SM, Imberty A. Fungal lectins: structure, function and potential applications. *Current opinion in structural biology*. 2013;23(5):678-85.
114. Mishra A, Behura A, Mawatwal S, Kumar A, Naik L, Mohanty SS, et al. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2019;134:110827.
115. Hopper JTS, Ambrose S, Grant OC, Krumm SA, Allison TM, Degiacomi MT, et al. The Tetrameric Plant Lectin BanLec Neutralizes HIV through Bidentate Binding to Specific Viral Glycans. *Structure*. 2017;25(5):773-82 e5.
116. Lima TA, Dornelles LP, Oliveira APS, Guedes CC, Souza SO, Sa RA, et al. Binding targets of termiticidal lectins from the bark and leaf of *Myracrodruon*

urundeuva in the gut of *Nasutitermes corniger* workers. *Pest management science*. 2018;74(7):1593-9.

117. Moura MC, Napoleao TH, Coriolano MC, Paiva PM, Figueiredo RC, Coelho LC. Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. *Journal of applied microbiology*. 2015;119(3):666-76.

118. Asaduzzaman AKM, Hasan I, Chakraborty A, Zaman S, Islam SS, Ahmed FRS, et al. *Moringa oleifera* seed lectin inhibits Ehrlich ascites carcinoma cell growth by inducing apoptosis through the regulation of Bak and NF-kappaB gene expression. *International journal of biological macromolecules*. 2018;107(Pt B):1936-44.

119. Li C, Yan R, Yang Z, Wang H, Zhang R, Chen H, et al. BCMab1-Ra, a novel immunotoxin that BCMab1 antibody coupled to Ricin A chain, can eliminate bladder tumor. *Oncotarget*. 2017;8(28):46704-5.

120. Jiang QL, Zhang S, Tian M, Zhang SY, Xie T, Chen DY, et al. Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. *Cell proliferation*. 2015;48(1):17-28.

121. Shi Z, Li WW, Tang Y, Cheng LJ. A Novel Molecular Model of Plant Lectin-Induced Programmed Cell Death in Cancer. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2017;40(10):1625-9.

122. Cavada BS, Silva MTL, Osterne VJS, Pinto-Junior VR, Nascimento APM, Wolin IAV, et al. *Canavalia bonariensis* lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential. *International journal of biological macromolecules*. 2018;106:369-78.

123. Liao P, Liu W, Li H, Gao H, Wang H, Li N, et al. Morphological changes of ricin toxin-induced apoptosis in human cervical cancer cells. *Toxicology and industrial health*. 2012;28(5):439-48.

124. Zou LB, Zhan JB. Purification and anti-cancer activity of ricin. *Zhejiang da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Zhejiang University Medical sciences*. 2005;34(3):217-9.

125. Tyagi N, Tyagi M, Pachauri M, Ghosh PC. Potential therapeutic applications of plant toxin-ricin in cancer: challenges and advances. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015;36(11):8239-46.
126. Fu LL, Zhou CC, Yao S, Yu JY, Liu B, Bao JK. Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2011;43(10):1442-9.
127. Batista J, Ralph MT, Vaz RV, Souza P, Silva AB, Nascimento D, et al. Plant lectins ConBr and CFL modulate expression toll-like receptors, pro-inflammatory cytokines and reduce the bacterial burden in macrophages infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2017;25:52-60.
128. de Siqueira Patriota LL, Procopio TF, de Santana Brito J, Sebag V, de Oliveira APS, de Araujo Soares AK, et al. *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells. *International journal of biological macromolecules*. 2017;103:36-46.
129. Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. *Nature reviews Immunology*. 2016;16(7):433-48.
130. Singh RS WA. Microbial lectins and their prospective mitogenic potential. *Critical reviews in microbiology*. 2014;40(4):329-47.
131. Cui B, Li L, Zeng Q, Lin F, Yin L, Liao L, et al. A novel lectin from *Artocarpus lingnanensis* induces proliferation and Th1/Th2 cytokine secretion through CD45 signaling pathway in human T lymphocytes. *Journal of natural medicines*. 2017;71(2):409-21.
132. Souza MA, Carvalho FC, Ruas LP, Ricci-Azevedo R, Roque-Barreira MC. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconjugate journal*. 2013;30(7):641-57.
133. Sander VA, Corigliano MG, Clemente M. Promising Plant-Derived Adjuvants in the Development of Coccidial Vaccines. *Frontiers in veterinary science*. 2019;6:20.

134. Benildo S. Cavada VRP-J. ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships. *Int J Mol Sci* 2019;20.
135. Tanasienko OA RM, Pozur VV, Potebnya GP. Influence of bacterial lectins on some reactions of nonspecific immunity in sarcoma 37 transplanted mice. *Experimental oncology*. 2010;32:254-7.
136. Shalimov SA KE, Grinevich YA, et al. Adjuvant immunotherapy in treatment of patients with colorectal cancer. *Oncology*. 2003;5:101–6.
137. Zajciuk VV VR, Cheshuk VE, et al. Efficacy of combination of anticancer autovaccine with standard anticancer treatment in breast cancer (analysis of 10-year surveillance data). *Oncology*. 2015;17: 47-54.
138. Європейська конвенція про захист хребетних тварин щвдтінц. Конвенція, Міжнародний документ 1986р.
139. Кожем`якін ЮМ, Хромов ОС, Філоненко МА, Сайфетдінова ГА. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. 2002:156.
140. Li J. WH. High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR. . *Exp Anim* 2020;3(69):326-35.
141. Каркищенко ВН, Шмидт ЕФ. Исследователи предпочитают мышей BALB/c. *Биомедицина*. 2007; 6: 57-70.
142. Стефанов ОВ. Доклінічне дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації. Київ: Видавничий дім «Авіцена». 2001:361-70.
143. Софьина ЗП, Сыркин АВ. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. *Медицина*. 1980.
144. Dunham LJ, Stewart HL. A survey of transplantable and transmissible animal tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 1953;13(5):1299-377.
145. Calixto-Campos C ZA. The Ehrlich tumor induces pain-like behavior in mice: A novel model of cancer pain for pathophysiological studies and pharmacological screening. *BioMed Res Int* 2013.

146. Chekhun VF, Didenko GV, Cheremshenko NL, et al. Strain of bacteria *Bacillus subtilis* IMB B-7724 – producer of cytotoxic substances with antitumor activity (Pat. №131824 UA). Bul. №2. Publ. 25.01.2019.
147. Podgorsky VS The method for the obtainmen of bacterial lectin, specific to sialic acids. (Pat. № 1791 UA). Publ. 23.01.1991.148. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.
149. Shlyakhovenko VA. Rapid method for determining the concentration of protein in the microvolumes of biological fluids. 1998;1.
150. Mahboobeh R AE. Effect of salinity on growth, chlorophyll, carbohydrate and protein contents of transgenic *Nicotiana Plumbaginifolia* over expressing P5CS gene. 2013;4.
151. Goralsky LP. Fundamentals of histological technology and morphofunctional methods of research in norm and in pathology. 2011.
152. Nakamoto K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. 2009.
153. Dam TK, Brewer CF. Effects of clustered epitopes in multivalent ligand-receptor interactions. Biochemistry. 2008;47(33):8470-6.
154. Луцик МД, Панасюк ЕН, Антонюк ВА. Методы поиска лектинов (фитогемаглютининов) и определение их иммунохимической специфичности. Методические рекомендации для биохимиков и иммунологов. Львов. 1980: 20.
156. Juranic ZD, Neskovic-Konstantinovic Z, Stanojkovic TP, Zizak Z, Srdic T, Stanojevic-Bakic N, et al. The antitumor immune response in HER-2 positive, metastatic breast cancer patients. Journal of translational medicine. 2005;3(1):13.
157. Eghianruwa Q, Odekanyin O, Kuku A. Physicochemical properties and acute toxicity studies of a lectin from the saline extract of the fruiting bodies of the shiitake mushroom, *Lentinula edodes* (Berk). International journal of biochemistry and molecular biology. 2011;2(4):309-17.
158. Muhammadiev RS, Ibragimov AN, Bagaeva TV. Physico-chemical properties of the lectin micromycete *Rhizoctonia solani*. 2016;16.

159. Клаус Дж. Лимфоциты. Методы. Москва: Мир. 1990:395.
160. Mueller J, Brun del Re G, Buerki H, Keller HU, Hess MW, Cottier H. Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *European journal of immunology*. 1975;5(4):270-4.
161. Reiner NE. *Methods in molecular biology. Macrophages and dendritic cells. Methods and protocols. Preface. Methods in molecular biology*. 2009;531:v-vi.
162. 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.
163. Бурлака АП, Ганусевич П, Вовк АВ, Лукін СМ, Вірко СВ. Прогностичне значення показників редокс-стану крові у хворих на рак молочної залози Онкологія. 2018;20(1):17-22.
164. Сиденко АВ, Вишняков ВВ, Исаев СМ. Теория статистики. Учебник М: МАКС-Пресс. 2011:343.
165. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology*. 2010;11(10):889-96.
166. Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stange G, Van den Bossche J, et al. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer research*. 2010;70(14):5728-39.
167. Laoui D, Van Overmeire E, De Baetselier P, Van Ginderachter JA, Raes G. Functional Relationship between Tumor-Associated Macrophages and Macrophage Colony-Stimulating Factor as Contributors to Cancer Progression. *Frontiers in immunology*. 2014;5:489.
168. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annual review of immunology*. 2015;33:643-75.
169. Williams M, Thierry GR, Bonnardel J, Bajenoff M. Establishment and Maintenance of the Macrophage Niche. *Immunity*. 2020;52(3):434-51.
170. Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage

subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(6):2568-73.

171. Griess B, Mir S, Datta K, Teoh-Fitzgerald M. Scavenging reactive oxygen species selectively inhibits M2 macrophage polarization and their pro-tumorigenic function in part, via Stat3 suppression. *Free radical biology & medicine*. 2020;147:48-60.

172. Nonnenmacher Y, Hiller K. Biochemistry of proinflammatory macrophage activation. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2018;75(12):2093-109.

173. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*. 2012;336(6077):86-90.

174. Franklin RA, Liao W, Sarkar A, Kim MV, Bivona MR, Liu K, et al. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science*. 2014;344(6186):921-5.

175. Liu YC, Zou XB, Chai YF, Yao YM. Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International journal of biological sciences*. 2014;10(5):520-9.

176. Watanabe H NK, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. 2004 22 (5):460-6.

177. Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. 2004 22 (5):460-6.

178. Soudi S, Zavarán-Hosseini A. Comparative Study of The Effect of LPS on The Function of BALB/c and C57BL/6 Peritoneal Macrophages. *Cell Journal(Yakhteh)*. 2013;15(1):45-54.

179. Bleul T, Zhuang X, Hildebrand A. Different Innate Immune Responses in BALB/c and C57BL/6 Strains following Corneal Transplantation. *J Innate Immun* 2021;13:49-59.

180. Symchych TV, Fedosova NI, Chumak AV, Cheremshenko NL, Karaman OM, Burlaka AP, Chehun VF. Functions of tumor-associated macrophages and macrophages residing in remote anatomical niches in Ehrlich carcinoma bearing mice. *Experimental oncology*. 2020;42(3):197-203.

181. Chumak AV, Fedosova NI, Cheremshenko NL, Symchych TV, Voyeykova IM, Chekhun VF. Macrophage polarization in dynamics of Lewis lung carcinoma growth and metastasis. *Experimental oncology*. 2021;43(1):15-20.
182. Іванченко АВ, Симчич ТВ, Федосова НІ, Черемшенко НЛ, Караман ОМ. . Особливості поляризації макрофагів різних органів і тканин мишей з карциномою легені Льюїс. Тези науково-практичної конференції молодих вчених: «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», Київ, 4-5 лютого 2019 *Онкологія* 2019;21 (1):63-4.
183. Чумак А, Федосова Н, Симчич Т, Караман О, Черемшенко Н, Діденко Г. Дослідження функціонального стану макрофагів у мишей з експериментальними модельними пухлинами. XVI Міжнародна наукова конференція "Молодь і поступ біології", Львів, 27–29 квітня 2020.
184. Чумак А, Симчич ТВ, Караман О, Черемшенко Н, Федосова Н, Чехун ВФ. Функціональний стан резидентних макрофагів у мишей з модельним пухлинним процесом. XVIII Міжнародна наукова конференція «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки BioScience Advances», Київ. 2020.
185. Scheeren TW, Schober P, Schwarte LA. Monitoring tissue oxygenation by near infrared spectroscopy (NIRS): background and current applications. *Journal of clinical monitoring and computing*. 2012;26(4):279-87.
186. Kuchnir GV LT, Ryvak GP, et al. The characteristics of modern methods for the determination of raw protein in feeds and in plant materials. 2017;19.
187. Kuchnir GV, Levytzkiy TR, Ryvak GP, et al. The characteristics of modern methods for the determination of raw protein in feeds and in plant materials. 2017;19.
188. Antosiewicz JM, Shugar D. UV-Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. Part 1: basic principles and properties of tyrosine chromophore. *Biophysical reviews*. 2016;8(2):151-61.
189. van Die I, Cummings RD. Glycan gimmickry by parasitic helminths: a strategy for modulating the host immune response? *Glycobiology*. 2010;20(1):2-12.
190. Carvalho EVMM OW, Coelho LCB, Correia MTS. Lectins as mitosis stimulating factors: Briefly reviewed. *Life Sci*. 2018;207:152-7.

191. Свистунова АА. Доклинические исследования лекарственных веществ. ГЭОТАР-Медиа. 2017: 302.
192. Fedosova NI, Cheremshenko NL, Getman KI, Karaman OM, Symchych TV, Ivanchenko AV, Danyliuk OI, Voeykova IM, Didenko GV. Bioactivity of the *Bacillus subtilis* IMV B-7724 extracellular lectin. *Mikrobiol Z* 2019;81(4):107-17.
193. Fedosova NI, Cheremshenko NL, Hetman KI, Symchych TV, Chumak AV, Shliahovenko VO, Voyeykova IM, Didenko HV. Physicochemical and cytotoxicity properties of *Bacillus subtilis* IMB B-7724 extracellular lectin. *Mikrobiol Z* 2021; 83(1): 39-48.
194. Федосова НІ, Черемшенко НЛ, Симчич ТВ, Чумак АВ, Воєйкова ІМ. Оцінка гострої токсичності лектину *B. subtilis*. IMB B-7724. Фармакологія та лікарська токсикологія 2021;15(2):110-6.
195. 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 Sciences* 2021;3.
196. Chumak A, Shcherbina V, Fedosova N. Changes in the intact mice macrophages` polarization by the influence of lectin *B.subtilis* IMB B-7724. Науково-практична конференція молодих вчених «Сучасна онкологія: від фундаментальних досліджень до нових терапевтичних підходів Київ, 12-13 жовтня 2021.
197. Ahmed FRS, Amin R, Hasan I, Asaduzzaman AKM, Kabir SR. Antitumor properties of a methyl-beta-d-galactopyranoside specific lectin from *Kaempferia rotunda* against Ehrlich ascites carcinoma cells. *International journal of biological macromolecules*. 2017;102:952-9.
198. Marvibaigi M, Supriyanto E, Amini N, Abdul Majid FA, Jaganathan SK. Preclinical and clinical effects of mistletoe against breast cancer. *BioMed research international*. 2014;2014:785479.
199. Zhou J, Hu M, Li J, Liu Y, Luo J, Zhang L, et al. Mannan-Binding Lectin Regulates Inflammatory Cytokine Production, Proliferation, and Cytotoxicity of Human Peripheral Natural Killer Cells. *Mediators of inflammation*. 2019;2019:6738286.

200. Zhou J, Li Z, Wu T, Zhao Q, Zhao Q, Cao Y. LncGBP9/miR-34a axis drives macrophages toward a phenotype conducive for spinal cord injury repair via STAT1/STAT6 and SOCS3. *Journal of neuroinflammation*. 2020;17(1):134.
201. van Dalen FJ, van Stevendaal M, Fennemann FL, Verdoes M, Iлина O. Molecular Repolarisation of Tumour-Associated Macrophages. *Molecules*. 2018;24(1).
202. Li D, De S, Li D, Song S, Matta B, Barnes BJ. Specific detection of interferon regulatory factor 5 (IRF5): A case of antibody inequality. *Scientific reports*. 2016;6:31002.
203. Almuttaqi H, Udalova IA. Advances and challenges in targeting IRF5, a key regulator of inflammation. *The FEBS journal*. 2019;286(9):1624-37.
204. Arora S, Dev K, Agarwal B, Das P, Syed MA. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology*. 2018;223(4-5):383-96.
205. Tugal D, Liao X, Jain MK. Transcriptional control of macrophage polarization. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33(6):1135-44.
206. Chumak AV, Fedosova NI, Shcherbina VM, Cheremshenko NL, Karaman OM, Chekhun VF. Influence of bacterial lectin on key regulatory links of functional activity of macrophages of mice with ehrlich carcinoma. *Exp Oncol* 2021; 3: 197-203. DOI: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no-3.16537.
207. Чумак А, Симчич ТВ, Черемшенко Н, Федосова Н. Розробка нового методу імунотерапії раку за допомогою лектину *B. subtilis* ІМВ 7724. . Матеріали науково-практичної конференції «Другий національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 175-річчю з дня народження П Мечникова (за участю міжнародних спеціалістів)» Харків, 16-17 вересня 2020 року.
208. Чумак АВ, Федосова НІ, Караман ОМ, Черемшенко НЛ, Симчич ТВ, Воєйкова ІМ. Протипухлинна активність лектину *B.subtilis* ІМВ В-7724 у мишей з аденокарциномою Ерліха. XIV з'їзд онкологів та радіологів України Київ, 3009–02102021.

209. Кжышковска ЮГ, Грачев АН. Маркеры моноцитов и макрофагов для диагностики иммунопатологий. Патогенез. 2012;10:14-9.
210. Sawa-Wejksza K, Kandefer-Szerszen M. Tumor-Associated Macrophages as Target for Antitumor Therapy. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2018;66.
211. Бережная НМ. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. I. Клетки и цитокины - участники воспаления. Онкология. 2009;1.
212. Чехун ВФ, Шербан С, Савцова ЗД. Гетерогенность опухоли - динамичное состояние. Онкология. 2012;5.
213. Бережная НМ. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. Взаимодействие клеток системы иммунитета с другими компонентами микроокружения Онкология. 2009;2.
214. Tang X, Mo C, Wang Y, Wei D, Xiao H. Anti-tumour strategies aiming to target tumour-associated macrophages. *Immunology*. 2013;138(2):93-104.
215. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51.
216. Paul D. The systemic hallmarks of cancer. *T J Cancer Metastasis Treat* 2020;6:29.
217. Roszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of inflammation*. 2015;2015:816460.
218. Davis MJ, Tsang TM, Qiu Y, Dayrit JK, Freij JB, Huffnagle GB, et al. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *mBio*. 2013;4(3):e00264-13.
219. Potebnya GP, Lisovenko GS. Biotherapy of cancer: achievements and perspectives. *Oncology*. 2010;12.
220. Chekhun VF, Didenko GV, Cheremshenko NL, et al. Strain of bacteria *Bacillus subtilis* IMB B-7724 – producer of cytotoxic substances with antitumor activity (Pat. №131824 UA). *Bul. №2*. Publ. 25.01.2019.
221. Караман ОМ, Федосова НІ, Восійкова ІМ, Черемшенко НЛ, Іванченко АВ, Савцова ЗД. Перспективи використання лектинів для діагностики і лікування злоякісних новоутворень. Онкология 2018; 1(72): 10-16.

222. Федосова НІ, Караман ОМ, Воєйкова ІМ, Іванченко АВ, Черемшенко НЛ, Круць ОО, Діденко ГВ. Оцінка цитотоксичної активності лектинподібної речовини *B. subtilis* 7724 в системі in vitro. Онкологія 2018; 20 №3(74): 10-16.
223. Weiss M, Blazek K, Byrne AJ, Perocheau DP, Udalova IA. IRF5 is a specific marker of inflammatory macrophages in vivo. Mediators of inflammation. 2013;2013:245804.
224. Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Ebrahimi-Kalan A, Jaymand M, et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. Cell communication and signaling : CCS. 2020;18(1):59.
225. Hong IS. Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types. Experimental & molecular medicine. 2016;48(7):e242.
226. Jeannin P, Paolini L, Adam C, Delneste Y. The roles of CSFs on the functional polarization of tumor-associated macrophages. The FEBS journal. 2018;285(4):680-99.
227. Abdolvahab MH, Darvishi B, Zarei M, Majidzadeh AK, Farahmand L. Interferons: role in cancer therapy. Immunotherapy. 2020;12(11):833-55.
228. Budhwani M, Mazzeri R, Dolcetti R. Plasticity of Type I Interferon-Mediated Responses in Cancer Therapy: From Anti-tumor Immunity to Resistance. Frontiers in oncology. 2018;8:322.
229. Ali S, Mann-Nuttel R, Schulze A, Richter L, Alferink J, Scheu S. Sources of Type I Interferons in Infectious Immunity: Plasmacytoid Dendritic Cells Not Always in the Driver's Seat. Frontiers in immunology. 2019;10:778.

ДОДАТОК Б

Список публікацій здобувача

1. Караман ОМ, Федосова НІ, Воєйкова ІМ, Черемшенко НЛ, Іванченко АВ, Савцова ЗД. Перспективи використання лектинів для діагностики і лікування злоякісних новоутворень. Онкологія 2018; 1(72): 10-16. *(Дисертантом проаналізовано вітчизняну та закордонну літературу для написання статті).*
2. Федосова НІ, Караман ОМ, Воєйкова ІМ, Іванченко АВ, Черемшенко НЛ, Круць ОО, Діденко ГВ. Оцінка цитотоксичної активності лектинподібної речовини *B. subtilis* 7724 в системі *in vitro*. Онкологія 2018; 20 №3(74): 218-224. *(Дисертантом проаналізовано вітчизняну та закордонну літературу для написання статті).*
3. Karaman OM, Ivanchenko AV, Chekhun VF. Macrophages — a perspective target for antineoplastic Immunotherapy. Exp Oncol 2019; 4 (41): 282–290. *(Дисертантом проведено аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті).*
4. Fedosova NI, Cheremshenko NL, Getman KI, Karaman OM, Symchych TV, Ivanchenko AV, Danyliuk OI, Voeykova IM, Didenko GV. Bioactivity of the *Bacillus subtilis* IMV B-7724 extracellular lectin. Mikrobiol. Z 2019; 81(4):107-117. *(Дисертантом проведено планування та виконання основної експериментальної частини роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті).*
5. Symchych TV, Fedosova NI, Chumak AV, Cheremshenko NL, Karaman OM, Burlaka AP, Voyeykova IM. 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. *(Дисертантом проведено планування та виконання*

основної експериментальної частини роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті).

6. Chumak AV, Fedosova NI, Shcherbina VM, Cheremshenko NL, Karaman OM, Chekhun VF. Influence of bacterial lectin on key regulatory links of functional activity of macrophages of mice with ehrlich carcinoma. *Exp Oncol* 2021; 43(3): 197-203. *(Дисертантом проведено планування та виконання основної експериментальної частини роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті).*
7. 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. *(Дисертантом проведено планування та виконання основної експериментальної частини роботи, аналіз та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті).*
8. Chumak AV, Fedosova NI, Cheremshenko NL, Symchych TV, Voyeykova IM, Chekhun VF. Macrophage polarization in dynamics of lewis lung carcinoma growth and metastasis. *Exp Oncol* 2021; 43(1), 15–20. *(Дисертантом проведено основну частину експериментальної роботи та обробку отриманих даних, написання та оформлення статті).*
9. Fedosova NI, Cheremshenko NL, Hetman KI, Symchych TV, Chumak AV, Shliahovenko VO, Voyeykova IM, Didenko HV. Physicochemical and cytotoxicity properties of *Bacillus subtilis* IMB B-7724 extracellular lectin. *Mikrobiol. Z* 2021; 83(1): 39-48. *(Дисертантом виконано частину експериментальної роботи, підбірано та проаналізовано літературу).*
10. Федосова НІ, Черемшенко НЛ, Симчич ТВ, Чумак АВ, Воєйкова ІМ. Оцінка гострої токсичності лектину *B. subtilis*. IMB B-7724. *Фармакологія та лікарська токсикологія* 2021; 15(2): 110-116. *(Дисертантом виконано частину експериментальної роботи, підбірано та проаналізовано літературу).*
11. Черемшенко НЛ, Федосова НІ, Гетьман КІ, Караман ОМ, Симчич ТВ, Іванченко АВ, Воєйкова ІМ, Чехун ВФ. Цитотоксичний лектин з

протипухлинною активністю. Патент на корисну модель №141944 UA. Опубл. 12.05.2020, бюл. № 9/2020.

- 12.Іванченко АВ, Симчич ТВ, Федосова НІ, Черемшенко НЛ, Караман ОМ. Особливості поляризації макрофагів різних органів і тканин мишей з карциномою легені Льюїс. Тези науково-практичної конференції молодих вчених: «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», Київ, 4-5 лютого 2019. Онкологія 2019; 21, 1: 63-64.
- 13.Чумак А, Федосова Н, Симчич Т, Караман О, Черемшенко Н, Діденко Г. Дослідження функціонального стану макрофагів у мишей з експериментальними модельними пухлинами. XVI Міжнародна наукова конференція "Молодь і поступ біології", Львів, 27–29 квітня 2020 р.
- 14.Чумак А, Симчич Т, Караман О, Черемшенко Н, Федосова Н, Чехун ВФ. Функціональний стан резидентних макрофагів у мишей з модельним пухлинним процесом. XVIII Міжнародна наукова конференція «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки. BioScience Advances», Київ, травень 2020 р.
- 15.Чумак А, Симчич Т, Черемшенко Н, Федосова Н. Розробка нового методу імунотерапії раку за допомогою лектину *B. subtilis* IMB 7724. Матеріали науково-практичної конференції «Другий національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 175-річчю з дня народження І.І. Мечникова (за участю міжнародних спеціалістів)». Харків, 16-17 вересня 2020 року.
- 16.Чумак АВ, Федосова НІ, Караман ОМ, Черемшенко НЛ, Симчич ТВ, Воєйкова ІМ. Протипухлинна активність лектину *B.subtilis* IMB B-7724 у мишей з аденокарциномою Ерліха. XIV з'їзд онкологів та радіологів України. Київ, 30.09– 02.10.2021.

Відомості про апробацію результатів дисертації

1. Науково-практична конференція молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопаталогією» (м.Київ, 2019 р.) – постерна доповідь.
2. XVI міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (м.Львів, 2020 р.) – усна доповідь.
3. XVIII міжнародна наукова конференція «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки. BioScience Advances» (Київ, 2020 р.) – тези.
4. Науково-практична конференція «Другий національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 175-річчю з дня народження І.І. Мечникова (за участю міжнародних спеціалістів)» (Харків, 2020 р.) – усна доповідь.
5. XIV з'їзд онкологів та радіологів України (Київ, 2021 р.) – тези.