

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Інститут високих технологій

Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії
д.х.н., професор Ігор Володимирович Комаров
Протокол №____ засідання кафедри
Від «__» _____ 2021 року

**ФЕНОТИПОВІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ
ПЕРИТОНЕАЛЬНИХ МАКРОФАГІВ МИШЕЙ ЗА УМОВ
ТЕРАПІЇ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНОЇ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС
ФОТОЧУТЛИВИМИ ПЕПТИДОМІМЕТИКАМИ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студента напряму підготовки
102 «Хімія (Хемоінформатика)»
Ступака Івана Андрійовича

Науковий керівник, професор, д. б. н.,
Толстанова Ганна Миколаївна

Оцінка захисту роботи

Київ - 2021 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

M – макрофаги;

M1- мічені антитілами анти-CD80 FITC, анти-iNOS PE

M2 –мічені антитілами анти-CD80 FITC, анти-Arginase APC

HCT – нітросиній тетразолій;

PMA – форбол 12-миристат-13-ацетат;

ПАМ – пухлино-асоційовані макрофаги;

ФДТ- фотодинамічна терапія

TNF – фактор некрозу пухлини;

VEGF-A – фактор росту судинного ендотелію;

IFN – інтерферон;

LPS – ліпополісахарид;

LLC – карцинома легені Льюїса;

IL – інтерлейкін;

GMPs – гранулоцитарно-макрофагальні попередники;

MDPs – моноцитарно-дендритні клітини-попередники;

iNOS – індукцибельна синтаза оксиду азоту;

NOS – синтаза оксиду азоту;

FITC – флуоресцеїнаізотіоціанат;

PE – фікоеритрин;

APC – алко-фікоціанін.

LMB002 – фоточутливий пептидоміметик

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	7
1.1. Стадії фагоцитозу	7
1.2. Система фагоцитарних клітин	9
1.3. Макрофаги, їх функції та роль в організмі	11
1.4 Макрофаги і пухлинний ріст	14
1.5. Стратегії фотодинамічної протипухлинної терапії.....	21
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження	23
2.1. Перещеплена модель карциноми легень Льюїс... ..	23
2.2. Визначення росту пухлин та рівня метастазування.....	23
2.3. Отримання перитонеальних макрофагів.....	24
2.4. Підрахунок клітин у камері Горяєва	24
2.5. Оцінка стимульованої метаболічної активності перитонеальних макрофагів.....	26
2.6. Імунофенотипування макрофагів	26
2.7. Визначення адгезивних властивостей перитонеальних макрофагів за забарвленням фіолетовим кристалічним	27
2.8. Індукована проліферація Т і В-лімфоцитів в селезінці	28
2.9. Статистичний аналіз	29
РОЗДІЛ 3. Результати та їх обговорення	30
3.1. Отримання перитонеальних макрофагів, визначення їх життєздатності та адгезії.....	30
3.2. Дослідження метаболічної активності макрофагів в НСТ-тесті	34
3.3. Визначення фенотипу M1 та M2 макрофагів в експериментальних групах.....	38
3.4. Визначення рівня апоптозу та проліферації спленоцитів.	42
ВИСНОВКИ	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	47

ВСТУП

Фагоцитарна активність - одна з основних функцій імунних клітин і тому її дослідження є дуже важливим для розуміння механізмів функціонування організму в нормі та за патологічних станів [1]. Найбільш інформативними показниками для оцінки цієї функції вважають фагоцитарну активність, визначену в НСТ тесті з метою оцінки спонтанної та індукованої активності [2].

Серед диференційованих імунних клітин, що мають фагоцитарну природу та мають специфічні фенотипові характеристики найбільш поширеними є макрофаги [3]. Вони являють собою різноманітний набір імунних клітин, які поляризуються різними мікросередовищними стимулами, створюючи гетерогенну популяцію з різними властивостями та функціями. Макрофаги беруть участь у гомеостазі тканин, захисних механізмах та загоєнні ран. Вони також відіграють певну роль у різних захворюваннях, таких як аутоімунні розлади, атеросклероз та пухлини [4], які є найбільш поширеними на сьогодні патологіями. При цьому спостерігається імуносупресивний стан, що пов'язано з перепрограмуванням макрофагів M1 в M2 фенотип. Багато досліджень свідчать, що патологічна поляризація та перепрограмування макрофагів призводить до прогресування пухлинної хвороби в напрямку неоангіогенезу та метастазування [5,6]. Пригнічення неоангіогенезу залежить не лише від стану васкулярної сітки, а й від гіперпродукції проангіогенних факторів. Останнім часом виявлено, що суттєву роль в даному процесі можуть відігравати пухлиноасоційовані макрофаги (ПАМ), роль яких полягає в надлишковій продукції за умов гіпоксії фактору росту ендотеліальних клітин (VEGF), а також ряду цитокінів, які в нормі залучені у ангіогенез [6,7]. Використання нових підходів в терапії новоутворень пов'язано з підходами комбінованої терапії, за яких використовують вплив не лише на безпосередні мішені новоутворень - пухлинні клітини, а й на клітини імунної системи, які

рекрутуються пухлиною. Зокрема, одними із важливих елементів є ПАМ, що можуть стимулювати пухлинний ріст та метастазування. Тому, важливим напрямком експериментального дослідження нових стратегій протипухлинної терапії є вивчення не лише ефективності відносно пухлинних клітин, а й інших нормальних клітин організму, що можуть стимулювати/пригнічувати пухлинний ріст. Насьогодні одним із напрямків комбінованої протипухлинної терапії є використання цитостатиків з подальшим підсиленням їх дії за допомогою активації фотодинамічною терапією (ФДТ) [8-10]. Така терапія є класичною, коли в якості фотоактивних елементів використовують мішені з активними формами кисню. В сучасній ФДТ застосовують більше 60 лікарських засобів, що мають фотосенсибілізуючу активність, які умовно можна розділити на 3 великі типи: похідні порфіринів, похідні хлоринів та синтетичні похідні барвників. Іншим важливим компонентом методу ФДТ є джерела лазерного опромінення, які використовують широкополосні лампи та монохромні лазерні установки. Також сьогодні існує новий напрям ФДТ без участі молекулярного кисню за участі низькомолекулярних пептидів, які під дією видимого світла здатні змінювати свою конформацію, і відповідно активність [10]. Дослідження ефективності протипухлинної терапії проводять на експериментальних моделях, однією із яких є високометастазуючий штаб перещеплюваної карциноми легені Льюїс. Це високометастазуючий штаб, що входить в обов'язкові протоколи доклінічного вивчення протипухлинної терапії.

Крім основних показників (динаміки росту пухлин та рівня метастазування) важливим є визначення імуномодулюючого ефекту такої терапії.

Саме тому, **метою** нашої роботи було вивчення фагоцитарної активності, фенотипових особливостей перитонеальних макрофагів мишей

та стану спленоцитів за умов пухлинного росту перещеплюваної карциноми легень Льюїс та терапії з використанням фоточутливих пептидоміметиків

Відповідно до мети були поставлені такі **завдання**:

- Виділити перитонеальні макрофаги у тварин інтактних, пухлиноносіїв та тварин з терапією фоточутливим пептидоміметиком;
- Визначити рівень фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів з використанням НСТ-тесту у тварин вищезазначених груп
- Оцінити фенотип перитонеальних макрофагів (M1 та M2) в цитофлуориметричному аналізі
- Визначити проліферативні та апоптичні показники Т- та В селезінкових лімфоцитів за мітоген індукованої активації.

Ключові слова: перитональні макрофаги, НСТ-тест, апоптичні показники.

РОЗДІЛ I

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Стадії фагоцитозу

Процес фагоцитозу здійснюється за допомогою механізму, що діє як замок– змійка (від англ. zipper, тобто послідовного розпізнавання патогенів псевдоподіями фагоцитів). Поглинання мікроорганізмів відбувається шляхом інвагінації плазматичної мембрани клітин і утворення фагоцитарної вакуолі. При цьому активуються дві функції фагоцитів: викид вмістимого гранул у фагосому та кисневий вибух — каскад послідовних реакцій утворення реактивних метаболітів Оксигену, здатних руйнувати мікроорганізми [1]. Традиційно виділяють 8 стадій фагоцитозу:

- 1) хемотаксис (спрямований рух фагоциту до мішені);
- 2) адгезія (прикріплення до мішені);
- 3) активація мембрани (актин-міозинова система - фагоциту);
- 4) початок власне фагоцитозу, пов'язаний з утворенням навколо поглинуваної мішені псевдоподій;
- 5) утворення фагосоми (поглинувана мішень виявляється укладеною у вакуоль завдяки оточенню її плазматичною мембраною фагоцита);
- 6) злиття фагосоми з лізосомами;
- 7) лізис і переварювання;
- 8) викид продуктів деградації з клітини.

Таблиця 1.1

Стадії фагоцитозу

Стадія	Функція	Фактори клітини-мішені	Фактори фагоцита
Хемотаксис	Направлений рух фагоциту до об'єкта	Хемотаксини: бактеріальні, C5a, C3a, хемокіни, лейкотриєни	Рецептори хемотаксичних факторів, цитоскелет
Адгезія	Встановлення контакту (прилипання фагоцита)	Опсоніни (антитіла, C3b, фібронектин), молекули адгезії	Молекули адгезії (інтегрини та інші), рецептори (FcR, C3R та інші)
Активація мембрани	Підготовка до поглинання	Інтегрини, опсоніни, захисні фактори мікроорганізмів	Білки G, Ca ²⁺ , сигнальні фактори, кінази, цитоскелет
Початок власне фагоцитозу	Інвазія об'єкта	Захисні фактори, що перешкоджають фагоцитозу	Цитоскелет (мікрофіламенти)
Утворення фагосоми	Замикання мембрани і занурення	Не встановлені	Цитоскелет (мікротрубочки, мікрофіламенти)
Утворення фаголізосоми	Злиття фагосоми і лізосоми	Блокуючі агенти	Теж саме
Кілінг і перетравлення	Загибель об'єкта і його перетравлення	Фактори стійкості	O ₂ - і NO- залежні фактори, катіонні білки, ферменти
Викид продуктів деградації	Викид вмісту фаголізосоми з клітини	Не встановлені	Цитоскелет, мембрана

Після досить тісного прикріплення клітини, що фагоцитує, до клітини-мішені (адгезія) вона поглинає об'єкт фагоцитозу. При цьому утворюється так звана фагосома, або фагоцитарна вакуоля, що формується за рахунок мембрани клітини, яка фагоцитує, навколо поглинуваної частинки. Така фагосома просувається всередині цитоплазми клітини в напрямку до лізосоми, і мембрани цих двох вакуолей зливаються в одну вакуолю — фаголізосому. Після утворення фаголізосоми починається процес перетравлювання поглиненого чужорідного матеріалу. Вміст лізосомних гранул дуже важливий для руйнування поглиненого матеріалу і знищення мікроорганізмів. Лізосомні гранули бувають двох типів: а) первинні, що містять багато гідролітичних ферментів, мієлопероксидазу, лізоцим і катіонні білки; б) вторинні (специфічні), яких більше, ніж первинних, і які містять лужну фосфатазу, лактоферин і лізоцим. Уміст первинних і вторинних гранул під час руйнування клітин - фагоцитів може потрапляти в інтерстиційний (проміжний) простір. Цей процес називають екзоцитозом. Для нього характерне пошкодження тканин і запальні процеси [3].

1.2 Система фагоцитарних клітин

Фагоцитарні клітини – основна група клітин системи природного імунітету. Вони мають мієлоїдне походження і здатні до фагоцитозу.

По морфології і функції їх поділяють на мононуклеарні клітини (моноцити/макрофаги) і нейтрофіли, що поділяються на макро – і мікрофаги. Розвиваються із гемопоетичних стовбурових клітин кісткового мозку. Фагоцити – найбільш важливий компонент системи природного імунітету. За допомогою різноманітних рецепторів, так званих рецепторів природного імунітету, фагоцити взаємодіють з патогенами, а також з пошкодженими соматичними клітинами, фагоцитують і знищують їх. Фагоцити не мають рецепторів, подібних TCR і BCR.

Мононуклеарні фагоцити – довгоживучі клітини (тривалість життя складає місяці і роки), представлені резидентними макрофагами, що перебувають у тканинах, і циркулюючими моноцитами, що мобілізуються в місце запалення (Рис.1.1)

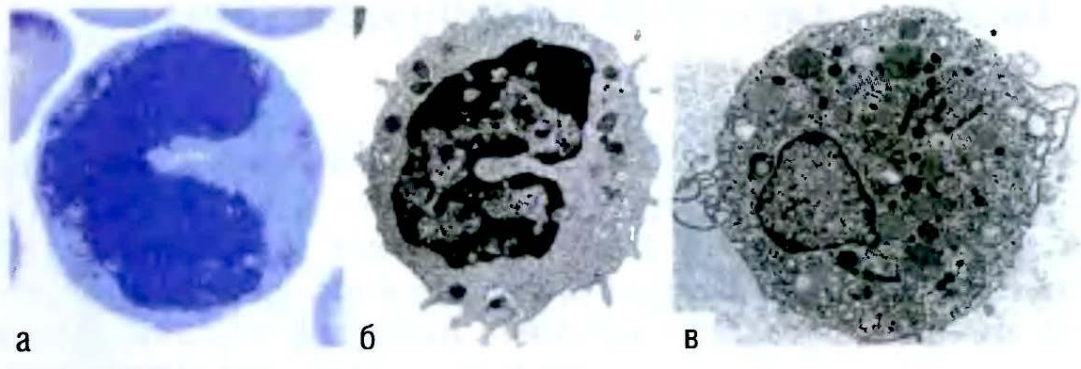


Рис.1.1 Морфологія мононуклеарних фагоцитів: а – моноцит периферичної крові людини, світлова мікроскопія; б – моноцит периферичної крові людини, електронна мікрофотографія; в – електронна мікрофотографія активованого тканинного макрофага з фагосомами.

Моноцити – великі клітини (діаметр 10 – 18 мкм) з підковоподібним ядром, мембраною з багаточисельними псевдоподіями, вираженим комплексом Гольджі.

Нейтрофіли, як універсальні фаги, реагують на будь – яке пошкодження тканин. Активовані нейтрофіли синтезують ферменти, відповідальні за безпосереднє пошкодження тканин при запальних процесах. Властивості нейтрофілів забезпечують їх участь у розвитку гострого запалення, серед них найважливішими є наявність цитотоксичних факторів; висока чутливість до будь – яких локальних змін гомеостазу; здатність нагромаджуватись у вогнищах пошкодження та ініціювати ланцюгову реакцію з виділенням цитотоксичних речовин і забезпеченням локального переважання в балансі ефektor – інгібітор; поява при секреції нейтрофілів біологічно активних речовин, які активують попередники медіаторів запалення. Перебіг патологічного

процесу при інфекційних хворобах великою мірою залежить від функціональної здатності нейтрофілів, зокрема їхньої фагоцитарної активності.

1.3. Макрофаги, їх функції та роль в організмі

Макрофаги є спеціалізованими клітинами, що беруть участь у пізнаванні чужорідних компонентів, фагоцитозі, знищенні бактерій та інших шкідливих організмів. Крім того, вони також можуть презентувати антигени до Т-клітин та ініціювати запалення шляхом вивільнення молекул (відомих як цитокіни), які активують інші клітини. Макрофаги є важливими клітинами імунної системи, які формуються у відповідь на інфекцію або накопичують пошкоджені або мертві клітини. Термін "макрофаг" сформований поєднанням грецьких термінів "макро", що означає "великий" та "фагін", тобто їдять.

Макрофаги походять з моноцитів крові, які виходять з циркулюючого русла та диференціюються в різних тканинах. Існує суттєва неоднорідність серед кожного типу макрофагів, що, ймовірно, відображає необхідний рівень спеціалізації в середовищі будь-якої заданої тканини. Ця неоднорідність відображається на їхній морфології, типі збудників, які вони можуть розпізнати, а також на рівні вироблених ними запальних цитокінів (наприклад, IL-1, IL-6, фактор некрозу пухлини альфа). Крім того, макрофаги виробляють активні види кисню, такі як оксид азоту, які можуть вбивати фагоцитозних бактерій. Гетерогенний характер цих клітин не може бути виключно результатом їх процесу диференціювання, але, ймовірно, він успадковується від їх попередників моноцитів.

Макрофаги зустрічаються по всьому організму у всіх тканинах, де вони відіграють важливу роль при імунному нагляді. Вони здатні модифікувати їх імунологічну відповідь за індивідуальними

подразниками [11]. Крім того, макрофаги також демонструють фенотипову неоднорідність залежно від їх локального середовища. Функція макрофагів може бути розділена на дві основні ролі: по-перше, вони задіяні в підтримці тканин (гомеостаз), де макрофаги очищають апоптотичні чи некротичні клітини та залишки клітин і виділяють фактори росту і, як правило, регулюють запалення тканин [12]. Інша основна функція полягає в тому, щоб ідентифікувати та фагоцитувати чужорідні антигени з вірусних, бактеріальних та паразитарних патогенів, з наступною стимуляцією адаптивної імунної відповіді шляхом обробки та презентації антигенів. При виявленні та у відповідь на подразники активізуються макрофаги, що приводить до змін, що дозволяють поглинання збудника, індукує вироблення запальних цитокінів, активізує сигнальні шляхи, змінює експресію генів та індукує набутий імунітет [12].

Макрофаги утворюються шляхом диференціювання моноцитів, однієї з основних груп білих кров'яних клітин імунної системи. Макрофаги, присутні у людини, становить близько 21 мікрметрів в діаметрі. Вони можуть вижити протягом декількох місяців за раз. Вони також беруть участь у розвитку неспецифічного або вродженого імунітету. Макрофаги мігрують і циркулюють практично в кожній тканині, Макрофаги є життєво важливими природженими імунними клітинами, циркулюють в крові як моноцити і диференційовані тканинспецифічні макрофаги [13,14].

Згідно поляризації макрофагів вони класифікуються як класично активовані макрофаги M1 або, як альтернативно активовані M2 макрофаги. Активуються макрофаги M1 за допомогою інтерферону- γ , ліпополісахариду (ЛПС) або фактору некрозу пухлини (TNF) - α і мають прозапальну та бактерицидну функції. Інтерлейкін (ІЛ) -1, ІЛ-12, ФНО- α та індуцибельна

синтази оксиду азоту експресуються в макрофагах M1 [15,16]. Макрофаги M2 індукуються IL-4 і IL -13 і ідентифікуються за рецептором аргінази-1, маннози (MMR, CD206) та (SR-A, CD204) [17,18]. Класично активовані макрофаги M1-містять імунні ефекторні клітини з гострим запальним фенотипом. Вони є досить агресивними проти бактерій і виробляють велику кількість лімфокінів. В якості альтернативи активовані, протизапальні M2-макрофаги можуть бути розділені щонайменше на три підгрупи. Ці підтипи мають різні функції, в тому числі регуляції імунітету, підтримку толерантності і відновлення тканин / загоєння ран (Differentiation of M1- or M2-Macrophages from PBMC/Monocytes)

Макрофаги здатні виявляти патогени бактерій та інших мікроорганізмів, використовуючи систему рецепторів розпізнавання, таких як Toll-like рецептори (TLRs). Ці рецептори можуть специфічно зв'язуватися з різними компонентами збудника, такими як цукри (ЛПС), РНК, ДНК або позаклітинними білками (наприклад, флагелін з бактеріальних джгутиків). Роль фагоцитів в імунній відповіді дуже велика. Вони виконують ряд ключових функцій як в природному, так і в набутому імунітеті. Активація фагоцитів запускається через багато поверхових рецепторів. Головна роль в активації фагоцитів відводиться паттернрозпізнавачим рецепторам природного імунітету, таким як Toll – подібні рецептори, NOD – рецептори, манозні рецептори, рецептори комплемента і багато інших. Відповідна реакція розвивається швидко, не потребує проліферації і диференціювання клітин. Процес активації зазвичай поділяється на два етапи: праймінг і сама активація. Суть праймінгу в тому, що попередня обробка клітин невеликою кількістю стимулятора (1-й сигнал), дія якого не викликає прямої активації, супроводжується збільшенням відповіді фагоцитів на другий сигнал. В результаті активовані фагоцити виконують наступні функції:

Процесінг і презентація антигена («професіональними» антигенпредставляючими клітинами: дендритними, мононуклеарними фагоцитами) [19].

Важлива роль у захисті організму від шкідливого впливу агентів зовнішнього середовища належить фагоцитарної функції нейтрофільних лейкоцитів. Нейтрофіли периферичної крові представляють по суті першу лінію захисту організму у вогнищі ураження. Володіючи здатністю вільного пересування, нейтрофільні лейкоцити легко проходять базальні мембрани і між клітинними елементами, прямуючи до місця пошкодження, запалення і тканинного розпаду [4].

Відомо, що процес фагоцитозу супроводжується утворенням активних форм кисню (АФК), які генеруються нейтрофілами в значних кількостях на початкових стадіях стимуляції імунокомпетентних клітин. Утворення АФК забезпечує фагоцитарну активність нейтрофілів, еозинофілів, моноцитів. Функціональну активність нейтрофілів пов'язують з їх здатністю генерувати АФК. Рівень продукції АФК у нейтрофілах визначають *in vitro* у реакції відновлення цими клітинами нітросинього тетразолію (ЕСТ) до нерозчинних гранул диформазиу [3].

1.4. Макрофаги і пухлинний ріст

Фенотипово-функціональна гетерогенність макрофагів обумовлена багатогранною природою їх функцій. Макрофаги належать до категорії мононуклеарних фагоцитів. Вони утворюються з мієлоїдних попередників у кістковому мозку, селезінці і фетальній печінці. Новоутворені моноцити залишають специфічне мікрооточення кісткового мозку і прямують через судинні стінки в кровотік. В циркулюючій крові вони взаємодіють з різноманітними агентами (цитокінами, хемокінами, гормонами, імуноглобулінами, жирними кислотами, адренергічними і холінергічними

агоністами та ін.), здатними чинити вплив, який визначає їх фенотипові і функціональні характеристики.

Під впливом хемокінів і хемініфакторів циркулюючі моноцити вибірково спрямовуються в різноманітні тканини завдяки адгезії до судинного ендотелію. Адгезія циркулюючих моноцитів до ендотелію судин опосередковується взаємодією лігандів таких, як LFA-1, на поверхні моноцитів і молекулами міжклітинної адгезії (ICAM-1, E- і P-селектини) на поверхні ендотеліоцитів. Після екстравазації моноцити мігрують в тканину, під впливом мікрооточення якої вони диференціюють, перетворюючись на резидентні макрофаги і залишаються в тканині протягом 30-90 діб, після чого гинуть або емігрують у локальні лімфовузли.

Відмінною рисою макрофагів є їх фенотипово-функціональна гетерогенність, обумовлена як мікрооточенням тканини, так і природою активаційних стимулів. Ключові фенотипові маркери присутні на поверхні резидентних макрофагів у різних тканинах, однак, в залежності від функціональної спеціалізації тканини, рівень їх експресії відрізняється: CD14 у великій кількості представлений на мембрані циркулюючих макрофагів і практично відсутній на альвеолярних макрофагах, FcγRs широко представлені на перитонеальних макрофагах і супресовані на резидентних клітинах матки і децидуальної оболонки. Незалежно від конститутивної чи індукованої міграції, вплив на макрофаги спричиняють ліганди, з якими вони зв'язуються: змінені клітини хазяїна, що експресують мутовані рецептори, модифіковані молекули, екзогенні агенти, тощо. Ці ліганди розпізнаються різними рецепторами на поверхні клітини, що призводить в кожному конкретному випадку до стимуляції ендоцитозу, фагоцитозу, внутрішньоклітинного сигналіngu, комплексу змін в активації або репресії тих чи інших генів і продукції більше, ніж 150 біологічно активних медіаторів.

Відповідно до Th1/Th2 дихотомії імунної відповіді існує, щонайменше, два типи спрямованості активації макрофагів: класична (M1) і альтернативна (M2). Взаємодія макрофагів з агентами запалення такими, як патогенасоційовані мікробні структури, або прозапальні цитокіни (наприклад, IFN- γ), призводить до прозапальної (класичної) активації цих клітин, котра супроводжується продукцією ними прозапальних цитокінів, реактивних форм кисню, окису азоту та ін. У сукупності така активація макрофагів призводить до розвитку запального процесу і індукуванню імунної відповіді Th1-типу. Надмірна прозапальна активація макрофагів може виступати патогенетичним фактором ряду захворювань людини таких, як подагра ішемічна хвороба та ін. Альтернативна активація макрофагів призводить до розвитку імунної відповіді Th2 типу. Такі макрофаги практично втрачають цитотоксичну активність. Незважаючи на продукцію МНСII-молекул, вони не здатні до повноцінної презентації антигену і, натомість, виконують функції регуляторних клітин.

Класична і альтернативна активація макрофагів призводить до різної спрямованості метаболізму аргініну. За класичної активації iNOS метаболізує аргінін з утворенням NO, тоді як за альтернативної активації індукується Arg-1 і метаболізує аргінін до сечовини і орнітину, попередника поліамінів і проліну. Поліаміни залучені у процеси клітинного росту, а пролін є ключовим компонентом колагену [11]. Альтернативно активовані макрофаги поділяються на три підгрупи, в залежності від поляризуючих стимулів: M1a, стимульовані IL4 у сукупності з IL13, M1b, активовані імунними комплексами в присутності IL1 β або бактеріального ліпополісахариду, і M1c, активовані IL10, TGF- β або глюкокортикоїдами. Активація макрофагів у такий спосіб задіяна у формотворчих процесах в організмі таких, як загоєння ран, реконструкція ендометрію в процесі менструального циклу та ін. Альтернативна активація макрофагів перетворює їх на толерогенні антигенпрезентувальні клітини з

регуляторними властивостями. Продукція такими клітинами ростових факторів і цитокінів сприяє клітинній проліферації і ангиогенезу. Альтернативна активація макрофагів сприяє прогресії ряду захворювань людини, серед яких атеросклероз і рак.

Було описано взаємодію між макрофагом та пухлинною клітиною і було показано, що макрофаги охоплюють відростками пухлинні клітини, швидко кластерезують клітину та ферментативно її переварюють. При цьому відмічається явне розрушення мембрани пухлинної клітини та злиття цих двох клітин між собою. Було це явище також показано на сенсibilізованій клітинній культурі. Також в брюшній порожнині було виявлено, що макрофаги та пухлинні клітини щільно приклеюються одна до одної, відростки цих клітин тісно переплітаються між собою, після чого макрофаги захоплюють пухлинні клітини цілими або частинами. Стимульовані зрілі макрофаги в брюшній порожнині більш ефективні по відношенню до пригнічення росту пухлинних клітин, ніж менш зрілі макрофаги. Було помічено, що коли перитонеальні макрофаги від імунізованих тварин реагують *in vitro*, вони приклеюються до пухлинних клітин. Хоча лімфоцити при деяких експериментальних умовах можуть бути справжніми ефекторними клітинами, більш сприйнятною є теорія про те, що взаємовідносини між лімфоцитами та макрофагами може бути те, що лімфоцити продукують цитокіни, які активують макрофаги. Останні за цих обставин стають цитотоксичними.

Біологічний ефект CCL2 при пухлинному рості має дозозалежний характер: низький рівень його експресії пухлинними клітинами асоціюється з пухлинною прогресією, а високий – з регресією, ймовірно, зумовленою міграцією в зону росту пухлини макрофагів M1-фенотипу [13]. CCL5 продукується наївними T-клітинами, а також клітинами деяких пухлин. Цей хемокін спричиняє міграцію моноцитів в область пухлинного росту, а також експресію ними низки хемокінів для мієлоїдних клітин таких, як CCL2,

CCL3 (MCP-1 α), CCL4 (MCP-1 β) та CXCL8 (IL8). Клітинам злоякісних новоутворень притаманна продукція інших хемокинів: CCL8 (MCP-2), CCL-18 (MIP-4) CCL-22 (хемокин макрофагального походження). Залучення моноцитів у пухлину знаходиться також під контролем цитокінів, серед яких ключове значення мають CSF-1 і VEGF. Продукція означених цитокінів також притамана багатьом типам пухлин таких, як карцинома молочної залози, колоректальний рак, рак яєчників та багато інших. CSF-1 стимулює проліферацію, диференціювання і життєздатність моноклеарних фагоцитів, а також сприяє інфільтрації злоякісних пухлин моноцитами. Рівень VEGF в зоні росту злоякісного новоутворення корелює з вмістом у ньому ПАМ. Цей цитокін стимулює міграцію циркулюючих моноцитів у зону пухлинного росту і опосередковує хомінг мієлоїдних клітин в місцях пухлинної неоваскуляризації, спричиняючи експресію клітинами в структурі пухлини CXCL-12 (фактора-1 стромальних клітин). Дієвими чинниками рекрутингу фагоцитів у зону росту пухлини є також ендотеліни ET-1б ET-2 і ET-3. ET-1, окрім здатності стимулювати проліферацію і інвазію злоякісно трансформованих клітин, володіє хемоаттрактантною активністю по відношенню до моноцитів і нейтрофілів. ET-2 опосередковує рекрутинг в пухлину макрофагів, локалізацію їх в зоні гіпоксії та активацію цих клітин до продукції біологічно активних сполук, котрі сприяють пухлинній прогресії, наприклад, матриксних металопротеаз 2 і 9.

Функції макрофагів у зоні росту пухлини надзвичайно різноманітні і, іноді, парадоксальні. Першочерговою і єдиною задачею ПАМ тривалий час вважалась безпосередня цитотоксична дія по відношенню до злоякісно трансформованих клітин, а також фагоцитоз апоптисованих клітин і клітинного дебрису. На сьогоднішній день поняття про функції ПАМ значно розширились. Відомо, що рекрутовані моноцити в зоні росту пухлини здатні зазнавати функціональної диверсифікації на дві популяції:

M1-клітини, які приймають участь в активації протипухлинного імунітету і M2-клітини, які сприяють пухлинній прогресії.

Активація протипухлинної імунної відповіді M1-ПАМ пов'язана з реконструкцією тканинної стромы, яка супроводжує пухлинний ріст. В процесі такої реконструкції експресуються прозапальні медіатори, котрі залучають в зону росту пухлини моноцити, а також дендритні клітини і природні кілери, що призводить до значного підвищення в області пухлинного росту рівнів IFN- γ і IL12. Рекрутовані моноцити першочергово диференціюють у M1-макрофаги і активуються до продукції IL12. IL12 стимулює природні кілери і дендритні клітини до продукції IFN- γ . Під дією IFN- γ ПАМ стимулюються до цитотоксичної активності з продукцією реактивних форм кисню і NO, котрі спричиняють загибель пухлинних клітин. Протипухлинну дію чинить також продукований фагоцитами TNF- α . Загибель пухлинних клітин супроводжується експозицією пухлинних антигенів і активацією адаптивної протипухлинної імунної відповіді. ПАМ діють також як антигенпрезентуючі клітини, процесуючи і презентуючи пухлинні антигени T-лімфоцитам після міграції у дренажні лімфовузли. Активовані лімфоцити проліферують з утворенням пухлиноспецифічних клонів і інфільтрують пухлину, започатковуючи протипухлинний адаптивний імунітет [5, 22, 23].

Підсумовуючи вищевикладене, можна зазначити, що активовані макрофаги загалом класифікуються як про-запальні M1 макрофаги та протизапальні M2 макрофаги. M1-подібний фенотип індукується лігандами рецепторного типу (бактеріальний ліпополісахарид) або цитокінами Th1, такими як фактор некрозу пухлини альфа (TNF- α), гамма інтерферон (IFN γ) і колонієстимулюючий фактор 2 (CSF2) [14-16].

M1-подібні макрофаги виявляють високу здатність презентувати антиген. Вони також виділяють реактивні форми кисню (ROS) і цитокіни, такі як IL-6, IL-12, IL-23 та TNF- α , пов'язані з бактерицидною та протизапальною дією

[17]. Таким чином, M1-макрофаги є протипухлинними і асоційовані пов'язані з хорошим прогнозом перебігу пухлинного росту [18-19].

З іншого боку, M2-подібні макрофаги поляризовані цитокінами, похідними від Th2, такими як IL4, IL10, IL13, трансформуючим фактором росту бета (TGFβ) або простагландином E2 (PGE2). Вони сприяють відновленню тканин за допомогою імунної толерантності та реконструкції тканин, очищення дебрису та імунної модуляції. Що стосується раку, M2-подібні макрофаги підтримують ангиогенез, виділяючи адреномедулін та фактори судинного епітелію (VEGF) та експресують імуносупресивні молекули, такі як IL10, запрограмований ліганд смерті 1 (PD-L1) та TGFβ, що сприяє росту пухлини.

Переключення (switching) пухлиноасоційованих макрофагів з фенотипу M1 на фенотип M2, згідно числених літературних даних, відбувається тоді, коли пухлина, що розвивається досягає розмірів близько 2 мм² [20-21]. При подальшому збільшенні розмірів обмін киснем, поживними речовинами і продуктами обміну з оточуючою тканиною шляхом дифузії не забезпечує повноцінної життєдіяльності пухлинних клітин. Це призводить до формування в центрі пухлини, що розвивається зони гіпоксії і гіпоглікемії, для якої характерна інтенсивна загибель клітин. Для подальшого росту пухлині необхідно стимулювати утворення своєї власної васкулатури.

M2 макрофаги: функціональна характеристика та їх участь у пухлинній прогресії:

- Неоангіогенез: гіпоксія та її вплив на функціональну активацію пухлиноасоційованих макрофагів; продукція ангіогенних факторів (VEGF та ін., протеолітичні ферменти, фактори для міграції, проліферації ендотеліоцитів і тубулоформування); васкулогенез і ангиогенез (ступінь зрілості васкулярної стінки пухлинної васкулатури пов'язана з метастазуванням пухлин) .

- Посилення метастазування (фактори, що активують міграцію пухлинних клітин);
- Стимуляція проліферації пухлинних клітин (ростові фактори).

1.5. Стратегії фотодинамічної протираухлинної терапії

На сьогодні в протираухлинній терапії використовують принципи протираухлинного впливу, які поєднують різні підходи сумісного впливу на пухлинні клітини як основні мішені так і на інші клітини організму-пухлиноносія, зокрема клітини імунної системи. При цьому поєднуються як засоби хіміотерапії, так і променевої, магнітотерапії, також імуномодулятори, антиангіогенні засоби і т.д. Серед новітніх стратегій також застосовується фотофармакологія, підхід який зосереджений на розробці та застосуванні фотоконтрольованих сполук для протираухлинної терапії. Даний метод лікування базується на застосуванні світлочутливих речовин — фотосенсибілізаторів, як правило, видимого світла певної довжини хвилі. Сенсибілізатор уводиться в організм внутрішньовенно, проте може застосовуватися у вигляді аплікацій або перорально. Препарати для фотодинамічної терапії. мають властивість вибірково накопичуватися у пухлині або в уражених клітинах. Після цього тканини опромінують світлом з довжиною хвилі, яка відповідає максимуму поглинання сенсибілізатора. Як джерело світла використовують лазерні пристрої, які випромінують світло високої інтенсивності та певної довжини хвилі. Поглинання молекулами фотосенсибілізатора квантів світла за наявності активних форм кисню приводить до фотохімічної реакції, внаслідок якої молекулярний кисень перетворюється на синглетний, а також утворюються інші радикали, які викликають у клітинах пухлини некроз і апоптоз — два види загибелі клітин.

Друга, більш популярна стратегія, спирається на використання фотоконтрольованих лікарських засобів та використання їх як безпосередньої дії на біологічні мішені, що беруть участь у патологічних процесах. Дана стратегія передбачає введення фотоконтрольованих пептидоміметиків в нецитотоксичному діапазоні концентрацій а потім за допомогою ФДТ активувати і підсилити їх ефективність завдяки фотоконтролю [9-10]; Такий підхід заснований на концепції, що фотоконтрольований лікарський засіб можна вводити у неактивній, менш токсичній ізомерній формі, яка потім може активуватися світлом з високим рівнем просторово-часової точності у бажаному місці дії [8]. Індукована світлом, магнітотерапія або термічна інактивація фотоконтрольованих лікарських засобів після того, як вони досягли мішені дії також постулюється як внесок у безпеку лікарських засобів для пацієнтів та навколишнього середовища в цілому [9].

Отже, важливим напрямком досліджень в протипухлинній терапії на сьогодні є фотодинамічна терапія, яка враховує як безпосередній ефект на пухлинні клітини, так і розглядає опосередковану ефективність через клітини імунної системи, зокрема фагоцитуючі клітини та лімфоцити. Тому важливим завданням даного експериментального дослідження було визначення фенотипових та функціональних характеристик перитонеальних макрофагів та спленоцитів за експериментального онкогенезу та терапії фотодинамічними пептидоміметиками.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Перещеплена модель карциноми легень Льюїс

Дослідження були проведені на перещеплюваній моделі карциноми легень Льюїс (LLC) у мишей C57 Black [23,24]. Інокуляцію пухлинних клітин проводили в стегновий м'яз в концентрації $0,8 \times 10^6$ клітин первинної культури LLC. Декапітацію тварин проводили на 28 добу після перещеплення пухлини. В дослідженнях використано 2 групи тварин з пухлинами (n=5); 1 група тварини, яким не проводили терапію; 2 група тварини яким проводили терапію фоточутливим пептидоміметиком (двічі) з подальшим опроміненням видимим світлом (15 хвилин) [8]..

2.2 Визначення росту пухлин та рівня метастазування

За динамікою росту пухлин слідували за допомогою заміру діаметрів стегна тварини в двох взаємно перпендикулярних площинах з періодичністю 1 раз в 7 днів. Для визначення діаметру пухлини проводили заміри стегна, в яке не було інокульовано пухлинні клітини. Віднімаючи від значення діаметру стегна з пухлиною значення діаметру інтактного стегна визначали розмір пухлини. Ріст пухлин оцінювали за об'ємом згідно формули

$$P = 4/3 \pi r^3$$

Де r визначали за вимірами середнього діаметра (в трьох проекціях), розділеного на 2.

Для оцінки інтенсивності процесу метастазування використовували такі критерії: середня кількість метастазів на тварину в групі, середній об'єм метастатичного ураження легенів на тварину в групі. Для цього на 7-у, 19-у

та 25-у доби після перещеплення пухлин проводили евтаназію тварин за допомогою ефіру згідно правил гуманного поводження з тваринами.

Миші препарували, видаляли легені, які поміщали в розчин фіксатору Буена (насичений водний розчин пікринової кислоти : нерозведений формалін : льодяна оцтова кислота у співвідношенні 15:5:1). Метастазування в легені оцінювали за ваговим індексом, кількістю та об'ємом метастатичного ураження.

Підраховували кількість метастазів в легенях по загальноприйнятій методиці.

Також оцінювали ваговий індекс імунних органів – селезінки та тимусу.

2.3.Отримання перитонеальних макрофагів

Мононуклеарні фагоцити перитонеального ексудату мишей отримували за методом, описаним Pietrangeli [25]. Після евтаназії тварин в умовах стерильності оголяли область черева, обережно знімаючи шкіру. В черевну порожнину вводили 5 мл охолодженого розчину Хенкса і після масування відбирали рідину за допомогою стерильного шприца з товстою голкою в охолоджені пробірки. Отриману суспензію клітин двічі відмивали протягом 10 хв при 1500 g і розводили в повному середовищі RPMI-1640, доводячи кількість клітин до необхідної концентрації в залежності від задачі експерименту. Виходячи із результатів фарбування розчином трипанового синього, в отриманих суспензіях, як правило, містилось не менше 85- 98% живих макрофагів.

2.4 Підрахунок клітин у камері Горяєва

Перед роботою предметне скло камери та шліфоване покривне скло добре промивали під водопровідною водою, прополіскували дистильованою

водою та витирали насухо. Потім покривне скло притирали до камери до появи райдужних «ньютонівих» кілець.

Макрофаги відцентрифугували за 1500 об/хв протягом 10 хвилин. Осад ресуспендували в 1 мл фосфатно-сольового буферу. Відібрали аліквоту в 20 мкл та додали 80 мкл 0,4 % розчину барвника трипанового синього, попередньо приготувавши розчини, наважку 400 мг розвели у 100 мл фосфатно-сольового буферу, рН 7,2 (до кінцевого вмісту барвника в розчині 0,2%). Після профарбовування протягом 5 хв, клітини ретельно перемішали та внесли пастеровською або автоматичною піпеткою в притерту покривним склом камеру Горяєва. Надлишок розчину видалили фільтрувальним папером.

Рахували клітини під об'єктивом x10. При достатній щільності клітин провели підрахунок у чотирьох наборах із 16 маленьких квадратів (в кожному куті центральної заштрихованої області). Порахували спочатку лише незафарбовані клітини. Розділили отримане число на 4, отримаємо середнє число клітин в 1 мм². Так як висота камери становить 0,1 мм, то коефіцієнт перерахунку для гемоцитометра становить 104.

Отже, загальна формула для підрахунку клітин в камері Горяєва наступна:

$$X=(a \times 4000 \times v) / b \quad (3.2.)$$

де X – кількість клітин в 1 мм³; а – сума клітин, порахованих в певному об'ємі камери; б – кількість порахованих малих квадратів; в – розведення клітинної суспензії.

Для визначення життєздатності клітин, що аналізуються порахували відповідним чином зафарбовані трипановим синім клітини.

2.5 Оцінка стимульованої метаболічної активності перитонеальних макрофагів

Спонтанну та індуковану метаболічну активність перитонеальних макрофагів вимірювали за допомогою тесту відновлення нітросинього тетразолію (НСТ). Для виявлення спонтанної активності (СА) NADPH-оксидази, НСТ був доданий до макрофагів в лунки 96-лункового планшета (0,1 мл 0,2 % НСТ додавали до 1×10^5 макрофагів в 0,1 мл середовища). Для виявлення стимульованої активності (СТА), 20 нМ форбол-міристан-ацетату було додано до складу розчину НСТ. Клітини інкубували в стандартних умовах (+37 °С, 5 % CO₂) протягом 1 год. Планшети центрифугували при 300 g протягом 10 хв, надосадову рідину обережно видаляли і додавали в кожен лунку 0,2 мл 100 % етанолу. Планшети повторно центрифугували і накопичений формазан вивільняли шляхом ресуспендування клітинного осаду в 0,1 мл 100 мМ гідроксиду калію і 0,1 мл диметилсульфоксиду на лунку. Оптичну щільність вимірювали за допомогою фотометра NanoDrop Multiscan Spectrum 2000 (Thermo Scientific, США) на довжині хвилі 540 нм. Відсоток стимульованої активності був розрахований за формулою:

$$(\text{абсорбція при СТА} - \text{абсорбція при СА}) \times 100 \% / \text{абсорбція при СА}.$$

2.6. Імунофенотипування макрофагів

Визначення субпопуляційного складу макрофагів проводили методом 3-ох параметрової цитофлюориметрії із застосування моноклональних антитіл (МкАТ) до антигенів людини, анти-CD80 FITC, анти-iNOS PE та анти-Arginase APC.

В дві цитометричні пробірки внести суспензію клітин в кількості 10^5 клітин об'ємом 100 мкл. В кожен пробірку додати по 500 мкл 4 % розчину параформальдегіду та інкубувати протягом 20 хв. при 4 °С для фіксації мембрани. У пробірки додати по 2 мл PBS та осадити на центрифугу

протягом 10 хв при 1000 об/хв. Видалити над осадову рідину, а до осаду додати 500 мкл 0,1% розчину сапоніну та інкубувати протягом 20 хв при 37 °С для пермебіалізації мембрани. У пробірці додати по 2 мл PBS та осадити на центрифугі протягом 10 хв при 1000 об/хв. Видалити над осадову рідину. Перша пробірка залишається без змін, буде використана для налаштування параметрів автофлюоресценції клітин. У другу пробірку додати по 5 мкл кожного антитіла (анти-CD80 FITC, анти-iNOS PE та анти-Arginase APC) та інкубувати протягом 20 хв при кімнатній температурі без доступу прямих сонячних променів. У пробірку додати по 2 мл PBS та осадити на центрифугі протягом 10 хв при 1000 об/хв. Видалити над осадову рідину та у всі пробірки додати по 400 мкл PBS. Аналіз зразків проводити на проточному цитофлуориметрі FACSCalibur за допомогою програми CellQuest-PRO («Becton Dickinson», США).

2.7. Визначення адгезивних властивостей перитонеальних макрофагів за забарвленням фіолетовим кристалічним

Для зафарбовування макрофагів, адгезованих на планшетах, використовували вітальний барвник фіолетовий кристалічний. Оцінку швидкості прикріплення клітин до субстрату за впливу досліджуваних речовин здійснювали на високоадгезивному субстраті – 96-лункових планшетах (Falcon, США). Для цього клітини вносили в лунки та фіксували концентрацію клітин після їх зафарбовування (1% водним розчином кристалічного фіолетового упродовж 15 хв при кімнатній температурі) за колориметричним показником при довжині хвилі 570 нм на спектрофотометричному мультилунковому сканері (Labsystems Multiscan MS).

Рівень оптичного поглинання є прямо залежним від концентрації адгезованих клітин у лунках. Вимірювання повторювали 2-3 рази, отримані результати усереднювали та зображували у вигляді стовпчикових діаграм.

2.8. Індукована проліферація Т і В-лімфоцитів в селезінці

Селезінки мишей промивали у середовищі RPMI-1640 з додаванням антибіотиків (100 мкг/мл стрептоміцину і 100 од/мл пеніциліну); мононуклеарні лімфоцити виділяли шляхом гомогенізування і подальшої фільтрації через фільтр з розміром пор 100 мкм. Потім отриману суспензію центрифугували (1500 об/хв протягом 30 хв) в градієнті густини фікол-верографіну (Merck, Німеччина). Клітини селезінки в кількості 5×10^6 /мл інкубували протягом трьох днів при стандартних умовах культивування в середовищі RPMI-1640 (HyClone, США), яке містило 10 % ФБС, 2 мМ глутаміну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 100 од/мл пеніциліну, 25 мМ 2-меркаптоетанолу (Sigma, США). Т-клітини стимулювали фітогемагглютиніном (ФГА) в дозі 30 мкг/мл, а В-клітини стимулювали за допомогою ліпополісахариду (ЛПС) в дозі 100 мкг/мл (Sigma, США). Після цього, 10^6 клітин на пробу центрифугували при 300 g протягом 10 хв, ресуспендували в 1 мл гіпотонічного буферу для лізису, що містив 0,1 % цитрату натрію, 0,1 % Тритону X-100, 5 мкг/мл пропідіум йодиду та інкубували протягом 30 хв. Вміст ДНК в лімфоцитах вимірювали за допомогою проточної цитометрії з використанням цитометра FACS Calibur (BD Biosciences, США). Гістограми клітинного циклу були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення Mod Fit LT 3.0 (Verity Software House, США)

2.9. Статистичний аналіз

Математичну обробку та аналіз експериментальних даних проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel та Origin 6.1. Вірогідність результатів визначали за t-критерієм Стюдента, достовірно значимими вважали відмінності при $P < 0.05$. Морфометричні показники підраховували в програмах Axiovision та ImageJ. Всі дані приведені у вигляді середніх арифметичних та стандартних відхилень.

РОЗДІЛ 3

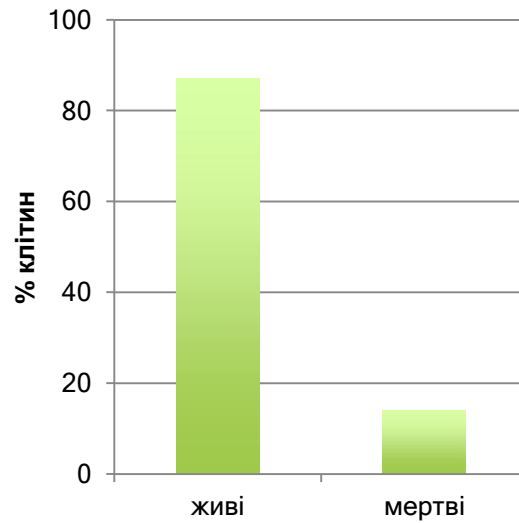
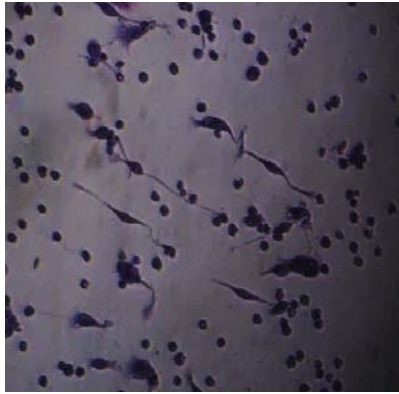
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Отримання перитонеальних макрофагів, визначення їх життєздатності та адгезії

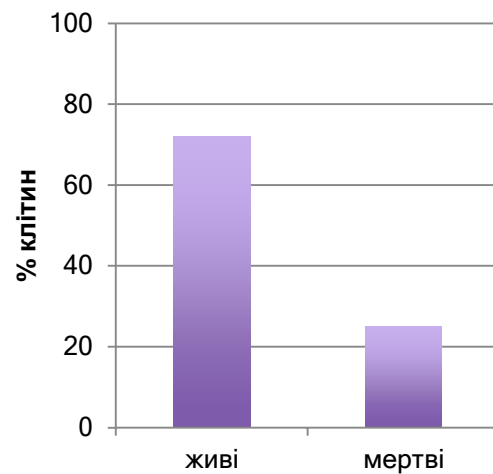
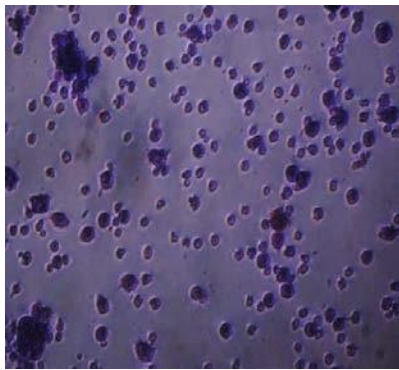
Макрофаги, що заселяються в мікрооточення пухлин (TME), зазвичай називають макрофагами, асоційованими з пухлиною (TAM) [26,27.]. Великий обсяг досліджень свідчить про те, що TAM служать ключовими промоторами метастазів в TME, які спричиняють майже всі стадії метастазування пухлини, в тому числі асоційовані з неоангіогенезом [28,29.]. Продукуючи фактори росту, протеолітичні ферменти та різні інгібіторні білки в T-клітинах, TAM демонструють функції пов'язані з регуляцією метастазів. Крім того, в останні роки все більше уваги дослідників привертає поляризація TAM як терапевтична стратегія для запобігання прогресування пухлин та метастазів [30].

Тому визначення фенотипу макрофагів за перебігу різних патологій, в тому числі пухлинного росту та метастазування, має фундаментальне та науково-практичне значення. Особливо це стосується фенотипу M1 та M2 макрофагів. За новоутворень відбувається перепрограмування макрофагів в прозапальний фенотип, що стимулює пухлинний ріст в напрямку неоангіогенезу.

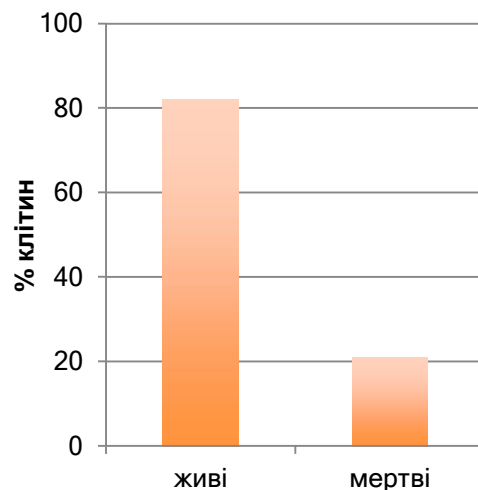
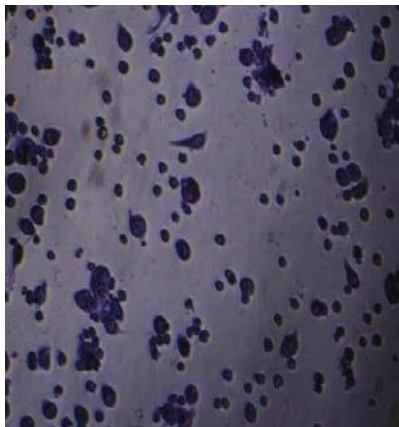
В нашому дослідженні, для отриманих макрофагів від тварин інтактних та тварин з пухлинами та терапією вираховували життєздатність клітин та перевіряли їх на здатність адгезувати до субстрату після 24-х годинної інкубації та зафарбовування фіолетовим кристалічним (рис.3.1).



А- макрофаги, отримані із перитонеальної рідини інтактних тварин; співвідношення живих та мертвих клітин



Б- макрофаги, отримані із перитонеальної рідини тварин з перещепленою карциномою легень Льюїс (28 день після інокуляції пухлинних клітин); співвідношення живих та мертвих клітин



В -макрофаги, отримані із перитонеальної рідини тварин з перещепленою карциномою легень Льюїс (28 день після інокуляції пухлинних клітин) та 2 кратної терапії LMB002 та свіченням ; співвідношення живих та мертвих клітин

Рис.3.1 Життєздатність та морфологічні властивості перитонеальних макрофагів, отриманих від А-інтактних тварин; Б-тварин з пухлинами; В – тварин з пухлинами та терапією.

Як свідчать наведені дані життєздатність макрофагів отриманих із перитонеального ексудату мишей з пухлинами була дещо нижчою, порівняно з з такими, отриманими від інтактних тварин, проте даний показник не був статистично значимим. Згідно морфологічних характеристик, то найбільш розпластаними на субстраті були макрофаги, отримані від інтактних тварин. Разом з тим у цих клітин виявлено довгі відростки, витягнуту та трапецієвидну форму. Водночас, макрофаги отримані від тварин з пухлинами характеризувались більш округлими формами, а також спостерігались скупчення клітин з характерним субстрат-незалежним ростом. І, відповідно, при визначенні вмісту клітин, прикріплених до субстрату було зафіксовано зниження даного показника

(рис.3.2). Для макрофагів після терапії фоточутливим пептидоміметиком LMB002 можна було спостерігати збільшення відсотку прикріплених клітин, а також локуси з добре розпластаними на субстраті макрофагами, подібно до таких, отриманих від інтактних тварин (рис.3.1.А).

Так, при визначенні рівня адгезивних клітин використовували забарвлення фіолетовим кристалічним та оцінювали вміст прикріплених макрофагів після 24 годинної інкубації клітин в умовах CO₂-інкубатора (5%) при 37° С та інкубації клітин в середовищі RPMI-1640 (“Sigma”США). Після двохкратної промивки фосфатно-сольовим буфером та оцінкою оптичного поглинання прикріплених клітин за розчиненим барвником фіолетовим кристалічним в диметилсульфоксиді. Згідно даних наведених на рис.3.2 найбільша адгезивна здатність була зафіксована для макрофагів отриманих від інтактних клітин, тоді як для макрофагів, отриманих від тварин-пухлиноносіїв даний показник був нижчим в 1,5 рази проти інтактних. У тварин після терапії адгезивна здатність нормалізувалась і статистично значимо не різнилась від такої інтактних.

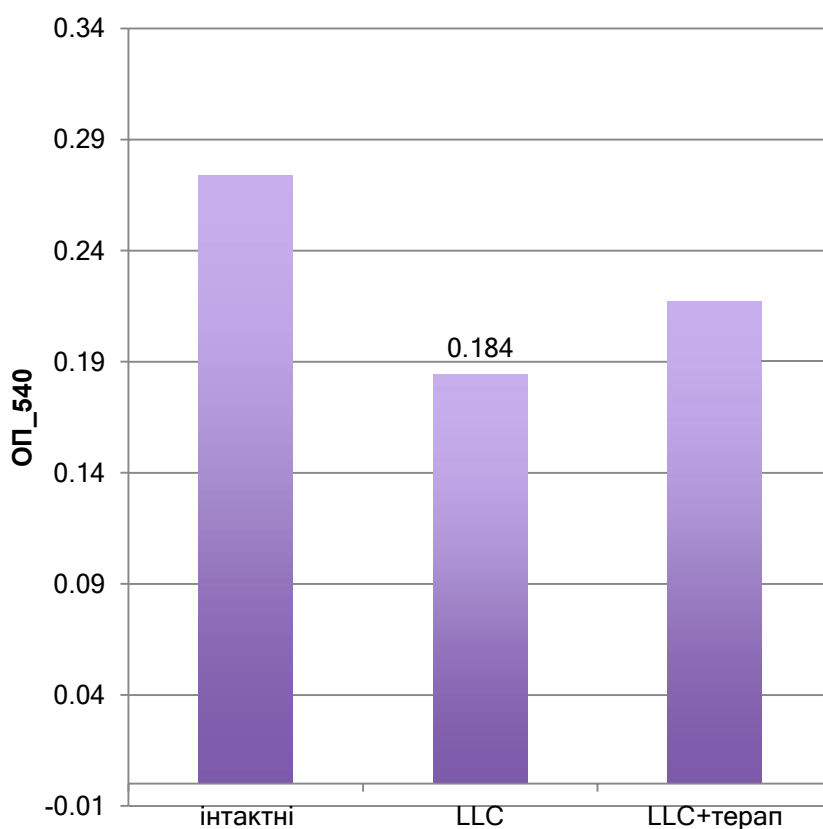


Рис.3.2 Гістограми вмісту прикріплених до субстрату перитонеальних макрофагів, отриманих від тварин інтактних, з пухлинами та з терапією.

Таким чином, результати, наведені в підрозділі 3.1 вказують на відмінності макрофагів, отриманих від інтактних тварин, тварин з пухлинами та тварин з терапією фоточутливим пептидоміметиком LMB002 як за морфологічними особливостями, виживаністю, так і адгезивним показником. Наступний етап полягав у визначенні функціональної активності, отриманих макрофагів.

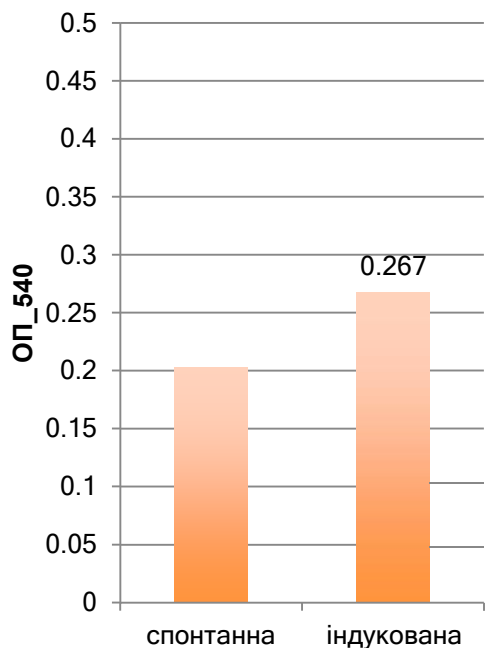
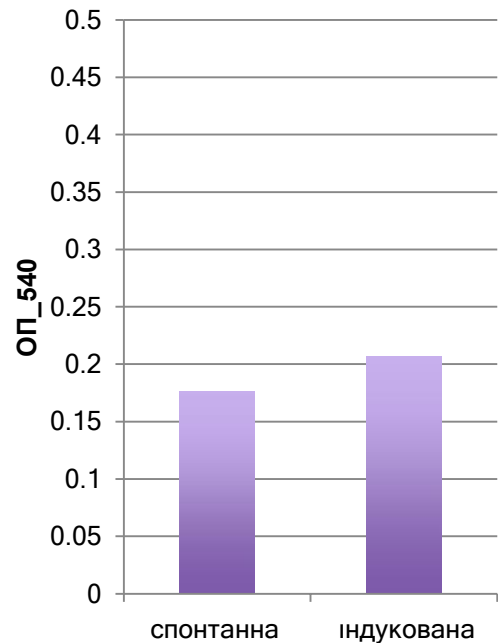
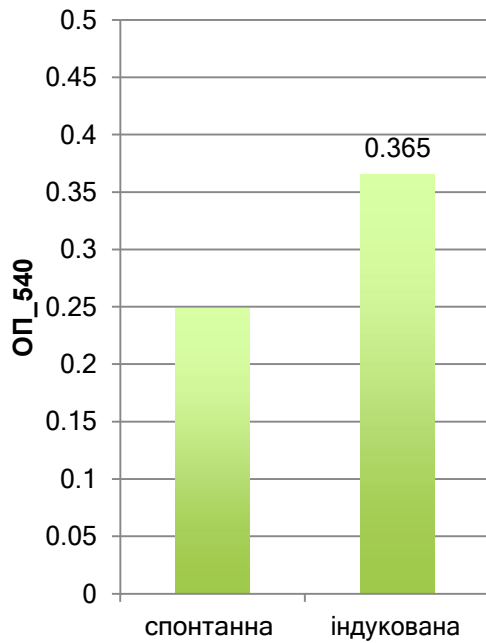
3.2. Дослідження метаболічної активності макрофагів в НСТ-тесті.

Активація макрофагів необхідна для встановлення контролю над запаленням і прогресуванням захворювань. Антиген-неспецифічні ефektorні клітини, які включають натуральні кілери, макрофаги, нейтрофіли і дендритні клітини, відіграють важливу роль в протипухлинному захисті [31,32.]. Індукований НСТ–тест дозволяє оцінити функціональний резерв кисень залежного механізму бактерицидності фагоцитів. Спонтанну та індуковану активність перитонеальних макрофагів вимірювали за допомогою тесту відновлення нітросинього тетразолію (НСТ). Для виявлення спонтанної активності (СА) NADPH-оксидази, НСТ був доданий до макрофагів в лунки 96-лункового планшета (0,1 мл 0,2 % НСТ додавали до 1×10^5 макрофагів в 0,1 мл середовища). Для виявлення стимульованої активності (СТА), 20 нМ форбол-міристан-ацетату було додано до інкубаційного середовища з НСТ. Даний тест в модифікації з РМА використовують для виявлення резервних можливостей внутрішньоклітинних систем фагоцитів. При збереженій внутрішньоклітинній антибактеріальній активності у фагоцитах різко зростає кількість формазан позитивних макрофагів після їх стимуляції РМА.

Зниження показників стимульованого НСТ–тесту нейтрофілів нижче за 20% та моноцитів нижче за 30% свідчать про недостатність фагоцитозу. Величина стимульованого НСТ–тесту в нормі складає 20 - 40%.

В нашому дослідженні, перитонеальні макрофаги, отримані від тварин трьох експериментальних груп розсаджували на 96-лункові планшети в концентрації 1 млн/мл (в об'ємі 100 мкл) та після 2-годинного адаптаційного періоду до частини додавали активатори метаболічної активності – форбол 12-меристат-13-ацетатом (РМА), витримували 20 хвилин та до всіх зразків додавали нітросиній тетразолій і інкубували протягом години. Після центрифугування, захоплені фагоцитами формаган розчиняли в диметилсульфоксиді з додаванням 1 М КОН та визначали оптичне поглинання при довжині хвилі 540 нм.

Висока спонтанна та індукована активність була характерна для макрофагів отриманих від інтактних тварин (рис.3.3 А). Функціональний резерв (відношення різниці між індукованою та спонтанною активністю до індукованої активності, виражену у відсотках) в даній групі складав 31,8% (табл. 3.1). Натомість, у тварин з перещепленою пухлиною карциноми легені Льюїс, низькою була як спонтанна фагоцитарна активність так і індукована. Виявлено лише незначне збільшення індукованої РМА активності, проте статистично не достовірно. Для тварин з пухлиною та терапією фотокерованим видимим світлом пептидоміметиком LMB002 виявлено збільшення як спонтанної так і індукованої фагоцитарної активності в порівнянні з групою тварин без терапії, функціональний резерв для яких складав 24% (табл.3.1) Проте, рівень спонтанної та індукованої активності не досягав значень інтактних тварин (рис.3.3 в). Представлені дані щодо фагоцитарної активності в групах піддослідних тварин свідчать за знижений рівень метаболізму фагоцитів у тварин-пухлиноносіїв, що вказує на загальну імуносупресивну дію патологічного стану організму, в якому розвивається пухлина та метастазування.



а

б

в

Рис.3.3. Рівень спонтанної та індукованої фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів, отриманих від інтактних тварин (а); тварин з перещепленою пухлиною LLC (б); тварин з перещепленою карциномою легень LLC та терапією фотокерованим пептидоміметиком LMB002 (в).

Доречно зауважити, що рівень спонтанної активності макрофагів, отриманих від тварин з перещепленою пухлиною LLC був нижчим в 1.4 рази ($p < 0.05$) від такого показника у інтактних тварин, тоді як у тварин після терапії він знижувався в 1.22 рази ($p < 0.05$), порівняно з інтактними (рис.3.3). Також, слід відмітити, що рівень спонтанної та індукованої активності у групі тварин з перещепленою пухлиною LLC був знижений у порівнянні з групою тварин з перещепленою карциномою легень LLC та терапією

фотокерованим пептидоміметиком LMB002 в 1.16 рази для спонтанної активності та в 1.29 рази для РМА-індукованої фагоцитарної активності

Таблиця 3.1

Функціональний резерв перитонеальних макрофагів (%), визначений як відношення різниці РМА індукованої та спонтанної фагоцитарної активності до РМА індукованої.

Групи тварин	інтактні	Тварини з перещепленою карциномою легень Льюїс LLC	тварини з перещепленою карциномою легень LLC та терапією фотокерованим пептидоміметиком LMB002
Функціональний резерв (%)	31,8 %	17,6%[^]	24%

[^]-статистично не значимо

Таким чином, із наведених даних видно, що при застосуванні комбінованої терапії фотокерованого пептидоміметика на моделі перещеплюваної карциноми легень Льюїс проявляється тенденція до нормалізації фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів та підвищення функціонального резерву в порівнянні з групою тварин, у яких індукували пухлини.

3.3 Визначення фенотипу M1 та M2 макрофагів в експериментальних групах

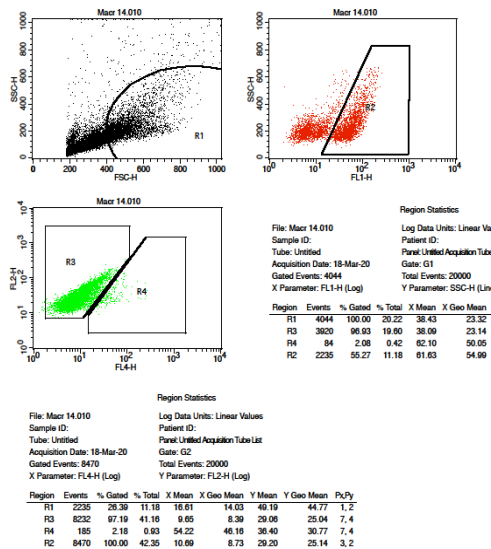
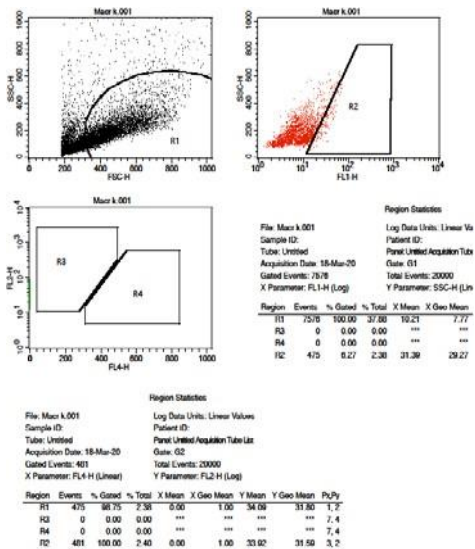
Однією з головних причин невідповідності впливу пухлиноасоційованих макрофагів (ПAM) на клініко-патологічні параметри є локалізація інфільтрації ПAM. Так, ПAM в різних зонах пухлин можуть по-різному впливати на прогноз раку. Наприклад, у дослідженнях раку молочної залози інфільтрація M2 в пухлинній стромі була пов'язана з більшим розміром пухлини, вищим гістологічним ступенем, вищим показником виникнення 5-річного рецидиву та 5-річною смертністю від раку молочної залози [33]. Аналогічно, при карциномі стравоходу інфільтрація M2 ПAM в пухлинній стромі була сильно пов'язана з більш злоякісними ознаками, такими як метастази та прогресування клінічної стадії. Це підкреслює важливість розгляду локалізації ПAM на додаток до їх кількості як прогностичного маркера. Відомо також, що коли солідні пухлини виростають до певного розміру, запускається процес, який називається "ангіогенним переключенням", внаслідок чого утворюється судинна система високої щільності для постачання поживних речовин та видалення метаболітів [34]. TAM є критичними чинниками в регулюванні "ангіогенного переключення". Вони утворюють скупчення у внутрішньопухлинних областях та на інвазивних краях, що є важливими факторами ангіогенезу та метастазів. На відміну від цього відсутність TAM значно знижувала (на 40%) щільність судин [35].

Поширена думка, що макрофаги M2 та M1 відіграють протилежні ролі у рості пухлин та метастазуванні. Таким чином, можливо запропонувати терапевтичні стратегії для перетворення пропухлинного фенотипу M2 в протипухлинний фенотип M1 [36]. Зокрема виявилось, що золедронова кислота є придатним засобом як третє покоління аміно-бісфосфонатного агента для лікування метастазів в кістках. Багато досліджень показали, що

золедронова кислота відіграє потужну роль у модулюванні фенотипів макрофагів [37].

В нашому дослідженні ми перевіряли фенотип перитонеальних макрофагів, отриманих із тварин експериментальних груп. Для цього використовували анти-CD80, мічене FITC, що характеризує загальну популяцію макрофагів; анти-iNOS PE для визначення вмісту M1 макрофагів та анти-Arginase APC для визначення субпопуляції M2 макрофагів. Відомо, що захисна роль макрофагів тісно пов'язана з продукцією цими клітинами бактерицидних молекул, в ряду яких важливе місце займає NO. Аргінін слугує субстратом для продукції NO за участі індукцібельної NO синтази (iNOS) [38]. Синтез і активність iNOS регулюються доступністю субстрату (аргініну) в міжклітинному просторі [39,40]. Крім того, макрофаги продукують аргіназу - інший фермент, який також використовує аргінін в якості субстрату [41,42]. Синтез iNOS і аргінази в клітинах регулюється реципрочно, залежно від мікрооточення в яке попадають макрофаги.

На рис.3.4 (а,б, в) наведено типові гістограми фенотипового розподілу CD80 мічених флюоресцеїнізотіоціанатом (FITC) макрофагів – типового для них антигену, а також фенотипу M1 (анти-iNOS фікоеритрином - PE) макрофагів та M2 (анти-Arginase алко-фікоціаніном - APC) макрофагів, відповідно.



Page 1

Page 1

a

b

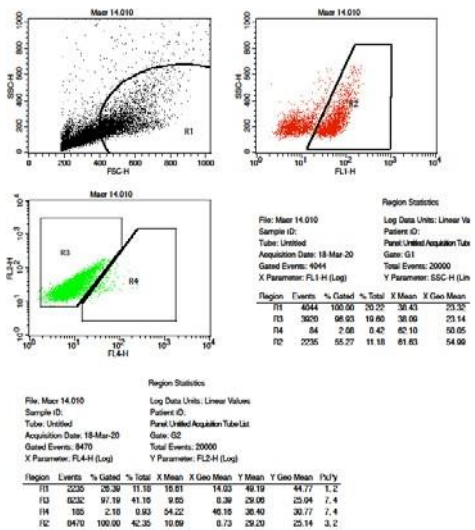


Рис. 3.4. Типові гістограми цитофлуориметричного аналізу фенотипування макрофагів отриманих із різних експериментальних груп інтактних тварин (а); тварин з перещепленою пухлиною LLC (б); тварин з перещепленою карциномою легень LLC та терапією фотокерованим пептидоміметиком LMB002 (в).

Page 1

б

При визначенні середніх значень фенотипового розподілу макрофагів із-за великих розбіжностей не було зафіксовано достовірної різниці в популяціях M1 та M2 макрофагів у групах інтактних тварин ; тварин з

перещепленою пухлиною LLC та тварин з перещепленою карциномною легень LLC та терапією фотокерованим пептидоміметиком LMB002 (Рис 3.5 та 3.6).

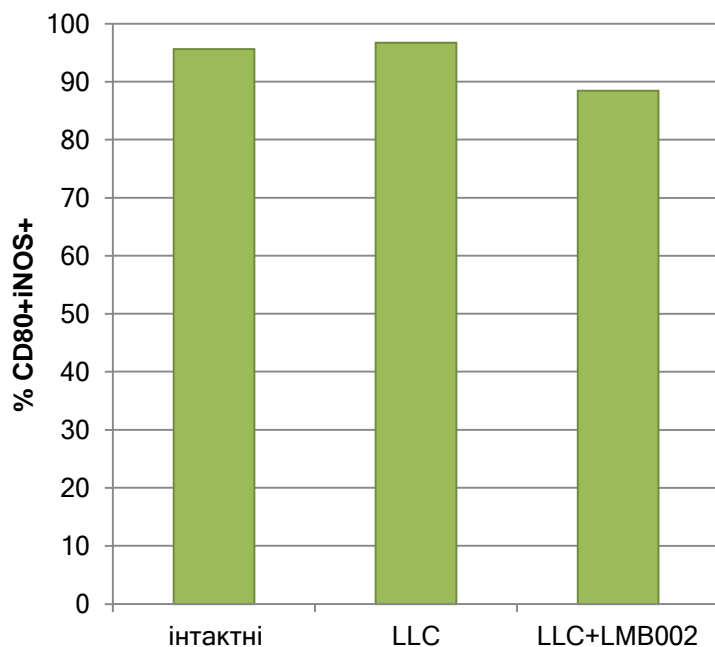


Рис 3.5 Імунофенотип CD80+iNOS+ (M1 макрофаги) в досліджуваних групах інтактних тварин, тварин з перещепленою пухлиною LLC, тварин з перещепленою карциномною легень LLC та терапією фотокерованим пептидоміметиком LMB002

Також не було зафіксовано зміни в фенотипі M2 макрофагів (рис.3.6)

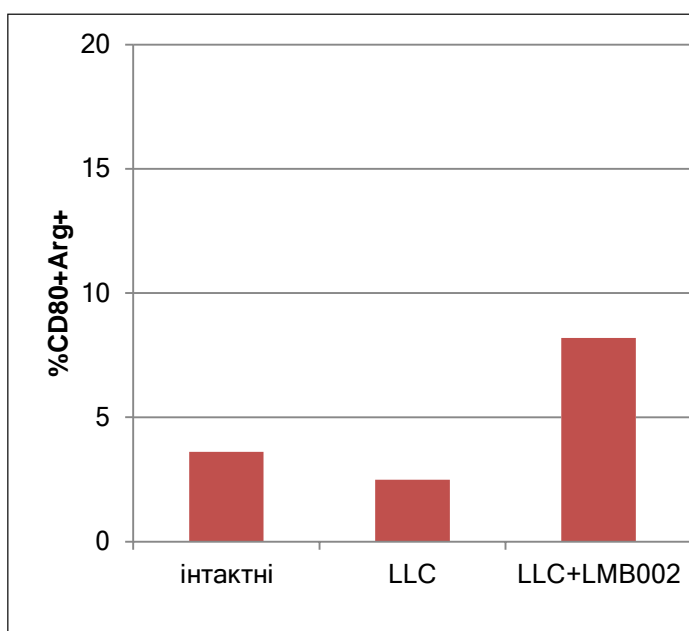


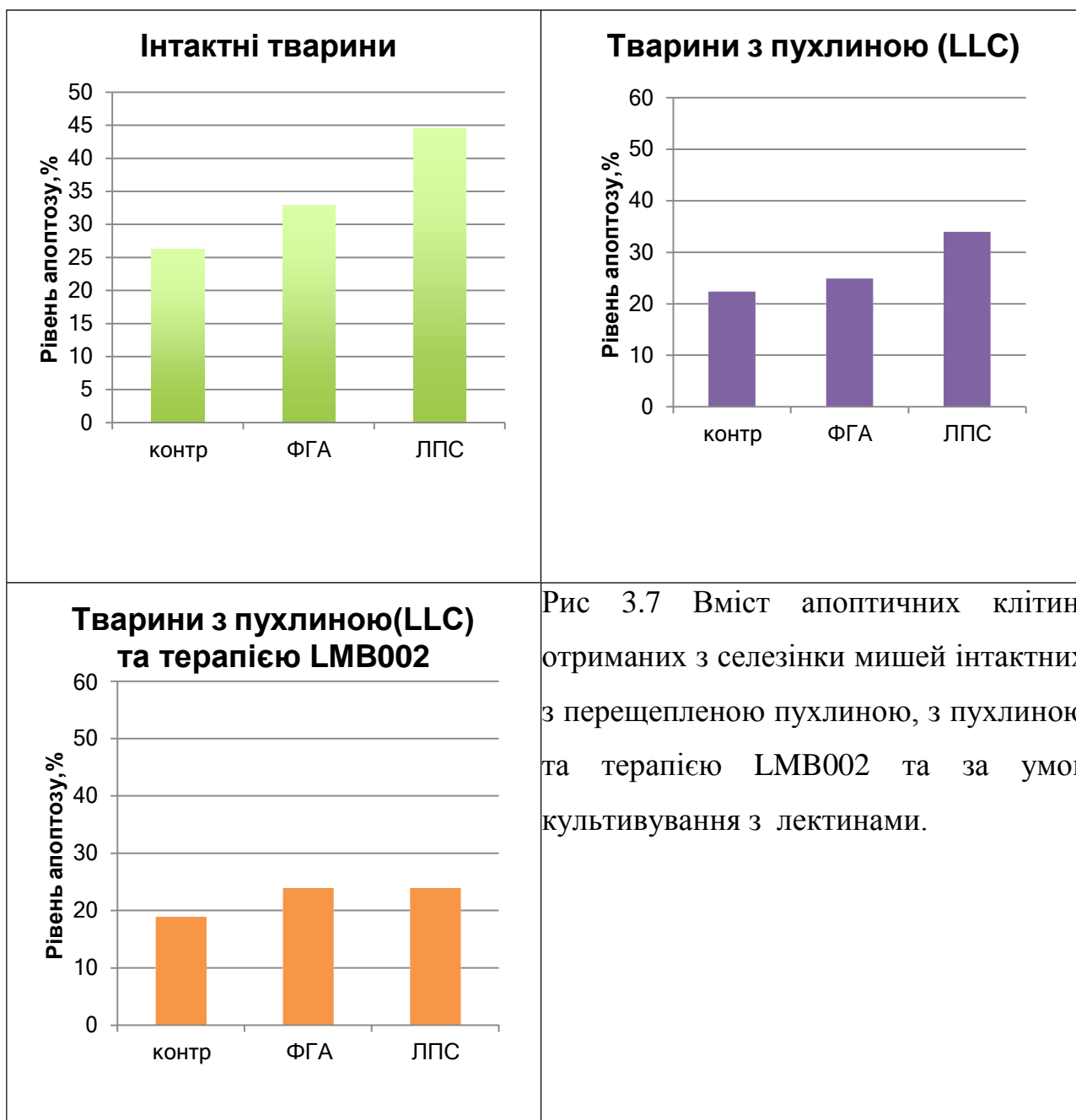
Рис3.6 Імунофенотип CD80+Arg+ (M2 макрофаги) в досліджуваних групах інтактних тварин, тварин з перещепленою пухлиною LLC, тварин з перещепленою карциномною легень LLC та терапією фотокерованим пептидоміметиком LMB002

Отже, при дослідженні морфофункціональних властивостей перитонеальних макрофагів, отриманих від тварин інтактної групи, тварин з перещепленою карциномою легені Льюїс та з терапією фотокерованим пептидоміметиком LMB002 було виявлено пригнічення метаболізму макрофагів, на що вказують показники спонтанної та РМА-індукованої активності у тварин з пухлинами, порівняно з інтактними, тоді як спонтанна та індукована активність у тварин з терапією LMB002 зростала порівняно з тваринами з пухлиною (без терапії).

3.4 Визначення рівня апоптозу та проліферації спленоцитів

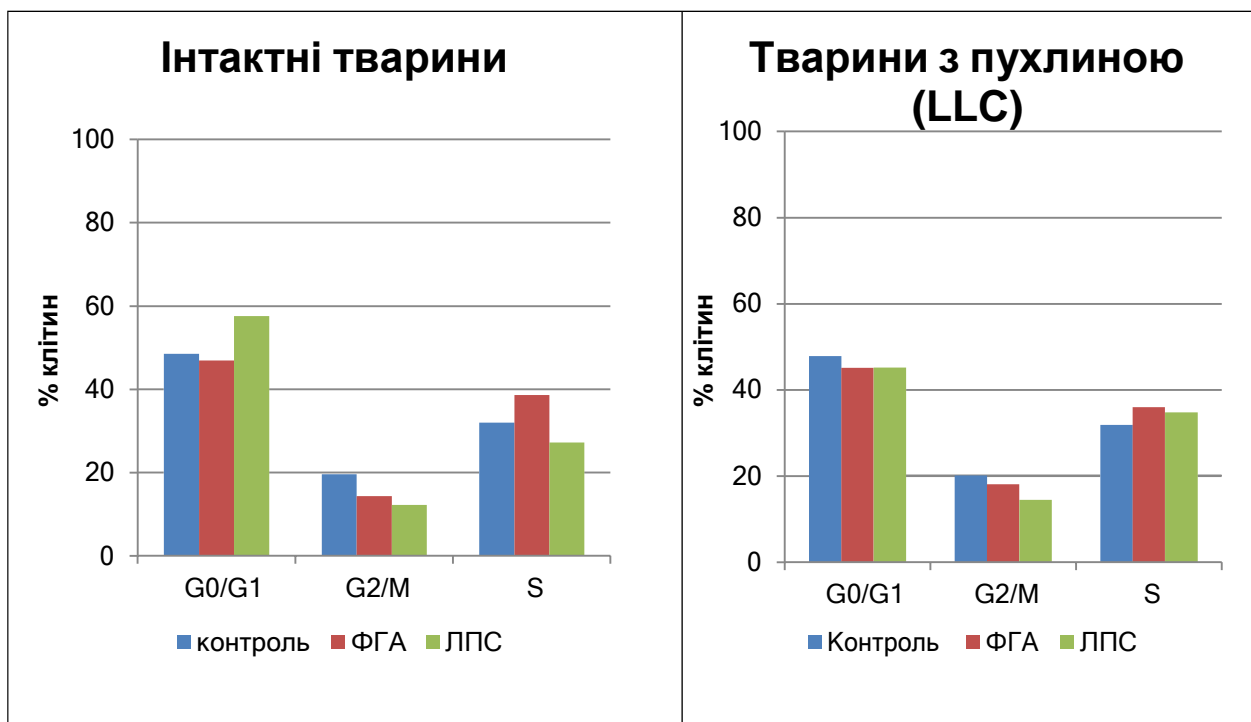
Процес індукованої проліферації Т- і В-лімфоцитів селезінки мишей досліджували за допомогою методу проточної цитометрії. Для цього тканину селезінки подрібнювали в середовищі RPMI-1640 і фільтрували до отримання однорідної клітинної суспензії. Клітини в концентрації 5×10^6 / мл інкубували при 37°C і 5% CO_2 протягом 3 діб в повному поживному культуральному середовищі RPMI-1640 в присутності мітогенів: фітогемаглютинину (ФГА) –індуктор проліферації Т-лімфоцитів та ліпополісахаридів(ЛПС) – індуктор проліферації В-лімфоцитів.

При визначенні рівня апоптичних клітин в суспензії спленоцитів було показано, що за умов 3-х добового культивування рівень апоптозу був майже однаковим як для інтактних тварин, так і тварин з пухлинами та терапією фотокерованим пептидоміметиком (статистично показники рівня апоптичних клітин не відрізнялись, рис.3.7). Збільшення рівня апоптичних клітин виявлено при інкубації з ліпополісахаридами, що в основному свідчить за зростання апоптичного індексу В-лімфоцитів.



При визначенні проліферативних показників в спленоцитах представлених експериментальних груп було виявлено, що у всіх трьох групах досліджуваних тварин після трьохдобового культивування спленоцитів співвідношення клітин проліферативного спокою та проліферативного пулу було приблизно однаковим: 45-48% до 52-57% відповідно (рис.3.8). У відповідь на активацію лектином, специфічним до Т-лімфоцитів – фітогемаглютинином спостерігали подібну тенденцію у всіх

трьох групах тварин: інтактних, тварин з пухлинами та тварин з пухлинами і терапією у фазі G0/G1. Однак в проліферативному пулі відмічено наступне: однаковий вміст клітин в S-фазі в тварин інтактної групи та тварин з пухлинами, тоді як у тварин з терапією майже 2-х кратно пригнічення синтетичної фази клітинного циклу і відповідно збільшення клітин в G2/M-фазі.



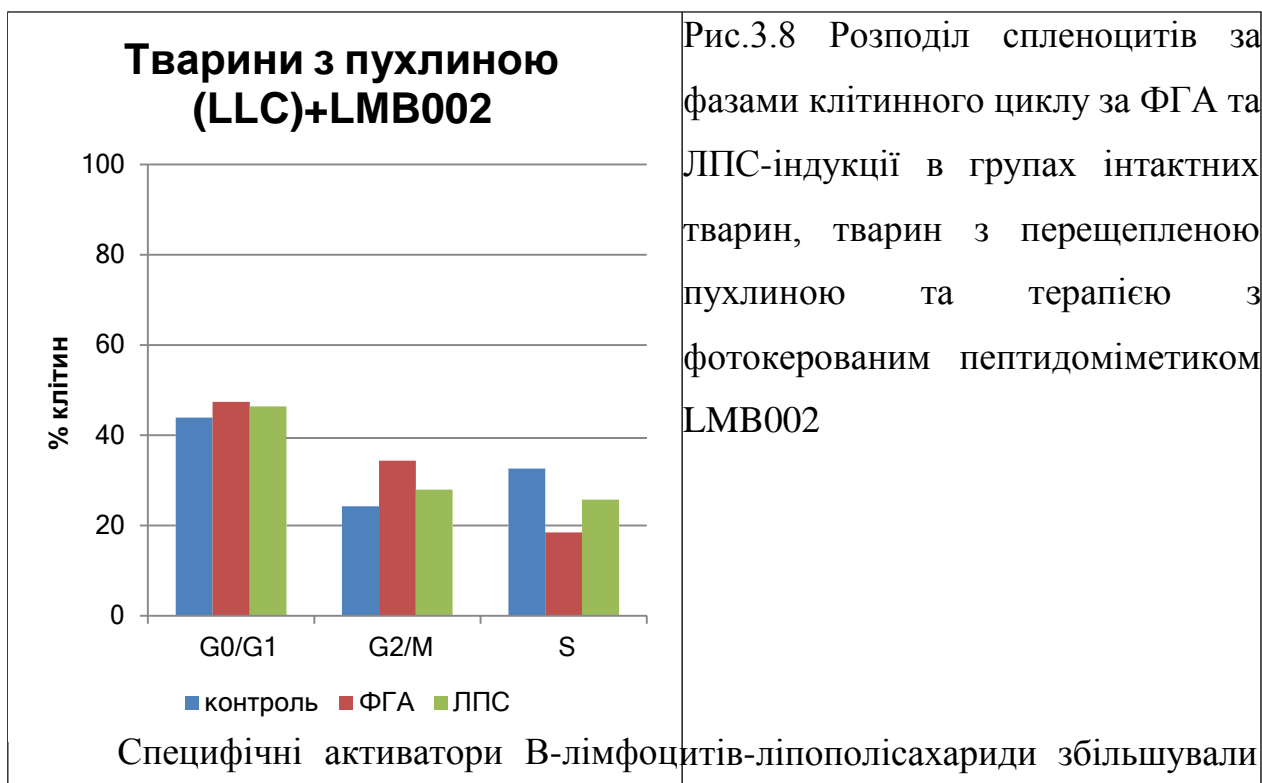


Рис.3.8 Розподіл спленоцитів за фазами клітинного циклу за ФГА та ЛПС-індукції в групах інтактних тварин, тварин з перещепленою пухлиною та терапією з фотокерованим пептидоміметиком LMB002

вміст клітин в G0/G1 –фазі у інтактних тварин порівняно з контролем та ФГА-індукованою мітоген-активацією, тоді як у тварин з пухлинами та пухлинами і фототерапією даний показник залишався на рівні контролю (без мітогенної активації). Найвищий вміст клітин в S-фазі за ЛПС-стимуляції було зафіксовано у тварин з пухлинами, тоді як у інтактних тварин та тварин з терапією стимуляція ЛПС призводила до однакового вмісту клітин в S-фазі..

Отже в результаті проведеного дослідження було отримано результати, які вказують на зміну оксигензалежного метаболізму перитонеальних макрофагів у тварин з пухлинами в порівнянні з інтактними тваринами. Також зафіксовані зміни в адгезивних характеристиках перитонеальних макрофагів в сторону зменшення прикріплення та розпластання на субстраї. РМА-індукована активність перитонеальних макрофагів у тварин з пухлинами була пригніченою порівняно з макрофагами інтактних тварин і відповідно функціональний резерв як відношення індукованої активності до спонтанної був зниженим у тварин з пухлинами.

ВИСНОВКИ

В результаті проведеного експериментального дослідження на перещеплюваній високометастазуючій карциномі легені Льюїс при застосуванні фотодинамічної терапії новосинтезованим пептидоміметиком LMB002 зафіксовані ефекти імуномодулюючої дії.

1. Виявлено, що в перитонеальних макрофагах від тварин-пухлиноносіїв знижена оксигензалежна активність порівняно з макрофагами від інтактних тварин; за фотодинамічної терапії даний показник зростає, порівняно з тваринами без терапії, проте не досягає рівня інтактних тварин
2. З використанням цитофлуориметричного аналізу охарактеризовано фенотип M1 (анти-CD80 FITC анти-iNOS PE) та M2 (анти-CD80 FITC, анти-Arginase APC) перитонеальних макрофагів отриманих від тварин досліджуваних експериментальних груп та не зафіксовано достовірної різниці у співвідношенні M1:M2
3. Найнижча адгезивна активність макрофагів виявлена в тварин з пухлинами, тоді як за терапії фотопептидоміметиком зафіксовано зростання даного показника.
4. За індукції мітогенами (ФГА та ЛПС) відмічено зміну в проліферативних показниках Т- та В-лімфоцитів при застосуванні фотодинамічної терапії новосинтезованим пептидоміметиком LMB002.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Хаитов, Р., Пинегин, Б. (2001). Иммунология: Оценка иммунного статуса человека в норме и при патологии, №4 – с. 4 - 6.
2. Wynn, T., Chawla, A., Pollard, J. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496(7446), pp. 445 - 455.
3. Pollard, J. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*, 4(1), pp. 71 - 78, doi: 10.1038/nrc1256.
4. Lin, A. (2010). Dendritic cells integrate signals from the tumor microenvironment to modulate immunity and tumor growth. *Immunol. Lett.*, 127(2), pp. 77 - 84, doi: 10.1016/j.imlet.2009.09.003.
5. Dandekar, R., Kingaonkar, A., Dhabekar, G. (2011). Role of macrophages in malignancy. *Ann Maxillofac Surg.*, 1(2), pp. 150 - 154, doi: 10.4103/2231-0746.92782.
6. Richards, D., Hettinger, J., Feuerer, M. (2013). Monocytes and macrophages in cancer: development and functions. *Cancer Microenviron.*, 6(2), pp.179 - 191, doi: 10.1007/s12307-012-0123-x.
7. Biswas, S., Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.*, 11, pp. 889 - 896.
8. Van Straten, D., Mashayekhi, V., De Bruijn, H., Oliveira, S., Robinson, D. (2017). Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. *Cancers (Basel)*, 9(2), pp. 19, doi: 10.3390/cancers9020019.

9. Castano, A., Mroz, P., Hamblin, M. (2006). Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer*, 6, pp. 535–545.
10. Babii, O., Afonin, S., Garmanchuk, L., Nikulina, V., Nikolaienko, T., Storozhuk, O., Shelest, D., Dasyukevich, O., Ostapchenko, L., Iurchenko, V., Zozulya, S., Ulrich, A., Komarov, I. (2016). Direct Photocontrol of Peptidomimetics: An Alternative to Oxygen-Dependent Photodynamic Cancer Therapy. *Angewandte Chemie - International Edition*, 55 (18), pp. 5493 - 5496.
11. Bain, C., Scott, C., Mowat, A. (2012). Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Immunology*, 137, pp. 218 - 228.
12. Wynn, T., Chawla, A. and Pollard, J. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496(7446), pp. 445 - 455.
13. Gordon, S., Taylor, P. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.*, 5(12), pp. 953 - 964.
14. Yona, S., Kim, K., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M. (2013) Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 38(1), pp. 79 - 91.
15. Mosser, D., Edwards, J. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.*, 8(12), pp. 958 - 69.

16. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.*, 23(11), pp. 549 - 55.
17. Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., Allavena, P. (2006). Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur. J. Cancer.*, 42(6), pp. 717 - 727.
18. Gensel, J., Zhang, B. (2015). Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res.*, 1619, pp. 1 - 11.
19. Stout, R. (2004). Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J. Leukoc. Biol.*, 76(3), pp. 509 - 513.
20. Dandekar, R., Kingaonkar, A., Dhabekar, G. (2011). Role of macrophages in malignancy. *Ann Maxillofac Surg.*, 1(2), pp. 150 - 154, doi: 10.4103/2231-0746.92782.
21. Wang, L., Zhang, S., Wu, H., Rong, X., Guo, J. (2018). M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J. Leukoc. Biol.*, 106, pp. 345 - 358, 10.1002/JLB.3RU1018-378RR.
22. Zheng, X., Turkowski, K., Mora, J., Brüne, B., Seeger, W., Weigert, A. (2017). Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy. *Oncotarget*, 8(48), pp. 436 - 452. 10.18632/oncotarget.17061.
23. Трещалина, Е., Жукова, О., Герасимова, Г., Андропова, Н., Гарин, А. (2005). Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. *Москва: Медицина.*
24. Teicher, B., Andrews, P. (2004). Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and approval. *New Jersey: Humana Press.*
25. Pietrangeli, C., Edelson, P. (2001). Measurement of 5'-nucleotidase in mouse peritoneal macrophages in listeriosis. *Inf. Immunity*, 32(3), pp. 1206 - 1210.

26. Ruffell, B., Affara, N., Coussens, L. (2012). Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.*, 33(3), pp. 119 - 126.
27. Singh, S., Mehta, N., Lilan, J., Budhthoki, M., Chao, F., Yong, L. (2017). Initiative action of tumor-associated macrophage during tumor metastasis. *Biochimie Open.*, 4, pp. 8 - 18.
28. Komohara, Y., Jinushi, M., Takeya, M. (2014). Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Science*, 105(1), pp. 1 - 8.
29. Ruffell, B., Coussens, L. (2015). Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell*, 27(4), pp. 462 - 472.
30. Luo-Qin Fu, Wen-Lin Du, Mao-Hua Cai, Jia-Yu Yao, Yuan-Yuan Zhao, Xiao-Zhou Mou (2020). The roles of tumor-associated macrophages in tumor angiogenesis and metastasis. *Cellular Immunology*, 353, pp. 104 - 119, <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104119>.
31. Deryagina, V., Ryzhova, N., Golubeva, I. (2011). Phagocyte functional activity and production of nitric oxide compounds in mouse models of tumor xenografts RAMN. *Vestnik RONTs im. N. N. Blokhina*, 22(2), pp. 49 - 57.
32. Kladnytska, L., Nikulina, V., Garmanchuk, L. (2014). Influence Allogeneic Mesenchymal Stem Cells on the Tumour Growth Parameters and Metastatic Potential in the Transplantable Carcinoma Lung Lewis. *Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 1 (1), pp. 1 - 5.
33. Medrek, C., Pontén, F., Jirström, K., Leandersson, K. (2012). The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer*, 12(306), p. 2, <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/12/306>.
34. Lin, E., Pollard, J. (2007). Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Res.*, 67(11), pp. 5064 - 5066.

35. Wang, J., Cao, Z., Zhang, X., Nakamura, M., Sun, M., Hartman, J., Harris, R., Sun, Y., Cao, Y. (2015). Novel mechanism of macrophage-mediated metastasis revealed in a zebrafish model of tumor development. *Cancer Res.*, 75(2), pp. 306 - 315.
36. Beatty, G., Chiorean, E., Fishman, M., Saboury, B., Teitelbaum, U., Sun, W., Huhn, R., Song, W., Li, D., Sharp, L., Torigian, D., O'Dwyer, P., Vonderheide, R. (2011). CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science*, 331(6024), pp. 1612 - 1618.
37. Comito, G., Segura, C., Sobierajska, K., Ippolito, L., Taddei, M., Giannoni, E., Chiarugi P. (2014). Zoledronic acid impairs stromal reactivity by inhibiting M2-macrophages polarization and prostate cancer-associated fibroblasts. *Eur. J. Cancer*, 50, pp. 74 - 79.
38. Nathan, C., Shiloh, M. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(16), pp. 8841 - 8848, doi:10.1073/pnas.97.16.8841.
39. Mori, M. (2007). Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J. Nutr.*, 137(6), pp. 1616 - 1620.
40. Pautz, A., Art, J., Hahn, S., Nowag, S., Voss, C., Kleinert, H. (2010). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide*, 23(2), pp. 75 - 93, doi: 10.1016/j.niox.2010.04.007.
41. Bronte, V., Zanovello, P., (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.*, 5, pp. 641 - 654, doi: 10.1038/nri1668.
42. Das, P., Lahiri, A., Chakravorty, D. (2010). Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. *PLoS Pathog.*, 6(6), doi: 10.1371/journal.ppat.1000899.