

Зміни функціонального стану перитонеальних макрофагів у мишей в кінетиці росту високоангіогенного варіанта карциноми легені Льюїс

О.Г.Федорчук

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

Проведено вивчення функціональної активності (метаболічної, цитотоксичної, аргіназної та продукції активних форм кисню) макрофагів мишей з високоангіогенним варіантом карциноми легені Льюїс (LLC/R9). Показано, що макрофаги мишей з LLC/R9 проявляють ознаки альтернативної активації. Біологічні властивості LLC/R9 асоціюються з поляризацією макрофагів у напрямі фенотипу M2.

Ключові слова: VEGF, активація макрофагів, фенотип M1 та M2.

ВСТУП

Наукові досягнення в онкології показали, що розуміння механізмів неконтрольованого росту та прогресії пухлинних клітин неможливе без глибокого аналізу їх взаємодії з нормальними клітинами організму. Взаємодія пухлинних клітин з компонентами їх мікрооточення (ендотеліальними клітинами, нейтрофілами та лімфоцитами, моноцитами/макрофагами, фібробластами/міофібробластами тощо), що реалізується за рахунок міжклітинних контактів або розчинних медіаторів, відіграє критичну роль у більшості процесів, що обумовлюють чи супроводжують інвазію та метастазування злоякісних пухлин [1, 2, 4].

Моноцити/макрофаги складають одну з найбільших (пухлиноасоційовані макрофаги (ПАМ) складають до 80% лейкоцитів стромі солідних пухлин) фракцій нормальних клітин організму, які інфільтровані в пухлину. Ці

клітини є плюрипотентними, функціональна спрямованість яких залежить від тканинного цитокінового мікрооточення. В умовах пухлинного росту макрофаги можуть як перешкоджати, так і сприяти розвитку злоякісного новоутворення. Відомо, що прозапальна активація макрофагів робить їх дієвими ефекторами проти пухлинного імунітету [8, 10]. Однак моноцити, які залучаються в зону пухлинного росту і проходять диференціювання під впливом розчинних факторів, що їх продукують злоякісні клітини, зазнають альтернативної активації і перетворюються на толерогенні макрофаги [7, 15, 20]. При цьому під впливом гіпоксії, характерної для пухлинних тканин, вони посилюють продукцію транскрипційних факторів, таких як HIF-1,-2 та NF-κB, що, в свою чергу, призводить до посиленого синтезу і секреції біологічно активних сполук (VEGF, IL-1, TNF та ін.), які сприяють процесам мітогенезу, інвазії, метастазування та пухлинного ангіогенезу [12, 14, 18]. Крім того, колонізуючи зону росту пухлини, такі макрофаги поляризують розвиток адаптивної протипухлинної імунної відповіді за Th2 типом, що також сприяє прогресії пухлинного процесу [8, 10].

Незважаючи на те, що багатьма дослідженнями було продемонстровано, що залежно від організму та характеру злоякісного процесу мононуклеарні фагоцити по-різному впливають на ріст і метастазування пухлин [9, 13, 19], питання про взаємозв'язок між біологічними властивостями злоякісних пухлин та функціональним станом макрофагів залишається відкритим.

Метою роботи було порівняльне дослідження функціональної активності макрофагів мишей з перещепленими пухлинами одного генезу, які відрізняються біологічними влас-

тивостями, а саме: проліферативним, ангіогенним та метастатичним потенціалами. Для цього в роботі було використано два варіанти карциноми легені Льюїс — LLC та LLC/R9, які істотно відрізняються за вищевказаними характеристиками, а також за характером їх впливу на фізіологічні системи організму тварин [3, 5]. При цьому LLC/R9 характеризується високим ангіогенним потенціалом, на користь чого свідчить значно вищий рівень продукції VEGF (ключового індуктора ангіогенезу) цими клітинами порівняно з клітинами LLC. Незважаючи на високий ангіогенний потенціал, варіант LLC/R9 має втричі нижчий рівень метастазування, аніж LLC. Крім того, суттєво не відрізняючись за швидкістю росту в умовах *in vitro* (у фазі експоненційного росту), за темпами росту *in vivo* варіант LLC/R9 значно випереджає варіант LLC, що свідчить про високу залежність його росту від пухлинного ангіогенезу [21-22].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження змін функціональної активності макрофагів черевної порожнини мишей у процесі росту LLC та LLC/R9 проведені на мишах-самицях лінії C57B1/6 середньої маси 18-23 г віком 2-2,5 місяця розведення віварію Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України. В якості експериментальних пухлинних моделей було використано два варіанти карциноми легені Льюїса: вихідну лінію LLC та варіант LLC/R9, отриманий шляхом експериментальної прогресії вихідного штаму LLC в напрямі формування лікарської резистентності до цисплатину *in vivo*. Для перещеплення тваринам пухлинні клітини LLC і LLC/R9 культивували *in vitro* в повному поживному середовищі за стандартних умов. Клітини після механічного зняття із флаконів для культивування ресуспендували у фізіологічному розчині та інокулювали мишам внутрішньом'язево (0,1 мл суспензії клітин, яка містила $1,0 \cdot 10^6$ клітин).

Матеріал для дослідження відбирали на 8, 14, 20 та 26 добу після перещеплення, де визначали показники киснезалежної активності в НСТ-тесті, рівень продукції активних форм кисню (АФК), цитотоксичної та аргіназної активності макрофагів перитонеальної порожнини мишей з LLC і LLC/R9 у порівнянні з інтактними мишами.

Клітини перитонеального змиву (КПЗ) отримували без попереднього стимулювання з че-

ревної порожнини мишей. Для цього в черевну порожнину тварин вводили 5 мл середовища 199 чи фосфатного буферного розчину (ФБР) (рН 7,2-7,4) з 5 ОД/мл гепарину і проводили масаж передньої стінки черевної порожнини протягом 10 хв. Потім відбирали суспензію КПЗ, що утворилася, і ще двічі промивали черевну порожнину свіжими порціями середовища 199. Отримані КПЗ двічі відмивали від гепарину (400g, 10 хв.), суспендували в 1 мл середовища RPMI 1640 з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки чи в безбарвному сольовому розчині Хенкса («Sigma», США) (у залежності від вимог подальшої постановки конкретної методики). Підраховували кількість життєздатних КПЗ. Для отримання перитонеальних макрофагів суспензію КПЗ розливали аліквотами по 3,5 мл у пластикові чашки Петрі діаметром 6 см та інкубували протягом 45 хв. у термостаті при 37°C. Суспензію неадгезованих КПЗ зливали та двічі обережно промивали чашки Петрі теплим розчином Хенкса. Далі вносили розчин Хенкса з 0,02% ЕДТА і ставили чашки Петрі на лід (10-15 хв.). Після цього змивали з дна фракцію адгезованих клітин, переважно представлених перитонеальними макрофагами. Суспензію перитонеальних макрофагів осаджували шляхом центрифугування (400g, 10 хв.) і суспендували в поживному середовищі чи ФБР. Підраховували кількість життєздатних КПЗ шляхом їх фарбування трипановим синім і доводили концентрацію до $1 \cdot 10^6$ /мл.

Для визначення спонтанної метаболічної активності в НСТ-тесті [17] отримані перитонеальні макрофаги вносили в планшет у кількості $1 \cdot 10^5$ у лунку в об'ємі 100 мкл. У дослідні проби для визначення спонтанної активності клітин вносили 0,1 мл 0,2% нітросинього тетразолію. У контрольні лунки вносили 0,1 мл повного середовища. Клітини інкубували 1 год. при 37 С у присутності 5% CO₂. Після інкубації планшет центрифугували 10 хв. при 1000 об./хв. До осаду додавали 0,2 мл метанолу та повторно центрифугували за тих самих умов. Після видалення надосадової рідини в усі лунки додавали 0,1 мл 0,1 н КОН і 0,1 мл ДМСО. Вміст проб акуратно піпетували і проводили облік результатів спектрофотометричним методом при довжині хвилі 540 нм. Спонтанну активність перитонельних макрофагів виражали в умовних одиницях.

Для визначення генерації ROS [6] макрофагами відбирали по 100 мкл суспензії клітин після їх зняття з поверхні культурального пластика ($5 \cdot 10^5$ клітин на зразок) у пробірки для цитофлуориметра, додавали 4 мкл 20 мМ

дихлорфлуоресцеїнуацетату (ДХФ) та інкубували зразки протягом 30 хв. в інкубаторі при 37 С. Після інкубації зразки тричі відмивали ФР та фіксували в 0,4% формаліні для подальшого аналізу на цитофлуориметрі.

Для визначення рівня цитотоксичної активності клітини-мішені (LLC або LLC/R9) та клітини-ефектори (макрофаги черевної порожнини) вносили в лунки 96-луночного круглодонного планшета в об'ємі 100 мкл повного середовища за стандартною методикою ($2 \cdot 10^4$ клітин-мішеней і $4 \cdot 10^5$ клітин-ефекторів) [6]. Співвідношення мішень/ефектор складало 1:40. Після центрифугування при 500 g 5 хв. планшет інкубували протягом 4-х год. при 37°C і 5% CO₂. Підрахунок мертвих клітин-мішеней проводили за допомогою проточного цитофлуориметра. Для цього по закінченні інкубації суспензію клітин переносили в окремі пробірки і вносили пропідій-йодид у концентрації 2,5 мкг/мл.

Рівень цитотоксичної активності підраховували за формулою: ЦА (%) = (Д-К)/К*100%, де Д – кількість мертвих клітин-мішеней в дослідній пробі (клітини-мішені + ефектори), К – кількість мертвих клітин-мішеней в контролі (клітини-мішені + середовище).

Визначення аргіназної активності макрофагів [16] базується на здатності аргінази клітин метаболізувати аргінін до сечовини, концентрацію якої можна визначити спектрофотометрично і кількісно охарактеризувати за допомогою калібрувальної кривої. Під час експерименту для визначення активності аргінази відбирали однакову кількість макрофагів (200 тис.), лізували їх, додавали однакову кількість аргініну та інкубували суміш протягом 1 год. при 37°C. Далі концентрацію сечовини, що утворювалася, визначали спектрофотометрично. Мірою активності аргінази було обрано кіль-

кість сечовини, яка утворювалася за годину інкубації лізату стандартної кількості клітин зі стандартною кількістю доданого аргініну в перерахунок на 1 млн клітин.

Статистичну обробку даних проводили з використанням t-критерію Стьюдента за допомогою програм Microsoft Excel і Microcal Origin.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Об'єктом дослідження були макрофаги черевної порожнини мишей з LLC та LLC/R9 як найбільш вивчені та зручні для досліджень представники мононуклеарних фагоцитів ссавців. Вони походять з мієлоїдних попередників, розташованих у кістковому мозку, а також у селезінці і фетальній печінці. Мієлоїдні попередники розвиваються до стадії промоноцитів і далі диференціюють у моноцити. Новоутворені моноцити («недосвічені» макрофаги) залишають унікальне мікрооточення кісткового мозку і потрапляють у кров. У циркулюючій крові вони стикаються з багаточисленними агентами (цитокінами, хемокінами, адренергічними і холінергічними агоністами, гормонами, імуноглобулінами, жирними кислотами та ін.), здатними чинити визначальний вплив на їх фенотипові і функціональні характеристики [11, 23].

Першим аналізованим функціональним показником перитонеальних фагоцитів був рівень спонтанного киснезалежного метаболізму, детектований за здатністю клітин відновлювати нітросиній тетразолій (НСТ). Даний тест є інтегральним індикатором рівня продукування (як конститутивного, так і у відповідь на екзогенний стимул) токсичних для пухлинних клітин активних форм кисню (супероксид-аніон, пероксид водню, радикал гідропероксиду та ін.).

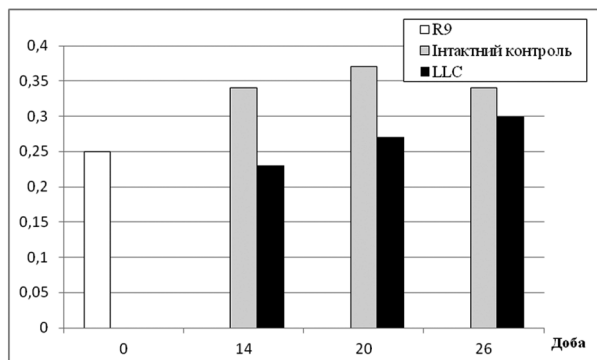


Рис. 1. Рівень спонтанної метаболічної активності перитонеальних макрофагів мишей у процесі росту LLC/R9 (сірі стовпчики) та LLC (штриховані стовпчики). Білий стовпчик – відповідний показник інтактних тварин.

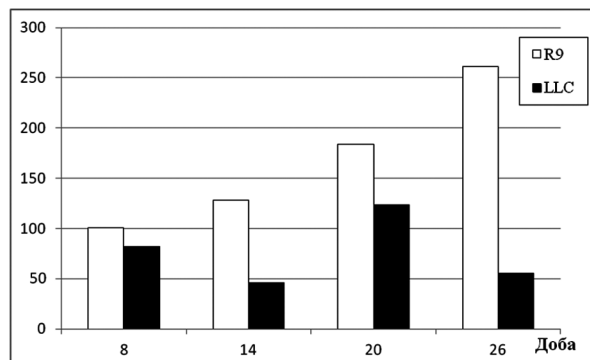


Рис. 2. Рівень спонтанної продукції активних форм кисню (ROS) перитонеальними макрофагами мишей у процесі росту LLC/R9 та LLC.

ТАБЛИЦЯ 1

Рівень цитотоксичної активності перитонеальних макрофагів (%) по відношенню до аутологічних клітин-мішеней у процесі росту LLC та LLC/R9

Інтактні тварини	Доба після перещеплення	Миші з LLC – до LLC	Миші з LLC/R9 – до LLC/R9
До LLC – 32±2,5	14	14,3±8,3*	16±1,5*
До LLC/R9 – 22,6±2,5	20	30±5,9	27,7±3,9
	25	18±2,04*	21,2±7,6

Примітка: * – різниця з інтактними тваринами достовірна ($p < 0,05$).

У результаті досліджень було показано, що рівень спонтанної метаболічної активності перитонеальних макрофагів мишей з високоангіогенним варіантом карциноми легені LLC/R9 у порівнянні з контролем був вищий ($p < 0,05$) у середньому на 40% практично на всіх етапах пухлинного росту. При цьому у мишей з LLC спонтанний рівень дихальної активності макрофагів істотно не змінювався в динаміці росту пухлини і не відрізнявся від показників інтактних тварин (рис. 1).

Отримані результати свідчать про те, що LLC/R9 здатна справляти активаторну дію на киснезалежний метаболізм перитонеальних макрофагів.

Посилення киснезалежного метаболізму макрофагів у мишей з LLC/R9 знаходить своє підтвердження і в підвищенні рівня продукції ними активних форм кисню (АФК). За результатами наших досліджень було показано, що рівень продукції АФК перитонеальними макрофагами тварин з LLC/R9 лінійно зростав у процесі росту пухлини і на 26 добу після перещеплення був вищий у 2,5 разу в порівнянні з аналогічним показником на 8 добу (рис. 2).

На відміну від тварин з LLC/R9, характер змін рівня продукції АФК макрофагами мишей у процесі росту LLC носив нелінійний характер з максимумом на 20 добу росту пухлини та зменшенням на 26 добу. При цьому рівень продукції АФК у мишей з LLC/R9 на 26 добу був у 5 разів вищий ($p < 0,01$) у порівнянні з таким у тварин з LLC. Таким чином, встановлено, що отримані дані корелюють з даними попереднього дослідження і свідчать про активаторний вплив LLC/R9 на киснезалежний метаболізм макрофагів.

Дослідження цитотоксичної активності фагоцитів по відношенню до клітин карциноми легені Льюїса з різними біологічними властивостями показало, що клітини високоангіогенного варіанта більш чутливі до цитотоксичної дії перитонеальних фагоцитів інтактних тварин (табл. 1). Цитотоксична дія макрофагів значною мірою опосередкована саме активними формами кисню. Виходячи з вищевикладених

даних, можна було б припустити, що рівень цитотоксичної активності перитонеальних фагоцитів по відношенню до аутологічних пухлинних клітин у мишей з LLC/R9 має бути вищим, ніж у мишей з LLC. За результатами проведених експериментів було встановлено, що лише на початкових термінах пухлинного росту (14 день) цей показник у дослідних тварин був нижчий (на 55% та 28% у мишей з LLC і LLC/R9 відповідно) порівняно з інтактним контролем. У більш пізній термін (20-25 доба) цитотоксичність перитонеальних макрофагів тварин з LLC/R9 зростала до рівня інтактних тварин. У тварин з LLC на етапі зрілої пухлини (20 доба) показник цитотоксичної активності не відрізнявся від такого у контрольних інтактних тварин, а на етапі метастазування був статистично достовірно нижчим за аналогічні показники у тварин без пухлин.

Таким чином, у результаті досліджень було встановлено, що на період інтенсивного росту первинної пухлини у мишей з LLC/R9, на відміну від мишей з LLC, відмічена тенденція до підвищення рівня цитотоксичної активності, що в певній мірі також корелює з попередніми дослідженнями.

Активация киснезалежного метаболізму пригатаманна макрофагам як M1, так і M2 фенотипу і не дозволяє характеризувати функціональну поляризацію перитонеальних фагоцитів за ростом карциноми легені Льюїса з різним ангіогенним потенціалом. Найбільш інформативним функціональним показником, що відображує функціональну спрямованість макрофагів, є характер метаболізму аргініну. Утилізація макрофагами аргініну відбувається за участю двох основних ферментів: NO-синтетази і аргінази. Посилення активності аргінази макрофагів – ознака їх поляризації до M2 фенотипу [14].

Як видно з рис. 3, на початкових термінах після перещеплення рівень аргіназної активності перитонеальних фагоцитів мишей з LLC/R9 був знижений на 28% порівняно з показником інтактного контролю. У період інтенсивного росту первинної пухлини (14 доба

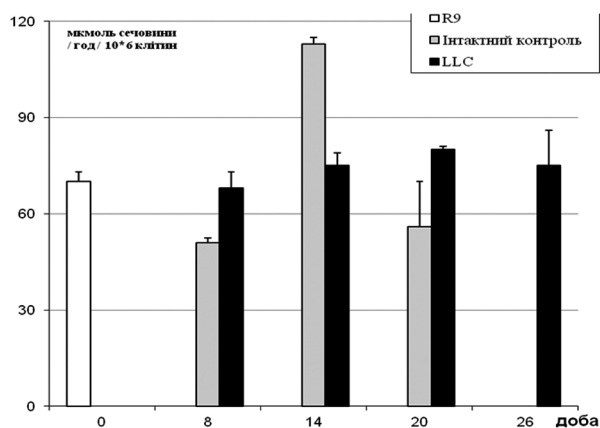


Рис. 3. Аргіназна активність перитонеальних макрофагів мишей у процесі росту LLC/R9 та LLC.

після трансплантації пухлинних клітин) спостерігалось достовірне ($p < 0,05$) підвищення (на 61%) рівня аргіназної активності перитонеальних макрофагів мишей з високоангіогенним варіантом пухлини. Зважаючи на те, що LLC/R9 значно випереджає LLC за темпами росту первинного вузла [13], можна припустити, що поляризація фагоцитів у мікрооточенні пухлини може бути одним з механізмів цього феномену. Однак висловлене припущення потребує перевірки: тестування функціональної спрямованості пухлиноасоційованих макрофагів.

На відміну від тварин з LLC/R9, рівень аргіназної активності макрофагів мишей з LLC не мав статистично достовірних відмінностей від показника інтактного контролю на всіх досліджених етапах росту пухлини.

ВИСНОВКИ

Отримані дані дозволяють висунути припущення, що метаболіти, продуковані в процесі росту LLC/R9, спричиняють поляризацію макрофагів до M2 фенотипу. Зважаючи на те, що початковим етапам росту високоангіогенного варіанта карциноми легені Льюїса притаманне різке зростання продукції VEGF [21], можна припустити, що функціональна поляризація циркулюючих (а можливо, не лише циркулюючих) моноцитів до M2 фенотипу є однією з причин інтенсивного локального росту первинного пухлинного вузла у мишей з LLC/R9.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Иммунология злокачественного роста. — Киев: Наукова думка, 2005. — 791 с.
2. Кавецкий Р.Е. Взаимодействие организма и опухоли. — Киев: Наукова думка, 1977. — 243 с.

3. Колесник Д.Л. Біологічні властивості модифікованого варіанту карциноми легені Льюїс, асоційовані з пухлинним ангиогенезом: Автореф. ... дис. канд. біол. наук. — Київ, 2010. — 20 с.
4. Осинский С., Ваупель П. Микрофизиология опухоли. — Киев: Наукова думка, 2009. — 253 с.
5. Федорчук О.Г., Пясковська О.М., Сківка Л.М. та ін. VEGF опосередковує особливості паранеопластичного синдрому у мишей з високоангіогенним варіантом карциноми легені Льюїс // Вісник Луганського національного університету ім. Т.Шевченка. — 2010. — №10. — С. 23-29.
6. Хаитов Р.В. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека. Пособие для врачей лаборантов. — Москва, 2001. — 51 с.
7. al-Sarireh B., Eremin O. Tumour-associated macrophages (TAMS): disordered function, immune suppression and progressive tumour growth // J. R. Coll. Surg. Edinb. — 2000. — Vol. 45. — P. 1-16.
8. Blankenstein T. The role of inflammation in tumour growth and tumour suppression // Novartis Found. Symp. — 2004. — Vol. 256. — P. 205-210.
9. Clevers H. At the crossroads of inflammation and cancer // Cell. — 2004. — Vol. 118. — P. 671-64.
10. Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and cancer // Nature. — 2002. — Vol. 420. — P. 860-867.
11. Jeneway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. Immunology: the immune system in health & disease: Fifth edition: New York and London: Garland Publishing, 2002. — 732 p.
12. Knowles H., Leek R., Harris A.L. Macrophage infiltration and angiogenesis in human malignancy // Novartis Found. Symp. — 2004. — Vol. 256. — P. 189-200.
13. Lewis C.E., Pollard J.W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments // Cancer Res. — 2006. — Vol. 66. — P. 605-612.
14. Li Q., Withoff S., Verma I.M. Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin // Trends Immunol. — 2005. — Vol. 26. — P. 318-325.
15. Mantovani A., Sozzani S., Locati M. et al. Infiltration of tumours by macrophages and dendritic cells: tumour-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes // Novartis Found. Symp. — 2004. — Vol. 256. — P. 137-145.
16. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization // Front Biosci. — 2008. — Vol. 13. — P. 453-461.
17. Muller L.R., Rollag A., Froland S.S. Nitroblue tetrazolium reduction in monocytes and monocyte derived macrophages // Immun. Today. — 1989. — Vol. 97. — P. 490-496.
18. Naldini A., Carraro F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis // Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy. — 2005. — Vol. 4. — P. 3-8.
19. Ohm J.E., Gabrilovich D.I., Sempowski G.D. et al. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression // Blood. — 2003. — Vol. 101. — P. 4878-4886.
20. Ohno S., Suzuki N., Ohno Y., Inagawa H. et al. Tumor-associated macrophages: foe or accomplice of tumors?

- // Anticancer Res. — 2003. — Vol. 23. — P. 4395-43409.
21. Pyaskovskaya O.N., Dasyukevich O.I., Kolesnik D.L. et al. Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during Lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance // Exp. Oncol. — 2007. — Vol. 29. — №3. — P. 197-202.
 22. Pyaskovskaya O.N., Kolesnik D.L., Kolobov A.V. et al. Analysis of growth kinetics and proliferative heterogeneity of Lewis lung carcinoma cells growing as unfed culture // Exp. Oncol. — 2008. — Vol. 30. — №4. — P. 269-275.
 23. Stout R.D., Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments // J. Leukoc. Biol. — 2004. — Vol. 76. — P. 509-513.
 24. Van Ginderachter J.A., Movahedi K., Hassanzadeh Ghassabeh G. et al. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion // Immunobiology. — 2006. — Vol. 211. — P. 487-501.

А.Г.Федорчук. Изменения функционального состояния перитонеальных макрофагов мышей в кинетике роста высокоангиогенного варианта карциномы легкого Льюис. Киев, Украина.

Ключевые слова: VEGF, активация макрофагов, фенотип M1 и M2.

Было проведено изучение функциональной активности (метаболической, цитотоксической, аргиназной и продукции активных форм кислорода) макрофагов мышей с высокоангиогенным вариантом карциномы легкого Льюис (LLC/R9). Показано, что макрофаги мышей LLC/R9 проявляют признаки альтернативной активации. Биологические свойства LLC/R9 ассоциируются с поляризацией макрофагов в сторону M2 фенотипа.

A.G.Fedorchuk. The changes of functional state of peritoneal macrophages in tumor-bearing mice during high-angiogenic Lewis lung carcinoma growth. Kyiv, Ukraine.

Key words: VEGF, macrophage activation, M1 and M2 phenotype.

The comparative study of functional activities (metabolic, cytotoxic, arginase activities and generation of reactive oxygen species) of macrophages and from tumor-bearing mice with high-angiogenic variant of Lewis lung carcinoma (LLC/R9) was carried out. It was shown that macrophages from mice with LLC/R9 manifested signs of alternative activation. The biological properties of LLC/R9 are associated with macrophage polarization towards M2 phenotype.

Надійшла до редакції 18.08.2011 р.