

Л. М. Сківка, В. В. Позур, М. П. Рудик, О. Г. Федорчук,
М. Ю. Гром

Модуляторний і комодуляторний вплив препарату NSC-631570 на функціональну активність перитонеальних макрофагів мишей *in vitro*

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Д. М. Говоруном)

Досліджували вплив пухлино-селективного препарату NSC-631570 (Ukrain), застосованого самостійно та у поєднанні з патогенасоційованими біополімерами грамдодативних (пептидоглікан, ліпоейхоева кислота, екстракт цитоплазматичних мембран *Staphylococcus aureus*) та грамнегативних (ліпополісахарид *Escherichia coli*) бактерій на метаболічну активність перитонеальних макрофагів мишей *in vitro*. Показано, що при самостійному застосуванні NSC-631570 спричиняє помірне посилення киснезалежного метаболізму інтактних клітин і зростання їх аргіназної активності. Спрямованість комодуляторної дії препарату залежить від вихідного функціонального стану фагоцитів.

NSC-631570 (Ukrain) — напівсинтетична похідна тіофосфорної кислоти та алкалоїдів чистоїлу великого (*Chelidonium majus* L.). Препарат справляє цитотоксичну і цитостатичну дію на пухлинні клітини як *in vitro*, так і *in vivo* завдяки здатності вибірково накопичуватись у пухлинній тканині та активувати загибель злоякісно трансформованих клітин без ушкодження здорових клітин [1, 2]. Понад 20 років NSC-631570 застосовується в медицині для лікування доброякісних і злоякісних пухлин [3–5]. Одночасно з протипухлинним ефектом NSC-631570 справляє виразну імуномодуляторну дію, спричиняючи підвищення в периферичній крові тварин-пухлиноносіїв кількості Т-лімфоцитів-хелперів на фоні зниження відносної кількості Т-лімфоцитів-супресорів, а також регулюючи метаболічну активність макрофагів [6, 7]. Однак механізм і спрямованість імуномодуляторної дії препарату вивчені недостатньо.

Макрофаги — одна із субпопуляцій мононуклеарних фагоцитів — являють собою важливу ланку природного протипухлинного імунітету. Однак спеціалізація та активація макрофагів регулюється локальними і системними стимулами, продукованими під час пухлинного росту, такими, як цитокіни, хемокіни тощо [8]. Відповідно до Th1/Th2 дихотомії імунної відповіді існує щонайменше два типи спрямованості активації макрофагів: класичний (M1) і альтернативний (M2) [9]. Під впливом медіаторів пухлинного походження макрофаги поляризуються до M2-фенотипу, втрачають здатність справляти протипухлинну дію і можуть сприяти росту і метастазуванню пухлини [10].

Зважаючи на вищесказане, ми ставили за мету дослідити вплив препарату NSC-631570, застосованого як самостійно, так і в поєднанні з патогенасоційованими молекулами (ПАМ), які широко використовуються в імуноад'ювантній терапії пухлин, на функціональну активність макрофагів мишей *in vitro*.

Макрофаги виділяли з клітин перитонеального змиву C57/Black без попередньої стимуляції за здатністю адгезувати до пластикової поверхні. Киснезалежний метаболізм макрофагів визначали за відновленням нітросинього тетразолію (НСТ-тест) згідно з методикою

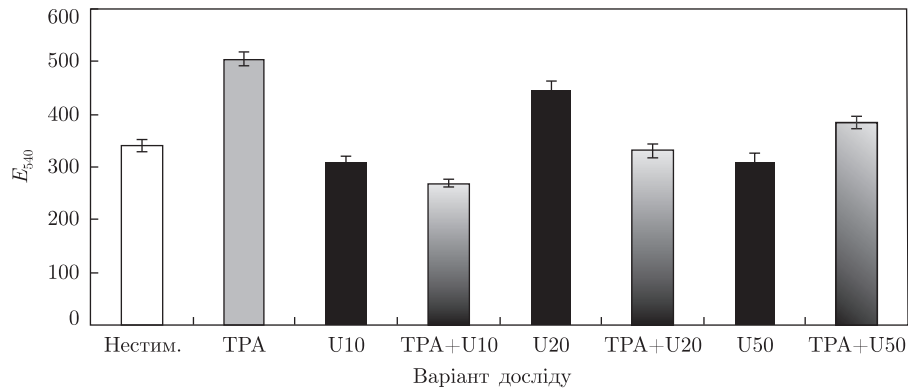


Рис. 1. Вплив препарату NSC-631570 (Ukraine), застосованого самостійно та в поєднанні з ТРА, на киснезалежний метаболізм перитонеальних макрофагів мишей. ТРА — тетрафторболацетат; U10, U20, U50 — препарат “Ukraine” у концентраціях 10, 20 і 50 мкг/мл відповідно

F. Müller зі співавт. [11]. Як референтний стимулятор киснезалежного метаболізму використовували тетрафторболовий ефір (tetra phorbol acetate, ТРА) (“Sigma”, США). Для дослідження аргіназної активності в клітинних лізатах застосовували стандартний метод, що базується на фотометричному визначенні метаболізованого до сечовини аргініну, з незначними модифікаціями [12]. Препарат NSC-631570 (Ukraine) був наданий компанією Nowicky Pharma (Відень, Австрія). Як ПАМ використовували біополімери *Staphylococcus aureus*: ліпотейхоєву кислоту (ЛТК) та пептидоглікан (ПГ) (“Sigma”, США), екстракт цитоплазматичних мембран, люб’язно наданий професором В. К. Позуром, а також ліпополісахарид (ЛПС) *Escherichia coli* (“Sigma”, США).

За результатами проведених нами попередніх досліджень [13] для вивчення модуляторного впливу NSC-631570 було обрано три концентрації препарату: максимальна неапоптогенна по відношенню до пухлинних клітин (10 мкг/мл), мінімальна апоптогенна (20 мкг/мл) та апоптогенна концентрація, що спричиняла загибель 85–90% пухлинних клітин *in vitro*.

Киснезалежний метаболізм — один з критеріїв класичної (прозапальної) активації макрофагів. Взаємодія макрофагів з агентами запалення такими, як патогенасоційовані мікробні структури, або прозапальні цитокіни (наприклад, IFN- γ), приводить до прозапальної (класичної) активації цих клітин, що супроводжується продукцією ними прозапальних цитокінів, реактивних форм кисню, окису азоту та ін. У сукупності така активація макрофагів спричиняє розвиток запального процесу й індукування імунної відповіді Th1-типу [14]. Неадекватна прозапальна активація макрофагів може виступати патогенетичним фактором низки захворювань людини таких, як подагра, ішемічна хвороба та ін.

За результатами наших досліджень, у пробах фагоцитів, оброблених ТРА, показник стимуляції становив 47%. Препарат NSC-631570, застосований самостійно у концентрації 20 мкг/мл, справляв помірний стимуляторний вплив на киснезалежний метаболізм перитонеальних макрофагів (рис. 1). Показник метаболічної активності у цих пробах був вищим, ніж у нестимульованому контролі, на 32%. Застосований в інших концентраціях (10, 50 мкг/мл) препарат не чинив статистично значущого модуляторного впливу на киснезалежний метаболізм перитонеальних макрофагів. Застосування NSC-631570 на фоні впливу ТРА призводило до нівелювання стимуляторного ефекту останнього. При комбінованому застосуванні ТРА з препаратом NSC-631570, незалежно від його концентрації, показники киснезалежного метаболізму перитонеальних фагоцитів не перевищували значень нестиму-

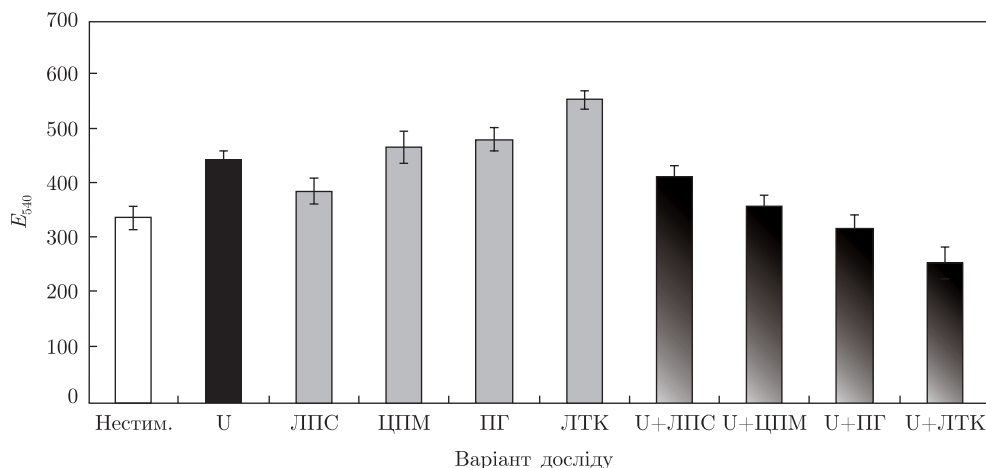


Рис. 2. Вплив препарату NSC-631570 (Ukraine), застосованого самостійно та в поєднанні з ПАМ, на киснезалежний метаболізм перитонеальних макрофагів мишей.

ПАМ — патогенасоційовані молекули; U — препарат “Ukraine” у концентрації 20 мкг/мл; ЛПС — ліпополісахарид; ЦПМ — екстракт цитоплазматичних мембран; ПГ — пептидоглікан; ЛТК — ліптейхоєва кислота

льованого контролю. Оскільки відомо, що ТРА стимулює киснезалежний метаболізм фагоцитів через активацію гексозо-монофосфатного шунта, можна припустити, що NSC-631570 здатний регулювати цей функціональний ланцюг. Отримані дані вказують також на те, що спрямованість модуляторного впливу препарату NSC-631570 на киснезалежний метаболізм перитонеальних макрофагів залежить від вихідного значення цього показника.

Застосування NSC-631570 на фоні впливу ПАМ мало подібні наслідки щодо киснезалежного метаболізму макрофагів. Зважаючи на те, що найвищий рівень модуляції кисневого метаболізму макрофагів ми зареєстрували у пробах, оброблених NSC-631570 у концентрації 20 мкг/мл, саме цю концентрацію використовували для дослідження комодуляторної активності препарату при його сумісному застосуванні з ПАМ. Усі використані в роботі ПАМ посилювали “кисневий вибух” фагоцитів (рис. 2). Більший приріст показника метаболічної активності спостерігався в пробах, оброблених біополімерами *S. aureus* (ЛТК — в 1,57 раза, ПГ — в 1,4 раза, ЦПМ — в 1,37 раза), і дещо менший — при обробці біополімером грамнегативних бактерій ЛПС — в 1,2 раза. Додавання NSC-631570 до клітин, оброблених ПАМ грамполозитивних бактерій (ЛТК, ПГ, ЦПМ), спричиняло нівелювання стимуляторного ефекту останніх: показники метаболічної активності перитонеальних макрофагів знаходилися в межах значень нестимульованого контролю. При сумісній обробці фагоцитів NSC-631570 і ЛПС показники метаболічної активності перевищували контрольні в 1,2 раза, що свідчить про відсутність впливу NSC-631570 на стимуляторний ефект ЛПС. Відомо, що активація киснезалежного метаболізму ПАМ грамполозитивних і грамнегативних бактерій відбувається із залученням різних сигнальних шляхів. У випадку полімерів грамполозитивних бактерій сигнальний шлях є залежним від протеїнкінази С [15]. Ймовірно, NSC-631570 здатний справляти регуляторний вплив на цей сигнальний шлях.

Зростання аргіназної активності — ознака альтернативної активації макрофагів. Фермент аргінази Arg-1 полімеризує аргінін з утворенням сечовини і орнітину (попередника поліамінів і проліну). Поліаміни залучені в процес клітинного росту, а пролін є ключовим компонентом колагену. Альтернативна активація макрофагів перетворює їх на толерогенні антигенпрезентувальні клітини з регуляторними властивостями. Продукція цими кліти-

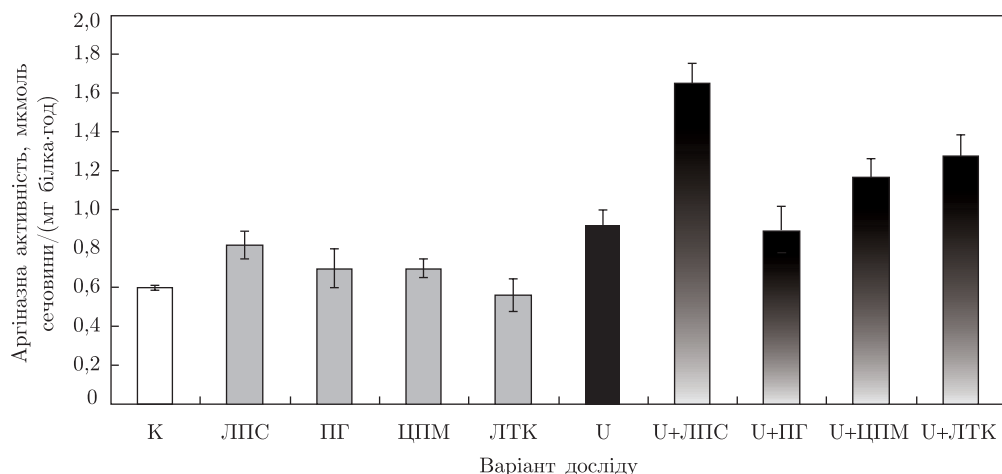


Рис. 3. Вплив препарату NSC-631570 (Ukraine), застосованого самостійно та в поєднанні з ПАМ, на аргіназну активність перитонеальних макрофагів мишей.

ПАМ — патогенасоційовані молекули; U — препарат “Ukraine” у концентрації 20 мкг/мл; ЛПС — ліпополісахарид; ЦПМ — екстракт цитоплазматичних мембран; ПГ — пептидоглікан; ЛТК — ліпотьохоева кислота

нами ростових факторів і цитокінів активує клітинну проліферацію і ангиогенез. Однак у деяких випадках аргіназа коекспресується з NO-синтетазою і посилення її активності супроводжує прозапальну активацію фагоцитів [8, 9]. Усі використані в роботі ПАМ грам-позитивних бактерій не чинили статистично вірогідного впливу на аргіназну активність перитонеальних макрофагів (рис. 3). У пробах клітин, оброблених ЛТК, спостерігалось незначне зниження аргіназної активності порівняно з необробленими клітинами. Зазначимо, що показники аргіназної активності перитонеальних макрофагів за умов стимуляції ПАМ характеризувались значною індивідуальною варіабельністю. ЛПС посилювала метаболізм аргініну до сечовини на 37%. NSC-631570, застосований самостійно в концентрації 20 мкг/мл, посилював аргіназну активність перитонеальних фагоцитів в 1,5 раза. Сумісне застосування препарату та ПАМ у всіх випадках спричиняло статистично вірогідне посилення метаболізму аргініну до сечовини, найбільшою мірою — у пробах з ЛТК. Це дозволяє зробити припущення, що спрямованість модуляторного впливу NSC-631570 на аргіназну активність також може залежати від вихідного функціонального стану фагоцитів. Однак для перевірки цього припущення необхідно додатково дослідити вплив препарату в умовах дії інгібіторів аргіназної активності.

Таким чином, препарат NSC-631570 справляє модуляторний і комодуляторний вплив на метаболічну активність перитонеальних макрофагів мишей *in vitro*. Обробка інтактних макрофагів NSC-631570 спричиняє помірне посилення киснезалежного метаболізму клітин і зростання їх аргіназної активності. Спрямованість комодуляторної дії препарату залежить від вихідного функціонального стану фагоцитів.

1. Todor I. The effect of the antineoplastic drug NSC631570 on the electrokinetic potential of malignant and normal cells // Int. J. Immunother. – 2003. – **19**, No 2-4. – P. 159-167.
2. Habermehl D., Kammerer B., Handrick R. et al. Proapoptotic activity of Ukraine is based on Chelidonium majus L. alkaloids and mediated via a mitochondrial death pathway // BMC Cancer. – 2006. – **6**. – P. 14.
3. Ernst E., Schmidt K. Ukraine – a new cancer cure? A systematic review of randomised clinical trials // Ibid. – 2005. – **5**. – P. 1-7.
4. Hohenwarter O., Strutzenberger K., Katinger H. et al. Selective inhibition of *in vitro* cell growth by the anti-tumor drug Ukraine // Drug. Exp. Clin. Res. – 1992. – Suppl. 18. – P. 1-4.

5. Venkatesh K., Govindaraj S., Ramachandran A. et al. Effect of Ukrain on Cell Survival and Apoptosis in the Androgen-Independent Prostate Cancer Cell Line PC-3 // J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. – 2011. – **30**, No 1. – P. 11–19.
6. Mozhenok T. P., Beliaeva T. N., Leont'eva E. A., Fadeeva M. D. Effect of alkaloid sanguinarine and a pharmaceutical preparation Ukrain on modulation of vesicular membrane fusion and actin cytoskeleton of macrophages // Tsitologiya. – 2005. – **47**, No 10. – P. 860–865.
7. Grinevich Y., Shalimov S., Bendyuh G. et al. Effect of Ukrain on the growth and metastasizing of Lewis carcinoma in C57BL/6 mice // Drug. Exp. Clin. Res. – 2005. – **31**, No 2. – P. 59–70.
8. Mosser D.M. The many faces of macrophage activation // J. Leukoc. Biol. – 2003. – **73**. – P. 209–212.
9. Martinez F. O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization // Front. Biosci. – 2008. – **13**. – P. 453–461.
10. Mantovani A., Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity // Curr. Opin. Immunol. – 2010. – **22**, No 2. – P. 231–237.
11. Müller F., Rollag H., Frøland S. S. Nitroblue tetrazolium reduction in monocytes and monocyte-derived macrophages. Effect of oxidative burst stimulants and interferons // Acta pathol., microbiol. et immunol. scand. – 1989. – **97**, No 6. – P. 490–496.
12. *Macrophages and dendritic cells. Methods and protocols* / Ed. by E. R. Neil. – New York: Humana Press, 2009. – 368 p.
13. Skivka L., Susak Y., Trompak O. et al. The effect of monotherapy and combined therapy with NSC-631570 (Ukrain) on growth of low- and high-metastasizing B16 melanoma in mice // J. Oncol. Pharm. Pract. – 2011. – **17**, No 4. – P. 339–349.
14. Mège J. L., Mehraj V., Capo C. Macrophage polarization and bacterial infections // Curr. Opin. Infect. Dis. – 2011. – **24**, No 3. – P. 230–234.
15. Farnell M. B., He H., Kogut M. H. Differential activation of signal transduction pathways mediating oxidative burst by chicken heterophils in response to stimulation with lipopolysaccharide and lipoteichoic acid // Inflammation. – 2003. – **27**, No 4. – P. 225–231.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка
Інститут експериментальної патології,
онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 16.11.2011

Л. М. Скивка, В. В. Позур, М. П. Рудык, А. Г. Федорчук, М. Ю. Гром

Модуляторное и комодуляторное действие препарата NSC-631570 на функциональную активность перитонеальных макрофагов мышей *in vitro*

Исследовали влияние опухоли-селективного препарата NSC-631570 (Ukrain), примененного самостоятельно, а также в сочетании с патогенассоциированными биополимерами грампозитивных (пептидогликан, липотейхоевая кислота, экстракт цитоплазматических мембран Staphylococcus aureus) и грамотригативных (липолисахарид Escherichia coli) бактерий на метаболическую активность перитонеальных макрофагов мышей in vitro. Показано, что при самостоятельном использовании NSC-631570 вызывает умеренное усиление кислородзависимого метаболизма интактных клеток и увеличение их аргиназной активности. Направленность комодуляторного действия препарата зависит от исходного функционального состояния фагоцитов.

L. M. Skivka, V. V. Pozur, M. P. Rudyk, O. G. Fedorchuk, M. Yu. Grom

Modulatory and co-modulatory effects of NSC-631570 on mouse peritoneal macrophage functional activity *in vitro*

The effects of cancer-selective drug NSC-631570 (Ukrain) used alone and in combination with pathogen-associated polymers of Gram-positive (peptidoglycan, lipoteichoic acid, and cytoplasmic membrane extraction of Staphylococcus aureus) and Gram-negative (Escherichia coli lipopolysaccharide) bacteria on mouse peritoneal macrophage metabolic activity in vitro are investigated. It is shown that NSC-631570, as used alone, causes a moderate enhancement of oxidative metabolism and arginase activity of intact peritoneal macrophages. The co-modulatory effect of the preparation depends on the initial functional state of phagocytes.