

МОРФОЛОГІЯ ТА ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН

УДК 571.27

¹С. В. ГУРМАЧ, ¹М. П. РУДИК, ¹В. М. СВЯТЕЦЬКА, ²О. В. СКАЧКОВА,
¹Л. М. СКІВКА

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини»
пр-т Академіка Глушкова, 2, Київ, 03022;

²Національний інститут раку, лабораторія експериментальної онкології
вул. Михайла Ломоносова, 33/43, Київ, 03022

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ ПРОФІЛЬ ФАГОЦИТІВ ЩУРІВ РІЗНОЇ ЛОКАЛІЗАЦІЇ ЗА РОСТУ ГЛІОМИ С6

Визначали спрямованість функціонального профілю фагоцитів головного мозку та перитонеальних макрофагів у щурів з гліомою С6. Функціональний профіль фагоцитів характеризували за показниками аргіназної та NO-синтазної активності, визначеними колориметричними методами, а також за генерацією реактивних форм кисню, фагоцитарною активністю та експресією CD206, визначеними методом проточної цитофлюориметрії. Встановлено, що ріст гліоми С6 у щурів супроводжується змінами функціональних характеристик не лише резидентних макрофагів головного мозку, а й резидентних макрофагів у межах лімфоїдної тканини, асоційованої зі слизовими оболонками – перитонеальних клітин. Перитонеальні макрофаги у щурів з пухлиною характеризувалися функціональним профілем альтернативно активованих клітин. Мікроглії були властиві нетипові для будь-якого активаційного профілю макрофагів функціонально-фенотипові характеристики, що може бути наслідком комплексного складу гліома-асоційованої популяції мононуклеарних фагоцитів.

Ключові слова: гліома, мікроглія, макрофаги, поляризація, функціональний профіль

Центральна нервова система (ЦНС) історично вважалася імунологічно привілейованим органом унаслідок функціонування гематоенцефалічного бар'єру, відсутність традиційної лімфатичної системи та недостатню кількість антиген-презентувальних клітин у тканинах головного мозку [1]. У світлі відкриттів останніх років відбувся кардинальний перегляд імунології головного мозку. У ЦНС виявлено функціональну “глімфатичну систему” (“glymphatic system”), яка використовує унікальні периваскулярні тунелі, утворені астрогліальними клітинами, для виведення з тканин мозку клітинного дебрису та метаболітів [2]. На додачу до глімфатичної системи виявлено менінгіальні лімфатичні судини, залучені у транспортування клітин імунної системи та розчинних медіаторів з головного мозку до дренажних назальних та шийних організованих лімфоїдних утворів, де відбувається презентація антигенів головного мозку у випадку активації імунної відповіді, спричиненої розвитком патологічних процесів, таких як ріст злоякісних пухлин. При цьому лімфатична система слизової оболонки носу є основним компонентом дренажу цереброспінальної рідини [3,4]. Слизові оболонки носу є складовою частиною лімфоїдної тканини, асоційованої зі слизовими оболонками (Mucosa Associated Lymphoid Tissue, MALT), структурні компоненти якої перебувають у тісному функціональному взаємозв'язку [5, 6]. Однак, функціональний стан

фагоцитів у периферичних структурах MALT за умов розвитку гліоми С6 практично не досліджений. Гліоми є найагресивнішими пухлинами головного мозку. Основною популяцією імуніцитів, які можуть складати до 30 % клітин у мікрооточенні злоякісних гліом, є мікроглія – резидентні макрофаги головного мозку [7]. Метаболічний профіль мікроглії в умовах росту гліом є предметом активних досліджень з огляду на її виключну роль у пухлинному процесі та унікальність механізмів функціональної поляризації цих фагоцитів [8, 9].

Метою досліджень було визначити спрямованість функціонального профілю фагоцитів головного мозку та перитонеальних макрофагів у щурів з гліомою С6.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проведені на білих нелінійних щурах масою 40-50 г розведення віварію ННЦ «Інституту біології та медицини» КНУ імені Тараса Шевченка. Після рандомізації за масою тварини були поділені на дві групи по вісім тварин у кожній: 1 група – інтактні тварини, 2 група - тварини, яким перещеплювали пухлину. Усі дослідження на тваринах здійснювали згідно із нормами, встановленими законом України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», і норм, прийнятих в Європейській конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і наукових цілей від 20.09.1985 [10].

Культуру клітин гліоми щурів С6 було отримано з Національного банку клітинних ліній людини та тварин при ІЕПОР ім. Р.С. Кавецького НАН України. Клітини лінії гліоми щурів С6 культивували у культуральному пластику (Sarsted, Німеччина) у повному культуральному середовищі DMEM у CO₂-інкубаторі за 37 °С. Перещеплення гліоми С6 щурам проводили після загальної анестезії із застосуванням в/ч кетаміну (0,1 мг/г тварини) і седазину (0,02 мг/г тварини) методом інтрацеребральної інокуляції 50 мкл клітинної суспензії (500 тис. клітин на тварину) у праву тім'яну зону (передній ріг правого бокового шлуночку) на відстані 3 мм від *sinus sagittalis* для уникнення інтракраніальної кровотечі. Тваринам також безпосередньо перед операцією вводили 0,25 % маркаїну в дозі 0,04 мл/г для полегшення болю протягом 6-8 годин. Контролювали масу тварин в динаміці після інокуляції пухлинних клітин.

Оцінку інфільтрації пухлини активованими клітинами мікроглії проводили імуногістохімічним методом за експресією Iba-1. Як контроль використовували тканину не ураженої пухлиною півкулі головного мозку щурів. Як первинні антитіла використовували моноклональні антитіла, специфічні до Iba-1 (Abcam, Великобританія) у розведеннях відповідно до інструкції виробника. Для візуалізації результатів імуногістохімічних реакцій використовували набір реактивів EnVision system (Dako LSAB2 system, Данія) відповідно до рекомендацій виробника, гістологічні зрізи забарвлювали гематоксилином Майєра. Результати імуногістохімічних реакцій аналізували з використанням оптичного мікроскопу XSP-137-VP (JNOEC, збільшення 200-400).

Для виділення клітин мікроглії після евтаназії щурів шляхом в/ч ін'єкції 200 мкл фенобарбітала натрію (Narcogen) і перфузією з використанням 0,9 % розчину NaCl виділену мозкову тканину поміщали на лід у чашки Петрі у 0,9 % розчин NaCl з додаванням 0,2 % глюкози з подальшим гомогенізуванням у гомогенізаторі Поттера у 0,9 % розчині NaCl протягом 15 хв за кімнатної температури. Отриманий гомогенат пропускали крізь 40 нм клітинний фільтр (BD Biosciences Discovery, США) для додаткового подрібнення тканини. Гомогенат переносили в пробірку і центрифугували при 350 g протягом 10 хв при кімнатній температурі. Потім супернатант відбирали і суспендували в 1 мл 70% ізотонічного розчину Перкола і переносили в нову пробірку. Два мілілітри 50% ізотонічного розчину Перкола обережно нашаровували поверх 70% шару, а потім додавали 1 мл фосфатного буферного розчину (ФБР), м'яко поверх шару 50% Перкола і центрифугували 40 хв/1200 g. Після центрифугування отримували два шари з клітинами. Верхній шар на межі між ФБР і 50 % розчином Перкола містить всі елементи ЦНС, крім мікроглії. Нижній шар на межі розділу між 70 і 50 % ізотонічними фазами Перколу містить мікроглію, позбавлену інших макрофагів ЦНС. Виділені клітини мікроглії промивали у 10 мл ФБР протягом 5 хв при кімнатній температурі та ресуспентували у середовищі RPMI-1640 з додаванням ембріональної телячої сироватки для подальшої оцінки функціональних показників.

Резидентні перитонеальні макрофаги отримували стерильно з черевної порожнини щурів згідно протоколу Zhang et al. [11]. Для цього у черевну порожнину тварин вводили 20 мл холодного ФБР (рН 7,2–7,4) і проводили масаж передньої стінки черевної порожнини протягом 10 хв. Потім відбирали суспензію клітин змиву, що утворилася, і ще двічі промивали черевну порожнину свіжими порціями холодного розчину ФБР. Далі виділені клітини двічі відмивали ФБР та ресуспентували у середовищі RPMI-1640 для подальшої оцінки функціональних показників.

Для оцінки аргіназної активності в клітинних лізатах використовували методику Classen et al. [12]. До досліджуваної популяції клітин послідовно додавали 100 мкл 0,1 % Triton X-100 («Sigma-Aldrich», США), 100 мкл 50 ммоль Tris-HCl (рН 7,5; «Sigma-Aldrich», США), що містив 10 ммоль MnCl₂. Суміш нагрівали при 56 °С упродовж 7 хв для активації аргіназної активності. Реакцію гідролізу L-аргініну здійснювали шляхом інкубації суміші, що містила попередньо активовану аргіназу, зі 100 мкл L-аргініну (0,5 моль; рН 9,7; «SigmaAldrich», США) при 37 °С протягом 2 год. Для зупинення реакції до зразків додавали 800 мкл суміші кислот (H₂SO₄ : H₃PO₄ : H₂O = 1 : 3 : 7). Колориметричне виявлення сечовини здійснювали після додавання до суміші α-ізонітрозопропіофенону (40 мкл, 6 % в етанолі, «Sigma-Aldrich», США) та інкубації при 95 °С 30 хв, а потім при 4 °С упродовж 30 хв. Концентрацію сечовини вимірювали спектрофотометрично при 545 нм. Значення оптичної густини переводили у мікрограми сечовини, використовуючи калібрувальну криву, побудовану з використанням розчинів сечовини відомої концентрації. Аналізували дані, використовуючи наступну формулу: мкг сечовини / 60 (ММ сечовини) × 50 (фактор розведення) / t (хвилини інкубування з аргініном) = одиниць аргінази на 1×10⁶ клітин; 1 одиниця = кількості ферменту, яка необхідна для гідролізу 1 мкМ аргініну за хвилину.

Рівень продукції нітритів вимірювали у супернатанті фагоцитів за допомогою реактиву Гріса [12]. Чкий виготовляли змішуванням однакових об'ємів 2 % сульфаніламід у 10 % фосфорній кислоті і 0,2 % нафилетилендіамінгідрохлориду («Sigma-Aldrich», США). 100 мкл реактиву Гріса додавали до 100 мкл середовища культивування клітин. Суміш інкубували протягом 30 хв за кімнатної температури в темряві. Облік результатів проводили спектрофотометричним методом на планшетному фотометрі Ascent («Labsystems», Фінляндія) при довжині хвилі 540 нм. Рівень нітритів визначали за допомогою калібрувальної кривої, побудованої з використанням стандартних розчинів нітриту натрію. Проби ставили у чотирьох повторях для кожного варіанту дослідження. Значення ділили на кількість живих клітин у зразку. Рівень нітритів представляли для 10⁶ клітин.

Продукцію реактивних форм кисню (РФК) визначали методом проточної цитофлюориметрії з використанням дихлородигідрофлуоресцеїн діацетату (ДХФ-ДА) («Sigma Aldrich», USA) [13]. Клітини інкубували у ФБР, який містив 10 μМ ДХФ-ДА, протягом 30 хв при 37 °С. Оцінювали інтенсивність флуоресценції похідної ДХФ-ДА. Фагоцитарну активність визначали методом проточної цитометрії [13]. Як об'єкт фагоцитозу використовували *S. aureus* Cowan.

Рівень експресії клітинами CD206 молекул оцінювали методом проточної цитофлюориметрії з використанням первинних специфічних антитіл (Alexa Fluor 647, «BD Biosciences», Канада).

Статистичну обробку результатів проводили методами варіаційної статистики з розрахунком середнього значення, середнього квадратичного відхилення (σ) та середньої квадратичної похибки (m). Для визначення вірогідної відмінності показників використовували t-критерій Стьюдента [14].

Результати досліджень та їх обговорення

Серед усіх існуючих моделей пухлин головного мозку гліома С6 має найбільше біологічних властивостей, подібних до таких у гліобластом людини: високий мітотичний індекс, паренхімну інвазію, неоангіогенез тощо. Згідно даних літератури на пізніх термінах росту гліоми С6 *in vivo* відбувається інвазія пухлини у паренхіму і розвиваються розлади моторної функції у тварин [15-17]. За результатами наших досліджень, ріст гліоми С6 супроводжувався зниженням маси дослідних тварин, починаючи з 14 доби після інокуляції пухлинних клітин ().

МОРФОЛОГІЯ ТА ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН

На момент закінчення експерименту маса тварин з пухлинами була на 22 % нижчою за масу контрольних щурів. Спостерігалось також зниження активності тварин, що може бути свідченням розвитку пухлино-асоційованої кахексії. Усі тварини на 14 добу після трансплантації пухлинних клітин мали проблеми з ходюю, защемлення в кон'юктиві ока, що є ознакою швидкого росту гліоми С6.

Таблиця 1

Маса щурів після перещеплення пухлини (г), $M \pm m$, $n=8$

Група тварин	Термін після перещеплення пухлини, доба				
	1	7	14	20	24
Контроль	46,6 \pm 1,4	56,7 \pm 1,7	73, 5 \pm 2,2	92, 4 \pm 2,2	105,2 \pm 2,1
Гліома С6	44,3 \pm 1,2	49,4 \pm 1,4*	59,6 \pm 2,0*	80,1 \pm 2,2*	82,8 \pm 3,3*

Примітка. * - $p < 0,05$ щодо показників щурів контрольної групи.

Імуногістохімічний аналіз тканини головного мозку у ділянці росту пухлини проводили з використанням антитіл проти Iba-1. Iba-1 – фенотиповий маркер активованої (ramified) мікроглії, який широко застосовується для характеристики локалізації мікрогліальних клітин у тканинах головного мозку. Рівень його експресії пропорційний ступеню активації мікрогліальних клітин [18]. Результати проведених нами імуногістохімічних досліджень виявили значну інфільтрацію пухлинної тканини у щурів з гліомою С6 Iba-1+ мікрогліальними клітинами на 24 добу після ініціювання пухлинного росту (рис. 1).

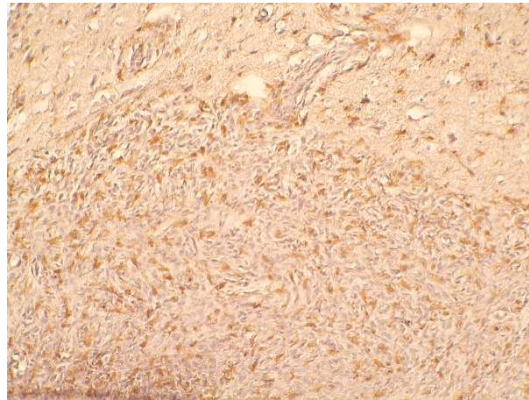


Рис. 1. Імуногістохімічне дослідження маркеру активації мікроглії Iba-1 у пухлинній тканині щурів з гліомою С6 на 24 добу після інокуляції пухлинних клітин.

Додаткове фарбування гематоксилином Майєра, $\times 200$.

Клітини мікроглії є істотним компонентом пухлинного мікрооточення і тісним чином взаємодіють з клітинами гліоми. Цитокіни та інші біологічно активні речовини, продуковані пухлинними клітинами, викликають активацію мікрогліальних клітин і зміну їх метаболізму, перетворюючи резидентні макрофаги головного мозку на пухлино-асоційовані макрофаги, котрі сприяють життєздатності, проліферації та інвазії злоякісно трансформованих клітин [7]. Пухлино-асоційовані макрофаги традиційно характеризуються як фагоцити альтернативної (M2) функціональної спрямованості. Такі фагоцити характеризуються здатністю продукувати протизапальні цитокіни та ростові фактори, котрі підтримують життєздатність пухлинних

клітин і стимулюють пухлинний ангиогенез [19]. Однак, єдиної думки щодо функціонального профілю пухлино-асоційованої мікроглії на даний час не існує. Згідно даних деяких дослідницьких груп пухлино-асоційовані мікрогліальні клітини також сприяють неоваскуляризації і прогресуванню злоякісної гліоми, однак мають змішаний M1/M2 фенотип [8, 9]. Gabrusiewicz et al. [20] виявили функціональний профіль гліома-асоційованої мікроглії, близький до нейтрального (M0 фенотип).

У наших дослідженнях функціональний профіль гліома-асоційованої мікроглії, а також перитонеальних макрофагів характеризували за традиційними метаболічними (аргіназною активністю, синтезом нітритів та генерацією РФК) та фенотиповими (CD206) маркерами поляризації фагоцитів.

Спрямованість метаболізму аргініну є ключовим метаболічним маркером функціональної поляризації фагоцитів. Класично активовані фагоцити характеризуються підвищеним рівнем експресії ферменту NO-синтази, який метаболізує аргінін з утворенням реактивних форм азоту та цитруліну. Реактивні форми азоту чинять цитотоксичну дію на пухлинні клітини і є важливими сигнальними молекулами, що активують реакції протипухлинного імунітету. Альтернативно активовані фагоцити характеризуються надекспресією фермента аргінази, який гідролізує аргінін до орнітину та сечовини. Цей метаболічний шлях обмежує доступ аргініну для NO-синтази і залучений у посилення інвазії пухлинних клітин [21]. Згідно результатів наших досліджень, аргіназна активність мікрогліальних клітин на 24 добу після інокуляції пухлинних клітин була нижчою порівняно з показником інтактних тварин (рис. 2А). Водночас, нами було зареєстровано статистично вірогідне посилення NO-синтазної активності мікрогліальних клітин тварин з пухлинами у цій часовій точці (рис. 2В). У сукупності ці дані свідчать про прозапальне зміщення метаболізму мікроглії.

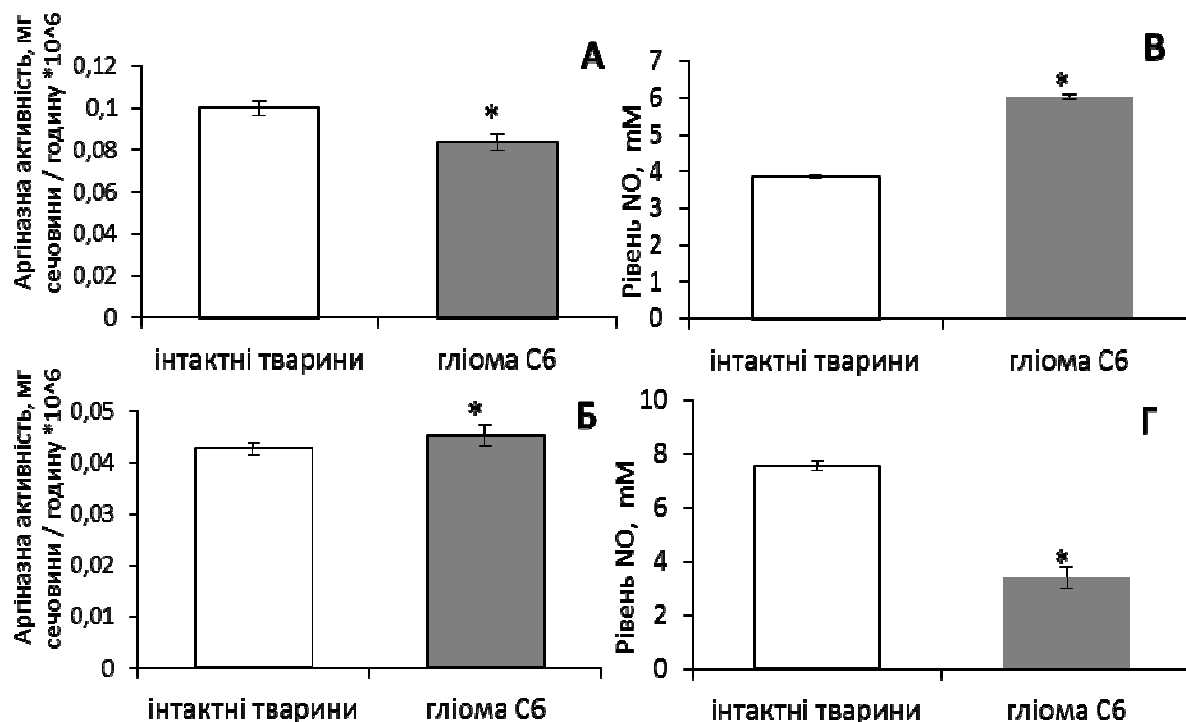


Рис. 2. Аргіназна активність мікроглії (А) та перитонеальних макрофагів (Б), продукція оксиду азоту мікроглії (В) та перитонеальними макрофагами (Г) щурів на 24 добу після перещеплення гліоми С6 (M±m, n=8 у всіх групах).

Примітка. * - p<0,05 відносно показників щурів інтактної групи.

Перитонеальні макрофаги тварин з пухлинами, котрі є складовою частиною MALT, мали іншу спрямованість метаболізму аргініну: аргіназну активність на рівні показника інтактних щурів (рис. 2Б) одночасно зі статистично вірогідно зниженою NO-синтазною активністю (рис. 2Г). Це вказує на протизапальну спрямованість метаболізму фагоцитів цієї локалізації.

Посилення киснезалежного метаболізму найчастіше асоціюють з класичним (прозапальним та протипухлинним) активаційним профілем фагоцитів [22]. У той же час генерація РФК є одним з ключових імуносупресивних механізмів дії мієлоїдних супресорних клітин. Збільшення генерації РФК в мієлоїдних супресорних клітинах є результатом підвищеної регуляції активності НАДФ-оксидази в цих клітинах. [23]. Підвищення синтезу РФК у популяції пухлино-асоційованих фагоцитів необхідне для їх перетворення на альтернативно-активовані клітини з пропухлинним метаболічним профілем [24]. У наших експериментах генерація РФК мікрогліальними клітинами була незначно підвищена у щурів з гліомою С6, порівняно з інтактними тваринами (рис. 3А). Показник киснезалежного метаболізму перитонеальних макрофагів щурів з пухлиною був статистично достовірно знижений порівняно з аналогічним показником контрольних інтактних тварин (рис. 3Б).

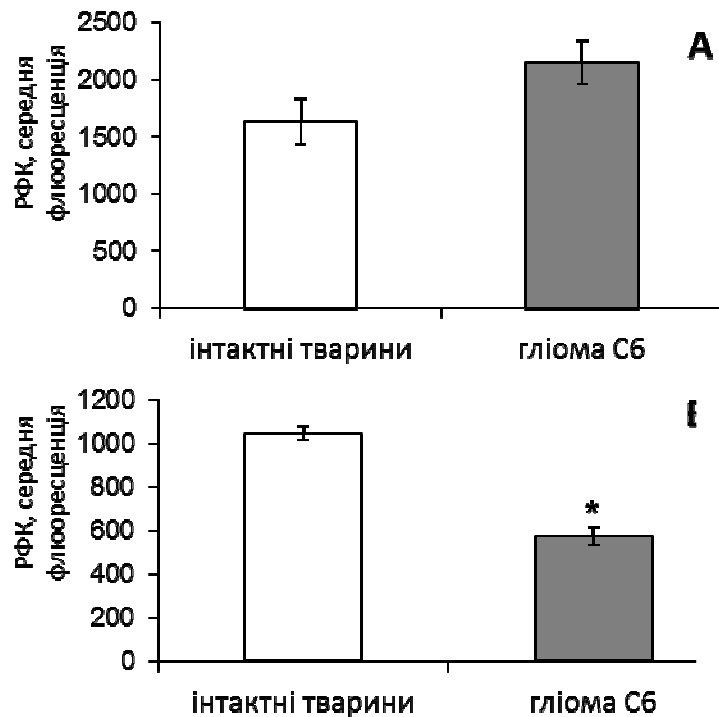


Рис. 3. Продукція реактивних форм кисню мікрогліальними клітинами (А) та перитонеальними макрофагами (Б) щурів на 24 добу після перещеплення гліоми С6 ($M \pm m$, $n=8$ у всіх групах).

Примітка. * - $p < 0,05$ відносно показників щурів інтактної групи.

Ендоцитарна функція – одна з основних функцій фагоцитів, яка реалізується із залученням різних рецепторів, залежно від ендоцитованого матеріалу. Відомо, що фагоцитоз, пов'язаний з мікробіцидною активністю макрофагів, посилюється в умовах їх класичної функціональної поляризації. У той час, як фагоцитоз, опосередкований рецепторами очищення, знижується у клітин з таким функціональним профілем. Посилення фагоцитозу із залученням скавенджер-рецепторів властиве репаративним процесам і альтернативній поляризації фагоцитів [25,26].

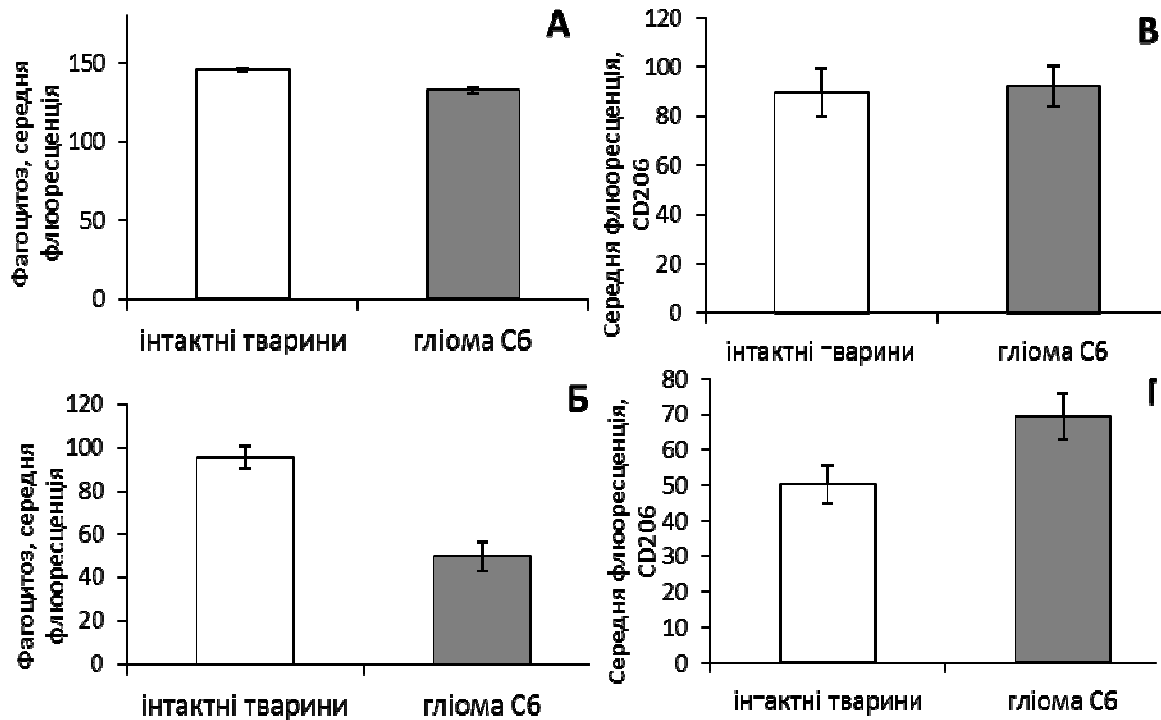


Рис. 4. Фагоцитоз мікроглії (А) та перитонеальними макрофагами (Б), експресія CD206 мікроглії (В) та перитонеальними макрофагами (Г) щурів на 24 добу після перещеплення гліоми С6 ($M \pm m$, $n=8$ у всіх групах).

Результати проведених нами досліджень показали відсутність статистично вірогідних змін інтенсивності фагоцитозу бактерій мікрогліальними клітинами щурів з гліомою С6 порівняно з інтактними тваринами (рис. 4А). Не виявлено статистично вірогідних змін і в рівні експресії цими клітинами рецептора манози CD206, котрий є одним з рецепторів очищення і розглядається як фенотиповий маркер альтернативної (пропухлинної) функціональної поляризації фагоцитів (рис. 4В) [27]. Натомість, фагоцитарна активність перитонеальних клітин по відношенню до *S. aureus* Cowan була майже вдвічі нижчою за аналогічний показник контрольних тварин (рис. 4Б). Рівень експресії цими клітинами маркера альтернативної поляризації CD206 майже у півтора раза перевищував аналогічний показник у інтактних тварин (рис. 4Г).

Висновки

1. Ріст гліоми С6 у щурів супроводжується змінами функціональних характеристик не лише резидентних макрофагів головного мозку – мікрогліальних клітин, а й резидентних макрофагів у межах MALT – перитонеальних клітин.
2. Перитонеальні макрофаги щурів з гліомою С6 характеризувалися типовим профілем альтернативно поляризованих фагоцитів із зсувом метаболізму аргініну у бік зниження NO-синтазної активності, зниженням оксидативного метаболізму і фагоцитозу бактеріальних клітин, одночасно з посиленням експресії рецептора очищення CD206.
3. Функціональні характеристики мікроглії щурів з гліомою С6 відрізнялися від таких, властивих як класичній, так і альтернативній поляризації фагоцитів: зсув метаболізму аргініну у бік посилення NO-синтазної активності з підвищенням рівня генерації РФК і відсутністю змін у показниках фагоцитарної активності. Імовірно, це обумовлено комплексним складом популяції гліома-асоційованої мікроглії, до якої можуть входити як типові пухлино-асоційовані макрофаги, так і мієлоїдні супресорні клітини, які мають різні фенотипово-функціональні властивості.

1. *Louveau A.* Revisiting the mechanisms of CNS immune privilege / Louveau A., Harris T.H., Kipnis J. // *Trends Immunol.* — 2015. — № 36 (10). — P. 569—577.
2. *Jessen N.A.* The glymphatic system: A beginner's guide. / Jessen N.A., Munk A.S.F., Lundgaard I. [et. al] // *Neurochem Res.* — 2015. — P. 1—17.
3. *Louveau A.* Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. / Louveau A., Smirnov I., Keyes T.J. [et.al] // *Nature.* — 2015. — № 523 (7560). — P. 337—341.
4. *Louveau A.* Understanding the functions and relationships of the glymphatic system and meningeal lymphatics / Louveau A., Plog B.A., Antila S. [et. al] // *J. Clin Invest.* — 2017. — №127 (9). — P. 3210—3219.
5. *Lohrberg M.* Co-localization of lymphoid aggregates and lymphatic networks in nose- (NALT) and lacrimal duct-associated lymphoid tissue (LDALT) of mice. / Lohrberg M., Pabst R., Wilting J. // *BMC Immunol.* — 2018. — № 19 (1). — P. 5.
6. *Sun B.L.* Lymphatic drainage system of the brain: A novel target for intervention of neurological diseases. / Sun B.L., Wang L.H., Yang T. [et. al] // *Prog Neurobiol.* — 2018. — № 163. — P. 118—143.
7. *Charles N.A.* The brain tumor microenvironment. / Charles N.A., Holland E.C., Gilbertson R. // *Glia.* — 2011. - № 8 (59). — P. 1169—1180.
8. *Szulzewsky F.* Glioma-associated microglia/macrophages display an expression profile different from M1 and M2 polarization and highly express Gpnmb and Spp1. / Szulzewsky F., Pelz A., Feng X. [et. al] // *PLoS One.* — 2015. — № 10 (2). — P. 116—644.
9. *Roesch S.* When Immune Cells Turn Bad-Tumor-Associated Microglia/Macrophages in Glioma. / Roesch S., Rapp C., Dettling S. [et. al] // *Int. J. Mol. Sci.* — 2018. — № 19 (2). pii: E436.
10. *Резніков О.* Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах / О. Резніков // *Вісник Національної академії наук України.* — 2001. — № 11. — С. 30—33.
11. *Zhang X.* The isolation and characterization of murine macrophages. / Zhang X., Goncalves R., Mosser DM // *Current Protocols in Immunology.* — 2008. — № 14. — P. 14.
12. *Reiner N. E.* Macrophages and Dendritic Cells. Methods and Protocols / Reiner, Neil E. // New York : Humana press, 2009. — P. 29—43.
13. *Reiner N. E.* Macrophages and Dendritic Cells. Methods and Protocols. / Reiner Neil E. // New York : Humana press, 2009. — P. 368.
14. *Реброва О. Ю.* Статистичний аналіз медичних даних. Застосування пакету прикладних програм STATISTICA / Реброва О.Ю. // *Медіф Сфера.* — 2002. — 305 с.
15. *Grobben B.* Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. / Grobben B., De Deyn P.P., Slegers H. // *Cell @Tissue Research.* — 2002. - № 310 (3). — P. 257—270.
16. *Souza T.K.F.* Image and motor behavior for monitoring tumor growth in C6 glioma model / Souza T.K.F., Nucci M.P., Mamani J.B. [et. al] // *PLoS One.* — 2018. — 13 (7): e0201453.
17. *Barth R.F.* Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas / Barth R.F., Kaur B. // *J. Neurooncol.* — 2009. — № 94 (3). — P. 299—312.
18. *Hendrickx D.A.E.* Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology / Hendrickx D.A.E., van Eden C.G., Schuurman K.G. // *J. Neuroimmunol.* — 2017. — № 309. — P. 12—22.
19. *Takeya M.* Role of tumor-associated macrophages in human malignancies: friend or foe? / Takeya M., Komohara Y. // *Pathol Int.* — 2016. — № 66 (9). — P. 491—505.
20. *Gabrusiewicz K.* Glioblastoma-infiltrated innate immune cells resemble M0 macrophage phenotype / *JCI insight.* — 2016. — № 1. — P. 1—32.
21. *Rath M.* Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. / Rath M., Müller I., Kropf P. // *Front Immunol.* — 2014. — № 5. — P. 532.
22. *Tan H.Y.* The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. / Tan H.Y., Wang N., Li S. [et. al] // *Oxid Med Cell Longev.* — 2016:2795090.
23. *Corzo C.A.* Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells / Corzo C.A., Cotter M.J., Cheng P. [et. al] // *J. Immunol.* — 2009. — №.182 (9). — P. 5693—5701.
24. *Zhang Y.* ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages. / Zhang Y., Choksi S., Chen K. [et. al] // *Cell Res.* — 2013. — № 23 (7). — P. 898—914.
25. *Frausto-Del-Río D.* Interferon gamma induces actin polymerization, Rac1 activation and down regulates phagocytosis in human monocytic cells / Frausto-Del-Río D., Soto-Cruz I., Garay-Canales C. [et. al] // *Cytokine.* — 2012. — № 57. — P. 158—168.

26. *Varin A.* Alternative activation of macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion / *Varin A., Mukhopadhyay S., Herbein G. [et. al]* // *Blood.* — 2010. — № 115. — P. 353—362.
27. *Enninga E.A.L.* CD206-positive myeloid cells bind galectin-9 and promote a tumor-supportive microenvironment / *Enninga E.A.L., Chatzopoulos K., Butterfield J.T. [et. al]* // *J. Pathol.* — 2018. — №245(4). — P. 468—477.

Y. V. Hurmach, M. P. Rudyk, V. M. Svyatetska, O. V. Skachkova, L. M. Skivka

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

National Cancer Institute, Kyiv, Ukraine

FUNCTIONAL PROFILE OF PHAGOCYTES FROM DIFFERENT LOCATIONS IN RAT WITH C6 GLIOMA

Glioma is one of the most common types of malignant brain tumor characterized by bad prognosis. The development of malignant glioma is accompanied by the microglial activation, the influx of circulating phagocytes and the massive infiltration of systemic macrophage-like cells as a result of a disrupted blood-brain barrier. It results in dramatic alterations of the metabolism of this complex microglia. Functional characteristics of these cells can reflect the pathological changes in the tumor microenvironment. Mucous membranes of the nose are an integral part of the lymphoid tissue associated with the mucous membranes (Mucosa Associated Lymphoid Tissue, MALT), whose structural components are closely interconnected. Resident phagocytes in mucosa associated lymphoid tissue are peritoneal macrophages. However, the data concerning metabolic state of such phagocyte cells in glioma-bearing animals are controversial and sparse. The research aims to study the functional profile of brain phagocytes and peritoneal macrophages in rats affected with C6 glioma. Phagocyte functional profile was characterized by arginase and NO-synthase activity (colorimetric assays) as well as ROS generation, phagocytosis and CD206 expression (flow cytometry). The research findings show that *in vivo* C6 glioma growth is associated with alterations in functional profile of both microglia and resident phagocytes in mucosa associated lymphoid tissue (MALT) – peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages in rats with C6 glioma is characterized by alternative functional profile. Microglia has its distinctive properties as compared with M1 and M2 phagocytes. It may be caused of complexity of glioma-associated mononuclear phagocyte population.

Key words: glioma, microglia, macrophages, polarization, functional profile

Рекомендує до друку

К. С. Волков

Надійшла 03.12.2018