

© Коллектив авторов, 2017  
УДК 616-092

Калиш С.В.<sup>1</sup>, Лямина С.В.<sup>1</sup>, Раецкая А.А.<sup>1</sup>, Малышев И.Ю.<sup>1,2</sup>

## Репрограммированные M1 макрофаги с ингибированными STAT3, STAT6 и SMAD3 увеличивают продолжительность жизни мышей с экспериментальной карциномой

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; 127473, г. Москва, Россия, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

<sup>2</sup> ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАН; 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

**Цель исследования.** Репрограммирование M1 фенотипа макрофагов с ингибированными факторами транскрипции M2 фенотипа STAT3, STAT6 и SMAD и оценка их влияния на развитие карциномы Эрлиха (КЭ) *in vitro* и *in vivo*. **Методика.** Рост опухоли инициировали *in vitro* путем добавления клеток КЭ в среду культивирования RPMI-1640 и *in vivo* путем внутривентральной инъекции клеток КЭ мышам. **Результаты.** Установлено, что M1-STAT3/6-SMAD3 макрофаги и *in vitro*, и *in vivo* оказывают выраженный противоопухолевый эффект, который превосходит антиопухолевые эффекты M1, M1-STAT3/6, M1-SMAD3 макрофагов и цисплатина. **Заключение.** M1 макрофаги с ингибированными STAT3, STAT6 и/или SMAD3 эффективно ограничивают рост опухоли. Полученные данные обосновывают разработку новой технологии противоопухолевой клеточной терапии.

**Ключевые слова:** макрофаги; карцинома Эрлиха; опухолевое микроокружение; репрограммирование; цитокины.

**Для цитирования:** Калиш С.В., Лямина С.В., Раецкая А.А., Малышев И.Ю. Репрограммированные M1 макрофаги с ингибированными STAT3, STAT6 и SMAD3 увеличивают продолжительность жизни мышей с экспериментальной карциномой. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(2): 4–9.  
DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.4-9

**Для корреспонденции:** Малышев Игорь Юрьевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, рук. лаб. стресса и адаптации ФГБУ НИИОПП РАН, e-mail: iymalyshev1@gmail.com

**Финансирование.** Статья написана при финансовой поддержке ведущих научных школ, Соглашение № 14.W02.16.9835-НИИ об условиях использования гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ НИИ-9835.2016.7.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.12.2016

Kalish S.V.<sup>1</sup>, Lyamina S.V.<sup>1</sup>, Raetskaya A.A.<sup>1</sup>, Malyshev I.Iy.<sup>1,2</sup>

## Reprogrammed M1 macrophages with inhibited STAT3, STAT6 and/or SMAD3 extends lifespan of mice with experimental carcinoma

<sup>1</sup> Moscow State University of Medicine and Dentistry n.a. A.I. Evdokimov; ul. Delegatskaya, d. 20, str. 1, Moscow, 127473, Russia

<sup>2</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology; Moscow, ul. Baltiyskaya, d. 8, 125315, Russia.

**Objective.** Reprogramming of M1 macrophage phenotype with inhibited M2 phenotype transcription factors, such as STAT3, STAT6 and SMAD and assess their impact on the development of Ehrlich carcinoma (EC) *in vitro* and *in vivo*. **Methods.** Tumor growth *in vitro* was initiated by addition of EC cells in RPMI-1640 culture medium and *in vivo* by intraperitoneal of EC cell injection into mice. **Results.** It was found that M1-STAT3/6-SMAD3 macrophages have a pronounced anti-tumor effect *in vitro*, and *in vivo*, which was greater than anti-tumor effects of M1, M1-STAT3/6, M1-SMAD3 macrophages and cisplatin. **Conclusion.** M1 macrophages with inhibited STAT3, STAT6 and/or SMAD3 effectively restrict tumor growth. The findings justify the development of new anti-tumor cell therapy technology.

**Keywords:** macrophages; Ehrlich carcinoma; tumor microenvironment; reprogramming; cytokines.

**For citation:** Kalish S.V., Lyamina S.V., Raetskaya A.A., Malyshev I.Yu. Reprogrammed M1 macrophages with inhibited STAT3, STAT6 and/or SMAD3 extends lifespan of mice with experimental carcinoma. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(2): 4–9. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.4-9

Received 05.12.2016

## Введение

Ключевую роль в нарушении иммунного ответа при канцерогенезе играют макрофаги [1, 2]. Концепция, выдвинутая Миллсом с коллегами [3, 4], поддерживаемая также другими учеными [5—7], постулирует, что в зависимости от микроокружения, макрофаги могут приобретать провоспалительный M1 или альтернативно противовоспалительный M2 фенотип. Макрофаги M1 способны содействовать уничтожению опухолевых клеток благодаря продукции оксида азота (NO) [8], провоспалительных цитокинов [9, 10], активации натуральных киллеров [11] и презентации опухолевых антигенов лимфоцитам [12]. Провоспалительные цитокины, действуя на M1 макрофаги, еще больше стимулируют продукцию провоспалительных цитокинов и еще больше сдвигают фенотип макрофагов в сторону M1 фенотипа. Однако многие опухоли продуцируют в большом количестве противовоспалительные цитокины, такие, как TGF- $\beta$ , IL-10 и IL-13 [13, 14], которые через факторы транскрипции M2 фенотипа STAT3, STAT6 и SMAD3 перепрограммируют противоопухолевый M1 фенотип в проопухолевый M2 [15, 16]. M2 фенотип макрофагов продуцирует незначительное количество противовоспалительных цитокинов, имеет низкую способность к представлению опухолевых антигенов [15—19], но продуцирует в большом количестве противовоспалительные цитокины, способствует подавлению нормального иммунного ответа и промотирует рост опухоли [1, 2].

Мы предположили, что блокирование факторов транскрипции STAT3, STAT6 и/или SMAD3 может предупредить проопухолевое репрограммирование M1 макрофагов и сохранить их антиопухолевые свойства. Цель исследования состояла в проверке этой гипотезы.

## Методика

**Экспериментальные животные.** Все экспериментальные работы проводились на мышах линии C57BL/6J и BALB/c в соответствии с руководством ВОЗ ([www.cioms.ch/publications/guidelines](http://www.cioms.ch/publications/guidelines)). Мыши были получены в питомнике «Андреевка» (<http://andreevka.msk.ru>). Протокол экспериментов был одобрен университетским Комитетом по этике.

**Реактивы.** Stat3 ингибитор (S3I204) (Axon Medchem, USA, cat# 2312), Stat6 ингибитор (As1517499) (Axon Medchem, USA, cat# 1992), IFN- $\gamma$  (Invitogen, USA, cat# PMC4034), LPS (Sigma-Aldrich, USA, cat# L3755), SMAD3 inhibitor (SIS3) (Calbiochem, USA, cat# 566405), FBS (Thermo Hyclone, UK, cat# SV30160.03), cisplatin (TEVA, Israel).

Опухолевый рост инициировали с помощью внутривенного введения клеток карциномы Эрлиха (КЭ). Клетки опухоли были получены в «Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина». Мышам вводили 250 тысяч опухолевых клеток, разведенных в 0,2 мл физиологического раствора. В кривой роста опухоли различают 3 периода: лаг-фаза (1-е — 5-е сут. после введения опухолевых клеток); лог-фаза (6-е — 10-е сут.); и терминальный период, (11-е — 15-е сут.), за которым следует гибель организма. Выбор модели КЭ определяется тем, что: 1 — КЭ воспроизводит многие аспекты канцерогенеза опухоли поджелудочной железы, рака яичников, раков толстой и прямой кишки и рака простатической железы [20—23], 2 — мышиную модель КЭ, обычно, используют для оценки противоопухолевых эффектов [24, 25] и 3 — КЭ легко воспроизводится экспериментально.

**Выделение макрофагов.** Нативные макрофаги (M0 фенотип) были выделены путем перитонеального смыва у мышей [26]. После выделения из перитонеальной жидкости макрофаги культивировали в питательной среде RPMI-1640, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку (FBS), 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>.

**In vitro репрограммирование макрофагов в M1; M1<sub>STAT3/6</sub>; M1<sub>SMAD3</sub> и M1<sub>STAT3/6-SMAD3</sub> фенотипы.** Макрофаги репрограммировали в M1 фенотип с помощью удаления сыворотки из среды (0% FBS) [4] и добавления IFN- $\gamma$  (20 нг/мл) [27]. Для репрограммирования M1<sub>STAT3/6</sub>; M1<sub>SMAD3</sub> и M1<sub>STAT3/6-SMAD3</sub> фенотипов, репрограммирующая смесь на M1 фенотип (0% FBS+IFN- $\gamma$  20 нг/мл) была дополнена: 1) ингибиторами STAT3 и STAT6 для получения M1<sub>STAT3/6</sub> фенотипа, 2) ингибитором SMAD3 для получения M1<sub>SMAD3</sub> фенотипа или 3) ингибиторами STAT3, STAT6 и SMAD3 для получения M1<sub>STAT3/6+SMAD3</sub> фенотипа.

В итоге были сформированы 10 групп макрофагов:

- Группа 1 (нестимулированный M0 фенотип): макрофаги, культивируемые в стандартных условиях в течение 36 ч в присутствии 10% FBS;
- Группа 2 (стимулированный M0 фенотип): макрофаги культивировали в течение 12 ч с 10% FBS, а затем стимулировали липополисахаридом (ЛПС) (500 нг/мл) в течение 24 ч;
- Группа 3 (нестимулированный M1 фенотип): макрофаги культивировали в течение 36 ч без FBS с добавлением IFN- $\gamma$ ;
- Группа 4 (стимулированный M1 фенотип): макрофаги культивировали в течение 12 ч без FBS с добавлением IFN- $\gamma$ , а затем стимулировали ЛПС (500 нг/мл) в течение 24 ч;

• Группа 5 (нестимулированный M1<sub>STAT3/6</sub> фенотип): макрофаги культивировали в течение 36 ч без FBS с добавлением IFN- $\gamma$  (20 нг/мл), ингибитора STAT3 (5 мкг/мл) и ингибитора STAT6 (10 мкг/мл);

• Группа 6 (стимулированный M1<sub>STAT3/6</sub> фенотип): макрофаги культивировали в течение 12 ч без FBS с добавлением IFN- $\gamma$  (20 нг/мл), ингибитора STAT3 (5 мкг/мл) и ингибитора STAT6 (10 мкг/мл), а затем стимулировали ЛПС (500 нг/мл) в течение 24 ч;

• Группа 7 (нестимулированный M1<sub>SMAD3</sub> фенотип): макрофаги культивировали в течение 36 ч без FBS с добавлением IFN- $\gamma$  (20 нг/мл) и ингибитора SMAD3 (2 нмоль/мл);

• Группа 8 (стимулированный M1<sub>SMAD3</sub> фенотип): макрофаги культивировали в течение 12 ч без FBS с добавлением IFN- $\gamma$  (20 нг/мл) и ингибитора SMAD3 (2 нмоль/мл), а затем стимулировали ЛПС (500 нг/мл) в течение 24 ч;

• Группа 9 (нестимулированный M1<sub>STAT3/6-SMAD3</sub> фенотип): макрофаги культивировали в течение 36 ч без FBS с добавлением IFN- $\gamma$  (20 нг/мл), ингибитора STAT3 (5 мкг/мл), ингибитора STAT6 (10 мкг/мл) и ингибитора SMAD3 (2 нмоль/мл);

• Группа 10 (стимулированный M1<sub>STAT3/6-SMAD3</sub> фенотип): макрофаги культивировали в течение 36 ч без FBS с добавлением IFN- $\gamma$  (20 нг/мл), ингибитора STAT3 (5 мкг/мл), ингибитора STAT6 (10 мкг/мл) и ингибитора SMAD3 (2 нмоль/мл), а затем стимулировали ЛПС в концентрации 500 нг/мл в течение 24 ч.

*Кокультивирование макрофагов с клетками КЭ.* После репрограммирования макрофагов к активированным M0 (Группы 2), M1 (Группа 4), M1<sub>STAT3/6</sub> (Группа 6), M1<sub>SMAD3</sub> (Группа 8), and M1<sub>STAT3/6-SMAD3</sub> (Группа 10) добавляли 25 000 клеток КЭ, в соотношении числа макрофагов к числу опухолевых клеток КЭ: 5:1, 10:1, 20:1, 40:1 и 80:1. Противоопухолевый препарат цисплатин [28, 29] использовали в концентрации 10, 20 и 40 мкг/мл в качестве препарата сравнения.

После совместного кокультивирования макрофаги и опухолевые клетки были разделены по методу, описанному ранее [19]. После совместного кокультивирования в течение 24 ч опухолевые клетки подсчитывали и сравнивали с количеством опухолевых клеток, которые культивировали без макрофагов.

Живые и мертвые макрофаги и клетки КЭ были подсчитаны с помощью трипанового синего ([http://www.hyclone.com/pdf/procedure\\_assay.pdf](http://www.hyclone.com/pdf/procedure_assay.pdf)).

*Инъекция макрофагов в брюшную полость.* Макрофаги групп 2, 4 и 6 были удалены с дна лунки культурального планшета путем инкубирования при

37°C в присутствии PBS, содержащий 5 мМ ЭДТА [5]. Концентрация макрофагов была доведена до  $8 \times 10^6$  клеток в 0,2 мл PBS. Далее мышам внутрибрюшинно вводили макрофаги на 1-е, 3-е, 5-е и 7-е сут. после инъекции клеток КЭ. В итоге было сформировано 6 групп животных:

• Группа 1: «Опухоль» — мыши, которым ввели клетки КЭ (n = 16);

• Группа 2: «Опухоль + PBS» — мыши, которым вводили клетки КЭ и PBS (n = 16);

• Группа 3: «Опухоль + M0-Мак» — мыши, которым вводили клетки КЭ и стимулированные нерепрограммированные макрофаги (n = 16);

• Группа 4: «Опухоль + M1-Мак» — мыши, которым вводили клетки КЭ и стимулированные M1 макрофаги (n = 16);

• Группа 5: «Опухоль + M1<sub>STAT3/6-SMAD3</sub>-Мак» — мыши, которым вводили клетки КЭ и стимулированные ЛПС M1<sub>STAT3/6-SMAD3</sub> макрофаги (n = 16);

• Группа 6: «Опухоль + цисплатин» — мыши, которым вводили клетки КЭ и 0,05 мл цисплатина (0,5 мг/мл) в качестве противоопухолевого препарата [28—30], (n = 14).

Эффект введения макрофагов и цисплатина оценивали по изменению продолжительности жизни мышей по сравнению с группой «Опухоль».

Статистический анализ проводили с использованием критериев Стъдента—Ньюмана—Келса. Данные представлены в виде среднего значения (M), учитывающего стандартную ошибку среднего значения ( $\pm$  SEM). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

1. M1<sub>STAT3/6-SMAD3</sub> макрофаги оказывают более выраженный антиопухолевый эффект *in vitro*, по сравнению с M1<sub>STAT3/6</sub> и M1<sub>SMAD3</sub> макрофагами

На рис. 1 видно, что в процессе 24-часового культивирования в среде, содержащей 10% FBS, количество опухолевых клеток увеличилось в 7 раз: с 25 000 до  $174\,000 \pm 7\,000$  клеток. Культивирование опухолевых клеток в репрограммирующих средах, без макрофагов, не влияло на рост опухолевых клеток.

Добавление нерепрограммированных макрофагов (M0) к клеткам КЭ при всех соотношениях практически не влияло на деление опухолевых клеток. Сильное дозозависимое антиопухолевое действие оказало добавление M1<sub>STAT3/6</sub>, M1<sub>SMAD3</sub> или M1<sub>STAT3/6-SMAD3</sub> макрофагов. При этом M1<sub>STAT3/6-SMAD3</sub> фенотип макрофагов оказал наиболее выраженное противоопухолевое действие.

2. *M1-STAT3/6-SMAD3* макрофаги *in vivo* оказали более выраженный антиопухолевый эффект по сравнению с эффектом цисплатина и *M1* макрофагами.

Для того, чтобы оценить, воспроизводится ли противоопухолевый эффект репрограммированных макрофагов *in vitro*, в условиях *in vivo*, было оценено действие репрограммированных *M1-* и *M1-STAT3/6-SMAD3* макрофагов на продолжительность жизни мышей с введенными клетками КЭ. *M1-STAT3/6-SMAD3* фенотип был выбран, как фено-

тип с наиболее выраженным противоопухолевым эффектом, по сравнению с другими фенотипами (рис. 1).

На рис. 2 показано влияние макрофагов и цисплатина на продолжительность жизни мышей с КЭ. Продолжительность жизни мышей группы «Опухоль», которым вводили клетки КЭ, составила  $13,4 \pm 0,4$  сут.; продолжительность жизни мышей группы «Опухоль + *M1-Мак*» составила  $22,8 \pm 0,8$  сут. ( $p < 0.01$ ), что на 70% больше, чем в группе «Опухоль». Продолжительность жизни мы-

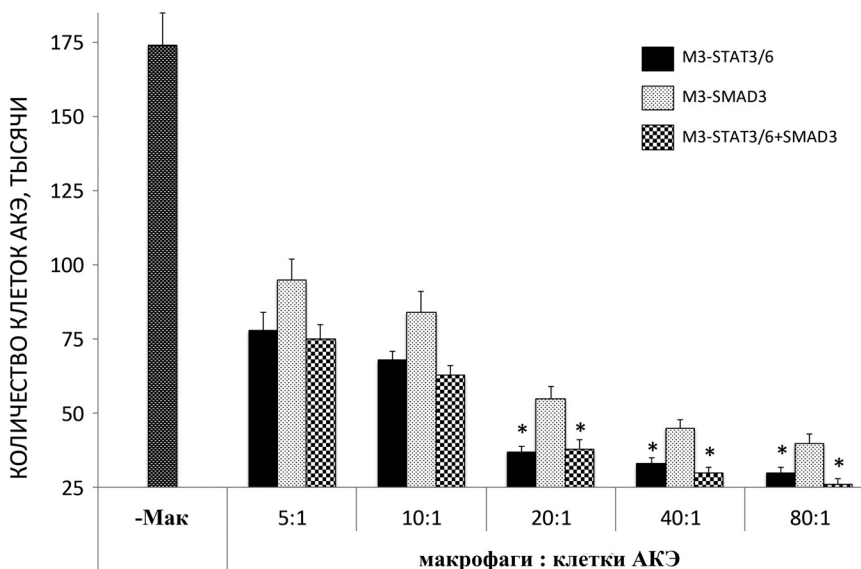


Рис. 1. Эффект *M1-SMAD3*, *M1-STAT3/6-SMAD3* и *M1-STAT3/6* фенотипов макрофагов на рост опухолевых клеток КЭ. Представлены данные 5 повторов. -Мак – без макрофагов. Значимые отличия по сравнению с *M1-SMAD3* макрофагами: \*  $p < 0,05$ .

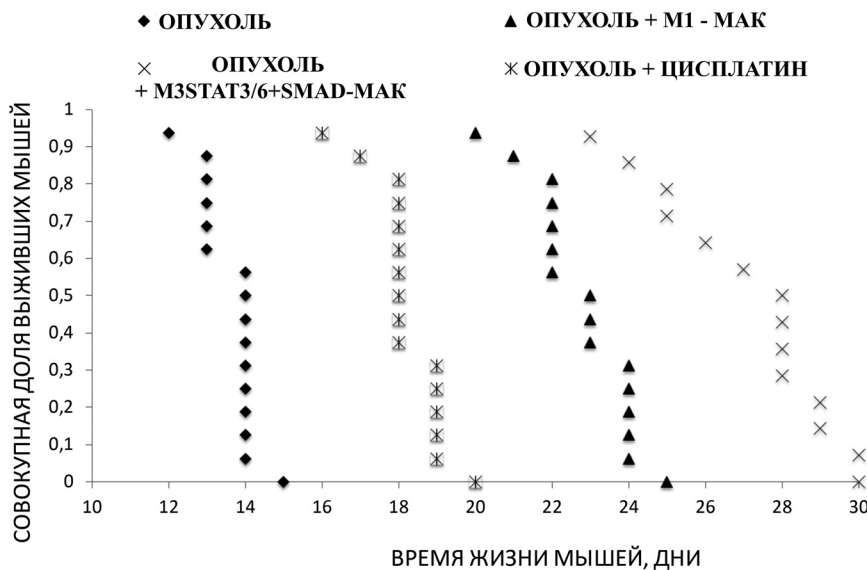


Рис. 2. Эффект введения *M1* и *M1-STAT3/6-SMAD3* макрофагов и цисплатина на продолжительность жизни мышей с КЭ (по анализу выживаемости по Каплану–Мейеру).

шей группы «Опухоль + M1<sub>STAT3/6-SMAD</sub>-Мак» составила  $27,1 \pm 0,5$  сут. ( $p < 0,01$ ), что на 102% больше, чем в группе «Опухоль». Противоопухолевый эффект M1<sub>STAT3/6-SMAD</sub> фенотипа макрофагов оказался значительно более выраженным, по сравнению с эффектами дисплатина.

Добавление PBS в группе «Опухоль + PBS» или M0 фенотипа макрофагов в группе «Опухоль + M0-Мак» не оказало существенного влияния на продолжительность жизни мышей.

Таким образом, инъекции M1<sub>STAT3/6-SMAD3</sub> макрофагов значительно повысило устойчивость мышей к развитию КЭ.

Результаты проведенного исследования подтвердили нашу гипотезу о том, что опухолевый рост может быть эффективно ограничен с помощью M1 макрофагов с ингибированными факторами транскрипции: STAT3, STAT6 и/или SMAD3. Важной особенностью M1 макрофагов является то, что воспалительные цитокины, продуцируемые этим фенотипом, еще больше усиливают продукцию воспалительных цитокинов и еще больше сдвигают фенотип макрофагов в сторону M1 фенотипа. В результате образуется положительная обратная связь, необходимая для быстрого программирования противомикробного и противоопухолевого действия M1 макрофагов. Точно так же противовоспалительные цитокины IL-10 или TGF- $\beta$ , продуцируемые M2 фенотипом, еще больше усиливают продукцию противовоспалительных цитокинов и еще больше сдвигают фенотип макрофагов в сторону M2 фенотипа. В результате образуется положительная обратная связь, необходимая для быстрого программирования антипаразитарных, противовоспалительных и ремоделирующих свойств этого фенотипа [31, 32].

В проопухолевой среде M1 фенотип репрограммируется в M2 фенотип [15], который усиливает экспрессию противовоспалительных цитокинов. В отличие от M1 макрофагов, M1 макрофаги с ингибированными факторами транскрипции M2 фенотипа STAT3, STAT6 и/или SMAD3, вероятно, не снижают продукцию провоспалительных цитокинов и не увеличивают продукцию противовоспалительных цитокинов, и, таким образом, сохраняют антиопухолевые свойства в проопухолевой среде. Это предположение требует экспериментальной проверки.

Макрофаги уже давно привлекают внимание в качестве возможных мишеней для антиопухолевой терапии. Так, например, антиопухолевую активность макрофагов пытались усилить путем стимуляции Toll-like рецепторов и ингибирования рецепторов к TGF- $\beta$  [33]; культивирования в среде без сыворотки [5]; усиления активности генов, отвечающих за экспрессию IFN- $\gamma$  и IL-12 [34]; связывания проопухолевых

факторов или их рецепторов на макрофагах [35, 36] и т.д. По существу, все описанные подходы направлены на формирование противоопухолевого M1 фенотипа, но опухоль перепрограммирует M1 фенотип в M2 [15], и это снижает эффективность M1 макрофагов.

По сравнению с M1 макрофагами, M1 макрофаги с ингибированными факторами транскрипции STAT3, STAT6 и/или SMAD3 оказывали более выраженное антиопухолевое действие *in vitro* и способствовали увеличению продолжительности жизни экспериментальных мышей с КЭ. Более выраженный противоопухолевый эффект этих макрофагов по сравнению с M1 может быть связан с большей провоспалительной активностью M1 макрофагов с ингибированными STAT3, STAT6 и/или SMAD3 и способностью сохранять анитиопухолевые свойства в проопухолевой среде.

Выявленные в работе факты, что M1 макрофаги с ингибированными факторами транскрипции STAT3, STAT6 и/или SMAD3 существенно подавляют рост опухоли, делают перспективной разработку клинической версии биотехнологии ограничения роста опухоли путем репрограммирования макрофагов с помощью блокирования факторов транскрипции M2 фенотипа.

## References

1. Condeelis J., Pollard J.W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 2006; 124: 263-266.
2. Sica A., Schioppa T., Mantovani A., Allavena P. Tumor-associated macrophages are a distinct M2 polarized population promoting tumor progression: potential targets of anti-cancer therapy. *European Journal of Cancer*. 2006; 42: 717-27.
3. Mills C.D., Thomas A.C., Lenz L.L., Munder M. Macrophage: SHIP of Immunity. *Frontiers in Immunology* 2014; 5: 620.
4. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *The Journal of Immunology*. 2000; 164(12): 6166-73.
5. Rey-Giraud F., Hafner M., Ries C.H. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One*. 2012; 7(8): e42656.
6. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*. 2000; 55: 953-64.
7. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*. 2002; 23: 549-55.
8. Zeini M., Traves P.G., Lopez-Fontal R., Pantoja C., Matheu A., Serrano M. et al. Specific contribution of p19 (ARF) to nitric oxide-dependent apoptosis. *The Journal of Immunology*. 2006; 177: 3327-36.
9. Tsung K., Dolan J.P., Tsung Y.L., Norton J.A. Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced T cell-dependent tumor rejection. *Cancer Research*. 2002; 62: 5069-75.

10. Ibe S, Qin Z, Schuler T, Preiss S., Blankenstein T. Tumor rejection by disturbing tumor stroma cell interactions. *The Journal of Experimental Medicine*. 2001; 194: 1549-59.
11. Sharma M. Chemokines and their receptors: orchestrating a fine balance between health and disease. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2009; 30: 1-22.
12. Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoeediting. *Immunity*. 2004; 21: 137-48.
13. Khong H.T., Restifo N.P. Natural selection of tumor variants in the generation of «tumor escape» phenotypes. *Nature Immunology*. 2002; 3: 999-1005.
14. Zou W. Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2006; 6: 295-307.
15. Stout R.D., Watkins S.K., Suttles J. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. 2009; 86(5): 1105-9.
16. Malyshev I., Malyshev Yu. Current concept and update of the macrophage plasticity concept: intracellular mechanisms of reprogramming and M3 macrophage «switch» phenotype. *BioMed Research International*. 2015; 2015: 341308.
17. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumor-induced dendritic-cell defects. *Nature Reviews Immunology*. 2004; 4: 941-52.
18. Kono Y., Kawakami S., Higuchi Y., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M. Antitumor effect of nuclear factor- $\kappa$ B decoy transfer by mannose-modified bubble lipoplex into macrophages in mouse malignant ascites. *Cancer Science*. 2014; 105(8): 1049-55.
19. Kalish S.V., Lyamina S.V., Usanova E.A., Manukhina E.B., Larionov N.P., Malyshev I.Yu. Macrophages reprogrammed in vitro towards the M1 phenotype and activated with LPS extend lifespan of mice with ehrlich ascites carcinoma. *Medical Science Monitor Basic Research*. 2015; 21: 226-34.
20. Cavazzoni E., Bugiantella W., Graziosi L., Franceschini M.S., Donini A. Malignant ascites: pathophysiology and treatment. *International Journal of Clinical Oncology*. 2013; 18: 1-9.
21. Becker G., Galandi D., Blum H.E. Malignant ascites: systematic review and guideline for treatment. *European Journal of Cancer*. 2006; 42: 589-97.
22. Ahmed N., Stenvers K.L. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Frontiers in Oncology*. 2013; 3: 256.
22. Saif M.W., Siddiqui I.A., Sohail M.A. Management of ascites due to gastrointestinal malignancy. *Annals of Saudi Medicine*. 2009; 29: 369-77.
24. Kono Y., Kawakami S., Higuchi Y., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M. Antitumor effect of nuclear factor- $\kappa$ B decoy transfer by mannose-modified bubble lipoplex into macrophages in mouse malignant ascites. *Cancer Science*. 2014; 105(8): 1049-55.
25. Ray T., Chakrabarti M.K., Pal A. Hemagglutinin protease secreted by *V. cholerae* induced apoptosis in breast cancer cells by ROS mediated intrinsic pathway and regresses tumor growth in mice model. *Apoptosis*. 2016; 21(2): 143-54.
26. Zhang X., Goncalves R., Mosser D.M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Current Protocols in Immunology*. 2008; Chapter 14: Unit 14.1.
27. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience*. 2008; 1(13): 453-61.
28. Roco A., Сауьн J., Contreras S., Stojanova J., Quinones L. Can pharmacogenetics explain efficacy and safety of cisplatin pharmacotherapy? *Frontiers in Genetics*. 2014; 5: 391.
29. Chen T.C., Cho H.Y., Wang W., Wetzel S.J., Singh A., Nguyen J. et al. Chemotherapeutic effect of a novel temozolomide analog on nasopharyngeal carcinoma in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Science*. 2015; 22(1): 71.
30. Noël W., Raes G., Hassanzadeh Ghassabeh G., De Baetselier P., Beschin A. Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends in Parasitology*. 2004; 20(3): 126-33.
31. Mantovani A., Sica A., Locati A. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Europ. The Journal of Immunology*. 2006; 37(1): 14-6.
32. Ramanathan S., Jagannathan N. Tumor associated macrophage: the phenotypes, traits and functions. *Iranian Journal of Cancer Prevention*. 2014; 7(1): 1-8.
33. Peng J., Tsang J.Y., Li D., Niu N., Ho D.H., Lau K.F. et al. Inhibition of TGF- $\beta$  signaling in combination with TLR7 ligation re-programs a tumoricidal phenotype in tumor-associated macrophages. *Cancer Letters*. 2013; 331(2): 239-49.
34. Satoh T., Saika T., Ebara S., Kusaka N., Timme T.L., Yang G. et al. Macrophages transduced with an adenoviral vector expressing IL-12 suppress tumor growth and metastasis in a preclinical metastatic prostate cancer model. *Cancer Research*. 2003; 63(22): 7853-60.
35. Baay M., Brouwer A., Pauwels P., Peeters M. and Lardon F. Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. *Clinical and Developmental Immunology*. 2011: 565187.
36. Aharinejad S., Abraham D., Paulus P., Abri H., Hofmann M., Grossschmidt K. Colony-stimulating factor-1 antisense treatment suppresses growth of human tumor xenografts in mice. *Cancer Research*. 2002; 62: 5317-24.

### Сведения об авторах:

Калиш Сергей Валерьевич, ст. лаборант каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, e-mail: anahoretas@mail.ru

Лямина Светлана Владимировна, доктор мед. наук, проф. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, e-mail: svlvs@mail.ru

Раецкая Анастасия Александровна, лаборант каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, e-mail: mohnush@mail.ru

Мальшев Игорь Юрьевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, руководитель лаб. стресса и адаптации ФГБУ НИИОПП РАН, e-mail: iymalyshev1@gmail.com