

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092

Калиш С.В.¹, Лямина С.В.¹, Раецкая А.А.¹, Буданова О.П.², Малышев И.Ю.^{1,2}

Программирование противоопухолевого иммунного ответа *in vitro* и его использование для остановки пролиферации опухолевых клеток и увеличения продолжительности жизни мышей с карциномой *in vivo*

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный медицинский стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, 127473, г. Москва, Россия, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

² ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАН, 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Цель — представить доказательства правомерности гипотезы, что комбинированный пул репрограммированных *in vitro* макрофагов и лимфоцитов будет эффективно ограничивать пролиферацию опухолевых клеток *in vitro*, а при введении в организм будет существенно ограничивать развитие опухоли *in vivo*. **Методика.** Размножение опухолевых клеток инициировали *in vitro* путем добавления клеток карциномы Эрлиха (КЭ) в среду культивирования RPMI-1640. Развитие асцитной опухоли *in vivo* воспроизводили путем внутрибрюшной инъекции клеток КЭ мышам. **Результаты.** Установлено, что M3-STAT3/6-SMAD3 макрофаги вместе с антиген-репрограммированными лимфоцитами оказывают выраженный противоопухолевый эффект и *in vitro*, и *in vivo*, который был существенно выше противоопухолевого эффекта цисплатина. **Заключение.** Факты, свидетельствующие, что M3 макрофаги в сочетании с *in vitro* антиген-репрограммированными лимфоцитами значительно подавляют рост опухоли *in vivo*, делают перспективным разработку клинической версии биотехнологии ограничения роста опухоли путем предварительного программирования противоопухолевого иммунного ответа «в пробирке».

Ключевые слова: макрофаги, лимфоциты, карцинома, репрограммирование, иммунный ответ.

Для цитирования: Калиш С.В., Лямина С.В., Раецкая А.А., Малышев И.Ю. Программирование противоопухолевого иммунного ответа *in vitro* и его использование для остановки пролиферации опухолевых клеток и увеличения продолжительности жизни мышей с карциномой *in vivo*. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 67–73. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8525

Для корреспонденции: Малышев Игорь Юрьевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, руководитель лаб. стресса и адаптации ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАН, e-mail: iymalyshev1@gmail.com

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.05.2017

Kalish S.V.¹, Lyamina S.V.¹, Raetskaya A.A.¹, Budanova O.P.², Malyshev I.Yu.^{1,2}

Programming the anti-tumor immune response *in vitro* and its application to stop the growth of tumor cells and prolonging the lifespan of mice with carcinoma *in vivo*

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

² Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8, ul. Baltiyskaya, Moscow, 125315, Russia

Aim. To test a hypothesis that a combined pool of *in vitro* reprogrammed macrophages and lymphocytes will effectively limit growth of tumor cells *in vitro*, and injections of these cells into the body will considerably limit development of a tumor *in vivo*. **Methods.** Tumor growth was initiated *in vitro* by addition of Ehrlich carcinoma (EC) cells to the RPMI-1640 cell culture medium and *in vivo* by intraperitoneal injection of EC cells into mice. **Results.** M3-STAT3/6-SMAD3 macrophages in combination with antigen-reprogrammed lymphocytes exerted a pronounced antitumor effect both *in vitro* and *in vivo*, which was superior to the effect of cisplatin. **Conclusion.** M3 macrophages in combination with *in vitro* antigen-reprogrammed lymphocytes significantly inhibited the tumor growth *in vivo*. This fact justifies development of a clinical version of the tumor

growth restricting biotechnology using pre-programming of the antitumor immune response *in vitro*.

Keywords: macrophages; lymphocytes; carcinoma; reprogramming, immune response.

For citation: Kalish S.V., Lyamina S.V., Raetskaya A.A., Budanova O.P., Malyshev I.Yu. Programming the anti-tumor immune response *in vitro* and its application to stop the growth of tumor cells and prolonging the lifespan of mice with carcinoma *in vivo* *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(4): 67–73. (in Russian). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8525

For correspondence: Igor Yu. Malyshev, Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Pathological Physiology of the Moscow State University of Medicine and Dentistry n.a. A.I. Evdokimov; 20, str. 1, ul. Delegatskaya, d., Moscow, 127473, Russia, Head of stress and adaptation laboratory of the Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8, ul. Baltiyskaya, Moscow, 125315, Russian Federation, e-mail: iymalyshev1@gmail.com

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study was conducted with the Governmental financial support represented by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Agreement dated May 5, 2016, № 14.W02.16.9835-НЦЦ)

Information about authors:

Malyshev I.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-2381-9612>

Received 29.05.2017

Введение

Важную роль в нарушении иммунного ответа при развитии опухоли играют макрофаги [1, 2]. В зависимости от микроокружения, макрофаги могут приобретать или провоспалительный M1 фенотип, или противовоспалительный M2 [3–7]. M1 макрофаги содействуют уничтожению опухолевых клеток благодаря продукции оксида азота (NO) [8], провоспалительных цитокинов [9, 10], активации натуральных киллеров [11] и презентации опухолевых антигенов лимфоцитам [12]. Однако многие опухоли продуцируют много противовоспалительных цитокинов, таких, как TGF- β , IL-10 и IL-13 [13, 14], которые через активацию факторов транскрипции M2 фенотипа STAT3, STAT6 и SMAD3 перепрограммируют антиопухолевые M1 макрофаги в проопухолевые M2 [15, 16]. При этом M2 фенотип макрофагов продуцирует большое количество противовоспалительных цитокинов, плохо представляют опухолевые антигены [17–19] и благодаря этому промотируют рост опухоли [1, 2].

Ранее мы показали, что блокирование STAT3, STAT6 и SMAD3 предупреждает проопухолевое репрограммирование M1 макрофагов. M1 макрофаги с заблокированными STAT3, STAT6 и SMAD3, в отличие от исходных M1 макрофагов, в ответ на действие проопухолевых противовоспалительных цитокинов отвечали усилением продукции антиопухолевых провоспалительных цитокинов и благодаря этому сохраняли свои антиопухолевые свойства и замедляли деление опухолевых клеток *in vitro* и увеличивали продолжительность жизни мышей с карциномой Эрлиха (КЭ) [20]. Мы обозначили такой фенотип макрофагов как фенотип переключения, или как M3 фенотип [16, 20].

В иммунной системе за эффективное уничтожение опухолевых клеток отвечают антиген-специфические лимфоциты. Макрофаги могут выполнять функции антиген-презентирующих клеток и способствовать формированию антиген-специфических T и Th1 лимфоцитов. Однако в условиях *in vivo* опухоль нарушает процесс антиген-презентации и формирование антиген-специфических цитотоксических лимфоцитов из T лимфоцитов и Th1 лимфоцитов из Th0 лимфоцитов [21].

Учитывая эти данные, мы предположили, что проведение презентации антигенов опухоли для лимфоцитов с помощью M3 макрофагов *in vitro*, в отсутствие опухолевых клеток, может привести к противоопухолевому программированию лимфоцитов и получению пула иммунных клеток (макрофагов и лимфоцитов) с выраженными противоопухолевыми свойствами. Можно ожидать, что комбинированный пул репрограммированных макрофагов и лимфоцитов будет эффективно ограничивать рост опухолевых клеток *in vitro* и при введении в организм будет существенно ограничивать развитие опухоли *in vivo*. Цель исследования состояла в проверке этой гипотезы.

Методика

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

Реактивы. Stat3 ингибитор (S31204) (Axon Medchem, USA, cat# 2312), Stat6 ингибитор

(As1517499) (Axon Medchem, USA, cat# 1992), IFN- (Invitogen, USA, cat# PMC4034), LPS (Sigma-Aldrich, USA, cat# L3755), SMAD3 inhibitor (SIS3) (Calbiochem, USA, cat# 566405), FBS (Thermo Hyclone, UK, cat# SV30160.03), и лекарственная форма cisplatin (TEVA, Israel).

Моделирование карциномы Эрлиха. Опухолевый рост инициировали с помощью внутрибрюшинного 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.;
- терминальный период, 11-е — 15-е сут., за которыми следует гибель организма.

Выбор модели КЭ определяется тем, что:

1. КЭ воспроизводит многие аспекты канцерогенеза опухоли поджелудочной железы, рака яичников, рака толстой и прямой кишки и рака простатической железы [22, 23, 25].

2. Мышиную модель КЭ обычно используют для оценки противоопухолевых эффектов [26, 27].

3. КЭ легко воспроизводится экспериментально.

Получение культуры опухолевых клеток. Мышей через 7—9 сут. после введения клеток КЭ, декапитировали под эфирным наркозом, отбирали асцитическую жидкость в объеме 3—4,5 мл. Асцитическую жидкость центрифугировали 4 мин при 1000 об/мин, при 4°C. Супернатант сливали, а к осадку добавляли среду RPMI-1640 без сыворотки и ресуспензировали. Затем отбирали 10 мкл в пробирки, добавляли 90 мкл RPMI-1640 (разведение в 10 раз) и производили подсчет клеток в камере Горяева. После этого доводили концентрацию клеток из асцитической жидкости до 100 тыс. кл. в 20 мкл.

Выделение макрофагов. Нативные макрофаги (M0 фенотип) были выделены у мышей путем перитонеального смыва [28]. 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% CO₂.

In vitro репрограммирование макрофагов на M3-STAT3/6-SMAD3 фенотип. Были получены макрофаги с M0 фенотипом и с M3-STAT3/6-SMAD3 фенотипом. Для получения M0 фенотипа макрофаги культивировали в течение 12 ч с 10% FBS, а затем стимулировали липополисахаридом (ЛПС) (500 нг/мл) в течение 24 ч. Для получения M3-STAT3/6-SMAD3 фенотипа макрофаги культивиро-

вали в течение 12 ч без FBS [4] с добавлением IFN-γ (20 нг/мл) [29], ингибитора STAT3 (5 мкг/мл), ингибитора STAT6 (10 мкг/мл) и ингибитора SMAD3 (2 нмоль/мл) [20], а затем стимулировали ЛПС в концентрации 500 нг/мл еще в течение 24 ч.

Лизис опухолевых клеток для получения опухолевых антигенов. Концентрацию клеток КЭ в культуре, полученной по методу, описанному выше в разделе «Получение культуры опухолевых клеток» доводили до 500 тыс. кл. в 20 мкл. Полученную суспензию подвергали трем циклам заморозки и разморозки [30], где каждый цикл состоял из одночасового замораживания на -80°C и 10-минутного размораживания при 37°C. В результате все структуры клеток разрушались и в полученную взвесь попадали поверхностно-клеточные и внутриклеточные опухолевые антигены.

Выделение лимфоцит-содержащей клеточной фракции из селезенки. Выделение лимфоцит-содержащей клеточной фракции из селезенки проводили по методу, описанному Goldberg S [31]. Кратко: у животных выделяли селезенку и размещали в фарфоровый покрытый стеклянкой глазурью гомогенизатор. Затем к 1 селезенке в гомогенизаторе добавляли 2 мл 10-ммолярного раствора ЭДТА и гомогенизировали в течение 2 мин при 4°C. Полученную суспензию фильтровали через капроновый фильтр (USA, Falcon, cat 352360, 100 нм) и после этого фильтрат центрифугировали в течение 4 мин, при 1000 об/мин, при 4°C. Надосадочную жидкость сливали, добавляли повторно 10 ммолярный раствор ЭДТА 4°C, объемом равным или немного большим объема клеточного осадка и вновь ресуспензировали. Полученную суспензию помещали на шейкер на 5 мин при 4°C. После этого суспензию центрифугировали 4 мин, при 1000 об/мин, при 4°C и оценивали степень лизиса эритроцитов по цвету осадка. Если осадок был красный, вновь добавляли 10 ммолярный раствор ЭДТА 4°C, объемом равным или немного большим клеточного осадка. Смесь ресуспензировали и полученную суспензию помещали на шейкер на 5 мин при 4°C и затем центрифугировали 4 мин, при 1000 об/мин, при 4°C. Если осадок не был красным — супернатант сливали, заменяли на RPMI-1640, объемом в 2 раза большим объема осадка, и ресуспензировали. Затем производили подсчет клеток и доводили концентрацию до 500 тыс. клеток на 10 мкл. В полученной из селезенки клеточной фракции лимфоциты составляют подавляющее большинство [32].

Культирование макрофагов с лизатом опухолевых клеток, с лимфоцит-содержащей клеточной фракцией из селезенки и с клетками КЭ in vitro. Для удобства здесь мы обозначили макрофаги буквой «М», лизат опухолевых клеток, содержащий

опухолевые антигены — «А» и лимфоцит-содержащую клеточную фракцию селезенки — «Л». В условиях *in vitro* были сформированы 4 группы:

1. «М0-А-Л» — группа, в которой для антигенпрезентации использовали М0 макрофаги;
2. «М3-STAT3/6-SMAD3-А-Л» — группа, в которой для антигенпрезентации использовали М3-STAT3/6-SMAD3 макрофаги;
3. «А-Л» — группа, в которой кокультивировали лизат опухолевых клеток с лимфоцит-содержащей клеточной фракцией селезенки без макрофагов;
4. «Л» — группа, в которой культивировали только лимфоцит-содержащую клеточную фракцию селезенки без макрофагов и без лизата опухолевых клеток.

В этих группах количество макрофагов составляло 500 тыс. клеток, количество лизата опухолевых клеток — 5 мкл, и количество клеток лимфоцит-содержащей клеточной фракции селезенки — 500 тыс. клеток.

К каждой из групп добавляли 25 000 клеток КЭ и кокультивировали в течение 24 ч. После этого макрофаги и опухолевые клетки были разделены по методу, описанному ранее [19]. Затем опухолевые клетки подсчитывали и сравнивали с количеством опухолевых клеток, которые культивировали без макрофагов. Противоопухолевый препарат цисплатин [33, 34] использовали в концентрации 10, 20 и 40 мкг/мл в качестве препарата сравнения.

Инъекция макрофагов и лимфоцитов в брюшинную полость. Клетки групп «М0-А-Л», «М3-STAT3/6-SMAD3-А-Л»; «А-Л» и «Л» были удалены со дна лунки культурального планшета путем инкубирования при 37°C в присутствии PBS, содержащий 5 мМ ЭДТА [5]. Концентрация макрофагов и лимфоцитов была доведена до 8×10^6 клеток в 0,2 мл PBS. Далее мышам внутрибрюшинно вводили клетки перечисленных выше групп на 1-е, 3-е, 5-е и 7-е сут.

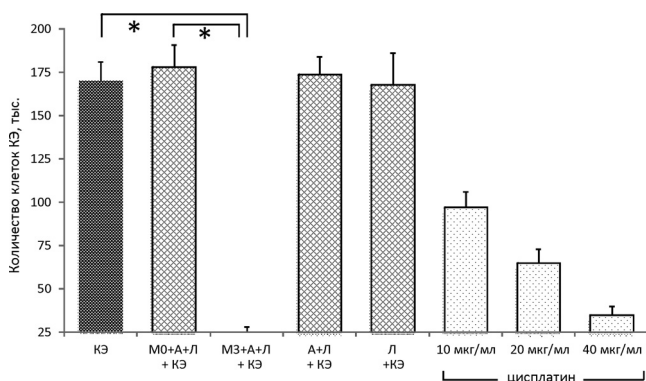


Рис. 1. Эффект М3-STAT3/6-SMAD3 макрофагов и антиген-репрограммированных лимфоцитов на рост опухолевых клеток КЭ. КЭ — клетки карциномы Эрлиха. Представлены данные 5 повторов. Значимые различия между группами «КЭ» и «М3-STAT3/6-SMAD3+А+Л» и группами «М0+А+Л» и «М3-STAT3/6-SMAD3+А+Л»: ** $p < 0,01$.

после инъекции клеток КЭ. В итоге было сформировано 6 групп животных по 18 крыс в каждой:

- Группа «Опухоль» — мыши, которым ввели клетки КЭ;
- Группа «Опухоль + М0-А-Л» — мыши, которым вводили клетки КЭ и клетки группы М0-А-Л;
- Группа «Опухоль + М3-STAT3/6-SMAD3-А-Л» — мыши, которым вводили клетки КЭ и клетки группы М3-STAT3/6-SMAD3-А-Л;
- Группа «Опухоль + А-Л» — мыши, которым вводили клетки КЭ и клетки группы А-Л;
- Группа «Опухоль + Л» — мыши, которым вводили клетки КЭ и клетки группы Л;
- Группа «Опухоль+цисплатин» — мыши, которым вводили клетки КЭ и 0,05 мл цисплатина (0,5 мг/мл) в качестве противоопухолевого препарата [33—35].

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

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

Результаты и обсуждение

1. М3-STAT3/6-SMAD3 макрофаги и антиген-репрограммированные лимфоциты полностью останавливают деление клеток карциномы Эрлиха *in vitro*

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 $170\,000 \pm 11\,000$ клеток. Кокультивирование клеток КЭ с клетками групп «М0-А-Л», «А-Л» и «Л» статистически значимо не влияло на пролиферацию опухолевых клеток.

Добавление клеток группы «М3-STAT3/6-SMAD3-А-Л» практически полностью остановило деление опухолевых клеток КЭ. При этом видно, что противоопухолевый эффект клеток группы «М3-STAT3/6-SMAD3-А-Л» существенно превышал эффект препарата цисплатин.

2. М3-STAT3/6-SMAD3 макрофаги и антиген-репрограммированные лимфоциты продемонстрировали выраженный антиопухолевый эффект *in vivo*

Для того, чтобы оценить, воспроизводится ли противоопухолевый эффект репрограммированных макрофагов и лимфоцитов *in vitro* в условиях *in vivo*, было оценено действие клеток группы «М3-STAT3/6-SMAD3-А-Л» на продолжительность жизни мышей с карциномой Эрлиха.

На рис. 2 представлен эффект введения M3.STAT3/6-SMAD3 макрофагов и антиген-репрограммированных лимфоцитов и цисплатина на продолжительность жизни мышей с КЭ в кривых выживаемости по Каплану—Мейеру. Продолжительность жизни мышей группы «Опухоль», которым вводили клетки КЭ, составила $15,3 \pm 0,3$ сут.; продолжительность жизни мышей группы «Опухоль + M0-A-L» составила $13,3 \pm 0,2$ сут. ($p < 0,01$), что на 13% меньше, чем в группе «Опухоль». Продолжительность жизни мышей группы «Опухоль + M3.STAT3/6-SMAD3-A-L» составила $37,2 \pm 0,7$ сут. ($p < 0,01$), что на 143% больше, чем в группе «Опухоль». Противоопухолевый эффект клеток группы «M3.STAT3/6-SMAD3-A-L» оказался существенно более выраженным, по сравнению с эффектом цисплатина.

Добавление клеток групп «A+L» или одного антигена (группа «A»), или одних лимфоцитов (группа «L») мышам с опухолью не оказало существенного влияния на продолжительность жизни мышей.

Таким образом, инъекции клеток группы «M3.STAT3/6-SMAD3-A-L» значительно повысило устойчивость мышей к развитию КЭ. Результаты проведенного исследования подтвердили нашу гипотезу о том, что опухолевый рост может быть эффективно ограничен с помощью M3 макрофагов с ингибированными факторами транскрипции M2 фенотипа: STAT3, STAT6 и SMAD3 в сочетании с антиген-репрограммированными лимфоцитами. При использовании M0 макрофагов вместо M3 эффект группы «M0-A-L» оказался противоположным. Добавление этой группы клеток снизило продолжительность жизни мышей с опухолью. Эти данные хорошо коррелирует с представлением о проопухолевой трансформации макрофагов в зоне опухоли [13—16].

Макрофаги уже давно привлекают внимание в качестве мишеней для противоопухолевой терапии. Антиопухолевую активность макрофагов пытались усилить путем стимуляции Toll-like рецепторов и ингибирования рецепторов к TGF- β [36]; культивирования в среде без сыворотки [5]; усиления активности генов, отвечающих за экспрессию IFN- γ и IL-12 [37]; связывания проопухолевых факторов или их рецепторов на макрофагах [38, 39] и т.д. Все эти подходы направлены на формирование противоопухолевого M1 фенотипа, но опухоль перепрограммирует M1 фенотип в M2 [15], что снижает эффективность M1 макрофагов [40].

По сравнению с M1 макрофагами, M3 макрофаги с ингибированными факторами транскрипции STAT3, STAT6 и/или SMAD3 оказывали более выраженное противоопухолевое действие *in vitro* и способствовали увеличению продолжительности жизни

ни мышей с КЭ [20, 40]. Более выраженный противоопухолевый эффект этих макрофагов по сравнению с M1 может быть связан с большей воспалительной активностью M3 макрофагов с ингибированными STAT3, STAT6 и/или SMAD3 и способностью сохранять антиопухолевые свойства в проопухолевой среде.

Ограничение эффективности использования M3 макрофагов связано с тем, что опухоль снижает активность и перепрограммирует не только макрофаги, но и лимфоциты [41], а именно лимфоциты являются главными клетками, отвечающими за уничтожение опухоли. Опухоль снижает способность антиген-презентирующих клеток захватывать и осуществлять презентацию опухолевых антигенов лимфоцитам [23]. Понимание механизмов опухолевой трансформации привело нас к гипотезе, что предварительное репрограммирование макрофагов на M3 фенотип и антиген-зависимое репрограммирование лимфоцитов в условиях *in vitro*, в условиях отсутствия угнетающего и репрограммирующего действия опухоли, может существенно увеличить антиопухолевую эффективность иммунных клеток. Действительно, ранее мы показали, что инъекции только M3 макрофагов мышам с карциномой Эрлиха, увеличивает продолжительность жизни этих мышей примерно на 100% [20], тогда как в настоящей работе инъекции M3 макрофагов вместе с *in vitro* антиген-репрограммированными лимфоцитами, увеличивали продолжительность жизни таких же мышей с опухолью на 143%. Макрофаги являются клетками врожденного, а лимфоциты — адаптивного иммунного ответа, поэтому в данной работе, по сути, была продемонстрирована возможность программирования антиопухолевого иммунного ответа

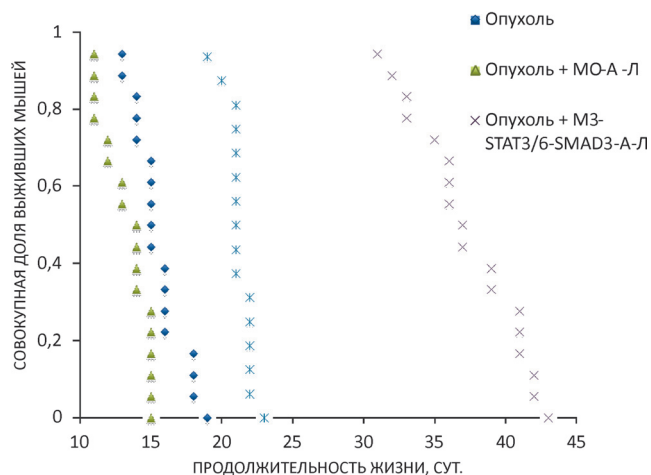


Рис. 2. Эффект введения M3.STAT3/6-SMAD3 макрофагов и антиген-репрограммированных лимфоцитов, в сравнении с эффектом цисплатина на продолжительность жизни мышей с КЭ (по анализу выживаемости по Каплану—Мейеру).

in vitro (в пробирке), в условиях отсутствия влияния опухоли, и дальнейшего эффективного использования в условиях *in vivo*.

Обнаруженные в работе факты, что М3 макрофаги в сочетании с антиген-репрограммированными лимфоцитами значительно подавляют рост опухоли, делают перспективным разработку клинической версии биотехнологии ограничения роста опухоли путем предварительного программирования антиопухолевого иммунного ответа «в пробирке».

References

1. Condeelis J., Pollard J.W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 2006; 124(2): 263-6.
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(6): 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; 5: 953-964.
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(11): 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(5): 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(17): 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(11): 1549-1559.
11. Sharma M. Chemokines and their receptors: orchestrating a fine balance between health and disease. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2009; 30(1): 1-22.
12. Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004; 21(2): 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(11): 999-1005.
14. Zou W. Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2006; 6(4): 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 (12): 941-52.
18. Kono Y., Kawakami S., Higuchi Y., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M. Antitumor effect of nuclear factor- κ 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. Kalish S., Lyamina S., Manukhina E., Malyshev Y., Raetskaya A., Malyshev I. M3 Macrophages Stop Division of Tumor Cells In Vitro and Extend Survival of Mice with Ehrlich Ascites Carcinoma. *Medical science monitor basic research*. 2017; 23: 8-19.
21. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature reviews. Immunology*. 2004; 4(12): 941-52.
22. Cavazzoni E., Bugiantella W., Graziosi L., Franceschini M.S., Donini A. Malignant ascites: pathophysiology and treatment. *International Journal of Clinical Oncology*. 2013; 18(1): 1-9.
23. Becker G., Galandi D., Blum H.E. Malignant ascites: systematic review and guideline for treatment. *European Journal of Cancer*. 2006; 42(5): 589-97.
24. Ahmed N., Stenvers K.L. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Frontiers in Oncology*. 2013; 3: 256.
25. Saif M.W., Siddiqui I.A., Sohail M.A. Management of ascites due to gastrointestinal malignancy. *Annals of Saudi Medicine*. 2009; 29(5): 369-77.
26. Kono Y., Kawakami S., Higuchi Y., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M. Antitumor effect of nuclear factor- κ B decoy transfer by mannose-modified bubble lipoplex into macrophages in mouse malignant ascites. *Cancer Science*. 2014; 105(8): 1049-55.
27. 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.
28. Zhang X., Goncalves R., Mosser D.M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Current Protocols in Immunology*. 2008; Chapter 14: Unit 14.1.
29. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience*. 2008; 1(13): 453-61.
30. Briard J.G., Poisson J.S., Turner T.R., Capicciotti C.J., Acker J.P., Ben R.N. Small molecule ice recrystallization inhibitors mitigate red blood cell lysis during freezing, transient warming and thawing. *Scientific reports*. 2016; 6: 23619.
31. Goldberg S. Mechanical/physical methods of cell disruption and tissue homogenization. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2008; 424: 3-22.

32. Lejtenyi D., Osmond D.G., Miller S.C. Natural killer cells and B lymphocytes in L-selectin and Mac-1/LFA-1 knockout mice: marker-dependent, but not cell lineage-dependent changes in the spleen and bone marrow. *Immunobiology*. 2003; 207(2): 129-35.
33. Roco A., Cayun J., Contreras S., Stojanova J., Quicones L. Can pharmacogenetics explain efficacy and safety of cisplatin pharmacotherapy? *Frontiers in Genetics*. 2014; 5: 391.
34. 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.
35. 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.
36. Peng J., Tsang J.Y., Li D., Niu N., Ho D.H., Lau K.F. et al. Inhibition of TGF- β signaling in combination with TLR7 ligation re-programs a tumoricidal phenotype in tumor-associated macrophages. *Cancer Letters*. 2013; 331(2): 239-49.
37. 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.
38. 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; 2011: 565187.
39. 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(18): 5317-24.
40. Malyshev I.Yu. Phenomena and signaling mechanisms reprogramming of macrophages. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2015; 59(2): 99-111. (in Russian)
41. Lee P.P., Yee C., Savage P.A., Fong L., Brocksedt D., Weber J.S., Johnson D., Swetter S., Thompson J., Greenberg P.D., Roederer M., Davis M.M. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nature medicine*. 1999; 5(6): 677-85.

Сведения об авторах:

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

Буданова Ольга Петровна, лаборант каф. регуляторных механизмов стресса и адаптации ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», e-mail: ova17@list.ru