

Репрограммированные *in vitro* M1 макрофаги увеличивают продолжительность жизни мышей с асцитной карциномой Эрлиха*

Калиш С.В.¹, Лямина С.В.¹, Усанова Е.¹, Бахтина Л.Ю.², Буданова О.П.², Малышев И.Ю.^{1,2}

¹ — МГМСУ. Московский Государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова. Министерство образования и науки России. 127473, Москва, Россия

² — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». Федеральное агентство научных организаций, 125315, Москва, Россия

Большинство опухолей, особенно злокачественные, включают механизмы активного перепрограммирования макрофагов с антиопухолевого M1-фенотипа на проопухолевый M2-фенотип. M2-фенотип подавляет антиопухолевый иммунитет, способствует росту и васкуляризации опухоли, а также инвазии и метастазированию опухолевых клеток. Мы предположили, что увеличение количества M1 макрофагов в зоне опухоли может ограничить канцерогенез и увеличить продолжительность жизни организма с опухолью. Цель работы состояла в экспериментальной проверке этого предположения на примере наиболее злокачественного вида опухоли — асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ). Для достижения этой цели мы определили три задачи: 1) оценить изменение фенотипа и секреторной NO-продуцирующей активности макрофагов в ходе развития опухоли; 2) оценить влияние асцитической жидкости на фенотип и секреторную NO-продуцирующую активность макрофагов; 3) репрограммировать макрофаги *in vitro* на M1 фенотип и оценить влияние этих макрофагов на продолжительность жизни мышей с АКЭ. Работа была проведена на мышах линии C57BL/6J. Результаты показали, что: 1) по мере развития АКЭ происходило драматическое угнетение способности макрофагов синтезировать NO и перепрограммирование макрофагов на M2 фенотип; 2) асцитическая жидкость мышей с опухолью существенно угнетает NO-продуцирующую активность макрофагов; 3) введение репрограммированных *in vitro* M1 макрофагов мышам достоверно повысило устойчивость этих мышей к развитию АКЭ по параметрам продолжительности жизни и накопления асцитической жидкости в брюшной полости. Полученные данные свидетельствуют о высокой перспективности разработки новых биотехнологий ограничения роста опухоли с помощью репрограммированных *in vitro* макрофагов.

Ключевые слова: макрофаги, фенотип M1 и M2, репрограммирование, карцинома Эрлиха, карциногенез, опухоль

Введение

Несмотря на успехи в области фармакологического лечения, онкологические заболевания по-прежнему имеют серьезные социальные и экономические последствия. В связи с этим, разработка новых способов ограничения опухолевого роста является одной из главных задач современной медицины.

Существует более двухсот видов онкологических заболеваний. Каждое заболевание имеет свою специфику, однако есть общее, что объединяет патогенез практически всех видов опухолей. Это проопухолевая трансформация иммунного ответа. В результате такой трансформации иммунные клетки теряют способность уничтожать опухолевые клетки и даже начинают способствовать росту опухоли [6, 21, 41].

Ключевую роль в нарушении иммунного ответа при канцерогенезе играют макрофаги [6, 21, 41]. Макрофаги в зоне опухолевого роста получили название — опухолево-ассоциированные макрофаги, или сокращенно TAM (Tumor-associated macrophages). В зависимости от микроокружения, которое создает растущая опухоль и поврежденная ткань, макрофаги могут приобретать или M1, или M2-фенотип [21].

M1-фенотип TAM (TAM-M1) за счет продукции оксида азота (NO) [47], провоспалительных цитокинов [15, 16,

46], активации природных киллеров [39] и презентации опухолевых антигенов лимфоцитам [8] способствует уничтожению опухоли.

Однако большинство опухолей, особенно злокачественные, включают механизмы активного перепрограммирования макрофагов. Опухолевые клетки начинают продуцировать противовоспалительные цитокины TGF- β 1, IL-4, IL-10, а также PGE2 [1, 9, 17, 50], которые ограничивают продукцию противоопухолевых факторов, таких, как NO, TNF- α и IFN- γ и репрограммируют макрофаги на M2-фенотип [43]. Кроме того, опухолевые клетки нарушают антиген-презентирующую функцию макрофагов [11, 27, 38]. В результате макрофаги, мигрировавшие в зону опухоли с целью обнаруживать и убивать опухолевые клетки, становятся «союзниками» опухоли. M2-фенотип TAM (TAM-M2) подавляет антиопухолевый иммунитет, способствует росту и васкуляризации опухоли, а также инвазии и метастазированию опухолевых клеток [6, 21, 23, 41].

Мы предположили, что увеличение количества M1 макрофагов в зоне опухоли может ограничить ее развитие и увеличить продолжительность жизни организма с опухолью. Цель работы состояла в экспериментальной проверке этого предположения на примере наиболее злокачественного вида опухоли — асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ).

* Исследования были проведены при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Соглашение от 17 июня 2014 г. №14.604.21.0020, Уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60414X0020).

Для достижения этой цели мы решали три задачи:

1) оценка изменения фенотипа и секреторной NO-продуцирующей активности макрофагов в ходе развития опухоли;

2) оценка влияния асцитической жидкости на фенотип и секреторную NO-продуцирующую активность макрофагов;

3) репрограммирование макрофаги *in vitro* на M1-фенотип и оценили влияние этих макрофагов на продолжительность жизни мышей с АКЭ.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Работа была проведена на мышах C57BL/6J. Мыши были получены из питомника «Андреевка» (<http://andreevka.msk.ru/index.htm>). Эксперименты проводились в соответствии с руководством ВОЗ для биомедицинских исследований (http://www.cioms.ch/publications/guidelines/1985_texts_of_guidelines.htm).

Асцитная карцинома Эрлиха. Опухолевый рост инициировали с помощью внутрибрюшинного введения клеток АКЭ. Клетки опухоли были получены в «Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина». Мышам внутрибрюшинно вводили 250 тысяч опухолевых клеток, разведенных в 0,2 мл физиологического раствора. В кривой роста опухоли различают 3 периода: лаг-фаза, 1—5 дни после введения опухолевых клеток; лог-фаза, 6—10 дни; и терминальный период, 11—15 дни, за которым следует гибель организма [33]. Устойчивость мышей к АКЭ оценивали по продолжительности жизни после введения опухолевых клеток и по изменению веса животных, которое отражало накопление асцита в брюшной полости.

Определение соотношения опухолевых клеток к макрофагам в асците мышей с опухолью основано на том, что в условиях культуры клеток макрофаги прилипают к пластике культуральной лунки, а опухолевые клетки нет. Асцитическую жидкость собирали с помощью шприца на 3-й, 7-й и 11-й день после введения опухолевых клеток мышам. В асците производили подсчёт клеток в камере Горяева. Далее клетки высаживали по 1000 клеток/1 мл/на лунку 24-луночного планшета и инкубировали в течение часа при 37,5°C и 5% CO₂. За это время все макрофаги прочно адгезировались на дне лунки. Затем планшет встряхивали, пипетировали содержимое лунки и собирали надосадочную жидкость. В надосадочной жидкости проводили подсчёт клеток. Эти клетки были представлены в основном опухолевыми клетками, которые не прилипают к пластику.

Оценка изменения фенотипа и секреторной активности макрофагов. Для оценки изменения фенотипа и секреторной активности макрофагов в ходе развития опухоли на 7-й и 11-й день после введения опухолевых клеток из мышей выделяли перитонеальные макрофаги [48]. После выделения, макрофаги размещали в плоскостонные лунки 48-луночных культуральных планшетов в среде RPMI-1640 с 10% сывороткой (FBS) с 100 U/мл пеницилина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37°C и 5% CO₂. Макрофаги распределяли из расчета 0.5 млн клеток на лунку в 0,5 мл среды. Секреторную активность макрофа-

гов оценивали по продукции NO. Для оценки базальной продукции NO макрофаги культивировали 24 часа, а для оценки стимулированной — добавляли липополисахарид (ЛПС) в концентрации 500 нг/мл на 24 часа. После этого оценивали содержание нитритов, конечных метаболитов NO, в среде культивирования макрофагов как показатель продукции NO [19]. Содержание нитритов оценивали спектрофотометрически с помощью реакции Грисса [34].

Изменение фенотипа макрофагов оценивали по изменению продукции NO. Увеличение NO продуцирующей активности макрофагов свидетельствовало о формировании M1-, а снижение — о формировании M2-фенотипа [28].

Оценка влияния асцитической жидкости на секреторную активность макрофагов. Асцитическую жидкость собирали с помощью шприца на 11-й день после введения опухолевых клеток. Затем среду культивирования макрофагов заменяли на асцитическую жидкость и оценивали базальную и стимулированную продукцию NO макрофагами, как описано выше.

Методика *in vitro* репрограммирования макрофагов на M1-фенотип. Макрофаги репрограммировали с помощью двух факторов, репрограммирующих макрофаги на M1-фенотип: 0% FBS [29] и 20 нг/мл IFN-γ [28]. Макрофаги выделяли из здоровых мышей и формировали 4 группы.

Группа 1 или «Контроль» — макрофаги, которые культивировались в стандартных условиях с 10% FBS в течение 36 часов. Макрофаги этой группы вводили внутрибрюшинно нормальным мышам и мышам с АЭК в качестве контроля.

Группа 2 или «ЛПС» — макрофаги, которые культивировались в течение 12 часов в стандартных условиях с 10% FBS, а затем стимулировались ЛПС (500 нг/мл) в течение 24 часов.

Группа 3 или «Репрограммирование без стимуляции ЛПС» — макрофаги, которые культивировались в течение 36 часов без FBS с добавлением IFN-γ в концентрации 20 нг/мл.

Группа 4, или «Репрограммирование и стимуляция ЛПС» — макрофаги, которые инкубировались в течение 12 часов без FBS с добавлением IFN-γ в концентрации 20 нг/мл, а затем стимулировались ЛПС (500 нг/мл) в течение 24 часов. Макрофаги этой группы вводили внутрибрюшинно нормальным мышам и мышам с АКЭ.

Для подтверждения эффективности репрограммирования макрофагов на M1-фенотип, кроме продукции NO, также оценивали продукцию про- и противовоспалительных цитокинов. Содержание провоспалительных M1 цитокинов IL-2, IL-6, IFNγ и TNF-α и противовоспалительных M2 цитокинов IL-5 и IL-10 [7, 22, 31] определяли методом проточной цитофлуориметрии (Beckman Coulter FC500, США) с помощью набора для определения цитокинов (BMS810FF, BenderMedSystems, США) по инструкции производителя.

Методики снятия макрофагов с лунки и введения макрофагов в брюшную полость мышей. Для снятия макрофагов с дна лунки использовали трипсин [36]. Из лунок удаляли среду и затем добавляли по 1 мл 0,25% раствора трипсина с 0,03% ЭДТА. Плашки инкубировали при 37°C в течение

Результаты

1. Изменение фенотипа и секреторной активности макрофагов в ходе развития АКЭ

3 мин. Затем плашки встряхивали. Далее в каждую лунку, добавляли по 1 мл среды и плашку встряхивали. Далее жидкость из лунки сливали в пробирку и добавляли в лунку 1 мл среды, еще раз встряхивали и сливали жидкость в ту же пробирку. Пробирки центрифугировали в течение 5 мин при 1000 оборотах в минуту. После этого надосадочную жидкость удаляли из пробирки, а к осадку макрофагов добавляли 1 мл среды и пипетировали до получения суспензии макрофагов. С помощью среды RPMI-1640 доводили концентрацию макрофагов до 1 млн клеток/1 мл среды (Раствор А). Из раствора А готовили суспензию 4000 макрофагов в 0,5 мл PBS (Раствор Б). Каждой мыши вводили внутривенно раствор Б на 3, 7 и 11 дни после введения опухолевых клеток. Были сформированы 5 групп по 16 мышей:

1. «Опухоль» — мыши, которым вводили опухолевые клетки;
2. «Опухоль + PBS» — мыши, которым вводили опухолевые клетки и на 3-й, 7-й и 11-й дни по 0,5 мл PBS;
3. «Опухоль + M1» — мыши, которым вводили опухолевые клетки и на 3-й, 7-й и 11-й дни 4000 макрофагов M1-фенотипа в 0,5 мл PBS;
4. «Опухоль + M0» — мыши, которым вводили опухолевые клетки и на 3-й, 7-й и 11-й дни 4000 перепрограммированных макрофагов в 0,5 мл PBS;
5. «Опухоль + цисплатин» — мыши, которым вводили опухолевые клетки и на 3-й, 7-й и 11-й дни 0,05 мл раствора цисплатина в концентрации 0,5 мг/мл [49].

Цисплатин — препарат с хорошо известным антиопухолевым действием [37]. Его использовали в качестве препарата сравнения. Эффект введенных макрофагов и цисплатина оценивали по изменению веса и продолжительности жизни животных с опухолью.

Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica 8.0 (Statsoft). Данные представлены в виде средних значений полученных показателей (M) и их ошибок ($\pm m$). Вероятность ошибки $p < 0,05$ оценивалась как значимая, $p < 0,01$ — очень значимая и $p < 0,001$ — максимально значимая.

Известно, что после появления опухолевых клеток в организме одновременно иницируются два процесса: деление опухолевых клеток и миграция макрофагов в зону опухолевого роста. Это приводит к увеличению количества и опухолевых клеток и макрофагов. Мы обнаружили, что скорость деления опухолевых клеток существенно опережает скорость привлечения макрофагов в зону опухоли. Так, в день введения опухолевых клеток соотношение количества опухолевых клеток к количеству макрофагов в брюшной полости составляло 0,5, на 7-й день — 1,0, а на 11-й день уже 1,5 (табл. 1).

Увеличение соотношения «опухолевые клетки/макрофаги» по мере развития АКЭ сопровождалось драматическим угнетением способности макрофагов синтезировать NO, как в базальных условиях, так и в ответ на стимуляцию ЛПС. На Log- и терминальной стадиях АКЭ базальная продукция NO макрофагами снижалась в 3 раза, а стимулированная — в 4 раза, по сравнению с контролем (табл. 1).

Низкая продукция NO является маркером проопухолевое M2-фенотипа макрофагов [28]. На этом основании можно заключить, что АКЭ сдвигает фенотип макрофагов мышей в сторону проопухолевое M2 фенотипа.

2. Влияние асцитической жидкости на секреторную активность макрофагов

Репрограммирование макрофагов на M2-фенотип в брюшной полости мышей с АКЭ, вероятно, происходит под действием разных факторов асцитической жидкости. В условиях культуры клеток мы оценили в целом влияние асцитической жидкости на секреторную активность нормальных макрофагов, выделенных от мышей без опухоли. Асцитическая жидкость существенно угнетала NO-продуцирующую активность макрофагов: базальную продукцию NO на 50%, а индуцированную — на 20% (табл. 2).

Таблица 1

Изменение NO-продуцирующей активности макрофагов при развитии АКЭ

Показатели	Дни после введения опухолевых клеток		
	0	7	11
Базальная продукция NO (нитриты, мкмоль/л)	17 ± 1,9	5 ± 0,2**	5 ± 0,3**
Стимулированная продукция NO (нитриты, мкмоль/л)	25 ± 2,1	6 ± 0,3**	6 ± 0,4**
Соотношение "опухолевые клетки/макрофаги" в брюшной полости	0,5	1,0	1,5

Достоверность отличий от контроля (день 0): ** — $p < 0,01$

Таблица 2

Влияние асцитической жидкости на NO-продуцирующую активность макрофагов в культуре клеток

Показатель	Контроль		Асцит терминальной стадии	
	Базальная	Стимулированная	Базальная	Стимулированная
Нитриты, мкмоль/л	19,1 ± 1,1	23,2 ± 0,5	9,4 ± 0,7**	18,9 ± 0,9*

Достоверность отличий от контроля: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$

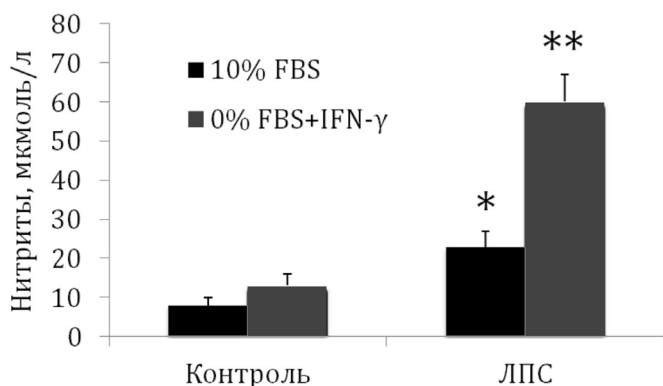


Рис. 1. Репрограммирование макрофагов с помощью комбинированной модели.

Ось абсцисс — содержание нитритов, конечных метаболитов NO; FBS; IFN-γ — факторы, репрограммирующие макрофаги на M1-фенотип; ЛПС — липополисахарид. Достоверность отличий: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$

Таким образом, растворимые в асците мышей с опухолью факторы вносят вклад в репрограммирование макрофагов на M2-фенотип и снижение NO-продуцирующей активности макрофагов.

3. Репрограммирование макрофагов *in vitro* на M1-фенотип

Данные о том, что АКЭ репрограммирует макрофаги на M2-фенотип, существенно снижая их NO-продуцирующую активность, дают еще большее основание полагать, что введение мышам с АКЭ макрофагов M1-фенотипа с высокой NO-продуцирующей активностью может ограничить рост АКЭ. На рис. 1 представлены данные об изменении NO-генерирующей активности макрофагов после их репрограммирования на M1-фенотип *in vitro*. Видно, что культивирование макрофагов в среде, не содержащей FBS с добавленным IFN-γ, приводило к увеличению базальной нестимулированной продукции NO, а также существенно увеличивало генерацию NO макрофагами в ответ на добавление ЛПС. Эти изменения указывают на процесс формирования M1-фенотипа с высокой NO-генерирующей активностью.

Таким образом, удаление FBS и добавление IFN-γ репрограммирует функциональный фенотип макрофагов мышей в сторону M1-фенотипа.

Для подтверждения эффективности репрограммирования макрофагов была также проанализирована секре-

торная активность ЛПС-индуцированных макрофагов по продукции цитокинов. Выявлено, что удаление FBS и добавление IFN-γ в среду, по сравнению со стандартной концентрацией 10% FBS, приводило к изменению продукции как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов (табл. 3). Удаление FBS из питательной среды макрофагов и добавление IFN-γ приводило к снижению продукции противовоспалительных цитокинов IL-5 и IL-10 и повышению продукции провоспалительных цитокинов IL-2, IL-6, TNF-α и INF-γ. Изменения для указанных цитокинов были достоверны по сравнению с показателями продукции цитокинов при концентрации FBS 10% ($p < 0,001$). Наиболее заметно при репрограммировании изменялся уровень провоспалительного цитокина IL-2 — его продукция возросла в 3,5 раза, и уровень противовоспалительного цитокина IL-5 — его продукция снизилась в 1,9 раза (табл. 3). Увеличение продукции провоспалительных цитокинов и снижение продукции противовоспалительных цитокинов является характерной чертой репрограммирования макрофагов на M1-фенотип [40].

Таким образом, проведенный анализ маркеров фенотипа макрофагов, таких, как продукция NO и цитокинов, позволяет рассматривать нашу модель как удовлетворительную модель *in vitro* репрограммирования макрофагов на M1-фенотип.

4. Репрограммированные M1 макрофаги продлевают жизнь мышей с АКЭ

Данные, представленные в табл. 4, показывают, что после введения опухолевых клеток продолжительность жизни мышей составила $13,6 \pm 0,2$ дней (группа 1), тогда как у мышей, которым вводили репрограммированные M1 макрофаги (группа 3) — $22,8 \pm 0,8$ дней ($p < 0,01$), то есть была на 68% дольше. Увеличение продолжительности жизни при введении репрограммированных M1 макрофагов было существенно больше, чем при использовании известного антиопухолевого препарата цисплатин (группа 5). Введение PBS (группа 2) или нерепrogramмированных макрофагов (группа 4) никак не повлияло на продолжительность жизни мышей с опухолью.

Во всех группах токсическое действие АКЭ проявлялось увеличением асцита в брюшной полости и, соответственно, увеличением веса животных. Однако у мышей, которым вводили репрограммированные M1 макрофаги (группа 3), увеличение веса к 11-му дню развития опухоли по сравнению с первым днем составило лишь $6,5 \pm 1,1\%$, тогда как у мышей, которым не вводили репрограммиро-

Таблица 3

Влияние комбинированного репрограммирования (0%FBS + IFN-γ) на продукцию провоспалительных и противовоспалительных цитокинов макрофагами

Цитокины	Контроль + ЛПС	Комбинированное репрограммирование + ЛПС
IL-2, M1	546,74 ± 67,20	1894,72 ± 351,2*
IL-5, M2	132,45 ± 41,48	67,80 ± 8,45*
IL-6, M1	7645,63 ± 748,86	15240,60 ± 872,30*
IL-10, M2	468,25 ± 81,85	272,21 ± 12,47*
IFN-γ, M1	8602,36 ± 1045,91	14639,49 ± 684,55*
TNF-α, M1	3548,06 ± 733,62	9675,58 ± 647,65*

Достоверность отличий от контроля (10% концентрации FBS в питательной среде): * $p < 0,001$ для одноименного цитокина

ванные на M1-фенотип макрофаги (группа 1) — $12,7 \pm 1,8\%$ ($p < 0,01$), то есть было почти в 2 раза больше. На рис. 2 представлена репрезентативная фотография мышей на 11-й день после введения опухолевых клеток из группы 3, получавшей репрограммированные макрофаги M1-фенотипа (слева, А) и группы 1, не получавшей репрограммированные макрофаги (справа, Б). Видно, что у мышей, получавших репрограммированные M1 макрофаги, накопление асцита в брюшной полости было существенно меньше, чем у мышей, не получавших такие макрофаги. Введение PBS (группа 2) или нерепrogramмированных макрофагов (группа 4) никак не повлияло на увеличение веса животных по мере развития опухоли.

Таким образом, введение репрограммированных M1 макрофагов мышам достоверно повысило устойчивость этих мышей к развитию АКЭ по параметрам продолжительности жизни и накопления асцитической жидкости в брюшной полости.

Обсуждение

В этой работе мы показали, что микроокружение, которое опухоль формирует вокруг макрофагов в брюшной полости *in vivo*, а также асцитическая жидкость, добавленная к макрофагам *in vitro*, приводят к репрограммированию макрофагов на M2-фенотип. В этом могут участвовать как минимум две группы факторов асцитической жидкости. Это, во-первых, иммунные факторы, такие, как противовоспалительный цитокин IL-10, который выделяет АКЭ [35]. Во-вторых, это физико-химические факторы, такие, как гипоксия [5] и изменение pH [20], которые всегда сопровождают опухолевый рост [18]. Наши данные хорошо согласуются с известными представлениями о том, что M2-фенотип обладает проопухолевыми свойствами [4, 12].

Дальше мы показали, что репрограммированные *in vitro* на M1-фенотип макрофаги продлевают жизнь мышей с АКЭ. Антиопухолевый эффект репрограммированных макрофагов M1-фенотипа при АКЭ хорошо согласуется с известными представлениями, что M1-фенотип обладает антиопухолевыми свойствами [4, 12, 14, 30].

Наши собственные данные и данные литературы позволяют понять, за счет каких механизмов экзогенные M1 макрофаги, введенные в зону опухолевого роста, могут ограничивать рост опухоли и увеличивать продолжительность жизни. Прежде всего, хорошо известно, и наши данные подтвердили это, что M1 макрофаги обладают повышенной способностью к продукции NO. NO играет в канцерогенезе двойственную роль. С одной стороны, показано, что NO может индуцировать апоптоз опухоле-

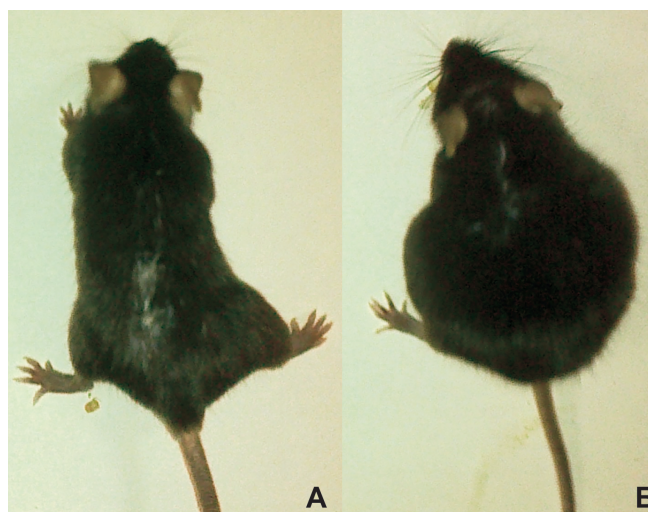


Рис. 2. Внешний вид мышей с АКЭ, которым вводили (А) и не вводили (Б) репрограммированные на M1-фенотип макрофаги.

вых клеток, благодаря подавлению синтеза антиапоптотического Bcl-2 и увеличению экспрессии проапоптотического Вах и p53 [47], и таким образом обладать антиопухолевым действием [13, 24]. Однако, с другой стороны, NO, благодаря нитрозилированию каспаз [25, 45] или активации синтеза HSP70 [26], может ограничивать развитие апоптоза в опухолевых клетках [32] и соответственно обладать проопухолевым действием. Локальная концентрация NO и свободных радикалов в зоне опухоли определяет, каким образом NO будет взаимодействовать с ДНК, с системами репарации ДНК, опухолевым супрессором p53, другими активаторами и ингибиторами апоптоза опухолевых клеток. Эти взаимодействия, в свою очередь, будут формировать про- или антиопухолевые эффекты NO [10].

В наших экспериментах введение M1 макрофагов с высокой NO-продуцирующей способностью привело к увеличению продолжительности жизни мышей с АКЭ. Поэтому, очевидно, что в этом случае реализовался антиопухолевый эффект NO.

M1 макрофаги могут ограничивать рост опухолевых клеток не только за счет продукции NO, но также и за счет других механизмов, таких, как увеличение продукции провоспалительных цитокинов [24, 46], увеличение продукции свободных радикалов [13], активация природных киллеров, которые могут эффективно уничтожать опухолевые клетки [42, 44]; презентация опухолевых антигенов и формирование Th1 и цитотоксических лимфоцитов [2, 3], которые инфильтрируют опухоль и убивают опухолевые клетки [8].

Таблица 4

Влияние введенных внутрибрюшинно репрограммированных на M1-фенотип макрофагов на продолжительность жизни мышей с АКЭ

Показатель	Группы мышей				
	Группа 1 "Опухоль"	Группа 2 "Опухоль + PBS"	Группа 3 "Опухоль + M1"	Группа 4 "Опухоль + M0"	Группа 5 "Опухоль + цисплатин"
Продолжительность жизни после введения опухолевых клеток, дни	$13,6 \pm 0,2$	$15,4 \pm 0,2$	$22,8 \pm 0,8^{**}$	$14,0 \pm 0,3$	$18,2 \pm 0,3^{**}$
Достоверность отличий от группы 1 "Опухоль": * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$					

Пока мы не можем точно сказать, благодаря какому из этих механизмов экзогенные макрофаги M1-фенотипа в наших экспериментах ограничивали рост АЭК, однако сам факт существенного увеличения жизни животных после введения таких макрофагов свидетельствует о высокой перспективности разработки новых биотехнологий ограничения роста опухоли с помощью репрограммированных *in vitro* макрофагов.

Список литературы

1. Мальшев И.Ю. Гипоксия и репрограммирование иммунного ответа при развитии опухоли: центральная роль макрофагов // Патогенез. — 2011. — (3). — С. 44–45.
2. Backer R., Schwandt T., Greuter M., Oosting M., Jngerkes F., Tting T et al. Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8+ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2010. — Vol. 107(1). — P. 216–221.
3. Barrio M.M., Abes R., Colombo M., Pizzurro G., Boix C., Roberti M.P. et al. Human macrophages and dendritic cells can equally present MART-1 antigen to CD8(+) T cells after phagocytosis of gamma-irradiated melanoma cells // PLoS One. — 2012. — 7(7). — e40311.
4. Chanmee T., Ontong P., Konno K., Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment // Cancers (Basel). — 2014. — 6(3). — P. 1670–1690.
5. Clin Ning-Bo Hao, Mu-Han Lu, Ya-Han Fan, Ya-Ling Cao, Zhi-Ren Zhang, Shi-Ming Yang. Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors // Dev. Immunol. — 2012. — 948098.
6. Condeelis J., Pollard J.W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis // Cell. — 2006. — Vol. 124. — P. 263–266.
7. Diehl S., Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation // Mol. Immunol. — 2002. — Vol. 39(9). — P. 531–536.
8. Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting // Immunity. — 2004. — Vol. 21. — P. 137–148.
9. Elgert K.D., Alleva D.G., Mullins D.W. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection // J. Leukoc. Biol. — 1998. — Vol. 64. — P. 275–290.
10. Engin A.B. Dual function of nitric oxide in carcinogenesis, reappraisal // Curr. Drug Metab. — 2011. — 12(9). — P. 891–899.
11. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumor-induced dendritic-cell defects // Nat. Rev. Immunol. — 2004. — 4. — P. 941–952.
12. Galdiero M.R., Bonavita E., Barajon I., Garlanda C., Mantovani A., Jaillon S. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer // Immunobiology. — 2013. — Nov. — Vol. 218 (11). — P. 1402–1410.
13. Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M. Immunity, inflammation, and cancer // Cell. — 2010. — Vol. 140(6). — P. 883–899.
14. Hao N.B., Lu M.H., Fan Y.H., Cao Y.L., Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas // J. Clin. Invest. — 2012. — Vol. 122 (3). — P. 787–795.
15. Harris D.P., Haynes L., Sayles P.C., Duso D.K., Eaton S.M., Lepak N.M., Johnson L.L., Swain S.L., Lund F.E. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells // Nat. Immunol. — 2000. — 1. — P. 475–482.
16. Ibe S., Qin Z., Schuler T., Preiss S., Blankenstein T. Tumor rejection by disturbing tumor stroma cell interactions // J. Exp. Med. — 2001. — Vol. 194. — P. 1549–1559.
17. Khong H.T., Restifo N.P. Natural selection of tumor variants in the generation of «tumor escape» phenotypes // Nat. Immunol. — 2002. — 3. — P. 999–1005.
18. Kumar V., Gabrilovich D.I. Hypoxia-inducible factors in regulation of immune responses in tumour microenvironment // Immunology. — 2014. — Vol. 143(4). — P. 512–519.
19. Lancaster J.R. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide // Jr. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1994. — Vol. 91(17). — P. 8137–8141.
20. Lardner A. The effects of extracellular pH on immune function // J. Leukoc. Biol. — 2001. — Vol. 69(4). — P. 522–530.
21. Lewis C.E., Pollard J.W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments // Cancer Res. — 2006. — Vol. 66. — P. 605–612.
22. Liao W., Lin J.X., Leonard W.J. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation // Curr. Opin. Immunol. — 2011. — Vol. 23(5). — P. 598–604.
23. Lin E.Y., Nguyen A.V., Russell R.G., Pollard J.W. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy // J. Exp. Med. — 2001. — Vol. 193. — P. 727–740.
24. Lum H.D., Buhtoiarov I.N., Schmidt B.E., Berke G., Paulnock D.M., Sondel P.M., Rakhmilevich A.L. Tumoristic effects of anti-CD40 mAb-activated macrophages involve nitric oxide and tumour necrosis factor- α // Immunology. — 2006. — Vol. 118(2). — P. 261–270.
25. Malysheva Y., Adachi S., Morikawa K., Ito H., Isobe M. Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation // J. Mol. Cell. Cardiol. — 2005. — Jan. — Vol. 38(1). — P. 163–174.
26. Malyshev I.Yu., Malugin A.V., Golubeva L.Yu., Zenina T.A., Manukhina E.B., Mikoyan V.D., Vanin A.F. Nitric oxide donor induces HSP70 accumulation in the heart and in cultured cells // FEBS Lett. — 1996. — Vol. 391(1–2). — P. 21–23.
27. Marincola F.M., Jaffee E.M., Hicklin D.J., Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance // Adv. Immunol. — 2000. — Vol. 74. — P. 181–273.
28. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization // Front Biosci. — 2008. — 1(13). — P. 453–461.
29. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm // J. Immunol. — 2000. — Vol. 164(12). — P. 6166–6173.
30. Mills C.D., Thomas A.C., Lenz L.L., Munder M. Macrophage: SHIP of Immunity // Front Immunol. — 2014. — 5. — P. 620.
31. Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation // Nature Reviews Immunology. — 2008. — 8(12). — P. 958–969.
32. Murphy M.E. The HSP70 family and cancer // Carcinogenesis. — 2013. — Vol. 34(6). — P. 1181–1188.
33. Ostrovskaja L.A., Skibida I.P., Krugliak S.A., Emanuel' N.M. Kinetic peculiarities of the development of Ehrlich ascites tumor in linear and non-linear mice // Izv. Akad. Nauk SSSR. Biol. — 1966. — 5. — P. 734–738. (in Russian).
34. Redente E.F., Dwyer-Nield L.D., Barrett B.S. et al. Lung tumor growth is stimulated in IFN- γ -/- mice and inhibited in IL-4R α -/- mice // Anticancer Research. — 2009. — Vol. 29(12). — P. 5095–5101.
35. Reinaldo J. da Silva, Marcia G. da Silva, Lozia C. Vilela and Denise Fecchio. Cytokine profile of Ehrlich ascites tumor treated with Bothrops jararaca venom // Mediators of Inflammation. — 2002. — 11. — P. 197–201.
36. Rey-Giraud F., Hafner M., Ries C.H. In Vitro Generation of Monocyte-Derived Macrophages under Serum-Free Conditions Improves Their Tumor Promoting Functions // PLoSone. — 2012. — 7(8). — e42656.
37. Roco A., Cayun J., Contreras S., Stojanova J., Quinones L. Can pharmacogenetics explain efficacy and safety of cisplatin chemotherapy? // Front Genet. — 2014. — 5. — P. 391.
38. Seliger B., Maeurer M.J., Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth // Immunol. Today. — 2000. — Vol. 21. — P. 455–464.
39. Sharma M. Chemokines and their receptors: orchestrating a fine balance between health and disease // Critical Reviews in biotechnology. — 2009. — 1. — P. 22.
40. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas // J. Clin. Invest. — 2012. — Vol. 122(3). — P. 787–795.
41. 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 // Eur. J. Cancer. — 2006. — Vol. 42. — P. 717–727.
42. Smyth M.J., Thia K.Y., Street S.E., MacGregor D., Godfrey D.I., Trapani J.A. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma // J. Exp. Med. — 2000. — Vol. 192. — P. 755–760.
43. Stout R.D., Watkins S.K., Suttles J. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated mac-

rophages // *J. Leukoc. Biol.* — 2009. — Vol. 86(5). — P. 1105–1109.

44. Street S.E., Cretny E., Smyth, M.J. Perforin and interferon-activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis // *Blood.* — 2001. — Vol. 97. — P. 192–197.

45. Torok N.J., Higuchi H., Bronk S., Gores G.J. Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9 // *Cancer Res.* — 2002. — Vol. 62(6). — P. 1648–1653.

46. 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 Res.* — 2002. — Vol. 62. — P. 5069–5075.

47. Zeini M., Traves P.G., Lopez-Fontal R., Pantoja C., Matheu A., Serrano M., Bosca L., Hortelano S. Specific contribution of p19(ARF) to nitric oxide-dependent apoptosis // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 177(5). — P. 3327–3336.

48. Zhang Xia, Goncalves Ricardo, Mosser David M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages // *Curr. Protoc. Immunol.* — 2008. — CHAPTER: Unit-14.1.

49. Zhao Nan, Li Y.H., Wu X.K., Wang G.Y., Cai D.Y., Han F.J. Effect of Brucea javanica fruit oil emulsion combined cisplatin on the growth inhibition of transplanted tumor in human ovarian cancer SKOV3 nude mice: an experimental study // *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* — 2015. — Jan. — Vol. 35(1). — P. 57–62.

50. Zou W. Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy // *Nat. Rev. Immunol.* — 2006. — 6. — P. 295–307.

Поступила 13.02.2015

References

1. Malyshev I.Ju. Gipoksija i reprogramirovanie immunnogo otveta pri razvitiu opuholi: central'naja rol' makrofagov // *Patogenez.* — 2011. — (3). — S. 44–45.

2. Backer R., Schwandt T., Greuter M., Oosting M., Jngerkes F., Tting T et al. Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8⁺ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2010. — Vol. 107(1). — P. 216–221.

3. Barrio M.M., Abes R., Colombo M., Pizzurro G., Boix C., Roberti M.P. et al. Human macrophages and dendritic cells can equally present MART-1 antigen to CD8⁺ T cells after phagocytosis of gamma-irradiated melanoma cells // *PLoS One.* — 2012. — 7(7). — e40311.

4. Chanmee T., Ontong P., Konno K., Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment // *Cancers (Basel).* — 2014. — 6(3). — P. 1670–1690.

5. Clin Ning-Bo Hao, Mu-Han Lu, Ya-Han Fan, Ya-Ling Cao, Zhi-Ren Zhang, Shi-Ming Yang. Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors // *Dev. Immunol.* — 2012. — 948098.

6. Condeelis J., Pollard J.W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis // *Cell.* — 2006. — Vol. 124. — P. 263–266.

7. Diehl S., Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation // *Mol. Immunol.* — 2002. — Vol. 39(9). — P. 531–536.

8. Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting // *Immunity.* — 2004. — Vol. 21. — P. 137–148.

9. Elgert K.D., Alleva D.G., Mullins D.W. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection // *J. Leukoc. Biol.* — 1998. — Vol. 64. — P. 275–290.

10. Engin A.B. Dual function of nitric oxide in carcinogenesis, reappraisal // *Curr. Drug Metab.* — 2011. — 12(9). — P. 891–899.

11. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumor-induced dendritic-cell defects // *Nat. Rev. Immunol.* — 2004. — 4. — P. 941–952.

12. Galdiero M.R., Bonavita E., Barajon I., Garlanda C., Mantovani A., Jaillon S. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer // *Immunobiology.* — 2013. — Nov. — Vol. 218 (11). — P. 1402–1410.

13. Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M. Immunity, inflammation, and cancer // *Cell.* — 2010. — Vol. 140(6). — P. 883–899.

14. Hao N.B., Lu M.H., Fan Y.H., Cao Y.L., Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas // *J. Clin. Invest.* — 2012. — Vol. 122 (3). — P. 787–795.

15. Harris D.P., Haynes L., Sayles P.C., Duso D.K., Eaton S.M., Lepak N.M., Johnson L.L., Swain S.L., Lund F.E. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells // *Nat. Immunol.* — 2000. — 1. — P. 475–482.

16. Ibe S., Qin Z., Schuler T., Preiss S., Blankenstein T. Tumor rejection by disturbing tumor stroma cell interactions // *J. Exp. Med.* — 2001. — Vol. 194. — P. 1549–1559.

17. Khong H.T., Restifo N.P. Natural selection of tumor variants in the generation of «tumor escape» phenotypes // *Nat. Immunol.* — 2002. — 3. — P. 999–1005.

18. Kumar V., Gabrilovich D.I. Hypoxia-inducible factors in regulation of immune responses in tumour microenvironment // *Immunology.* — 2014. — Vol. 143(4). — P. 512–519.

19. Lancaster J.R. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide // *Jr. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1994. — Vol. 91(17). — P. 8137–8141.

20. Lardner A. The effects of extracellular pH on immune function // *J. Leukoc. Biol.* — 2001. — Vol. 69(4). — P. 522–530.

21. Lewis C.E., Pollard J.W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments // *Cancer Res.* — 2006. — Vol. 66. — P. 605–612.

22. Liao W., Lin J.X., Leonard W.J. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation // *Curr. Opin. Immunol.* — 2011. — Vol. 23(5). — P. 598–604.

23. Lin E.Y., Nguyen A.V., Russell R.G., Pollard J.W. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy // *J. Exp. Med.* — 2001. — Vol. 193. — P. 727–740.

24. Lum H.D., Huhtiojarvi I.N., Schmidt B.E., Berke G., Paulnock D.M., Sondel P.M., Rakhmievich A.L. Tumorigenic effects of anti-CD40 mAb-activated macrophages involve nitric oxide and tumour necrosis factor- α // *Immunology.* — 2006. — Vol. 118(2). — P. 261–270.

25. Maejima Y., Adachi S., Morikawa K., Ito H., Isobe M. Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 2005. — Jan. — Vol. 38(1). — P. 163–174.

26. Malyshev I.Yu., Malugin A.V., Golubeva L.Yu., Zenina T.A., Manukhina E.B., Mikoyan V.D., Vanin A.F. Nitric oxide donor induces HSP70 accumulation in the heart and in cultured cells // *FEBS Lett.* — 1996. — Vol. 391(1–2). — P. 21–23.

27. Marincola F.M., Jaffee E.M., Hicklin D.J., Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance // *Adv. Immunol.* — 2000. — Vol. 74. — P. 181–273.

28. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization // *Front Biosci.* — 2008. — 1(13). — P. 453–461.

29. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 164(12). — P. 6166–6173.

30. Mills C.D., Thomas A.C., Lenz L.L., Munder M. Macrophage: SHIP of Immunity // *Front Immunol.* — 2014. — 5. — P. 620.

31. Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation // *Nature Reviews Immunology.* — 2008. — 8(12). — P. 958–969.

32. Murphy M.E. The HSP70 family and cancer // *Carcinogenesis.* — 2013. — Vol. 34(6). — P. 1181–1188.

33. Ostrovskaja L.A., Skibida I.P., Krugliak S.A., Emanuel' N.M. Kinetic peculiarities of the development of Ehrlich ascites tumor in linear and non-linear mice // *Izv. Akad. Nauk SSSR. Biol.* — 1966. — 5. — P. 734–738. (in Russian).

34. Redente E.F., Dwyer-Nield L.D., Barrett B.S. et al. Lung tumor growth is stimulated in IFN- γ -/- mice and inhibited in IL-4R α -/- mice // *Anticancer Research.* — 2009. — Vol. 29(12). — P. 5095–5101.

35. Reinaldo J. da Silva, Marcia G. da Silva, Lozia C. Vilela and Denise Feccchio. Cytokine profile of Ehrlich ascites tumor treated with Bothrops jararaca venom // *Mediators of Inflammation.* — 2002. — 11. — P. 197–201.

36. Rey-Giraud F., Hafner M., Ries C.H. In Vitro Generation of Monocyte-Derived Macrophages under Serum-Free Conditions Improves Their Tumor Promoting Functions // *PLOSone.* — 2012. — 7(8). — e42656.

37. Roco A., Cayun J., Contreras S., Stojanova J., Quinones L. Can pharmacogenetics explain efficacy and safety of cisplatin pharmacotherapy? // *Front Genet.* — 2014. — 5. — P. 391.

38. Seliger B., Maeurer M.J., Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth // *Immunol. Today*. — 2000. — Vol. 21. — P. 455–464.
39. Sharma M. Chemokines and their receptors: orchestrating a fine balance between health and disease // *Critical Reviews in biotechnology*. — 2009. — 1. — P. 22.
40. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas // *J. Clin. Invest.* — 2012. — Vol. 122(3). — P. 787–795.
41. 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 // *Eur. J. Cancer*. — 2006. — Vol. 42. — P. 717–727.
42. Smyth M.J., Thia K.Y., Street S.E., MacGregor D., Godfrey D.I., Trapani J.A. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma // *J. Exp. Med.* — 2000. — Vol. 192. — P. 755–760.
43. Stout R.D., Watkins S.K., Suttles J. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages // *J. Leukoc. Biol.* — 2009. — Vol. 86(5). — P. 1105–1109.
44. Street S.E., Cretney E., Smyth, M.J. Perforin and interferon-activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis // *Blood*. — 2001. — Vol. 97. — P. 192–197.
45. Torok N.J., Higuchi H., Bronk S., Gores G.J. Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9 // *Cancer Res.* — 2002. — Vol. 62(6). — P. 1648–1653.
46. 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 Res.* — 2002. — Vol. 62. — P. 5069–5075.
47. Zeini M., Traves P.G., Lopez-Fontal R., Pantoja C., Matheu A., Serrano M., Bosca L., Hortelano S. Specific contribution of p19(ARF) to nitric oxide-dependent apoptosis // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 177(5). — P. 3327–3336.
48. Zhang Xia, Goncalves Ricardo, Mosser David M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages // *Curr. Protoc. Immunol.* — 2008. — CHAPTER: Unit-14.1.
49. Zhao Nan, Li Y.H., Wu X.K., Wang G.Y., Cai D.Y., Han F.J. Effect of Brucea javanica fruit oil emulsion combined cisplatin on the growth inhibition of transplanted tumor in human ovarian cancer SKOV3 nude mice: an experimental study // *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. — 2015. — Jan. — Vol. 35(1). — P. 57–62.
50. Zou W. Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy // *Nat. Rev. Immunol.* — 2006. — 6. — P. 295–307.

Received 13.02.2015

Reprogrammed in vitro M1 macrophages increases life expectancy of mice with Ehrlich ascites carcinoma

Kalish S.V.¹, Lyamina S.V.¹, Usanova E.¹, Bakhtina L.Y.², Budanova O.P.², Malyshev I.Yu.^{1,2}

¹ — Moscow State University of Medicine and Dentistry them. A.I. Evdokimov

² — Institute of General Pathology and Pathophysiology

Most tumors, especially malignant, engage the mechanisms of active reprogramming of macrophage from the antitumor M1 phenotype towards pro-tumoral M2 phenotype. M2 phenotype suppress anti-tumor immunity, promotes growth and vascularization of tumor as well as invasion and metastasis of tumor cells. We hypothesized that increasing the number of M1 macrophages in the tumor area may limit carcinogenesis and increase the lifespan of an organism with a tumor. The purpose of this study was to experimental verification of this assumption on the example of the most malignant type of tumor — Ehrlich ascites carcinoma (EAC). To achieve this goal, we fulfilled three objectives: 1) evaluated the changes in phenotype of and secretory NO-producing activity of macrophages in tumor development, 2) evaluated the effect of ascites on the phenotype and NO-producing secretory activity of macrophages and 3) reprogrammed macrophages in vitro on M1 phenotype and evaluated the effect of these macrophages on the life span of mice with EAC. Work was carried out on mice of C57BL/6J. Results showed that: 1) as the development of EAC dramatic inhibition of ability of macrophages to synthesize NO and reprogramming M2 macrophage phenotype occurred; 2) ascitic fluid isolated from mice with tumor significantly inhibits a NO-producing activity of macrophages; 3) introducing reprogrammed in vitro M1 macrophages in mice significantly increased the resistance of these mice to the development of EAC in the parameters of life expectancy and the accumulation of ascitic fluid in the abdominal cavity. Findings indicates a high prospect of the development of new biotechnologies for limiting tumor growth by reprogramming in vitro macrophages.

Key words: macrophages, phenotype of M1 and M2, reprogramming, Ehrlich carcinoma, carcinogenesis, tumor