

УДК 616-092

М3 фенотип макрофагов повышает эффективность фагоцитоза – первого этапа кросс-презентации антигена

Шабунина Э.А.¹, Кузнецова Л.В.¹, Калиш С.В.¹, Буданова О.П.², Бахтина Л.Ю.², Малышев И.Ю.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И.Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Актуальность. Ранее было показано, что М3 фенотип макрофагов, который, в отличие от М1 и М2 фенотипов, на действие противовоспалительных факторов продуцирует провоспалительные цитокины (ПВ-М3), обладает выраженным противоопухолевым действием *in vivo*. Основная гипотеза работы состояла в том, что в основе более эффективного противоопухолевого эффекта ПВ-М3 макрофагов, по сравнению с другими фенотипами, лежит повышенная способность ПВ-М3 фенотипа фагоцитировать патогенные клетки и таким образом лучше проводить кросс-презентацию антигена. Это сделает ПВ-М3 фенотип весьма привлекательным кандидатом на разработку нового метода иммунотерапии рака, основанного на работе макрофагов.

Цель работы состояла в проверке вышеизложенной гипотезы.

Методы. В работе использовали макрофаги мышей, выделенные из перитонеального смыва. Для получения фенотипа М1, макрофаги культивировали в среде DMEM/F12 с IFN- γ . Для получения фенотипа М2, макрофаги культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 20–40% FBS. Фенотип ПВ-М3 макрофагов получали добавлением в среду культивирования IFN- γ , ингибиторов STAT3, STAT6 и SMAD3 с последующей стимуляцией липополисахаридом. После окончания стимуляции макрофагов ЛПС оценивали способность разных фенотипов к фагоцитозу. Оценку проводили с помощью набора окрашенных бактерий pHrodo® Red Staphylococcus aureus Bioparticles (Invitrogen).

Результаты. Фагоцитарная активность ПВ-М3 фенотипа – количество фагоцитирующих клеток, паттерн и показатель фагоцитарной активности – в нормальных условиях практически не отличалась от активности М1 фенотипа, но была существенно выше, по сравнению с М2 фенотипом. Культивирование макрофагов в опухолевой среде снизило фагоцитарную активность всех фенотипов, но при этом выявило существенную устойчивость фагоцитарной активности ПВ-М3 фенотипа, по сравнению с другими фенотипами.

Заключение. Результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о высокой способности ПВ-М3 макрофагов к фагоцитозу и согласуются с высказанной гипотезой, что в основе более эффективного противоопухолевого эффекта ПВ-М3 макрофагов может лежать более активная способность ПВ-М3 фенотипа фагоцитировать антиген.

Ключевые слова: макрофаги; репрограммирование; фагоцитоз; опухоль; кросс-презентация.

Для цитирования: Шабунина Э.А., Кузнецова Л.В., Калиш С.В., Буданова О.П., Бахтина Л.Ю., Малышев И.Ю. М3 фенотип макрофагов повышает эффективность фагоцитоза – первого этапа кросс-презентации антигена. *Патогенез*. 2021; 19(4): 23-29.

DOI: 10.25557/2310-0435.2021.04.23-29

Для корреспонденции: Малышев Игорь Юрьевич, e-mail: iymalyshev1@gmail.com

Финансирование: Исследования поддержаны Грантом Госзадания Министерства здравоохранения РФ, Соглашение от 17 декабря 2020 г. № 056-00035-21-00, и грантом Московского государственного медико-стоматологического университета имени А.И. Евдокимова

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила: 25.09.2021

The M3 macrophage phenotype increases the efficiency of phagocytosis, the first stage of antigen cross-presentation

Shabunina E.A.¹, Kuznetsova L.V.¹, Kalish S.V.¹, Budanova O.P.², Bakhtina L.Yu.², Malyshev I.Yu.^{1,2}

¹ A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Delegatskaya St. 20, Bldg. 1, Moscow 127473, Russian Federation

² Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation

Background. The M3 phenotype of macrophages, which, in contrast to the M1 and M2 phenotypes, produces proinflammatory cytokines (PI-M3) in response to the anti-inflammatory factors and exerts a pronounced *in vivo* anti-tumor effect. This study hypothesized that the more pronounced anti-tumor effect of PI-M3 macrophages compared to other phenotypes is based on a greater ability of the PI-M3 phenotype to phagocytize pathogenic cells and, thus, to perform better antigen cross-presentation. This makes the PI-M3 phenotype a desirable candidate for development of new macrophage-based cancer immunotherapy.

The aim of the study was to test this hypothesis.

Methods. Mouse macrophages isolated from peritoneal lavage were used in this study. The M1 phenotype was obtained by culturing macrophages in the DMEM/F12 medium with IFN- γ . The M2 phenotype was obtained by culturing macrophages in the DMEM/F12 medium supplemented with 20-40% FBS. The PI-M3 macrophage phenotype was obtained by adding IFN- γ and STAT3, STAT6, and SMAD3 inhibitors to the culture medium followed by stimulation with lipopolysaccharide (LPS). After the end of macrophage stimulation with LPS, the phagocytic ability of various phenotypes was assessed. The assessment was performed using the pHrodo® Red Staphylococcus aureus Bioparticles stained bacteria kit (Invitrogen).

Results. The phagocytic activity of the PI-M3 phenotype assessed as the number of phagocytic cells and the pattern and index of phagocytic activity, practically did not differ from the activity of the M1 phenotype but was significantly higher than that of the M2 phenotype under normal conditions. Culturing macrophages in a tumor environment reduced the phagocytic activity of all phenotypes but, at the same time, revealed significant stability of the phagocytic activity of the PI-M3 phenotype compared to other phenotypes.

Conclusion. This study demonstrated a high capability of PI-M3 macrophages for phagocytosis. This result is consistent with the hypothesis that the more pronounced anti-tumor effect of PI-M3 macrophages may be based on the greater functional ability of the PI-M3 phenotype to phagocytize the antigen.

Key words: macrophages; reprogramming; phagocytosis; tumor; cross-presentation.

For citation: Shabunina E.A., Kuznetsova L.V., Kalish S.V., Budanova O.P., Bakhtina L.Yu., Malyshev I.Yu. [The M3 macrophage phenotype increases the efficiency of phagocytosis, the first stage of antigen cross-presentation]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2021; 19(4): 23-29 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2021.04.23-29

For correspondence: Malyshev Igor` Yur`evich, e-mail: iymalyshev1@gmail.com

Funding: The publication was supported by the Government Assignment of the Ministry of Health Care of the Russian Federation, December 17, 2020 #056-00035-21-00 and the grant of the A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry.

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

Received: 25.09.2021

Введение

Успех иммунитета в защите организма от патогенного микроба или опухолевых клеток определяет иммунный цикл против патогена. Цикл состоит из семи стадий: 1. обнаружение антигена патогенной клетки; 2. фагоцитоз антигена антиген-презентирующей (АП) клеткой и его презентация на свою поверхность; 3. представление АП клеткой антигена Т-лимфоцитам и образование цитотоксических Т-клеток (Cytotoxic T Lymphocyte, CTL); 4. доставка CTL к патогенным клеткам или опухолям; 5. распознавание патогенной клетки; 6. уничтожение патогенной клетки токсическими продуктами CTL; и 7. высвобождение новой порции антигенов и замыкание цикла [1]. Среди этих стадий стадия антиген-презентации чужеродного, т.е. образовавшегося вне клетки антигена в составе главного комплекса гистосовместимости I (кросс-презентация антигена) исключительно важна, поскольку именно от нее зависит образование CTL – клеток, способных уничтожить патогенную клетку. Презентацию антигенов микробов или опухолевых клеток, наряду с дендритными клетками, могут осуществлять макрофаги [2]. Презентация антигенов патогенных клеток происходит по протеосомному или вакуолярному пути [2, 3]. И тот и другой путь начинается с фагоцитоза антигена [4]. Фагоцитоз антигена АП клеткой является первым условием эффективной кросс-презентации антигена.

Известно, что способность макрофагов фагоцитировать и кросс-презентировать антиген зависит от тканевого типа макрофага [5-7]. При этом надо иметь в виду, что макрофаги могут приобретать любой фенотип в континууме от провоспалительного M1 до противовоспалительного M2 [8]. Кросс-презентация антигена M1 макрофагами приводит к реактивации CTL

[3], а M2 макрофагами – нет. Вместе с тем кросс-презентация антигена M2 макрофагами формирует толерантность к комменсальным микробам и компонентам пищи [2].

Ранее мы предположили существование M3 фенотипа переклечения, который, в отличие от M1 и M2 фенотипов, на действие противовоспалительных факторов продуцирует провоспалительные цитокины (ПВ-M3) [9]. Мы полагаем, что ПВ-M3 фенотип формируется, когда появляется риск значительного снижения бактерицидных, противовирусных или противоопухолевых свойств иммунитета. Мы также разработали способ программирования такого фенотипа *in vitro*. Если кратко, он заключается в следующем. Многие сигнальные пути формирования фенотипа макрофага, JNK-, PI3K/Akt-, Notch-, JAK/STAT-, TGF- β /SMAD/non-SMAD-, TLR/NF- κ B-, EGF- и VEGF-пути и другие [10] имеют бифуркацию. Сигнальные пути M1 фенотипа имеют ответвление на активацию продукции противовоспалительных M2 цитокинов, а сигнальные пути M2 фенотипа – ответвление на активацию продукции воспалительных M1 цитокинов [9]. Наличие таких бифуркаций позволяет получить ПВ-M3 фенотип. Мы заблокировали фактор транскрипции противовоспалительного ответвления SMAD3 и оставили интактным воспалительное ответвление сигнального пути, активируемого противовоспалительным TGF- β . Кроме того, мы заблокировали факторы транскрипции противовоспалительного ответвления STAT3 и STAT6 и оставили интактным воспалительное ответвление JAK-зависимого сигнального пути, активируемого противовоспалительными цитокинами. Таким образом, мы перенаправили сигнал от противовоспалительных цитокинов на активацию факторов транскрипции фенотипа M1 фенотипа и получили ПВ-M3 фенотип [11]. ПВ-M3 фенотип существенно увеличивал выживаемость мышей с кар-

циномой по сравнению с другими фенотипами [11]. Мы предположили, что в основе более эффективно-го противоопухолевого эффекта ПВ-М3 макрофагов наряду с некоторыми другими факторами лежит более активная по сравнению с другими фенотипами способность М3 фенотипа фагоцитировать патогенные клетки.

Цель исследования состояла в проверке этой гипотезы путем сравнительной оценки способности к фагоцитозу М1, М2 и ПВ-М3 макрофагов в нормальных условиях и в условиях опухолевой среды.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использованы мыши линии C57/BL6j, самцы массой 22 ± 2 г, в возрасте 2 месяца из вивария МГМСУ имени А.И. Евдокимова. Этическая экспертиза исследования проведена Локальным Этическим Комитетом ФГБНУ «НИИОПП» (протокол № 2 от 12.05.2021, протокол № 5 от 17.11.2021). Схема эксперимента представлена на **рис. 1**.

Для культивирования и программирования макрофагов использовали ингибитор Stat3 (S3I204, Axon Med, США), ингибитор Stat6 (As1517499, Axon Med, США), IFN- γ (Invitogen, США), LPS (Sigma-Aldrich, США), ингибитор SMAD3 (SIS3, Calbiochem, США), Fetal Bovine Serum (FBS) (Thermo Hyclone, UK), DMEM/F12 (Панэко), пенициллин-стрептомицин (Gibco2017), pHrodo® Red Staphylococcus aureus Bioparticles (Invitrogen) Cat# A10010.

Макрофаги мышей выделяли из перитонеального смыва по методу Zhang et al [12]. Затем макрофаги помещали в культуральные планшеты со средой с 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (PS) при 37°C и 5% CO₂.

Дальше, для получения М1 фенотипа, макрофаги культивировали в течение 12 час в среде DMEM/F12 без сыворотки с 20 нг/мл IFN- γ . Затем течение следующих 24 час макрофаги стимулировали липополисахаридом (ЛПС) в концентрации 500 нг/мл в [13]. Для получения М2 фенотипа в среду DMEM/F12 добавляли сыворотку до 40% FBS и культивировали 12 час. Затем макрофаги стимулировали 500 нг/мл ЛПС 24 час [13]. Для получения ПВ-М3 фенотипа, в среду DMEM/F12 без сыворотки добавляли 20 нг/мл IFN- γ , 5 мкг/мл ингибитора STAT3, 10 мкг/мл ингибитора STAT6 и 2 нмоль/мл ингибитора SMAD3 и культивировали 12 час. Затем макрофаги стимулировали 500 нг/мл ЛПС 24 часа [14]. Контрольные М0 макрофаги культивировали 36 час в среде DMEM/F12, содержащей 10% FBS.

После окончания стимуляции макрофагов ЛПС, оценивали способность разных фенотипов к фагоцитозу. Оценка проводилась с помощью набора окрашенных бактерий pHrodo® Red Staphylococcus aureus Bioparticles (Invitrogen) путем подсчета количества фагоцитирующих макрофагов и интенсивности окраски

от поглощенных бактерий в фагоцитирующих макрофагах на фотографиях, полученных с помощью системы флуоресцентной визуализации клеток ZOE (BioRad, США). В соответствии с протоколом производителя pHrodo® Red Staphylococcus aureus Bioparticles (Invitrogen) были разморожены флуоресцентные частицы pHrodo™ BioParticles® и приготовлена рабочая концентрация частиц 10 мкг/мл для *S. aureus* BioParticles®. Затем была произведена замена культуральной среды в лунках на 100 мкл приготовленной суспензии pHrodo™ BioParticles® и после выполненной замены среды планшеты с клетками были перенесены в CO₂ инкубатор на 1 час, при 37°C. Через 1 час лунки фотографировали, 5 фото в разных полях зрения. Подсчитывали количество макрофагов, поглотивших окрашенный стафилококк в процентах. Среди фагоцитирующих клеток мы выделяли 3 группы: мало-, средне- и активно-фагоцитирующие. К мало-фагоцитирующим (МФМ) мы относили макрофаги, поглотившие от 1 до 4 бактерий, к средне-фагоцитирующим (СФМ) – от 5 до 10, и к активно-фагоцитирующим (АФМ) – от 11 и больше бактерий. Далее высчитывали показатель фагоцитоза, присваивая макрофагам с малой фагоцитирующей способностью 1 балл, со средне-фагоцитирующей способностью – 2 балла, и с активно-фагоцитирующей способностью – 3 бал-

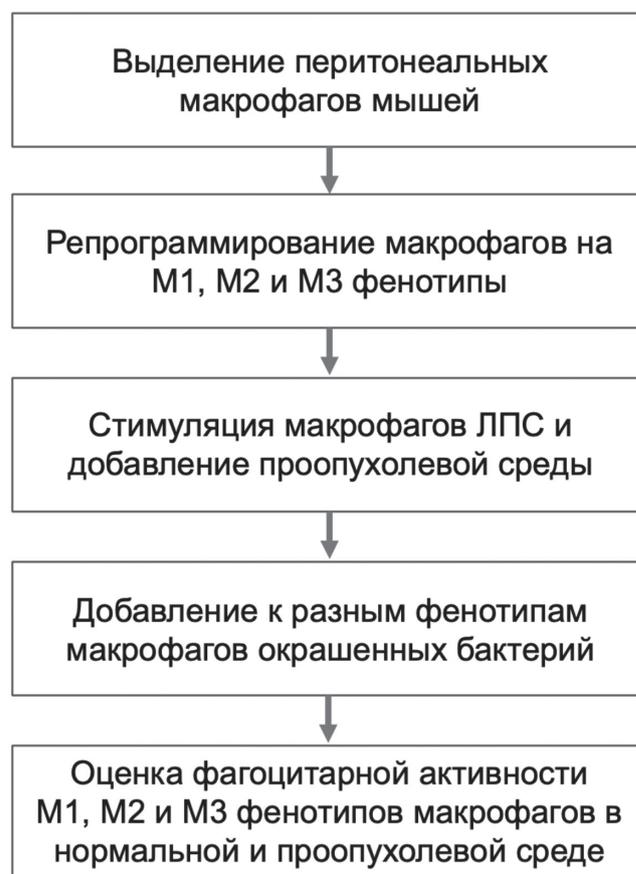


Рис. 1. Графическая схема эксперимента.

ла. Показатель активности фагоцитоза популяции макрофагов определяли в условных единицах и рассчитывали по формуле:

$$[\text{количество мало-фагоцитирующих макрофагов}] \times 1 + [\text{количество средне-фагоцитирующих макрофагов}] \times 2 + [\text{количество активно-фагоцитирующих макрофагов}] \times 3$$

Для оценки влияния опухолевого микроокружения на фагоцитарную активность макрофагов разных фенотипов к среде культивирования макрофагов на этапе стимуляции с ЛПС добавляли 10% кондиционированной среды, полученной при культивировании клеток опухоли Эрлиха в течении 24 час.

Данные представлены как среднее (M) ± стандартная ошибка среднего (m), и проанализированы с использованием Two Way ANOVA и post-hoc критерия Тьюки. При $p < 0,05$ различия рассматривали как статистически достоверные.

Результаты исследования

Результаты экспериментов по оценке фагоцитарной способности макрофагов в нормальной и опухолевой среде представлены в **табл. 1**.

Из **табл. 1** видно, что среди макрофагов нативного M0 фенотипа почти 80% проявили фагоцитарную активность по отношению к *Staphylococcus aureus*. При этом соотношение между слабо-, средне- и активно-фагоцитирующими макрофагами (паттерн фагоцитарной активности) составляло примерно 1,0:4,2:11,4. То есть, среди фагоцитирующих M0 макрофагов преобладали активно-фагоцитирующие клетки. Показатель фагоцитарной активности M0 макрофагов составлял 209,4±2,3.

Репрограммирование M0 фенотипа в сторону M1 фенотипа приводит к небольшому, но достоверному увеличению количества фагоцитирующих макрофагов (с 79,8±1,2 до 89,4±0,8, $p < 0,01$). Увеличение количества фагоцитирующих M1 макрофагов по сравнению с M0 макрофагами произошло за счет слабо- и сред-

не-фагоцитирующих макрофагов. В результате паттерн активности фагоцитоза стал 1,0:2,9:4,9. Показатель фагоцитарной активности M1 макрофагов по сравнению с M0 макрофагами, увеличился ($p < 0,05$) и составил 218,6±2,1.

Репрограммирование M0 фенотипа в сторону M2 фенотипа сопровождалось достоверным снижением количества фагоцитирующих макрофагов (с 79,8±1,2 до 69,0±0,8, $p < 0,01$). Снижение количества фагоцитирующих M2 макрофагов по сравнению с M0 макрофагами произошло за счет существенного снижения (более чем в 3,5 раза, $p < 0,01$) активно-фагоцитирующих макрофагов. При этом существенно увеличилась доля слабо-фагоцитирующих макрофагов. В результате паттерн активности фагоцитоза стал 1,0:0,6:0,4. Показатель фагоцитарной активности M2 макрофагов по сравнению с M0 макрофагами, снизился почти в два раза ($p < 0,01$) и составил 118,6±1,1.

Репрограммирование M0 фенотипа в сторону ПВ-M3 фенотипа приводит к небольшому, но достоверному увеличению количества фагоцитирующих макрофагов (с 79,8±1,2 до 90,0±0,4, $p < 0,01$). Увеличение количества фагоцитирующих ПВ-M3 макрофагов по сравнению с M0 макрофагами произошло за счет слабо- и средне-фагоцитирующих макрофагов. В результате паттерн активности фагоцитоза стал 1,0:3,0:4,8. Показатель фагоцитарной активности ПВ-M3 макрофагов по сравнению с M0 макрофагами, увеличился ($p < 0,05$) и составил 218,8±1,9.

Таким образом, фагоцитарная активность ПВ-M3 фенотипа – количество фагоцитирующих клеток, паттерн и показатель фагоцитарной активности – в нормальных условиях практически не отличалась от активности M1 фенотипа, но была существенно выше, по сравнению с M2 фенотипом

Из **табл. 1** также видно, что культивирование макрофагов нативного M0 фенотипа в опухолевой среде привело к двукратному снижению количества ($p < 0,01$)

Таблица 1

Влияние опухолевой среды на способность макрофагов разных фенотипов фагоцитировать бактерии *Staphylococcus aureus*

Группы	Фагоцитирующие макрофаги, %	МФМ 1 балл	СФМ 2 балла	АФМ 3 балла	Показатель фагоцитоза
Контроль M0	79,8±1,2	4,8±0,4	20,4±0,6	54,6±0,4	209,4±2,3
Опухолевая среда M0	39,8±1,2	24,8±0,4	10,0±0,8	5,0±0,4 #	59,8±2,2 #
Контроль M1	89,4±0,8 *	10,0±0,4	29,6±0,6	49,8±0,8	218,6±2,1 *
Опухолевая среда M1	47,2±0,6 #	24,6±0,6	19,6±0,6	15,0±0,4 #	108,8±0,9 #
Контроль M2	69,0±0,8 *	34,4±1,2	19,6±0,2	15,0±0,8 *	118,6±1,1 *
Опухолевая среда M2	30,8±0,8 #	22,0±0,4	8,8±0,4	0	39,6±1,0 #
Контроль ПВ-M3	90,0±0,4 *	10,2±1,0	30,8±0,6	49,0±0,8	218,8±1,9 *
Опухолевая среда ПВ-M3	79,8±1,0 #	29,8±1,0	25,2±0,4	24,8±0,4	154,6±1,4 #

Примечания: МФМ – мало-фагоцитирующие макрофаги, СФМ – средне-фагоцитирующие макрофаги, АФМ – активно-фагоцитирующие макрофаги. * – статистически значимые отличия от группы M0; # – статистически значимые различия между контролем и опухолевой средой.

фагоцитирующих *Staphylococcus aureus* M0 макрофагов. Наиболее сильно снизилось количество активно-фагоцитирующих макрофагов, более чем в 10 раз ($p < 0,01$). Соотношение между слабо-, средне- и активно-фагоцитирующими макрофагами существенно изменилось с 1,0:4,2:11,4 в контроле на 1,0:0,4:0,2 в опухолевой среде. Показатель фагоцитарной активности M0 макрофагов в опухолевой среде, по сравнению с контролем снизился в 3,5 раза ($p < 0,01$).

Культивирование M1 фенотипа в опухолевой среде также привело к почти двух-кратному снижению количества ($p < 0,01$) фагоцитирующих макрофагов. Как и в случае M0 фенотипа, наиболее сильно снизилось количество активно-фагоцитирующих макрофагов, более чем в 3 раза ($p < 0,011$). Соотношение между слабо-, средне- и активно-фагоцитирующими макрофагами существенно изменилось с 1,0:2,9:4,9 в контроле на 1,0:0,8:0,6 в опухолевой среде. Показатель фагоцитарной активности M1 макрофагов в опухолевой среде, по сравнению с контролем снизился в 2 раза ($p < 0,01$).

Культивирование M2 фенотипа в опухолевой среде также привело двукратному снижению количества ($p < 0,01$) фагоцитирующих макрофагов. При этом полностью исчезли активно-фагоцитирующие макрофаги. Соотношение между слабо-, средне- и активно-фагоцитирующими M2 макрофагами существенно изменилось с 1,0:0,6:0,4 в контроле на 1,0:0,4:0,0 в опухолевой среде. Показатель фагоцитарной активности M2 макрофагов в опухолевой среде, по сравнению с контролем снизился в 3 раза ($p < 0,01$).

В отличие от M0, M1 и M2 фенотипов, культивирование ПВ-М3 фенотипа в опухолевой среде привело лишь к небольшому (на 11%) снижению количества ($p < 0,01$) фагоцитирующих макрофагов. При этом количество активно-фагоцитирующих макрофагов снизилось лишь в 2 раза, а количество средне-фагоцитирующих клеток, практически не изменилось. Соотношение между слабо-, средне- и активно-фагоцитирующими ПВ-М3 макрофагами изменилось с 1,0:3,0:4,8 в контроле на 1,0:0,8:0,8 в опухолевой среде. Показатель фагоцитарной активности ПВ-М3 макрофагов в опухолевой среде, по сравнению с контролем снизился лишь на 30% ($p < 0,01$).

Таким образом, культивирование макрофагов в опухолевой среде снизило фагоцитарную активность всех фенотипов, но при этом выявило существенную устойчивость фагоцитарной активности ПВ-М3 фенотипа, по сравнению с другими фенотипами. Наряду с устойчивостью секреторной активности, выявленной нами ранее [11], устойчивость фагоцитарной активности к угнетающему действию опухолевой среды можно также считать важной характеристикой ПВ-М3 фенотипа макрофагов.

Обсуждение

Результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о высокой способности ПВ-М3 макрофагов

к фагоцитозу и согласуются с высказанной нами гипотезой, что в основе более эффективного противоопухолевого эффекта ПВ-М3 макрофагов может лежать более активная способность ПВ-М3 фенотипа фагоцитировать антиген. Вероятно, эта особенность ПВ-М3 фенотипа дает ПВ-М3 макрофагам определенное преимущество в процессе кросс-презентации антигена по сравнению с другими фенотипами. Имея в виду эту и другие особенности ПВ-М3 фенотипа, уже сейчас можно сформулировать несколько теоретических предпосылок эффективности ПВ-М3 макрофагов, которые нужно учитывать при разработке методов иммунотерапии рака.

Кросс-презентация антигена использует либо цитозольный, либо вакуолярный путь. Цитозольный путь состоит из пяти стадий: 1) захват антигена в фагосому; 2) сохранение антигена в фагосоме; 3) перенос антигена в цитозоль и его расщепление в протеосоме до олигопептидов; 4) перенос олигопептидов в МНС-I (главный комплекс гистосовместимости) –содержащие компартменты; 5) загрузка олигопептида на МНС-I и перенос на поверхность клетки. Вакуолярный путь отличается от цитозольного тем, что захваченный антиген не покидает фагосому, а там же расщепляется и нагружается на МНС-I [4]. Важно понимать стадии путей кросс-презентации, поскольку каждая стадия может стать мишенью для повышения эффективности иммунотерапии рака.

Результаты работы о том, что ПВ-М3 макрофаги по сравнению с M0, M1 и M2 макрофагами лучше фагоцитируют патогены в проопухолевой среде, предполагают, что ПВ-М3 макрофаги могут обеспечить более эффективную первую стадию кросс-презентации – захват антигена. Следующая стадия антиген-презентации в цитозольном пути – перенос антигена в цитозоль и расщепление в протеосоме. Свободно-радикальное повреждение мембран вакуоли является одним из способов выхода антигена в цитозоль [15]. Воспалительный фенотип, к которому относится ПВ-М3, продуцирует больше свободных радикалов, чем другие фенотипы [16] и поэтому может обеспечить большую вероятность разрыва мембран вакуолей и выход антигена в цитозоль.

Важным итогом антиген-презентации является активация CD8⁺ Т-клеток. Активация CD8⁺ Т-клеток зависит от количества МНС-I связавших антиген на АП клетке, коstimуляторных молекул CD80 и CD86, продукции IL-12 и CD4⁺ Th клеток [3, 17, 18]. МНС-I может попадать в фагосомы с поверхности клетки при фагоцитозе [19], особенно при стимуляции Toll-like рецепторов (TLR) [20]. Стимуляция TLR с помощью ЛПС входит в процедуру программирования ПВ-М3 фенотипа [11]. В ПВ-М3 макрофагах, вероятно, будет больше МНС-I в фагосомах потому, что ПВ-М3 макрофаги обладают большей способностью к фагоцитозу, и их TLR простимулированы ЛПС. Известно также, что воспалительный фенотип, к которому относится ПВ-М3, имеет много коstimуляторных молекул CD80, CD86 [21] и продуцирует больше IL-12, чем другие фенотипы.

И наконец, воспалительный фенотип, к которому относится ПВ-М3, по сравнению с другими фенотипами имеет более высокое содержание МНС-II [21]. Это может обеспечить более эффективное привлечение и активацию CD4⁺ Т-клеток.

Гипотеза о том, что ПВ-М3 фенотип обладает лучшей способностью к кросс-презентации по сравнению с другими фенотипами, пока имеет косвенное подтверждение и должна пройти экспериментальную проверку. Преимущество ПВ-М3 макрофагов в том, что обозначенные особенности воспалительного фенотипа с большой вероятностью будут сохраняться в опухолевой среде, в которой, как мы показали, ПВ-М3 фенотип в отличие от М1 фенотипа не репрограммируется на М2 фенотип, а продолжает сохранять воспалительный статус. Это делает ПВ-М3 фенотип весьма привлекательным кандидатом на разработку нового метода иммунотерапии рака, основанного на макрофагах.

Список литературы

- Chen D.S., Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity*. 2013; 39(1): 1–10. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.07.012
- Muntjewerff E.M., Meesters L.D., van den Bogaart G. Antigen Cross-Presentation by Macrophages. *Front. Immunol.* 2020; 11: 1276. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01276
- Embgenbroich M., Burgdorf S. Current concepts of antigen cross-presentation. *Front. Immunol.* 2018; 9: 1643. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01643
- Colbert J.D., Cruz F.M., Rock K.L. Cross-presentation of exogenous antigens on MHC-I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 2020; 64: 1–8. DOI: 10.1016/j.coi.2019.12.005
- Enders M., Franken L., Philipp M-S., Kessler N., Baumgart A-K., Eichler M., Wiertz E.J.H, Garbi N., Kurts C. Splenic red pulp macrophages cross-prime early effector CTL that provide rapid defense against viral infections. *J. Immunol.* 2020; 204(1): 87–100. DOI: 10.4049/jimmunol.1900021
- Dinther D., Veninga H., Iborra S., Borg E.G.F., Hoogterp L., Olesek K., Beijer M.R., Schetters S.T.T., Kalay H., Garcia-Vallejo J.J., Franken K.L., Cham L.B., Lang K.S., Kooyk Y., Sancho D., Crocker P.R., den Haan J.M.M. Functional CD169 on macrophages mediates interaction with dendritic cells for CD8+ T cell cross-priming. *Cell. Rep.* 2018; 22(6): 1484–1495. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.01.021
- Ebrahimkhani M.R., Mohar I., Crispe I.N. Cross-presentation of antigen by diverse subsets of murine liver cells. *Hepatology*. 2011; 54(4): 1379–1387. DOI: 10.1002/hep.24508
- Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8(12): 958–969. DOI: 10.1038/nri2448
- Malyshev I., Malyshev Y. Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage “Switch” Phenotype. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015: 341308. DOI: 10.1155/2015/341308
- Hu G., Su Y., Kang B.H., Fan Z., Dong T., Brown D.R., Cheah J., Wittrup K.D., Chen J. High-throughput phenotypic screen and transcriptional analysis identify new compounds and targets for macrophage reprogramming. *Nat. Commun.* 2021; 12(1): 773. DOI: 10.1038/s41467-021-21066-x
- Kalish S., Lyamina S., Manukhina E., Malyshev Y., Malyshev I. M3 Macrophages Stop Division of Tumor Cells In Vitro and Extend Survival of Mice with Ehrlich Ascites Carcinoma. *Med. Sci. Monit. Basic. Res.* 2017; 23: 8–19. DOI: 10.12659/MSMBR.902285
- Zhang X., Goncalves R., Mosser D.M. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.* 2008; Chapter 14: Unit 14.1. DOI: 10.1002/0471142735.im1401s83
- Лямина С.В., Веденикин Т.Ю., Бородовицына О.А., Суворова И.А., Шимшелашвили Ш.Л., Малышев И.Ю. Репрограммирование механизмов синтеза оксида азота у М1 и М2 фенотипов

перитонеальных макрофагов мышей *in vitro* в присутствии разных концентраций сыворотки. *Медицинская иммунология*. 2012; 14(1–2): 127–132.

14. Раецкая А.А., Калиш С.В., Лямина С.В., Малышева Е.В., Буданова О.П., Бахтина Л.Ю., Малышев И.Ю. Репрограммированные *in vitro* на М3 фенотип макрофаги останавливают рост солидной карциномы *in vivo*. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(1): 41–46. DOI: 10.25557/0031-2991.2018.01.41-46
15. Moore M.W., Carbone F.R., Bevan M.J. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell*. 1988; 54(6): 777–785. DOI: 10.1016/s0092-8674(88)91043-4
16. Wynn T.A., Vannella K.M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*. 2016; 44(3): 450–462. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.02.015
17. Ahrends T., Spanjaard A., Pilzecker B., Bąbała N., Bovens A., Xiao Y., Jacobs H., Borst J. CD4(+) T cell help confers a cytotoxic T cell effector program including coinhibitory receptor downregulation and increased tissue invasiveness. *Immunity*. 2017; 47(1): 848–861. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.10.009
18. Wang L., Du F., Wang H., Xie C. Cooperation of CD4+ T cells and CD8+ T cells and release of IFN-γ are critical for antileukemia responses of recipient mice treated by microtransplantation. *Exp. Ther. Med.* 2018; 15(2): 1532–1537. DOI: 10.3892/etm.2017.5541
19. Lizee G., Basha G., Tiong J., Julien J.P., Tian M., Biron K.E., Jefferies W.A. Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain. *Nat. Immunol.* 2003; 4(11): 1065–1073. DOI: 10.1038/ni989
20. Gupta P.N., Baccarini A., Tung N., Seyffer F., Florey O., Huang Y., Banerjee M., Overholzer M., Roche P.A., Tampé R., Brown B.D., Amsen D., Whiteheart S.W., Blander J.M. TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow crosspresentation. *Cell*. 2014, 158(3): 506–521. DOI: 10.1016/j.cell.2014.04.054
21. Chen Y., Song Y., Du W., Gong L., Chang H., Zou Z. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *J. Biomed. Sci.* 2019; 26(1): 78. DOI: 10.1186/s12929-019-0568-z

References

1. Chen D.S., Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity*. 2013; 39(1): 1–10. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.07.012
2. Muntjewerff E.M., Meesters L.D., van den Bogaart G. Antigen Cross-Presentation by Macrophages. *Front. Immunol.* 2020; 11: 1276. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01276
3. Embgenbroich M., Burgdorf S. Current concepts of antigen cross-presentation. *Front. Immunol.* 2018; 9: 1643. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01643
4. Colbert J.D., Cruz F.M., Rock K.L. Cross-presentation of exogenous antigens on MHC-I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 2020; 64: 1–8. DOI: 10.1016/j.coi.2019.12.005
5. Enders M., Franken L., Philipp M-S., Kessler N., Baumgart A-K., Eichler M., Wiertz E.J.H, Garbi N., Kurts C. Splenic red pulp macrophages cross-prime early effector CTL that provide rapid defense against viral infections. *J. Immunol.* 2020; 204(1): 87–100. DOI: 10.4049/jimmunol.1900021
6. Dinther D., Veninga H., Iborra S., Borg E.G.F., Hoogterp L., Olesek K., Beijer M.R., Schetters S.T.T., Kalay H., Garcia-Vallejo J.J., Franken K.L., Cham L.B., Lang K.S., Kooyk Y., Sancho D., Crocker P.R., den Haan J.M.M. Functional CD169 on macrophages mediates interaction with dendritic cells for CD8+ T cell cross-priming. *Cell. Rep.* 2018; 22(6): 1484–1495. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.01.021
7. Ebrahimkhani M.R., Mohar I., Crispe I.N. Cross-presentation of antigen by diverse subsets of murine liver cells. *Hepatology*. 2011; 54(4): 1379–1387. DOI: 10.1002/hep.24508
8. Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8(12): 958–969. DOI: 10.1038/nri2448
9. Malyshev I., Malyshev Y. Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage “Switch” Phenotype. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015: 341308. DOI: 10.1155/2015/341308
10. Hu G., Su Y., Kang B.H., Fan Z., Dong T., Brown D.R., Cheah J., Wittrup K.D., Chen J. High-throughput phenotypic screen and

- transcriptional analysis identify new compounds and targets for macrophage reprogramming. *Nat. Commun.* 2021; 12(1): 773. DOI: 10.1038/s41467-021-21066-x
11. Kalish S., Lyamina S., Manukhina E., Malyshev Y., Malyshev I. M3 Macrophages Stop Division of Tumor Cells In Vitro and Extend Survival of Mice with Ehrlich Ascites Carcinoma. *Med. Sci. Monit. Basic. Res.* 2017; 23: 8–19. DOI: 10.12659/MSMBR.902285
 12. Zhang X., Goncalves R., Mosser D.M. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.* 2008; Chapter 14: Unit 14.1. DOI: 10.1002/0471142735.im1401s83
 13. Lyamina S.V., Vedenikin T.Yu., Borodovitsyna O.A., Suvorova I.A., Shimshelashvili Sh.L., Malyshev I.Yu. [Reprogramming of mechanisms of nitric oxide synthesis in M1 and M2 phenotypes of peritoneal macrophages of mice *in vitro* in the presence of different serum concentrations]. *Meditsinskaya immunologiya [Medical Immunology]*. 2012; 14(1–2): 127–132. (in Russian)
 14. Raetskaya A.A., Kalish S.V., Lyamina S.V., Malysheva E.V., Budanova O.P., Bakhtina L.Yu., Malyshev I.Yu. [Reprogrammed *in vitro* for M3 phenotype macrophages stop the growth of solid carcinoma *in vivo*]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya [Pathological physiology and experimental therapy]*. 2018; 62(1): 41–46. DOI: 10.25557/0031-2991.2018.01.41-46 (in Russian)
 15. Moore M.W., Carbone F.R., Bevan M.J. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell.* 1988; 54(6): 777–785. DOI: 10.1016/s0092-8674(88)91043-4
 16. Wynn T.A., Vannella K.M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity.* 2016; 44(3): 450–462. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.02.015
 17. Ahrends T., Spanjaard A., Pilzecker B., Bąbała N., Bovens A., Xiao Y., Jacobs H., Borst J. CD4(+) T cell help confers a cytotoxic T cell effector program including coinhibitory receptor downregulation and increased tissue invasiveness. *Immunity.* 2017; 47(1): 848–861. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.10.009
 18. Wang L., Du F., Wang H., Xie C. Cooperation of CD4+ T cells and CD8+ T cells and release of IFN- γ are critical for antileukemia responses of recipient mice treated by microtransplantation. *Exp. Ther. Med.* 2018; 15(2): 1532–1537. DOI: 10.3892/etm.2017.5541
 19. Lizee G., Basha G., Tiong J., Julien J.P., Tian M., Biron K.E., Jefferies W.A. Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain. *Nat. Immunol.* 2003; 4(11): 1065–1073. DOI: 10.1038/ni989
 20. Gupta P.N., Baccarini A., Tung N., Seyffer F., Florey O., Huang Y., Banerjee M., Overholtzer M., Roche P.A., Tampé R., Brown B.D., Amsen D., Whiteheart S.W., Blander J.M. TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow crosspresentation. *Cell.* 2014, 158(3): 506–521. DOI: 10.1016/j.cell.2014.04.054
 21. Chen Y., Song Y., Du W., Gong L., Chang H., Zou Z. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *J. Biomed. Sci.* 2019; 26(1): 78. DOI: 10.1186/s12929-019-0568-z

Сведения об авторах:

Шабунина Элина Алексеевна — лаборант кафедры патологической физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кузнецова Лариса Вячеславовна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных биотехнологий Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0002-3030-2064>

Калиш Сергей Валерьевич — старший лаборант кафедры патологической физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Буданова Ольга Петровна — старший научный сотрудник лаборатории регуляторных механизмов стресса и адаптации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0002-6650-5082>

Бахтина Лидия Юрьевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляторных механизмов стресса и адаптации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Мальшев Игорь Юрьевич — доктор медицинских наук, заведующий кафедрой патологической физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; заведующий лабораторией регуляторных механизмов стресса и адаптации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <http://orcid.org/0000-0002-2381-9612>