

УДК 616-092

Наночастицы GO повышают эффективность фагоцитоза макрофагами в нормальной и опухолевой среде

Кузнецова Л.В.¹, Буданова О.П.², Бахтина Л.Ю.², Лобанов Е.В.¹, 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

Эксперименты на мышах, проведенные ранее, позволили выдвинуть предположение, что в основе противоопухолевого эффекта МЗ макрофагов лежит их повышенная способность фагоцитировать антигены патогенных клеток. Однако использование МЗ макрофагов для лечения опухоли у человека затруднено: 1) получением достаточного количества предшественников макрофагов; 2) дифференцировкой предшественников в макрофаги и их репрограммированием на МЗ фенотип *in vitro*; 3) доставкой макрофагов в опухоль. Понимание этих проблем и данные о том, что в зоне опухоли есть много макрофагов М0 и М2 фенотипа делает перспективным разработку нового способа терапии опухоли путем повышения способности к фагоцитозу макрофагов М0 и М2 фенотипа. Литературный поиск сведений о факторах повышения фагоцитарной активности макрофагов выявил потенциального претендента на эту роль – наночастицы оксида графена (GO).

Целью настоящей работы была проверка гипотезы о возможности активации фагоцитарной функции макрофагов наночастицами GO.

Материалы и методы. В работе использовали макрофаги мышей, выделенные из перитонеального смыва. Для получения фенотипа М0, макрофаги культивировали в среде DMEM/F12. Для получения фенотипа М2, макрофаги культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 40% FBS. Фенотип МЗ макрофагов получали добавлением в среду культивирования IFN- γ , ингибиторов STAT3, STAT6 и SMAD3. Далее все фенотипы макрофагов стимулировали липополисахаридом (ЛПС). После окончания стимуляции макрофагов ЛПС, оценивали способность разных фенотипов к фагоцитозу. Оценку проводили с помощью набора окрашенных бактерий pHrodo® Red Staphylococcus aureus BioParticles (Invitrogen). GO получали методом электрохимического расслоения рабочих электродов из высокоориентированного пиролитического графита. Макрофаги культивировали в присутствии GO в течение 2 часов, после чего отмывали и определяли коэффициент фагоцитоза по стандартной методике с использованием флуоресцентных частиц pHrodo™ BioParticles®. Фагоцитарную функцию оценивали у разных фенотипов макрофагов в нормальной и опухолевой среде.

Результаты. Добавление GO приводило к повышению фагоцитарной способности макрофагов с фенотипами М0 и М2 на 20% и 19%, соответственно, по сравнению с контролем, тогда как коэффициент фагоцитоза макрофагов с фенотипом МЗ практически не изменялся. Кроме того, наночастицы GO снижали депрессивный эффект опухолевой среды на фагоцитарную активность макрофагов. Этот эффект существенно зависел от фенотипа макрофагов. Для М0 макрофагов происходило почти двукратное повышение активности, для М2 фенотипа фагоцитарная активность в опухолевой среде при добавлении GO увеличивалась более, чем на 50%, а для МЗ фенотипа, добавление GO практически не влияло на уже достаточно высокую активность в опухолевой среде.

Заключение. Наночастицы GO способны повышать исходную и восстанавливать ослабленную в опухолевой среде способность М0 и М2 макрофагов к фагоцитированию.

Ключевые слова: макрофаги; наночастицы; репрограммирование; фагоцитоз; опухоль.

Для цитирования: Кузнецова Л.В., Буданова О.П., Бахтина Л.Ю., Лобанов Е.В., Малышев И.Ю. Наночастицы GO повышают эффективность фагоцитоза макрофагами в нормальной и опухолевой среде. Патогенез. 2023; 21(1): 22-27.

DOI: 10.25557/2310-0435.2023.01.22-27

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 им. А.И. Евдокимова

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы благодарны профессору университета Сапиенцы города Рима Стефании Марденте за предоставление в дар наночастиц GO.

Поступила: 11.11.2022

GO nanoparticles increase the efficiency of phagocytosis by macrophages in normal and tumor environment

Kuznetsova L.V.¹, Budanova O.P.², Bakhtina L.Yu.², Lobanov E.V.¹, 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

Previous experiments on mice suggested that the antitumor effect of M3 macrophages is based on their increased ability to phagocytize pathogenic cell antigens. However, the use of M3 macrophages for treatment of tumors in humans is complicated by: 1) obtaining a sufficient number of macrophage precursors; 2) differentiation of progenitors into macrophages and their reprogramming into the M3 phenotype *in vitro*; 3) delivery of macrophages to the tumor. Understanding these problems and the fact that there are numerous macrophages of the M0 and M2 phenotypes in the tumor zone make it promising to develop a new method of therapy for tumors by enhancing the ability of M0 and M2 macrophages to phagocytosis. A literature search for factors that increase the macrophage phagocytic activity has revealed a potential candidate for this role, graphene oxide (GO) nanoparticles.

The aim of this work was to test the hypothesis about a possibility of enhancing the macrophage phagocytic function with GO nanoparticles.

Methods. Murine macrophages isolated from peritoneal lavage were used in this work. To produce the M0 phenotype, macrophages were cultured in the DMEM/F12 medium. To produce the M2 phenotype, macrophages were cultured in the DMEM/F12 medium supplemented with 40% FBS. The M3 macrophage phenotype was obtained by adding IFN- γ and STAT3, STAT6, and SMAD3 inhibitors to the culture medium. Then all macrophage phenotypes were stimulated with lipopolysaccharide (LPS). After the end of LPS stimulation of macrophages, the phagocytic ability of different phenotypes was evaluated using a pHrodo[®] Red *Staphylococcus aureus* Bioparticles stained bacteria kit (Invitrogen). GO was obtained by electrochemical stratification of working electrodes from highly oriented pyrolytic graphite. Macrophages were cultured in the presence of GO for 2 hours, then washed, and the phagocytic index was determined according to the standard method with pHrodoTM BioParticles[®] fluorescent particles. The phagocytic activity was assessed for different macrophage phenotypes in normal and tumor environments.

Results. The addition of GO increased the phagocytic ability of macrophages with the M0 and M2 phenotypes by 20% and 19%, respectively, compared with the control, whereas the phagocytosis coefficient of macrophages with the M3 phenotype practically did not change. In addition, GO nanoparticles reduced the depressive effect of the tumor environment on the phagocytic activity of macrophages. This effect significantly depended on the macrophage phenotype. For M0 macrophages, there was an almost twofold increase in the activity for the M2 phenotype, the phagocytic activity in the tumor medium increased by more than 50% with the addition of GO; and for the M3 phenotype, the addition of GO had practically no effect on its already sufficiently high activity in the tumor medium.

Conclusion. GO nanoparticles were able to increase the baseline activity of M0 and M2 macrophages and to restore their phagocytic capability that had been weakened in the tumor environment.

Key words: macrophages; nanoparticles; reprogramming; phagocytosis; tumor.

For citation: Kuznetsova L.V., Budanova O.P., Bakhtina L.Yu., Lobanov E.V., Malyshev I.Yu. [GO nanoparticles increase the efficiency of phagocytosis by macrophages in normal and tumor environment]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2023; 21(1): 22-27. (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2023.01.22-27

For correspondence: Malyshev Igor Yurievich, e-mail: iymalyshev1@gmail.com

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

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

Acknowledgments. The authors are grateful to Professor Stefania Mardente of the Sapienza University of Rome for donating the GO nanoparticles.

Accepted: 11.11.2022

Сокращения: GO – оксид графена; CTL – Цитотоксический Т-лимфоцит; SMAD3, STAT3 и STAT6 – ингибиторы факторов транскрипции; M0, M1, M2, M3 – фенотипы макрофагов; IFN- γ – интерферон гамма; CD8⁺ – Т-лимфоциты киллеры; DMEM/F12 – питательная среда; FBS – фетальная бычья сыворотка.

Введение

Надежность защиты организма от патогенных микробов или опухолевых клеток зависит от способности иммунной системы продуцировать цитотоксические антиген-специфические Т-клетки (Цитотоксический Т-лимфоцит, CTL). Среди всех клеток иммунной системы CTL обладают наибольшей эффективностью

уничтожать патогенные клетки [1]. В процессе образования CTL, стадия антиген-презентации микробного или опухолевого антигена для Т-клеток исключительно важна. Презентацию антигенов, наряду с дендритными клетками, могут осуществлять макрофаги с помощью внутриклеточного протеосомного или вакуолярного пути [2, 3]. Оба пути начинаются с фагоцитоза антигена [4].

Способность макрофагов фагоцитировать и кросс-презентировать антиген зависит от функционального фенотипа макрофагов [5-8]. Презентация антигена провоспалительным M1 фенотипом приводит к реактивации CTL [3], а презентация антигена M2 макрофагами формирует толерантность к комменсальным микробам и компонентам пищи [2].

Ранее мы показали возможность существования М3 фенотипа переключения [9]. М3 макрофаги, в отличие от М1 и М2 макрофагов, на действие противовоспалительных факторов продуцируют провоспалительные цитокины [9]. Предположительно М3 фенотип появляется в условиях снижения бактерицидной, противовирусной или антиопухолевой активности иммунитета. Мы разработали технологию программирования М3 фенотипа *in vitro* с помощью ингибиторов факторов транскрипции SMAD3, STAT3 и STAT6 [10]. Эта технология позволяет перенаправить сигнал от противовоспалительных цитокинов на активацию факторов транскрипции провоспалительного фенотипа и получили М3 фенотип [11]. Оказалось, что М3 фенотип намного эффективнее защищает мышей от карциномы, по сравнению с М1 фенотипом, и тем более М2 фенотипом, который способствовал развитию опухоли [11]. Мы предположили, что в основе эффективного антиопухолевого эффекта М3 макрофагов лежит повышенная способность М3 фенотипа фагоцитировать патогенные клетки [12]. Эти данные создают основу для разработки клинической версии технологии М3 макрофагов для терапии опухолей.

Вместе с тем использование технологии М3 макрофагов для лечения опухоли у человека может иметь несколько ограничений. Это: 1. Проблема получения достаточного количества предшественников макрофагов из крови или костного мозга; 2. Проблема дифференцировки предшественников в макрофаги и репрограммирование на М3 фенотип *in vitro*; 3. Проблема доставки макрофагов в область опухолевого роста. Понимание этих проблем и данные о том, что в зоне опухоли есть много М0 и М2 макрофагов [13] наводит на мысль, о том, что повышение способности к фагоцитозу М0 и М2 макрофагов, которые в больших количествах уже находятся в зоне опухоли, может оказаться перспективным направлением к разработке нового способа терапии опухоли.

В отношении поиска способа повышения фагоцитарной активности макрофагов мы обратили внимание на наночастицы. Действительно, с развитием нанотехнологий появляются новые идеи, связанные с биомедицинским использованием наноматериалов. Многие наноматериалы обладают хорошей биосовместимостью и уникальными физико-химическими свойствами. В настоящее время идет активный поиск безопасных наноматериалов, пригодных к использованию в качестве адъювантов, способных повысить иммуногенность вакцинных и опухолевых антигенов, в частности, активизировать формирование клеточного иммунного ответа, опосредуемого CD8⁺ цитотоксическими Т-клетками.

Одним из претендентов на роль адъюванта — активатора клеточного иммунитета — является оксид графена (GO) [14]. Благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам GO широко используется в медицине для целей фототермического лечения рака, доставки лекарств, антибактериальной терапии и медицинской визуализации. GO также проявляет значительную адъювантную активность. В частности, известно, что GO

может активировать клеточный иммунитет путем акселерации ключевых свойств дендритных клеток, таких как зрелость и способность к миграции *in vivo* [15] способность к формированию иммунологического синапса между дендритными клетками и Т-лимфоцитами, что приводит к 20-кратному повышению количества антиген-специфических CD8⁺ цитотоксических Т-клеток [16]. Кроме того, GO в составе комплекса оксид графена/гидроксид алюминия Al(OH)₃/антиген обеспечивает эффективную доставку вакцинного антигена в цитозоль дендритных клеток с последующей кросс-презентацией антигена и активацией клеточного иммунитета [17].

Как отмечено выше, повлиять на формирование клеточного иммунитета можно путем регуляции функции антиген-презентации, первым этапом которой является интернализация вакцинного и опухолевого антигена антиген-презентирующими клетками [18]. Одним из способов интернализации антигена антиген-презентирующими клетками является фагоцитоз.

Таким образом, целью настоящей работы была проверка гипотезы о возможности активации фагоцитарной функции макрофагов наночастицами GO. Исследовались макрофаги с различными фенотипами (M0, M2, M3) в нормальных условиях и в условиях опухолевой среды.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили на линейных мышах самцах C57/BL6j, 21 ± 2 г, в возрасте 2 месяцев из вивария МГМСУ им. А.И. Евдокимова. Все манипуляции проводили в соответствии с международными и национальными этическими требованиями, а также требованиями Локального этического комитета (протоколы № 4 от 12.09.22 и № 5 от 09.11.22).

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 выделяли из перитонеального смыва [19] и помещали в культуральные планшеты со средой с 10% FBS, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37°C и 5% CO₂.

Для получения М2 фенотипа, в DMEM/F12 добавляли сыворотку до 40% FBS и культивировали 12 часов и затем макрофаги стимулировали 500 нг/мл ЛПС 24 часа [20]. Для получения М3 фенотипа, в 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 часов. После этого макрофаги стимулировали 500 нг/мл ЛПС 24 часа [21]. Контрольные М0 макрофаги культивировали 36 часов в DMEM/F12, содержащей 10% FBS.

Результаты исследования

ГО получали методом электрохимического расслоения рабочих электродов из высокоориентированного пиролитического графита [22–24]. Одну аликвоту буфера для электрофореза, содержащего эксфолиированный ГО, разбавляли в соотношении 1:10 000 фосфатно-солевым буфером для получения концентрации ГО 1 мг/мл. Полученную суспензию добавляли к клеточному монослою. Чтобы свести к минимуму цитотоксичность, индуцированную ГО, использовали минимальную конечную концентрацию 2 мкг/мл среды ГО, которая позволяла увеличить коэффициент фагоцитоза макрофагов, но не вызывала некроза клеток. Макрофаги культивировали в присутствии ГО в течение 2 часов, после чего отмывали и определяли коэффициент фагоцитоза по стандартной методике с использованием флуоресцентных частиц pHrodo™ BioParticles®. Фагоцитарную функцию оценивали у разных фенотипов макрофагов в нормальной и опухолевой среде. Оценку проводили путем подсчета профагоцитировавших макрофагов на фотографиях, полученных с помощью системы визуализации клеток Zoe (Bio-Rad, США). Флуоресцентные частицы pHrodo™ BioParticles® были разморожены и приготовлены в концентрации 10 мкг/мл согласно протоколу производителя. Культуральную среду в лунках заменяли на 100 мкл суспензии флуоресцентных частиц pHrodo™ BioParticles® и переносили в CO₂ инкубатор на 1 час при 37°C. Затем лунки фотографировали из расчета 5 полей на лунку, 3 лунки на эксперимент и данные усредняли. Подсчитывали клетки, поглотившие флуоресцентные частицы. Среди фагоцитирующих макрофагов выделяли 3 группы: мало-, средне- и активно-фагоцитирующие клетки. К мало-фагоцитирующим относили макрофаги, поглотившие от 1 до 4 бактерий, к средне-фагоцитирующим – от 5 до 10, и к активно-фагоцитирующим – 11 и более бактерий. После этого рассчитывали показатель фагоцитоза, присваивая макрофагам с малой фагоцитирующей способностью 1 балл, со средне-фагоцитирующей способностью – 2 балла и с активно-фагоцитирующей способностью – 3 балла. Показатель активности фагоцитоза макрофагов определяли в условных единицах и рассчитывали по формуле:

$$\begin{aligned} & [\text{количество мало-фагоцитирующих макрофагов}] \times 1 \\ & + [\text{количество средне-фагоцитирующих макрофагов}] \times 2 \\ & + [\text{количество активно-фагоцитирующих макрофагов}] \times 3. \end{aligned}$$

Для оценки влияния опухолевой среды на фагоцитарную активность макрофагов к среде культивирования макрофагов на этапе стимуляции с ЛПС добавляли 10% кондиционированной среды, полученной при культивировании клеток опухоли Эрлиха в течение 24 часов.

Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка измерения и проанализированы с помощью Two Factor ANOVA и post-hoc критерия Тьюки. При $p < 0,05$ различия считали статистически значимыми.

Результаты экспериментов по оценке влияния наночастиц ГО на фагоцитарную активность макрофагов различных фенотипов в нормальной и опухолевой среде представлены в табл. 1.

Результаты, представленные в табл. 1, позволяют обнаружить несколько важных закономерностей.

Во-первых, видно, что фенотип макрофагов влияет на их способность к фагоцитозу: изменение M0 фенотипа в сторону M2 снижает фагоцитарную активность макрофагов, а в сторону M3, напротив, увеличивает.

Во-вторых, опухолевая среда существенно снижает фагоцитарную способность макрофагов. Наиболее сильно это проявляется в отношении M0 и M2 фенотипов, коэффициент фагоцитоза которых снижался в 2,9 и 2,6 раз, соответственно. Фагоцитарная активность M3 макрофагов в опухолевой среде снижалась существенно меньше, всего на 29%.

В-третьих, добавление ГО приводило к повышению фагоцитарной способности макрофагов с фенотипами M0 и M2 на 20% и 19%, соответственно, по сравнению с контролем, тогда как коэффициент фагоцитоза макрофагов с фенотипом M3 практически не изменялся.

И, наконец, в-четвертых, наночастицы ГО снижали депрессивный эффект опухолевой среды на фагоцитарную активность макрофагов. Однако опять, этот эффект существенно зависел от фенотипа макрофагов. Для M0 макрофагов происходило почти двукратное повышение активности, для M2 фенотипа фагоцитарная активность в опухолевой среде при добавлении ГО увеличивалась более, чем на 50%, а для M3 фенотипа, добавление ГО практически не влияло на уже достаточно высокую активность в опухолевой среде (табл. 1).

Обсуждение

Результаты, полученные в этой работе, о том, что M3 фенотип обладает более высокой фагоцитарной активностью, и более устойчив к угнетающему действию опухолевой среды, по сравнению с другими фенотипами, по сути,

Таблица 1

Влияния наночастиц ГО на фагоцитарную активность макрофагов различных фенотипов в нормальной и опухолевой среде

Группы	Показатель активности фагоцитоза макрофагов, условные единицы		
	M0 (n = 5)	M2 (n = 5)	M3 (n = 3)
Контроль	163,2 \pm 1,7	120,6 \pm 2,6 [§]	221,0 \pm 1,1 [§]
Опухолевая среда	61,4 \pm 2,4 *	41,4 \pm 2,1 *	157,8 \pm 3,1 *
ГО	195,8 \pm 1,9 *	143,8 \pm 2,3 *	226,8 \pm 1,7
Опухолевая среда + ГО	112,8 \pm 2,6 #	66,6 \pm 2,0 #	159,4 \pm 3,5

Примечания. Обозначения статистической значимости межгрупповых различий: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # – $p < 0,05$ по сравнению с опухолевой средой; § – $p < 0,05$ по сравнению с контролем фенотипа M0; n – количество экспериментов.

воспроизвели наши, ранее опубликованные данные [12]. Данные этой работы, вместе с предыдущими [12] позволяют утверждать, что 1) устойчивость фагоцитарной активности к угнетающему действию опухолевой среды является важной характеристикой М3 фенотипа макрофагов и 2) репрограммирование макрофагов может оказаться хорошим инструментом управления фагоцитарной активностью макрофагов в терапевтических целях.

Главный новый результат этой работы состоит в том, что наночастицы GO повышали исходную и восстанавливали ослабленную в опухолевой среде способность макрофагов к фагоцитированию. Особенность эффекта была в том, что GO существенно повышал способность к фагоцитозу у М0 и М2 фенотипов с исходно низкой активностью, и практически не влиял на М3 фенотип с исходно высокой активностью. Фенотип-зависимый характер влияния GO имеет большую практическую терапевтическую привлекательность, поскольку в зоне опухоли существенно преобладают М2 и М0 макрофаги с ослабленной активностью [13]

С теоретической точки зрения, важно ответить на вопрос: через какие механизмы GO может повышать фагоцитарную активность макрофагов. В этом отношении в будущих экспериментах будет интересно оценить влияние GO на клатрин-зависимый и на актин-ассоциированный фагоцитоз и особенности этого влияния на разных фенотипах макрофагов.

Заключение

Наночастицы GO способны повышать исходную и восстанавливать ослабленную в опухолевой среде способность М0 и М2 макрофагов к фагоцитированию.

Авторский вклад

Кузнецова Л.В. – разработка методики, сбор данных, анализ данных, дифференцирована и фенотипирование макрофагов, написание текста статьи. Буданова О.П. – сбор данных, анализ данных, редактирование текста статьи. Бахтина Л.Ю. – анализ данных, редактирование текста статьи. Лобанов Е.В. – сбор данных, анализ данных, написание текста статьи. Малышев И.Ю. – обозначение темы, управление проектом, консультирование, редактирование текста статьи.

Список литературы

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. van 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., van 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: 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., Raetskaya A., 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. 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
13. Zhu S., Luo Z., Li X., Han X., Shi S., Zhang T. Tumor-associated macrophages: role in tumorigenesis and immunotherapy implications. *J. Cancer*. 2021; 12(1): 54–64. DOI: 10.7150/jca.49692
14. Cao W., He L., Cao W., Huang X., Jia K., Dai J. Recent progress of graphene oxide as a potential vaccine carrier and adjuvant. *Acta Biomater.* 2020; 112: 14–28. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.06.009
15. Axiachui W., Qianqian Z., Linsheng Z., Chulin H.E. Application of graphene oxide in preparing dendritic cell function accelerator. Режим доступа: <https://lens.org/155-168-425-134-662> Дата обращения: 07.07.2021
16. Qianqian Z., Sujing S.U.N., Xiaohui W., Linsheng Z. Application of graphene oxide sheet in preparation of DC vaccine immunologic adjuvant, DC vaccine and preparation method of DC vaccine. Режим доступа: <https://lens.org/191-419-479-381-14X> Дата обращения: 07.07.2021
17. Guilei M.A., Xiaoli W., Fengqiang C.A.O., Mengmeng Y.A.N. Tumor vaccine based on nano-graphene oxide-Al(OH)₃/antigen composite and preparation method thereof. Режим доступа: <https://lens.org/135-902-702-252-412> Дата обращения: 07.07.2021
18. Uribe-Querol E., Rosales C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front. Immunol.* 2020; 11: 1066. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01066
19. 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
20. 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.
21. Раяцкая А.А., Калиш С.В., Лямина С.В., Малышева Е.В., Буданова О.П., Бахтина Л.Ю., Малышев И.Ю. Репрограммирование 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
22. Valentini F., Mari E., Zicari A., Calcaterra A., Talamo M., Sciolli M.G., Orlandi A., Mardente S. Metal Free Graphene Oxide (GO) Nanosheets and Pristine-Single Wall Carbon Nanotubes (p-SWCNTs) Biocompatibility Investigation: A Comparative Study in Different Human Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(5): 1316. DOI: 10.3390/ijms19051316
23. Valentini F., Calcaterra A., Ruggiero V., Pichichero E., Martino A., Iosi F., Bertuccini L., Antonaroli S., Mardente S., Zicari A., Mari E., Iovenitti G., Leone G., Botta M., Talamo M. Functionalized Graphene

Derivatives: Antibacterial Properties and Cytotoxicity. *J. Nanomater.* 2019; 2019: 1–14. DOI: 10.1155/2019/2752539

24. Mardente S., Aventaggiato M., Mari E., Francioso A., Tafani M., Mosca L., Zicari A., Malyshev I., Kuznetsova L., Valentini F. GO Nanosheets: Promising Nano Carrier for the S29, 1-(2-Chloro-2-(4-chlorophenyl-ethyl)-N-(4-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amine, Therapeutic Agent in Neuroblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(17): 6430. DOI: 10.3390/ijms21176430

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. van 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., van 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: 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., Wittrop 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., Raetskaya A., 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. Shabunina, E., Kuznetsova, L., Kalish, S., Budanova, O., Bakhtina, L., Malyshev, I. [The M3 macrophage phenotype increases the efficiency of phagocytosis, the first stage of antigen cross-presentation]. *Patogenez [Pathogenesis].* 2021; 19(4): 23–29. DOI: 10.25557/2310-0435.2021.04.23-29 (in Russian)
13. Zhu S., Luo Z., Li X., Han X., Shi S., Zhang T. Tumor-associated macrophages: role in tumorigenesis and immunotherapy implications. *J. Cancer.* 2021; 12(1): 54–64. DOI: 10.7150/jca.49692
14. Cao W., He L., Cao W., Huang X., Jia K., Dai J. Recent progress of graphene oxide as a potential vaccine carrier and adjuvant. *Acta Biomater.* 2020; 112: 14–28. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.06.009
15. Xiaohui W., Qianqian Z., Linsheng Z., Chulin H.E. Application of graphene oxide in preparing dendritic cell function accelerant. Available at: <https://lens.org/155-168-425-134-662> Retrieved: 07.07.2021
16. Qianqian Z., Sujing S.U.N., Xiaohui W., Linsheng Z. Application of graphene oxide sheet in preparation of DC vaccine immunologic adjuvant. DC vaccine and preparation method of DC vaccine. Available at: <https://lens.org/191-419-479-381-14X> Retrieved: 07.07.2021
17. Guilei M.A., Xiaoli W., Fengqiang C.A.O., Mengmeng Y.A.N. Tumor vaccine based on nano-graphene oxide-Al(OH)₃/antigen composite and preparation method thereof. Available at: <https://lens.org/135-902-702-252-412> Retrieved: 07.07.2021
18. Uribe-Querol E., Rosales C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front. Immunol.* 2020; 11: 1066. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01066
19. 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
20. Lyamina S.V., Vedenikin T.Yu., Borodovitsyna O.A., Suvorova I.A., Shimshelashvili Sh.L., Malyshev I.Yu. [In vitro reprogramming of nitric oxide-synthetic mechanisms for M1 and M2 phenotypes of murine peritoneal macrophages: dependence on different serum concentrations]. *Meditsinskaya immunologiya [Medical Immunology].* 2012; 14(1–2): 127–132. (in Russian)
21. Raetskaya A.A., Kalish S.V., Lyamina S.V., Malysheva E.V., Budanova O.P., Bakhtina L.Yu., Malyshev I.Yu. [Reprogrammed in vitro on 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)
22. Valentini F., Mari E., Zicari A., Calcaterra A., Talamo M., Sciolli M.G., Orlandi A., Mardente S. Metal Free Graphene Oxide (GO) Nanosheets and Pristine-Single Wall Carbon Nanotubes (p-SWCNTs) Biocompatibility Investigation: A Comparative Study in Different Human Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(5): 1316. DOI: 10.3390/ijms19051316
23. Valentini F., Calcaterra A., Ruggiero V., Pichichero E., Martino A., Iosi F., Bertuccini L., Antonaroli S., Mardente S., Zicari A., Mari E., Iovenitti G., Leone G., Botta M., Talamo M. Functionalized Graphene Derivatives: Antibacterial Properties and Cytotoxicity. *J. Nanomater.* 2019; 2019: 1–14. DOI: 10.1155/2019/2752539
24. Mardente S., Aventaggiato M., Mari E., Francioso A., Tafani M., Mosca L., Zicari A., Malyshev I., Kuznetsova L., Valentini F. GO Nanosheets: Promising Nano Carrier for the S29, 1-(2-Chloro-2-(4-chlorophenyl-ethyl)-N-(4-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amine, Therapeutic Agent in Neuroblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(17): 6430. DOI: 10.3390/ijms21176430

Сведения об авторах:

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>

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»

Лобанов Евгений Валерьевич — аспирант кафедры патологической физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0003-2249-004X>

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>