

ВЛИЯНИЕ GcMAF-RF НА EX VIVO ПОЛЯРИЗАЦИЮ МАКРОФАГОВ, АКТИВАЦИЮ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК И ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Кирикович С.С.¹, Левитес Е.В.¹, Долгова Е.В.¹, Проскурина А.С.¹,
Риттер Г.С.¹, Рузанова В.С.^{1,2}, Леплина О.Ю.³, Шевела Е.Я.³,
Останин А.А.³, Рябичева Т.Г.⁴, Рыжикова С.Л.⁴, Дружинина Ю.Г.⁴,
Вараксин Н.А.⁴, Черных Е.Р.³, Богачев С.С.¹

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

² ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

³ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

⁴ АО «Вектор-Бест», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Резюме. Данная статья представляет собой второе сообщение из серии статей, посвященных получению отечественного препарата макрофаг-активирующего фактора (GcMAF-RF) и оценке его биологических свойств. Целью данной работы являлось изучение воздействия препарата GcMAF-RF на M0 → M1 поляризацию макрофагов (Мф) и активацию профессиональных свойств антиген-презентирующих дендритных клеток (ДК), генерированных *ex vivo*, а также на *ex vivo* продукцию провоспалительных (TNF α , IL-1 β , IL-6, IFN γ , IL-17, IL-18) и противовоспалительных (TGF- β , IL-4, IL-10) цитокинов, факторов роста (IL-2, GM-CSF, G-CSF, VEGF) и хемокинов (MCP, IL-8) клетками цельной крови здоровых доноров. Мф и ДК генерировали из моноцитов (3-5 × 10⁶/мл) прилипающей фракции мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови здоровых доноров; при этом для получения Мф использовали гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (rhGM-CSF), а при получении ДК – GM-CSF и интерферон- α . В качестве M1-поляризующих сигналов использовали липополисахарид (LPS *E. coli* 0114:B4) (контроль) либо препарат GcMAF-RF

Адрес для переписки:

Богачев Сергей Станиславович
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
“Институт цитологии и генетики” Сибирского
отделения Российской академии наук»
630090, Россия, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10.
Тел.: 8 (383) 363-49-63 (доб. 3411).
Факс: 8 (383) 333-12-78.
E-mail: labmolbiol@mail.ru

Address for correspondence:

Bogachev Sergey S.
Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian
Academy of Sciences
630090, Russian Federation, Novosibirsk, Lavrentiev ave, 10.
Phone: 7 (383) 363-49-63 (add. 3411).
Fax: 7 (383) 333-12-78.
E-mail: labmolbiol@mail.ru

Образец цитирования:

С.С. Кирикович, Е.В. Левитес, Е.В. Долгова, А.С. Проскурина, Г.С. Риттер, В.С. Рузанова, О.Ю. Леплина, Е.Я. Шевела, А.А. Останин, Т.Г. Рябичева, С.Л. Рыжикова, Ю.Г. Дружинина, Н.А. Вараксин, Е.Р. Черных, С.С. Богачев «Влияние GcMAF-RF на *ex vivo* поляризацию макрофагов, активацию дендритных клеток и продукцию цитокинов клетками цельной крови человека» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 257-274. doi: 10.15789/1563-0625-EOM-2132

© Кирикович С.С. и соавт., 2021

For citation:

S.S. Kirikovich, E.V. Levites, E.V. Dolgova, A.S. Proskurina, G.S. Ritter, V.S. Ruzanova, O. Yu. Leplina, E. Ya. Shevela, A.A. Ostanin, T.G. Ryabicheva, S.L. Ryzhikova, Yu.G. Druzhinina, N.A. Varaksin, E.R. Chernykh, S.S. Bogachev “Effect of macrophage-activating factor (GcMAF-RF) upon *ex vivo* polarization of macrophages, activation of dendritic cells and production of cytokines by human whole blood cells”, *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2021, Vol. 23, no. 2, pp. 257-274. doi: 10.15789/1563-0625-EOM-2132

DOI: 10.15789/1563-0625-EOM-2132

(опыт), которые добавляли за 48 ч до окончания культивирования. Стимулирующее влияние полученных Мф и ДК на пролиферацию клеток оценивали в аллогенной смешанной культуре лейкоцитов (алло-СКЛ) радиометрически по включению 3H-тимидина. Индекс влияния (ИВ) Мф или ДК на алло-СКЛ рассчитывали как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии Мф или ДК к уровню спонтанной пролиферации МНК. Для определения продукции цитокинов клетками цельной крови человека *ex vivo* использовали образцы периферической крови 3 доноров с двумя повторностями препарата GcMAF-RF, итого 6 вариантов. Все варианты исследования проведены на активированных митогеном и неактивированных клетках крови. Содержание цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. Для количественной оценки воздействия GcMAF-RF использован индекс влияния (ИВ) как отношение продукции цитокина в присутствии GcMAF-RF к уровню спонтанной продукции. Показано, что препарат GcMAF-RF эффективно, как и «стандартный» активатор Мф и ДК липополисахарид (LPS), индуцирует поляризацию дифференцированных M0-макрофагов в M1-клетки и конечное созревание ДК, что проявляется значимым усилением их аллостимуляторной активности в смешанной культуре лейкоцитов (алло-СКЛ). Кроме того, препарат GcMAF-RF стимулирует продукцию клетками крови (гранулоцитами, лимфоцитами, моноцитами) широкий спектр цитокинов и хемокинов (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-4, IL-10, GM-CSF, G-CSF, VEGF, IL-8), что свидетельствует о прямом участии активатора макрофагов GcMAF-RF в различных иммунных процессах. Таким образом, отечественный препарат GcMAF-RF индуцирует поляризацию макрофагов M0 \rightarrow M1, конечное созревание ДК и аллостимулирующую активность Мф и ДК, а также способен эффективно стимулировать циркулирующие клетки крови к синтезу цитокинов/хемокинов с провоспалительной и иммунорегуляторной активностью.

Ключевые слова: макрофаг-активирующий фактор (GcMAF-RF), макрофаги, дендритные клетки, цитокины

EFFECT OF MACROPHAGE-ACTIVATING FACTOR (GcMAF-RF) UPON EX VIVO POLARIZATION OF MACROPHAGES, ACTIVATION OF DENDRITIC CELLS AND PRODUCTION OF CYTOKINES BY HUMAN WHOLE BLOOD CELLS

Kirikovich S.S.^a, Levites E.V.^a, Dolgova E.V.^a, Proskurina A.S.^a, Ritter G.S.^a, Ruzanova V.S.^{a,b}, Leplina O.Yu.^c, Shevela E.Ya.^c, Ostanin A.A.^c, Ryabicheva T.G.^d, Ryzhikova S.L.^d, Druzhinina Yu.G.^d, Varaksin N.A.^d, Chernykh E.R.^c, Bogachev S.S.^a

^a Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

^b Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russian Federation

^c Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

^d JSC Vector-Best, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. This article is the second communication in a series of articles devoted to the effects of a domestic preparation of macrophage-activating factor (GcMAF-RF) and assessment of its biological properties. The aim of this work was to study the effect of the GcMAF-RF upon M0 \rightarrow M1 polarization of macrophages (Mph), and activation of the professional properties of *ex vivo* generated antigen-presenting dendritic cells (DC), as well as on *ex vivo* production of pro-inflammatory (TNF α , IL-1 β , IL-6, IFN γ , IL-17, IL-18) and anti-inflammatory (TGF- β , IL-4, IL-10) cytokines, growth factors (IL-2, GM-CSF, G-CSF, VEGF) and chemokines (MCP, IL-8) by the whole blood cells from healthy donors.

Mph and DC were generated from the monocytes (3 to 5 \times 10⁶/ml) derived from adherent fraction of peripheral blood mononuclear cells (MNC) of healthy donors. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) was used to obtain Mph, whereas DC production was induced by GM-CSF and interferon- α .

To provide M1 polarizing signals, bacterial lipopolysaccharide (LPS from *E. coli* 0114:B4) was used in controls. In experimental series, GcMAF-RF was added 48 h before the end of culture. The stimulating effect of the obtained Mph and DC upon cell proliferation was assessed in allogeneic mixed culture of leukocytes (allo-MLC) using radiometric technique, by ³H-thymidine incorporation. The influence index (IR) of Mph or DC upon allo-SCL was calculated as the ratio of the proliferative response of MNCs in the presence of Mph, or DC to the level of spontaneous MNC proliferation. To determine the cytokine production by human whole blood cells *ex vivo*, peripheral blood samples from 3 donors with two replicate GcMAF-RF preparations were used, at a total of 6 points. All variants of the study were carried out with mitogen-activated and non-activated blood cells. The cytokine content was determined by the ELISA assays. The effects of GcMAF-RF were quantified as a fold increase (FI), i.e., the ratio of cytokine production in the presence of GcMAF-RF to the level of their spontaneous production. It was shown that the GcMAF-RF preparation was as effective, as lipopolysaccharide (LPS), the standard Mph and DC activator which induces polarization of differentiated M0-macrophages into M1 cells and final maturation of DCs, manifesting by a significant increase in their allo-stimulatory activity in a mixed leukocyte culture (allo-MLC). Moreover, GcMAF-RF stimulates production of numerous cytokines and chemokines (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-4, IL-10, GM-CSF, G-CSF, VEGF, IL-8), by blood cells (granulocytes, lymphocytes, monocytes), thus indicating direct participation of the macrophage activator GcMAF-RF in various immune processes. The domestic GcMAF-RF drug induces polarization of macrophages M0 \rightarrow M1, final maturation of DCs and allostimulating activity of Mf and DCs, and is also able to effectively stimulate circulating blood cells to synthesize cytokines/chemokines with pro-inflammatory and immunoregulatory activities.

Keywords: macrophage-activating factor (GcMAF-RF), macrophages, dendritic cells, cytokines

Данная работа была выполнена при поддержке бюджетного финансирования по теме государственного задания № 0259-2021-0013.

Введение

Успехи в иммунологических исследованиях в значительной степени зависят от возможности использования в экспериментальной работе специфических факторов, эффективно влияющих на характер иммунного ответа организма, и которые доступны в необходимых количествах. Одним из таких факторов является белок, активирующий макрофаги, GcMAF (group-specific component protein-derived macrophage activating factor), впервые охарактеризованный в работе японских исследователей [49]. GcMAF получают *in vitro* энзиматическим преобразованием витамин D₃-связывающего белка плазмы крови (DBP) [3, 35, 39, 43, 49, 50, 52]. Способность GcMAF активировать циторедуцирующие и опсонизирующие функции макрофагов (элиминация микроорганизмов, стареющих, опухолевых и поврежденных клеток) широко используется в экспериментах на животных и в клинических исследованиях [26, 41, 46, 47, 49, 50, 51, 52].

В лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН совместно с ООО «АКТИВАТОР МАФ» был разработан оригинальный способ получения DBP и разработана процедура

его конвертации в GcMAF-RF цитоэнзиматическим способом [3]. Полученный полипептид GcMAF-RF по своим молекулярным свойствам соответствует описанному в литературе белку GcMAF, находящемуся на стадии клинических испытаний в США, Британии, Израиле и Японии (Saisei Mirai, Keihan, Reno Integrative Medical Center, Immuno Biotech Ltd, Efranat, Catalytic longevity).

Макрофаги (Мф), относятся к системе клеток врожденного иммунитета. Выделяют два основных фенотипа макрофагов: М1/провоспалительный и М2/противовоспалительный [6, 16, 22]. Макрофаги выполняют в организме множество функций, что обусловлено их функциональной гетерогенностью и высокой пластичностью [23]. Пул резидентных Мф может пополняться за счет дифференцировки циркулирующих моноцитов при их попадании в ткани из кровотока. Макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) являются основными регуляторами дифференцировки моноцитов в макрофаги. При этом M-CSF стимулирует дифференцировку моноцитов в Мф, характеризующиеся М2/противовоспалительным фенотипом (про-М2 клетки), тогда как GM-CSF индуцирует дифференцировку моноцитов в Мф с М1/провоспалительным фенотипом (про-М1 клетки) [19, 28]. Как про-М1, так и

про-M2 клетки могут быть поляризованы в Мф 1-го или 2-го типа под влиянием различных факторов микроокружения (поляризующих стимулов) [42, 45].

Макрофаги являются одной из основных популяций клеток, формирующих опухолевую строму. В опухолевом очаге, в ходе прогрессии опухоли под действием секретируемых опухолью гуморальных факторов и в результате межклеточных контактов, происходит поляризация моноцитарных предшественников в макрофаги М2/противовоспалительного фенотипа. М2-макрофаги совместно с миелоидными супрессорными клетками (MDSC, myeloid-derived suppressor cells) ингибируют противоопухолевую активность эффекторных иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль [33, 36, 44]. Под действием различных стимулов макрофаги способны переходить из М2 фенотипа в М1. Это свойство макрофагов является базовым при активации противоопухолевых свойств опухоль-инфильтрирующих фагоцитов [6]. Несмотря на обилие данных об активирующем влиянии препарата GcMAF на зрелые макрофаги, отсутствуют доказательства его влияния на процесс поляризации М0-макрофагов.

Наряду с макрофагами важным компонентом иммунной системы млекопитающих являются антиген-презентирующие дендритные клетки (ДК), осуществляющие запуск адаптивного иммунного ответа [2, 14, 20, 21, 25, 30, 38]. Известно, что «стандартный» активатор макрофагов, липополисахарид бактериальных стенок (LPS), также является «стандартным» активатором профессиональных свойств ДК [54, 55]. В настоящем исследовании был проведен сравнительный анализ поляризующего действия LPS и GcMAF-RF на сгенерированные *ex vivo* М0-макрофаги, а также проведена оценка активирующего влияния LPS и GcMAF-RF на сгенерированные *ex vivo* ДК человека.

Цитокины представляют собой низкомолекулярные белки, которые продуцируются многими типами клеток и прежде всего клетками иммунной системы. Они обеспечивают межклеточные связи и управляют различными процессами, происходящими в нормальных условиях и при патологических воздействиях. Цитокины обладают плеiotропностью биологического действия. Один и тот же цитокин может действовать на многие типы клеток, вызывая различные эффекты, в зависимости от вида клеток-мишеней. Для цитокинов характерна взаимозаменяемость биологического действия [1, 15, 17, 18, 32, 40,

53]. Выделяют несколько групп цитокинов. Это провоспалительные и противовоспалительные цитокины, факторы роста и хемокины [1, 18]. Цитокины, продуцируемые клетками периферической крови, индуцируют быстрый системный ответ [1, 15, 17, 18, 32, 53]. В этой связи представляется интересным оценить влияние GcMAF-RF на продукцию цитокинов клетками цельной крови. Этот интерес также связан с тем, что предполагается интраперитонеальное введение препарата, и в этой связи необходимо знать возможные клинические последствия такого введения, которые могут быть оценены по способности клеток крови секретировать определенную палитру цитокинов.

Целью данной работы является изучение влияния препарата GcMAF-RF на поляризацию макрофагов М0 фенотипа и созревание дендритных клеток, а также на продукцию цитокинов клетками цельной крови человека.

Материалы и методы

Получение GcMAF-RF

Витамин D₃-связывающий белок (DBP) выделяли из человеческой плазмы с помощью актиносефарозной аффинной хроматографии. Полученный полипептид конвертировали в GcMAF-RF цитоэнзиматическим способом, разработанным компанией ООО «АКТИВАТОР МАФ» [3].

Получение макрофагов

Макрофаги генерировали из моноцитов (3-5 × 10⁶/мл) прилипающей фракции мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови здоровых доноров в 6-луночных планшетах (TPP, Швейцария) в среде RPMI-1640, дополненной 0,05 мМ β-меркаптоэтанолом, 2 мМ пирувата натрия, 0,3 мг/мл L-глутамина, 1% раствором незаменимых аминокислот (все реактивы Sigma-Aldrich), 100 мг/мл гентамицина в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (rhGM-CSF, 50 нг/мл, Sigma-Aldrich) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS, «БиолоТ», Санкт-Петербург) в течение 7 суток при 37 °С и 5% CO₂. В качестве М1-поляризующих сигналов использовали липополисахарид (LPS *E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich) в дозе 10 мкг/мл, либо препарат GcMAF-RF в дозе 50 или 250 нг/мл, которые добавляли за 48 ч до окончания культивирования. GM-CSF-дифференцированные М0 и поляризованные М1 макрофаги снимали с пластика 0,25% раствором трипсин-версена («БиолоТ», Россия), отмывали, определяли цитоз и жизнеспособность.

Получение дендритных клеток

Дендритные клетки (ДК) генерировали из моноцитов ($3-5 \times 10^6$ /мл) прилипающей фракции МНК периферической крови доноров в 6-луночных планшетах (TPP, Швейцария) в среде RPMI-1640, дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 2,5% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS, «Биолот», Санкт-Петербург), в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и интерферона- α (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария) при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Для индукции конечного созревания ДК на 4-е сутки вносили LPS (*E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich, 10 мкг/мл) либо препарат GcMAF-RF в дозе 50, 100, 250 и 500 нг/мл и продолжали культивировать в течение 24 ч.

Оценка аллостимуляторной активности Мф и ДК

Стимуляторную активность Мф и ДК оценивали в аллогенной смешанной культуре лейкоцитов (алло-СКЛ), используя в качестве отвечающих клеток аллогенные МНК доноров ($0,1 \times 10^6$ /лунку), которые культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640 в присутствии 10%-ной инактивированной сыворотки крови АВ(IV) группы при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Стимуляторами служили либо Мф, либо ДК в соотношении МНК:Мф/ДК = 10:1. Пролиферативный ответ оценивали на 5 сутки радиометрически по включению 3Н-тимидина (1 мкКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования. Индекс влияния (ИВ) Мф или ДК в алло-СКЛ рассчитывали, как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии Мф к уровню спонтанной пролиферации МНК.

Оценка продукции цитокинов клетками цельной крови человека *ex vivo*

Для определения продукции цитокинов клетками цельной крови человека *ex vivo* использовали образцы периферической крови 3 доноров и 2 препарата GcMAF-RF с независимым выделением, итого 6 вариантов. Пробу 2 мл крови в стерильных условиях вносили во флакон, содержащий 8 мл стерильной поддерживающей среды (DMEM), гепарин (2,5 ЕД/мл), гентамицин (100 мкг/мл) и L-глутамин (0,6 мг/мл). Полученную разведенную кровь (к1/5) разделили на порции:

Для определения спонтанной продукции цитокинов использовали пробу:

- 3 мл к1/5;

Для оценки влияния препарата GcMAF-RF использовали пробы:

- 1 мл к1/5 + GcMAF-RF до конечной концентрации 5 мкг/мл;
- 1 мл к1/5 + GcMAF-RF до конечной концентрации 0,5 мкг/мл;
- 1 мл к1/5 + GcMAF-RF до конечной концентрации 0,05 мкг/мл.

Для определения митоген-индуцированной продукции цитокинов использовали пробу:

- 1 мл к1/5 + комплекс митогенов (РНА-М – 4 мкг/мл, РНА-Р – 4 мкг/мл, ConA – 4 мкг/мл и LPS – 2 мкг/мл).

Для оценки влияния препарата GcMAF-RF на митоген-индуцированную продукцию цитокинов использовали следующие пробы:

- 1 мл к1/5 + комплекс митогенов + GcMAF-RF до конечной концентрации 5 мкг/мл;
- 1 мл к1/5 + комплекс митогенов + GcMAF-RF до конечной концентрации 0,5 мкг/мл;
- 1 мл к1/5 + комплекс митогенов + GcMAF-RF до конечной концентрации 0,05 мкг/мл.

Препараты крови с добавленными активаторами инкубировали при 37 °С в течение суток. После окончания инкубации клетки крови осаждали центрифугированием при 10000 G в течение 3 минут на микроцентрифуге. Отобранную надосадочную жидкость аликвотировали, замораживали и хранили при -40 °С до проведения анализа. В полученном супернатанте определяли концентрацию IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IL-1 β , TNF α , IFN γ , VEGF и MCP-1 методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов производства АО «Вектор-Бест»; концентрацию G-CSF, GM-CSF, IL-17, TGF- β определяли с использованием реактивов фирмы R&D Systems (Великобритания).

Для количественной характеристики влияния активаторов на продукцию цитокинов использовали Индекс влияния (ИВ) и Цитокиновый индекс (ЦИ) (см. приложение 1). Индекс влияния (ИВ) = продукция цитокина во флаконе с разбавленной кровью + препарат/спонтанная продукция этого цитокина (во флаконе с разбавленной кровью без препарата). Цитокиновый индекс (ЦИ) = продукция цитокина во флаконе с разбавленной кровью + препарат + митоген/митогенная продукция этого цитокина (во флаконе с разбавленной кровью без препарата + митоген). ИВ характеризует влияние препарата на неактивированные клетки крови, что имитирует введение препарата GcMAF-RF пациенту. ЦИ характеризует влияние препарата на активиро-

ванные митогеном клетки крови, что имитирует либо синергичное с митогеном усиление препаратом активности клеток, либо ее подавление, возникающее при воздействии препарата в очаге воспаления [8].

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 10.0. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический W-критерий Вилкоксона (для связанных, парных выборок). Выявленные различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

M0 → M1 поляризация макрофагов препаратом GcMAF-RF

В настоящее время отработаны различные протоколы генерации из моноцитов крови макрофагов 1-го и 2-го типа на основе использования соответствующих дифференцировочных факторов (GM-CSF или M-CSF) и/или поляризующих стимулов. В культуре *in vitro* в качестве M1-поляризующих сигналов могут выступать различные инфекционные агенты (например, липополисахарид (LPS) или провоспалительные цитокины (TNF α или IFN γ , по отдельности или в комбинации). M1 макрофаги характеризуются *in vitro* фенотипом IL-12^{high}IL-23^{high}IL-10^{low}; они

активно секретируют реактивные метаболиты кислорода и монооксид азота (ROS и NO), а также воспалительные цитокины (IL-1 β , TNF α , IL-6); участвуют в развитии Th1-опосредованных иммунных реакций, обеспечивающих устойчивость к внутриклеточным патогенам и опухолям. Макрофаги M1/провоспалительного фенотипа, которые высоко экспрессируют молекулы, вовлеченные в активацию и ко-стимуляцию T-лимфоцитов (HLA-DR, CD86, CD40), а также активно секретируют иммунорегуляторные (IL-12, IL-23), но не иммуносупрессорные (IL-10, TGF- β) цитокины, способны наиболее эффективно индуцировать пролиферативный ответ T-лимфоцитов на аллоантигены в СКЛ. Поэтому оценка аллостимуляторной активности Mф, являясь «интегральным» показателем их функционального потенциала, позволяет четко идентифицировать M1 фенотип макрофагов человека, генерированных *ex vivo* из моноцитов крови [13, 34].

В настоящем исследовании была проведена сравнительная оценка влияния LPS и GcMAF-RF на аллостимуляторную активность GM-CSF-дифференцированных (неполяризованных) M0-макрофагов. Как видно из полученных данных, добавление M1-поляризующего стимула LPS к неполяризованным Mф усиливало их аллостимуляторную активность ($p < 0,01$). GcMAF-RF обладал схожим эффектом, причем в

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ GcMAF-RF НА M0 → M1 ПОЛЯРИЗАЦИЮ

TABLE 1. EFFECT OF GcMAF-RF ON THE M0 → M1 POLARIZATION

Варианты смешанной культуры лейкоцитов (алло-СКЛ) Allo-MLC (variants)	Пролиферативный ответ T-клеток (срп) T cell proliferative response (cpm)	ИБ FI
МНК (Мононуклеарные клетки) MNC (Mononuclear cells) alone	220 (190-310)	
МНК + Mф0 MNC + Mф0	1090 (800-2100)	5,1 (3,6-6,9)
МНК + MфLPS MNC + MфLPS	3420 (2020-4600)**	13,5 (9,1-17,0)**
МНК + MфGcMAF-RF ₅₀ MNC + MфGcMAF-RF ₅₀	3250 (2060-3800)**	11,7 (9,5-12,9)**
МНК + MфGcMAF-RF ₂₅₀ MNC + MфGcMAF-RF ₂₅₀	1820 (1470-2600)*	8,3 (6,9-9,1)*

Примечание. Данные двух независимых экспериментов (n = 9) представлены в виде медианных значений и интерквартильного диапазона – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). срп – импульсы в минуту; ИБ – индекс влияния. МНК + Mф0 – отрицательный контроль; МНК + MфLPS – положительный контроль. Активаторы: LPS 10 мкг/мл; GcMAF-RF 50 и 250 нг/мл. * p < 0,05; ** p < 0,01 – по сравнению с неполяризованными Mф0 (парный тест Вилкоксона).

Note. Data from two independent experiments (n = 9) are presented as median and interquartile range – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). cpm, count per minute; FI, fold increase. MNC + Mф0, negative control; MNC + MфLPS, positive control. Activators: LPS 10 μ g/ml; GcMAF-RF 50 and 250 ng/ml. * p < 0.05; ** p < 0.01, vs unpolarized Mф0 (Wilcoxon matched pairs test).

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ GcMAF-RF НА СОЗРЕВАНИЕ ДК, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. EFFECT OF GcMAF-RF ON THE DC MATURATION

Варианты смешанной культуры лейкоцитов (алло-СКЛ) Allo-MLC (variants)	Пролиферативный ответ Т-клеток (срм) T cell proliferative response (cpm)	ИБ FI
МНК + ДК ₀ MNC + DC ₀	3980 (2670-5300)	
МНК + ДК _{LPS} MNC + DC _{LPS}	6480 (6270-6690)*	1,6 (1,3-2,4)
МНК + ДК _{GcMAF-RF50} MNC + DC _{GcMAF-RF50}	6130 (5490-6760)*	1,5 (1,3-1,5)
МНК + ДК _{GcMAF-RF100} MNC + DC _{GcMAF-RF100}	6660 (6200-7120)*	1,7 (1,5-2,7)
МНК + ДК _{GcMAF-RF250} MNC + DC _{GcMAF-RF250}	7430 (7390-7480)*	1,9 (1,4-2,9)
МНК + ДК _{GcMAF-RF500} MNC + DC _{GcMAF-RF500}	5470 (5450-5490)*	1,4 (1,0-2,3)

Примечание. Данные двух независимых экспериментов (n = 9) представлены в виде медианных значений и интерквартильного диапазона – Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). срм – импульсы в минуту; ИБ – индекс влияния. МНК + ДК₀ – отрицательный контроль; МНК + ДК_{LPS} – положительный контроль. Активаторы: LPS 10 мкг/мл; GcMAF-RF 50, 100, 250 и 500 нг/мл. * p < 0,05 – по сравнению с незрелыми ДК₀ (парный тест Вилкоксона).

Note. Data from two independent experiments (n = 9) are presented as median and interquartile range – Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). cpm, count per minute; FI, fold increase. MNC + DC₀, negative control; MNC + DC_{LPS}, positive control. Activators: LPS 10 µg/ml; GcMAF-RF 50, 100, 250 and 500 ng/ml. * p < 0.05, vs immature DC₀ (Wilcoxon matched pairs test).

дозе 50 нг/мл проявлял более выраженную М1-поляризирующую активность (p < 0,01), чем в дозе 250 нг/мл (p < 0,05) (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют, что GcMAF-RF усиливает аллостимуляторную активность макрофагов аналогично LPS, что свидетельствует о его способности индуцировать поляризацию М0-макрофагов в сторону М1-фенотипа.

Влияние GcMAF-RF на конечное созревание и аллостимуляторную активность ДК

ДК, являясь «профессиональными» антиген-презентирующими клетками, не только обеспечивают инициацию специфического иммунного ответа, но наряду с этим способны выполнять регуляторные функции, контролируя силу и направленность иммунных реакций. Многочисленные экспериментальные исследования *in vivo* и *in vitro* показали, что ДК, нагруженные опухолевыми антигенами или антигенами инфекционных возбудителей, индуцируют эффективный противоопухолевый и противоинфекционный иммунный ответ.

Одним из интегральных показателей функциональной активности ДК является их способность к стимуляции пролиферативного ответа аллогенных Т-лимфоцитов в СКЛ, поскольку аллостимуляторная активность ДК ассоцииро-

вана со степенью зрелости ДК, а также со спектром и уровнем продуцируемых ими цитокинов. Показано, что ДК, которые генерируются из моноцитов крови в присутствии GM-CSF и интерферона-альфа (IFN-ДК), обладают выраженной аллостимуляторной активностью [5, 10]. Такую способность ДК приобретают в результате конечного созревания под влиянием различных факторов, таких как кондиционная среда моноцитов (monocyte conditionate medium; MCM, 30% v/v), лейкинферон (НПФ «Интекор», Москва), «Полиоксидоний», «Суперлимф», препарат двуцепочечной ДНК человека «Панаген» и др. Тем не менее наиболее часто используемым «классическим» дозревающим стимулом является LPS [4, 11, 12].

В настоящей работе был проведен сравнительный анализ стимулирующего действия LPS и отечественного активатора макрофагов GcMAF-RF [3] на созревание и аллостимуляторную активность (IFN-ДК). Для этого из моноцитов периферической крови генерировали ДК в течение 96 часов, затем культивировали их в течение 24 часов в присутствии либо липополисахарида (LPS), либо GcMAF-RF в различных дозах (50, 100, 250, 500 нг/мл) (по целевому белку) (табл. 2).

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ GcMAF-RF НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ
TABLE 3. EFFECT OF GcMAF-RF ON CYTOKINE PRODUCTION BY WHOLE BLOOD CELLS

Продукция Production	Группы цитокинов Groups of cytokines															
	Провоспалительные Pro-inflammatory						Противовоспалительные Anti-inflammatory				Факторы роста Group factors				Хемокины Chemokines	
	TNF α	IL-1 β	IL-6	IFN γ	IL-17	IL-18	TGF- β	IL-4	IL-10	IL-2	GM-CSF	G-CSF	VEGF	MCP	IL-8	
Спонтанная, пг/мл Spontaneous, pg/ml	1,0-5,1	1,3-7,2	0,8-30,2	2,0-2,0	1,0-1,0	30,0-38,0	1873-7571	0,4-0,4	1,0-1,5	2,0-2,0	2,0-2,0	10,4-77,3	54,9-3715,2	2,0-1061,0		
Митоген-индуцированная, пг/мл Mitogen-induced, pg/ml	1090,6-1940,9	1358,8-3409,4	9405,3-19254,6	1940,1-3963,2	48,9-295,7	37,3-58,7	1192-22377	1,0-4,1	79,7-186,8	45,5-100,4	14,2-137,8	531,8-1070,2	2825,1-4144,7	22250,0-38710,5		
GcMAF-RF _{0,5} -индуцированная, пг/мл GcMAF-RF _{0,5} -induced, pg/ml	13,1 (11,0-16,9)	67,4 (48,1-79,5)	317,77 (174,2-877,0)	2,4 (2,0-2,7)	1,0 (1,0-1,0)	49,5 (47,0-49,5)	6650,8 (4111,3-10667,1)	1,9 (1,9-1,9)	2,3 (1,0-5,2)	2,0 (2,0-5,5)	4,4 (3,3-5,4)	11,5 (2,0-27,8)	612,8 (311,0-22131,9)	340,2 (286,1-5234,1)		
ИБ FI	2,6	9,3	10,5	1,2	1,0	1,3	0,9	4,8	1,5	1,0	2,2	5,8	0,2	0,3		
GcMAF-RF _{5,0} -индуцированная, пг/мл GcMAF-RF _{5,0} -induced, pg/ml	40,9 (33,3-50,4)	482,7 (330,3-613,2)	2237,2 (806,4-2385,5)	2,0 (2,0-2,3)	1,0 (1,0-1,0)	117,8 (101,7-149,3)	6264 (4882-8935)	1,8 (1,5-1,9)	17,0 (8,3-19,4)	2,0 (2,0-3,2)	19,6 (12,5-27,3)	103,9 (70,6-132,3)	3882,6 (3000,0-34770,0)	4059,0 (3878,5-14810,5)		
ИБ FI	8,0	66,7	74,1	1,0	1,0	3,1	0,8	4,4	10,9	1,0	9,8	51,9	1,1	3,8		

Примечание. Данные по спонтанной и митоген-индуцированной продукции цитокинов (n = 3) представлены в виде минимальных и максимальных значений. Данные двух экспериментов по воздействию GcMAF-RF на продукцию цитокинов клетками цельной крови (n = 6) представлены в виде медианных значений и интерквартильного диапазона – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). ИВ – индекс влияния (медиана/максимальное значение спонтанной продукции цитокина). Используются концентрации активатора GcMAF-RF 0,5 и 5 мкг/мл.

Note. Data on spontaneous and mitogen-induced cytokine production (n = 3) are presented as minimum and maximum values (pg/ml). Data from two experiments on the effect of GcMAF-RF on cytokine production by whole blood cells (n = 6) are presented as median values and interquartile range – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). FI, fold increase (median/maximum value of spontaneous cytokine production). The concentrations of GcMAF-RF used were 0.5 and 5 μ g/ml.

Из результатов, представленных в таблице 2, видно, что добавление GcMAF-RF в культуру ДК на этапе созревания приводило к усилению аллостимуляторной активности ДК, сопоставимому с влиянием на ДК «стандартного» индуктора созревания, LPS. Максимальный эффект влияния GcMAF-RF отмечался при использовании дозы 250 нг/мл.

Влияние GcMAF-RF на продукцию цитокинов клетками цельной крови

Для оценки влияния препарата GcMAF-RF на продукцию цитокинов клетками цельной крови человека свежесыведенная кровь здоровых доноров обрабатывалась различными количествами активатора макрофагов GcMAF-RF (5,0 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 0,05 мкг/мл) (приложение 1). Были проанализированы цитокины, относящиеся к группе провоспалительных, противовоспалительных, факторов роста и хемокинов. Сравнивались: спонтанная продукция цитокинов, продукция цитокинов после активации комплексом митогенов (см. раздел материалы и методы) и после активации препаратом GcMAF-RF. Для сравнительного анализа были взяты данные по активации препаратом GcMAF-RF в концентрациях 5 мкг/мл и 0,5 мкг/мл. В случае спонтанной и митоген-индуцированной продукции цитокинов ($n = 3$) приводится диапазон min-max значений показателя (пг/мл). Для GcMAF-RF ($n = 6$) полученные результаты представлены медианами и интерквартильным размахом – Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), что позволяет оценить, как уровни продукции соответствующих цитокинов в пг/мл, так и индексы влияния (ИВ) комплекса митогенов, и препарата GcMAF-RF (табл. 3, приложение 1).

Показано, что препарат GcMAF-RF оказывает стимулирующее влияние на продукцию клетками цельной крови следующих из проанализированных цитокинов: провоспалительных (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-18), противовоспалительных (IL-4 и IL-10), факторов роста (GM-CSF, G-CSF, VEGF) и хемокинов (IL-8). Поскольку спонтанная продукция оценивалась по трем донорам и оценка эффекта выражалась в диапазоне минимальных-максимальных значений, то сравнение медианы индукции GcMAF-RF, показанной для 6 вариантов, проводилось с максимальным значением спонтанной продукции и эффект был выражен в индексе влияния (ИВ).

Из данных таблицы 3 видно, что используемый в исследовании комплекс митогенов (PHA-M, PHA-P, ConA и LPS) индуцировал значительное усиление интенсивности продукции клетками крови практически всех анализируемых цитоки-

нов. В сравнении с митогенами GcMAF-RF также характеризовался значимым, но при этом не таким «тотальным» стимулирующим эффектом. Так, из группы провоспалительных цитокинов GcMAF-RF в дозе 5,0 мкг/мл повышал продукцию TNF α , IL-1 β , IL-6 и IL-18 в ~ 8, 70, 70 и 3 раза соответственно, при этом наблюдался выраженный дозозависимый эффект. В то же время уровень секреции IFN γ и IL-17 в ответ на активацию препаратом GcMAF-RF практически не изменялся.

В группе противовоспалительных цитокинов наиболее сильно отреагировал на воздействие препаратом GcMAF-RF интерлейкин IL-10, и в меньшей степени IL-4 (ИВ GcMAF-RF в дозе 5,0 мкг/мл составляли в среднем 10,9 и 4,4 расч. ед. соответственно).

В ответ на стимуляцию препаратом GcMAF-RF_{5,0} усиливается также продукция факторов роста (GM-CSF, G-CSF, VEGF) и хемокина IL-8, что подтверждается значениями соответствующих индексов влияния. Видно, что интенсивность секреции этих цитокинов в примерно 10; 50; 1,2 и 3,8 раза превышает максимальные значения спонтанной продукции и зависит от дозы вносимого GcMAF-RF (табл. 3).

Полученные результаты демонстрируют высокую стимулирующую активность препарата GcMAF-RF на клетки цельной крови человека в условиях *ex vivo*.

Обсуждение

Многочисленные экспериментальные работы, проведенные с использованием различных очищенных препаратов GcMAF и активированной плазмы так называемого GcMAF второго поколения свидетельствуют о разноплановом биологическом действии фактора [37, 43]. Наиболее многочисленные исследования посвящены противораковой активности GcMAF. В различных экспериментах установлено, что противоопухолевая активность GcMAF главным образом опосредована активацией макрофагов [24, 35, 49, 52].

В настоящем исследовании в качестве фактора, активирующего макрофаги, был использован отечественный препарат GcMAF-RF[®], получаемый из плазмы крови человека с использованием нового регламента, разработанного компанией ООО «АКТИВАТОР МАФ» [3]. Препарат выделяется в биохимических условиях, основанных на использовании лигандов, аффинных к специфическим функциональным доменам витамин D₃-связывающего белка. Препарат GcMAF-RF индуцирует фагоцитарную активность перитоне-

альных макрофагов мыши и увеличивает продукцию ими монооксида азота, что является важнейшим показателем провоспалительного вектора активации [3, 7].

В настоящем исследовании были охарактеризованы ранее неизвестные свойства активирующего макрофаги препарата GcMAF-RF.

1. Показано, что препарат GcMAF-RF так же эффективно, как и LPS, индуцирует поляризацию GM-CSF-дифференцированных M0-макрофагов в M1-клетки, что проявляется значимым усилением их стимуляторной активности в алло-СКЛ. Максимальный эффект поляризации обнаруживается при концентрации GcMAF-RF 50 нг/мл. Макрофаги M1-фенотипа характеризуются активным фагоцитозом и функционированием киллерных систем [48], где основными цитолитиками выступают свободные радикалы кислорода и монооксид азота (NO), продуцируемые активированными макрофагами. В этой связи можно предположить, что противоопухолевое действие GcMAF, проявляющееся в различных биологических системах [9, 27, 29, 31, 41, 47], связано с перепрограммированием инфильтрирующих опухоль макрофагов с M2- на M1-фенотип. Именно эта активность GcMAF может являться одним из возможных механизмов ослабления опухоль-индуцированной иммуносупрессии и, как следствие, индукции эффективного противоопухолевого иммунного ответа.

2. Показано, что препарат GcMAF-RF индуцирует конечное созревание ДК и усиливает их функциональную активность в алло-СКЛ. Максимальный эффект отмечался при использовании GcMAF-RF в дозе 250 нг/мл и был сопоставим с действием LPS – «стандартного» индуктора созревания ДК. Ранее в литературе были опубликованы сведения о том, что GcMAF не оказывает активирующего влияния на ДК [52]. Полученные нами результаты демонстрируют более высокую биологическую активность отечественного препарата GcMAF-RF, что, вероятно, обусловлено использованием нового технологического регламента его получения.

3. Показано, что препарат GcMAF-RF стимулирует продукцию клетками крови (гранулоцитами, лимфоцитами, моноцитами) широкого спектра цитокинов и хемокинов (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-4, IL-10, GM-CSF, G-CSF, VEGF, IL-8).

В целом полученные данные свидетельствуют о широком диапазоне биологических эффектов отечественного препарата GcMAF-RF, который не только усиливает фагоцитарную активность

Мф и продукцию ими монооксида азота [3], но также индуцирует M0 \rightarrow M1 поляризацию макрофагов, конечное созревание и аллостимуляторную активность ДК и способен эффективно стимулировать синтез циркулирующими клетками крови цитокинов/хемокинов с провоспалительной и иммунорегуляторной активностью.

Комплексное исследование *ex vivo* влияния препарата GcMAF-RF свидетельствует о его выраженном активирующем векторе воздействия на системы врожденного и адаптивного иммунитета. Тем не менее одновременная стимуляция продукции противовоспалительного цитокина IL-10, показанная для клеток цельной крови здоровых доноров, может свидетельствовать о вариативности эффектов GcMAF-RF на иммунокомпетентные клетки и, как следствие, о более тонкой регуляции иммунных реакций.

Полученные нами данные позволяют рассматривать GcMAF-RF в качестве перспективного препарата, обладающего широким «репертуаром» биологических эффектов, наиболее значимых с точки зрения его потенциального использования для стимуляции противоопухолевого или противоинфекционного иммунитета.

Заключение

В настоящей работе охарактеризованы ранее неизвестные свойства активирующего макрофаги препарата GcMAF-RF: способность индуцировать поляризацию GM-CSF-дифференцированных M0-макрофагов в M1-клетки, индуцировать конечное созревание ДК и усиливать их функциональную активность в алло-СКЛ. Показано также, что GcMAF-RF способен эффективно стимулировать синтез циркулирующими клетками крови цитокинов/хемокинов с провоспалительной и иммунорегуляторной активностью. Полученные данные позволяют рассматривать GcMAF-RF в качестве перспективного препарата, обладающего широким «репертуаром» биологических эффектов.

Благодарности

Работа была выполнена при поддержке ООО «АКТИВАТОР МАФ» и ООО «БА-фарма».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Соавторы статьи А.С. Проскурина и С.С. Богачев являются директорами ООО «АКТИВАТОР МАФ» и ООО «БА-фарма» соответственно.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ВЛИЯНИЕ GcMAF-RF НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ МИТОГЕН-ИНДУЦИРОВАННЫМИ И НЕИНДУЦИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ
APPLICATION 1. EFFECT OF GcMAF-RF ON CYTOKINE PRODUCTION BY MITOGEN-INDUCED AND NON-INDUCED WHOLE BLOOD CELLS

Доноры Donors	Цитокины (пг/мл) Cytokines (pg/ml)														
	TGF-β	GM-CSF	IL-2	VEGF	TNFα	MCP	G-CSF	IL-1β	IFNγ	IL-8	IL-6	IL-17	IL-4	IL-18	IL-10
Комплекс митогенов Mitogen complex															
1	15974,1	93,7	80,3	56,7	1394,7	3379,8	786,6	2355,4	3094,1	28026,3	15307,0	135,1	3,0	46,0	120,9
2	12252,9	107,0	70,8	113,9	500,0	3595,2	605,8	1847,3	782,5	30460,5	5452,0	58,1	2,8	156,3	357,7
3	13064,6	109,5	64,3	110,2	548,6	3308,8	953,6	2426,8	592,3	30657,9	7885,2	51,0	2,9	118,3	417,0
4	19696,7	24,5	41,3	156,8	1006,2	3591,3	1078,6	3860,4	1162,8	46763,2	12893,6	70,0	0,7	176,2	491,2
5	19791,5	38,3	32,7	150,0	1040,0	3479,1	1107,7	4625,5	953,0	43447,4	14271,3	47,9	0,7	141,6	422,0
6	14099,0	159,6	92,6	86,2	718,7	2991,5	1216,0	2583,9	2367,3	39144,7	12219,4	406,2	2,8	153,3	684,4
1	13238,5	158,2	78,5	59,0	701,4	3065,0	1505,5	2910,1	1927,9	37368,4	13978,2	353,1	2,8	120,0	808,9
2	0,8	1,1	0,9	2,0	0,4	1,1	0,8	0,8	0,3	1,1	0,4	0,4	0,9	3,4	3,0
3	0,8	1,2	0,8	1,9	0,4	1,0	1,2	1,0	0,2	1,1	0,5	0,4	1,0	2,6	3,4
4	1,2	0,3	0,5	2,8	0,7	1,1	1,4	1,6	0,4	1,7	0,8	0,5	0,2	3,8	4,1
5	1,2	0,4	0,4	2,6	0,7	1,0	1,4	2,0	0,3	1,6	0,9	0,4	0,2	3,1	3,5
6	0,9	1,7	1,2	1,5	0,5	0,9	1,5	1,1	0,8	1,4	0,8	3,0	0,9	3,3	5,7
1	0,8	1,7	1,0	1,0	0,5	0,9	1,9	1,2	0,6	1,3	0,9	2,6	0,9	2,6	6,7
2	12702,2	131,0	80,2	56,4	868,2	3707,4	582,9	1587,8	1892,9	18386,2	7475,1	55,2	3,1	53,3	293,4
3	13311,0	127,0	77,5	79,4	739,6	3738,4	509,6	1534,4	1506,0	18004,7	7311,1	65,5	3,7	51,7	337,9
4	20787,7	16,4	48,8	130,1	1318,7	4024,8	897,4	3804,0	2611,1	35473,7	14359,2	76,7	1,1	70,2	402,2
5	24677,6	18,5	53,2	120,7	1372,2	4930,3	859,9	3365,1	2487,5	44947,4	15766,3	78,1	1,1	67,6	426,9
6	14692,0	153,9	91,9	31,3	986,5	3010,8	1101,5	1992,4	3638,1	20592,1	14359,2	335,0	3,4	55,5	692,4
1	13956,7	178,7	106,9	34,6	944,3	3037,9	1238,9	2189,3	3683,6	22447,4	13948,9	370,1	4,0	49,8	748,7
2	0,8	1,4	1,0	1,0	0,6	1,1	0,7	0,7	0,6	0,7	0,5	0,4	1,0	1,2	2,4
3	0,8	1,4	1,0	1,4	0,5	1,1	0,6	0,7	0,5	0,6	0,5	0,5	1,2	1,1	2,8
4	1,3	0,2	0,6	2,3	0,9	1,2	1,1	1,6	0,8	1,3	0,9	0,6	0,4	1,5	3,3
5	1,5	0,2	0,7	2,1	1,0	1,5	1,1	1,4	0,8	1,6	1,0	0,6	0,4	1,5	3,5
6	0,9	1,6	1,1	0,6	0,7	0,9	1,4	0,8	1,2	0,7	0,9	2,5	1,1	1,2	5,7
1	0,9	1,9	1,3	0,6	0,7	0,9	1,6	0,9	1,2	0,8	0,9	2,7	1,4	1,1	6,2

Приложение 1 (продолжение)
Appendix 1 (continued)

Доноры Donors	Цитокины (пг/мл) Cytokines (pg/ml)														
	TGF-β	GM-CSF	IL-2	VEGF	TNFα	MCP	G-CSF	IL-1β	IFNγ	IL-8	IL-6	IL-17	IL-4	IL-18	IL-10
1	14170,2	141,7	93,9	52,2	1090,7	3602,9	374,5	1629,8	2923,1	20552,6	9053,5	67,2	3,6	44,7	244,0
2	12774,7	135,3	84,3	49,3	907,7	3239,2	529,8	1450,4	2211,3	17711,3	8408,6	66,2	3,9	45,0	268,7
3	22732,7	16,7	46,7	71,1	1859,2	4489,2	770,3	2604,0	4216,7	41157,9	18580,4	62,2	1,0	55,5	303,3
4	23871,2	17,1	54,1	74,2	1831,1	4911,0	953,6	2841,6	4210,2	48855,3	19371,8	75,5	1,2	59,0	347,8
5	13340,0	178,3	117,9	15,6	1166,7	3409,4	1114,0	2032,2	4314,2	25447,4	16206,0	355,0	4,2	44,7	708,5
6	15047,8	183,9	119,9	12,8	1189,2	3606,8	978,6	2145,0	4164,7	25881,6	16088,7	336,4	3,6	43,4	676,3
1	0,9	1,5	1,2	0,9	0,8	1,1	0,5	0,7	0,9	0,7	0,6	0,5	1,2	1,0	2,0
2	0,8	1,4	1,1	0,9	0,7	1,0	0,7	0,6	0,7	0,6	0,5	0,5	1,3	1,0	2,2
3	1,4	0,2	0,6	1,3	1,3	1,3	1,0	1,1	1,4	1,5	1,2	0,5	0,3	1,2	2,5
4	1,5	0,2	0,7	1,3	1,3	1,5	1,2	1,2	1,4	1,7	1,3	0,6	0,4	1,3	2,9
5	0,8	1,9	1,5	0,3	0,8	1,0	1,4	0,9	1,4	0,9	1,1	2,6	1,4	1,0	5,9
6	0,9	2,0	1,5	0,2	0,9	1,1	1,2	0,9	1,3	0,9	1,1	2,5	1,2	0,9	5,6
Спонтанная продукция Spontaneous production	4071,2	2,0	2,0	36,7	2,8	1281,1	2,0	3,5	2,0	362,1	12,6	1,0	0,4	33,2	1,2
1	3381,0	15,3	2,0	88,2	33,3	3000,0	70,6	321,1	2,3	4204,2	569,7	1,0	2,1	149,3	6,7
2	5471,7	35,2	2,0	123,7	51,8	4015,2	178,6	670,0	2,0	3456,0	2385,5	1,0	1,5	110,2	19,5
3	12362,0	10,4	2,0	139,4	39,8	34770,5	88,2	382,7	2,0	14810,5	2185,3	1,0	1,5	150,2	15,0
4	8935,3	24,0	3,2	103,8	50,4	40693,7	132,3	613,2	2,0	17507,8	3822,7	1,0	1,6	101,7	27,9
5	4882,2	12,5	14,2	85,3	30,8	1481,7	46,3	330,3	2,0	3913,7	806,4	1,0	1,9	125,4	8,3
6	7056,1	27,3	2,0	69,7	42,1	3750,0	119,6	582,7	3,5	3878,5	2289,0	1,0	1,9	90,8	19,0
1	0,8	7,6	1,0	2,4	11,9	2,3	35,3	91,7	1,2	11,6	45,2	1,0	5,1	4,5	5,7
2	1,3	17,6	1,0	3,4	18,4	3,1	89,3	191,3	1,0	9,5	189,4	1,0	3,8	3,3	16,4
3	3,0	5,2	1,0	3,8	14,2	27,1	44,1	109,3	1,0	40,9	173,6	1,0	3,8	4,5	12,7
4	2,2	12,0	1,6	2,8	18,0	31,8	66,2	175,1	1,0	48,4	303,6	1,0	4,1	3,1	23,5
5	1,2	6,3	7,1	2,3	11,0	1,2	23,1	94,3	1,0	10,8	64,0	1,0	4,8	3,8	7,0
6	1,7	13,6	1,0	1,9	15,0	2,9	59,8	166,3	1,8	10,7	181,8	1,0	4,8	2,7	16,0

Приложение 1 (окончание)
Application 1 (continued)

Доноры Donors	Цитокины (пг/мл) Cytokines (pg/ml)														
	TGF-β	GM-CSF	IL-2	VEGF	TNFα	MCP	G-CSF	IL-1β	IFNγ	IL-8	IL-6	IL-17	IL-4	IL-18	IL-10
1	2029,8	3,3	2,0	35,6	8,7	182,9	2,0	34,9	2,0	131,4	76,1	1,0	1,9	51,2	1,0
2	5729,6	9,8	2,0	61,2	14,0	567,1	27,8	79,5	2,0	340,2	274,2	1,0	1,9	49,5	3,1
3	11109,2	2,2	2,0	42,7	16,9	23404,9	8,2	58,8	2,0	7065,8	877,0	1,0	1,6	49,5	5,2
4	10667,1	4,4	15,0	52,6	17,9	22131,9	40,6	109,2	2,7	5234,2	1063,9	1,0	1,9	49,5	5,7
5	7572,0	4,4	2,0	46,9	11,0	311,0	2,0	48,1	3,5	340,2	174,2	1,0	1,9	47,0	1,0
6	4111,3	5,5	5,5	0,0	12,3	658,5	14,9	76,0	2,7	286,1	361,3	1,0	2,2	36,9	1,6
1	0,5	1,6	1,0	1,0	3,1	0,1	1,0	10,0	1,0	0,4	6,0	1,0	4,8	1,5	0,8
2	1,4	4,9	1,0	1,7	5,0	0,4	13,9	22,7	1,0	0,9	21,8	1,0	4,8	1,5	2,6
3	2,7	1,1	1,0	1,2	6,0	18,3	4,1	16,8	1,0	19,5	69,6	1,0	4,1	1,5	4,4
4	2,6	2,2	7,5	1,4	6,4	17,3	20,3	31,2	1,4	14,5	84,5	1,0	4,8	1,5	4,8
5	1,9	2,2	1,0	1,3	3,9	0,2	1,0	13,7	1,8	0,9	13,8	1,0	4,8	1,4	0,8
6	1,0	2,7	2,8	0,0	4,4	0,5	7,4	21,7	1,4	0,8	28,7	1,0	5,5	1,1	1,3
1	3381,0	3,3	2,0	42,7	8,2	219,5	2,0	16,5	2,7	108,2	30,6	1,0	2,2	36,9	1,0
2	2687,1	2,0	2,0	25,6	5,6	457,3	2,0	14,5	2,0	85,1	37,7	1,0	2,5	35,8	1,0
3	11698,8	2,7	2,0	59,7	11,6	13815,8	2,0	77,2	2,7	4512,3	147,2	1,0	1,6	42,8	1,0
4	12177,8	4,4	6,3	69,7	28,3	26518,4	52,0	156,5	3,1	13223,7	1522,3	1,0	1,8	44,5	5,7
5	4367,0	2,0	2,0	19,9	5,5	182,9	5,2	8,4	2,7	2,0	20,4	1,0	2,2	32,7	1,0
6	3161,9	3,3	2,0	31,3	7,4	622,0	10,4	15,0	3,1	162,4	47,1	1,0	1,8	36,9	1,0
1	0,8	1,6	1,0	1,2	2,9	0,2	1,0	4,7	1,4	0,3	2,4	1,0	5,5	1,1	0,8
2	0,7	1,0	1,0	0,7	2,0	0,4	1,0	4,1	1,0	0,2	3,0	1,0	6,2	1,1	0,9
3	2,9	1,4	1,0	1,6	4,1	10,8	1,0	22,0	1,4	12,5	11,7	1,0	4,1	1,3	0,8
4	3,0	2,2	3,2	1,9	10,1	20,7	26,0	44,7	1,6	36,5	120,9	1,0	4,4	1,3	4,8
5	1,1	1,0	1,0	0,5	2,0	0,1	2,6	2,4	1,4	0,0	1,6	1,0	5,5	1,0	0,8
6	0,8	1,6	1,0	0,9	2,6	0,5	5,2	4,3	1,6	0,4	3,7	1,0	4,4	1,1	0,8

Примечание. ЦИ = продукция при активаторах митоген + GcMAF-RF/митоген; ИВ = продукция при активаторе GcMAF-RF/спонтанная продукция. Исползованные концентрации активатора GcMAF-RF: 5,0; 0,5 и 0,05 мкг/мл.

Note. CI = production with activators mitogen + GcMAF-RF/mitogen; FI = production with GcMAF-RF activator/spontaneous production. The used concentrations of the activator GcMAF-RF: 5.0, 0.5 and 0.05 µg/ml.

Список литературы / References

1. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб: Фолиант, 2008. 552 с. [Ketlinsky S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines. St. Petersburg: Foliant, 2008. 552 p.]
2. Козлова А.И., Воропаев Е.В., Конопля А.И. Роль дендритных клеток в формировании противоопухолевого иммунитета (обзор литературы) // Проблемы здоровья и экологии, 2015. С. 19-24. [Kozlova A.I., Voropaev E.V., Konoplya A.I. The role of dendritic cells in the formation of antitumor immunity (literature review). *Problemy zdorovya i ekologii = Health and Ecology Problems*, 2015, pp. 19-24. (In Russ.)]
3. Левитес Е.В., Кирикович С.С., Долгова Е.В., Проскурина А.С., Риттер Г.С., Останин А.А., Черных Е.Р., Богачев С.С. Оценка *in vitro* биологической активности отечественного препарата макрофаг-активирующего фактора (GcMAF-RF) // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2020. Т. 24, № 3. С. 284-291. [Levites E.V., Kirikovich S.S., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Ritter G.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. *In vitro* assay of biological activity of a national preparation of macrophage activating factor (GcMAF-RF). *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2020, Vol. 24, no. 3, pp. 284-291. (In Russ.)]
4. Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Козлов Ю.П., Ступак В.В., Никонов С.Д., Останин А.А., Черных Е.Р. Частично зрелые дендритные клетки как потенциальная основа для индукции противоопухолевого ответа у больных злокачественными глиомами // Медицинская иммунология, 2005. Т. 7, № 4. С. 365-374. [Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Kozlov Yu.P., Stupak V.V., Nikonov S.D., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Semi-mature dendritic cells as a potential basis for the induction of anti-tumor response in patients with malignant gliomas. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2005, Vol. 7, no. 4, pp. 365-374. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2005-4-365-374.
5. Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Алямкина Е.А., Богачев С.С., Останин А.А., Черных Е.Р. Функциональная активность IFN α - и IL-4-индуцированных дендритных клеток человека: сравнительное исследование // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 1. С. 43-52. [Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Alyamkina E.A., Bogachev S.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Functional activity of IFN α - and IL-4-induced human dendritic cells: a comparative study. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 1, pp. 43-52. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-1-43-52.
6. Монастырская Е.А., Лямина С.В., Малышев И.Ю. M1 и M2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии // Патогенез, 2008. Т. 6, № 4. С. 31-39. [Monastyrskaya E.A., Lyamina S.V., Malyshev I.Yu. M1 and M2 phenotypes of activated macrophages and their role in the immune response and pathology. *Patogenez = Pathogenesis*, 2008, Vol. 6, no. 4, pp. 31-39. (In Russ.)]
7. Останин А.А., Кирикович С.С., Долгова Е.В., Проскурина А.С., Черных Е.Р., Богачев С.С. Тернистый путь макрофаг-активирующего фактора (GcMAF): от открытия к клинической практике // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2019. Т. 23, № 5. С. 624-631. [Ostanin A.A., Kirikovich S.S., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Chernykh E.R., Bogachev S.S. A thorny pathway of macrophage activating factor (GcMAF): from bench to bedside. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2019, Vol. 23, no. 5, pp. 624-631. (In Russ.)]
8. Рыжикова С.Л., Дружинина Ю.Г., Рябичева Т.Г., Вараксин Н.А. Стандартизация методики определения продукции цитокинов клетками крови *ex vivo* // Клиническая лабораторная диагностика, 2011. Т. 11. С. 49-53. [Ryzhikova S.L., Druzhinina Yu.G., Ryabicheva T.G., Varaksin N.A. Standardization of the method for determining the production of cytokines by blood cells *ex vivo*. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2011, Vol. 11, pp. 49-53. (In Russ.)]
9. Сахно Л.В., Шевела Е.Я., Тихонова М.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Молекулярные механизмы иммуносупрессорной активности M2-макрофагов // Иммунология, 2016. Т. 37, № 6. С. 311-315. [Sakhno I.V., Shevela E.Ya., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Molecular mechanisms of M2 macrophage immunosuppressive activity. *Immunologiya = Immunologiya*, 2016, Vol. 37, no. 6, pp. 311-315. (In Russ.)]
10. Талаев В.Ю., Плеханова М.В., Матвейчев А.В. Экспериментальные модели, пригодные для оценки влияния компонентов новых разрабатываемых вакцин на дифференцировку дендритных клеток // Медиаль, 2014. Т. 2, № 12. С. 135-153. [Talaev V.Yu., Plekhanova M.V., Matveichev A.V. Experimental models suitable for evaluating the effect of components of new vaccines under development on dendritic cell differentiation. *Medial*, 2014, Vol. 2, no. 12, pp. 135-153. (In Russ.)]
11. Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Тыринова Т.В., Тихонова М.А., Ступак В.В., Мишинов С.В., Пендюрин И.В., Останин А.А. Противоопухолевая активность дендритных клеток здоровых доноров и больных с опухолями головного мозга // Медицинская иммунология, 2010. Т. 12, № 3. С. 199-206. [Chernykh E.R., Leplina O.Yu., Tyrinova T.V., Tikhonova M.A., Stupak V.V., Mishinov S.V., Pendyurin I.V., Ostanin A.A. Anti-tumor

activity of dendritic cells in healthy donors and patients with brain tumors. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2010, Vol. 12, no. 3, pp. 199-206. (In Russ.)]

12. Черных Е.Р., Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Курочкина Ю.Д., Олейник Е.А., Сахно Л.В., Останин А.А. Фенотип и функции дендритных клеток человека, генерированных из субпопуляций моноцитов CD14⁺, оппозитных по экспрессии CD16 // Бюллетень сибирской медицины, 2019. Т. 18, № 1. С. 266-276. [Chernykh E.R., Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Kurochkina Yu.D., Oleynik E.A., Sakhno L.V., Ostanin A.A. Phenotype and functions of human dendritic cells derived from CD14⁺ monocyte subsets opposed to CD16 expression. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 266-276. (In Russ.)]

13. Шевела Е.Я., Янковская А.А., Сахно Л.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Патент. РФ 2717024 Способ идентификации функционального M1 и M2 фенотипа макрофагов человека, генерированных *in vitro* из моноцитов крови / № 2019118746, заявл. 17.06.2019; опубл. 17.03.2020, Бюл. № 8. [Shevela E.Ya., Yankovskaya A.A., Sakhno L.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Pat. RF 2717024 Method for identification of functional M1 and M2 phenotype of human macrophages generated *in vitro* from blood monocytes / No. 2019118746, Appl. 06/17/2019; publ. 03.17.2020, Bul. No. 8.]

14. Banchereau J., Steinman R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998, Vol. 392, no. 6673, pp. 245-252.

15. Blanco P., Palucka A.K., Pascual V., Banchereau J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2008, Vol. 19, no. 1, pp. 41-52.

16. Cassetta L., Cassol E., Poli G. Macrophage polarization in health and disease. *Sci. World J.*, 2011, Vol. 11, pp. 2391-2402.

17. Cheda A., Nowosielska E.M., Wrembel-Wargocka J., Janiak M.K. Production of cytokines by peritoneal macrophages and splenocytes after exposures of mice to low doses of X-rays. *Radiat. Environ. Biophys.*, 2008, Vol. 47, pp. 275-283.

18. Duque G.A., Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 491. doi: 10.3389/fimmu.2014.00491.

19. Fleetwood A.J., Lawrence T., Hamilton J.A., Cook A.D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 8, pp. 5245-5252.

20. Fogg D.K., Sibon C., Miled C., Jung S., Aucouturier P., Littman D.R., Cumano A., Geissmann F.A. Clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science*, 2006, Vol. 311, no. 5757, pp. 83-87.

21. Geissmann F., Gordon S., Hume D.A., Mowat A.M., Randolph G.J. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 6, pp. 453-460.

22. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 3, pp. 23-35.

23. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, Vol. 5, no. 12, pp. 953-964.

24. Homma S., Yamamoto M., Yamamoto N. Vitamin D-binding protein (group-specific component) is the sole serum protein required for macrophage activation after treatment of peritoneal cells with lysophosphatidylcholine. *Immunol. Cell Biol.*, 1993, Vol. 71, pp. 249-257.

25. Hume D.A. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 9, pp. 5829-5835.

26. Inui T., Kuchiike D., Kubo K., Mette M., Uto Y., Hori H., Sakamoto N. Clinical experience of integrative cancer immunotherapy with GcMAF. *Anticancer Res.*, 2013, Vol. 33, no. 7, pp. 2917-2919.

27. Ishikawa M., Inoue T., Inui T., Kuchiike D., Kubo K., Uto Y., Nishikata T. A novel assay system for macrophage-activating factor activity using a human U937 cell line. *Anticancer Res.*, 2014, Vol. 34, no. 8, pp. 4577-4581.

28. Jaguin M., Houllbert N., Fardel O., Lecureur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell. Immunol.*, 2013, Vol. 281, pp. 51-61.

29. Kisker O., Onizuka S., Becker C.M., Fannon M., Flynn E., d'Amato R., Zetter B., Folkman J., Ray R., Swamy N., Pirie-Shepherd S. Vitamin D binding protein-macrophage activating factor (DBP-maf) inhibits angiogenesis and tumor growth in mice. *Neoplasia*, 2003, Vol. 5, no. 1, pp. 32-40.

30. Kroemer G., Galluzzi L., Kepp O., Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 31, pp. 51-72.

31. Kuchiike D., Uto Y., Mukai H., Ishiyama N., Abe C., Tanaka D., Kawai T., Kubo K., Mette M., Inui T., Endo Y., Hori H. Degalactosylated/desialylated human serum containing GcMAF induces macrophage phagocytic activity and *in vivo* antitumor activity. *Anticancer Res.*, 2013, Vol. 33, no. 7, pp. 2881-2885.
32. Kurosaka K., Takahashi M., Kobayashi Y. Activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 is involved in production of CXC-chemokine by macrophages during phagocytosis of late apoptotic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, Vol. 306, no. 4, pp. 1070-1074.
33. Lamagna C., Aurrand-Lions M., Imhof B.A. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, Vol. 80, no. 4, pp. 705-713.
34. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.*, 2008, Vol. 1, no. 13, pp. 453-461.
35. Mohamad S.B., Nagasawa H., Uto Y., Hori H. Tumor cell alpha-N-acetylgalactosaminidase activity and its involvement in GcMAF-related macrophage activation. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 2002, Vol. 132, pp. 1-8.
36. Murray P.J., Wynn T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 11, pp. 723-737.
37. Nagasawa H., Uto Y., Sasaki H., Okamura N., Murakami A., Kubo S., Kirk K.L., Hori H. Gc protein (vitamin D-binding protein): Gc genotyping and GcMAF precursor activity. *Anticancer Res.*, 2005, Vol. 25, no. 6, pp. 3689-3696.
38. Nagy L., Szanto A., Szatmari I., Szeles, L. Nuclear hormone receptors enable macrophages and dendritic cells to sense their lipid environment and shape their immune response. *Physiol. Rev.*, 2012, Vol. 92, pp. 739-789.
39. Naraparaju V.R., Yamamoto N. Roles of β -galactosidase of B lymphocytes and sialidase of T lymphocytes in inflammation-primed activation of macrophages. *Immunol. Lett.*, 1994, Vol. 43, no. 3, pp. 143-148.
40. O'Shea J.J., Siegel R.M. Cytokines and cytokine receptors. Clinical immunology. Ed. Rich R.R., Fleisher T.A., Shearer W.T., Schroeder H.W., Frew A.J., Weyand C.M. Elsevier, 2019, pp. 127-155.
41. Rehder D.S., Nelson R.W., Borges C.R. Glycosylation status of vitamin D binding protein in cancer patients. *Protein Sci.*, 2009, Vol. 18, no. 10, pp. 2036-2042.
42. Roszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, 816460. doi: 10.1155/2015/816460.
43. Saburi E., Saburi A., Ghanei M. Promising role for Gc-MAF in cancer immunotherapy: from bench to bedside. *Casp. J. Intern. Med.*, 2017, Vol. 8, no. 4, pp. 228-238.
44. Sica A., Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J. Clin. Invest.*, 2007, Vol. 117, no. 5, pp. 1155-1166.
45. Tarique A.A., Logan J., Thomas E., Holt P.G., Sly P.D., Fantino E. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2015, Vol. 53, no. 5, pp. 676-688.
46. Thyer L., Ward E., Smith R., Branca J.J.V., Morucci G., Gulisano M., Noakes D., Eslinger R., Pacini S. GC protein-derived macrophage-activating factor decreases α -N-acetylgalactosaminidase levels in advanced cancer patients. *Oncimmunology*, 2013, Vol. 2, no. 8, pp. 1-7.
47. Thyer L., Ward E., Smith R., Fiore M., Magherini S., Branca J., Morucci G., Gulisano M., Ruggiero M., Pacini S. A novel role for a major component of the vitamin d axis: vitamin d binding protein-derived macrophage activating factor induces human breast cancer cell apoptosis through stimulation of macrophages. *Nutrients*, 2013, Vol. 5, no. 7, pp. 2577-2589.
48. Weagel E., Smith C., Liu P., Robinson R., O'Neill K. Macrophage polarization and its role in cancer. *J. Clin. Cell Immunol.*, 2015, Vol. 6, pp. 4-11.
49. Yamamoto N., Homma S. Vitamin D3 binding protein (group-specific component) is a precursor for the macrophage-activating signal factor from lysophosphatidylcholine-treated lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1991, Vol. 88, no. 19, pp. 8539-8543.
50. Yamamoto N., Kumashiro R. Conversion of vitamin D3 binding protein (group-specific component) to a macrophage activating factor by the stepwise action of beta-galactosidase of B cells and sialidase of T cells. *J. Immunol.*, 1993, Vol. 151, no. 5, pp. 2794-2802.
51. Yamamoto N., Naraparaju V.R., Asbell S.O. Deglycosylation of serum vitamin D3-binding protein leads to immunosuppression in cancer patients. *Cancer Res.*, 1996, Vol. 56, no. 12, pp. 2827-2831.
52. Yamamoto N., Suyama H., Yamamoto N. Immunotherapy for prostate cancer with Gc protein-derived macrophage-activating factor, GcMAF. *Transl. Oncol.*, 2008, Vol. 1, pp. 65-72.

53. Yaraee R., Askari N., Naseri M. The effect of ms14 on production of pro-inflammatory cytokines by macrophages. *Iran. J. Basic Med. Sci.*, 2011. Vol. 14, no. 1, pp. 89-93.

54. Zhang G.-M., Wang X.-H., Sun L.-J. Effect of tacrolimus on maturity and allostimulatory activity of cultured dendritic cells of rats *in vitro*. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2009, Vol. 23, no. 5, pp. 345-350.

55. Zhou F., Zhang G-X., Rostami A. Distinct role of IL-27 in immature and LPS-induced mature dendritic cell-mediated development of CD4⁺CD127⁺3G11⁺ regulatory T cell subset. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2562. doi 10.3389/fimmu.2018.02562.

Авторы:

Кирикович С.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории индуцированных клеточных процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Левитес Е.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории индуцированных клеточных процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Долгова Е.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории индуцированных клеточных процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Проскурина А.С. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории индуцированных клеточных процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Риттер Г.С. — аспирант, исследователь лаборатории индуцированных клеточных процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Рузанова В.С. — исследователь лаборатории индуцированных клеточных процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” Сибирского отделения Российской академии наук»; магистрант ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Леплина О.Ю. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Шевела Е.Я. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Останин А.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Kirikovich S.S., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Induced Cell Processes, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Levites E.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Induced Cell Processes, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Dolgorova E.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Induced Cell Processes, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Proskurina A.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Induced Cell Processes, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Ritter G.S., Postgraduate Student, Researcher, Laboratory of Induced Cell Processes, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Ruzanova V.S., Researcher, Laboratory of Induced Cell Processes, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Master Study, Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russian Federation

Leplina O.Yu., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Shevela E.Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Ostanin A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Рябичева Т.Г. — ведущий специалист лаборатории стабилизации АО «Вектор-Бест», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Рыжикова С.Л. — ведущий биотехнолог лаборатории стабилизации АО «Вектор-Бест», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Дружинина Ю.Г. — ведущий биотехнолог лаборатории стабилизации АО «Вектор-Бест», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Вараксин Н.А. — заведующий лабораторией стабилизации АО «Вектор-Бест», р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Черных Е.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Богачев С.С. — д.б.н., заведующий лабораторией индуцированных клеточных процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Ryabicheva T.G., Leading Specialist, Laboratory of Stabilization, JSC Vector-Best, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Ryzhikova S.L., Leading Biotechnologist, Laboratory of Stabilization, JSC Vector-Best, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Druzhinina Yu.G., Leading Biotechnologist, Laboratory of Stabilization, JSC Vector-Best, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Varaksin N.A., Head, Laboratory of Stabilization, JSC Vector-Best, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Chernykh E.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Bogachev S.S., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Induced Cell Processes, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 21.09.2020
Принята к печати 09.01.2021

Received 21.09.2020
Accepted 09.01.2021