

СРАВНЕНИЕ *IN VITRO* МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СЕНЕСЦЕНТНЫХ ОПУХОЛЬ- АССОЦИИРОВАННЫХ МАКРОФАГОВ

Пухальская Т.В.^{1,2,3}, Юракова Т.Р.³, Михайловская В.С.¹,
Богданова Д.А.^{1,2}, Демидов О.Н.^{1,2}

¹ АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус»», Сириус, Россия

² Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Резюме. Опухоль-ассоциированные макрофаги (от англ. Tumor-associated macrophages – TAMs) являются важной и наиболее представленной популяцией иммунных клеток в микроокружении опухоли. В значительной мере именно TAMs могут определять направленность противоопухолевого иммунного ответа, они могут или дополнительно стимулировать его, или наоборот способствовать формированию иммуносупрессивного микроокружения. Одновременно под влиянием опухолевых клеток и противоопухолевой терапии многие клетки в микроокружении опухоли (от англ. tumor microenvironment, TME) могут развивать состояние сенесцентности. Последнее десятилетие особую популярность приобретает тема старения (сенесцентности, от англ. senescence) и поиска терапии, направленной на удаление сенесцентных клеток. В поисках новых терапевтических стратегий для лечения онкологических заболеваний стареющим клеткам иммунной системы в микроокружении опухоли уделяется особое внимание. Так как наличие сенесцентных TAMs в опухоли ассоциировано с неблагоприятным прогнозом и плохим ответом на терапию. Учитывая актуальность изучения роли стареющих иммунных клеток в TME (в частности опухоль-ассоциированных макрофагов), мы провели сравнительный анализ экспериментальных протоколов получения опухоль-ассоциированных макрофагов *in vitro*, чтобы определить наиболее релевантный подход.

Мы проверили два протокола получения макрофагов из костного мозга мыши: 1) путем добавления кондиционной среды от клеточной линии саркомы мыши L929 (LCCM) (LCCM-BMDM); 2) путем добавления рекомбинантного M-CSF мыши (M-CSF-BMDM). Нами было показано, что LCCM-BMDM по сравнению с M-CSF-BMDM имеют повышенную экспрессию фермента аргиназы (Arg1), способного подавлять активность противоопухолевых цитотоксических лимфоцитов, путем истощения аргинина в микроокружении опухоли. Также LCCM-BMDM демонстрировали повышенную секрецию факторов, характерных для фенотипа, ассоциированного со старением (от англ. senescence-associated secretory phenotype, SASP) – IL-6 и TNF. Как Arg1, так и IL-6 с TNF являются маркерами,

Адрес для переписки:

Пухальская Тамара Владимировна
АНОО ВО НТУ «Сириус»
354340, Россия, Краснодарский край, Федеральная
территория «Сириус», Олимпийский пр., 1.
Тел.: 8 (996) 121-31-34.
E-mail: tomapukhalskaya@gmail.com

Address for correspondence:

Tamara V. Pukhalskaia
Sirius University of Science and Technology
1 Olympic Ave
Federal Territory Sirius
Krasnodar Region
354340 Russian Federation
Phone: + 7 (996) 121-31-34.
E-mail: tomapukhalskaya@gmail.com

Образец цитирования:

Т.В. Пухальская, Т.Р. Юракова, В.С. Михайловская,
Д.А. Богданова, О.Н. Демидов «Сравнение *in vitro*
моделей для исследования сенесцентных опухоль-
ассоциированных макрофагов» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 4. С. 693–700.
doi: 10.15789/1563-0625-COI-16929

© Пухальская Т.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

T.V. Pukhalskaia, T.R. Yurakova, V.S. Mikhailovskaya,
D.A. Bogdanova, O.N. Demidov “Comparison of *in vitro*
models for the study of senescence of macrophages associated
with a tumor”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4, pp. 693–700.
doi: 10.15789/1563-0625-COI-16929

© Pukhalskaia T.V. et al., 2024

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-COI-16929

характерными для сенесцентных макрофагов. Таким образом использование LCCM для получения первичной культуры макрофагов ограничивает дальнейшие шаги в создании модели опухоль-ассоциированных макрофагов, которая отражала бы специфичные характеристики фенотипического ответа макрофагов для различных типов опухолей. Мы считаем, что дифференцировка макрофагов в присутствии M-CSF представляется более предпочтительным протоколом для изучения TAMs и сенесцентных TAMs с последующим тестированием новых терапевтических стратегий.

Ключевые слова: сенесцентные клетки, $p21^{cip1}$, микроокружение опухоли, TAMs, SASP, *in vitro*

COMPARISON OF *IN VITRO* MODELS FOR THE STUDY OF SENEESCENCE OF MACROPHAGES ASSOCIATED WITH A TUMOR

Pukhalskaia T.V.^{a, b, c}, Yurakova T.R.^c, Mikhailovskaya V.S.^a, Bogdanova D.A.^{a, b}, Demidov O.N.^{a, b}

^a Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius, Russian Federation

^b Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

^c Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. Tumor-associated macrophages (TAMs) are an important and most represented population of immune cells in the tumor microenvironment. To a great extent, TAMs can determine the direction of the antitumor immune response; they can either additionally stimulate it or on the contrary contribute to the formation of immunosuppressive microenvironment. At the same time, under the influence of tumor cells and antitumor therapy, many cells in the tumor microenvironment (TME) can develop a state of senescence. Over the last decade, the topic of senescence and the search for therapies aimed at removing senescent cells has gained popularity. In the search for new therapeutic strategies to treat cancer, senescent cells of the immune system in the tumor microenvironment have received special attention since the presence of senescent TAMs in tumors is associated with poor prognosis and poor response to therapy. Given the relevance of studying the role of senescent immune cells in TME (in particular tumor-associated macrophages), we performed a comparative analysis of experimental protocols to obtain tumor-associated macrophages *in vitro* to determine the most relevant approach. We tested two protocols for obtaining macrophages from mouse bone marrow: (1) by adding conditioned medium from the L929 mouse sarcoma cell line (LCCM) (LCCM-BMDM); and (2) by adding recombinant mouse M-CSF (M-CSF-BMDM). We showed that LCCM-BMDMs, compared to M-CSF-BMDMs, have increased expression of the arginase enzyme (Arg1), which can inhibit the activity of anti-tumor cytotoxic lymphocytes by depleting arginine in the tumor microenvironment. LCCM-BMDMs also exhibited increased secretion of factors characteristic of the senescence-associated secretory phenotype (SASP): IL-6 and TNF. Both Arg1 and IL-6 and TNF are markers characteristic of senescence-associated macrophages. Thus, the use of LCCM to obtain primary macrophage culture limits further steps in creating a model of tumor-associated macrophages that reflects the specific characteristics of the macrophage phenotypic response for different tumor types and also limits studies of senescence formation in tumor-associated macrophages in models of carcinogenesis other than sarcoma. We believe that differentiation of macrophages in the presence of M-CSF appears to be a more preferable protocol to study TAMs and senescent TAMs to test new therapeutic strategies.

Keywords: senescent cells, $p21^{cip1}$, tumor microenvironment, TAMs, SASP, *in vitro*

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант РНФ 19-75-30032).

Введение

Несмотря на широкий спектр различных лекарственных средств, используемых в терапии рака, в данной области остается еще много не-

решенных вопросов, а поиск новых подходов, направленных на увеличение эффективности противоопухолевой терапии, не теряет своей актуальности. Стоит учитывать, что любая терапия оказывает эффект не только на опухолевые клетки, но и на клетки микроокружения (от англ. tumor microenvironment, TME), в том числе и на клетки иммунной системы. Как опухолевые

клетки, так и клетки ТМЕ могут подвергаться «старению» (сенесценс), спонтанно или под воздействием противоопухолевой терапии [2]. Сенесцентность характеризуется, необратимой остановкой клеточного цикла и устойчивостью к апоптотическим стимулам, что делает такие клетки устойчивыми и к дальнейшим вмешательствам. Кроме того, для большинства сенесцентных клеток характерны повышенная активность лизосом, увеличение гликолиза, увеличение повреждений ДНК, а также повышенная секреция хемокинов, цитокинов и факторов роста, объединенных под общим названием «секреторный фенотип, ассоциированный со старением» (от англ. senescence-associated secretory phenotype, SASP). В свою очередь SASP, паракринно влияя на клетки ТМЕ, способствует целому ряду патологических процессов и резистентности к терапии [3].

Особый интерес в контексте сенесцентности представляют макрофаги, ассоциированные с опухолью (от англ. Tumor-associated macrophages – TAMs). Макрофаги – чрезвычайно пластичные клетки. При физиологических и патологических процессах они имеют два противоположных фенотипа (поляризации): классически активированный подтип М1 и альтернативно активированный подтип М2. В ТМЕ чаще представлены так называемые М2 подобные макрофаги и супрессорные клетки миелоидного происхождения, которые формируют иммуносупрессивное микроокружение в опухоли [1]. Наличие сенесцентных TAMs в опухоли ассоциировано с неблагоприятным прогнозом и плохим ответом на терапию. Суммируя данные, полученные в различных моделях *in vivo* и *in vitro*, можно выделить некоторые общие черты, характерные для сенесцентных TAMs, такие как: совместное увеличение экспрессии ингибиторов циклин-зависимых киназ p16^{INK4} и/или p21^{cip1}, Arg1, CD206, CXCR1, CD38; увеличенный метаболизм аргинина и гликолиз. SASP сенесцентных TAMs характеризуется секрецией TGF-β, IL-10, IL-6, TNF, IL-1β, Mmp12, Timp2, Cxcl12, Cxcl13, Hgf [6].

Несмотря на то, что эталоном для изучения процессов старения и канцерогенеза является использование *in vivo* моделей, на этапах масштабных скринингов препаратов также необходимо иметь подходящие *in vitro* модели TAMs. Таким образом, задачей данного исследования было провести сравнительный анализ экспериментальных протоколов получения TAMs *in vitro*, чтобы определить наиболее релевантный подход.

Материалы и методы

Мыши

В работе использовали мышей линии C57Bl/6 в возрасте 6-8 недель, полученных из питом-

ника лабораторных животных «Пушино», филиала Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН в г. Пушино. Животных содержали в автономном экспериментально-биологическом комплексе для временного размещения и исследования генетически модифицированных линий лабораторных мышей категории SPF. Эксперименты были одобрены Комиссией по биоэтике ИМБ РАН (Протокол №3 от 27.10.2023).

Выделение и дифференцировка первичных макрофагов мыши

Макрофаги костного мозга (от англ. bone-marrow-derived macrophage, BMDM) дифференцировали из клеток костного мозга мыши C57Bl/6 в соответствии с ранее опубликованными протоколами [9]. Костный мозг был выделен из большеберцовых и бедренных костей мышей дикого типа.

Культивирование клеток

Клеточные линии колоректального рака мыши MC38 получены из Kerafast и фибробласты L929 (ATCC CCL-1) были получены из ATCC (American Type Culture Collection, США) и культивировались в среде DMEM 4,5 г/л глюкозы (НПП «ПанЭко», Россия) с добавлением 10% FBS, 4 mM L-глутамин и антибиотиков при 37 °C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂.

Модель получения опухоль-ассоциированных макрофагов

После окончания дифференцировки BMDM рассаживали в концентрации 1 × 10⁶ на лунку 24-луночного планшета в объеме 500 мкл, давали прикрепиться клеткам в течении 3-4 часов, после чего добавляли 500 мкл 3-дневной кондиционной опухолевой среды от линии клеток MC38. В качестве положительного контроля использовали LPS (10 нг/мл), IFNγ (10 нг/мл) и IL-4 (20 нг/мл) мыши для М1 и М2 поляризации соответственно.

Выделение РНК и обратная транскрипция

Клетки из одной лунки 24-луночного планшета лизировали в ExtractRNA (ЗАО «Евроген», Россия). Суммарную мРНК выделяли в соответствии с инструкцией производителя. Обратную транскрипцию РНК, очищенной от геномной ДНК, проводили с использованием набора Thermo Scientific RevertAid RT Kit (Thermo Scientific, США) и проводили синтез в соответствии с инструкцией производителя.

Анализ экспрессии генов методом количественной ПЦР в реальном времени

Для постановки количественной ПЦР использовали готовый набор с SYBR (qPCRmix-HS SYBR+LowROX, ЗАО «Евроген», Россия), последовательности праймеров приведены в таблице 1. Синтез производился на амплификаторе MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, Applied

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ qPCR

TABLE 1. SEQUENCES OF PRIMERS FOR qPCR

Ген Gene	Последовательности праймеров (5'→3') Primer sequences (5'→3')	
	Прямой Forward	Обратный Reverse
<i>Actb</i>	CTCCTGAGCGCAAGTACTCTGTG	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC
<i>Tnf</i>	CAGCCTCTTCTCATTCCTGCTTGTC	CTGGAAGACTCCTCCCAGGGTATAT
<i>Fpr2</i>	CGAAGAGTGTAGAAGGAGAC	AAGGAAGAAAAGTGATGGAGAC
<i>CD38</i>	CTACAGGCCTGCCAGGTTTC	GTTGCTTCTGAGCCCCTTCA
<i>Arg1</i>	TGAGGAAAGCTGGTCTGCTG	GGCCAGAGATGCTTCCAAC
<i>Egr2</i>	ATCCTAGGCTCAGTTCAACC	ATCATGCCATCTCCCGC
<i>Mrc1</i>	TACTTGACGGATAGATGGAGG	CATAGAAAGGAATCCACGCAG
<i>P21</i>	CAAAGTGTGCCGTTGTCTCT	AGGAAGTACTGGGCCTCTTG

Biosystems. Для каждого образца реакцию проводили в трех технических повторах. Уровень экспрессии анализируемых генов был нормализован относительно уровня *ACTB*. Относительную экспрессию генов подсчитывали методом сравнительной количественной оценки величины порогового цикла ($\Delta\Delta C_t$) [10].

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Содержание IL-6 и TNF в надклеточной среде анализировали с помощью набора Invitrogen™ Mouse IL-6 Uncoated ELISA Kit (Thermo Scientific, США) и Invitrogen™ Mouse TNF Uncoated ELISA Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Мультиплексный анализ продукции цитокинов

Профиль продукции цитокинов в LCCM был исследован с помощью технологии мультиплексного анализа Luminex xMAP (Merck, Германия). В настоящей работе был использован набор MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel. Анализ был проведен в соответствии с инструкциями производителя, обработку данных проводили в программе Analyst (Merck, Германия).

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили попарно при помощи t-критерия Стьюдента в программе GraphPad Prism 10. Различия считали достоверными при * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns (non-significant) — нет разницы.

Результаты и обсуждение

Для сравнения как дифференцировка макрофагов с помощью различных протоколов влияет

на последующее моделирование TAMs была выбрана следующая схема эксперимента (рис. 1А, см. 2-ю стр. обложки). Согласно полученным результатам, LCCM-BMDM демонстрируют повышенную экспрессию *Arg1* и *Mrc1* по сравнению с M-CSF-BMDM (рис. 1Б, см. 2-ю стр. обложки). На основании полученных результатов и ранее опубликованных данных о повышенном базовом уровне экспрессии IL-10 [4] можно предположить, что LCCM-BMDM изначально демонстрируют предрасположенность к M2-подобному фенотипу после дифференцировки по сравнению с M-CSF-BMDM.

Макрофаги, полученные путем добавления LCCM, секретируют более высокие уровни IL-6 и TNF (рис. 1В, см. 2-ю стр. обложки). Данные изменения могут быть обусловлены наличием IL-6 в составе LCCM (рис. 1Г, см. 2-ю стр. обложки). Это может способствовать проявлению более выраженного M2 фенотипа при активации макрофагов IL-4, увеличивая *Arg1* и *Mrc1* [7]. Помимо IL-6, LCCM также содержит фактор, ингибирующий лейкемию, который может стимулировать макрофаги к M2-подобному фенотипу через активацию STAT3 [11].

Несмотря на эти отличия между макрофагами, полученными путем дифференцировки из клеток костного мозга в присутствии рекомбинантного M-CSF или LCCM в качестве основного источника M-CSF, LCCM-BMDM широко используются для изучения биологии макрофагов [12]. Тем не менее такой подход, на наш взгляд, является спорным в случае получения первичной культуры TAMs *in vitro*. Использование LCCM-BMDM для дальнейшей ассоциации с опухолью может приводить к искажен-

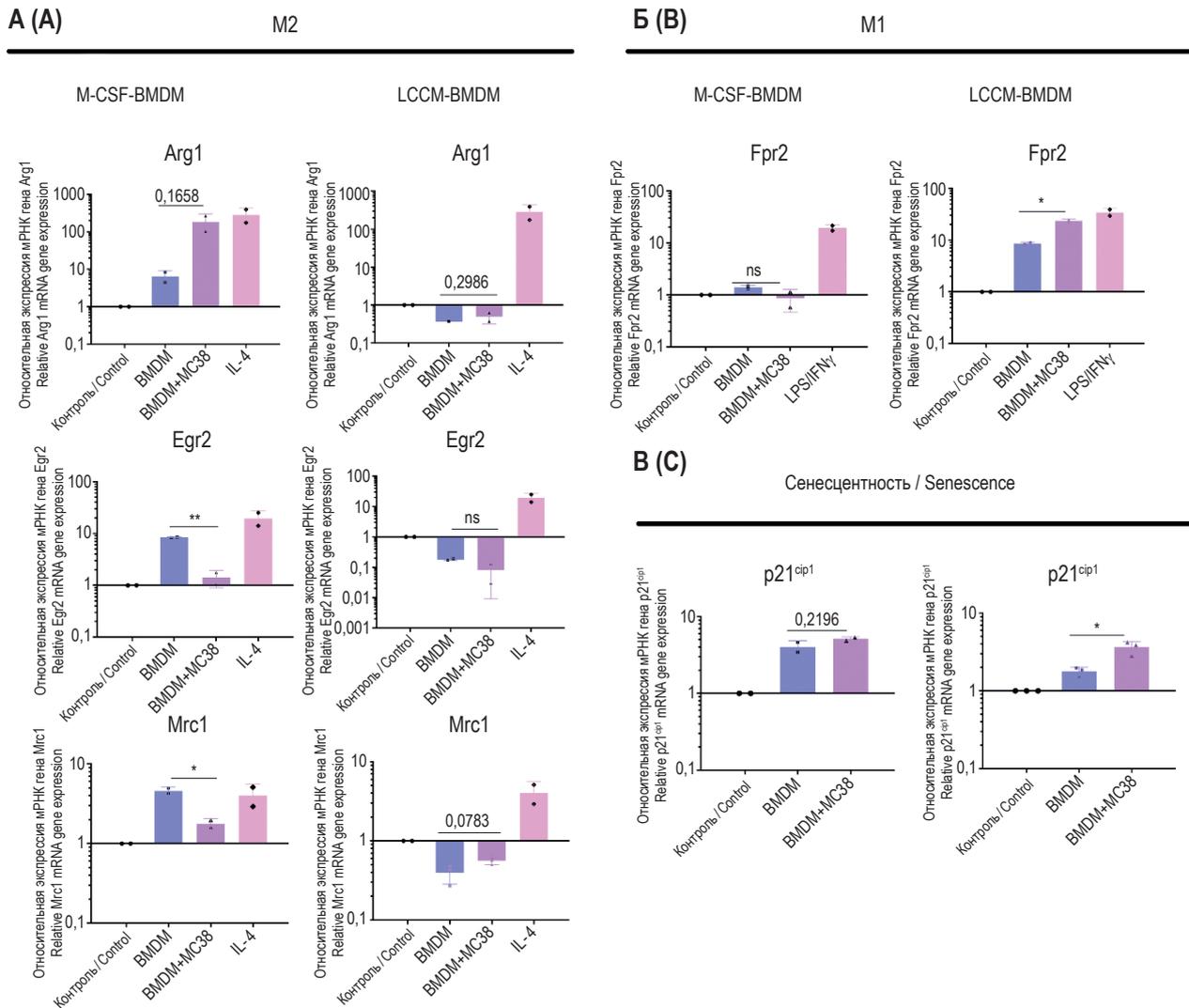


Рисунок 2. Изменения относительной экспрессии мРНК в LCCM-BMDM и M-CSF-BMDM после 24 ч ассоциации с кондиционной средой от аденокарциномы толстой кишки мыши (MC38)

Примечание. А – изменения относительной экспрессии генов M2 поляризации (*Arg1*, *Egr2*, *Mrc1* соответственно). Б – изменения относительной экспрессии генов M1 поляризации (*Fpr2*). В – изменения относительной экспрессии ингибитора клеточного цикла *p21^{cip1}*. Данные qPCR. Уровень экспрессии был нормализован относительно уровня Actb. Значения представляют собой среднее \pm стандартное отклонение среднего из двух независимых экспериментов. Контроль: M-CSF-BMDM или LCCM-BMDM, собранными сразу после окончания дифференцировки. В качестве положительного контроля M1/M2 поляризации использовались LPS/IFN γ и IL-4 соответственно. Статистический анализ проведен при помощи t-критерия Стьюдента, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, ns (non-significant) – нет разницы.

Figure 2. Changes in relative mRNA expression in LCCM-BMDM and M-CSF-BMDM after 24 h association with conditioned medium from mouse colon adenocarcinoma (MC38)

Note. A, changes in relative expression of M2 polarization genes (*Arg1*, *Egr2*, *Mrc1*, respectively). B, changes in relative expression of M1 polarization genes (*Fpr2*). C, changes in the relative expression of the cell cycle inhibitor *p21^{cip1}*. qPCR data. Expression levels were normalized relative to Actb levels. Values represent the mean \pm standard deviation of the mean from two independent experiments. Control: M-CSF-BMDM or LCCM-BMDM harvested immediately after the end of differentiation. LPS/IFN γ and IL-4 were used as positive controls for M1/M2 polarisation, respectively. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ns – non-significant (Student's t-test, was used).

ным фенотипическим характеристикам TAMs (рис. 1Г, см. 2-ю стр. обложки). Кроме пластичности для макрофагов характерна способность «запоминать» различные сигналы, с которыми они раньше встречались, посредством метабо-

лических и эпигенетических изменений. Данное явление получило название тренированный иммунитет [5]. Можно предположить, что подобный механизм может лежать в основе различий M-CSF-BMDM и LCCM-BMDM.

Таким образом, переход макрофагов в фенотип, подразумеваемый конкретной моделью опухолевой ассоциации, может быть «смазан» или затруднен на фоне влияния, которое макрофаги уже получили в процессе дифференцировки от LCCM. Так, например, в полученных нами данных были показаны фенотипические различия LCCM-BMDM и M-CSF-BMDM после ассоциации кондиционной средой от аденокарциномы толстой кишки мыши (MC38). Ассоциация M-CSF-BMDM с MC38 вызывала увеличение экспрессии аргиназы *Arg1* (рис. 2А). В то же время наблюдалось снижение экспрессии *Egr2* и *Mrc1* относительно контроля (рис. 2А). При ассоциации LCCM-BMDM с MC38 наблюдалось увеличение экспрессии *Fpr2*, в отличие от M-CSF-BMDM, где экспрессия *Fpr2* (рис. 2Б) не изменялась. Также в отличие от M-CSF-BMDM в LCCM BMDM не наблюдалось увеличения *Arg1* (рис. 2А).

Тем не менее в отдельных случаях моделирование TAMs с использованием LCCM-BMDM может быть актуально – например, в моделях, в которых опухоли являются источником M-CSF. При гепатоцеллюлярной карциноме человека существует значительная связь между высокой экспрессией M-CSF и повышенной инфильтрацией макрофагов, что связано с плохой выживаемостью пациентов [8]. Однако к TAMs, которые были получены с использованием LCCM-BMDM, стоит относиться осторожнее, принимая во внимание ограничения данной модели при изучении сенесцентных макрофагов в ТМЕ. В частности было продемонстрировано, что ассоциация LCCM-BMDM с MC38 *in vitro*

приводит к значимому увеличению экспрессии p21^{cip1}, в отличие от M-CSF-BMDM ассоциированных с MC38 (рис. 2В).

Заключение

Наши результаты показывают, что в *in vitro* моделях TAMs использование рекомбинантного M-CSF для дифференцировки является наиболее подходящей методикой получения TAMs, которая ближе всего отражает дифференцировку TAMs *in vivo*. Кондиционная среда от L929 изначально репрограммирует макрофаги в промежуточное состояние между M2-подобным фенотипом и фенотипом характерным для сенесцентных клеток. Так, LCCM-BMDM изначально демонстрируют увеличенную экспрессию *Arg1* и *Mrc1* по сравнению с M-CSF-BMDM, а также секрецию факторов SASP – IL-6 и TNF. Таким образом, необходимо тщательно выбирать модель получения TAMs, что позволит избежать нежелательных aberrаций при тестировании новых стратегий репрограммирования ТМЕ с целью повышения эффективности противоопухолевой терапии.

Благодарности

Работа Пухальской Т.В. и Богдановой Д.А. финансировалась Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-10-2021-093; Проект НИР-ИМБ-2102). Также выражаем благодарность Друцкой Марине Сергеевне за ценные замечания и советы, а также за возможность провести работу на базе лаборатории молекулярных механизмов иммунитета.

Список литературы / References

1. Boutilier A.J., ElSawa S.F. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 29, no. 22, 6995. doi: 10.3390/ijms22136995.
2. Bruni D., Angell H.K., Galon J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat. Rev. Cancer*, 2020, Vol. 20, no. 11, pp. 662-680.
3. Chambers C.R., Ritchie S., Pereira B.A., Timpson P. Overcoming the senescence-associated secretory phenotype (SASP): a complex mechanism of resistance in the treatment of cancer. *Mol. Oncol.*, 2021, Vol. 15, no. 12, pp. 3242-3255.
4. de Brito Monteiro L., Davanzo G.G., de Aguiar C.F., Corrêa da Silva F., Andrade J.R., Campos Codo A., Silva Pereira J.A.D., Freitas L.P., Moraes-Vieira P.M. M-CSF- and L929-derived macrophages present distinct metabolic profiles with similar inflammatory outcomes. *Immunobiology*, 2020, Vol. 225, no. 3, 151935. doi: 10.1016/j.imbio.2020.151935.
5. Ding C., Shrestha R., Zhu X., Geller A.E., Wu S., Woeste M.R., Li W., Wang H., Yuan F., Xu R., Chariker J.H., Hu X., Li H., Tieri D., Zhang H.G., Rouchka E.C., Mitchell R., Siskind L.J., Zhang X., Xu X.G., McMasters K.M., Yu Y., Yan J. Inducing trained immunity in pro-metastatic macrophages to control tumor metastasis. *Nat. Immunol.*, 2023, Vol. 24, no. 2, pp. 239-254.
6. Haston S., Gonzalez-Gualda E., Morsli S., Ge J., Reen V., Calderwood A., Moutsopoulos I., Panousopoulos L., Deletic P., Carreno G., Guiho R., Manshaei S., Gonzalez-Meljem J.M., Lim H.Y., Simpson D.J., Birch J., Pallikonda H.A., Chandra T., Macias D., Doherty G.J., Rassl D.M., Rintoul R.C., Signore M., Mohorianu I., Akbar A.N., Gil J., Muñoz-

Espín D., Martínez-Barbera J.P. Clearance of senescent macrophages ameliorates tumorigenesis in KRAS-driven lung cancer. *Cancer Cell*, 2023, Vol. 41, no. 7, pp. 1242-1260.e6.

7. Hu S., Marshall C., Darby J., Wei W., Lyons A.B., Körner H. Absence of tumor necrosis factor supports alternative activation of macrophages in the liver after infection with leishmania major. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1. doi: 10.3389/fimmu.2018.00001.

8. Mantovani A., Marchesi F., Malesci A., Laghi L., Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2017, Vol. 14, no. 7, pp. 399-416.

9. Marim F.M., Silveira T.N., Lima D.S. Jr., Zamboni D.S. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PLoS One*, 2010, Vol. 5, no. 12, e15263. doi: 10.1371/journal.pone.0015263.

10. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.*, 2008, Vol. 3, no. 6, pp. 1101-1108.

11. Yu S., Li Q., Wang Y., Cui Y., Yu Y., Li W., Liu F., Liu T. Tumor-derived LIF promotes chemoresistance via activating tumor-associated macrophages in gastric cancers. *Exp. Cell. Res.*, 2021, Vol. 406, no. 1, 112734. doi: 10.1016/j.yexcr.2021.112734.

12. Yurakova T.R., Gubernatorova E.O., Gorshkova E.A., Nosenko M.A., Nedospasov S.A., Drutskaya M.S. HDM induces distinct immunometabolic phenotype in macrophages in TLR4-dependent manner. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 2022, Vol. 1868, no. 12, 166531. doi: 10.1016/j.bbadis.2022.166531.

Авторы:

Пухальская Т.В. — старший лаборант, Институт цитологии Российской академии наук; студент магистратуры АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус»», Сириус; старший лаборант-исследователь, ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Юракова Т.Р. — старший инженер-исследователь ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Pukhalskaia T.V., Senior Laboratory Assistant, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences; Graduate Student, Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius; Senior Research Assistant, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Yurakova T.R., Senior Research Engineer, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Михайловская В.С. — студент магистратуры
АНОО ВО «Научно-технологический университет
“Сириус”», Сириус, Россия

Богданова Д.А. — младший научный сотрудник
АНОО ВО «Научно-технологический университет
“Сириус”», Сириус; младший научный сотрудник
Институт цитологии Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

Демидов О.Н. — д.м.н., профессор, ведущий научный
сотрудник, Институт цитологии Российской академии
наук; профессор, АНОО ВО «Научно-технологический
университет “Сириус”», Сириус, Россия

Mikhailovskaya V.S., Graduate Student, Sirius University
of Science and Technology, Federal Territory Sirius, Russian
Federation

Bogdanova D.A., Postgraduate Student, Junior Research
Associate, Sirius University of Science and Technology,
Federal Territory Sirius; Junior Research Associate, Institute
of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg,
Russian Federation

Demidov O.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Senior
Research Associate, Institute of Cytology, Russian Academy
of Sciences, St. Petersburg; Professor, Sirius University of
Science and Technology, Federal Territory Sirius, Russian
Federation

Поступила 03.04.2024
Отправлена на доработку 05.04.2024
Принята к печати 09.04.2024

Received 03.04.2024
Revision received 05.04.2024
Accepted 09.04.2024