Багаев А.В., Рыбинцев А.С., Федорова А.А., Ушакова Е.И., Лебедева Е.С.,
Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И.

Синергизм агонистов TLR3 и TLR4 при перепрограммировании макрофагов в противоопухолевое состояние

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. В ткани солидных опухолей, как правило, содержится много макрофагов. Эти клетки активно поддерживают прогрессивный рост злокачественной ткани, стимулируют ангиогенез, способствуют росту фиброзного каркаса опухоли через размножение фибробластов и их трансформацию в миофибробласты, подавляют иммунные реакции с помощью иммуносупрессивных субстанций, таких, как ИЛ-10, TFR β , IDO, PGE₂, индуцируют эпителиально-мезенхимальную трансформацию злокачественных клеток, что обеспечивает злокачественным клеткам возможность свободного перемещения в ткани (инвазивный рост опухоли) и в организме (метастазирование). Макрофаги известны своей пластичностью, способностью переходить из одного состояния в другое. Проопухолевые макрофаги можно перепрограммировать в M1-макрофаги, обладающие повышенной противоопухолевой активностью. В состоянии M1 макрофаги переводят внешние сигналы бактериальной и вирусной природы, действующие на рецепторы, распознающие молекулярные образы инфекций (TLR, NOD и др.), а также цитокины (TNFR, IL1R, IFN β и др.).

Цель данного исследования – анализ синергизма агонистов TLR3- и TLR4-рецепторов при перепрограммировании макрофагов в противоопухолевое состояние M1.

Материал и методы. Использовали макрофаги, полученные из клеток костного мозга мыши путем дифференцировки *in vitro* в присутствии ГМ-КСФ. Клетки активировали синтетическим poly I:C (агонист TLR3) или кислым пептидогликаном из растений (агонист TLR4, активный компонент препарата Иммуномакс, далее – ИММ). Активацию внутриклеточных сигнальных путей, начинающихся с рецепторов TLR3 и TLR4, измеряли по уровню фосфорилирования протеинкиназ TBK1/IKK ϵ , ERK1 и ERK2, а также транскрипционного фактора NF- κ B. Для измерения фосфорилирования сигнальных белков использовали проточную цитофлуориметрию и вестерн-блоттинг со специфическими моноклональными антителами. Интенсивность экспрессии мРНК *Nos2* и *Ifnb1* исследовали методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Цитотоксическую активность макрофагов оценивали в совместной культуре с клетками 4T1 карциномы молочной железы по уменьшению количества опухолевых клеток.

Результаты. Показано, что трансформацию макрофагов в противоопухолевое состояние можно индуцировать более эффективно, если использовать не одиночные агонисты TLR3 и TLR4, а их комбинацию. Оба агониста индуцировали значительную и быструю активацию TBK1/IKK ϵ , ERK1/2 и NF- κ B. Совместное действие агонистов незначительно повышало уровень фосфорилирования киназ – всего на 15–20 %. Но уровень транскрипции активируемых генов усиливался синергически. Совместное действие агонистов TLR3 и TLR4 повышало уровень транскрипции мРНК *Nos2* и *Ifnb1* в 2,6–3,5 раза по сравнению с уровнем транскрипции в ответ на активацию одиночными агонистами. Синергическое действие TLR3- и TLR4-агонистов показано также по активации противоопухолевых свойств макрофагов в цитотоксическом тесте против клеток карциномы 4T1.

Заключение. Впервые описан синергизм агонистов TLR3 и TLR4 при перепрограммировании макрофагов в состояние M1. Синергическое действие агонистов приводит к кратному усилению экспрессии генов, кодирующих противоопухолевые эффекторные белки, в частности iNOS и IFN- β , а также к значительному усилению противоопухолевого цитотоксического действия макрофагов. На уровне фосфорилирования протеинкиназ TBK1/

Для корреспонденции
Атауллаханов Равшан Иноятович –
доктор медицинских наук, профессор,
руководитель отдела
иммунной биотехнологии,
заведующий лабораторией
активации иммунитета
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России, Москва,
Российская Федерация
E-mail: ravshan.ataullakhanov@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4767-6409>

IKK ϵ и ERK1/2, а также транскрипционного фактора NF- κ B синергического эффекта агонистов TLR3 и TLR4 не обнаружено, что, по-видимому, свидетельствует о наличии кооперативного взаимодействия между другими компонентами этих 2 сигнальных путей.

Ключевые слова: Toll-подобные рецепторы; агонисты; синергизм; перепрограммирование макрофагов; сигналинг; iNOS; ИФН- β ; противоопухолевый эффект

Статья получена 11.08.2021. Принята в печать 17.11.2021.

Для цитирования: Багаев А.В., Рыбинетс А.С., Федорова А.А., Ушакова Е.И., Лебедева Е.С., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И. Синергизм агонистов TLR3 и TLR4 при перепрограммировании макрофагов в противоопухолевое состояние. Иммунология. 2021; 42 (6): 615–630. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-6-615-630>

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 20-15-00391.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Bagaev A.V., Rybinets A.S., Fedorova A.A., Ushakova E.I., Lebedeva E.S., Pichugin A.V., Ataullakhanov R.I.

Synergism of TLR3 and TLR4 agonists during macrophage reprogramming into an antitumor state

National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. Solid tumor tissue usually contains many macrophages. These cells actively support the progressive growth of malignant cells, stimulate angiogenesis, promote the growth of the fibrotic scaffold the tumor by activating divisions of fibroblasts and their transformation into myofibroblasts, immune responses inhibition with immunosuppressive substances such as IL-10, TGF β , IDO, PGE2, and an induction of epithelial-mesenchymal transformation of malignant cells, which allows malignant cells to move freely within tissues (invasive tumor growth) and around the host organism (distant metastases). Macrophages' plasticity, i.e. their ability for transition from one state to another, is well documented by previous studies. Particularly, tumor-promoting macrophages can be reprogrammed into anti-tumor M1 macrophages. External infection-derived signals acting via pathogen recognition receptors (TLR, NOD, etc.), as well as internal damage-derived signals acting via pro-inflammatory cytokine and other receptors, transfer macrophages into M1 state.

The aim of this study is to analyze the synergism of TLR3- and TLR4-agonists during macrophages reprogramming into their M1 antitumor state.

Material and methods. Macrophages were obtained from the mouse bone marrow using in vitro differentiation in the presence of GM-CSF. Cells were activated with synthetic poly I:C (TLR3 agonist) or acidic peptidoglycan of the plant origin (TLR4 agonist, active component of Immunomax, hereinafter IMM). The activation of TLR3- and TLR4-related downstream signaling pathways was measured according to TBK1/IKK ϵ , ERK1 and ERK2 protein kinases, as well as NF- κ B transcription factor phosphorylation intensities. Flow cytometry and Western blotting with specific monoclonal antibodies were used to measure phosphorylation degree of the signaling proteins. The expression intensity of *Nos2* and *Ifnb1* mRNAs was investigated by a quantitative RT-PCR. The cytotoxic activity of macrophages was estimated in their co-culture with 4T1 breast carcinoma cells according to the reduction of the tumor cells number.

Results. A transformation of macrophages into an antitumor state can be induced with a combination of TLR3- and TLR4-agonists, more efficiently than with the same agonists used alone. Both agonists induced significant and rapid activation of TBK1/IKK ϵ , ERK1/2 and NF- κ B. Compared to the single agonists, the combined action of TLR3 and TLR4 agonists increased the kinases phosphorylation level by only 15–20 %. Even though the activated genes transcription rate was enhanced synergistically. The combined action of TLR3 and TLR4 agonists increased the level of *Nos2* and *Ifnb1* mRNAs transcription by 2.6–3.5 times as compared to the transcription rate of the same genes in response to each of these agonists used alone. TLR3- and TLR4-agonists also synergistically activated the antitumor properties of macrophages in a cytotoxic test against 4T1 carcinoma cells.

For correspondence

Ravshan I. Ataullakhanov –
MD, PhD, Professor,
Head of the Department
of Immune Biotechnology,
Head of the Laboratory
of Immunity Activation,
NRC Institute of Immunology,
FMBA of Russia, Moscow,
Russian Federation
E-mail: ravshan.ataullakhanov@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4767-6409>

Conclusion. The synergism of TLR3 and TLR4 agonists during reprogramming of macrophages into the M1 state has been described for the 1st time. The synergistic action of agonists leads to a multiple increase in the expression of genes encoding antitumor effector proteins, in particular, iNOS and IFN- β , as well as to a significant increase in the antitumor cytotoxic effect of macrophages. At the level of phosphorylation of TBK1/IKK ϵ and ERK1/2 protein kinases, as well as the NF- κ B transcription factor, no synergistic effect of TLR3 and TLR4 agonists was found, which indicates the presence of cooperative interaction between other components of these 2 signaling pathways.

Keywords: Toll-like receptors; agonists; synergism; reprogramming of macrophages; signaling; iNOS; IFN- β ; antitumor effect

Received 11.08.2021. Accepted 17.11.2021.

For citation: Bagaev A.V., Rybinets A.S., Fedorova A.A., Ushakova E.I., Lebedeva E.S., Pichugin A.V., Ataulakhov R.I. Synergism of TLR3 and TLR4 agonists during reprogramming of macrophages to antitumor state. *Immunologiya*. 2021; 42 (6): 615–30. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-6-615-630> (in Russian)

Funding. This study was supported by a grant from the RSF No. 20-15-00391.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Введение

Макрофаги являются одним из наиболее многочисленных компонентов в микроокружении солидных опухолей. Ассоциированные с опухолью макрофаги (tumor-associated macrophages, TAM) активно поддерживают прогрессивный рост злокачественной ткани [1–3]. При этом TAM не просто заняты поддержанием порядка в ткани, удаляя погибающие клетки и тканевой детрит [4]. TAM – «дирижеры» согласованного роста всех клеточных и внеклеточных компонентов опухолевой ткани [5]. Они стимулируют ангиогенез, секретируя факторы роста сосудов – VEGF и др. [6, 7], способствуют размножению фибробластов и формированию фибробластами стромального каркаса опухоли (ТФР β , ФРФ) [8]. С помощью специальных хемокинов (CCL2, CCL4 и др.) TAM индуцируют выход моноцитов из кровотока в ткань опухоли, где моноциты превращаются в макрофаги, пополняя пул опухолевых макрофагов [3, 9]. Выделяя иммуносупрессивные ИЛ-10, ТФР β , IDO, ПГЕ₂, макрофаги ингибируют иммунные реакции в опухоли [10]. С факторами, которые вырабатывают TAM, связывают эпителиально-мезенхимальную трансформацию (ЭМТ) злокачественных клеток, когда клетки, которые обязаны быть прочно вмонтированы в монослой эпителиальных клеток, претерпевают разрушение межклеточных контактов и начинают свободное путешествие в ткани и в организме, подобно клеткам мезенхимального происхождения, таким, как фибробласты и лейкоциты. ЭМТ – это процесс, лежащий в основе повышенной злокачественности опухоли, ее способности к инвазии в смежные ткани и метастазированию в отдаленные ткани [11, 12].

Хорошо известны, как минимум, 2 полярных состояния макрофагов – M1 и M2 [13]. 1-е (M1) соответствует макрофагам, агрессивно атакующим инфекцию. Для этого состояния характерен целый ряд особых признаков. M1-макрофаги синтезируют активные формы кис-

лорода, азота, противомикробные и противоопухолевые вещества. Благодаря этим веществам M1-макрофаги эффективно убивают злокачественные клетки самых разных опухолей. На M1-макрофагах экспрессируются рецепторы, необходимые для выполнения антиген-презентирующих функций, что позволяет этим клеткам стимулировать адаптивные реакции иммунитета. Мало того, M1-макрофаги выделяют факторы, стимулирующие иммунные реакции против опухоли. Таким образом M1-макрофаги обладают множеством противоопухолевых активностей. Макрофаги переходят в состояние M1 под влиянием веществ бактериальной и вирусной природы в результате сигнализации через рецепторы, распознающие молекулярные образы инфекций (TLR, NOD и др.) и цитокины (TNFR, IL1R, IFNR и др.) [14, 15].

Сильно отличаются по функции и предназначению M2-макрофаги, активированные альтернативным образом. Их функция состоит не в убийстве и разрушении врага, а в созидании. Поляризация в состояние M2 характерна для макрофагов, которые выступают в роли инициаторов строительства ткани, например при восстановлении повреждений. Когда ткань очищена от инфекции, когда ликвидированы останки инфекционных и погибших собственных клеток, возникает необходимость регенерации – заживления повреждений, возникших в результате вторжения. Тут нужны не бойцы, а строители [16]. В роли «дирижеров» строительного дела выступают M2-макрофаги. Они вырабатывают факторы (ТФР β), с помощью которых привлекают фибробласты, активируют размножение этих клеток и их трансформацию в миофибробласты. Последние необходимы для создания грануляционной ткани, т. е. для заполнения повреждений в ткани. M2-макрофаги индуцируют снабжение регенерированной ткани новыми сосудами, секретируя для этого факторы ангиогенеза [17]. Как легко заметить, функции M2-макрофагов и TAM очень схожи. Те и другие управляют созданием новой ткани, размножением клеток, привлекают и стимули-

Рис. 1. Кинетика фосфорилирования комплекса TBK/IKKε и зависимость этого процесса от концентрации агонистов TLR

А – окрашивание фосфорилированной формы TBK/IKKε (по Ser172) и измерения методом проточной цитометрии. Для одиночных клеток, выбранных по сигналам прямого и бокового светорассеивания, была измерена средняя интенсивность флуоресценции; Б – кинетика уровня фосфорилирования комплекса TBK/IKKε при активации агонистом TLR4 (ИММ, 5 мкг/мл); В – зависимость уровня фосфорилирования от концентрации активатора TLR3; Г – зависимость уровня фосфорилирования от концентрации активатора TLR4.

руют должным образом другие типы клеток (эндотелий, перитциты, фибробласты, моноциты). Именно из-за сходства свойств и функций TAM и M2-макрофагов исследователи очень часто проводят аналогию между этими типами макрофагов.

С отчетливым пониманием проопухолевой роли TAM связаны экспериментальные подходы, направленные на ликвидацию макрофагов в опухоли, блокирование их размножения или перепрограммирование в противоопухолевое состояние [8, 17–19]. Разработка методов перепрограммирования TAM из M1 в M2 – одно из актуальных направлений современной экспериментальной иммунотерапии злокачественных новообразований. Именно в этом направлении и выполнена данная работа. В ней мы сообщаем о синергическом активирующем эффекте на макрофаги агонистов, действующих через рецепторы TLR3 и TLR4. При этом, как и положено веществам, имитирующим молекулярные образы патогенов, агонисты TLR3 и TLR4 стимулируют трансформацию макрофагов в состояние M1.

Необходимо отметить, что макрофаги обладают способностью переходить из одного состояния в другое и обратно, что принято называть термином «пластичность макрофагов» [14, 19]. Поляризацию макрофагов

в состояние M1 индуцируют внешние сигналы, ассоциированные с инфекционным вторжением и лизисом собственных клеток организма, а в состояние M2 – сигналы, характерные для завершения иммунной реакции против патогена, когда возникает необходимость регенерации поврежденной ткани, или в отсутствие какого-либо вторжения – комплекс сигнальных цитокинов, хемокинов и ростовых факторов, характерных для растущей ткани. Считается, что соответствующие сигналы микроокружения способны индуцировать переход из состояния M2 в M1, и обратно – из M1 в M2, что и характеризует «пластичность» этих клеток.

В данной работе мы показали, что все перечисленные признаки трансформации макрофагов в противоопухолевое состояние удастся индуцировать более эффективно, если использовать не одиночные агонисты TLR3 и TLR4, но их комбинацию, одновременно действуя на 2 сигнальные цепи, начинающиеся с рецепторов TLR3 и TLR4. О подобном синергизме при активации макрофагов и дендритных клеток мы сообщали ранее, но в прежних работах мы исследовали комбинации агонистов TLR4, TLR9 и NOD при активации противомикробных свойств фагоцитирующих клеток. В данной работе мы впервые сообщаем о синергизме TLR3

Рис. 2. Уровень фосфорилирования TBK/IKKε в зависимости от концентраций TLR-агонистов и их комбинаций

Представлены значения, нормированные на уровень сигнала пробы без добавления агонистов. Этот сигнал принят за 100.

А – таблица нормированных сигналов проб в зависимости от комбинаций концентраций TLR-агонистов. Интенсивность цвета отображает увеличение значений; Б – гистограмма средних уровней интенсивности флуоресценции меченого TBK/IKKε в зависимости от комбинаций концентраций TLR агонистов.

и TLR4 при активации противоопухолевых свойств макрофагов. Эти данные могут послужить полезной основой для разработки новых фармакологических методов иммунотерапии злокачественных новообразований.

Материал и методы

Животные. Мыши линии BALB/c 8–10-недельного возраста были получены из питомника «Столбовая», содержались на стандартной диете в стандартных условиях вивария ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. Все экспериментальные процедуры с животными проводили в соответствии с Правилами исследовательской работы с лабораторными животными в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (приказ от 12.11.2015), сертифицированными Местным комитетом по этике (Резолюция 4/17 от 13.07.2017).

Культуры клеток. Все культуры клеток инкубировали в полной среде (ПС), составленной из DMEM с 25 mM NEPERES, дополненной смесью заменимых аминокислот, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамин, 1 mM пирувата натрия, 50 мкМ β-меркаптоэтанол и 10 мкг/мл гентамицина (всереактивы «ПанЭко», Россия), при 37 °C, в увлажненной атмосфере 5 % CO₂ в воздухе.

Линию клеток 4T1 карциномы молочной железы мыши (любезно предоставлена проф. М.А. Агаджаняном, Institute for Molecular Medicine, CA) и созданный нами на ее основе клон 4T1-D5, экспрессирующий зеленый флуоресцентный белок GFP, поддерживали регулярными пересевами в ПС. При достижении 60–70 % конфлюэнтности клетки снимали раствором Трипсин-ЭДТА (ПанЭко), отмывали центрифугированием в фосфатном буферном физиологическом растворе (ФБ) с 0,5 % бычьего сывороточного альбумина (БСА), ресу-

спендировали, подсчитывали количество клеток, пассировали в новую культуру при плотности 0,3 • 10⁶ клеток в 1 мл ПС.

Антитела, TLR-агонисты, реагенты. Для проточной цитометрии использовали меченые флуорохромами моноклональные антитела, специфичные к CD40-V421 (BD Bioscience, США), CD86-PE (eBioscience, США), ERK1/2 (Cell Signaling, США), TBK/IKKε (Cell Signaling, США), кроличьему IgG-AF488 (Invivogen, США). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью окраски DAPI (Invitrogen, США).

В качестве агониста TLR3 применяли Poly I:C (Invivogen, США), а агониста TLR4 – кислый пептидогликан с молекулярной массой более 1 млн Да, выделенный из растений, являющийся активным компонентом лекарственного препарата Иммуномакс (далее – ИММ). ИММ активирует макрофаги и дендритные клетки через рецептор TLR4, что было доказано с использованием специальных клеточных линий HEK-Blue (Invivogen, США), экспрессирующих только один из рецепторов TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 или TLR9, а также клеток с генетической делецией TLR4 [20, 24].

Получение макрофагов из костного мозга. Суспензии первичных клеток костного мозга мышей приготавливали общепринятыми методами. Макрофаги получали *in vitro* дифференцировкой клеток костного мозга мышей BALB/c в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). Костный мозг вымывали из бедренных и больших берцовых костей мыши, эритроциты удаляли осмотическим лизисом, ядродержащие клетки дважды отмывали ФБ, после чего культивировали в полной среде с добавлением 10 нг/мл ГМ-КСФ (Sigma, США) в течение 7 дней, как описано в [24]. К оконча-

Рис. 3. Кинетика фосфорилирования ERK1/2-киназ и зависимость этого процесса от концентрации TLR-агонистов

А – окрашивание фосфорилированной формы ERK1/2 (по Ser202, Thr204), измерения методом проточной цитометрии. Для одиночных клеток, выбранных по сигналам прямого и бокового светорассеивания, измерена средняя интенсивность флуоресценции; *Б* – кинетика уровня фосфорилирования киназ при активации 5 мкг/мл агониста TLR4; *В* – зависимость уровня фосфорилирования от концентрации активатора TLR3; *Г* – зависимость уровня фосфорилирования от концентрации активатора TLR4

нию этого срока неадгезированные клетки содержали 70–75 % дендритных клеток. Адгезированная часть культуры была на 95 % представлена макрофагами. Для получения макрофагов сначала осторожно удаляли неадгезированные клетки, оставшийся монослой адгезированных клеток отмывали ФБ (0,5 % БСА), затем приливали раствор Версена («ПанЭко», Россия) и выдерживали в течение 1 ч при 4 °С, после чего макрофаги смывали ФБ (0,5 % БСА).

Исследование противоопухолевой активности макрофагов *in vitro*. Опухолевые клетки (4T1, 4T1-D5) помещали в лунки 96-луночного планшета в количестве 300 клеток на лунку в ПС, культивировали в виде монокультуры или совместно с макрофагами (20 000–30 000 на лунку). TLR-агонисты Poly I:C и ИММ вносили в культуры клеток в концентрациях 0,1, 1 или 10 мкг/мл. В контрольные культуры агонисты не вносили. Для статистики все культуры клеток создавали в 4 повторностях.

Клеточные культуры инкубировались в течение 5 дней при температуре 37 °С и 5 % CO₂. По окончании культивирования клетки снимали со дна планшета раствором Трипсин-ЭДТА («ПанЭко», Россия), фиксировали 2 % параформальдегидом (Sigma, США), исследовали методом проточной цитометрии на приборе BD FACS Aria II (Becton Dickinson, США). Для подсчета точного количества клеток в пробе к ней добавлялись меченые шарики (Invitrogen, США). Клетки 4T1-D5 были гейтированы как GFP-флуоресцирующие и негативные по DAPI. Для сравнения результатов независимых экспериментов количество клеток нормализовали с учетом контрольных значений.

Для визуализации колоний опухолевых клеток фиксированные клетки окрашивали 0,5 % метиленовым синим в растворе 50 % этанола, как описано в [24]. Планшеты с окрашенными опухолевыми колониями сканировали на сканере Epson perfection V300 photo (Epson, Япония). По полученным фотографиям определяли относительную площадь под колониями опухолевых клеток в программе ImageJ (NIH, США).

Измерение уровня экспрессии генов *Ifnb1* и *Nos2*. Экспрессия генов, кодирующих интерферон-β (ИФН-β) и индуцибельную NO-синтазу (iNOS), анализировалась методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (ПЦР-РВ). Для этого макрофаги были посеяны в лунки 96-луночного планшета в количестве 50 тыс. клеток в лунку в ПС RPMI и инкубировались без или с добавлением Poly I:C или ИММ в концентра-

Рис. 4. Активация ERK1/2 и NF-κB при активации макрофагов агонистом TLR, подтвержденная методом вестерн-блоттинга. Клетки активировали ИММ (10 мкг/мл). Через указанные промежутки времени в клеточных лизатах анализировали содержание фосфорилированной формы белков NF-κB и ERK1/2 методом вестерн-блоттинга. Концентрация фосфорилированных белков в клеточном лизате представлена относительно концентрации β-актина.

циях 0,01; 0,1 или 1 мкг/мл в течение 2 ч для измерения уровня экспрессии *Ifnb1* и в течение 6 ч для гена *Nos2*. Каждая проба была сделана в 2 повторах. По окончании инкубации клетки лизировали тризолом, изолировали тотальную мРНК с помощью набора РНК-ЭКСТРАН («Синтол», Россия). Полученную мРНК переводили в кДНК методом обратной транскрипции с использованием random-праймеров и ревертазы MMLV RT («Евроген», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученная кДНК использовалась для исследования уровней экспрессии генов *Ifnb1* и *Nos2* методом ПЦР-РВ. Полученные данные по экспрессии были нормированы на экспрессию гена *Actb*, кодирующего β-актин.

Анализ уровня фосфорилирования киназного комплекса ТВК/IKKε и киназы ERK1/2. Макрофаги были помещены в стерильные цитометрические пробирки по 50 тыс. клеток в ПС и инкубировались без или с добавлением Poly I:C и ИММ в концентрациях 0,01; 0,1; 1 или 5 мкг/мл в течение 20 мин при температуре 37°C и 5 % CO₂. Затем клетки фиксировали в 2 % параформальдегиде в течение 30 мин при 37 °C, после чего клетки отмывали центрифугированием в ФБ. Для пермеабиллизации мембран фиксированные макрофаги в течение ночи инкубировались в 100 % метаноле.

Перфорированные клетки отмывали от метанола, разделяли на 2 части, одну из них инкубировали в течение 2 ч с кроличьими антителами к pERK1/2, вторую —

с кроличьими антителами к pTBK/IKKε. Клетки снова отмывали и инкубировали в течение 1 ч в присутствии вторичных козьих антител, меченных AF488. Окрашенные макрофаги анализировали методом проточной цитометрии на приборе BD FACS Aria II (Becton Dickinson, США). Активированные макрофаги с мечеными фосфорилированными киназами были идентифицированы как одиночные события по прямому и боковому рассеиванию и по флуоресценции в канале FITC.

Анализ активации протеинкиназ ERK1/2 и транскрипционного фактора NF-κB методом вестерн-блоттинга. Клетки, активированные агонистом TLR, а также неактивированные контрольные клетки трижды промывали охлажденным фосфатно-солевым буфером и подвергали лизису (Invitrogen, Cell Extraction Buffer, FNN0011, США) в присутствии ингибиторов протеаз (Sigma, P2714-1BTL, США) 30 мин при 4 °C. Клеточные экстракты осветляли центрифугированием (14 000g, 10 мин, 4 °C) и измеряли в них концентрацию белка (Pierce, Protein Assay Reagent, 23225, США). Полученную смесь клеточных белков (25 мкг) разделяли в 10% SDS-PAGE и переносили на PVDF-мембрану (Amersham Hybond-P, Великобритания). Для детекции целевых белков мембрану последовательно в течение ночи инкубировали с первичными антителами к Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (Cell Signaling Technology, 3033, США), Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2; Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology, 4370, США)

Рис. 5. Уровень фосфорилирования ERK1/2 киназ в зависимости от концентраций TLR-агонистов и их комбинаций

Представлены значения, нормированные на уровень сигнала пробы без добавления агонистов. Этот сигнал принят за 100.

А – таблица нормированных сигналов проб в зависимости от комбинаций концентраций TLR-агонистов. Интенсивность цвета отображает увеличение значений; Б – гистограмма средних уровней интенсивности флуоресценции меченого TBK1/IKKε в зависимости от комбинаций концентраций агонистов TLR. Каждая группа столбцов отражает разные концентрации ИММ в пробах, столбцов одного цвета обозначают изменение концентрации агониста TLR3-рецептора.

и β-актину (Cell Signaling Technology, 4967, США) в разведении 1:2000, 1:10 000, 1:10 000, соответственно. Далее мембрану в течение 1 ч выдерживали в растворе вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, в разведении 1:1 000 000 (Sigma, A0545-1ML, США). Визуализацию результатов осуществляли методом хемилюминесценции (Pierce, SuperSignal West Femto Maximum sensitivity, 34095, США). Для количественной оценки результатов интенсивность белковых пятен анализировали с помощью программы ImageJ (NIH, США), интенсивность окраски пятен целевых белков нормировали на значения интенсивности пятен β-актина.

Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Graph-Pad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., США). Статистическую значимость между группами определяли по критерию Краскела–Уоллиса (значения $p < 0,05$ считались значимыми) и одностороннему сравнительному критерию Тьюки. Все представленные в работе результаты получены, как минимум, в 3 аналогичных экспериментах. На графиках представлены средние значения и стандартное отклонение.

Результаты

Кинетика фосфорилирования сигнальных протеинкиназ после активации макрофагов агонистами TLR3 или TLR4

Активацию макрофагов отдельными агонистами TLR3 и TLR4 или их сочетанием TLR3+TLR4 мы исследовали начиная с ранних сигнальных событий в клетках. Исходя из знания о сигнальных путях, идущих от рецепторов TLR3 и TLR4, мы анализировали активацию сигнальных каскадов TRIF, MAPK и NF-κB.

Для оценки взаимодействия 2 агонистов анализировали активацию комплекса TBK1/IKKε, являющегося одним из ключевых компонентов TRIF-зависимого каскада, и киназ ERK1/2 из MAPK-каскада, общего для обоих рецепторов.

Эффекты агонистов TLR3 и TLR4 мы сравнили по активации сигнального каскада TRIF (рис. 1). Фосфорилированную форму TBK1/IKKε в фиксированных и пермеабилizированных клетках окрашивали и анализировали методом проточной цитометрии, как описано выше (рис. 1А). Было установлено, что пик фосфорилирования комплексов TBK1/IKKε приходится примерно на 20 мин после активации (рис. 1Б), поэтому зависимость уровня фосфорилирования комплексов TBK1/IKKε от концентрации агонистов TLR3 и TLR4 исследовали через 20 мин после активации. Было показано, что агонисты TLR3 и TLR4, внесенные в культуру макрофагов в концентрациях 0,1 и 1 мкг/мл, увеличивают уровень фосфорилирования комплексов TBK1/IKKε в 3 и 6 раз соответственно. Макрофаги оказались более чувствительными к агонисту TLR4. При концентрации TLR4-агониста 0,01 мкг/мл активация TBK1/IKKε имела место, хотя та же концентрация TLR3-агониста не активировала этот сигнальный путь в макрофагах (рис. 1В, Г).

Совместное влияние агонистов TLR3 и TLR4 на макрофаги исследовали в разных комбинациях ИММ и Poly I:C (от 0 до 1 мкг/мл) (рис. 2). Агонист TLR3 был менее эффективен в активации фосфорилирования TBK1/IKKε по сравнению с агонистом TLR4. Поэтому эффект от совместного воздействия 2 агонистами

Рис. 6. Изменение уровней экспрессии мРНК, кодирующих ИФН-β и iNOS, при активации макрофагов агонистами TLR3, TLR4 или их сочетанием

Представленные значения пересчитаны относительно уровней мРНК *Actb* и нормированы на значение в контроле (клетки без агонистов).

А, В – в таблице представлены уровни экспрессии мРНК *Ifnb1* и *Nos2* при воздействии отдельными агонистами TLR3 или TLR4 или их комбинацией в указанных концентрациях. Интенсивность цвета отображает увеличение значений; Б и Г – гистограммы зависимости уровня экспрессии мРНК *Ifnb1* и *Nos2* от комбинации агонистов TLR в указанных концентрациях. Каждая группа столбцов отражает разные концентрации агониста TLR4, столбцы разных цветов обозначают различные концентрации агониста TLR3. Различия по экспрессии гена *Ifnb1* достоверны между точками (Poly I:C = 1 мкг/мл; ИММ = 0) и (Poly I:C = 1 мкг/мл; ИММ = 10 мкг/мл), $p = 0,04$; между точками (Poly I:C = 0 мкг/мл; ИММ = 10 мкг/мл) и (Poly I:C = 1 мкг/мл; ИММ = 10 мкг/мл), $p < 0,001$; отличия экспрессии гена *Nos2* между точками (poly I:C = 1 мкг/мл; ИММ = 0) и (poly I:C = 1 мкг/мл; ИММ = 10 мкг/мл), $p < 0,001$; между точками (poly I:C = 0 мкг/мл; ИММ = 10 мкг/мл) и (poly I:C = 1 мкг/мл, ИММ = 10 мкг/мл), $p < 0,001$.

сравнивали с эффектом агониста TLR4. Оказалось, что совместная активация 2 агонистами немногим более эффективна по сравнению с ИММ, совместное воздействие 2 агонистами в среднем повышало интенсивность фосфорилирования ТВК/ИККε на 11 %.

По фосфорилированию ERK1/2 мы определили вклад MAPK-киназного сигнального каскада в активацию макрофагов при воздействии агонистами TLR3 и TLR4, использованными по отдельности или в комбинации. Исследование кинетики фосфорилирования ERK1/2 в ответ на воздействие TLR4-агонистом (ИММ, 5 мкг/мл, рис. 3А, Б) позволило выбрать точку 20 мин

в качестве оптимального времени для изучения эффектов активации ERK1/2 в макрофагах при воздействии агонистами TLR и их комбинации.

Исследование зависимости активации ERK1/2 от концентрации Poly I:C (рис. 3В) показало, что при активации макрофагов 0,01 мкг/мл Poly I:C сигнал фосфорилирования ERK1/2 увеличивается в 1,5 раза, при повышении концентрации TLR3-агониста до 0,1 мкг/мл ERK1/2 активируется в 4 раза, а при концентрации 1 мкг/мл – в 14 раз. Даже через 1 ч после воздействия агонистом TLR3 уровень фосфорилирования ERK1/2 оставался в 8 раз выше исходного (до активации).

Рис. 7. Фотографии фиксированных в планшетах клеток карциномы 4T1 в монокультуре опухолевых клеток или в совместной культуре клеток 4T1 (или 4T1-D5) с макрофагами.

Культуры без агонистов TLR сравнены с культурами, в которые внесены агонисты TLR3, TLR4 или оба агониста.

При активации макрофагов ИММ происходило еще более интенсивное фосфорилирование ERK1/2. В течение 20 мин после воздействия на макрофаги концентрацией 0,01 мкг/мл TLR4-агониста сигнал фосфорилированных ERK1/2 нарастал в 3 раза по сравнению с базовым уровнем. При концентрации агониста 0,1 мкг/мл фосфорилирование ERK1/2 повышалось в 21 раз, а при концентрации 1 мкг/мл – почти в 50 раз (рис. 3Г).

Методом вестерн-блоттинга мы подтвердили активацию ERK1/2 под действием ИММ. Причем в этом случае отчетливо видно фосфорилирование каждой из 2 киназ, разделенных в электрофорезе (рис. 4). Кинетика активации ERK1/2 имела пик через 15 мин после воздействия ИММ и не зависела от метода регистрации – внутриклеточная цитофлуориметрия (рис. 3Б) или вестерн-блоттинг (рис. 4А, В). Активация транскрипционного фактора NF-κB достигла максимума через 5–15 мин после воздействия на макрофаги TLR4-агонистом (рис. 4А).

При сочетанном воздействии агонистами TLR3 и TLR4 активирующее влияние на ERK1/2 в макрофагах мы сравнивали с эффектом ИММ, который был более интенсивным по сравнению с эффектом Poly I:C. Интенсивность фосфорилирования ERK1/2 в макрофагах при воздействии комбинацией Poly I:C и ИММ была выше, чем при использовании этих агонистов по отдельности (рис 5). Одновременное воздействие 2 агонистами TLR3 и TLR4 приводило к увеличению сигнала на 15–20 % по сравнению с максимальным уровнем при действии одиночного агониста TLR4.

Синергизм агонистов TLR3 и TLR4 в активации экспрессии генов *Ifnb1* и *Nos2* в макрофагах

Активация TLR3 и TLR4 ведет к включению сигнальных путей в макрофагах с последующей активацией транскрипции сотен генов, кодирующих различные белки, участвующие в регуляции иммунного ответа или исполнении защитных функций. Среди таких индуцированных к синтезу белков важнейшую роль в иммунной защите играют ИФН-β и iNOS. Эти вещества являются ключевыми противоопухолевыми факторами, которые секретируют активированные макрофаги. Продукты iNOS – оксид азота и пероксинитрит – оказывают сильное цитотоксическое действие на опухолевые клетки. ИФН-β подавляет размножение злокачественных клеток, а также является одним из важных регуляторных факторов при инициации адаптивных реакций иммунитета. Активация экспрессии генов *Nos2* и *Ifnb1* является явным признаком включения транскрипционной программы, поляризующей макрофаги в состояние M1.

Мы исследовали интенсивность экспрессии мРНК *Nos2* и *Ifnb1* в результате активации макрофагов агонистами TLR в диапазоне концентраций от 0 до 1 мкг/мл для агониста TLR3 и 0 до 10 мкг/мл для агониста TLR4 (рис. 6). Клетки инкубировали с Poly I:C или ИММ, или их комбинациями в течение 2 ч для оценки экспрессии мРНК *Ifnb1* и 6 ч для мРНК *Nos2*. Затем из макрофагов была выделена тотальная мРНК.

Полученные результаты свидетельствуют, что агонист TLR3 сильнее активирует экспрессию мРНК *Ifnb1*, чем агонист TLR4 (рис. 6А, Б). При активации макро-

Рис. 8. Изучение противоопухолевого эффекта макрофагов, активированных разными концентрациями агонистов TLR

А и Б – фотографии опухолевых клеток, зафиксированных и окрашенных в лунках после инкубации с макрофагами, активированными разными концентрациями агониста TLR4; В–Е – графики зависимости нормированного количества опухолевых клеток от концентраций агонистов TLR, активирующих противоопухолевые свойства макрофагов; Ж, И – таблицы зависимости нормированного количества клеток линии 4T1 от комбинаций концентраций агонистов TLR, активирующих противоопухолевые свойства макрофагов; К, Л – гистограммы зависимости нормированного количества клеток линии 4T1 от комбинаций концентраций агонистов TLR, активирующих противоопухолевые свойства макрофагов. Каждая группа столбцов отражает разные концентрации ИММ, столбцы разных цветов обозначают различные концентрации агониста TLR3. К – различия достоверны между точками (Poly I:C = 10 мкг/мл; ИММ = 0) и (Poly I:C = 10 мкг/мл; ИММ = 10 мкг/мл), $p = 0,05$, а также между точками (Poly I:C = 0; ИММ = 10 мкг/мл) и (Poly I:C = 10 мкг/мл; ИММ = 10 мкг/мл), $p = 0,02$. Л – различия достоверны между точками (Poly I:C = 10 мкг/мл; ИММ = 0) и (Poly I:C = 10 мкг/мл; ИММ = 10 мкг/мл), $p = 0,045$, а также между точками (Poly I:C = 0; ИММ = 10 мкг/мл) и (Poly I:C = 10 мкг/мл; ИММ = 10 мкг/мл), $p = 0,07$.

фагов 1 мкг/мл Poly I:C уровень экспрессии мРНК *Ifnb1* возрастает в 88 раз, в то время как при той же концентрации ИММ интенсивность экспрессии мРНК *Ifnb1* увеличивается лишь в 28 раз. С учетом более сильного эффекта агониста TLR3 влияние разных комбинаций агонистов TLR3 и TLR4 сравнивалось с влиянием агониста TLR3. Оказалось, что одновременная активация макрофагов двумя агонистами сильнее стимулирует экспрессию мРНК *Ifnb1*, чем активация отдельными агонистами TLR3 или TLR4. Так, уровень активации экспрессии гена *Ifnb1* при использовании 2 агонистов в концентрации 1 мкг/мл достигал 289, что в 3,3 раза превышало ответ макрофагов на активацию TLR3-агонистом и в 2,6 раза превышало сумму ответов на TLR3- и TLR4-агонисты, использованные по отдельности.

Агонист TLR4 индуцировал экспрессию мРНК *Nos2* в 7 раз сильнее, чем агонист TLR3 (рис. 6В, Г). Совместное воздействие на макрофаги 2 агонистами TLR3 и TLR4 индуцировало экспрессию мРНК *Nos2* в 3–3,5 раза более интенсивную, чем в ответ на TLR4-агонист и даже сумму ответов на каждый агонист в отдельности.

Таким образом, мы наблюдали выраженный синергизм TLR3- и TLR4-агонистов в активации экспрессии мРНК *Ifnb1* и *Nos2*, отражающих включение программы поляризации макрофагов в состояние M1.

Активация противоопухолевых цитотоксических свойств макрофагов с помощью агонистов TLR3, TLR4 и их сочетания

Выше было показано, что при активации макрофагов агонистами TLR3 и TLR4 происходит интенсивная экспрессия мРНК *Ifnb1* и *Nos2*, в результате чего эти клетки могут приобретать свойства киллеров опухоли. Мы исследовали влияние агонистов и их сочетания на цитотоксичность макрофагов в отношении сингенных клеток 4Т1 рака молочной железы и полученного из этих клеток клона 4Т1-D5, конститутивно экспрессирующих флуоресцентный белок GFP. Клетки карциномы 4Т1 и клона 4Т1-D5 культивировались в присутствии или в отсутствии макрофагов, активированных или не активированных TLR-агонистами. Через 5 дней определяли количество живых клеток 4Т1. Репрезентативные фотографии фиксированных и окрашенных опухолевых клеток в лунках планшета представлены на рис. 7. Для анализа содержания опухолевых клеток в каждой лунке планшеты сканировали, фотографии обрабатывали в программе ImageJ, согласно [24]. В случае использования клеток 4Т1-D5 через 5 дней культивирования число клеток опухоли определяли методом проточной цитофлуориметрии в канале зеленой флуоресценции.

Агонисты TLR3 и TLR4, а также их сочетания в разных концентрациях не оказывали влияния на жизнеспособность и скорость размножения клеток карциномы 4Т1 и 4Т1-D5 (рис. 7, 8).

Макрофаги, стимулированные TLR3- или TLR4-агонистом, значительно подавляли рост опухолевых клеток в совместной культуре (рис. 7). Так, при использовании концентрации 10 мкг/мл Poly I:C и ИММ снижали содержание опухолевых клеток приблизительно в 3 раза в совместных культурах макрофагов и клеток 4Т1, а также макрофагов и клеток 4Т1-D5. Зависимость противоопухолевого эффекта макрофагов от концентрации агонистов представлена на рис. 8. Очевидный противоопухолевый эффект макрофагов TLR3- и TLR4-агонисты индуцировали в концентрациях $\geq 0,1$ мкг/мл.

Изучение противоопухолевых свойств макрофагов при их активации сочетаниями TLR3- и TLR4-агонистов в различных концентрациях показало, что макрофаги, активированные комбинацией ИММ и Poly I:C, сильнее подавляют рост опухолевых клеток, чем макрофаги, активированные этими агонистами по отдельности. Противоопухолевый эффект макрофагов при их активации сочетанием агонистов TLR3 и TLR4 сравнивали с противоопухолевым эффектом макрофагов, активированных агонистом TLR4, который был более активен, чем агонист TLR3. Максимальное усиление противоопухолевой активности макрофагов 2 агонистами по сравнению с одним TLR4-агонистом достигало 40 % при концентрации агонистов 10 мкг/мл (см. рис. 8Ж, 3).

На клетках обеих опухолевых линий (4Т1 и 4Т1-D5) было показано, что при одновременной активации макрофагов 2 агонистами (10 мкг/мл) численность опухолевых клеток в совместной культуре с активированными макрофагами снижается в 5 раз по сравнению с совместными культурами без агонистов. Количество оставшихся в культуре живых опухолевых клеток удавалось точнее измерить при использовании цитофлуориметрии с клетками 4Т1-D5. В этом варианте экспериментов можно было аккуратнее оценить противоопухолевое действие макрофагов, активированных малыми концентрациями агонистов. Установлено, что при активации макрофагов агонистом TLR3 в концентрации 0,1 мкг/мл число опухолевых клеток в совместной культуре с макрофагами снизилось на 19 %, при концентрации 1 мкг/мл – на 49 %, а при концентрации 10 мкг/мл – на 66 % по сравнению с количеством клеток опухоли в совместной культуре с макрофагами без агониста. Макрофаги, активированные агонистом TLR4 в концентрации 0,1 мкг/мл, снижали количество опухолевых клеток на 56 %, при концентрации агониста TLR4 1 мкг/мл – на 63 % и при концентрации агониста TLR4 10 мкг/мл – на 66 % (рис. 9В, Г).

Противоопухолевый эффект макрофагов при сочетанной активации 2 агонистами TLR3+TLR4 сравнивали с эффектом агониста TLR4, более активного по сравнению с агонистом TLR3. При активации макрофагов 2 агонистами в концентрации 0,1 мкг/мл противоопухолевый эффект был всего лишь на 7 % сильнее, чем при действии одним агонистом TLR4. При активации 2 агонистами в концентрации

Рис. 9. Исследование методом проточной цитометрии противоопухолевого эффекта макрофагов (Мф), активированных TLR3- и TLR4-агонистами

А и Б – измерение количества опухолевых клеток 4T1-D5 методом проточной цитометрии; А – клетки 4T1-D5 после культивирования совместно с макрофагами без добавления агонистов; Б – с добавлением 10 мкг/мл обоих агонистов; В – в таблице представлен противоопухолевый эффект макрофагов, активированных сочетанием агонистов TLR3 и TLR4 в разных концентрациях (количество опухолевых клеток в лунке нормировано на значение в контроле без агонистов); Г – гистограмма, демонстрирующая противоопухолевый эффект макрофагов, активированных разными комбинациями агонистов TLR3 и TLR4. Каждая группа столбцов отражает разные концентрации IMM, цветом обозначены разные концентрации Poly I:C. Различия достоверны между точками (Poly I:C = 10 мкг/мл; IMM = 0) и (Poly I:C = 10 мкг/мл; IMM = 10 мкг/мл), $p = 0,04$, а также между точками (Poly I:C = 0; IMM = 10 мкг/мл) и (Poly I:C = 10 мкг/мл; IMM = 10 мкг/мл), $p = 0,03$.

1 мкг/мл противоопухолевое действие макрофагов было на 16 %, а при концентрации 10 мкг/мл – на 42 % более выраженным по сравнению с агонистом TLR4 (рис. 9В, Г).

Обсуждение

Транскрипционное перепрограммирование макрофагов в состояние M1 сочетает в себе 2 важных аспекта. Во-первых, фундаментальное знание о пластичности этого типа клеток, о внешних сигналах, в ответ на которые клетки существенно перестраивают свою программу на уровне транскрипции многих сотен генов, что в итоге существенно изменяет фенотип и функциональные свойства этих клеток. Во-вторых, практическое использование свойства пластичности макрофагов и других миелоидных клеток, что позволило бы произвольно переключать, перепрограммировать эти клетки в микроокружении злокачественной опухоли, переводя их из состояния верных слуг опу-

холи в ее киллеров. Первое и второе тесно связаны. Не зная, не понимая тонких молекулярных механизмов регуляции программы макрофагов, нельзя рассчитывать на успешное управление этой программой в интересах иммунотерапии пациента с онкологическим заболеванием.

В этой экспериментальной работе мы исследовали сочетание 2 факторов (агонисты TLR3 и TLR4), имитирующих молекулярные образы инфекций. Для макрофагов такие молекулярные образы являются сильнейшим раздражителем. Они включают программу быстрой и всесторонней мобилизации, перестройки клетки из состояния мирного хранителя благополучия в ткани в состояние беспощадного и очень эффективного убийцы, предназначение которого – быстрейшая ликвидация врага.

Использованные нами агонисты TLR3 и TLR4 лишь имитируют встречу с инфекцией. Собственно, инфекции нет, но этой имитации достаточно для макро-

фагов, чтобы они отреагировали переключением в новое, агрессивное, состояние. Примечательно, что агрессивное M1-состояние эффективно не только против инфекции, но и против злокачественных клеток. Молекулярное оружие в виде короткоживущих радикалов и перекисей, в том числе NO и пероксинитритов, действует лишь на очень небольших расстояниях порядка нескольких клеточных размеров и потому убивает соседствующие злокачественные клетки. Поскольку макрофаги равномерно распределены во всей ткани злокачественной опухоли, такое их быстрое превращение из стимуляторов опухолевого роста в убийц, массово истребляющих злокачественные клетки в опухоли, может радикально изменить всю молекулярную и клеточную среду в опухолевой ткани.

Это и нужно в случае лечения пациента с онкологическим заболеванием. Если макрофаги, обильно представленные в опухолевой ткани, превратятся в киллеров злокачественных клеток, то они инициируют целый ряд событий, желанных для борьбы с опухолевым процессом и, в предельно оптимальном случае, для выздоровления пациента. Убивая злокачественные клетки, макрофаги затормозят или остановят рост опухоли. Они вызовут освобождение опухолевых антигенов, против которых могут развиваться адаптивные реакции Т- и В-клеток, что приведет к контролю или ликвидации опухоли, с последующей долговременной иммунной памятью, защищающей от рецидива заболевания.

Чем более эффективны воздействия, вызывающие включение программы M1, тем выше шансы на успех в лечении пациентов с онкологическими заболеваниями. Именно с целью достижения максимальной эффективности при перепрограммировании макрофагов мы исследовали в данной работе синергическое действие сочетания агонистов TLR3 и TLR4. Ранее мы сообщали о выраженном синергизме сигналов, действующих через рецепторы TLR4, TLR9 и NOD-2 [21–23]. Идея состоит в том, чтобы действовать на макрофаги на разных уровнях рецепции – на внешней мембране (TLR4), в эндосоме (TLR9) и в цитозоле (NOD). Мы показали, что сочетания активационных сигналов на 2 из указанных уровней достаточно для индукции максимального, синергического, ответа клетки. В прошлой работе нас интересовала противои инфекционная активность макрофагов и дендритных клеток. А в данном исследовании мы имели целью синергическую активацию противоопухолевых свойств макрофагов.

Описанные в настоящей работе результаты наших экспериментов доказывают, что сочетания 2 агонистов, действующих на 2 уровнях рецепции – внешней (TLR4) и эндосомальной (TLR3) мембранах клетки, вполне достаточно для индукции синергической активации противоопухолевых свойств макрофагов. Мы установили также синергизм этих 2 агонистов в активации транскрипции мРНК *Ifnb1* и *Nos2*, ключевых молекулярных факторов, обеспечивающих противоопухолевую активность макрофагов [24]. Таким образом, мы видим полную согласованность синергического ответа на 2 уров-

нях. В ответ на двойную активацию агонистами TLR3 и TLR4 синергически активируется продукция NO, пероксинитритов и ИФН-β с одной стороны и киллерная противоопухолевая активность макрофагов с другой. Конечно, это 2 уровня одного и того же, глобального для этих клеток процесса – изменения транскрипционной программы, приводящего к поляризации макрофагов в состояние M1.

Во внутриклеточных сигнальных цепях, от TLR-рецепторов до регуляторов транскрипции, нам хотелось бы увидеть сигнальные события, приводящие к синергической перестройке транскрипции и изменению фенотипа макрофагов. Однако предпринятая в данной работе попытка увидеть синергизм на уровне активации сигнальных протеинкиназ TBK1/IKKε и ERK1/2 не оправдала надежд. Эти протеинкиназы и сигнальные пути, в которых они играют ключевую роль, сильно активировались агонистами TLR3 и TLR4, но при активации макрофагов сразу 2 агонистами TLR3 и TLR4 мы не увидели значительного (синергического) ответа по активации этих киназ. Прирост активности был весьма и весьма невелик – 10–20%. Остается интригующий вопрос, может ли такое небольшое изменение активности ключевых протеинкиназ обеспечить кратное усиление транскрипции важнейших генов и значительное увеличение цитотоксической активности макрофагов. Предстоит продолжение поиска элементов внутриклеточной сигнализации, обеспечивающих синергический ответ на двойную активацию макрофагов агонистами TLR3 и TLR4.

Выводы

1. Одновременная активация макрофагов 2 агонистами TLR3 и TLR4 индуцирует синергический ответ этих клеток. Происходит синергическая активация транскрипции мРНК *Ifnb1* и *Nos2*, а также синергическое усиление противоопухолевой цитотоксической активности макрофагов в отношении клеток карциномы 4T1.

2. При активации макрофагов агонистами TLR3 и TLR4 происходит сильная активация фосфорилирования сигнальных протеинкиназ TBK1/IKKε и ERK1/2, но синергического ответа на этом уровне не обнаружено.

Вклад авторов. Багаев А.В. – концепция, дизайн исследования, постановка экспериментов, статистическая обработка данных; Рыбинец А.С. – постановка экспериментов; Федорова А.А. – участие в анализе литературы и написании статьи; Ушакова Е.И. – анализ литературы, редактирование статьи; Лебедева Е.С. – планирование и постановка экспериментов методом электрофореза и вестерн-блоттинга, анализ данных; Пичугин А.В. – планирование и постановка экспериментов методом проточной цитофлуориметрии, анализ данных; Атауллаханов Р.И. – концепция, анализ данных, написание статьи.

■ Литература

- Li X., Liu R., Su X., Pan Y., Han X., Shao C., Shi Y. Harnessing tumor-associated macrophages as aids for cancer immunotherapy. *Mol. Cancer*. 2019; 18 (1): 177. PMID: 31805946. DOI: <http://doi.org/10.1186/s12943-019-1102-3>
- Salmon H., Remark R., Gnjatich S., Merad M. Host tissue determinants of tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer*. 2019; 19 (4): 215–27. PMID: 30867580. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41568-019-0125-9>
- Huang Y., Ge W., Zhou J., Gao B., Qian X., Wang W. The role of tumor associated macrophages in hepatocellular carcinoma. *J. Cancer*. 2021; 12 (5): 1284–94. PMID: 33531974. DOI: <http://doi.org/10.7150/JCA.51346>
- DeNardo D.G., Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2019; 19 (6): 369–82. PMID: 30718830. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41577-019-0127-6>
- Qian B.Z., Pollard J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010; 141 (1): 39–51. PMID: 20371344. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014>
- Berse B., Brown L.F., Van de Water L., Dvorak H.F., Senger D.R. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol. Biol. Cell*. 1992; 3 (2): 211–20. PMID: 1550962. DOI: <http://doi.org/10.1091/mbc.3.2.211>
- Yang Q., Guo N., Zhou Y., Chen J., Wei Q., Han M. The role of tumor-associated macrophages (TAMs) in tumor progression and relevant advance in targeted therapy. *Acta Pharm. Sin. B*. 2020; 10 (11): 2156–70. PMID: 33304783. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.04.004>
- Xiang X., Wang J., Lu D., Xu X. Targeting tumor-associated macrophages to synergize tumor immunotherapy. *Signal. Transduct. Target Ther.* 2021; 6 (1): 75. PMID: 33619259. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41392-021-00484-9>
- Zhou Z., Peng Y., Wu X., Meng S., Yu W., Zhao J., Zhang H., Wang J., Li W. CCL18 secreted from M2 macrophages promotes migration and invasion via the PI3K/Akt pathway in gallbladder cancer. *Cell. Oncol. (Dordr.)*. 2019; 42 (1): 81–92. PMID: 30276551. DOI: <http://doi.org/10.3389/fonc.2020.00188>
- Ruffell B., Chang-Strachan D., Chan V., Rosenbusch A., Ho C.M., Pryer N., Daniel D., Hwang E.S., Rugo H.S., Coussens L.M. Macrophage IL-10 blocks CD8⁺ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell*. 2014; 26 (5): 623–37. PMID: 25446896. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.09.006>
- Wei C., Yang C., Wang S., Shi D., Zhang C., Lin X., Liu Q., Dou R., Xiong B. Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis. *Mol. Cancer*. 2019; 18 (1): 64. PMID: 30927925. DOI: <http://doi.org/10.1186/s12943-019-0976-4>
- Song W., Mazzei R., Yang T., Gobe G.C. Translational significance for tumor metastasis of tumor-associated macrophages and epithelial-mesenchymal transition. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1106. PMID: 28955335. DOI: <http://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01106>
- Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* 2000; 164 (12): 6166–73. PMID: 10843666. DOI: <http://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>
- Pan Y., Yu Y., Wang X., Zhang T. Tumor-associated macrophages in tumor immunity. *Front. Immunol.* 2020; 11: 583084. PMID: 33365025. DOI: <http://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583084>
- Müller E., Christopoulos P.F., Halder S., Lunde A., Beraki K., Speth M., Oynebraten I., Corthay A. Toll-like receptor ligands and interferon- γ synergize for induction of antitumor M1 macrophages. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1383. PMID: 29123526. DOI: <http://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01383>
- Tan Y., Wang M., Zhang Y., Ge S., Zhong F., Xia G., Sun C. Tumor-associated macrophages: a potential target for cancer therapy. *Front. Oncol.* 2021; 11: 693517. PMID: 34178692. DOI: <http://doi.org/10.3389/fonc.2021.693517>
- Zhou J., Tang Z., Gao S., Li C., Feng Y., Zhou X. Tumor-associated macrophages: recent insights and therapies. *Front. Oncol.* 2020; 10: 188. PMID: 32161718. DOI: <http://doi.org/10.3389/fonc.2020.00188>
- Li C., Xu X., Wei S., Jiang P., Xue L., Wang J. Tumor-associated macrophages: potential therapeutic strategies and future prospects in cancer. *J. Immunother. Cancer*. 2021; 9 (1): e001341. PMID: 33504575. DOI: <http://doi.org/10.1136/jitc-2020-001341>
- Li X., Guo X., Ling J., Tang Z., Huang G., He L., Chen T. Nano-medicine-based cancer immunotherapies developed by reprogramming tumor-associated macrophages. *Nanoscale*. 2021; 13 (9): 4705–27. PMID: 33625411. DOI: <http://doi.org/10.1039/d0nr08050k>
- Ghochikyan A., Pichugin A., Bagaev A., Davtyan A., Hovakimyan A., Tikhvatulin A., Davtyan H., Shcheblyakov D., Logunov D., Chulkina M., Savilova A., Trofimov D., Nelson E. L., Agadjanyan M.G., Ataullakhanov R.I. Targeting TLR-4 with a novel pharmaceutical grade plant derived agonist, Immunomax, as a therapeutic strategy for metastatic breast cancer. *J. Transl. Med.* 2014; 12 (1): 322. PMID: 25432242. DOI: <http://doi.org/10.1186/s12967-014-0322-y>
- Лебедева Е.С., Багаев А.В., Чулкина М.М., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И. Синергическое усиление транскрипции генов интерферонов 1-го типа и цитокинов при активации макрофагов и дендритных клеток сочетанием двух агонистов Prr. *Иммунология*. 2017; 38 (1): 64–71. DOI: <http://doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-1-64-71>
- Лебедева Е.С., Багаев А.В., Чулкина М.М., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И. NF- κ B-, но не MAPK-сигнальный путь определяет синергический ответ макрофагов на одновременную активацию двух типов рецепторов TLR4 + NOD2 или TLR9 + NOD2. *Иммунология*. 2017; 38 (2): 76–82. DOI: <http://doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-2-76-82>
- Пичугин А.В., Багаев А.В., Лебедева Е.С., Чулкина М., Атауллаханов Р.И. Синергическая продукция цитокинов дендритными клетками в ответ на одновременную активацию парами агонистов различных рецепторов врожденного иммунитета. *Иммунология*. 2017; 38 (2): 118–23. DOI: <http://doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-2-118-123>
- Bagaev A., Pichugin A., Nelson E.L., Agadjanyan M.G., Ghochikyan A., Ataullakhanov R.I. Anticancer mechanisms in two murine bone marrow-derived dendritic cell subsets activated with TLR4 agonists. *J. Immunol.* 2018; 200: 2656–69. PMID: 29500244. DOI: <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1701126>

■ References

- Li X., Liu R., Su X., Pan Y., Han X., Shao C., Shi Y. Harnessing tumor-associated macrophages as aids for cancer immunotherapy. *Mol. Cancer*. 2019; 18 (1): 177. PMID: 31805946. DOI: <http://doi.org/10.1186/s12943-019-1102-3>
- Salmon H., Remark R., Gnjatich S., Merad M. Host tissue determinants of tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer*. 2019; 19 (4): 215–27. PMID: 30867580. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41568-019-0125-9>
- Huang Y., Ge W., Zhou J., Gao B., Qian X., Wang W. The role of tumor associated macrophages in hepatocellular carcinoma. *J. Cancer*. 2021; 12 (5): 1284–94. PMID: 33531974. DOI: <http://doi.org/10.7150/JCA.51346>
- DeNardo D.G., Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2019; 19 (6): 369–82. PMID: 30718830. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41577-019-0127-6>
- Qian B.Z., Pollard J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010; 141 (1): 39–51. PMID: 20371344. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014>
- Berse B., Brown L.F., Van de Water L., Dvorak H.F., Senger D.R. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol. Biol. Cell*. 1992; 3 (2): 211–20. PMID: 1550962. DOI: <http://doi.org/10.1091/mbc.3.2.211>
- Yang Q., Guo N., Zhou Y., Chen J., Wei Q., Han M. The role of tumor-associated macrophages (TAMs) in tumor progression and relevant advance in targeted therapy. *Acta Pharm. Sin. B*. 2020; 10 (11): 2156–70. PMID: 33304783. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.04.004>
- Xiang X., Wang J., Lu D., Xu X. Targeting tumor-associated macrophages to synergize tumor immunotherapy. *Signal. Transduct. Target Ther.* 2021; 6 (1): 75. PMID: 33619259. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41392-021-00484-9>
- Zhou Z., Peng Y., Wu X., Meng S., Yu W., Zhao J., Zhang H., Wang J., Li W. CCL18 secreted from M2 macrophages promotes migration and invasion via the PI3K/Akt pathway in gallbladder cancer. *Cell. Oncol. (Dordr.)*. 2019; 42 (1): 81–92. PMID: 30276551. DOI: <http://doi.org/10.3389/fonc.2020.00188>
- Ruffell B., Chang-Strachan D., Chan V., Rosenbusch A., Ho C.M., Pryer N., Daniel D., Hwang E.S., Rugo H.S., Coussens L.M. Macrophage IL-10 blocks CD8⁺ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells.

Cancer Cell. 2014; 26 (5): 623–37. PMID: 25446896. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.006>

11. Wei C., Yang C., Wang S., Shi D., Zhang C., Lin X., Liu Q., Dou R., Xiong B. Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis. *Mol. Cancer*. 2019; 18 (1): 64. PMID: 30927925. DOI: <http://doi.org/10.1186/s12943-019-0976-4>

12. Song W., Mazzei R., Yang T., Gobe G.C. Translational significance for tumor metastasis of tumor-associated macrophages and epithelial-mesenchymal transition. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1106. PMID: 28955335. DOI: <http://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01106>

13. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* 2000; 164 (12): 6166–73. PMID: 10843666. DOI: <http://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>

14. Pan Y., Yu Y., Wang X., Zhang T. Tumor-associated macrophages in tumor immunity. *Front. Immunol.* 2020; 11: 583084. PMID: 33365025. DOI: <http://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583084>

15. Müller E., Christopoulos P.F., Halder S., Lunde A., Beraki K., Speth M., Oynebraten I., Corthay A. Toll-like receptor ligands and interferon- γ synergize for induction of antitumor M1 macrophages. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1383. PMID: 29123526. DOI: <http://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01383>

16. Tan Y., Wang M., Zhang Y., Ge S., Zhong F., Xia G., Sun C. Tumor-associated macrophages: a potential target for cancer therapy. *Front. Oncol.* 2021; 11: 693517. PMID: 34178692. DOI: <http://doi.org/10.3389/fonc.2021.693517>

17. Zhou J., Tang Z., Gao S., Li C., Feng Y., Zhou X. Tumor-associated macrophages: recent insights and therapies. *Front. Oncol.* 2020; 10: 188. PMID: 32161718. DOI: <http://doi.org/10.3389/fonc.2020.00188>

18. Li C., Xu X., Wei S., Jiang P., Xue L., Wang J. Tumor-associated macrophages: potential therapeutic strategies and future prospects in cancer. *J. Immunother. Cancer*. 2021; 9 (1): e001341. PMID: 33504575. DOI: <http://doi.org/10.1136/jitc-2020-001341>

Сведения об авторах

Багаев Александр Владиславович – науч. сотр. лаб. активации иммунитета отдела иммунной биотехнологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: bavmofc@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8680-854X>

Рыбинцев Александра Сергеевна – студент, лаб. активации иммунитета отдела иммунной биотехнологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: aleksandra.rybinets@gmail.com

Федорова Анастасия Алексеевна – лаборант лаб. активации иммунитета отдела иммунной биотехнологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: anastasyafedorovafedorova@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2687-9319>

Ушакова Екатерина Игоревна – мл. науч. сотр. лаб. активации иммунитета отдела иммунной биотехнологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: ekaterina.ushakova95@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2143-1021>

Лебедева Екатерина Семеновна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. активации иммунитета отдела иммунной биотехнологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: ekaterinalebedeva2612@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0384-9299>

Пичугин Алексей Васильевич – канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотр. лаб. активации иммунитета отдела иммунной биотехнологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: pichalvas@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-5356-3331>

Атауллаханов Равшан Иноятович – д-р мед. наук, проф., руководитель отдела иммунной биотехнологии, зав. лаб. активации иммунитета отдела иммунной биотехнологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: ravshan.ataullakhanov@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4767-6409>

19. Li X., Guo X., Ling J., Tang Z., Huang G., He L., Chen T. Nano-medicine-based cancer immunotherapies developed by reprogramming tumor-associated macrophages. *Nanoscale*. 2021; 13 (9): 4705–27. PMID: 33625411. DOI: <http://doi.org/10.1039/d0nr08050k>

20. Ghochikyan A., Pichugin A., Bagaev A., Davtyan A., Hovakimyan A., Tikhvatulin A., Davtyan H., Shcheblyakov D., Logunov D., Chulkina M., Savilova A., Trofimov D., Nelson E. L., Agadjanyan M.G., Ataullakhanov R.I. Targeting TLR-4 with a novel pharmaceutical grade plant derived agonist, Immunomax, as a therapeutic strategy for metastatic breast cancer. *J. Transl. Med.* 2014; 12 (1): 322. PMID: 25432242. DOI: <http://doi.org/10.1186/s12967-014-0322-y>

21. Lebedeva E.S., Bagaev A.V., Chulkina M.M., Pichugin A.V., Ataullakhanov R.I. Synergistic activation of gene transcription encoding type I interferons and cytokines in macrophages and dendritic cells by the combinations of two PRR-agonists. *Immunologiya*. 2017; 38 (1): 64–71. DOI: <http://doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-1-64-71> (in Russian)

22. Lebedeva E.S., Bagaev A.V., Chulkina M.M., Pichugin A.V., Ataullakhanov R.I. NF- κ B-, but not MAPK-signaling pathway determines synergistic response of macrophages to the simultaneous activation of two types receptors TLR4 + NOD2 or TLR9 + NOD2. *Immunologiya*. 2017; 38 (1): 76–82. DOI: <http://doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-2-76-82> (in Russian)

23. Pichugin A.V., Bagaev A.V., Lebedeva E.S., Chulkina M., Ataullakhanov R.I. Synergistic cytokine production by murine dendritic cells in response to their simultaneous activation with pairs of agonists of different innate immune receptors. *Immunologiya*. 2017; 38 (1): 118–23. DOI: <http://doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-2-118-123> (in Russian)

24. Bagaev A., Pichugin A., Nelson E.L., Agadjanyan M.G., Ghochikyan A., Ataullakhanov R.I. Anticancer mechanisms in two murine bone marrow-derived dendritic cell subsets activated with TLR4 agonists. *J. Immunol.* 2018; 200: 2656–69. PMID: 29500244. DOI: <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1701126>

Authors' information

Alexander V. Bagaev – Researcher, Immunity Activation Lab., Immune Biotechnology Dept., NRC Institute of Immunology of FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: bavmofc@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8680-854X>

Alexandra S. Rybinets – Research Student, Immunity Activation Lab., Immune Biotechnology Dept., NRC Institute of Immunology of FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: aleksandra.rybinets@gmail.com

Anastasiya A. Fedorova – Research Assistant, Immunity Activation Lab., Immune Biotechnology Dept., NRC Institute of Immunology of FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: anastasyafedorovafedorova@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2687-9319>

Ekaterina I. Ushakova – Junior Researcher, Immunity Activation Lab., Immune Biotechnology Dept., NRC Institute of Immunology of FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: ekaterina.ushakova95@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2143-1021>

Ekaterina S. Lebedeva – PhD, Senior Researcher, Immunity Activation Lab., Immune Biotechnology Dept., NRC Institute of Immunology of FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: ekaterinalebedeva2612@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0384-9299>

Alexey V. Pichugin – PhD, Leader Researcher, Immunity Activation Lab., Immune Biotechnology Dept., NRC Institute of Immunology of FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: pichalvas@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-5356-3331>

Ravshan I. Ataullakhanov – MD, PhD, Prof., Head of Immune Biotechnology Dept., Head of Immunity Activation Lab., NRC Institute of Immunology of FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: ravshan.ataullakhanov@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4767-6409>