

Оценка *in vitro* биологической активности отечественного препарата макрофаг-активирующего фактора (GcMAF-RF)

Е.В. Левитес^{1#}, С.С. Кирикович^{1#}, Е.В. Долгова¹, А.С. Проскурина¹, Г.С. Риттер^{1, 2}, А.А. Останин³,
Е.Р. Черных³, С.С. Богачев¹ 

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

 e-mail: labmolbiol@mail.ru

Аннотация. В статье сообщается о разработанном оригинальном способе получения витамин D₃-связывающего белка (DBP) и его конвертации в макрофаг-активирующий фактор GcMAF-RF. Согласно разработанному регламенту, DBP получали из плазмы крови человека, применяя аффинную колоночную хроматографию, очищали и модифицировали до GcMAF-RF с использованием цитоиммобилизованных гликозидаз (бета-галактозидаза и нейраминидаза). Принадлежность полученного полипептида к Gc-группе глобулинов плазмы крови подтверждали вестерн-блотом с использованием специфических антител. Полученный полипептид по своим молекулярным свойствам соответствует описанному в литературе белку GcMAF, находящемуся на стадии клинических испытаний в США, Британии, Израиле и Японии (Saisei Mirai, Reno Integrative Medical Center, Immuno Biotech Ltd, Efranat, Catalytic Longevity). Биологическую активность препарата GcMAF-RF определяли по индукции у перитонеальных макрофагов мыши фагоцитарной активности и способности продуцировать монооксид азота (NO) *in vitro*. Фагоцитарную активность макрофагов оценивали по эффективности захвата магнитных шариков. Степень активации макрофагов рассчитывали по отношению числа захваченных шариков к общему числу макрофагов. Уровень продукции NO оценивали по накоплению монооксида азота в культуральных супернатантах перитонеальных макрофагов колориметрическим методом с использованием реактива Грисса. Показано, что GcMAF-RF кратно увеличивает фагоцитарную активность макрофагов и достоверно увеличивает продукцию ими монооксида азота. Выделенный оригинальным способом активатор макрофагов GcMAF-RF по своим характеристикам (согласно материалам, опубликованным в печати) соответствует препаратам GcMAF, представляемым на рынке зарубежными компаниями, и может рассматриваться как новый отечественный биологически активный препарат с широким спектром действия. Наибольший интерес вызывает его способность через активацию макрофагов усиливать адаптивный иммунитет организма. В этой связи предполагаются два направления терапевтического применения препарата GcMAF-RF. Препарат может быть востребован в области лечения онкологических заболеваний и, кроме того, может быть использован при лечении ряда нейродегенеративных патологий и иммунодефицитных состояний.
Ключевые слова: макрофаг-активирующий фактор (GcMAF); витамин D₃-связывающий белок (DBP); фагоцитоз; монооксид азота (NO); перитонеальные макрофаги.

Для цитирования: Левитес Е.В., Кирикович С.С., Долгова Е.В., Проскурина А.С., Риттер Г.С., Останин А.А., Черных Е.Р., Богачев С.С. Оценка *in vitro* биологической активности отечественного препарата макрофаг-активирующего фактора (GcMAF-RF). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(3):284-291. DOI 10.18699/VJ20.621

In vitro assay of biological activity of a national preparation of macrophage activating factor (GcMAF-RF)

E.V. Levites^{1#}, S.S. Kirikovitch^{1#}, E.V. Dolgova¹, A.S. Proskurina¹, G.S. Ritter^{1, 2}, A.A. Ostanin³, E.R. Chernykh³, S.S. Bogachev¹ 

¹ Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

 e-mail: labmolbiol@mail.ru

Abstract. The article reports an original method for producing vitamin D₃-binding protein (DBP) and its conversion into macrophage-activating factor GcMAF-RF. According to an original protocol, DBPs were obtained from human blood plasma using affinity chromatography, purified and modified to GcMAF-RF using cytoimmobilized glycosidases (beta-galactosidase and neuraminidase). The presence of the polypeptide obtained in the Gc group of blood plasma globulins was confirmed by Western blot using specific antibodies. The molecular properties of this polypeptide put it in correspondence with the GcMAF protein described in the literature, which is undergoing clinical trials in the USA, Britain, Israel and Japan (at Saisei Mirai; Reno Integrative Medical Center; Immuno Biotech Ltd; Efranat; and Catalytic

Longevity). The biological activity of the GcMAF-RF preparation was detected by the induction of phagocytic activity of macrophages and their ability to produce nitrogen monoxide (NO) *in vitro*. The phagocytic activity of macrophages was evaluated by their ability to uptake magnetic beads. The degree of activation of macrophages was calculated by the ratio of trapped beads to the total number of macrophages. The level of NO production was estimated by the accumulation of nitrogen monoxide in the culture supernatants of peritoneal macrophages by the colorimetric method using the Griess reagent. It was shown that GcMAF-RF multiplies the phagocytic activity of macrophages and significantly increases their production of nitrogen monoxide. The macrophage activator GcMAF-RF, according to its characteristics, corresponds to similar preparations which are made available to the market by foreign companies, and can be considered as a new biologically active preparation with a wide spectrum of action. Of greatest interest is its ability – through the activation of macrophages – to enhance the adaptive immunity. In this regard, two areas of therapeutic use of the GcMAF-RF are proposed. The preparation will be in demand in the field of cancer treatment, and, in addition, it can be used in the treatment of a number of neurodegenerative pathologies.

Key words: Gc protein-derived macrophage activating factor (GcMAF); vitamin D₃-binding protein (DBP); phagocytosis; nitrogen monoxide (NO); peritoneal macrophages.

For citation: Levites E.V., Kirikovich S.S., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Ritter G.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. *In vitro* assay of biological activity of a national preparation of macrophage activating factor (GcMAF-RF). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(3):284-291. DOI 10.18699/VJ20.621 (in Russian)

Введение

GcMAF (group-specific component protein-derived macrophage activating factor), важный компонент системы активации макрофагов, образуется в результате сайт-специфического дегликозилирования витамин D₃-связывающего белка (DBP), который присутствует в плазме крови человека в большом количестве (300–600 мг/л) (Malik et al., 2013; Delanghe et al., 2015). Нативный DBP содержит один трисахарид, ковалентно связанный с треонином в позиции 420 и состоящий из *N*-ацетилгалактозамина (GalNAc) с присоединенными к нему галактозой и сиаловой кислотой. Преобразование DBP в GcMAF происходит путем отсоединения от GalNAc галактозы и сиаловой кислоты под действием β-галактозидазы и сиалидазы, локализованных на клеточных мембранах активированных В- и Т-лимфоцитов соответственно (Yamamoto, Homma, 1991; Yamamoto, Kumashiro, 1993). В результате такого селективного дегликозилирования образуется активный белок GcMAF. Считается, что именно GalNAc, входящий в состав активного центра GcMAF, обеспечивает активацию макрофагов (Naraparaju, Yamamoto, 1994; Mohamad et al., 2002; Saburi et al., 2017a, b).

Исследовательский и практический интерес к GcMAF определяется его способностью через активацию макрофагов участвовать в защитных реакциях организма: в защите от патогенов, в элиминации стареющих, опухолевых и поврежденных клеток, а также в процессах заживления. Широка биологических эффектов макрофагов, имеющих в ряде случаев опозитную направленность, обеспечивается высокой функциональной гетерогенностью макрофагов (Gordon, 2003; Cassetta et al., 2011). Наиболее четко выделяются два субтипа макрофагов, которые обозначаются как M1- и M2-клетки с про- и противовоспалительной активностью соответственно.

M1-макрофаги играют важную роль в элиминации опухолевых клеток. Они способны проявлять цитотоксическую, микробицидную и антипролиферативную активности, опосредованные продукцией активных метаболитов кислорода (например, H₂O₂), монооксида азота (NO) и провоспалительных цитокинов. M2-макрофаги, напротив, проявляя противовоспалительную активность, ограни-

чивают воспалительный/иммунный ответ. Повышенная активность M2-макрофагов сопряжена с развитием иммуносупрессии, приводящей к опухолевому росту (Lamagna et al., 2006; Sica, Bronte, 2007; Murray, Wynn, 2011).

Установлено, что функциональный тип макрофагов во многом определяется условиями их активации и инактивации (Korbelik et al., 1998; Mosser, 2003; Saburi et al., 2017a, b). Одним из факторов, препятствующих активации макрофагов, является ингибирование продукции GcMAF, осуществляемое ферментом нагалазой (α-*N*-ацетилгалактозаминидазой), секретлируемым опухолевыми клетками (Korbelik et al., 1998; Rehder et al., 2009; Saburi et al., 2017a, b). Сывороточная нагалаза у больных раком способна полностью дегликозилировать предшественник MAF (DBP), осуществляя гидролиз по GalNAc-остатку. Лишенный активного сайта, полипептид теряет способность активировать инфильтрующие опухоль макрофаги, что в клинических наблюдениях характеризуется как иммуносупрессия, связанная с потерей макрофагами специфических активностей (Yamamoto et al., 1996; Mohamad et al., 2002; Matsuura et al., 2004; Thyer et al., 2013a). У здоровых людей уровень нагалазы в несколько раз ниже, чем у онкологических больных, и нагалаза в отсутствие патологии не дегликозилирует трисахарид DBP (Ioannou et al., 1992; Nagasawa et al., 2005).

В пионерных работах N. Yamamoto (Yamamoto, Homma, 1991; Yamamoto, Kumashiro, 1993; Yamamoto et al., 1996) было сделано предположение, что инъекции очищенного экзогенного GcMAF могут компенсировать дефектный фактор, активировать систему макрофагов и их противоопухольную активность. Проведенные клинические исследования свидетельствовали об эффективном воздействии GcMAF на опухоль, приводящем к значительной редукции опухолевого очага или полному уходу опухоли с продолжительным (несколько лет) безрецидивным периодом (Yamamoto et al., 2008; Rehder et al., 2009; Inui et al., 2013; Thyer et al., 2013a, b).

Со времени опубликования N. Yamamoto своих результатов относительно принадлежности выделенного полипептида к групп-специфическому активатору макрофагов прошло более 15 лет. Исследованием полипептида в на-

правлении поиска мишеней его клинического применения занимались разные лаборатории. Получены многочисленные, противоречивые данные о его функциональных возможностях в качестве активатора иммунных реакций при лечении злокачественных новообразований, аутизма, различных нарушений в работе иммунной системы. Противоречивые результаты, касающиеся эффективности клинических возможностей GcMAF, вызвали немалую долю скептицизма в научном сообществе (Rehder et al., 2009; Ugarte et al., 2014; Borges, Rehder, 2016; Ruggiero et al., 2016). Такое состояние вопроса связано еще и с тем, что препарат невозможно сделать предметом промышленной собственности, а можно только патентовать различные способы его получения и различные композиции, в составе которых он может применяться. Именно по такому пути идут все производители GcMAF (Saisei Mirai, Reno Integrative Medical Center, Immuno Biotech Ltd, Efranat, Catalytic Longevity). Тем не менее о перспективности возможного практического использования препарата GcMAF свидетельствуют многочисленные данные, полученные на экспериментальных животных, а также данные доклинических исследований и накопленный положительный опыт его клинического применения (Korbelik et al., 1997; Kisker et al., 2003; Yamamoto et al., 2008; Toyohara et al., 2011; Pacini et al., 2012; Inui et al., 2013, 2016a, b; Kuchiike et al., 2013; Thyer et al., 2013a, b; Klokol, Teppone, 2016; Saburi et al., 2017a, b; Moya et al., 2018; Păduraru et al., 2019; Greilberger, Herwig, 2020).

Проведенный нами анализ литературных источников продемонстрировал большой интерес к препарату GcMAF в мире, несмотря на имеющиеся различные точки зрения (Останин и др., 2019), и определил направление его исследования в нашей лаборатории. Поскольку практически во всех исследованиях процедура получения и активации препарата переписывается с одной-двух пионерных работ (Link et al., 1986; Yamamoto, Nomma, 1991; Yamamoto, Kumashiro, 1993), что связано с его коммерческой перспективностью и нежеланием раскрывать детали выделения больших количеств активатора, мы решили разработать независимый регламент получения и активации фактора и экспериментально определить его возможную «клиническую мишень».

В настоящей работе, представляющей собой первую статью цикла из трех статей, описывающих действие препарата на экспериментальные биологические системы, оценивается способность полученного оригинальным способом препарата GcMAF-RF (GcMAF-Related Factor) активировать фагоцитарную функцию макрофагов и продуцировать монооксид азота *in vitro*.

Оригинальный способ выделения DBP и процедура его конвертации в GcMAF-RF цитоэнзиматическим способом были разработаны в ООО «Активатор MAF» совместно с лабораторией индуцированных клеточных процессов Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики (ФИЦ ИЦиГ) СО РАН. Способ получения препарата GcMAF-RF, в связи с его статусом «предмета промышленной собственности» компании ООО «Активатор MAF», охарактеризован здесь без указания деталей процедур. Тем не менее общая характеристика способа, представленная в разделе «Результаты», дает достаточно

полную информацию, демонстрирующую оригинальность подхода. По своим молекулярным свойствам полученный полипептид соответствует описанному в литературе белку GcMAF, находящемуся на стадии клинических испытаний в США, Британии, Израиле и Японии (Saisei Mirai, Reno Integrative Medical Center, Immuno Biotech Ltd, Efranat, Catalytic Longevity).

Материалы и методы

В экспериментах использовали по две-три месячных мыши линии СВА разведения вивария № 2 ФИЦ ИЦиГ СО РАН (стандартное содержание). Перитонеальные макрофаги (5×10^5 клеток/лунку) культивировали в 12-луночных планшетах в среде RPMI-1640 (Biolot), содержащей 10 % FBS (HyClone) и 40 мкг/мл гентамицина в течение 12 ч. Затем адгезивную фракцию макрофагов три раза отмывали забуференным физиологическим раствором (PBS) для удаления неприкрепленных клеток. Полученные макрофаги использовали в дальнейшем для анализа их биологической активности.

Фагоцитарную функцию макрофагов оценивали согласно методике, представленной в работе (Ishikawa et al., 2014). Перитонеальные макрофаги выделяли из брюшной полости двух-трех мышей, объединяли, распределяли по лункам планшета в равном количестве и культивировали в бессывороточной среде RPMI-1640 в течение 2 ч. Затем среду меняли на RPMI-1640, содержащую 10 % FBS в отсутствие (контроль) или в присутствии следующих активаторов (позитивный контроль): липополисахарида (LPS, Sigma, 10 мкг/мл, *E. coli* 0114:B4) либо полученных нами DBP (5 мкг/мл) или GcMAF-RF (5 мкг/мл). В каждую лунку добавляли также магнитные шарики (Dynabeads M-280, Invitrogen) в дозе 60 мкг/лунку. После трехчасовой инкубации макрофаги три раза отмывали PBS для удаления неинтернализированных шариков, затем фотографировали в проходящем свете с использованием инвертированного микроскопа AxioObserver Z1 (Zeiss) и подсчитывали количество интернализированных гранул (IBN). Фагоцитарную активность макрофагов оценивали по формуле: $IBN = \frac{\text{количество интернализированных шариков}}{\text{количество макрофагов}}$. Для статистического анализа IBN учитывали данные четырех независимых экспериментов, в каждом эксперименте оценивали 300–500 клеток. Учет клеток был проведен из нескольких полей, расположенных в разных частях лунки планшета.

Продукцию NO определяли в пяти повторностях на семи мышцах по накоплению нитритов после 3 ч инкубирования с активаторами в культуральных супернатантах перитонеальных макрофагов колориметрическим методом с использованием реактива Грисса (Green et al., 1982). Для этого 100 мкл каждого тестируемого супернатанта переносили в 96-луночный планшет, смешивали с равным объемом реактива Грисса и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Оптическую плотность оценивали на многоканальном спектрофотометре при длине волны 540 нм. Результаты соотносили со стандартной калибровочной кривой, полученной на основе серийных разведений 3 мМ раствора нитрита натрия.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica 10. В каждом экс-

перименте было выполнено минимум четыре повторения. Существование статистически значимых различий между исследуемыми группами проанализировано при помощи критерия Краскела–Уоллиса. Для апостериорных сравнений между группами использовали U-критерий Манна–Уитни с учетом поправки Бонферрони (минимальный уровень значимости $p = 0.05/\text{число сравнений}$). Таким образом, в случае анализа IBN различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.017$ (три попарных сравнения), а в случае анализа продукции NO – при $p < 0.013$ (четыре попарных сравнения) (Гржибовский, 2008).

Результаты

Как сказано выше, витамин D₃-связывающий белок содержит три функциональных сайта: витамин D₃-связывающий домен, актин-связывающий сегмент полипептидной цепи и сайт гликозилирования. Соответственно, существуют два очевидных способа аффинного выделения специфического белка, за актин- и витамин D₃-связывающие домены (Haddad et al., 1984; Link et al., 1986; Swamy, Ray, 1995). В исследованиях других авторов описывается практически всегда один и тот же способ получения активатора макрофагов GcMAF. Витамин D₃ модифицируется в производную молекулу, содержащую гидроксил в положении 25, или химическим, или ферментативным способом. Модифицированный витамин «пришивается» к активированной бромцианом сепарозе, и проводится аффинная хроматография. Далее белок активируется в GcMAF ферментативной конвертацией двумя гидролазами – салидазой и β-галактозидазой, ковалентно фиксированными на носителе (Yamamoto, Kumashiro, 1993; Yamamoto, 1996; Mohamad et al., 2002). Функциональная активность полученного GcMAF тестируется по его способности индуцировать у макрофагов способность фагоцитировать разнообразные внеклеточные частицы. Главным образом используются опсонированные эритроциты барана (Hammarstrom, Kabat, 1971; Yamamoto, Kumashiro, 1993). Наши многочисленные попытки выделить, активировать и оценить функциональную активность полученного полипептида способами, описанными в статьях, не увенчались успехом. Основными причинами неудач были: невозможность в достаточном количестве быстро получить составляющие компоненты всех сложных процедур, их высокая цена, постоянное утаивание авторами опубликованных работ принципиальных технических деталей той или иной процедуры.

В этой связи после тотальной проработки принципов получения GcMAF мы разработали следующий регламент выделения большого количества препарата витамин D₃-связывающего белка, его конвертации в GcMAF-RF и оценки его способности активировать фагоцитарную функцию макрофагов и продукцию ими NO.

Витамин D₃-связывающий белок был выделен из сыворотки крови здоровых доноров с использованием аффинной хроматографии на колонке с ковалентно пришитым актином. Данный подход состоял из двух процедур. Во-первых, актин, необходимый в качестве аффинного лиганда, получали самостоятельно из мышц кролика (Spudich, Watt, 1971), благодаря чему удалось быстро наладить аффинную хроматографию и на порядки сократить затраты. Одновременно из крабовых панцирей был выделен субстрат, необходимый для пришивки аффинного лиганда (de Souza et al., 2008). Этот способ также позволил не опираться на импортные дорогие реактивы и существенно ускорил время получения фактора. Для конвертации DBP в GcMAF-RF был разработан оригинальный способ с использованием активированных лизофосфатидилхолином (Lyso-PC, Sigma) воспалительных лимфоцитов, получаемых от того же донора (Ngwenya, Yamamoto, 1986; Yamamoto, Homma, 1991; Asaoka et al., 1992). Суть подхода состоит в том, что на цитоплазматической мембране активированных к воспалению В- и Т-лимфоцитов присутствуют оба необходимых для конвертации DBP в GcMAF ферменты: β-галактозидаза и салидаза соответственно. Полученные от донора лимфоциты после воспалительной активации добавлялись к DBP. После инкубации полученный GcMAF-RF проверялся на способность активировать специфическую фагоцитарную активность макрофагов. Для этого был валидирован способ с использованием металлических

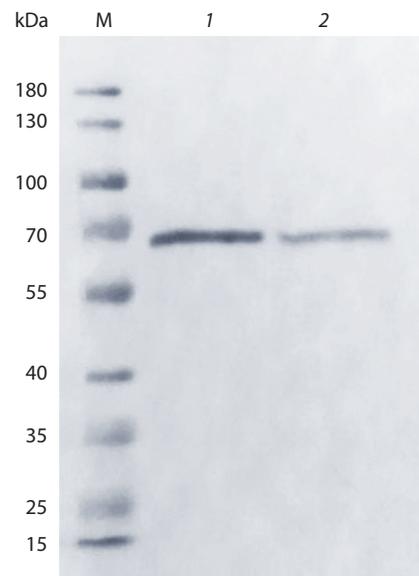


Fig. 1. Western blot analysis of DBP samples obtained by actin and sepharose (with 25-hydroxyvitamin D₃) chromatography.

Lanes: M, molecular marker "The Thermo Scientific™ Page Ruler™ Prestained protein Ladder" (Thermo Fisher Scientific Inc., USA); 1, DBP obtained on a column with 25-hydroxyvitamin D₃-Sepharose; 2, DBP obtained by actin-sepharose affinity chromatography.

бус (Ishikawa et al., 2014). Процедура хорошо стандартизируется, не требует многостадийного получения опсонированных эритроцитов барана и высокотехнологична. Дополнительно для оценки специфичности выделенного GcMAF-RF был разработан оригинальный метод получения лектина, позволяющий оценить эффективность отщепления хвостов сахаров и сохранения в сайте гликозилирования N-ацетилгалактозамина, который является основной молекулой, участвующей в активации макрофагов.

Для проверки соответствия DBP, выделенного с использованием в качестве аффинного лиганда актина, препарату DBP, выделяемому аффинно на 25-гидроксивитамин D₃-сепарозе, и характеристики принадлежности обоих полипептидов к группе специфических Gc-белков был проведен сравнительный вестерн-блот анализ. Прямой сравнительный вестерн-блот анализ образцов препарата с антителами против Gc-группы свидетельствует об идентичности упомянутых двух вариантов белков (рис. 1).

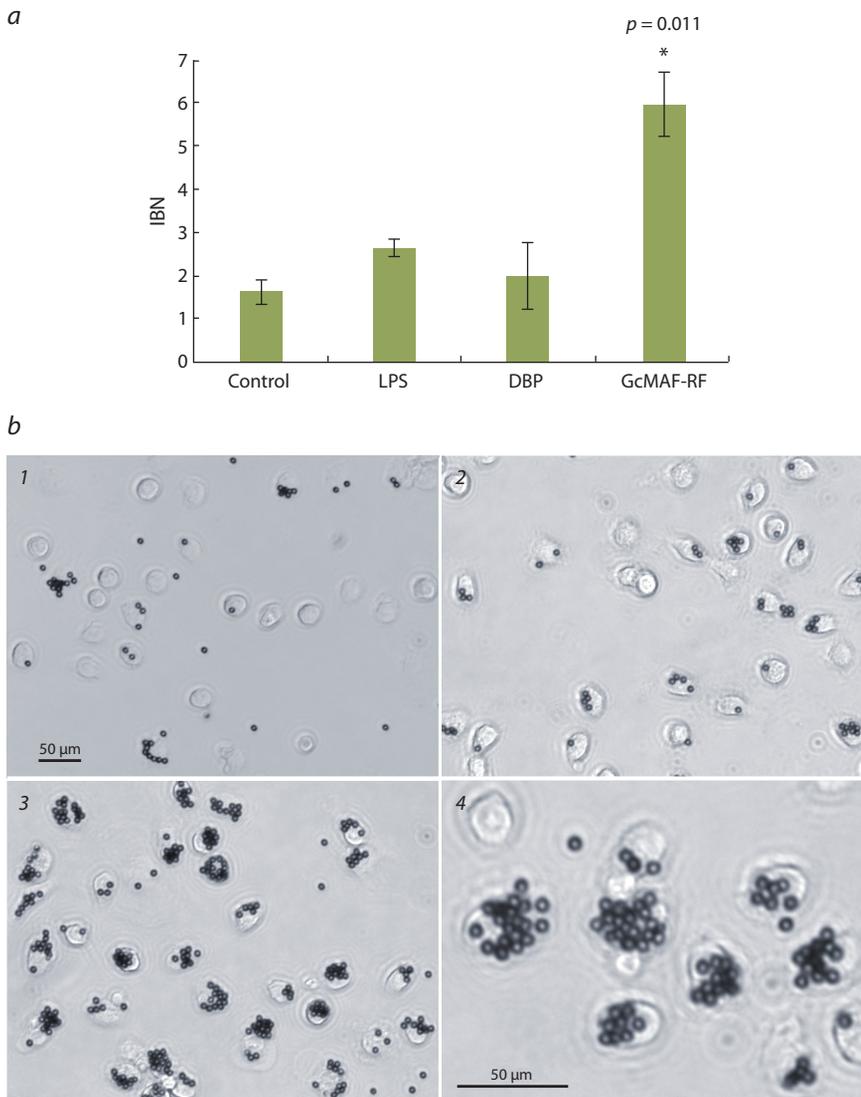


Fig. 2. Effect of GcMAF-RF on the phagocytic activity of peritoneal macrophages.

a, data are presented as $M \pm SEM$ ($n = 4$), * $p < 0.017$ – significance of differences compared with control (Bonferroni-corrected Mann–Whitney U-test); *b*, representative photographs of macrophages with internalized granules: 1, control; 2, after activation by DBP; 3, 4, after activation by GcMAF-RF.

После получения, конвертации и проверки специфической активности, способности активировать фагоцитарную активность макрофагов, препарат GcMAF-RF стерилизовали фильтрованием, а затем или замораживали и хранили при -70°C , или лиофилизировали (см. рис. 1).

Биологическую активность GcMAF-RF оценивали по его влиянию на фагоцитарную функцию перитонеальных макрофагов (Ishikawa et al., 2014) (рис. 2). Было выполнено три апостериорных сравнения экспериментальных групп с контролем с использованием U-критерия Манна–Уитни с учетом поправки Бонферрони. Показано, что по сравнению с контролем только препарат GcMAF-RF статистически значимо усиливает способность макрофагов интернализировать магнитные шарики. В присутствии GcMAF-RF фагоцитарная активность макрофагов увеличивалась в 3.7 раза ($p = 0.011$), тогда как в ответ на DBP или ЛПС – в 1.2 и 1.6 раза соответственно. Репрезентативные фотографии макрофагов (см. рис. 2, б) четко демонстрируют, что при стимуляции препаратом GcMAF-RF (но не его предшественником DBP) в общей популяции перитонеальных макрофагов значительно возрастает число клеток с интернализированными магнитными шариками. В данном тесте оценивали биологиче-

скую активность образцов из каждой полученной партии препарата, при этом различные образцы GcMAF-RF демонстрировали трех-семикратное увеличение фагоцитарной функции макрофагов.

Препарат GcMAF-RF усиливал не только фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов, но также их способность продуцировать NO (рис. 3). Было проведено четыре апостериорных сравнения (экспериментальные группы с контролем и ЛПС и GcMAF-RF между собой) с использованием U-критерия Манна–Уитни с учетом поправки Бонферрони. Оказалось, что GcMAF-RF (но не его предшественник DBP) статистически значимо ($p < 0.013$) повышал уровень продукции монооксида азота, при этом уровень индуцированной NO-продукции был даже выше, чем в ответ на стандартный активатор макрофагов ЛПС ($p = 0.008$).

Все перечисленные процедуры, валидирующие препарат как активатор макрофагов (GcMAF-RF), постоянно проводятся для характеристики каждого нового выделения препарата и доведения до состояния технологии, которая готовится к сертификации.

Обсуждение

В настоящем исследовании проведена оценка биологической активности первого отечественного препарата GcMAF-RF, который был выделен из плазмы крови человека в соответствии с новым технологическим регламентом, разработанным компанией ООО «Активатор МАФ». Прямой сравнительный вестерн-блот анализ образцов препарата с антителами против Gc-группы показал (см. рис. 1), что молекулярная масса белков, выделенных двумя вариантами аффинной хроматографии, соответствует размеру GcMAF в 65–67 кДа, определенному другими авторами в аналогичной трис-глициновой электрофоретической системе (Smith et al., 2013). Полученный результат свидетельствует об идентичности полипептидов, выделяемых с использованием двух имеющихся в молекуле DBP доменов, различающихся по своей функциональной специфичности (актин-связывающий и витамин D_3 -связывающий).

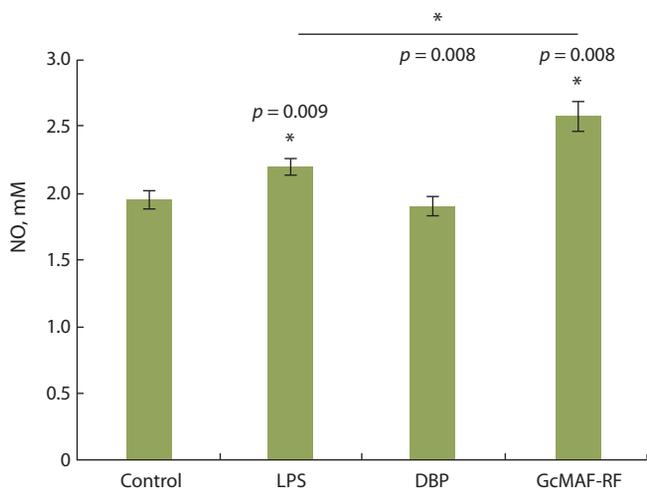


Fig. 3. Effect of the drug GcMAF-RF on the production of NO.

Data are presented as $M \pm SEM$ ($n = 4$). * Differences from the control and between the LPS and GcMAF-RF groups are significant at $p < 0.013$ (Bonferroni-corrected Mann-Whitney U-test).

В витральных тестах образцы GcMAF-RF из каждой полученной партии препарата проявляли свойства, характерные для макрофаг-активирующего фактора, а именно: кратно усиливали фагоцитарную функцию перитонеальных макрофагов мыши (см. рис. 2), а также статистически значимо стимулировали продукцию NO (см. рис. 3).

Выявленные в нашем исследовании факты стимулирующего влияния полученного препарата GcMAF-RF на свойства макрофагов согласуются с данными целого ряда исследователей (Mohamad et al., 2002; Thyer et al., 2013b; Ishikawa et al., 2014; Ruggiero et al., 2014; Saburi et al., 2017a, b). Это позволяет заключить, что препарат GcMAF-RF соответствует известным импортным аналогам не только по своим физико-химическим характеристикам, но и по проявляемой биологической активности.

Следующие два сообщения будут содержать результаты по влиянию препарата GcMAF-RF на культуру дендритных клеток и поляризацию M2-макрофагов. Также будет продемонстрирована способность активированных препаратом GcMAF-RF перитонеальных макрофагов лизировать клетки нескольких опухолевых культур и оценена его противораковая активность в биологических тестах на экспериментальных животных.

Заключение

Представлены первые экспериментальные данные, характеризующие способность препарата GcMAF-RF, полученного оригинальным способом, активировать перитонеальные макрофаги мыши, что проявляется кратным усилением их фагоцитарной функции и значимым повышением уровня продукции монооксида азота. Выделенный активатор макрофагов (GcMAF-RF) по своим характеристикам соответствует аналогичным препаратам, представляемым на рынке зарубежными компаниями, и может рассматриваться как новый отечественный биологически активный фактор разнонаправленного действия.

Список литературы / References

- Гржибовский А.М. Анализ трех и более независимых групп количественных данных. Экология человека. 2008;3:50-58. [Grjibovsky A.M. Analysis of three and more independent groups of quantitative data. *Ekologiya Cheloveka = Human Ecology*. 2008; 3:50-58. (in Russian)]
- Останин А.А., Кирикович С.С., Долгова Е.В., Прокуркина А.С., Черных Е.Р., Богачев С.С. Тернистый путь макрофаг-активирующего фактора (GcMAF): от открытия к клинической практике. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(5):624-631. DOI 10.18699/VJ19.535. [Ostanin A.A., Kirikovich S.S., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Chernykh E.R., Bogachev S.S. A thorny pathway of macrophage activating factor (GcMAF): from bench to bedside. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(5):624-631. DOI 10.18699/VJ19.535. (in Russian)]
- Asaoka Y., Ota M., Yoshida K., Sasaki Y., Nishizuka Y. Role of lysophosphatidylcholine in T-lymphocyte activation: involvement of phospholipase A2 in signal transduction through protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992;89(14):6447-6451. DOI 10.1073/pnas.89.14.6447.
- Borges C.R., Rehder C.R. Glycan structure of Gc protein-derived macrophage activating factor as revealed by mass spectrometry. *Arch. Biochem. Biophys.* 2016;606:167-179. DOI 10.1016/j.abb.2016.08.006.
- Cassetta L., Cassol E., Poli G. Macrophage polarization in health and disease. *Sci. World J.* 2011;11:2391-2402. DOI 10.1100/2011/213962.
- Delanghe J.R., Speeckaert R., Speeckaert M.M. Behind the scenes of vitamin D binding protein: more than vitamin D binding. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015;29(5):773-786. DOI 10.1016/j.beem.2015.06.006.
- de Souza M.G., Grossi A.L., Pereira E.L., da Cruz C.O., Mendes F.M., Cameron L.C., Paiva C.L. Actin immobilization on chitin for purifying myosin II: a laboratory exercise that integrates concepts of molecular cell biology and protein chemistry. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2008;36(1):55-60. DOI 10.1002/bmb.122.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;3(1):23-35. DOI 10.1038/nri978.
- Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 1982;126(1):131-138. DOI 10.1016/0003-2697(82)90118-x.
- Greilberger J., Herwig R. Vitamin D – deglycosylated vitamin D-binding protein dimer: positive synergistic effects on recognition, activation, phagocytosis and oxidative stress on macrophages. *Clin. Lab.* 2020;66(1):169-177. DOI 10.7754/Clin.Lab.2019.191121.
- Haddad J.G., Kowalski M.A., Sanger J.W. Actin affinity chromatography in the purification of human, avian and other mammalian plasma proteins binding vitamin D and its metabolites (Gc globulins). *Biochem. J.* 1984;218(3):805-810. DOI 10.1042/bj2180805.
- Hammarstrom S., Kabat E.A. Studies on specificity and binding properties of the blood group A reactive hemagglutinin from *Helix pomatia*. *Biochemistry.* 1971;10(9):1684-1692. DOI 10.1021/bi00785a028.
- Inui T., Amitani H., Kubo K., Kuchike D., Uto Y., Nishikata T., Mette M. Case report: a non-small cell lung cancer patient treated with GcMAF, sonodynamic therapy and tumor treating fields. *Anticancer Res.* 2016a;36:3767-3770. PMID: 27354652.
- Inui T., Katsuura G., Kubo K., Kuchike D., Chenery L., Uto Y., Nishikata T., Mette M. Case report: GcMAF treatment in a patient with multiple sclerosis. *Anticancer Res.* 2016b;36:3771-3774. PMID: 27354653.
- Inui T., Kuchike D., Kubo K., Mette M., Uto Y., Hori H., Sakamoto N. Clinical experience of integrative cancer immunotherapy with GcMAF. *Anticancer Res.* 2013;33(7):2917-2919. PMID: 23780980.

- Ioannou Y.A., Bishop D.F., Desnick R.J. Overexpression of human alpha-galactosidase A results in its intracellular aggregation, crystallization in lysosomes, and selective secretion. *J. Cell Biol.* 1992; 119:1137-1150. DOI 10.1083/jcb.119.5.1137.
- Ishikawa M., Inoue T., Inui T., Kuchiike D., Kubo K., Uto Y., Nishikata T. A novel assay system for macrophage-activating factor activity using a human U937 cell line. *Anticancer Res.* 2014;34(8): 4577-4581. PMID: 25075102.
- Kisker O., Onizuka S., Becker C.M., Fannon M., Flynn E., D'Amato R., Zetter B., Folkman J., Ray R., Swamy N., Pirie-Shepherd S. Vitamin D binding protein-macrophage activating factor (DBP-*maf*) inhibits angiogenesis and tumor growth in mice. *Neoplasia.* 2003; 5(1):32-40. DOI 10.1016/S1476-5586(03)80015-5.
- Klokol D., Teppone M. Management of metastatic colorectal carcinoma with GcMAF Forte and thymus peptides: a case report. *J. Clin. Cell. Immunol.* 2016;7:4. DOI 10.4172/2155-9899.1000449.
- Korbelik M., Naraparaju V.R., Yamamoto N. Macrophage-directed immunotherapy as adjuvant to photodynamic therapy of cancer. *Br. J. Cancer.* 1997;75(2):202-207. DOI 10.1038/bjc.1997.34.
- Korbelik M., Naraparaju V.R., Yamamoto N. The value of serum α -N-acetylgalactosaminidase measurement for the assessment of tumour response to radio- and photodynamic therapy. *Br. J. Cancer.* 1998; 77:1009-1014. DOI 10.1038/bjc.1998.166.
- Kuchiike D., Uto Y., Mukai H., Ishiyama N., Abe C., Tanaka D., Kawai T., Kubo K., Mette M., Inui T., Endo Y., Hori H. Degalactosylated/desialylated human serum containing GcMAF induces macrophage phagocytic activity and *in vivo* antitumor activity. *Anticancer Res.* 2013;33(7):2881-2885. PMID: 23780974.
- Lamagna C., Aurrand-Lions M., Imhof B.A. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 2006;80(4):705-713. DOI 10.1189/jlb.1105656.
- Link R.P., Perlman K.L., Pierce E.A., Schnoes H.K., DeLuca H.F. Purification of human serum vitamin D-binding protein by 25-hydroxyvitamin D₃-Sepharose chromatography. *Anal. Biochem.* 1986; 157(2):262-269. DOI 10.1016/0003-2697(86)90624-x.
- Malik S., Fu L., Juras D.J., Karmali M., Wong B.Y., Gozdzik A., Cole D.E. Common variants of the vitamin D binding protein gene and adverse health outcomes. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2013;50(1): 1-22. DOI 10.3109/10408363.2012.750262.
- Matsuura T., Uematsu T., Yamaoka M., Furusawa K. Effect of salivary gland adenocarcinoma cell-derived α -N-acetylgalactosaminidase on the bioactivity of macrophage activating factor. *Int. J. Oncol.* 2004; 24(3):521-528. DOI 10.3892/ijo.24.3.521.
- Mohamad S.B., Nagasawa H., Uto Y., Hori H. Preparation of Gc protein-derived macrophage activating factor (GcMAF) and its structural characterization and biological activities. *Anticancer Res.* 2002; 22(6C):4297-4300. PMID: 12553073.
- Mosser D.M. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 2003;73(2):209-212. DOI 10.1189/jlb.0602325.
- Moya R., Chan M.K.S., Klokol D., Pan S.Yi. Active specific immunotherapy (ASI) and GcMAF Forte in management of metastatic invasive carcinoma – overview of the therapeutic modalities and a case report. *J. Clin. Exp. Immunol.* 2018;3(2):1-4.
- Murray P.J., Wynn T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 2011;11:723-737. DOI 10.1038/nri3073.
- Nagasawa H., Uto Y., Sasaki H., Okamura N., Murakami A., Kubo S., Kirk K.L., Hori H. Gc protein (vitamin D-binding protein): Gc genotyping and GcMAF precursor activity. *Anticancer Res.* 2005;25: 3689-3696. PMID: 16302727.
- Naraparaju V.R., Yamamoto N. Roles of β -galactosidase of B lymphocytes and sialidase of T lymphocytes in inflammation-primed activation of macrophages. *Immunol. Lett.* 1994;43(3):143-148. DOI 10.1016/0165-2478(94)90214-3.
- Ngwenya B.Z., Yamamoto N. Effects of inflammation products on immune systems. Lysophosphatidylcholine stimulates macrophages. *Cancer Immunol. Immunother.* 1986;21(3):174-182. DOI 10.1007/bf00199358.
- Pacini S., Punzi T., Morucci G., Gulisano M., Ruggiero M. Effects of vitamin D-binding protein-derived macrophage-activating factor on human breast cancer cells. *Anticancer Res.* 2012;32(1):45-52. PMID: 22213287.
- Păduraru D.N., Bouariu A., Ion D., Andronic O., Dumitrașcu M.C., Bolocan A. Considerations regarding GcMAF treatment in breast cancer. *Rom. Biotechnol. Lett.* 2019;24(5):851-855. DOI 10.25083/rbl/24.5/851.855.
- Rehder D.S., Nelson R.W., Borges C.R. Glycosylation status of vitamin D binding protein in cancer patients. *Protein Sci.* 2009;18(10): 2036-2042. DOI 10.1002/pro.214.
- Ruggiero M., Reinwald H., Pacini S. Is chondroitin sulfate responsible for the biological effect attributed to the GC protein-derived Macrophage Activating Factor (GcMAF)? *Med. Hypotheses.* 2016;94: 126-131. DOI 10.1016/j.mehy.2016.07.012.
- Ruggiero M., Ward E., Smith R., Branca J.J., Noakes D., Morucci G., Taubmann M., Thyer L., Pacini S. Oleic acid, deglycosylated vitamin D-binding protein, nitric oxide: a molecular triad made lethal to cancer. *Anticancer Res.* 2014;34(7):3569-3578. PMID: 24982371.
- Saburi E., Saburi A., Ghanei M. Promising role for Gc-MAF in cancer immunotherapy: from bench to bedside. *Caspian J. Intern. Med.* 2017a;8(4):228-238. DOI 10.22088/cjim.8.4.228.
- Saburi E., Tavakol-Afshari J., Biglari S., Mortazavi Y. Is α -N-acetylgalactosaminidase the key to curing cancer? A mini-review and hypothesis. *JBUON.* 2017b;22(6):1372-1377. PMID: 29332325.
- Sica A., Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J. Clin. Invest.* 2007;117(5):1155-1166. DOI 10.1172/JCI31422.
- Smith R., Thyer L., Ward E., Meacci E., Branca J.J.V., Morucci G., Gulisano M., Ruggiero M., Pacini A., Paternostro F., Mannelli L.D.C., Noakes D.J., Pacini S. Effects of Gc-macrophage activating factor in human neurons; implications for treatment of chronic fatigue syndrome. *Am. J. Immunol.* 2013;9(4):120-129. DOI 10.3844/ajisp.2013.120.129.
- Spudich J.A., Watt S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* 1971;246(15):4866-4871. PMID: 4254541.
- Swamy N., Ray R. 25-Hydroxy[26,27-methyl-³H]vitamin D₃- β -(1,2-epoxypropyl)ether: an affinity labeling reagent for human vitamin D-binding protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995;319(2):504-507. DOI 10.1006/abbi.1995.1323.
- Thyer L., Ward E., Smith R., Branca J.J., Morucci G., Gulisano M., Noakes D., Eslinger R., Pacini S. GC protein-derived macrophage-activating factor decreases α -N-acetylgalactosaminidase levels in advanced cancer patients. *Oncoimmunology.* 2013a;2(8):e25769. DOI 10.4161/onci.25769.
- Thyer L., Ward E., Smith R., Fiore M.G., Magherini S., Branca J.J., Morucci G., Gulisano M., Ruggiero M., Pacini S. A novel role for a major component of the vitamin D axis: vitamin D binding protein-derived macrophage activating factor induces human breast cancer cell apoptosis through stimulation of macrophages. *Nutrients.* 2013b;5(7):2577-2589. DOI 10.3390/nu5072577.
- Toyohara Y., Hashitani S., Kishimoto H., Noguchi K., Yamamoto N., Urade M. Inhibitory effect of vitamin D-binding protein-derived macrophage activating factor on DMBA-induced hamster cheek pouch carcinogenesis and its derived carcinoma cell line. *Oncol. Lett.* 2011;2(4):685-691. DOI 10.3892/ol.2011.306.
- Ugarte A., Bouche G., Meheus L. Inconsistencies and questionable reliability of the publication “Immunotherapy of metastatic colorectal cancer with vitamin D-binding protein-derived macrophages-activating, GcMAF” by Yamamoto et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 2014;63(12):1347-1348. DOI 10.1007/s00262-014-1587-y.

Yamamoto N. Structural definition of a potent macrophage activating factor derived from vitamin D₃-binding protein with adjuvant activity for antibody production. *Mol. Immunol.* 1996;33:1157-1164. PMID: 8360493.

Yamamoto N., Homma S. Vitamin D₃ binding protein (group-specific component) is a precursor for the macrophage-activating signal factor from lysophosphatidylcholine-treated lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991;88(19):8539-8543. DOI 10.1073/pnas.88.19.8539.

Yamamoto N., Kumashiro R. Conversion of vitamin D₃ binding protein (group-specific component) to a macrophage activating factor by the stepwise action of beta-galactosidase of B cells and sialidase of T cells. *J. Immunol.* 1993;151(5):2794-2802. PMID: 8360493.

Yamamoto N., Naraparaju V.R., Asbell S.O. Deglycosylation of serum vitamin D₃-binding protein leads to immunosuppression in cancer patients. *Cancer Res.* 1996;56(12):2827-2831. PMID: 8665521.

Yamamoto N., Suyama H., Yamamoto N. Immunotherapy for prostate cancer with Gc protein-derived macrophage-activating factor, GcMAF. *Transl. Oncol.* 2008;1(2):65-72. DOI 10.1593/tlo.08106.

ORCID ID

E.V. Levites orcid.org/0000-0002-3093-407X
S.S. Kirikovich orcid.org/0000-0002-3426-4501
E.V. Dolgova orcid.org/0000-0002-5543-248X
A.S. Proskurina orcid.org/0000-0002-7650-4331

G.S. Ritter orcid.org/0000-0003-1573-3795
A.A. Ostanin orcid.org/0000-0001-6895-938X
E.R. Chernykh orcid.org/0000-0003-2346-6279
S.S. Bogachev orcid.org/0000-0002-2019-9382

Acknowledgements. The authors are grateful to Head of the Shared Access Center "Cell technologies", Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, for access to the microscope. This work was supported by the companies Activator MAF and BA Pharma and by State Budgeted Project 0324-2019-0042 (registration ID AAAA-A17-117071240065-4).

Conflicts of interests. The co-authors of the paper A.S. Proskurina and S.S. Bogachev are directors of Activator MAF and BA Pharma, respectively.

Received December 10, 2019. Revised March 23, 2020. Accepted April 1, 2020.