

Влияние гуминовых веществ УГЛЯ и биоконпозиций с наночастицами серебра на их основе на баланс аргинина в перитонеальных макрофагах интактных мышей

Трофимова Е.С.^{1,2}, Зыкова М.В.², Данилец М.Г.¹, Лигачева А.А.¹, Шерстобоев Е.Ю.¹, Григорьева И.О.³, Михалёв Д.А.², Цупко А.В.², Логвинова Л.А.², Перминова И.В.³, Белоусов М.В.²

¹ Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины (НИИФиРМ) имени Е.Д. Гольдберга, Томский научный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук Россия, 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

² Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ) Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова Россия, 119991, г. Москва, Ленинские Горы, 1

РЕЗЮМЕ

Введение. Антигенпрезентирующие клетки, особенно макрофаги, играют важную роль в защите организма от различных патогенов, их дисфункции и поляризация связана с большинством воспалительных и аутоиммунных заболеваний. Воспалительный процесс жестко регулируется активацией и(или) ингибированием дифференциально экспрессируемых макрофагами генов. Успешная коррекция воспалительного процесса приводит, во-первых, к устранению воспалительных стимулов и далее ремоделированию и восстановлению тканей и органов. Экспериментально доказано, что биоконпозиции с наночастицами серебра на основе природных гуминовых веществ (ГВ) угля различного генеза, а также исходные матрицы данных ГВ способны активировать про- и противовоспалительные свойства макрофагов.

Цель. Исследование в культуре клеток перитонеальных макрофагов цитотоксических, пирогенных и иммуномодулирующих свойств (баланс аргинина) исходных образцов ГВ и образцов наночастиц серебра, ультрадиспергированных в данных матрицах гуминовых веществ (ГВ-AgNPs), а также их влияния на про- и противовоспалительные свойства антигенпрезентирующих клеток.

Материалы и методы. Использовались культуральные и биохимические методы.

Результаты. Показано, что образцы CHE-K, CHE-AgNPs, CHS-K, CHP-K за счет усиления активности НО-синтазы и ингибиции аргиназы способствуют поляризации перитонеальных макрофагов по классическому типу (M1). Образцы CHI-K, CHI-AgNPs, CHP-AgNPs и CHS-AgNPs модулируют альтернативный M2 или M2-подобный тип (M2-like state) активации макрофагов. При этом ГВ не цитотоксичны в эффективных концентрациях, а также три из четырех исследуемых образцов не содержат пирогенных примесей.

Заключение. Применение ГВ и серебросодержащих бионаноконпозиций на основе ГВ, обладающих способностью широко влиять на поляризацию антигенпрезентирующих клеток, является перспективным направлением исследований коррекции воспалительной реакции и, в частности, для решения острой социальной и медицинской проблемы – лечения хронических ран.

Ключевые слова: гуминовые вещества угля, наночастицы серебра, поляризация макрофагов, баланс аргинина.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-65-47052).

Соответствие принципам этики. Эксперименты с использованием лабораторных животных выполнялись с соблюдением принципов гуманности, изложенными в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Исследование одобрено биоэтическим комитетом НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга (протокол № 171052020 от 18.05.2020).

Для цитирования:

Для цитирования: Трофимова Е.С., Зыкова М.В., Данилец М.Г., Лигачева А.А., Шерстобоев Е.Ю., Григорьева И.О., Михалёв Д.А., Цупко А.В., Логвинова Л.А., Перминова И.В., Белоусов М.В. Влияние гуминовых веществ УГЛЯ и биокмпозиций с наночастицами серебра на их основе на баланс аргинина в перитонеальных макрофагах интактных мышей. *Бюллетень сибирской медицины*. 2021; 20 (4): 71–78. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-4-71-78>.

The effect of coal-derived humic substances and their silver-containing bionanocomposites on arginine balance in peritoneal macrophages of intact mice

Trofimova E.S.^{1,2}, Zykova M.V.², Danilets M.G.¹, Ligacheva A.A.¹, Sherstoboev E.Yu.¹, Grigorieva I.O.³, Mikhalev D.A.², Tsupko A.V.², Logvinova L.A.², Perminova I.V.³, Belousov M.V.²

¹ Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center (NRMС)

3, Lenina Av., Tomsk, 634028, Russian Federation

² Siberian State Medical University (SSMU)

2, Moscow Tract, Tomsk, 634050, Russian Federation

³ Lomonosov Moscow State University

1, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation

ABSTRACT

Background. Antigen-presenting cells (APCs), especially macrophages, play an important role in the body defense against various pathogens. Their dysfunction and polarization are associated with most inflammatory and autoimmune diseases. The inflammatory process is regulated by activation and / or inhibition of genes differentially expressed by macrophages. Successful correction of inflammation leads firstly to elimination of inflammatory stimuli and then to remodeling and restoration of tissues and organs. It was experimentally confirmed that silver-containing bionanocomposites based on natural humic substances (HS) obtained from coal of different origin, as well as initial matrices of these HS, are capable of activating pro- and anti-inflammatory properties of macrophages.

Aim. To study cytotoxic, pyrogenic, and immunomodulatory properties (arginine balance) of initial HS samples and samples of silver nanoparticles ultradispersed in these HS matrices (HS-AgNPs) in the cell culture of peritoneal macrophages, as well as their effect on pro- and anti-inflammatory properties of APCs.

Materials and methods. Cultural and biochemical methods were used in the study.

Results. The study showed that the samples CHE-K, CHE-AgNPs, CHS-K, and CHP-K increased M1 macrophage polarization due to stimulation of the NO-synthase activity and inhibition of arginase. The samples CHI-K, CHI-AgNPs, CHP-AgNPs, and CHS-AgNPs modulated an alternative M2 or M2-like state of macrophage activation. At the same time, HS are not cytotoxic at effective concentrations, and three out of four studied samples did not contain pyrogenic impurities.

Conclusion. The use of HS and their silver-containing bionanocomposites, which have the ability to greatly affect the polarization of antigen-presenting cells, is a promising research area in correction of the inflammatory response for solving an important social and medical problem of treating chronic wounds.

Keywords: coal-derived humic substances, silver nanoparticles, macrophage polarization, arginine balance.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

Source of financing. This work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (Grant No. 20-65-47052).

Conformity with the principles of ethics. Experiments using laboratory animals were carried out in accordance with the principles of humanity set out in the directives of the European Community (86/609/EEC) and the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Bioethics Committee at Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (Protocol No. 171052020 of 18.05.2020).

For citation: Trofimova E.S., Zykova M.V., Danilets M.G., Ligacheva A.A., Sherstoboev E.Yu., Grigorieva I.O., Mikhalev D.A., Tsupko A.V., Logvinova L.A., Perminova I.V., Belousov M.V. The effect of coal-derived humic substances and their silver-containing bionanocomposites on arginine balance in peritoneal macrophages of intact mice. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2021; 20 (4): 71–78. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-4-71-78>.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что антигенпрезентирующие клетки (АПК), особенно макрофаги (МФ), играют важную роль в инициации воспалительного процесса и патогенеза хронических (болезнь Крона, язвенный колит, астма, аллергии, атопический дерматит, пародонтоз), аутоиммунных (ревматоидный артрит, рассеянный склероз, сахарный диабет, сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенеративные расстройства) и онкологических заболеваний [1]. Макрофаги являются первой линией защиты и в зависимости от природы антигена (бактерии, вирусы) либо изменения микросреды (ишемия, некроз и апоптоз клеток), они активируются и принимают различные типы фенотипической и функциональной поляризации [2].

Тип поляризации МФ определяет развитие специфического иммунного ответа и активацию Th1, Th2, Th17 и Treg-клеток, которые далее отвечают за протекание патологического процесса и воспалительной реакции, системный метаболизм, гематопоз, васкулогенез, гомеостаз тканей [3, 4]. Макрофаги в основном существуют в двух фенотипах – M1 и M2. M1 (классически активированные или провоспалительные) посредством экспрессии факторов транскрипции, в основном ядерного фактора-κB (NF-κB), продуцируют провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухоли α (TNFα), интерлейкин (IL) 1β, IL-6, IL-12 и IL-23. M2 (альтернативно активированные, противовоспалительные), которые являются иммунорегуляторными, продуцируют противовоспалительные цитокины IL-10 и трансформирующий фактор роста β (TGFβ) [1, 5–8].

Функции классически активированных M1 традиционно ассоциируются с фагоцитозом микроорганизмов, микробицидной активностью, индукцией воспаления и противоопухолевой активностью. M2 подавляют воспаление и способствуют восстановле-

нию и ремоделированию тканей, гомеостазу и васкулогенезу. Баланс M1/M2 определяет судьбу органа в условиях воспаления или травмы. При этом МФ очень пластичны, и один фенотип может реполяризоваться в другой фенотип [3]. При инфекции (воспалении) резидентные в ткани МФ сначала проявляют фенотип M1, однако, длительное развитие этой фазы вызывает хроническое воспаление, повреждение тканей и потерю функций органов. В этих условиях крайне необходимо подавление воспаления и активация M2 [6, 9]. Таким образом, управление и модуляция функций макрофагов, их поляризация и взаимосвязь между про- и противовоспалительным ответом определяют исход воспаления, необходимы для контроля воспаления и восстановления функций органов [10].

В настоящее время уже доступны эффективные противовоспалительные препараты, и целый ряд средств различного происхождения находится в стадии разработки. Изучение биоконпозиций на основе гуминовых веществ (ГВ) и их биоконпозиций с наночастицами серебра, обладающих антимикробными, противовоспалительными и ранозаживляющими свойствами для лечения гнойных долго незаживающих хронических ран, является инновационным, и в мировой литературе не описаны. Неизвестно, прежде всего, влияние этих веществ на механизмы протекания противовоспалительной реакции и формирование иммунного ответа. Актуальность подобного рода исследований не вызывает сомнений, поскольку отсутствие эффективных приемов в лечении хронических долго незаживающих ран приводит к инфицированию, и на фоне существующей проблемы антибиотикорезистентности – к сепсису и летальному исходу. Поэтому потенциально эффективные и безопасные вещества, обладающие антимикробными и ранозаживляющими свойствами, должны быть тщательным образом изучены и при

условии подтверждения терапевтической эффективности внедрены в медицинскую практику.

Цель – исследование в культуре клеток перитонеальных макрофагов цитотоксических, пирогенных и иммуномодулирующих свойств (баланс аргинина) исходных образцов гуминовых веществ (ГВ) и образцов наночастиц серебра, ультрадиспергированных в данных матрицах гуминовых веществ (ГВ-AgNPs), а также их влияния на про- и противовоспалительные свойства антигенпрезентирующих клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тест-системы. В экспериментах использовали конвенциональных мышей линии C57BL/6 (всего 80 особей) обоего пола в возрасте 8–10 нед, полученных из отдела экспериментальных биомоделей структурного подразделения Томского НИМЦ НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга.

Исследуемые вещества – гуминовые вещества и биоконпозиции на их основе с наночастицами серебра (ГВ-AgNPs), синтезированные в лаборатории природных гуминовых систем химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Растворяли непосредственно перед использованием в культуральной среде. Синтез биоматериалов ГВ-AgNPs проводили путем восстановления ионов серебра в растворах ГВ (в концентрации 15 г/л) с использованием раствора AgNO_3 до создания конечной концентрации наночастиц серебра 20 ммоль/л. Характеристика объектов исследования представлена в табл. 1.

Таблица 1

Экспериментальные образцы гуминовых веществ угля и серебросодержащих бионаноматериалов на их основе		
Названия коммерческих образцов ГВ угля	Шифр образца	
	ГВ (базовая матрица)	ГВ с наночастицами Ag (ГВ-AgNPs)
Powhumus (Гуминтех, Германия)	СНР-К	СНР-AgNPs
Сахалинские гуматы, Россия	СНС-К	СНС-AgNPs
Иркутские гуматы, Россия	СНИ-К	СНИ-AgNPs
ООО НПФ «Генезис», Россия	СНЕ-К	СНЕ-AgNPs

Получение клеток. Из полученной промыванием брюшной полости мышей ледяным раствором хлорида натрия клеточной взвеси выделяли зрелые перитонеальные МФ с помощью набора для селекции клеток EasySep™ Biotin Positive Selection Kit и антител, специфических к макрофагальным рецепторам, Anti-Mouse F4/80 Antibody (Stem Cell, США).

Условия культивирования. МФ ($2,5\text{--}3 \times 10^6$) культивировали 48 ч (37°C , 5% CO_2 , 100% влажность) в

полной культуральной среде (RPMI 1640 (Sigma, США) с добавлением 10 % ЭТС (Hyclone, Великобритания), 20 mM HEPES (Sigma, США), 0,05 mM 2-меркаптоэтанола (Sigma, США), 50 мкг/мл гентамицина (Sigma, США) и 2 mM L-глутамина (Sigma, США)) в 96-луночных планшетах в присутствии различных концентраций изучаемых образцов или ЛПС 0,1 мкг/мл (Sigma, США).

Изучение баланса аргинина и цитотоксичности. Согласно приложенным протоколам определяли в супернатанте содержание нитритов по продукции оксида азота (NO), смешивая в эквивалентных объемах надосадов с реактивом Грисса (Sigma-Aldrich, США), в клеточном лизате измеряли активность аргиназы по концентрации мочевины с помощью тест-системы «Мочевина-450» (Erba Lachema, Чехия). Также в лизате МФ оценивали пролиферацию клеток, для чего за 4 ч до окончания культивирования в лунки вносили 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT, Sigma, США) в конечной концентрации 200 мкг/мл, осадок растворяли диметилсульфоксидом (Sigma, США). Абсорбцию растворов (ед. опт. плотн.) измеряли на анализаторе иммуноферментных реакций УНИ-ПЛАН ПИКОН (АИФР-01, ЗАО «Пикон», Россия) при длине волны 540 нм. Концентрацию нитритов (мкМ) рассчитывали по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных растворов нитрита натрия. За 1 единицу активности (Е.А.) аргиназы принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкМ мочевины в мин.

Определение пирогенности. Для определения примеси липополисахарида (ЛПС) – эндотоксина – ГВ обрабатывали в течение 1 ч антибиотиком полимиксином Б (50 мкг/мл), затем добавляли клетки и инкубировали, как описано выше.

Статистическую обработку проводили с помощью программного обеспечения Statistica 13.3, используя однофакторный дисперсионный анализ и критерий Даннета и Стьюдента, предварительно проведя проверку на нормальность с помощью критерия Шапиро – Уилка (распределение данных соответствует нормальному), где $\bar{M}$ – выборочное среднее; m – ошибка среднего; уровень статистической значимости различий $p < 0,05$; объем выборки $n \geq 5$ в зависимости от метода исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что вещества гуминовой природы представляют собой темноокрашенные азотсодержащие органические соединения, интенсивность окраски которых прямо пропорционально зависит

от концентрации образца [11]. Исходя из этого, была предварительно проведена оценка влияния нативной темной окраски образцов ГВ на спектрофотометрические показатели водных растворов. Показано, что все образцы ГВ в концентрации 1 мкг/мл не влияли на спектрофотометрические показатели супернатантов МФ даже без добавления реактива Грисса (табл. 2). При увеличении концентрации до 10 мкг/мл только у образца CHS оптическая плотность превышала контрольные значения в 2,6 раза, но в концентрации 100 мкг/мл все образцы были темнее в 2–15 раз контроля.

Выявлено, что при одинаковой концентрации исследуемых веществ оптическая плотность образца CHS-AgNPs была ниже исходной матрицы ГВ, у образцов CHP-AgNPs и CHI-AgNPs, наоборот, выше. Далее при изучении пролиферации клеток показано, что все исследуемые базовые образцы ГВ не обладают токсическим действием ни в одной из использованных концентраций (табл. 3). Культивирование МФ с образцами CHP-AgNPs, CHS-AgNPs, CHE-AgNPs и CHP-AgNPs, начиная с концентрации 10 мкг/мл, приводило к ингибированию пролиферации клеток в 2–3 раза.

Таблица 2

Влияние гуминовых веществ угля и серебросодержащих бионаноматериалов на их основе на оптическую плотность супернатантов макрофагов (без реактива Грисса), ед. опт. плотн. $\times 10^{-3}$, $M \pm m$				
Исследуемое вещество	Контроль (МФ + среда)	МФ+ГВ, мкг/мл		
		1	10	100
CHP-K	119 $\pm$ 3	130 $\pm$ 4	135 $\pm$ 3	260 $\pm$ 8*♦
CHP-AgNPs		121 $\pm$ 3	128 $\pm$ 3	372 $\pm$ 3*♦■
CHS-K		132 $\pm$ 1	307 $\pm$ 6*●	1777 $\pm$ 9*♦
CHS-AgNPs		130 $\pm$ 3	132 $\pm$ 4■	336 $\pm$ 3*♦■
CHI-K	127 $\pm$ 4	127 $\pm$ 2	135 $\pm$ 2	222 $\pm$ 2*♦
CHI-AgNPs		125 $\pm$ 1	133 $\pm$ 3	321 $\pm$ 5*♦■
CHE-K		139 $\pm$ 5	137 $\pm$ 1*	266 $\pm$ 4*♦
CHE-AgNPs		134 $\pm$ 2	137 $\pm$ 2	251 $\pm$ 2*♦

* различия показателя с контролем.

Примечание. ● – различия между концентрациями 1 и 10 мкг/мл, ♦ – различия между концентрациями 10 и 100 мкг/мл, ■ – различия образцов ГВ-AgNPs с базовыми матрицами ГВ в одинаковой концентрации; уровень статистической значимости различий $p < 0,05$, $n = 6$.

Таблица 3

Влияние различных концентраций гуминовых веществ угля и серебросодержащих бионаноматериалов на их основе на пролиферацию перитонеальных макрофагов интактных мышей линии C57BL/6, мкг/мл, $M \pm m$					
Исследуемое вещество	Контроль 1 (МФ + среда)	Контроль 2 (МФ + ЛПС)	МФ + ГВ		
			1	10	100
CHP-K	460 $\pm$ 9	425 $\pm$ 3	500 $\pm$ 8●	467 $\pm$ 8	512 $\pm$ 10●
CHP-AgNPs			494 $\pm$ 11	154 $\pm$ 6*●■	169 $\pm$ 6*●■
CHS-K	510 $\pm$ 4	451 $\pm$ 3	541 $\pm$ 11●	594 $\pm$ 9●	536 $\pm$ 8●
CHS-AgNPs			496 $\pm$ 9	169 $\pm$ 7*●■	164 $\pm$ 7*●■
CHI-K	282 $\pm$ 12	279 $\pm$ 7	291 $\pm$ 9●	308 $\pm$ 6●	340 $\pm$ 17*●
CHI-AgNPs			298 $\pm$ 13	197 $\pm$ 2*●■	208 $\pm$ 11*●■
CHE-K			264 $\pm$ 8●	260 $\pm$ 5	556 $\pm$ 10*●
CHE-AgNPs			294 $\pm$ 9	255 $\pm$ 2	273 $\pm$ 10■

* различия показателя с контролем 1.

Примечание. ● – различия показателя с контролем 2, ■ – различия образцов ГВ-AgNPs с базовыми матрицами ГВ в одинаковой концентрации; уровень статистической значимости различий $p < 0,05$. Концентрация ЛПС 0,1 мкг/мл, $n = 6$.

Таким образом, в дальнейшей работе во избежание ложноположительных результатов и выраженных токсических эффектов при оценке активирующих свойств изучаемых веществ использовали концентрации 1 и 10 мкг/мл, а для образца CHS только – 1 мкг/мл.

Изучение NO-активирующих свойств исходных матриц ГВ показало, что культивирование МФ с образцами CHP-K и CHE-K приводило к увеличению концентрации нитритов по сравнению с интактным контролем в 1,2 (CHP-K) и 17 (CHE-K) раз в концен-

трации 1 мкг/мл, и в 13 раз – в концентрации 10 мкг/мл (табл. 4). Базовые матрицы образцов CHS-K и CHI-K, а также ни один из образцов AgNPs, не влия-

ли на секреторные свойства МФ. NO-активирующий эффект всех веществ был значительно ниже митоген-стимулированного контроля.

Таблица 4

Влияние различных концентраций гуминовых веществ угля и серебросодержащих бионаноматериалов на их основе на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами интактных мышей линии C57BL/6, мкг/мл, $M \pm m$				
Исследуемое вещество	Концентрация	ГВ	Контроль 1 (МФ + среда)	Контроль 2 (МФ + ЛПС)
CHP-K	1	$3,30 \pm 0,13^{*}\bullet$	$2,66 \pm 0,14$	$69,70 \pm 0,18^{*}$
	10	$34,63 \pm 0,43^{*}\bullet$		
CHP-AgNPs	1	$2,77 \pm 0,11\bullet\blacksquare$		
	10	$2,59 \pm 0,07\bullet\blacksquare$		
CHS-K	1	$2,93 \pm 0,06\bullet$	$2,51 \pm 0,15$	$65,93 \pm 0,37^{*}$
CHS-AgNPs	1	$2,77 \pm 0,11\bullet$		
CHI-K	1	$2,41 \pm 0,06\bullet$		
	10	$2,58 \pm 0,13\bullet$		
CHI-AgNPs	1	$2,81 \pm 0,16\bullet$	$2,44 \pm 0,17$	$37,89 \pm 0,71^{*}$
	10	$2,87 \pm 0,10\bullet$		
CHE-K	1	$41,61 \pm 0,28^{*}$		
	10	$33,91 \pm 0,71^{*}$		
CHE-AgNPs	1	$2,53 \pm 0,07\bullet\blacksquare$		
	10	$2,41 \pm 0,07\bullet\blacksquare$		

* различия показателя с контролем 1.

Примечание. $\bullet$ – различия показателя с контролем 2, $\blacksquare$ – различия образцов ГВ-AgNPs с базовыми матрицами ГВ в одинаковой концентрации; уровень статистической значимости различий $p < 0,05$. Концентрация ЛПС 0,1 мкг/мл, $n = 6$.

Известно, что в активированных МФ резко повышается потребление L-аргинина. Молекулярными маркерами M1 являются NO-синтаза (iNOS), CD16, CD32, CD40, CD80, CD86 и, наоборот, M2 характеризуются активацией ферментов аргиназы-1 (Arg-1) и транслутаминазы 2, маркеров поверхности макрофагов CD36, рецептора трансферрина CD71, CD163, маннозы (MMR или CD206), CCL-22, Е-кадгерина [1, 3, 7]. Классически активированные МФ с помощью iNOS преобразуют аргинин в оксид азота и цитруллин; альтернативно активированные посредством аргиназы – в мочевины и орнитин. Изучение влияния исследуемых веществ на баланс аргинина в перито-

неальных МФ показало, что увеличение продукции нитритов при культивировании МФ с образцами CHE-K (в 29 раз) и CHE-AgNPs (в 1,5 раза) сопровождалось снижением активности аргиназы в лизатах клеток по сравнению с интактным контролем в 1,2 и 4 раза соответственно (табл. 5).

Образец CHP-K на фоне 13-кратного роста концентрации нитритов не влиял на активность аргиназы, а образцы CHS-K, CHS-AgNPs и CHP-AgNPs, не проявляя NO-активирующих свойств, значительно усиливали ферментацию мочевины относительно контроля 1. Образцы CHI-K и CHI-AgNPs не влияли на изучаемые показатели.

Таблица 5

Влияние различных концентраций гуминовых веществ угля и серебросодержащих бионаноматериалов на их основе на активность NO-синтазы (продукция нитритов) и аргиназы (ферментация мочевины) в перитонеальных макрофагах интактных мышей линии C57BL/6, $M \pm m$			
Исследуемое вещество	Концентрация, мкг/мл	Концентрация нитритов, мкМ	Ферментация мочевины, ЕА
Контроль 1 (МФ + среда)	–	$2,20 \pm 0,22$	$53,64 \pm 0,40$
Контроль 2 (МФ + ЛПС)	0,1	$64,56 \pm 0,67^{*}$	$42,47 \pm 0,46^{*}$
CHP-K	10	$28,74 \pm 0,72^{*}\bullet$	$52,85 \pm 0,35\bullet$
CHP-AgNPs	10	$2,49 \pm 0,03\bullet\blacksquare$	$5,29 \pm 0,82^{*}\bullet\blacksquare$
CHS-K	1	$2,88 \pm 0,19^{*}\bullet$	$33,81 \pm 0,46^{*}\bullet$
CHS-AgNPs	1	$2,52 \pm 0,05\bullet$	$20,71 \pm 0,56^{*}\bullet\blacksquare$
CHI-K	10	$2,51 \pm 0,07\bullet$	$60,16 \pm 0,45\bullet$
CHI-AgNPs	10	$2,42 \pm 0,04\bullet$	$56,81 \pm 0,74\bullet$
CHE-K	10	$63,48 \pm 0,30^{*}$	$43,13 \pm 0,35^{*}$
CHE-AgNPs	10	$3,26 \pm 0,11^{*}\bullet\blacksquare$	$12,91 \pm 0,51^{*}\bullet\blacksquare$

* различия показателя с контролем 1.

Примечание. $\bullet$ – различия показателя с контролем 2, $\blacksquare$ – различия образцов ГВ-AgNPs с базовыми матрицами ГВ в одинаковой концентрации; уровень статистической значимости различий $p < 0,05$; $n = 5$ (нитриты) и $n = 10$ (аргиназа).

В литературе описано, что экстракты растительного происхождения, могут содержать примесь эндотоксина, который также вызывает усиление продукции оксида азота [12]. Для того чтобы оценить степень очистки изучаемых веществ от ЛПС, были проведены эксперименты с использованием полимиксина В, который связывается непосредственно с эндотоксином и, таким образом, блокирует его стимулирующее действие. Как видно из табл. 6, антибиотик не влиял на NO-стимулирующие

свойства образцов CHS-K и CHS-AgNPs, CHI-K и CHI-AgNPs, CHE-K и CHE-AgNPs. При культивировании образцов CHP-K и CHP-AgNPs с антибиотиком, концентрация нитритов снижалась в 1,3–1,7 раза.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии примеси эндотоксина и пирогенных свойств в образцах CHS-K и CHS-AgNPs, CHI-K и CHI-AgNPs, CHE-K и CHE-AgNPs и присутствии в образцах CHP-K и CHP-AgNPs.

Таблица 6

Влияние полимиксина В на NO-продуцирующие свойства гуминовых веществ угля и серебросодержащих бионаноматериалов на их основе в перитонеальных макрофагах интактных мышей линии C57BL/6, $M \pm m$							
Исследуемое вещество, мкг/мл		Контроль 1 (МФ + среда)		Контроль 2 (МФ + ЛПС)		МФ + ГВ	
		полимиксин В		полимиксин В		полимиксин В	
		нет	есть	нет	есть	нет	есть
CHP-K	10	$2,34 \pm 0,03$	$2,36 \pm 0,11$	$32,31 \pm 0,41^*$	$3,56 \pm 0,11 \blacktriangle \blacksquare$	$25,43 \pm 0,02^{\bullet}$	$14,93 \pm 0,16 \blacktriangle \blacksquare \blacklozenge$
CHP-AgNPs	10					$2,64 \pm 0,08^{\bullet}$	$1,91 \pm 0,05 \blacktriangle \blacksquare \blacklozenge$
CHS-K	1					$3,63 \pm 0,15^{\bullet}$	$4,08 \pm 0,09 \blacksquare$
CHS-AgNPs	1					$2,34 \pm 0,08^{\bullet}$	$2,71 \pm 0,06 \blacklozenge$
CHI-K	10	$2,48 \pm 0,07$	$2,16 \pm 0,13$	$36,63 \pm 0,62^*$	$2,72 \pm 0,1 \blacktriangle \blacksquare$	$2,78 \pm 0,15^{\bullet}$	$2,53 \pm 0,10$
CHI-AgNPs	10					$2,76 \pm 0,07^{\bullet}$	$2,40 \pm 0,08$
CHE-K	10					$45,30 \pm 0,51^{\bullet}$	$41,02 \pm 0,54 \blacksquare \blacklozenge$
CHE-AgNPs	10					$2,66 \pm 0,06^{\bullet}$	$2,29 \pm 0,06$

* различия показателя с контролем 1 без полимиксина. Примечание. $\blacktriangle$ – различия показателя с инкубацией каждого вещества без полимиксина, $\bullet$ – различия показателя с контролем 2 без полимиксина, $\blacksquare$ – различия показателя с контролем 1 с полимиксином, $\blacklozenge$ – различия показателя с контролем 2 с полимиксином; уровень статистической значимости различий $p < 0,05$. Концентрация полимиксина В – 50 мкг/мл, ЛПС – 0,1 мкг/мл, $n = 5$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что образцы CHE-K, CHE-AgNPs и CHS-K способствуют поляризации антигенпрезентирующих клеток по классическому типу (M1) за счет усиления активности NO-синтазы и ингибиции аргиназы. Базовую матрицу CHP-K, значительно усиливающую NO-стимулирующие свойства клеток на фоне стабильного состояния аргиназы, также можно отнести к данному типу веществ. Функции провоспалительных макрофагов M1 ассоциируются с фагоцитозом микроорганизмов, микробицидной активностью, индукцией воспаления и адаптивного иммунного ответа, противоопухолевой активностью и сопровождаются секрецией Th1-цитокинов.

Образцы CHI-K и CHI-AgNPs не влияли на активность NO-синтазы и аргиназы перитонеальных МФ, что позволяет рассматривать данные вещества как активаторы альтернативных, противовоспалительных свойств макрофагов M2. Последние направлены на образование межклеточного матрикса, репарацию и ремоделирование тканей, подавление воспаления, стимуляцию сосудообразования, фагоцитоз апоптотических клеток, синтез противовоспалительных

цитокинов (IL-10, TGF β , IL-4, IL-1ra). Образцы CHP-AgNPs и CHS-AgNPs, ингибирующие активность аргиназы, но не влияющие на продукцию нитритов, можно отнести к M2-подобному типу (M2-like state) поляризации, обладающему некоторыми, но не всеми характерными особенностями клеток M2 [3]. При этом ГВ не цитотоксичны в эффективных концентрациях, а также три из четырех исследуемых образцов не содержат пирогенных примесей.

Таким образом, макрофаги на каждом этапе заживления раны претерпевают различные динамические изменения. Во-первых, M1 опосредуют повреждение тканей и инициируют воспалительные реакции. Во-вторых, на ранних стадиях репарации инфильтрирующие МФ проявляют фенотип M2 для подавления острого воспаления, и далее уже их истощение ингибирует образование чрезмерно васкуляризованной и рубцовой ткани. Применение серебросодержащих бионаноконпозиций на основе ГВ, обладающих способностью широко влиять на поляризацию антигенпрезентирующих клеток, является перспективным направлением исследований для решения острой социальной и медицинской проблемы – лечения хронических ран.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H., Taghadosi M., Esmaceli S.A., Mardani F., Seifi B., Mohammadi A., Afshari J.T., Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* 2018; 233 (9): 6425–6440. DOI: 10.1002/jcp.26429.
2. Nathan C., Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell.* 2010; 140 (6): 871–882. DOI: 10.1016/j.cell.2010.02.029.
3. Mantovani A., Biswas S. K., Galdiero M.R., Sica A., Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling. *J. Pathol.* 2013; 229: 176–185. DOI: 10.1002/path.4133.
4. Patel U., Rajasingh S., Samanta S., Cao T., Dawn B., Rajasingh J. Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation. *Drug Discov. Today.* 2017; 22 (1): 186–193. DOI: 10.1016/j.drudis.2016.08.006.
5. Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004; 25: 677–686. DOI: 10.1016/j.it.2004.09.015.
6. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell.* 2010; 140 (6): 771–776. DOI: 10.1016/j.cell.2010.03.006.
7. Tugal D., Liao X., Jain M.K. Transcriptional control of macrophage polarization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2013; 33: 1135–1144. DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.301453.
8. Pandolfi F., Altamura S., Frosali S., Conti P. Key role of DAMP in inflammation, cancer, and tissue repair. *Clin. Ther.* 2016; 38 (5): 1017–1028. DOI: 10.1016/j.clinthera.2016.02.0280149-2918/\$.
9. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature.* 2002; 420 (6917): 846–852. DOI: 10.1038/nature01320.
10. Mohammadi A., Sharifi A., Pourpaknia R., Moghaddam S., Sahebkar A. Manipulating macrophage polarization and function using classical HDAC inhibitors: Implications for autoimmunity and inflammation. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2018; 128: 1–18. DOI: 10.1016/j.critrev-onc.2018.05.009.
11. Trofimova E.S., Zykhova M.V., Ligacheva A.A., Sherstoboev E.Yu., Zhdanov V.V., Belousov M.V., Yusubov M. S., Krivoshechekov S.V., Danilets M.G., Dygai A.M. Effects of humic acids isolated from peat of various origin on *in vitro* production of nitric oxide: a screening study. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine, First Online:* 2016; 161 (5): 687–692. DOI: 10.1007/s10517-016-3486-z.
12. Schepetkin I.A., Xie G., Kirpotina L.N., Jutila M.A., Quinn M.T., Klein R.A. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Opuntia polyacantha*. *International Immunopharmacology.* 2008; 8 (10): 1455–1466. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.10.005.

Вклад авторов

Зыкова М.В., Белоусов М.В. и Шерстобоев Е.Ю. обосновали актуальность работы. Перминова И.В., Григорьева И.О., Цупко А.В., Михалёв Д.А., Логвинова Л.А. и Зыкова М.В. синтезировали образцы и провели их стандартизацию. Трофимова Е.С., Данилец М.Г., Лигачева А.А. разработали эксперимент, проводили оценку биологической активности изучаемых веществ, культуральные исследования. Данилец М.Г., Лигачева А.А. участвовали в обработке данных. Трофимова Е.С., Данилец М.Г. проводили теоретические расчеты. Данилец М.Г., Трофимова Е.С., Зыкова М.В., Белоусов М.В. участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Сведения об авторах

Трофимова Евгения Сергеевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-5367-715X.

Зыкова Мария Владимировна, д-р фарм. наук., доцент, зав. кафедрой химии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-1973-8983.

Данилец Марина Григорьевна, д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0001-7862-4778.

Лигачёва Анастасия Александровна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-3337-1516.

Шерстобоев Евгений Юрьевич, д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, зав. отделом иммунофармакологии, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-6178-5329.

Григорьева Ирина Олеговна, аспирант, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва. ORCID 0000-0002-7978-9774.

Михалёв Дмитрий Александрович, лаборант, кафедра химии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-00002-5292-1368.

Цупко Андрей Владиславович, лаборант, кафедра химии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-7169-8846.

Логвинова Людмила Анатольевна, ассистент, кафедра химии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-0167-7043.

Перминова Ирина Васильевна, д-р хим. наук, профессор, кафедра медицинской химии, зав. лабораторией природных гуминовых систем, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва. ORCID 0000-0001-9084-7851.

Белоусов Михаил Валерьевич, д-р фарм. наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтического анализа, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-2153-7945.

(✉) Трофимова Евгения Сергеевна, e-mail: trofimova_es@pharmso.ru

Поступила в редакцию 01.09.2021

Подписана в печать 05.10.2021