

**ВЛИЯНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ КАРБОНАТА ЛИТИЯ НА  
ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ ПРИ РАЗВИТИИ  
ГЕПАТОКАРЦИНОМЫ-29**

**В.И. Коненков, Ю.И. Бородин, О.П. Макарова, Н.П. Бгатова, Л.Н. Рачковская**

ФБГУ «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» СО РАМН г. Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2 (директор – академик РАМН В.И. Коненков), Новосибирск

**РЕФЕРАТ**

Функциональную активность макрофагов при введении наноразмерных частиц карбоната лития после инициации гепатокарциномы 29 у мышей-самцов СВА изучали по продукции NO, активности аргиназы и по способности поглощать зимозановые гранулы. У интактных животных после однократного введения наноразмерных частиц в мышцу бедра уровень продукции NO перитонеальными макрофагами (пМф) увеличивался в 4 раза, активность аргиназы в 3,1 раза. После четырех- и пятикратного введения частиц уровень продукции NO пМф оставался повышенным, а активность аргиназы возвращалась к норме. Численность фагоцитирующих пМф возрастала в 1,4 раза после пятикратного введения частиц. При развитии гепатокарциномы в мышечной ткани бедра уровень продукции NO макрофагами повышался постепенно на 3 сут – в 1,6 раза, на 7 сут – в 3,2 раза и на 13 сут – в 2,6 раза по сравнению с уровнем продукции у интактных животных. Рост продукции NO пМф после инициации опухолевого процесса не сопровождался изменением активности аргиназы и способности поглощать зимозановые гранулы. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что введение НЧ Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> после инокуляции клеток гепатокарциномы 29 в мышечной ткани правого бедра, не оказывало влияния на функциональное состояние пМф по изучаемым параметрам.

**ABSTRACT**

Konenkov V.I., Borodin Yu.I., Makarova O.P., Bgatova N.P., Rachkovskaya L.N.

Macrophage activity was studied by NO production, arginase activity levels and ability to engulf zymosan granules at lithium carbonate nano-sized particles injection after the hepatocarcinoma 29 initiation in male mice CBA. NO production level by peritoneal macrophages (pMf) increased 4 times, arginase activity by 3.1 times in intact mice after a single injection into the thigh muscle. The level of NO production by macrophages remained elevated, and arginase activity returned to control level after four- and fivefold injection of nano-sized particles into muscle tissue. Number of phagocytic pMf increased 1.4 times after fivefold injection of lithium carbonate nano-sized particles. NO production levels by macrophages increased gradually to 3 days - 1.6 times on day 7 - 3.2 times and 13 days - in 2.6 times in comparison with the level in intact mice at hepatocarcinoma in the thigh

muscle tissue. The rise of NO production by pMf was not accompanied by a change in the ability to phagocyte zymozan and arginase activity level at tumor growth. The results of experiment indicated that neither single nor fivefold injection of lithium carbonate nano-sized particles after hepatocarcinoma 29 cells inoculation in muscle tissue of the right thigh had any effect on the macrophage functional parameters.

**Ключевые слова:** наноразмерные частицы карбоната лития, гепатокарцинома, макрофаги, оксид азота, аргиназа, зимозановые гранулы

**Адрес для корреспонденции:** [opmak@ngs.ru](mailto:opmak@ngs.ru) Макарова Ольга Петровна

Гепатокарцинома относится к одной из самых агрессивных опухолей человека и, не смотря на успехи в ранней диагностике и лечении, дает высокий процент летальности среди больных за счет метастазирования [7]. Необходимым условием для прогрессирования рака печени является хронический воспалительный процесс [6], который, активно поддерживается макрофагами [3]. В то же время макрофаги играют важную роль всистеме противоопухолевой защиты. В основе фенотипической функциональной поляризации макрофагов лежит соотношение между альтернативными путями метаболизма аргинина — NO-синтазным и аргиназным, которое определяет их способность стимулировать клеточные (Th1-зависимые) или гуморальные (Th2-зависимые) иммунные реакции [4]. В связи с этим вещества, изменяющие этот баланс, могут быть использованы для модуляции противоопухолевого иммунного ответа. Показано, что соли лития обладают иммуномодулирующими свойствами [13]. Наноразмерные частицы карбоната лития (НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ) доступны для фагоцитов, поскольку НЧ обладают высокоразвитой активной поверхностью, высокой сорбционной емкостью и благодаря своим размерам могут взаимодействовать и связываться с ними [14]. В связи с этим целью нашей работы явилось изучение эффектов НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  на NO-синтазную, аргиназную и фагоцитарную активности макрофагов при развитии гепатокарциномы 29.

## **МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ**

Эксперимент проведен на мышцах-самцах линии СВА массой 18-20 г в возрасте 3-х месяцев. Животных содержали на стандартной диете со свободным доступом к воде и пище. Все исследования проводили в утренние часы. Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

В эксперименте использовано 4 группы животных. В 1 группу вошли интактные мыши, во 2 группу — животные, получавшие внутримышечно взвесь НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ , в 3 группу — животные с перевитой опухолью, в 4 группу — животные, получавшие инъекции взвеси НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  после трансплантации опухолевых клеток. Животным 2 группы в правое бедро вводили взвесь НЧ в объеме 0,1 мл в дозе 0,058 мг на животное, приготовленную на стерильном 0,85 %

водном растворе хлорида натрия. НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  диаметром 10-20 нм были получены путем механоактивации образцов в мельнице-активаторе планетарного типа АГО-2С (разработка ИХТТМ СО РАН, г. Новосибирск). Забор материала для исследований проводили на 2 сут после однократного введения частиц, на 5 сут после 4-кратного введения частиц и на 10 сут после 5-кратного введения частиц. У животных 3 группы для инициации опухолевого процесса использовали клетки гепатокарциномы-29 (Г-29). Г-29 получена из банка опухолевых штаммов Института цитологии и генетика СО РАН [2]. Клетки Г-29 перевивали мышам линии СВА в брюшную полость, через 10 сут производили забор асцитической жидкости, суспендировали в 10-кратном объеме физиологического раствора и вводили по 0,1 мл интактным животным в мышцу правого бедра. У животных 3 группы со спонтанным развитием опухоли забор материала производили на 3, 7 и 13 сутки после введения опухолевых клеток. Животным 4 группы после инициации опухолевого процесса вводили НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  в выше указанной дозе однократно (3 сут) и пятикратно (7 и 13 сут). Забор материала производили на 3, 7 и 13 сутки после введения опухолевых клеток. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом методом кранио-цервикальной дислокации. Забор экспериментального материала выполняли в утренние часы.

Клетки для исследования получали из перитонеальной полости. Для выделения макрофагов клетки в культуральной среде DMEM/F12, содержащей 10 % фетальной телячьей сыворотки, 15 мМ HEPES, 0,3 % L-глутамин и 50 мкг/мл гентамицина, вносили в лунки 96-луночного планшета по  $2,0 \times 10^5$  в объеме 200 мкл и инкубировали 2 ч ( $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ), не прилипшую фракцию удаляли, дважды промывали свежей средой и продолжали инкубировать 18 ч. О продукции NO судили по содержанию нитритов в супернатантах клеточных культур. К 100 мкл супернатанта добавляли 100 мкл реактива Грисса, смешивали и через 15 мин измеряли количество продукта реакции на спектрофотометре «SmartSpec Plus» (Bio-Rad, США) при длине волны 540 нм [9].

Активность аргиназы определяли по скорости образования мочевины [8]. Макрофаги лизировали, после чего к 50 мкл лизата добавляли 50 мкл 50 мМ Трис-НСl (рН 7,4) и 10 мкл 50 мМ раствора хлорида марганца. Аргиназу активировали нагреванием в термостате при  $57^\circ\text{C}$  в течение 10 мин, после чего к пробам добавляли по 100 мкл 0,5 М раствора L-аргинина и инкубировали их в течение 30 мин при  $37^\circ\text{C}$ , после остановки реакции определяли концентрацию мочевины.

Фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов (пМф) оценивали по способности поглощать гранулы зимозана, представляющего собой – нерастворимый полисахаридный комплекс из стенок дрожжевых грибов *S. cerevisiae* (НПО "Биолар",

Эстония). Клетки перитонеальной жидкости в объеме 200 мкл помещали в камеры, смонтированные на предметном стекле, и инкубировали 1 ч при 37°C. Затем не прилипшие клетки удаляли промыванием средой 199. Инкубационную смесь готовили, исходя из соотношения 1 пМф к 50 гранулам, вносили в объеме 200 мкл, инкубировали 45 мин при 37°C. Перед внесением в инкубационную среду (среда 199 с 20 % телячьей сыворотки) зимозановые гранулы дополнительно не опсонизировали. Монослои пМф фиксировали и окрашивали по Романовскому-Гимза. Подсчитывали фагоцитарный индекс – процент фагоцитирующих макрофагов и фагоцитарное число - количество зимозановых гранул, поглощенных одним макрофагом.

Полученные результаты подвергали общепринятым методам вариационной статистики с использованием непараметрических критериев Крускала-Уоллиса и Манна-Уитни.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

У мышей 2 группы после однократного введения НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  в мышцу правого бедра регистрировали увеличение концентрации NO в супернатантах культур пМф в 4 раза по сравнению с аналогичными показателями у интактных животных 1 группы (рис. 1). Высокий уровень продукции NO макрофагами у мышей сохранялся и после 4- (5 сут) и 5-кратного (10 сут) введения НЧ, превышая контрольные значения в 3 и 3,4 раза, соответственно. После 1-кратного введения НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  на 2 сут уровень активности аргиназы в макрофагах перитонеальной полости у мышей 2 группы увеличивался в 3,1 раза по сравнению с уровнем ее активности у животных 1 группы (рис.1). После 4- и 5-кратного введения НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  активность аргиназы в пМф снижалась до контрольного уровня. На 10 сут у животных 2 группы после 5-кратного введения НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  наблюдали рост фагоцитарного индекса или численности пМф, фагоцитирующих зимозановые гранулы, в 1,4 раза по сравнению с контрольными показателями, но не отмечали изменений в количестве фагоцитированных частиц одним макрофагом (табл. 1).

У животных 3 группы после инокуляции клеток Г-29 в мышечную ткань правого бедра наблюдали постепенное увеличение продукции NO пМф на 3 сут – в 1,6 раза, на 7 сут – в 3,2 раза и на 13 сут – в 2,6 раза по сравнению с уровнем продукции этого медиатора у животных 1 группы (рис.2). Рост продукции NO пМф после инициации опухолевого процесса не сопровождался изменением уровня активности аргиназы в них и способности поглощать зимозановые гранулы (табл. 2).

Динамика увеличения уровня продукции NO пМф у мышей 4 группы была сходной с таковой у животных 3 группы (рис. 2). Ни 2-, ни 5-кратное введение НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  после трансплантации клеток Г-29 в мышечную ткань не влияло на интенсивность образование NO

пМф при развитии опухоли (рис. 2, табл. 2). Кроме того, введение НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  после инициации Г-29 в мышечной ткани бедра не изменяло активности аргиназы в пМф и их способность к фагоцитозу на всех сроках исследования по сравнению с аналогичными показателями у животных 1 и 3 группы (рис. 2, табл. 2).

Анализ полученных данных свидетельствовал о том, что после введения НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  в мышечную ткань интактным животным увеличивается способность макрофагов перитонеальной полости к продукции NO и фагоцитозу гранул зимозана при отсутствии роста активности аргиназы в них. Это дает возможность предположить наличие в популяции пМф большого количества классически активированных клеток, обладающих фенотипом M1. Активация пМф, скорее всего, связана с попаданием продуктов деструкции мышечной ткани и НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  в брюшную полость. Ранее показано, что при введении НЧ  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  в мышечную ткань усиливались процессы перекисного окисления липидов, что приводило к повреждению мышечных волокон и окружающих клеток [1].

При развитии гепатокарциномы в мышечной ткани бедра усиливалась продукция NO дистантными макрофагами, к которым относятся макрофаги перитонеальной полости. пМф напрямую не принимают участие в развитии опухоли, но согласно современным представлениям эти клетки могут играть роль свидетелей, отражающих системный иммунный ответ на рост опухоли в целом. Ранее показано, что периферические макрофаги не обладают свойствами ни M1, ни M2 фенотипа: показывают обратную регуляцию NF- $\kappa$ B-зависимых провоспалительных сигнальных путей и продукции ИЛ-12 и не проявляют типичных маркеров M2 фенотипа, а именно повышенной экспрессии ИЛ-10 и аргиназы [15]. Наши данные согласуются с результатами, полученными Kisseleva E.P. et al. [11]. Показано, что у мышей после подкожного введения клеток гепатомы 22a в область спины на 3 сут уровень продукции NO пМф был снижен, но к 7 сут он существенно превышал контрольные показатели. Согласно нашим данным в ранний период развития Г-29 (3 сут) пМф продуцируют NO в пределах контрольных значений, а на 7 и 13 сут значительно больше, но при этом не отмечается повышения способности пМф к фагоцитозу зимозановых гранул и активации аргиназы. Предполагается, что повышенная продукция NO пМф может иметь негативное влияние из-за своего супрессирующего эффекта на T-клеточный ответ [5]. Увеличение продукции NO, по-видимому, вызвано молекулами, появившимися вследствие гибели опухолевых клеток, например, фрагментами гиалуронана, которые являются эндогенными лигандами для толл-рецепторов (TLR-2, TLR-4) и запускают M2 цитокиновый профиль [12], а также белками теплового шока HSP60 и HSP70, сдвигая активность пМф к M1 фенотипу [9], что не способствует поляризации фенотипа популяции пМф.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что ведение НЧ Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> после индукции гепатокарциномы 29 в мышечной ткани правого бедра, не оказывало влияния на функциональное состояние дистантных пМф и не способствовало поляризации их фенотипа.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бгатова Н.П., Макарова О.П., Пожидаева А.А. и др. // Успехи наук о жизни.-2012.-№5.- С.29-46.
2. Каледин В.И., Жукова Н.А., Николин В.П. и др. // Бюл. экспер биол. – 2009.- Том 148, № 12.- С. 664-669.
3. Маянский Д.Н. Хроническое воспаление. М.: Медицина, 1991.-272 с.
4. Михайленко А.А., Коненков В.И., Базанов Г.А., Покровский В.И. Руководство по клинической иммунологии, аллергологии, иммуногенетике и иммунофармакологии. В 2 т. – Москва: Триада, 2005.- 1072 с.
5. Alleva D.G., Burger C.J., and Elgert K.D. // Journal of Immunology. – 1994. - Vol. 153, №. 4. - P. 1674–1686.
6. Berasain C., Castillo J., Perugorria M.J. et al. // Ann N Y Acad Sci. 2009 Feb;1155:206-21. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.03704.x.
7. Capece D., Fischietti M., Versella D. et al. // Biomed Research International.-Vol. 2013, Article ID 187204, 15 pages <http://doi.org/10.1155/2013/187204>Berasain C., Castillo J., Perugorria M. J. et al. // Ann NY Acad Sci.-2009.-Vol. 1155.-P. 206-211.
8. Corraliza I.M., Campo M.L., Soler G., Modolell M. // J. Immunol. Methods. - 1994.-Vol. 174.- P. 231–235.
9. Green L.C., Wagner D.A., Glowgowski J. et al. // Anal. Biochem.- 1984.- Vol. 126.- P. 131-138.
10. Hashemi S.M., Hassan Z.M., Soudi S., and Shahabi S. // Cell Biology International. – 2008. - Vol. 32, №. 7. – P. 835–840.
11. Kisseleva E.P., Lrylov A.V., Stepanova O.I., Liodyno V.I. // Inter. J. Cell Biol. Vol. 2011, Article ID 793034, 14 pages. doi:10.1155/2011/793034.
12. Kuang D.-M., Wu Y., Chen N., Cheng J. et al. // Blood.- 2007. - Vol. 110, № 2. - P. 587–595.
13. Raghavendra P.B., Lee E., Parameswaran N. // J Neuroimmune Pharmacol. 2013 Nov 27
14. Salata O.V. Applications of nanoparticles in biology and medicine <http://www.jnanobiotechnology.com/content/2/1/3>
15. Torroella-Kouri M., Silvera R., Rodriguez D. et al. // Cancer Research. – 2009. - Vol. 69, № 11. – P. 4800-4809.

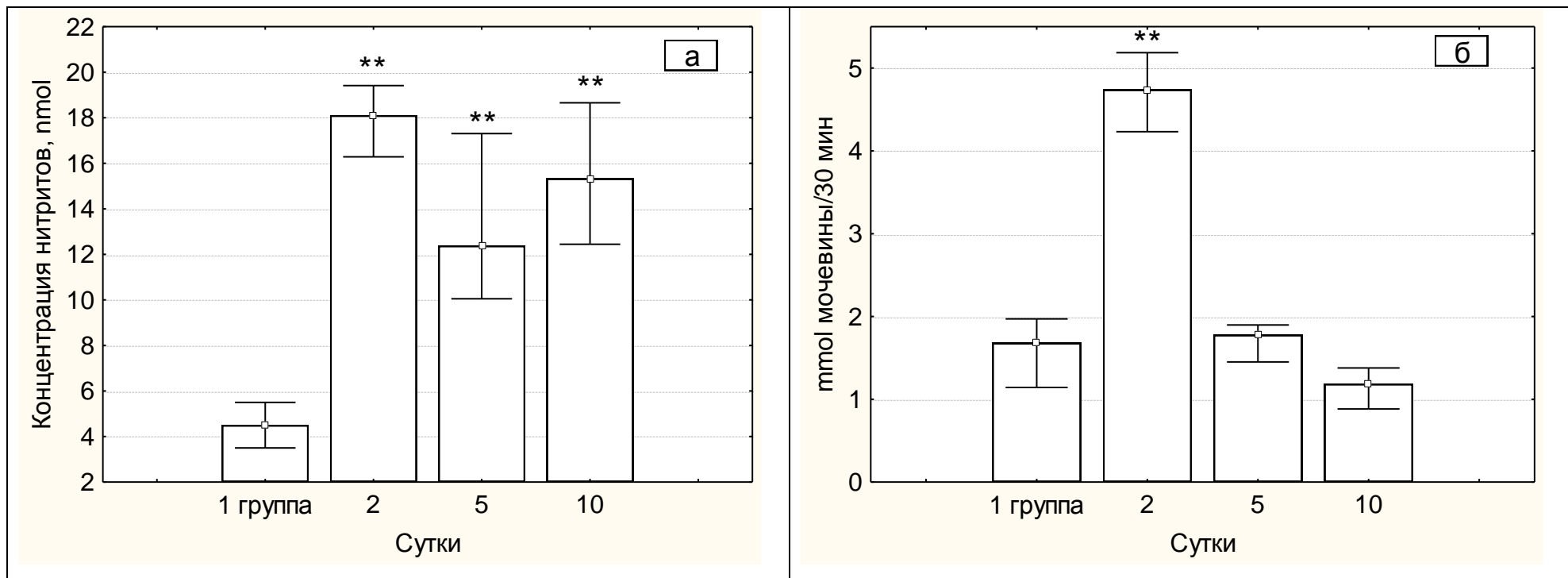


Рис. 1. Динамика показателей продукции NO перитонеальными макрофагами (а) и активности в них аргиназы (б) после введения наноразмерных частиц  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ . Ме, 25%-75%; \*\* -  $P < 0,01$  по сравнению с 1 группой животных.

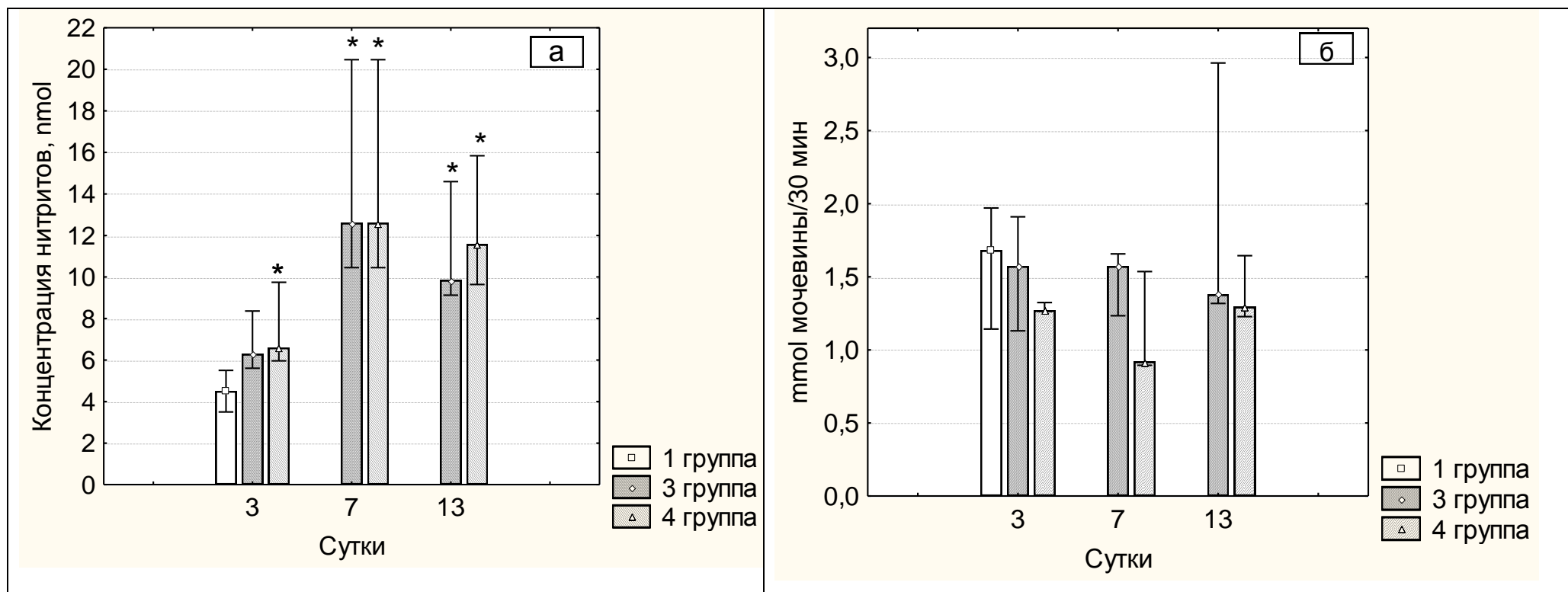


Рис. 2. Изменение показателей продукции NO перитонеальными макрофагами (а) и активности в них аргиназы (б) при развитии гепатокарциномы-29 в мышечной ткани правого бедра в условиях введения наноразмерных частиц  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ . Me, 25%-75%; \* -  $P < 0,05$  по сравнению с 1 группой интактных животных



Таблица 1

Изменение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов после введения наноразмерных частиц карбоната лития ( $M \pm m$ )

Сроки исследования	Показатели фагоцитарной активности	
	Фагоцитарный индекс	Фагоцитарное число
1 группа (4)	$54,7 \pm 2,4$	$4,1 \pm 0,32$
2 группа		
5 суток (5)	$50,5 \pm 2,5$	$5,6 \pm 2,07$
10 суток (5)	$78,1 \pm 4,9^*$	$6,7 \pm 1,02$

Примечание: в скобках указано количество животных, \* -  $P < 0,05$  по сравнению с 1 группой интактных животных

Таблица 2

Фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов при развитии гепатокарциномы 29 в мышечной ткани правого бедра ( $M \pm m$ )

Сроки исследования	Показатели фагоцитарной активности	
	Фагоцитарный индекс	Фагоцитарное число
1 группа (4)	$54,7 \pm 2,4$	$4,1 \pm 0,32$
3 группа - 7 сут (4)	$66,3 \pm 5,2$	$4,4 \pm 0,43$
4 группа – 7 сут (4)	$59,4 \pm 7,7$	$4,8 \pm 0,3$

Примечание: в скобках указано количество животных, \* -  $P < 0,05$  по сравнению с 1 группой

Таблица (цифровой материал для построения рис. 1)

Динамика показателей продукции NO перитонеальными макрофагами и активности в них аргиназы после введения наноразмерных частиц  $Li_2CO_3$

Группы животных	1 группа (5)		2 суток (5)		5 суток (5)		10 суток (5)	
	Me	25-75%	Me	25-75%	Me	25-75%	Me	25-75%
<b>NO</b> (NO <sub>2</sub> nmol)	4,5	3,5-5,5						
2 группа			18,1 <sup>**</sup>	16,3-19,4	12,4 <sup>**</sup>	10,1-20,5	15,3 <sup>**</sup>	12,5-18,7
<b>Аргиназа</b> (nmol мочевины/30мин)	1,7	1,1-1,97						
2 группа			4,7 <sup>**</sup>	4,2-5,2	1,78	1,45-1,9	1,18	0,88-1,38

Примечание: в скобках указано количество животных в группе; <sup>\*\*</sup> - P<0,01 по сравнению с 1 группой

Таблица (цифровой материал для построения рис. 2)

Динамика показателей продукции NO перитонеальными макрофагами и активности в них аргиназы при развитии опухолевого процесса в мышечной ткани правого бедра условиях введения наноразмерных частиц  $Li_2CO_3$

Группы животных	1 группа (5)		3 суток (5)		7 суток (5)		13 суток (5)	
	Me	25-75%	Me	25-75%	Me	25-75%	Me	25-75%
<b>NO</b> (NO <sub>2</sub> nmol)	4,5	3,5-5,5						
3 группа			6,29	5,6-8,4	12,6 <sup>*</sup>	10,5-20,5	9,85 <sup>*</sup>	9,1-14,6
4 группа			6,59	6,0-9,7	12,6 <sup>*</sup>	10,5-20,5	11,57 <sup>*</sup>	9,6-15,8
<b>Аргиназа</b> (nmol мочевины/30мин)	1,7	1,1-1,97						
3 группа			1,57	1,1-1,91	1,57	1,2-1,66	1,38	1,3-2,96
4 группа			1,27	1,26-1,3	0,92	0,89-1,54	1,29	1,2-1,64

Примечание: в скобках указано количество животных в группе; <sup>\*</sup> - P<0,05 по сравнению с 1 группой