https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-46-53
УДК 57.085.23

Check for updates
CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Антиоксидантная активность серебросодержащих бионанокомпозиций на основе гуминовых веществ в культуре клеток

Е. Е. Буйко[1,2]*, М. В. Зыкова[1], В. В. Иванов[1], К. А. Братишко[1,2], А. А. Уфандеев[1], И. О. Григорьева[3], А. В. Цупко[1], Д. А. Михалёв[1], И. В. Перминова[3], М. В. Белоусов[1,2]

[1] ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России), 634050, Россия, Томская обл., г. Томск, Московский тракт, д. 2
[2] ФГАОУ ВО « Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ), 634034, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 30
[3] ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова), 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1

***Контактное лицо:** Буйко Евгений Евгеньевич. **E-mail:** buykoevgen@yandex.ru

ORCID: Е. Е. Буйко – https://orcid.org/0000-0002-6714-1938; М. В. Зыкова – https://orcid.org/0000-0002-1973-8983; В. В. Иванов – https://orcid.org/0000-0001-9348-4945; К. А. Братишко – https://orcid.org/0000-0001-6571-4061; А. А. Уфандеев – https://orcid.org/0000-0002-3837-1179; И. О. Григорьева – https://orcid.org/0000-0002-7978-9774; А. В. Цупко – https://orcid.org/0000-0001-7169-8846; Д. А. Михалёв – https://orcid.org/0000-0002-5292-1368; И. В. Перминова https://orcid.org/0000-0001-9084-7851; М. В. Белоусов – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945.

Статья поступила: 15.10.09.2021 **Статья принята в печать:** 19.11.2021 **Статья опубликована:** 25.11.2021

Резюме

Введение. Наночастицы серебра являются перспективными агентами для подавления резистентных штаммов микроорганизмов и ускорения заживления гнойных ран. Окислительный стресс нарушает процессы нормального ранозаживления, что приводит к образованию хронических незаживающих ран. Поэтому определение способности новых ранозаживляющих агентов подавлять продукцию активных форм кислорода является актуальной задачей.

Цель. Исследовать влияние серебросодержащих бионанокомпозиций на основе гуминовых веществ на базальную и стимулированную *трет*-бутилгидропероксидом продукцию активных форм кислорода в культуре клеток нормальных фибробластов 3T3-L1 *in vitro*.

Материалы и методы. Исследование проведено на 7 образцах исходных гуминовых веществ и соответствующих им биоматериалах с наночастицами серебра, синтезированных в Лаборатории природных гуминовых систем химического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова. Оценка внутриклеточной продукции активных форм кислорода проводилась с использованием флуоресцентного зонда 2,7-дихлородигидрофлуоресцеиндиацетата. Клетки культивировали с образцами в течение 24 ч, для стимуляции продукции активных форм кислорода использовали *трет*-бутилгидропероксид. Детекцию осуществляли флуориметрически с помощью микропланшетного ридера.

Результаты и обсуждение. Наиболее выраженную антиоксидантную активность продемонстрировали три образца биоматериалов с наночастицами серебра, ультрадиспергированными в матрицах гуминовых веществ (CHS-AgNPs, CHP-AgNPs и CHE-AgNPs), что позволяет рассматривать их как наиболее перспективные в качестве фармацевтических агентов для лечения гнойно-воспалительных процессов. Наиболее вероятным механизмом высокой антиоксидантной активности исследуемых биоматериалов в отношении интрацеллюлярных активных форм кислорода является собственная активность гуминовых веществ по связыванию активных форм кислорода, в то время как наночастицы серебра в составе биоматериалов катализируют восстановительные процессы их взаимодействия с активными формами кислорода.

Заключение. Для исследуемых образцов биоматериалов с наночастицами серебра, ультрадиспергированными в матрицах гуминовых веществ, характерна выраженная антиоксидантная активность, что вместе с антибактериальными свойствами позволяет рассматривать их как потенциальные агенты для ускорения заживления гнойных ран.

Ключевые слова: гуминовые вещества, наночастицы серебра, антиоксидантная активность, *трет*-бутилгидропероксид, ранозаживление

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

Вклад авторов. М. В. Зыкова, М. В. Белоусов и В. В. Иванов обосновали актуальность работы. И. В. Перминова, И. О. Григорьева, А. В. Цупко, Д. А. Михалёв и М. В. Зыкова выделяли и синтезировали образцы и провели их стандартизацию. Е. Е. Буйко, В. В. Иванов, А. А. Уфандеев, К. А. Братишко разработали эксперимент, проводили оценку антиоксидантной активности изучаемых веществ, культуральные исследования. Е. Е. Буйко и В. В. Иванов участвовали в обработке данных и проводили теоретические расчеты. Е. Е. Буйко, М. В. Зыкова, В. В. Иванов, М. В. Белоусов участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 20-65-47052).

Для цитирования: Буйко Е. Е., Зыкова М. В., Иванов В. В., Братишко К. А., Уфандеев А. А., Григорьева И. О., Цупко А. В., Михалёв Д. А., Перминова И. В., Белоусов М. В. Антиоксидантная активность серебросодержащих бионанокомпозиций на основе гуминовых веществ в культуре клеток. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):46–53. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-46-53

© Буйко Е. Е., Зыкова М. В., Иванов В. В., Братишко К. А., Уфандеев А. А., Григорьева И. О., Цупко А. В., Михалёв Д. А., Перминова И. В., Белоусов М. В., 2021
© Buyko E. E., Zykova M. V., Ivanov V. V., Bratishko K. A., Ufandeev A. A., Grigorieva I. O., Tsupko A. V., Mikhalyov D. A., Perminova I. V., Belousov M. V., 2021

Antioxidant Activity of Silver-containing Bionanocompositions Based on Humic Substances in Cell Culture

Evgeny E. Buyko[1,2]*, Maria V. Zykova[1], Vladimir V. Ivanov[1], Kristina A. Bratishko[1,2], Alexander A. Ufandeev[1], Irina O. Grigorieva[3], Andrey V. Tsupko[1], Dmitry A. Mikhalyov[1], Irina V. Perminova[3], Mikhail V. Belousov[1,2]

[1] Siberian State Medical University, SSMU, 2, Moskovsky tract, Tomsk, Tomsk region, 634050, Russia
[2] The National Research Tomsk Polytechnic University, 30, Lenina ave., Tomsk, 634034, Russia
[3] Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia

***Corresponding author:** Evgeny E. Buyko. **E-mail:** buykoevgen@yandex.ru

ORCID: Evgeny E. Buyko – https://orcid.org/0000-0002-6714-1938; Maria V. Zykova – https://orcid.org/0000-0002-1973-8983; Vladimir V. Ivanov – https://orcid.org/0000-0001-9348-4945; Kristina A. Bratishko – https://orcid.org/0000-0001-6571-4061; Alexander A. Ufandeev – https://orcid.org/0000-0002-3837-1179; Irina O. Grigorieva – https://orcid.org/0000-0002-7978-9774; Andrey V. Tsupko – https://orcid.org/0000-0001-7169-8846; Dmitry A. Mikhalyov – https://orcid.org/0000-00002-5292-1368; Irina V. Perminova – https://orcid.org/0000-0001-9084-7851; Mikhail V. Belousov – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945.

Received: 15.10.2021 **Revised:** 19.11.2021 **Published:** 25.11.2021

Abstract

Introduction. Silver nanoparticles are promising agents for suppressing resistant strains of microorganisms and accelerating the purulent wounds healing. Oxidative stress disrupts normal wound healing processes, which leads to the formation of chronic non-healing wounds. Therefore, the determination of the ability of new wound healing agents to decrease the production of reactive oxygen species is a relevant task.

Aim. The aim of the current study was to investigate the effect of silver-containing bionanocompositions based on humic substances on the basal and *tert*-butyl hydroperoxide-stimulated production of reactive oxygen species at the normal fibroblasts 3T3-L1 cell culture *in vitro*.

Materials and methods. The study was carried out on 7 samples of initial humic substances and biomaterials with silver nanoparticles synthesized in the Laboratory of Natural Humic Systems, Faculty of Chemistry, Moscow State University named after M. V. Lomonosov. The intracellular production of reactive oxygen species was assessed using a 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate fluorescent probe. Cells were cultured with samples for 24 h; *tret*-butyl hydroperoxide was used to stimulate the production of reactive oxygen species. Detection was performed fluorometrically using a microplate reader.

Results and discussion. The most pronounced antioxidant activity was demonstrated by three samples of biomaterials with silver nanoparticles ultradispersed in humic substances matrices (CHS-AgNPs, CHP-AgNPs and CHE-AgNPs), which allows us to consider them as the most promising pharmaceutical agents for the treatment of purulent-inflammatory processes. The most probable mechanism of the high antioxidant activity of the studied biomaterials in relation to intracellular reactive oxygen species is the intrinsic activity of humic substances to bind reactive oxygen species, while silver nanoparticles in biomaterials catalyze the reduction processes of their interaction with reactive oxygen species.

Conclusion. For the studied samples of biomaterials with silver nanoparticles ultradispersed in matrices of humic substances pronounced antioxidant activity was shown. Together with antibacterial properties, it makes it possible to consider them as potential agents for purulent wounds healing accelerating.

Keywords: humic substances, silver nanoparticles, antioxidant activity, *tert*-butyl hydroperoxide, wound healing

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Maria V. Zykova, Mikhail V. Belousov and Vladimir V. Ivanov substantiated the relevance of the work. Irina V. Perminova, Irina O. Grigorieva, Andrey V. Tsupko, Dmitry A. Mikhalev and Maria V. Zykova isolated, synthesized and standardized studied samples. Evgeny E. Buyko, Vladimir V. Ivanov, Alexander A. Ufandeev, Kristina A. Bratishko designed an experiment, assessed the antioxidant activity of the studied substances, provided cultural studies. Evgeny E. Buyko and Vladimir V. Ivanov participated in data processing and performed theoretical calculations. Evgeny E. Buyko, Maria V. Zykova, Vladimir V. Ivanov, Mikhail V. Belousov participated in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

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

For citation: Buyko E. E., Zykova M. V., Ivanov V. V., Bratishko K. A., Ufandeev A. A., Grigorieva I. O., Tsupko A. V., Mikhalyov D. A., Perminova I. V., Belousov M. V. Antioxidant activity of silver-containing bionanocompositions based on humic substances in cell culture. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):46–53. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-46-53

ВВЕДЕНИЕ

Достижения в области нанотехнологий привели к повышенному вниманию к наноразмерным частицам со стороны специалистов всех областей науки [1]. Уникальные химические, физические и биологические свойства наночастиц предоставляют доступ к широкому спектру их применения в электронике, спектральном анализе, катализе, а также биомедицине и фармацевтической промышленности для поиска новых эффективных лекарственных средств [2]. Особое внимание исследователей привлекают наночастицы металлов, в частности серебра (AgNPs), ввиду наличия у них противомикробных и ранозаживляющих свойств [3, 4]. Как следствие, AgNPs находят применение в качестве потенциальных антибактериальных агентов для подавления резистентных штаммов микроорганизмов и ускорения заживления гнойных ран [5]. Физико-химические свойства AgNPs в основном определяются их формой, размером, диэлектрическими свойствами и дисперсностью [6].

Известно, что активные формы кислорода (АФК) играют ключевую роль в процессе смены стадий заживления ран [7]. Сразу после формирования раны начинается комплексный, но упорядоченный процесс заживления, состоящий из перекрывающихся фаз: коагуляции, иммунного ответа, воспаления, пролиферации и ремоделирования [8, 9]. При низком уровне АФК в ране происходит подавление инфекционных агентов и стимулируется эффективное заживление путем индукции антиапоптотических сигналов [10, 11]. В то же время избыточный и неконтролируемый окислительный стресс способствует нарушению регуляции воспалительных процессов вследствие окислительной модификации биомолекул клеток и индукции апоптоза, что приводит к образованию хронических незаживающих ран [12]. Экспериментальные и клинические исследования показали, что стратегия использования агентов, обладающих антиоксидантной активностью (АОА), демонстрирует положительные результаты при лечении незаживающих ран [10]. *Антиоксиданты* – это химические соединения, которые могут отдавать свои электроны молекулам АФК, тем самым препятствуя акцепции электронов от других биологически важных молекул (например, белков или ДНК) [13]. Эти вещества обеспечивают протекание сложных каскадов реакций по превращению АФК в более стабильные молекулы, такие как H_2O и O_2. Таким образом, интерес к использованию соединений с АОА для лечения ран растет, и определение способности новых ранозаживляющих агентов подавлять продукцию АФК и снижать их уровень является актуальной задачей.

Процессы синтеза AgNPs с использованием химических или физических методов (с помощью микроволнового или γ-излучения, термического разложения и химического восстановления) часто требуют использования токсичных восстанавливающих и стабилизирующих агентов (гидразин-гидрат, натрий боргидрид, этиленгликоль) [14] и сопряжены с другими экологическими и биологическими рисками [6]. Поэтому для производства наноматериалов биомедицинского назначения в настоящее время применяется «зеленый синтез» или «биогенный синтез», который признается специалистами как экоадаптивный подход к созданию разнообразных наноматериалов, включая наночастицы металлов [6, 15–17]. Биосинтез наночастиц может быть достигнут путем восстановления катионов металлов с использованием экстрактов растений, дрожжей, водорослей, лишайников, грибов и бактерий в качестве исходных матриц. Гуминовые вещества (ГВ) представляют собой гетерогенные природные биополимеры, содержащиеся в различных каустобиолитах (торфе, буром угле, донных отложениях и пр.) [18, 19], и являются перспективными матрицами для синтеза AgNPs. Ранее было показано, что ГВ оказывают иммуномодулирующее и антиоксидантное действие в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [20–22]. В связи с этим в качестве объектов исследования в настоящей работе были выбраны бионанокомпозиции, содержащие биологически активное серебро, ультрадиспергированное в матрицах ГВ.

Цель. Исследовать влияние серебросодержащих бионанокомпозиций на основе гуминовых веществ на базальную и стимулированную *трет*-бутилгидропероксидом продукцию активных форм кислорода в культуре клеток нормальных фибробластов 3T3-L1 *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являются 7 исходных образцов ГВ, представляющие собой как ГВ, выделенные из природного сырья (торфа) на кафедре химии СибГМУ и на химическом факультете МГУ, так и коммерческие гуминовые препараты, выделенные из угля, а также соответствующие им 7 образцов биоматериалов, содержащие наночастицы серебра (ГВ-AgNPs), синтезированные в Лаборатории природных гуминовых систем химического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова. 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 таблице 1.

Оценка внутриклеточной продукции АФК проводилась с использованием флуоресцентного зонда 2,7-дихлородигидрофлуоресцеиндиацетата (ДХФДА) по описанной ранее методике [23]. Принцип метода основан на способности ДХФДА легко проникать в цитоплазму клеток и деэстерифицироваться под действием внутриклеточных эстераз. 2,7-Дихлородигидрофлуоресцеин не способен транспортироваться из клеток и является слабо флуоресцирующим агентом, но в реакциях с окислителями превращается в сильно флуоресцирующий продукт – дихлорофлуоресцеин. При повышении внутриклеточного уровня оксидантов увеличивается скорость окисления 2,7-дихлородигидрофлуоресцеина. Таким образом, активация внутриклеточного окисления сопровождается увеличением флуоресценции.

Клетки линии 3T3-L1 культивировали в стандартных условиях [атмосфера 5 % CO_2, среда DMEM/F-12 (Gibco™, США) + 10 % FBS (Gibco™, США) + 2 мМ L-глутамина (Gibco™, США) и 1 % гентамицина (Gibco™, США)] и рассаживали на черные 96-луночные культуральные планшеты для измерения флуоресценции (1×10^4 клеток/лунку). В соответствующие лунки вносили образцы исследуемых ГВ и ГВ-AgNPs (12,5 мкг/мл) и инкубировали 24 ч. Затем клетки отмывали от образцов, в лунки вносили рабочий раствор ДХФДА (10 мкМ) (Sigma-Aldrich, США, D6883). Планшеты инкубировали в термостате 20 минут при 37 °C, отмывали от ДХФДА и для стимуляции продукции АФК вносили *трет*-бутилгидропероксид (t-BHP) (25 мкМ) (Sigma-Aldrich, США, B2633). После инкубации в течение 60 минут при 37 °C определяли флуоресценцию в лунках при λ_{ex} = 485 нм и λ_{em} = 530 нм.

Таблица 1. Экспериментальные образцы гуминовых веществ (ГВ) и серебросодержащих бионаноматериалов на их основе (ГВ-AgNPs)

Table 1. Experimental samples of humic substances (HS) and silver-containing bionanomaterials (HS-AgNPs)

Шифр ГВ HS code	Шифр ГВ-AgNPs HS-AgNPs code	Источник исходных субстанций ГВ Source of the initial HS
CHS-K	CHS-AgNPs	Гуминовые вещества угля, коммерческий препарат (ООО «Сахалинские гуматы», Россия) Coal humic substances, commercial preparation ("Sakhalin humates" LLC, Russia)
CHE-K	CHE-AgNPs	Гуминовые вещества угля, коммерческий препарат (ЗАО «Генезис», Россия) Coal humic substances, commercial preparation ("Genesis" CJSC, Russia)
CHP-K	CHP-AgNPs	Гуминовые кислоты угля «Powhumus», коммерческий препарат (Humintech GmbH, Германия) Humic acids of «Powhumus» coal, commercial preparation (Humintech GmbH, Germany)
FA	FA-AgNPs	Фульвокислоты торфа «Fulvagra», коммерческий препарат (Humintech GmbH, Германия) Fulvic acids of peat «Fulvagra», commercial preparation (Humintech GmbH, Germany)
Peat1	Peat1-AgNPs	Гуминовые кислоты верхового ангустифолиум-торфа Томской области, выделенные экстракцией 0,1 моль/л раствором NaOH по методике, описанной в [18] Humic acids of high-moor peat angustifolium of the Tomsk region, isolated by extraction with 0.1 M NaOH solution according to the method described in [18]
PHF-T3	PHF-T3-AgNPs	Гуминовые вещества низинного торфа Тверской области, выделенные экстракцией 1 моль/л раствором NaOH, обессоленные на катионите Ку-2-8, высушенные методом лиофилизации Humic substances of low-lying peat of the Tver region, isolated by extraction with 1 M NaOH solution, desalted on a Ku-2-8 cation exchanger, dried by lyophilization
Peat2	Peat2-AgNPs	Гуминовые кислоты верхового сфагново-мочажинного торфа Томской области, выделенные экстракцией 0,1 моль/л раствором NaOH по методике, описанной в [18] Humic acids of high sphagnum-hollow peat of the Tomsk region, isolated by extraction with 0.1 mol/L NaOH solution according to the method described in [18]

Содержание АФК выражали в единицах флуоресценции. Для оценки антиоксидантной активности ГВ и ГВ-AgNPs величины флуоресценции в лунках, в которые вносили только ДХФДА или ДХФДА и t-BHP, принимали за 100 % базальной или стимулированной продукции АФК соответственно. Антиоксидантную активность образцов выражали как процент снижения флуоресценции в соответствующих лунках относительно базального или стимулированного уровней.

Экспериментальные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Все результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего (M ± SE, $n = 6$). Проверку на нормальность распределения значений проводили с использованием критерия Шапиро – Уилка. Анализ уровня статистической значимости различий между выборками выполняли при помощи однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Достоверность различий считали значимой при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

In vitro оценка АОА с использованием ДХФДА редко применяется для анализа наночастиц. Большинство исследований основаны на использовании в модельных системах ДФПГ (2,2-дифенил-1-пикрилгидразилгидрат) или ABTS (2,2'-азино-бис[3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота]) [24, 25]. Однако эти методы не отражают АОА на клеточном уровне, поскольку не учитывают физиологические условия, такие как pH, температура и биодоступность.

Прооксидант t-BHP используется в моделировании окислительного стресса *in vitro* [26, 27]. Введение t-BHP приводит к увеличению содержания окисленной формы глутатиона (GSSG) в клетке, что является причиной изменения экспрессии про/антиапоптотических белков Bax/Bcl-2 вследствие активации каспазы-3 и апоптотической гибели клетки [28].

Перед проведением экспериментов мы исследовали влияние различных концентраций прооксиданта на уровень внутриклеточных АФК в культуре клеток 3T3-L1 в условиях аналогичного эксперимента. Результаты представлены на рисунке 1.

В диапазоне концентраций от 6,25 до 50 мкМ прооксиданта наблюдается линейная зависимость интенсивности флуоресценции (уравнение линейной регрессии $y = 546,8x + 7043$; $R^2 = 0,9945$; $P = 0,0027$). При концентрациях t-BHP выше 50 мкМ линейность зависимости нарушается. В связи с этим в дальнейших экспериментах мы использовали концентрацию 25 мкМ, которая находится в середине линейного диапазона. Добавление прооксиданта t-BHP в культуру клеток 3T3-L1 вызывало повышение интенсивности флуоресценции ДХФДА в 4,0 раза ($p < 0,05$) (21326,0 ± 1001,9 ед. флуоресценции) по сравнению с контролем (5300,1 ± 68,9 ед. флуоресценции).

В результате проведенных экспериментов установлено, что образцы исходных ГВ, а также биоматериалы с наночастицами серебра ГВ-AgNPs не проявляют прооксидантных эффектов *in vitro*. В то же время выраженность АОА в отношении базального (без добавления прооксиданта) и стимулированного t-BHP уровней внутриклеточной продукции АФК существенно различается между исследуемыми образцами (рисунок 2).

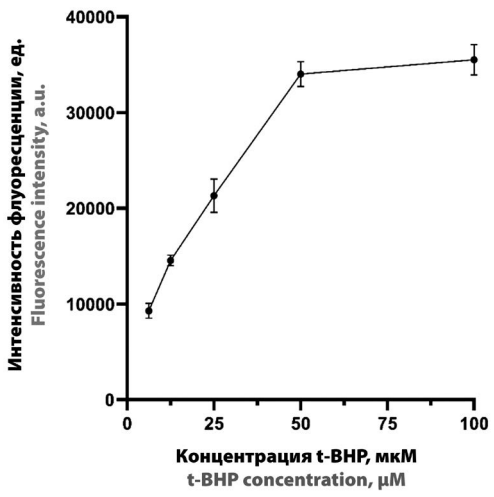

Рисунок 1. Влияние различных концентраций прооксиданта *трет*-бутилгидропероксида (t-BHP) на флуоресценцию 2,7-дихлородигидрофлуоресцеиндиацетата в культуре клеток 3T3-L1

Figure 1. Effect of different concentrations of the prooxidant *tert*-butyl hydroperoxide (t-BHP) on the fluorescence of 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate in 3T3-L1 cells

В ряду исходных образцов ГВ в эксперименте с оценкой влияния на базальный уровень продукции АФК наиболее активным является образец CHE-K (снижение уровня внутриклеточных АФК на 20,7 ± 3,1 %), затем по убыванию располагаются еще три образца с достаточно близкой активностью – CHP-K (18,8 ± 4,6 %), FA (18,3 ± 3,3 %) и CHS-K (15,2 ± 1,5 %). Остальные образцы отличались относительно низкой (в среднем 7,6 – 5,3 %) собственной АОА. Аналогичная картина распределения активности сохранилась и при добавлении к клеткам t-BHP в качестве прооксиданта: наиболее активными остались образцы CHS-K (30,1 ± 2,9 %), CHP-K (24,3 ± 2,3 %) и CHE-K (17,3 ± 1,6 %), далее по убыванию располагаются два образца с близкой и невысокой активностью: Peat1 (10,0 ± 2,7 %) и FA (9,9 ± 2,0 %), для оставшихся двух образцов отмечена наименьшая АОА.

Для образцов с наночастицами серебра ГВ-AgNPs в целом отмечена более высокая АОА в сравнении с исходными ГВ. Так, в эксперименте по оценке снижения базальной продукции АФК без прооксидантной стимуляции наиболее активными были четыре образца – CHP-AgNPs (42,1 ± 4,3 %), CHE-AgNPs (41,9 ± 2,2 %), CHS-AgNPs (38,1 ± 1,8 %) и FA-AgNPs (30,2 ± 3,1 %).

Таким образом, сохранилась ранее описанная закономерность по АОА образцов CHE-K, CHP-K, CHS-K и FA. Для остальных образцов отмечена значительно более низкая (в среднем 16,4 – 10,2 %) базальная АОА. Аналогичная картина распределения активности после добавления в инкубационную среду прооксиданта также отмечена и для образцов ГВ-AgNPs: наиболее активными остались образцы CHS-AgNPs (47,9 ± 1,5 %) и CHP-AgNPs (38,0 ± 2,6 %), несколько меньшая активность отмечена для CHE-AgNPs (22,3 ± 1,4 %) и FA-AgNPs (18,4 ± 3,1 %), также была отмечена достаточно высокая АОА Peat1 (23,1 ± 3,6 %). Для оставшихся двух образцов отмечена наименьшая АОА.

С позиций влияния на процессы окислительного стресса в ране наиболее перспективными образцами в качестве фармацевтических агентов для лечения гнойно-воспалительных процессов являются три образца ГВ-AgNPs – CHS-AgNPs, CHP-AgNPs и CHE-AgNPs.

Результаты исследования АОА AgNPs различного происхождения часто противоречивы [29]. Известно, что способность AgNPs связывать свободные радикалы и прерывать цепные процессы окисления обусловлена в первую очередь антиоксидантной и, в частности, антирадикальной активностью исходных матриц, используемых для синтеза [29].

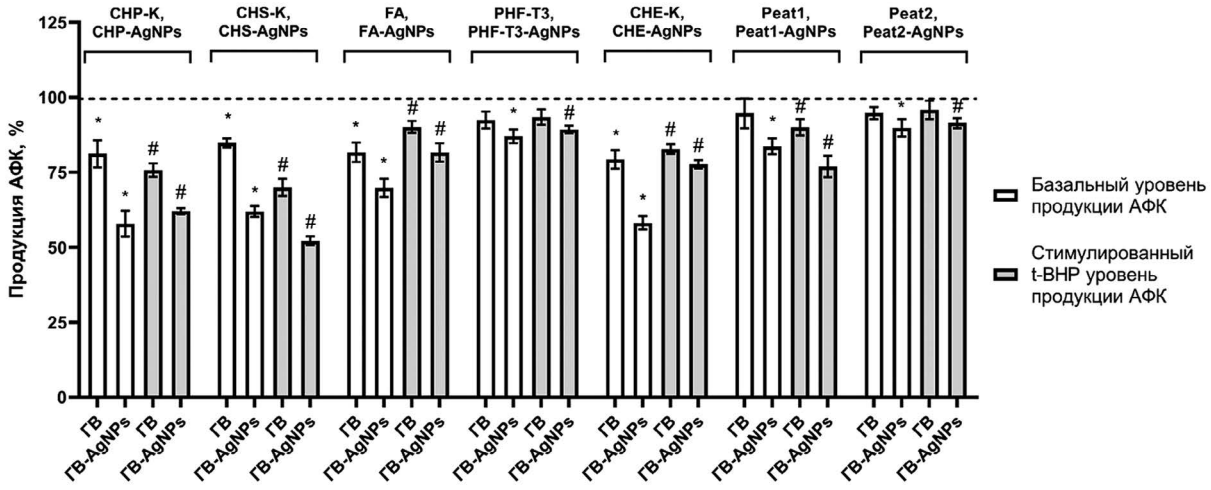

Рисунок 2. Влияние матриц гуминовых веществ (ГВ) и серебросодержащих биоматериалов на их основе (ГВ-AgNPs) на базальную (без добавления прооксиданта) и стимулированную *трет*-бутилгидропероксидом (t-BHP) внутриклеточную продукцию активных форм кислорода (АФК) в культуре клеток линии 3T3-L1.

Примечания. * Отличия от базального уровня АФК в культуре клеток 3T3-L1 статистически значимы, $p < 0,05$; # – отличия от стимулированного t-BHP уровня АФК в культуре клеток 3T3-L1 статистически значимы, $p < 0,05$

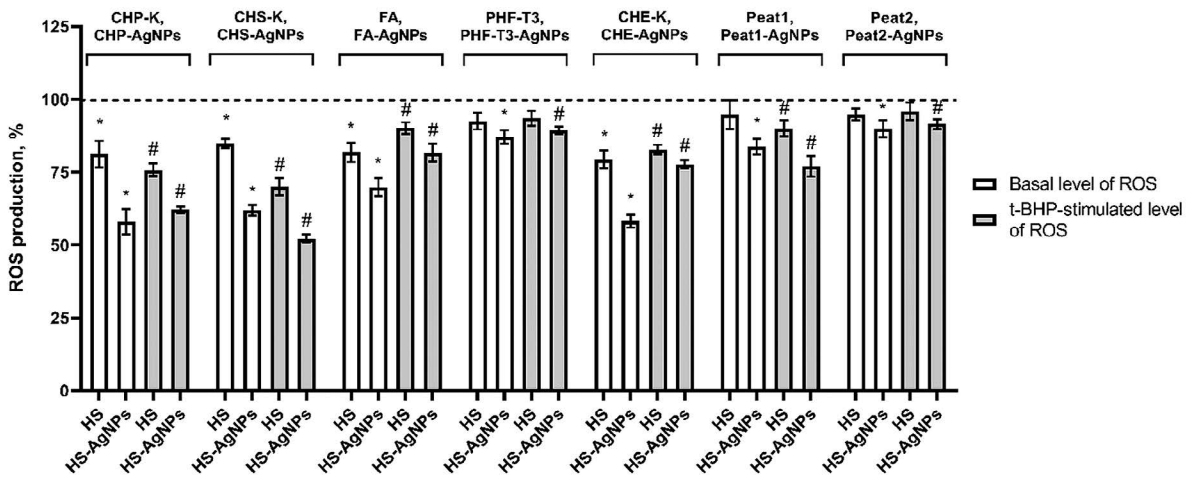

Figure 2. Influence of matrices of humic substances (HS) and silver-containing biomaterials (HS-AgNPs) on the basal (without the addition of a prooxidant) and stimulated by *tert*-butyl hydroperoxide (t-BHP) intracellular production of reactive oxygen species (ROS) in the cell line 3T3-L1.

Notes. * Differences from the basal ROS level in the 3T3-L1 cell culture are statistically significant, $p < 0.05$; # – differences from the t-BHP-stimulated ROS level in the 3T3-L1 cell culture are statistically significant, $p < 0.05$

ГВ обладают собственной выраженной АОА вследствие наличия в их молекулярном строении определенных структурных детерминант [18], они содержат большое количество фрагментов, способных к окислению. Один из механизмов АОА ГВ реализуется за счет наличия большого количества фенольных гидроксилов в их структуре, что позволяет перехватывать свободные радикалы в реакции:

$$AH + R\bullet \rightarrow A\bullet + RH,$$

где AH – антиоксидант с подвижным атомом водорода; R• – радикальный инициатор или промежуточный радикальный продукт свободно-радикального окисления.

ГВ также обладают высокой каталитической активностью в реакциях электровосстановления кислорода за счет наличия в их структуре хиноидных группировок [18, 30–31], что в совокупности с наличием стабилизированных жесткой полимерной матрицей органических радикалов семихинонного типа [18, 32] говорит об их высокой активности как восстановителей и ловушек свободных радикалов.

В наших экспериментах показана более выраженная АОА ГВ-AgNPs в сравнении с исходными матрицами ГВ. Известно, что серебро является катализатором восстановительных реакций, лежащих в основе реализации антиоксидантных эффектов, а придание серебру наноразмерной формы повышает его реакционную способность за счет дисперсионных свойств частиц и высокого отношения площади их поверхности к объему частицы [33–36]. Ранее было продемонстрировано, что AgNPs могут использоваться в качестве каталитических агентов в реакциях восстановления метиленовой сини [34], азокрасителей Direct Orange 26 (DO26) и Direct Blue 15 (DB15) [35], а также 4-нитрофенола [33, 36]. Таким образом, более высокая АОА ГВ-AgNPs в отношении интрацеллюлярных АФК объясняется собственной высокой радикал-связывающей активностью ГВ, в то время как AgNPs катализируют восстановительные процессы их взаимодействия с АФК. Механизмы каталитической активности AgNPs в случае антирадикальных реакций требуют дальнейшего углубленного изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании проведена оценка влияния 7 образцов серебросодержащих бионаноматериалов ГВ-AgNPs, синтезированных в Лаборатории природных гуминовых систем химического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, а также исходных матриц ГВ на базальную и стимулированную t-BHP продукцию АФК в культуре клеток нормальных фибробластов 3T3-L1 *in vitro*. Три образца ГВ-AgNPs (CHS-AgNPs, CHP-AgNPs и CHE-AgNPs) являются наиболее перспективными в качестве фармацевтических агентов для лечения гнойно-воспалительных процессов в контексте влияния на окислительно-восстановительный баланс в ране. В качестве предполагаемого механизма АОА исследуемых ГВ-AgNPs предлагается первичная роль исходных ГВ как доноров протона, восстановителей и ловушек свободных радикалов, в то время как AgNPs выполняют функции катализатора процесса взаимодействия ГВ с АФК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anjum S., Hashim M., Malik S. A., Khan M., Lorenzo J. M., Abbasi B. H., Hano, C. Recent Advances in Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) for Cancer Diagnosis, Target Drug Delivery, and Treatment. *Cancers*. 2021;13(18):4570. DOI: 10.3390/cancers13184570.
2. Abbasi E., Milani M., Fekri Aval S., Kouhi M., Akbarzadeh A., Tayefi Nasrabadi H., Nikasa P., Joo S.W., Hanifehpour Y., Nejati-Koshki K., Samiei M. Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. *Critical reviews in microbiology*. 2016;42(2):173–180. DOI: 10.3109/1040841X.2014.912200.

3. Paladini F., Pollini M. Antimicrobial silver nanoparticles for wound healing application: progress and future trends. *Materials*. 2019;12(16):2540. DOI: 10.3390/ma12162540.
4. GhavamiNejad A., Park C. H., Kim C. S. In situ synthesis of antimicrobial silver nanoparticles within antifouling zwitterionic hydrogels by catecholic redox chemistry for wound healing application. *Biomacromolecules*. 2016;17(3):1213–1223. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b00039.
5. Tian X., Jiang X., Welch C., Croley T. R., Wong T. Y., Chen C., Fan S., Chong Y., Li R., Ge C., Chen C., Yin J. J. Bactericidal effects of silver nanoparticles on lactobacilli and the underlying mechanism. *ACS applied materials & interfaces*. 2018;10(10):8443–8450. DOI: 10.1021/acsami.7b17274.
6. Netala V. R., Bethu M. S., Pushpalatha B., Baki V. B., Aishwarya S., Rao J. V., Tartte V. Biogenesis of silver nanoparticles using endophytic fungus Pestalotiopsis microspora and evaluation of their antioxidant and anticancer activities. *International journal of nanomedicine*. 2016;11:5683. DOI: 10.2147/IJN.S112857.
7. Comino-Sanz I. M., López-Franco M. D., Castro B., Pancorbo-Hidalgo P. L. The Role of Antioxidants on Wound Healing: A Review of the Current Evidence. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(16):3558. DOI: 10.3390/jcm10163558.
8. Velnar T., Bailey T., Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*. 2009;37(5):1528–1542. DOI: 10.1177/147323000903700531.
9. Rosenbaum A. J., Banerjee S., Rezak K. M., Uhl R. L. Advances in wound management. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2018;26(23):833–843. DOI: 10.5435/JAAOS-D-17-00024.
10. Cano Sanchez M., Lancel S., Boulanger E., Neviere R. Targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the treatment of impaired wound healing: a systematic review. *Antioxidants (Basel)*. 2018;7(8):98. DOI: 10.3390/antiox7080098.
11. Rodriguez P. G., Felix F. N., Woodley D. T., Shim E. K. The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatologic surgery*. 2008;34(9):1159–1169. DOI: 10.1177/147323000903700531.
12. Bryan N., Ahswin H., Smart N., Bayon Y., Wohlert S., Hunt J. A. Reactive oxygen species (ROS)–a family of fate deciding molecules pivotal in constructive inflammation and wound healing. *Eur Cell Mater*. 2012;24:249–265. DOI: 10.22203/ecm.v024a18.
13. Dunnill C., Patton T., Brennan J., Barrett J., Dryden M., Cooke J., Leaper D., Georgopoulos N. T. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International wound journal*. 2017;14(1):89–96. DOI: 10.1111/iwj.12557.
14. Musino D., Devcic J., Lelong C., Luche S., Rivard C., Dalzon B., Landrot G., Rabilloud T., Capron, I. Impact of Physico-Chemical Properties of Cellulose Nanocrystal/Silver Nanoparticle Hybrid Suspensions on Their Biocidal and Toxicological Effects. *Nanomaterials*. 2021;11(7):1862. DOI: 10.3390/nano11071862.
15. Alahmad A., Feldhoff A., Bigall N. C., Rusch P., Scheper T., Walter J. G. Hypericum perforatum L.-mediated green synthesis of silver nanoparticles exhibiting antioxidant and anticancer activities. *Nanomaterials*. 2021;11(2);487. DOI: 10.3390/nano11020487.
16. Nguyen T. H. A., Nguyen V. C., Phan T. N. H., Le V. T., Vasseghian Y., Trubitsyn M. A., Nguyen A. T., Chau T. P., Doan V. D. Novel biogenic silver and gold nanoparticles for multifunctional applications: Green synthesis, catalytic and antibacterial activity, and colorimetric detection of Fe (III) ions. *Chemosphere*. 2021;287(3):132271. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.132271.
17. Aboyewa J. A., Sibuyi N. R., Meyer M., Oguntibeju O. O. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles Using Some Selected Medicinal Plants from Southern Africa and Their Biological Applications. *Plants*. 2021;10(9);1929. DOI: 10.3390/plants10091929.
18. Zykova M. V., Schepetkin I. A., Belousov M. V., Krivoshchekov S. V., Logvinova L. A., Bratishko K. A., Yusubov M. S., Romanenko S. V., Quinn M. T. Physicochemical characterization and antioxidant activity of humic acids isolated from peat of various origins. *Molecules*. 2018;23(4):753. DOI: 10.3390/molecules23040753.
19. Orlov D. S. Humus acids of soils. Rotterdam: AA Balkema; 1985. 378 p.
20. Schepetkin I., Khlebnikov A., Kwon B. S. Medical drugs from humus matter: focus on mumie. *Drug development research*. 2002;57(3):140–159. DOI: 10.1002/ddr.10058.
21. Trofimova E. S., Zykova M. V., Ligacheva A. A., Sherstoboev E. Y., Zhdanov V. V., Belousov M. V., Krivoshchekov S. V., Danilets M. G., Dygai A. M. Influence of humic acids extracted from peat by different methods on functional activity of macrophages in vitro. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2017;162(6):741–745. DOI: 10.1007/s10517-017-3702-5.
22. Jooné G. K., Dekker J., van Rensburg C. E. J. Investigation of the immunostimulatory properties of oxihumate. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*. 2003;58(3–4):263–267. DOI: 10.1515/znc-2003-3-421.
23. Жаркова Л. П., Князева И. Р., Иванов В. В., Большаков М. А., Кутенков О. П., Ростов В. В. Влияние импульсно-периодического рентгеновского и микроволнового излучений на уровень перекисей в изолированных гепатоцитах. *Вестник Томского государственного университета*. 2010;333:161–163.
24. Laghrib F., Houcini H., Khalil F., Liba A., Bakasse M., Lahrich S., El Mhammedi M. A. Synthesis of Silver Nanoparticles Using Chitosan as Stabilizer Agent: Application towards Electrocatalytical Reduction of p-Nitrophenol. *ChemistrySelect*. 2020;5(3):1220–1227. DOI: 10.1002/slct.201903955.
25. Nasirizadeh N., Shekari Z., Dehghani M., Makarem S. Delphinidin immobilized on silver nanoparticles for the simultaneous determination of ascorbic acid, noradrenalin, uric acid, and tryptophan. *Journal of food and drug analysis*. 2016;24(2):406–416. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.11.011.
26. Ha D. T., Oh J., Khoi N. M., Dao T. T., Dung L. V., Do T. N. Q., Lee S. M., Jang T. S., Jeong G., Na M. In vitro and in vivo hepatoprotective effect of ganodermanontriol against t-BHP-induced oxidative stress. *Journal of ethnopharmacology*. 2013;150(3):875–885. DOI: 10.1016/j.jep.2013.09.039.
27. Ye H., Luo J., Hu D., Yang S., Zhang A., Qiu Y., Ma X., Wang J., Hou J., Bai J. Total Flavonoids of Crocus sativus Petals Release tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress in BRL-3A Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021;2021:1–15. DOI: 10.1155/2021/5453047.
28. Заводник И. Б. Образование активных форм кислорода и морфологические изменения клеток линии В14 при окислительном воздействии, индуцируемом органическим гидропероксидом. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. 2015;3:104–108.
29. Bedlovičová Z., Strapáč I., Baláž M., Salayová A. A brief overview on antioxidant activity determination of silver nanoparticles. *Molecule*. 2020;25(14):3191. DOI: 10.3390/molecules25143191.
30. Aeschbacher M., Graf C., Schwarzenbach R. P., Sander M. Antioxidant properties of humic substances. *Environ Sci Technol*. 2012;1;46(9):4916–4925. DOI: 10.1021/es300039h.
31. Братишко К. А., Зыкова М. В., Иванов В. В., Буйко Е. Е., Дрыгунова Л. А., Перминова И. В., Белоусов М. В. Гуминовые кислоты торфа – перспективные биологически активные вещества с антиоксидантной активностью для разработки протекторных средств. *Химия растительного сырья*. 2021;1:287–298. DOI: 10.14258/jcprm.2021018784
32. Klavins M., Sire J. Variations of humic acids properties within peat profiles. *Mires and peat*. 2010;4:175–197.
33. Vijilvani C., Bindhu M. R., Frincy F. C., AlSalhi M. S., Sabitha S., Saravanakumar K., Devanesan S., Umavedi M., Aljaafreh M. J., Atif M. Antimicrobial and catalytic activities of biosynthesized gold, silver and palladium nanoparticles from Solanum nigurum leaves. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2020;202:111713. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2019.111713.
34. Du L., Xu Q., Huang M., Xian L., Feng J. X. Synthesis of small silver nanoparticles under light radiation by fungus Penicillium oxalicum and its application for the catalytic reduction of methylene blue. *Materials Chemistry and Physics*. 2015;160:40–47. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2015.04.003.
35. Hu D., Yang X., Chen W., Feng Z., Hu C., Yan F., Chen X., Qu D., Chen Z. Rhodiola rosea Rhizome Extract-Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Evaluation of Their Potential Antioxidant and Catalytic Reduction Activities. *ACS omega*. 2021;6(38):24450–24461. DOI: 10.1021/acsomega.1c02843.
36. Bharadwaj K. K., Rabha B., Pati S., Choudhury B. K., Sarkar T., Gogoi S. K., Kakati N., Baishya D., Kari Z. A., Edinur H. A. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Diospyros malabarica Fruit Extract and Assessments of Their Antimicrobial, Anticancer and Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol (4-NP). *Nanomaterials*. 2021;11(8):1999. DOI: 10.1021/acsomega.1c02843.

REFERENCES

1. Anjum S., Hashim M., Malik S. A., Khan M., Lorenzo J. M., Abbasi B. H., Hano, C. Recent Advances in Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) for Cancer Diagnosis, Target Drug Delivery, and Treatment. *Cancers*. 2021;13(18):4570. DOI: 10.3390/cancers13184570.

2. Abbasi E., Milani M., Fekri Aval S., Kouhi M., Akbarzadeh A., Tayefi Nasrabadi H., Nikasa P., Joo S.W., Hanifehpour Y., Nejati-Koshki K., Samiei M. Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. *Critical reviews in microbiology*. 2016;42(2):173–180. DOI: 10.3109/1040841X.2014.912200.
3. Paladini F., Pollini M. Antimicrobial silver nanoparticles for wound healing application: progress and future trends. *Materials*. 2019;12(16):2540. DOI: 10.3390/ma12162540.
4. GhavamiNejad A., Park C. H., Kim C. S. In situ synthesis of antimicrobial silver nanoparticles within antifouling zwitterionic hydrogels by catecholic redox chemistry for wound healing application. *Biomacromolecules*. 2016;17(3):1213–1223. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b00039.
5. Tian X., Jiang X., Welch C., Croley T. R., Wong T. Y., Chen C., Fan S., Chong Y., Li R., Ge C., Chen C., Yin J. J. Bactericidal effects of silver nanoparticles on lactobacilli and the underlying mechanism. *ACS applied materials & interfaces*. 2018;10(10):8443–8450. DOI: 10.1021/acsami.7b17274.
6. Netala V. R., Bethu M. S., Pushpalatha B., Baki V. B., Aishwarya S., Rao J. V., Tartte V. Biogenesis of silver nanoparticles using endophytic fungus Pestalotiopsis microspora and evaluation of their antioxidant and anticancer activities. *International journal of nanomedicine*. 2016;11:5683. DOI: 10.2147/IJN.S112857.
7. Comino-Sanz I. M., López-Franco M. D., Castro B., Pancorbo-Hidalgo P. L. The Role of Antioxidants on Wound Healing: A Review of the Current Evidence. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(16):3558. DOI: 10.3390/jcm10163558.
8. Velnar T., Bailey T., Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*. 2009;37(5):1528–1542. DOI: 10.1177/147323000903700531.
9. Rosenbaum A. J., Banerjee S., Rezak K. M., Uhl R. L. Advances in wound management. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2018;26(23):833–843. DOI: 10.5435/JAAOS-D-17-00024.
10. Cano Sanchez M., Lancel S., Boulanger E., Neviere R. Targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the treatment of impaired wound healing: a systematic review. *Antioxidants (Basel)*. 2018;7(8):98. DOI: 10.3390/antiox7080098.
11. Rodriguez P. G., Felix F. N., Woodley D. T., Shim E. K. The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatologic surgery*. 2008;34(9):1159–1169. DOI: 10.1177/1473230009037005 31.
12. Bryan N., Ahswin H., Smart N., Bayon Y., Wohlert S., Hunt J. A. Reactive oxygen species (ROS)–a family of fate deciding molecules pivotal in constructive inflammation and wound healing. *Eur Cell Mater*. 2012;24:249–265. DOI: 10.22203/ecm.v024a18.
13. Dunnill C., Patton T., Brennan J., Barrett J., Dryden M., Cooke J., Leaper D., Georgopoulos N. T. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International wound journal*. 2017;14(1):89–96. DOI: 10.1111/iwj.12557.
14. Musino D., Devcic J., Lelong C., Luche S., Rivard C., Dalzon B., Landrot G., Rabilloud T., Capron, I. Impact of Physico-Chemical Properties of Cellulose Nanocrystal/Silver Nanoparticle Hybrid Suspensions on Their Biocidal and Toxicological Effects. *Nanomaterials*. 2021;11(7):1862. DOI: 10.3390/nano11071862.
15. Alahmad A., Feldhoff A., Bigall N. C., Rusch P., Scheper T., Walter J. G. Hypericum perforatum L.-mediated green synthesis of silver nanoparticles exhibiting antioxidant and anticancer activities. *Nanomaterials*. 2021;11(2);487. DOI: 10.3390/nano11020487.
16. Nguyen T. H. A., Nguyen V. C., Phan T. N. H., Le V. T., Vasseghian Y., Trubitsyn M. A., Nguyen A. T., Chau T. P., Doan V. D. Novel biogenic silver and gold nanoparticles for multifunctional applications: Green synthesis, catalytic and antibacterial activity, and colorimetric detection of Fe (III) ions. *Chemosphere*. 2021;287(3):132271. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.132271.
17. Aboyewa J. A., Sibuyi N. R., Meyer M., Oguntibeju O. O. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles Using Some Selected Medicinal Plants from Southern Africa and Their Biological Applications. *Plants*. 2021;10(9);1929. DOI: 10.3390/plants10091929.
18. Zykova M. V., Schepetkin I. A., Belousov M. V., Krivoshchekov S. V., Logvinova L. A., Bratishko K. A., Yusubov M. S., Romanenko S. V., Quinn M. T. Physicochemical characterization and antioxidant activity of humic acids isolated from peat of various origins. *Molecules*. 2018;23(4):753. DOI: 10.3390/molecules23040753.
19. Orlov D. S. Humus acids of soils. Rotterdam: AA Balkema; 1985. 378 p.
20. Schepetkin I., Khlebnikov A., Kwon B. S. Medical drugs from humus matter: focus on mumie. *Drug development research*. 2002;57(3):140–159. DOI: 10.1002/ddr.10058.
21. Trofimova E. S., Zykova M. V., Ligacheva A. A., Sherstoboev E. Y., Zhdanov V. V., Belousov M. V., Krivoshchekov S. V., Danilets M. G., Dygai A. M. Influence of humic acids extracted from peat by different methods on functional activity of macrophages in vitro. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2017;162(6):741–745. DOI: 10.1007/s10517-017-3702-5.
22. Jooné G. K., Dekker J., van Rensburg C. E. J. Investigation of the immunostimulatory properties of oxihumate. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*. 2003;58(3–4):263–267. DOI: 10.1515/znc-2003-3-421.
23. Жаркова Л. П., Князева И. Р., Иванов В. В., Большаков М. А., Кутенков О. П., Ростов В. В. Влияние импульсно-периодического рентгеновского и микроволнового излучений на уровень перекисей в изолированных гепатоцитах. *Вестник Томского государственного университета*. 2010;333:161–163.
24. Laghrib F., Houcini H., Khalil F., Liba A., Bakasse M., Lahrich S., El Mhammedi M. A. Synthesis of Silver Nanoparticles Using Chitosan as Stabilizer Agent: Application towards Electrocatalytical Reduction of p-Nitrophenol. *ChemistrySelect*. 2020;5(3):1220–1227. DOI: 10.1002/slct.201903955.
25. Nasirizadeh N., Shekari Z., Dehghani M., Makarem S. Delphinidin immobilized on silver nanoparticles for the simultaneous determination of ascorbic acid, noradrenalin, uric acid, and tryptophan. *Journal of food and drug analysis*. 2016;24(2):406–416. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.11.011.
26. Ha D. T., Oh J., Khoi N. M., Dao T. T., Dung L. V., Do T. N. Q., Lee S. M., Jang T. S., Jeong G., Na M. In vitro and in vivo hepatoprotective effect of ganodermanontriol against t-BHP-induced oxidative stress. *Journal of ethnopharmacology*. 2013;150(3):875–885. DOI: 10.1016/j.jep.2013.09.039.
27. Ye H., Luo J., Hu D., Yang S., Zhang A., Qiu Y., Ma X., Wang J., Hou J., Bai J. Total Flavonoids of Crocus sativus Petals Release tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress in BRL-3A Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021;2021:1–15. DOI: 10.1155/2021/5453047.
28. Zavodnik I. B. Reactive oxygen species generation and B14 cells morphological transformations under oxidative treatment by organic hydroperoxide. *Izvestiya Natsional'noy akademii nauk Belarusi. Seriya biologicheskikh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2015;3:104–108. (In Russ.)
29. Bedlovičová Z., Strapáč I., Baláž M., Salayová A. A brief overview on antioxidant activity determination of silver nanoparticles. *Molecule*. 2020;25(14):3191. DOI: 10.3390/molecules25143191.
30. Aeschbacher M., Graf C., Schwarzenbach R. P., Sander M. Antioxidant properties of humic substances. *Environ Sci Technol*. 2012;1;46(9):4916–4925. DOI: 10.1021/es300039h.
31. Bratishko K. A., Zykova M. V., Ivanov V. V., Buyko E. E., Drygunova L. A., Perminova I. V., Belousov M. V. Peat humic acids–prospective biologically active substances with antioxidant activity for the development of protective agents. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*. 2021;1:287–298. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2021018784.
32. Klavins M., Sire J. Variations of humic acids properties within peat profiles. *Mires and peat*. 2010;4:175–197.
33. Vijilvani C., Bindhu M. R., Frincy F. C., AlSalhi M. S., Sabitha S., Saravanakumar K., Devanesan S., Umavedi M., Aljaafreh M. J., Atif M. Antimicrobial and catalytic activities of biosynthesized gold, silver and palladium nanoparticles from Solanum nigurum leaves. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2020;202:111713. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2019.111713.
34. Du L., Xu Q., Huang M., Xian L., Feng J. X. Synthesis of small silver nanoparticles under light radiation by fungus Penicillium oxalicum and its application for the catalytic reduction of methylene blue. *Materials Chemistry and Physics*. 2015;160:40–47. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2015.04.003.
35. Hu D., Yang X., Chen W., Feng Z., Hu C., Yan F., Chen X., Qu D., Chen Z. Rhodiola rosea Rhizome Extract-Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Evaluation of Their Potential Antioxidant and Catalytic Reduction Activities. *ACS omega*. 2021;6(38):24450–24461. DOI: 10.1021/acsomega.1c02843.
36. Bharadwaj K. K., Rabha B., Pati S., Choudhury B. K., Sarkar T., Gogoi S. K., Kakati N., Baishya D., Kari Z. A., Edinur H. A. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Diospyros malabarica Fruit Extract and Assessments of Their Antimicrobial, Anticancer and Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol (4-NP). *Nanomaterials*. 2021;11(8):1999. DOI: 10.1021/acsomega.1c02843.