

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-64-69>
УДК 547.992.2:57.02



Оригинальная статья / Research article

Роль сигнального каскада IKK-2/NF-κB в активации перитонеальных макрофагов гуминовыми кислотами торфа

Е. С. Трофимова^{1,2}✉, М. В. Зыкова², А. А. Лигачева¹, М. Г. Данилец¹, Е. Ю. Шерстобоев¹,
А. В. Цупко², Д. А. Михалёв², М. В. Белоусов²

¹ НИИФирМ им. Е. Д. Гольдберга Томского НИМЦ, 634028, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 3

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

✉ Контактное лицо: Трофимова Евгения Сергеевна. E-mail: trofimova_es@pharmso.ru

ORCID: Е. С. Трофимова – <https://orcid.org/0000-0002-5367-715X>; М. В. Зыкова – <https://orcid.org/0000-0002-1973-8983>; А. А. Лигачева – <https://orcid.org/0000-0002-3337-1516>;
М. Г. Данилец – <https://orcid.org/0000-0001-7862-4778>; Е. Ю. Шерстобоев – <https://orcid.org/0000-0002-6178-5329>; А. В. Цупко – <https://orcid.org/0000-0001-7169-8846>;
Д. А. Михалёв – <https://orcid.org/0000-00002-5292-1368>; М. В. Белоусов – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Статья поступила: 27.06.2022

Статья принята в печать: 15.08.2022

Статья опубликована: 25.08.2022

Резюме

Введение. Макрофаги занимают особое место в формировании и координации иммунного ответа, их популяция характеризуется гетерогенностью, однако среди них выделяют два основных типа: провоспалительные (классически активированные) макрофаги M1, которые активируются интерфероном-γ (ИФН-γ) или липополисахаридом (ЛПС) бактерий, продуцируют провоспалительные цитокины, оксид азота (NO) и инициируют иммунный ответ, и противовоспалительные (альтернативно активированные) макрофаги M2, которые активируются такими цитокинами как интерлейкин 1 (ИЛ-1), ИЛ-10 или ИЛ-13 и связаны с подавлением иммунного ответа и заживлением тканей. Провоспалительные свойства макрофагов чаще всего связывают с активацией внутриклеточного сигнального каскада с участием киназного комплекса IKK-2 и ядерного фактора-κB (NF-κB), который является важнейшей молекулой сигнальной трансдукции. Ранее было показано, что гуминовые кислоты (ГК) торфа вызывают появление у макрофагов провоспалительных свойств, однако внутриклеточные механизмы такой активации не изучены.

Цель. Изучение вклада внутриклеточного сигнального каскада IKK-2/NF-κB в процесс активации провоспалительных свойств макрофагов гуминовыми кислотами торфа.

Материалы и методы. Исследования проводили с помощью культуральных методов, а также методом вестерн-блоттинга.

Результаты и обсуждение. Показано, что добавление ингибитора киназы IKK-2 в культуру макрофагов снижало способность ГК стимулировать продукцию оксида азота исследуемыми клетками. Методом вестерн-блоттинга выявлено, что через 30 минут после совместной инкубации ГК с макрофагами содержание молекулы NF-κB p65 в клетках увеличивалось, через 60 минут снижалось до показателей интактного контроля, а через 17 часов уменьшалось в 3 раза по сравнению с контрольным уровнем. Однако ингибитор IKK-2 после 30-минутной инкубации не оказывал блокирующего влияния на киназу IKK, тогда как через час после совместной инкубации клеток с ингибитором и веществами наблюдалось снижение уровня NF-κB p65. Эта тенденция сохранялась и к 17 часам.

Заключение. Стимулирующее действие гуминовых кислот торфа на макрофаги реализуется, в том числе, за счет активации киназного комплекса IKK-2 с дальнейшим высвобождением субъединицы p65 молекулы NF-κB. Прослеживается зависимость степени активации NF-κB от срока взаимодействия клетки с активирующими агентами. ГК осуществляют запуск внутриклеточного сигнального каскада ядерного фактора NF-κB уже в течение первых 30 минут.

Ключевые слова: гуминовые кислоты, оксид азота, IKK-2, NF-κB, иммуноблоттинг

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

Вклад авторов. М. В. Зыкова, М. В. Белоусов, М. Г. Данилец и Е. Ю. Шерстобоев обосновали актуальность работы. А. В. Цупко, Д. А. Михалёв, М. В. Зыкова синтезировали образцы и провели их стандартизацию. Е. С. Трофимова, А. А. Лигачева разработали и провели эксперимент. А. А. Лигачева участвовала в обработке данных. Е. С. Трофимова, М. Г. Данилец проводили теоретические расчеты. Е. С. Трофимова, М. Г. Данилец, М. В. Зыкова, М. В. Белоусов участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 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 и были одобрены биоэтическим комитетом НИИФирМ им. Е. Д. Гольдберга, протокол № 98122015.

Для цитирования: Трофимова Е. С., Зыкова М. В., Лигачева А. А., Данилец М. Г., Шерстобоев Е. Ю., Цупко А. В., Михалёв Д. А., Белоусов М. В. Роль сигнального каскада IKK-2/NF-κB в активации перитонеальных макрофагов гуминовыми кислотами торфа. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):64–69. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-64-69>

The Role of IKK-2/NF-κB Signaling Cascade in the Activation of Peritoneal Macrophages by Humic Acids of Peat

Evgenia S. Trofimova^{1,2}✉, Maria V. Zyкова², Anastasia A. Ligacheva¹, Marina G. Danilets¹,
Evgenii Yu. Sherstoboev¹, Andrey V. Tsupko², Dmitrii A. Mikhalev², Mikhail V. Belousov²

¹ Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk NRCM, 3, Lenin Av., Tomsk, 634028, Russia

² Siberian State Medical University, 2, Moskovsky tract, Tomsk, 634050, Russia

© Трофимова Е. С., Зыкова М. В., Лигачева А. А., Данилец М. Г., Шерстобоев Е. Ю., Цупко А. В., Михалёв Д. А., Белоусов М. В., 2022

© Trofimova E. S., Zyкова M. V., Ligacheva A. A., Danilets M. G., Sherstoboev E. Yu., Tsupko A. V., Mikhalev D. A., Belousov M. V., 2022

✉ **Corresponding author:** Evgenia S. Trofimova. **E-mail:** trofimova_es@pharmso.ru

ORCID: Evgenia S. Trofimova – <https://orcid.org/0000-0002-5367-715X>; Maria V. Zykova – <https://orcid.org/0000-0002-1973-8983>;
Anastasia A. Ligacheva – <https://orcid.org/0000-0002-3337-1516>; Marina G. Danilets – <https://orcid.org/0000-0001-7862-4778>;
Evgenii Yu. Sherstoboev – <https://orcid.org/0000-0002-6178-5329>; Andrey V. Tsupko – <https://orcid.org/0000-0001-7169-8846>;
Dmitrii A. Mikhalev – <https://orcid.org/0000-00002-5292-1368>; Mikhail V. Belousov – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Received: 27.06.2022

Revised: 15.08.2022

Published: 25.08.2022

Abstract

Introduction. Macrophages occupy a special place in the formation and coordination of the immune response, their population is characterized by heterogeneity, however, two main types are distinguished among them: pro-inflammatory (classically activated) macrophages M1, which are activated by interferon- γ (IFN- γ) or lipopolysaccharide (LPS) of bacteria, produce pro-inflammatory cytokines, nitric oxide (NO) and initiate an immune response, and anti-inflammatory (alternatively activated) macrophages M2, which are activated by such cytokines as interleukin 1 (IL-1), IL-10 or IL-13 and are associated with suppression of the immune response and tissue healing. The proinflammatory properties of macrophages are most often associated with the activation of an intracellular signaling cascade with the participation of the IKK-2 kinase complex and nuclear factor- κ B (NF- κ B), which is the most important signal transduction molecule. Previously, the authors showed that humic acids (HA) of peat cause the appearance of pro-inflammatory properties in macrophages; however, the intracellular mechanisms of such activation have not been studied.

Aim. Study of the contribution of the intracellular signaling cascade IKK-2/NF- κ B to the activation of pro-inflammatory properties of macrophages by humic acids of peat.

Materials and methods. The studies were carried out using cultural methods and western blotting.

Results and discussion. It was shown that the addition of the IKK-2 inhibitor to the macrophage culture reduced the ability of HA to stimulate the production of nitric oxide by the cells. Western blotting revealed that after 30 minutes simultaneous incubation of HA with macrophages, the content of the NF- κ B p65 molecule in the cells increased, after 60 minutes it decreased to the values of intact control, and after 17 hours it decreased 3 times compared to the control level. However, the IKK-2 inhibitor after a 30-minute incubation did not have a blocking effect on the IKK kinase, whereas in an hour of the co-incubation of the cells with the inhibitor and substances, a decrease in the level of NF- κ B p65 was observed. This trend continued in 17 hours.

Conclusion. The stimulating effect of peat humic acids on macrophages is realized, among other things, due to the activation of the IKK-2 kinase complex with further release of the p65 subunit of the NF- κ B molecule. The dependence of the degree of NF- κ B activation on the period of interaction of the cell with activating agents is traced. HA start the intracellular signaling cascade of the nuclear factor NF- κ B already within the first 30 minutes.

Keywords: humic acids, nitric oxide, IKK-2, NF- κ B, immunoblotting

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, Michail V. Belousov, Marina G. Danilets and Evgenii Yu. Sherstoboev substantiated the relevance of the work. Andrey V. Tsupko, Dmitrii A. Mikhalev, Maria V. Zykova synthesized samples and carried out their standardization. Evgenia S. Trofimova, Anastasia A. Ligacheva developed and conducted the experiment. Anastasia A. Ligacheva participated in data processing. Evgenia S. Trofimova, Marina G. Danilets performed theoretical calculations. Evgenia S. Trofimova, Marina G. Danilets, Maria V. Zykova, Michail V. Belousov participated in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. This work was carried out with financial support from the Russian Science Foundation within the framework of scientific project No. 20-65-47052.

Compliance with the principles of ethics. Experiments using laboratory animals were carried out in compliance with the principles of humanity set out in the directives of the European Community (86/609/EEC) and the Helsinki Declaration and were approved by the Bioethical Committee of Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, protocol No. 98122015.

For citation: Trofimova E. S., Zykova M. V., Ligacheva A. A., Danilets M. G., Sherstoboev E. Yu., Tsupko A. V., Mikhalev D. A., Belousov M. V. The role of IKK-2/NF- κ B signaling cascade in the activation of peritoneal macrophages by humic acids of peat. *Drug development & registration*. 2022;11(3):64–69. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-64-69>

ВВЕДЕНИЕ

Путь передачи сигналов с помощью ядерного фактора- κ B (NF- κ B) является одним из наиболее значимых внутриклеточных механизмов, связанных с развитием иммунных реакций. Сигнальный путь NF- κ B активируется многочисленными экзогенными и эндогенными стимулами и является ключевым в регуляции воспалительной реакции на патогены и раковые клетки, а также аутоиммунных заболеваний. Семейство NF- κ B состоит из пяти мономеров NF- κ B (RelA/p65, RelB, cRel, NF- κ B1 p50 и NF- κ B2 p52), которые могут димеризоваться с образованием до 15 уникальных факторов транскрипции. В покоящихся клетках ядер-

ный фактор находится в цитоплазме в виде гетеродимера, инактивированного ингибиторным белком I κ B. Стимуляция цитокиновых или паттерн-распознающих рецепторов приводит к фосфорилированию киназного комплекса I κ B (IKK-2), который состоит из субъединиц IKK- β и NEMO (известный как IKK- γ). Активация IKK- β приводит к фосфорилированию I κ B, убиквитинированию, протеасомальной деградаци и высвобождению NF- κ B с последующей транслокацией в ядро и запуском транскрипции генов [1–5].

В последнее время гуминовые кислоты (ГК) стали широко использоваться в экспериментальной медицине как объект для исследований. Выявлено их гепа-

топротекторное, антиоксидантное, антибактериальное, адаптогенное, ранозаживляющее действие [6]. Кроме того, показано, что *in vitro* ГК обладают противовирусной активностью против вирусов герпеса 1 и 2 типов (HSV1, HSV2), респираторного и цитомегаловируса человека (HCMV, RSV) [7], проявляют иммуномодулирующие свойства на фоне применения антибиотиков, а также способствуют усилению сосудобразования [8].

Ранее было доказано, что ГК торфа усиливают продукцию оксида азота макрофагами (МФ), подавляют в них активность аргиназы, а также стимулируют секрецию ряда провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-12, ФНО- α , ИФН- γ) и снижают продукцию противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10) иммунокомпетентными клетками [3, 4]. Иными словами, ГК торфа вызывают активацию макрофагов по классическому пути и появление у них провоспалительных свойств, но внутриклеточные механизмы такой активации почти не изучены. Поляризация МФ зависит от целого ряда путей сигнальной внутриклеточной трансдукции, в частности, MAP киназ, JNK, PI3-киназы/Akt, NOTCH, JAK/STAT, TGF- β , TLR/NF- κ B и NIF [9, 10]. Однако провоспалительные свойства макрофагов чаще всего связывают с передачей сигнала с помощью молекулы NF- κ B [2].

В связи с этим целью нашего исследования было изучение вклада внутриклеточного сигнального каскада IKK-2/NF- κ B в процесс активации макрофагов гуминовыми кислотами торфа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ГК, которые получали из образцов верхового торфа болота «Васюганское», Томской области, которые отличались друг от друга местом отбора, глубиной отбора, степенью разложения торфа и зольностью: ГК-1 (сфагново-мочажинный торф, мочажина грядово-мочажинного комплекса, глубина отбора 20–70 см; степень разложения 5–10 %; зольность 2,77 %), ГК-2 (сосново-пушицевый торф, высокий рям, глубина отбора 10–50 см; степень разложения 30–35 %; зольность 7,25 %), ГК-3 (магелланikum торф, гряда грядово-мочажинного комплекса, глубина отбора 100–120 см; степень разложения 10–15 %; зольность 2,66 %). Образцы высушивали при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния, измельчали в роторно-ножевой мельнице, просеивали через сито (диаметр 3 мм), обрабатывали 0,1 моль/л раствором натрия пиродифосфата в массовом соотношении 1:100, перемешивали в течение 8 часов в реакторе Р-100 при температуре 25–27 °С, отделяли жидкую фазу (экстракт) ГК от твердых остатков торфа вакуумной фильтрацией (нутч-фильтр), обрабатывали экстракт кислотой хлороводородной до pH 1–2, осаждали центрифугированием, отмывали осадок водой очищенной до pH 7 и высушивали при комнатной температуре.

Исследования проводили на перитонеальных макрофагах мышей линии C57BL/6 8–10 недель (НИИФирм им. Е. Д. Гольдберга Томского НИМЦ), которые выделяли из брюшной полости промыванием ледяным раствором хлорида натрия. Из полученной перитонеальной взвеси выделяли зрелые МФ с помощью набора EasySep™ Biotin Positive Selection Kit и антител, специфических к макрофагальным рецепторам Anti-Mouse F4/80 Antibody (оба «Stem Cell», Канада, кат. № 17683, № 60027BT). Далее макрофаги ($2,5\text{--}3 \times 10^6$) культивировали в 96-луночных планшетах при 37 °С в атмосфере с 5%-м CO₂ и абсолютной влажности в среде, состоящей из RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10%-м ЭТС (HyClone, США), 20 мМ HEPES (Sigma-Aldrich, США), 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, США), 50 мкг/мл гентамицина (Sigma-Aldrich, США) и 2 мМ L-глутамин (Sigma-Aldrich, США), в присутствии образцов ГК и/или ингибитора IKK-2 в концентрации 20 нМ (Calbiochem, США, кат. № 401481), а также стандартного активатора – ЛПС (0,1 мкг/мл) (Sigma-Aldrich, США, серотип O111:B4). Через 2 суток после инкубации из лунок собирали надосады, смешивали с эквивалентным объемом реактива Грисса (Sigma-Aldrich, США) и измеряли содержание нитритов при помощи анализатора иммуноферментных реакций Униплан (АИФР-01, ЗАО «Пикон», Россия) при длине волны 540 нм.

Для определения уровня NF- κ B макрофаги инкубировали с исследуемыми веществами как описано выше в течение 30, 60 минут и 17 часов, затем собирали, отмывали фосфатно-солевым буфером и разрушали RIPA буфером (Abcam, Великобритания), содержащим коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз. Полученные лизаты разделяли на белковые фракции с помощью SDS-PAGE. Белки из геля переносили полусухим переносом на PVDT мембрану Immun-Blot® (Bio-Rad, США), затем блокировали мембрану 5%-м раствором BSA (Sigma-Aldrich, США). После этого мембрану инкубировали с первичными антителами Anti-NF- κ B p65 (Abcam, Великобритания, кат. № ab16502), а затем со вторичными HRP Goat anti-Rabbit IgG (Cedarlane, Канада, кат. № CLGRHRP). В качестве контроля загрузки использовали Anti- β -Actin-Peroxidase антитела (Sigma-Aldrich, США, кат. № A3854). Визуализацию проводили при помощи хемилюминесцентного субстрата Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, США). Денситометрический анализ выполняли с использованием геле-документирующей системы G:BOX Chemi XRQ (Syngene, Великобритания) и программного обеспечения Gene-Tools (Syngene, Великобритания).

Статистическую обработку проводили с помощью пакета Statistica 13.3, используя критерий Даннета. Проверка на нормальность распределения проводилась с помощью критерия Шапиро – Уилка. Для каждой выборки вычисляли выборочное среднее (M), ошибку среднего (m), различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе была определена способность гуминовых кислот и ЛПС (в качестве стандартного активатора макрофагов) стимулировать продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами. Все исследуемые гуминовые кислоты и ЛПС после совместной инкубации в течение 48 часов их с клетками достоверно повышали концентрацию нитритов в супернатантах. Однако ингибитор ИКК-2 не оказывал влияния на ЛПС-стимулированную продукцию оксида азота, но при этом снижал стимулирующие свойства ГК (таблица 1). Вероятно, механизм стимулирующего действия ГК на макрофаги отличается от механизма действия ЛПС и в большей степени связан с сигнальным каскадом ИКК-2/NF-κB. А действие ЛПС реализуется за счет других сигнальных каскадов или других мономеров молекулы NF-κB, либо с участием субъединицы α киназного комплекса ингибитора κB (IKK-α).

Таблица 1. Влияние ингибитора ИКК-2 на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами мышей линии C57/BL6, стимулированными гуминовыми кислотами (M ± m)

Table 1. Effect of IKK-2 inhibitor on nitric oxide production by peritoneal macrophages of C57/BL6 mice stimulated with humic acids (M ± m)

Исследуемое вещество Test substance	Концентрация, мкг/мл Concentration, µg/ml	Концентрация нитритов, мкМ Nitrite concentration, µM	
		Инкубация без ингибитора Incubation without inhibitor	Инкубация с ингибитором ИКК-2 Incubation with IKK-2 inhibitor
Среда (контроль) Medium (control)	–	3,75 ± 0,19	3,32 ± 0,06
ЛПС LPS	0,1	15,85 ± 0,20*	16,67 ± 0,06
ГК-1 HA-1	10	17,36 ± 0,28*	14,45 ± 0,13■
ГК-2 HA-2	100	14,54 ± 0,23*	8,42 ± 0,07■
ГК-3 HA-3	10	18,10 ± 0,31*	13,99 ± 0,09■

Примечание. * Различия показателя со средой без ингибитора, $p < 0,05$; ■ – различия показателя с инкубацией каждого вещества без ингибитора; $p < 0,05$; $n = 5$.

Note. * Differences with the medium without an inhibitor, $p < 0.05$; ■ – differences with the incubation of each substance without an inhibitor; $p < 0.05$; $n = 5$.

Для дальнейшего исследования внутриклеточной активации NF-κB с помощью иммуоблоттинга нами была выбрана гуминовая кислота ГК-2, поскольку ингибитор ИКК-2 наиболее эффективно отменял ее стимулирующее действие. Было выявлено, что ГК-2 вызывала увеличение содержания субъединицы p65 молекулы NF-κB в макрофагах через 30 минут после совместной инкубации в 1,3 раза относительно ин-

тактных клеток. Через 60 минут уровень p65 снижался до показателей интактного контроля, а после 17 часов инкубации был в 3 раза ниже контрольного уровня. Динамика изменений уровня NF-κB после стимуляции клеток ЛПС была аналогичной (рисунок 1). Таким образом, ГК осуществляют запуск внутриклеточного сигнального каскада ядерного фактора NF-κB уже в течение первых 30 минут, а значительное снижение содержания молекулы NF-κB в клетке к 17 часам, вероятно, связано с включением механизмов обратной связи и деградацией молекулы. Такие механизмы, например, могут напрямую зависеть от локальной концентрации NO [11]. А их биологический смысл, вероятно, заключается в прекращении иммунного ответа с целью ограничения повреждения собственных тканей.

При добавлении в культуру клеток ингибитора ИКК-2 после 30-минутной инкубации он не оказывал блокирующего влияния на киназу ИКК, поскольку уровень NF-κB p65 в макрофагах не только не уменьшался, но даже увеличивался под действием гуминовой кислоты и ЛПС по сравнению с контролем. Тогда как через час совместной инкубации клеток с ингибитором и веществами наблюдалось снижение уровня NF-κB p65. Эта тенденция сохранялась и к 17 часам (рисунок 2). Исходя из этих результатов, можно сделать вывод о том, что активирующее действие ГК происходит в течение 30 минут, а для реализации блокирующего действия ингибитора ИКК-2 требуется не менее часа. Снижение уровня NF-κB после 17 часовой инкубации макрофагов с ГК и ингибитором ИКК-2 мы связываем с тем, что к этому сроку наблюдается уменьшение экспрессии NF-κB даже без добавления ингибитора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что стимулирующее действие гуминовых кислот торфа на антигенпрезентирующие клетки в большой степени реализуется за счет активации киназного комплекса ИКК-2 с дальнейшим высвобождением субъединицы p65 молекулы NF-κB. Более того, прослеживается зависимость степени активации NF-κB от продолжительности действия активирующих агентов на клетки. Показано, что ГК осуществляют запуск внутриклеточного сигнального каскада ядерного фактора NF-κB уже в течение первых 30 минут. В отличие от ЛПС механизм стимулирующего действия ГК на макрофаги в большей степени связан с сигнальным каскадом ИКК-2/NF-κB, поскольку одновременная инкубация клеток с митогеном и ингибитором ИКК-2 не снижала выработку оксида азота.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H., Taghadosi M., Esmaeili S.-A., Mardani F., Seifi B., Mohammadi A., Afshari J.T., Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;233(9):6425–6440. DOI: 10.1002/jcp.26429.

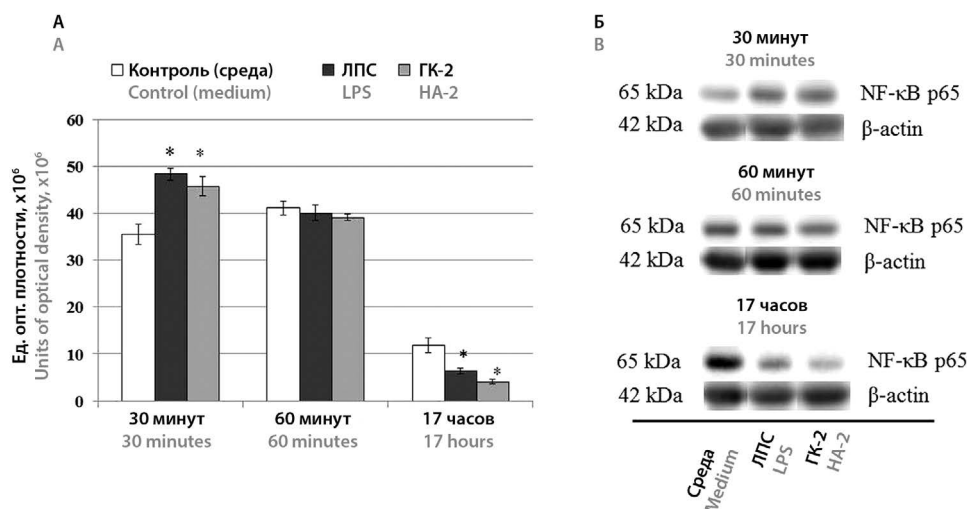


Рисунок 1. Определение уровня NF-κB p65 в перитонеальных макрофагах мышей на разных сроках активации гуминовой кислотой торфа методом иммуноблоттинга.

A – относительное содержание NF-κB p65 в перитонеальных макрофагах, выявленное с помощью денситометрических измерений на иммуноблотах; B – репрезентативные для каждой группы полосы иммуноблота.

Примечание. * Различия показателя с контролем, $p < 0,05$; $n = 3$

Figure 1. Determination of NF-κB p65 in peritoneal macrophages of mice at different periods of activation by humic acid of peat by the method of immunoblotting.

A – relative content of NF-κB p65 in peritoneal macrophages, revealed by densitometric measurements on immunoblots; B – representative immunoblot bands for each group.

Note. * Differences with control, $p < 0.05$; $n = 3$

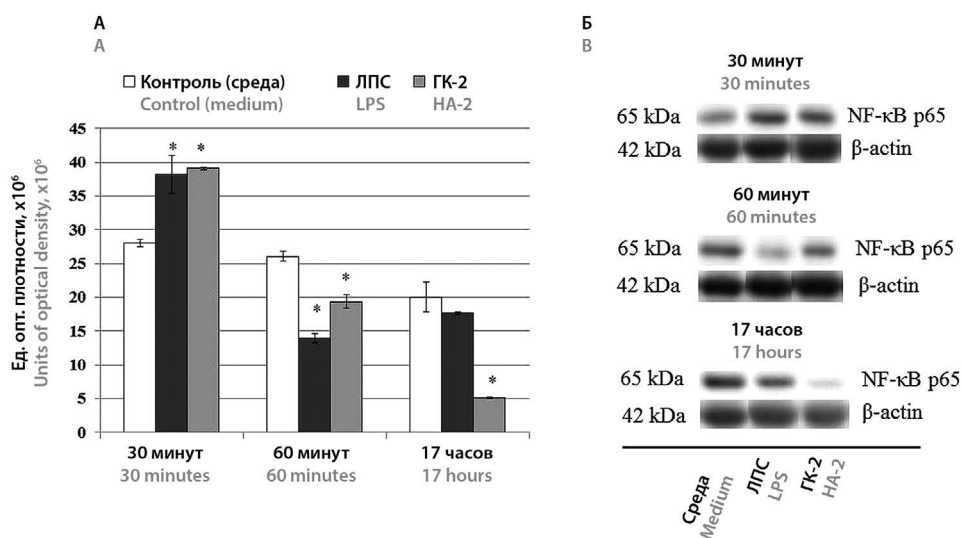


Рисунок 2. Определение уровня NF-κB p65 в перитонеальных макрофагах мышей на разных сроках активации гуминовой кислотой торфа в присутствии ингибитора ИКК-2 методом иммуноблоттинга.

A – относительное содержание NF-κB p65 в перитонеальных макрофагах, выявленное с помощью денситометрических измерений на иммуноблотах; B – репрезентативные для каждой группы полосы иммуноблота.

Примечание. * Различия показателя со средой, $p < 0,05$; $n = 3$

Figure 2. Determination of NF-κB p65 in peritoneal macrophages of mice at different periods of activation by humic acid in peat in the presence of IKK-2 inhibitor by immunoblotting.

A – relative content of NF-κB p65 in peritoneal macrophages, revealed by densitometric measurements on immunoblots; B – representative immunoblot bands for each group.

Note. * Differences with medium, $p < 0.05$; $n = 3$

- Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S. C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2017;2(17023). DOI: 10.1038/sigtrans.2017.23.
- Trofimova E. S., Ligacheva A. A., Sherstoboev E. Y., Zhdanov V. V., Danilets M. G., Dygai A. M., Zykova M. V., Belousov M. V., Yusubov M. S., Krivoshchekov S. V. 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.
- Trofimova E. S., Zykova M. V., Sherstoboev E. Yu., Danilets M. G., Ligacheva A. A., Belousov M. V. Effects of Humic Acids, Isolated from High-Moor Pine-Peat Moss-Cotton Grass Peat on the Production of Cytokines by Mouse and Human Immunocompetent Cells and on Humoral Immune Response. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2020;168(5):651–653. DOI: 10.1007/s10517-020-04772-2.
- Dorrington M. G., Fraser I. D. C. NF- κ B Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. *Frontiers in immunology*. 2019;10:705. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00705.
- Зыкова М. В., Логвинова Л. А., Белоусов М. В. Высокомолекулярные соединения гуминовой природы – перспективные биологически активные соединения. *Традиционная медицина*. 2018;2(53):27–38.
- Cagno V., Donalizio M., Civra A., Cagliero C., Rubiolo P., Lembo D. In vitro evaluation of the antiviral properties of Shilajit and investigation of its mechanisms of action. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;166:129–134. DOI: 10.1016/j.jep.2015.03.019.
- Radomska-Leśniewska D. M., Skopińska-Różewska E., Józwiak J., Demkow U., Bała B. J. Angiomodulatory properties of some antibiotics and Tolpa Peat Preparation. *Central-European Journal of Immunology*. 2016;41(1):19–24. DOI: 10.5114/ceji.2016.58312.
- Мальшев И. Ю. Феномены и сигнальные механизмы репрограммирования макрофагов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2015;59(2):99–111.
- Zhou D., Huang C., Lin Z., Zhan S., Kong L., Fang C., Li J. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signal*. 2014;26(2):192–197. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.11.004.
- Connelly L., Palacios-Callender M., Ameixa C., Moncada S., Hobbs A. J. Biphasic Regulation of NF- κ B Activity Underlies the Pro- and Anti-Inflammatory Actions of Nitric Oxide. *The Journal of Immunology*. 2001;166(6):3873–3881. DOI: 10.4049/jimmunol.166.6.3873.
- Zykova M. V., Logvinova L. A., Belousov M. V. High-molecular-weight compounds of humic nature – promising bioactive compounds. *Traditsionnaya meditsina*. 2018;2(53):27–38. (In Russ.)
- Cagno V., Donalizio M., Civra A., Cagliero C., Rubiolo P., Lembo D. In vitro evaluation of the antiviral properties of Shilajit and investigation of its mechanisms of action. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;166:129–134. DOI: 10.1016/j.jep.2015.03.019.
- Radomska-Leśniewska D. M., Skopińska-Różewska E., Józwiak J., Demkow U., Bała B. J. Angiomodulatory properties of some antibiotics and Tolpa Peat Preparation. *Central-European Journal of Immunology*. 2016;41(1):19–24. DOI: 10.5114/ceji.2016.58312.
- Мальшев И. Ю. Феномены и сигнальные механизмы репрограммирования макрофагов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2015;59(2):99–111.
- Zhou D., Huang C., Lin Z., Zhan S., Kong L., Fang C., Li J. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signal*. 2014;26(2):192–197. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.11.004.
- Connelly L., Palacios-Callender M., Ameixa C., Moncada S., Hobbs A. J. Biphasic Regulation of NF- κ B Activity Underlies the Pro- and Anti-Inflammatory Actions of Nitric Oxide. *The Journal of Immunology*. 2001;166(6):3873–3881. DOI: 10.4049/jimmunol.166.6.3873.

REFERENCES

- Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H., Taghadosi M., Esmaeili S.-A., Mardani F., Seifi B., Mohammadi A., Afshari J. T., Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;233(9):6425–6440. DOI: 10.1002/jcp.26429.
- Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S. C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2017;2(17023). DOI: 10.1038/sigtrans.2017.23.
- Trofimova E. S., Ligacheva A. A., Sherstoboev E. Y., Zhdanov V. V., Danilets M. G., Dygai A. M., Zykova M. V., Belousov M. V., Yusubov M. S., Krivoshchekov S. V. 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.
- Trofimova E. S., Zykova M. V., Sherstoboev E. Yu., Danilets M. G., Ligacheva A. A., Belousov M. V. Effects of Humic Acids, Isolated from High-Moor Pine-Peat Moss-Cotton Grass Peat on the Production of Cytokines by Mouse and Human Immunocompetent Cells and on Humoral Immune Response. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2020;168(5):651–653. DOI: 10.1007/s10517-020-04772-2.
- Dorrington M. G., Fraser I. D. C. NF- κ B Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. *Frontiers in immunology*. 2019;10:705. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00705.