

УДК 57.085.23

ВЛИЯНИЕ НАНОКЛАСТЕРНОГО ПОЛИОКСОМЕТАЛЛАТА $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МАКРОФАГОВ В КУЛЬТУРЕ

© 2024 г. С. А. Титова^{1, *}, М. О. Тонкушина¹, К. В. Гржегоржевский¹,
И. Г. Данилова^{1, 2}, В. А. Поздина², М. В. Улитко¹, А. А. Остроушко¹

¹ Уральский федеральный университет им. Первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, 620002, Россия

² Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, 620049, Россия

* E-mail: svetattitova12021998@gmail.com

Поступила в редакцию 20.03.2024

После доработки 30.04.2024

Принята к публикации 13.05.2024

Цель данной работы — оценка влияния нанокластерного полиоксометаллата $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$, перспективного в качестве основы для средств адресной доставки лекарств в организме, на морфологию, фенотип, функциональную активность перитонеальных и альвеолярных макрофагов. Показано, что $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ не токсичен для перитонеальных и альвеолярных макрофагов, не оказывает значимого влияния на морфологию клеток и на активность α -нафтилацетатэстеразы. Введение $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ способствует снижению фагоцитарной активности и числа CD163⁺-макрофагов в культуре, стимулирует поляризацию макрофагов в направлении фенотипа M1.

Ключевые слова: макрофаги, нанокластер, полиоксометаллаты, клеточные культуры

Принятые сокращения: ПД — продукты деструкции; ПОМ — полиоксометаллат; ФЧ — фагоцитарное число; ЦХИ — цитохимический индекс; ЯЦО — ядерно-цитоплазматическое отношение.

DOI: 10.31857/S0041377124040053 **EDN:** QCQFVM

Макрофаги представляют собой пластичные и гетерогенные иммунные клетки (Taylor et al., 2005). Они присутствуют практически во всех тканях, участвуют в распознавании, фагоцитозе и деградации клеточного мусора и патогенов (Rogler, 2017). Они играют важную роль в презентации антигенов Т-клеткам, а также в индукции экспрессии костимулирующих молекул на других типах антигенпрезентирующих клеток, что инициирует адаптивный иммунный ответ (Jackson, 2016). Кроме того, макрофаги задействованы в инициации воспаления путем высвобождения цитокинов и хемокинов, которые, в свою очередь, привлекают другие иммунные клетки к очагам воспаления (Duan, 2016).

В зависимости от того, какие цитокины, факторы роста, эффекторные молекулы секретируют макрофаги, их традиционно подразделяют на классически и альтернативно активированные (M1 и M2 соответственно). Именно пластичность макрофагов,

способность менять фенотип и функциональную активность в зависимости от характера микроокружения делает эти клетки чрезвычайно привлекательными при разработке лекарственных средств.

Макрофаги играют решающую роль в распознавании, обработке и клиренсе чужеродных частиц, в том числе наночастиц (Dobrovolskaia et al., 2007). Между тем наночастицы могут направлять макрофаги к различным поляризационным состояниям в качестве стимула микроокружения (Lucarelli et al., 2004; Bartneck et al., 2012; Laskar et al., 2013). Перепрограммирование макрофагов с фенотипа M1 на фенотип M2 может быть использовано для лечения хронических воспалительных заболеваний (Liu et al., 2014). Фенотипический сдвиг макрофагов M2 в сторону подтипа M1 полезен на ранних фазах воспаления и иммунотерапии рака (Su et al., 2015).

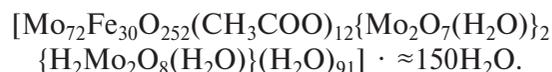
Адресная доставка лекарственных препаратов с использованием наночастиц для повышения

безопасности и терапевтической эффективности инкапсулированных лекарственных средств относится к одному из интенсивно развивающихся направлений нанотехнологии (Saruthers et al., 2007; Dutta, 2007). Более глубокое понимание влияния наночастиц на поляризацию макрофагов имеет важное значение для модуляции биологических эффектов *in vivo* и разработки методов лечения, основанных на использовании наночастиц.

Соединения, известные как нанокластерные полиоксометаллаты с кеплератной структурой (ПОМ) впервые были синтезированы под руководством Мюллера (Müller et al., 1998, 1999). Представители этого класса привлекают внимание высокосимметричной структурой молекул сферической формы и размерами порядка нескольких нанометров. ПОМ обладают рядом интересных свойств, которые делают их перспективными для использования в качестве наночастиц для адресной доставки лекарств (Ostroushko et al., 2021). Нанокластерные, а также более простые ПОМ обладают собственной биологической активностью (Yamase, 2013; Vijelic et al., 2019). Многие ПОМ содержат молибден в двух степенях окисления (+5 и +6); присутствие пентавалентного молибдена обуславливает их токсическое действие. ПОМ $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$, содержащий молибден только в высшей степени окисления (Mo^{+6}), представляется нам наиболее перспективным представителем данного класса соединений в качестве основы средства адресной доставки. Обладая размером молекулы 2.5 нм, растворимый в воде, $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ способен разлагаться в средах организма на более простые соединения молибдена и железа (Остроушко и др., 2011), которые в дальнейшем включаются в естественные для организма процессы метаболизма.

$\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ состоит из кислородных полимеров молибдена и железа, стабилизированных ацетатными и водными лигандами, имеет внутреннюю полость (Müller et al., 1999) и способен связывать лекарственные препараты, флуоресцентные метки, биосовместимые полимеры, белки (Grzhegorzhevskii et al., 2023; Ostroushko et al., 2018; Tonkushina et al., 2022) и осуществлять движение под действием слабых электрических полей, в частности, при чрезкожном ионофорезе (Ostroushko et al., 2021). Ранее нами было продемонстрировано

продолжительное высвобождение противоопухолевого лекарственного препарата из комплекса с $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ в эксперименте, моделирующем высвобождение препарата в крови (Tonkushina et al., 2022). Формула соединения:



Однако исследований действия этого ПОМ на культуру макрофагов, а также возможности их перепрограммирования при действии ПОМ ранее не проводили.

Цель настоящей работы заключалась в оценке влияния $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ на культуру макрофагов, а также изучение возможности поляризации клеток при действии этого ПОМ. Оценивали влияние $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ на морфологию, жизнеспособность, фагоцитарную активность и активность α -нафтилацетатэстеразы (специфического фермента моноцитов/макрофагов), а также на фенотип перитонеальных и альвеолярных макрофагов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

ПОМ кеплератного типа $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ для проведения исследований был синтезирован с использованием отработанной двухстадийной методики (Müller et al., 1998, 1999). При культивировании клеток с $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ его вводили в дозе 100 мкл (водного раствора в концентрации 2.0 г/л) на 900 мкл питательной среды. Доза была отработана в предыдущих исследованиях (Остроушко и др., 2018). Так как $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ в питательной среде постепенно разрушает на более простые молибден и железосодержащие ионы, использовали и продукты разрушения ПОМ (ПД) в качестве образцов сравнения для выявления влияния непосредственно нанокластерной структуры $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$. ПД получали кипячением раствора $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ в концентрации 2.0 г/л в течение 3 ч и также вводили в дозе 100 мкл раствора на 900 мкл питательной среды. $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ устойчив до температуры $\sim 70^\circ C$, и кипячение водного раствора позволяет гарантировать его разрушение до более простых ионов молибдена и железа.

Животные. В работе использовали популяции макрофагов различной тканевой принадлежности (альвеолярные и перитонеальные),

полученные из самцов крыс трехмесячного возраста породы Wistar. Условия содержания и обращение с используемыми в эксперименте животными соответствовали рекомендациям международных этических комитетов (директива Совета ЕС 2010/63/EU).

Выделение и культивирование макрофагов. Для выделения перитонеальных макрофагов вводили внутривентриально 5 мл ледяного раствора Хэнкса, содержащего 100 ЕД пенициллина и 100 мкг стрептомицина на 1 мл (Li et al., 2012). Выполняли легкий массаж брюшной полости, а затем осторожно собирали жидкость. Полученную перитонеальную жидкость центрифугировали при 250 g в течение 10 мин. Клетки промывали раствором Хэнкса и повторно центрифугировали. Надосадочную жидкость сливали, а клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл полной питательной среды и разливали по 500 мкл на покровные стекла, уложенные в 6-луночный планшет, и оставляли для прикрепления в течение 60 мин в инкубаторе при 37°С, 5% CO₂ и 95% воздуха.

Для приготовления полной питательной среды использовали культуральную среду RPMI-1640 (90% от общего объема) (“Биолот”, Россия), эмбриональную телячью сыворотку FBS (“Биолот”, Россия) (10% от общего объема среды), и гентамицин в концентрации 10 мкг/мл.

Альвеолярные макрофаги получали из бронхоальвеолярной жидкости методом альвеолярного лаважа теплым раствором Хэнкса в объеме 3–4 мл, подогретым до температуры тела (36–37°С) (Wiggins, 1991). Полученную лаважную жидкость легких центрифугировали при 250 g в течение 10 мин. Клетки промывали раствором Хэнкса и центрифугировали. Надосадочную жидкость сливали, а клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл полной питательной среды и разливали по 500 мкл на покровные стекла, уложенные в 6-луночный планшет и оставляли для прикрепления в течение 60 мин в инкубаторе при 37°С, 5% CO₂ и 95% воздуха.

За это время макрофаги прикреплялись к культуральной поверхности. По истечении 1 ч среду с не прикрепившимися клетками сливали, лунки промывали раствором Хэнкса, после чего вновь заливали нужный объем питательной культуральной среды. Далее клетки культивировали при 37°С в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха.

Определение фенотипических маркеров макрофагов. Фенотип полученных клеток оценивали методом иммуноцитохимического окрашивания. В качестве фенотипического маркера использовали маркер F4/80, который позволяет определить дифференцировку клеток в макрофаги (McKnight et al., 1996; Dos Anjos Casado, 2017; Khazen et al., 2005). По маркеру CD163 определяли дифференцировку макрофагов в противовоспалительный фенотип M2 (Schaer et al., 2006; Шарафутдинова и др., 2014). При связывании моноклонального антитела к CD163 с соответствующим гликопротеином клеток наблюдается диффузное окрашивание мембран и цитоплазмы макрофагов M2 (Hu et al., 2017). Кроме того, этот маркер представляет собой скавенджер-рецептор, повышенная экспрессия которого связана с активацией эндотоза (Onofre et al., 2009; Etzerodt et al., 2013). Исследование проводили через 24 ч после культивирования макрофагов с {Mo₇₂Fe₃₀} или ПД в CO₂-инкубаторе. Для идентификации вышеперечисленных маркеров применяли непрямой пероксидазный метод окрашивания. Процедура окрашивания одинакова для всех идентифицируемых антигенов.

Покровные стекла фиксировали в 10%-ном формалине. После высушивания их подвергали депарафинизации, дегидратации и промывке в фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем Tween 20 (PanReac AppliChem GmbH, Германия), pH 7.6. Фиксация в формалине может приводить к изменению трехмерной структуры белков. При этом может происходить модификация антигенных эпитопов и изменение электростатического взаимодействия, что приводит к невозможности взаимодействия эпитопа антигена с паратопом антитела. Поэтому, до нанесения первичных антител проводили демаскировку эпитопов протеазами.

Для минимизации фонового окрашивания проводили блокировку активности эндогенной пероксидазы путем нанесения на срезы 3%-ного раствора пероксида водорода, последующей промывки и нанесения на 30 мин протеинового блока на основе бычьего сывороточного альбумина.

Следующий этап включал инкубацию с первичными антителами в течение 60 мин при 37°С. Несвязавшиеся реагенты отмывали в буфере PBS + Tween 20 (3 раза по 5 мин)

и после проводили инкубацию с вторичными антителами в течение 60 мин при 37°С, затем повторяли промывку в то же буфере.

Для визуализации антигенреактивных клеток использовали хромогенный субстрат 3,3-диаминобензидин (ДАВ) в забуференном растворе. ДАВ-позитивные клетки идентифицировали по коричневому окрашиванию. После окрашивания покровные стекла промывали в дистиллированной воде 5 мин, окрашивали гематоксилином и промывали в водопроводной воде 5 мин. На стеклах подсчитывали общее число клеток и число клеток, положительно окрашенных соответствующим антителом.

Влияние ПОМ. Полученные культуры перитонеальных и альвеолярных макрофагов делили на три группы: нестимулированные (контроль), стимулированные макрофаги, к которым через 24 ч культивирования в CO₂-инкубаторе добавляли {Mo₇₂Fe₃₀} или ПД и продолжали культивировать еще 24 ч.

Оценка жизнеспособности макрофагов. Жизнеспособность оценивали через сутки после добавления {Mo₇₂Fe₃₀} или ПД. Старую среду сливали и промывали клетки 2 раза PBS Дюльбекко (DPBS, “ПанЭко”, Россия), pH 7.0–7.1, осмолярность 300 ± 20 мосмоль/кг. Культуры клеток переводили в суспензию путем инкубации в смеси 0.25%-го раствора трипсина с раствором Версена (1:1 при 37°С) в течение 10 мин при 37°С в CO₂-инкубаторе. Далее добавляли питательную среду и повторно суспендировали клетки, аккуратно пипетируя их. Затем клетки центрифугировали при 300 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость сливали, клетки ресуспендировали в DPBS комнатной температуры, чтобы смыть остатки клеточного мусора и белков. Затем этап с центрифугированием и промывкой в DPBS повторяли еще раз.

Далее клетки окрашивали раствором трипанового синего (100 мкл 0.4%-ного трипанового синего на 100 мкл полученной клеточной суспензии). Инкубировали смесь в течение 3 мин при комнатной температуре (Strober, 2015). Считали окрашенные (нежизнеспособные) и неокрашенные (живые) клетки.

Жизнеспособность клеток оценивали согласно международному стандарту ISO 10993-5 и определяли, как отношение числа

жизнеспособных клеток аликвоты к общему числу клеток на 1 мл аликвоты. Оценивали среднее значение жизнеспособности по трем параллельным измерениям.

Морфометрическая характеристика макрофагов. В качестве морфометрических показателей определяли площадь клетки и ядра в мкм², а также ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО). Визуализацию осуществляли с помощью оптического микроскопа Olympus BX-51 (Япония), оснащенного флуоресцентным модулем LED ADF FL-LED-BGUV (ADF, Китай) и подключенной к нему монохроматической камерой ADF FLM07 (ADF, Китай) с охладителем Пельтье. Для обработки изображений использовали программное обеспечение камеры ADF Image Capture (<http://adfmicroscopy.com/>).

Ферментативная активность. В группу ферментов, гидролизующих эфиры карбоновых кислот, входят неспецифические эстеразы (ЕС 3.1.1). Ферментативную (секреторную) активность макрофагов оценивали, окрашивая их на неспецифическую α-нафтилацетатэстеразу, характерную для них и их идентификации (Ennist et al., 1983), и определяли цитохимический индекс (ЦХИ) (Наyhое et al., 1980). Как и другие неспецифические эстеразы, α-нафтилацетатэстераза катализирует реакцию гидролиза производных нафтилацетата (Wang et al., 2021) и, кроме того, участвует в детоксикации эндотоксинов и ксенобиотиков (Terriere, 1984; Zvereva et al., 2003). Для выявления ее активности макрофаги фиксировали в формалине в течение 5 мин. Затем инкубировали при комнатной температуре 30 мин в рабочем растворе, состоящем из 10 мг α-нафтилацетата, растворенного в 1 мл ацетона, 50 мл фосфатного буфера (pH 7.4) и 50 мг прочного синего. Затем клетки промывали в дистиллированной воде 2–3 мин. Докрашивали ядра гематоксилином Карацци (“Диахим-ЦитоСтейн-ГК”; “АБРИС+”, Россия) в течение 5 мин. α-Нафтилацетатэстераза ускоряет гидролизное расщепление α-нафтилацетата до уксусной кислоты и α-нафтола, соединение которого с диазониевой солью образует красно-коричневое окрашивание, нерастворимое в воде.

Подсчет макрофагов проводили под микроскопом ZEISS Primo Star (ZEISS, Германия) с помощью компьютерной программы ToupView 3.7 (<http://toupTek.com/product/>

showproduct.php?lang=en&id=103). Активность фермента выявляли по коричнево-черным гранулам в цитоплазме клеток.

Степень активности неспецифической эстеразы оценивали по описанной методике (Hayhoe et al., 1980). Подсчет результатов проводили, используя принцип Астальди (Astaldi et al., 1952; Astaldi et al., 1957). Клетки делили на 3 группы по активности эстеразы: 1-я – площадь, занимаемая гранулами не более 1/3 площади ядра; 2-я – площадь, занимаемая гранулами более 1/3 площади ядра, но не более площади всего ядра; 3-я – площадь, занимаемая гранулами более площади ядра. Степень эстеразной активности определяли по формуле:

$$ЦХИ = \frac{B \times 1 + C \times 2 + D \times 3}{N},$$

где B – число клеток с активностью 1; C – с активностью 2; D – с активностью 3; N – общее число посчитанных клеток.

Полученные показатели ЦХИ сравнивали с референсными значениями: для макрофагов ЦХИ в норме составляет 0.94–0.98 (Кост, 1975; Dhingra et al., 1982).

Фагоцитарная активность. Использовали частицы латекса (10%-ная полистирольная суспензия) диаметром 1.5 мкм (“ПанЭко”, США). Макрофаги делили на три группы: контрольную и 2 опытные – с $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ и с ПД и культивировали в течение 24 ч. Далее вносили 10 мкл суспензии частиц латекса на 500 мкл полной питательной среды в 6-луночные планшеты (примерно от 350 частиц на 1 клетку). Затем альвеолярные и перитонеальные макрофаги инкубировали с частицами латекса течение 1 ч при 37°С в CO_2 -инкубаторе. По окончании питательную среду удаляли и макрофаги окрашивали по Романовскому. Подсчет числа поглощенных частиц латекса осуществляли с помощью светового микроскопа, используя компьютерную программу ADF (Китай, <http://adfmicroscopy.com/>). Определяли фагоцитарное число (ФЧ) – среднее число частиц, поглощенных одним макрофагом (Sharma et al., 2014).

Полученные данные анализировали с помощью программы STATISTICA.10 и Microsoft Excel. Вычисляли среднее арифметическое значение, ошибку среднего (SE) и стандартное отклонение (σ). Использовали непараметрический критерий Манна–Уитни для определения

значимости разницы в опытных группах по сравнению с контролем. Различия считали достоверными при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Жизнеспособность макрофагов. В контрольной группе жизнеспособность перитонеальных и альвеолярных макрофагов по трем параллельным измерениям составила 94.7 ± 3.9 и $93.2 \pm 3.8\%$ соответственно. При культивировании клеток с $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ или с ПД в течение 24 часов статистически значимых различий показателей жизнеспособности не было (табл. 1).

Морфологическая и морфометрическая характеристика макрофагов. Морфометрический анализ перитонеальных макрофагов позволил выявить следующие закономерности: перитонеальные макрофаги контрольной группы представлены клетками округлой формы с округлым или бобовидным ядром, расположенным на периферии, что свидетельствует

Таблица 1. Влияние $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ и продуктов его деструкции (ПД) на жизнеспособность и морфометрические характеристики макрофагов

Макрофаги	Контроль	ПОМ	ПД
Жизнеспособность, %			
Перитонеальные	94.7 ± 3.9	94.1 ± 4.4	93.1 ± 3.8
Альвеолярные	93.2 ± 3.8	94.2 ± 2.6	94.6 ± 3.4
Площадь клетки, мкм ²			
Перитонеальные	285.3 ± 7.1	307.3 ± 8.2	281.7 ± 3.6
Альвеолярные	246.8 ± 8.3	260.7 ± 6.0	241.6 ± 6.9
Площадь ядра, мкм ²			
Перитонеальные	74.8 ± 4.3	73.7 ± 5.7	71.2 ± 2.6
Альвеолярные	246.8 ± 8.3	260.7 ± 6.0	241.6 ± 6.9
ЯЦО			
Перитонеальные	0.35 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.34 ± 0.01
Альвеолярные	0.45 ± 0.01	0.47 ± 0.02	0.52 ± 0.01
ЦХИ, усл. ед.			
Перитонеальные	0.93 ± 0.02	0.88 ± 0.07	0.92 ± 0.05
Альвеолярные	0.98 ± 0.02	0.98 ± 0.02	0.95 ± 0.03
ФЧ, усл. ед.			
Перитонеальные	72.9 ± 3.9	$55.9^* \pm 4.1$	65.8 ± 2.0
Альвеолярные	70.8 ± 4.5	$45.6^* \pm 3.6$	$42.0^* \pm 3.4$

Примечание к табл. 1 и 2. Показаны средние значения и их ошибки.

* – Различие с контролем достоверно при $P < 0.05$.

о нормальной морфологии изучаемых клеточных культур. При культивировании перитонеальных макрофагов с $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ или с ПД в течение 24 часов изменения формы клеток и ядер не наблюдали.

Статистически значимых различий морфометрических показателей между контрольной группой и группой макрофагов с ПД или с $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ обнаружено не было (табл. 1). Однако отмечали тенденцию к увеличению площади клеток при культивировании их с $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$. Статистически значимых различий площадей ядер и величин ЯЦО при культивировании с $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ или ПД нет (табл. 1). Не наблюдали и изменения формы клеток и ядер.

Активность неспецифической эстеразы. Показатели ЦХИ α -нафтилацетатэстеразы перитонеальных и альвеолярных макрофагов находятся в пределах референсных значений и согласуются с данными литературы (Кост, 1975; Dhingra et al., 1982). В контрольной группе ЦХИ составил 0.93 ± 0.02 и 0.98 ± 0.02 для перитонеальных и альвеолярных макрофагов

соответственно. Статистически значимых отличий от ЦХИ клеток, культивируемых с ПД или $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ в течение суток не обнаружено (см. табл. 1).

Таким образом, как $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$, так и ПД не влияют на активность α -нафтилацетатэстеразы. Следовательно, можно предположить, что процесс детоксикации эндотоксинов и ксенобиотиков (Terriere, 1984; Zvereva et al., 2003), осуществляемый макрофагами благодаря наличию в клетках неспецифических эстераз (в том числе α -нафтилацетатэстеразы) не нарушается при их взаимодействии с ПОМ.

Фагоцитарная активность. У перитонеальных и альвеолярных макрофагов контрольной группы значение ФЧ (фагоцитирование латексных частиц) составило соответственно 72.9 ± 3.9 и 70.8 ± 4.5 . В группах макрофагов обоих видов, культивируемых с $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ в течение 24 часов, ФЧ значительно уменьшилось. Разница фагоцитарной активности показана на рис. 1. При культивировании с ПД (в течение суток)

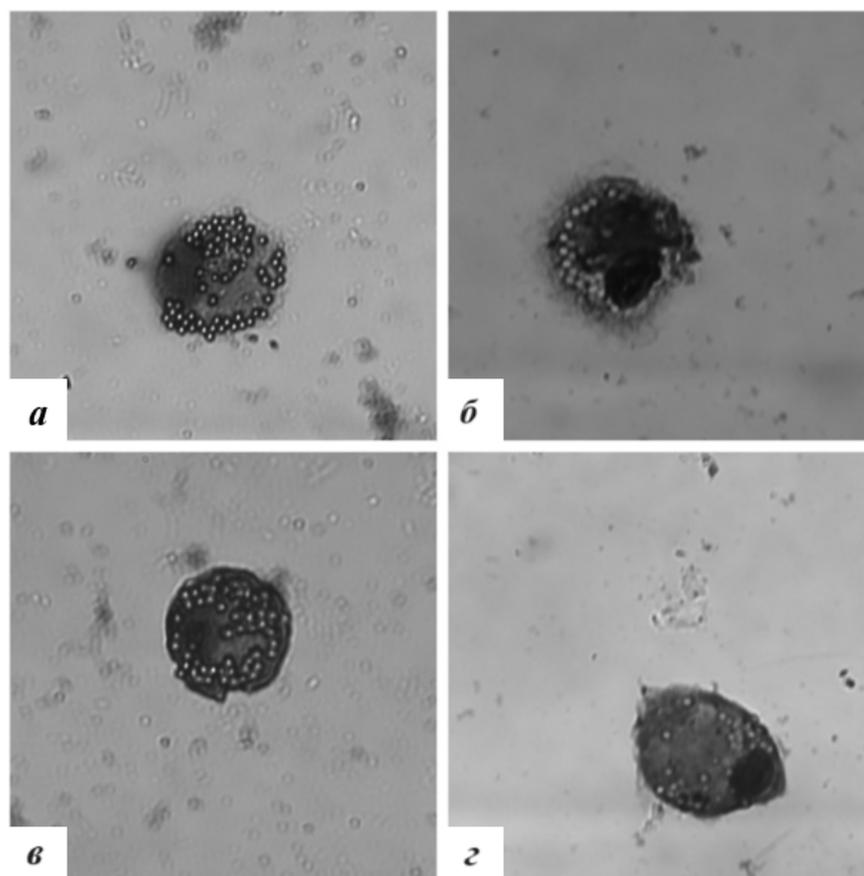


Рис. 1. Фагоцитоз латексных частиц перитонеальными (а, б) и альвеолярными (в, г) макрофагами. а, в – в контроле; б, г – после действия $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$.

статистически значимых различий не наблюдали (табл. 1).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о снижении фагоцитарной активности макрофагов при их культивировании с $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$. Можно предположить, что снижение фагоцитоза обусловлено поляризацией макрофагов с последующей сменой фенотипа. Макрофаги разных фенотипов отличаются друг от друга функциональной активностью, в том числе и фагоцитарной. Имеются данные о том, что макрофаги M2 активнее фагоцитируют латексные шарики, чем M1, которые иммунологически ориентированы на захват бактерий и вирусов (Stangel et al., 2000; Yunna et al., 2020).

Фенотипические маркеры макрофагов.

Принадлежность полученных клеток к популяции резидентных тканевых макрофагов оценивали по экспрессии специфического маркера F4/80 (является частью семейства EGF-TM7).

Клетки F4/80⁺ перитонеальных и альвеолярных макрофагов показаны на рисунках 2б и 3б, клетки F4/80⁻ – на рис. 2а и 3а соответственно. Маркер CD163 определяет дифференцировку макрофагов в противовоспалительный фенотип M2 (Шарафутдинова и др., 2014; Schaer et al., 2006). Перитонеальные макрофаги CD163⁻ и CD163⁺ продемонстрированы на рис. 2в и 2г, альвеолярные – на рис. 3в и 3г.

Выделенные в первичную культуру перитонеальные макрофаги контрольной группы по своему составу содержали $84.02 \pm 3.8\%$ положительно окрашенных на F4/80 клеток, что свидетельствует о высокой чистоте выделенных культур. Доля макрофагов CD163⁺ (маркер M2 макрофагов) среди клеток, выделенных в первичную культуру, составила $47.06 \pm 4.4\%$ для контрольной группы. Культивирование перитонеальных макрофагов с $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ или с ПД в течение суток не изменило долю F4/80⁺-клеток (табл. 2). Однако доля CD163⁺-макрофа-

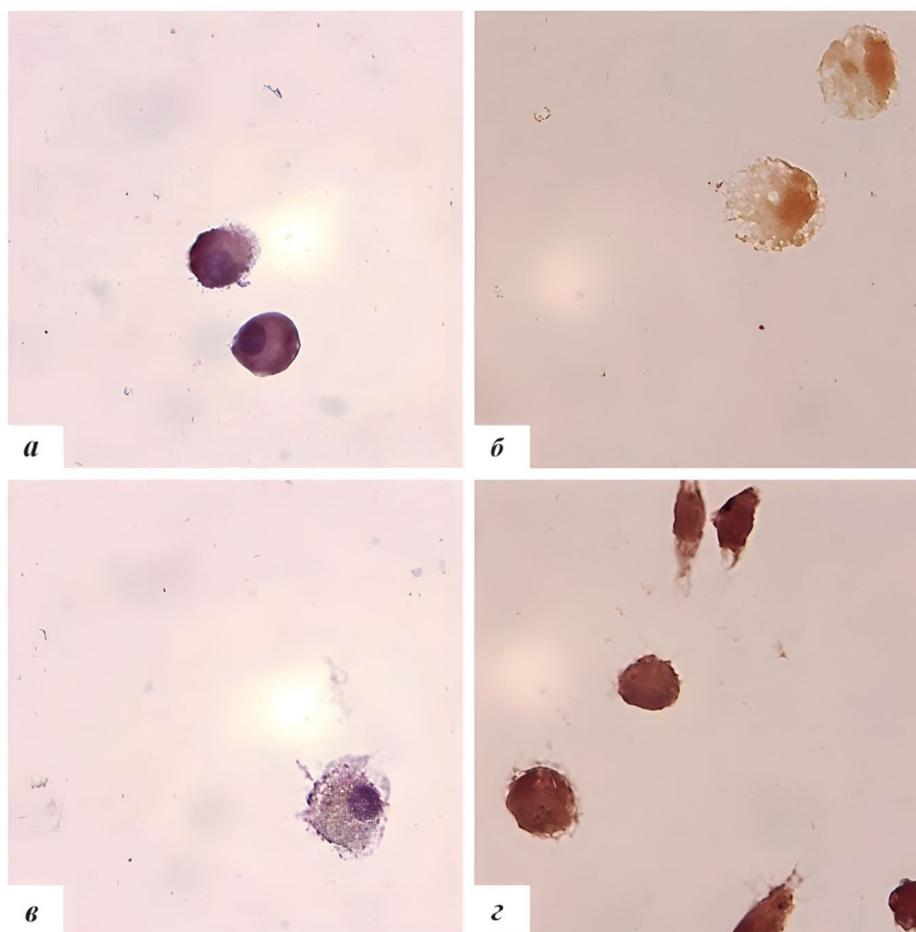


Рис. 2. Фенотипическое окрашивание перитонеальных макрофагов. а – F4/80⁻-клетки, б – F4/80⁺-клетки, в – CD163⁻-клетки, г – CD163⁺-клетки.

гов снизилась в группе клеток, культивируемых с $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$.

В первичной культуре альвеолярные макрофаги контрольной группы содержали $85.55 \pm 5.7\%$ F4/80⁺-клеток и $49.91 \pm 5.2\%$ CD163⁺-клеток. Действие $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ или ПД в течение 24 часов не изменило долю F4/80⁺-клеток (табл. 2), но снижалась доля CD163⁺-макрофагов и перитонеальных, и альвеолярных в случае действия и $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$, и ПД (табл. 2). Для перитонеальных макрофагов это может свидетельствовать об уменьшении доли макрофагов M2 в культуре.

Снижение доли CD163⁺-клеток в культуре альвеолярных макрофагов при инкубировании с ПД может объясняться тем, что альвеолярные макрофаги характеризуются высокой чувствительностью к железу, могут приобретать как связанное с трансферрином железо, высвобождаемое альвеолярными эпителиальными клетками, так и вдыхаемое железо

Таблица 2. Влияние $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ и продуктов его деструкции на фенотипические маркеры макрофагов

Макрофаги	Контроль	ПОМ	ПД
Доля F4/80 ⁺ -клеток, %			
Перитонеальные	84.0 ± 3.8	85.0 ± 3.5	86.5 ± 5.2
Альвеолярные	85.5 ± 5.7	91.6 ± 2.5	87.8 ± 2.1
Доля CD163 ⁺ -клеток, %			
Перитонеальные	47.1 ± 4.4	32.7 ± 1.9*	43.5 ± 2.3
Альвеолярные	49.9 ± 5.2	33.4 ± 2.5*	37.9 ± 3.5*

Примечание. См. табл. 1.

в результате воздействия окружающей среды (например, дыма и загрязнения воздуха) (Nollian et al., 1990; Corhay et al., 2000). Снижение доли макрофагов M2 может указывать на возможную поляризацию макрофагов в провоспалительный фенотип M1. Эти данные согласуются со снижением фагоцитарной активности, поскольку CD163 представляет собой скавенджер-рецептор, повышенная экспрессия

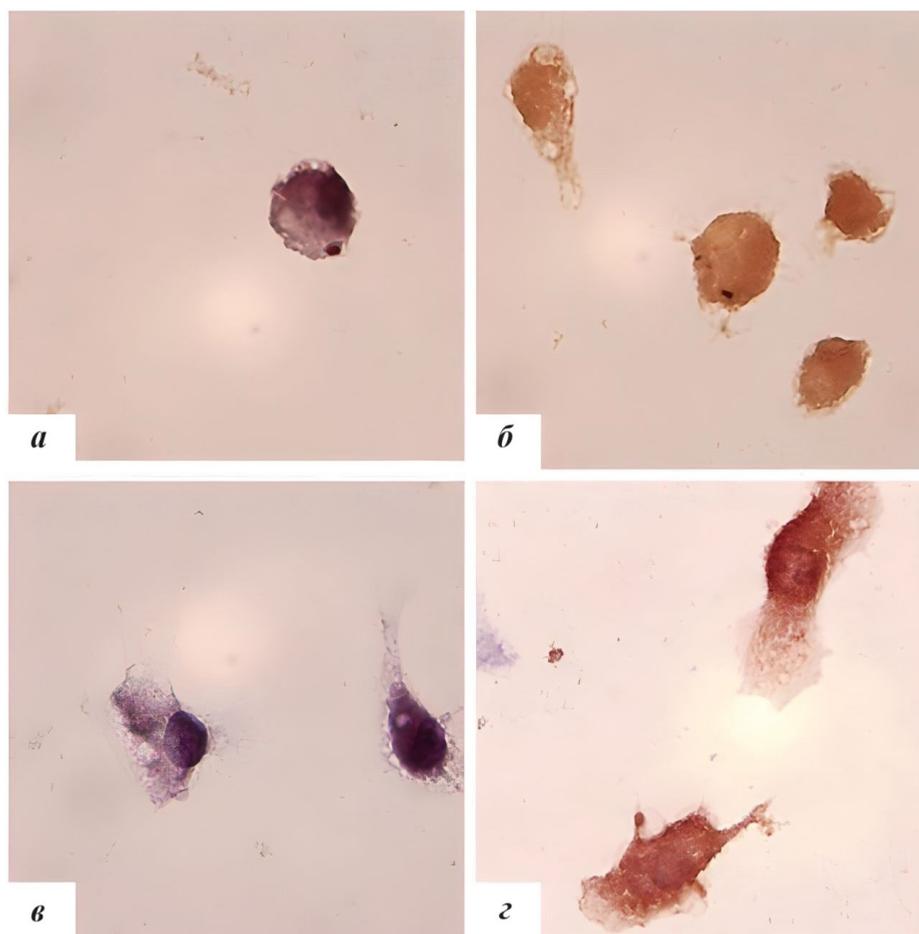


Рис. 3. Фенотипическое окрашивание альвеолярных макрофагов: *a* – F4/80⁻-клетки, *б* – F4/80⁺-клетки, *в* – CD163⁻-клетки, *г* – CD163⁺-клетки.

которого связана с эндоцитозом (Onofre et al., 2009; Etzerodt et al., 2013). Соответственно, уменьшение экспрессии данного рецептора на поверхности мембраны клетки способствует переходу макрофага от противовоспалительного фенотипа M2, который наиболее активно поглощает частицы латекса за счет эндоцитоза (фагоцитоза) к провоспалительному M1 (Stangel et al., 2000; Yunna et al., 2020).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты настоящей работы показали, что $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ и его ПД не оказывают значимого влияния на жизнеспособность перитонеальных и альвеолярных макрофагов, не приводят к значимому изменению морфологических показателей клетки и активности неспецифической эстеразы (α -нафтилацетатэстеразы), важного компонента системы детоксикации клетки. Таким образом, не обнаружено токсического действия ПОМ на культуры перитонеальных и альвеолярных макрофагов.

В ходе исследования отмечено снижение фагоцитарной активности макрофагов в экспериментальных группах. Мы предположили, что это может быть связано с изменением фенотипа макрофагов, поэтому провели иммуноцитохимическое окрашивание клеток на маркер CD163. Полученные данные продемонстрировали снижение доли CD163⁺-клеток в присутствии $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$, что согласуется с результатами оценки фагоцитарной активности. В литературе имеются сведения о том, что фагоцитоз именно M2-макрофагов более эффективен по отношению к латексным шарикам и частицам зимозана по сравнению с фенотипом M1 (Martinez et al., 2008; Stangel et al., 2000). Стоит отметить также, что поскольку CD163 представляет собой скавенджер-рецептор, связанный с эндоцитозом (Onofre et al., 2009; Etzerodt et al., 2013), уменьшение его экспрессии на поверхности мембраны способствует переходу макрофага от противовоспалительного фенотипа M2, который наиболее активно поглощает частицы латекса за счет эндоцитоза (фагоцитоза) к провоспалительному M1 (Stangel et al., 2000; Yunna et al., 2020).

Полученные данные о влиянии $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ на поляризацию макрофагов в провоспалительный фенотип M1 делает его еще более перспективным

объектом исследования в области онкологии. Кроме того, изучение влияния наночастиц на поляризацию макрофагов, становится важным звеном в понимании механизма действия данных соединений на клетку.

В настоящее время есть примеры изменения поляризации макрофагов с помощью железосодержащих наночастиц. Например, суперпарамагнитные наночастицы оксида железа (SPION), покрытые полиэтиленгликолем, индуцируют поляризацию M1, характеризующуюся заметной апрегуляцией типичных генов, связанных с M1, таких как CD80, IL-1 β , TNF- α (Mulens-Arias et al., 2015). Поскольку макрофаги вносят вклад в опухолевое иммунное микроокружение, их взаимодействие с наночастицами оксида железа может определять тераностический результат и представлять важный инструмент для перепрограммирования фенотипа опухолеассоциированных макрофагов (Mulens-Arias et al., 2021).

В настоящее время необходим поиск стратегий, способных усилить действие существующих лекарств за счет разработки новых терапевтических подходов. Лекарственные препараты могут быть конъюгированы с наночастицами с целью повышения их фармакологического действия или придания им новых специфических свойств. Например, лечение только доксорубицином снижало секрецию макрофагами ФНО- α – важного цитокина, который активирует специфические рецепторы, определяющие раковую клетку, блокирует дальнейшее деление клетки и способствует ее гибели (Reichel et al., 2019). Аналогичным образом ФНО- α воздействует на клетки, инфицированные вирусами и другими патогенами. Наночастицы оксида цинка незначительно увеличивали секрецию ФНО- α макрофагами. В отличие от предыдущих групп, комплекс ZnO-доксорубицин значительно увеличивал секрецию ФНО- α макрофагами, а также секрецию IL-6 – еще одного важного провоспалительного цитокина (Reichel et al., 2019). Макрофаги, обработанные ZnO-доксорубицином, демонстрировали повышенную экспрессию CD80, CD86 и MHCII по сравнению с наночастицами оксида цинка или свободным доксорубицином (Reichel et al., 2019).

Как показали исследования, проведенные в последние десятилетия, ПОМ обладают

перспективной биологической активностью, в том числе противоопухолевой и противoinфекционной благодаря своей особой структуре и свойствам (Wang, 2022). Их высокая биосовместимость, структурная стабильность и модифицируемость предоставляют широкие возможности для исследований в области диагностики и лечения рака.

Иммунотерапия антигенпрезентирующими клетками инициирует мощный Т-клеточный ответ при онкологических, вирусных и инфекционных заболеваниях (Masson et al., 2008; Gardner et al., 2020). Использование аутологичных макрофагальных вакцин в клинических испытаниях представляет собой индивидуальную форму клеточной терапии, требующей генерации макрофагов типа М2 или М1 в зависимости от вида и тяжести заболевания.

Таким образом, исследуемый нами ПОМ $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ может представлять большой интерес для биомедицины и онкологии. Предполагаемая способность обеспечивать поляризацию макрофагов делает его интересным объектом для онкологических исследований. Мы показали, что исследованный ПОМ $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ эффективно поляризуют макрофаги в направлении фенотипа М1. В дальнейшем мы планируем использовать ПОМ для стимуляции образования М1-макрофагов и возможного использования полученной культуры в экспериментальных моделях ряда онкологических и воспалительных заболеваний.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования ИИФ УрО РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет при финансовой поддержке в рамках государственного задания по науке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 123031300049-8), а также в рамках госзадания Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН (№ 122020900136-4) и Программы развития Уральского федерального университета имени первого Президента России

Б.Н. Ельцина в соответствии с программой стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>). Протоколы с использованием животных были одобрены одобрены этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН, протокол № 07/19 от 18.12.2019.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Губарев Ю.А., Лебедева Н.Ш., Тонкушина М.О., Гагарин И.Д., Голуб А.Я., Остроушко А.А. 2021. Взаимодействие нанокластерного железосодержащего полиоксометаллата с доxorубицином. Физико-химические аспекты изучения кластеров, наноструктур и наноматериалов. № 13. С. 841. (Gubarev Yu.A., Lebedeva N.Sh., Tonkushina M.O., Gagarin I.D., Golub A.Yu., Ostroushko A.A. 2021. Interaction of iron-containing nanocluster polyoxometalate with doxorubicin. Phys. Chem. Aspects of the Study of clusters, Nanostruct. Nanomat. (Russ.) № 13. P. 841.)
- Кост Е.А. 1975. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. Москва: Медицина. (Cost E.A. 1975. Handbook of clinical laboratory research methods. Moscow: Medicine.)
- Остроушко А.А., Тонкушина М.О. 2015. Деструкция нанокластерных полиоксометаллатов на основе молибдена в водных растворах. Журн. физической химии. Т. 89. № 3. С. 440. (Ostroushko A.A., Tokushima M.O. 2015. Destruction of molybdenum nanocluster polyoxometallates in aqueous solutions. Russian J. Phys. Chem. A. V. 89. P. 443).
- Остроушко А.А., Тонкушина М.О., Мартынова Н.А. 2010. Особенности явлений массы и электропереноса в системах, содержащих нанокластерные полиоксометаллаты молибдена со структурой фуллерена. Журн. физ. химии. Т. 84. № 6. С. 1135. (Ostroushko A.A., Tonkushina M.O., Martynova N.A. 2010. Mass and charge transfer in systems containing nanocluster molybdenum polyox-

- ometallates with a fullerene structure. Russ. J. Phys. Chem. V. 84. P. 1022.)
- Остроушко А.А., Сенников М.Ю., Тонкушина М.О.* 2009. Взаимодействие полиоксометаллата Mo132 с поливиниловым спиртом. Журн. неорганической химии. Т. 84. № 4. С. 666. (*Ostroushko A.A., Sennikov M.Y., Tonkushina M.O.* 2009. Interaction of polyoxometalate Mo132 with poly(vinyl alcohol). Russ. J. Inorg. Chem. V. 54. P. 611.)
- Остроушко А.А., Гетте И.Ф., Медведева С.Ю., Тонкушина М.О., Данилова И.Г., Прокофьева А.В., Морозова М.В.* 2011. Оценка безопасности железо-молибденовых нанокластерных полиоксометаллатов, предназначенных для адресной доставки лекарственных веществ. Вестник уральской медицинской академической науки. Т. 34. № 2. С. 107. (*Ostroushko A.A., Gette I.F., Medvedeva S.Yu., Tonkushina M.O., Danilova I.G., Prokofiev A.V., Morozova M.V.* 2011. Safety assessment of iron-molybdenum nanocluster polyoxometallates intended for targeted drug delivery. Bulletin of the Ural Medical Academic Science. Vol. 34. No. 2. P. 557.)
- Остроушко А.А., Гетте И.Ф., Данилова И.Г., Медведева С.Ю., Тонкушина М.О., Прокофьева А.В.* 2011. Исследование хронической токсичности молибденовых и железо-молибденовых нанокластерных полиоксометаллатов. Уральский мед. ж. Т. 89. № 11. С. 75. (*Ostroushko A.A., Gette I.F., Danilova I.G., Medvedeva S.Yu., Tonkushina M.O., Prokofiev A.V.* 2011. Investigation of the chronic toxicity of molybdenum and iron-molybdenum nanocluster polyoxometallates. Ural Med. Univ. V. 89. No. 11. P. 75.)
- Остроушко А.А., Улитко М.В., Тонкушина М.О., Зубарев И.В., Медведева С.Ю., Данилова И.Г., Губаева О.В., Гагарин И.Д., Гетте И.Ф.* 2018. Влияние нанокластерных молибденсодержащих полиоксометаллатов на морфофункциональное состояние фибробластов в культуре. Российские нанотехнологии. Т. 13. № 1-2. С. 3. (*Ostroushko A.A., Ulitko M.V., Tonkushina M.O. et al.* 2018. Influence of Nanocluster Molybdenum Polyoxometallates on the Morphofunctional State of Fibroblasts in Culture. Nanotechnol Russia. V. 13. P. 1.)
- Шарафутдинова Л.А., Горшкова Е.Н., Садрутдинова И.И., Хисматуллина З. Р., Башкатов С.А.* 2014. Оценка морфологических параметров нейтрофильных гранулоцитов методом атомно-силовой микроскопии после воздействия фуллерена C60. Биомедицина. № 3. С. 49. (*Sharafutdinova E.N., Gorshkova I.I., Sadrtinova Z.R., Khismatulina S.A.* 2014. Evaluation of the morphological parameters of neutrophilic granulocytes by atomic force microscopy after exposure to fullerene C60. Biomed. (Russ.) V. 3. P. 49.)
- Akatsuka S., Yamashita Y., Ohara H., Liu Y-T, Izumiya M., Abe K.* 2012. Fenton reaction induced cancer in wild type rats recapitulates genomic alterations observed in human cancer. PloS One. V. 7: e43403.
- Astaldi G., Bernardelli E., Rondanelli E.* 1952. Behavior of glycogen in surviving leukocytes. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. V. 28. P. 286.
- Astaldi G., Verga L.* 1957. The glycogen content of the cells of lymphatic leukaemia. Acta Haematol. V. 17. P. 129.
- Bartneck M., Ritz T., Keul H.A., Wambach M., Bornemann J., Gbureck U., Ehling J., Lammers T., Heymann F., Gassler N., Lüdde T., Trautwein C., Groll J., Tacke F.* 2012. Peptide-functionalized gold nanorods increase liver injury in hepatitis. ACS nano. V. 6. P. 8767.
- Bijelic A., Aureliano M., Rompel A.* 2019. Polyoxometalates as potential next-generation metallodrugs in the combat against cancer. Angewandte Chemie Int. Ed. V. 58. P. 2980.
- Caruthers S.D., Wickline S.A., Lanza G.M.* 2007. Nanotechnological applications in medicine. Curr. Opin. Biotechnol. V. 18. P. 26.
- Corhay J.L., Weber G., Bury T., Mariz S., Roelandts I., Radermecker M.F.* 1992. Iron content in human alveolar macrophages. Eur. Respir. J. V. 5. P. 804.
- Dhingra V.K., Gupta R.K., & Sadana J.R.* 1982. Demonstration of acid alpha naphthyl acetate esterase activity in bovine lymphocytes and monocytes or macrophages. Res. Veterinary Sci. V. 33. P. 26.
- Dobrovolskaia M.A., McNeil S. E.* 2007. Immunological properties of engineered nanomaterials. Nature Nanotechnol. V. 2. P. 469.
- Dos Anjos Cassado A.* 2017. F4/80 as a major macrophage marker: the case of the peritoneum and spleen. Results Problems Cell Diff. V. 62. P. 161.
- Duan L., Mukherjee E.* 2016. Janeway's Immunobiol. 9th Ed. Yale J. Biol. Med. V. 89. P. 424.
- Dutta R.C.* 2007. Drug carriers in pharmaceutical design: promises and progress. Curr. Pharm. Des. V. 13. P. 76.
- Ennist D.L., Jones K.H.* 1983. Rapid method for identification of macrophages in suspension by acid alpha-naphthyl acetate esterase activity. J. Histochem. Cytochem. V. 31. P. 960.
- Etzerodt A., Moestrup S.K.* 2013. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. Antioxid. Redox Signal. V. 18. P. 2352.
- Giovanni M., Yue J., Zhang L., Xie J., Ong C.N., Leong D.T.* 2015. Pro-inflammatory responses of RAW264.7 macrophages when treated with ultralow concentrations of silver, titanium dioxide, and zinc oxide nanoparticles. J. Hazard. Materials. V. 297. P. 146.
- Grzhegorzhevskii K., Tonkushina M., Gushchin P., Gagarin I., Ermoshin A., Belova K., Prokofyeva A. Ostroushko A., Novikov A.* 2023. Association of kepler-

- ate-type polyoxometalate $\{Mo_{72}Fe_{30}\}$ with tetracycline: nature of binding sites and antimicrobial action. *Inorganics*. V. 11. P. 9.
- Grzhegorzhevskii K.V., Zelenovskiy P.S., Koryakova O.V., Ostroushko A.A. 2019. Thermal destruction of giant polyoxometalate nanoclusters: a vibrational spectroscopy study. *Inorg. Chimica Acta*. V. 489. P. 287.
- Hayhoe F.G.J., Quaglino D. 1980. Haematological cytochemistry. Edinburgh, N.Y.: Churchill Livingstone. P. 336.
- Holian A., Scheule R.K. 1990. Alveolar macrophage biology. *Hosp. Pract.* V. 25. P. 53.
- Hu J. M., Liu K., Liu J. H., Jiang X. L., Wang X. L., Chen Y. Z., Li S. G., Zou H., Pang L. J., Liu C. X., Cui X. B., Yang L., Zhao J., Shen X. H., Jiang J. F., Liang W. H., Yuan X. L., Li F. 2017. CD163 as a marker of M2 macrophage, contribute to predict aggressiveness and prognosis of Kazakh esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. V. 8. P. 21526.
- Jackson J. 2016. In situ tissue regeneration: host cell recruitment and biomaterial design. In: Lee S.J., Atala A., Yoo J. (Eds.). 2016. *Immunology: Host responses to biomaterials*. Elsevier/Acad. Press. P. 35.
- Khazen W., M'bika J.P., Tomkiewicz C., Benelli C., Chany C., Achour A., & Forest C. 2005. Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. *FEBS Letters*, V. 579. P. 5631.
- Laskar A., Eilertsen J., Li W., Yuan X. M. 2013. SPION primes THP1 derived M2 macrophages towards M1-like macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 441. P. 737.
- Li Y., Yang Y., Guo T. 2023. Heme oxygenase-1 determines the cell fate of ferroptotic death of alveolar macrophages in COPD. *Front. Immunol.* V. 14: 1162087.
- Liu Y., Chen Z., Gu N., Wang J. 2011. Effects of DMSA-coated Fe_3O_4 magnetic nanoparticles on global gene expression of mouse macrophage RAW264.7 cells. *Toxicol. Lett.* V. 205. P. 130.
- Liu Y.C., Zou X.B., Chai Y.F., Yao Y.M. 2014. Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int. J. Biol. Sci.* V. 10. P. 520.
- Li Z., Zhao Z.J., Zhu X.Q., et al. 2012. Differences in iNOS and arginase expression and activity in the macrophages of rats are responsible for the resistance against *T. gondii* infection. *PLoS One*. V. 7: e35834.
- Lucarelli M., Gatti A. M., Savarino G., Quattroni, P., Martinelli L., Monari E., Boraschi, D. 2004. Innate defence functions of macrophages can be biased by nano-sized ceramic and metallic particles. *Eur. Cytokine Network*. V. 15. P. 339.
- Martinez F.O., Sica A., Mantovani A. 2008. Macrophage activation and polarization, *Front. Biosci.* V. 13. P. 453.
- Martinez F.O. 2011. Regulators of macrophage activation. *Eur. J. Immuno.* V. 41. P. 1531.
- McKnight A.J., Macfarlane A.J., Dri P., Turley L., Willis A.C., Gordon S. 1996. Molecular cloning of F4/80, a murine macrophage-restricted cell surface glycoprotein with homology to the G-protein-linked transmembrane 7 hormone receptor family. *J. Biol. Chem.* V. 271. P. 486.
- Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A. M. 2000. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* V. 164. P. 6166.
- Mulens-Arias V., Rojas J.M., Pérez-Yagüe S., Morales M.P., Barber D.F. 2015. Polyethylenimine-coated SPIONs trigger macrophage activation through TLR-4 signaling and ROS production and modulate podosome dynamics. *Biomaterials*. V. 52. P. 494.
- Mulens-Arias V., Rojas J.M., Barber D.F. 2021. The use of iron oxide nanoparticles to reprogram macrophage responses and the immunological tumor microenvironment. *Front. Immunol.* V. 12: 693709.
- Müller A., Krickemeyer E., Bögge H., Schidtmann M., Peters F. 1998. Organizational forms of matter: an inorganic superfullerene and keplerate based on molybdenum oxide. *Angew Chem. Int.* V. 37. P. 3360.
- Müller A., Sarkar S., Nazir Shah S.Q., Bögge H., Schidtmann M., Sarkar Shatarupa, Kögerler P., Hauptfleisch B., Trautwein A.X., Schünemann V. 1999. Archimedian synthesis and magic numbers: «sizing» giant molybdenum – oxide based molecular spheres of the keplerate type. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* V. 38. P. 3238.
- Onofre G., Koláčková M., Jankovicová K., Krejsek J. 2009. Scavenger receptor CD163 and its biological functions. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. V. 52. P. 57.
- Ostroushko A.A., Gagarin, I.D., Tonkushina, M.O. 2018. Association of spherical porous nanocluster keplerate-type polyoxometalate $Mo_{72}Fe_{30}$ with biologically active substances. *J. Clust. Sci.* V. 29. P. 111.
- Ostroushko A.A., Grzhegorzhevskii K.V., Medvedeva S.Y. 2021. Physicochemical and biochemical properties of the keplerate-type nanocluster polyoxomolybdates as promising components for biomedical use. *Nanosystems: Phys. Chem. Mathem.* V. 12. P. 81.
- Reichel D., Tripathi M., Perez J.M. 2019. Biological effects of nanoparticles on macrophage polarization in the tumor microenvironment. *Nanotheranostics*. V. 3. P. 66.
- Rogler G. 2017. Immune cells: monocytes and macrophages. In: Baumgart D.C. (Ed.) 2017. *Crohn's disease and ulcerative colitis: from epidemiology and immunobiology to a rational diagnostic and therapeutic approach*: Springer. P. 119.
- Schaer D.J., Schaer C.A., Buehler P.W., Boykins R.A., Schoedon G., Alayash A.I., Schaffner A. 2006. CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. *Blood*. V. 107. P. 373.

- Sharma L., Wu W., Dholakiya S.L. 2014. Assessment of phagocytic activity of cultured macrophages using fluorescence microscopy and flow cytometry. *Metods Mol. Biol.* V. 1172. P. 137.
- Stangel M., Joly E., Scolding N. J., Compston D.A.S. 2000. Normal polyclonal immunoglobulins ('IVIg') inhibit microglial phagocytosis in vitro. *J. Neuroimmunol.* V. 106. P. 137.
- Strober W. 2015. Trypan blue exclusion test of cell viability. *CP Immunol.* V. 111. P. A3. B. 1.
- Su L., Zhang W., Wu X., Zhang Y., Chen X., Liu G., Chen G., Jiang M. 2015. Glycocalyx-mimicking nanoparticles for stimulation and polarization of macrophages via specific interactions. *Small.* V. 11. P. 4191.
- Taylor P. R., Martinez-Pomares L., Stacey M., Lin H. H., Brown G. D., Gordon S. 2005. Macrophage receptors and immune recognition. *Ann. Rev. Immunol.* V. 23. P. 901.
- Terriere L.C. 1984. Induction of detoxication enzymes in insects. *Ann. Rev. Entomol.* V. 29. P. 71.
- Tian F., Cui D., Schwarz H., Estrada G.G., Kobayashi H. 2006. Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human *fi* broblasts. *Toxicol. In Vitro.* V. 20. P. 1202.
- Tonkushina M.O., Grzhegorzhevskii K.V., Ermoshin A.A., Tugbaeva A.S., Kim G.A., Taniya O.S., Gagarin I.D., Ostroushko A.A. 2022. The electrostatic-mediated formation of a coordination complex: the trapping and release of an antitumor drug with an anthracycline core from {Mo₇₂Fe₃₀} based ensembles. *Chemistry-Select.* V. 7. P. e202203684.
- Wang K, Feng B, Yang Y. 2021. Dual-factor synergistically activated ES IPT-based probe: differential fluorescence signals to simultaneously detect α -naphthyl acetate and acid α -naphthyl acetate esterase. *Anal. Chem.* V. 93. P. 14471.
- Wang X., Wei S., Zhao C. 2022. Promising application of polyoxometalates in the treatment of cancer, infectious diseases and Alzheimer's disease. *J. Biol. Inorg. Chem.* V. 27. P. 405.
- Wiggins D. 1991. Bronchoalveolar lavage. *Methods and application. Pulmonology.* V. 3. P. 43.
- Wolf-Grosse S., Mollnes T. E, Ali S., Stenvik J., Nilsen A.M. 2018. Iron Oxide nanoparticles enhance toll-like receptor-induced cytokines in a particle size- and actin-dependent manner in human blood. *Nanomed.* V. 13. P. 1773.
- Yamase T. 2013. Polyoxometalates active against tumors, viruses, and bacteria. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* V. 54. P. 65.
- Yunna C., Mengru H., Lei W., Weidong C. 2020. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur. J. Pharmacol.* V. 877: 173090.
- Zvereva E., Serebrov V., Glupov V., Dubovskiy I. 2003. Activity and heavy metal resistance of non-specific esterases in leaf beetle *Chrysomela lapponica* from polluted and unpolluted habitats. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* V. 35. P. 383.

EFFECT OF NANOCUSTER POLYOXOMETALATE {Mo₇₂Fe₃₀} ON MORPHOFUNCTIONAL STATE OF MACROPHAGES IN CULTURES

S. A. Titova^{a, *}, M. O. Tonkushina^a, K. V. Grzhegorzhevskii^a, I. G. Danilova^{a, b}, V. A. Pozdina^b, M. V. Ulitko^a, A. A. Ostroushko^a

^a Ural Federal University named after the First President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, 620002, Russia

^b Institute of Immunology and Physiology, Urals Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620049, Russia

* E-mail: svetattitova12021998@gmail.com

The aim of this work was to study the effect of nanocluster polyoxometalate {Mo₇₂Fe₃₀} on the macrophage link of the immune system. In vitro studies of polyoxometalate on macrophage cultures allowed us to evaluate the reaction of immune system cells (in particular, peritoneal and alveolar macrophages) to nanoparticles. The analysis of the obtained data allowed to establish that {Mo₇₂Fe₃₀} is not toxic for peritoneal and alveolar macrophages, has no significant effect on the morphology of cells, as well as on the activity of α -naphthylacetate esterase. However, it significantly reduces phagocytic activity when cells are cultured with POM, which may indicate possible polarisation of macrophages. The obtained results confirm the possibility of using {Mo₇₂Fe₃₀} in the field of biomedicine.

Keywords: macrophages, nanoclusters, polyoxometalates, cell cultures