

©Коллектив авторов

## ВЛИЯНИЕ ГИПЕРГЛИКЕМИИ НА АКТИВАЦИЮ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ БЕЛЫХ КРЫС

И.А. Голяко<sup>1</sup>, В.С. Кузьмин<sup>2</sup>, Л.Р. Горбачева<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
119991 Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1, стр. 12; \*эл. почта:gorbi67@mail.ru

<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. ак. Е.И. Чазова,  
121552 Москва, ул. Академика Чазова, 15а

<sup>3</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,  
117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Гипергликемия является одним из основных повреждающих факторов сахарного диабета (СД). Тяжесть данного заболевания наиболее ярко проявляется на фоне воспалительного процесса. В данной работе исследовали особенности активации перитонеальных макрофагов (МФ) крысы в условиях высокой концентрации глюкозы *in vitro*. В ходе оценки пролиферации и накопления нитритов в среде культивирования МФ и при сравнении изолированного и сочетанного влияния стрептозотоцинового сахарного диабета (СД) и гипергликемии установлено сходство эффектов СД и гипергликемии на МФ. Показано, что повышенный уровень глюкозы и в меньшей степени СД снижают базовую пролиферацию и продукцию NO МФ *in vitro*. Использование активатора протеинкиназы С (ПКС) фторболового эфира (ФЭ) отменяло провоспалительное действие тромбина на МФ, что может свидетельствовать о вовлечении ПКС в эффекты протеазы. При этом, влияние тромбина на уровень нитритов в среде культивирования демонстрирует выраженный дозозависимый характер, что не выявлено при измерении пролиферации. Провоспалительная активация МФ потенцируется гипергликемией — одним из основных патологических факторов СД. Несмотря на то, что глюкоза в высокой концентрации оказывает существенное влияние на пролиферацию и продукцию NO, не было выявлено статистически значимых различий между ответами МФ, полученных от здоровых животных, и МФ от животных со стрептозотоциновым СД. Такое соотношение наблюдалось по всем исследуемым в работе параметрам и при анализе пролиферации клеток, и при измерении нитритов в среде культивирования. Таким образом, полученные результаты указывают на ведущую роль повышенного уровня глюкозы в регуляции активации МФ, которая сопоставима с эффектом СД и даже “маскирует” его.

**Ключевые слова:** макрофаги; гипергликемия; тромбин; стрептозотин-вызванный диабет; оксид азота; пролиферация

**DOI:** 10.18097/PBMC20236906394

### ВВЕДЕНИЕ

По данным Международной Федерации Диабета (IDF), на 2021 год в мире зарегистрировано 537 миллионов больных сахарным диабетом (СД) и ежегодно их число возрастает. СД характеризуется стойким повышением уровня глюкозы в крови — гипергликемией, которая выступает в качестве наиболее значимого патологического фактора СД. Гипергликемия способствует повреждению сосудов, что приводит к развитию таких осложнений СД как нефропатии, нейропатии, ангиопатии, ретинопатии, диабетическая стопа и др. [1, 2]. Явно выраженная гипергликемия свидетельствует о тяжести заболевания. Диабет, так же, как и его осложнения, неразрывно связан с возникновением и развитием воспалительных процессов. Важную роль в воспалительных реакциях играют макрофаги (МФ) — иммунные клетки с микробицидной и противоопухолевой активностью, дифференцировка которых определяется стимулами окружающей ткани. За последнее десятилетие обширные исследования были сосредоточены именно на роли МФ как ключевых участников воспаления [3, 4]. МФ характеризуются пластичностью и способны быстро адаптироваться к широкому спектру биологических сигналов [5]. Секреторная активность макрофагов может иметь как провоспалительный,

так и противовоспалительный характер [6]. Известно, что провоспалительные цитокины, секретируемые МФ жировой ткани, нарушают сигнализацию инсулина в адипоцитах [5]. В результате возникающая инсулинорезистентность способствует развитию гипергликемии, которая приводит к повышению образования конечных продуктов гликирования и стимулирует продукцию активных форм кислорода МФ и эндотелиальными клетками [8, 9]. Кроме того, эти устойчивые воспалительные стимулы значительно уменьшают ранозаживляющее действие МФ [10–12]. Как следствие, язвы стопы являются ведущей причиной ампутаций у пациентов с диабетом.

Однако на настоящий момент известна и альтернативная точка зрения, которая предполагает, что иммунные клетки обеспечивают поддержание целостности тканей, и накопление МФ может быть защитным механизмом, направленным на борьбу с метаболическим стрессом [13]. Таким образом, механизм активации МФ и их роль в патологических процессах до конца не ясны.

Регуляция активности МФ осуществляется через мембранные рецепторы, в том числе и рецепторы, активируемые протеазами (ПАР), агонистом которых является сериновая протеаза — тромбин [14, 15]. Показано, что активация тромбином

ПАР на микроглиальных клетках приводила к увеличению экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS), продукции оксида азота (NO), активации транскрипционного фактора NF-κB [16]. Применение селективных ингибиторов протеинкиназы C (ПКС) на фоне данного воздействия способствовало снижению эффекта тромбина на активацию клеток. Интересно, что при гипергликемии и СД также происходит активация ПКСβ [17], которую считают одним из основных звеньев патофизиологических изменений при СД [18]. Показано, что ингибирование активности ПКСβ в условиях СД замедляет развитие диабетических осложнений, а в некоторых случаях приводит к улучшению состояния больного [17].

Активация ПКС и её участие в диабетических осложнениях связаны и с другими механизмами, например, окислительным стрессом и митохондриальной дисфункцией, что играет ключевую роль при гипергликемическом повреждении сосудов. Посредниками изменений сосудов, вызванных активацией ПКС, выступают VGSF, TGFβ1, эндотелин 1 и другие белки, нарушающие микроциркуляцию [19].

В настоящее время не ясно влияние высокого уровня глюкозы на активацию МФ, так же, как и их активация сериновыми протеазами гемостаза. В связи с этим целью нашей работы было изучение механизмов активации перитонеальных МФ крыс в условиях нормо- и гипергликемии.

## МЕТОДИКА

### Объект исследования

Эксперименты выполнены на первичной культуре макрофагов, выделенных из перитонеальной полости 3–4-месячных самцов крыс линии Wistar массой около 300 г. В контрольной группе было 9 животных, в группе с диабетом — 5. Животных содержали в виварии кафедры Физиологии человека и животных при температуре 23°C, стандартном суточном цикле освещённости (12 ч / 12 ч), сухой корм и вода животным — *ad libitum*.

### Индукция экспериментального сахарного диабета

Экспериментальный диабет первого типа вызывали однократным внутрибрюшинным введением стрептозотоцина (“Sigma”, США) в дозе 40 мг/кг. Стрептозотоцин является веществом, повреждающим β-клетки поджелудочной железы и тем самым снижающим продукцию инсулина в организме, что характерно для СД первого типа [20]. Данная методика индукции диабета используется во многих исследованиях [21, 22]. Раствор стрептозотоцина в концентрации 30 мг/мл готовили в 0,1 М цитратном буфере (pH 4,2) непосредственно перед введением. Контрольным животным вводили цитратный буфер. Уровень глюкозы в крови измеряли через неделю после введения стрептозотоцина при помощи глюкометра (“OK Biotech Co. Ltd”, Тайвань). Животное считали вошедшим в СД, если уровень глюкозы в крови превышал 16,66 мМ (300 мг/дл).

### Выделение перитонеальных макрофагов

Перитонеальные МФ получали по протоколу, описанному ранее [23]. Животных с СД и из контрольной группы наркотизировали хлороформом, декапитировали и вводили 10 мл фосфатно-солевого буфера (“Amresco”, США) в перитонеальную полость. Полученный смыв с перитонеальной полости центрифугировали в течение 5 мин при 300 g. Далее манипуляции с клетками проводили в стерильных условиях, используя БМБ-II-Ламинар-С-1.3 NEOTERIC (“Lamsystems”, Германия). Полученный осадок ресуспендировали в среде DMEM (“ПанЭко”, Россия), содержащей 0,5 мМ L-глутамин, 10% инактивированную эмбриональную бычью сыворотку (HI-FBS), 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина (“Gibco”, США) с концентрацией глюкозы 1 г/л (5,5 мМ). Подсчёт клеток и оценку жизнеспособности осуществляли при помощи счётчика клеток TC20 (“Bio-Rad”, США) после предварительного окрашивания суспензии красителем трипановым синим. Суспензию клеток (250 тыс. живых клеток на лунку) помещали на культуральные 48-луночные планшеты при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Через 2 ч проводили полную смену среды для удаления не прикрепившихся клеток. Данный протокол позволяет получить культуру макрофагов с чистотой более 90% [23].

### Активация перитонеальных макрофагов

Полученные МФ инкубировали в течение 24 ч в присутствии тромбина (“Sigma”) в концентрациях 10 нМ и 50 нМ, липополисахарида (ЛПС, Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O111:B4, L3024, “Sigma”) — 100 нг/мл, форболового эфира (Форбол 12-миристинат 13-ацетат, ФЭ, “Sigma”) — 100 нМ, кальциевого ионофора A23187 (A23, “Sigma”) — 100 нМ. Используемые активаторы МФ развели до необходимой концентрации в среде (DMEM) с нормальной (5,5 мМ), либо с высокой (25 мМ) концентрацией глюкозы и добавляли к клеточным культурам. Ранее в аналогичной модели показано, что именно высокая концентрация глюкозы повышает пролиферацию МФ [24].

Степень активации МФ оценивали по пролиферации и продукции оксида азота (NO).

### Оценка пролиферации перитонеальных макрофагов

Анализ пролиферации МФ осуществляли при помощи WST-1 теста в соответствии с рекомендациями производителя. Через 24 ч инкубации МФ с исследуемыми веществами среду культивирования заменяли на свежую с 10% содержанием WST-1-реагента (“Sigma”) и инкубировали в течение 40 мин. После чего измеряли оптическую плотность раствора при 450 нм на планшетном фотометре iMark (“Bio-Rad”).

### Оценка накопления нитритов в культуре перитонеальных макрофагов *in vitro* с помощью реактива Грисса

Уровень продукции NO оценивали по концентрации нитритов в среде, согласно ранее описанному

протоколу [25]. 50 мкл среды из клеточного супернатанта, собранного через 24 ч после добавления активаторов, смешивали с 50 мкл реактива Грисса ("Sigma"). Через 30 мин инкубации регистрировали оптическую плотность на планшетном фотометре iMark ("Bio-Rad"), используя фильтр на 530 нм.

#### Статистическая обработка данных

Статистический анализ проводили, используя программу GraphPad Prism 6.0 ("GraphPad Software", США). Статистическую обработку данных осуществляли с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с поправкой Даннетта для множественных сравнений. Предварительно данные были проверены на соответствие распределения нормальному тестом Шапиро-Уилка. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ . Число  $n$  в каждой группе — количество независимых экспериментов. В каждой группе было не менее 6 независимых повторов. Данные на графиках нормированы относительно контрольной группы при соответствующем уровне глюкозы (рис. 1–4) или относительно эффекта соответствующего воздействия при уровне глюкозы в среде 5,5 мМ (рис. 5, 6) и представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Влияние уровня глюкозы на провоспалительную активацию макрофагов *in vitro*

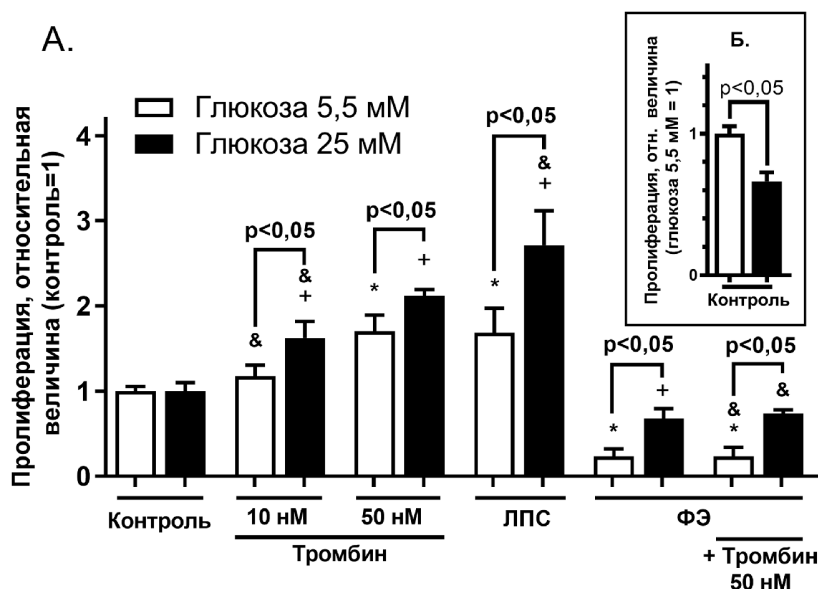
Индукция стрептозотоцин-вызванного диабета сопровождалась стойким повышением уровня глюкозы в крови животных. Через неделю после введения стрептозотоцина концентрация глюкозы

в крови животных достигала в среднем 26 мМ, в то время как у животных в контрольной группе этот показатель не изменялся, оставаясь на уровне 5,8 мМ. Помимо существенного увеличения концентрации глюкозы в крови у животных с СД наблюдали полидипсию, полиурию, потерю веса. Таким образом, используемая модель СД является адекватной и сопровождается характерными для данного заболевания симптомами.

#### Влияние уровня глюкозы на пролиферацию макрофагов *in vitro* при действии провоспалительных стимулов

Известно, что СД сопровождается поддержанием высокого уровня глюкозы в крови и стойким выраженным воспалительным ответом даже на слабые стимулы, что может приводить к дисфункции органов и некрозу тканей. В очаге воспаления наблюдается не только активация иммунокомпетентных клеток, их гибель, но и пролиферация [26].

В связи с этим, в первой серии экспериментов нами была исследована пролиферация МФ на фоне стимуляции в условиях нормального (5,5 мМ) и высокого (25 мМ) уровня глюкозы в среде культивирования. Обнаружено, что используемые нами вещества оказывали разное влияние на пролиферацию клеток. Так, при нормальном уровне глюкозы тромбин в нарастающих концентрациях (10 нМ и 50 нМ), как и ЛПС (100 нг/мл) повышали пролиферацию МФ по сравнению с контролем (без воздействия веществ) (рис. 1А). Поскольку для активации клеток в условиях *in vitro* часто используют ФЭ как активатор ПКС, а также повышение концентраций цитозольного кальция, например, с помощью ионофора А23187, мы проанализировали влияние этих веществ на МФ на фоне разной концентрации глюкозы в среде



**Рисунок 1.** Действие активаторов на пролиферацию МФ на фоне нормальной (5,5 мМ) и высокой (25 мМ) концентрации глюкозы. А. Пролиферация МФ в присутствии активаторов. Данные нормированы относительно контрольной группы (без активаторов) при соответствующем уровне глюкозы. Б. Пролиферация МФ в отсутствии воздействий (без активаторов). Данные нормированы относительно контрольной группы при уровне глюкозы 5,5 мМ. ЛПС – липополисахарид, ФЭ – фоболовый эфир. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем при концентрации глюкозы 5,5 мМ; + –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем при концентрации глюкозы 25 мМ; & –  $p < 0,05$  по сравнению с тромбином 50 нМ при той же концентрации глюкозы.

культивирования. Добавление в среду культивирования макрофагов ФЭ в условиях нормальной концентрации глюкозы (5,5 мМ) приводило к снижению пролиферации клеток как при изолированном, так и при совместном действии с 50 нМ тромбином по сравнению с контрольной группой (рис. 1А). Добавление в среду культивирования МФ кальциевого ионофора А23187 не оказывало влияния на пролиферацию (данные не представлены).

Культивирование МФ в течение 24 ч в среде с высокой концентрацией глюкозы (25 мМ) приводило почти к 2-кратному снижению числа клеток по сравнению с уровнем пролиферации МФ при аналогичных воздействиях, но при культивировании клеток в среде, содержащей 5,5 мМ глюкозу (рис. 1Б). Данный факт согласуется с имеющимися в литературе сведениями о токсическом действии высоких концентраций глюкозы [1]. Культивирование перитонеальных МФ в условиях высокой концентрации глюкозы (25 мМ) в течение 24 ч приводило к достоверному повышению пролиферации в ответ на добавление всех используемых веществ, по сравнению с их эффектами при нормальном уровне глюкозы в среде (рис. 1А). При этом, тромбин и ЛПС повышали пролиферацию МФ относительно контроля в 2,1 и 2,7 раза соответственно. Наблюдаемый эффект ЛПС значимо отличается от эффекта тромбина на пролиферацию МФ в данных условиях. Подобное различие может указывать на модулирующее влияние высокой концентрации глюкозы на процесс рецепции и внутриклеточную передачу сигнала под действием тромбина и ЛПС, что ранее было показано для рецепторов тромбина на эндотелиальных клетках

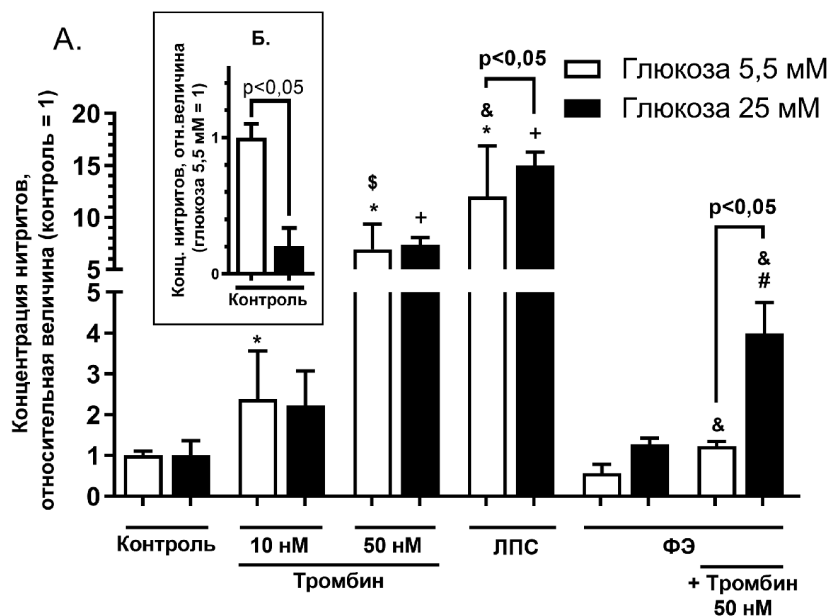
и тромбоцитах, а для TLR4 — на миокарде [27–29]. В условиях высокой глюкозы эффект ФЭ на пролиферацию МФ был выше, чем в условиях нормальной концентрации глюкозы; однако эти значения пролиферации оставались ниже показателей в контрольной группе клеток (рис. 1А).

Таким образом, повышение концентрации глюкозы в среде культивирования МФ потенцировало *in vitro* разнонаправленность эффектов на пролиферацию МФ ЛПС и тромбина с одной стороны и ФЭ — с другой.

#### Влияние уровня глюкозы на содержание нитритов в среде культивирования макрофагов при действии разных провоспалительных стимулов

Активация МФ может быть вызвана целым спектром разных факторов и сопровождаться секрецией как провоспалительных, так и противовоспалительных медиаторов. Например, бактерицидные свойства М1 МФ определяются продукцией свободных радикалов азота и кислорода при участии iNOS и NADPH-оксидазного комплекса. В последнее время показано, что повышенная продукция NO играет значительную роль в патогенезе СД [8, 11, 30]. Поэтому в следующей серии нами была проанализирована продукция оксида азота МФ по накоплению нитритов в среде культивирования.

Активация МФ на фоне нормальной концентрации глюкозы (5,5 мМ) 10 нМ и 50 нМ тромбином и ЛПС сопровождалась увеличением продукции NO в 2,5, 7,2 и 12,5 раз соответственно (рис. 2А). Как видно из рисунка 2А, уровень нитритов резко возрастает при инкубации клеток с 50 нМ тромбином, что подчёркивает зависимость эффекта тромбина



**Рисунок 2.** Влияние активаторов на продукцию оксида азота (NO) МФ на фоне нормальной (5,5 мМ) и высокой (25 мМ) концентрации глюкозы. Продукцию NO оценивали при помощи реакции Грисса по концентрации стабильных метаболитов (нитритов). **А.** Эффекты активаторов на концентрацию NO в среде культивирования. Данные нормированы относительно контрольной группы (без активаторов) при соответствующем уровне глюкозы. **Б.** Концентрация NO в среде культивирования в отсутствии воздействий (без активаторов). Данные нормированы относительно контрольной группы при уровне глюкозы 5,5 мМ. ЛПС – липополисахарид, ФЭ – фторболовый эфир. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем при глюкозе 5,5 мМ; + –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем при глюкозе 25 мМ; \$ –  $p < 0,05$  по сравнению с тромбином 10 нМ при той же концентрации глюкозы; & –  $p < 0,05$  по сравнению с тромбином 50 нМ при той же концентрации глюкозы; # –  $p < 0,05$  по сравнению с ФЭ при глюкозе 25 мМ.

от его концентрации. Интересно, что эффект тромбина на уровень пролиферации МФ не имел столь выраженного дозозависимого характера (рис. 1А). Влияние ФЭ на продукцию NO имело однонаправленный характер с наблюдаемым ранее его влиянием на пролиферацию МФ. Предобработка клеток ФЭ при нормальной концентрации глюкозы (5,5 мМ) отменяла влияние 50 нМ тромбина на уровень нитритов (рис. 2А). Кальциевый ионофор A23187 не влиял на продукцию NO МФ при нормальной концентрации глюкозы (данные не представлены).

Эффект 25 мМ глюкозы на продукцию NO макрофагами имел однонаправленный характер с её влиянием на пролиферацию (рис. 2Б). При этом, влияние тромбина на уровень накопления нитритов в среде культивирования клеток было сходным при культивировании МФ как в среде с 5,5 мМ глюкозой, так и в среде с 25 мМ глюкозой. Выраженность же эффекта ЛПС на высвобождение NO МФ в среде культивирования клеток с 5,5 мМ глюкозой и 25 мМ глюкозой отличалась (рис. 2А). При повышении концентрации глюкозы в среде от 5,5 мМ до 25 мМ существенно возрастал эффект совместного действия ФЭ и тромбина (50 нМ). Это может указывать на доминирующее влияние тромбина на данный показатель, в противоположность эффекту ФЭ.

Таким образом, нами обнаружено, что ЛПС и тромбин (50 мМ) обладают однонаправленным провоспалительным действием на МФ, вызывая увеличение продукции NO и стимулируя пролиферацию МФ. Культивирование МФ в среде с глюкозой в высокой концентрации потенцировало влияние указанных активаторов на клеточную пролиферацию. Изолированное действие высокого уровня глюкозы характеризовалось как угнетением пролиферации, так и снижением высвобождения NO перитонеальными МФ *in vitro*. Такое снижение высвобождения NO в условиях высокого уровня глюкозы может быть связано как со снижением активности NO-синтазы, что наблюдается при гипергликемии на фоне СД, так и с истощением L-аргинина, доступного для NO-синтазы [31, 32].

Активация ПКС в данных условиях имела сходный характер с действием высокой концентрации глюкозы на исследуемые показатели. Более того, повышение содержания глюкозы в среде культивирования МФ уменьшало отличия изменений накопления нитратов и пролиферации клеток, вызванных действием ФЭ от показателей в контроле. Это может свидетельствовать о сходном механизме действия ФЭ и гипергликемии на исследуемые показатели. В то же время, активация ПКС отменяет вызванные тромбином повышение как пролиферации, так и, в меньшей степени, высвобождение NO. Данный эффект, вероятно, обусловлен ингибирующим действием ФЭ на работу ПКС. В литературе описано подобное влияние длительной инкубации клеток в присутствии высоких концентраций ФЭ [33]. ПКС опосредует провоспалительные эффекты тромбина, в связи с этим её ингибирование должно приводить к снижению эффекта тромбина, что и подтверждается нашими данными.

#### *Влияние стрептозотоцинового сахарного диабета на провоспалительную активацию макрофагов in vitro*

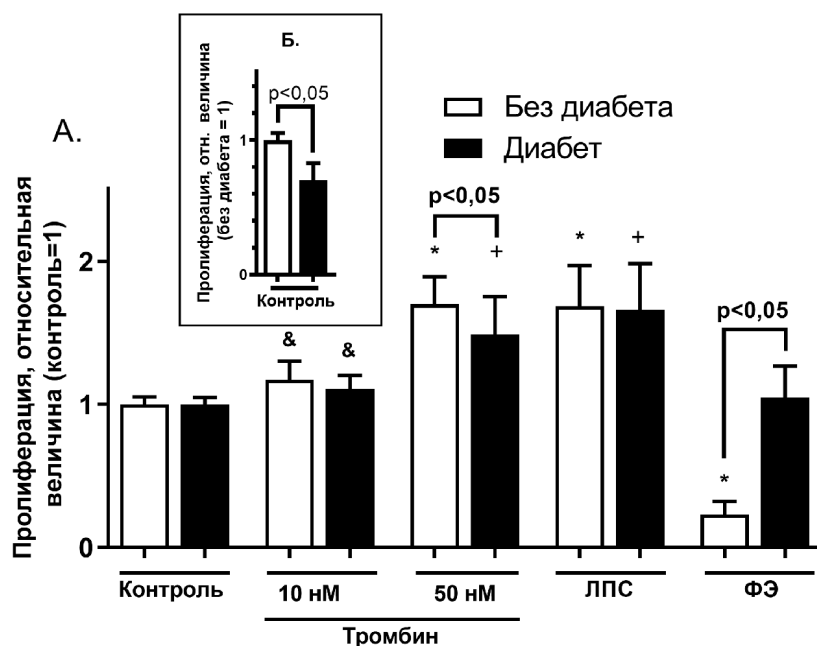
Известно, что при СД состояние иммунокомпетентных клеток изменяется, что, вероятно, определяет особенности развития воспаления при данном заболевании. Для исследования активации МФ на фоне СД мы использовали общепринятую модель стрептозотоцинового СД у крыс. Забор перитонеальных клеток осуществляли на 7 день после инъекции животным стрептозотоцина, когда уровень глюкозы был выше 16,6 мМ. При СД происходило снижение как пролиферации клеток, так и накопление нитритов, однако этот эффект был менее выражен, чем действие высокой концентрации глюкозы на МФ (см. предыдущий раздел, рис. 3Б, 4Б). Оценка пролиферации МФ, выделенных из крыс с СД, показала увеличение данного показателя лишь на фоне ЛПС и тромбина в концентрации 50 нМ, но не ФЭ и 10 нМ тромбина (рис. 3А). При этом, в отличие от действия высокой концентрации глюкозы, СД не повышал, а в случае аппликации тромбина (50 нМ) даже снижал данный показатель по сравнению с эффектами, наблюдаемыми на контрольных МФ (без СД). Влияние ФЭ на пролиферацию МФ крыс с диабетом имело сходный характер с его эффектом на МФ в условиях высокой концентрации глюкозы в среде (рис. 1А, 3А). Измерение уровня нитритов подтвердило однонаправленное влияние диабета на особенность действия активаторов на пролиферацию МФ при действии на них глюкозы в концентрации 25 мМ.

Обнаруженное нами снижение эффектов активаторов (за исключением ФЭ) на МФ в условиях СД по сравнению с действием высокого уровня глюкозы может определяться изменённым на момент аппликации препаратов состоянием клеток, подвергшихся действию гипергликемии в условиях диабета *in vivo*. В результате, выраженность ответа на стимуляцию *in vitro* МФ, полученных от животных с СД, снижена по сравнению с 24-часовым воздействием повышенного уровня глюкозы.

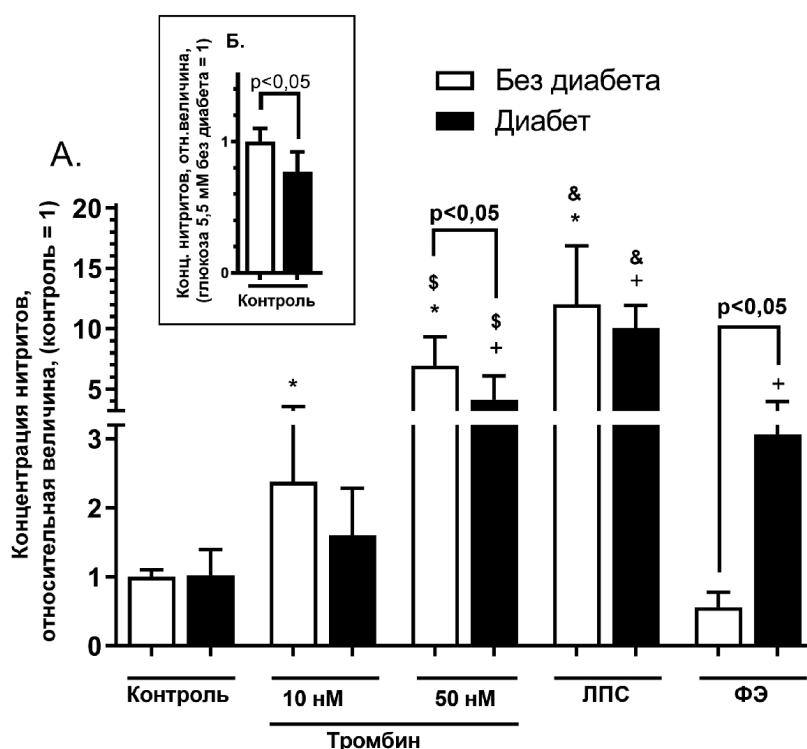
#### *Влияние уровня глюкозы в среде культивирования на провоспалительную активацию макрофагов крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом*

В следующей серии экспериментов мы провели сравнительный анализ влияния высокой концентрации глюкозы на вызванные активаторами ответы МФ контрольных животных и МФ от крыс с СД. Изменение действия активаторов под влиянием высокой концентрации глюкозы носит сходный характер как в случае МФ, полученных от контрольных животных (без диабета), так и полученных от животных с СД (рис. 5, 6).

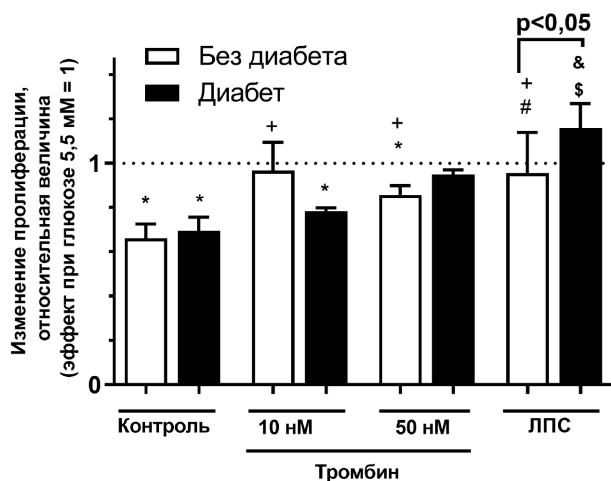
Так, высокая концентрация глюкозы способствовала существенному снижению пролиферации МФ в группе “без диабета” в контроле и при воздействии 50 нМ тромбина (рис. 5). Возможно, что индуцируемые высоким уровнем глюкозы реакции, например, продукция активных форм кислорода, могут приводить к гибели клеток и/или к снижению



**Рисунок 3.** Действие активаторов на пролиферацию МΦ на фоне СД и его отсутствия. **А.** Пролиферация МΦ в присутствии активаторов. Данные нормированы относительно контрольной группы (без активаторов) при соответствующем воздействии (отсутствие СД/СД). **Б.** Пролиферация МΦ в отсутствии воздействий (без активаторов). Данные нормированы относительно контрольной группы в отсутствии СД. ЛПС – липополисахарид, ФЭ – форболовый эфир. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем при отсутствии СД; + –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем при СД; & –  $p < 0,05$  по сравнению с тромбином 50 нМ при том же воздействии (отсутствие СД/СД).



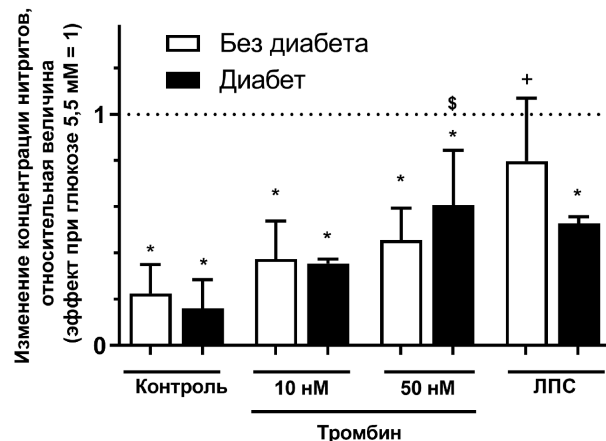
**Рисунок 4.** Влияние активаторов на продукцию оксида азота (NO) МΦ на фоне СД и при его отсутствии. Продукцию NO оценивали при помощи реакции Грисса по концентрации стабильных метаболитов (нитритов). **А.** Эффекты активаторов на концентрацию NO в среде культивирования МΦ. Данные нормированы относительно контрольной группы (без активаторов) при соответствующем воздействии (отсутствие СД/СД). **Б.** Концентрация NO в среде культивирования МΦ в отсутствии воздействий (без активаторов). Данные нормированы относительно контрольной группы в отсутствии СД. ЛПС – липополисахарид, ФЭ – форболовый эфир. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем при СД; + –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем при отсутствии СД; \$ –  $p < 0,05$  по сравнению с тромбином 10 нМ при том же воздействии (отсутствие СД/СД); & –  $p < 0,05$  по сравнению с тромбином 50 нМ при том же воздействии (отсутствие СД/СД).



**Рисунок 5.** Эффекты активаторов или их отсутствия на пролиферацию МФ при гипергликемии на фоне СД и его отсутствия. Данные нормированы относительно эффекта соответствующего активатора или его отсутствия при нормальном уровне глюкозы (5,5 мМ) при соответствующем воздействии (отсутствие СД/СД) (взято за 1). ЛПС – липополисахарид. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с эффектом воздействия при глюкозе 5,5 мМ (взято за 1); + –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем при отсутствии СД; \$ –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем при СД; & –  $p < 0,05$  по сравнению с тромбином 10 нМ при СД.

их устойчивости к действию патогенов, токсических факторов. Так, снижение пролиферации в присутствии 50 мМ тромбина может свидетельствовать о повышении чувствительности МФ к токсическому действию протеазы на фоне 25 мМ глюкозы (рис. 5). Ранее было показано, что тромбин в высоких концентрациях может вызывать гибель клеток [34]. Аналогичные изменения пролиферации клеток, полученных от животных с диабетом, были, как и в предыдущем случае, в группе без активаторов и в группе с тромбином (10 нМ). Таким образом, отсутствие в условиях гипергликемии достоверных различий относительных изменений (по сравнению с соответствующими воздействиями в условиях нормогликемии) пролиферации, вызванных используемыми факторами, между контрольной группой и группой животных с СД, указывает на “маскировку” вызванных повышенным уровнем глюкозы эффектов. Единственно достоверное отличие в пролиферации МФ было обнаружено между группами без СД и с СД при воздействии ЛПС. Более того, воздействие данного активатора на МФ от диабетических животных приводило к возрастанию его эффекта с возрастанием уровня глюкозы в среде. В то же время в группе без диабета пролиферация МФ в условиях высокого уровня глюкозы в среде не отличалась от величины данного показателя при нормогликемии (5,5 мМ) (рис. 5).

Анализ уровня нитритов в среде культивирования показал, что при высоком уровне глюкозы происходило снижение продукции NO МФ независимо от того, был ли до этого вызван СД у животного или нет (рис. 6). МФ, полученные от животных с СД демонстрировали снижение продукции NO



**Рисунок 6.** Эффекты активаторов или их отсутствия на продукцию оксида азота (NO) МФ при гипергликемии на фоне СД и его отсутствия. Продукцию NO оценивали при помощи реакции Грисса по концентрации стабильных метаболитов (нитритов). Данные нормированы относительно эффекта соответствующего активатора или его отсутствия при нормальном уровне глюкозы (5,5 мМ, значение принято за 1) при соответствующем воздействии (отсутствие СД/СД). ЛПС – липополисахарид. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с эффектом воздействия при глюкозе 5,5 мМ (принято за 1); # –  $p < 0,05$  по сравнению с ФЭ, тромбином 50 нМ при отсутствии СД; + –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем при отсутствии СД; \$ –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем при СД.

при высоком уровне глюкозы как в отсутствии (контрольная группа), так и в присутствии активаторов (тротбин 10 нМ, 50 нМ, ЛПС) (рис. 6). Аналогичный результат был получен для клеток животных без СД, за исключением группы с ЛПС, где эффект при высоком уровне глюкозы не отличался от такового при нормогликемии (рис. 6).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Высокая концентрация глюкозы существенно влияет на пролиферацию и продукцию NO МФ *in vitro*; более того, повышение глюкозы до 25 мМ в среде культивирования нивелировало различия в ответах МФ на провоспалительные стимулы между группами животных без СД и с СД. Такое соотношение наблюдалось по всем исследуемым в работе параметрам и при анализе пролиферации клеток, и при измерении нитритов в среде культивирования.

Таким образом, полученные результаты указывают на ведущую роль повышенного уровня глюкозы в регуляции активации МФ, которая сопоставима с эффектом СД и даже “маскирует” его.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 22-15-00189 (эксперименты по изучению провоспалительной активации макрофагов в культуре) и научного проекта № 22-25-00848 (эксперименты по моделированию и изучению сахарного диабета *in vivo* и условий гипергликемии *in vitro*).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты были выполнены согласно Директиве 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sheetz M.J., King G.L. (2002) Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *Diabetes*, **288**(20), 2579-2588. DOI: 10.1001/jama.288.20.2579
2. King G.L., Loeken M.R. (2004) Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. *Histochem. Cell Biol.*, **122**(4), 333-338. DOI: 10.1007/s00418-004-0678-9
3. Qiu P., Liu Y., Zhang J. (2019) Review: The role and mechanisms of macrophage autophagy in sepsis. *Inflammation*, **42**(1), 6-19. DOI: 10.1007/s10753-018-0890-8
4. Oishi Y., Manabe I. (2018) Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *Int. Immunol.*, **30**(11), 511-528. DOI: 10.1093/intimm/dxy054
5. Lawrence T., Natoli G. (2011) Transcriptional regulation of macrophage polarization: Enabling diversity with identity. *Nat. Rev. Immunol.*, **11**(11), 750-761. DOI: 10.1038/nri3088
6. Olefsky J.M., Glass C.K. (2010) Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.*, **72**(1), 219-246. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021909-135846
7. Lee J. (2013) Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes. *Arch. Pharm. Res.*, **36**(2), 208-222. DOI: 10.1007/s12272-013-0023-8
8. Crespo M.J., Zalacain J., Dunbar D.C., Cruz N., Arocho L. (2008) Cardiac oxidative stress is elevated at the onset of dilated cardiomyopathy in streptozotocin-diabetic rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, **13**(1), 64-71. DOI: 10.1177/1074248407307854
9. di Marco E., Gray S.P., Jandeleit-Dahm K. (2013) Diabetes alters activation and repression of pro- and anti-inflammatory signaling pathways in the vasculature. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **4**, 68. DOI: 10.3389/fendo.2013.00068
10. Louiselle A.E., Niemiec S.M., Zgheib C., Liechty K.W. (2021) Macrophage polarization and diabetic wound healing. *Transl. Res.*, **236**, 109-116. DOI: 10.1016/j.trsl.2021.05.006
11. Maassen S., Coenen B., Ioannidis M., Harber K., Grijpstra P., van den Bossche J., van den Bogaart G. (2023) Itaconate promotes a wound resolving phenotype in pro-inflammatory macrophages. *Redox Biol.*, **59**, 102591. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102591
12. Mirza R.E., Fang M.M., Weinheimer-Haus E.M., Ennis W.J., Koh T.J. (2014) Sustained inflammasome activity in macrophages impairs wound healing in type 2 diabetic humans and mice. *Diabetes*, **63**(3), 1103-1114. DOI: 10.2337/db13-0927
13. Ahmed M., de Winther M.P.J., van den Bossche J. (2017) Epigenetic mechanisms of macrophage activation in type 2 diabetes. *Immunobiology*, **222**(10), 937-943. DOI: 10.1016/j.imbio.2016.08.011
14. Cunningham M.A., Rondeau E., Chen X., Coughlin S.R., Holdsworth S.R., Tippinget P.G. (2000) Protease-activated receptor 1 mediates thrombin-dependent, cell-mediated renal inflammation in crescentic glomerulonephritis. *J. Exp. Med.*, **191**(3), 455-462. DOI: 10.1084/jem.191.3.455
15. Colognato R., Slupsky J.R., Jendrach M., Burysek L., Syrovets T., Simmet T. (2003) Differential expression and regulation of protease-activated receptors in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells. *Blood*, **102**(7), 2645-2652. DOI: 10.1182/blood-2002-08-2497
16. Ryu J., Pyo H., Jou I., Joeet E. (2000) Thrombin induces NO release from cultured rat microglia via protein kinase C, mitogen-activated protein kinase, and NF-kappa B. *J. Biol. Chem.*, **275**(39), 29955-29959. DOI: 10.1074/jbc.M001220200
17. Joy S., Scates A.C., Bearely S., Dar M., Taulien C.A., Goebel J.A., Cooney M.J. (2005) Ruboxistaurin, a protein kinase C  $\beta$  inhibitor, as an emerging treatment for diabetes microvascular complications. *Ann. Pharmacother.*, **39**(10), 1693-1699. DOI: 10.1345/aph.1E572
18. Варданын Г., Алавердян А. (2009) Протеинкиназа C: от особенностей молекулярной структуры до возможной роли при развитии диабетической нейропатии. *Нейрохимия*, **26**(1), 19-28. [Vardanyan G.S., Alaverdyan A.R. (2009) Protein kinase C: from its specific molecular structure to its role in diabetic neuropathy. *Neurochemical Journal*, **3**(1), 14-22.] DOI: 10.1134/s1819712409010024
19. Morgan D., Oliveira-Emilio H.R., Keane D., Hirata A.E., Santos da Rocha M., Bordin S., Curi R., Newsholme P., Carpinelliet A.R. (2007) Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. *Diabetologia*, **50**(2), 359-369. DOI: 10.1007/s00125-006-0462-6
20. Lenzen S. (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, **51**(2), 216-226. DOI: 10.1007/s00125-007-0886-7
21. Furman B.L. (2015) Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr. Protoc. Pharmacol.*, **70**(1), 5.47.1-5.47.20. DOI: 10.1002/0471141755.ph0547s70
22. Fiordaliso F., Li B., Latini R., Sonnenblick E.H., Anversa P., Leri A., Kajstura J. (2000) Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats is angiotensin II-dependent. *Lab. Invest.*, **80**(4), 513-527. DOI: 10.1038/labinvest.3780057
23. Zhang X., Goncalves R., Mosser D.M. (2008) The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.*, **83**(1), 14.1.1-14.1.14. DOI: 10.1002/0471142735.im1401s83
24. Liu Y.J., Saini A., Cohen D.J., Ooi B.S. (1995) Modulation of macrophage proliferation by hyperglycemia. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **114**(1-2), 187-192. DOI: 10.1016/0303-7207(95)96799-n
25. Qiu L., Ding L., Huang J., Wang D., Zhang J., Guo B. (2009) Induction of copper/zinc-superoxide dismutase by CCL5/CCR5 activation causes tumour necrosis factor- $\alpha$  and reactive oxygen species production in macrophages. *Immunology*, **128**(1pt2), e325-e334. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.02966.x
26. Gerlach B.D., Ampomah P.B., Yurdagul A. Jr., Liu C., Lauring M.C., Wang X., Kasikara C., Kong N., Shi J., Tao W., Tabas I. (2021) Efferocytosis induces macrophage proliferation to help resolve tissue injury. *Cell Metab.*, **33**(12), 2445-2463. DOI: 10.1016/j.cmet.2021.10.015
27. Vital Rao H., Bihagi S.W., Iannucci J., Sen A., Grammas P. (2021) Thrombin signaling contributes to high glucose-induced injury of human brain microvascular endothelial cells. *J. Alzheimer's Dis.*, **79**(1), 211-224. DOI: 10.3233/JAD-200658



28. Sudic D., Razmara M., Forslund M., Ji Q., Hjemdahl P., Li N. (2006) High glucose levels enhance platelet activation: Involvement of multiple mechanisms. *Br. J. Haematol.*, **133**(3), 315-322. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2006.06012.x
29. Wang Y., Luo W., Han J., Khan Z.A., Fang Q., Jin Y., Chen X., Zhang Y., Wang M., Qian J., Huang W., Lum H., Wu G., Liang G. (2020) MD2 activation by direct AGE interaction drives inflammatory diabetic cardiomyopathy. *Nat. Commun.*, **11**(1), 2148. DOI: 10.1038/s41467-020-15978-3
30. Jin X., Yao T., Zhou Z., Zhu J., Zhang S., Hu W., Shen C. (2015) Advanced glycation end products enhance macrophages polarization into M1 phenotype through activating RAGE/NF- $\kappa$ B pathway. *Biomed Res. Int.*, **2015**, 732450. DOI: 10.1155/2015/732450
31. Noyman L., Marikovsky M., Sasson S., Stark A.H., Bernath K., Seger R., Madar Z. (2002) Hyperglycemia reduces nitric oxide synthase and glycogen synthase activity in endothelial cells. *Nitric Oxide*, **7**(3), 187-193. DOI: 10.1016/s1089-8603(02)00106-4
32. de Souza L.F., Barreto F., da Silva E.G., Andrades M.E., Guimarães E.L., Behr G.A., Moreira J.C., Bernard E.A. (2007) Regulation of LPS stimulated ROS production in peritoneal macrophages from alloxan-induced diabetic rats: Involvement of high glucose and PPAR $\gamma$ . *Life Sci.*, **81**, 153-159. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.04.035
33. Severn A., Wakelam M.J.O., Liew F.Y. (1992) The role of protein kinase C in the induction of nitric oxide synthesis by murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **188**(3), 997-1002. DOI: 10.1016/0006-291x(92)91330-s
34. Gorbacheva L., Pinelis V., Ishiwata S., Strukova S., Reiser G. (2010) Activated protein C prevents glutamate- and thrombin-induced activation of nuclear factor-kappaB in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*, **165**(4), 1138-1146. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.11.027

Поступила в редакцию: 12. 11. 2023.  
После доработки: 17. 11. 2023.  
Принята к печати: 20. 11. 2023.

## THE EFFECT OF HYPERGLYCEMIA ON THE ACTIVATION OF PERITONEAL MACROPHAGES OF ALBINO RATS

I.A. Golyako<sup>1</sup>, V.S. Kuzmin<sup>2</sup>, L.R. Gorbacheva<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Moscow State University,

1/12 Leninskie Gory, GSP-1, Moscow, 119991 Russia; \*e-mail: gorbi67@mail.ru

<sup>2</sup>Academician E.I. Chazov National Medical Research Center for Cardiology,

15a Academic Chazov str., Moscow, 121552 Russia

<sup>3</sup>Pirogov Russian National Research Medical University,

1 Ostrovityanova str., Moscow, 117997 Russia

Hyperglycemia is one of the main damaging factors of diabetes mellitus (DM). The severity of this disease is most clearly manifested under conditions of the inflammatory process. In this work, we have studied the activation features of rat peritoneal macrophages (MPs) under conditions of high glucose concentration *in vitro*. Comparison of the independent and combined effects of streptozotocin-induced DM and hyperglycemia on proliferation and accumulation of nitrites in the MPs culture medium revealed similarity of their effects. Elevated glucose levels and, to a lesser extent, DM decreased basal proliferation and NO production by MPs *in vitro*. The use of the protein kinase C (PKC) activator, phorbol ester (PMA), abolished the proinflammatory effect of thrombin on MPs. This suggests the involvement of PKC in the effects of the protease. At the same time, the effect of thrombin on the level of nitrites in the culture medium demonstrates a pronounced dose-dependence, which was not recognized during evaluation of proliferation. Proinflammatory activation of MPs is potentiated by hyperglycemia, one of the main pathological factors of diabetes. Despite the fact that high concentrations of glucose have a significant effect on proliferation and NO production, no statistically significant differences were found between the responses of MPs obtained from healthy animals and from animals with streptozotocin-induced DM. This ratio was observed for all parameters studied in the work, during analysis of cell proliferation and measurement of nitrites in the culture medium. Thus, the results obtained indicate the leading role of elevated glucose levels in the regulation of MPs activation, which is comparable to the effect of DM and even “masks” it.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

**Key words:** macrophages; hyperglycemia; thrombin; streptozotocin-induced diabetes mellitus; nitric oxide; proliferation

**Funding.** The study was carried out with financial support from the Russian Science Foundation within the framework of the scientific project No. 22-15-00189 (experiments to study the pro-inflammatory activation of macrophages in culture) and the scientific project No. 22-25-00848 (experiments on modeling and studying DM *in vivo* and conditions of hyperglycemia *in vitro*).

Received: 12.11.2023; revised: 17.11.2023; accepted: 20.11.2023.