

УДК 577.27:615.275.4:547.992.2-032.34  
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2025-4-95-103>

## Влияние гуминовых кислот торфа на фагоцитарную активность клеток врожденного иммунитета и гуморальный иммунный ответ

Трофимова Е.С.<sup>1,2</sup>, Зыкова М.В.<sup>2</sup>, Лигачева А.А.<sup>1</sup>, Селиванова Н.С.<sup>1,2</sup>, Данилец М.Г.<sup>1</sup>, Карнаухова Е.А.<sup>1</sup>, Шерстобоев Е.Ю.<sup>1</sup>, Белоусов М.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга (НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга), Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томский НИМЦ)

Россия, 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)

Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

### РЕЗЮМЕ

**Цель.** Изучение влияния курсового введения гуминовых кислот торфа болот Томской области на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов и нейтрофилов крови мышей и тимусзависимый гуморальный иммунный ответ, вызванный введением эритроцитов барана.

**Материалы и методы.** Использовались следующие иммунологические методы: изучение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов и нейтрофилов крови мышей, определение количества антителообразующих клеток (АОК) в селезенках мышей, измерение уровня антител к эритроцитам барана в сыворотке крови мышей с помощью реакции гемагглютинации после курсового введения образцов торфяных гуминовых кислот. В эксперименте использовали 70 самок мышей линии C57BL/6J в возрасте 7–8 нед.

**Результаты.** Курсовое введение всех исследуемых образцов гуминовых кислот приводило к увеличению числа фагоцитов и интенсивности поглощения ими частиц. Два из трех образцов усиливали гуморальный иммунный ответ, индуцированный введением эритроцитов барана, который проявлялся увеличением числа АОК в селезенках и титра гемагглютининов в сыворотке крови.

**Заключение.** Образцы гуминовых кислот, влияющие на фагоцитарную функцию макрофагов и нейтрофилов и усиливающие гуморальный иммунный ответ, могут послужить основой для разработки новых терапевтических средств для лечения иммунодефицитных состояний.

**Ключевые слова:** гуминовые кислоты, фагоцитоз, перитонеальные макрофаги, нейтрофилы, гуморальный иммунный ответ, антителообразующие клетки, гемагглютинины

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

**Источник финансирования.** Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Министерства здравоохранения РФ № 056-00071-22-02.

**Соответствие принципам этики.** Исследование одобрено биоэтическим комитетом НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ (протокол № 227012024 от 01.02.2024).

**Для цитирования:** Трофимова Е.С., Зыкова М.В., Лигачева А.А., Селиванова Н.С., Данилец М.Г., Карнаухова Е.А., Шерстобоев Е.Ю., Белоусов М.В. Влияние гуминовых кислот торфа на фагоцитарную активность клеток врожденного иммунитета и гуморальный иммунный ответ. *Бюллетень сибирской медицины*. 2025;24(4):95–103. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2025-4-95-103>.

✉ Трофимова Евгения Сергеевна, [evs.trofimova@yandex.ru](mailto:evs.trofimova@yandex.ru)

## Effects of peat humic acids on phagocytic activity of innate immunity cells and humoral immune response

Trofimova E.S.<sup>1,2</sup>, Zykova M.V.<sup>2</sup>, Ligacheva A.A.<sup>1</sup>, Selivanova N.S.<sup>1,2</sup>, Danilets M.G.<sup>1</sup>, Karnaukhova E.A.<sup>1</sup>, Sherstoboev E.Yu.<sup>1</sup>, Belousov M.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences

3 Lenin Ave., 634028 Tomsk, Russian Federation

<sup>2</sup> Siberian State Medical University

2 Moskovsky trakt, 634050 Tomsk, Russian Federation

### ABSTRACT

**Aim.** To study the effect of a course administration of peat humic acids from bogs of the Tomsk Region on the phagocytic activity of peritoneal macrophages and blood neutrophils in mice, and the thymus-dependent humoral immune response induced by the administration of sheep erythrocytes.

**Materials and methods.** The following immunological methods were used: study of the phagocytic activity of peritoneal macrophages and blood neutrophils of mice, determination of the number of antibody-forming cells (AFC) in the spleen of mice, measurement of the serum level of antibodies to sheep erythrocytes by the hemagglutination assay after the course administration of three samples of peat humic acids. The experiment involved 70 C57Bl/6J mice (females), aged 7–8 weeks.

**Results.** It was found that the course administration of all studied samples of humic acids resulted in an increase in the number of phagocytes and the intensity of particle engulfment. Two out of three samples enhanced the humoral immune response induced by the administration of sheep erythrocytes, which was manifested by an increase in the number of AFCs in the spleen and the hemagglutination assay titer in the blood serum.

**Conclusion.** The samples of humic acids that influence the phagocytic function of macrophages and neutrophils and enhance the humoral immune response may serve as a basis for the development of new therapeutic agents for the treatment of immunodeficiency states.

**Keywords:** humic acids, phagocytosis, peritoneal macrophages, neutrophils, humoral immune response, antibody-forming cells, hemagglutinins

**Conflict of interest.** The authors declare the absence of obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

**Source of financing.** The study was funded by the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 056-00071-22-02.

**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the Bioethics Committee at E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk NRMC, Russian Academy of Sciences (Minutes No. 227012024 dated April 1, 2024).

**For citation:** Trofimova E.S., Zykova M.V., Ligacheva A.A., Selivanova N.S., Danilets M.G., Karnaukhova E.A., Sherstoboev E.Yu., Belousov M.V. Effects of peat humic acids on phagocytic activity of innate immunity cells and humoral immune response. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2025;24(4):95–103. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2025-4-95-103>.

## ВВЕДЕНИЕ

Процесс фагоцитоза представляет собой поглощение эукариотическими клетками, называемыми фагоцитами, микроорганизмов, разрушенных и поврежденных клеток хозяина, а также инородных частиц. Способностью к поглощению чужеродных агентов обладают моноциты крови, тканевые макрофаги, клетки микроглии, остеокласты, дендритные клетки, нейтрофильные лейкоциты. Фагоциты обеспечивают функционирование врожденного иммунитета и пред-

ставляют собой первую линию защиты организма при взаимодействии с инфекционными агентами. Типичными фагоцитами, способными уничтожать как внеклеточные, так и внутриклеточные микроорганизмы, являются нейтрофилы и макрофаги. Также эти клетки, вырабатывая цитокины и ростовые факторы, регулируют развитие и завершение воспаления, стимулируют активацию и пролиферацию лимфоцитов и других иммунокомпетентных клеток, что является необходимым звеном для развития эффективного адаптивного иммунного ответа [1, 2].

Кроме того, важным условием запуска приобретенного иммунитета является презентация антигена клеткам адаптивной иммунной системы, что осуществляется фагоцитами благодаря их способности к фагоцитозу и презентации чужеродных молекулярных паттернов Т-лимфоцитам [3]. Таким образом, процесс фагоцитоза является связующим звеном между врожденным и приобретенным иммунным ответом, что играет решающую роль, когда врожденный иммунитет не эффективен в устранении инфекционных агентов.

Гуморальный иммунный ответ относится к адаптивному иммунитету и основан на индукции антиген-специфических В-лимфоцитов и, как следствие, выработке и секреции антител, специфичных к антигену. Гуморальные иммунные реакции можно разделить на Т-клеточно-зависимые (тимусзависимые) и Т-клеточно-независимые (тимуснезависимые) ответы в зависимости от необходимости участия Т-лимфоцитов для выработки антител. При тимуснезависимых реакциях продукция антител происходит непосредственно после активации В-лимфоцитов антигенами. Запуск тимусзависимого гуморального иммунного ответа происходит после активации В-лимфоцитов Т-хелперами, чему предшествует представление антигена дендритными клетками и макрофагами Т-лимфоцитам [4]. Золотым стандартом для формирования тимусзависимого гуморального иммунного ответа считается известный Т-клеточный антиген – эритроциты барана (ЭБ) [5].

В настоящее время известно значительное количество средств для коррекции нарушений иммунной системы. Однако большинство из них представляют собой продукты химического синтеза с широким спектром побочных эффектов. Среди иммуномодулирующих препаратов природного происхождения известны только экстракт эхинацеи, препараты на основе бактериальных лизатов и иммуномодуляторы эндогенного происхождения, которые на данный момент времени, как правило, представлены рекомбинантными аналогами [6]. Актуальным направлением экспериментальной медицины является изучение таких природных соединений, как гуминовые вещества, выделенные из торфа и бурого угля, которые образуются в процессе гумификации биологических остатков растений и животных [7].

Основным компонентом гуминовых веществ являются гуминовые кислоты (ГК), которые представляют собой высокомолекулярные гетерополимеры, проявляющие сходные химические и биологические свойства, однако их точная молекулярная структура не определена [8]. Гуминовые кислоты широко используются в сельском хозяйстве и ветеринарии

и демонстрируют многочисленные биологические эффекты в эксперименте, а именно ранозаживляющее, адаптогенное, гепатопротекторное действие, противовоспалительную, антибактериальную и антиоксидантную активность [9, 10]. Исследования подтвердили влияние ГК на иммунные процессы, включая регуляцию выработки цитокинов, обладающих провоспалительными (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-6, IL-2) и противовоспалительными (IL-10, IL-4) свойствами, поляризацию макрофагов, процессы внутриклеточной сигнализации [11–14]. Показано их участие в регуляции как гуморального, так и клеточного звеньев иммунитета [15–17].

Принимая во внимание вышесказанное, изучение влияния ГК торфа болот Томской области на такие аспекты функционирования иммунной системы, как фагоцитарные реакции клеток врожденного иммунитета (макрофаги и нейтрофилы) и показатели адаптивного гуморального иммунного ответа, представляет особый интерес. Таким образом, целью настоящей работы является изучение влияния курсового применения торфяных ГК на фагоцитирующую активность перитонеальных макрофагов и нейтрофилов периферической крови лабораторных мышей, а также тимусзависимый гуморальный иммунный ответ, вызванный иммунизацией животных эритроцитами барана.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Получение гуминовых кислот

В качестве объектов исследования использовались ГК, выделенные из торфа методом массообменной экстракции. Экстракцию гуминовых веществ из торфа проводили при комнатной температуре на протяжении 8 ч с использованием раствора пирофосфата натрия (0,1 моль/л, соотношение 1 : 100). Добавляя в образцы соляную кислоту до pH = 1–2, из них осаждали гуминовые кислоты, центрифугировали, отмывали водой до pH = 7,0 и высушивали. В качестве источников сырья использовали три вида верхового торфа, добытого из торфяного месторождения «Васюганское» Томской области. Образец GKsphagn извлечен из сфагново-мочажинного вида торфа (отбор на глубине 20–70 см) со степенью разложения растительных остатков (R) 5–10% и зольностью (A) 2,8%. Образец GKpine-cott получен из сосново-пушицевого вида торфа (отбор на глубине 10–50 см, R = 30–35%, A = 7,3%). Образец GKmagellan выделен из вида торфа магелланикум (отбор на глубине 100–120 см, R = 10–15%, A = 2,7%).

### Химическое описание гуминовых кислот

Для каждого из образцов ГК был исследован элементный состав и определена молекулярная мас-

са ( $M_w$  – средневесовая молекулярная масса,  $M_n$  – среднечисленная молекулярная масса и  $M_p$  – пиковое значение молекулярных масс). Элементный состав (содержание углерода, водорода и азота) определяли с использованием С,Н,N-анализатора (Carlo Erba Strumentazione 1106, Италия) и выражали в атомных долях каждого из элементов, содержание кислорода определяли по разности. Для образца ГКsphagn: С –  $41,7 \pm 0,2\%$ , Н –  $40,1 \pm 0,2\%$ , N –  $1,9 \pm 0,01\%$ , O –  $16,3 \pm 0,1\%$ . Для образца ГКpine-cott: С –  $38,6 \pm 0,5\%$ , Н –  $42,5 \pm 0,4\%$ , N –  $1,40 \pm 0,02\%$ , O –  $17,6 \pm 0,2\%$ . Для образца ГКmagellan: С –  $38,4 \pm 0,5\%$ , Н –  $42,47 \pm 0,4\%$ , N –  $2,2 \pm 0,03\%$ , O –  $16,9 \pm 0,2\%$ . Для образца ГКsphagn:  $M_w = 39,7$  кДа,  $M_n = 7,7$  кДа и  $M_p = 17,5$  кДа. Для образца ГКpine-cott:  $M_w = 22,8$  кДа,  $M_n = 6,1$  кДа и  $M_p = 11,8$  кДа. Для образца ГКmagellan:  $M_w = 18,8$  кДа,  $M_n = 4,9$  кДа и  $M_p = 9,6$  кДа.

### Экспериментальные группы животных и схемы введения веществ

В качестве объектов исследования *in vivo* выступали самки мышей линии C57Bl/6J ( $n = 70$ ) в возрасте 7–8 нед, приобретенные в отделе экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (разрешение биоэтической комиссии № 227012024 от 01.02.2024). Продолжительность курса ГК составляла 10 сут и заключалась в ежедневных интраперитонеальных инъекциях. Препараты ГК готовили из расчета 1 мг/кг массы тела животного (в качестве растворителя использовали 0,9%-й раствор хлорида натрия) и вводили в объеме 100 мкл. Контрольная группа получала внутривентриально 100 мкл физиологического раствора, группа сравнения – 100 мкл глюкозаминилмурамилдипептида (ликопид, ООО «Скопинфарм», Россия) из расчета 2 мг/кг 10 сут. Режим дозирования и схема применения исследуемых соединений были предварительно оптимизированы в серии подготовительных экспериментов.

Для индукции тимусзависимого гуморального иммунного ответа животным интраперитонеально вводили ЭБ в дозе  $5 \times 10^6$  клеток на 5-е сут введения исследуемых веществ. Через 1 сут после окончания курса проводили оценку количества антителообразующих (АОК) клеток в селезенке животных, также собирали кровь для получения сыворотки и определения титров специфических антител к ЭБ (гемагглютининов) [18].

### Исследование способности нейтрофилов периферической крови к фагоцитозу

Стимуляция фагоцитоза нейтрофилов периферической крови осуществлялась с помощью добав-

ления к ним латексных частиц. Для этого гепарин (500 ЕД/мл) в объеме 3 мкл смешивали с 10 мкл образца периферической крови мышей, взятых из хвостовой вены через 24 ч после последней инъекции ГК, и 10 мкл латексных частиц (концентрация  $60\text{--}80 \times 10^3/\text{мкл}$ ) в лунках круглодонного планшета и инкубировали 30 мин при  $37^\circ\text{C}$ , встряхивая на шейкере. Далее планшет центрифугировали 5 мин ( $1\ 000$  об/мин), удаляли 10 мкл надосадка, осадок ресуспендировали и использовали для приготовления мазков на предметных стеклах. Мазки фиксировали красителем по Май-Грюнвальду, а затем докрашивали азуром II и эозином. Микроскопический анализ окрашенных мазков проводился для определения следующих показателей: фагоцитарный индекс (доля нейтрофилов, фагоцитировавших частицы латекса, %) и фагоцитарное число (среднее количество частиц латекса, поглощенных одним нейтрофилом) [18].

### Изучение фагоцитирующей активности перитонеальных макрофагов

Стимуляция фагоцитоза перитонеальных макрофагов осуществлялась с помощью раствора туши (0,05%), которую вводили мышам внутривентриально в объеме 2 мл через сут после последнего введения образцов ГК. Через 10 мин брюшную полость промывали физиологическим раствором, клеточную суспензию дважды осаждали центрифугированием, затем подсчитывали общее количество клеток перитонеального экссудата и количество макрофагов, поглотивших тушь. Затем суспензию клеток снова осаждали, избавлялись от супернатанта, а осадок разрушали дистиллированной водой и измеряли оптическую плотность раствора спектрофотометрически ( $\lambda = 620$  нм). Значения оптической плотности отражали объем поглощенной макрофагами туши. На основании данных рассчитывали фагоцитарный индекс (доля макрофагов, захвативших частицы туши) и фагоцитарное число (среднее количество туши, поглощенное одним макрофагом) [18].

### Определение количества клеток-антителопродуцентов в селезенках мышей

Извлеченные у мышей селезенки гомогенизировали вместе с 0,9%-м раствором хлорида натрия, полученный гомогенат фильтровали через сеточку и подсчитывали клеточность полученной взвеси. На водяной бане ( $50^\circ\text{C}$ ) смешивали 900 мкл агарозного раствора, состоящего из 0,7% агара (Difco, США) в среде 199 (Sigma, США), по 200 мкл 20%-й суспензии ЭБ и спленоцитов и 100 мкл комплемента (компания «Микроген», Россия). Полученную смесь

заливали в камеры Горяева и инкубировали во влажной атмосфере при 37 °С в течение 2 ч. Количество зон гемолиза, образованных в монослое эритроцитов и соответствующее количеству антителообразующих клеток, подсчитывали с помощью светового микроскопа [18].

### Определение уровня антител к эритроцитам барана (гемагглютининов) в сыворотке крови мышей

Сыворотку инактивировали при температуре 56 °С в течение 30 мин. После этого проводили последовательное разведение образцов в иммунологическом круглодонном планшете, используя объем 25 мкл и шаг 1 : 2. К каждому разведению добавляли 25 мкл 1%-й взвеси ЭБ и инкубировали смесь при 37 °С в течение 2 ч. Максимальное разведение сыворотки, при котором визуально фиксировалась агглютинация (склеивание) антигена, считали титром гемагглютининов и выражали в логарифмической форме по основанию 2 ( $\log_2 T$ ) [18].

Статистический анализ данных проводили в программе Statistica 10 (StatSoft) для Windows. Вследствие малого объема выборки для оценки статистической значимости различий количественных показателей трех и более групп использовали непараметрический критерий Краскела – Уоллиса. Исследуемые параметры описывали с помощью ме-

дианы ( $Me$ ) и межквартильного интервала ( $Q_1; Q_3$ ). Статистически значимыми считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ

После введения курсом мышам образцов ГК и ликопида (препарата сравнения) были получены следующие результаты. Все исследуемые образцы ГК и ликопид оказывали стимулирующее действие на способность нейтрофилов к фагоцитозу. Фагоцитарный индекс (доля нейтрофилов, поглотивших латекс, %) достоверно увеличивался во всех группах, получавших ГК и ликопид, при этом эффект ликопида был наиболее выражен (табл. 1). Образцы ГКsphagn и ГКmagellan увеличивали фагоцитарный индекс в меньшей степени, чем ликопид.

В отличие от ликопида и ГКpine-cott, образцы ГКsphagn и ГКmagellan существенно повышали фагоцитарное число нейтрофилов (количество частиц латекса на клетку). Образец ГКpine-cott не влиял на фагоцитарное число, однако значительно увеличивал фагоцитарный индекс, приближаясь по эффективности к ликопиду.

Далее было выявлено, что введение курсом ликопида и препаратов ГК вызывало рост клеточной популяции в перитонеальной жидкости подопытных мышей, а также повышение числа фагоцитирующих клеток в перитонеальном экссудате (табл. 2).

Таблица 1

Показатели фагоцитирующей способности нейтрофилов периферической крови мышей линии C57Bl/6J после курсового применения препаратов торфяных гуминовых кислот, $Me (Q_1; Q_3)$		
Группа наблюдения, доза, количество животных ( $n$ )	Фагоцитарный индекс	Фагоцитарное число
1. Контроль ( $n = 7$ )	9,00 (6,00; 10,00)	2,17 (1,50; 2,50)
2. Ликопид, 2 мг/кг ( $n = 7$ )	23,00 (19,00; 28,00); 1–2 $p = 0,001$	2,17 (1,74; 2,80)
3. ГКsphagn, 1 мг/кг ( $n = 7$ )	14,00 (12,00; 15,00); 1–3 $p = 0,02$ ; 2–3 $p = 0,001$	5,21 (4,14; 7,00); 1–3 $p = 0,001$ ; 2–3 $p = 0,001$
4. ГКpine-cott, 1 мг/кг ( $n = 7$ )	18,00 (18,00; 23,00); 1–4 $p = 0,001$	2,00 (1,72; 3,22)
5. ГКmagellan, 1 мг/кг ( $n = 7$ )	16,00 (13,00; 18,00); 1–5 $p = 0,009$ ; 2–5 $p = 0,002$	3,69 (3,41; 4,38); 1–5 $p = 0,002$ ; 2–5 $p = 0,01$

Таблица 2

Количественный состав клеток перитонеального экссудата мышей линии C57Bl/6J после курсового применения препаратов торфяных гуминовых кислот, $Me (Q_1; Q_3)$		
Группа наблюдения, доза, количество животных ( $n$ )	Количество клеток перитонеального экссудата, $\times 10^6$	Количество фагоцитирующих клеток перитонеального экссудата, $\times 10^6$
1. Контроль ( $n = 7$ )	0,78 (0,58; 1,33)	0,20 (0,13; 0,30)
2. Ликопид, 2 мг/кг ( $n = 7$ )	2,05 (2,03; 2,85); 1–2 $p = 0,002$	0,68 (0,60; 0,90); 1–2 $p = 0,002$
3. ГКsphagn, 1 мг/кг ( $n = 7$ )	3,88 (3,63; 4,18); 1–3 $p = 0,001$ ; 2–3 $p = 0,005$	1,03 (0,93; 1,30); 1–3 $p = 0,001$ ; 2–3 $p = 0,008$
4. ГКpine-cott, 1 мг/кг ( $n = 7$ )	3,70 (3,43; 4,38); 1–4 $p = 0,001$ ; 2–4 $p = 0,009$	1,18 (0,98; 1,28); 1–4 $p = 0,001$ ; 2–4 $p = 0,01$
5. ГКmagellan, 1 мг/кг ( $n = 7$ )	4,93 (4,83; 7,00); 1–5 $p = 0,001$ ; 2–5 $p = 0,001$	1,73 (1,48; 2,13); 1–5 $p = 0,001$ ; 2–5 $p = 0,001$

Также было показано, что применение *in vivo* ГК вызывало увеличение относительного количества макрофагов, поглотивших тушь (фагоцитарного индекса) как для группы препарата сравнения, так и для

опытных групп (табл. 3). Во всех экспериментальных группах также зафиксировано увеличение количества поглощенной туши клетками перитонеального экссудата относительно контрольных показателей.

Однако во всех исследуемых группах наблюдалось достоверное снижение среднего количества туши, поглощенной одним макрофагом (фагоцитарного числа), по сравнению с контролем, что мы связываем с существенным увеличением количества фагоцитирующих клеток в перитонеальном экссудате.

В ходе работы также исследовали параметры тимусзависимого гуморального иммунного ответа, вызванного введением ЭБ у мышей, получавших курс

ГК. Проводили оценку количества АОК в селезенке мышей и уровня антител к ЭБ (гемагглютининов) в сыворотке крови. В опытной группе животных, получавших курсом образец ГКsphagn, было зафиксировано снижение числа АОК относительно контрольной группы и группы, получавшей ликопид. Уровень продуцируемых антител к ЭБ (титр гемагглютининов) при этом также снижался в данной группе мышей (табл. 4).

Таблица 3

Показатели фагоцитирующей способности перитонеальных макрофагов мышей линии С57В1/6J после курсового применения препаратов торфяных гуминовых кислот, $Me(Q_2; Q_3)$			
Группа наблюдения, доза, количество животных ( $n$ )	Фагоцитарный индекс	Количество туши в клетках перитонеального экссудата, ед. опт. плотности	Фагоцитарное число, $\times 10^{-6}$
1. Контроль ( $n = 7$ )	22,58 (20,00; 24,53)	0,17 (0,13; 0,21)	0,91 (0,85; 1,08)
2. Ликопид, 2 мг/кг ( $n = 7$ )	29,63 (27,22; 33,33) 1-2 $p = 0,02$	0,42 (0,39; 0,47) 1-2 $p = 0,001$	0,59 (0,50; 0,65) 1-2 $p = 0,001$
3. ГКsphagn, 1 мг/кг ( $n = 7$ )	27,56 (24,34; 30,10) 1-3 $p = 0,008$	0,47 (0,43; 0,51) 1-3 $p = 0,001$	0,46 (0,40; 0,48) 1-3 $p = 0,001$ ; 2-3 $p = 0,04$
4. ГКpine-cott, 1 мг/кг ( $n = 7$ )	31,45 (26,86; 37,23) 1-4 $p = 0,006$	0,43 (0,39; 0,48) 1-4 $p = 0,001$	0,36 (0,34; 0,39) 1-4 $p = 0,001$ ; 2-4 $p = 0,002$
5. GKmagellan, 1 мг/кг ( $n = 7$ )	30,57 (30,00; 31,51) 1-5 $p = 0,01$	0,55 (0,49; 0,64) 1-5 $p = 0,001$ ; 2-5 $p = 0,005$	0,33 (0,30; 0,37) 1-5 $p = 0,001$ ; 2-5 $p = 0,001$

Таблица 4

Показатели гуморального тимусзависимого иммунного ответа у мышей линии С57В1/6J после курсового применения препаратов торфяных гуминовых кислот, $Me(Q_1; Q_3)$		
Группа наблюдения, доза, количество животных ( $n$ )	Количество антителообразующих клеток, $\times 10^3$ /селезенка	Титр гемагглютининов, $\log_2 T$
1. Контроль ( $n = 7$ )	24,29 (16,43; 31,43)	4,00 (3,00; 4,50)
2. Ликопид, 2 мг/кг ( $n = 7$ )	70,00 (58,57; 82,86); 1-2 $p = 0,001$	4,00 (3,00; 4,50)
3. ГКsphagn, 1 мг/кг ( $n = 7$ )	5,71 (4,29; 8,57); 1-3 $p = 0,002$ ; 2-3 $p = 0,004$	2,00 (1,50; 2,50); 1-3 $p = 0,02$ ; 2-3 $p = 0,01$
4. ГКpine-cott, 1 мг/кг ( $n = 7$ )	98,57 (82,86; 150,00); 1-4 $p = 0,001$ ; 2-4 $p = 0,002$	6,00 (4,50; 7,00); 1-4 $p = 0,01$ ; 2-4 $p = 0,03$
5. GKmagellan, 1 мг/кг ( $n = 7$ )	91,43 (62,86; 120,71); 1-5 $p = 0,001$ ; 2-5 $p = 0,001$	6,00 (5,50; 7,00); 1-5 $p = 0,001$ ; 2-5 $p = 0,005$

Тогда как в группе мышей, которым вводили ГКpine-cott, наблюдалось повышение числа АОК в селезенках и титра вырабатываемых ими антител. Такая же тенденция наблюдалась и у животных, получавших образец GKmagellan. Введение мышам препарата сравнения (ликопида) вызывало увеличение количества АОК в селезенках, но не оказывало влияния на продукцию ими гемагглютининов.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Продукты природного происхождения, такие как мумие, торф и сапропель, богатые гуминовыми веществами, активно применяются в практике народной медицины. Помимо доказанного в эксперименте адаптогенного, антиоксидантного, гепатопротекторного, ранозаживляющего, антибактериального и противовоспалительного действия [9, 10], гуминовые кислоты могут оказывать влияние на иммунную систему.

В работе D. Mudroňová и соавт. [16] продемонстрировано, что пищевая добавка на основе гуминовых кислот стимулировала поглощающую активность фагоцитов периферической крови цыплят-бройлеров, а также увеличивала долю CD4+ и уменьшала долю CD8+ лимфоцитов. Результаты, полученные R. Habibian и соавт. [19] с использованием препарата Farmagulator Dry, содержащего ГК, показали дозозависимое усиление гуморального иммунного ответа на вакцину против *B. melitensis*, а также повышение фагоцитоза дрожжевых частиц мононуклеарными лейкоцитами крови крыс при применении *ad libitum*.

Еще одним примером является работа A.V. Vucskits с соавт. [20], в которой показано, что добавление в рацион крыс гуминовых и фульвовых кислот, выделенных из бурого угля, приводит к усилению гуморального иммунитета, что проявляется в увеличении титра антител к овальбумину.

Аналогичные наблюдения сделаны на модели цыплят бройлеров [21], где использование кормовой добавки, состоящей из ГК или смеси ГК с органическими кислотами, приводило к увеличению титров антител к вирусам инфекционного бронхита и болезни Ньюкасла без влияния на биохимические параметры крови.

В рамках нашей работы изучено влияние ГК, выделенных экстракцией натрий пиррофосфатом из трех различных видов торфа болот Томской области (торфяное месторождение «Васюганское»), на фагоцитарную активность нейтрофилов, полученных из периферической крови, и перитонеальных макрофагов лабораторных мышей, а также показатели тимусзависимого гуморального иммунного ответа. Препараты гуминовых кислот животным применяли курсом на протяжении 10 сут. Группе сравнения вводили глюкозаминилмурамилдипептид (ликопид) – аналог бактериального пептидогликана, стимулирующий врожденный и приобретенный иммунитет, в том числе бактерицидную функцию фагоцитов и гуморальный иммунный ответ [22].

Нарушение способности клеток-эффекторов врожденного иммунитета – нейтрофилов и макрофагов – поглощать патогены может спровоцировать неконтролируемое распространение инфекции, накопление клеточного дебриса, хроническое воспаление и нарушения в формировании адаптивного иммунного ответа [3]. Таким образом, фагоцитоз играет ключевую роль в подавлении воспалительных процессов и восстановлении гомеостаза в организме, а соединения, способные повышать фагоцитарную активность иммунных клеток, рассматриваются как перспективные иммуномодулирующие препараты.

Результаты исследования продемонстрировали, что курсовое применение торфяных ГК и ликопида у мышей стимулировало фагоцитарную активность нейтрофильных лейкоцитов периферической крови – наблюдалось увеличение нейтрофилов, поглотивших латекс (фагоцитарный индекс) в образцах крови животных, получавших курсом все тестируемые препараты гуминовых кислот. Следует заметить, что эффект препарата ГКpine-cott был сравним с действием ликопида (см. табл. 1), а введение животным образцов GKsphagn и GKmagellan вызывало рост среднего количества частиц, поглощаемых одной клеткой (фагоцитарное число), по сравнению с группой, получавшей ликопид. Кроме того, курсовое введение препаратов вызывало увеличение общего числа клеток перитонеального экссудата, включая фагоцитирующие элементы (см. табл. 2), что нашло отражение в повышении фагоцитарного индекса перитонеальных макрофагов (см. табл. 3).

Следует отметить, что общее количество клеток перитонеального экссудата и количество фагоцитов в группах, получавших ГК, превышало аналогичные показатели для группы ликопида. Также мы наблюдали увеличение количества туши, поглощенной перитонеальными фагоцитами, во всех экспериментальных группах по сравнению с контрольной, получавшей физиологический раствор.

В процессе фагоцитоза инородных агентов антигенпрезентирующие клетки представляют чужеродные молекулярные структуры лимфоцитам. Это процесс запускает механизмы адаптивного иммунитета. В настоящем исследовании изучено воздействие курсового применения торфяных ГК на показатели гуморального иммунного ответа, сформированного у животных в результате иммунизации бараньими эритроцитами. Исследование показало, что введение образца GKsphagn подавляло активность антителообразующих клеток в селезенке и снижало уровень гемагглютининов в сыворотке крови подопытных животных относительно контрольной группы (см. табл. 4). В противоположность этому использование соединений GKpine-cott и GKmagellan стимулировало рост указанных параметров у мышей. Более того, после курсового введения препаратов GKpine-cott и GKmagellan значения как количества клеток-антителопродукторов, так и титра антител (гемагглютининов) оказались выше, чем аналогичные показатели, зафиксированные при применении ликопида. Образцы GKpine-cott и GKmagellan продемонстрировали иммуностимулирующую активность, выраженную в усилении фагоцитарной функции нейтрофилов периферической крови и перитонеальных макрофагов у мышей, а также в активации гуморального иммунного ответа на эритроциты барана. По результатам исследований их эффективность оказалась сопоставимой с препаратом сравнения (ликопидом), а в ряде случаев – даже превышающей его показатели.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате экспериментов нами установлено, что курсовая терапия всеми тестируемыми препаратами торфяных гуминовых кислот стимулировала пролиферацию фагоцитирующих клеток и повышала эффективность их взаимодействия с инородными частицами. Более того, применение курсом препаратов GKpine-cott и GKmagellan способствовало усилению гуморального иммунного ответа, вызванного введением эритроцитов барана подопытным животным, что выражалось в увеличении числа антителообразующих клеток в тканях селезенки и росте титра гемагглютининов в сыворотке крови. Таким образом, образцы гуминовых кислот GKpine-cott и GKmagellan,

выделенные из болот Томской области, способные стимулировать фагоцитарную активность макрофагов и нейтрофилов, а также повышать эффективность гуморального иммунного ответа, представляют перспективную основу для создания инновационных препаратов природного происхождения, которые могут быть использованы в терапии заболеваний, связанных с иммунодефицитными состояниями.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Prame Kumar K., Nicholls A.J., Wong C.H.Y. Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. *Cell Tissue Res.* 2018;371(3):551–565. DOI: 10.1007/s00441-017-2753-2.2.
2. Fu Y.L., Harrison R.E. Microbial phagocytic receptors and their potential involvement in cytokine induction in macrophages. *Front. Immunol.* 2021;12:662063. DOI: 10.3389/fimmu.2021.662063
3. Uribe-Querol E., Rosales C. Phagocytosis: our current understanding of a universal biological process. *Front. Immunol.* 2020;11:1066. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01066.
4. Kojima F., Frolov A., Matnani R., Woodward J.G., Croford L.J. Reduced T cell-dependent humoral immune response in microsomal prostaglandin E synthase-1 null mice is mediated by nonhematopoietic cells. *J. Immunol.* 2013;191(10):4979–4988. DOI: 10.4049/jimmunol.1301942.
5. Ladics G.S. Primary immune response to sheep red blood cells (SRBC) as the conventional T-cell dependent antibody response (TDAR) test. *J. Immunotoxicol.* 2007;4(2):149–152. DOI: 10.1080/15476910701337357.
6. Хаитов Р.М. Иммунотерапия; под ред. Р.М. Хаитова, Р.И. Атауллаханова, А.Е. Шульженко. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020:768.
7. Kleber M., Lehmann J. Humic substances extracted by alkali are invalid proxies for the dynamics and functions of organic matter in terrestrial and aquatic ecosystems. *J. Environ. Qual.* 2019;48(2):207–216. DOI: 10.2134/jeq2019.01.0036.
8. Ampong K., Thilakarathna M.S., Gorim L.Y. Understanding the role of humic acids on crop performance and soil health. *Front. Agron.* 2022;4:2022. DOI: 10.3389/fagro.2022.848621.
9. Zykova M.V., Bratishko K.A., Buyko E.E., Azarkina L.A., Ivanov V.V., Mihalyov D.A. et al. Coal-derived humic substances: insight into chemical structure parameters and biomedical properties. *Molecules.* 2024;29(7):1530. DOI: 10.3390/molecules29071530.
10. Vašková J., Stupák M., Vidová Ugurbaş M., Žatko D., Vaško L. Therapeutic efficiency of humic acids in intoxications. *Life (Basel).* 2023;13(4):971. DOI: 10.3390/life13040971.
11. Şhitoğlu M.H., Öztupuz Ö., Karaboğa İ., Ovalı M.A., Uzun M. Humic acid has protective effect on gastric ulcer by alleviating inflammation in rats. *Cytol. Genet.* 2022;56:84–97. DOI: 10.3103/S0095452722010091.
12. Verrillo M., Parisi M., Savy D., Caiazza G., Di Caprio R., Luciano M.A., Cacciapuoli S., Fabbrocini G., Piccolo A. Anti-inflammatory activity and potential dermatological applications of characterized humic acids from a lignite and a green compost. *Sci. Rep.* 2022;12(1):2152. DOI: 10.1038/s41598-022-06251-2.
13. Trofimova E.S., Zykova M.V., Danilets M.G., Ligacheva A.A., Sherstoboev E.Y., Tsupko A.V. et al. Immunomodulating properties of humic acids extracted from Oligotrophic sphagnum magellanicum peat. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2021;170(4):461–465. DOI: 10.1007/s10517-021-05088-5.
14. Trofimova E.S., Zykova M.V., Ligacheva A.A., Danilets M.G., Sherstoboev E.Yu., Selivanova N.S. et al. The role of intracellular signaling molecules in macrophage activation by peat humic acids. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2023;175(3):353–357. DOI: 10.1007/s10517-023-05866-3.
15. Ahfeethah F., Elazomi A., Kammon A. Effect of humic acid and probiotics on immunity of broiler chickens. *Open Vet. J.* 2023;13(7):839–845. DOI: 10.5455/OVJ.2023.v13.i7.5.
16. Mudroňová D., Karaffová V., Pešulová T., Koščová J., Maruščáková I.C., Bartkovský M. et al. The effect of humic substances on gut microbiota and immune response of broilers. *Food Agric. Immunol.* 2020;31(1):137–149. DOI: 10.1080/09540105.2019.1707780.
17. Bujňák L., Hreško Šamudovská A., Mudroňová D., Naď P., Marcinčák S., Maskal'ová I., Harčárová M., Karaffová V., Bartkovský M. The Effect of dietary humic substances on cellular immunity and blood characteristics in piglets. *Agriculture.* 2023;13(3):636. DOI: 10.3390/agriculture13030636.
18. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая; под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2013:944.
19. Habibian R., Morshedi A., Delirez N. Effect of humic acid on humoral immune response and phagocytosis. *Global Veterinaria.* 2010;4(2):135–139.
20. Vucskits A.V., Hullár I., Bersényi A., Andrásosfzky E., Kulcsár M., Szabó J. Effect of fulvic and humic acids on performance, immune response and thyroid function in rats. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.).* 2010;94(6):721–728. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2010.01023.x.
21. Akaichi A., Jebali A., Abbes O., Haj Taieb S., Feki M., Kaboudi K. et al. Effect of humic acid and organic acids, alone or in combination, on blood biochemical constituents and humoral immune response in broiler chickens. *Livest. Sci.* 2022;258:104880. DOI: 10.1016/j.livsci.2022.104880.
22. Несмеянов В.А. Механизм действия и клиническая эффективность иммуномодулятора глюкозаминилмурамил дипептида (ликопида). *Клиническая медицина.* 1997;75(3):11–15.

### Вклад авторов

Шерстобоев Е.Ю. и Данилец М.Г. разработали концепцию и дизайн экспериментов. Зыкова М.В. синтезировала образцы и провела их стандартизацию. Трофимова Е.С., Лигачева А.А., Селиванова Н.С., Карнаухова Е.А. проводили оценку биологической активности изучаемых веществ с помощью иммунологических методов. Данилец М.Г., Лигачева А.А., Карнаухова Е.А. анализировали и интерпретировали данные. Трофимова Е.С., Зыкова М.В. участвовали в написании текста статьи и проверке критически важного интеллектуального содержания. Шерстобоев Е.Ю. и Белоусов М.В. утвердили рукопись для публикации.

## Информация об авторах

**Трофимова Евгения Сергеевна** – д-р мед. наук, ст. науч. сотрудник НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ; доцент кафедры патофизиологии, СибГМУ, г. Томск, [evs.trofimova@yandex.ru](mailto:evs.trofimova@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0002-5367-715X>

**Зыкова Мария Владимировна** – д-р фармацевт. наук, доцент, зав. кафедрой химии, СибГМУ, г. Томск, [huminolog@mail.ru](mailto:huminolog@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1973-8983>

**Лигачёва Анастасия Александровна** – канд. биол. наук, науч. сотрудник, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск, [vittelli@mail.ru](mailto:vittelli@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-3337-1516>

**Селиванова Наталья Сергеевна** – мл. науч. сотрудник, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ; ассистент кафедры нормальной физиологии, СибГМУ, г. Томск, [selivan.ns@gmail.com](mailto:selivan.ns@gmail.com), <https://orcid.org/0009-0006-6218-3051>

**Данилец Марина Григорьевна** – д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, [danilets\\_mg@pharmso.ru](mailto:danilets_mg@pharmso.ru), <https://orcid.org/0000-0001-7862-4778>

**Карнаухова Елизавета Александровна** – аспирант, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск, [eak\\_eak@mail.ru](mailto:eak_eak@mail.ru), <https://orcid.org/0009-0003-5312-8462>

**Шерстобоев Евгений Юрьевич** – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, зав. отделом иммунофармакологии, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, Томский НИМЦ, г. Томск, [sherstoboev\\_eu@pharmso.ru](mailto:sherstoboev_eu@pharmso.ru), <https://orcid.org/0000-0002-6178-5329>

**Белоусов Михаил Валерьевич** – д-р фармацевт. наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтического анализа, СибГМУ, г. Томск, [mvb63@mail.ru](mailto:mvb63@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>

(✉) **Трофимова Евгения Сергеевна**, [evs.trofimova@yandex.ru](mailto:evs.trofimova@yandex.ru)

Поступила в редакцию 24.04.2025;  
одобрена после рецензирования 02.06.2025;  
принята к публикации 19.06.2025