

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет
им. В.И. Вернадского» Минобрнауки Российской Федерации
Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского»
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

КИРЕЕВА ЕЛЕНА АЛЬФРЕДОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ГЛЮКОНАТОВ
3D-МЕТАЛЛОВ НА МОДЕЛИ ИНДУЦИРОВАННОЙ
МИЕЛОМЫ Sp2/0 Ag14 У МЫШЕЙ BALB/c**

3.3.3 – Патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Князева Ольга Александровна

Научный консультант:
доктор медицинских наук,
Фомочкина Ирина Ивановна

Симферополь – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Взаимодействие иммунной системы и опухоли.....	13
1.2. Роль нейтрофилов в элиминации неопластических клеток.....	19
1.3. Роль комплемента при неопластических процессах.....	21
1.4. Роль стресса в развитии злокачественных новообразований.....	23
1.5. Терапия неопластических образований путем воздействия на иммунную систему.....	24
1.6. Иммуностропные и противоопухолевые свойства 3d-металлов.....	28
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
2.1. Экспериментальные модели для исследования эффектов глюконатов 3d-металлов на показатели иммунного ответа и прогрессии индуцированной миеломы Sp 2/0 Ag14 у мышей BALB/c.....	51
2.1.1. Модель индуцированной миеломы Sp 2/0 Ag14 у мышей линии BALB/c.....	51
2.1.2. Модель иммуносупрессии у мышей BALB/c.....	52
2.1.3. Модель экспериментального стрессового расстройства у мышей BALB/c.....	52
2.2. Методы исследования эффектов глюконатов 3d-металлов на показатели иммунного ответа и прогрессии миеломы Sp 2/0 Ag14 у мышей BALB/c....	52
2.2.1. Введение глюконатов 3d-металлов и препаратов сравнения.....	52
2.2.2. Определение содержания компонентов комплемента в сыворотках крови мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14 и больных ходжкинскими и неходжкинскими лимфомами.....	54
2.2.3. Определение лейкоцитарных индексов в крови мышей BALB/c.....	56
2.2.4. Определение влияния глюконатов 3d-металлов на показатели опухолевой прогрессии миеломы Sp 2/0 Ag14 у мышей BALB/c.....	57
2.2.5. Морфологическое исследование опухолевых образований и органов	

мышей BALB/c индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14.....	58
2.2.6. Определение поглотительной активности нейтрофилов крови мышей BALB/c индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14.....	58
2.2.7. Определение метаболической активности нейтрофилов крови мышей BALB/c индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14.....	59
2.2.8. Оценка поведенческих реакций мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14 в тесте «Открытое поле».....	62
2.2.9. Статистическая обработка результатов.....	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	65
3.1. Исследование влияния глюконатов 3d-металлов на оценочные критерии системы комплемента в сыворотке крови мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14 при сопоставлении с данными показателями у больных с лимфопролиферативными заболеваниями.....	65
3.2. Исследование влияния глюконатов 3d-металлов на реактивность иммунной системы у мышей BALB/c по лейкоцитарным показателям эндогенной интоксикации	73
3.3. Исследование эффектов глюконатов 3d-металлов (Mn, Cu, Zn) на опухолевую прогрессию и морфологические изменения в тканях на модели индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 у линейных мышей BALB/c.....	85
3.4. Оценка влияния глюконатов марганца, меди и цинка на поглотительную и метаболическую активность нейтрофилов периферической крови мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14.....	117
3.5. Исследование влияния глюконата марганца на поведенческие реакции мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14 на фоне моделированного стрессового расстройства.....	132
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	138
ВЫВОДЫ.....	142
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	143
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	146

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Литературные данные последних 10-15 лет показывают, что перспективным методом профилактики и лечения неопластических образований является сочетание классических методов с использованием иммуностропных препаратов, в частности, соединений таких физиологически активных элементов как 3d-металлы (так называемые «биометаллы») – марганец, железо, кобальт, медь и цинк. Эффективность терапии, активируемой ионами 3d-металлов, убедительно подтверждена во многих работах (Lv, M. et al., 2020; Toren A. et al., 2016; 2020; Wang C. et al., 2020; Du W. et al., 2021).

Появляется все больше доказательств того, что металлы не только являются необходимыми компонентами для функционирования почти половины всех ферментов, участвуя практически во всех фундаментальных биологических процессах, но играют важную роль и в регуляции врожденного иммунного восприятия, защиты хозяина от вторжения патогенов, а также имеют тесное взаимодействие с процессами онкогенеза, апоптоза, иммуногенеза и иммунопатологических процессов (Efimova I. et al., 2020; Rozenberg J.M. et al., 2022). О значении ионов металлов для иммунитета свидетельствует также выявление различных иммунодефицитов у больных с мутациями в ионных каналах и при онкологических заболеваниях (Амбеси-Импломбато Ф.С. и др., 2014; Карзакова Л.М. и др., 2008).

Образуя координационные соединения с физиологически активными молекулами, переходные металлы способствуют формированию в их структуре новых активных центров, изменяющих реакционную способность, а, значит, и свойства этих соединений (Esfahani K. et al., 2019).

Терапия неопластических патологий путем воздействия на иммунную систему организма принесла пациентам значительные улучшения с точки зрения выживаемости и качества жизни. Тем не менее, мы все еще находимся на начальной

стадии открытия разнообразных иммунологических функций ионов металлов и механистического понимания роли этих ионов в иммунной регуляции. В связи с этим исследование механизмов действия соединений 3d-металлов является актуальной задачей, для решения которой могут быть выбраны координационные соединения некоторых 3d-металлов с полидентатным лигандом D-глюконовой кислотой – органической кислотой природного происхождения. Эти соединения ранее были изучены в разноплановых экспериментах *in vitro* и *in vivo*, которые продемонстрировали их иммуностропные свойства. В частности, корректирующее действие на иммунный и окислительный гомеостаз мышей показано в работах (Князева О.А. и др., 2016; 2018; 2018; 2021; 2022), ингибирование опухолевого процесса под действием композиции глюконатов 3d-металлов в работах (Князева О.А., 2008; Князева О.А., Камилов Ф.Х., 2011). Однако механизмы противоопухолевого действия этих соединений не изучены, не установлена связь между изменениями показателей иммунитета и прогрессирования опухолевого процесса. Поэтому исследования в данном направлении представляются весьма актуальными.

Степень разработанности темы исследования

Металлы являются компонентами всех форм жизни, в частности, 3d-металлы: железо (Fe), кобальт (Co), марганец (Mn), медь (Cu) и цинк (Zn) играют жизненно важную роль в обмене веществ, благодаря своим уникальным окислительно-восстановительным свойствам. Они находятся в d-блоке периодической таблицы Д.И. Менделеева, их особенностью является незаполненность внутренних d-орбиталей, благодаря которой они могут иметь разную степень окисления и обладают способностью образовывать донорно-акцепторные / координационные связи с атомами азота, серы, кислорода в составе различных органических соединений.

Вопросы противоопухолевого действия 3d-металлов исследованы в литературе недостаточно.

Мало сведений о том, какое влияние на опухолевый рост оказывают 3d-металлы в комплексе с глюконовой кислотой, в соединении с которой уменьшается их токсичное действие, а биологическая доступность, напротив, возрастает. До сих пор не выяснены механизмы такого действия.

Известно, что многие лекарственные препараты, ингибирующие развитие опухоли, подавляют иммунную систему, и это значительно снижает эффективность терапии. Поэтому исследования веществ, обладающих способностью одновременно оказывать иммуностропное и противоопухолевое действие, являются актуальными. В этом отношении особое место занимают соединения 3d-металлов, дисбаланс которых, как уже отмечалось, наблюдается при многих заболеваниях, в том числе, онкологических.

На основании имеющихся литературных данных, можно полагать, что глюконаты 3d-металлов проявляют противоопухолевое действие, благодаря своим иммунокорректирующим свойствам, а в случае глюконата марганца, благодаря стабилизирующему влиянию на нейроиммунную ось, поскольку ионы марганца участвуют также в синтезе и обмене нейромедиаторов (Нотова С.В. и др., 2020). Поэтому для подтверждения данного предположения необходимо было провести исследование, которое могло бы это подтвердить.

В данном диссертационном исследовании, которое является продолжением серии научных работ, выполненных по научному направлению, посвященному иммунологическому надзору при неопластических процессах и поиску иммуностропных веществ, оказывающих противоопухолевое действие (руководитель – О.А. Князева), изучаются вопросы влияния соединений 3d-металлов с глюконовой кислотой на степень эндогенной интоксикации, вызванной цитостатиком циклофосфамидом, эффекты глюконатов металлов марганца, меди и цинка, в наибольшей степени проявивших иммуномодулирующие свойства, на индуцированную миелому, поглотительную и метаболическую активность нейтрофилов. Анализируется корреляционная зависимость между показателями прогрессирования миеломы и фагоцитарной активности, влияние глюконата марганца на поведенческие реакции животных, косвенно отражающие состояние

центральной нервной системы.

Цель работы – установить эффекты соединений 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu и Zn) с глюконовой кислотой на показатели иммунного ответа и прогрессии экспериментально индуцированной миеломы Sp 2/0 Ag14 у мышей BALB/c.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать влияние глюконатов 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn) на оценочные критерии системы комплемента в сыворотке крови мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14 при сопоставлении с данными показателями у больных с лимфопролиферативными заболеваниями.

2. Оценить влияние глюконатов 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn) на реактивность иммунной системы у мышей BALB/c по лейкоцитарным показателям эндогенной интоксикации.

3. Изучить эффекты наиболее иммуностимулирующих глюконатов 3d-металлов (Mn, Cu, Zn) на опухолевую прогрессию и морфологические изменения в тканях на модели индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 у линейных мышей BALB/c.

4. Оценить влияние глюконатов 3d-металлов (Mn, Cu, Zn) на поглотительную и метаболическую активность фагоцитов крови мышей BALB/c на фоне индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14.

5. Исследовать влияние глюконата марганца на поведенческие реакции мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14 при экспериментальном стрессовом расстройстве.

Научная новизна работы

В данной работе впервые показано ингибирующее действие глюконатов марганца, меди и цинка на миелому Sp2/0 Ag14, индуцированную у мышей BALB/c.

Впервые дана оценка влияния глюконатов 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn) на реактивность иммунной системы мышей BALB/c по лейкоцитарным

показателям эндогенной интоксикации.

Впервые показано, что под действием глюконатов марганца, меди и цинка происходит увеличение метаболической активности нейтрофилов в периферической крови мышей BALB/c, коррелирующее со снижением показателей прогрессирования индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14.

Впервые показано корригирующее влияние глюконата марганца на поведенческие реакции мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14 на фоне экспериментального стрессового расстройства.

Теоретическая и практическая значимость

Получены новые данные, характеризующие механизмы действия глюконатов марганца, меди и цинка на индуцированную миелому Sp2/0 Ag14 у линейных мышей BALB/c.

Показана возможность ингибирования индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c с помощью перорального введения глюконатов марганца, меди и цинка.

Обнаружена корреляционная зависимость между повышением метаболической активности нейтрофилов, сопровождающейся образованием активных форм кислорода, инициирующих апоптоз опухолевых клеток, и снижением показателей прогрессирования миеломы, что может быть одним из основных механизмов ингибирующего действия глюконатов 3d-металлов на индуцированную миелому Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c.

Установлено корригирующее действие глюконата марганца на поведенческие реакции мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14 на фоне экспериментального стрессового расстройства, свидетельствующее о возможном механизме его противоопухолевого действия путем стабилизирующего влияния на нейроиммунную ось.

Полученные в диссертационной работе результаты могут быть использованы для продолжения исследований иммуностимулирующих и опухолингибирующих

эффектов соединений 3d-металлов, а также в лечебно-профилактической терапии неопластических процессов.

Методология и методы исследования

Настоящее диссертационное исследование выполнено на самцах мышей линии BALB/c, у которых моделировали экспериментальную миелому штамма Sp2/0 Ag14. В исследовании использовали соединения 3d-металлов с глюконовой кислотой: глюконат марганца (MnGl), глюконат железа (FeGl), глюконат кобальта (CoGl), глюконат меди (CuGl), глюконат цинка (ZnGl), которые синтезировали в ОСП ФГБНУ «Уфимский институт химии» УФИЦ РАН – в лаборатории физико-химических методов анализа по методикам, описанным ранее (Конкина И.Г. и др., 2002; 2003).

При проведении исследований использовали методы моделирования патологических процессов: индуцированной миеломы, иммуносупрессии и стрессового расстройства у мышей; методы введения препаратов подопытным животным: глюконатов 3d-металлов, цитостатика циклофосфида, иммуномодулятора глюкозаминилмурамилдипептида (ликопида) и кальция глюконата. Для анализа результатов экспериментов изменения функций иммунной и нервной систем подопытных и контрольных животных оценивали с помощью составления таблиц, построения диаграмм. Проводили морфологические, биохимические, иммунологические исследования крови и органов у мышей BALB/c. Определяли показатели прогрессирования индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14, показатели системы комплемента, лейкоцитарную формулу крови, лейкоцитарные показатели эндогенной интоксикации, поглотительную и метаболическую активность фагоцитов, оценивали поведенческие функции мышей BALB/c на фоне индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 с использованием теста «Открытое поле».

Цифровой материал подвергали статистической обработке для установления средних величин, отклонений от них, различий между средними величинами и их

достоверности. Наличие корреляционной зависимости между показателями иммунной системы и показателями прогрессирования индуцированной миеломы оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Данные исследования проведены при использовании сертифицированного оборудования.

Положения диссертации, выносимые на защиту

1. Глюконаты 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn) повышают реактивность иммунной системы при экспериментальной эндогенной интоксикации у мышей BALB/c, вызванной цитостатиком циклофосфамидом: снижают токсическую иммуносупрессию, увеличивают реактивность фагоцитов и скорость регенерации лейкоцитарного звена. Наиболее высокая эффективность выявлена у глюконата марганца, далее следуют глюконаты цинка и меди.

2. Глюконаты 3d-металлов оказывают ингибирующее действие на индуцированную миелому Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c и увеличивают продолжительность их жизни. Наибольшая эффективность обнаружена у глюконата марганца и глюконата цинка.

3. Глюконаты марганца, меди и цинка увеличивают фагоцитарную активность нейтрофилов, что коррелирует со снижением показателей прогрессирования индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c, указывая на возможный механизм их противоопухолевого действия, обусловленного иммуномодулирующими свойствами.

4. Введение мышам BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14 глюконата марганца на фоне экспериментального стрессового расстройства, оказывает корректирующее действие на их поведенческие реакции, что свидетельствует о механизме противоопухолевого действия, опосредованного стабилизирующим действием на нейроиммунную ось.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных в ходе данной работы результатов подтверждается применением современных методов исследования, их хорошей воспроизводимостью и согласованностью.

Материалы диссертации были представлены на различных конференциях: 83-я Всероссийская научная конференция студентов и молодых ученых с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины», г. Уфа, 23 апреля, 2018; II Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы биохимии, генетики и биотехнологии», г. Уфа, 2-4 октября 2018; 84-я Всероссийская научная конференция студентов и молодых ученых с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины», г. Уфа, 23-24 апреля 2019; Всероссийская научно-практической конференции с международным участием, посвященная 90-летию профессоров А.Ш. Бышевского и Р.И. Лифшица, г. Тюмень, 24-26 октября 2019; II Объединённый научный форум VI Съезда физиологов СНГ, VI Съезда биохимиков России, IX Российского симпозиума «Белки и пептиды». Сочи, Дагомыс, 1-6 октября 2019; XII Международная студенческая научная конференция. Студенческий научный форум, Москва, 2020; XXII Международный конгресс «Здоровье и образование в XXI веке», Москва, 20-22 декабря 2020; Международная научная конференция «Фундаментальные и прикладные исследования в медицине». Москва, 28-29 декабря 2020; III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. VII съезд биохимиков России. X Российский симпозиум «Белки и пептиды». VII съезд физиологов СНГ. Сочи, Дагомыс, 3–8 октября 2021.

Личный вклад

Результаты, приведенные в диссертации, получены лично автором или при непосредственном его участии. Диссертант самостоятельно провела

информационный поиск, анализ источников литературы, непосредственно участвовала в лабораторных исследованиях, оформлении первичной документации, статистической обработке результатов, формулировании основных положений и выводов, подготовке научных публикаций и представлении результатов работы на научно-практических конференциях. Разработка научных идей, планирование экспериментальных работ, формулирование целей и задач исследований, проведение анализа и представления полученных результатов в научной печати проведены совместно с научным руководителем.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Взаимодействие иммунной системы и опухоли

Концепция иммунологического надзора, которую выдвинул в 1900 г. П. Эрлих, заключается в том, что иммунная система воспринимает неопластические клетки как чужеродные и элиминирует. Позже эта гипотеза была разработана Ф.М. Бернетом, который считал, что иммунологический контроль над соматическими клетками – главная функция иммунной системы (Йегер Л. и др., 1990).

Стратегии уклонения опухоли от иммунной атаки могут быть самыми разными (Бурместер Г.-Р., Пецутто А., 2009; Malladi S. et al., 2016; Mantovani A. et al. 2017; McGranahan N. et al., 2017; Bottcher J.P. et al., 2018; Gonzalez H. et al., 2018): 1 – в некоторых опухолях может не быть пептидов, соответствующих участкам связывания на молекулах МНС; 2 – может происходить потеря молекул основного класса гистосовместимости I (МНС-I) на поверхности опухолевых клеток из-за снижения экспрессии генов МНС, в результате которых они не распознаются цитотоксическими Т-клетками; 3 - в опухолевых клетках из-за нарушения синтеза антигена (например, из-за дефицита белка-транспортера, связанного с процессингом антигена) опухолевые пептиды не транспортируются в эндоплазматический ретикулум; 4 – у опухолевых клеток нет костимулирующих молекул CD80 и CD86, необходимых для активации Т-клеток, без которых презентация пептида приводит к анергии и толерантности Т-клеток; 5 – некоторые опухолевые клетки прекращают синтезировать опухолевые антигены, чтобы избежать иммунной реакции; 6 - опухоль может производить иммуносупрессоры (например, ИЛ-10 и трансформирующий фактор роста β (ТФР- β)); 7 – некоторые опухолевые клетки синтезируют рецепторы-приманки, с которыми связываются лиганды, в результате чего не запускается механизм апоптоза; 8 – в клетках большинства злокачественных опухолей человека имеется фермент теломераза, который поддерживает длину теломеров, и тем самым обеспечивает им бессмертие; 9 – ряд опухолевых клеток приобретает способность защищаться от действия комплемента, неся на своей поверхности белки – ингибиторы

комплемента; 10 – для защиты от иммунного надзора опухолевые клетки используют взаимодействие с ингибирующими молекулами белка PD-1 и его лиганда PD-L1, предотвращающее чрезмерную реакцию Т-клеток. (PD-L1 – лиганд, экспрессируемый опухолевыми клетками; PD-1 (Programmed cell Death-1) – протеин, присутствующий на Т-лимфоцитах, который связывается с PD-L1 при попытке Т-лимфоцита разрушить опухолевую клетку, что вызывает: торможение пролиферации и выделение цитокинов, губительных для опухоли).

Приобретение неопластическими клетками подобных изменений приводит к развитию вторичного иммунодефицита, из-за которого иммунный ответ подавляется даже на иммуногенные опухолевые клетки.

В иммунном ответе против опухоли участвуют различные типы клеток адаптивного иммунитета: CD8⁺-Т-лимфоциты, дифференцирующиеся в цитотоксические Т-лимфоциты, В-клетки, продуцирующие противоопухолевые антитела и CD4⁺-Т-лимфоциты – помощники CD8⁺-Т-лимфоцитов и В-клеток, которые могут функционировать, как цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) (Xie Y., et al., 2010), оказывающие антиметастатический эффект (Sun W.W. et al., 2017).

К основным эффекторным клеткам естественного иммунитета, направленным против опухоли, относятся киллерные клетки / естественные киллеры (ЕК), дендритные клетки (ДК), макрофаги, полиморфно-ядерные лейкоциты (ПЯЛ), включая нейтрофилы.

Т-клетки – компоненты адаптивной иммунной системы, широко изучаются при различных типах рака (Speiser D.E. et al., 2016; Donadon et al., 2017). На ранних стадиях развития опухоли, если продуцируется достаточное количество иммуногенных антигенов, наивные Т-клетки активируются и мигрируют в опухолевое микроокружение (ОМО), откуда запускают эффекторный иммунный ответ, устраняя иммуногенные раковые клетки. Гистопатологический анализ опухолей человека показывает, что связанные с опухолью Т-клетки выходят за пределы инвазивного края опухоли и преобладают в ее ядре (Kirilovsky A. et al. 2016). Показано, что высокий уровень инфильтрации Т-клеток в опухоли связан с благоприятным прогнозом (Kitamura T. et al., 2015).

CD8⁺T-клетки – самые известные противоопухолевые клетки, после активации специализированных антигенпрезентирующих клеток и дифференцировки в ЦТЛ они оказывают эффективную противоопухолевую атаку, приводя к прямому разрушению клеток-мишеней посредством экзоцитоза гранул, содержащих перфорин и гранзим (Hanson H.L. et al., 2000; Matsushita H. et al., 2012). Противоопухолевый ответ, опосредованный CD4⁺T-хелперами 1 (Th-1) за счет секреции большого количества провоспалительных цитокинов способствует активации не только ЦТЛ, но и противоопухолевой активности макрофагов, ЕК и увеличения презентации опухолевых антигенов (Shankaran V. et al., 2001). Присутствие CD8⁺T-клеток и Th-1 в опухолях коррелирует с благоприятным прогнозом при многих злокачественных новообразованиях (Fridman W.H. et al., 2012).

Вследствие постоянного селективного давления эффекторного ответа отбираются варианты опухоли, избегающие иммунного распознавания. Трансформированные клетки вступают в фазу роста, одновременно опухолью индуцируется набор регуляторных CD4⁺T-клеток, которые противодействуют противоопухолевым иммунным клеткам с помощью различных механизмов (Gonzalez H. et al., 2018). В поддержании иммунного гомеостаза основным механизмом является регуляция эффекторного Т-клеточного ответа через иммунные контрольные точки на активированных CD4⁺T-клетках, использование ингибиторов к которым может приводить к усилению эффекторного противоопухолевого ответа (Gotwals P. et al., 2017). По мере того как иммунная система останавливает рост опухоли, раковые клетки и ОМО одновременно подавляют их противоопухолевую функцию, действуя на иммунные контрольные точки, вовлекая регуляторные CD4⁺T-клетки (Treg) (Ward-Hartstonge K.A., Kemp R.A., 2017), которые подавляют активацию Т-клеток и противоопухолевый иммунный ответ (Joshi N.S. et al., 2015). Показана терапевтическая эффективность ингибирования иммунных контрольных точек при метастатических карциномах (Pai-Scherf L. et al., 2017) и опухолях головного мозга, несмотря на отсутствие адаптивного иммунного ответа в центральной нервной системе (Di Giacomo A.M.

et al., 2017).

Роль В-клеток в прогрессировании рака изучена гораздо меньше, чем роль Т-клеток. После активации в зародышевых центрах лимфоидных органов В-клетки, экспрессирующие высокоаффинные антитела, дифференцируются в секретирующие антитела плазматические клетки и В-клетки памяти, которые обеспечивают гуморальный иммунитет (De Silva N.S., Klein U., 2015). Показано, что В-клетки способствуют и поддерживают рост опухоли, т.к. при их отсутствии прогрессирование опухоли снижается, а при адоптивном переносе хроническое воспаление, ангиогенез и рост опухоли восстанавливаются (Gonzalez H. et al., 2018).

ЕК – клетки врожденного иммунитета, которые проявляют быструю и сильную цитолитическую активность в ответ на инфицированные или трансформированные клетки (Cerwenka A., Lanier L.L., 2016), способные лизировать клетки-мишени без сенсibilизации, характерной для Т-киллеров. На своей клеточной поверхности они имеют широкий спектр ингибирующих и стимулирующих рецепторов, которые используются для иммунного надзора. Ингибирующие рецепторы нацелены на опухолевые клетки, лишенные МНС-I, маркируя их для запрограммированной гибели клеток (Marcus A. et al., 2014). ЕК обладают хорошо выраженным противоопухолевым действием (Marcus A. et al., 2014; Iannello A. et al., 2016). Существует сложная связь между зарождающейся трансформацией опухоли и способностью клеток врожденного иммунитета распознавать ее. Так, у мышей аберрантная пролиферация клеток индуцирует продукцию лиганда, распознаваемого стимулирующим рецептором, экспрессируемым на ЕК (Raulet D.H. et al., 2013). Продукцию лигандов в опухолевых клетках, которые распознаются рецептором на ЕК, индуцируют также повреждение ДНК и активация пути RAS (RAS-зависимый сигнальный путь регулируется рецепторной тирозинкиназой; в котором основная роль принадлежит белкам RAS – первым участникам реакций, катализируемых киназами, активирующими транскрипцию генов, которые регулируют дифференцировку и пролиферацию клетки) (Liu X.V. et al., 2012).

В ЕК имеется набор различных рецепторов, которые при связывании со своими опухолевыми лигандами их активируют, запуская пути апоптоза (Liu R.B. et al., 2012). На модели рака у мышей показано, что рецептор естественной цитотоксичности и ингибирующий рецептор на ЕК предотвращает метастатический рост меланомы, рака легких и фибросаркомы (Andrews D.M. et al., 2012; Glasner A. et al., 2012).

ДК – специализированные антигенпрезентирующие клетки, осуществляющие взаимодействие между естественным и адаптивным иммунитетом, способные представлять эндогенные и экзогенные антигены Т-клеткам в контексте молекул МНС. За исключением паренхимы головного мозга ДК расположены во всех тканях тела (Mildner A., Jung S., 2014). Во время развития опухоли ДК запускают наивные Т-клетки и Т-клетки памяти, и, в зависимости от воспалительного окружения и костимулирующих сигналов, презентация антигена может приводить к толерантности к антигену и запуску эффекторного Т-клеточного ответа. Проникающие в опухоль ДК описаны при многих типах рака (Tran Janco J.M. et al., 2015), причем противоопухолевый эффект ДК, избирательно зависит от продукции ИФН-1 (Diamond M.S. et al., 2011). На модели фибросаркомы у мышей, лишенных ДК, показано нарушение отторжения опухоли, опосредованное Т-клетками (Hildner K. et al., 2008). На моделях опухолей у мышей (меланомы, рака молочной железы и рака шейки матки) показана важная роль ДК в презентации опухолевого антигена (Roberts E.W., et al., 2016). Экспрессия рецептора формилпептида на ДК способствовала распознаванию и взаимодействию с гибнущими раковыми клетками с последующим поглощением и презентацией антигена (Vacchelli E. et al., 2015). Выявлена роль ДК в качестве прямых супрессоров метастатических клеток меланомы (Headley M.B. et al., 2016). Показано истощение ДК, коррелирующее с нарушением активности ЕК и Т-клеток, которое способствует прогрессированию опухоли (Lavin Y., et al., 2017). На моделях меланомы, рака молочной железы и колоректального рака у мышей продемонстрировано нарушение рекрутирования ДК в микроокружение опухоли за счет секреции простагландина E2, понижающее противоопухолевую функцию

ЕК-клеток (Bottcher J.P. et al., 2018).

Макрофаги – клетки врожденного иммунитета, которые дифференцируются из циркулирующих в крови моноцитов после экстравазации в ткани. После дифференцировки макрофаги способны воспринимать патогены, повреждения тканей и реагировать на них, играя ключевую роль в гомеостазе и восстановлении тканей (Lavin Y. et al., 2015). В качестве факторов хронического воспаления, связанного с неопластическими процессами, их участие было описано на каждом этапе прогрессирования опухоли, от ранней трансформации и метастатического прогрессирования до терапевтической устойчивости (Kitamura T. et al., 2015; Gonzalez et al. др. 2018). У мышей с экспериментальными моделями рака уровень ассоциированных с опухолью макрофагов (МО) коррелировал с плохим прогнозом и снижением общей выживаемости (Noy R., Pollard J.W., 2014). Активированные макрофаги называют провоспалительными («тип М1») или противовоспалительными («тип М2») (Mantovani A. et al., 2002). При канцерогенезе они проявляют М1-свойства, что играет важную роль в устранении иммуногенных неопластических клеток. По мере прогрессирования опухоли происходит М2-подобная поляризация ассоциированных с опухолью макрофагов (Mantovani A. et al., 2017). Исследования последних лет показали, что МО оказывает сильное влияние на рост и метастазирование опухоли за счет сложных взаимодействий с опухолевыми клетками (Зибиров Р.Ф., Мозеров С.А., 2018).

МО способствуют прогрессированию опухоли разными способами: путем стимуляции ангиогенеза, лимфангиогенеза, пролиферации опухоли, метастазирования, индукции иммуносупрессии противоопухолевых иммунных клеток (Qian B.Z. et al., 2015; Mantovani A. et al., 2017). Кроме того МО секретируют цитокины ИЛ-10 (Ng T.H. et al., 2013), стимулируют пролиферацию опухолевых клеток, способствуют ангиогенезу опухоли посредством секреции эпидермального (Shojaei F. et al., 2008) и трансформирующего фактор роста бета (ТФР-β), который, в свою очередь, контролирует пролиферацию, клеточную дифференцировку и т.д. (McIntire R.H. et al., 2004). ТФР-β вызывает иммуносупрессию, нарушая активность эффекторных Т-клеток и, ингибируя

созревание ДК (Rubtsov Y.P. et al., 2008). На модели рака молочной железы показано, что МАО регулируют инвазию стромы и интравазацию клеток опухоли посредством передачи сигналов через клеточные контакты (Roh-Johnson M. et al., 2014), а также рекрутируют в опухоли с помощью ряда хемокинов (Halama N. et al., 2016; Nakatsumi H. et al., 2017).

1.2. Роль нейтрофилов в элиминации неопластических клеток

Важную роль в элиминации неопластических клеток, играют нейтрофилы, действующие на опухоль с помощью цитотоксических факторов (активных форм кислорода, пептидов, белков) и фагоцитоза (Долгушин И.И, Бухарин О.В., 2001; Блиндарь В.Н., Зурихина В.Н., 2005; Лаврова В.С., 1992; Ломакин М.С., 1990).

Нейтрофилы (нейтрофильные гранулоциты / нейтрофильные сегментоядерные гранулоциты / полиморфонуклеарные нейтрофилы (Andryukov V.G. et al., 2019) – самая многочисленная группа гранулоцитов, в человеческом организме – на их долю приходится 40-70% от всех лейкоцитов (Actor J.K., 2012). Нейтрофилы функционально неоднородны, в работе (Лисяный Н.И., Лисяный А.А., 2018) дается характеристика основных фенотипов нейтрофилов Н1 и Н2, обсуждаются их функции и механизмы перехода от Н1 клеток с противоопухолевой активностью в Н2 клетки, стимулирующие пролиферацию опухолевых клеток, ангиогенез и метастазирование.

Нейтрофилы считаются ключевыми иммунными клетками при воспалительных процессах. Они одни из первых привлекаются к поврежденной ткани для устранения патогена и модулирования воспаления с помощью фагоцитоза, секреции антибактериальных белков, внеклеточных ловушек нейтрофилов и протеазы экзоцитозных пузырьков (Kolaczowska E., Kubes P., 2013). У онкологических больных могут наблюдаться высокие уровни опухолевых нейтрофилов (ОН), нейтрофилов крови и / или высокое соотношение между нейтрофилами и лимфоцитами, что является неблагоприятным прогнозом при различных злокачественных новообразованиях (Keizman D. et al., 2012; Donskov F., 2013). В то же время, при неопластических процессах отмечается также и снижение

функциональной активности нейтрофилов, лизоцима и компонентов комплемента (Алексеев Н.А., 2002).

На модели мышей с привитой аденокарциномой легких, было показано, что ИЛ-17 – чувствительны к ОН и способствуют росту опухоли (Chang S.H. et al., 2014). Эластаза нейтрофилов, когда секретируется в месте воспаления, способствует инвазии опухолевых клеток, ангиогенезу и пролиферации раковых клеток (Houghton A.M. et al., 2010; Gong L. et al., 2013). При раке желудка ОН вызывают иммуносупрессию в Т-клетках за счет экспрессии PD-L1, индуцированной опухолевыми макрофагами (Wang T.T. et al., 2017). Противоопухолевые функции ОН зависят от перекрестного взаимодействия иммунной системы с другими иммунными клетками, ассоциированными с опухолью (Steele C.W. et al., 2016).

Присутствие нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) в ОМО связано с прогрессированием неопластического процесса (Cools-Lartigue et al. 2013, 2014; Tohme et al. 2016). НВЛ представляют собой внеклеточные сети, высвобождаемые нейтрофилами, состоящие в основном из хроматина, протеазы (такие как эластаза, катепсин G) и внутриклеточных белков, которые иммобилизуют патогены для облегчения их последующего удаления (Papaouannopoulos V., 2018). Увеличение образования НВЛ коррелирует с прогрессированием метастатического распространения опухоли у пациентов с колоректальным раком после операции (Tohme S. et al., 2016). Кроме того, НВЛ улавливают циркулирующие раковые клетки, увеличивая адгезию в синусоидах печени, что способствует экстравазации и колонизации паренхимы (Cools-Lartigue J. et al. 2013). При раке молочной железы НВЛ накапливаются вокруг метастатических клеток, и мигрируют в легкие (Park J. et al., 2016).

Важными показателями естественного иммунитета, характеризующими его неспецифическую реактивность, являются поглотительная и метаболическая активность фагоцитов, благодаря которым эти клетки поглощают и переваривают различные чужеродные агенты (Мавзютов А.Р. и др., 2012; 2017). Поскольку нейтрофилы играют значительную роль в удалении опухолевых клеток, большое

значение имеет исследование их поглотительной и метаболической активности с помощью реакции с нитросиним тетразолием, которая имеет общие закономерности с фагоцитозом. Об активности пероксидазных систем можно судить по степени активации стимулированных лейкоцитов с восстановлением нитросинего тетразолия (НСТ-тест), основанного на поглощении фагоцитирующими клетками нитросинего тетразолия из среды с его последующим восстановлением, которое отражает функциональную активность ферментной системы фагоцитов (Маркина А.А., 2012).

1.3. Роль комплемента при неопластических процессах

Комплемент обладает наиболее многогранным действием среди систем гуморального звена естественного иммунитета и играет одну из ключевых ролей в поддержании иммунного гомеостаза. Результаты, полученные в последние годы, указывают на связь между активацией комплемента в опухоли с воспалительными процессами и ингибированием противоопухолевых реакций иммунной системы (Reis E.S. et al., 2018). Показано, что комплемент участвует в пролиферации, миграции, дифференцировке злокачественных клеток. Рост продукции компонентов C3, C4, субкомпонентов C5a и C3a при некоторых неопластических процессах коррелирует с интенсивностью и распространенностью опухолевого процесса (Gallenkamp J. et al., 2018; Swiatly A. et al., 2017; Wang H. et al. 2017).

Взаимодействие C1q и IgG компонентов гуморального иммунитета является ключевым событием, т.к. известно, что цепь реакций классического пути активации комплемента начинается с присоединения к комплексу антиген-антитело субкомпонента C1q. Далее идут реакции, в которых участвуют другие активированные путем ограниченного протеолиза компоненты комплемента. В итоге образуется мембраноатакующий комплекс, осуществляющий лизис чужеродной клетки, например, опухолевой.

Кроме того, показана роль C1q субкомпонента комплемента еще и в качестве фактора, способствующего прогрессированию неопластического процесса и инвазии (Bulla R. et al., 2016).

Компонент С3 является одной из наиболее универсальных и многофункциональных молекул в системе комплемента. К его структурно-функциональным особенностям относится способность присоединять с помощью эфирных и амидных связей различные акцепторные молекулы, находящиеся на биомембранах клеток (Chen Z.A. et al., 2016; Klapper Y. et al., 2014). Такие свойства у этого белка проявляются за счет наличия тиоэфирной связи внутри α -цепи. Формирование тиоэфирной связи между функциональными группами цистеина (SH) и глутамина (NH₂) происходит на данном (-Gly-Cys⁹⁸⁸-Gly-Glu-Gln⁹⁹¹-Asn-) отрезке аминокислотной цепи во время постсинтетической модификационной стадии (Sahu A., Lambris J.D., 2001). Эта связь обычно скрыта в гидрофобном окружении нативной молекулы и недоступна действию воды. Но, благодаря конформационной подвижности белка, тиоэфирная связь может подвергаться действию воды или растворенных в воде нуклеофильных частиц и гидролизоваться. В результате гидролиза молекула белка С3 претерпевает внутримолекулярную перестройку, в результате которой формируется производное, называемое гидролизной или конформационной формой С3 – С3(Н₂О). С участием этой молекулы и фрагмента фактора В (Вв) образуется начальная С3-конвертаза комплемента, действующая по альтернативному пути, которая представляет собой комплекс С3(Н₂О)Вв (Vexborn F. et al., 2008; Chen Z.A. et al., 2016).

Гидролиз белков считается важным средством, регулирующим деятельность всего организма, поэтому, чтобы понимать модификационные механизмы, действующие при патологии, требуется более глубокое его изучение (Троицкий Г.В., 1991). В организме спонтанный гидролиз тиоэфирной связи в молекуле С3 происходит постоянно, в нормальной сыворотке крови количество гидролизной формы С3(Н₂О) колеблется от 0,3 до 2,5% от общего уровня данного белка (Князева О.А., Камиллов Ф.Х., 2011). Изменения уровня С3(Н₂О) выявлены в сыворотках крови больных ХЛ, НХЛ и РМЖ, получавших курс полихимиотерапии, которые коррелировали с положительной динамикой лечения (Сакаева Д.Д., Князева О.А., 2000; 2002; 2002; Князева О.А. и др., 2002; 2007; 2007; Князева О.А., 2007; 2008;

Князева О.А., Камиллов Ф.Х., 2011). Подобные изменения наблюдались также и в сыворотках крови у мышей с привитой миеломой Sp 2/0 Ag14 (Князева О.А. и др., 2010; 2011; Князева О.А., Уразаева А.И., 2020). У больных раком яичников была обнаружена прямая корреляционная связь между уровнем C3(H₂O) и содержанием опухолюассоциированного антигена CA-125 (Князева О.А. и др., 2007). На основании этих результатов предполагается, что показатели комплемента: спонтанный гидролиз C3 и взаимодействие субкомпонента C1q с IgG, можно рассматривать как составляющие иммунного надзора, характеризующие направленность изменений резистентности организма на интенсивность опухолевого роста (Князева О.А., Камиллов Ф.Х., 2011).

1.4. Роль стресса в развитии злокачественных новообразований

Неопластическим состояниям зачастую сопутствует стрессовый фон, являющийся индуктором развития заболевания за счет угнетения иммунной системы, ответственной за уничтожение злокачественных клеток. Также известно о негативном влиянии стресса на потенцирование опухолевого роста и ухудшение прогноза для пациентов с онкопатологией (Солопова А. и др., 2017).

Стрессорное воздействие приводит к значительному угнетению противоопухолевой защиты за счет снижения активности естественных киллеров, а сочетанное с канцерогенезом вследствие уменьшения содержания дендритных клеток (Котелкина А.А. и др., 2019) что, вероятно, и является причиной опухолевой прогрессии.

Стрессорное воздействие вызывает активацию гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси и соответствующие нейроиммуноэндокринные нарушения, такие как выброс глюкокортикоидов, снижение продукции антител, повышение перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков. Также выявлена корреляционная зависимость между показателями депрессии, нервной, иммунной, эндокринной систем и опухолевой прогрессии (Князева О.А., Уразаева А.И., 2020).

В последние годы для предотвращения стимуляции опухолевого роста

первостепенное значение придается ранней антистрессовой терапии (Матреницкий В.Л., 2020), поскольку стрессовые расстройства среди онкологических больных постоянно растут, что негативно сказывается на их лечении (Chan C., et al., 2018).

В связи с вышесказанным поиск новых иммуностропных препаратов с антистрессовыми свойствами, является особенно актуальным.

1.5. Терапия неопластических образований путем воздействия на иммунную систему

Перспективным методом профилактики и лечения неопластических образований является сочетание классических методов с использованием препаратов, воздействующих на иммунную систему организма (Galluzzi L. et al., 2017; Gonzalez H. et al., 2018; Efimova I. et al., 2020). Наряду с хирургией, лучевой терапией и химиотерапией, иммунотерапия признана весьма эффективной противоопухолевой стратегией (Kepp O. et al., 2014; Krysko D.V. et al., 2012; Mishchenko T. et al., 2019; Zhou J. et al., 2019; Kroemer G. et al., 2013; Galluzzi L. et al., 2020; Efimova I. et al., 2020). По концепции иммуногенной гибели клеток (ИГК) цитолиз злокачественных клеток сочетается с активацией иммунного ответа, что приводит к выработке иммунитета. Это связано с выделением медиаторов ИГК и повреждением «дистресс-ассоциированных молекулярных паттернов» (ДАМП), представляющих собой семейство эндогенных молекул высвобождающихся при клеточном дистрессе. К ним относятся АТФ, кальретикулин (КР), провоспалительные цитокины (Ghiringhelli F. et al., 2009; Sistigu A., et al., 2014; Obeid M. et al., 2007; Garg A.D. et al., 2012; Galluzzi L. et al., 2017). ДАМП действуют с одной стороны, как сигналы опасности, а с другой стороны, как вспомогательные молекулы для активирования иммунной системы (Kepp O. et al., 2014; Galluzzi L. et al., 2020; Krysko O. et al., 2013).

На ранних стадиях развития опухоли эффекторные иммунные клетки обычно уничтожают иммуногенные раковые клетки. Только оставшиеся в живых клетки развиваются до клинически обнаруживаемых опухолей, привлекая иммунные клетки, способные подавлять рост других опухолевых клеток (Gonzalez H. et al.,

2018). Имеются доказательства, что противоопухолевый иммунитет в некоторых случаях приводит к спонтанной регрессии опухоли, что зафиксировано, например, для пациентов с меланомой (Rosenberg SA., 2001), паранеопластическими неврологическими расстройствами (Darnell RB, Posner JB., 2003) и др.

ЕК, ДК, ПЯЛ, тучные клетки и макрофаги являются эффекторами первой линии. Естественные Т-клетки-киллеры и γ -, δ - Т-клетки играют роль как врожденных, так и адаптивных компонентов иммунитета, благодаря тесному взаимодействию с клетками адаптивной иммунной системы, такими как CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты, которые обладают цитотоксическим действием и памятью (Dranoff G., 2004).

Подавление распространения опухоли может происходить за счет взаимодействиями эффекторных клеток врожденного иммунитета с опухолью (Liu Ya., Zeng G., 2012). Связывание лигандов семейства TNF, называемых TRAIL, на ЕК-клетках с соответствующими рецепторами на опухолевых клетках запускает их апоптоз. Макрофаги фагоцитируют опухолевые клетки через рецепторы CD14, TIM, TAM и FcR. Активирующие и ингибирующие рецепторы (FcR + и FcR-) находятся на макрофагах, продуцирующих цитокины. ДК могут захватывать апоптотические опухолевые клетки через рецепторы $\alpha\beta 5$, CD36, FcR, TIM и TAM. Секреция цитокинов в ДК и макрофагах способствует активации антигенпредставляющих клеток, что приводит к клеточному и гуморальному адаптивному иммунному ответу. Активация FcR на ДК помогает презентации антигена опухолевых клеток. Активирующие и ингибирующие FcR также экспрессируются на нейтрофилах, эозинофилах и тучных клетках, которые непосредственно распознают опухоли, сенсibilизированные антителами, для стимулирования или ингибирования секреции цитокинов и хемокинов клетками врожденного иммунитета.

Опухолевые клетки могут удаляться макрофагами, т.к. они экспрессируют на поверхности, так называемые молекулы «съешь меня» для распознавания и последующего фагоцитоза. Эти сигналы включают липид фосфатидилсерин, окисленный фосфатидилсерин, окисленный липопротеин низкой плотности и

многофункциональный белок КР (Jeannin P. et al., 2008). Эти молекулы перераспределяются для экспозиции на поверхности опухолевых клеток во время апоптоза (Gardai S.J. et al., 2006; 2005) КР связан с рецептором CD91 на макрофагах и участвует в поглощении апоптотических клеток посредством взаимодействия с белковым субкомпонентом комплемента C1q и его лигандом фосфатидилсеринном. Взаимодействие апоптотических опухолевых клеток с фагоцитарными макрофагами приводит к иммунной толерантности, не провоцируя значительного повышения иммунитета. В отличие от ЕК, макрофаги одновременно экспрессируют как активирующие, так и ингибирующие рецепторы FcγR. Активация FcγR стимулирует цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам. Считается, что в опухолевой среде макрофаги вносят основной вклад в хроническое воспаление, которое создает среду, подавляющую иммунитет и благоприятствующую росту опухоли (Ostrand-Rosenberg S., 2008). В основе таких эффектов лежат молекулярные механизмы взаимодействия макрофагов и злокачественных клеток. Через взаимодействие с рецепторами врожденная иммунная система человека при воспалениях инициирует адаптивные иммунные ответы (Kawai T, Akira S., 2010; Chen G.Y, Nunez G., 2010).

Для опухолевых клеток, подвергающихся апоптозу, предложена концепция иммуногенной клеточной смерти (Garg AD et al, 2012; Casares N. et al, 2012; Panaretakis T. et al, 2009; Vandenabeele P. et al, 2016). Однако было показано, что эти клетки способны уклоняться от апоптоза и развивать к нему устойчивость (Hanahan D. et al, 2011; Mohammad R.M., et al., 2015).

Другой формой регулируемой клеточной смерти является некроптоз – программируемая некротическая гибель клетки, сопровождающаяся взаимодействием с рецепторами протеинкиназы-1, -3, называемыми в литературе RIPK-1 и RIPK-3, а также псевдокиназой. В последние годы индукция некроптоза приобрела первостепенное значение в экспериментальной терапии рака как альтернатива апоптозу (Kaczmarek A. et al, 2013; Weinlich R. et al, 2017; Krysko D.V. et al, 2003). Некроптоз запускается, если апоптоз невозможен, и отличается выработкой более сильного иммунного ответа, т.к. при гибели клетки

высвобождаются молекулы, активирующие иммунитет. Считается, что с точки зрения активации противоопухолевого иммунитета, индукция иммуногенного некроптоза является перспективной стратегией. Однако, было показано, что опухолевые клетки часто развивают устойчивость и к некроптозу (Huang C.-Y. et al, 2013; Krysko O. et al, 2017; Wang Y. et al, 2018).

Не так давно стало известно и о другом способе уничтожения опухолевых клеток, отличающемся от апоптоза и некроптоза. Это, так называемый, ферроптоз, представляющий собой гибель клеток вследствие перекисного окисления липидов (ПОЛ), вызванного действием ионов железа (Efimova I. et al, 2020). Эта совместная статья российских и бельгийских ученых о новом возможном способе лечения рака была признана Международным научным журналом «Journal for Immunotherapy of Cancer» лучшей публикацией 2020 года.

Ферроптоз запускается в клетках, экспрессирующих мутантные гены семейства RAS (Dixon S.J. et al, 2012). По мнению многих ученых концепция ферроптоза является многообещающей, т.к., благодаря ей, появилась возможность повысить эффективность противоопухолевой терапии (Hangauer M.J. et al, 2017; Hassannia B. et al, 2018; Viswanathan V.S. et al, 2017; Friedmann A.J.P. et al, 2019; Li J. et al, 2020). Хотя пока неизвестно, являются ли клетки, подвергающиеся ферроптозу, иммуногенными (Efimova I. et al, 2020), по мнению этих авторов, ключевым фактором иммуногенности ферроптотических злокачественных клеток и их влияния на противоопухолевый иммунитет, является стадия гибели клеток. Для понимания механизмов действия этой разновидности программируемой клеточной смерти необходимы дальнейшие исследования.

Известно, что наряду с ионами железа способностью вызывать перекисное окисление липидов обладают также и другие 3d-металлы – марганец, кобальт, медь. Еще один 3d-элемент – цинк, напротив, защищает клетки от повреждающего действия ПОЛ. Поэтому концепцию ферроптоза можно экстраполировать и на эти металлы.

Поскольку окислительно-восстановительный метаболизм злокачественных клеток отличается от такового в здоровых тканях, и в опухолевых клетках часто

наблюдается повышенный уровень активных форм кислорода (АФК), воздействие на окислительно-восстановительный гомеостаз опухолевой клетки металлов переменной валентности является многообещающим подходом к терапии рака (Jungwirth U. et al, 2011).

Есть данные, что комплексы металлов (меди и марганца) нарушают клеточный окислительно-восстановительный гомеостаз. Изменение окислительно-восстановительных условий, усиление оксидативного стресса с его молекулярными последствиями являются для опухолевых клеток точками воздействия при разработке инновационных препаратов на основе переходных металлов (Jungwirth U. et al, 2011; Moreira-Pais A. et al, 2018).

1.6. Иммунотропные и противоопухолевые свойства 3d-металлов

Термин «d-металлы» объединяет элементы в d-блоке периодической таблицы Д.И. Менделеева, особенностью которых является незаполненность внутренних d-орбиталей, благодаря которой они могут иметь разную степень окисления и обладают способностью образовывать донорно-акцепторные/ координационные связи с атомами азота, серы, кислорода в составе различных органических соединений. Благодаря этим особенностям d-металлы играют существенную роль в биологических процессах и способны оказывать эффективное влияние на все системы организма (Haas K.L., Franz K.J., 2009).

Особый интерес вызывают такие 3d-металлы, как Mn, Fe, Co, Cu, Zn (Авцын А.П. и др., 1991; Кудрин А.В., Громова О.А., 2007), дисбаланс которых наблюдается при неопластических процессах. Они играют центральную роль в структуре активного центра многих ферментов, в формировании эритроцитарных клеток (Co, Fe), в регуляции уровня глюкозы (Mn), активации антиоксидантных ферментов (Mn, Cu, Zn) (Sousa C. et al, 2018) и различных процессах иммунной системы (Mn, Cu, и Zn) (Gharibzahedi S.M.T., Jafari S.M., 2017). Поскольку эти микроэлементы выполняют важные для человеческого организма функции, их необходимо получать с пищей (Gupta U.C., Gupta S.C., 2017; Fox J.M., Zimba P.V., 2018) богатой овощами, фруктами и продуктами животного происхождения.

Биодоступность микроэлементов зависит от пищеварения, его высвобождения из пищевой матрицы, скорости абсорбции целевого ингредиента клетками кишечника и количества, транспортируемого вещества в клетки (Maham L.K. et al., 2012; Gharibzahedi S.M.T., Jafari S.M., 2017). Как правило, микроэлементы, присутствующие в пище, всасываются в различных частях желудочно-кишечного тракта (двенадцатиперстной кишке, тощей кишке и подвздошной кишке). Микроэлементы, которые поглощаются эпителиальными клетками кишечника, транспортируются через цитоплазматическую мембрану в кровь посредством активного транспортного механизма. Если микроэлемент не транспортируется через мембрану, он остается в кишечной клетке, связанным с белками. Например, ионы железа связываются с ферритином, а цинк — с металлотioneином (Sousa C. et al, 2018). Минеральные вещества, которые не всасываются, обычно выделяются с фекалиями. Этот механизм, по-видимому, защищает организм от потенциальной токсичности, которую может вызвать чрезмерное поглощение металлов клеткой (Maham L.K. et al, 2012; Gharibzahedi S.M.T., Jafari S.M., 2017). Если микроэлементы не поступают в достаточном количестве, возникает дефицит, который может проявляться специфическими и неспецифическими симптомами. Серьезный дефицит необходимого микроэлемента можно исправить только путем его перорального введения в организм. Количество микроэлементов, поступающих с пищей, бывает не всегда достаточно, если их биодоступность низкая (Drago S.R., 2017).

Лекарственные препараты на основе металлов давно используются в медицине в качестве противоопухолевых, противовоспалительных, противодиабетических и противомикробных средств или при лечении определенных состояний (Chylewska A. et al, 2018; Jurowska A. et al, 2016; Perez A. et al, 2018).

Использование металлопрепаратов в качестве эффективных фармацевтических средств показывает, что возможно контролировать цитотоксичность ионов металлов путем соответствующего выбора лиганда (Chylewska A. et al, 2018). Так в соединении с глюконовой кислотой 3d-металлы

образуют нетоксичные хелатные соединения, которые становятся более мембранопроницаемыми и доступными для транспортировки в клетке (Graur V., 2015), оказывают корректирующее действие на гуморальное и клеточное звенья иммунной системы (Князева О.А. и др., 2016; 2018; 2018; 2021; 2022).

Хелатная форма взаимодействия металла с лигандом является наиболее энергетически выгодной для организма. Активность элемента в таких комплексах часто возрастает в сотни и тысячи раз в сравнении с активностью металла в ионном состоянии (Новиков В.С. и др., 2017).

Структуру глюконатов 3d-металлов можно выразить в общем виде следующей формулой: $M(C_6H_{11}O_7)_2 \cdot 2H_2O$, здесь M – ион свободного металла.

Неорганические соли 3d-металлов, напротив, являются токсичными, при попадании в желудочно-кишечный тракт они вызывают активацию моноцитов/макрофагов путем, так называемого, незавершенного фагоцитоза (Лебедева С.А. и др., 2013; Скальная М.Г. и др., 2015; Calabro A.R. et al., 2011; Yu S. et al., 2015), уровень их биодоступности составляет не более 2–20%, и часто при длительном употреблении они оказывают негативное влияние на организм (Новиков В.С. и др., 2017).

Лечение неопластических патологий цитостатическими препаратами часто сопровождается развитием эндогенной интоксикации (Борсук О.С. и др. 2010; Корчагина Я.А. и др., 2018), которая является следствием таких деструктивных процессов как интенсификация свободно-радикального окисления и лавинообразное ускорение мембранодеструкции, что ведет к токсинообразованию и срыву компенсаторных возможностей органов детоксикации. При недостатке факторов, осуществляющих репарацию, клетка оказывается неспособной устранить возникшие повреждения и вступает в апоптоз (Корчагина Я.А. и др., 2018). Для снижения степени эндогенной интоксикации при химиотерапии используются иммунокорректирующие препараты (Борсук О.С. и др. 2010). Ряд соединений 3d-металлов способен оказывать влияние на систему иммунитета – стимулировать фагоцитарную активность лейкоцитов, регулировать функционирование макрофагов, секрецию цитокинов (Скальная М.Г., Скальный

А.В., 2015; Jarosz S.A., 2018; Haase H., Rink L., 2007; Taheri M. et al., 2020). Как показано в работах (Конкина И.Г. и др., 2002; Князева О.А. и др. 2016; 2018; 2021; 2022), глюконаты 3d-металлов проявляют эффективное антиоксидантное и иммуномодулирующее действие, поэтому представляет интерес использование данных соединений в качестве иммунокорректоров при введении цитостатиков.

Марганец – жизненно необходимый микроэлемент (сут. потребность 2-5 мг), участвует во всех видах обмена: углеводном (гипогликемическое действие), белковом (катаболическое действие), липидном (липолитическое действие), минеральном (повышает ассимиляцию фосфора и кальция), в синтезе витаминов и гормонов, позитивно влияет на центральную нервную систему (Syrovaya A.O. et al., 2017).

Марганец оказывают стимулирующее действие на аденилатциклазу. Повышенное образование циклического нуклеотида цАМФ приводит к активации генов c-jun, c-fos, c-junb, которые участвуют в экспрессии гена цитокина ИЛ-2, активирующего на ранних этапах естественные клетки-киллеры (ЕК), осуществляющие уничтожение опухолевых клеток (Новиков В.М., 1995), т.к. на поздних этапах дифференцировки ЕК, под действием цАМФ, происходит торможение их активности.

Получены данные о способности ацетата марганца эффективно подавлять гуморальный иммунитет и стимулировать клеточный иммунный ответ (Колесникова и др., 2009). Показано, что в больших концентрациях марганец (2+) тормозит образование внутриклеточных месенджеров и протеинкиназы А (Кухарь В.П. и др.), а также индуцирует образование в Т-лимфоцитах ИЛ-1 и блокирует синтез цитокина ИЛ-2 с рецепторами (Theocharis S., et al., 1991).

В экспериментах на животных продемонстрировано, что введение солей марганца увеличивает продукцию α -, β -интерферонов, активируя, таким образом, в 2-4 раза ЕК, что приводило к подавлению развития опухоли в легких после инъецирования им клеток меланомы B16-F10 (Smialowisz R.I. et al., 1988).

Показано терапевтическое действие порфиринов марганца на раковые клетки (рис. 1).

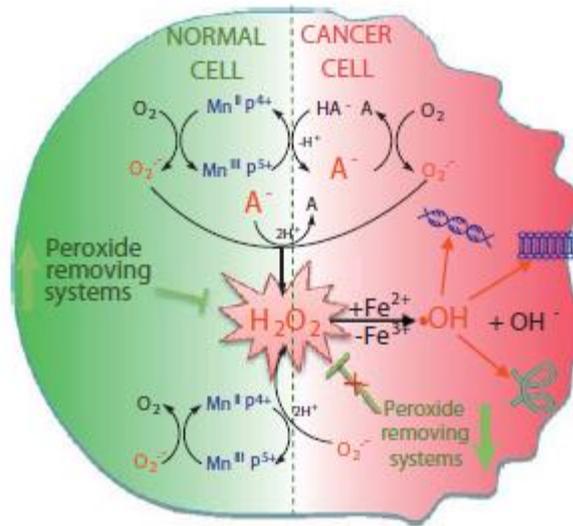


Рисунок 1. – Действие Mn-порфирина на злокачественные и нормальные клетки (Tovmasyan A. et al., 2013).

На рисунке продемонстрировано как окислительно-восстановительный цикл Mn-порфирина с аскорбатом оказывает действие на неопластические и нормальные клетки. Из-за высокого уровня аскорбиновой кислоты Mn-порфирин III (Mn III P) восстанавливается до Mn II P внутри клетки, который действует как восстановитель, реагируя либо с супероксиданионом ($O_2^{\cdot-}$), либо с пероксинитрит-анионом ($ONOO^-$), либо с гипогалоидом хлора (ClO^-), либо с пероксидом водорода (H_2O_2). Mn II P может восстанавливать O_2 до $O_2^{\cdot-}$, который превращается в H_2O_2 . В нормальной клетке имеется много ферментов, удаляющих пероксиды, поэтому вклад реакции Фентона, приводящей к образованию OH^{\cdot} - радикала незначительный (Aykin-Burns N. et al., 2009; Devi G.S. et al., 2000; Hileman E.O. et al., 2004; Kondo S. et al., 1999; Pelicano H. et al., 2004; Szatrowski T.P., Nathan C.F., 1991; Toyokuni S., 1998; Arambula J.F. et al., 2011; Doyle T. et al., 2011). Раковые клетки часто лишены ферментов, удаляющих H_2O_2 , поэтому формируется чрезмерное количество перекиси, поэтому в присутствии аскорбата будут идти прооксидантные реакции, приводящие к гибели раковых клеток (Miriayala S. et al., 2012; Ye X. et al., 2011; Batinic-Haberle I. et al., 2011).

Помимо индуцирования ЕК марганец увеличивает образование эпитопа 24LFA-1 и взаимодействие Т-лимфоцитов с опухолевыми клетками, что свидетельствует о стимулировании под действием марганца чувствительности клеток опухоли к лимфокинактивированным клеткам- киллерам (Кудрин А.В., Громова О.А., 2007).

Показано, что марганец необходим для естественного иммунного распознавания опухолей и, что он усиливает адаптивный иммунный ответ против опухолей. У мышей с дефицитом марганца наблюдалось значительное увеличение роста опухоли и метастазирования со снижением количества проникающих в опухоль цитолитических CD8⁺ Т-лимфоцитов. Mn²⁺ способствовал созреванию дендритных клеток, макрофагов и представлению опухолеспецифического антигена, а также усилению дифференцировки CD8⁺ Т-клеток, активации ЕК, и увеличению памяти CD8⁺ Т-клеток. Клиническое исследование с комбинированным введением Mn²⁺ и антитела против PD-1 показало эффективность для большинства пациентов с метастатическими солидными опухолями на поздних стадиях и продемонстрировало индукцию интерферона 1 (Lv M. et al., 2020). Способность марганца индуцировать апоптоз позволяет также использовать его в качестве супрессора неопластических процессов (Hernroth B. et al., 2018).

Железо является жизненно необходимым микроэлементом (сут. потребность 10-55 мг), его влияние на иммунную систему осуществляется путем воздействия на пролиферацию клеток иммунной системы, регулируемой при помощи рецепторов к трансферрину на лимфоцитах Т и В, и тем самым обеспечивает его доставку в эти клетки. Чувствительность типов Т-лимфоцитов к дефициту железа является различной: Т-хелперы второго типа (Th2) способны в большей степени поглощать железо, поэтому при его дефиците страдают, прежде всего, Т-хелперы первого типа (Th1). Вследствие этого при недостатке железа снижается пролиферация иммунных клеток, что приводит к угнетению клеточного иммунитета (Леонов В.В. и др., 2016; Миронов А.Ю. и др., 2016). При дефиците железа происходит также угнетение продукции цитокинов ИЛ-2 и активности естественных киллеров

(Beard J.L., 2001; Ahluwalia N., 2004). В обмене железа важная роль принадлежит кобальту, который способствует его поступлению из кишечника и обеспечивает внедрение в состав гемоглобина.

Кобальт (Co) (суточная потребность 0,05-0,1 мг), входит в состав витамина В₁₂, производные которого являются коферментами жизненно важных ферментов (Курхалюк Н. и др., 2016), активирует фагоцитоз (Лазурина Л.П. и др., 2006), взаимодействует с иммуноглобулинами и Fc-рецепторами. Глюконат кобальта повышает активность классического пути комплемента путем стимуляции взаимодействия субкомпонента комплемента C1q с комплексом антиген-антитело (Князева О.А. и др., 2019).

Координационные соединения на основе ионов Co(II) и Co(III) рассматриваются как перспективные противоопухолевые средства из-за высокого сродства кобальта к различным N-, O-, S-донорным лигандам и разнообразия форм соединений. Цитотоксические свойства этих комплексов сравнимы с цитотоксичностью цисплатина, что может обеспечить хорошую избирательность в отношении раковых клеток, не характерную для координационных соединений других биогенных металлов (Гук Д.А. и др., 2021).

Медь (Cu), важный микроэлемент, который присутствует в организме человека примерно в количестве 100 мг. Нормальное потребление Cu взрослым человеком составляет около 1-4 мг/день (Reilly C., 2004). Медь участвует во множестве биологических процессов, выполняя разнообразные функции, большей частью в составе металлопротеинов и ферментов, действуя структурно, или в качестве кофактора каталитической активности (Reilly C., 2004). Церулоплазмин является наиболее распространенным медьсодержащим ферментом (на его долю приходится до 95% меди в плазме крови человека), является ферроксидазой, что придает ему антиоксидантные свойства (Sabatucci A. et al., 2007; Linder M.C., 2016).

Гипокупремия является причиной анемии и нейтропении, а также подобно дефициту кобаламина может приводить к прогрессирующей миелоневропатии, что наблюдается, например, у пациентов, получающих длительное питание через зонд или парентеральное питание (Jacobson A.E. et al., 2017). Внутриутробный дефицит

Cu может привести к нарушению развития сердечно-сосудистой системы, порокам развития костей и сохраняющимся неврологическим и иммунологическим отклонениям (Bost M. et al., 2016). Во взрослом возрасте низкие концентрации Cu в сыворотке крови являются причиной снижения плотности костной массы, ослабления формирования и минерализации костей и нарушения целостности хрящей (Qu X. et al., 2018).

Медь играет важную роль в иммунной системе, т.к. участвует в функционировании фагоцитов (Lloyd M.M. et al., 2013; Freitas M., 2014). Синтез импортера меди и стимуляция ее поглощения находится под контролем ИФН γ (Rehmani N.S., 2017). При дефиците меди увеличивается восприимчивость к инфекционным и нейродегенеративным заболеваниям (Jarosz S.A. et al., 2018), снижаются количество Т-лимфоцитов, синтез иммуноглобулинов G, фагоцитарный индекс фагоцитирующих клеток, нарушается синтез белков острой фазы (Loison F. et al., 2014). В исследованиях (Колесникова и др., 2009) было показано, что ацетат меди и кобальта в дозах 1–10 мкг/мл обладают отчетливыми антипролиферативными свойствами.

Показана роль меди в индукции апоптоза с помощью ингибитора XIAP (X-linked Inhibitor Apoptosis Protein), содержащего медь-связывающий участок. XIAP подавляет активность каспазы-3, а медь способствует диссоциации комплекса [XIAP-каспаза-3], тем самым активируя фермент и индуцируя апоптоз (Mufti A.R. et al., 2007).

Результаты исследований синтезированных комплексов меди послужили основанием для рассмотрения их в качестве потенциальных противоопухолевых агентов, поскольку неопластические клетки поглощают большее количество Cu, чем нормальные клетки, при этом ангиогенез и метастазирование связаны с ее метаболизмом (Qi J. et al., 2015). Продемонстрирована *in vitro* активность комплексов меди с витамином B1 в отношении клеток аденокарциномы толстой кишки человека Caco-2 (Brandão P. et al., 2019). Показана цитотоксичность комплексов Cu(II)-нифлумат в отношении линии клеток меланомы человека HT-144 (Kumar S. et al., 2019) и клеток рака шейки матки человека (HeLa) *in vitro*

(Kongot M. et al., 2019). Обнаружена противоопухолевая активность соединений Cu (II) с тиосемикарбазоном (ТСК) в отношении раковых клеток печени *in vitro*, что возможно, связано с апоптозом, индуцированным соединениями меди через внутренний митохондриальный путь, опосредованный АФК (Qi J. et al., 2015). Тестирование панели ТСК с противоопухолевой активностью, выявило более высокую стабильность комплекса меди (II) и более медленную скорость восстановления, что приводило к снижению окислительно-восстановительной активности. Напротив, ТСК с более низкой противоопухолевой активностью индуцировали более высокие уровни супероксидного аниона, который стимулировал экспрессию супероксиддисмутазы в клетках, эффективно защищая их от окислительно-восстановительного стресса (Hager S. et al., 2020).

У ряда комплексных препаратов меди, имеющих противоопухолевые свойства, выявлено ингибирующее действие на ферменты, участвующие в репликации ДНК – топоизомеразы 1 и 2 (Molinaro C. et al., 2020).

Показана перспективность соединений на основе меди для разработки таргетных и противоопухолевых препаратов. Результаты, полученные *in vitro* на культивируемых клеточных линиях MCF-7, подтвердили роль в противоопухолевом действии этих соединений АФК. *In vivo* было показано противовоспалительное действие данных препаратов (Husain F.M. et al., 2019).

Цинк (Zn), суточная потребность 15 мг, является кофактором свыше 300 ферментов. Основные его функции в клетке: каталитическая, регуляторная и структурная, открытая благодаря наличию цинк-фингерных участков в белках (Williams R.J., 2012). Этот металл известен в качестве медиатора апоптоза, благодаря таким функциям, как: 1 - защита клетки в качестве кофактора супероксиддисмутазы, глутатионтрансферазы от оксидативного стресса; 2 - подавление всасывания прооксидантных ионов железа и меди; 3 - ингибирование НАДФН-оксидазы, как источника образования свободного радикала супероксиданиона; 4 - защита тиолсодержащих белков от повреждения продуктами ПОЛ; 5 - структурное присутствие в транскрипционных (p21, A20 и других) факторах, участвующих в апоптозе; 6 - блокировка Ca^{2+} -, Mg^{2+} - зависимой

эндонуклеазы и каспазы-3, повреждающих фермент, репарирующий ДНК; 7 - присутствие Zn^{2+} -каналов во внутренней оболочке ядерной мембраны, регулирующих содержание Zn^{2+} в ядре и обеспечивающих защиту ядерных факторов p53, Erg, Spl, NF- κ B, API и др. от повреждения продуктами ПОЛ.

В иммунной системе цинку принадлежит регуляторная роль, которая связана с активацией или ингибированием сигнальных путей, оказывающих влияние через Toll-подобные рецепторы (TLR) на секрецию провоспалительных цитокинов (Haase H., Rink, L., 2007). Описано стимулирующее влияние цинка на иммунитет (Rink L., Gabriel P., 2017), фагоцитарную активность нейтрофилов (Халиуллина С.В., 2013). Экспериментально доказано иммуномодулирующее влияние глюконата цинка и ряда других 3d-металлов на продукцию антител и цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИФН- γ , ФНО- α (Князева О.А. и др., 2018; 2018), а также фагоцитоз (Князева О.А. и др., 2018; 2022). Показано влияние цинка на активацию транскрипционного фактора NF- κ B, играющего ведущую роль в иммунном ответе (Кунцевич Н.В., 2012).

Доказана ведущая роль цинка в потенцировании клеточного и гуморального иммунитета (Singh K.P. et al., 1992), в качестве кофактора фингерного белка A20, защищающего опухолевые клетки от апоптоза, индуцируемого фактором некроза опухоли и др. (Opirari A.W. et al., 1992; Radosevic K. et al., 1995; Sarma V. et al., 1995). Показано участие цинка в индукции иницирующих апоптоз факторов ras-онкоген и p21 (Tough O.F. et al., 1992). При дефиците цинка выявлено снижение выживаемости трех клеточных линий лимфом человека (Martin S.J. et al., 1991), возрастание апоптоза предшественников Т-клеток до 300% (Fracker T, 2005).

Многие белки, продуцируемые онкогенами, это металлозависимые ферменты. Так белок p21, являющийся продуктом гена H-ras – внутриклеточная ГТФ-аза, контролирующая клеточный рост и обеспечивающая прогресс роста опухоли (Wittinghofer F. et al., 1991), содержит сайт, связывающий двухвалентный катион металла (в том числе цинка), который играет ведущую роль в катализе. Zn^{2+} -зависимые фосфопротеины участвуют в прогрессии и супрессии опухолевого роста (Wittinghofer F. et al., 1991). Zn^{2+} и Mn^{2+} -зависимые трансмембранные клеточные

рецепторы (интегрины) обеспечивают адгезию и распространение клеток опухоли. Кроме того, цинк является важным кофактором ангиогенеза опухоли (Aznavorian S., Liotta L.A., 1991).

В экспериментах на животных и исследованиях *in vitro* продемонстрировано, что дефицит цинка индуцирует Fas/Apo1 опосредованный апоптоз многих линий клеток, в то время как восполнение недостатка Zn ингибирует этот механизм программированной гибели клеток (Nodera M et al., 2001). Позже было выявлено, что дефицит Zn приводит к количественному дефициту Т-клеточного звена иммунной системы, сочетающемуся с существенным снижением иммунного ответа в реакции бласттрансформации лимфоцитов, при котором увеличивается экспрессия Fas-рецептора (CD95) (Карзакова Л.М., 2005). Показана также роль активных форм кислорода (АФК), образующихся во время индуцированного металлами перекисного окисления липидов (ПОЛ), в подавлении апоптоза за счет повреждения гена p53 (Polyak K et al., 1997). Избыточное поступление марганца (2+) в клетку приводило к усилению образования АФК за счет накопления марганца в митохондриях (Gunter T.E. et al., 2009), что связано с ингибированием митохондриальных ферментов (Zheng W. et al., 1999; Chen J.-Y. et al., 2001) и сверхпродукцией H₂O₂ митохондриальной супероксиддисмутазой (Fernandes J. et al., 2017). Аналогично марганцу (2+), цинк (2+) накапливается также в митохондриях (Sensi S.L. et al., 2002; Ma T. et al., 2022), внутриклеточных везикулах (Abiria S.A. et al., 2017), эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи (Lu Q. et al., 2016; Chabosseau, P. et al., 2018).

Цинк и марганец являются кофакторами онкобелков и ферментов, способствующих метастазированию опухоли. Концентрация цинка в плазме животных-опухоленосителей находится в зависимости от синтеза белков металлотионеинов, конформация которых стабилизируется при связывании d-металлов. Металлотионеины обладают высоким сродством к цинку, уровень которого в плазме снижается при повышении их экспрессии и повышается при некрозе опухоли, индуцируя продукцию металлотионеинов (Philcox J.C. et al., 1994).

Роль цинка в подавлении апоптоза, связанная, видимо, с активацией ядерных эндонуклеаз, подтверждена в многочисленных экспериментах на лимфоидных, опухолевых и других клетках. Воздействие высоких концентраций Zn^{2+} вызывает перегрузку его внутриклеточного депо, митохондриальную дисфункцию и апоптоз (Chen L. et al., 2020; Du W. et al., 2021; Gazaryan I.G. et al., 2007). Напротив, воздействие низких уровней Zn^{2+} на нормальные клетки может оказывать антиоксидантное и антиапоптотические эффекты (Rudolf E. et al., 2017; Prasad A.S. et al., 2019; Wei Q. et al., 2004; Zhao Y. et al., 2011).

Не так давно стало очевидным, что изменение концентрации цинка и марганца может быть фактором, влияющим на канцерогенез, например, при раке предстательной железы (Lim J.T. et al., 2019; To P.K. et al., 2020), колоректальном раке (Nawi A.M. et al., 2019; Sohrabi, M. et al., 2018), раке легкого (Zabłocka-Słowińska K. et al., 2018) и глиобластоме (Doble P.A. et al., 2018).

Мутации и изменение экспрессии переносчиков, регулирующих гомеостаз цинка и марганца, являются отличительной чертой многих неопластических процессов (Zhang J. et al., 2022; Costello L.C. et al., 2015; Murali P. et al., 2020; Singh S.K. et al., 2016). При злокачественных опухолях часто наблюдаются скоординированные изменения концентраций Zn^{2+} , Mn^{2+} и переносчиков этих ионов (Zhang J. et al., 2022; Singh, S.K. et al., 2016), хотя то, как эти изменения модулируют ионный гомеостаз и способствуют росту опухоли, пока еще не ясно. Введение этих ионов влияют на эффективность противоопухолевой терапии, что подтверждено и клиническими испытаниями (Du W. et al., 2021; Lv, M. et al., 2020; Toren A. et al., 2016; 2020) (клинические испытания.gov NCT03991559, NCT04488783). Эффекты действия цинка и марганца на опухоль сводятся к индуцированному митохондриями апоптозу, транскрипционной регуляции сигнального пути cGAS-STING, опосредующего иммунный ответ (Rozenberg, J.M. et al., 2022). Механизмы Zn- и Mn-опосредованных эффектов, влияющих на метаболизм опухоли, связаны в основном с новыми диагностическими и терапевтическими подходами (Ekooue, D.N. . et al., 2017; Lossow K. et al., 2021; Lu Q. et al., 2016; Lossow K. et al., 2021; Wang C. et al., 2020).



Рисунок 2. – Предполагаемый механизм противоопухолевого действия цитотоксических комплексов 3d-металлов (Гук Д.А. и др., 2021).

Примечание: интеркаляция — встраивание комплекса между основаниями ДНК, приводящему к сдвигу рамки считывания, а также ингибированию репликации и транскрипции.

Таким образом, многочисленные литературные данные свидетельствуют о том, что 3d-металлы способны оказывать подавляющее действие на развитие неопластических образований, что имеет далеко идущие перспективы для использования их в клинической практике. В качестве одного из возможных механизмов противоопухолевого действия цитотоксических соединений 3d-металлов рассматривается способность инициировать апоптоз (рис. 2).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальное исследование включало в себя пять основных этапов.

На первом этапе провели оценку влияния композиции глюконатов 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn) в сравнении с эфирными маслами лаванды настоящей и шалфея мускатного на показатели врожденного иммунитета (профиль гидролиза C3 компонента комплемента и взаимодействие субкомпонента первого фактора комплемента C1q с IgG) в сыворотке крови мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14 при сопоставлении с данными показателями у больных с лимфопролиферативными заболеваниями.

На втором этапе исследовали влияние глюконатов 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn) на реактивность иммунной системы у мышей BALB/c по лейкоцитарным показателям эндогенной интоксикации.

На третьем этапе изучали влияние глюконатов 3d-металлов, в наибольшей степени проявивших иммуностимулирующие свойства (Mn, Cu, Zn), на опухолевую прогрессию и морфологические изменения в тканях на модели индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 у линейных мышей BALB/c.

Задачей четвертого этапа стало исследование влияния глюконатов 3d-металлов (Mn, Cu, Zn) на поглотительную и метаболическую активность нейтрофилов крови мышей BALB/c на фоне индуцированной миеломы и оценка корреляционных связей между показателями фагоцитоза и прогрессирования миеломы.

На пятом этапе исследовали влияние глюконата марганца, проявившего наибольший эффект стимуляции метаболической активности нейтрофилов, на поведенческие реакции мышей с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14 при моделировании стрессового расстройства.

Всего в работе было использовано 328 линейных белых мышей BALB/c, самцов, в возрасте 2,5-3 месяца, с массой 25-28 гр, полученных из питомника лабораторных животных филиала ФГУП НПО Микроген МЗ РФ (Республика Башкортостан, Чишминский район, село Горный). Животных содержали в

условиях вивария ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997 г.), а также правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96).

Мышей, по 10-12 животных, держали в пластиковых клетках, имеющих площадь 1125 см², дно которых покрывали деревянными стружками. Температура в помещении составляла 20-25⁰С, влажность – 60-65%, световое освещение поддерживалось естественным. Рацион питания представлял собой стандартный корм лабораторных животных (ГОСТ Р50258-92), а также животные получали очищенную воду без ограничения.

Содержание мышей в виварии, их вывод из эксперимента, а также отбор материала для исследований осуществляли согласно положению Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным, соответствующему положениям Российской Федерации, принятым МЗ РФ 19 июня 2003 г. (№ 267).

На всех этапах использовали глюконаты 3d-металлов (3dMGI), где М – Mn / Fe / Co / Cu / Zn, которые вводили либо в виде композиционного комплекса, либо по отдельности. 3dMGI синтезировали в Уфимском институте химии УФИЦ РАН, лаборатории физико-химических методов анализа (Конкина И.Г. и др., 2002, 2003).

В исследованиях раздела 3.1 использовали кровь 16 здоровых доноров и 32 больных с ходжкинскими и неходжкинскими лимфомами (ГБУЗ РБ Республиканский клинический онкологический диспансер, г. Уфа).

В исследованиях раздела 3.1 использовали эфирные масла лаванды настоящей и шалфея мускатного (НПФ «Царство ароматов», Крым), разделов 3.2, 3.3 и 3.4 – препарат циклофосфамид («Бакстер АГ», Швейцария); раздела 3.2 – глюкозаминилмурамилдипептид в виде препарата «ликопид» (ООО «Пептек», Россия) и кальция глюконат (Обновление ПФК АО, Россия).

В разделах 3.1, 3.3, 3.4 и 3.5 у мышей индуцировали миелому штамма Sp 2/0 Ag14, любезно предоставленную Открытым акционерным обществом «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения» (Москва).

I этап. Оценка влияния композиции глюконатов 3d-металлов на показатели системы комплемента

В экспериментальной части данного этапа исследования изучали влияние композиции глюконатов 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn) в сравнении с эфирными маслами лаванды настоящей в смеси 2:1 с шалфеем мускатным (ЭМ) на показатели системы комплемента в сыворотке крови мышей линии BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14. Схема эксперимента имела следующий вид (рис. 3).



Рисунок 3. – Схема эксперимента по определению влияния композиции глюконатов 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn) (3dMGI) в сравнении с эфирными маслами лаванды настоящей в смеси с шалфеем мускатным (ЭМ) на показатели комплемента в сыворотке крови мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14.

Эксперимент проводили в 4-х группах животных, используя схему, представленную на рисунке 4.

В клинической части исследовали показатели комплемента в сыворотках и плазме крови больных с лимфопролиферативными заболеваниями: ходжкинскими (ХЛ) (n=16) и неходжкинскими лимфомами (НХЛ) (n=16) в сравнении со здоровыми донорами (n=16) (ГБУЗ РБ Республиканский клинический онкологический диспансер, г. Уфа). Имеется заключение Экспертного совета по биомедицинской этике (локального этического комитета) Федерального

государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации от 04.05.2018.

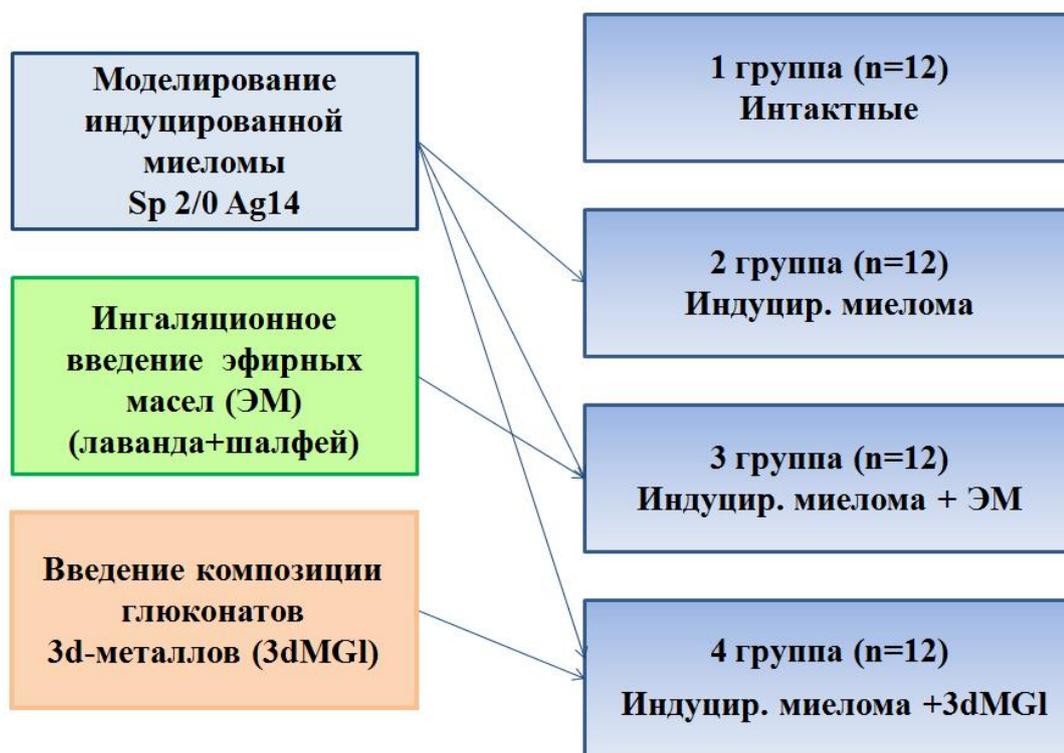


Рисунок 4. – Экспериментальные группы животных для исследования влияния композиции глюконатов 3d-металлов на показатели комплемента в сравнении с эфирными маслами лаванды настоящей и шалфея мускатного (2:1).

II этап. Исследование влияния глюконатов 3d-металлов на лейкоцитарные показатели у мышей BALB/c при экспериментальной иммуносупрессии

Эксперимент проводили в 9 группах мышей BALB/c по 12 особей в каждой. Оценку степени эндогенной интоксикации осуществляли путём определения лейкоцитарных индексов: индекса стрессорной активности, лейкоцитарного индекса интоксикации, ядерного индекса степени эндотоксикоза, индекса сдвига лейкоцитов. Схема эксперимента представлена на рисунке 5.

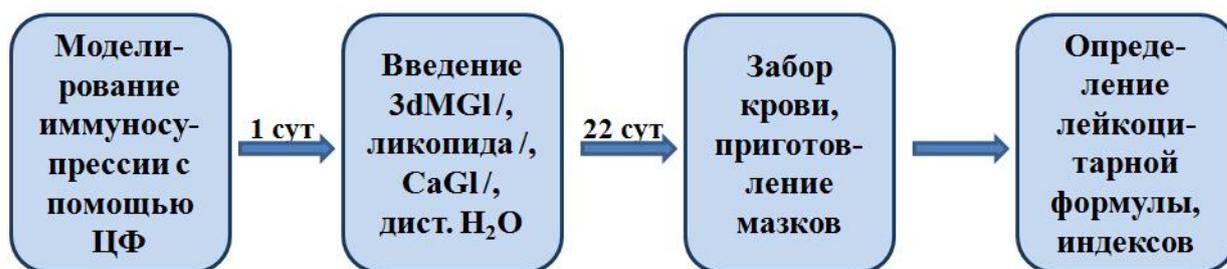


Рисунок 5. – Схема эксперимента по исследованию влияния глюконатов 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn) на лейкоцитарные показатели эндогенной интоксикации у мышей BALB/c.

Распределение животных по группам имело следующий вид: №1 – интактные, №2 – введение иммуносупрессора – циклофосфида (ЦФ) без лечения, №3 – группа сравнения с введением ЦФ и иммуностимулятора глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП), №4 – группа сравнения с введением ЦФ и кальция глюконата, группы №№ 5-9 – ЦФ и глюконаты 3d-металлов (MnGl, FeGl, CoGl, CuGl и ZnGl соответственно).

Экспериментальные группы мышей BALB/c схематически изображены на рисунке 6.

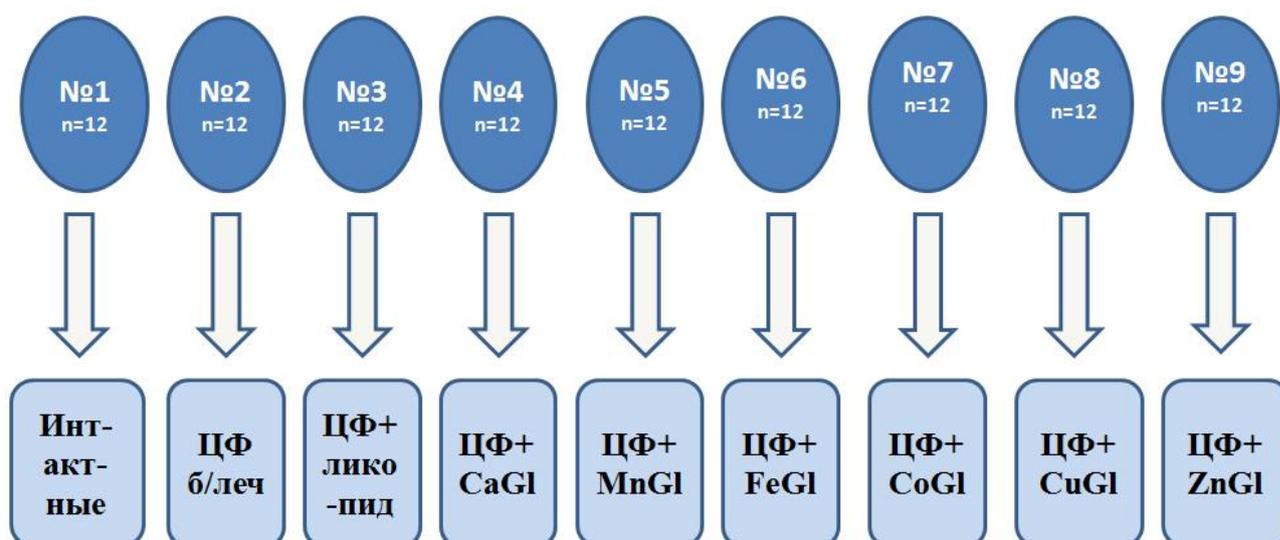


Рисунок 6. – Экспериментальные группы мышей по исследованию влияния глюконатов 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn) на реактивность иммунной системы.

III этап. Исследование влияния глюконатов 3d-металлов (Mn, Cu, Zn) на индуцированную миелому Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c

Схема эксперимента по исследованию влияния наиболее иммуностимулирующих глюконатов 3d-металлов (MnGl, CuGl, ZnGl) на индуцированную миелому Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c представлена на рисунке 7.



Рисунок 7. – Схема эксперимента по исследованию влияния наиболее иммуностимулирующих глюконатов 3d-металлов (MnGl, CuGl, ZnGl) на индуцированную миелому Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c.

Ингибирующий эффект на развитие индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 наиболее иммуностимулирующих глюконатов 3d-металлов (MnGl, CuGl, ZnGl) оценивали в пяти экспериментальных группах животных: №1 – «контроль-миелома»; №2 – «миелома + препарат сравнения циклофосфамид (ЦФ)»; №3 – «миелома + глюконат марганца»; №4 – «миелома + глюконат меди»; №5 – «миелома + глюконат цинка». В каждой из этих групп количество животных составляло 20 особей.

Экспериментальные группы животных схематически изображены на рисунке 8.

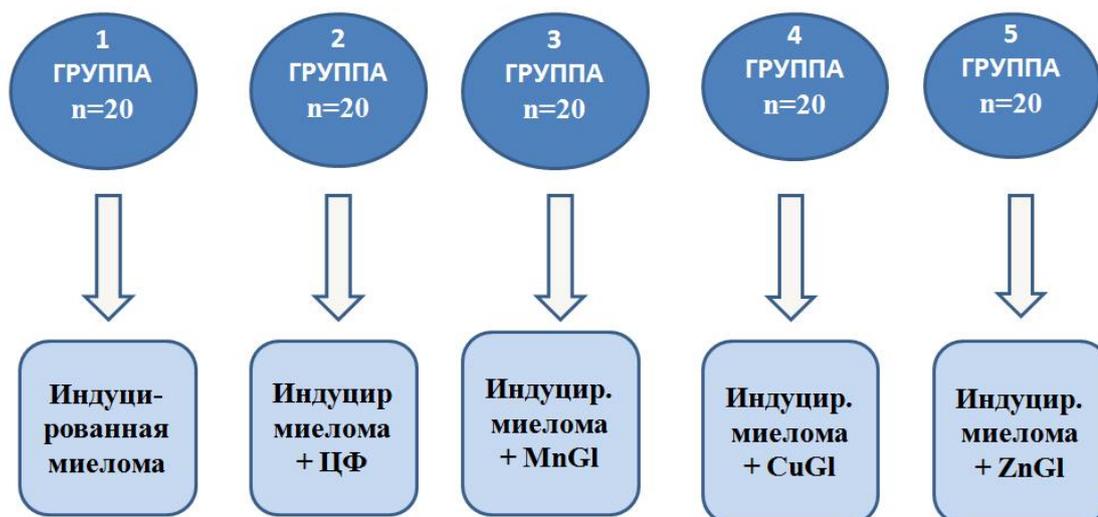


Рисунок 8. – Экспериментальные группы мышей BALB/c по исследованию влияния наиболее иммуностимулирующих глюконатов 3d-металлов (MnGl, CuGl, ZnGl) на индуцированную миелому Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c.

Схема исследования морфологических изменений, вызванных действием наиболее иммуностимулирующих глюконатов 3d-металлов (MnGl, CuGl, ZnGl) на индуцированную миелому Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c представлена на рисунке 9.

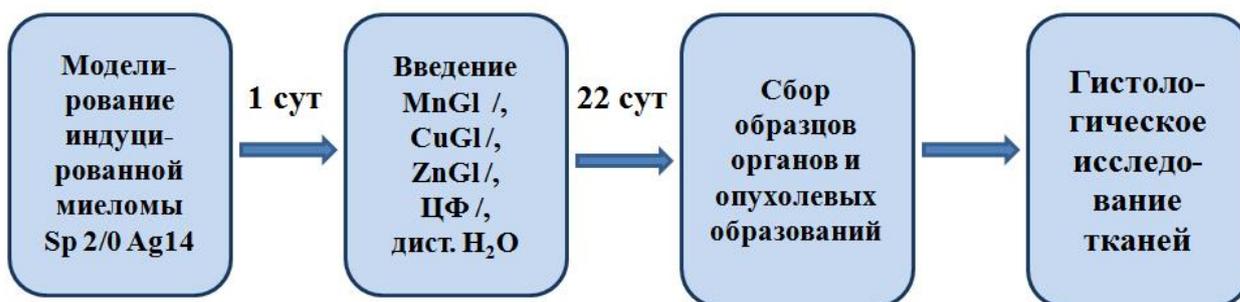


Рисунок 9. – Схема исследования морфологических изменений под действием глюконатов 3d-металлов (MnGl, CuGl, ZnGl) на миелому Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c.

Морфологические изменения в тканях животных исследовали в шести экспериментальных группах через 3 недели терапии: №1 – интактные животные; №2 – животные с индуцированной миеломой; №3 – введение животным с

индуцированной миеломой циклофосфида; №4 – введение животным с индуцированной миеломой глюконата марганца; №5 – введение животным с индуцированной миеломой глюконата меди; №6 – введение животным с индуцированной миеломой глюконата цинка.

Группы животных схематически изображены на рисунке 10.

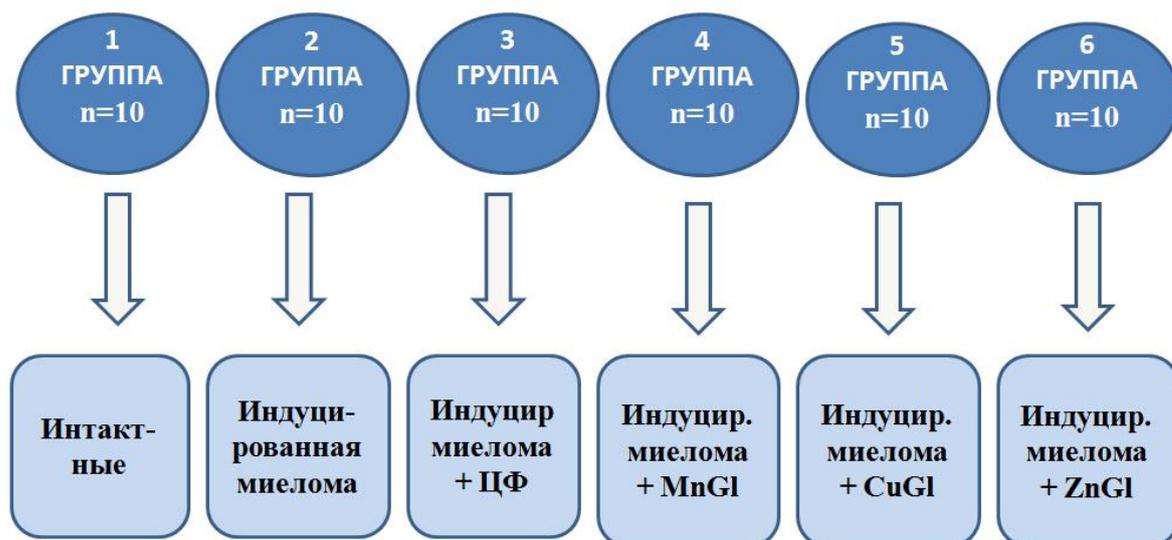


Рисунок 10. – Группы животных по исследованию влияния глюконатов 3d-металлов (MnGl, CuGl, ZnGl) на морфологические изменения в тканях на модели индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 у линейных мышей BALB/c.

IV этап. Исследование влияния глюконатов 3d-металлов (Mn, Cu, Zn) на поглотительную и метаболическую активность нейтрофилов периферической крови мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14

Схема исследования влияния наиболее иммуностимулирующих глюконатов 3d-металлов (MnGl, CuGl, ZnGl) на поглотительную и метаболическую активность нейтрофилов периферической крови мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14 представлена на рисунке 11.



Рисунок 11. – Схема эксперимента по исследованию эффектов глюконатов 3d-металлов (MnGl, CuGl, ZnGl) на поглотительную и метаболическую активность нейтрофилов крови мышей BALB/c на фоне индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14.

Эксперимент проводили в 6-ти экспериментальных группах (по 10 особей в каждой группе) в течение трех недель: №1 группа – интактные, №№ 2-6 группы – мыши с индуцированной миеломой (№2 – без лечения; №3 – введение циклофосамида (препарата сравнения), №4 – введение глюконата марганца; №5 – введение глюконата меди, №6 – введение глюконата цинка.

Группы животных схематически изображены на рисунке 12.

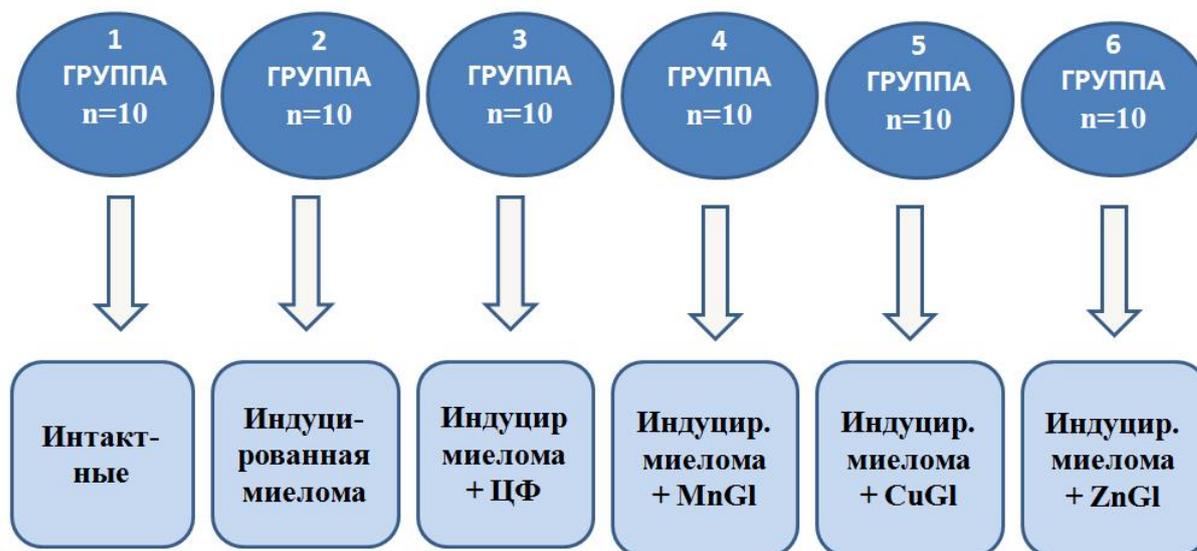


Рисунок 12. – Экспериментальные группы мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14 по исследованию эффектов глюконатов марганца, меди и цинка на поглотительную и метаболическую активность нейтрофилов крови.

V этап. Исследование влияния глюконата марганца на поведенческие реакции мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14

на фоне стрессового расстройства

Поведенческие реакции мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14 на фоне стрессового расстройства исследовали в тесте «Открытое поле». Схема эксперимента представлена на рисунке 13.

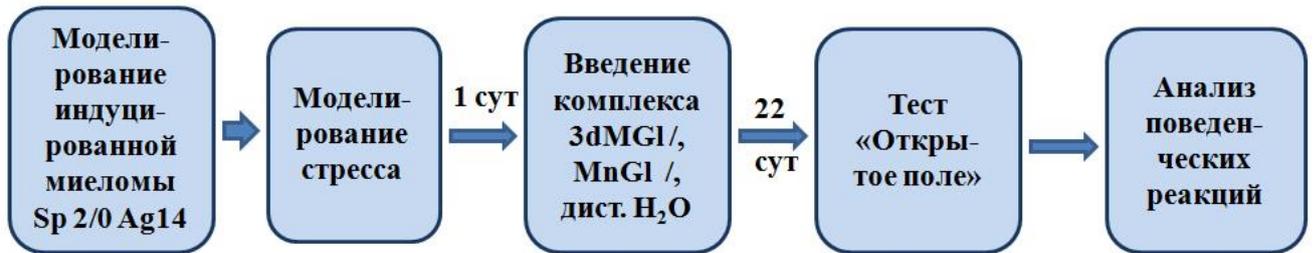


Рисунок 13. – Схема эксперимента по исследованию влияния глюконата марганца на поведенческие реакции мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14 на фоне стрессового расстройства.

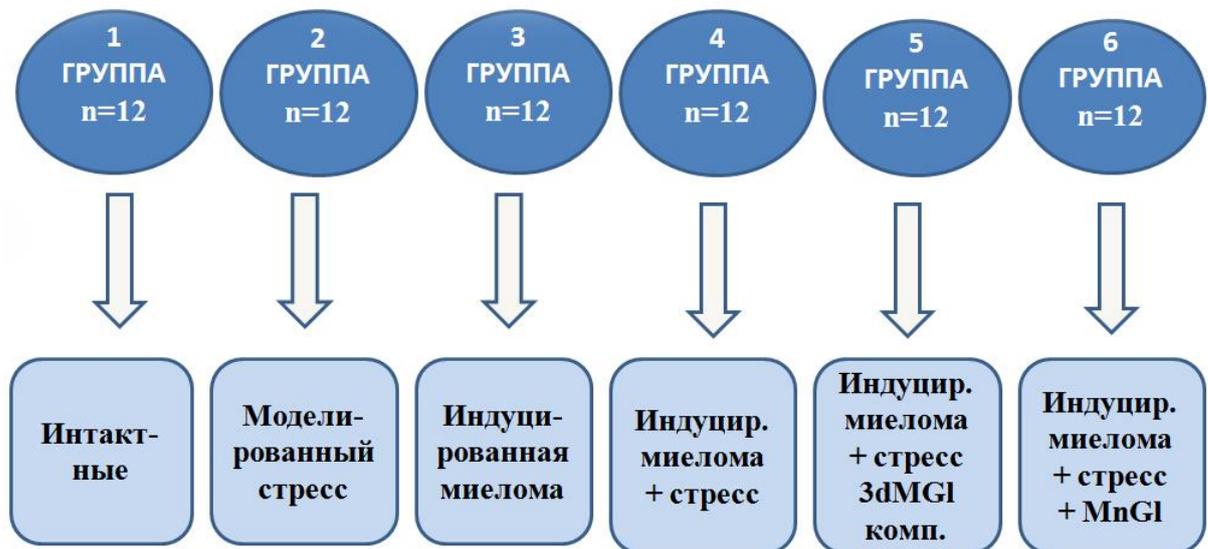


Рисунок 14. – Схема экспериментальных групп по исследованию влияния глюконата марганца на поведенческие реакции мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14 на фоне стрессового расстройства.

Эксперимент проводили в шести экспериментальных группах мышей линии BALB/c (по 12 особей в каждой группе): №1 – интактные, №2 – животные с

моделированным стрессовым расстройством, №3 – животные с индуцированной миеломой без лечения; №4 – животные с индуцированной миеломой на фоне стрессового расстройства, №5 – введение животным с индуцированной миеломой на фоне стрессового расстройства композиции глюконатов 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn); №6 – введение животным с индуцированной миеломой на фоне стрессового расстройства глюконата марганца.

Группы животных схематически изображены на рисунке 14.

2.1. Экспериментальные модели для исследования эффектов глюконатов 3d-металлов на показатели иммунного ответа и прогрессии индуцированной миеломы Sp 2/0 Ag14 у мышей BALB/c

2.1.1. Модель индуцированной миеломы Sp 2/0 Ag14 у мышей линии BALB/c

Модель индуцированной миеломы создавали у мышей линии BALB/c путем однократного внутрибрюшинного введения клеток мышинной миеломы Sp 2/0 Ag14 ECACC 85072401 (Европейская коллекция аутентифицированных клеточных культур) (Открытое акционерное общество «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения», Москва) в количестве 10^6 клеток на мышь, рассuspендированных в среде RPMI-1640 (HyClone).

Линия Sp2/0-Ag14 была получена путем слияния клеток селезенки мыши BALB/c и мышинной миеломы P3X63Ag8. Клетки миеломы дефектны по ферменту гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе, поэтому погибают в культуральной среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин, в так называемой селективной среде ГАТ. Эти клетки обладают устойчивостью к 8-азагуанину (аналог пурина гуанина, проявляющий противоопухолевую активность) при 20 мкг/мл и не синтезируют иммуноглобулины.

2.1.2. Модель иммуносупрессии у мышей BALB/c

Иммуносупрессию у мышей BALB/c моделировали, используя препарат циклофосфамид (ЦФ) («Бакстер АГ», Швейцария), который находит широкое применение, как в клинической практике, так и в научных разработках для создания моделей индуцированной иммуносупрессии (Лебединская Е.А. и др., 2010; Мавзютов А.Р. и др., 2017; Князева О.А. и др., 2016; 2018; 2021; 2022а).

ЦФ вводили внутривенно, однократно, в дозе 50 мг/кг, экспериментально ранее установленной (Конкина И.Г. и др., 2002). Благодаря такому введению препарат поступает в кровь равномерно, скорость выведения из организма замедляется, что создает длительное состояние иммуносупрессии (Мавзютов А.Р. и др., 2017).

2.1.3. Модель экспериментального стрессового расстройства у мышей BALB/c

Экспериментальное стрессовое расстройство у мышей моделировали, с помощью методики ежедневного 10 минутного контакта с запахом хищника – кошачьей мочи, в течение 3 недель (Кондашевская М.В. и др., 2017). Животных с индивидуальной маркировкой содержали на стандартном пищевом рационе и воде, при температуре 20-24°C, 12-ти часовом световом дне в отдельных клетках по 12 особей в каждой.

2.2. Методы исследования эффектов глюконатов 3d-металлов на показатели иммунного ответа и прогрессии миеломы Sp 2/0 Ag14 у мышей BALB/c

2.2.1. Введение глюконатов 3d-металлов и препаратов сравнения

Глюконаты 3d-металлов вводили с помощью желудочного зонда по 0,18-0,2 мл раствора на мышшь, в зависимости от веса животного.

На I и V этапах исследования использовали композиционный препарат соединений 3d-металлов с глюконовой кислотой в концентрации 0,4 мг/мл.

На II, III, IV и V этапах глюконаты 3d-металлов вводили каждый в

отдельности: II этап – MnCl, FeCl, CoCl, CuCl, ZnCl; III и IV этапы – MnCl, CuCl, ZnCl; V этап – MnCl.

Используемую в экспериментах концентрацию (10^{-2} моль/л) рассчитывали по иону металла, исходя из данных, опубликованных ранее и принятых в медицинской практике.

На I этапе в качестве препаратов сравнения использовали смесь эфирных масел лаванды настоящей и шалфея мускатного (в соотношении 4:1), которые вводили мышам с индуцированной миеломой одновременно в течение 3 недель путем ингаляции – 45-ти минутного распыления с парами воды при 80°C до концентрации в помещении 4-5 мг/м³.

На II этапе использовали препараты сравнения: глюкозаминилмурамилдипептид (торговое название «ликопид»), который вводили перорально в дозе 0,025 мг/мл (по инструкции рекомендуемая доза 0,14-0,28 мг/кг), и кальция глюконат, который вводили также перорально, но в дозе 22 мг/мл (согласно инструкции рекомендуемая доза – 86 мг/ кг массы).

На III и IV этапах исследования использовали широко применяемый в терапии онкологических заболеваний цитостатик циклофосфамид (ЦФ) («Бакстер АГ», Швейцария), который вводили внутривенно по 0,1 мл (12 мг/10 мл ФР), в дозе 4,5 мг/кг (0,12 мг / мышь), в течение трех недель. По инструкции препарат рекомендуется вводить в дозе 3-6 мг/кг, нами было взято среднее значение 4,5 мг/кг, что составляет от 0,11 мг до 0,13 мг на мышь (при весе мыши от 25 г до 28 г), т.е. в среднем 0,12 мг/мышь.

Мышам контрольной группы вводили дистиллированную воду в том же объеме.

Курс терапии начинали через 24 ч после инъектирования клеток миеломы Sp 2/0 Ag14 (I, III, IV, V этапы) или циклофосфамида (II этап), и продолжали в течение трех недель, забор материала для исследований осуществляли на 22 сутки после начала эксперимента.

2.2.2. Определение содержания компонентов комплемента в сыворотках крови мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14 и больных ходжкинскими и неходжкинскими лимфомами

Концентрацию компонентов комплемента определяли с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА), используя тестовые наборы (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург).

Для определения уровня гидролизной формы C3 компонента комплемента C3(H₂O) в процессе инкубации сыворотки крови были использованы моноклональные антитела H11C3 и G10, полученные в Федеральном государственном унитарном предприятии «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства (ФГУП «ГосНИИ ОЧБ» ФМБА России). Там же были получены моноклональные антитела к субкомпоненту C1q.

Определение C3(H₂O) проводили по следующей схеме:

1 – введение в лунки пластикового планшета мышинных моноклональных антител H11C3, растворенных в 0,05 М натрий-бикарбонатном буферерном растворе (рН 9,2), концентрация антител составляла 10 мкг/мл, количество раствора, вносимого в каждую лунку - 50 мкл;

2 – внесение раствора 10% бычьего сывороточного альбумина (БСА) по 100 мкл в лунку;

3 – внесение исследуемой сыворотки крови по 50 мкл в каждую лунку в разведении от 1/400 до 1/800, в качестве контроля сравнения использовали сыворотку здоровых доноров или интактных животных, которую титровали в физрастворе от 1:50 мкл до 1:3200 мкл;

4 – внесение в каждую лунку 50 мкл раствора моноклональных антител G10, против антигенной детерминанты, экспонированной на C3(H₂O) – гидролизном производном C3 компонента комплемента в разведении 1/1000;

5 – внесение конъюгата кроличьих антител против антител мыши с пероксидазой в разведении 1/1000.

6 – внесение субстрата: 5 мг ортофенилендиамина, 5 мкл 30% перекиси водорода, 10 мл 0,05 М цитратного буфера (pH 4,5) по 100 мкл в каждую лунку планшета.

После каждого этапа планшеты инкубировали 60 мин при температуре 37°С, промывали холодной водой из-под крана и физраствором (ФР). После внесения субстрата инкубацию проводили 15-20 минут до появления желтой окраски. Останавливали реакцию с помощью внесения по 50 мкл 5% серной кислоты на каждую лунку.

Результаты учитывали при длине волны 492 нм, оптическом пути 3 мм на спектрофотометре «Stat Fax-2100» (США).

Уровень гидролизной формы С3 компонента (С3(Н₂О)) высчитывали, используя калибровочный график, построенный по результатам, полученным для сывороток крови доноров или интактных животных, раститрованных в восьми лунках.

Взаимодействие субкомпонента С1q с иммуноглобулинами G определяли по константе диссоциации (Kd) С1q-IgG по разработанной методике, предназначенной для сравнительной оценки величин Kd между собой (Князева О.А., 2008; Князева О.А, Камиллов Ф.Х., 2011), позволяющей оценить изменение силы взаимодействия С1q с IgG с помощью ИФА по следующей схеме:

1 – добавление в 96-луночный планшет по 50 мкл в каждую лунку раствора С1q ($6,70 \cdot 10^{-7}$ М) в 0,05 М Na-бикарбонатном буферном растворе (pH 9,2). В контрольные лунки вносили 10% БСА. Для лучшего связывания белков с поверхностью лунок планшета сенсibilизацию проводили в 0,05 М Na-бикарбонатном буферном растворе, pH 9,2;

2 – внесение 100 мкл 10% раствора БСА в каждую лунку;

3 – внесение по 100 мкл в лунку смеси двух антител: против С1q и против мелиттина (Князева О.А. и др., 1993).

4 – внесение по 100 мкл в лунку 0,2 мМ раствора АВТС в 0,05 М цитратном буфере (pH 4,0) с добавлением 0,01% перекиси водорода.

Инкубацию между каждым из этапов проводили в течение 60 мин при

комнатной температуре. Отмывали планшет холодной водой и ФР. Регистрировали результаты на спектрофотометре «Stat Fax-2100» (США) при длине волны 405 нм.

2.2.3. Определение лейкоцитарных индексов в крови мышей BALB/c

На 22-е сутки после начала эксперимента у мышей отбирали кровь из хвостовой вены путем надрезания кончика хвоста. Кровь собирали в стерильные пробирки с антикоагулянтом (раствор гепарина 5000 ЕД/мл, Белмедпрепараты, Беларусь).

Для подсчета лейкоцитарной формулы и определения лейкоцитарных индексов готовили мазки крови: на обезжиренное предметное стекло наносили 1 каплю крови мышей и окрашивали по Романовскому–Гимзе.

Краску Романовского-Гимза (азур-эозин) (Абрис+) растворяли в смеси спирта (этилового) и глицерина (1:1) из расчета 800 мг порошка на 100 мл спиртового растворителя. Две капли готового красителя перед окрашиванием мазков разводили 1 мл дистиллированной воды. Мазки окрашивали в течение 25 минут при 37 С в закрытой чашке Петри с влажным фильтром на дне. После окрашивания мазки промывали в проточной воде, сушили на воздухе и исследовали под микроскопом: определяли лейкоцитарную формулу и затем рассчитывали лейкоцитарные индексы: индекс стрессорной активности (ИСА) по Л.Х. Гаркави, характеризующий взаимоотношение гуморального и клеточного звеньев иммунной системы, лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) Я.Я. Кальф-Калифа в модификации Б.А. Рейса, характеризующий фагоцитарную и пролиферативную активность нейтрофилов, ядерный индекс степени эндотоксикоза (ЯИСЭ) Г.Д. Даштаянца, характеризующий регенеративную активность нейтрофилов и моноцитов, индекс сдвига лейкоцитов (ИСЛ), характеризующий соотношение между гранулоцитами и агранулоцитами.

$$1. [\text{ИСА} (\%)] = [\text{лимфоциты}] / [\text{сегментоядерные нейтрофилы}]$$

$$2. [\text{ЛИИ} (\%)] = [\text{нейтрофилы (палочкоядерные + сегментоядерные)}] / [\text{моноциты}] + [\text{лимфоциты}] + [\text{эозинофилы}]$$

3. [ЯИСЭ (%)] = [моноциты]+[палочкоядерные нейтрофилы] /
[сегментоядерные нейтрофилы]

4. [ИСЛ (%)] = [эозинофилы] + [базофилы] + [нейтрофилы (палочкоядерные + сегментоядерные)] / [моноциты] + лимфоциты

2.2.4. Определение влияния глюконатов 3d-металлов на показатели опухолевой прогрессии миеломы Sp 2/0 Ag14 у мышей BALB/c

Влияние глюконатов 3d-металлов на индуцированную миелому Sp 2/0 Ag14 у мышей BALB/c оценивали в момент их вывода из эксперимента на 22 сутки от начала эксперимента. Животных, по 10 особей из каждой группы, декапитировали под эфирным наркозом и осуществляли забор крови в стерильные пробирки. Затем проводили отбор асцитической жидкости и опухолевых образований (при наличии), а также органов (печень, легкие, почки, селезенка, сердце) для исследования морфологических изменений. Остальных животных продолжали наблюдать еще в течение 3 месяцев.

Определение степени прогрессирования миеломы проводили по следующим показателям:

- 1 – прирост массы тела (ПМТ),
- 2 – увеличение объема асцита (УОА),
- 3 – средняя величина продолжительности жизни / медиана продолжительности жизни (МПЖ), которую определяли по результатам наблюдений за животными в течение трех месяцев.

Исходя из полученных результатов, по методике (Трещалина Е.М. и др., 2005) рассчитывали такие показатели, как увеличение продолжительности жизни мышей (УПЖ), торможение прироста массы тела (ТПМ) и торможение развития асцита (ТРА). Формулы для расчетов приведены в разделе 3.3.

2.2.5. Морфологическое исследование опухолевых образований и органов мышей BALB/c индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14

Морфологическое исследование опухолевых образований и органов экспериментальных животных (печень, легкое, почки, селезенка, сердце) проводили по стандартной общепринятой методике. Она включала последовательные этапы фиксации материала, вырезку и проводку за счет обезвоживания и пропитки парафином, изготовление срезов и окраску обзорным способом с последующей микроскопией и изготовлением микрофотографий (Jocelyn H., Bruce-Gregorios, M.D, 1974).

Для этого кусочки ткани помещали в 10% нейтральный формалин, затем осуществляли стандартную проводку спиртом (70°, 80°, 90° и 100°), спирт – хлороформом, парафин – хлороформом, двумя порциями парафина и пропитанный кусочек ткани заключали в парафин. Ручная проводка обеспечила хорошую сохранность тканей органов мышей. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5–6 микрометров с использованием микротомы LEICA 4RM 2145 (Германия).

Срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Волкова О.В., Елецкий Ю.К., 1982; Саркисов Д.С. и др., 1997). Визуализацию и фотографирование препаратов осуществляли с использованием микроскопа LEICA MD -5000 и Leica MD 2000 (Германия) с объективами Plan 10x, 40x, и цифровой камерой 0,5x со специализированным обеспечением управления, настройками и захватом изображения.

2.2.6. Определение поглотительной активности нейтрофилов крови мышей BALB/c индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14

Забор крови для исследований осуществляли в стерильные пробирки, обработанные антикоагулянтом ЭДТА на 22 сутки от начала эксперимента после декапитирования мышей под эфирным наркозом.

Поглотительную активность нейтрофилов в периферической крови, стабилизированной с помощью ЭДТА, определяли по количеству поглощенных частиц латекса по следующим показателям:

1. Фагоцитарное число (ФЧ) – усредненное число поглощенных частиц латекса в расчете на одну фагоцитирующую клетку (частное, полученное при делении общего числа поглощенных частиц латекса на количество клеток, вступивших в фагоцитоз).

2. Фагоцитарный индекс (ФИ), % – процент нейтрофилов, фагоцитировавших частицы латекса.

3. Интегральный фагоцитирующий индекс (ИФИ), % рассчитывали по формуле:

$$\text{ИФИ} = (\text{ФИ} \times \text{ФЧ}) / 100$$

ФЧ и ФИ определяли с помощью иммерсионной микроскопии в мазках крови, которые готовили следующим образом:

В кровь (150 мкл) добавляли монодисперсный полистерольный латекс (50 мкл) в виде взвеси. Диаметр частиц латекса (ПанЭко, РФ) составлял 1,5 мкм. Смесь инкубировали 30 минут в термостате при 37°C, перемешивали и наносили на обезжиренное предметное стекло. Затем фиксировали смесью Никифорова и окрашивали метиленовым синим (1% раствор, в разведении 1:4) в течение 1 минуты.

2.2.7. Определение метаболической активности нейтрофилов крови мышей BALB/c индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14

Оценку метаболической активности нейтрофилов проводили по показателям НСТ-теста, учитывающего восстановление с помощью активных форм кислорода (супероксиданионов), инициирующих стимуляцию фагоцитоза (Виксман М.Е. и др., 1979), поглощенного клетками нитросинего тетразолия (растворимый в воде краситель) в диформазан (нерастворимая форма красителя) – черные глыбки включений внутри ядра.

Образующиеся глыбки диформазана визуально учитывали при микроскопировании. Определяли два показателя:

1 – спонтанный тест с нитросиним тетразолием (сп НСТ) – процент клеток с

гранулами восстановленного НСТ (диформаза́н черного цвета) в спонтанном тесте;

2 – стимулированный тест с нитросиним тетразолием (ст НСТ) – процент клеток с гранулами восстановленного НСТ (диформаза́н черного цвета) в стимулированном латексом тесте.

сп НСТ проводили без стимуляции фагоцитоза, ст НСТ-тест – при стимуляции латексом.

По результатам спонтанного теста можно судить о количестве активированных клеток, например, под влиянием терапии, а стимулированного – о способности их к активации. Стимулированный НСТ-тест характеризует способность фагоцитов отвечать респираторным взрывом и является критерием готовности нейтрофилов к завершённому фагоцитозу (Сабанчиева Ж.Х, 2006).

Определение сп НСТ и ст НСТ проводили следующим образом:

В пробирки с 0,2 мл крови добавляли 0,1 мл 0,2% раствора стандартного разведенного нитросинего тетразолия в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4).

Для оценки стимулированного НСТ-теста в каждую лунку добавляли 20 мкл суспензии частиц монодисперсного полистерольного латекса (стимулированная серия) или 20 мкл 0,9% NaCl (спонтанная серия).

После 30-минутной инкубации при температуре 37⁰С к реакционной смеси добавляли 3 мл 0,1 % соляной кислоты для остановки реакции. Пробирки центрифугировали при 1500 об./мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость разливали в стерильные ампулы, из осадка готовили мазки. После сушки препараты фиксировали этанолом и 5 минут окрашивали 0,1% водным раствором сафранина. С помощью микроскопии при использовании иммерсионной системы определяли % клеток, восстанавливающих НСТ, и интенсивность реакции по активности восстановления НСТ.

Кроме того определяли показатели, характеризующие интенсивность метаболических и биоэнергетических процессов в фагоцитирующих клетках:

1. Средний цитохимический коэффициент в спонтанном тесте (сп СЦК), у.е.
2. Средний цитохимический коэффициент в стимулированном латексом

тесте (ст СЦК), у.е.

3. Индекс стимуляции (ИС), у.е.:

В двух вариантах НСТ-теста оценивали функциональный резерв клеток, который определяли по разнице между количеством стимулированных диформазанпозитивных и спонтанно окисляющих диформазанпозитивных нейтрофилов. Во время проведения НСТ-теста определяли средний цитохимический коэффициент в спонтанном тесте (сп СЦК) и средний цитохимический коэффициент в стимулированном тесте (ст СЦК), т.к. по этим показателям отражающим, активность ферментативных реакций, протекающих в фагоцитах, можно судить об интенсивности метаболических и биоэнергетических процессов.

Самым информативным в отношении резерва биоцидности нейтрофилов является индекс стимуляции. ИС рассчитывали по величине частного, полученного при делении ст СЦК на сп СЦК:

$$\text{ИС} = \text{ст СЦК} / \text{сп СЦК}$$

Микроскопируя и просматривая каждый отдельный мазок, отбирали эталонные клетки. Цитоплазму без окраски принимали за нулевую степень. При наличии окраски в участке, составляющем примерно $\frac{1}{4}$ часть цитоплазмы, считали, что в клетке интенсивность реакции первой степени, обозначали ее буквой А. При окрашивании $\frac{4}{5}$ части цитоплазмы считали интенсивность реакции второй степени, обозначали ее буквой В. При окрашивании всей цитоплазмы интенсивность реакции принимали за третью степень, обозначали ее буквой С.

Определяя средний цитохимический коэффициент, считали процент клеток с разной степенью в 100 однотипных клетках. При этом клетки, у которых интенсивность реакции была нулевой, исключали. Процент клеток А складывали с удвоенным процентом клеток В, и с утроенным процентом клеток С (Хейхоу Ф.Г. Дж., Кваглино Д., 1983). Т.е. формула для расчета имела следующий вид:

$$\text{СЦК} = (\text{А} + 2\text{В} + 3\text{С}) / 100$$

2.2.8. Оценка поведенческих реакций мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag 14 в тесте «Открытое поле»

Поведение у грызунов представлено определенными двигательными и исследовательскими актами, с помощью которых они собирают информацию об окружающей среде. Данные реакции у мышей обычно исследуют с помощью, так называемого теста «Открытое поле» (ОП). Этот тест был предложен еще 1934 году (Hall C.S., 1934) для регистрации поведения животных в ответ на «новые, потенциально опасные стимулы» (Судаков, С.К. и др., 2013).

Процедура состояла из двух этапов: подготовительного и собственно тестирования. ОП представляло собой квадратную пластиковую клетку с размерами 1 × 1 (м), с дном, расчерченным на 25 равных квадратов. Освещали клетку с помощью лампы на 100 Вт, которую подвешивали на высоту 1,5 м от дна клетки.

1 этап

Перед началом тестирования за 1 час всех мышей помещали в темную клетку с размерами 300×150×100 (мм), имевшую отверстия для доступа воздуха. В это время животных не перемещали и не кормили. Все активные манипуляции проводили с ними за сутки до тестирования.

2 этап

Мышь помещали в центр ОП и регистрировали формы поведения, записывая на камеру:

1 - количество пересеченных линий квадратов (горизонтальная двигательная активность);

2 - подъем на задние лапы (вертикальная стойка/ вертикальная двигательная активность);

3 - заглядывание за край «поля» (ориентировочно-исследовательская активность);

4 - количество актов груминга (умываний) и дефекаций (эмоциональная реакция).

К горизонтальной двигательной активности относили пробежки по разным траекториям и кружение на месте. За учитываемую единицу принимали один пересеченный квадрат четырьмя лапами. При переходе в соседний квадрат, если задние лапы пересекали линию между ними, прибавляли также один квадрат.

За вертикальную двигательную активность принимали поднятие животного на передние лапки.

За ориентировочно-исследовательскую активность принимали вертикальную стойку животного, когда оно задними лапами стояло на дне клетки, а передними упиралось, а также когда оно обнюхивало край ОП.

Эмоциональные реакции регистрировали по количеству умываний (груминг), характеризующихся быстрыми круговыми движениями лап вокруг носа, глаз, ушей, головы, лап, боков и других частей туловища, а также и хвоста. Считали также количество дефекаций, оставленных животным во время пребывания в ОП.

Длительность наблюдения составляла 5 минут.

2.2.9. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили непараметрическими методами с применением современных программных пакетов математико-статистического анализа. Применяли программы: «Microsoft Excel» и «Statistica 10.0», работающие в операционной среде «Windows». Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Для описания количественных признаков в малых выборках применяли медиану (Me) и интерквартильный размах (Q_1-Q_3), где Q_1 – 25% квартиль, Q_3 – 75% квартиль. Определение статистической значимости различий количественных признаков проводили по непараметрическому критерию Манна-Уитни для двух независимых групп.

Корреляционный анализ

Взаимосвязь между признаками выявляли с помощью расчета коэффициентов ранговой корреляции Спирмена (r_s). Интерпретацию производили

по уровню силы связи:

$r_s > 0,01 \leq 0,29$ – слабая положительная связь,

$r_s > 0,30 \leq 0,69$ – умеренная положительная связь,

$r_s > 0,70 \leq 1,00$ – сильная положительная связь,

$r_s > -0,01 \leq -0,29$ – слабая отрицательная связь,

$r_s > -0,30 \leq -0,69$ – умеренная отрицательная связь,

$r_s > -0,70 \leq -1,00$ – сильная отрицательная связь.

p-уровень коэффициента корреляции интерпретировали также, как и непараметрического критерия Манна-Уитни: если $p \leq 0,05$ – связь между переменными статистически значима; если $p > 0,05$ – связь между переменными статистически не значима (Наследов, 2011).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Исследование влияния глюконатов 3d-металлов на оценочные критерии системы комплемента в сыворотке крови мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14 при сопоставлении с данными показателями у больных с лимфопролиферативными заболеваниями.

Влияние композиции синтезированных глюконатов 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn) на профиль спонтанного гидролиза C3 компонента комплемента и взаимодействие субкомпонента первого фактора комплемента C1q с IgG было исследовано в сыворотке крови мышей BALB/c через 3 недели ежедневного перорального введения, которое проводили, начиная со второго дня после инъецирования клеток миеломы Sp2/0 Ag14.

В качестве препаратов сравнения использовали смесь эфирных масел лаванды настоящей и шалфея мускатного (в соотношении 2:1), которые вводили мышам путем ингаляции. Иммуномодулирующее и противоопухолевое действие этих масел было обнаружено в предыдущих исследованиях (Князева О.А., Уразаева А.И., 2016; 2020).

На рисунке 15 продемонстрировано корригирующее влияние данных препаратов на профиль гидролиза C3 компонента комплемента. Наибольшие отличия в сыворотках крови мышей с привитой миеломой и интактных животных наблюдались через 5 (более чем в 2 раза) и 11 часов инкубации (выше контрольного уровня примерно в 2 раза) ($p < 0,05$). После проведения терапии эта разница значительно сокращалась: после ингаляционного введения эфирных масел – в 1,3 раза, после введения глюконатов 3d-металлов – в 1,6 раз ($p < 0,05$). Через 9 часов инкубации сыворотки крови разность между показателями в 1, 3 и 4 группах практически нивелировалась.

При этом происходило снижение другого оценочного критерия комплемента – константы диссоциации C1q- IgG: с $(6,9 \pm 0,8) \cdot 10^{-7}$ до $(3,5 \pm 0,4) \cdot 10^{-7}$ после терапии

эфирными маслами, и до $(2,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}$ после введения композиции глюконатов 3d-металлов ($p < 0,05$). У интактных животных данный показатель составлял $(2,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}$.

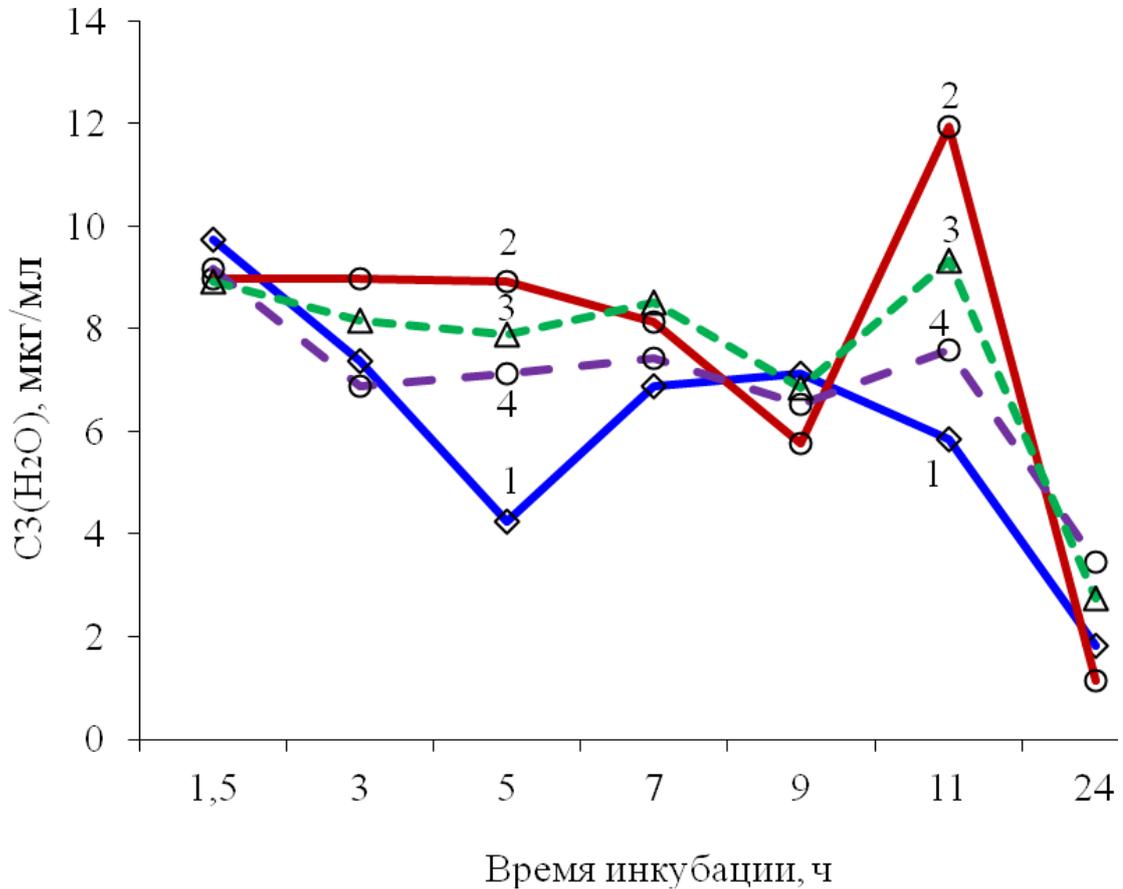


Рисунок 15. – Изменение концентрации $C3(H_2O)$ компонента комплемента при инкубации сыворотки крови мышей с индуцированной миеломой: 1 – контроль-интактные; 2 – миелома без лечения; 3 – после терапии эфирными маслами; 4 – после терапии композицией глюконатов 3d-металлов.

Примечание. Отличия статистически значимы: p_{1-2} , p_{1-3} , p_{1-4} , p_{2-3} , p_{2-4} , p_{3-4} , $< 0,05$ через 5 и 11 ч.

Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными при исследовании активности комплемента в сыворотках крови больных при лимфопролиферативных заболеваниях: ходжкинских лимфомах (злокачественном заболевании лимфатической системы, которое проявляется лимфоаденопатиями с различными локализациями с немногочисленными диффузно рассеянными

атипичными клетками В-клеточной природы) и неходжкинских лимфомах (группе опухолей из клона лимфоидных клеток, являющихся предшественниками различной гистогенетической принадлежности и степени дифференцировки) (Поддубная И.В., Савченко В.Г., 2013; Князева О.А., Киреева Е.А., 2018; 2019; 2021).

Представленные в таблицах результаты (табл. 1, 2) показали, что концентрации компонентов СЗ и СЗ(Н₂О) при ходжкинских (ХЛ) и неходжкинских лимфомах (НХЛ) через 1,5 ч инкубации не отличались от нормы. Однако в процессе инкубации они изменялись отличным образом от уровня здоровых людей. Так, концентрация СЗ в сыворотках крови больных при ХЛ была выше, чем у здоровых доноров через 3, 5, 7, 9, 11 и 24 ч ($p < 0,05$). При НХЛ – через 3, 5, 9, 11 и 24 ч ($p < 0,05$). В сыворотке крови с ЭДТА, при ХЛ концентрация СЗ была выше, чем в контроле через 3, 5, 7, 9, 11 и 24 ч ($p < 0,05$), а при НХЛ в отличие от ХЛ через 9 ч становилась ниже, чем в контроле ($p < 0,05$) (табл. 2).

Концентрация СЗ(Н₂О) в сыворотках крови при ХЛ через 3, 5 и 7 ч была выше, чем в контроле, а через 24 ч ниже ($p < 0,05$). При НХЛ его концентрация в течение первых 7 ч не изменялась, но была выше, чем в контроле ($p < 0,05$). При ХЛ концентрация СЗ(Н₂О) в течение всего времени инкубации была выше, чем в контроле. При НХЛ через 1,5 и 3 ч – такой же, как в контроле, через 5, 7, 9, 11 и 24 ч выше ($p < 0,05$).

На рисунках 16-17 показано, что доля СЗ(Н₂О) от СЗ (%) у больных ХЛ, НХЛ и здоровых донорах на протяжении 24 часов инкубации сыворотки крови без и с ЭДТА изменялась различным образом. Так в сыворотке крови без ЭДТА (рис. 16) разница между показателями при ХЛ и в норме наблюдалась через 5 и 7 ч (при ХЛ выше, чем в контроле), 9, 11 и 24 ч (в контроле выше, чем при ХЛ). У больных НХЛ данный показатель превышал уровень контроля так же, как и при ХЛ – через 5 и 7 часов инкубации сыворотки крови.

Таблица 1

Концентрации С3 компонента комплемента и его гидролизной формы С3(Н₂О) в процессе инкубации в течение суток сыворотки крови у больных при ходжкинских (ХЛ) и неходжкинских лимфомах (НХЛ)

Группа	С3, мкг/мл							С3(Н ₂ О), мкг/мл						
	Время инкубации сыворотки крови, ч													
	1,5	3	5	7	9	11	24	1,5	3	5	7	9	11	24
Контроль (n=16)	1300 ±104	1050 ±84	726 ±58	1298 ±104	1000 ±80	1150 ±92	750 ±60	10,1± 0,8	6,1 ±0,5	4,2 ±0,3	6,0 ±0,5	6,2 ±0,5	5,6 ±0,4	1,3 ±0,2
Больные ХЛ (n=16)	1450 ±116	1639 ±131 **	1230 ±98 **	1750 ±140 *	1449 ±116 *	2019 ±162 **	1200 ±96 **	10,0 ±0,8	10,0 ±0,8 **	10,0 ±0,8 **	9,9 ±0,8 **	5,9 ±0,5	6,1 ±0,5	0,6 ±0,05 **
Больные НХЛ (n=16)	1450 ±116	2079 ±166 **	1230 ±98,4 **	1149 ±92	1278 ±102 *	2176 ±174 **	1412 ±113 **	10,1± 0,8	10,1± 0,8 **	10,0 ±0,8 **	10,0 ±0,8 **	5,9 ±0,5	9,9 ±0,7 **	1,0 ±0,08

Примечание: * - p < 0,01; ** - p < 0,001 при сравнении с контролем (здоровые доноры)

Таблица 2

Концентрации С3 компонента комплемента и его гидролизной формы С3(Н₂О) в процессе инкубации сыворотки крови с ЭДТА у больных при ходжкинских (ХЛ) и неходжкинских лимфомах (НХЛ)

Группа	С3, мкг/мл							С3(Н ₂ О), мкг/мл						
	Время инкубации сыворотки крови, ч													
	1,5	3	5	7	9	11	24	1,5	3	5	7	9	11	24
Контроль (n=16)	1023 ±82	630 ±50	522 ±42	650 ±52	680 ±54	900 ±72	520 ±42	10,1± 0,8	4,4 ±0,4	4,1 ±0,4	4,2 ±0,4	4,0 ±0,3	4,1 ±0,3	3,2 ±0,3
Больные ХЛ (n=16)	872 ±70	1051 ±84,1 **	1339 ±107 **	1339 ±107 **	1080 ±86,4 **	1350 ±108 **	959 ±77 **	10,0 ±0,8	9,9 ±0,8 **	7,5 ±0,6 **	7,5 ±0,6 **	9,9 ±0,8 **	5,9 ±0,5 *	5,1 ±0,4 **
Больные НХЛ (n=16)	948 ±76	1400 ±112 **	1048 ±84 **	1246 ±100 **	480 ±38 *	1200 ±96 *	820 ±66 **	10,0± 0,9	4,0 ±0,3	9,8 ±0,8 **	5,9 ±0,5 *	9,8 ±0,8 **	5,6 ±0,5 *	4,8 ±0,4 **

Примечание: * - $p < 0,01$; ** - $p < 0,001$ при сравнении с контролем (здоровые доноры)

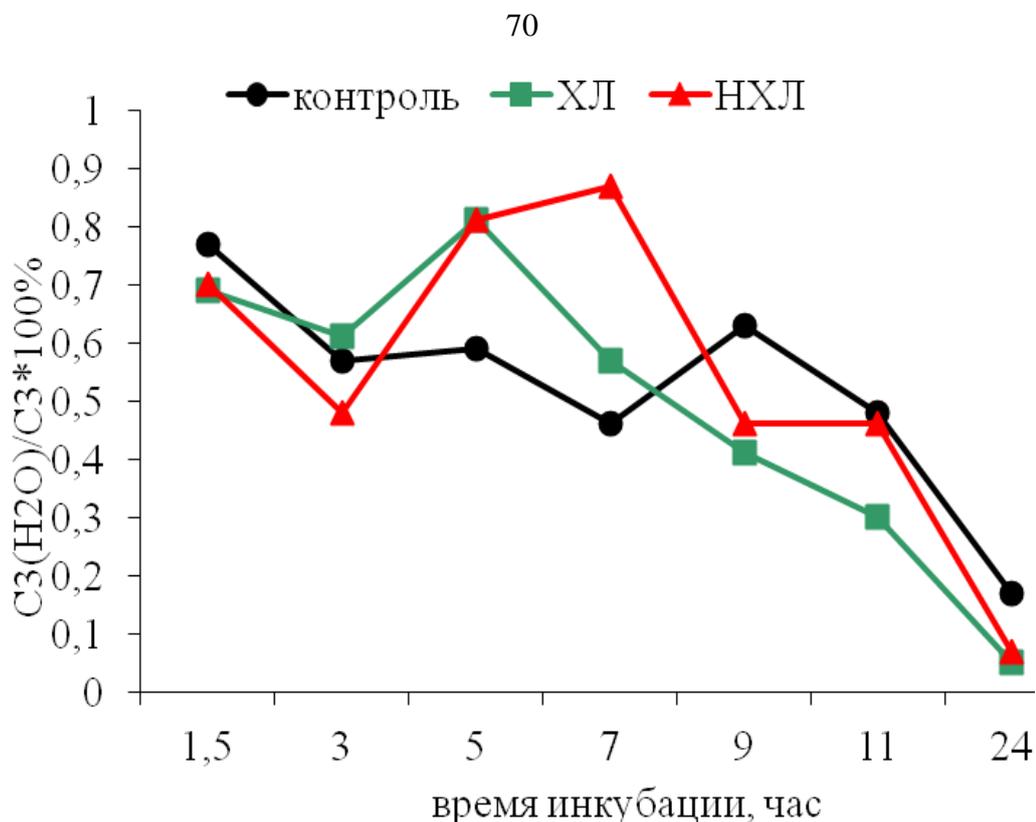


Рисунок 16. – Показатель $C3(H_2O)/C3 \times 100\%$ в процессе инкубации сыворотки крови у больных ходжкинскими (ХЛ) и неходжкинскими лимфомами (НХЛ).

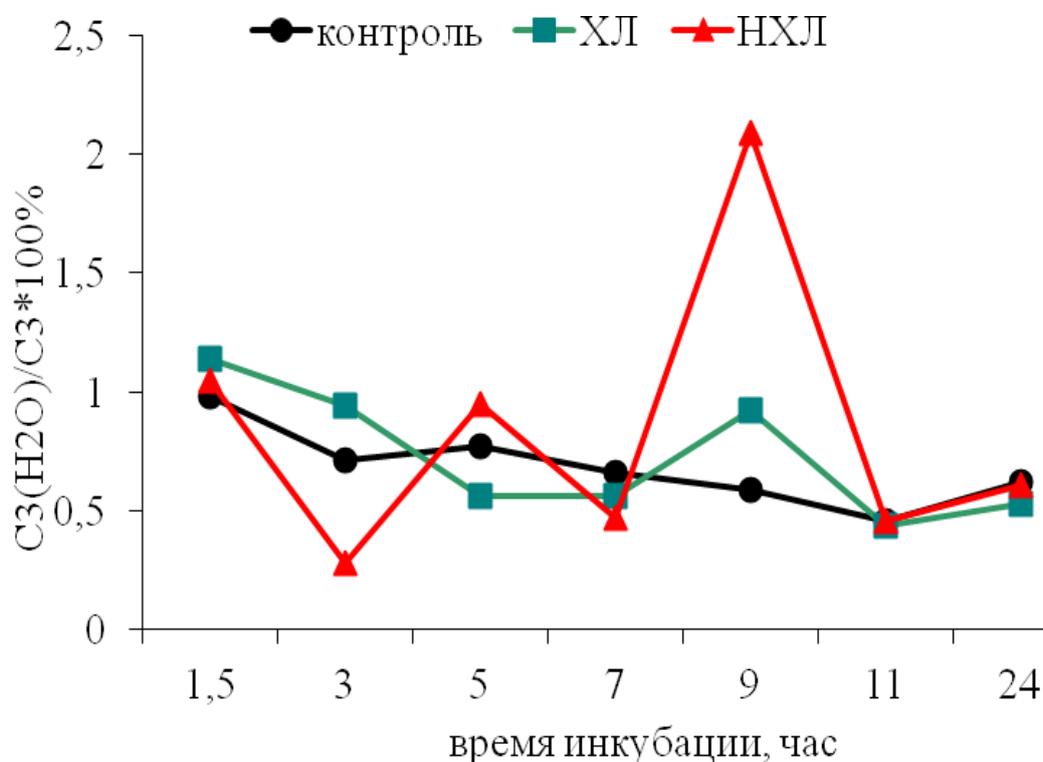


Рисунок 17. – Показатель $C3(H_2O)/C3 \times 100\%$ в процессе инкубации сыворотки крови с ЭДТА у больных ходжкинскими (ХЛ) и неходжкинскими лимфомами (НХЛ).

В сыворотке крови, взятой на ЭДТА (рис. 17) пик профиля С3(Н₂О)/С3 обнаруживался несколько позднее – через 9 часов инкубации.

На основании представленных результатов, можно предположить, что при неопластических состояниях белок С3 модифицируется благодаря появлению большого по сравнению с нормой количества нуклеофильных частиц, делающих тиоэфирную связь более доступной для моноклональных антител тест-системы, взаимодействующих с антигенной детерминантой, расположенной на С3(Н₂О). Увеличение гидролиза С3 может происходить также вследствие появления большего количества протеаз. Доказательством влияния ферментов на гидролиз компонента С3 может служить то, что в сыворотке крови без ЭДТА, ингибирующей ферментативную активность, резкое повышение уровня С3(Н₂О) наблюдалось на 2 часа раньше.

Таблица 3

Показатели комплемента в сыворотках крови больных при лимфопролиферативных заболеваниях: ходжкинских лимфомах (ХЛ) и неходжкинских лимфомах (НХЛ)

Показатель	Контроль (n=16)	ХЛ (n=16)	НХЛ (n=16)
СН50	48,3±4,7	44,5±4,6	53,8±5,4
АРН50	82,9±8,4	76,7±7,8	84,4±8,6
С1q, мкг/мл	173±22	181±19	196±20
С3, мкг/мл	639±69	668±67	564±58
С3а, мкг/мл	0,09±0,01	0,08±0,01	0,07±0,01
С3(Н ₂ О), мкг/мл	2,1±0,2	1,8±0,2	2,3±0,3
Kd·10 ⁻⁷ (IgG-С1q)	1,93±0,45	6,73±1,28*	5,84±1,22*

Примечание. В сравнении с контролем (здоровые доноры): * – p < 0,05.

Следует отметить, что при этом общая гемолитическая активность комплемента (СН50), активность комплемента по альтернативному пути (АРН50), концентрации отдельных компонентов существенно не отличались от показателей здоровых доноров (табл. 3).

Значимые отличия наблюдались лишь по величине, характеризующей взаимодействие субкомпонента С1q с иммуноглобулинами G – константе диссоциации комплекса С1q-IgG (Kd), указывающей на ослабление силы связывания между С1q и IgG при неопластических процессах.

Таким образом, полученные результаты доказывают наличие эффективного влияния композиции глюконатов 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn) на профиль спонтанного гидролиза С3 компонента комплемента и взаимодействие субкомпонента С1q с IgG в сыворотке крови мышей с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14. При сопоставлении их с данными литературы, в которых доказывается взаимосвязь коррекции профиля гидролиза С3 компонента в сыворотках крови онкобольных с положительной динамикой курса полихимиотерапии (Сакаева Д.Д. и др., 2002; Князева О.А. и др., 2007), можно предполагать противоопухолевое действие глюконатов 3d-металлов, связанное с их иммунокорригирующими свойствами. Поэтому на следующем этапе необходимо было исследовать влияние каждого из глюконатов 3d-металлов на реактивность иммунной системы.

Глава 3.2. Исследование влияния глюконатов 3d-металлов на реактивность иммунной системы у мышей BALB/c по лейкоцитарным показателям эндогенной интоксикации

Целью данного этапа исследования явилась оценка действия глюконатов 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu и Zn) на степень эндогенной интоксикации у мышей на фоне цитостатического воздействия циклофосфида методом определения лейкоцитарных индексов.

Этот метод является одним из достоверных методов оценки реактивности иммунной системы при химиотерапии, который позволяет косвенно судить о степени эндогенной интоксикации (Сипливый В.А. и др., 2009; Lomako V.V., 2020; Князева О.А., Киреева Е.А. и др., 2022а).

Для оценки степени эндогенной интоксикации мы использовали следующие лейкоцитарные индексы:

1. Индекс стрессорной активности по Л.Х. Гаркави, называемый также индексом напряжённости иммунного статуса. Этот индекс отражает взаимоотношение гуморального и клеточного звеньев иммунной системы: индекс стрессорной активности = лимфоциты / сегментоядерные нейтрофилы.

Повышение индекса свидетельствует об эндогенной интоксикации и токсической иммуносупрессии.

2. Лейкоцитарный индекс интоксикации Я.Я. Кальф-Калифа в модификации Б.А. Рейса, характеризующий активность процессов фагоцитоза и пролиферации нейтрофилов: лейкоцитарный индекс интоксикации = нейтрофилы / моноциты + лимфоциты + эозинофилы.

Данный индекс снижается в фазу иммуносупрессии.

3. Ядерный индекс степени эндотоксикоза, характеризующий скорость регенерации нейтрофилов и моноцитов, а также продолжительность их циркуляции в кровяном русле: ядерный индекс степени эндотоксикоза = моноциты + палочкоядерные нейтрофилы / сегментоядерные нейтрофилы.

Этот индекс увеличивается в острой фазе интоксикации вследствие цитолиза

сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов.

4. Индекс сдвига лейкоцитов, характеризующий отношение гранулоцитов к агранулоцитам. Уменьшение данного индекса свидетельствует о нарушении иммунологической реактивности.

Проведенные исследования показали, что после однократного введения ЦФ в дозе 50 мг/кг происходит существенное изменение лейкоцитарной формулы, в частности, содержание эозинофилов снизилось более чем в 10 раз, моноцитов – почти в 3 раза, сегментоядерных нейтрофилов – примерно в 1,5 раза. Количество палочкоядерных нейтрофилов, напротив, возросло в 2 раза, лимфоцитов – в 1,1 раза (табл.4).

Такие изменения содержания клеток иммунной системы в крови животных, в частности, уменьшение соотношения зрелых и молодых нейтрофилов (так называемый сдвиг лейкоцитарной формулы влево), свидетельствуют об острой интоксикации организма животных.

При введении препарата сравнения иммуностимулятора глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) степень интоксикации несколько снижалась, однако на уровень моноцитов препарат не оказывал существенного влияния. При использовании второго препарата сравнения, CaG1, данный показатель практически нормализовался, но остальные значительно отличались от интактных.

Введение 3dMG1 приводило к увеличению содержания моноцитов, эозинофилов, сегментоядерных нейтрофилов и уменьшению палочкоядерных нейтрофилов, что может свидетельствовать о стадии восстановления организма. При использовании всех 3dMG1, за исключением FeG1, зарегистрирована нормализация количества лимфоцитов (статистических различий по этому показателю с группой интактных животных не обнаружено).

Лейкоцитарные индексы для интактных животных заметно изменялись после применения ЦФ, но под действием 3dMG1 происходила коррекция этих значений, степень которой достоверно ($p < 0,05$) превышала степень коррекции под действием препаратов сравнения ГМДП и CaG1 (табл. 5).

Влияние глюконатов 3d-металлов (3dMGI) на лейкоцитарную формулу при эндогенной интоксикации мышей циклофосфамидом (ЦФ)

№	Группа	Статистич. показатель	Лейкоциты				
			Эозинофилы	Палочко-ядерные нейтрофилы	Сегментоядерные нейтрофилы	Лимфоциты	Моноциты
1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Контроль интактные	M±m Me [Q ₁ -Q ₃]	0,4±0,04 0,4 [0,35-0,43]	1,0±0,09 1,02 [0,9-1,1]	23,2±2,3 22,7 [20,9-25,1]	74,8±7,7 74,3 [67,5-81,4]	1,4±0,21 1,43 [1,22-1,58]
2.	Контроль ЦФ без лечения	M±m Me [Q ₁ -Q ₃] p-знач.	0,03±0,003 0,03 [0,02-0,04] p ₁₋₂ <0,001	2,0±0,19 1,97 [1,8-2,1] p ₁₋₂ <0,001	14,8±1,4 14,9 [13,3-15,9] p ₁₋₂ <0,001	84,8±8,4 86,4 [77,1-91,9] p ₁₋₂ =0,009	0,5±0,05 0,52 [0,47-0,54] p ₁₋₂ <0,001
3.	ЦФ + ГМДП	M±m Me [Q ₁ -Q ₃]	0,8±0,08 0,81 [0,78-0,83]	0,4±0,04 0,38 [0,36-0,45]	17,0±1,6 16,3 [15,6-18,3]	81,2±8,1 79,4 [75,0-89,3]	0,6±0,06 0,61 [0,56-0,66]

		р-знач.	$p_{1-3}<0,001$ $p_{2-3}<0,001$ $p_{3-4}<0,001$ $p_{3-5}<0,001$ $p_{3-6}=0,81$ $p_{3-7}<0,001$ $p_{3-8}=0,02$ $p_{3-9}=0,82$	$p_{1-3}<0,001$ $p_{2-3}<0,001$ $p_{3-4}<0,001$ $p_{3-5}<0,001$ $p_{3-6}<0,001$ $p_{3-7}<0,001$ $p_{3-8}<0,001$ $p_{3-9}<0,001$	$p_{1-3}<0,001$ $p_{2-3}=0,006$ $p_{3-4}=0,58$ $p_{3-5}<0,001$ $p_{3-6}=0,59$ $p_{3-7}=0,09$ $p_{3-8}=0,06$ $p_{3-9}<0,001$	$p_{1-3}=0,15$ $p_{2-3}=0,39$ $p_{3-4}=0,69$ $p_{3-5}=0,06$ $p_{3-6}=0,27$ $p_{3-7}=0,29$ $p_{3-8}=0,78$ $p_{3-9}=0,50$	$p_{1-3}<0,001$ $p_{2-3}<0,001$ $p_{3-4}<0,001$ $p_{3-5}<0,001$ $p_{3-6}<0,001$ $p_{3-7}<0,001$ $p_{3-8}<0,001$ $p_{3-9}<0,001$
4.	ЦФ+ CaGl	M±m Me [Q ₁ -Q ₃] р-знач.	0,4±0,04 0,4 [0,38-0,44] $p_{1-4}=0,75$ $p_{2-4}<0,001$ $p_{3-4}<0,001$ $p_{4-5}<0,001$ $p_{4-6}<0,001$ $p_{4-7}<0,001$ $p_{4-8}<0,001$ $p_{4-9}<0,001$	0,2±0,02 0,2 [0,17-0,22] $p_{1-4}<0,001$ $p_{2-4}<0,001$ $p_{3-4}<0,001$ $p_{4-5}<0,001$ $p_{4-6}<0,001$ $p_{4-7}<0,001$ $p_{4-8}<0,001$ $p_{4-9}<0,001$	16,6±1,5 16,6 [14,8-17,9] $p_{1-4}<0,001$ $p_{2-4}=0,04$ $p_{3-4}=0,58$ $p_{4-5}<0,001$ $p_{4-6}=0,9$ $p_{4-7}=0,06$ $p_{4-8}=0,92$ $p_{4-9}=0,81$	79,6±7,9 79,0 [73,2-85,3] $p_{1-4}=0,25$ $p_{2-4}=0,15$ $p_{3-4}=0,69$ $p_{4-5}=0,06$ $p_{4-6}=0,24$ $p_{4-7}=0,26$ $p_{4-8}=0,74$ $p_{4-9}=0,46$	1,2±0,11 1,2 [1,12-1,30] $p_{1-4}=0,02$ $p_{2-4}<0,001$ $p_{3-4}<0,001$ $p_{4-5}<0,001$ $p_{4-6}<0,001$ $p_{4-7}<0,001$ $p_{4-8}<0,001$ $p_{4-9}<0,001$

5.	ЦФ+ MnGI	M±m Me [Q ₁ -Q ₃] p-знач.	1,0±0,09 1,01 [0,92-1,09] p ₁₋₅ <0,001 p ₂₋₅ <0,001 p ₃₋₅ <0,001 p ₄₋₅ <0,001 p ₅₋₆ <0,001 p ₅₋₇ <0,001 p ₅₋₈ =0,88 p ₅₋₉ <0,001	1,2±0,11 1,22 [1,13-1,28] p ₁₋₅ =0,001 p ₂₋₅ <0,001 p ₃₋₅ <0,001 p ₄₋₅ <0,001 p ₅₋₆ =0,02 p ₅₋₇ <0,001 p ₅₋₈ <0,001 p ₅₋₉ <0,001	22,4±2,2 23,1 [20,5-23,9] p ₁₋₅ = 0,5 p ₂₋₅ <0,001 p ₃₋₅ <0,001 p ₄₋₅ <0,001 p ₅₋₆ <0,001 p ₅₋₇ <0,001 p ₅₋₈ <0,001 p ₅₋₉ =0,01	73,6±7,3 77,0 [69,0-79,2] p ₁₋₅ =0,64 p ₂₋₅ =0,01 p ₃₋₅ =0,06 p ₄₋₅ =0,19 p ₅₋₆ =0,33 p ₅₋₇ =0,33 p ₅₋₈ =0,15 p ₅₋₉ =0,18	1,8±0,17 1,81 [1,64-2,01] p ₁₋₅ <0,001 p ₂₋₅ <0,001 p ₃₋₅ <0,001 p ₄₋₅ <0,001 p ₅₋₆ <0,001 p ₅₋₇ <0,001 p ₅₋₈ =0,95 p ₅₋₉ <0,001
6.	ЦФ+ FeGI	M±m Me [Q ₁ -Q ₃] p-знач.	0,8±0,08 0,78 [0,73-0,87] p ₁₋₆ <0,001 p ₂₋₆ <0,001 p ₃₋₆ =0,81 p ₄₋₆ <0,001 p ₅₋₆ <0,001	1,0±0,09 0,91 [0,86-1,11] p ₁₋₆ =0,49 p ₂₋₆ <0,001 p ₃₋₆ <0,001 p ₄₋₆ <0,001 p ₅₋₆ =0,02	17,2±1,7 16,6 [16,3-17,8] p ₁₋₆ <0,001 p ₂₋₆ =0,003 p ₃₋₆ =0,59 p ₄₋₆ =0,9 p ₅₋₆ <0,001	79,2±7,9 76,1 [71,3-84,1] p ₁₋₆ =0,42 p ₂₋₆ =0,04 p ₃₋₆ =0,27 p ₄₋₆ =0,09 p ₅₋₆ =0,33	1,8±0,18 2,63 [2,4-2,8] p ₁₋₆ <0,001 p ₂₋₆ <0,001 p ₃₋₆ <0,001 p ₄₋₆ <0,001 p ₅₋₆ <0,001

			$p_{6-7}<0,001$ $p_{6-8}=0,01$ $p_{6-9}=0,99$	$p_{6-7}<0,001$ $p_{6-8}=0,01$ $p_{6-9}=0,99$	$p_{6-7}=0,15$ $p_{6-8}=0,08$ $p_{6-9}=0,01$	$p_{6-7}=0,95$ $p_{6-8}=0,60$ $p_{6-9}=0,82$	$p_{6-7}=0,13$ $p_{6-8}<0,001$ $p_{6-9}=0,13$
7.	ЦФ+ CoGl	M±m Me [Q ₁ -Q ₃] p-знач.	0,5±0,05 0,51 [0,46-0,55] $p_{1-7}<0,001$ $p_{2-7}<0,001$ $p_{3-7}<0,001$ $p_{4-7}<0,001$ $p_{5-7}<0,001$ $p_{6-7}<0,001$ $p_{7-8}<0,001$ $p_{7-9}<0,001$	0,8±0,07 0,78 [0,74-0,86] $p_{1-7}<0,001$ $p_{2-7}<0,001$ $p_{3-7}<0,001$ $p_{4-7}<0,001$ $p_{5-7}<0,001$ $p_{6-7}<0,001$ $p_{7-8}=0,82$ $p_{7-9}<0,001$	18,3±1,8 18,0 [16,8-19,4] $p_{1-7}<0,001$ $p_{2-7}<0,001$ $p_{3-7}=0,09$ $p_{4-7}=0,06$ $p_{5-7}<0,001$ $p_{6-7}=0,15$ $p_{7-8}=0,88$ $p_{7-9}=0,09$	78,0±7,8 76,6 [71,2-84,1] $p_{1-7}=0,36$ $p_{2-7}=0,04$ $p_{3-7}=0,29$ $p_{4-7}=0,26$ $p_{5-7}=0,33$ $p_{6-7}=0,95$ $p_{7-8}=0,64$ $p_{7-9}=0,82$	2,4±0,23 2,78 [2,54-2,98] $p_{1-7}<0,001$ $p_{2-7}<0,001$ $p_{3-7}<0,001$ $p_{4-7}<0,001$ $p_{5-7}<0,001$ $p_{6-7}=0,13$ $p_{7-8}<0,001$ $p_{7-9}=0,01$
8.	ЦФ+ CuGl	M±m Me [Q ₁ -Q ₃] p-знач.	1,0±0,10 0,98 [0,8-1,0] $p_{1-8}<0,001$ $p_{2-8}<0,001$	0,8±0,08 0,82 [0,74-0,87] $p_{1-8}<0,001$ $p_{2-8}<0,001$	18,4±1,8 17,9 [17,1-19,6] $p_{1-8}<0,001$ $p_{2-8}<0,001$	77,0±7,6 79,4 [73,9-83,9] $p_{1-8}=0,23$ $p_{2-8}=0,12$	2,8±0,27 1,76 [1,62-1,96] $p_{1-8}<0,001$ $p_{2-8}<0,001$

			$p_{3-8}=0,02$	$p_{3-8}<0,001$	$p_{3-8}=0,06$	$p_{3-8}=0,98$	$p_{3-8}<0,001$
			$p_{4-8}<0,001$	$p_{4-8}<0,001$	$p_{4-8}=0,87$	$p_{4-8}=0,07$	$p_{4-8}<0,001$
			$p_{5-8}=0,88$	$p_{5-8}<0,001$	$p_{5-8}<0,001$	$p_{5-8}=0,15$	$p_{5-8}=0,95$
			$p_{6-8}=0,01$	$p_{6-8}=0,01$	$p_{6-8}=0,08$	$p_{6-8}=0,60$	$p_{6-8}<0,001$
			$p_{7-8}<0,001$	$p_{7-8}=0,82$	$p_{7-8}=0,88$	$p_{7-8}=0,64$	$p_{7-8}<0,001$
			$p_{8-9}=0,01$	$p_{8-9}<0,001$	$p_{8-9}=0,09$	$p_{8-9}=0,99$	$p_{8-9}<0,001$
9.	ЦФ+ ZnGl	M±m Me [Q ₁ -Q ₃] p-знач.	0,8±0,08 0,78 [0,73-0,87]	0,21±0,02 0,21 [0,19-0,23]	19,6±1,9 19,1 [18,3-20,6]	77,4±7,7 78,8 [70,3-84,6]	2,6±0,25 2,39 [2,19-2,62]
			$p_{1-9}<0,001$	$p_{1-9}<0,001$	$p_{1-9}=0,001$	$p_{1-9}=0,27$	$p_{1-9}<0,001$
			$p_{2-9}<0,001$	$p_{2-9}<0,001$	$p_{2-9}<0,001$	$p_{2-9}=0,05$	$p_{2-9}<0,001$
			$p_{3-9}=0,82$	$p_{3-9}<0,001$	$p_{3-9}<0,001$	$p_{3-9}=50$	$p_{3-9}<0,001$
			$p_{4-9}<0,001$	$p_{4-9}=0,31$	$p_{4-9}<0,001$	$p_{4-9}=46$	$p_{4-9}<0,001$
			$p_{5-9}<0,001$	$p_{5-9}<0,001$	$p_{5-9}=0,01$	$p_{5-9}=0,18$	$p_{5-9}<0,001$
			$p_{6-9}=0,99$	$p_{6-9}=0,99$	$p_{6-9}=0,01$	$p_{6-9}=0,82$	$p_{6-9}=0,13$
			$p_{7-9}<0,001$	$p_{7-9}<0,001$	$p_{7-9}=0,09$	$p_{7-9}=0,82$	$p_{7-9}=0,01$
			$p_{8-9}=0,01$	$p_{8-9}<0,001$	$p_{8-9}=0,09$	$p_{8-9}=0,99$	$p_{8-9}<0,001$

Влияние глюконатов 3d-металлов (3dMGI) на лейкоцитарные индексы при
эндогенной интоксикации мышей (n=12) циклофосфамидом (ЦФ)

№	Группа	Статист. показа- тель	Индекс стрес- сорной активности	Лейко- цитарный индекс инто- ксикации	Ядерный индекс степени эндо- токсикога	Индекс сдвига лейко- цитов
1.	Контроль интактные	M±m Me [Q ₁ -Q ₃]	3,22±0,28 3,11 [2,97-3,41]	0,31±0,03 0,32 [0,29-0,34]	0,10±0,015 0,09 [0,08-0,11]	0,32±0,03 0,32 [0,30-0,36]
2.	Контроль ЦФ без лечения	M± m Me [Q ₁ -Q ₃] p-знач.	5,70±0,42 5,82 [5,53-6,19] p ₁₋₂ <0,001	0,19±0,02 0,19 [0,17-0,21] p ₁₋₂ <0,001	0,17±0,020 0,175 [0,15-0,19] p ₁₋₂ <0,001	0,20±0,02 0,21 [0,19-0,22] p ₁₋₂ <0,001
3.	ЦФ + ГМДП	M± m Me [Q ₁ -Q ₃] p-знач.	4,77±0,39 4,72 [4,3-5,1] p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ =0,02 p ₃₋₄ =0,45 p ₃₋₅ <0,001 p ₃₋₆ =0,93 p ₃₋₇ =0,07 p ₃₋₈ =0,08 p ₃₋₉ =0,03	0,21±0,02 0,21 [0,19-0,24] p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ =0,02 p ₃₋₄ =0,06 p ₃₋₅ <0,001 p ₃₋₆ =0,54 p ₃₋₇ =0,04 p ₃₋₈ =0,02 p ₃₋₉ <0,001	0,15±0,018 0,15 [0,14-0,17] p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ =0,03 p ₃₋₄ =0,06 p ₃₋₅ =0,08 p ₃₋₆ =0,21 p ₃₋₇ =0,13 p ₃₋₈ =0,01 p ₃₋₉ =0,21	0,22±0,02 0,22 [0,20-0,24] p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ =0,51 p ₃₋₄ =0,93 p ₃₋₅ <0,001 p ₃₋₆ =0,09 p ₃₋₇ =0,10 p ₃₋₈ <0,001 p ₃₋₉ <0,001
4.	ЦФ+ CaGI	M± m Me [Q ₁ -Q ₃]	4,80±0,40 4,81 [4,4-5,2]	0,20±0,02 0,21 [0,19-0,22]	0,18±0,027 0,17 [0,15-0,20]	0,21±0,02 0,21 [0,19-0,24]

		р-знач.	$p_{1-4}<0,001$ $p_{2-4}=0,002$ $p_{3-4}=0,06$ $p_{4-5}<0,001$ $p_{4-6}=0,33$ $p_{4-7}<0,001$ $p_{4-8}=0,01$ $p_{4-9}<0,001$	$p_{1-4}<0,001$ $p_{2-4}=0,02$ $p_{3-4}=0,45$ $p_{4-5}<0,001$ $p_{4-6}=0,51$ $p_{4-7}=0,01$ $p_{4-8}=0,02$ $p_{4-9}=0,01$	$p_{1-4}<0,001$ $p_{2-4}=0,86$ $p_{3-4}=0,06$ $p_{4-5}<0,001$ $p_{4-6}=0,54$ $p_{4-7}=0,58$ $p_{4-8}=0,42$ $p_{4-9}=0,01$	$p_{1-4}<0,001$ $p_{2-4}=0,45$ $p_{3-4}=0,93$ $p_{4-5}<0,001$ $p_{4-6}=0,07$ $p_{4-7}=0,08$ $p_{4-8}<0,001$ $p_{4-9}<0,001$
5.	ЦФ+ MnGI	M± m Me [Q ₁ -Q ₃] р-знач.	3,28±0,31 3,29 [2,96-3,64] $p_{1-5}=0,75$ $p_{2-5}<0,001$ $p_{3-5}<0,001$ $p_{4-5}<0,001$ $p_{5-6}<0,001$ $p_{5-7}<0,001$ $p_{5-8}<0,001$ $p_{5-9}<0,001$	0,30±0,03 0,31 [0,28-0,32] $p_{1-5}=0,53$ $p_{2-5}<0,001$ $p_{3-5}<0,001$ $p_{4-5}<0,001$ $p_{5-6}<0,001$ $p_{5-7}<0,001$ $p_{5-8}<0,001$ $p_{5-9}<0,001$	0,13±0,016 0,13 [0,12-0,15] $p_{1-5}<0,001$ $p_{2-5}<0,001$ $p_{3-5}=0,08$ $p_{4-5}<0,001$ $p_{5-6}<0,001$ $p_{5-7}<0,001$ $p_{5-8}<0,001$ $p_{5-9}=0,53$	0,32±0,03 0,32 [0,30-0,36] $p_{1-5}=1,0$ $p_{2-5}<0,001$ $p_{3-5}<0,001$ $p_{4-5}<0,001$ $p_{5-6}<0,001$ $p_{5-7}<0,001$ $p_{5-8}<0,001$ $p_{5-9}<0,001$
6.	ЦФ+ FeGI	M±m Me [Q ₁ -Q ₃] р-знач.	4,60±0,41 4,65 [4,22-4,96] $p_{1-6}<0,001$ $p_{2-6}<0,001$ $p_{3-6}=0,54$ $p_{4-6}=0,33$ $p_{5-6}<0,001$ $p_{6-7}=0,12$ $p_{6-8}=0,06$	0,22±0,02 0,22 [0,20-0,24] $p_{1-6}<0,001$ $p_{2-6}=0,02$ $p_{3-6}=0,93$ $p_{4-6}=0,51$ $p_{5-6}<0,001$ $p_{6-7}=0,09$ $p_{6-8}=0,09$	0,16±0,015 0,165 [0,16-0,18] $p_{1-6}<0,001$ $p_{2-6}=0,4$ $p_{3-6}=0,21$ $p_{4-6}=0,54$ $p_{5-6}<0,001$ $p_{6-7}=0,99$ $p_{6-8}=0,44$	0,23±0,02 0,23 [0,22-0,25] $p_{1-6}<0,001$ $p_{2-6}<0,001$ $p_{3-6}=0,09$ $p_{4-6}=0,07$ $p_{5-6}<0,001$ $p_{6-7}=0,91$ $p_{6-8}=0,09$

			$p_{6-9}=0,01$	$p_{6-9}=0,05$	$p_{6-9}=0,01$	$p_{6-9}=0,03$
7.	ЦФ+ CoGI	М± m Me [Q ₁ -Q ₃] p-знач.	4,27±0,38 4,2 [3,95-4,74] $p_{1-7}<0,001$ $p_{2-7}<0,001$ $p_{3-7}=0,04$ $p_{4-7}<0,001$ $p_{5-7}<0,001$ $p_{6-7}=0,12$ $p_{7-8}=0,73$ $p_{7-9}=0,11$	0,23±0,02 0,23 [0,22-0,25] $p_{1-7}<0,001$ $p_{2-7}<0,001$ $p_{3-7}=0,07$ $p_{4-7}=0,01$ $p_{5-7}<0,001$ $p_{6-7}=0,09$ $p_{7-8}=0,91$ $p_{7-9}=0,75$	0,17±0,019 0,165 [0,15-0,18] $p_{1-7}<0,001$ $p_{2-7}=0,45$ $p_{3-7}=0,13$ $p_{4-7}=0,58$ $p_{5-7}<0,001$ $p_{6-7}=0,99$ $p_{7-8}=0,45$ $p_{7-9}=0,01$	0,24±0,02 0,23 [0,22-0,25] $p_{1-7}<0,001$ $p_{2-7}<0,001$ $p_{3-7}=0,10$ $p_{4-7}=0,08$ $p_{5-7}<0,001$ $p_{6-7}=0,91$ $p_{7-8}=0,06$ $p_{7-9}=0,02$
8.	ЦФ+ CuGI	М± m Me [Q ₁ -Q ₃] p-знач.	4,18±0,38 4,33 [3,78-4,53] $p_{1-8}<0,001$ $p_{2-8}<0,001$ $p_{3-8}=0,02$ $p_{4-8}=0,01$ $p_{5-8}<0,001$ $p_{6-8}=0,06$ $p_{7-8}=0,73$ $p_{8-9}=0,11$	0,24±0,02 0,23 [0,22-0,25] $p_{1-8}<0,001$ $p_{2-8}<0,001$ $p_{3-8}=0,08$ $p_{4-8}=0,02$ $p_{5-8}<0,001$ $p_{6-8}=0,09$ $p_{7-8}=0,91$ $p_{8-9}=0,64$	0,19±0,02 0,185 [0,17-0,20] $p_{1-8}<0,001$ $p_{2-8}=0,39$ $p_{3-8}=0,01$ $p_{4-8}=0,42$ $p_{5-8}<0,001$ $p_{6-8}=0,44$ $p_{7-8}=0,45$ $p_{8-9}<0,001$	0,25±0,02 0,26 [0,24-0,27] $p_{1-8}<0,001$ $p_{2-8}<0,001$ $p_{3-8}<0,001$ $p_{4-8}<0,001$ $p_{5-8}<0,001$ $p_{6-8}=0,09$ $p_{7-8}=0,06$ $p_{8-9}=0,44$
9.	ЦФ+ ZnGI	М± m Me [Q ₁ -Q ₃] p-знач.	3,94±0,32 3,98 [3,67-4,27] $p_{1-9}=0,001$ $p_{2-9}<0,001$ $p_{3-9}<0,001$	0,24±0,02 0,24 [0,22-0,25] $p_{1-9}<0,001$ $p_{2-9}<0,001$ $p_{3-9}=0,03$	0,14±0,018 0,14 [0,13-0,16] $p_{1-9}<0,001$ $p_{2-9}=0,002$ $p_{3-9}=0,21$	0,26±0,02 0,27 [0,24-0,28] $p_{1-9}<0,001$ $p_{2-9}<0,001$ $p_{3-9}<0,001$

			$p_{4-9} < 0,001$	$p_{4-9} = 0,01$	$p_{4-9} = 0,01$	$p_{4-9} < 0,001$
			$p_{5-9} < 0,001$	$p_{5-9} < 0,001$	$p_{5-9} = 0,53$	$p_{5-9} < 0,001$
			$p_{6-9} = 0,01$	$p_{6-9} = 0,05$	$p_{6-9} = 0,01$	$p_{6-9} = 0,03$
			$p_{7-9} = 0,11$	$p_{7-9} = 0,75$	$p_{7-9} = 0,01$	$p_{7-9} = 0,02$
			$p_{8-9} = 0,11$	$p_{8-9} = 0,64$	$p_{8-9} < 0,001$	$p_{8-9} = 0,44$

Распределение субстанций по эффективности коррекции лейкоцитарных индексов может быть представлено следующим образом.

Индекс стрессорной активности:

$CaGl < ГМДП < FeGl < CoGl < CuGl < ZnGl < MnGl$.

Лейкоцитарный индекс интоксикации:

$CaGl < ГМДП < FeGl < CoGl < CuGl < ZnGl < MnGl$.

Индекс сдвига лейкоцитов:

$CaGl < ГМДП < FeGl < CoGl < CuGl < ZnGl < MnGl$.

Ядерный индекс степени эндотоксикоза:

$CaGl < CuGl < CoGl < FeGl < ГМДП < ZnGl < MnGl$.

Анализ представленных рядов и полученных численных значений позволяет сделать вывод о высокой степени иммунокоррекции цитотоксического действия ЦФ при использовании $MnGl$. Лейкоцитарные индексы при введении данного глюконата корректируются практически до значений, полученных для интактных животных. Возможно, в этом случае имеет значение то обстоятельство, что Mn -супероксиддисмутаза катализирует дисмутацию супероксидного анион-радикала, образование которого связано с деструкцией клеточных мембран. Кроме того, известна также роль ионов марганца в активации РНК-полимеразы и некоторых киназ, участвующих в регенеративных внутриклеточных процессах (Wang C. et al., 2018; Wu Q. et al., 2020).

Заслуживает внимания также степень эффективности глюконатов цинка и меди, что возможно, связано с цитопротективными свойствами этих металлов, участвующих в защите дезоксирибонуклеиновой кислоты и транскрипционных

факторов (p53, Erg, Sp1, NF-κB, AP1) от свободнорадикального повреждения, ингибирования протеиназ и др.

На основании полученных результатов были сделаны следующие выводы:

1. Глюконаты 3d-металлов оказывают корректирующее влияние на степень эндогенной интоксикации, вызванной цитостатиком ЦФ, снижают токсическую иммуносупрессию, увеличивают реактивность фагоцитов и скорость регенерации лейкоцитарного звена.

2. Наиболее высокая эффективность выявлена у MnGl, далее следуют ZnGl и CuGl.

Поэтому на следующем этапе исследования противоопухолевой активности глюконатов 3d-металлов были выбраны эти три соединения: глюконат марганца, глюконат меди и глюконат цинка.

3.3. Исследование эффектов глюконатов 3d-металлов (Mn, Cu, Zn) на опухолевую прогрессию и морфологические изменения в тканях на модели индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 у линейных мышей BALB/c

Цель данного этапа исследования – изучение эффектов наиболее иммуномодулирующих глюконатов 3d-металлов (MnGl, CuGl, ZnGl), на опухолевую прогрессию и морфологические изменения в тканях на модели индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 у линейных мышей BALB/c.

Эксперимент проводили в течение 3 месяцев в 5-ти группах (1-я – животные с индуцированной миеломой без лечения, 2-я – животные с индуцированной миеломой и введением препарата сравнения циклофосфида, 3-5-я – животные с индуцированной миеломой и введением глюконатов марганца, меди и цинка). Через 3 недели у части животных осуществляли забор материала.

Опухолевую прогрессию индуцированной миеломы у мышей оценивали на 22-е сутки по приросту массы тела (ПМТ), увеличению количества асцитической жидкости/асцита (УОА), гистологическим срезам органов (печень, легкое, почка, селезенка и сердце) и опухолевого образования (при наличии), а также медиане продолжительности жизни (МПЖ), которую определяли исходя из наблюдений в течение 3 месяцев. На основании полученных результатов рассчитывали показатели торможения прироста массы тела (ТПМ), торможения развития асцита (ТРА) и увеличения продолжительности жизни животных (УПЖ). Расчеты проводили относительно контрольной группы «контроль-миелома» по следующим формулам:

$$\text{ТПМ} = [(\text{ПМТ}_{(к-м)} - \text{ПМТ}_о) / \text{ПМТ}_{(к-м)}] \times 100 (\%), \text{ где}$$

$\text{ПМТ}_{(к-м)}$ - прирост массы тела в контрольной группе (г),

$\text{ПМТ}_о$ – прирост массы тела в опытной группе (г).

$$\text{ТРА} = [(\text{УОА}_{(к-м)} - \text{УОА}_о) / \text{УОА}_{(к-м)}] \times 100 (\%), \text{ где}$$

$\text{УОА}_{(к-м)}$ – увеличение объема асцита в контрольной группе (мл),

$\text{УОА}_о$ – увеличение объема асцита в опытной группе (мл).

$$\text{УПЖ} = [(\text{МПЖ}_о - \text{МПЖ}_к) / \text{МПЖ}_к] \times 100 (\%), \text{ где}$$

МПЖк – медиана продолжительности жизни в контрольной группе;

МПЖо – медиана продолжительности жизни в опытной группе.

Полученные результаты – значения показателей ПМТ, УОА и МПЖ, представлены в таблице 6.

Таблица 6

Влияние глюконатов 3d-металлов на прирост массы тела (ПМТ), увеличение объема асцита (УОА) и медиану продолжительности жизни (МПЖ) на модели индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c

Статистич. показатель	Экспериментальные группы мышей				
	1 (n=10)	2 (n=10)	3 (n=10)	4 (n=10)	5 (n=10)
	Контроль - миелома	Циклофос-фамид +миелома	MnGl+ миелома	CuGl + миелома	ZnGl + миелома
Прирост массы тела (ПМТ), г					
М±σ	13,2±2,2	9,4±1,6	6,5±1,0	9,3±1,4	8,4±1,4
Me	12,9	9,8	6,6	9,3	8,8
[Q ₁ -Q ₃]	[12,1-14,8]	[8,7-10,2]	[5,7-7,2]	[8,2-10,0]	[7,6-9,1]
р-знач.		p ₁₋₂ =0,001 p ₂₋₃ =0,001 p ₂₋₄ =0,27 p ₂₋₅ =0,04	p ₁₋₃ <0,001 p ₂₋₃ =0,001 p ₃₋₄ <0,001 p ₃₋₅ =0,003	p ₁₋₄ <0,001 p ₂₋₄ =0,27 p ₃₋₄ <0,001 p ₄₋₅ =0,09	p ₁₋₅ <0,001 p ₂₋₅ =0,04 p ₃₋₅ =0,003 p ₄₋₅ =0,09
Увеличение объема асцита (УОА), мл					
М±σ	6,8±1,0	4,8±0,8	3,4±0,6	4,7±0,8	4,3±0,6
Me	7,1	5,0	3,5	4,8	4,6
[Q ₁ -Q ₃]	[6,3-7,7]	[4,4-5,4]	[3,1-3,8]	[4,2-5,0]	[4,0-4,8]
р-знач	p ₁₋₂ =0,001	p ₁₋₂ =0,001	p ₁₋₃ <0,001	p ₁₋₄ <0,001	p ₁₋₅ <0,001

	$p_{1-3}<0,001$	$p_{2-3}=0,001$	$p_{2-3}=0,001$	$p_{2-4}=0,23$	$p_{2-5}=0,03$
	$p_{1-4}<0,001$	$p_{2-4}=0,23$	$p_{3-4}=0,001$	$p_{3-4}=0,001$	$p_{3-5}=0,004$
	$p_{1-5}<0,001$	$p_{2-5}=0,03$	$p_{3-5}=0,004$	$p_{4-5}=0,09$	$p_{4-5}=0,09$
Медиана продолжительности жизни (МПЖ), сут					
Me	24,3 [8-38]	61,6 [38-90]	72,4 [45-90]	56,1 [45-90]	68,6 [45-90]

Данные расчетов показателей ТПМ, ТРА и УПЖ, демонстрирующие эффекты ингибирующего действия глюконатов марганца, меди и цинка на опухолевую прогрессию отражены на диаграмме (рис. 18).

Показано, что после курса введения глюконата марганца происходит статистически значимое снижение прироста массы тела и увеличения объема асцитической жидкости, как по сравнению с группой «контроль-миелома», так и по сравнению с другими группами. После терапии глюконатом меди статистически значимое снижение показателей выявлено относительно группы «контроль-миелома», а после терапии глюконатом цинка также и по сравнению с группой «миелома+ циклофосфамид».

Соответственно торможение прироста массы тела и торможение развития асцита составили для глюконата марганца – 50,8% и 50%, для глюконата меди – 29,5% и 30,9%, для глюконата цинка – 36,4% и 36,8% ($p<0,05$).

Показатель увеличения продолжительности жизни в той же последовательности составил: 197,9%, 130,9% и 182,3%. В группе сравнения «миелома+ циклофосфамид» эти показатели оказались ниже, чем после терапии глюконатами марганца и цинка (28,8%, 29,4% и 153,5%) ($p<0,05$).

Таким образом, результаты эксперимента свидетельствуют о том, что глюконаты 3d-металлов (марганца, меди и цинка) оказывают ингибирующее действие на индуцированную миелому Sp 2/0 Ag14 у мышей BALB/c, увеличивая продолжительность их жизни. Наибольшая эффективность была показана для

глюконата марганца, далее для глюконата цинка и глюконата меди.

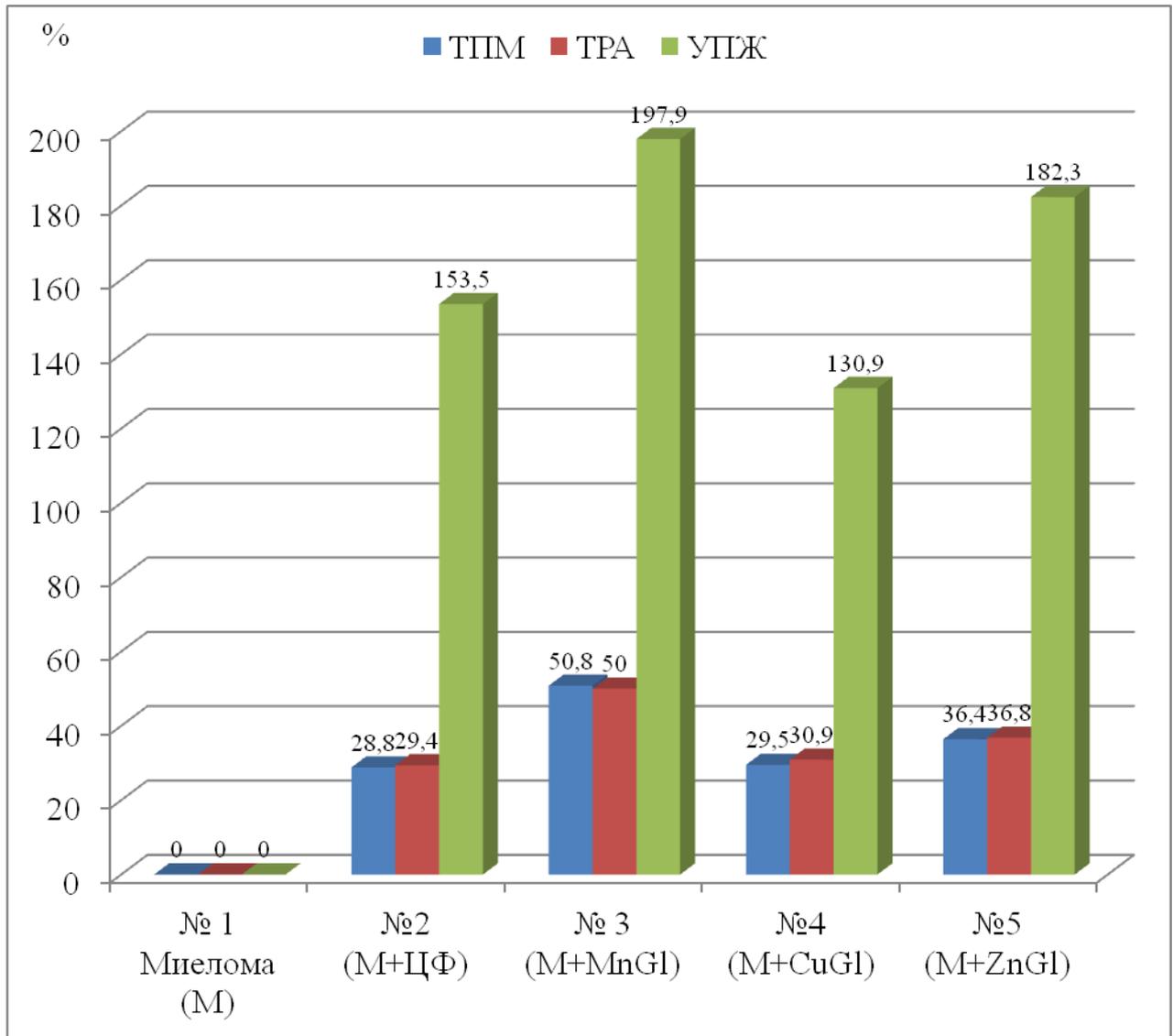


Рисунок 18. – Изменение показателей торможения прироста массы тела (ТПМ), торможения развития асцита (ТРА) и увеличения продолжительности жизни (УПЖ) у мышей с экспериментальной миеломой (М) после терапии глюконатами марганца, меди и цинка.

Примечание. Отличия статистически значимы: ТПМ – [$p_{1-(2-5)}$, $p_{2-(3;5)}$, $p_{3-(4;5)}$, p_{4-5}]; ТРА – [$p_{1-(2-5)}$, $p_{2-(3;5)}$, $p_{3-(4;5)}$, p_{4-5}]; УПЖ – [$p_{1-(2-5)}$, $p_{2-(3-5)}$, $p_{3-(4;5)}$, p_{4-5}] < 0,05.

**Исследование морфологических изменений в тканях мышей BALB/c
с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14 под действием
глюконатов марганца, меди и цинка**

Морфологические изменения в тканях органов мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14 под действием глюконатов марганца, меди и цинка исследовали через 3 недели от начала их ежедневного перорального введения. Гистологические исследования жизненно важных органов проводили у 10 особей из каждой экспериментальной группы мышей: 1) интактные животные («контроль-интактные»); 2) животные с индуцированной миеломой без лечения («миелома без лечения»); 3) животные с индуцированной миеломой и введением препарата сравнения циклофосфида («миелома+ЦФ»); 4) животные с индуцированной миеломой и введением глюконата марганца («миелома+MnGl»); 5) животные с индуцированной миеломой и введением глюконата меди («миелома+CuGl»); 6) животные с индуцированной миеломой и введением глюконата цинка («миелома+ZnGl»).

При исследовании гистологических срезов фрагментов тканей 3-х месячных самцов мыши линии BALB/c из группы 1 – интактные животные («контроль-интактные») строение органов (печень, легкие, почки, селезенка и миокард) типичное для лабораторных грызунов.

Ткань печени характеризуется сохранной гистоархитектоникой. Печень окружена соединительнотканной капсулой, вглубь органа отходят соединительнотканые перегородки, делящие ее на множество долек. Междольковая рыхлая соединительная ткань развита очень слабо, определяется лишь в зоне расположения печеночных триад. Печеночные дольки шестигранной формы, в центре каждой располагается центральная венула, а по периферии – портальные тракты и триады. Печеночные дольки сформированы плотно расположенными рядами гепатоцитов с зернистой эозинофильной цитоплазмой и крупными ядрами округлой формы с визуализирующимися ядрышками. Встречаются полиплоидные гепатоциты с двумя ядрами. По ходу внутريدольковых

синусоидных капилляров определяется периваскулярное пространство со слабо развитой соединительной тканью. Между печеночными дольками располагается триада печени, состоящая из: междолькового желчного протока, образованного однослойным кубическим эпителием; междольковой артерии значительного диаметра, имеющей округлую форму и выраженную стенку; междольковой вены, уплощенной или складчатой формы, имеющей более тонкую стенку по сравнению с артерией (рис. 19).

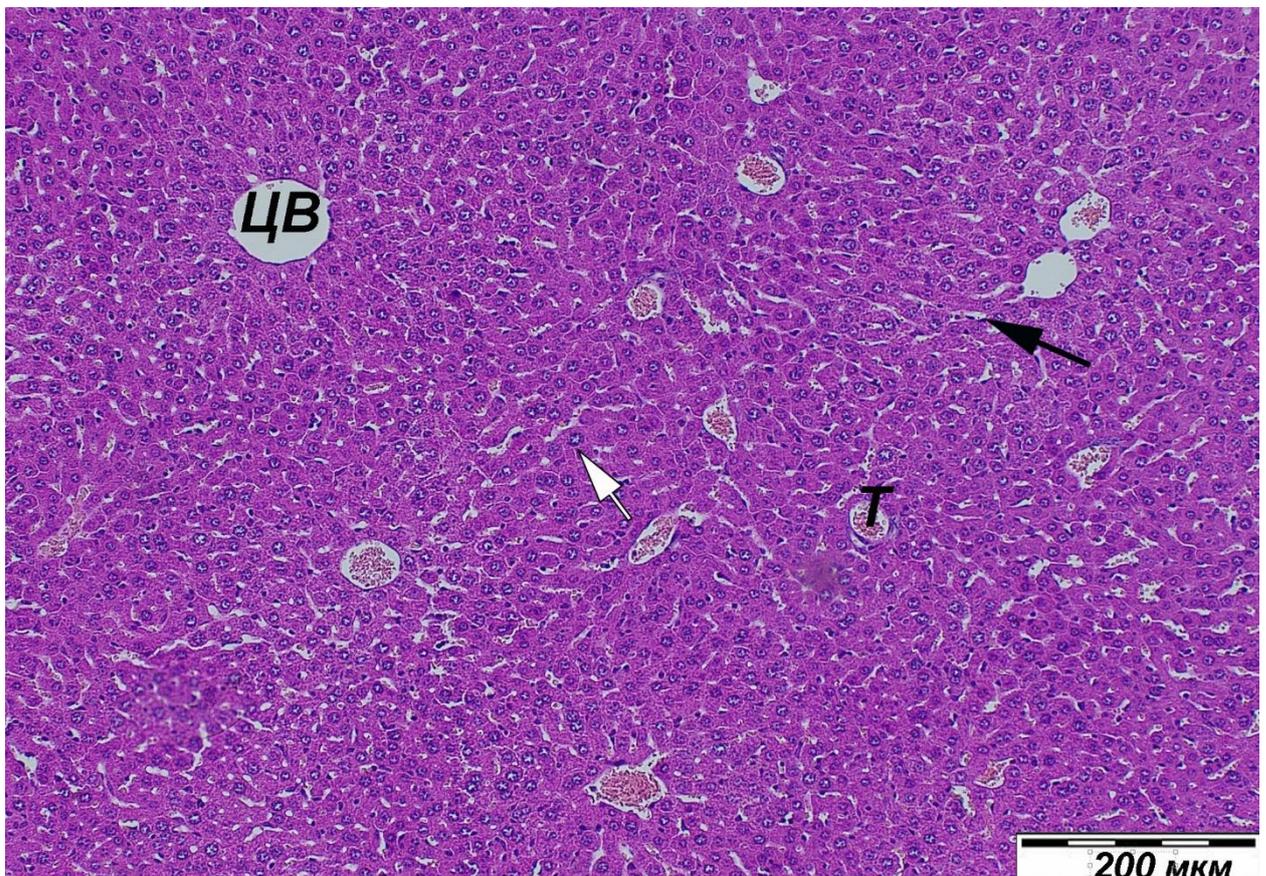


Рисунок 19. – Ткань печени мыши из группы «контроль-интактные» с характерным строением долек, гепатоциты структурированы в печеночные балки (белая стрелка), имеют типичное строение, зернистую цитоплазму. По периферии долек расположены печеночные триады (Т), между балками сформированы синусоидные капилляры (черная стрелка), сходящиеся к центральной венуле (ЦВ). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$.

Ткань легкого типичной гистологической структуры с наличием бронхов

различного калибра и соответственно различного строения. Стенка крупных бронхов представлена адвентициальной оболочкой, незамкнутыми хрящевыми кольцами, мышечной пластинкой, собственной пластинкой слизистой оболочки, внутренняя выстилка – реснитчатый псевдомногослойный цилиндрический эпителий. Мелкие бронхи имеют схожее строение, однако они лишены хрящевых колец. Основную массу препарата легкого наряду с мелкими бронхами занимает респираторный отдел. Респираторные бронхиолы выстланы однослойным кубическим эпителием, располагаются в окружении кровеносных сосудов. Альвеолы легкого тесно прилегают друг к другу, представлены однослойным плоским эпителием, окруженным густой сетью капилляров с одиночными фибробластическими клетками. Кроме альвеолоцитов в стенке альвеол обнаруживаются альвеолярные макрофаги (рис. 20).

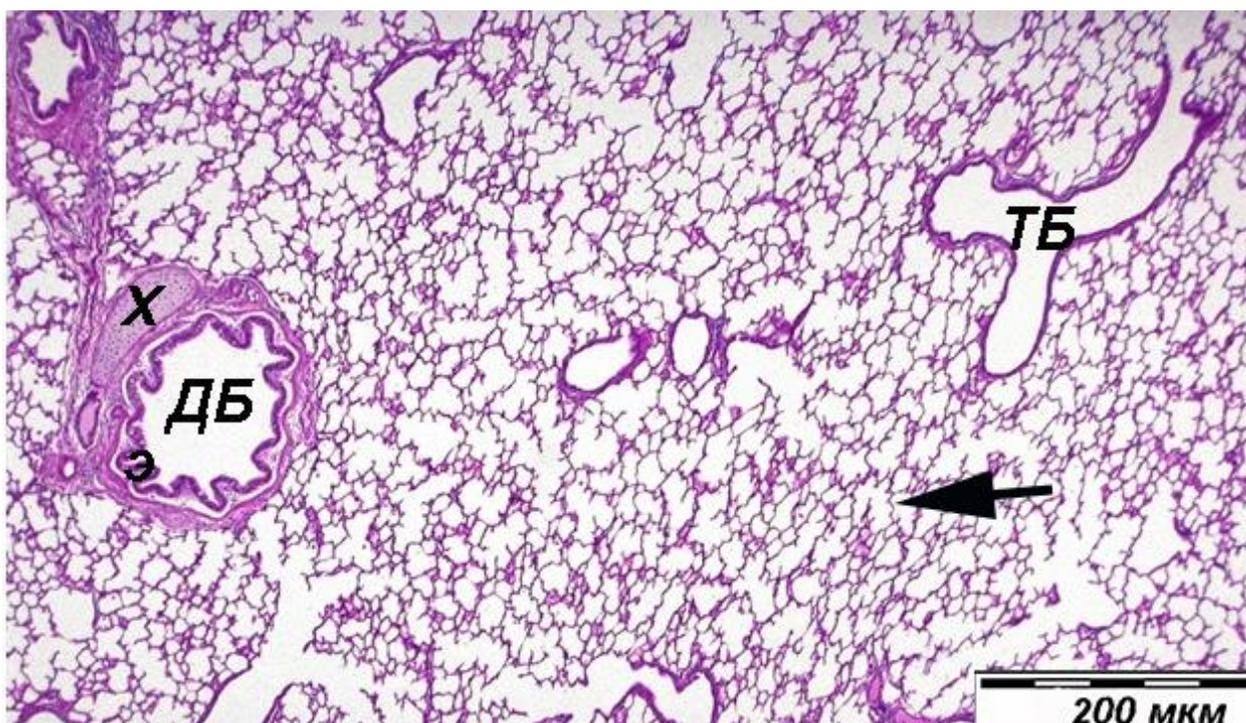


Рисунок 20. – Легкое мыши из группы «контроль-интактные». Дольковый бронх (ДБ) содержит в стенке неполные кольца хрящей (х), изнутри выстлан эпителием (э). Терминальные бронхи (ТБ) не имеют хрящевых элементов. Большая часть препарата представлена респираторным отделом легкого с альвеолами (стрелка). Гематоксилин-эозин. Ув. ×200.

Почка покрыта соединительнотканной капсулой с тонкими, едва различимыми трабекулами. В корковом слое почки обнаруживаются почечные тельца, окруженные канальцами нефрона. Нефроны состоят из почечного тельца и последовательно переходящих друг в друга почечных канальцев. Почечные тельца хорошо визуализируются в виде структур, состоящих из сосудистого капиллярного клубочка и эпителиальной капсулы. У некоторых нефронов в срез попадают артериолы, прилежащие к сосудистому клубочку, при этом приносящий и выносящий сосуды, имеют различный диаметр. Между капиллярами клубочка определяются многочисленные анастомозы. Эндотелий кровеносных капилляров сильно уплощен и располагается на базальной мембране. Внутренний листок капсулы почечного тельца охватывает отростчатыми клетками со всех сторон клубочковые кровеносные капилляры. Наружный листок капсулы клубочка состоит из плоских эпителиальных клеток. Последовательность расположения проксимальных и дистальных извитых канальцев, нисходящих и восходящих отделов петли нефрона, собирательных трубочек, в препарате не прослеживается, поскольку они сильно изгибаются и переплетаются со структурами соседних нефронов, вследствие чего в срез попадают фрагменты разных структур. Однако данные трубчатые элементы визуально различимы на увеличениях микроскопа 400х и более за счет различного диаметра и строения эпителиоцитов. Среди почечной паренхимы визуализируются артериальные и венозные сосуды мелкого калибра, преимущественно междольковые артерии и вены коркового вещества почки. Юкстагломерулярный комплекс четко не визуализируется, тем не менее, можно отметить плотные структуры, расположенные в виде пятен около почечного тельца. Соединительная ткань располагается в виде тонких прослоек, окружающих все структуры почки и содержащих фибробласты, гистиоциты, лимфоидные клетки, тогда как в мозговом веществе определяются веретеновидные клетки интерстиция (рис. 21).

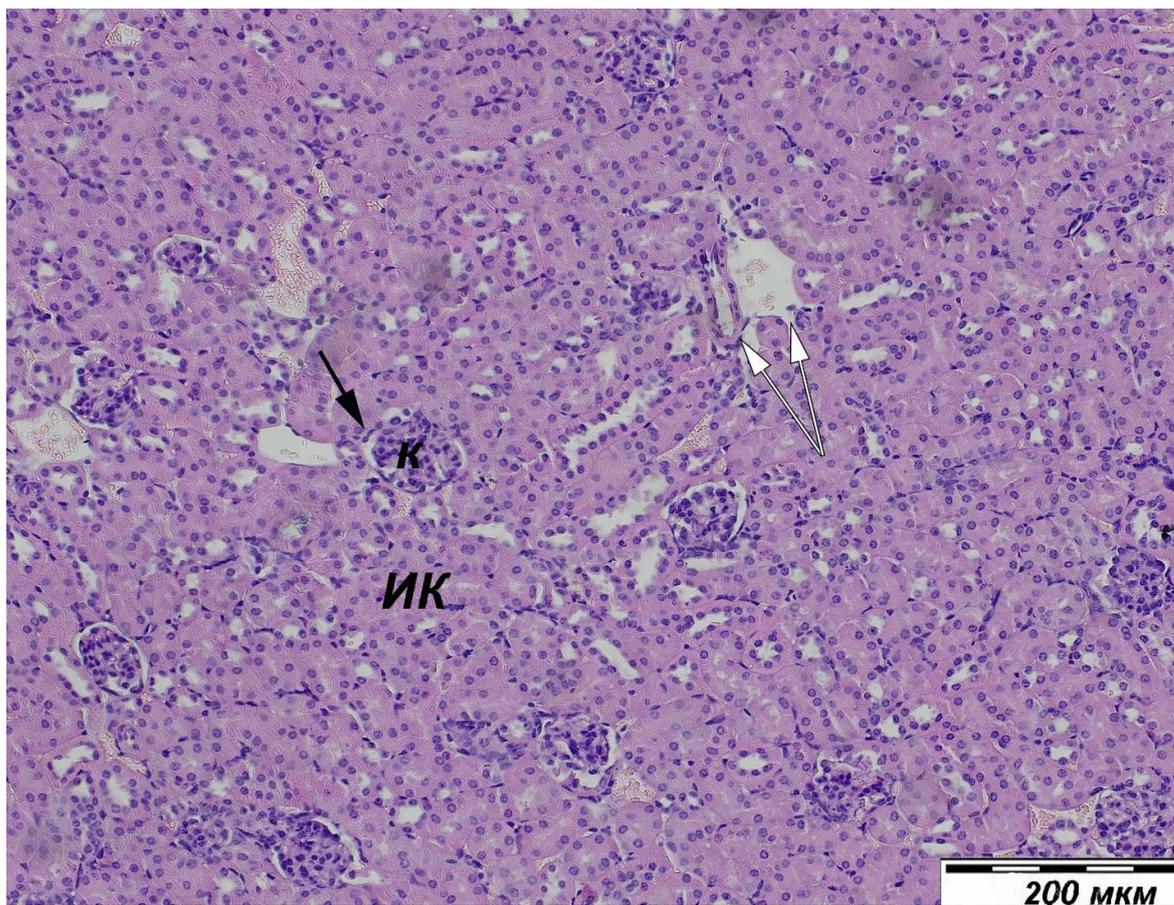


Рисунок 21. – Почка мыши из группы «контроль-интактные». Почечные тельца хорошо визуализируется в виде структур, состоящих из сосудистого капиллярного клубочка (К) и эпителиальной капсулы (черная стрелка). Клубочки окружены петлями проксимальных и дистальных извитых канальцев (ИК). Среди почечной паренхимы визуализируются междольковые артерии (белая стрелка слева) и вены (белая стрелка справа) коркового вещества почки. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$.

Ткань селезенки покрыта соединительнотканной капсулой и представлена белой и красной пульпой. От капсулы в паренхиму органа отходят тонкие, анастомозирующие между собой перегородки. Белая пульпа представлена лимфоидной тканью, где хорошо различимы лимфоидные узелки с центральной артерией, периартериальные лимфатические влагиалища и маргинальная зона вокруг них. Красная пульпа представлена венозными синусоидами и селезеночными тяжами. Венозные синусы выглядят как тонкостенные, анастомозирующие сосуды, имеют разнообразную форму, кровеносные сосуды

выстланы эндотелиальными клетками, селезеночные тяжи образованы скоплениями эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, среди которых встречаются макрофаги, лимфоидные и плазматические клетки (рис. 22).

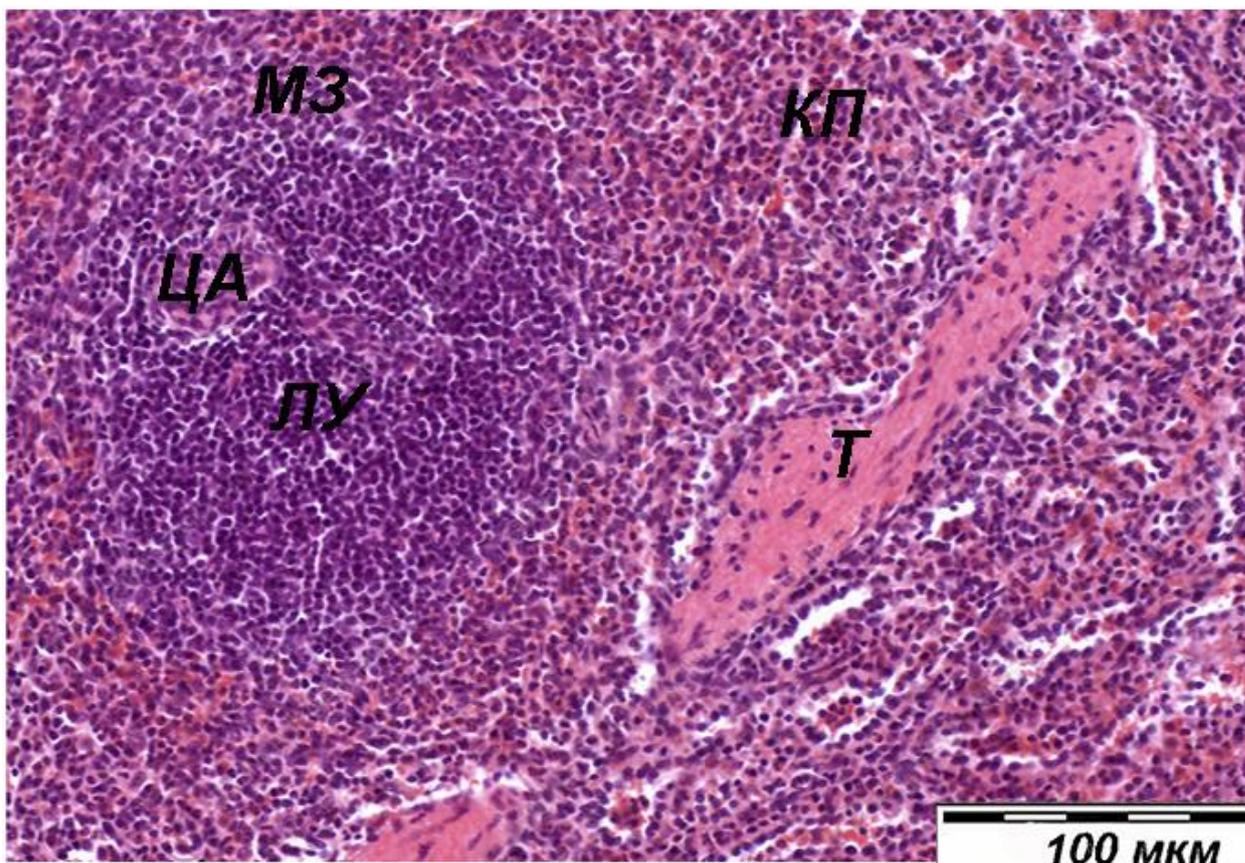


Рисунок 22. – Селезенка мыши из группы «контроль-интактные». Белая пульпа представлена лимфоидными узелками (ЛУ) с центральной артериолой (ЦА), окруженные маргинальной зоной (МЗ). Красная пульпа (КП) представлена венозными синусоидами и селезеночными тяжами. В ней хорошо видны трабекулы (Т), формирующие внутренний каркас органа. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$.

В структуре миокарда хорошо просматривается поперечнополосатая мышечная ткань сердечного типа. Кардиомиоциты имеют вытянутую форму, в центральной их части располагается ядро овальной формы, встречаются также двуядерные клетки. Клетки, покрытые сарколеммой, соединяются друг с другом в области вставочных дисков, с помощью которых кардиомиоциты соединяются в

функциональные комплексы, которые выглядят как мышечные «волокна». Хорошо заметна сложная сетчатая структура этого комплекса, продольные и боковые связи кардиомиоцитов. Между клетками миокарда располагается рыхлая волокнистая соединительная ткань с кровеносными капиллярами, тесно контактирующими с кардиомиоцитами. Между эндокардом и миокардом находятся видоизмененные кардиомиоциты – элементы проводящей системы сердца, клетки которой характеризуются большим объемом цитоплазмы и малым количеством миофибрилл (рис. 23).

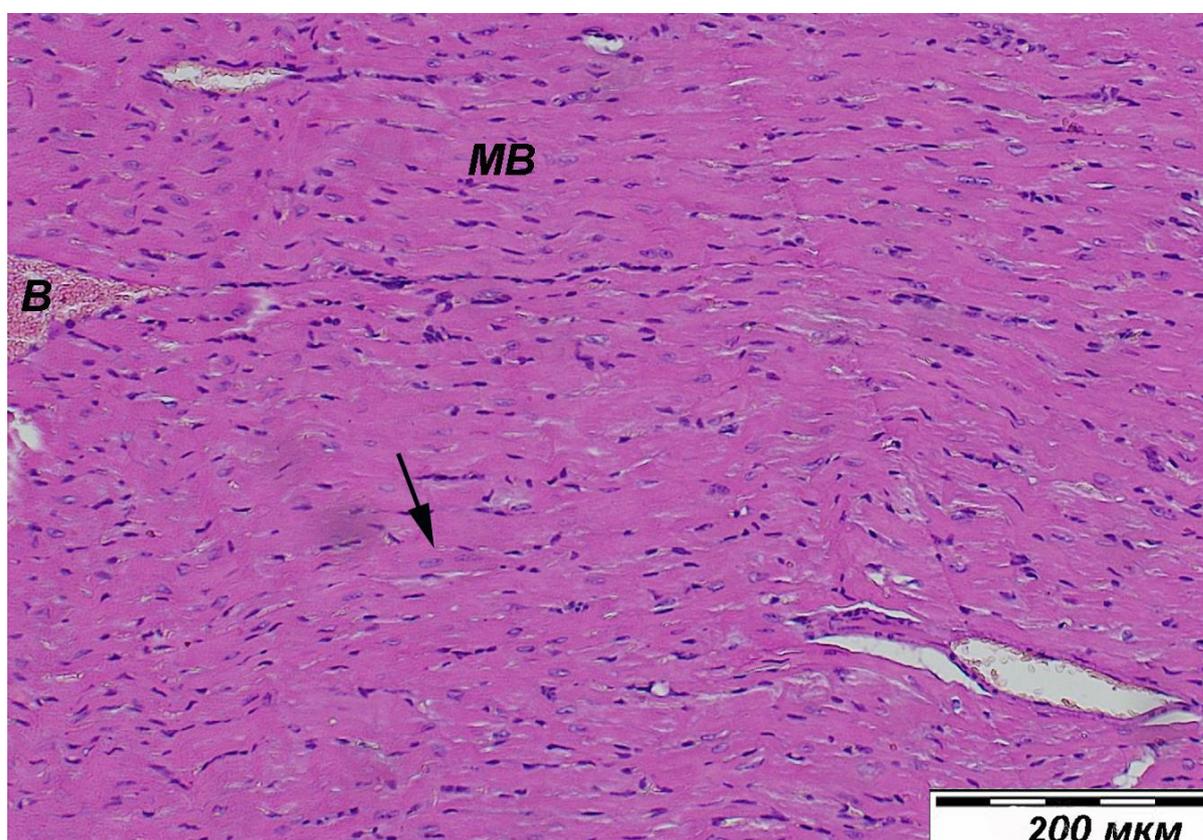


Рисунок 23. – Стенка левого желудочка сердца мыши из группы «контроль-интактные». Кардиомиоциты (стрелка) вытянутой формы с бледным ядром в центре клетки группируются в мышечные «волокна» (MB). Между ними проходят полнокровные венозные сосуды (B). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. ×400.

У мышей 2-й контрольной группы – «индуцированная миелома без лечения» в брюшной полости обнаружено опухолевое образование, его размеры

составляют в среднем $1,0 \times 1,4$ см. Опухоль достаточно плотная на ощупь, макроскопически имеет относительно ровную поверхность, на гистологических препаратах опухоль имеет нечеткие контуры, дольчатую структуру, состоит из ячеистых образований, разделенных прослойками соединительной ткани. Стенки ячеек, инфильтрированные лимфоидными клетками, образуют основную массу опухоли. В соединительнотканной строме опухоли располагаются полнокровные кровеносные сосуды различного калибра, чаще всего отмечается венозная гиперемия (рис. 24).

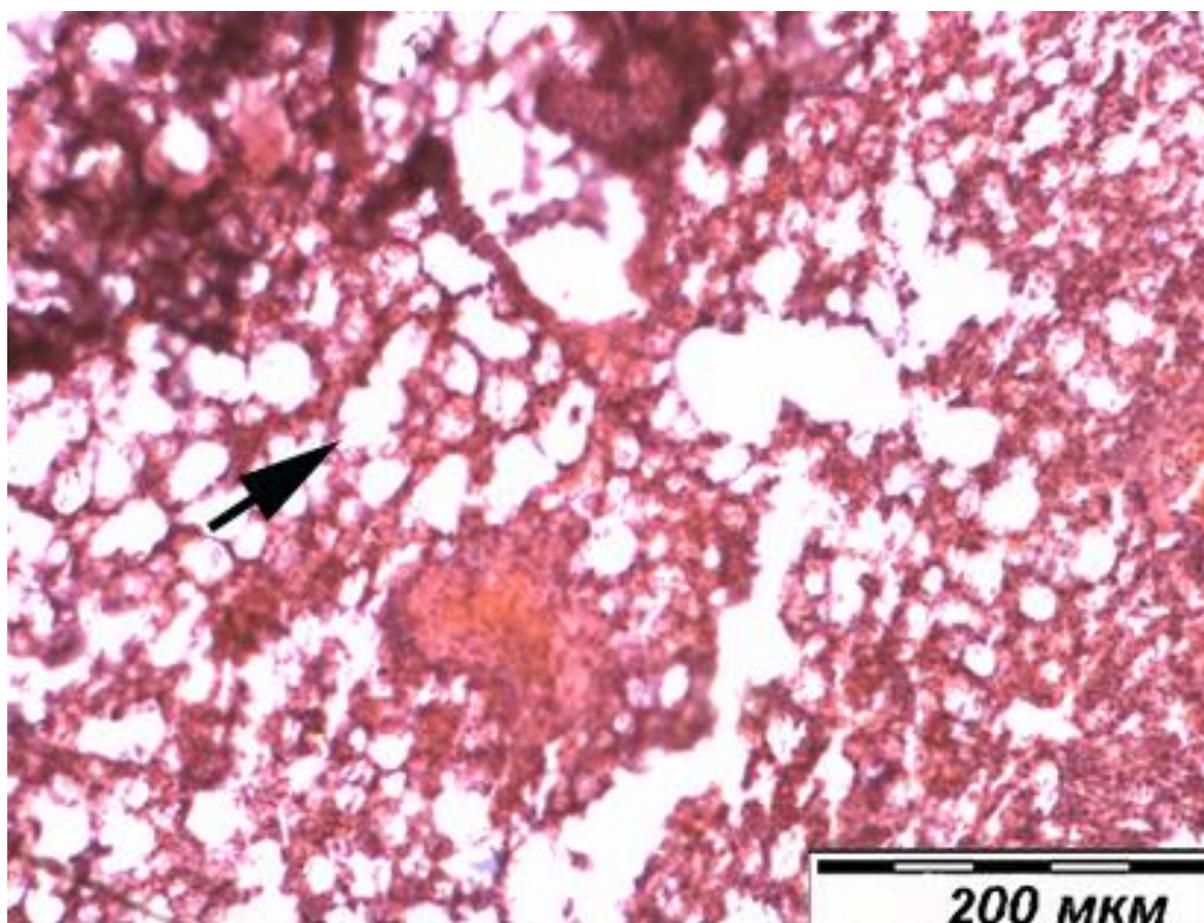


Рисунок 24. – Фрагмент опухолевого образования мыши из группы «миелома без лечения». Визуализируются ячейки опухоли (стрелка), окруженные плотно расположенными лимфоидными клетками опухоли. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$.

Скопления лимфоидных клеток, схожих с клетками, инфильтрирующими ячейки опухоли, определяются и вокруг кровеносных сосудов, имеющих, как

правило, значительную толщину и диаметр (рис. 25). Присутствие иммунных клеток в опухоли указывает и на прогрессирование опухолевого процесса, его активную стадию (Fridman W.H. et al., 2012). Лимфоидные клетки имеют различный размер, расположены как диффузно, так и в виде крупных скоплений. Лимфоидные клетки плотно прилегают друг к другу, а также к кровеносным сосудам, пронизывающим опухолевое образование в различных направлениях (рис. 26).

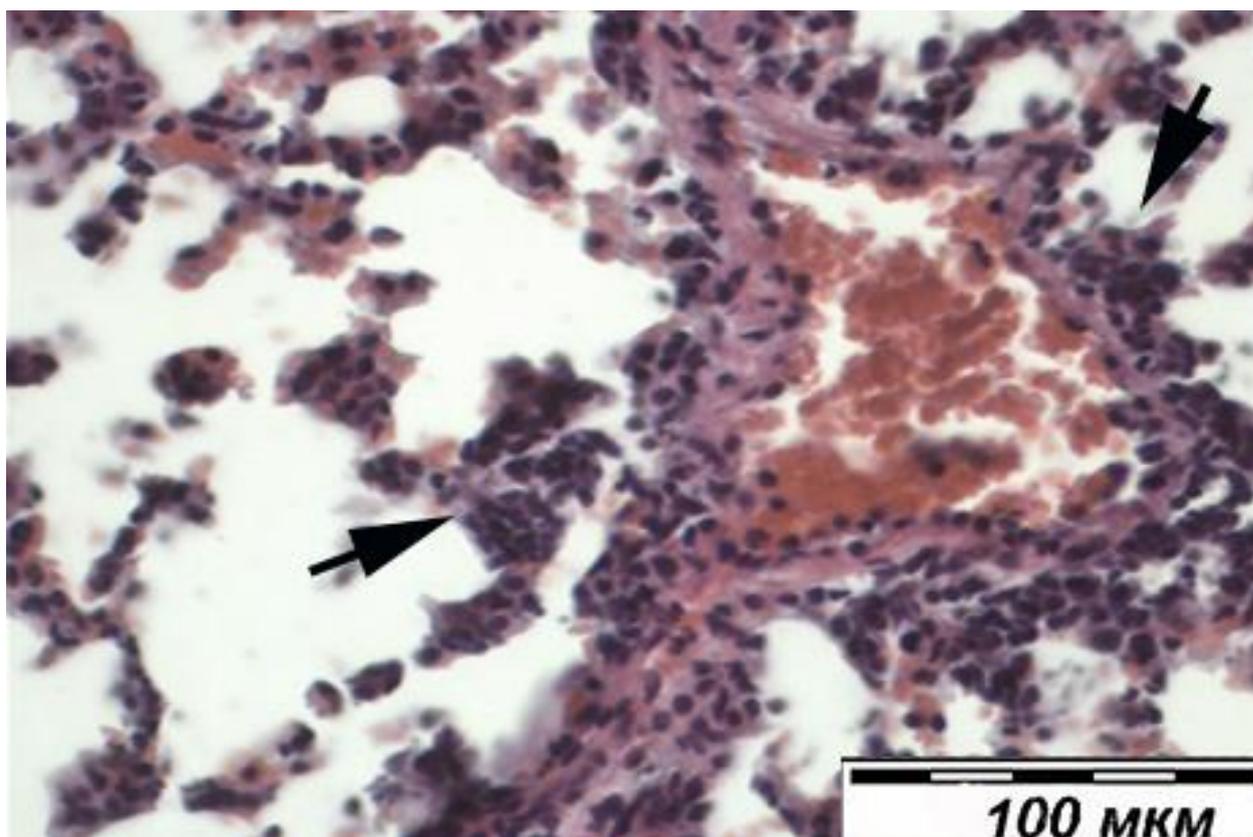


Рисунок 25. – Фрагмент опухолевого образования мыши из группы «миелома без лечения». Визуализируется выраженная инфильтрация лимфоидных клеток вокруг кровеносного сосуда и в стенке ячеистых структур опухоли (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$.

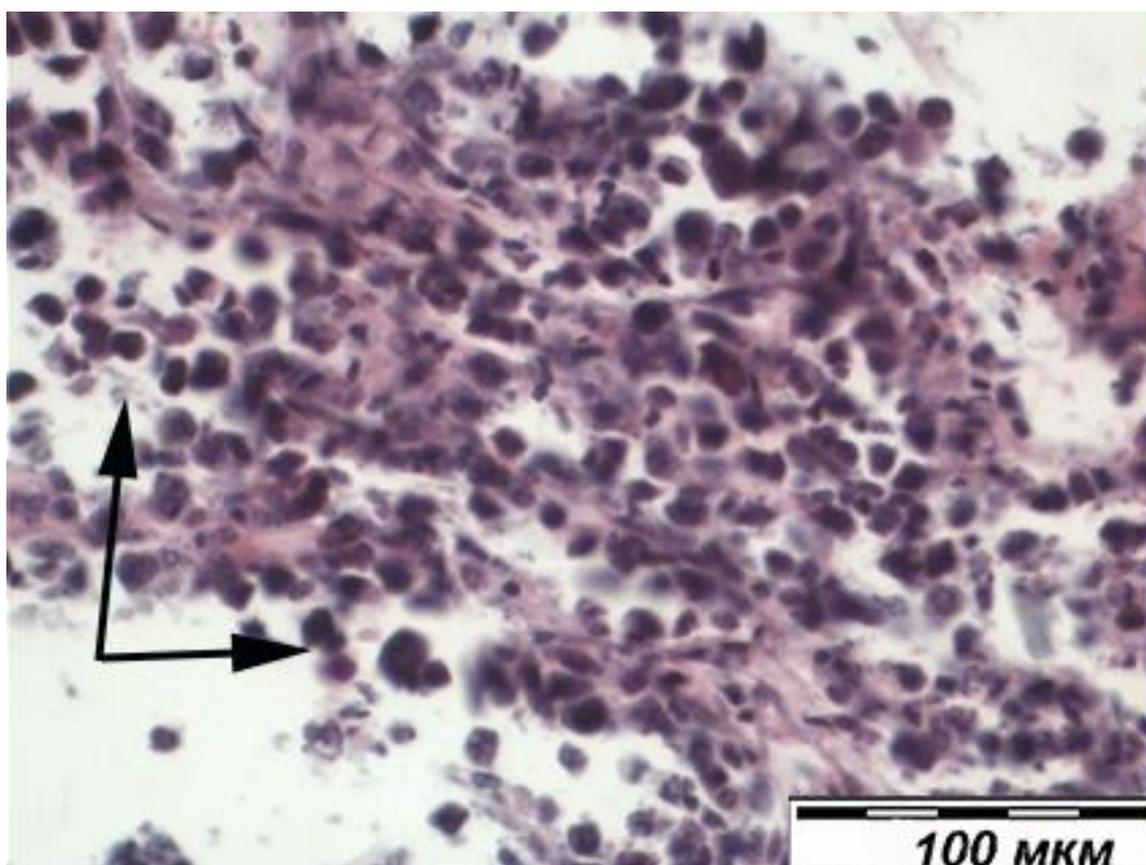


Рисунок 26. – Фрагмент опухолевого образования мышцы из группы «миелома без лечения». Визуализируются лимфоидные клетки опухоли, полиморфные и различного размера, местами плотно прилегающие друг к другу, а также к кровеносным сосудам, пронизывающим опухолевое образование в различных направлениях. Гиперхромные опухолевые клетки (стрелка) перекрывают слабо визуализирующиеся структуры стенки сосудов опухоли. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$.

В полости опухолевых ячеек обнаружена тканевая жидкость, выведенная из ткани во время проводки и видимая на гистологическом препарате в виде пустот или слабо эозинофильного фонового окрашивания. В зоне клубочкового, сконцентрированного расположения лимфоидных клеток, накапливаются богатые белком эозинофильные массы. Отдельные лимфоидные клетки, характеризующиеся увеличением цитоплазмы и нарушением ядерно-цитоплазматического соотношения, оторваны от стенок ячеек и располагаются в их полости.

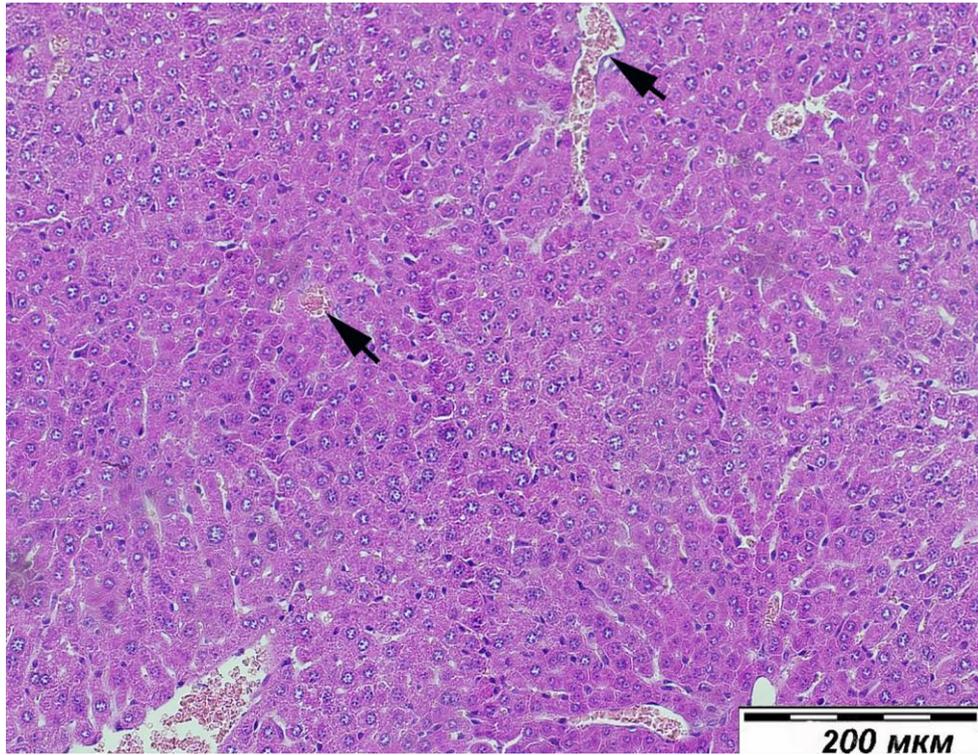


Рисунок 27. – Печень животного из группы «миелома без лечения». Печеночные дольки сохраняют типичное строение с радиальным ходом балок, гепатоциты не изменены, однако сосуды гиперемированы (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$.

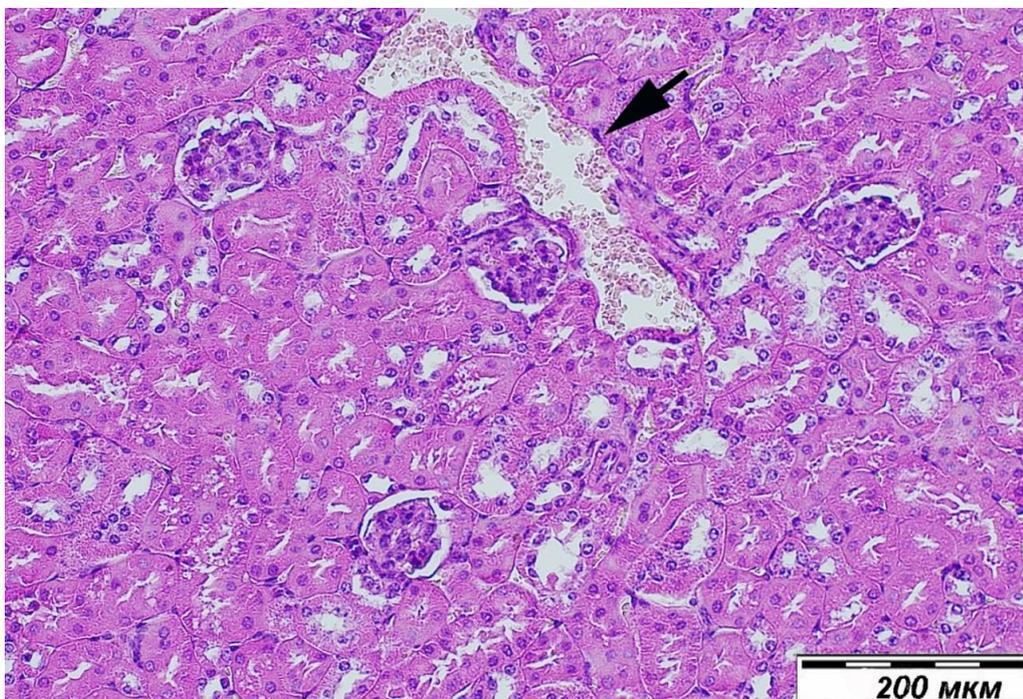


Рисунок 28. – Сохранная ткань почки животного из группы «миелома без лечения». Наблюдается гиперемия сосудов (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$.

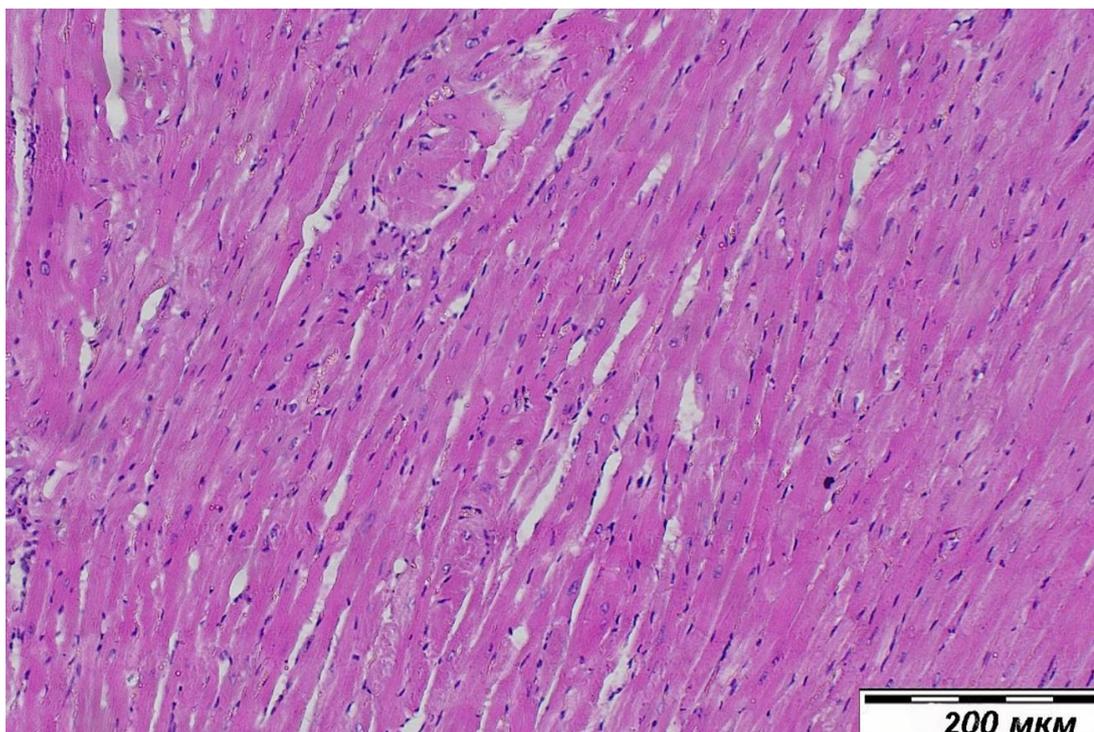


Рисунок 29. – Стенка левого желудочка животного из группы «миелома без лечения». Кардиомиоциты без признаков повреждения. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$.

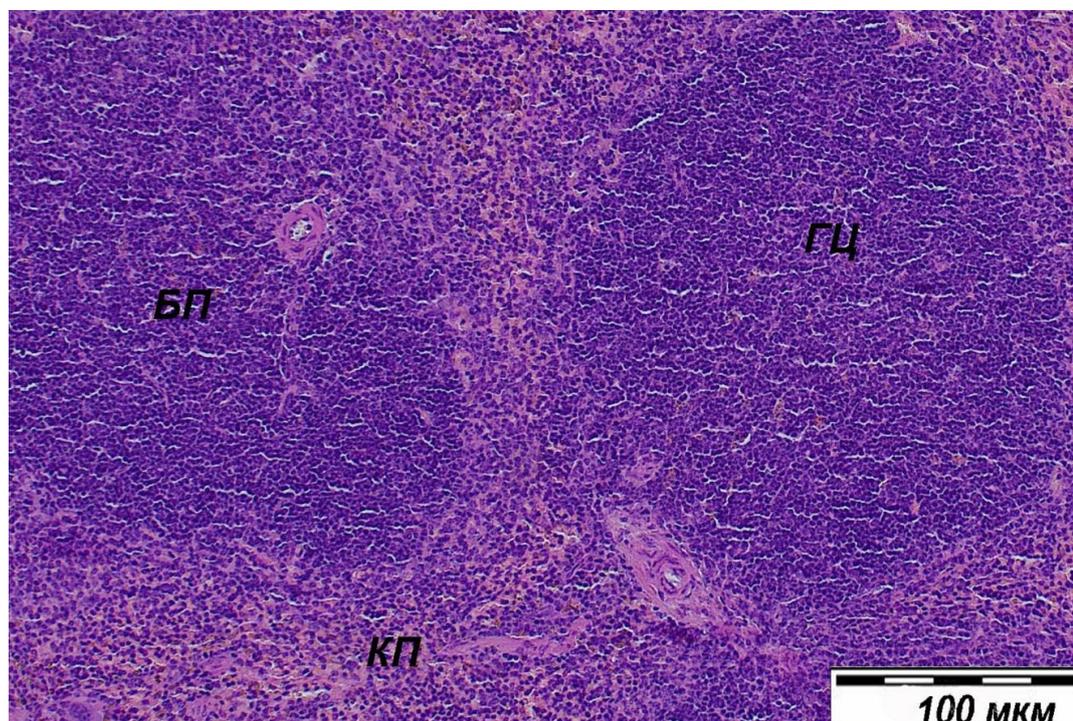


Рисунок 30. – Селезенка животного из группы «миелома без лечения» с увеличенными лимфоидными узелками в белой пульпе (БП), содержащими активные герминативные центры (ГЦ). Красная пульпа (КП) полнокровна, без видимых изменений. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$.

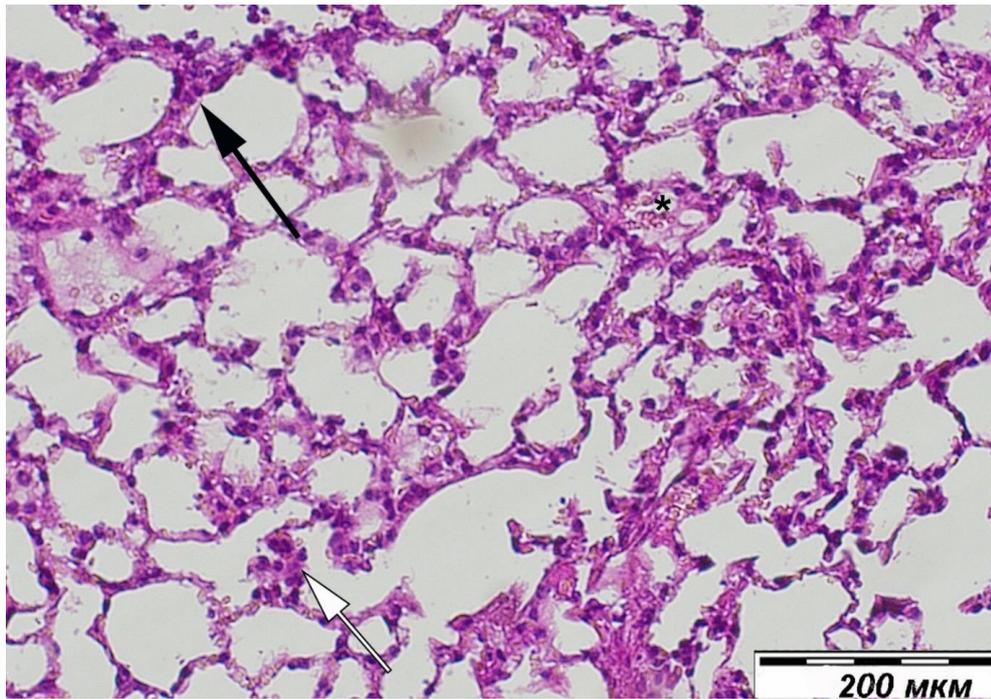


Рисунок 31. – Легкое животного из группы «миелома без лечения». Очаговые скопления лимфоидных клеток (белая стрелка) на фоне утолщения межальвеолярных перегородок (черная стрелка) и полнокровия сосудов (*). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х 400.

Морфологическое исследование гистологических срезов тканей органов группы животных с индуцированной миеломой без лечения показало, что фрагменты ткани печени (рис. 27), почечных телец с канальцами нефрона (рис. 28), кардиомиоцитов (рис. 29) значительных изменений по сравнению с контрольной группой интактных животных не имеют. Выявлены лишь явления гиперемии, а в паренхиме почек и печени единичные клетки с признаками зернистой дистрофии, имеющей обратимый характер.

Выявлены реактивные изменения белой и красной пульпы селезёнки (рис. 30), а также выраженные изменения в ткани легкого, в респираторном отделе которого отмечаются очаговые скопления лимфоидных клеток на фоне утолщения межальвеолярных перегородок и полнокровия сосудов (рис. 31).

В 3 группе животных с индуцированной миеломой после терапии циклофосфамидом обнаружены также опухолевые образования, макроскопические размеры которых в среднем меньше, но не имеют значимых

отличий от группы с индуцированной миеломой без лечения.

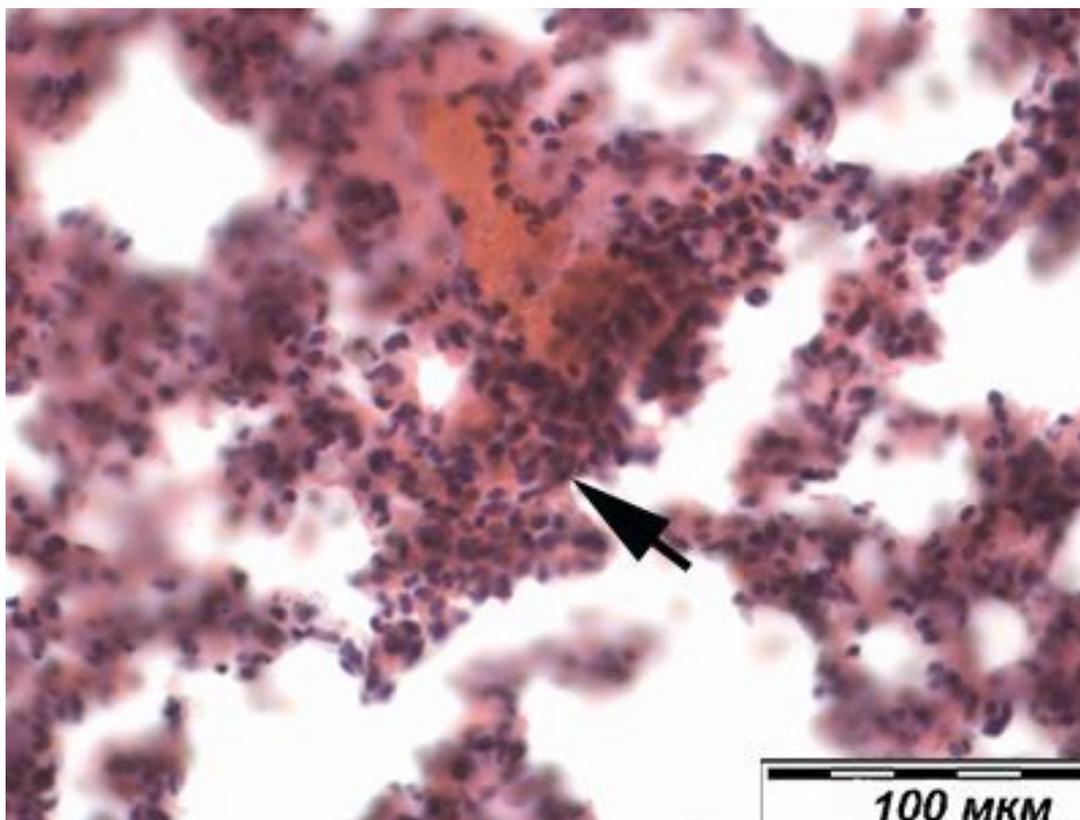


Рисунок 32. – Фрагмент опухолевого образования мышцы из группы с индуцированной миеломой после терапии циклофосфамидом «миелома +ЦФ». Визуализируется групповое и диффузное расположение лимфоидных клеток (стрелка) опухоли после терапии циклофосфамидом. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х 400.

Опухоль менее плотная, имеет выраженное ячеистое строение, стенка всех ячеек инфильтрирована лимфоидными клетками, расположенными вплотную друг к другу. Однако среди однообразных ячеистых структур встречаются значительного диаметра полости, выстланные клетками призматической формы, расположенными в один слой и напоминающие выводные протоки желез. Просветы ячеек заполнены прозрачной жидкостью, стенки резко расширенных ячеек выстланы крупными плазматическими клетками. Опухолевую структуру пронизывают кровеносные сосуды различного диаметра, в которых, как правило, отмечается застой крови: венозная гиперемия с периваскулярным отеком с

последующей миграцией лейкоцитов через стенку кровеносных сосудов, что приводит к накоплению лимфоидных клеток в стенке ячеек опухолевого образования (рис. 32).

Гистологическое исследование срезов тканей органов мышей 3 группы (по сравнению с контрольной группой интактных животных и группы мышей с миеломой без лечения) обнаружило довольно выраженные изменения, свидетельствующие о токсичном действии циклофосфида. В гепатоцитах выявляются признаки выраженной зернистой дистрофии, местами встречаются дольки печени с инфильтрацией лимфоидными клетками, которые чаще всего концентрируются вокруг триады печени, а также лимфоидные скопления, расположенные в зоне печеночных пластинок (рис. 33).

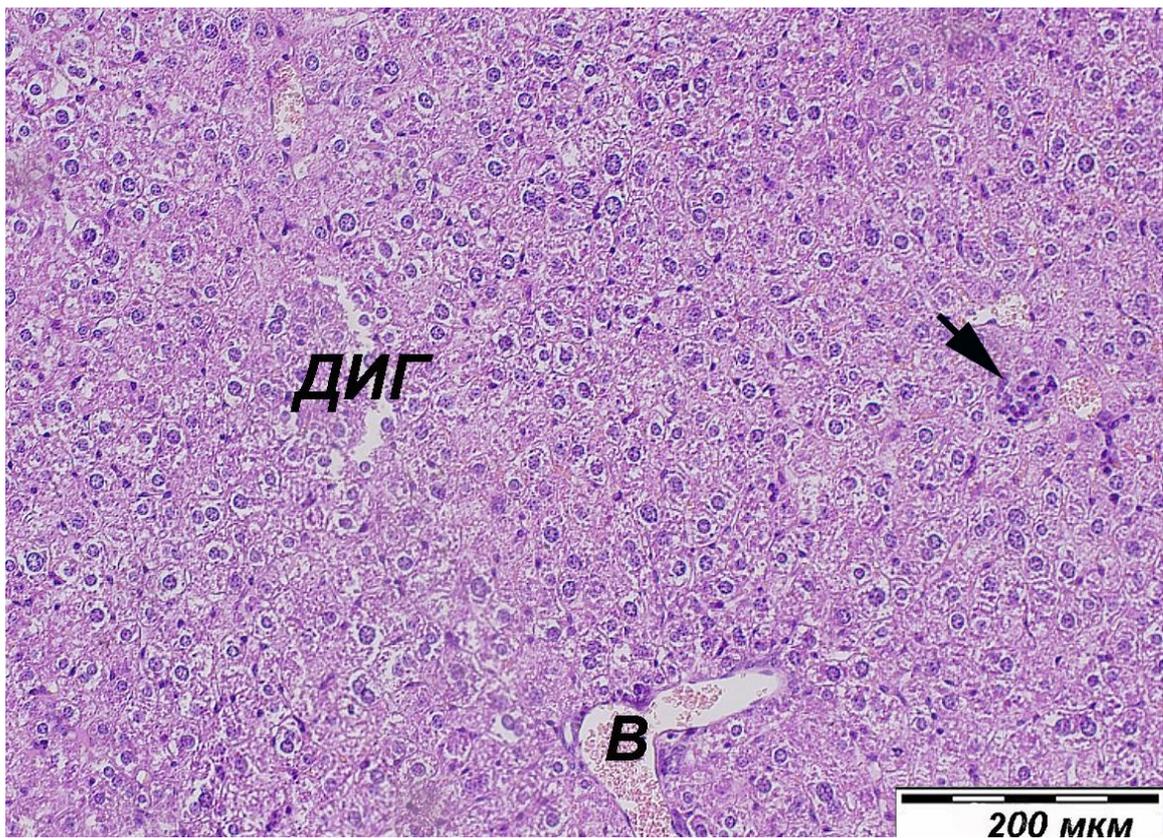


Рисунок 33. – Печень мыши из группы «миелома+ЦФ». Ткань печени с дистрофически измененными гепатоцитами (ДИГ), полнокровием сосудов (В) и очаговыми лимфоидными скоплениями (стрелка). Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 200$.

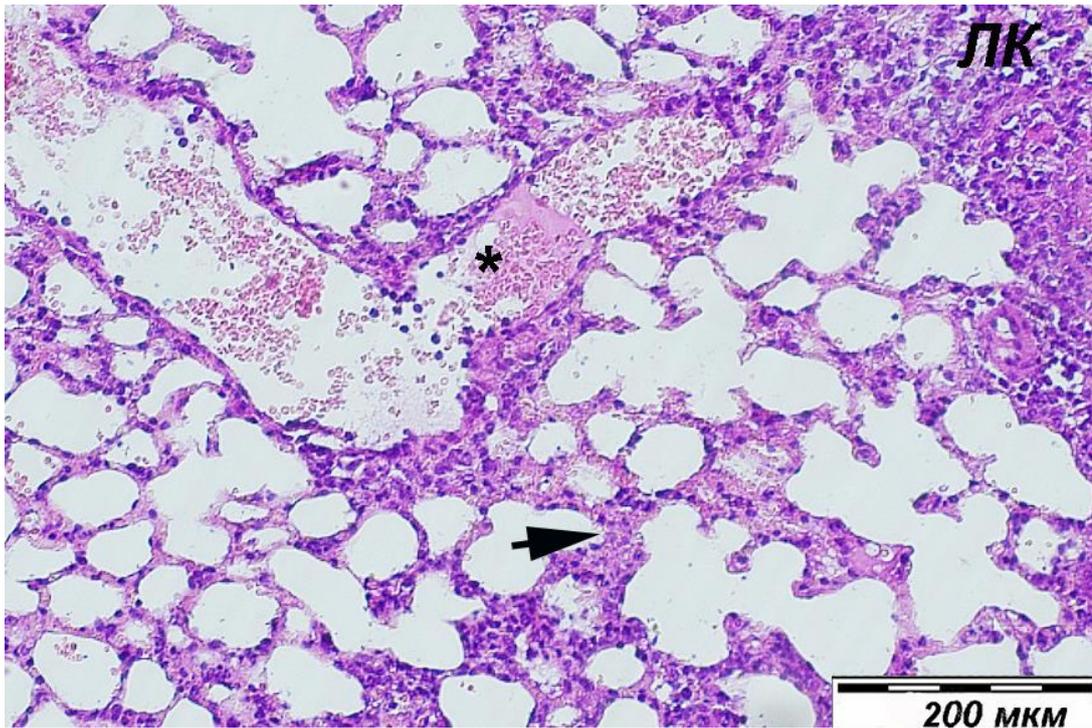


Рисунок 34. – Легкое мыши из группы «миелома+ЦФ». Скопление лимфоидных клеток (ЛК) в респираторном отделе, межальвеолярные перегородки утолщены (стрелка), сосуды полнокровны (*). Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 200$.

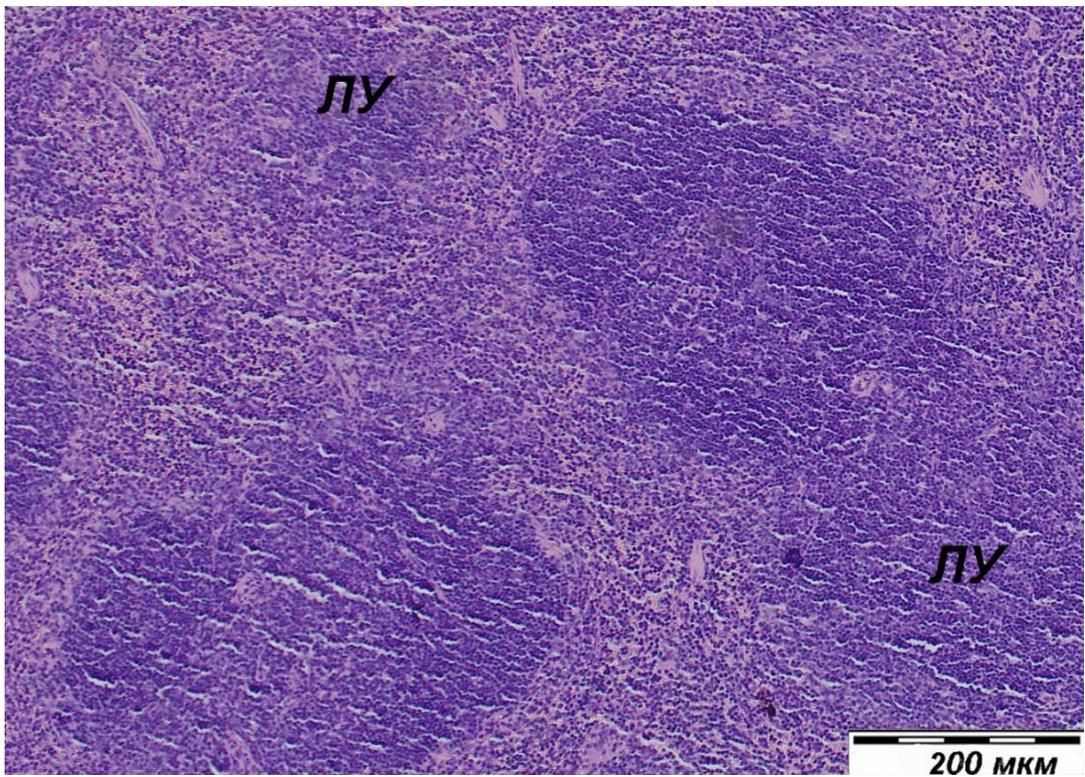
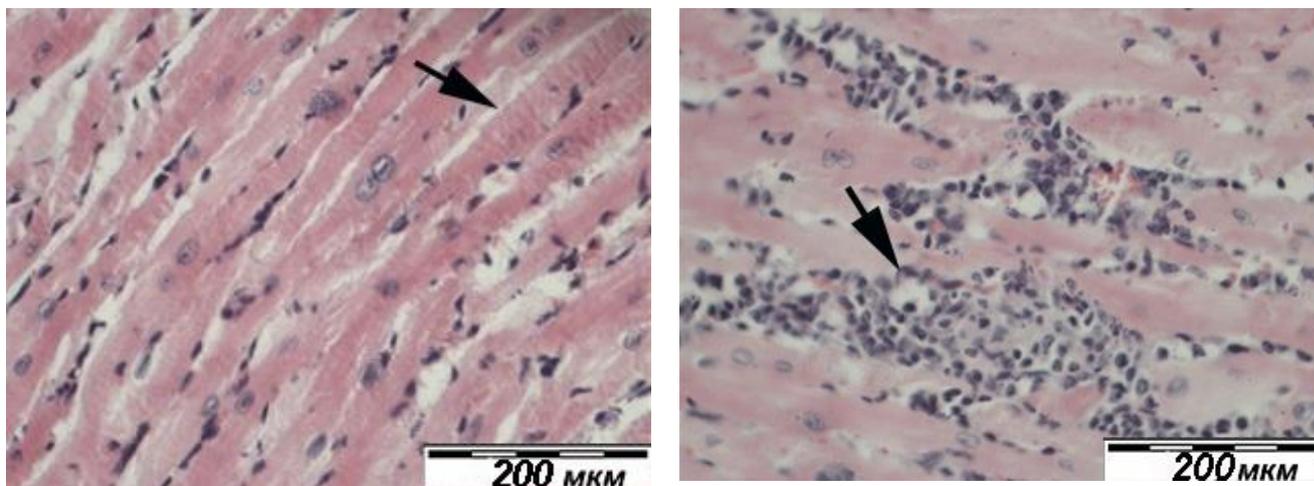


Рисунок 35. – Селезенка мыши из группы «миелома+ЦФ». Лимфоидные узелки (ЛУ) теряют зональность. Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 200$.

В легких наблюдается скопление лимфоидных клеток и утолщение межальвеолярных перегородок, аналогичные группе без лечения (рис. 34). Лимфоидные узелки селезенки утрачивают свою зональность, имеют нечеткие границы, в части отмечается выраженная реактивная фолликулярная гиперплазия (рис. 35).

В миокарде также отмечаются существенные морфологические изменения. Наряду с визуально интактными участками, выявляются очаговые повреждения миокарда. В этих зонах контуры кардиомиоцитов нечеткие, ядра утрачивают ядрышки, саркоплазма клеток окрашена неравномерно, что отражает развитие дистрофии (рис. 36 А). Поперечная исчерченность миофибрилл выражена слабо, местами отсутствует, возле поврежденных кардиомиоцитов формируются скопления лимфоидных элементов, при этом возле некротизированных клеток выявляются единичные инфильтраты (рис. 36 Б).



А.

Б.

Рисунок 36. – Миокард мышей из группы «миелома+ЦФ». А – Миокард, состоящий из кардиомиоцитов с признаками очаговых поражений (стрелка). Б – Скопление лимфоидных клеток между кардиомиоцитами (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х 400.

В брюшной полости мышей групп 4-6 с индуцированной миеломой после терапии предложенным автором способом («миелома+MnGl», «миелома+CuGl»,

«миелома+ZnGl») макроскопически не визуализируются опухолевые образования, в полости брюшины серозная, изредка слегка мутная выпотная жидкость. В спайках и уплотненных производных брюшины, в области брыжеек, инфильтрированных клеточными элементами крови и соединительной ткани, нет характерных ячеистых структур и скоплений полиморфных и гиперхромных опухолевых клеток.

Морфологическое исследование гистологических срезов тканей органов мышей из **4 опытной группы** с индуцированной миеломой после терапии глюконатом марганца («миелома+MnGl») существенных изменений в органах по сравнению с контрольной группой интактных животных не выявило. В ткани печени определяется очаговое полнокровие центральных венул (рис. 37).

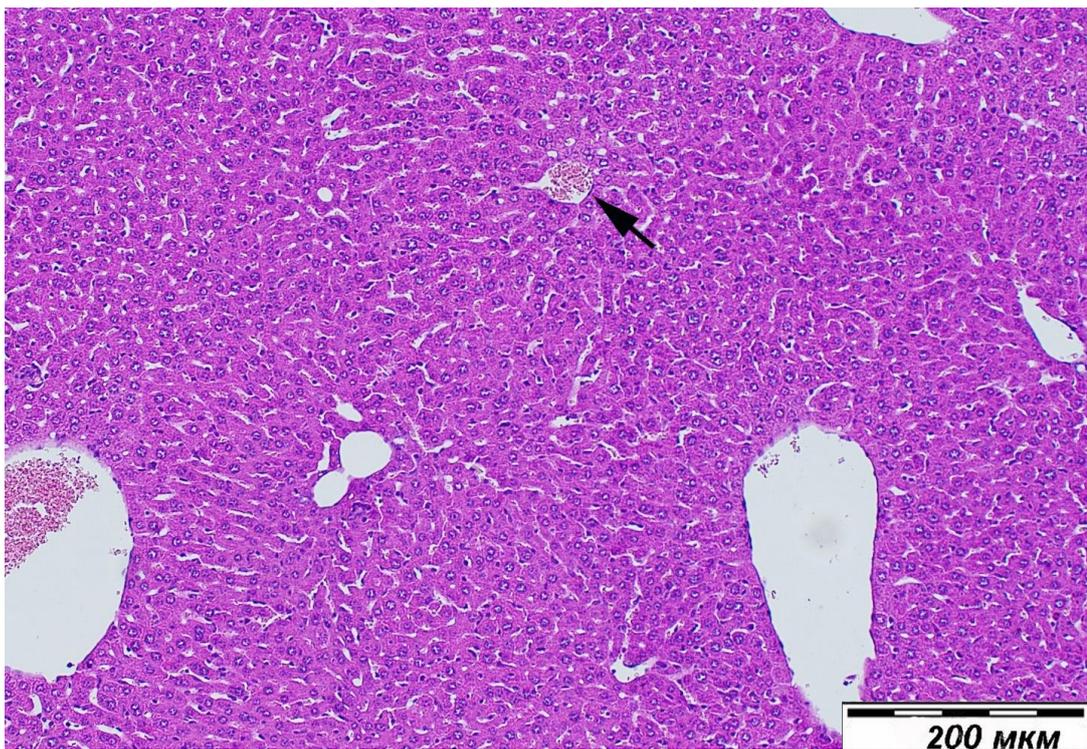


Рисунок 37. – Фрагмент печени мыши из группы «миелома+MnGl». Строение долек и структура балок не нарушены. Отмечается очаговая гиперемия центральных венул (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x 200.

В ткани легких также не выявлено значимых изменений: бронхи и бронхиолы выстланы реснитчатым псевдомногослойным цилиндрическим эпителием, стенки

альвеол тонкие, формируют ячеистую сеть, отмечается очаговое полнокровие сосудов, однако изменений со стороны сосудистой стенки не выявлено (рис. 38).

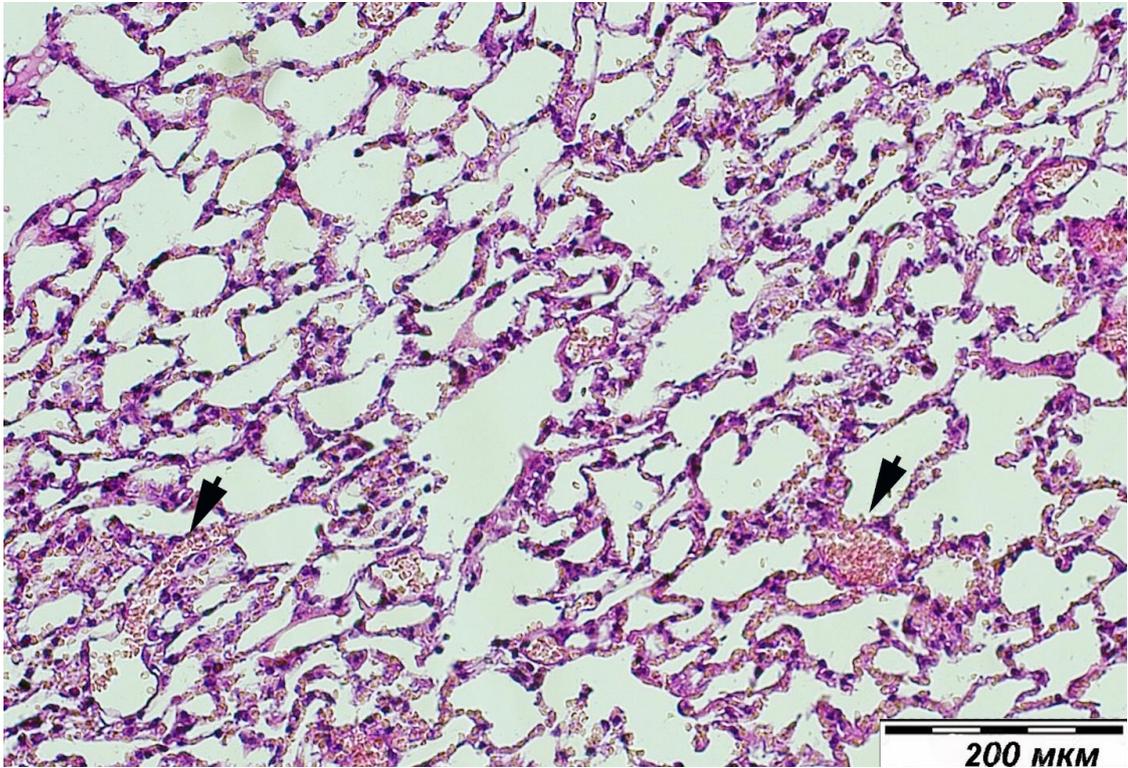


Рисунок 38. – Легкое мыши из группы «миелома+MnGl». Стенки альвеол тонкие, формируют ячеистую сеть, отмечается очаговое полнокровие сосудов (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x 200.

В ткани почек также отмечается полнокровие неизмененных сосудов, эпителий канальцев представлен типичными крупными клетками с широкой эознофильной цитоплазмой (проксимальные канальцы) и небольшими клетками со скудной цитоплазмой и базофильными ядрами (дистальные сегменты нефрона), отмечается очаговая гиперемия капилляров клубочков (рис. 39).

Ткань селезенки имеет четкую дифференцировку на белую и красную пульпу. В-лимфоцитарные фолликулы белой пульпы характеризуются четкой зональностью и ровными границами. Красная пульпа определяется как ретикулярная сеть капилляров, венозных синусов и тяжей (рис. 40).

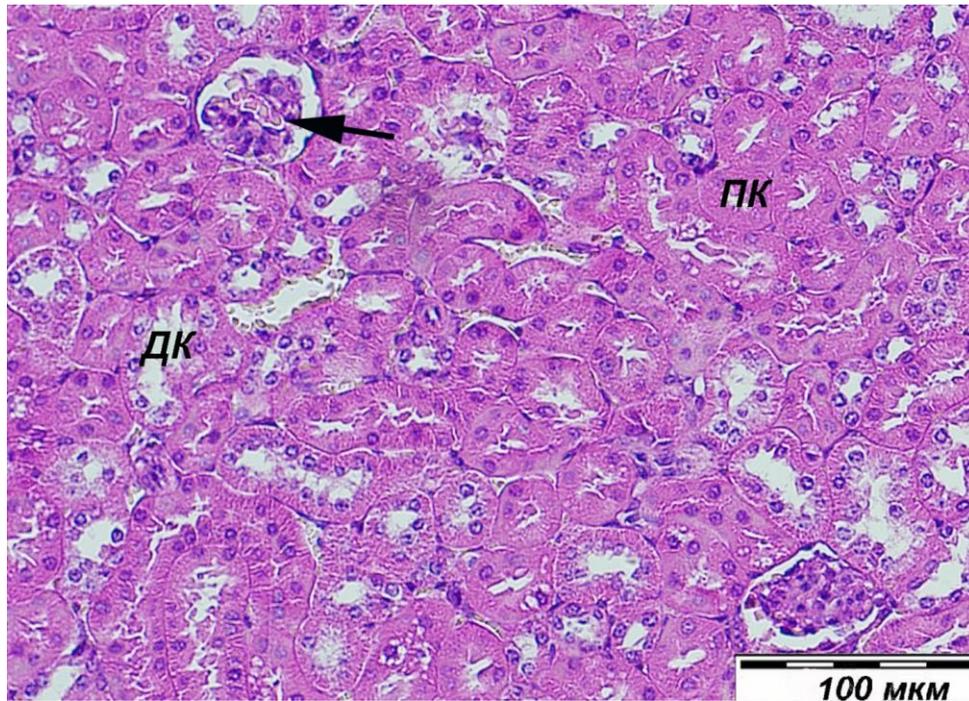


Рисунок 39. – Кортикальное вещество почки мыши из группы «миелома+MnGl». Проксимальные каналцы (ПК) и дистальные каналцы (ДК) имеют типичное строение. Капилляры клубочков гиперемированы (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х 400.

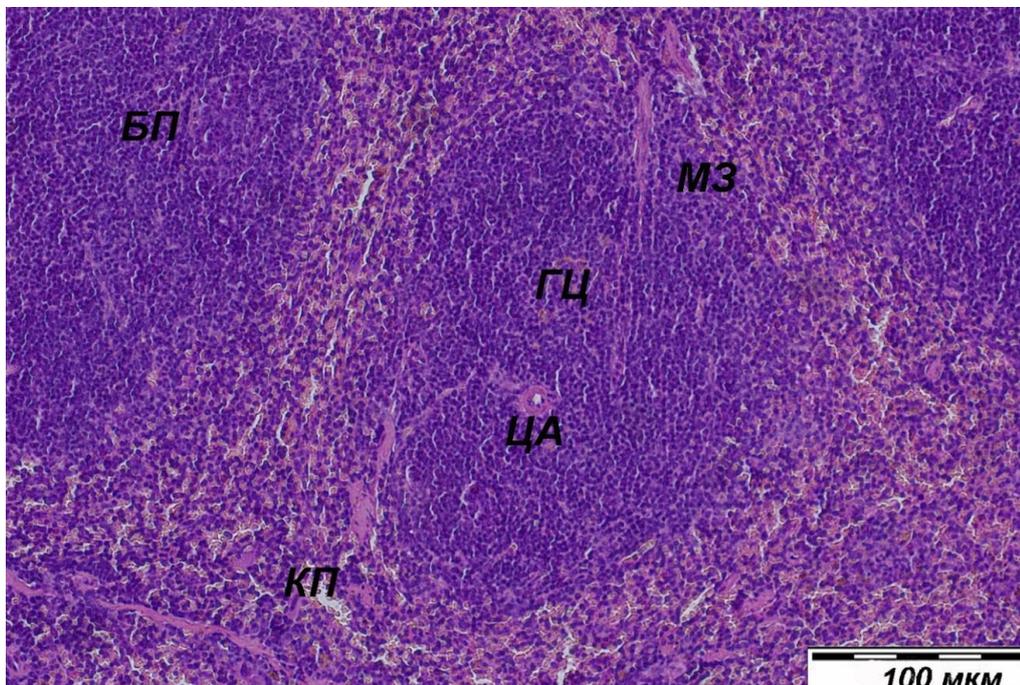


Рисунок 40. – Селезенка мыши из группы «миелома+MnGl». Белая пульпа (БП) представлена лимфоидными узелками с центральными артериолами (ЦА) и четко выраженными герминативным центром (ГЦ) и маргинальной зоной (МЗ). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х 400.

Ткань миокарда представлена кардиомиоцитами веретеновидной формы с центрально расположенными овальными ядрами и везикулярным хроматином. Дистрофических изменений тканей сердца не выявлено (рис. 41).

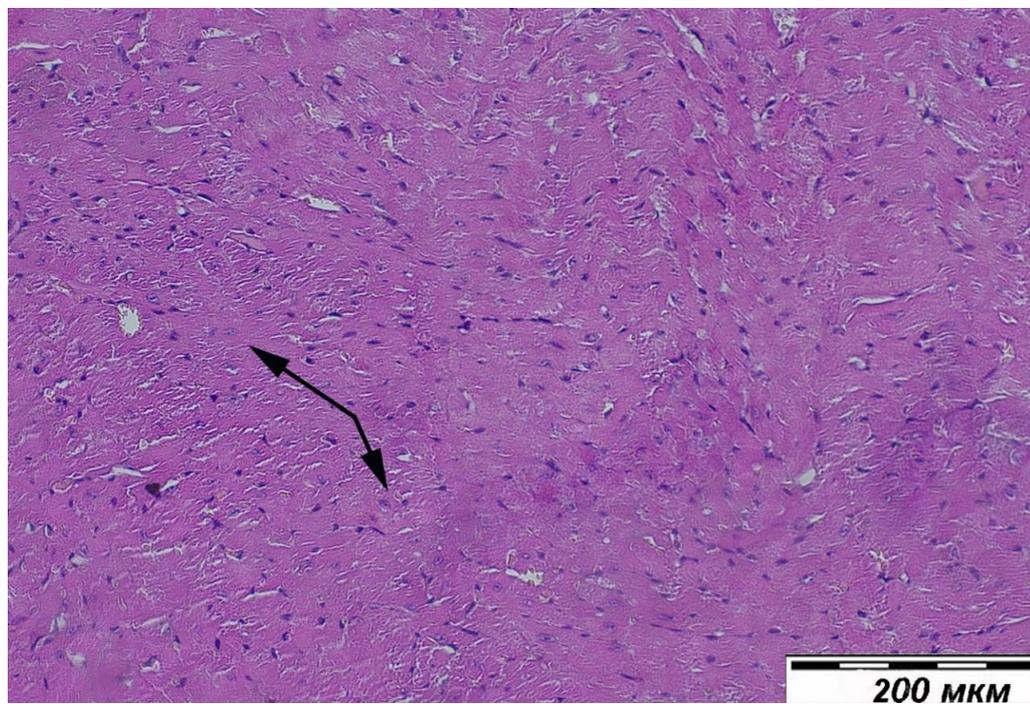


Рисунок 41. – Миокард мыши из группы «миелома+MnGl». Кардиомиоциты (стрелки) без патологии. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х 200.

Исследование гистологических срезов тканей органов мышей из **5 опытной группы** с индуцированной миеломой после курса терапии глюконатом меди («миелома+CuGl») показало, что исследуемые фрагменты тканей органов: печени (рис. 42), легкого (рис. 43), почки (рис. 44), селезенки (рис. 45) и сердца (рис. 46) существенных структурных изменений не имеют. Структура паренхимы и стромы органов схожа с аналогичными элементами контрольной группы. Также нет существенных отличий гистологического строения от тканей органов мышей группы 4.

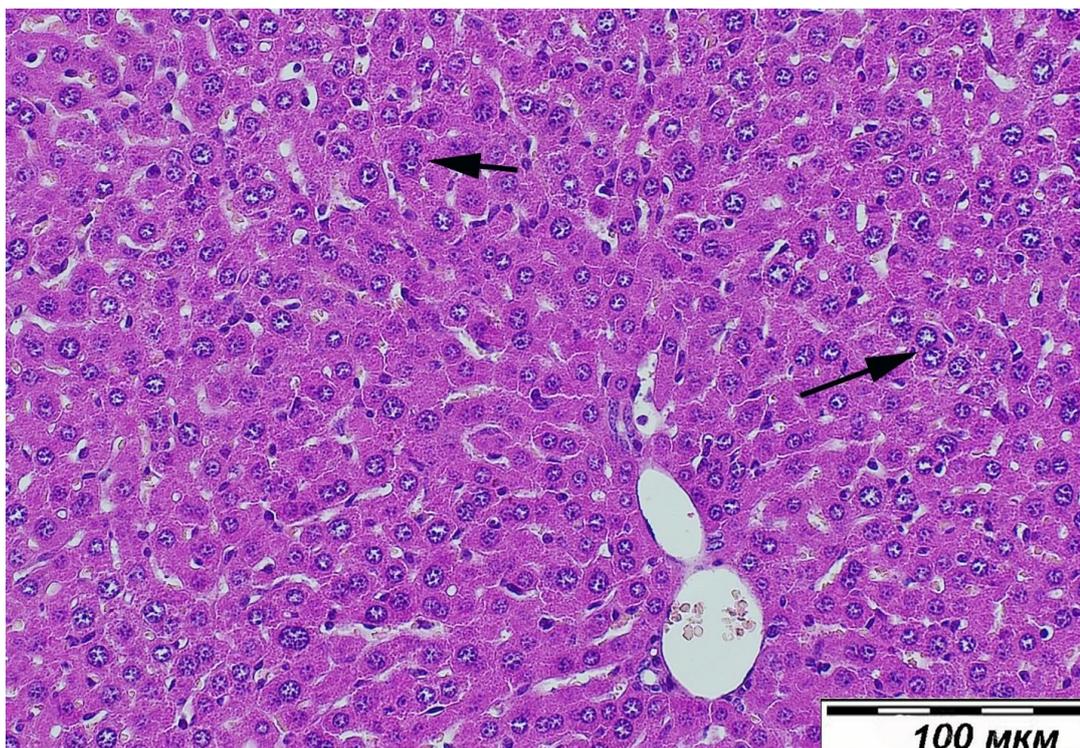


Рисунок 42. – Печень мыши из группы «миелома+CuGl». Структура дольки сохранна. Гепатоциты без признаков дистрофии. Встречаются единичные клетки с двумя ядрами (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х 400.

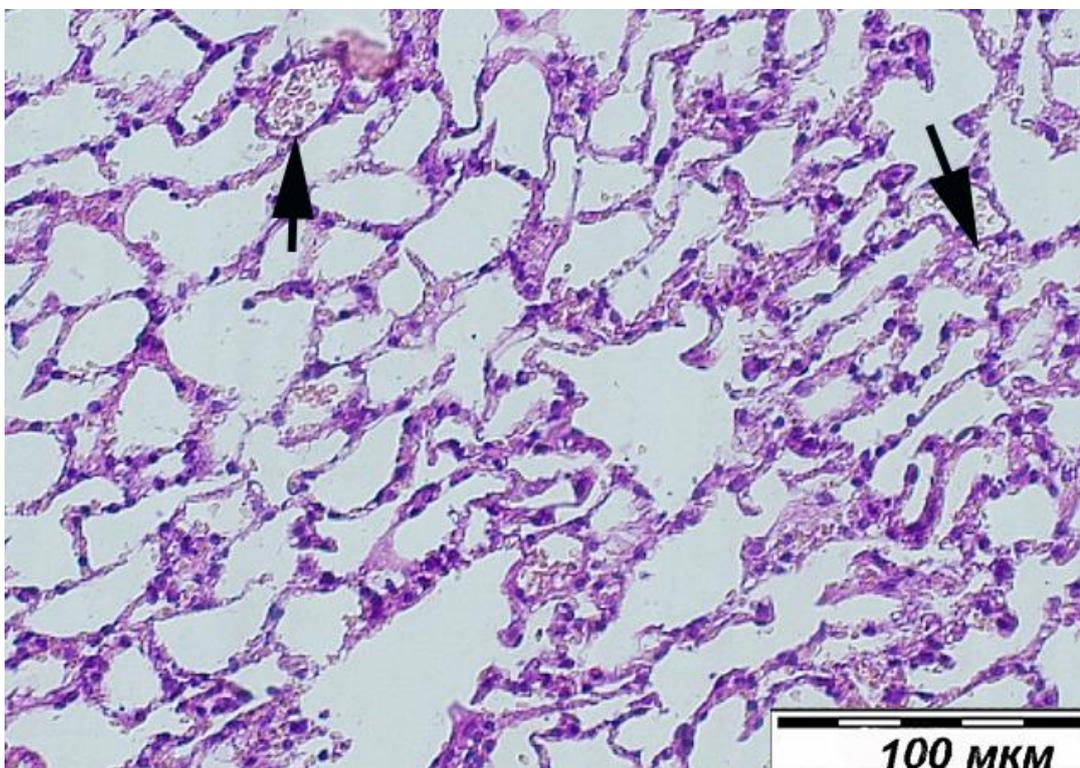


Рисунок 43. – Ткань легкого мыши из группы «миелома+CuGl» с гиперемией капилляров межальвеолярных перегородок (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. ×400.

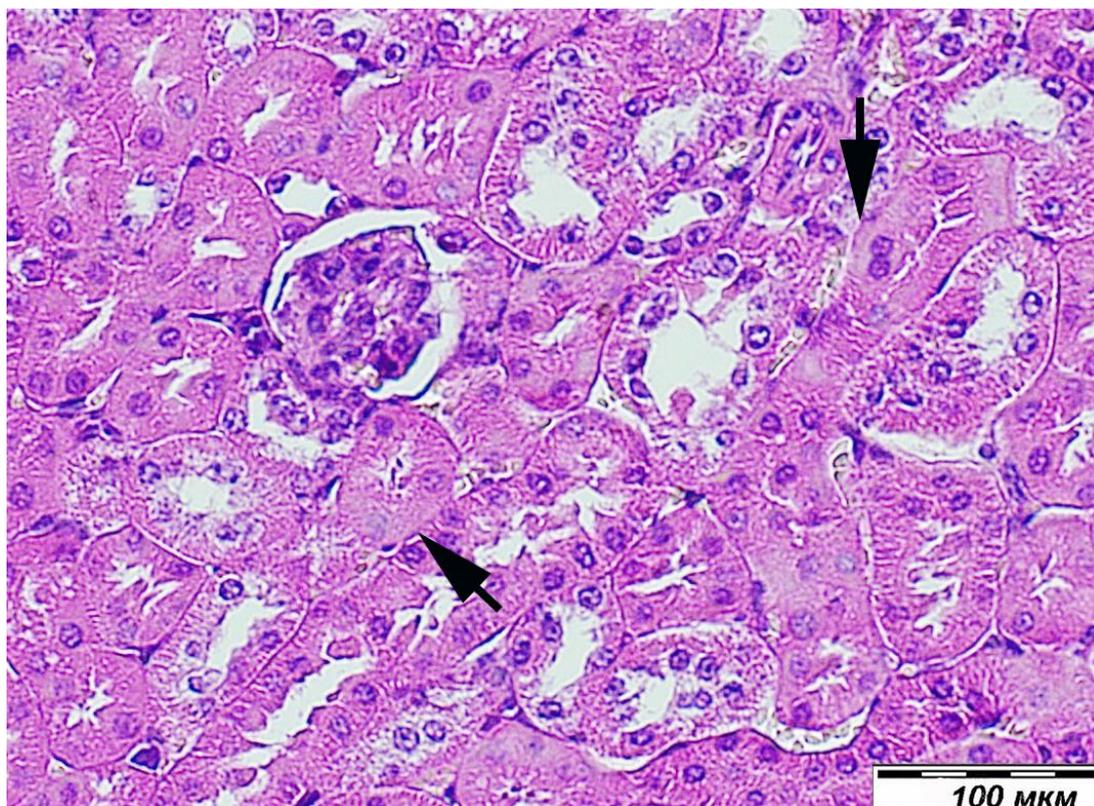


Рисунок 44. – Ткань почки мыши из группы «миелома+CuGI» с набуханием эпителиоцитов канальцев (стрелка). Гематоксилин и эозин. Ув. $\times 400$.

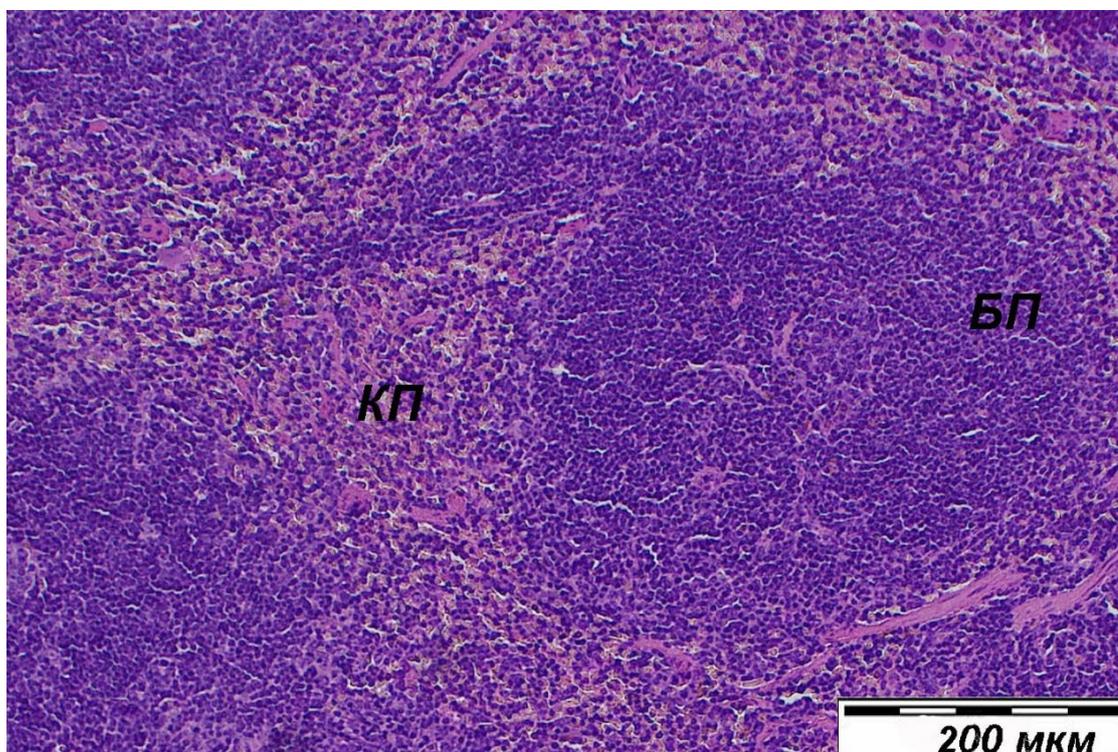


Рисунок 45. – Селезёнка из группы «миелома+CuGI» с сохранной дифференцировкой белой (БП) и красной (КП) пульпы. Окраска гематоксилином и эозином Ув. $\times 200$.

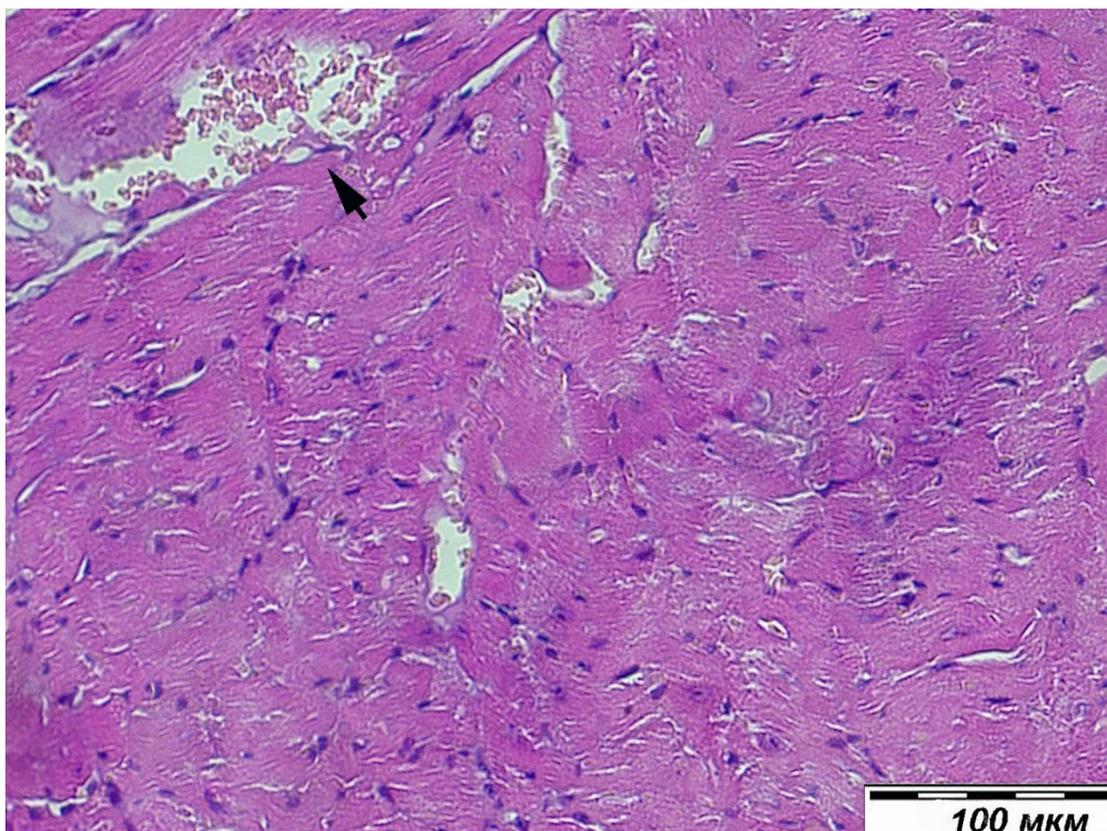


Рисунок 46. – Ткань миокарда мыши из группы «миелома+CuGI» с полнокровием капилляров (стрелка). Гематоксилин и эозин. Ув. $\times 400$.

Исследование гистологических срезов тканей органов мышей из **6 опытной группы** с индуцированной миеломой после курса терапии глюконатом цинка («миелома+ZnGI») также показало, что исследуемые фрагменты тканей органов: печени (рис. 47), легкого (рис. 48), почки (рис.49), селезенки (рис. 50) и сердца (рис. 51) по сравнению с контрольной группой интактных животных значимых изменений не имеют. Опухолевых образований в этих группах животных не выявлено.

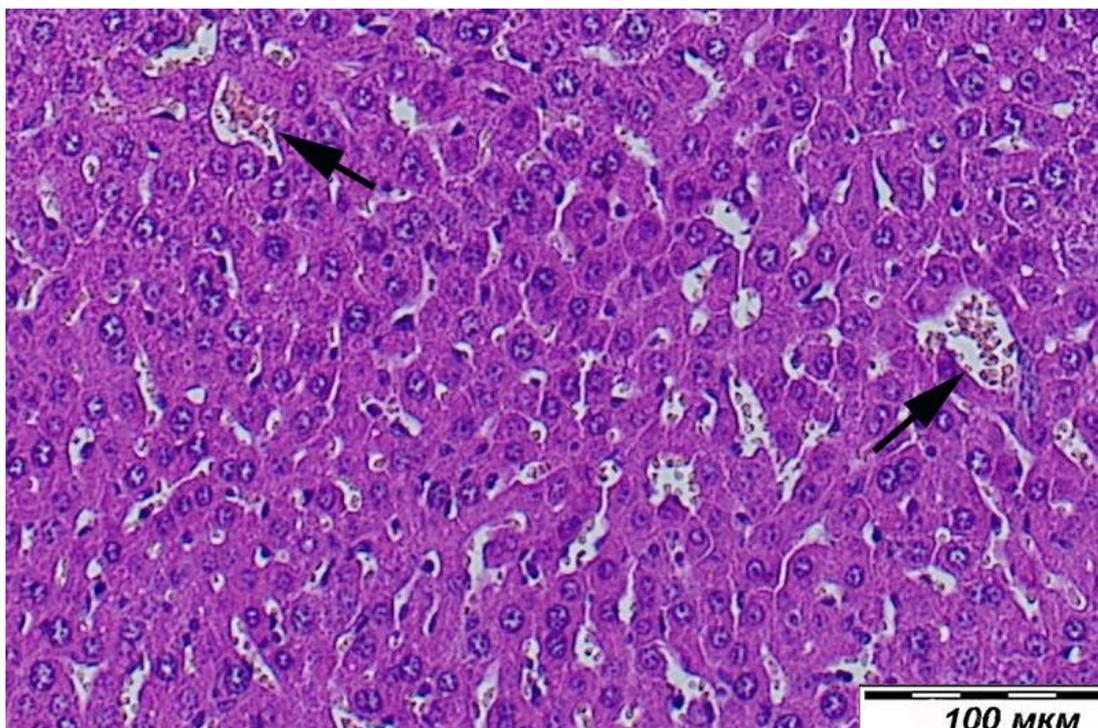


Рисунок 47. – Ткань печени мыши из группы «миелома+ZnGl» с полнокровием сосудов (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$.

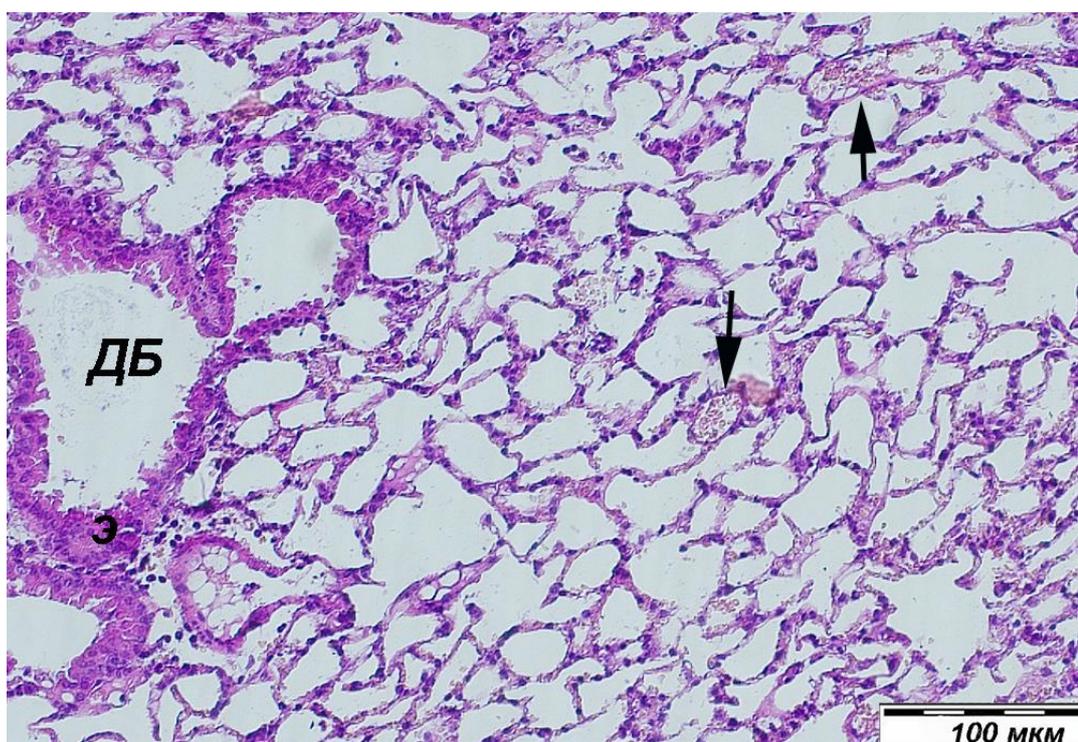


Рисунок 48. – Ткань легких мыши из группы «миелома+ZnGl» с гиперемией капилляров межальвеолярных перегородок (стрелка). Эпителий (э) дольковых бронхов (ДБ) и стенок альвеол не изменен. Окраска гематоксилином и эозином Ув. $\times 400$.

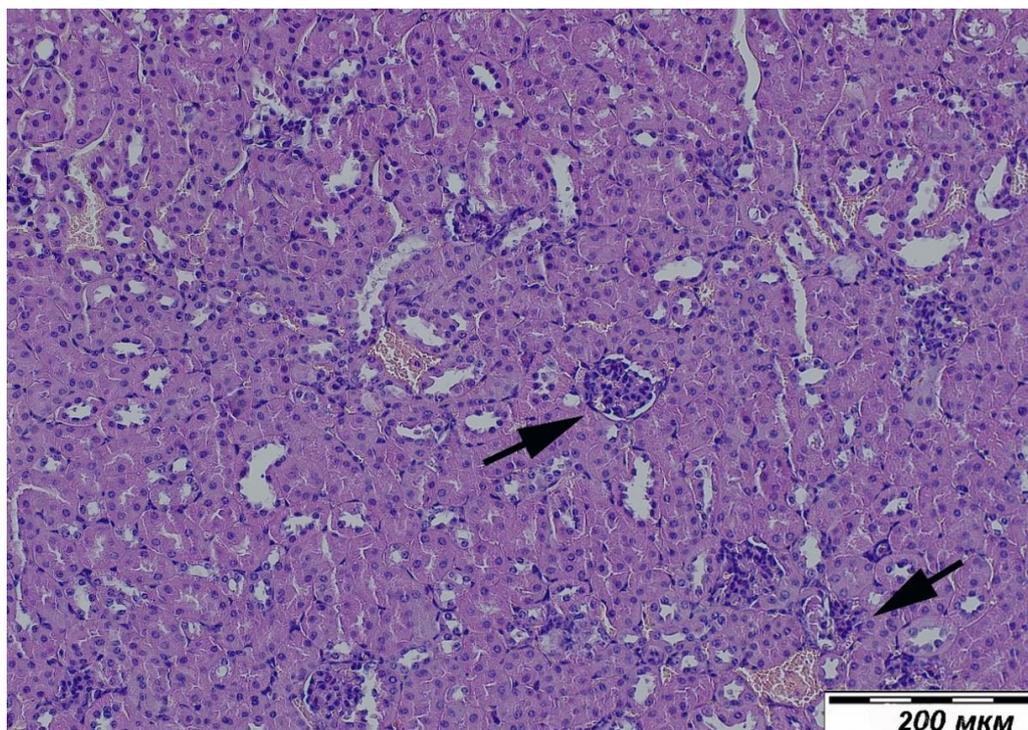


Рисунок 49. – Ткань почки мыши из группы «миелома+ZnGl» с очаговой гиперемией капилляров клубочков (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином Ув. $\times 200$.

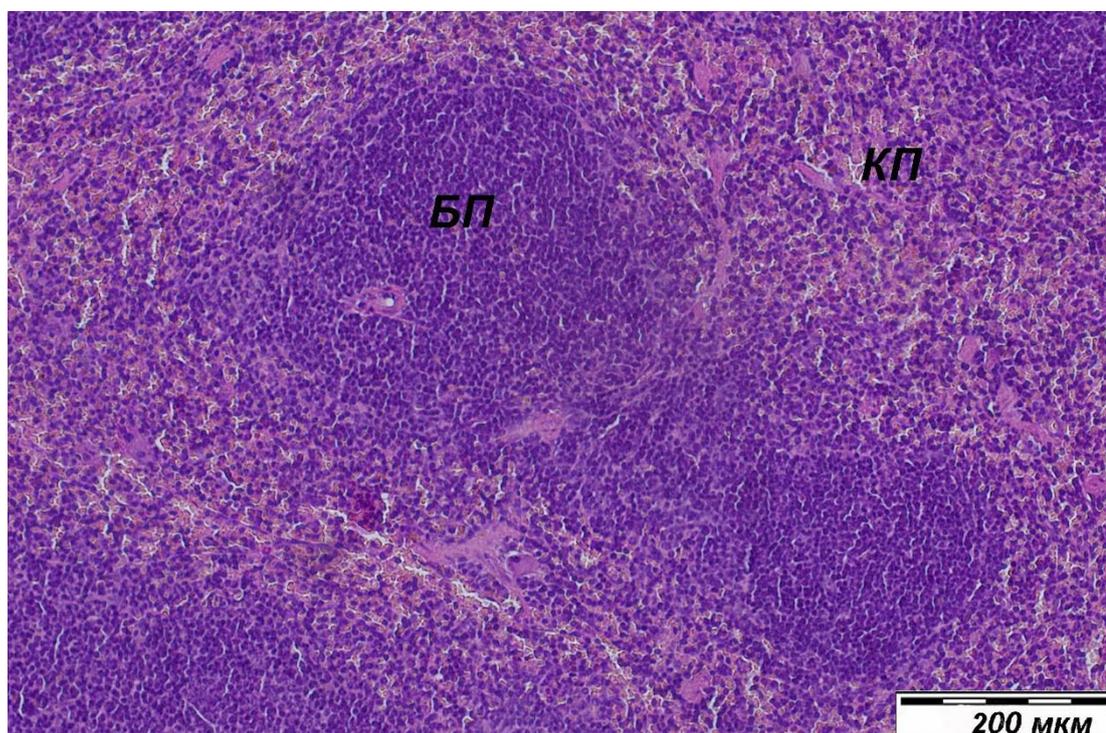


Рисунок 50. – Селезёнка мыши из группы «миелома+ZnGl» типичного гистологического строения, дифференцировка на красную пульпу (КП) и белую (БП) сохранена. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$.

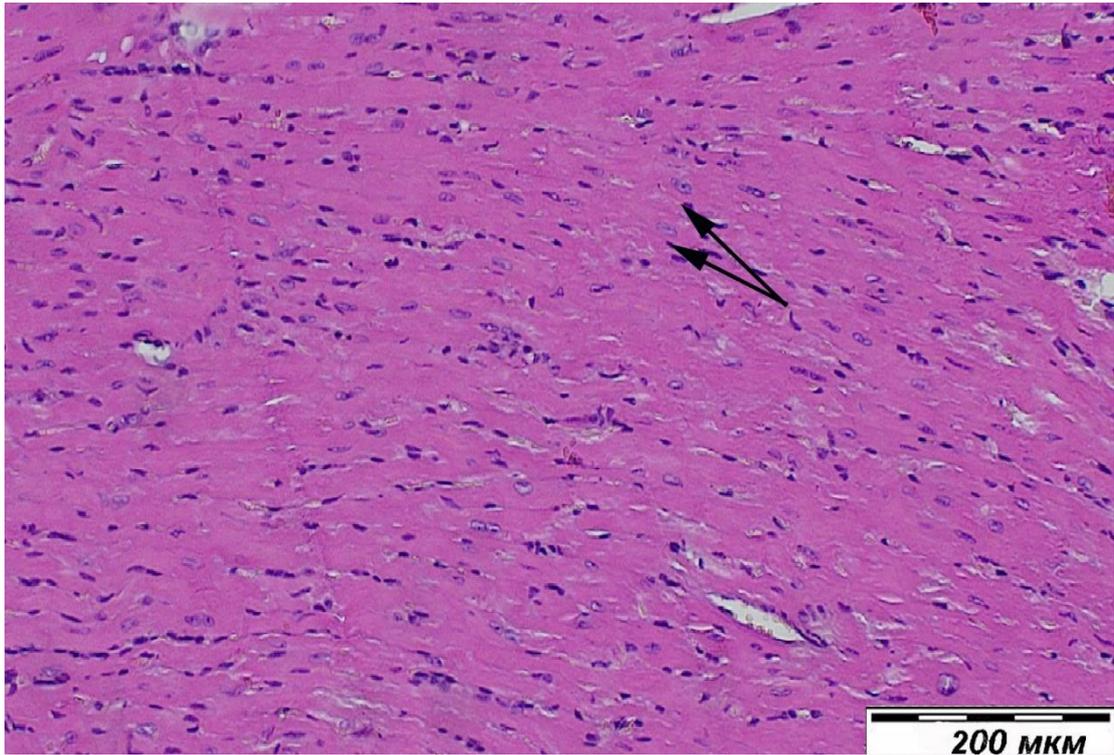


Рисунок 51. – Сердце мыши из группы «миелома+ZnGl». Кардиомиоциты веретеновидной формы, со светлыми овальными ядрами (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$.

Таким образом, проведенное морфологическое исследование свидетельствует о том, что клетки миеломы Sp2/0 Ag14, введенные в брюшную полость, разрастаются путем инфильтрации вокруг кровеносных сосудов брыжейки. Инфильтрация трансформированных клеток может быть диффузной или очаговой. Можно допустить, что формируется хронический лимфоцитарный лейкоз (миеломная болезнь). Миеломные клетки в брюшной полости формируют узловатую опухоль размером $1,0 \times 1,4$ см, связанную с брыжейкой кишки. При этом опухоль имеет округлую форму, собственную брыжейку с кровоснабжением. Все опухолевые образования стандартного размера. В гистологических препаратах определяется дольчатое строение, все перегородки опухоли инфильтрированы лимфоидными клетками различной толщины и конфигурации. В местах контакта ячеек определяются большого размера лимфоидные клетки, ядра которых имеют признаки митоза. Внутри опухоли обнаруживается выраженная сеть сосудистых

структур, заполненных кровью, что указывает на активное кровоснабжение. Можно допустить, что это новая разновидность опухоли миеломной ткани.

В заключение следует отметить, что на 22 сутки после инъекции мышам BALB/c клеток миеломы Sp2/0 Ag14 опухолевые образования выявлены в группах «миелома без лечения» и «миелома+ЦФ», тогда как в группах «миелома+MnGl», «миелома+CuGl» и «миелома+ZnGl» животные солидных опухолей не имеют. Т.е. исследуемые глюконаты металлов ингибируют развитие индуцированной миеломы. Механизм их действия, вероятно, связан с иммуномодулирующими свойствами, препятствующими формированию опухолевой ниши с толерантным к опухоли микроокружением. Поскольку эти свойства у мышей на фоне индуцированной миеломы не исследовались, а также, учитывая то, что центральная роль в противоопухолевом ответе отводится клеточному иммунитету, то на следующем этапе необходимо было оценить влияние глюконатов 3d-металлов (марганца, меди и цинка), проявивших в наибольшей степени иммуностимулирующие свойства, на фагоцитарную активность и другие неспецифические реакции.

3.4. Оценка влияния глюконатов марганца, меди и цинка на поглотительную и метаболическую активность нейтрофилов периферической крови мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14.

Цель данного этапа исследования – оценка влияния глюконатов марганца, меди и цинка на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14 и взаимосвязь с прогрессированием опухоли.

Эксперимент проводили в течение трех недель в 6 экспериментальных группах животных: №1 – интактные, №№ 2-6 – мыши с индуцированной миеломой; №2 – без лечения; №3 группа – введение циклофосфамида (препарата сравнения), №4 группа – введение глюконата марганца; №5 – введение глюконата меди, №6 – введение глюконата цинка.

Поглотительную активность нейтрофилов оценивали по следующим показателям: фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ) и интегральный фагоцитарный индекс (ИФИ). Метаболическую активность клеток оценивали по показателям НСТ-теста в двух вариантах: спонтанном (сп НСТ) и стимулированном латексом (ст НСТ), а также по среднему цитохимическому коэффициенту – спонтанному и стимулированному (сп СЦК / ст СЦК) и индексу стимуляции (ИС) (Виксман М.Е., 1979; Князева О.А., Киреева Е.А., 2022в).

При неопластических процессах функциональная активность нейтрофилов может быть снижена (Алексеев Н.А. 2002). В согласии с этими данными результаты наших исследований, представленные в таблице 7 и продемонстрированные для наглядности в процентах (рис. 52-54), показали, что в крови мышей с индуцированной миеломой без лечения (группа № 2) наблюдалось снижение поглотительной активности нейтрофилов по сравнению с контрольной группой интактных животных (группа № 1): показатель ФЧ снижался на 51,2%, ФИ – на 51,5%, ИФИ – на 63,2% ($p < 0,05$).

Наблюдалось также снижение показателей метаболической активности: сп НСТ и ст НСТ снижались на 41,7% и 61,6%; сп СЦК и ст СЦК – на 42,9% и 66,7%;

ИС – на 28% ($p < 0,05$).

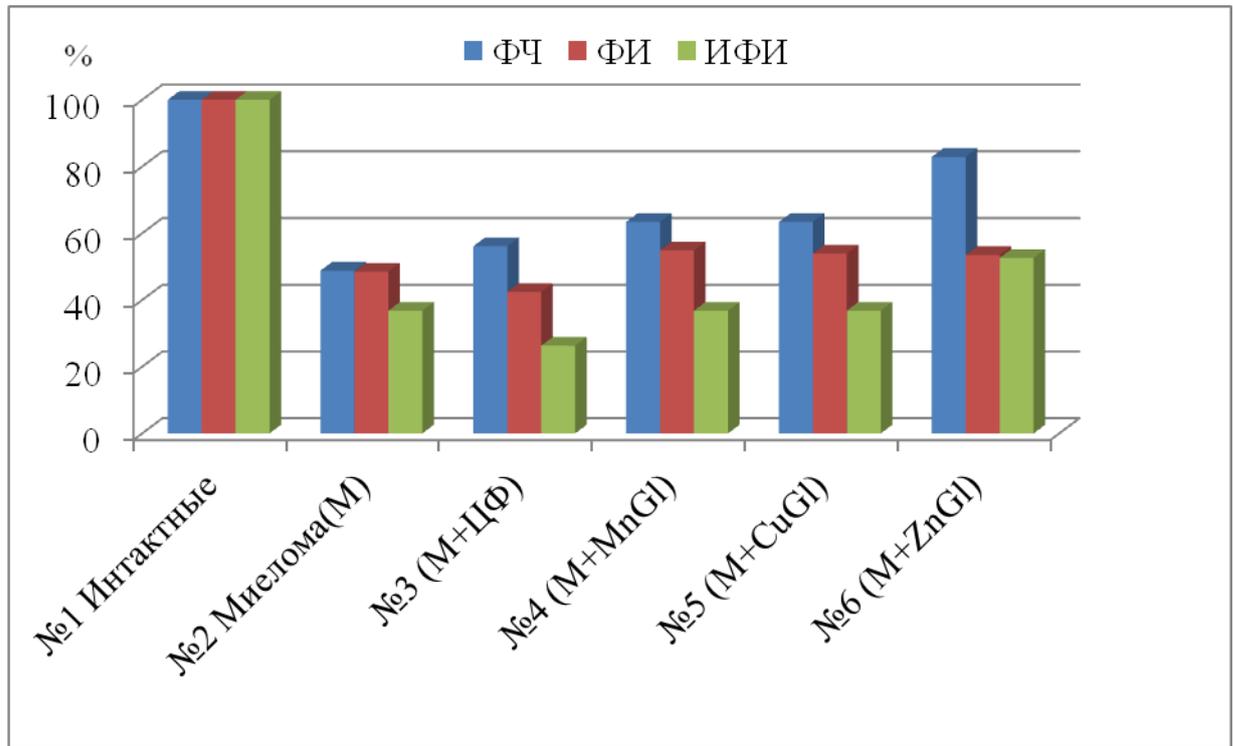


Рисунок 52. – Влияние глюконатов 3d-металлов (3dMGI) и циклофосфида (ЦФ) на поглотительную активность нейтрофилов (ФЧ, ФИ, ИФИ) у мышей BALB/c с индуцированной миеломой (М) в сравнении с контрольными группами (№1 и №2).

Примечание. Отличия статистически значимы: ФЧ – [$p_{1-(2-5)}$, $p_{2-(4-6)}$, $p_{3-(4-6)}$; p_{4-6} ; p_{5-6}] $< 0,05$; ФИ – [$p_{1-(2-6)}$, $p_{3-(4-6)}$] $< 0,05$; ИФИ – [$p_{1-(2-6)}$, p_{2-3} , p_{2-6} , $p_{3-(4-6)}$; p_{4-6} ; p_{5-6}] $< 0,05$

В группе сравнения, в которой мыши получали циклофосфамид (группа № 3), снижались показатели как поглотительной активности нейтрофилов: ФЧ – на 43,9%, ФИ – на 57,6%, ИФИ – на 73,7%, так и метаболической активности: сп НСТ и ст НСТ – на 38,9% и 45,1%; сп СЦК и ст СЦК – на 28,6% и 52,4%; ИС – на 24%, относительно группы № 1 ($p < 0,05$). По сравнению с группой № 2 поглотительная активность тоже несколько снижалась, в особенности, ИФИ – на 10,5%, а метаболическая активность, напротив, повышалась: ст НСТ – на 16,5%, сп СЦК и ст СЦК – на 14,3% ($p < 0,05$).

Влияние глюконатов 3d-металлов на поглотительную и метаболическую активность фагоцитов крови мышей с индуцированной миеломой (ИМ) в сравнении с цитостатиком циклофосфамидом (ЦФ)

Статист. показатель	Группы мышей					
	№1 (n=10)	№2 (n=10)	№3 (n=10)	№4 (n=10)	№5 (n=10)	№6 (n=10)
	Интактные- контроль	ИМ- контроль	ИМ+ ЦФ	ИМ+ MnGl	ИМ+ CuGl	ИМ+ ZnGl
Фагоцитарное число (ФЧ)						
M±m	3,8±0,3	1,9±0,2	2,2±0,2	2,6± 0,2	2,6 ±0,2	3,5±0,28
Me	4,1	2,0	2,3	2,6	2,6	3,4
[Q ₁ -Q ₃]	[3,5-4,3]	[1,7-2,2]	[1,9-2,4]	[2,4-2,9]	[2,4-2,9]	[3,2-3,6]
p-знач.	p ₁₋₂ <0,001	p ₁₋₂ <0,001	p ₁₋₃ <0,001	p ₁₋₄ <0,001	p ₁₋₅ <0,001	p ₁₋₆ =0,08
	p ₁₋₃ <0,001	p ₂₋₃ =0,06	p ₂₋₃ =0,06	p ₂₋₄ =0,001	p ₂₋₅ =0,001	p ₂₋₆ <0,001
	p ₁₋₄ <0,001	p ₂₋₄ =0,001	p ₃₋₄ =0,03	p ₃₋₄ =0,03	p ₃₋₅ =0,01	p ₃₋₆ <0,001
	p ₁₋₅ <0,001	p ₂₋₅ =0,001	p ₃₋₅ =0,01	p ₄₋₅ =0,44	p ₄₋₅ =0,44	p ₄₋₆ <0,001
	p ₁₋₆ =0,08	p ₂₋₆ <0,001	p ₃₋₆ <0,001	p ₄₋₆ <0,001	p ₅₋₆ <0,001	p ₅₋₆ <0,001

Фагоцитарный индекс (ФИ), %						
M±m	50,0±4	24,0±1,9	21,0±1,7	28,0±2,2	27,0±2,1	27,0±2,1
Me	49,5	24,0	21,0	27,2	26,7	26,5
[Q ₁ -Q ₃]	[43,8-54,0]	[22,1-27,7]	[19,0-23,2]	[25,8-31,3]	[24,1-29,5]	[23,3-30,3]
p-знач	p ₁₋₂ <0,001	p ₁₋₂ <0,001	p ₁₋₃ <0,001	p ₁₋₄ <0,001	p ₁₋₅ <0,001	p ₁₋₆ <0,001
	p ₁₋₃ <0,001	p ₂₋₃ =0,11	p ₂₋₃ =0,11	p ₂₋₄ =0,08	p ₂₋₅ =0,11	p ₂₋₆ =0,10
	p ₁₋₄ <0,001	p ₂₋₄ =0,08	p ₃₋₄ =0,002	p ₃₋₄ =0,002	p ₃₋₅ =0,005	p ₃₋₆ =0,007
	p ₁₋₅ <0,001	p ₂₋₅ =0,11	p ₃₋₅ =0,005	p ₄₋₅ =0,36	p ₄₋₅ =0,36	p ₄₋₆ =0,45
	p ₁₋₆ <0,001	p ₂₋₆ =0,10	p ₃₋₆ =0,007	p ₄₋₆ =0,45	p ₅₋₆ =0,47	p ₅₋₆ =0,47
Интегральный фагоцитирующий индекс (ИФИ), %						
M±m	1,9±0,15	0,67±0,05	0,46±0,04	0,73±0,06	0,7±0,05	0,95±0,07
Me	1,9	0,7	0,5	0,7	0,7	0,97
[Q ₁ -Q ₃]	[1,75-2,12]	[0,62-0,75]	[0,40-0,54]	[0,67-0,82]	[0,63-0,76]	[0,88-1,03]
p-знач	p ₁₋₂ <0,001	p ₁₋₂ <0,001	p ₁₋₃ <0,001	p ₁₋₄ <0,001	p ₁₋₅ <0,001	p ₁₋₆ <0,001
	p ₁₋₃ <0,001	p ₂₋₃ <0,001	p ₂₋₃ <0,001	p ₂₋₄ =0,26	p ₂₋₅ =0,27	p ₂₋₆ =0,001
	p ₁₋₄ <0,001	p ₂₋₄ =0,26	p ₃₋₄ <0,001	p ₃₋₄ <0,001	p ₃₋₅ =0,001	p ₃₋₆ <0,001
	p ₁₋₅ <0,001	p ₂₋₅ =0,27	p ₃₋₅ =0,001	p ₄₋₅ =0,34	p ₄₋₅ =0,34	p ₄₋₆ =0,002
	p ₁₋₆ <0,001	p ₂₋₆ =0,001	p ₃₋₆ <0,001	p ₄₋₆ =0,002	p ₅₋₆ =0,002	p ₅₋₆ =0,002

Спонтанный НСТ-тест (сп НСТ), %						
M±m	7,0±0,56	4,0±0,32	4,6±0,4	7,0±0,56	5,0±0,4	6,0±0,48
Me	7,2	4,2	4,4	7,2	5,0	6,0
[Q ₁ -Q ₃]	[6,4-8]	[3,3-4,4]	[4,1-5,1]	[6,52-7,56]	[4,5-5,6]	[5,52-6,74]
p-знач	p ₁₋₂ <0,001	p ₁₋₂ <0,001	p ₁₋₃ <0,001	p ₁₋₄ =0,41	p ₁₋₅ =0,001	p ₁₋₆ =0,05
	p ₁₋₃ <0,001	p ₂₋₃ =0,11	p ₂₋₃ =0,11	p ₂₋₄ <0,001	p ₂₋₅ =0,005	p ₂₋₆ =0,002
	p ₁₋₄ =0,41	p ₂₋₄ <0,001	p ₃₋₄ <0,001	p ₃₋₄ <0,001	p ₃₋₅ =0,26	p ₃₋₆ =0,008
	p ₁₋₅ =0,001	p ₂₋₅ =0,005	p ₃₋₅ =0,26	p ₄₋₅ =0,002	p ₄₋₅ =0,002	p ₄₋₆ =0,03
	p ₁₋₆ =0,05	p ₂₋₆ =0,002	p ₃₋₆ =0,008	p ₄₋₆ =0,03	p ₅₋₆ =0,02	p ₅₋₆ =0,02
Стимулированный НСТ-тест (ст НСТ), %						
M±m	51,0±4,0	20,0±1,6	27,0±2,1	48,0±3,8	37,0±2,9	43,0 ±3,4
Me	52,1	20,0	28,6	48,1	36,6	42,6
[Q ₁ -Q ₃]	[48,4-56]	[18,4-22,04]	[22,8-30]	[42,6-52]	[32,03-40]	[37,2-47]
p-знач	p ₁₋₂ <0,001	p ₁₋₂ <0,001	p ₁₋₃ <0,001	p ₁₋₄ =0,11	p ₁₋₅ =0,001	p ₁₋₆ =0,03
	p ₁₋₃ <0,001	p ₂₋₃ =0,001	p ₂₋₃ =0,001	p ₂₋₄ <0,001	p ₂₋₅ <0,001	p ₂₋₆ <0,001
	p ₁₋₄ =0,11	p ₂₋₄ <0,001	p ₃₋₄ <0,001	p ₃₋₄ <0,001	p ₃₋₅ <0,001	p ₃₋₆ <0,001
	p ₁₋₅ =0,001	p ₂₋₅ <0,001	p ₃₋₅ <0,001	p ₄₋₅ =0,004	p ₄₋₅ =0,004	p ₄₋₆ =0,13
	p ₁₋₆ =0,03	p ₂₋₆ =0,001	p ₃₋₆ <0,001	p ₄₋₆ =0,13	p ₅₋₆ =0,06	p ₅₋₆ =0,06

Средний цитохимический коэффициент в спонтанном тесте (сп СЦК), у.е.						
M±m	0,08±0,01	0,04±0,003	0,05±0,004	0,08±0,005	0,06±0,01	0,07±0,005
Me	0,07	0,04	0,05	0,08	0,06	0,07
[Q ₁ -Q ₃]	[0,07-0,09]	[0,04-0,04]	[0,04-0,05]	[0,08-0,09]	[0,05-0,08]	[0,06-0,07]
p-знач	p ₁₋₂ <0,001	p ₁₋₂ <0,001	p ₁₋₃ =0,002	p ₁₋₄ =0,24	p ₁₋₅ =0,12	p ₁₋₆ =0,36
	p ₁₋₃ =0,002	p ₂₋₃ =0,05	p ₂₋₃ =0,05	p ₂₋₄ <0,001	p ₂₋₅ =0,002	p ₂₋₆ =0,001
	p ₁₋₄ =0,24	p ₂₋₄ <0,001	p ₃₋₄ <0,001	p ₃₋₄ <0,001	p ₃₋₅ =0,02	p ₃₋₆ =0,001
	p ₁₋₅ =0,12	p ₂₋₅ =0,002	p ₃₋₅ =0,02	p ₄₋₅ =0,006	p ₄₋₅ =0,006	p ₄₋₆ =0,01
	p ₁₋₆ =0,36	p ₂₋₆ =0,001	p ₃₋₆ =0,001	p ₄₋₆ =0,01	p ₅₋₆ =0,15	p ₅₋₆ =0,15
Средний цитохимический коэффициент в стимулированном тесте (ст СЦК), у.е.						
M±m	0,21±0,01	0,07±0,01	0,095±0,01	0,19±0,02	0,14±0,01	0,18±0,01
Me	0,21	0,07	0,10	0,20	0,15	0,17
[Q ₁ -Q ₃]	[0,20-0,22]	[0,05-0,08]	[0,08-0,10]	[0,17-0,22]	[0,12-0,17]	[0,16-0,18]
p-знач	p ₁₋₂ <0,001	p ₁₋₂ <0,001	p ₁₋₃ <0,001	p ₁₋₄ =0,32	p ₁₋₅ <0,001	p ₁₋₆ =0,009
	p ₁₋₃ <0,001	p ₂₋₃ =0,01	p ₂₋₃ =0,01	p ₂₋₄ <0,001	p ₂₋₅ <0,001	p ₂₋₆ <0,001
	p ₁₋₄ =0,32	p ₂₋₄ <0,001	p ₃₋₄ <0,001	p ₃₋₄ <0,001	p ₃₋₅ <0,001	p ₃₋₆ <0,001
	p ₁₋₅ <0,001	p ₂₋₅ <0,001	p ₃₋₅ <0,001	p ₄₋₅ =0,006	p ₄₋₅ =0,006	p ₄₋₆ =0,21
	p ₁₋₆ =0,009	p ₂₋₆ <0,001	p ₃₋₆ <0,001	p ₄₋₆ =0,21	p ₅₋₆ =0,34	p ₅₋₆ =0,34

Индекс стимуляции (ИС), у.е.						
M±m	2,5±0,2	1,7±0,1	1,9±0,2	2,4±0,2	2,3±0,2	2,4±0,2
Me	2,5	1,8	1,9	2,4	2,3	2,5
[Q ₁ -Q ₃]	[2,3-2,7]	[1,6-1,8]	[1,7-2,2]	[2,2-2,7]	[2,0-2,5]	[2,2-2,6]
p-знач	p ₁₋₂ =0,001	p ₁₋₂ =0,001	p ₁₋₃ =0,007	p ₁₋₄ =0,58	p ₁₋₅ =0,24	p ₁₋₆ =0,70
	p ₁₋₃ =0,007	p ₂₋₃ =0,08	p ₂₋₃ =0,08	p ₂₋₄ =0,001	p ₂₋₅ =0,002	p ₂₋₆ <0,001
	p ₁₋₄ =0,58	p ₂₋₄ =0,001	p ₃₋₄ =0,03	p ₃₋₄ =0,03	p ₃₋₅ =0,07	p ₃₋₆ =0,02
	p ₁₋₅ =0,24	p ₂₋₅ =0,002	p ₃₋₅ =0,07	p ₄₋₅ =0,59	p ₄₋₅ =0,59	p ₄₋₆ =0,84
	p ₁₋₆ =0,70	p ₂₋₆ <0,001	p ₃₋₆ =0,02	p ₄₋₆ =0,84	p ₅₋₆ =0,58	p ₅₋₆ =0,58

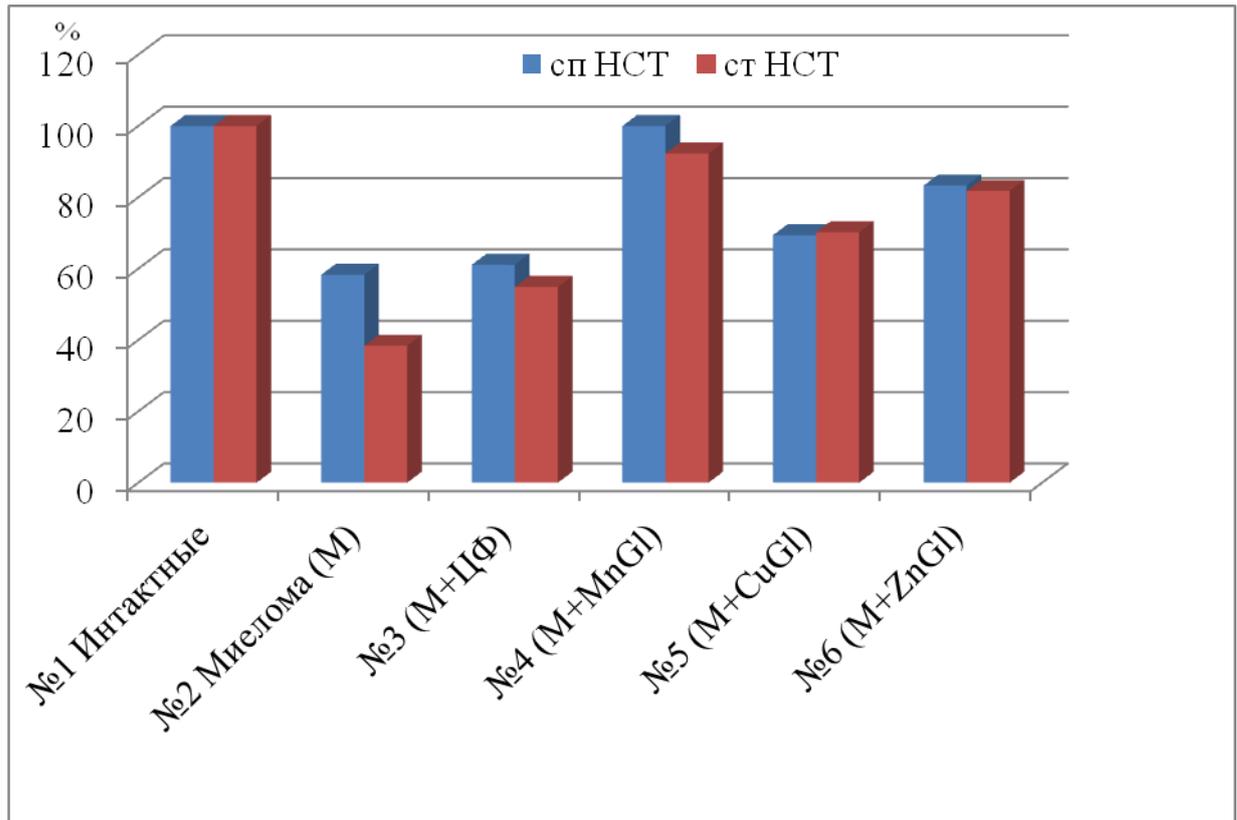


Рисунок 53. – Влияние глюконатов 3d-металлов (3dMGI) и циклофосфида (ЦФ) на метаболическую активность нейтрофилов (сп НСТ и ст НСТ) у мышей BALB/c с индуцированной миеломой (М) в сравнении с контрольными группами (№1 и №2).

Примечание. Отличия статистически значимы: сп НСТ – $[p_{1-(2-6)}, p_{2-(4-6)}] < 0,05$; ст НСТ – $[p_{1-(2-6)}, p_{2-(3-6)}] < 0,05$

После применения глюконатов 3d-металлов наблюдалось увеличение показателей поглотительной активности. Так после терапии глюконатом цинка по сравнению с группой № 2 ФЧ увеличивался на 34,1%, ИФИ – на 15,8% ($p < 0,05$).

По сравнению с группой № 3 показатель ФЧ возрастал на 26,8%, ФИ – на 11,1%, ИФИ – на 26,3% ($p < 0,05$). Метаболическая активность возрастала после применения всех глюконатов, в особенности, после терапии глюконатом марганца, достигая уровня интактных животных: по сравнению с группой № 2 на 41,7% (сп НСТ), 53,9% (ст НСТ), 57,2% (сп СЦК), 61,9% (ст СЦК), 24% (ИС) ($p < 0,05$); по сравнению с группой № 3 – 38,9% (сп НСТ), 37,4% (ст НСТ), 42,9% (сп СЦК), 47,6%

(ст СЦК) и 20% (ИС) ($p < 0,05$).

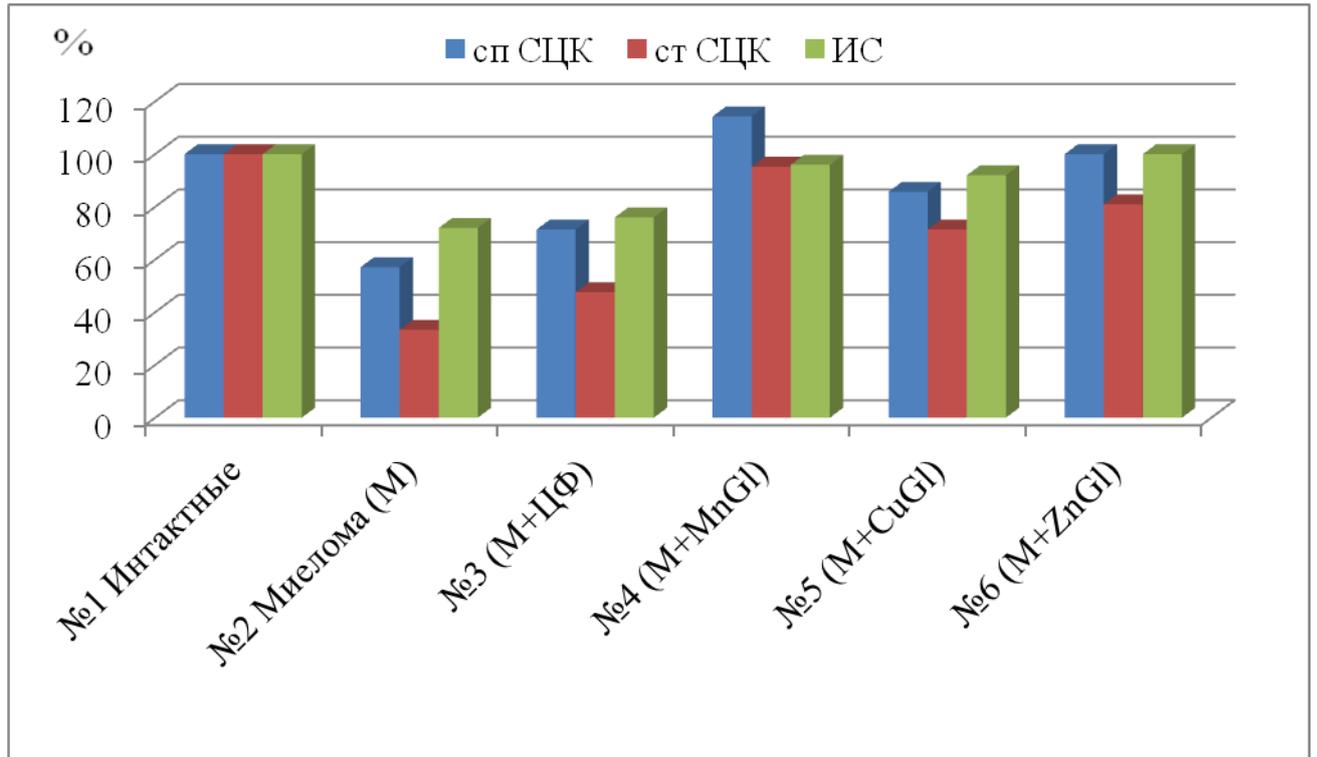


Рисунок 54. – Влияние глюконатов 3d-металлов (3dMGl) и циклофосфида (ЦФ) на показатели интенсивности метаболических и биоэнергетических процессов нейтрофилов сп СЦК, ст СЦК, ИС) у мышей BALB/c с индуцированной миеломой (М) в сравнении с контрольными группами (№1 и №2).

Примечание. Отличия статистически значимы: сп СЦК – [$p_{1-(2-3)}$, $p_{2-(3-6)}$, $p_{3-(4-6)}$; $p_{4-(5-6)}$] $< 0,05$; ст СЦК – [$p_{1-(2-3, 5-6)}$, $p_{2-(3-6)}$, $p_{3-(4-6)}$, p_{4-5}] $< 0,05$; ИС – [$p_{1-(2-3)}$, $p_{2-(4-6)}$, $p_{3-(4, 6)}$] $< 0,05$

Таким образом, по оценке эффективности воздействия на поглотительную и метаболическую активность нейтрофилов у мышей с индуцированной миеломой ведущее положение принадлежит глюконату марганца. Далее следуют глюконат цинка и глюконат меди.

Поскольку марганец играет важную роль не только в работе иммунной системы, но положительно влияет и на нервную систему (Syrovaya A.O. et al., 2017; Нотова С.В. и др, 2020), то на следующем этапе работы необходимо было оценить влияние глюконата марганца на поведенческие реакции мышей BALB/c с

индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14.

Анализ взаимосвязей между показателями фагоцитарной активности нейтрофилов и прогрессирования миеломы

Для выяснения возможного механизма действия глюконатов 3d-металлов на индуцированную мышиную миелому Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c был проведен корреляционный анализ Спирмена между показателями фагоцитарной активности нейтрофилов и прогрессирования опухоли.

Ранее с помощью корреляционного анализа было показано, что в основе механизмов иммунокорригирующего действия глюконатов 3d-металлов при иммунодефицитном состоянии лежит их способность восстанавливать окислительный и иммунный гомеостаз (Уразаева С.И., Князева О.А., 2018; Князева О.А. и др., 2021; 2021), а также индуцировать синтез антител и цитокинов (Князева О.А. и др., 2018; 2018). В эксперименте на мышах BALB/c с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14, которым проводилось ингаляционное введение эфирных масел лаванды и шалфея, было доказано наличие тесной корреляционной связи между показателями прогрессирования миеломы Sp 2/0 Ag14 (объем асцитической жидкости и прирост массы тела) и показателями нейроиммуноэндокринной («степень депрессии», уровень иммуноглобулинов G, C3(H₂O), кортизола) и про-антиоксидантной систем (уровень малонового диальдегида, карбонилированных белков, показатели активности активность антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза и глутатионтрансферазы) (Князева О.А. и др., 2018).

В наших исследованиях (табл. 8) корреляционная зависимость выявлена между снижением показателя стимулированного НСТ-теста и объемом асцита ($r_s=0,64$, $p=0,05$) в группе мышей с индуцированной миеломой без лечения, что свидетельствует об усилении злокачественного роста клеток при снижении активации НАДФН-оксидазных реакций, сопровождающихся образованием активных форм кислорода. Проведение курса терапии с применением препарата сравнения циклофосфида выявило также корреляционную связь между

снижением показателей ИФИ и приростом массы тела ($r_s=0,68$, $p=0,03$), что указывает на зависимость роста индуцированной миеломы от поглотительной активности нейтрофилов.

После курса терапии глюконатом марганца тесная корреляционная связь обнаружена между увеличением показателя стимулированного НСТ-теста и снижением обоих показателей прогрессирования индуцированной миеломы: ($r_s=0,65$, $p=0,04$; $r_s=0,61$, $p=0,05$). После терапии глюконатами меди и цинка корреляционная связь обнаружена между увеличением ФЧ и снижением объема асцита ($r_s=0,67$, $p=0,03$ и $r_s=0,68$, $p=0,03$ соответственно), а после введения глюконата меди между увеличением ФИ и снижением прироста массы тела ($r_s=0,67$, $p=0,03$), что доказывает наличие зависимости между этими факторами. Также умеренная корреляционная связь выявлена между увеличением показателя ст СЦК, отображающего активность энергетических ресурсов ферментных систем нейтрофилов и снижением прироста массы тела после терапии глюконатом цинка ($r_s=0,64$; $p=0,05$).

Таблица 8

Результаты корреляционного анализа показателей поглотительной и метаболической активности нейтрофилов с показателями прогрессирования индуцированной миеломы Sp 2/0 Ag14 у мышей BALB/c

Показатели фагоцитоза	Показатели прогрессирования миеломы	
	Прирост массы тела (ПМТ)	Увеличение объема асцита (УОА)
группа «контроль-миелома»		
ФЧ	$r_s= -0,32$ $p= 0,36$	$r_s= -0,01$ $p= 0,99$
ФИ	$r_s=0,33$ $p=0,35$	$r_s= -0,35$ $p= 0,33$

ИФИ	$r_s = 0,00$ $p = 1$	$r_s = -0,49$ $p = 0,15$
НСТсп	$r_s = -0,12$ $p = 0,75$	$r_s = -0,06$ $p = 0,85$
НСТст	$r_s = -0,06$ $p = 0,85$	<u>$r_s = 0,64$</u> <u>$p = 0,05$</u>
СЦКсп	$r_s = -0,09$ $p = 0,80$	$r_s = 0,15$ $p = 0,68$
СЦКст	$r_s = 0,47$ $p = 0,17$	$r_s = 0,30$ $p = 0,39$
ИС	$r_s = 0,54$ $p = 0,11$	$r_s = 0,12$ $p = 0,75$
группа «миелома+ циклофосфамид (М+ЦФ)		
ФЧ	$r_s = 0,48$ $p = 0,16$	$r_s = 0,04$ $p = 0,91$
ФИ	$r_s = 0,03$ $p = 0,93$	$r_s = 0,27$ $p = 0,45$
ИФИ	<u>$r_s = 0,68$</u> <u>$p = 0,03$</u>	$r_s = -0,35$ $p = 0,33$
НСТсп	$r_s = 0,46$ $p = 0,17$	$r_s = 0,26$ $p = 0,47$
НСТст	$r_s = -0,27$ $p = 0,45$	$r_s = -0,13$ $p = 0,73$
СЦКсп	$r_s = 0,13$ $p = 0,73$	$r_s = 0,05$ $p = 0,88$
СЦКст	$r_s = 0,13$ $p = 0,73$	$r_s = 0,44$ $p = 0,21$
ИС	$r_s = 0,07$ $p = 0,85$	$r_s = -0,01$ $p = 0,99$

група «миелома+ глюконат марганца» (M+MnGl)		
ФЧ	$r_s = 0,05$ $p = 0,88$	$r_s = 0,49$ $p = 0,15$
ФИ	$r_s = 0,08$ $p = 0,83$	$r_s = -0,13$ $p = 0,73$
ИФИ	$r_s = 0,36$ $p = 0,31$	$r_s = -0,12$ $p = 0,75$
НСТсп	$r_s = -0,14$ $p = 0,70$	$r_s = -0,22$ $p = 0,53$
НСТст	<u>$r_s = -0,65$</u> <u>$p = 0,04$</u>	<u>$r_s = -0,61$</u> <u>$p = 0,05$</u>
СЦКсп	$r_s = -0,27$ $p = 0,46$	$r_s = 0,42$ $p = 0,23$
СЦКст	$r_s = -0,06$ $p = 0,85$	$r_s = 0,30$ $p = 0,39$
ИС	$r_s = 0,12$ $p = 0,75$	$r_s = 0,45$ $p = 0,19$
група «миелома + глюконат меди» (M+ CuGl)		
ФЧ	$r_s = -0,52$ $p = 0,13$	<u>$r_s = 0,67$</u> <u>$p = 0,03$</u>
ФИ	<u>$r_s = -0,67$</u> <u>$p = 0,03$</u>	$r_s = 0,12$ $p = 0,75$
ИФИ	$r_s = 0,44$ $p = 0,20$	$r_s = -0,25$ $p = 0,49$
НСТсп	$r_s = -0,52$ $p = 0,12$	$r_s = 0,16$ $p = 0,66$
НСТст	$r_s = 0,13$ $p = 0,73$	$r_s = 0,55$ $p = 0,09$
СЦКсп	$r_s = 0,22$	$r_s = -0,30$

	p= 0,53	p= 0,39
СЦКст	r _s = 0,09 p= 0,79	r _s = -0,28 p= 0,43
ИС	r _s = 0,02 p= 0,95	r _s = 0,22 p= 0,53
группа «миелома+ глюконат цинка» (M + ZnGl)		
ФЧ	r _s = 0,22 p= 0,55	<u>r_s= 0,68</u> <u>p= 0,03</u>
ФИ	r _s = 0,14 p= 0,70	r _s = -0,18 p= 0,62
ИФИ	r _s = -0,16 p= 0,65	r _s = 0,13 p= 0,71
НСТсп	r _s =-0,09 p=0,80	r _s = 0,15 p= 0,68
НСТст	r _s =0,38 p= 0,28	r _s = 0,09 p= 0,80
СЦК сп	r _s = -0,27 p=0,46	r _s = -0,11 p= 0,76
СЦК ст	<u>r_s= -0,64</u> <u>p= 0,05</u>	r _s = 0,01 p= 0,97
ИС	r _s = 0,18 p= 0,63	r _s = -0,48 p= 0,89

Примечание: коэффициент Спирмена $r_s < 0,29$ - слабая корреляция, 0,30-0,69 – корреляция средней силы; $r > 0,70$ - сильная корреляция ($p < 0,05$)

В качестве одного из возможных механизмов противоопухолевого действия соединений 3d-металлов рассматривается их способность инициировать апоптоз (Gonzalez H. et al., 2018; Гук Д.А. и др. 2021; Rozenberg J.M. et al., 2022). Полученные нами результаты показали, что под действием глюконатов марганца, меди и цинка происходит увеличение фагоцитарной активности нейтрофилов.

Корреляция между этим фактором и снижением прогрессирования индуцированной миеломы, позволяет сделать предположение о механизме противоопухолевого действия исследуемых соединений металлов путем инициации апоптоза.

Таким образом, по результатам оценки воздействия глюконатов 3d-металлов на поглотительную и метаболическую активность нейтрофилов у мышей с индуцированной миеломой наибольшая эффективность обнаружена для глюконата марганца, затем глюконата цинка и глюконата меди.

Увеличение метаболической активности нейтрофилов, сопровождающееся повышенным образованием активных форм кислорода, коррелирует со снижением показателей прогрессирования индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c, что указывает на возможный механизм противоопухолевого действия глюконатов 3d-металлов путем инициации апоптоза.

3.5. Исследование влияния глюконата марганца на поведенческие реакции у мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14 на фоне моделированного стрессового расстройства

Цель данного этапа исследования – оценка влияния глюконата марганца на поведенческие реакции мышей с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14 при моделировании стрессового расстройства.

Одним из методов, позволяющих оценить действие биологически активных веществ на состояние центральной нервной системы мышей, является метод открытого поля. Этот метод, основанный на исследовательском поведении животных в новом для них окружении, используемый для скрининга *in vivo* лекарственных препаратов, получил наиболее широкое распространение (Ковалёв Г. И. и др., 2019). Поэтому для определения влияния глюконата марганца на поведенческие реакции у мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14 нами был выбран данный подход.

Эксперимент проводили в течение трех недель в шести экспериментальных группах животных: №1 – интактные, №2 – мыши с моделированным стрессовым расстройством (MCP), №3 – мыши с индуцированной миеломой («миелома»), №4 – мыши с индуцированной миеломой на фоне MCP («миелома+MCP»), №5 (группа сравнения) – введение композиции глюконатов 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn) на фоне индуцированной миеломы и MCP («миелома+MCP+k3dMGl») №6 – введение глюконата марганца на фоне индуцированной миеломы и MCP («миелома+MCP+MnGl»).

Для исследования механизма действия глюконата марганца на индуцированную миелому путем влияния на нейроиммунную ось было принято решение провести эксперимент на фоне моделированного стрессового расстройства, которое вызывает еще большее отклонение поведенческих реакций от нормы и на его фоне действие корректора выглядит более убедительно. Для сравнения животным другой группы (№5) вводили композицию глюконатов 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn).

Влияние глюконата марганца на показатели теста «Открытое поле» у мышей линии BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag 14 на фоне моделированного стрессового расстройства (MCP)

Группа животных	Статистический показатель	Показатели теста «Открытое поле»				
		Пересеченные квадраты	Вертикальная стойка	Заглядывание за край «поля»	Грумминг	Количество дефекаций
1. интактные n=12	M±m	42,1±3,4	18,7±1,4	11,7±0,9	3±0,3	1,1±0,1
	Me	42,1	19,3	12,0	3,1	1,2
	[Q ₁ -Q ₃]	[36,5-46,7]	[18,0-20,6]	[10,4-13,3]	[2,6-3,2]	[1,0-1,2]
2. MCP n=12	M±m	31,6±2,5	11,7±0,8	6,1±0,5	11,3±0,9	1,8±0,2
	Me	33,6	11,9	6,0	11,4	1,8
	[Q ₁ -Q ₃]	[27,2-35,6]	[10,5-13,2]	[5,3-6,6]	[10,1-12,7]	[1,6-2,0]
	p-знач	p ₁₋₂ =0,001	p ₁₋₂ =0,001	p ₁₋₂ <0,001	p ₁₋₂ <0,001	p ₁₋₂ =0,001
		p ₂₋₃ =0,06	p ₂₋₃ =0,04	p ₂₋₃ =0,004	p ₂₋₃ <0,001	p ₂₋₃ =0,24
		p ₂₋₄ <0,001	p ₂₋₄ =0,12	p ₂₋₄ =0,2	p ₂₋₄ =0,004	p ₂₋₄ <0,001
		p ₂₋₅ =0,006	p ₂₋₅ <0,001	p ₂₋₅ =0,18	p ₂₋₅ =0,18	p ₂₋₅ <0,001
	p ₂₋₆ =0,02	p ₂₋₆ =0,02	p ₂₋₆ =0,003	p ₂₋₆ =0,003	p ₂₋₆ <0,001	

3. Миелома n=12	M±m	27,6±2,1	14,0±1,1	7,9±0,6	8,3±0,7	2,0±0,2
	Me	28,1	13,2	8,2	8,5	1,9
	[Q ₁ -Q ₃]	[26,6-30,1]	[12,5-16,7]	[6,9-9,1]	[7,1-9,2]	[1,8-2,2]
	p-знач	p ₁₋₃ <0,001	p ₁₋₃ =0,001	p ₁₋₃ =0,001	p ₁₋₃ <0,001	p ₁₋₃ <0,001
		p ₂₋₃ =0,06	p ₂₋₃ =0,04	p ₂₋₃ =0,04	p ₂₋₃ <0,001	p ₂₋₃ =0,24
		p ₃₋₄ =0,001	p ₃₋₄ =0,001	p ₃₋₄ <0,001	p ₃₋₄ <0,001	p ₃₋₄ <0,001
		p ₃₋₅ =0,001	p ₃₋₅ =0,01	p ₃₋₅ =0,001	p ₃₋₅ <0,001	p ₃₋₅ <0,001
	p ₃₋₆ <0,001	p ₃₋₆ =0,15	p ₃₋₆ =0,02	p ₃₋₆ <0,001	p ₃₋₆ <0,001	
4. Миелома+ MCP n=12	M±m	18,0±1,4	10,5±0,8	4,4±0,3	14,5±1,1	5,2±0,4
	Me	18,4	10,7	4,5	15,3	5,4
	[Q ₁ -Q ₃]	[15,4-19,9]	[10,2-11,3]	[3,8-4,7]	[13,6-15,6]	[4,4-5,6]
	p-знач	p ₁₋₄ <0,001	p ₁₋₄ =0,002	p ₁₋₄ =0,001	p ₁₋₄ <0,001	p ₁₋₄ <0,001
		p ₂₋₄ <0,001	p ₂₋₄ =0,12	p ₂₋₄ =0,2	p ₂₋₄ =0,004	p ₂₋₄ <0,001
		p ₃₋₄ =0,001	p ₃₋₄ =0,001	p ₃₋₄ <0,001	p ₃₋₄ <0,001	p ₃₋₄ <0,001
		p ₄₋₅ <0,001	p ₄₋₅ =0,001	p ₄₋₅ <0,001	p ₄₋₅ <0,001	p ₄₋₅ <0,001
	p ₄₋₆ <0,001	p ₄₋₆ =0,001	p ₄₋₆ <0,001	p ₄₋₆ <0,001	p ₄₋₆ <0,001	

5. Миелома + MCP + 3dMGI n=12	M±m	38,8±3,0	17,6±1,4	11,0±0,9	4,6±0,4	1,4±0,1
	Me	39,8	16,4	11,2	4,6	1,4
	[Q ₁ -Q ₃]	[39,4-42,6]	[15,4-19,1]	[10,0-11,9]	[4,0-5,0]	[1,2-1,6]
	p-знач	p ₁₋₅ =0,24	p ₁₋₅ =0,42	p ₁₋₅ =0,24	p ₁₋₅ =0,24	p ₁₋₅ =0,002
		p ₂₋₅ =0,006	p ₂₋₅ <0,001	p ₂₋₅ =0,18	p ₂₋₅ =0,18	p ₂₋₅ =0,001
		p ₃₋₅ =0,001	p ₃₋₅ =0,02	p ₃₋₅ =0,001	p ₃₋₅ =0,001	p ₃₋₅ <0,001
		p ₄₋₅ <0,001	p ₄₋₅ =0,001	p ₄₋₅ <0,001	p ₄₋₅ <0,001	p ₄₋₅ <0,001
	p ₅₋₆ =0,88	p ₅₋₆ =0,22	p ₅₋₆ =0,12	p ₅₋₆ =0,26	p ₅₋₆ =0,001	
6. Миелома + MCP + MnGI n=12	M±m	39,9±3,1	15,5±1,2	9,7±0,8	4,0±0,3	1,0±0,1
	Me	39,3	16,2	9,9	4,3	1,0
	[Q ₁ -Q ₃]	[35,9-44,5]	[13,8-17,0]	[8,5-10,6]	[4,0-4,4]	[0,9-1,1]
	p-знач	p ₁₋₆ =0,44	p ₁₋₆ =0,12	p ₁₋₆ =0,02	p ₁₋₆ =0,002	p ₁₋₆ =0,14
		p ₂₋₆ =0,02	p ₂₋₆ =0,02	p ₂₋₆ =0,003	p ₂₋₆ =0,003	p ₂₋₆ <0,001
		p ₃₋₆ <0,001	p ₃₋₆ =0,16	p ₃₋₆ =0,02	p ₃₋₆ <0,001	p ₃₋₆ <0,001
		p ₄₋₆ <0,001	p ₄₋₆ =0,001	p ₄₋₆ <0,001	p ₄₋₆ <0,001	p ₄₋₆ <0,001
	p ₅₋₆ =0,88	p ₅₋₆ =0,22	p ₅₋₆ =0,12	p ₅₋₆ =0,26	p ₅₋₆ =0,001	

Поведенческие реакции оценивали по количеству пересеченных линий квадратов (горизонтальная двигательная активность), подъему на задние лапы (вертикальная двигательная активность), заглядыванию за край «поля» (ориентировочно-исследовательская активность), количеству актов груминга (умываний) и дефекаций (эмоциональные реакции).

Из результатов, представленных в таблице 9, видно, что при МСР (группа №2) у мышей происходило снижение горизонтальной двигательной активности в 1,3 раза, вертикальной двигательной активности – в 1,6 раз, ориентировочно-исследовательской двигательной активности – в 2 раза. Эмоциональные реакции, напротив, повышались: количество умываний (груминг) – в 3,7 раз, количество дефекаций – в 1,5 раза ($p < 0,05$).

У мышей с индуцированной миеломой горизонтальная, вертикальная и ориентировочно-исследовательская двигательная активность также снижались – каждый из параметров в 1,5 раза относительно группы №1. По сравнению с группой №2 показатели вертикальной и ориентировочно-исследовательской двигательной активности возрастали в 1,1 и 1,4 раза. Эмоциональные реакции: груминг и количество дефекаций увеличивались относительно группы №1 в 2,7 и 1,6 раза соответственно. Количество умываний снижалось по сравнению с группой №2 в 1,3 раза ($p < 0,05$).

В группе мышей с индуцированной миеломой на фоне МСР (№4) показатели горизонтальной, вертикальной и познавательной двигательной активности снижались еще больше относительно группы интактных мышей: в 2,3; 1,8 и 2,7 раза соответственно. По сравнению с группой №3 – в 1,5; 1,2 и 1,8 раза. Эмоциональные реакции – груминг и количество дефекаций увеличивались более значительно, чем в группе «миелома»: в 4,9 и 4,5 по сравнению с группой №1 и в 1,8 и 2,8 раза по сравнению с группой №3 (миелома без применения МСР) ($p < 0,05$).

После введения композиции глюконатов 3d-металлов наблюдалось изменение показателей в сторону нормы: увеличение показателей горизонтальной, вертикальной, ориентировочно-исследовательской активности и снижение эмоциональной активности. Под действием комплексного препарата и глюконата

марганца горизонтальная двигательная активность увеличивалась в 2,2 и 2,1 раза соответственно, вертикальная двигательная активность в обеих группах – в 1,5 раза, ориентировочно-исследовательская двигательная активность – в 2,5 и 2,2 раза соответственно. При этом эмоциональные реакции снижались в 3,3 и 3,6 раза (груминг), в 3,9 и 5,4 раза (количество дефекаций) ($p < 0,05$).

Т.е. действие глюконата марганца на показатель эмоциональных реакций – количество дефекаций, оказалось более эффективным, чем у комплексного препарата, и не отличалось по этому основному индексу эмоциональности, а также показателям горизонтальной и вертикальной активности от интактных животных. Отсутствие статистически значимых отличий, за исключением количества дефекаций, с группой мышей, которым вводился комплексный препарат, скорее всего, связано с присутствием глюконата марганца в его составе.

Таким образом, введение мышам BALB/c с индуцированной миеломой на фоне МСР глюконата марганца (отдельно или в составе комплекса глюконатов 3d-металлов), оказывает корригирующее действие на поведенческие реакции мышей, что может свидетельствовать о механизме его противоопухолевого действия, опосредованного стабилизирующим действием на нейроиммунную ось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опыт применения химиотерапевтических препаратов показал, что они обладают высокой токсичностью и подавляют собственный иммунитет организма. Это осложняет терапию онкологических заболеваний и делает актуальным поиск более щадящих способов торможения злокачественного роста клеток.

Исследования последних лет свидетельствуют, что ряд координационных соединений 3d-металлов обладает способностью ингибировать развитие неопластических процессов (Efimova I. et al, 2020; Гук Д.А. и др., 2021; Rozenberg, J.M. et al., 2022; Jia Liu et al., 2015), но известно также, что они могут проявлять иммуномодулирующие свойства (Syrovaya A.O. et al., 2017; Gharibzahedi S.M.T., Jafari S.M., 2017; Князева О.А. и др., 2021). В частности, для координационных соединений 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu и Zn) с глюконовой кислотой (3dMGI) было показано, что они корректируют иммунный и окислительный гомеостаз (Конкина И.Г. и др., 2002; Князева О.А. и др., 2008-2022), а в комплексе ингибируют развитие миеломы у мышей (Князева О.А., 2008; Князева О.А., Камилов Ф.Х., 2011).

В представленной работе проведены исследования, направленные на изучение механизмов противоопухолевого действия глюконатов 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn) и связи между изменениями показателями иммунитета и прогрессирования новообразований при действии этих соединений в экспериментах *in vivo* на мышах линии BALB/c.

С этой целью в ряде экспериментов *in vitro* и *in vivo* было изучено влияние 3dMGI на гуморальный и клеточный иммунитет, а также действие на злокачественный рост клеток на примере мышинной миеломы Sp2/0 Ag14.

Корректирующее действие композиции 3dMGI на показатели комплемента (профиль гидролиза C3 компонента и взаимодействие C1q субкомпонента комплемента с иммуноглобулинами G) было выявлено в сыворотках крови мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14, на основании сопоставления с результатами, полученными в сыворотках крови больных с

лимфопролиферативными заболеваниями (Князева О.А., Киреева Е.А., 2018; 2021).

Увеличение реактивности фагоцитов и скорости регенерации лейкоцитарного звена было показано на модели эндогенной интоксикации у мышей BALB/c, вызванной путем введения циклофосфамида. Введение 3dMGI вызывало коррекцию значений лейкоцитарных индексов, которые значительно изменялись после применения ЦФ (Князева О.А. и др., 2022а). Наиболее высокая эффективность была выявлена у глюконата марганца, затем у глюконатов цинка и меди.

В следующем эксперименте было изучено влияние этих соединений на поглотительную и метаболическую активность нейтрофилов периферической крови мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14 и показано, что они вызывают активацию фагоцитоза, особенно его метаболической составляющей (Князева О.А. и др., 2022в).

Исследование противоопухолевой активности наиболее эффективно иммуностимулирующих 3dMGI – глюконатов марганца, меди и цинка, было проведено на модели индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 у линейных мышей BALB/c путем оценки показателей торможения прироста массы тела, торможения развития асцита и увеличения продолжительности жизни животных, а также изучения гистологических срезов органов и опухолевых образований. Проведенные морфологические исследования показали, что клетки миеломы, введенные в брюшную полость, разрастаются путем инфильтрации вокруг кровеносных сосудов брыжейки, и формируют узловатую опухоль размером 1,0×1,5 см, связанную с брыжейкой кишечника.

Необходимо отметить, что на момент забора биоматериала для морфологических исследований, а именно, сразу после окончания терапии животных соединениями 3dMGI (на 22 день), новообразований у животных, получавших 3dMGI, обнаружено не было, хотя они были выявлены в группах мышей с индуцированной миеломой без лечения и с применением препарата сравнения цитостатика циклофосфамида.

Оценка показателей торможения прироста массы тела, торможения развития

асцита и увеличения продолжительности жизни животных, которая проводилась в течение 3-х месяцев, показала, что глюконаты марганца, меди и цинка ингибируют развитие миеломы Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c и увеличивают продолжительность их жизни. Значения показателей торможения прироста массы тела, торможения развития асцита и увеличения продолжительности жизни составили для глюконата марганца – 51%, 50% и 198%, для глюконата цинка – 36%, 37% и 182%, для глюконата меди – 30%, 31% и 131%. В группе сравнения, в которой животные получали циклофосфамид, данные показатели составили: 29%, 29% и 154%. Наибольшая эффективность выявлена после терапии глюконатом марганца.

Марганец, как известно, играет важную роль не только для иммунной системы, но и нервной, активно участвуя в синтезе и обмене нейромедиаторов (Нотова С.В. и др., 2020). Проведенный эксперимент на мышах BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14 на фоне экспериментального стрессового расстройства показал, что глюконат марганца эффективно корректирует поведенческие реакции мышей, что адекватно отражает состояние центральной нервной системы.

Проведенный корреляционный анализ по Спирмену между показателями фагоцитоза и прогрессирования миеломы показал, что увеличение метаболической активности нейтрофилов, сопровождающееся повышенным образованием активных форм кислорода, коррелирует со снижением показателей прогрессирования индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c.

На основании суммы полученных результатов можно сделать предположение, что механизм противоопухолевого действия глюконатов марганца, меди и цинка обусловлен сочетанием, как иммуномодулирующих свойств, так и цитотоксического воздействия путем инициации апоптоза вследствие образования активных форм кислорода. Не исключен также вклад регулирующего влияния глюконата марганца путем стабилизирующего воздействия на нейроиммунную ось (рис. 55).



Рисунок 55. – Патогенетическая схема механизмов действия глюконатов 3d-металлов на торможение индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c.

ВЫВОДЫ

1. Глюконаты 3d-металлов оказывают корректирующее действие на показатели комплемента сыворотки крови у мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14 (профиль гидролиза C3 компонента и взаимодействие субкомпонента C1q с IgG).

2. Глюконаты 3d-металлов индуцируют реактивность клеточного иммунитета при эндогенной интоксикации, вызванной цитостатиком циклофосфамидом: снижают токсическую иммуносупрессию, увеличивают реактивность фагоцитов и скорость регенерации лейкоцитарного звена. Наиболее высокая эффективность выявлена у глюконата марганца, далее следуют глюконат цинка и глюконат меди.

3. Глюконаты марганца, меди, цинка ингибируют развитие индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c и увеличивают продолжительность их жизни. Наибольшая эффективность выявлена у глюконата марганца и глюконата цинка.

4. Глюконаты марганца, меди и цинка увеличивают фагоцитарную активность нейтрофилов, что коррелирует со снижением показателей прогрессирования индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c, указывая на возможный механизм их противоопухолевого действия, обусловленного иммуномодулирующими свойствами.

5. Глюконат марганца оказывает корректирующее действие на поведенческие реакции мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp2/0 Ag14, что может свидетельствовать о механизме противоопухолевого действия, опосредованного стабилизирующим действием на нейроиммунную ось.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

БСА – бычий сывороточный альбумин

ГМДП – иммуностимулятор глюкозаминилмурамилдипептид в виде препарата ликопад

ДК – дендритные клетки

ДНФГ – динитрофенилгидразин

ЕК – естественные киллеры / естественные киллерные клетки

ЕСАСС – Европейская коллекция аутентифицированных клеточных культур

ИГК – иммуногенная гибели клеток

ИЛ – интерлейкины

ИС – индекс стимуляции

ИФА – иммуноферментный анализ

ИФИ – интегральный фагоцитарный индекс

ИФН – интерфероны

КР – кальретикулин

МАО – макрофаги, ассоциированные с опухолью

МНС-I – основной класс гистосовместимости I

МСР – моделированное стрессовое расстройство

НВЛ – нейтрофильные внеклеточные ловушки

сп НСТ – спонтанный тест с нитросиним тетразолием

ст НСТ – стимулированный тест с нитросиним тетразолием

ОМО – опухолевое микроокружение

ОН – опухолевые нейтрофилы

ОП – открытое поле

ОФД – ортофенилендиамин

ПОЛ – перекисное окисления липидов

ПЯЛ – полиморфно-ядерные лейкоциты

сп СЦК – средний цитохимический коэффициент в спонтанном тесте

- ст СЦК – средний цитохимический коэффициент в стимулированном тесте
- ТСК – тиосемикарбазон
- ФР – физиологический раствор
- ФИ – фагоцитарный индекс
- ФНО /TNF- фактор некроза опухоли
- ФНО- α – фактор некроза опухоли α
- ФЧ – фагоцитарное число
- ЦНС – центральная нервная система
- ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты
- ЦФ – циклофосфамид
- ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
- ЭМ – эфирные масла
- $\alpha\nu\beta 5$, CD36, FcR, TIM и TAM – рецепторы, через которые дендритные клетки могут захватывать апоптотические опухолевые клетки
- C1q – субкомпонент первого компонента системы комплемента
- C3 – третий компонент комплемента
- C3(H₂O) – гидролизная форма, производная C3 компонента комплемента
- CD – дифференцировочный антиген
- CD4, CD8 – Т-клеточные рецепторы
- CD14, TIM, TAM и FcR – рецепторы, через которые макрофаги фагоцитируют опухолевые клетки
- CD91 – рецептор, с которым связан КР на макрофагах
- FcR + / FcR- – активирующие / ингибирующие рецепторы на макрофагах, продуцирующих цитокины
- Ig – иммуноглобулины
- IgG– иммуноглобулины класса G
- 3dMGI – глюконаты 3d-металлов
- PD-1 (Programmed cell Death-1) – белок, присутствующий на Т-лимфоцитах
- PD-L1– лиганд, экспрессируемый опухолевыми клетками
- RIPK-1, RIPK-3 – рецепторы протеинкиназы-1, -3

Th1, Th2 – популяция Т-лимфоцитов хелперов 1 и 2 типа

TLR – Toll-подобные рецепторы

TRAIL – лиганды семейства ФНО/TNF

Treg – регуляторные CD4 + Т-клетки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев, Н.А. Клинические аспекты лейкопений, нейтропений и функциональных нарушений нейтрофилов / Н.А. Алексеев. – СПб. : Фолиант, 2002. – 416 с.
2. Антииммуносупрессивное действие глюконатов 3d-металлов при экспериментальном иммунодефиците / О.А. Князева, С.И. Уразаева, И.Г. Конкина [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2018. – № 2. – С. 255-259; DOI: 10.17816/KMJ2018-255.
3. Блиндарь, В.Н. Современное представление о роли нейтрофилов в противоопухолевом иммунитете: обзор литературы / В.Н. Блиндарь, В.Н. Зубрихина // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 8. – С. 51-54.
4. Борсук, О.С. Доклинические исследования препаратов природного происхождения в условиях цитостатического воздействия / О.С. Борсук, Н.В. Масная, А.А. Чурин // Биомедицина. – 2010. – № 2. – С. 53-64.
5. Бурместер, Г.-Р. Наглядная иммунология / Г.-Р. Бурместер, А. Пецутто ; Пер. с англ. – 2-е изд., испр. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 320 с.
6. Взаимосвязь между изменением под действием химиотерапии уровня С3(Н₂О) комплемента и опухолиассоциированного антигена СА-125 в плазме крови больных раком яичников / О.А. Князева, Д.Д. Сакаева, Ф.Х. Камилов, В.А. Вахитов // Вопросы онкологии. – 2007. – Т. 46, №6. – С. 696-698.
7. Влияние ароматерапии на противоопухолевую активность и спонтанный гидролиз С3 компонента комплемента / О.А. Князева, И.Г. Конкина, А.В. Князев [и др.] // Фармация. – 2010. – № 7. – С. 42-45.
8. Влияние глюконатов 3d-металлов на активность антиоксидантных ферментов и окислительные процессы *in vivo* при экспериментальном иммунодефиците / О.А. Князева, И.Г. Конкина, С.И. Уразаева, Ю.И. Муринов // Медицинский Вестник Башкортостана. – 2018. – Т. 13, № 4 (76). – С. 48-52.
9. Влияние глюконатов 3d-металлов на лейкоцитарные показатели эндогенной интоксикации / О.А. Князева, Е.А. Киреева, И.Г. Конкина [и др.] //

Казанский медицинский журнал. – 2022. – Т. 103, № 3. – С. 427-433; DOI: 10.17816/KMJ2022-427.

10. Влияние глюконатов 3d-металлов на поглотительную и метаболическую активность фагоцитов при экспериментальном иммунодефиците / О.А. Князева, С.И. Уразаева, С.А. Усачев, И.Г. Конкина // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – № 4. – С. 205.

11. Влияние глюконатов марганца, меди и цинка на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag 14 / О.А. Князева, Е.А. Киреева, Л.Р. Мусина [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2022. – № 4. – С. 117.

12. Влияние липополисахарида *Escherichia coli* на фагоцитарную и метаболическую активность нейтрофилов крови мышей с индуцированным иммунодефицитом / А.Р. Мавзютов, О.А. Князева, Р.Р. Гарафутдинов, А.Р. Габдрахманова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2017. – № 3. – С. 84-90.

13. Влияние рекомбинантной марганец-супероксиддисмутазы (rMnSOD) на гемоталагический статус мышей, облученных протонами / Ф.С. Амбеси-Импиембато, В.П. Шахов, Н.Ю. Шелгаев, В.А. Серебрякова // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2014. – Т. 59, № 6. – С. 5-11.

14. Влияние эфирных масел *Lavandula vera* и *Salvia sclarea* на противоопухолевую активность и динамику спонтанного гидролиза C3 компонента комплемента / О.А. Князева, И.Г. Конкина, А.В. Князев [и др.] // Медицинский Вестник Башкортостана. – 2011. – Т.6, № 1. – С. 86-89.

15. Волкова, О.В. Основы гистологии с гистологической техникой / О.В. Волкова, Ю.К. Елецкий. – М.: Медицина, 1982. – 304 с.

16. Гук, Д.А. Координационные соединения биогенных металлов как цитотоксические агенты для терапии злокачественных новообразований / Д.А. Гук, О.О. Красновская, Е.К. Белоглазкина // Успехи химии. – 2021. – Т. 90, № 12. – С. 1566-1623.

17. Долгушин, И.И. Нейтрофилы и гомеостаз / И.И. Долгушин, О.В.

Бухарин // Екатеринбург: Изд-во УрОРАН, 2001. – 284 с.

18. Зибиров, Р.Ф. Характеристика клеточного микроокружения опухоли / Р.Ф. Зибиров, С.А. Мозеров // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2018. – Т. 7. – № 2. – 67-72.

19. Изменение уровня конформационной формы C3(H₂O) в процессе спонтанного гидролиза C3 компонента комплемента под влиянием микроэлементов / О.А. Князева, И.Г. Конкина, Ю.И. Муринов, Ф.Х. Камилов // Астраханский медицинский журнал. – 2008. – № 31. – С. 18-20.

20. Иммунологические и иммуногенетические маркеры хронической обструктивной болезни легких в условиях естественного дефицита / Л.М. Карзакова, Н.Д. Ухтерова, Л.В. Борисова, Л.Н. Иванов // Медицинская иммунология. – 2008. – Т. 10, № 6. – С. 513-518.

21. Карзакова, Л.М. Дефицит цинка индуцирует fas*опосредованный апоптоз / Л.М. Карзакова // Медицинская Иммунология. – 2005. – Т. 7, № 4. – С. 441–443.

22. Клеточный состав тимуса крыс при сочетанном воздействии канцерогена и стресса / А.А. Котелкина, О.Ю. Кострова, Л.М. Меркулова [и др.] // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2019. – Т. 8, № 2. – С. 47-54.

23. Клиническая иммунология и аллергология: В 3 Т. / Л. Йегер, Г. Амброзиус, Р. Байер [и др.]. – М.: Медицина, 1990. – Т. 1. – 528 с.

24. Князева О.А. Взаимодействие комплемента с иммуноглобулинами G и конформационные изменения компонента C3 при неопластических процессах: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.04, 03.00.02 / Князева, Ольга Александровна. – Пушкино, 2008. – 288 с.

25. Князева, О.А. Анализ взаимосвязей между показателями развития миеломы и нейроиммуноэндокринной системы у мышей после проведения аэрофитотерапии / О.А. Князева, А.И. Уразаева, Е.А. Киреева // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – № 3. – С. 65.

26. Князева, О.А. Взаимосвязь окислительного и иммунного гомеостаза в условиях иммунодефицита / О.А. Князева, С.И. Уразаева, Е.А. Киреева //

Современные проблемы науки и образования : Материалы международных научных конференций, проведенных Академией Естествознания (Международной ассоциацией ученых, преподавателей и специалистов), Москва, 01 мая 2020 года – 28 февраля 2021 года. Том XXI. – Москва: Издательский Дом "Академия Естествознания", 2021. – С. 94-95. – ISBN 978-5-91327-632-2.

27. Князева, О.А. Влияние иммунокорректирующей терапии на некоторые показатели системы комплемента / О.А. Князева, Е.А. Киреева // Медицинская биохимия - от фундаментальных исследований к клинической практике. Традиции и перспективы : Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 90-летию профессоров А.Ш. Бышевского и Р.И. Лифшица, Тюмень, 24–26 октября 2019 года. – Тюмень: Рекламно-издательский центр "Айвекс", 2019. – С. 52-55.

28. Князева, О.А. Влияние соединений 3d-металлов с глюконовой кислотой на белок-белковые взаимодействия *in vitro* / О.А. Князева, Е.А. Киреева, С.И. Уразаева // Acta Naturae. – 2019. – Т. 11, № S 2. – С. 103-104.

29. Князева, О.А. Влияние хронического стресса на развитие привитой миеломы Sp 2/0 Ag 14 у мышей BALB/c на фоне ингаляционного введения эфирных масел / О.А. Князева, А.И. Уразаева // Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке. – 2016. – Т. 18, № 4. – С. 83-87.

30. Князева, О.А. Глюконаты 3d-металлов: влияние на окислительный и иммунный гомеостаз, использование в терапии иммунодефицита / О.А. Князева, С.И. Уразаева, И.Г. Конкина – М.: Издательский дом Академии Естествознания, 2021. – 122 с. – ISBN 978-5-91327-676-6.

31. Князева, О.А. Исследование влияния комплексов ионов 3d-металлов с глюконовой кислотой на синтез цитокинов при экспериментальном иммунодефиците / О.А. Князева, С.И. Уразаева // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2018. – Т. 26, № 4. – С. 459-465.

32. Князева, О.А. Комплемент для оценки эффективности терапии при онкопатологии / О.А. Князева, Е.А. Киреева // Природные ресурсы Земли и охрана окружающей среды. – 2021. – Т.2, № 1. – С. 23-27.

33. Князева, О.А. Комплемент и антитела при онкологических заболеваниях. Результаты исследований / О.А. Князева, Ф.Х. Камилов. – Германия: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2011. – 284 с.

34. Князева, О.А. Конформационные изменения С3 компонента комплемента при инкубации плазмы крови больных раком молочной железы и «группы онкологического риска» / О.А. Князева // Вятский медицинский вестник. – 2007. – № 4. – С. 54-56.

35. Князева, О.А. Особенности взаимодействия субкомпонента комплемента C1q с IgG при неопластических процессах / О.А. Князева, Ф.Х. Камилов // Иммунология. – 2007. – № 4. – С. 231-233.

36. Князева, О.А. Особенности конформационных изменений С3 компонента комплемента в процессе его спонтанного гидролиза при неопластических процессах / О.А. Князева, Д.Д. Сакаева, Ф.Х. Камилов // Иммунология. – 2007. – № 5. – С. 268-272.

37. Князева, О.А. Противоопухолевое действие аэрофитотерапии: экспериментальное исследование / О.А. Князева, А.И. Уразаева. – М.: Издательский дом Академии Естествознания, 2020. – 104 с. – ISBN 978-5-91327-627-8.

38. Князева, О.А. Профиль гидролиза С3 компонента комплемента – биохимический маркер онкопатологии? / О.А. Князева, Е.А. Киреева // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2018. – № 4. – С. 96-100.

39. Князева, О.А. Роль соединений глюконовой кислоты с 3d-металлами в коррекции индуцированного иммунодефицита у мышей / О.А. Князева, С.А. Усачев, С.И. Уразаева // Здоровье и образование в XXI веке. – 2016. – Т. 18, № 4. – С. 88-93.

40. Князева, О.А. С3-компонент комплемента в процессе хранения

сыворотки крови больных неходжкинскими лимфомами / О.А. Князева, Д.Д. Сакаева // Цитокины и воспаление. – 2002. – Т.1, № 2. – С. 10.

41. Ковалёв, Г.И. Сравнение поведения мышей в тестах открытого поля, закрытого и приподнятого крестообразного лабиринтов с помощью факторного анализа / Г.И. Ковалёв, Е.В. Васильева, Р.М. Салимов // Журнал высшей нервной деятельности. – 2019. – Т. 69, № 1. – С. 123–130.

42. Кудрин, А.В. Микроэлементы в иммунологии и онкологии / А.В. Кудрин, О.А. Громова. – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2007. – 544 с.

43. Кунцевич, Н.В. Роль нуклеарного фактора транскрипции $\text{nf-}\kappa\text{b}$ в развитии отторжения трансплантата / Н.В. Кунцевич // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – № 12 (1). – С. 72-77.

44. Курхалюк, Н. Модуляторы каналов К-АТФ в предотвращении окислительного стресса и улучшение антиоксидантной способности в сердце крысы с различной устойчивостью к гипоксии при обработке кобальтом / Н. Курхалюк, А. Ткаченко // Журнал ветеринарных исследований. – 2016. – Т. 60, № 2. – С. 195-206.

45. Лаврова, В.С. Нейтрофилы и злокачественный рост / В.С. Лаврова, Н.В. Чердынцева, Н.В. Васильев. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1992. – 124 с.

46. Лазурина, Л.П. Изучение антимикробной активности многокомпонентных гелей, содержащих новые биоконплексы металлов с производными нитрофурана / Л.П. Лазурина, И.В. Самохвалова, А.А. Краснов [и др.] // Современные наукоемкие технологии. – 2006. – № 5. – С. 66- 67.

47. Леонов, В.В. Биопленкообразование оппортунистических микроорганизмов в плазме крови в зависимости от содержания железа / В.В. Леонов, А.Ю. Миронов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61, № 1. – С. 52-54.

48. Лисяный, Н.И. Нейтрофилы и онкогенез / Н.И. Лисяный, А.А. Лисяный // Клиническая онкология. – 2018. – Т. 8, № 1 (29). – С. 40-45.

49. Ломакин, М.С. Иммунобиологический надзор / М.С. Ломакин. – М.: Медицина, 1990. – 256 с.

50. Маркина, А.А. Комплексное экспериментальное моделирование шоковых состояний / А.А. Маркина // Иммунология. – 2012. – № 5. – С. 250-254.
51. Матреницкий, В.Л. Психотравма диагноза, дистресс и депрессия у пациентов как факторы прогрессии онкозаболевания, способы их профилактики и терапии / В.Л. Матреницкий // Клінічна онкологія. – 2020. – Т. 10, № 1 (37). – С. 1–9.
52. Металлокомплексы цинка и кобальта в восстановительном лечении гипоксических состояний / С.А. Лебедева, З.Х. Бабаниязова, И.А. Радионов, А.А. Скальный // Вестник восстановительной медицины. – 2013. – № 2. – С. 67-69.
53. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ / Е.М. Трещалина, О.С. Жукова, Г.К. Герасимова [и др.] ; под ред. Р.У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – С. 637-351.
54. Микроэлементозы человека / А.П. Авцын, А.А. Жаворонков, А.А. Риш [и др.]. – М. : Издательство "Медицина", 1991. – 496 с.
55. Миронов, А.Ю. Железо, вирулентность и межмикробные взаимодействия условно-патогенных микробов / А.Ю. Миронов, В.В. Леонов // Успехи современной биологии. – 2016. – Т. 136, № 3. – С. 285-294.
56. Молекулярно-клеточные механизмы коррекции индуцированной введением циклофосфана иммуносупрессии / Е.А. Лебединская, О.В. Лебединская, Я.Н. Тройнич [и др.] // Казанская наука. – 2010. – № 9. – С. 832-836.
57. Нарушение морфофункционального состояния надпочечников при экспериментальном посттравматическом стрессовом расстройстве у крыс: корреляция с поведенческими маркерами / М. В. Кондашевская, В. Э. Цейликман, Е. Б. Манухина [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2017. – Т. 103, № 7. – С. 808-818.
58. Наследов, А.Д. SPSS 19. Профессиональный статистический анализ данных / А. Д. Наследов. – СПб.: Питер, 2011. – 400 с.
59. Нейроиммунология в онкологии: воздействие стресса на болезнь / А. Солопова, Л. Идрисова, Е. Чуканова, В. Алипов // Врач. – 2017. – № 9. – С. 14–16.
60. Новиков, В.С. Функциональное питание человека при экстремальных

воздействиях / В.С. Новиков, В.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов. – СПб.: Политехника-принт, 2017. – 346 с.

61. Нотова, С.В. Изучение химических форм меди и марганца в живом организме (обзор) / С.В. Нотова, Т.В. Казакова, О.В. Маршинская // Животноводство и кормопроизводство. – 2020. – Т. 103, № 1. – С. 47-64.

62. Патогенетические факторы прогрессирования тяжести общего состояния детей с медуллобластомой мозжечка на фоне химиолучевой терапии / Я.А. Корчагина, В.Е. Долгих, Е.И. Долгих, А.В. Ершов // Лабораторная служба. – 2018. – Т. 7, № 3. – С. 26-31.

63. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний / Под руководством проф. И.В. Поддубной, проф. В.Г. Савченко. – М.: Медиа Медика, 2013. – 104 с.

64. Сабанчиева, Ж.Х. Состояние фагоцитарной системы крови в НСТ-тесте у больных вич-инфекцией / Ж.Х. Сабанчиева // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 3. – С. 44-45.

65. Сакаева, Д.Д. Влияние полихимиотерапии на конформационные изменения С3 компонента комплемента при лимфогранулематозе / Д.Д. Сакаева, О.А. Князева // Гематология и трансфузиология. – 2002. – Т. 47, № 4. – С.28-30.

66. Сакаева, Д.Д. Изменение С3 компонента комплемента под влиянием полихимиотерапии у больных с неходжкинскими лимфомами / Д.Д. Сакаева, О.А. Князева. – М. : Изд-во "Медицина", 2000. – 12 с.

67. Сакаева, Д.Д. Изменения С3 компонента комплемента под влиянием полихимиотерапии у больных раком молочной железы / Д.Д. Сакаева, О.А. Князева // Иммунология. – 2002. – № 3. – С. 172-174.

68. Саркисов, Д.С. Общая патология человека / Д.С. Саркисов, М.А. Пальцев, Н.К. Хитров. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1997. – 608 с.

69. Сипливый, В.А. Использование лейкоцитарных индексов для прогнозирования исхода перитонита / В.А. Сипливый, Е.В. Конь, Д.В. Евтушенко // Клінічна хірургія. – 2009. – № 9. – С. 21-26.

70. Скальная, М.Г. Микроэлементы: биологическая роль и значение для

медицинской практики. Сообщение 1. Медь / М.Г. Скальная, А.В. Скальный // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2015. – № 1. – С. 15-31.

71. Скрининг иммуноактивных и противоопухолевых свойств комплексов триэтаноламина с солями биомикроэлементов / О.П. Колесникова, А.Н. Мирскова, С.Н. Адамович [и др.] // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2009. – Т. 29, № 6. – С. 73-79.

72. Судаков, С.К. Определение уровня тревожности у крыс в тестах «открытое поле», «крестообразный приподнятый лабиринт» и тесте Фогеля / С.К. Судаков, Р.А. Назарова, Е.В. Алексеева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155, № 3. – С. 268-270.

73. Троицкий, Г.В. Дефектные белки: постсинтетическая модификация / Г.В. Троицкий. – Киев: Наук. Думка, 1991. – 232 с.

74. Уразаева, С.И. Влияние глюконатов 3d-металлов на взаимосвязь биохимических показателей оксидантного и иммунного гомеостаза при экспериментальном иммунодефиците / С.И. Уразаева, О.А. Князева // Наука молодых. – 2018. – Т. 6, № 4. – С. 548-560.

75. Физико-химические свойства и фармакологическая активность глюконатов Mn(II), Fe(II), Co(II), Cu(II) и Zn(II) / И.Г. Конкина, С.П. Иванов, О.А. Князева [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – № 1. – С. 18-25.

76. Халиуллина, С.В. Клиническое значение дефицита цинка в организме ребенка (обзор литературы) / С.В. Халиуллина // Вестник современной клинической медицины. – 2013. – № 3. – С. 72-78.

77. A novel multiplex detection array revealed systemic complement activation in oral squamous cell carcinoma / J. Gallenkamp, G. Spanier, E. Elisabeth Wörle [et al.] // Oncotarget. – 2018. – Vol. 9, № 3. – P. 3001-3013.

78. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death / A.D. Garg, D.V. Krysko, T. Verfaillie [et al.] // Embo. J. – 2012. – Vol. 31. – P. 1062–79.

79. A pair of transporters controls mitochondrial Zn²⁺ levels to maintain

mitochondrial homeostasis / T. Ma, L. Zhao, J. Zhang [et al.] // *Protein. Cell.* – 2022. – Vol. 13. – P. 180–202.

80. A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future / K. Esfahani, L. Roudaia, N. Buhlaiga [et al.] // *Curr. Oncol.* – 2020. – Vol. 27, № S2. – P. S87-S97.

81. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 beta-dependent adaptive immunity against tumors / F. Ghiringhelli, L. Apetoh, A. Tesniere [et al.] // *Nat. Med.* – 2009. – Vol. 15. – P. 1170–8.

82. Actor, J.K. *Cells and Organs of the Immune System* / J.K. Actor // Elsevier's *Integrated Rev. Immunol. Microbiol.* – 2012. – P. 7–16.

83. Allele-specific HLA loss and immune escape in lung cancer evolution / N. McGranahan, R. Rosenthal, C.T. Hiley [et al.] // *Cell.* – 2017. – Vol. 171. – P. 1259–1271 e1211.

84. An emerging role for nanomaterials in increasing immunogenicity of cancer cell death / T. Mishchenko, E. Mitroshina, I. Balalaeva [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* – 2019. – Vol. 1871. – P. 99–108.

85. Analysis of Zinc-Exporters Expression in Prostate Cancer / C.K. Singh, K.M. Malas, C. Tydrick [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 36772.

86. Andryukov, B.G. Phenotypic heterogeneity of neutrophils: new antimicrobial characteristics and diagnostic technologies / B.G. Andryukov, V.D. Bogdanova, I.N. Lyapun // *Rus. J. Hematol. Transfusiol.* – 2019. – Vol. 64, № 2. – P. 211—221.

87. Anticancer Activity of Metal Complexes: Involvement of Redox Processes / U. Jungwirth, C.R. Kowol, B.K. Keppler [et al.] // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2011. – Vol. 15, № 4. – P. 1085-1127.

88. Association between serum heavy metals and prostate cancer risk—A multiple metal analysis / J.T. Lim, Y.Q. Tan, L. Valeri [et al.] // *Environ. Int.* – 2019. – Vol. 132. – P. 105109.

89. Association between zinc nutritional status and glycemic control in individuals with well-controlled type-2 diabetes / A. Perez, P. Rojas, F. Carrasco [et al.] // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 2018. – Vol. 50. – P. 560-565.

90. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8 α + dendritic cells in cytotoxic / K. Hildner, B.T. Edelson, W.E. Purtha [et al.] // *T. Cell. Immun. Science.* – 2008. – Vol. 322. – P. 1097–1100.
91. Batinic-Haberle, I. A combination of two antioxidants (an SOD mimic and ascorbate) produces a pro-oxidative effect forcing *Escherichia coli* to adapt via induction of oxyR regulon / I. Batinic-Haberle, Z. Rajic, L. Benov // *Anticancer Agents Med. Chem.* 2011. – Vol. 11. – P. 329–340.
92. Beard, J.L. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning / J.L. Beard // *J. Nutr.* – 2001. – Vol. 131. – P. 568-580.
93. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer / R.M. Mohammad, I. Muqbil, L. Lowe [et al.] // *Semin. Cancer. Biol.* – 2015. – Vol. 35, Suppl.S. – P. 78–103.
94. C1q acts in the tumour microenvironment as a cancer-promoting factor independently of complement activation / R. Bulla, C. Tripodo, D. Rami [et al.] // *Nat. Commun.* – 2016. – Vol. 7. – P. 10346.
95. Calabro, A.R. Effect of metals on B-actin and total protein synthesis in cultured human intestinal epithelial cells / A.R. Calabro, D.I. Gazarian, F.A. Barile // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* – 2011. – Vol. 63. – P. 47–58.
96. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis / M. Obeid, T. Panaretakis, N. Joza [et al.] // *Cell. Death. Differ.* – 2007. – Vol. 14. – P. 1848–50.
97. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy / A. Sistigu, T. Yamazaki, E. Vacchelli [et al.] // *Nat. Med.* – 2014. – Vol. 20. – P. 1301–9.
98. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps / J. Park, R.W. Wysocki, Z. Amoozgar [et al.] // *Sci. Transl. Med.* – 2016. – Vol. 8, № 361. – P. 138.
99. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting / H. Matsushita, M.D. Vesely, D.C. Koboldt [et al.] // *Nature.* – 2012. – Vol. 482. – P. 400–404.
100. Caspase-Dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell

death / N. Casares, M.O. Pequignot, A. Tesniere [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 202. – P. 1691–701.

101. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte / S.J. Gardai, K.A. McPhillips, S.C. Frasch [et al.] // *Cell.* – 2005. – Vol. 123. – P. 321–334.

102. Cerwenka, A. Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer / A. Cerwenka, L.L. Lanier // *Nat. Rev. Immunol.* – 2016. – Vol. 16. – P. 112–123.

103. Characteristics of circulating tumor cells in organ metastases, prognosis, and T lymphocyte mediated immune response / W.W. Sun, Z.H. Xu, P. Lian [et al.] // *Onco. Targets. Ther.* – 2017. – Vol. 10. – P. 2413–2424.

104. Chemotherapy-induced antitumor immunity requires formyl peptide receptor 1 / E. Vacchelli, Y. Ma, E.E. Baracco [et al.] // *Science.* – 2015. – Vol. 350. – P. 972–978.

105. Chen, G.Y. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage / G.Y. Chen, G. Nunez // *Nat. Rev. Immunol.* – 2010. – Vol. 10. – P. 826–837.

106. Comparing the Influence of High Doses of Different Zinc Salts on Oxidative Stress and Energy Depletion in IPEC-J2 Cells / L. Chen, X. Yu, H. Ding [et al.] // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2020. – Vol. 196. – P. 481–493.

107. Complement in cancer: untangling an intricate relationship / E.S. Reis, D.C. Mastellos, D. Ricklin [et al.] // *Nat. Rev. Immunol.* – 2018. – Vol. 18, № 1. – P. 5-18.

108. Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death / L. Galluzzi, I. Vitale, S. Warren [et al.] // *J. Immunother. Cancer.* – 2020. – Vol. 8. – P. e000337.

109. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death / O. Kepp, L. Senovilla, I. Vitale [et al.] // *Oncoimmunology.* – 2014. – Vol. 3. – P. e955691.

110. Copper (II) complexes as potential anticancer and Nonsteroidal antiinflammatory agents: In vitro and in vivo studies / F.M. Husain, A. Alsalme, M.A. Siddiqui [et al.] // *Scientific. Reports.* – 2019. – Vol. 9. – P. 5237.

111. Copper Complexes as Anticancer Agents Targeting Topoisomerases I and II / C. Molinaro, A. Martoriati, L. Pelinski, K. Cailliau // *Cancers.* – 2020. – Vol. 12. – P.

2863.

112. Course and predictors of post-traumatic stress disorder in a cohort of psychologically distressed patients with cancer: a 4-year follow-up study / C. Chan, C. Ng, N. Taib [et al.] // *Cancer*. – 2018. – Vol. 15, № 124 (2). – P. 406-416.

113. Critical role for CD103⁺/CD141⁺ dendritic cells bearing CCR7 for tumor antigen trafficking and priming of T cell immunity in melanoma / E.W. Roberts, M.L. Broz, M. Binnewies [et al.] // *Cancer Cell*. – 2016. – Vol. 30. – P. 324–336.

114. CXCR2 inhibition profoundly suppresses metastases and augments immunotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma / C.W. Steele, S.A. Karim, J.D. Leach [et al.] // *Cancer Cell*. – 2016. – Vol. 29. – P. 832–845.

115. Cytotoxic effects of Mn(III) N-alkylpyridylporphyrins in the presence of cellular reductant, ascorbate / X. Ye, D. Fels, A. Tovmasyan [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2011. – Vol. 45. – P. 1289–1306.

116. Darnell, R.B. Paraneoplastic syndromes involving the nervous system / R.B. Darnell, J.B. Posner // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – Vol. 349. – P. 1543–1554.

117. De Silva, N.S. Dynamics of B cells in germinal centres / N.S. De Silva, U. Klein // *Nat. Rev. Immunol.* – 2015. – Vol. 15. – P. 137–148.

118. Densely granulated murine NK cells eradicate large solid tumors / R.B. Liu, B. Engels, A. Arina [et al.] // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72. – P. 1964–1974.

119. Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway / V.S. Viswanathan, M.J. Ryan, H.D. Dhruv [et al.] // *Nature*. – 2017. – Vol. 547. – P. 453–7.

120. Design, Mechanism of Action, Bioavailability and Therapeutic Effects of Mn Porphyrin-Based Redox Modulators / A. Tovmasyan, H. Huaxin Sheng, T. Weitner [et al.] // *Med. Princ. Pract.* – 2013. – Vol. 22. – P. 103–130.

121. Development of novel Cu(I) compounds with vitamin B1 derivative and their potential application as anticancer drugs / P. Brandão, S. Guieu, A. Correia-Branco [et al.] // *Inorg. Chim. Acta.* – 2019. – Vol. 487. – P. 287–294.

122. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved Issues / M. Bost, S. Houdart, M. Oberli [et al.] // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 2016. – Vol. 35. –

P. 107–115.

123. Differential cytotoxicity of Mn (II) and Mn(III): Special reference to mitochondrial [Fe-S] containing enzymes / J.-Y. Chen, G.C. Tsao, Q. Zhao, W. Zheng // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 175. – P. 160–168.

124. Doble, P.A. Distributions of manganese in diverse human cancers provide insights into tumour radioresistance / P.A. Doble, G.L.G. Miklos // *Metallomics.* – 2018. – Vol. 10. – P. 1191–1210.

125. Donskov, F. Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials / F. Donskov // *Semin. Cancer. Biol.* – 2013. – Vol. 23. – P. 200–207.

126. Drago, S.R. Minerals / S.R. Drago // *Nutraceutical and Functional Food Components.* – 2017. – P. 129-157. – DOI: 10.1016/B978-0-12-805257-0.00005-3.

127. Dranoff, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy / G. Dranoff // *Nat. Rev. Cancer.* – 2004. – Vol. 4. – P. 11–22.

128. Drug-Tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition / M.J. Hangauer, V.S. Viswanathan, M.J. Ryan [et al.] // *Nature.* – 2017. – Vol. 551. – P. 247–50.

129. Enhancement of natural killer cell activity and interferon production by manganese in young mice / R. Smialowicz, M.M. Riddle, R.R. Rogers [et al.] // *Immunopharmacology.* – 1988. – Vol. 10. – P. 93-107.

130. Eradication of established tumors by CD8+ T cell adoptive immunotherapy. / H.L. Hanson, D.L. Donermeyer, H. Ikeda [et al.] // *Immunity.* – 2000. – Vol. 13. – P. 265–276.

131. Evidence that Human Prostate Cancer is a ZIP1-Deficient Malignancy that could be Effectively Treated with a Zinc Ionophore (Clioquinol) Approach / L.C. Costello, R.B. Franklin, J. Zou, M.J. Naslund // *Chemotherapy.* – 2015. – Vol. 4. – P. 152.

132. Exacerbation of diabetes-induced testicular apoptosis by zinc deficiency is most likely associated with oxidative stress, p38 MAPK activation, and p53 activation in mice / Y. Zhao, Y. Tan, J. Dai [et al.] // *Toxicol. Lett.* – 2011. – Vol. 200. – P. 100–106.

133. FDA approval summary: pembrolizumab for treatment of metastatic non-small cell lung cancer: first-line therapy and beyond / L. Pai-Scherf, G.M. Blumenthal, H. Li [et al.] // *Oncologist*. – 2017. – Vol. 22. – P. 1392–1399.
134. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death / S.J. Dixon, K.M. Lemberg, M.R. Lamprecht [et al.] // *Cell*. – 2012. – Vol. 149. – P. 1060–72.
135. Ferroptosis: past, present and future / J. Li, F. Cao, H-liang Yin [et al.] // *Cell. Death. Dis.* – 2020. – Vol. 11. – P. 1–13.
136. FLT1 signaling in metastasis-associated macrophages activates an inflammatory signature that promotes breast cancer metastasis / B.Z. Qian, H. Zhang, J. Li [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2015. – Vol. 212. – P. 1433–1448.
137. Fox, J.M. Minerals and Trace Elements in Microalgae / J.M. Fox, P.V. Zimba. – *Microalgae Health Dis. Prevent*, 2018. – P. 177-193.
138. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias / G.S. Devi, M.H. Prasad, I. Saraswathi [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2000. – Vol. 293. – P. 53–62.
139. Friedmann Angeli, J.P. Ferroptosis at the crossroads of cancer-acquired drug resistance and immune evasion / J.P. Friedmann Angeli, D.V. Krysko, M. Conrad // *Nat. Rev. Cancer.* – 2019. – Vol. 19. – P. 405–14.
140. From the Cover: Manganese Stimulates Mitochondrial H₂O₂ Production in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells over Physiologic as well as Toxicologic Range / J. Fernandes, L. Hao, K.M. Bijli [et al.] // *Toxicol. Sci.* – 2017. – Vol. 155. – P. 213–223.
141. Gharibzahedi, S.M.T. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation / S.M.T. Gharibzahedi, S.M. Jafari // *Trends Food Sci. Technol.* – 2017. – Vol. 62. – P. 119-132.
142. Gonzalez, H. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression T / H. Gonzalez, C. Hagerling, Z. Werb // *Genes Dev.* – 2018. – Vol. 32. – P. 1267–1284.
143. Graur, V. Synthesis, structure and biological activity of N(4)-ALLYL-3-thiosemicarbazones and their coordination compounds with some 3 d-metals / V. Graur // *Studia universitatis Moldaviae. Seria: slinle reale si ale nature II.* – 2015. – Vol. 86,

№6. – P. 130–141.

144. Growth modulatory role of zinc in prostate cancer and application to cancer therapeutics / P.K. To, M.H. Do, J.-H. Cho, C. Jung // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21. – P. 2991.

145. Gunter, T.E. The case for manganese interaction with mitochondria / T.E. Gunter, C.E. Gavin, K.K. Gunter // *Neurotoxicology.* – 2009. – Vol. 30. – P. 727–729.

146. Gupta, U.C. Sources and Deficiency Diseases of Mineral Nutrients in Human Health and Nutrition: A Review / U.C. Gupta, S.C. Gupta // *Pedosphere.* – 2014. – Vol. 24, № 1. – P. 14-38.

147. Haas, K. L. Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology / K.L. Haas, K.J. Franz // *Chem. Rev.* – 2009. – Vol. 109, № 10. – P. 4921–4960.

148. Haase, H. Signal transduction in monocytes: the role of zinc ions / H. Haase, L. Rink // *Biometals.* – 2007. – Vol. 20. – P. 579.

149. Hall, C.S. Emotional behavior in the rat. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality / C.S. Hall // *J. Comp. Psychol.* – 1934. – Vol. 18, № 3. – P. 385-403.

150. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell.* – 2011. – Vol. 144. – P. 646–74.

151. Hgg-04. zinc enhances temozolomide cytotoxicity in pediatric glioblastoma multiforme model system / A. Toren, M. Yalon, A. Dafni, R. Mehrian-Shai // *Neuro-Oncol.* – 2020. – Vol. 22. – P. iii344–iii345.

152. High Copper Complex Stability and Slow Reduction Kinetics as Key Parameters for Improved Activity, Paraptosis Induction, and Impact on Drug-Resistant Cells of Anticancer Thiosemicarbazones / S. Hager, V.F.S. Pape, V. Pósa [et al.] // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2020. – Vol. 33, № 6. – P. 395-414.

153. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity / V. Shankaran, H. Ikeda, A.T. Bruce [et al.] // *Nature.* – 2001. – Vol. 410. – P. 1107–1111.

154. Immune function is impaired in irondeficient, homebound, older women / N.

- Ahluwalia, J. Sun, D. Krause [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2004. – Vol. 79. – P. 516-521.
155. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy / D.V. Krysko, A.D. Garg, A. Kaczmarek [et al.] // *Nat. Rev. Cancer.* – 2012. – Vol. 12. – P. 860–75.
156. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease / L. Galluzzi, A. Buquй, O. Kepp [et al.] // *Nat. Rev. Immunol.* – 2017. – Vol. 17. – P. 97–111.
157. Immunogenic cell death in cancer therapy / G. Kroemer, L. Galluzzi, O. Kepp [et al.] // *Annu. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 51–72.
158. Immunogenic cell death in cancer therapy: present and emerging inducers / J. Zhou, G. Wang, Y. Chen [et al.] // *J. Cell. Mol. Med.* – 2019. – Vol. 23. – P. 4854–65.
159. Immunosurveillance and immunotherapy of tumors by innate immune cells / A. Iannello, T.W. Thompson, M. Ardolino [et al.] // *Curr. Opin. Immunol.* – 2016. – Vol. 38. – P. 52–58.
160. Immunotherapy targeting immune check-point(s) in brain metastases / A.M. Di Giacomo, M. Valente, A. Covre [et al.] // *Cyt. Growth Factor.* – 2017. – Vol. 36. – P. 33–38.
161. In vitro and vivo evaluation of effects of Mg-6Zn alloy on tight junction of intestinal epithelial cell / S. Yu, X.-H. Wang, Y.-G. Chen [et al.] // *Trans. Nonferrous. Met. Soc. China.* – 2015. – Vol. 25, № 11. – P. 3760–3766.
162. Increased infiltration of natural killer and T cells in colorectal liver metastases improves patient overall survival / M. Donadon, K. Hudspeth, M. Cimino [et al.] // *J. Gastrointest. Surg.* – 2017. – Vol. 21. – P. 1226–1236.
163. Increased levels of superoxide and H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation / N. Aykin-Burns, I.M. Ahmad, Y. Zhu [et al.] // *Biochem. J.* – 2009. – Vol. 418. – P. 29–37.
164. Inhibition of apoptosis by Zn²⁺ in renal tubular cells following ATP depletion / Q. Wei, J. Wang, M.-H. Wang [et al.] // *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* – 2004. – Vol. 287. – P. F492–F500.
165. Innate immune landscape in early lung adenocarcinoma by paired single-cell analyses / Y. Lavin, S. Kobayashi, A. Leader [et al.] // *Cell.* – 2017. – Vol. 169. – P. 750–765.e17.

166. Intracellular zinc distribution in mitochondria, ER and the Golgi apparatus / Q. Lu, H. Haragopal, K.G. Slepchenko [et al.] // *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* – 2016. – Vol. 8. – P. 35–43.
167. Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity / E.O. Hileman, J. Liu, M. Albitar [et al.] // *Canc. Chem. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 53. – P. 209–219.
168. Jacobson, A.E. Refractory cytopenias secondary to copper deficiency in children receiving exclusive jejunal nutrition / A.E. Jacobson, S.B. Kahwash, A. Chawla // *Pediatr. Blood. Cancer.* – 2017. – Vol. 64, № 11. – DOI: 10.1002/pbc.26617.
169. Jarosz, S.A. The effect of feed supplementation with a copper-glycine chelate and copper sulphate on selected humoral and cell-mediated immune parameters in broiler chickens / S.A. Jarosz // *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* – 2018. – Vol. 102. – P. 326-336.
170. Jeannin, P. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells / P. Jeannin, S. Jaillon, Y. Delneste // *Curr. Opin. Immunol.* – 2008. – Vol. 20. – P. 530–537.
171. Jocelyn H., Bruce-Gregorios *Histopathologic Techniques* / Bruce-Gregorios Jocelyn H. – JMC Press Inc., Quezon City, Philippines, 1974. – 600 pp. – ISBN 978-1521524701.
172. Kaczmarek, A. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance / A. Kaczmarek, P. Vandenabeele, D.V. Krysko // *Immunity.* – 2013. – Vol. 38. – P. 209–23.
173. Kawai, T. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors / T. Kawai, S. Akira // *Nat. Immunol.* – 2010. – Vol. 11. – P. 373–384.
174. Kitamura, T. Immune cell promotion of metastasis / T. Kitamura, B.Z. Qian, J.W. Pollard // *Nat. Rev. Immunol.* – 2015. – Vol. 15. – P. 73–86.
175. Kolaczkowska, E. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation / E. Kolaczkowska, P. Kubes // *Nat. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 13. – P. 159–175.

176. Linder, M.C. Ceruloplasmin and other copper binding components of blood plasma and their functions / M.C. Linder // *Metallomics*. – 2016. – Vol. 8. – P. 887–905.
177. Liu, Ya. Cancer and Innate Immune System Interactions: Translational Potentials for Cancer Immunotherapy / Ya. Liu, G. Zeng // *J. Immunother.* – 2012. – Vol. 35, № 4. – P. 299–308.
178. Lomako, V.V. Blood Leukocyte Indices in Male Rats of Different Ages / V.V. Lomako // *Advan. Gerontol.* – 2020. – Vol. 10, № 2. – P. 135–141.
179. Lossow, K. Are trace element concentrations suitable biomarkers for the diagnosis of cancer? / K. Lossow, M. Schwarz, A.P. Kipp // *Redox. Biol.* – 2021. – Vol. 42. – P. 101900.
180. Lysosomal Zn²⁺ release triggers rapid, mitochondria-mediated, non-apoptotic cell death in metastatic melanoma / W. Du, M. Gu, M. Hu [et al.] // *Cell. Rep.* – 2021. – Vol. 37. – P. 109848.
181. Macrophage contact induces RhoA GTPase signaling to trigger tumor cell intravasation / M. Roh-Johnson, J.J. Bravo-Cordero, A. Patsialou [et al.] // *Oncogene*. – 2014. – Vol. 33. – P. 4203–4212.
182. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes / A. Mantovani, S. Sozzani, M. Locati [et al.] // *Trends Immunol.* – 2002. – Vol. 23. – P. 549–555.
183. Maham, L.K. / Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. / L.K. Maham, S. Escott-Stump, J.L. Raymond. – Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2012. – 13^a edição. – ISBN: 978-85-352-5512-6.
184. MALDI-TOF-MS analysis in discovery and identification of serum proteomic patterns of ovarian cancer / A. Swiatly, A. Horala, J. Hajduk [et al.] // *BMC CANCER*. – 2017. – Vol. 17. – P. 472.
185. Manganese homeostasis at the host-pathogen interface and in the host immune system / Q. Wu, Z. Xia, J. Min, F. Wang // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2021. – Vol. 5. – P. 1-9.
186. Manganese Increases the Sensitivity of the cGAS-STING Pathway for Double-Stranded DNA and Is Required for the Host Defense against DNA Viruses / C.

Wang, Y. Guan, M. Lv [et al.] // *Immunity*. – 2018. – Vol. 48, № 4. – P. 675-687.

187. Manganese Inhibits Viability of Prostate Cancer Cells / B. Hernroth, I. Holm, A. Gondikas, H. Tassidis // *Anticancer Res. J.* – 2018. – Vol. 38, № 1. – P. 137-145.

188. Manganese is critical for antitumor immune responses via cGAS-STING and improves the efficacy of clinical immunotherapy / M. Lv, M. Chen, R. Zhang [et al.] // *Cell Res.* – 2020. – Vol. 30. – P. 966–979.

189. Manganese superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 contribute to the rise and fall of mitochondrial reactive oxygen species which drive oncogenesis / D.N. Ekoue, C. He, A.M. Diamond, M.G. Bonini // *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* – 2017. – Vol. 1858. – P. 628–632.

190. Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics / S. Miriyala, I. Spasojevic, A. Tovmasyan [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1822. – P. 794–814.

191. Many faces of DAMPs in cancer therapy / O. Krysko, T. Luvve Aaes, C. Bachert [et al.] // *Cell. Death. Dis.* – 2013. – Vol. 4. – P. e631.

192. Mechanisms of internalization of apoptotic and necrotic L929 cells by a macrophage cell line studied by electron microscopy / D.V. Krysko, G. Brouckaert, M. Kalai [et al.] // *J. Morphol.* – 2003. – Vol. 258. – P. 336–45.

193. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death / T. Panaretakis, O. Kepp, U. Brockmeier [et al.] // *Embo J.* – 2009. – Vol. 28. – P. 578–90.

194. Mediation of a non-proteolytic activation of complement component C3 by phospholipid vesicles / Y. Klapper, O.A. Hamad, Y. Teramura [et al.] // *Biomaterials.* – 2014. – Vol. 35, № 11. – P. 3688–3696.

195. Metalloimmunology: The metal ion-controlled immunity / C. Wang, R. Zhang, X. Wei [et al.] // *Adv. Immunol.* – 2020. – Vol. 145. – P. 187–241.

196. Metallopharmaceuticals in Therapy - A New Horizon for Scientific Research / A. Chylewska, M. Biedulska, P. Sumczynski, M. Makowski // *Cur. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 25, № 15. – P. 1729-1791.

197. Metallothionein and zinc homeostasis during tumor progression / J.C.

Philcox, M.H. Tilley, P. Coyle, A.M. Rote // *Biol. Trace Elem. Res.* – 1994. – Vol. 40. – P. 295-308.

198. Metastatic latency and immune evasion through autocrine inhibition of WNT / S. Malladi, D.G. Macalinao, X. Jin [et al.] // *Cell.* – 2016. – Vol. 165. – P. 45–60.

199. Mildner, A. Development and function of dendritic cell subsets / A. Mildner, S. Jung // *Immunity.* – 2014. – Vol. 40. – P. 642–656.

200. Molybdenum Metallopharmaceuticals Candidate Compounds - The "Renaissance" of Molybdenum Metallodrugs? / A. Jurowska, K. Jurowski, J. Szklarzewicz [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 23, № 29. – P. 3322-3342.

201. Moreira-Pais, A. Platinum-induced muscle wasting in cancer chemotherapy: Mechanisms and potential targets for therapeutic intervention / A. Moreira-Pais, R. Ferreira, R. Gil da Costa // *Life Sci.* – 2018. – Vol. 208. – P. 1-9.

202. Mufti, A.R. XIAP: cell death regulation meets copper Homeostasis / A.R. Mufti, E. Burstein, C.S. Duckett // *Arch Biochem Biophys.* – 2007. – Vol. 463. – P. 168–74.

203. Naive tumor-specific CD4(+) T-cells differentiated in vivo eradicate established melanoma / Y. Xie, A. Akpınarli, C. Maris [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2010. – Vol. 207. – P. 651-667.

204. Nakatsumi, H. Noncanonical pathway for regulation of CCL2 expression by an mTORC1–FOXK1 axis promotes recruitment of tumor-associated macrophages / H. Nakatsumi, M. Matsumoto, K.I. Nakayama // *Cell Rep.* – 2017. – Vol. 21. – P. 2471–2486.

205. Nano-targeted induction of dual ferroptotic mechanisms eradicates high-risk neuroblastoma / B. Hassannia, B. Wiernicki, I. Ingold [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2018. – Vol. 128. – P. 3341–55.

206. Necroptosis in development, inflammation and disease / R. Weinlich, A. Oberst, H.M. Beere [et al.] // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2017. – Vol. 18. – P. 127–36.

207. Necroptotic cell death in anti-cancer therapy / O. Krysko, T.L. Aaes, V.E. Kagan [et al.] // *Immunol. Rev.* – 2017. – Vol. 280. – P. 207–19.

208. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor

growth / A.M. Houghton, D.M. Rzymkiewicz, H. Ji [et al.] // *Nat. Med.* – 2010. – Vol. 16. – P. 219–223.

209. Neutrophil extracellular traps promote the development and progression of liver metastases after surgical stress / S. Tohme, H.O. Yazdani, A.B. Al-Khafaji [et al.] // *Cancer Res.* – 2016. – Vol. 76. – P. 1367–1380.

210. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis / J. Cools-Lartigue, J. Spicer, B. McDonald [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2013. – Vol. 123. – P. 3446–3458.

211. New copper(II) niflumate complexes with N-donor ligands: synthesis, characterization and evaluation of anticancer potential against human cell lines / S. Kumar, R.P. Sharma, P. Venugopalan [et al.] // *Inorg. Chim. Acta.* – 2019. – Vol. 488. – P. 260-268.

212. NK cells stimulate recruitment of cDC1 into the tumor microenvironment promoting cancer immune control / J.P. Bottcher, E. Bonavita, P. Chakravarty [et al.] // *Cell.* – 2018. – Vol. 172. – P. 1022–1037.e14.

213. Nodera, M. Increased apoptosis in a variety of tissues of zinc-deficient rats / M. Nodera, H. Yanagisawa, O. Waldce // *Life Sce.* – 2001. – Vol. 69, № 14. – P.1639-1649.

214. Novel role for the Golgi membrane protein TMEM165 in control of migration and invasion for breast carcinoma / P. Murali, B.P. Johnson, Z. Lu [et al.] // *Oncotarget.* – 2020. – Vol. 11. – P. 2747–2762.

215. Noy, R. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy / R. Noy, J.W. Pollard // *Immunity.* – 2014. – Vol. 41. – P. 49–61

216. Ostrand-Rosenberg, S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity / S. Ostrand-Rosenberg // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2008. – Vol. 18. – P. 11–18.

217. Overview of the biogenic elements. Complex formation in biological systems; methodical instructions for 1st year students' self-work in Medical Chemistry / A.O. Syrovaya, T.S. Tishakova, E.V. Savelieva [et al.]. – Kharkiv: KhNMU, 2017. – 38 p.

218. Papayannopoulos, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease / V. Papayannopoulos // *Nat. Rev. Immunol.* – 2018. – Vol. 18. – P. 134–147.
219. Pelicano, H. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications / H. Pelicano, D. Carney, P. Huang // *Drug. Resist. Updat.* – 2004. – Vol 7. – P. 97–110.
220. Persistent oxidative stress in human colorectal carcinoma, but not in adenoma / S. Kondo, S. Toyokuni, Y. Iwasa [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – Vol. 27. – P. 401–410.
221. Pkm2 inhibitor shikonin overcomes the cisplatin resistance in bladder cancer by inducing necroptosis / Y. Wang, F. Hao, Y. Nan [et al.] // *Int. J. Biol. Sci.* – 2018. – Vol. 14. – P. 1883–91.
222. Potent drug candidature of an ONS donor tethered copper (II) complex: Anticancer activity, cytotoxicity and spectroscopically approached BSA binding studies / M. Kongot, D. Reddy, V. Singh [et al.] // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2019. – Vol. 212. – P. 330–342.
223. Prasad, A.S. Molecular Mechanisms of Zinc as a Pro-Antioxidant Mediator: Clinical Therapeutic Implications / A.S. Prasad, B. Bao // *Antioxidants.* – 2019. – Vol. 8. – P. 164.
224. Promoting effect of neutrophils on lung tumorigenesis is mediated by CXCR2 and neutrophil elastase / L. Gong, A.M. Cumpian, M.S. Caetano [et al.] // *Mol. Cancer.* – 2013. – Vol. 12. – P. 154.
225. Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy / P. Gotwals, S. Cameron, D. Cipolletta [et al.] // *Nat. Rev. Cancer.* – 2017. – Vol. 17. – P. 286–301.
226. Ras activation induces expression of Raet1 family NK receptor ligands / X.V. Liu, S.S. Ho, J.J. Tan [et al.] // *J. Immunol.* – 2012. – Vol. 189. – P. 1826–1834.
227. Rational bases for the use of the Immunoscore in routine clinical settings as a prognostic and predictive biomarker in cancer patients / A. Kirilovsky, F. Marliot, C. El Sissy [et al.] // *Int. Immunol.* – 2016. – Vol. 28. – P. 373–382.

228. Recognition and prevention of tumor metastasis by the NKreceptor NKp46/NCR1 / A. Glasner, H. Ghadially, C. Gur [et al.] // *J. Immunol.* – 2012. – Vol. 188. – P. 2509–2515.
229. Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective / S.J. Gardai, D.L. Bratton, C.A. Ogden [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 2006. – Vol. 79. – P. 896–903.
230. Recognition of the nonclassicalMHCclass I molecule H2-M3 by the receptor Ly49A regulates the licensing and activation of NK cells / D.M. Andrews, L.C. Sullivan, N. Baschuk [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2012. – Vol. 13. – P. 1171–1177.
231. Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. / A. Marcus, B.G. Gowen, T.W. Thompson [et al.] // *Adv. Immunol.* – 2014. – Vol. 122. – P. 91–128.
232. Recombinant HLA-G5 and -G6 drive U937 myelomonocytic cell production of TGF- β 1 / R.H. McIntire, P.J. Morales, M.G. Petroff [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* - 2004. – Vol. 76. – P. 1220–1228.
233. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10 / T.H. Ng, G.J. Britton, E.V. Hill [et al.] // *Front. Immunol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 129.
234. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor / D.H. Raulet, S. Gasser, B.G. Gowen [et al.] // *Annu. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 413–441.
235. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues / Y. Lavin, A. Mortha, A. Rahman, M. Merad // *Nat. Rev. Immunol.* – 2015. – Vol. 15. – P. 731–744.
236. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces / Y.P. Rubtsov, J.P. Rasmussen, E.Y. Chi [et al.] // *Immunity* – 2008. – Vol. 28. – P. 546–558.
237. Regulatory T cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures suppress anti-tumor T cell responses / N.S. Joshi, E.H. Akama-Garren, Y. Lu [et al.] // *Immunity*. – 2015. – Vol. 43. – P. 579–590.
238. Reilly, C. *The Nutritional Trace Metals* / C. Reilly. – Brisbane, Australia: Blackwell Publishing Ltd, 2004. – 356 pp.
239. Resistance to hypoxia-induced necroptosis is conferred by glycolytic

pyruvate scavenging of mitochondrial superoxide in colorectal cancer cells / C.-Y. Huang, W.-T. Kuo, Y.-C. Huang [et al.] // *Cell. Death. Dis.* – 2013. – Vol. 4. – P. e622.

240. Review on the Serum Electrolytes and Trace Elements Role in the Pathophysiology of COVID-19 / M. Taheri, A. Bahrami, P. Habibi, F.A. Nouri // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2020. – Vol. 8. – P. 1-7.

241. Rink, L. Zinc and the immune system / L. Rink, P. Gabriel // *Proc. Nutr. Soc.* – 2000. – Vol. 59, № 4. – P. 541-552.

242. Role of myeloid cells in tumor angiogenesis and growth / F. Shojaei, C. Zhong, X. Wu [et al.] // *Trends. Cell. Biol.* – 2008. – Vol. 18. – P. 372–378.

243. Rosenberg, S.A. Progress in human tumour immunology and immunotherapy / S.A. Rosenberg // *Nature.* – 2001. – Vol. 411. – P. 380–384.

244. Rudolf, E. Increases in Intracellular Zinc Enhance Proliferative Signaling as well as Mitochondrial and Endolysosomal Activity in Human Melanocytes / E. Rudolf, K. Rudolf // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2017. – Vol. 43. – P. 1–16.

245. Sahu, A. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity / A. Sahu, J.D. Lambris // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 180. – P. 35–48.

246. Sensi, S.L. Mitochondrial sequestration and Ca²⁺-dependent release of cytosolic Zn²⁺ loads in cortical neurons / S.L. Sensi, D. Ton-That, J.H. Weiss // *Neurobiol. Dis.* – 2002. – Vol. 10. – P. 100–108.

247. Sensors for measuring subcellular zinc pools / P. Chabosseau, J. Woodier, R. Cheung, G.A. Rutter // *Metallomics.* – 2018. – Vol. 10. – P. 229–239.

248. Serum and whole blood Zn, Cu and Mn profiles and their relation to redox status in lung cancer patients / K. Zabłocka-Słowinska, S. Płaczkowska, A. Prescha [et al.] // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 2018. – Vol. 45. – P. 78–84.

249. Serum copper levels are associated with bone mineral density and total fracture / X. Qu, Z. He, H. Qiao [et al.] // *J. Orthop. Translat.* – 2018. – Vol. 14. – P. 34-44.

250. Serum peptidome profiling for the diagnosis of colorectal cancer: discovery and validation in two independent cohorts / H. Wang, C.Luo, S. Zhu [et al.] // *Oncotarget.*

– 2017. – Vol. 8, № 35. – P. 59376-59386.

251. Speiser, D.E. Regulatory circuits of T cell function in cancer / D.E. Speiser, P.C. Ho, G. Verdeil // *Nat. Rev. Immunol.* – 2016. – Vol. 16. – P. 599–611.

252. Structural Characterization of the Ceruloplasmin: Lactoferrin Complex in Solution / A. Sabatucci, P. Vachette, V.B. Vasilyev [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 371, № 4. – P. 1038–1046.

253. Synthesis of four binuclear copper(II) complexes: Structure, anticancer properties and anticancer mechanism / J. Qi, S. Liang, Y. Gou [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 96. – P. 360-368.

254. Szatrowski, T.P. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells / T.P. Szatrowski // *Cancer. Res.* – 1991. – Vol. 51. – P. 794–798.

255. T helper 17 cells play a critical pathogenic role in lung cancer / S.H. Chang, S.G. Mirabolfathinejad, H. Katta [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2014. – Vol. 111. – P. 5664–5669.

256. Targeting the overproduction of peroxynitrite for the prevention and reversal of paclitaxel-induced neuropathic pain / T. Doyle, Z. Chen, C. Muscoli [et al.] // *J. Neurosci.* – 2012. – Vol. 32. – P. 6149–6160.

257. Texaphyrins: tumor localizing redox active expanded porphyrins / J.F. Arambula, C. Preihs, D. Borthwick [et al.] // *Anticancer Agents Med. Chem.* – 2011. – Vol. 11. – P. 222–232.

258. The association of pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio with response rate, progression free survival and overall survival of patients treated with sunitinib for metastatic renal cell carcinoma / D. Keizman, M. Ish-Shalom, P. Huang [et al.] // *Eur. J. Cancer.* – 2012. – Vol. 48. – P. 202–208.

259. The correlation and role analysis of SLC30A1 and SLC30A10 in cervical carcinoma / J. Zhang, X.-W. Chen, L.-S. Shu, C.-D. Liu // *J. Cancer.* – 2022. – Vol. 13. – P. 1031–1047.

260. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome / W.H. Fridman, F. Pages, C. Sautes-Fridman, J. Galon // *Nat. Rev. Cancer.* – 2012. – Vol. 12. – P. 298–306.

261. The Role of the Metabolism of Zinc and Manganese Ions in Human Cancerogenesis / J.M. Rozenberg, M. Kamynina, M. Sorokin [et al.] // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10, № 5. – P. 1072.
262. The Tick-Over Theory Revisited: Formation and Regulation of the Soluble Alternative Complement C3 Convertase (C3(H₂O)Bb) / F. Bexborn, P.O. Andersson, H. Chen [et al.] // *Mol. Immunol.* – 2008. – Vol. 45, № 8. – P. 2370–2379.
263. Three-dimensional structure of p21 in the active conformation and analysis of an oncogenic mutant / F. Wittinghofer, U. Krengel, J. John [et al.] // *Environ. Health Perspect.* – 1991. – Vol. 93. – P. 11-15.
264. Tissue and Serum Trace Elements Concentration among Colorectal Patients: A Systematic Review of Case-Control Studies / A.M. Nawi, S.-F. Chin, S. Azhar Shah R. Jamal // *Iran. J. Public. Health.* – 2019. – Vol. 48. – P. 632–643.
265. Toyokuni, S. Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation / S. Toyokuni // *Biotherapy.* – 1998. – Vol. 11. – P. 147–154.
266. Trace Element and Heavy Metal Levels in Colorectal Cancer: Comparison between Cancerous and Non-cancerous Tissues / M. Sohrabi, A. Gholami, M.H. Azar, [et al.] // *Biol. Trace. Elem. Res.* – 2018. – Vol. 183. – P. 1–8.
267. Trace Minerals in Human Health: Iron, Zinc, Copper, Manganese and Fluorine / C. Sousa, C. Moutinho, A.F. Vinha, C. Matos // *Ijsrm. Human.* – 2019. – Vol. 13, № 3. – P. 57-80.
268. TRPM7 senses oxidative stress to release Zn²⁺ from unique intracellular vesicles / S.A. Abiria, G. Krapivinsky, R. Sah [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2017. – Vol. 114. – P. E6079–E6088.
269. Tumoral immune cell exploitation in colorectal cancer metastases can be targeted effectively by anti-CCR5 therapy in cancer patients / N. Halama, I. Zoernig, A. Berthel [et al.] // *Cancer Cell* – 2016. – Vol. 29. – P. 587–601.
270. Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis / J.M. Tran Janco, P. Lamichhane, L. Karyampudi, K.L. Knutson // *J. Immunol.* – 2015. – Vol. 194. – P. 2985–2991.
271. Tumor-targeting novel manganese complex induces ROS-mediated

apoptotic and autophagic cancer cell death / Liu Jia, Guo Wenjie, Li Jing [et al.] // *Creat. Comm. Tribut.* – 2015. – Vol. 20. – P. 607-616.

272. Tumour-activated neutrophils in gastric cancer foster immune suppression and disease progression through GM-CSF–PD-L1 pathway / T.T. Wang, Y.L. Zhao, L.S. Peng [et al.] // *Gut.* – 2017. – Vol. 66. – P. 1900–1911.

273. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology / A. Mantovani, F. Marchesi, A. Malesci [et al.] // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol. 14. – P. 399–416.

274. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors / M.S. Diamond, M. Kinder, H. Matsushita [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2011. – Vol. 208. – P. 1989–2003.

275. Vaccination with early ferroptotic cancer cells induces efficient antitumor immunity / I. Efimova, E. Catanzaro, L. Van der Meeren [et al.] // *J. Immunother. Cancer.* – 2020. – Vol. 8. – P. e001369.

276. Vandenameele, P. Immunogenic apoptotic cell death and anticancer immunity / P. Vandenameele, K. Vandecasteele, C. Bachert. – Springer, Cham, 2016. – P. 133–49.

277. Visualization of immediate immune responses to pioneer metastatic cells in the lung / M.B. Headley, A. Bins, A. Nip [et al.] // *Nature.* – 2016. – Vol. 531. – P. 513–517.

278. Ward-Hartstonge, K.A. Regulatory T-cell heterogeneity and the cancer immune response / K.A. Ward-Hartstonge, R.A. Kemp // *Clin. Transl. Immunology.* – 2017. – Vol. 6. – P. e154.

279. Williams, R.J. Zinc in evolution / R.J. Williams // *J. Inorg. Biochem.* – 2012. – Vol. 111. – P. 104-109.

280. Zheng, W. Manganese inhibits mitochondrial aconitase: A mechanism of manganese neurotoxicity / W. Zheng, S. Ren, J.H. Graziano // *Brain. Res.* – 1998. – Vol. 799. – P. 334–342.

281. Zinc enhances temozolomide cytotoxicity in glioblastoma multiforme model systems / A. Toren, T. Pismenyuk, M. Yalon [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7. – P.

74860–74871.

282. Zinc irreversibly damages major enzymes of energy production and antioxidant defense prior to mitochondrial permeability transition / I.G. Gazaryan,; I.P. Krasinskaya, B.S. Kristal, A.M. Brown // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282. – P. 24373–24380.