

На правах рукописи

КИРЕЕВА
Елена Альфредовна

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

3.3.3. – Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Симферополь – 2023

Работа выполнена в Институте «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»; Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Князева Ольга Александровна, доктор биологических наук, доцент.

Научный консультант:

Фомочкина Ирина Ивановна, доктор медицинских наук, доцент.

Официальные оппоненты:

Котиева Инга Мовлиевна, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Ростовский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры патологической физиологии.

Цейликман Вадим Эдуардович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)», заведующий лабораторией перспективных исследований молекулярных механизмов стресса высшей медико-биологической школы

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____ 2023 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета 24.2.318.01 в Институте «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» (295051 г. Симферополь, бульвар Ленина, 5/7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» (295051, г. Симферополь, бульвар Ленина, 5/7) и на сайте <http://cfuv.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета 24.2.318.01,
доктор медицинских наук, доцент

Зяблицкая Евгения Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Литературные данные последних 10-15 лет показывают, что перспективным методом профилактики и лечения неопластических образований является сочетание классических методов с использованием иммуотропных 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 3d-металлы играют не только важную роль в регуляции иммунитета, но имеют также тесное взаимодействие с процессами онкогенеза, апоптоза, иммуногенеза (Efimova I. et al., 2020; Rozenberg J.M. et al., 2022). Образуя координационные соединения с физиологически активными молекулами, ионы переходных металлов формируют в структуре этих молекул новые активные центры, изменяющие реакционную способность, и, следовательно, биологические свойства соединений (Esfahani K. et al., 2019).

Соединения 3d-металлов с полидентатным лигандом D-глюконовой кислотой – органической кислотой природного происхождения, ранее были изучены в разноплановых экспериментах *in vitro* и *in vivo*, которые продемонстрировали их иммуотропные 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. Практически не изучено действие соединений 3d-металлов с глюконовой кислотой, в комплексе с которой увеличивается биодоступность и снижается токсичность 3d-металлов, при неопластических процессах. Поэтому исследование механизмов действия глюконатов 3d-металлов на индуцированную миелому является актуальной проблемой.

Цель исследования – 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. 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 работы. 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 и снижением показателей прогрессирования миеломы, что может быть одним из 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 стрессового расстройства.

Полученные в диссертационной работе результаты могут быть использованы для продолжения исследований эффектов соединений 3d-металлов, а также в лечебно-профилактической терапии неопластических процессов.

Результаты работы внедрены в учебный процесс и научно-

исследовательскую работу кафедры факультетской терапии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и кафедры общей и клинической патофизиологии Института «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского».

Методы исследования. Применяли методы моделирования патологических процессов: индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14, иммуносупрессии и стрессового расстройства; методы введения препаратов лабораторным животным: глюконатов 3d-металлов, цитостатика циклофосамида, иммуномодулятора глюкозаминилмурамилдипептида (ликопида) и кальция глюконата. 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 нейтрофилов, оценивали поведенческие функции мышей BALB/c на фоне индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 с использованием теста «Открытое поле». Цифровой материал подвергали статистической обработке.

Все лабораторные исследования проведены на сертифицированном оборудовании.

Основные положения, 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 циклофосамидом: 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 корригирующее действие на их поведенческие реакции, что свидетельствует о механизме противоопухолевого действия, опосредованного стабилизирующим действием на нейроиммунную ось.

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

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 автора в исследование. 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 исследования, формулировка цели и задач, анализ и представление основных результатов в научных публикациях проводились совместно с научным руководителем.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 научных работ, отражающих основные результаты: 1 статья в журнале, индексируемом в международной базе Scopus; 3 статьи в научных журналах, входящих в перечень ВАК Российской Федерации, 6 статей в рецензируемых журналах, 7 публикаций в сборниках материалов конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, глав с описанием материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения и выводов. Текст изложен на 174 страницах машинописного текста, включает 9 таблиц, 55 рисунков. Библиографический указатель содержит 282 источника (76 отечественных и 206 зарубежных).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. Диссертационное исследование выполнено на 328 мышах линии BALB/c, самцах, 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). Содержание животных, вывод из эксперимента, забор крови и другого биоматериала проводили в соответствии с положением Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным, которое соответствует положениям, принятым в Российской Федерации (МЗ РФ от 19 июня 2003 г. № 267).

В работе использовали 3 экспериментальные модели: 1 – индуцированной миеломы Sp 2/0 Ag14 (Открытое акционерное общество «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения», Москва) путем однократного внутрибрюшинного введения 10^6 клеток/мышь в среде RPMI-1640 (HyClone); 2 – иммуносупрессии, путем однократного внутрибрюшинного введения препарата циклофосфида («Бакстер АГ», Швейцария) в дозе 50 мг/кг (Конкина И.Г. и др., 2002); 3 – стрессового расстройства, путем ежедневного в течение 3 недель контакта с запахом кошачьей мочи (Кондашевская М.В. и др., 2017).

Во всех разделах работы использовали глюконаты 3d-металлов (MG1), где М – Mn / Fe / Co / Cu / Zn в концентрации 10^{-2} моль/л, рассчитанной по иону металла, которые вводили либо в виде композиционного комплекса, либо по отдельности с помощью желудочного зонда по 0,18-0,2 мл раствора на мышь, в зависимости от веса животного, в течение 3 недель. MG1 синтезированы в лаборатории физико-химических методов анализа Уфимского института химии УФИЦ РАН (Конкина И.Г. и др., 2002, 2003).

В качестве препаратов сравнения на 1 этапе использовали эфирные масла лаванды настоящей и шалфея мускатного (НПФ «Царство ароматов», Крым), которые вводили мышам с индуцированной миеломой в соотношении 2:1 в течение 3 недель путем аэрофитотерапии при 80°C до концентрации 4-5 мг/м³. На 2 этапе: глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП) / «ликопид» (ООО «Пептек», Россия) в дозе 0,025 мг/мл и кальция глюконат (раствор для инъекций, АО БИННОФАРМ, Россия) в дозе 22 мг/мл, которые вводили перорально в течение 3 недель. На 3 и 4 этапах в качестве препарата сравнения использовали цитостатик циклофосфамид («Бакстер АГ», Швейцария), который вводили внутрибрюшинно по 0,1 мл (0,12 мг / мышь), в течение трех недель.

Мыши контрольных групп получали дистиллированную воду в том же объеме.

Концентрацию компонентов комплемента в сыворотках крови 32 больных с ходжкинскими и неходжкинскими лимфомами и 16 здоровых доноров и (ГБУЗ РБ Республиканский клинический онкологический диспансер, г. Уфа), а также мышей определяли с помощью метода ИФА, используя тестовые наборы (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург).

В крови мышей рассчитывали лейкоцитарные индексы: индекс стрессорной активности (ИСА), лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ), ядерный индекс степени эндотоксикоза (ЯИСЭ), индекс сдвига лейкоцитов (ИСЛ).

Влияние MG1 на миелому Sp 2/0 Ag14 у мышей BALB/c оценивали в момент их вывода из эксперимента на 22 сутки от начала эксперимента: часть животных декапитировали под эфирным наркозом и отбирали кровь в стерильные пробирки с ЭДТА, затем проводили отбор асцитической жидкости, опухолевых образований и органов (печень, легкие, почки, селезенка, сердце). Остальных животных продолжали наблюдать в течение 3 месяцев.

Морфологическое исследование опухолевых образований и органов проводили по методике, включающей фиксацию материала, вырезку и проводку за счет обезвоживания и пропитки парафином, изготовление срезов и окраску с последующей микроскопией и изготовлением микрофотографий (Joselyn H., Bruce-Gregorios, M.D, 1974). 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.

Поглотительную активность нейтрофилов в крови определяли по фагоцитарному числу (ФЧ), фагоцитарному индексу (ФИ), интегральному фагоцитирующему индексу (ИФИ). Оценку метаболической активности проводили по показателям НСТ-теста: спонтанного (сп НСТ) и стимулированного латексом (ст НСТ). Определяли также показатели, характеризующие интенсивность метаболических и биоэнергетических процессов: средний цитохимический коэффициент в спонтанном тесте (сп СЦК), средний цитохимический коэффициент в стимулированном латексом тесте (ст СЦК) и индекс стимуляции (ИС).

Влияние MG1 на поведенческие реакции мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag 14 оценивали с помощью теста «Открытое поле».

Статистическую обработку результатов проводили непараметрическими методами с применением программ «Microsoft Excel» и «Statistica 10.0». Взаимосвязь между показателями прогрессии индуцированной миеломы и фагоцитарной активности нейтрофилов выявляли с помощью расчета коэффициентов ранговой корреляции Спирмена. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние 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.

Исследование проводили в сыворотках крови 4 групп мышей BALB/c: 1 – интактные; 2 – с индуцированной миеломой без лечения; 3 – с индуцированной миеломой после терапии эфирных масел (препарата сравнения); 4 – с индуцированной миеломой после введения композиции глюконатов 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn).

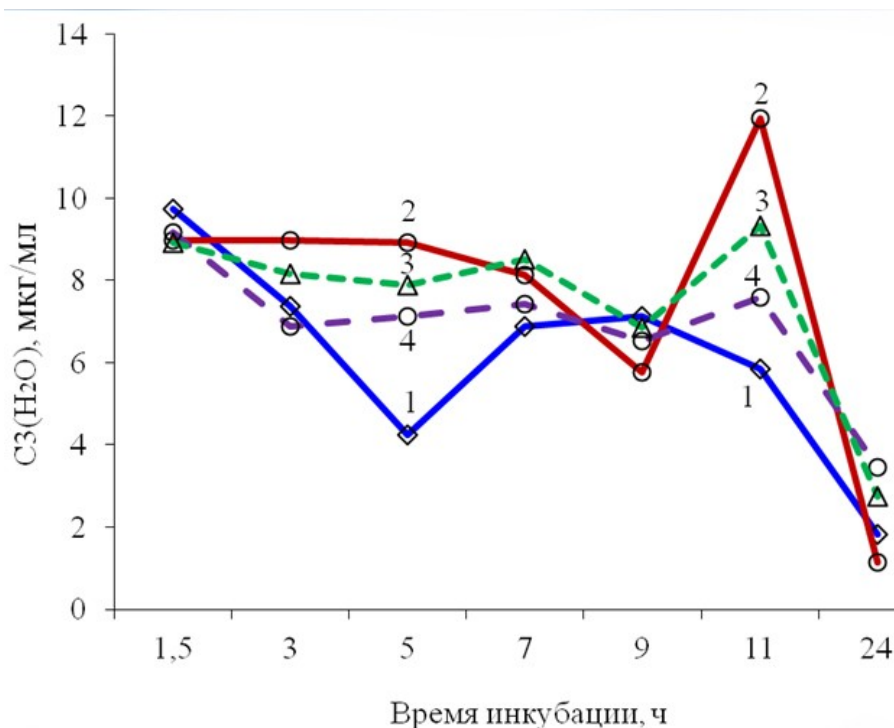


Рисунок 1. – Уровень C3(H₂O) компонента комплемента при инкубации сыворотки крови мышей BALB/c: 1 – интактные; 2 – с индуцированной миеломой без лечения; 3 – с индуцированной миеломой после ингаляционного введения эфирных масел (препарат сравнения); 4 – с индуцированной миеломой после введения композиции глюконатов 3d-металлов.

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

Корректирующее действие MGI на профиль спонтанного гидролиза C3 компонента комплемента показано на рисунке 1. Наибольшие отличия между 1 и 2 группами наблюдались через 5 и 11 часов инкубации ($p < 0,05$). После проведения терапии разница с контролем значительно сокращалась: после введения глюконатов 3d-металлов – в 1,6 раз (эффективнее в 1,2 раза по сравнению с эфирными маслами, $p < 0,05$). Через 9 часов инкубации сыворотки

крови разность между показателями в 1, 3 и 4 группах практически нивелировалась.

При этом происходило снижение другого оценочного критерия компонента – 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 $(2,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}$.

Сопоставление полученных результатов с результатами в сыворотках крови больных при лимфопролиферативных заболеваниях (Князева О.А., Киреева Е.А., 2018; 2019; 2021), а также с данными литературы, в которых доказывается взаимосвязь коррекции профиля гидролиза СЗ компонента в сыворотках крови онкобольных с положительной динамикой курса полихимиотерапии (Сакаева Д.Д. и др., 2002; Князева О.А. и др., 2007), указывает на то, что корригирующее действие глюконатов 3d-металлов, связано, с их иммуотропными свойствами.

2. Влияние глюконатов 3d-металлов на реактивность иммунной системы у мышей BALB/c при моделированной иммуносупрессии.

Таблица 1.

Влияние глюконатов 3d-металлов на лейкоцитарные индексы при иммуносупрессии мышей циклофосфамидом (ЦФ)

№	Группа, n=12	Показатель	Индекс стрессорной активности	Лейкоцитарный индекс интоксикации	Ядерный индекс степени эндотоксикоза	Индекс сдвига лейкоцитов
1	Контроль интактные	Me [Q ₁ –Q ₃]	3,11 [2,97–3,41]	0,32 [0,29–0,34]	0,09 [0,08–0,11]	0,32 [0,30–0,36]
2	ЦФ без лечения	Me [Q ₁ –Q ₃]	5,82 [5,53–6,19] ¹	0,19 [0,17–0,21] ¹	0,175 [0,15–0,19] ¹	0,21 [0,19–0,22] ¹
3	ЦФ+ ГМДП	Me [Q ₁ –Q ₃]	4,72 [4,3–5,1] ^{1,2,4,5,7–9}	0,21 [0,19–0,24] ^{1,2,5,9}	0,15 [0,14–0,17] ^{1,2,8}	0,22 [0,20–0,24] ^{1,5,8,9}
4	ЦФ+ CaGl	Me [Q ₁ –Q ₃]	4,81 [4,4–5,2] ^{1,2,5,7–9}	0,21 [0,19–0,22] ^{1,2,5,7–9}	0,17 [0,15–0,20] ^{1,5,9}	0,21 [0,19–0,24] ^{1,5,8,9}
5	ЦФ+ MnGl	Me [Q ₁ –Q ₃]	3,29 [2,96–3,64] ^{2,6–9}	0,31 [0,28–0,32] ^{2,6–9}	0,13 [0,12–0,15] ^{1,2,6–8}	0,32 [0,30–0,36] ^{2,6–9}
6	ЦФ+ FeGl	Me [Q ₁ –Q ₃]	4,65 [4,22–	0,22 [0,20–	0,165 [0,16–	0,23 [0,22–

			4,96] ^{1,2,9}	0,24] ^{1,2,9}	0,18] ^{1,9}	0,25] ^{1,2,9}
7	ЦФ+ CoGl	Me [Q ₁ –Q ₃]	4,2 [3,95– 4,74] ^{1,2}	0,23 [0,22– 0,25] ^{1,2}	0,165 [0,15– 0,18] ^{1,9}	0,23 [0,22– 0,25] ^{1,2,9}
8	ЦФ+ CuGl	Me [Q ₁ –Q ₃]	4,33 [3,78– 4,53] ^{1,2}	0,23 [0,22– 0,25] ^{1,2}	0,185 [0,17– 0,20] ^{1,9}	0,26 [0,24– 0,27] ^{1,2}
9	ЦФ+ ZnGl	Me [Q ₁ –Q ₃]	3,98 [3,67– 4,27] ^{1,2}	0,24 [0,22– 0,25] ^{1,2}	0,14 [0,13– 0,16] ^{1,2}	0,27 [0,24– 0,28] ^{1,2}

Примечание: ^{1–9}различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с группами 1–9

Исследование проводили в 9 группах мышей BALB/c по 12 особей в каждой: 1 — интактные, 2 — введение ЦФ без лечения, 3 — группа сравнения с введением ЦФ и иммуностимулятора 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).

Лейкоцитарные индексы для интактных животных заметно изменялись после применения ЦФ, но под действием MGl происходила коррекция этих значений, степень которой достоверно ($p < 0,05$) превышала степень коррекции под действием препаратов сравнения ГМДП и CaGl (табл. 1).

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.

На основании полученных результатов был сделан вывод о том, что MGl повышают реактивность иммунной системы, при этом наиболее высокая эффективность выявлена у MnGl, далее следуют ZnGl и CuGl.

3. Влияние 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.

Исследование проводили в течение 3 месяцев в 5 группах мышей BALB/c по 20 особей в каждой: 1 – с индуцированной миеломой без лечения (контроль), 2 – с индуцированной миеломой и введением препарата сравнения ЦФ, 3-5 – с индуцированной миеломой после терапии глюконатами марганца (3), меди (4) и цинка (5).

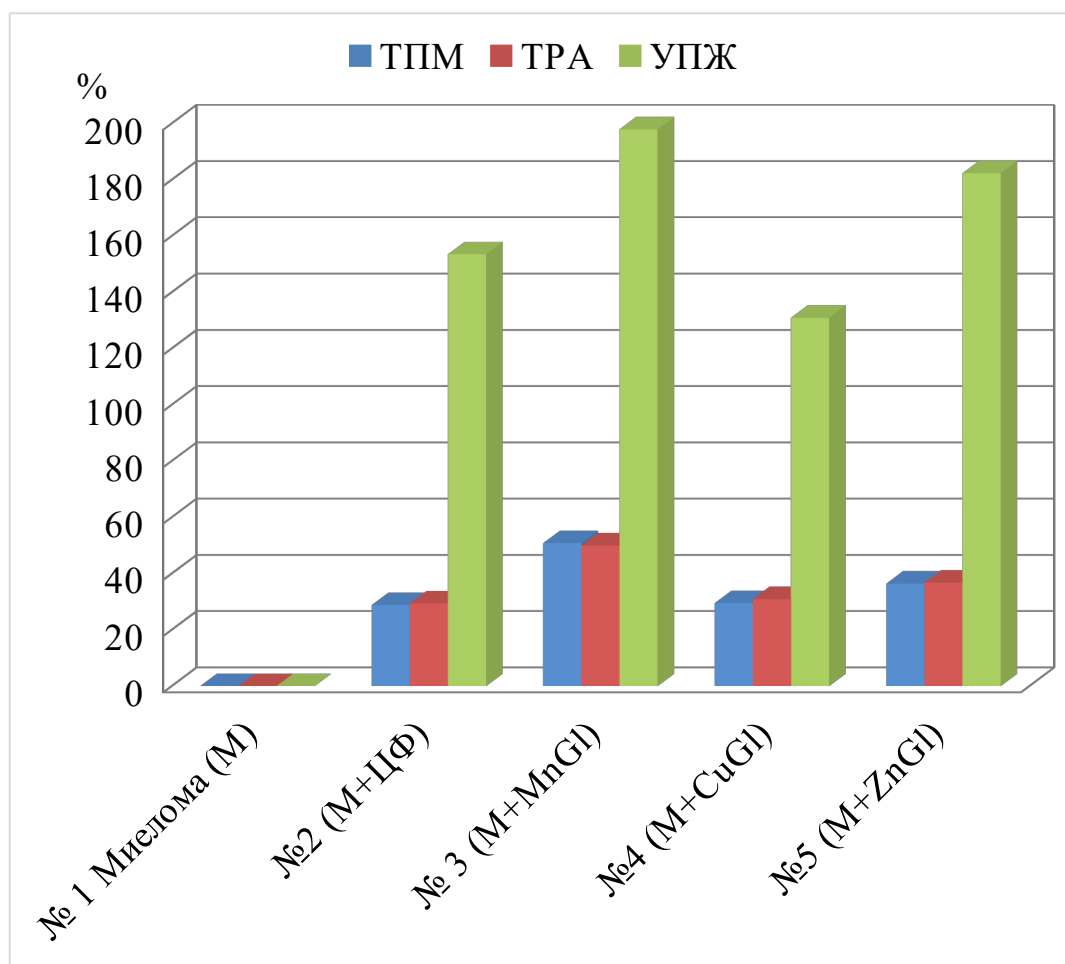


Рисунок 2. – Влияние глюконатов 3d-металлов на торможение развития асцита (ТРА), торможение прироста массы тела (ТПМ) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ) у мышей BALB/c с экспериментальной миеломой Sp2/0 Ag14 (М).

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.

Определение прогрессии индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 проводили по показателям прироста массы тела, увеличения объема асцита и медианы продолжительности жизни животных. Затем рассчитывали торможение прироста массы тела (ТПМ), торможение развития асцита (ТРА) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ) (Трещалина Е.М. и др., 2005).

На рисунке 2 продемонстрированы ингибирующие эффекты действия глюконатов марганца, меди и цинка на прогрессию индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c.

Результаты данного 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. Наибольшая эффективность выявлена у глюконата марганца.

Проведенное морфологическое исследование показало, что клетки миеломы Sp2/0 Ag14, введенные в брюшную полость, разрастаются путем

инфильтрации вокруг кровеносных сосудов брыжейки (рис. 3). Инфильтрация трансформированных клеток может быть диффузной или очаговой (рис. 4).

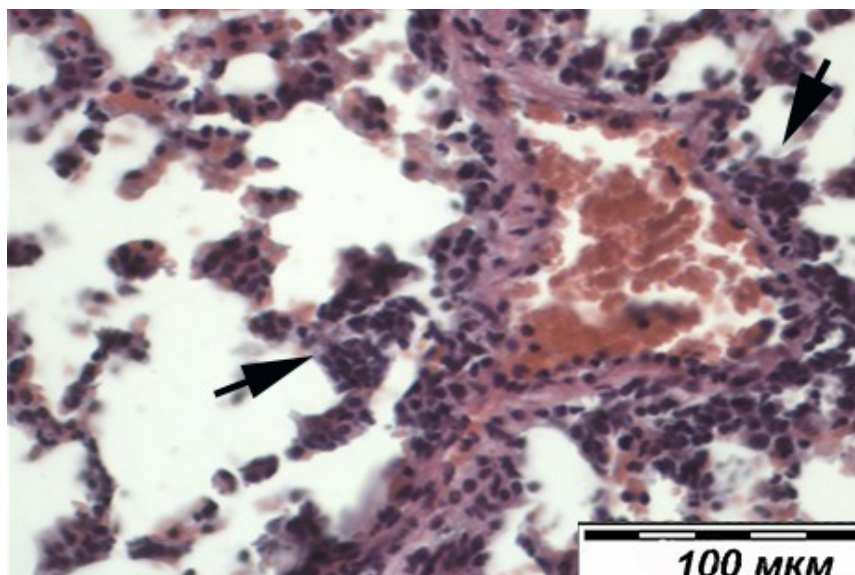


Рисунок 3. – Фрагмент опухолевого образования мышцы из группы с индуцированной миеломой без лечения (контроль). Визуализируется выраженная инфильтрация лимфоидных клеток вокруг кровеносного сосуда и в стенке ячеистых структур опухоли (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$.

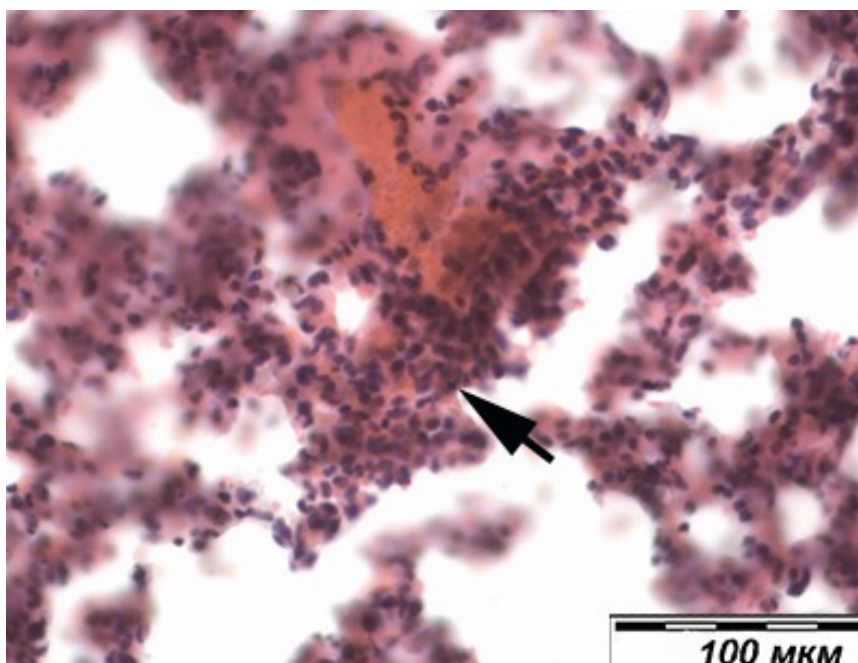


Рисунок 4. – Фрагмент опухолевого образования мышцы из группы с индуцированной миеломой после терапии циклофосфамидом. Визуализируется групповое и диффузное расположение лимфоидных клеток (стрелка) опухоли после терапии циклофосфамидом. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$.

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 имели.

Т.о., исследуемые глюконаты 3d-металлов ингибируют развитие индуцированной миеломы, что, вероятно, связано с их иммуномодулирующими свойствами, препятствующими формированию опухолевой ниши с толерантным к опухоли микроокружением.

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

Исследование проводили в течение трех недель в 6 группах мышей BALB/c: 1 – интактные, 2-6 – с индуцированной миеломой; 2 – с индуцированной миеломой без лечения; 3 – с индуцированной миеломой и введением препарата сравнения ЦФ; 4 – с индуцированной миеломой и введением MnGl; 5 – с индуцированной миеломой и введением CuGl, 6 – с индуцированной миеломой и введением ZnGl.

На рисунках 5-7 продемонстрировано, что в крови мышей с индуцированной миеломой без лечения (группа 2) поглотительная активность нейтрофилов относительно контрольной группы (группа 1) снижалась следующим образом: ФЧ – на 51,2%, ФИ – на 51,5%, ИФИ – на 63,2%. Показатели метаболической активности также снижались: сп НСТ и ст НСТ на 41,7% и 61,6%; сп СЦК и ст СЦК – на 42,9% и 66,7%; ИС – на 28% ($p<0,05$).

В группе сравнения, в которой мыши получали ЦФ (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 ($p<0,05$). Относительно группы 2 поглотительная активность также 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% ($p<0,05$).

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) ($p<0,05$).

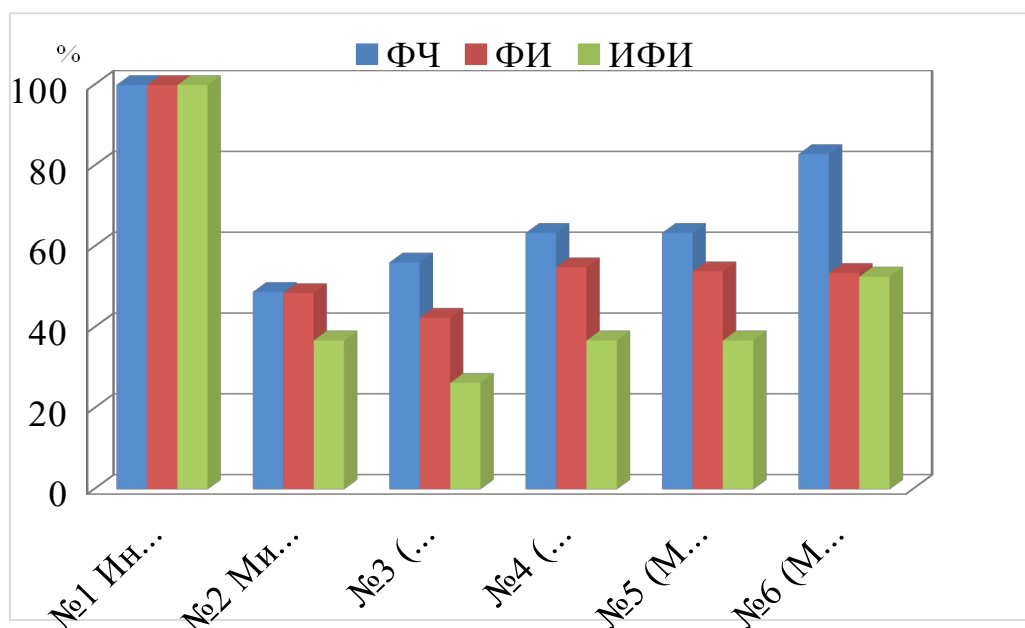


Рисунок 5. – Показатели поглотительной активности фагоцитов (ФЧ, ФИ, ИФИ) после курса введения мышам с индуцированной миеломой (М) глюконатов 3d-металлов (MnGl, CuGl, ZnGl) и циклофосаида (ЦФ) в сравнении с контрольными группами (№1 и №2).

Примечание. Отличия статистически значимы: ФЧ – [p₁₋₍₂₋₅₎, p₂₋₍₄₋₆₎, p₃₋₍₄₋₆₎; p₄₋₆; p₅₋₆] <0,05; ФИ – [p₁₋₍₂₋₆₎, p₃₋₍₄₋₆₎] <0,05; ИФИ – [p₁₋₍₂₋₆₎, p₂₋₃, p₂₋₆, p₃₋₍₄₋₆₎; p₄₋₆; p₅₋₆] <0,05

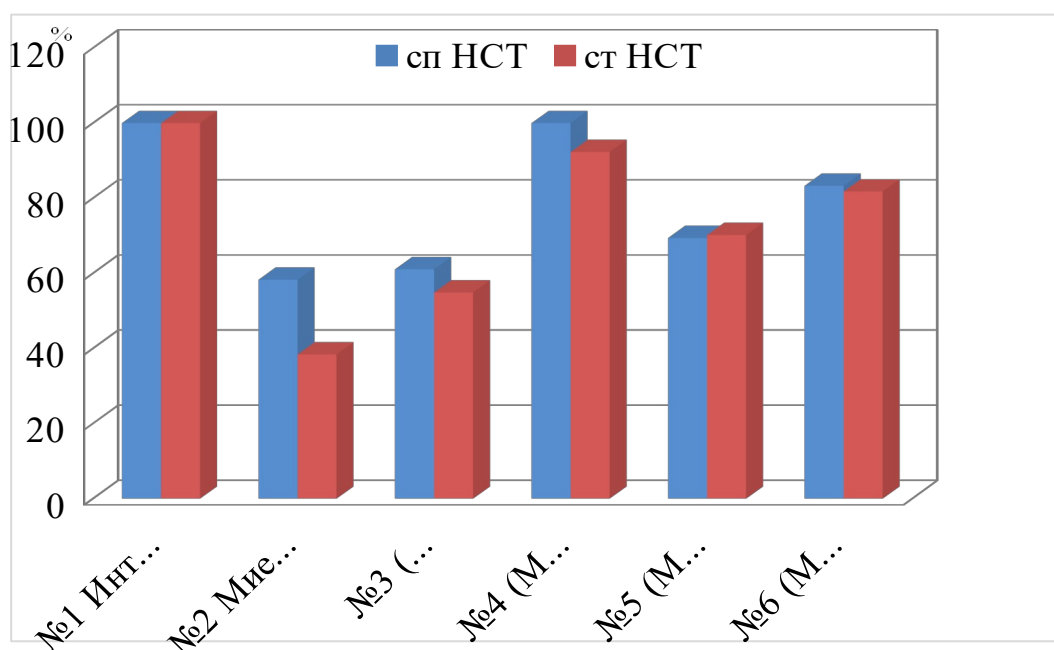


Рисунок 6. – Показатели метаболической активности фагоцитов (сп НСТ и ст НСТ) после курса введения мышам с индуцированной миеломой (М) глюконатов 3d-металлов (MnGl, CuGl, ZnGl) и циклофосаида (ЦФ) в сравнении с контрольными группами (№1 и №2).

Примечание. Отличия статистически значимы: сп НСТ – [p₁₋₍₂₋₆₎, p₂₋₍₄₋₆₎] <0,05; ст НСТ – [p₁₋₍₂₋₆₎, p₂₋₍₃₋₆₎] <0,05

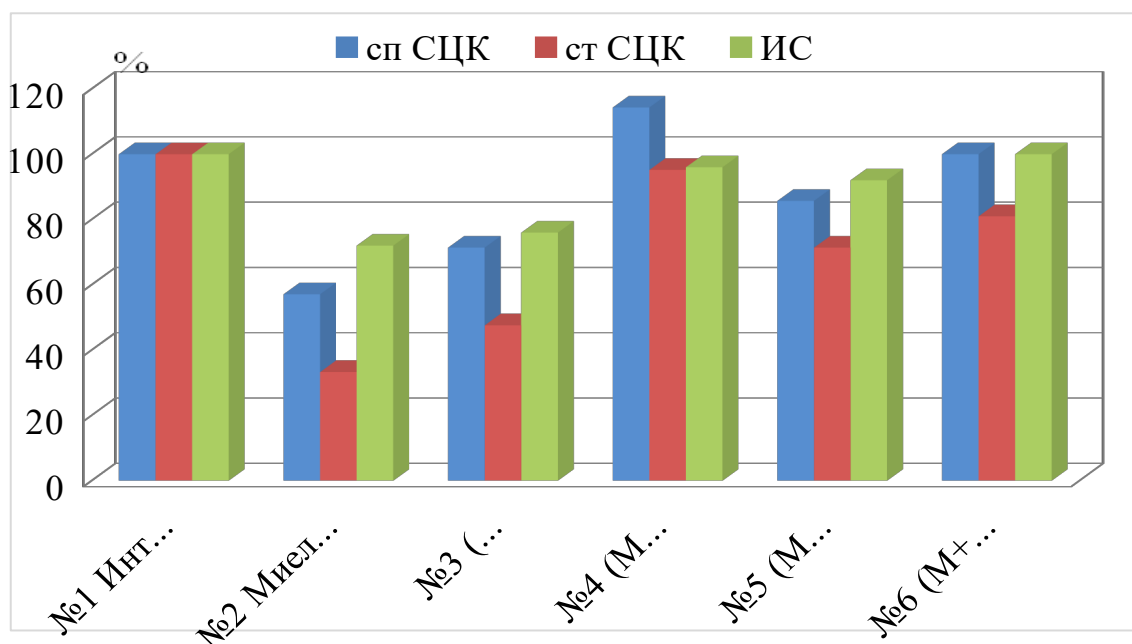


Рисунок 7. – Показатели цитохимических коэффициентов (сп СЦК, ст СЦК) и индекса стимуляции (ИС) после курса введения мышам с индуцированной миеломой (М) глюконатов 3d-металлов (MnGl, CuGl, ZnGl) и циклофосфамида (ЦФ) в сравнении с контрольными группами (№1 и №2).

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

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. После введения препарата сравнения циклофосфамида обнаружена корреляционная связь между снижением показателей ИФИ и приростом массы тела ($r_s=0,68$, $p=0,03$), что указывает на зависимость роста 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 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. Корреляционная связь выявлена также между увеличением показателя ст СЦК, отображающего активность энергетических ресурсов ферментных систем нейтрофилов и снижением прироста массы тела после терапии глюконатом цинка ($r_s=0,64$; $p=0,05$).

5. Влияние глюконата марганца на поведенческие реакции у мышей BALB/c с индуцированной миеломой Sp 2/0 Ag14 на фоне экспериментального стрессового расстройства.

Исследование проводили в течение 3 недель в 6 группах мышей BALB/c по 12 особей в каждой: 1 – интактные; 2 – с моделированным стрессовым расстройством (CP), 3 – с индуцированной миеломой (M), 4 – с индуцированной миеломой на фоне CP (M+CP), 5 – с индуцированной миеломой на фоне CP и введением композиции глюконатов 3d-металлов (M+CP+MGI); 6 – с индуцированной миеломой на фоне CP и введением глюконата марганца (M+CP+ MnGI).

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).

Как показано на рисунке 8, при CP (группа 2) у мышей происходило снижение горизонтальной, вертикальной и ориентировочно-исследовательской двигательной активности. Эмоциональные реакции (груминг и количество дефекаций), напротив, повышались ($p < 0,05$).

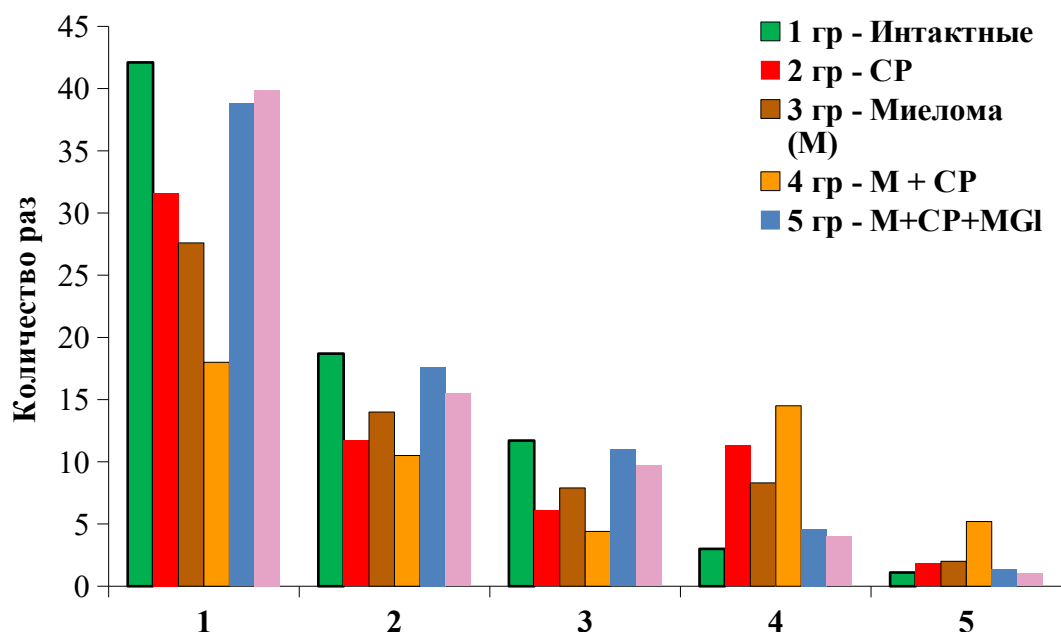


Рисунок 8. – Влияние глюконата марганца (MnGI) и композиции глюконатов 3d-металлов (MGI) на показатели теста «Открытое поле» (ОП) у мышей BALB/c с индуцированной миеломой (M) на фоне стрессового расстройства (CP): 1 - пересеченные квадраты; 2 - вертикальная стойка; 3 - заглядывание за край ОП; 4 - груминг; 5 - количество дефекаций. *Примечание.* Отличия статистически значимы: 1 – [$p_{1-(2-6)}$, $p_{2-(3-6)}$, $p_{3-(4-6)}$; $p_{4-(5-6)}$] < 0,05; 2 – [$p_{1-(2-4)}$, $p_{2-(3;5;6)}$, $p_{3-(4;5)}$, $p_{4-(5;6)}$] < 0,05; 3 – [$p_{1-(2-4;6)}$, $p_{2-(3;6)}$, $p_{3-(4-6)}$, $p_{4-(5;6)}$] < 0,05; 4 – [$p_{1-(2-4;6)}$, $p_{2-(3;4;6)}$, $p_{3-(4-6)}$, $p_{4-(5;6)}$] < 0,05; 5 – [$p_{1-(2-5)}$, $p_{2-(4-6)}$, $p_{3-(4-6)}$, $p_{4-(5;6)}$, p_{5-6}] < 0,05

В группе мышей с индуцированной миеломой на фоне СР (группа 4) данные показатели изменялись еще более значимо, чем в группе 3 ($p < 0,05$). После введения глюконатов 3d-металлов (группы 5 и 6) наблюдалась коррекция показателей в сторону интактных животных. Действие MnGI на основной индекс эмоциональности (уровень дефекаций), а также показатели горизонтальной и вертикальной активности оказалось более эффективным, чем у композиционного препарата, и не отличалось от интактных животных. Отсутствие статистически значимых отличий с группой мышей, которым вводилась композиция MGI (за исключением уровня дефекаций), скорее всего, связано с присутствием MnGI в его составе.

На основании суммы полученных результатов предполагается, 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. 9).



Рисунок 9. – Патогенетическая схема механизмов действия глюконатов 3d-металлов на торможение индуцированной миеломы Sp2/0 Ag14 у мышей BALB/c.

ВЫВОДЫ

1. Глюконаты 3d-металлов оказывают корригирующее 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 корригирующее 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации

1. 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; URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27698>; DOI: 10.17513/spno.27698.

2. Соотношение про- и противовоспалительных цитокинов в терминальной стадии рака молочной железы / О.А. Князева, **Е.А. Киреева**, Л.М. Газдалиева, Л.М. Саптарова // Проблемы медицинской микологии. – 2018. – Т.20, № 2. – С. 78–79.

3. Влияние глюконатов 3d-металлов на лейкоцитарные показатели эндогенной интоксикации / О.А. Князева, **Е.А. Киреева**, И.Г. Конкина, С.И. Уразаева, Л.М. Газдалиева, Ю.И. Муринов // Казанский медицинский журнал. – 2022. – Т.103, № 3. – С. 427–433; DOI: 10.17816/KMJ2022-427.

4. 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, Л.М. Газдалиева, И.Г. Конкина // Современные проблемы науки и образования. – 2022. – № 4. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=31952>; DOI: 10.17513/spno.31952.

Статьи в других изданиях

5. Профиль гидролиза C3 компонента комплемента – биохимический маркер онкопатологии? / О.А. Князева, **Е.А. Киреева** // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2018. – № 4. – С. 96–100.
6. Эндогенная интоксикация у онкологических больных / Г.А. Мухаметшина, **Е.А. Киреева** // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2018. – № 3. – С. 11–18.
7. Антиоксидантные и иммуномодулирующие свойства глюконата кобальта (II) как возможный механизм его противоопухолевого действия / А.И. Гареева, **Е.А. Киреева**, О.А. Князева // Международный студенческий научный вестник. – 2018. – № 4 – 3. – С. 452–455.
8. Цитокиновый профиль при онкопатологии *in vivo*, возможность коррекции / О.А. Князева, **Е.А. Киреева**, Л.М. Газдалиева, Л.М. Саптарова // Современные проблемы биохимии, генетики и биотехнологии: материалы II Всероссийской научной конференции с международным участием. Уфа: РИЦ БашГУ. – 2018. – С. 95–97.
9. Влияние иммунокорректирующей терапии на некоторые показатели системы комплемента / О.А. Князева, **Е.А. Киреева** // В сборнике: 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. – 2019. – С. 52–55.
10. Изменение активности супероксиддисмутазы и миелопероксидазы у больных с онкопатологией / **Е.А. Киреева**, Д.Н. Овсяк, В.А. Чумак // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2019. – № S1. – С. 708–713.
11. Продукция цитокинов, как оценочный критерий терапии при раке молочной железы / Гареева А.И., **Е.А. Киреева** // Научное обозрение. Педагогические науки. – 2019. – № 5, ч. 3. – С. 40–42.
12. Влияние соединений 3d-металлов с глюконовой кислотой на белок-белковые взаимодействия *in vitro* / О.А. Князева, **Е.А. Киреева**, С.И. Уразаева // АСТА NATURAE (русскоязычная версия). – 2019. – Т.11, № S2. – С. 103–104.
13. Роль гепсидина в метаболизме ионов железа / Р.Р. Загитов, Р.А. Халикова, **Е.А. Киреева**, О.А. Князева // Журнал "European Journal of Natural History". – 2020. – № 4. – С. 44–47.
14. [Активность ферментов про-антиоксидантной системы у больных с онкопатологией, как возможный оценочный критерий тяжести заболевания](#) / Д.Н. Овсяк, В.А. Чумак, **Е.А. Киреева**, О.А. Князева // В сборнике: Студенческий научный форум. Материалы Международной студенческой научной конференции. Москва. – 2020. – С. 35–37.
15. 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; <http://dx.doi.org/10.26787/nydha-2713-203X-2021-2-1-23-27>.

16. Цитокины как прогностические факторы при терапии злокачественных новообразований / О.А. Князева, **Е.А. Киреева** // НАУЧНЫЕ ТРУДЫ. – Т.2. – М.: Издательство «Перо». – 2021. – С.67.

17. Взаимосвязь окислительного и иммунного гомеостаза в условиях иммунодефицита / О.А. Князева, С.И. Уразаева, **Е.А. Киреева** // В сборнике: Современные проблемы науки и образования. Материалы международных научных конференций, проведенных Академией Естествознания (Международной ассоциацией ученых, преподавателей и специалистов). Москва. – 2021. – С. 94–95.

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ГМДП – иммуностимулятор глюкозаминилмурамилдипептид в виде препарата ликопад

ИС – индекс стимуляции

ИФА – иммуноферментный анализ

ИФИ – интегральный фагоцитарный индекс

сп НСТ – спонтанный тест с нитросиним тетразолием

ст НСТ – стимулированный тест с нитросиним тетразолием

ОП – открытое поле

сп СЦК – средний цитохимический коэффициент в спонтанном тесте

ст СЦК – средний цитохимический коэффициент в стимулированном тесте

ФИ – фагоцитарный индекс

ФЧ – фагоцитарное число

ЦФ – циклофосфамид

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

МГ1 – глюконаты 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn)