

*На правах рукописи*

**УРАЗАЕВА**

**Сабина Ильясовна**

**ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ И  
МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ГЛЮКОНАТОВ 3d-МЕТАЛЛОВ  
ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ ИММУНОДЕФИЦИТЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

03.01.04 – Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Уфа – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор **Князева Ольга Александровна**

**Официальные оппоненты:**

**Бородулин Владимир Борисович**, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой биохимии

**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 «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г. в \_\_\_\_ на заседании диссертационного совета Д 208.084.05 при ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, по адресу: 390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, 34, корп. 2) и на сайте [www.rzgmu.ru](http://www.rzgmu.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат медицинских наук

Короткова Н.В.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность исследования**

Большинство описанных в литературе функций 3d-металлов изучены на их неорганических солях, поэтому эта информация противоречива, особенно, для биохимических эффектов, оказывающих влияние на иммунитет.

Применение 3d-металлов в медицине долгое время сдерживалось острой токсичностью их неорганических солей. Однако, хелатирование свободных ионов металла полидентатными лигандами, в частности, глюконовой кислотой, превращает их в устойчивые, не способные нарушить гомеостаз живого организма малотоксичные частицы, поскольку они формируют в структуре этих молекул новые активные центры, изменяющие в целом биологические свойства соединения (Конкина И.Г. и др., 2007; Кудрин А.В., 2007; Князева О.А. и др., 2008; Graur V., 2015).

Изучение биохимических основ иммунодефицитных состояний и возможностей их коррекции является чрезвычайно актуальной проблемой биомедицины, поскольку на сегодняшний день это одно из самых тяжелых патологических состояний человека, объединяющее в себе множество заболеваний.

### **Степень разработанности темы**

Вопросы коррекции вторичных иммунодефицитных состояний и связанные с ними исследования биохимических основ действия корректоров, в литературе отражены недостаточно. Практически не изучено действие соединений биометаллов с глюконовой кислотой – лигандом, увеличивающим биодоступность и снижающим токсичность 3d-металлов в условиях иммунодефицита. Остаются не выясненными многие биохимические аспекты механизмов их действия. Данные литературы позволяют предположить, что глюконаты 3d-металлов оказывают терапевтическое действие на иммунную систему. Была высказана гипотеза, что это может быть обусловлено совокупностью двух основных факторов: влиянием ионов 3d-металлов на

баланс оксидантно-антиоксидантной активности и возможностью активации фагоцитоза остатками глюконовой кислоты аналогичной для 1,3-гликанов (Huang R. et al., 2013). Для проверки состоятельности данной гипотезы, необходимо было провести экспериментальные исследования, что и обусловило цель настоящей работы.

### **Цель исследования**

Оценить изменения показателей окислительного и иммунного гомеостаза при экспериментальном иммунодефиците под действием синтезированных соединений 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu и Zn) с глюконовой кислотой.

Для осуществления цели поставлены следующие **задачи исследования:**

1. Изучить биохимические эффекты глюконатов 3d-металлов на процессы перекисного окисления липидов, окислительной модификации белка и активность антиоксидантных ферментов в печени мышей при иммунодефиците, индуцированном путем введения цитостатика циклофосфида.

2. Охарактеризовать влияние глюконатов 3d-металлов на поглотительную и метаболическую активность фагоцитов крови мышей на фоне экспериментального иммунодефицита.

3. Оценить эффективность введения глюконатов 3d-металлов на продукцию цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИФН- $\gamma$ ,  $\alpha$ -ФНО) в сыворотке крови мышей при индуцированном иммунодефиците.

4. Изучить действие глюконатов 3d-металлов на продукцию IgG и его взаимодействие с C1q (субкомпонентом первого компонента комплемента) в сыворотке крови мышей при экспериментальном иммунодефиците.

5. Оценить влияние глюконатов 3d-металлов на взаимодействие субкомпонента C1q с комплексом антиген-антитело *in vitro*.

6. Проанализировать взаимосвязь биохимических показателей оксидантно-антиоксидантной системы с показателями поглотительной и метаболической активности фагоцитов, синтеза цитокинов и иммуноглобулинов G.

## **Научная новизна работы**

Показано позитивное влияние глюконатов 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu и Zn) на оксидантную систему (снижение уровня ТБК-активных продуктов перекисного окисления липидов) и активность антиоксидантных ферментов (каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы) при экспериментальном иммунодефиците.

Установлен корректирующий эффект глюконатов 3d-металлов на показатели поглотительной и метаболической активности фагоцитов, продукции цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИФН- $\gamma$ ,  $\alpha$ -ФНО), иммуноглобулинов G, а также их взаимодействие с C1q (субкомпонентом первого компонента комплемента) на фоне индуцированного иммунодефицита у мышей.

Предложена методика оценки влияния глюконатов 3d-металлов на взаимодействие субкомпонента C1q с комплексом антиген-антитело *in vitro* (получен Патент на изобретение № 2669342).

## **Теоретическая и практическая значимость**

Получены новые данные, характеризующие биохимические механизмы воздействия глюконатов 3d-металлов на окислительный гомеостаз в печени лабораторных мышей с индуцированным иммунодефицитом (процессы перекисного окисления липидов, окислительной модификации белка, активность антиоксидантных ферментов), метаболическую активность фагоцитов, продукцию цитокинов, IgG, взаимодействие IgG с C1q.

Показана возможность коррекции показателей иммунной системы с помощью введения глюконатов 3d-металлов.

Результаты диссертационной работы могут быть использованы для дальнейших исследований иммунокорректирующего действия глюконатов 3d-металлов с целью использования в терапии иммунодефицитных состояний.

## **Методология и методы исследования**

Работа выполнена на кафедре биологической химии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации в соответствии с планом научно-

исследовательских работ.

Глюконаты 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn) синтезированы в Уфимском институте химии УФИЦ РАН, где их физико-химические свойства были изучены с помощью методов инфракрасной и электронной спектроскопии, термического разложения, молярной электропроводности, измерения эффективных магнитных моментов (Конкина И.Г. и др., 2002, 2003, 2010).

При проведении исследований использовали методологию системного подхода с применением комплекса методов, включающих в себя биохимические, иммунохимические, биологические, химические и статистические методы: определение токсичности соединений 3d-металлов с глюконовой и хлористоводородной кислотами, культивирование клеток и определение цитотоксической активности глюконатов 3d-металлов *in vitro*, подсчет числа живых клеток при определении цитотоксичности, определение вторичного продукта перекисного окисления липидов – ТБК-реактивных соединений, окислительной модификации белка по показателям карбонилирования белка, активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы), поглотительной активности фагоцитов периферической крови, метаболической активности фагоцитов по показателям НСТ-теста, расчет показателей интенсивности метаболизма и энергетических процессов ферментных систем фагоцитов, определение с помощью иммуноферментного анализа продукции цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИФН- $\gamma$ ,  $\alpha$ -ФНО), иммуноглобулинов G и их комплексов с субкомпонентом комплемента C1q, получение конъюгатов антител с пероксидазой.

Статистическую обработку проводили, используя программы «AtteStat», «Microsoft Excel» и «Statistica 10.0». Значимость различий количественных признаков между группами оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Корреляционный анализ между показателями оксидантного и иммунного гомеостаза проводили путем расчета коэффициента Пирсона.

Все лабораторные исследования проведены на сертифицированном

оборудовании.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Глюконаты 3d-металлов вызывают позитивные изменения показателей оксидантно-антиоксидантного гомеостаза на фоне экспериментального иммунодефицита, инициированного путем введения цитостатика циклофосфида.

2. Глюконаты 3d-металлов оказывают корректирующее действие на показатели иммунного гомеостаза при индуцированном иммунодефиците: поглотительная и метаболическая активность фагоцитов, продукция цитокинов, уровень иммуноглобулинов G, взаимодействие IgG с субкомпонентом первого фактора комплемента C1q.

3. Полученные результаты являются экспериментальной основой для дальнейшего изучения биохимических механизмов действия глюконатов 3d-металлов с целью использования их для лечения иммунодефицитных состояний.

### **Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора**

Результаты, приведенные в диссертации, получены лично автором или при его непосредственном участии: проведение информационного поиска, анализ источников литературы, проведение лабораторных исследований, оформление первичной документации и статистической обработки результатов. Планирование научной работы, формулировка цели и задач, анализ и представление основных результатов в научных публикациях проводились совместно с научным руководителем.

Материалы данной работы доложены на 79-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2014); 80-й научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины», посвященной 70-летию победы в Великой Отечественной Войне (Уфа, 2015); X Всероссийской научной конференции «Химия и медицина» с Молодежной Научной Школой (Уфа-

Абзаково, 2015); Российской научно–практической конференции «Зубаировские чтения: новое в коагулологии» «Медицинская биохимия: достижения и перспективы» (Казань, 2015); Международной научной конференции «Инновационные взгляды в будущее 2017» (Одесса, 2017); 82-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2017); XXIV Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2018» (Санкт-Петербург, 2018).

### **Внедрение результатов работы**

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую работу кафедры биологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также в практику Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Республики Башкортостан «Городская клиническая больница №5».

### **Публикация результатов**

По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, из них 6 в журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ, и 1 патент РФ на изобретение.

### **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 167 страницах машинописного текста, включает 21 таблицу, 19 рисунков. Библиографический указатель содержит 275 источников (133 отечественных и 142 зарубежных).

### **Благодарности**

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю, профессору О.А. Князевой за помощь на всех этапах исследования, а также благодарит профессора Ф.Х. Камилова за ценные

советы, доцента И.Г. Конкину и профессора Ю.И. Муринова (Уфимский институт химии УФИЦ РАН) за синтез и предоставление соединений 3d-металлов с глюконовой кислотой для проведения экспериментов.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

В работе проведен анализ лабораторных показателей сывороток крови и печени 378 белых половозрелых лабораторных мышей 2,5-3-х месячных самцов с массой 25-28 г). Животные содержались в условиях вивария ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России на стандартном питании (ГОСТ Р50258-92) в соответствии с Международными рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997 г.), а также правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96, ГОСТ 3 51000.4-96).

Иммунодефицит у мышей индуцировали путем однократного внутрибрюшинного введения циклофосамида («Бакстер АГ», Швейцария) в экспериментально подобранной дозе 50 мг/кг. Введение 3dMeGl ( $10^{-2}$  моль/л) и препаратов сравнения в рассчитанных согласно инструкции дозировках (ликопид– 0,025 мг/мл и глюконат кальция- $10^{-2}$  моль/л), разведенных в воде по 0,18-0,20 мл (в зависимости от массы животного), начинали через 24 часа после инъекции циклофосамида, и далее ежедневно в течение 14 дней. Мыши двух контрольных групп (интактные и без лечения) получали дистиллированную воду в том же объеме.

По окончании эксперимента животных под эфирным наркозом декапитировали в соответствии с этическими нормами и рекомендациями положения Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным, которые полностью соответствуют аналогичным положениям в России (МЗ РФ от 19 июня 2003 г. №267). Ткань печени гомогенизировали при температуре 4°C, гомогенат центрифугировали при 500 G для осаждения неразрушенных

клеток и фрагментов тканей. В супернатанте определяли показатели антиоксидантной системы по активности ее ключевых ферментов: супероксиддисмутазы (СОД) (Чевари С. и др., 1985), каталазы (КТ) – (Королюк М.А. и др., 1988), глутатионпероксидазы (ГПО) и глутатионтрансферазы (ГТ) – (Власова С.Н. и др., 1990). Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию ТБК-активных продуктов в реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (Коробейникова Э.Н., 1989). Определение уровня спонтанной и металл-индуцируемой окислительной модификации белков (ОМБ) проводили, оценивая спонтанное (КБ сп) и индуцированное (КБ инд) карбонилирование белков (Дубинина Е.Е., 1995).

В крови, стабилизированной гепарином, определяли поглотительную и метаболическую активность макрофагов по восьми показателям: фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ), интегральный фагоцитарный индекс (ИФИ), двухвариантные (спонтанный и индуцированный) НСТ-тест и средний цитохимический коэффициент (СЦК), а также индекс стимуляции (ИС).

В сыворотке крови методом ИФА с помощью специфических моноклональных антител (ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России) определяли содержание иммуноглобулинов G и их взаимодействие с первым субкомпонентом первого фактора комплемента C1q (по уровню комплексов C1q-IgG), а также с помощью тест-наборов (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург) уровень цитокинов (И-1 $\beta$ , И-6, IFN- $\gamma$ ,  $\alpha$ -TNF).

Влияние глюконатов 3d-металлов на взаимодействие C1q с комплексом антиген-антитело *in vitro* оценивали с помощью сенсibilизированных гемолитической сывороткой (ФГУП НПО «Микроген» МЗ России) эритроцитов барана по запатентованной методике (Патент на изобретение № 2669342).

При статистической обработке данных рассчитывали средний показатель (M), среднее квадратичное отклонение ( $\sigma$ ), медиану (Me) и интерквартильный размах (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>), используя программы «AtteStat», «Microsoft Excel» и «Statistica 10.0», работающие в операционной среде «Windows».

Значимость различий количественных признаков между группами

оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Корреляционный анализ между показателями оксидантного и иммунного гомеостаза проводили, определяя коэффициент Пирсона. Отличия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **1. Влияние глюконатов 3d-металлов на оксидантно-антиоксидантную систему в печени мышей при экспериментальном иммунодефиците**

Представленные в таблице 1 данные свидетельствуют о том, что в печени иммунодефицитных мышей наряду со значительной активацией процессов ПОЛ (ТБК-АП в 4,2 раза) и окислительной модификации белка (КБсп в 1,4 и КБинд в 1,1 раза), происходило подавление активности антиоксидантных ферментов. Наиболее глубокое снижение наблюдалось в случае ГПО – в 10,4 и СОД – в 3,5 раза, активность КТ и ГТ – примерно в 1,7 раза. Это может свидетельствовать о том, что данный способ моделирования иммунодефицита инициирует процессы ПОЛ и ОМБ. При сочетании иммунодефицита с введением глюконатов 3d-металлов (3dMeGl) интенсивность ПОЛ снижалась на 36-91% по сравнению с результатами в группе 2. При этом уровень ОМБ не имел статистически значимых отличий от показателей ОМБ группы 2. Активность исследуемых антиоксидантных ферментов изменялась различным образом в зависимости от применяемого 3d-металла. Влияние 3dMeGl на СОД, за исключением ZnGl, оказалось негативным. Очевидно, что наличие элементов, обладающих способностью к редокс-взаимодействию, инактивирует реактивные центры в молекулах СОД, имеющих в своем составе металлы переменной валентности Mn, Fe, Cu, способные инициировать новые АФК. Это может быть также связано с дополнительной координацией металла в центре СОД глюконат-ионами, образующимися при диссоциации комплексов Mn, Fe, Co, менее устойчивых, в соответствии с рядом Ирвинга-Вильямса, по сравнению с CuGl и ZnGl. При введении CuGl активность СОД не снижалась, а ZnGl повышалась на 16% по отношению к уровню в группе 2.

Таблица 1 – Влияние глюконатов 3d-металлов (3dMeGl) на показатели ПОЛ, ОМБ (КБсп, КБинд) и антиоксидантных ферментов: СОД, КТ, ГПО, ГТ в гомогенате печени иммунодефицитных (ИД) мышей

Группы мышей	Стат. показатель	ТБК-АП, мкмоль/г ткани	КБсп., Ед/г белка	КБинд, Ед/г белка	СОД, Ед/мг белка	КТ, мкмоль/сек/мг белка	ГПО, мкмоль/мин/мг б.	ГТ, мкмоль/мин/г белка
1. Контроль интактные	Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	11 (9,9-12,4)	162 (146-174)	744 (671-799)	26,3 (24,8-28,7)	15,9 (14,1-17,4)	25,9 (22,8-28,3)	7,7 (6,6-8,6)
2. Контроль-ИД без леч. (n=12)	Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ) p-знач.	46 (43-50) p <sub>1-2</sub> =0,00003	227 (195-232) p <sub>1-2</sub> =0,00003	821 (741-882) p <sub>1-2</sub> =0,033	7,5 (6,5-8,2) p <sub>1-2</sub> =0,00003	9,1 (7,9-9,9) p <sub>1-2</sub> =0,00003	2,5 (2-2,8) p <sub>1-2</sub> =0,00003	4,6 (3,9-5,1) p <sub>1-2</sub> =0,00003
3. ИД+CaGl (n=12)	Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ) p-знач.	44 (42,7-47,3) p <sub>2-3</sub> = 0,184	224 (203-240) p <sub>2-3</sub> =0,603	818 (739-878) p <sub>2-3</sub> =0,729	7,8 (6,8- 8,4) p <sub>2-3</sub> =0,312	9,3 (8,3-9,9) p <sub>2-3</sub> =0,665	2,6 (2,3-2,9) p <sub>2-3</sub> =0,248	4,7 (4,2-5,3) p <sub>2-3</sub> =0,419
4. ИД+MnGl (n=12)	Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ) p-знач.	41 (37,3-42,4) p <sub>2-4</sub> =0,00003	215 (193-232) p <sub>2-4</sub> =0,1842	805 (726-865) p <sub>2-4</sub> =0,453	2,5 (2,0-2,8) p <sub>2-4</sub> =0,00003	10,4 (9,0-11,4) p <sub>2-4</sub> =0,0376	6,8 (5,7-7,5) p <sub>2-4</sub> =0,0003	4,6 (4,2-5,3) p <sub>2-4</sub> =0,6236
5. ИД+FeGl (n=12)	Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ) p-знач.	42 (39,5-46,2) p <sub>2-5</sub> =0,00003	226 (203-245) p <sub>2-5</sub> =0,9539	825 (742-886) p <sub>2-5</sub> =0,773	4,9 (4,2-5,6) p <sub>2-5</sub> =0,00008	8,5 (7,4-9,4) p <sub>2-5</sub> =0,1939	18,6 (16,5-20,2) p <sub>2-5</sub> =0,00003	1,5 (1,3-1,9) p <sub>2-5</sub> =0,00003
6. ИД+CoGl (n=12)	Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ) p-знач.	42 (37,5-43,8) p <sub>2-6</sub> =0,00003	220 (202-243) p <sub>2-6</sub> =0,908	819 (738-809) p <sub>2-6</sub> =0,729	3,9 (3,2-4,4) p <sub>2-6</sub> =0,00003	10,3 (9,0-11,3) p <sub>2-6</sub> =0,0376	10,8 (9,4-11,8) p <sub>2-6</sub> =0,00003	9,0 (7,8-9,8) p <sub>2-6</sub> =0,00003
7. ИД+CuGl (n=12)	Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ) p-знач.	38 (36,4-39,6) p <sub>2-7</sub> =0,00003	217 (195-235) p <sub>2-7</sub> =0,2726	810 (730-871) p <sub>2-7</sub> =0,603	7,4 (6,4-8,1) p <sub>2-7</sub> =0,6236	19,0 (16,8-20,7) p <sub>2-7</sub> = 0,00003	18,1 (16,1-19,7) p <sub>2-7</sub> =0,00003	9,7 (8,5-10,5) p <sub>2-7</sub> =0,00003
8. ИД+ZnGl (n=12)	Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ) p-знач.	36 (32,8-39,2) p <sub>2-8</sub> =0,00003	212 (190-229) p <sub>2-8</sub> =0,1059	805 (726-865) p <sub>2-8</sub> =0,453	11,7 (10,4-12,7) p <sub>2-8</sub> =0,00003	17,9 (15,8-19,5) p <sub>2-8</sub> =0,00003	15,4 (13,7-16,8) p <sub>2-8</sub> =0,00003	9,9 (8,5-10,9) p <sub>2-8</sub> =0,00003

Комплексы меди с координационным центром, имеющим квадратно-пирамидальную или плоско-квадратную конфигурацию, способны проявлять подобную СОД активность (Patel M.N. et al., 2010), однако, атом меди в CuGI находится в октаэдрическом окружении, что возможно является одной из причин невыраженного влияния CuGI на активность СОД (Конкина И.Г. и др., 2003). Кажущееся противоречие между одновременным снижением активности СОД и уменьшением содержания ТБК-АП может быть объяснено, вероятно, наблюдающимся ростом активности фермента ГПО, катализирующего не только процесс разложения пероксида водорода, но и восстановление гидропероксидов липидов, что придает ему первоочередное значение в антиоксидантной защите организма (Панина И.С. и др., 2014; Shazia Q. et al., 2012). Восстановление активности ГТ, наблюдающееся в данном эксперименте под действием 3dMeGI (за исключением FeGI), очевидно, также способствует снижению ПОЛ, поскольку ГТ катализирует конъюгацию восстановленного глутатиона через сульфгидрильную группу, создавая электрофильные центры, участвующие в детоксикации перекисей липидов.

Способность цинка связываться с тиольными группами является важным механизмом его антиоксидантного действия. Стабилизация сульфгидрильных групп может происходить при непосредственном связывании иона металла с данными группами и сайтом белка, в результате которого образуется трехкомпонентный комплекс и формируются препятствия для аминокислотных радикалов или конформационного изменения белка (Князева О.А. и др., 2017; Oteiza P.I., 2012). Также отмечено позитивное влияние ZnGI на активность ГТ, при использовании которого активность фермента превышает результаты, полученные не только для группы 2, но и для интактных животных (группа 1).

Понижение активности ГТ при использовании FeGI, возможно, обусловлено инициацией ионами железа известной реакции Фентона, являющейся дополнительным источником АФК, что, вероятно, оказывает влияние и на снижение активности СОД и КТ при его использовании. При введении CuGI активность СОД не снижалась, а после терапии ZnGI

повышалась на 36% по отношению к уровню в группе 2.

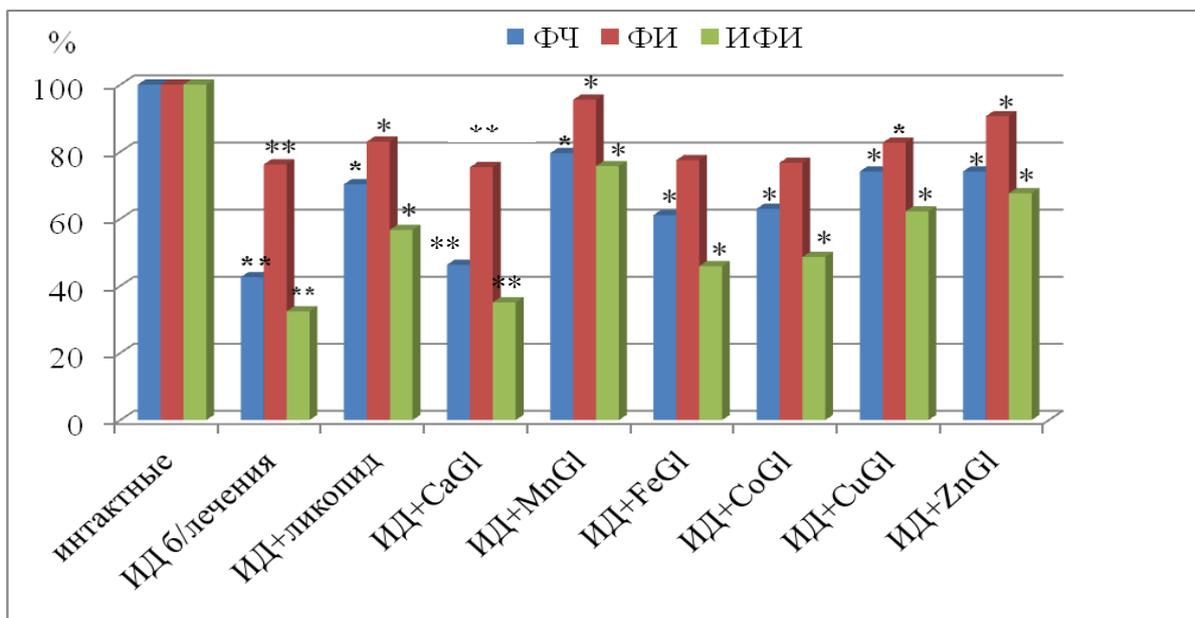
Восстановление активности ГТ под воздействием  $ZnMeGl$  (за исключением  $FeGl$ ), очевидно, также способствует снижению ПОЛ, поскольку ГТ катализирует конъюгацию восстановленного глутатиона через сульфгидрильную группу, создавая электрофильные центры, участвующие в детоксикации перекисей липидов. При использовании глюконата цинка уровень ГТ превышал даже результаты, полученные для интактных животных, возможно из-за его способности связываться с тиольными группами.

## **2. Влияние глюконатов Zn-металлов на поглотительную и метаболическую активность фагоцитов при иммунодефиците**

Биохимическим маркером активности пероксидазных систем является активация стимулированных фагоцитирующих клеток - НСТ-тест, основанный на поглощении фагоцитами нитросинего тетразолия из среды с его последующим восстановлением. По результатам НСТ-теста можно судить о функциональной активности ферментной системы фагоцитов и энзиматических дефектах клеточного иммунитета (Weiss G. et al., 2015).

Результаты исследования представлены на рисунках 1-3. При сравнении поглотительной активности фагоцитов первой группы мышей (интактные) и второй (иммунодефицит без лечения), отчетливо видна разница между показателями: ФЧ снижался на 57,4%, ФИ - на 23,8%, ИФИ – на 67,6% ( $p < 0,05$ ). Метаболическая активность клеток в этой группе мышей также снижалась относительно показателей группы интактных мышей. Так, значения НСТ–СП становились ниже на 34,6%, НСТ–ИН – на 29,6%; показатели цитохимических коэффициентов СЦК–СП – на 35,5%, СЦК–ИН – на 25,7%. Показатель ИС, отражающий интенсивность энергетических процессов ферментных систем фагоцитирующих клеток, снижался на 45,8% ( $p < 0,05$ ).

После двухнедельного введения ликопида происходила активация фагоцитоза следующим образом: ФЧ – 27,7%, ФИ – 6,8%, ИФИ – 24,3%, НСТ-СП – 20,5%, НСТ-ИН – 18,4%, СЦК-СП – 41,9%, СЦК-ИН – 18,5%; ИС – 29,1%.



**Примечание.** На рисунках 1-5 \*\* - отличия достоверны относительно интактных животных; \* - отличия достоверны относительно иммунодефицитных мышей без лечения. 100% - показатели интактных мышей

Рисунок 1 – Показатели поглотительной активности фагоцитов (ФЧ, ФИ, ИФИ) при экспериментальном иммунодефиците (ИД) после введения глюконатов 3d-металлов (3dMeGl) и препаратов сравнения (ликопид и CaGl)

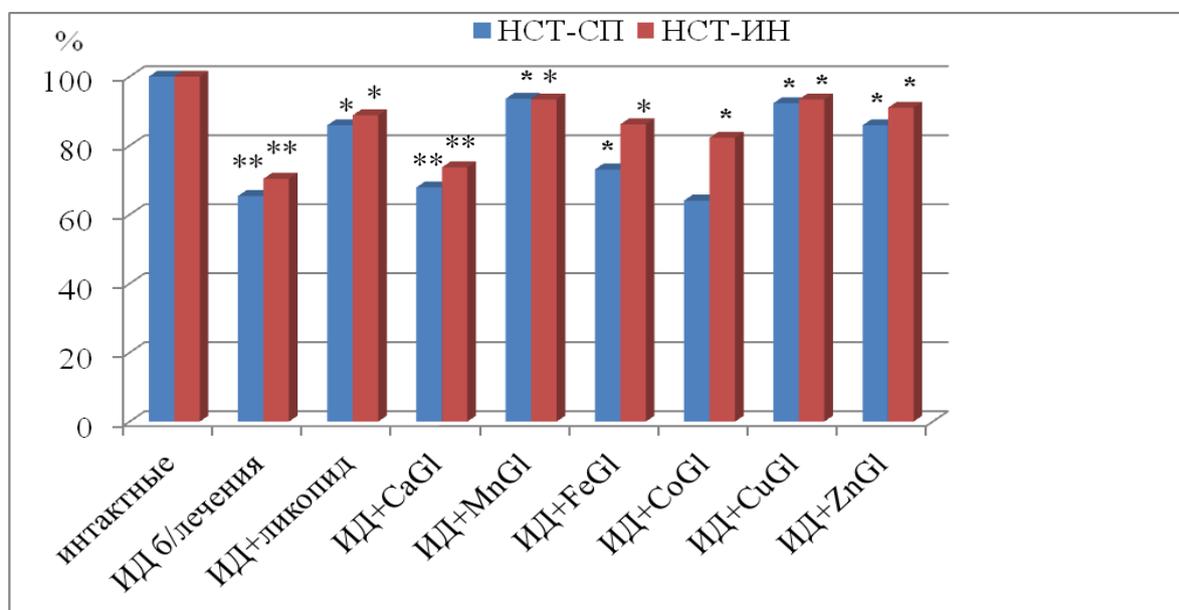


Рисунок 2 – Показатели метаболической активности фагоцитов (НСТ-СП и НСТ-ИН) при экспериментальном иммунодефиците (ИД) после курса введения глюконатов 3d-металлов (3dMeGl) и препаратов сравнения (ликопид и CaGl)

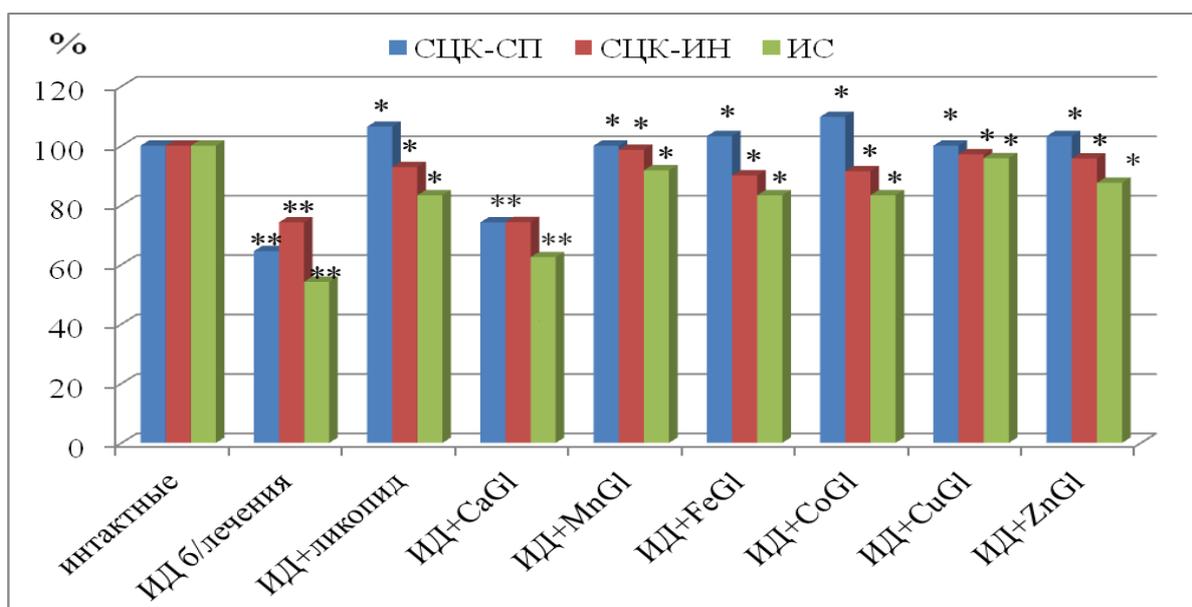


Рисунок 3 – Показатели цитохимических коэффициентов (СЦК–СП, СЦК–ИН) и индекса стимуляции (ИС) при экспериментальном иммунодефиците (ИД) после курса введения глюконатов 3d-металлов (3dMeGl) и препаратов сравнения (ликопид и CaGl)

Проведение терапии 3dMeGl приводило к сопоставимой с действием ликопида, активации фагоцитоза. Наибольшее увеличение ФЧ наблюдалось при использовании MnGl - на 37%. Под действием ZnGl и CuGl данный показатель увеличивался на 31,5%. Введение FeGl и CoGl вызывало повышение ФЧ на 18,5 и 20,4% ( $p < 0,05$ ). ФИ под действием 3dMeGl также повышался: в случае MnGl на 19,3%, ZnGl – на 14,4%, CuGl – на 6,5% ( $p < 0,05$ ). При этом ИФИ под действием MnGl увеличивался на 43,3%, ZnGl – на 35,2%, CuGl – на 29,8%, CoGl – на 16,2% и FeGl – на 13,5% ( $p < 0,05$ ). Рост показателя НСТ–СП по сравнению с группой 2 составил 28,2% после терапии MnGl, 26,9% – CuGl, 20,5% – ZnGl, 7,7% – FeGl. НСТ–ИН – на 16,2% CoGl, 23% – MnGl и CuGl, 20,5% – ZnGl, 15,8% – FeGl и 11,9% – CoGl ( $p < 0,05$ ). Повышение СЦК–СП происходило практически до уровня интактных мышей, при этом разница с группой 2 составила после терапии CoGl – 45,2%, ZnGl – 38,7%, MnGl, FeGl и CuGl – 35,5% ( $p < 0,05$ ). Максимальная разница обнаруживалась после терапии CoGl: превышение уровня интактных животных на 9,7%. Показатели СЦК–ИН

увеличивались: на 24,3% после терапии MnGl, на 22,8% - CuGl, на 21,4 – ZnGl, на 17,1 – CoGl и 15,7 – FeGl по сравнению с показателями группы 2 ( $p < 0,05$ ). При этом показатель ИС статистически значимо возрастал следующим образом: после введения CuGl – на 41,6%, MnGl – на 37,5%, ZnGl – на 33,3%, FeGl и CoGl – на 29,1%.

### 3. Влияние глюконатов 3d-металлов на продукцию цитокинов в сыворотке крови мышей при иммунодефиците

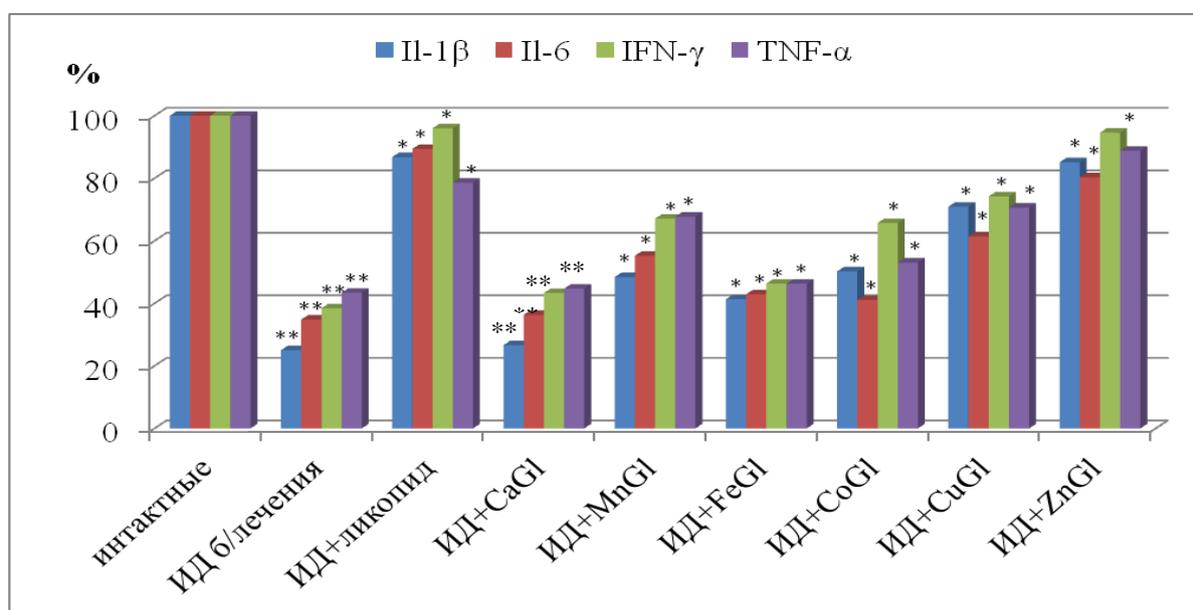


Рисунок 4 – Влияние глюконатов 3d-металлов на продукцию цитокинов (ИЛ-1β, ИЛ-6, ИФН-γ, ФНО-α) в сыворотке крови мышей с индуцированным иммунодефицитом (ИД)

Система цитокинов играет определяющую роль при развитии различных заболеваний, затрагивающих иммунную систему, что в настоящее время не вызывает сомнений. Из представленных на рисунке 4 данных видно, что при иммунодефиците в сыворотке крови мышей уровень цитокинов снижался: ИЛ-1β – на 75%, ИЛ-6 – на 65,2%, ИФН-γ – на 61,6%, ФНО-α – на 55,6% ( $p < 0,05$ ).

Введение 3dMeGl индуцировало выработку цитокинов. Относительно группы 2 их показатели увеличивались следующим образом: ИЛ-1β – на 23,4%,

ИЛ-6 – на 20,4%, ИФН- $\gamma$  - на 28,7%, ФНО- $\alpha$  – на 24,3% (MnGl); ИЛ-1 $\beta$  – на 16,3%, ИЛ-6 – на 8,1%, ИФН- $\gamma$  - на 7,9%, ФНО- $\alpha$  – без изменений (FeGl); ИЛ-1 $\beta$  – на 25,2%, ИЛ-6 – на 6,3%, ИФН- $\gamma$  - на 27,3%, ФНО- $\alpha$  – на 9,6% (CoGl); ИЛ-1 $\beta$  – на 45,9%, ИЛ-6 – на 26,6%, ИФН- $\gamma$  - на 35,8%, ФНО- $\alpha$  – на 27,2% (CuGl); ИЛ-1 $\beta$  – на 60,1%, ИЛ-6 – на 45,5%, ИФН- $\gamma$  - на 56,2%, ФНО- $\alpha$  – на 45,4% (ZnGl).

После терапии ликопидом эти показатели также становились выше: ИЛ-1 $\beta$  – на 61,8%, ИЛ-6 – на 54,6%, ИФН- $\gamma$  – на 57,6%, ФНО- $\alpha$  – на 35,2% ( $p < 0,05$ ). При этом глюконат кальция не оказывал значимого влияния на уровень цитокинов.

Сопоставление полученных результатов с литературными данными о роли нуклеарного фактора NF- $\kappa$ B, контролирующего экспрессию цитокинов (Rhodus N.L. et al.,2017) и активирующегося при введении ионов цинка (Кунцевич Н.В.,2016), указывает на возможный механизм иммунокорректирующего действия данных соединений за счет активации этого транскрипционного фактора, индуцирующего синтез цитокинов, которые в свою очередь стимулируют продукцию антител.

#### **4. Влияние глюконатов 3d-металлов на продукцию IgG и его взаимодействие с C1q в сыворотке крови мышей при иммунодефиците**

Инициация классического пути системы комплемента начинается с взаимодействия субкомпонента первого фактора комплемента C1q с активатором, которым обычно является IgG в комплексе с антигеном. Эти комплексы формируются постоянно в результате иммунного ответа организма, т.к. они запускают каскад биохимических реакций системы комплемента по классическому пути и стимулируют активацию натуральных киллеров, привлекающих фагоциты и лимфоциты (Черемных Е.Г., 2015).

Представленные на рисунке 5 результаты исследования показывают, что введение циклофосфида вызывает снижение уровня IgG на 53%, а комплексов C1q-IgG на 31,5% относительно группы интактных мышей, что

указывает на побочное действие цитостатика, вызывающего изменения в системе лимфопоэза, вследствие чего угнетается выработка IgG. С другой стороны, препарат в результате своего цитотоксического действия неселективно угнетает митотическую активность клеток различных тканей, способствуя их дегенеративным изменениям, потенцируя апоптоз.

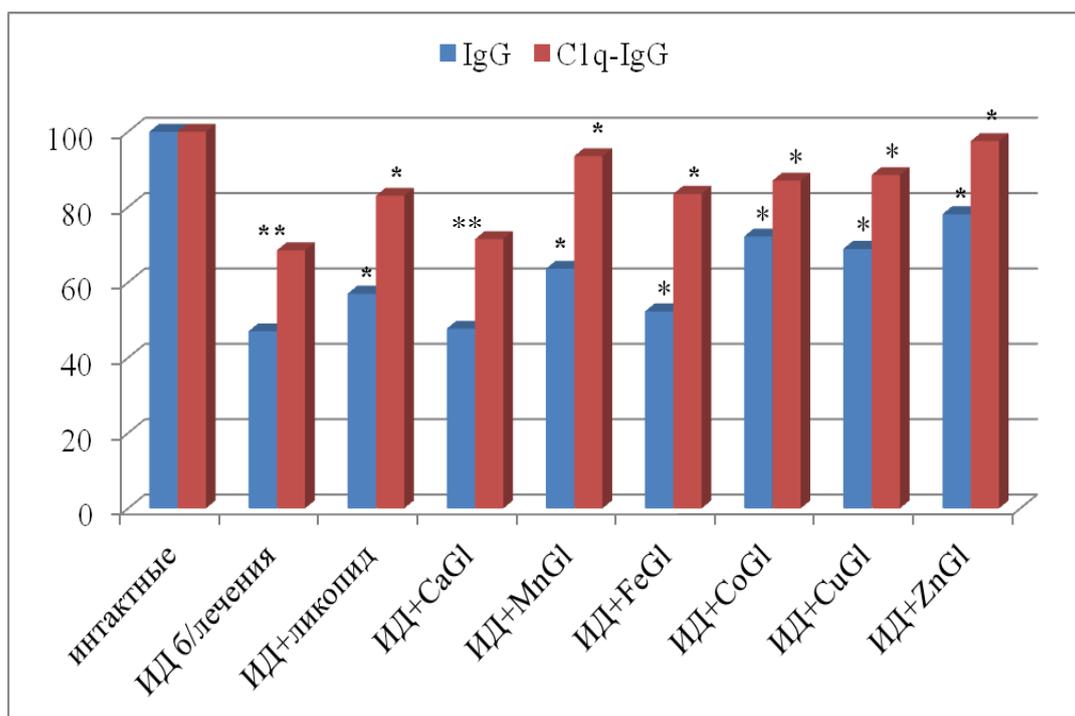


Рисунок 5 – Уровень IgG и C1q-IgG в сыворотке крови мышей при экспериментальном иммунодефиците (ИД) до и после введения глюконатов 3d-металлов (3dMeGl) и препаратов сравнения (ликопид и CaGl)

Образующиеся вследствие этого метаболиты распада, которые не могут полностью инактивироваться угнетенной фагоцитарной системой, связываются с Fc-фрагментами IgG, конкурируя с C1q, снижая долю связывания C1q с IgG. Причиной этого может быть и гепатотоксическое действие циклофосамида, которое обуславливает недостаточный синтез компонентов комплемента или их некомпетентность (Anwer F. et al., 2015).

Введение 3dMeGl приводило к существенному повышению концентрации IgG в сыворотке крови мышей по сравнению с группой 2 ( $p < 0,05$ ). Наибольшее

повышение концентрации IgG наблюдалось под действием ZnGl – на 31 %, CoGl – на 25 %, CuGl – на 22 %, MnGl – на 17% и FeGl – на 5%. Аналогичная картина наблюдалась и в содержании комплексов C1q-IgG. Выраженное увеличение их уровня было отмечено в группах мышей, получавших ZnGl (на 29 %), MnGl (на 25 %) и CuGl (на 20 %), в меньшей степени, при введении CoGl (на 18,5 %) и FeGl (на 15 %) ( $p < 0,05$ ). Возможно, такое действие 3dMeGl связано со стимулированием синтеза IgG, а также с конкурирующим взаимодействием с метаболитами распада, смещающим равновесие реакции C1q с IgG в сторону увеличения доли образования комплексов.

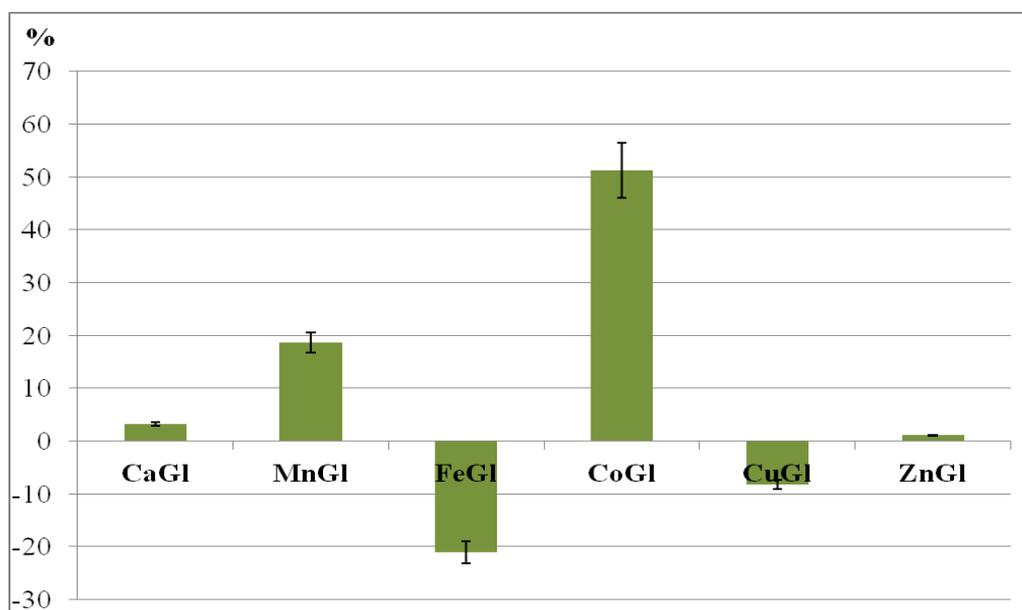


Рисунок 6 – Сравнительная оценка влияния глюконатов 3d-металлов на активность комплемента по классическому пути. По оси Y - С% - фиксация комплемента

Результаты определения влияния 3dMeGl на взаимодействие субкомпонента C1q с комплексом антиген-антитело *in vitro* продемонстрированы на рисунке 6. Показано, что способностью оказывать стимулирующее действие на взаимодействие субкомпонента C1q с комплексом антиген-антитело обладают CoGl (~51%) и MnGl (~19%). Два других: FeGl (~-21%) и CuGl (~-8%) оказывали ингибирующее действие. В то же время, ZnGl

оказывал на комплемент нейтральное действие, что может свидетельствовать о различных механизмах воздействия исследуемых соединений на белок-белковые взаимодействия.

Анализ взаимосвязей между биохимическими показателями оксидантно-антиоксидантной системы с показателями фагоцитарной активности, синтеза цитокинов и антител обнаружил существование между ними тесных корреляционных связей, частично нарушающихся при экспериментальном иммунодефиците, что выражалось в утрате корреляционной связи с ферментом ГТ. Пероральное введение мышам глюконатов 3d-металлов (кроме CuGI) приводило также к утрате зависимости от процессов липопероксидации, а после введения CoGI – от показателя окислительной модификации белка КБсп. Восстановление корреляционных связей с ГТ происходило под действием глюконатов меди и цинка. Из этого следует, что одним из механизмов иммунокорректирующего действия соединений 3d-металлов с глюконовой кислотой является их способность оказывать влияние на оксидантно-антиоксидантную систему.

Таким образом, представленные в диссертационном исследовании результаты свидетельствуют о корректирующем влиянии глюконатов 3d-металлов на окислительный и иммунный гомеостаз, и указывают на различные механизмы их действия, осуществляемые через индуцирование синтеза цитокинов (глюконат цинка), активацию (глюконаты марганца и кобальта) или ингибирование (глюконаты железа и меди) взаимодействия C1q с комплексом рецептор-антитело, а также через влияние на оксидантно-антиоксидантную систему.

## **ВЫВОДЫ**

1. Соединения 3d-металлов с глюконовой кислотой оказывают корректирующее действие на изменение оксидантно-антиоксидантного гомеостаза, вызванного моделированием вторичного иммунодефицита: снижение процессов перекисного окисления липидов, активацию антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидазы, каталазы и

глутатионтрансферазы) в печени экспериментальных животных, наиболее значимое для ионов меди и цинка.

2. Глюконаты 3d-металлов восстанавливают поглотительную и метаболическую активность фагоцитов крови, значительно снижающиеся при индуцированном иммунодефиците у мышей.

3. Глюконаты 3d-металлов, в большей степени цинка, индуцируют продукцию цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ ), что свидетельствует об их весомой роли в поддержании иммунного гомеостаза.

4. Глюконаты 3d-металлов оказывают стимулирующее действие на продукцию иммуноглобулинов G и их комплексов с субкомпонентом комплемента C1q, снижающиеся при экспериментальном иммунодефиците у мышей.

5. Глюконаты кобальта и марганца активируют взаимодействие C1q с комплексом рецептор-антитело, глюконаты железа и меди, напротив, ингибируют, что свидетельствует о различных механизмах воздействия исследуемых соединений на белок-белковые взаимодействия.

6. Механизмы иммуномодулирующего действия соединений 3d-металлов с глюконовой кислотой связаны с их способностью влиять на баланс оксидантно-антиоксидантной системы.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России**

1. 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**. – Текст (визуальный) : непосредственный // **Здоровье и образование в XXI веке**. – 2016. – Т. 18, № 4. – С. 88-93.

2. Влияние глюконатов 3d-металлов на активность антиоксидантных ферментов и окислительные процессы *in vivo* при экспериментальном иммунодефиците / О.А. Князева, **С.И. Уразаева**, И.Г. Конкина, Ю.И. Муринов.

– Текст (визуальный) : непосредственный // **Медицинский Вестник Башкортостана**. – 2018. – Т.13, № 4 (76). – С. 48-52.

3. Влияние глюконатов 3d-металлов на поглотительную и метаболическую активность фагоцитов при экспериментальном иммунодефиците / О.А. Князева **С.И. Уразаева**, И.Г. Конкина, С.А. Усачев. – Текст (визуальный) : электронный // **Современные проблемы науки и образования** [Электронный журнал]. – 2018. – № 4. – URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=27852>.

4. Князева, О.А. Антииммуносупрессивное действие глюконатов 3d-металлов при экспериментальном иммунодефиците / О.А. Князева, **С.И. Уразаева**, И.Г. Конкина. – Текст (визуальный) : непосредственный // **Казанский медицинский журнал**. – 2018. – № 2. – С. 255-259.

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

6. **Уразаева, С.И.** Влияние глюконатов 3d-металлов на взаимосвязь биохимических показателей оксидантного и иммунного гомеостаза при экспериментальном иммунодефиците / С.И. Уразаева, О.А. Князева. – Текст (визуальный) : непосредственный // **Наука молодых (Eruditio Juvenium)**. – 2018. – Т. 6, № 4. – С. 548-560.

#### Статьи в других изданиях

7. Уразаева, С.И. Иммуномодулирующие свойства глюконатов переходных металлов / **С.И. Уразаева**, Р.А. Султанов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Башкирского государственного университета. - 2014. – № 3 (Прил.). – С. 191-196.

8. Влияние глюконатов 3d-металлов на функциональное состояние фагоцитарного звена иммунитета / О.А. Князева, И.Г. Конкина, С.А. Усачев, **С.И. Уразаева**. – Текст (визуальный) : непосредственный // Тезисы докладов X Всероссийской конференции «Химия и медицина» Молодежной Научной Школы (1-6 июня 2015 г.). – Уфа, 2015. – С. 40.

9. **Уразаева, С.И.** Влияние глюконатов 3d-металлов на иммунный статус лабораторных мышей / С.И. Уразаева, С.А. Усачев, О.А. Князева. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российская научно-практическая конференция «Зубаировские чтения: новое в коагулологии» «Медицинская биохимия: достижения и перспективы»: сборник научных статей (Казань, 12-14 ноября 2015 г.) / под общей редакцией проф. И.Г. Мустафина. – Казань:

Издательство «Бриг», 2015. – С. 124-129.

10. Усачев, С.А. Влияние глюконатов металлов переменной валентности на образование циркулирующих иммунных комплексов IgG-C1q на фоне индуцированного вторичного иммунодефицита / С.А. Усачев, **С.И. Уразаева**. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Башкирского государственного университета. – 2015. – № 2 (Прил.). – С. 677-681.

11. Гареева, А.И. Антиоксидантные свойства глюконата кобальта / А.И. Гареева, **С.И. Уразаева**. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2017. – № 1 (Прил.). – С. 744-749.

12. Иммуномодулирующее действие глюконата цинка / О.А. Князева, **С.И. Уразаева**, Л.М. Саптарова, Л.М. Газдалиева. – Текст (визуальный) : непосредственный // Научный взгляд в будущее. – 2017. – Т. 6, вып. 5. – С. 24-26.

13. Ковальчук, Д.А. Биохимические механизмы иммуномодулирующего действия глюконата цинка / Д.А. Ковальчук, В.В. Сибатуллина, **С.И. Уразаева**. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2017. – № 1 (Прил.). – С. 698-703.

14. Овсяк, Д.Н. Влияние глюконата марганца на систему антиоксидантной защиты / Д.Н. Овсяк, В.А. Чумак, **С.И. Уразаева**. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2017. – № 1 (Прил.). – С. 837-842.

15. Рахматуллина, Г.С. Вторичный иммунодефицит: молекулярные аспекты, моделирование на животных / Г.С. Рахматуллина, **С.И. Уразаева**. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2017. – № 1 (Прил.). – С. 830-836.

16. Овсяк, Д.Н. Оценка влияния глюконата марганца на иммунную и про-/антиоксидантную системы / Д.Н. Овсяк, **С.И. Уразаева**, В.А. Чумак. – Текст (визуальный) : непосредственный // Актуальные проблемы биомедицины-2018: материалы XXIV Всероссийской конференции молодых ученых с Международным участием (Санкт-Петербург, 12-13 апреля 2018 г.) / отв. ред. Т.Д. Власов. – СПб.: РИЦ ПСПбГМУ, 2018. – С.176-177.

17. Патент №2669342 Российская Федерация, МПК G01N33/53. Способ определения влияния препаратов на взаимодействие компонента с комплексом антиген-антитело : заявл. 2017.06.07 : опубл. 2018.10.10 / О.А. Князева, Л.М. Саптарова, Л.М. Газдалиева, **С.И. Уразаева**. – Бюл. 28. – Текст (визуальный) : непосредственный.