

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

На правах рукописи

УРАЗАЕВА САБИНА ИЛЬЯСОВНА

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

03.01.04 - Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Князева Ольга Александровна

Уфа – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Моделирование иммунодефицита, метаболические изменения под действием циклофосфамида.....	12
1.2. Оксидантно-антиоксидантная система в поддержании иммунного гомеостаза.....	16
1.3. Роль координационных соединений 3d-металлов с глюконовой кислотой в метаболических процессах организма человека.....	24
1.3.1. Ионы марганца (Mn).....	27
1.3.2. Ионы железа (Fe).....	31
1.3.3. Ионы кобальта (Co).....	36
1.3.4. Ионы меди (Cu).....	38
1.3.5. Ионы цинка (Zn).....	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	46
2.1. Моделирование у мышей иммунодефицита.....	47
2.2. Введение глюконатов 3d-металлов и препаратов сравнения.....	47
2.3. Определение токсичности соединений 3d-металлов с глюконовой и хлористоводородной кислотой.....	49
2.4. Культивирование клеток и определение цитотоксической активности глюконатов 3d-металлов <i>in vitro</i>	50
2.5. Подсчет числа живых клеток при определении цитотоксичности.....	50
2.6. Определение вторичного продукта перекисного окисления липидов – ТБК-реактивных соединений.....	52
2.7. Определение окислительной модификации белка по показателям карбонилирования белка.....	53
2.8. Определение активности супероксиддисмутазы.....	54
2.9. Определение активности каталазы.....	54
2.10. Определение активности глутатионпероксидазы.....	55

2.11. Определение активности глутатионтрансферазы.....	56
2.12. Оценка поглотительной активности фагоцитов периферической крови.....	56
2.13. Оценка метаболической активности фагоцитов по показателям НСТ-теста.....	57
2.14. Расчет показателей интенсивности метаболизма и энергетических процессов ферментных систем фагоцитов.....	58
2.15. Определение продукции цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИФН- γ , α -ФНО) в сыворотке крови мышей.....	60
2.16. Определение продукции иммуноглобулинов G в сыворотке крови мышей.....	61
2.17. Определение взаимодействия иммуноглобулинов G с субкомпонентом первого фактора комплемента - C1q по уровню комплексов C1q-IgG в сыворотке крови мышей.....	62
2.18. Получение конъюгатов антител с пероксидазой.....	63
2.19. Оценка влияния глюконатов металлов на функциональную активность комплемента по классическому пути <i>in vitro</i>	64
2.20. Методы статистической обработки результатов исследования.....	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	66
3.1. Изучение биохимических эффектов глюконатов 3d-металлов на оксидантно-антиоксидантную систему в печени мышей при экспериментальном иммунодефиците	66
3.2. Оценка влияния глюконатов 3d-металлов на поглотительную и метаболическую активность фагоцитов при экспериментальном иммунодефиците у мышей.....	74
3.3. Оценка влияния глюконатов 3d-металлов на продукцию цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИФН- γ , α -ФНО) в сыворотке крови мышей при индуцированном иммунодефиците.....	84
3.4. Исследование влияния глюконатов 3d-металлов на продукцию IgG	

и его взаимодействие с C1q (субкомпонентом первого компонента комплемента) в сыворотке крови мышей при экспериментальном иммунодефиците.....	90
3.5. Оценка влияния глюконатов 3d-металлов на взаимодействие субкомпонента C1q с комплексом антиген-антитело <i>in vitro</i>	96
3.6. Анализ взаимосвязи биохимических показателей оксидантно-антиоксидантной системы с показателями поглотительной и метаболической активности фагоцитов, синтеза цитокинов и иммуноглобулинов G.....	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	124
ВЫВОДЫ.....	131
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	132
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	134

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

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

Применение 3d-металлов долгое время сдерживалось острой токсичностью их неорганических солей. Но хелатирование свободных ионов металла полидентатными лигандами, в частности, глюконовой кислотой, превращает их в устойчивые, не способные нарушить гомеостаз живого организма, малотоксичные частицы, поскольку ионы переходных металлов, входящие в состав координационных соединений, 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; Tripathi K., 2009).

Изучение биохимических основ иммунодефицитных состояний, а также 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.

В настоящее время почти все известные противоопухолевые препараты

оказывают подавляющее действие на иммунитет, что негативно отражается на процессе лечения. В связи с этим актуальное значение имеет исследование функциональной активности и участия в метаболических процессах иммунной системы комплексов неорганических ионов с органическими молекулами, как возможных иммунокорректоров, в условиях индуцированного цитостатиком иммунодефицита. В этом отношении особое место занимают соединения 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu и Zn), дисбаланс которых отмечается при различных заболеваниях (Конкина И.Г. и др., 2002; Князева О.А., 2008; Амбеси-Импломбато Ф.С и др., 2014; Кофтина В.А. и др., 2015).

Данные литературы позволяют предположить, что глюконаты 3d-металлов оказывают терапевтическое действие на иммунную систему. Была высказана гипотеза, что иммуномодулирующее действие глюконатов биометаллов может быть обусловлено совокупностью двух основных факторов. Один из них, вероятно, связан с влиянием ионов 3d-металлов на баланс про- и антиоксидантной активности, второй – с возможностью активации фагоцитоза остатками глюконовой кислоты аналогично подобной активации, описанной для молекул полисахаридов, например, для 1,3-гликанов (Huang R. et al., 2013). Чтобы проверить состоятельность данной гипотезы, необходимо было провести целенаправленные экспериментальные исследования, которые могли бы ее подтвердить или опровергнуть. Это и обусловило цель настоящей работы.

В представляемой работе, являющейся продолжением серии исследований, выполняемых в рамках темы: «Биохимия иммунного надзора при онкологических заболеваниях, поиск путей коррекции», рассматриваются также вопросы влияния глюконатов 3d-металлов на окислительный и иммунный гомеостаз на модели иммунодефицита, создаваемого путем введения цитостатика циклофосфида.

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 ПОЛ, 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 β , ИЛ-6, ИФН- γ , α -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 β , ИЛ-6, ИФН- γ , α -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 иммунокорригирующего действия глюконатов 3d-металлов с целью использования в терапии иммунодефицитных состояний.

Методология и методы исследования

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

Глюконаты 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn) синтезированы в лаборатории координационной химии Уфимского института химии УФИЦ РАН, где были изучены с помощью методов инфракрасной и электронной спектроскопии, термического разложения, молярной электропроводности, измерения эффективных магнитных моментов их физико-химические свойства (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 (супероксиддисмутаза, 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 β , ИЛ-6, ИФН- γ , α -ФНО), иммуноглобулинов G, и их комплексов с субкомпонентом комплемента C1q, получение конъюгатов антител с пероксидазой, определение влияния глюконатов 3d-металлов на взаимодействие C1q с комплексом антиген-антитело *in vitro* по защищенной патентом методике (Патент на изобретение № 2669342).

Статистическую обработку проводили, используя программы «AtteStat» 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 непосредственном участии автора: 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».

Структура и объем 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).

Публикации

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

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю, д.б.н. 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Моделирование иммунодефицита, метаболические изменения под действием циклофосфида

Вторичный иммунодефицит является одним из наиболее распространенных патологических состояний человека, объединяющих в себе большое число заболеваний, приводящих к развитию тяжелых хронических инфекций, воспалительному поражению органов и тканей. Иммунодефицит обычно диагностируется по снижению уровня показателей и / или функциональной активности отдельных составляющих иммунного гомеостаза, которые приводят к нарушению иммунной защиты организма, что проявляется в повышенной инфекционной заболеваемости (Сетдикова Н.Х. и др., 2006).

Основными причинами вторичного иммунодефицита являются не генетические нарушения, а агрессивные факторы окружающей среды и патогенной инфекции. Поэтому появление самого термина определили значительная распространенность и тяжесть течения хронических инфекционно-воспалительных заболеваний, устойчивых к лечению и сопровождающих многие соматические заболевания. Вызвать вторичный иммунодефицит могут не только различного рода инфекции, но и цитостатики, гормоны, ионизирующее излучение, стрессорные воздействия, злокачественные новообразования, патология обмена веществ и др. (Байков А.Н. и др., 2008; Барков С.Ю., 2017).

Наиболее выраженную активность проявляют цитостатики, являющиеся алкилирующими средствами, к которым относятся: циклофосфан и его аналоги, хлорамбуцил, тиотеп, проспидия хлорид, а также антиметаболиты (меркаптопурин, фторурацил и др.) и некоторые антибиотики (например, дактиномицин).

В настоящее время цитостатическая терапия остается одним из основных методов лечения злокачественных новообразований.

Циклофосфан или циклофосфамид (ЦФ) – производные азотистого иприта

является цитостатическим противоопухолевым химиотерапевтическим лекарственным препаратом алкилирующего действия, производное бис- β -хлорэтиламина и одновременно производное оксазафосфорина или производное диамидофосфата.

ЦФ обладает выраженным иммуносупрессивным действием с преимущественным угнетением активности В-, а не Т-субпопуляций лимфоцитов, в высоких дозах снижает показатели функциональной активности фагоцитирующих клеток (Лебединская Е.А. и др., 2011). Он обладает быстрым и сильным действием (1-6 месяцев), чаще эффективнее других иммуносупрессоров, менее миелотоксичен (Gralow J.R. et al., 2010).

ЦФ, как и другие хлорэтиламины, в биологических жидкостях вызывает отщепление ионов хлора. В результате этой реакции образуется электрофильный карбониевый ион, который затем спонтанно переходит в этиленимоний, способный образовать функционально более активный карбониевый ион, вступающий во взаимодействие с нуклеофильными фрагментами ДНК (гуанин, фосфодиэфирные и аминосульфгидрильные группы и др.). Взаимодействие алкилирующих веществ с дезоксирибонуклеиновой кислотой вызывает изменения ее стабильной структуры, физико-химических свойств, приводящие к нарушению целостности ДНК, подавлению клеточного деления, снижению энергетического и других видов обмена в клетке, и в конечном итоге изменению их функциональных свойств (Лебединская Е.А. и др., 2010; Малыкина А.Е. и др., 2012).

ЦФ оказывает влияние на протеины и нуклеиновые кислоты клеток, находящихся в любой из фаз клеточного цикла, в результате чего может наблюдаться гибель клеток, нарушение деления и созревания иммунокомпетентных клеток и их предшественников, угнетение синтеза антител и медиаторов иммунного процесса. Высказывается предположение, что в результате угнетающего действия ЦФ на моноклеарные клетки снижается их функция по удалению эндогенных метаболитов, которые образуются при индуцированной иммуносупрессии (Барков С.Ю., 2017).

В экспериментах на лабораторных животных показано, что ЦФ вызывает жировую инфильтрацию печени, снижает содержание в гепатоцитах цитохромов P-450 и b5, восстановленного глутатиона, что приводит к повреждению системы антиоксидантной защиты и, как следствие, интенсификации ПОЛ, приводящей к повреждению клеточной мембраны (Саратиков А.С. и др., 2004).

Доказано, что в токсическом действии цитостатиков одна из главных ролей принадлежит дисбалансу прооксидантной и антиоксидантной систем. Усиление генерации активных форм кислорода (АФК) и процессов ПОЛ при подавлении антиоксидантной системы (АОС) приводит к развитию деструктивных явлений, вызывающих гибель гепатоцитов (Потапова А.А. и др., 2018). Наблюдаемое угнетение функциональной активности печени при введении ЦФ в первую очередь отражается на ее метаболической функции (Ахматова Н.К. и др., 2015).

По данным литературы подавляющее действие ЦФ, подтвержденное в экспериментах на мышах, может проявляться в дозах, от 10 до 50 мг/кг массы тела. Показано, что после введения циклофосфана в дозировке 20 мг/кг у мышей происходило снижение количества спленоцитов и Т-клеток примерно на 50 процентов. Введение ЦФ в высоких дозах (максимально переносимых) вызывало более значительное снижение количества Т-лимфоцитов (до 90%), способствовало увеличению числа апоптозированных тимоцитов с фрагментированной ДНК, имеющих высокий уровень экспрессии активируемой каспазой ДНК-азы (Rocchi R. et al., 2007).

Одним из способов создания экспериментального иммунодефицитного состояния является также стресс – совокупность неспецифических адаптационных (нормальных) реакций организма на воздействие различных неблагоприятных факторов – стрессоров (физических или психологических), нарушающих его гомеостаз. Двусторонние прямые связи между ЦНС и иммунной системой обусловлены иннервацией лимфоидных органов, а также продукцией нейропептидов и цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-10) клетками нервной системы (нейронами и клетками нейроглии) (Kennard J., 2008). Цитокины, секреторирующиеся в лимфоидных органах, проникают через

гематоэнцефалический барьер и вызывают изменение состояния нейроэндокринной активности гипофиз-гипоталамической оси, в результате которого происходит снижение интенсивности реакций, обусловленных действием антигенспецифических CD4 Т-лимфоцитов и активности естественных киллеров (ЕК), являющихся антигеннезависимыми эффекторами врожденного иммунитета. Они активируются при контакте с вирусами, опухолевыми и другими чужеродными клетками, высвобождая цитотоксические молекулы, вызывающие апоптоз и лизис клеток-мишеней (Маянская И. В. и др., 2013).

Показано что при этом наблюдается значительное снижение соотношения содержания CD4+/CD8+ Т-лимфоцитов, угнетается гуморальный иммунный ответ (Новикова И.А., 2009; Торховская Т.И. и др., 2015).

Используется также комбинированная модель иммунодефицита, по которой в течение первых 3 дней ежедневно проводят вынужденное плавание животных в водопроводной воде при температуре 18°-20°С по 15-20 минут. Затем, на следующий день, животным вводится внутрибрюшинно 8-10 мг циклофосфана в расчете на 100 г массы тела животного (Пигунова Л.А. и др., 2009).

Наиболее удобной моделью для изучения нарушений иммунной системы является иммунодефицит, индуцированный путем введения циклофосфана (Маянская И. В. и др., 2013). Особый интерес представляет использование такой модели для изучения влияния различных иммуномодулирующих препаратов или соединений, имеющих в своем составе и строении предпосылки для коррекции нарушений иммунной защиты. Применение данной модели в первую очередь связано с тем фактом, что после введения циклофосфана наблюдается выраженная супрессия пролиферации В-лимфоцитов и, как следствие, снижение уровня иммуноглобулинов, а также нарушения в системе комплемента, являющейся важным звеном врожденного гуморального иммунитета (Новикова И.А., 2009).

Моделирование постмедикаментозного иммунодефицита в эксперименте эффективно осуществляется путем разовой внутрибрюшинной инъекции раствора циклофосфана в дозе 4 мг/100 г массы тела животного, после которой на 7-14

день проводится забор крови и исследование иммунологических и биохимических показателей (Мельникова В.И. и др., 2013).

В литературе имеются данные о том, что холодовой стресс также может вызывать иммунодефицитное состояние, приводящее к снижению показателей поглотительной активности фагоцитов, секреции цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-12. Под действием введения полисахаридов – β (1-3) (1-6)-D-глюканов, выделенных из грибов (дрожжи, плесень), зерна и водорослей, которые, как было экспериментально подтверждено, обладают иммуномодулирующими свойствами, исследуемые показатели возвращались к нормальным величинам (Vetvicka V., Vancikova Z., 2010).

1.2. Оксидантно-антиоксидантная система в поддержании иммунного гомеостаза

В последние несколько десятилетий окислительный стресс и воспалительный процесс, сопровождающиеся снижением иммунной защиты, а также их взаимосвязь были основным предметом исследований биомедицинской химии (Dandekar A., 2015). Сейчас уже стало очевидным, что для нормального функционирования всех систем организма необходимо поддержание окислительно-восстановительного баланса между про- и антиоксидантной системами, поскольку, как недостаточное, так и повышенное производство реактивных соединений кислорода оказывает негативное влияние на состояние организма, играя решающую роль в развитии патологий самого различного характера (O'Neill S., 2015; Xu J., 2018).

Реактивные соединения кислорода (ROS/АФК) – побочные продукты аэробного метаболизма, по своей природе являются очень сильными окислителями, способными действовать на биологические макромолекулы – нуклеиновые кислоты, белки и липиды (Зиновьева В.Н., Островский О.В., 2002; Гудков С.В., 2014; Новиков В.Е. и др., 2014; Schieber M., 2014; Schmidt H.H.W., 2015). Обычно их разделяют на две группы: первичные и вторичные.

- Первичные радикалы – постоянно синтезируются в жизненном цикле организма в качестве средств защиты, к ним относят супероксидный анион $O_2^{\cdot -}$ и оксид азота NO^{\cdot} . Они обладают регуляторным действием, индуцируют другие молекулы.

- Вторичные радикалы образуются из-за атаки первичными радикалами других молекул, к ним относятся синглетный кислород (1O_2), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильные радикалы (OH^{\cdot}), пероксинитрит, радикалы липидов и гипогалоиды, каждый из которых обладает присущими химическими свойствами, передавая реакционную способность различным биологическим мишеням. Они оказывают разрушительное действие, стремясь отнять электроны, вследствие чего «атакованная» молекула сама становится радикалом.

Повышение концентрации АФК вызывает токсическое действие вследствие способности радикалов необратимо повреждать молекулы липидов, белков и ДНК (Новиков В.Е. и др., 2014; Reyhaneh M.M. et al., 2018).

Небольшое количество индуцируемых АФК приводит к падению трансмембранного потенциала и активной генерации вторичных радикалов, следствием которой является развитие «окислительного взрыва». При этом происходит окисление белков и регуляторных тиолов, изменение редокс-статуса клетки, инициируется неспецифическая проницаемость мембран. Изменение неспецифической проницаемости мембраны приводит в свою очередь к нарушению функционирования электрон-транспортной цепи, изменению свойств клеточных мембран и, в конечном счете, к «окислительному взрыву» (Пожилова Е.В., 2015).

АФК большей частью продуцируются в ферментативных реакциях, катализируемых НАДФН-оксидазой (von Loehneysen K. et al., 2010), ксантинооксидазой, синтазой оксида азота, цитохромом P_{450} (Maeda H., 2013), а также лейкоцитами в процессе воспалительных реакций (Mavangira V., Sordillo L.M., 2018).

В плазматической мембране фагоцитов имеется НАДФН-оксидазная система, продуцирующая $O_2^{\cdot -}$ в ходе иммунного ответа (Пожилова Е.В. и др.,

2015; Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А., 2015). В начале процесса резко (в 10-20 раз) увеличивается поглощение кислорода (происходит так называемый «респираторный взрыв»).

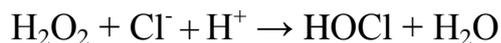
НАДФН-оксидаза восстанавливает O_2 , образуя супероксидный анион $O_2^{\cdot-}$:



$O_2^{\cdot-}$ действует на поглощенные фагоцитами клетки (бактериальные, опухолевые и т.д.) и спонтанно или при участии антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы превращается в пероксид водорода H_2O_2 :



Под действием миелопероксидазы из пероксидов в присутствии галогенов (йодидов и хлоридов) образуются дополнительные токсичные окислители – гипойодид или гипохлорид:



Кроме того, происходит синтез этими клетками других мощных прооксидантов, таких, как пероксинитрит ($ONOO^-$), гидроксил-радикал (OH^\cdot) и озон (O_3).

Метаболическая активность фагоцитов и способность к поглощению антигенов резко возрастает при активации комплемента (Krueger S. at al., 2018), поэтому логично предположить, что увеличение концентрации комплексов $C1q$ -IgG, инициирующих классический каскад реакций комплемента, может являться также и причиной активации этих процессов.

Показано, что интенсивность свободнорадикальных процессов и активность антиоксидантных систем возрастает с прогрессированием иммунодефицита (Penko N.V. at al., 2015). Накопление АФК приводит к окислительному повреждению, в результате которого происходит дисфункция митохондрий и повреждение клеток, в том числе иммунных (Li L., 2015). Происходит окисление азотистых оснований, причем, в большей степени митохондриальной ДНК, так как она находится в непосредственной близости от источников активных форм кислорода и не защищена гистонами. Супероксидный радикал / супероксид-анион

и пероксид водорода обладают слабой реакционной способностью, тогда как гидроксильный радикал очень активен и повреждает все четыре основания ДНК; синглетный кислород атакует преимущественно остатки гуанина. При повреждении митохондриальной ДНК нарушается синтез компонентов дыхательной цепи, вследствие чего усиливается утечка супероксид-аниона, который способен напрямую повреждать ДНК. С повреждением структур ДНК свободными радикалами в настоящее время связывают различные патологические состояния, в числе которых иммунодефицитные (Игнатов А.В., 2017).

Основной причиной повреждения биологических мембран, особенно в микросомах, митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме, является перекисное окисление липидов (ПОЛ) – процесс, при котором свободные радикалы атакуют липиды, особенно содержащие полиненасыщенные жирные кислоты (Ayala A., 2014).

В клетках здорового организма уровень ПОЛ является жизненно важным звеном в регуляции проницаемости и транспорта веществ через мембраны, в синтезе простагландинов, метаболизме стероидных гормонов и других клеточных механизмах. Свободные радикалы необходимы для регуляции клеточного метаболизма, например, для обновления клеточных мембран. Но при избыточном их действии поврежденные клеточные мембраны не могут полноценно выполнять свои функции, нарушается градиент концентрации ионов и рецепторные функции клеточной мембраны (Звенигородская Л.А., 2015). Следствием этого может быть развитие различных заболеваний, в том числе иммунодефицитных.

Образующиеся в процессе ПОЛ ТБК-активные продукты (основным компонентом которых является малоновый диальдегид) легко обнаруживаются в крови / печени по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) и используются в качестве маркеров окислительного стресса (Чуян Е.Н. и др. 2015; Dyomshina, O.O. at al., 2018; Demkovych A., 2019).

Избыточное накопление прооксидантов при снижении антиоксидантов является одним из важнейших патогенетических факторов, вызывающих окислительную модификацию белков (ОМБ) (Дубинина Е.Е., Пустыгина А.В.,

2008). Образующиеся в реакциях окислительного стресса ненасыщенные альдегиды, участвуют в окислении белков и других биомолекул, что в свою очередь может приводить к инактивации ферментов, повышенной подверженности белков протеолизу, ослаблению или полной потере их функций (Rahal A., 2014).

ОМБ может происходить путем карбонилирования белков по радикальным остаткам аминокислот пролина, аргинина, лизина и треонина с образованием аддуктов Михаэля. Карбонильные производные белков могут образовываться также при взаимодействии аминокислотных остатков лизина, цистеина и гистидина с продуктами ПОЛ. При этом аргинин и лизин могут терять один и больше атомов азота. ОМБ может также происходить в процессе гликирования/гликооксидации аминогрупп лизина (Levine R.L., 2002). Большая роль в ОМБ отводится также гликозилированию (Созарукова М.М. и др., 2016).

Продукты ОМБ чаще всего определяются путем оценки спонтанного и индуцированного карбонилирования белков по уровню образования 2,4-динитрофенилгидразонов, образующихся в результате взаимодействия продуктов свободно-радикального окисления белков с 2,4-динитрофенилгидразином (Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., 1995; Дубинина Е.Е. и др., 2000).

ОМБ обычно определяют в крови и тканях, большей частью, в печени (Муравлева Л.Е. и др., 2010). Основными индукторами ОМБ считаются АФК и продукты ПОЛ (Плюхин Д.В. и др., 2015). К ним следует также отнести ионы металлов переменной валентности (Абаленихина Ю.В. и др., 2012).

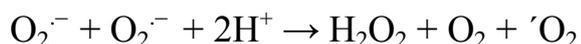
Реактивные окислители могут действовать также на активацию сигнальных путей, инициирующих иммунный ответ, производство медиаторов и активацию клеточных эффекторов (Lugrin J., 2014).

В организме имеется комплексная антиоксидантная система защиты (АСЗ) от повреждения, вызванного свободными радикалами, которая происходит через донорство электронов с последующей конверсией свободных радикалов в безопасные химические конфигурации, не способные повредить клетку и ее компоненты (Whayne T., 2016).

АСЗ состоит из неферментативных и ферментативных компонентов. Антиоксидантные ферменты включают супероксиддисмутазу (СОД), каталазу (КТ), глутатионпероксидазу (ГТ) и глутатионтрансферазу (ГТ). Эта группа ферментов, локализованная главным образом внутриклеточно, оказывает противодействие повреждающему эффекту АФК (Harris S. et al., 2015; Furfaro L. et al., 2016). В то же время, вместе с АФК, она играет важную регулирующую роль в процессе жизнедеятельности организма (Liu R.-M. et al., 2015).

Ферменты антирадикальной защиты характеризуются высокой селективностью действия, направленной против определенных радикалов. В нормальных условиях содержание ферментов АСЗ относительно постоянное, но в условиях усиленного образования АФК увеличивается уровень антиоксидантных ферментов, синтез которых, как и большинства белков, находится не только под генетическим контролем, но и под влиянием различных воздействий (Синицкий А.И. и др., 2014; Quiterio-Gutierrez T. et al., 2019; Zhao, L. et al., 2019).

Супероксиддисмутазы (СОД) – первые антиоксидантные ферменты, которые были охарактеризованы, они способны разлагать два супероксидных аниона на H_2O_2 и молекулярный кислород (Brown D.I. et al., 2015):



Наибольшей активностью из этой группы металлоферментов обладают Cu- и Zn-СОД, состоящие из двух идентичных субъединиц, каждая из которых содержит по одному иону меди и цинка. СОД обнаруживаются в цитоплазме практически всех аэробных клеток (Волыхина В.Е., Шафрановская Е.В., 2009).

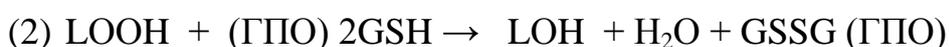
Каталаза (КТ) – это гемсодержащий фермент, который в максимальном количестве находится в эритроцитах, печени и почках, в основном в пероксисомах, где продуцируется перекись водорода, необходимая для неспецифической иммунной защиты (Владимиров Ю.А., 2000). Фермент катализирует реакцию преобразования двух молекул H_2O_2 в молекулы O_2 и H_2O :



Показано, что КТ конкурирует с миелопероксидазой за H_2O_2 и удаляет

гипохлорид, тем самым снижая его повреждающий эффект (Iyad A. et al., 2019).

Глутатионпероксидаза (ГПО) – семейство ферментов, которое имеет восемь изоформ, пять из которых в активном центре содержат селен. Эти тетрамерные ферменты, большей частью обнаруживаются в цитозоле всех тканей млекопитающих. ГПО обладает общей специфичностью к гидропероксидам и высокой специфичностью к восстановленному глутатиону (Кулинский В.И., Колесниченко Л.С., 2009; Chafik A. et al., 2019). Субстратами ГПО являются как пероксид водорода (1), так и органические пероксиды, например, липоперекиси (2):



Глутатионтрансфераза (ГТ) большей частью локализована в макрофагах печени, где находится в цитозоле. Катализирует реакции детоксикации пероксидов и участвующих в процессе S-глутатионилирования белков, являющихся важным регуляторным механизмом биохимических процессов (Калинина Е.В. и др., 2014).

Реакции, катализируемые ГТ:

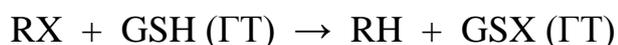
реакции восстановления органических гидроперекисей :



блокирования непредельных углеводов:



нуклеофильного замещения:



Среди неферментных антиоксидантных соединений: витамины (А, С, D, Е, К, F и др.), убихиноны, триптофан, фенилаланин, флавоноиды, каротины и каротиноиды, а также другие органические молекулы, эффективно взаимодействующие с АФК (Peng C., 2014; Sadowska-Bartosz I., 2014; Igielska-Kalwat J., 2015).

В последние годы большое значение придается антиоксидантной терапии

при профилактике и лечении расстройств, возникающих в связи с окислительным стрессом (Nagyási K., 2015). В то же время, имеются данные, свидетельствующие о том, что экзогенные антиоксидантные добавки, не оказывают позитивной модуляции на окислительный стресс (Makinde O., 2017).

Центральная роль в контроле баланса прооксидантной и антиоксидантной систем организма сейчас все больше отводится биометаллам 3d-ряда (Mn, Fe, Co, Cu, Zn). Их координационные соединения с глюконовой кислотой могут быть также рассмотрены в качестве корригирующих факторов оксидантно-антиоксидантного и иммунного гомеостазов (Конкина И.Г. и др., 2002; Князева О.А. и др., 2018).

Показано, что увеличение выработки АФК *in vivo* индуцирует окислительный стресс в организме, что приводит к ослаблению иммунной системы (Yahata T., 2017). Повышенный уровень АФК в иммунных клетках вызывает гиперактивацию воспалительных реакций, приводящих к повреждению тканей и развитию патологии, прогресс или подавление которой регулируется окислительно-восстановительным балансом между про- и антиоксидантной системами (Okeschukwu I.B., 2015).

В механизмах иммунной защиты используются эффекты АФК, поскольку они играют ключевую роль в защите организма от патогенов. Фагоцитарные клетки, В и Т-лимфоциты содержат фермент НАДФН-оксидазу, который вместе с митохондриальными АФК вовлекается в активацию В-клеток путем стимуляции В-клеточного рецептора (Schieber M., 2014).

Таким образом, прогресс или подавление патологии регулируется окислительно-восстановительным балансом между про- и антиоксидантной системами. С одной стороны, увеличение выработки АФК индуцирует окислительный стресс в организме, что приводит к гиперактивации воспалительных реакций и повреждению тканей, т.е. ослаблению иммунной системы. С другой стороны, эффекты АФК используются в механизмах иммунной защиты.

1.3. Роль координационных соединений 3d-металлов с глюконовой кислотой в метаболических процессах организма человека

Термин «d-металлы» относится к ряду элементов в d-блоке периодической таблицы Д.И. Менделеева. Их особенность состоит в том, что они имеют незаполненные внутренние d-орбитали с более низкой энергией по сравнению с внешними S-орбиталями. Это обстоятельство определяет выраженную способность переходных элементов к образованию координационных соединений. Вакантные места в своих d-орбиталях они могут предоставлять электронам с высокоэнергетических орбиталей донорных атомов, таких, как азот, сера, кислород, входящих в состав органических молекул, в том числе, белков, липидов, углеводов, образуя донорно-акцепторные связи. Еще одно важное свойство d-металлов заключается в том, что они могут существовать в разных степенях окисления (за исключением цинка, имеющего заполненную d-оболочку). Эти особенности d-металлов определяют их существенную значимость в биологических процессах, в связи с этим интерес к изучению влияния на биологические мишени, как самих d-металлов, так и их координационных соединений, постоянно возрастает (Haas K.L., Franz K.J., 2009).

К 3d-металлам относятся, так называемые, биометаллы: Mn, Fe, Co, Cu, Zn. Выбор их лиганда для биологических целей обусловлен рядом факторов (Ramachandran S. et al., 2006):

1. Комплексы металлов с выбранным лигандом должны иметь среднюю устойчивость для возможности оптимального взаимодействия с биологическими мишенями.
2. Лиганд не должен быть токсичным, желательно, чтобы он обладал детоксицирующими свойствами, а также способствовал активации иммунной системы.
3. Лиганд должен производиться в промышленных масштабах, поскольку предполагается использование его соединений для широкого круга потребителей.

Всем этим требованиям отвечает глюконовая кислота.

D-Глюконовая (2R,3S,4R,5R)-2,3,4,5,6-пентагидроксигексановая) кислота (**GI**), относящаяся к группе альдоновых кислот находит широкое применение в пищевой и фармацевтической промышленности, производстве косметических продуктов, средств бытовой химии (Ramachandran S. et al., 2006) (рисунок 1).

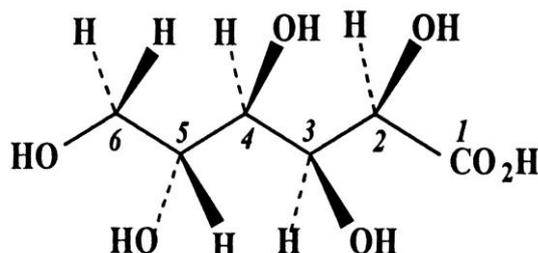


Рисунок 1 – Структура D-Глюконовой кислоты (цит. по: Конкина И.Г. и др., 2003)

Как полидентатный лиганд, содержащий, кроме карбоксильной группы, пять атомов кислорода гидроксигрупп, способных к образованию донорно-акцепторных связей, данная молекула привлекает внимание исследователей в качестве лиганда, снижающего токсичность координированного металла (Конкина И.Г. и др., 2002; Sillanpaa M. et al., 2003; Gregory L. et al., 2008; Amin M.A., Refat M.S., 2013).

Ионы d-элементов в воде легко образуют аквакатионы, которые могут окрашиваться в присущий данному металлу цвет. При образовании в растворах таких окрашенных комплексных ионов происходят электронные переходы, называемые в данном случае d-d-переходами, т.к. d-орбитали данных элементов заполнены только частично. Лишь у элемента Zn (II) 3d-оболочка не заполнена полностью, поэтому электронные переходы в ней невозможны, и раствор цинка бесцветен.

Хелатирование свободных ионов 3d-металлов глюконовой кислотой превращает их в устойчивые, более координационно насыщенные частицы, не способные разрушить биоккомплексы, а, следовательно, малотоксичные. В литературе отмечено, что образование комплексных соединений с 3d-металлами

увеличивает их мембранопроницаемость, обеспечивая транспортировку к клеточным мишеням (Graur V., 2015).

Состав глюконатов отвечает формуле: $Me (C_6H_{11}O_7)_2 \cdot 2H_2O$, где Me - атом металла. Структура комплекса 3d-металла с глюконовой кислотой показана на примере Mn (II) (рисунок 2):

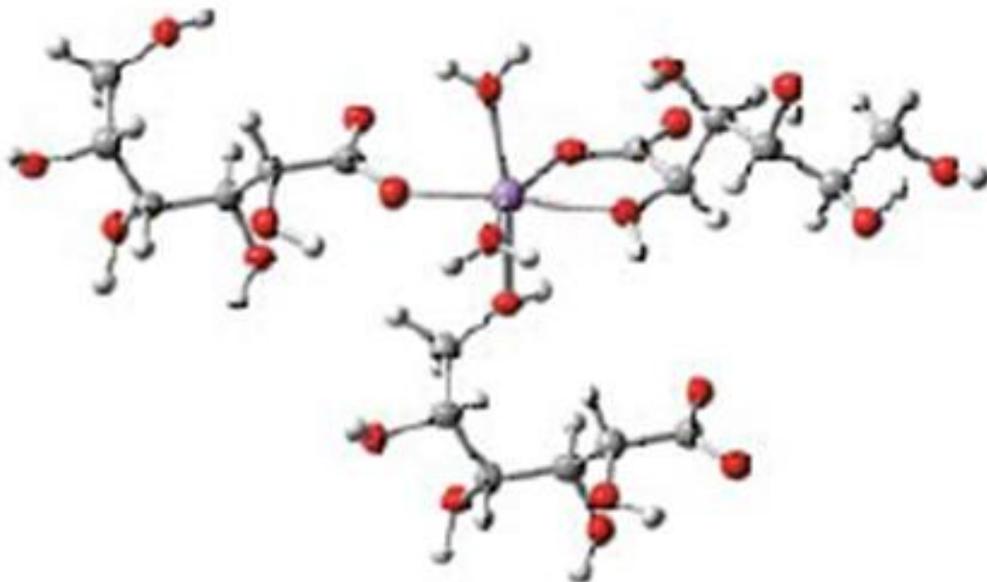


Рисунок 2 – Структура глюконата марганца (II) (цит. по: Gregory L. et al., 2008)

Введение 3d-металлов в соединениях с неорганическими кислотами сопровождается выраженной токсичностью, поскольку они воспринимаются иммунной системой слизистой оболочки тонкого кишечника как гаптены, активирующие моноцитарно-макрофагальную систему по механизму незавершенного фагоцитоза (Лебедева С.А. и др., 2013; Скальная М.Г. и др., 2015; Salabro A.R. et al., 2011; Yu S. et al., 2015). В результате этого происходит индуцирование перекисных процессов, которые приводят к повреждению клеточных мембран. Однако, в составе координационных соединений с рядом хелатирующих лигандов 3d-элементы в значительной степени теряют токсичность.

1.3.1. Ионы марганца (Mn)

Ионы марганца наиболее устойчивы в виде $2+$, остальные степени его окисления нестабильны. Обычно комплексы Mn (II) имеют форму октаэдра.

Марганец – жизненно важный микроэлемент, суточная его потребность у взрослых составляет 2,0-5,0 мг. Большая часть этого элемента присутствует в легких, мышцах, печени, головном мозге, почках, селезенке, костях и т.д.

Марганец оказывает большое влияние на все виды обмена: углеводный (снижает содержание глюкозы в крови и стимулирует синтез гликогена), белковый (увеличивает скорость распада белков), липидный (снижает депонирование триглицеридов), минеральный (способствует ассимиляции фосфора и кальция), участвует в синтезе аскорбиновой кислоты, синтезе гормонов парашитовидной железы, оказывают позитивное влияние на состояние центральной нервной системы (Syrovaya A.O. et al., 2017).

Вследствие своей способности изменять степень окисления от $2+$ до $3+$, марганец может выступать кофактором антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы (MnСОД), необходимого для нейтрализации свободного радикала супероксидного аниона (Tuschl K. et al., 2013). Mn участвует также в образовании активного центра многих других ферментов, играющих важную роль в метаболизме и работе основных систем организма, в том числе иммунной, таких как енолаза, пируваткиназа, пируваткарбоксилаза, фосфоенолпируваткарбоксикиназа, алкогольдегидрогеназа, аргиназа, аденилаткиназа, карбоксипептидаза, креатинкиназа, фосфоглюкомутаза и др., образуя в активном центре мостиковый комплекс, благодаря которому увеличивается сродство фермента к субстрату (Freeland-Graves J. et al., 2015).

В составе пищевых продуктов марганец присутствует обычно в виде неорганических соединений (оксида и сульфата). Другие известные его соединения с кислотами, такие как карбонат, цитрат, глюконат, гидроксипролинат марганца, используются в виде биологических активных добавок. Установлено,

что биодоступность органического марганца выше неорганического примерно в 1,4 раза (Hall J. et al., 2007).

В случае, если концентрация марганца в крови превышает норму, он проявляет токсические свойства, которые проявляются в дисфункции митохондриального тканевого дыхания, генерации реактивных соединений кислорода, нарушении дофаминэргической, глутаматэргической и ГАМК-эргической систем организма (Baker M. et al., 2014).

Всасывание марганца происходит лишь в виде ионов. Процесс всасывания начинается в проксимальном отделе тонкого кишечника, где он абсорбируется энтероцитами в форме Mn^{3+} и связывается с белком трансферрином (Gunter T. et al., 2013). Сначала происходит эндоцитоз образовавшегося с трансферрином комплекса, после этого с помощью трансферринового рецептора (TfR) образуются эндосомы и комплекс проникает внутрь клетки. Затем, как показано на схеме, внутри эндосомы под действием фермента ферроредуктазы Mn^{3+} переходит в Mn^{2+} (рисунок 3).

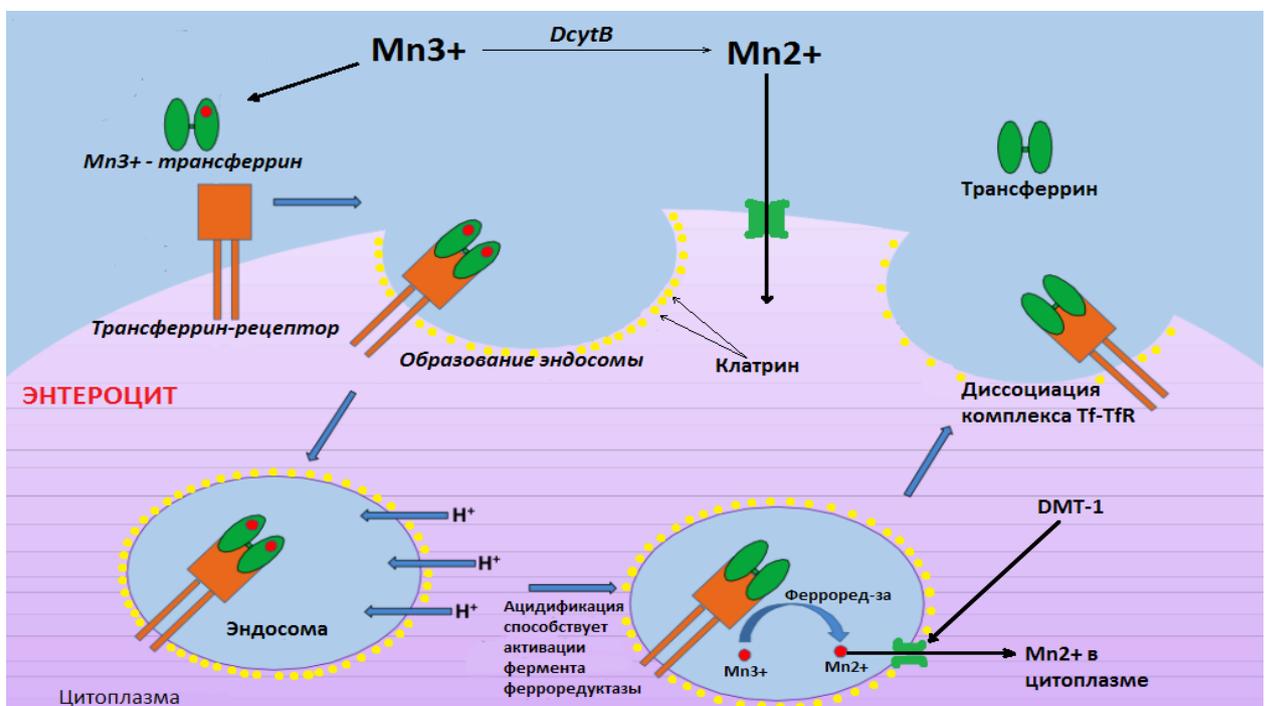


Рисунок 3 – Схема всасывания ионов марганца энтероцитами (цит. по: Sargent B., 2016)

По данным некоторых авторов причиной различия в абсорбционной способности соединений марганца с глюконовой и гидроксипролиновой кислотами является разница в скорости высвобождения иона Mn^{2+} из солеобразующих комплексов в результате действия ферментов желудочно-кишечного тракта (Yenice E. et al., 2015).

Трехвалентный марганец практически не обнаруживается в цитоплазме клеток (Tuschl K. et al., 2013). Основным переносчиком ионов марганца (на 80%) является транспортер двухвалентных металлов – ДМТ-1 / DMT1. Этот транспортер входит в состав образовавшейся эндосомы и выводит ионы марганца (II) в цитозоль (Gruenheid S. et al., 1999).

В цитоплазме энтероцитов ионы марганца практически не используются, а их высокая концентрация вызывает экспрессию генов, кодирующих синтез экспортеров марганца: АТФазы-13А2, SLC30А10, ферропортина и секреторной АТФазы-1. В клетках двенадцатиперстной кишки наибольшую активность проявляет ферропортин. При высоких концентрациях марганца повышается активность АТФазы-13А2, избыток Mn^{2+} связывается в комплекс Mn^{2+} - ДМТ-1 и выводится из клетки по типу экзоцитоза (рисунок 4) (Gruenheid S. et al., 1999; Yin Z. et al., 2010; Leyva D. et al., 2014).

В кровяном русле ионы марганца транспортируются в свободном виде или в комплексе с альбумином, α 2-макроглобулином, β 1-глобулином, и затем попадают в печень. Транспортирование марганца возможно также в другие органы и ткани с помощью транспортного белка трансферрина (Davis C. et al., 1993).

Проникновение ионов марганца в гепатоциты, как показано на рисунке 4, осуществляется с помощью белковых транспортеров: ДМТ-1, ZIP8, ZIP14 (эти транспортеры являются транспортерами ионов цинка), дикарбоксилатного транспортера, трансферриновых рецепторов (TfR), а также через кальциевые каналы (Chen P. et al., 2015).

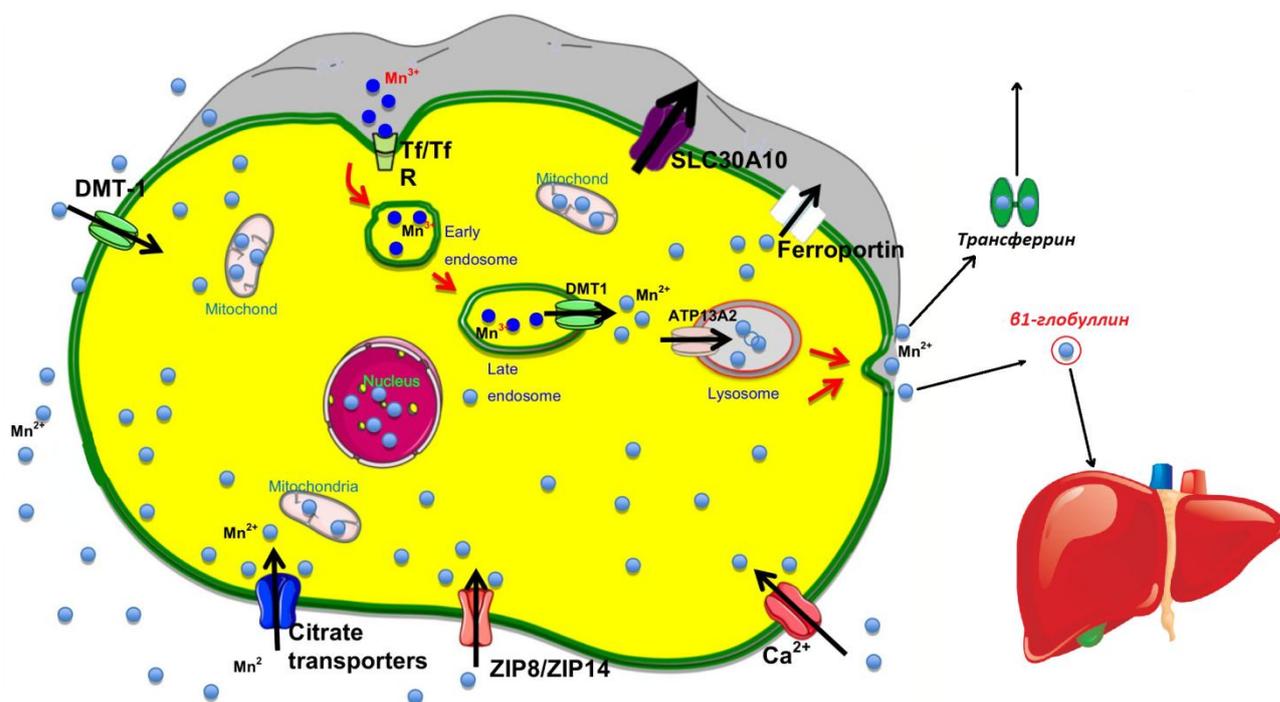


Рисунок 4 – Всасывание и транспорт ионов марганца в кровь и печень (модифицирован из: Chen P. et al., 2015)

Марганец может обладать и отрицательными эффектами (цитотоксичность и генотоксичность), поскольку ионы Mn^{3+} проявляют реакционную способность, индуцируя образование активных форм кислорода, которые могут приводить к развитию оксидативного стресса. При замещении в молекуле гемоглобина иона Fe (II) на ион Mn (II) его способность обратимо связывать O_2 утрачивается. Участие ионов Mn^{2+} в реакциях, катализируемых ДНК- и РНК-полимеразами (в зависимости от концентрации), может приводить к ошибкам синтеза нуклеиновых кислот. Описаны изменения в Mn-зависимом синтезе ДНК, при трансформации клеток из нормальных в опухолевые (Лахин А.В. и др., 2013).

Роль марганца в иммунной системе до конца не определена. В опытах на Mn-дефицитных мышцах продемонстрировано снижение продукции цитокинов и повышение уязвимости к вирусной инфекции (Wang C. et al., 2018).

Также имеются сведения о стимулирующем действии марганца на фагоцитоз (Syrovaya A.O. et al., 2017).

Экспериментально, в опыте на модельном перитоните у мышей, доказана роль этого микроэлемента в иммунной защите в связи с ведущей ролью Mn-содержащего высококонсервативного клеточного белка (MntC) в профилактике инфекции *S. aureus* (Yu W. et al., 2018).

В медицине соединения марганца используются для лечения ожирения, атеросклероза, авитаминоза. Растворы известного соединения перманганата калия (0,1-0,5%) используются для полосканий, промывания ран и т. д.

1.3.2. Ионы железа (Fe)

Fe является жизненно важным микроэлементом, ежедневная потребность в нем составляет 10 мг для мужчин и 15 мг – для женщин.

Схема всасывания свободных ионов Fe^{2+} , а также двух других 3d-металлов (Cu, Zn) в кишечнике представлена на рисунке (рисунок 5) (Nishito Y., Kambe T., 2018).

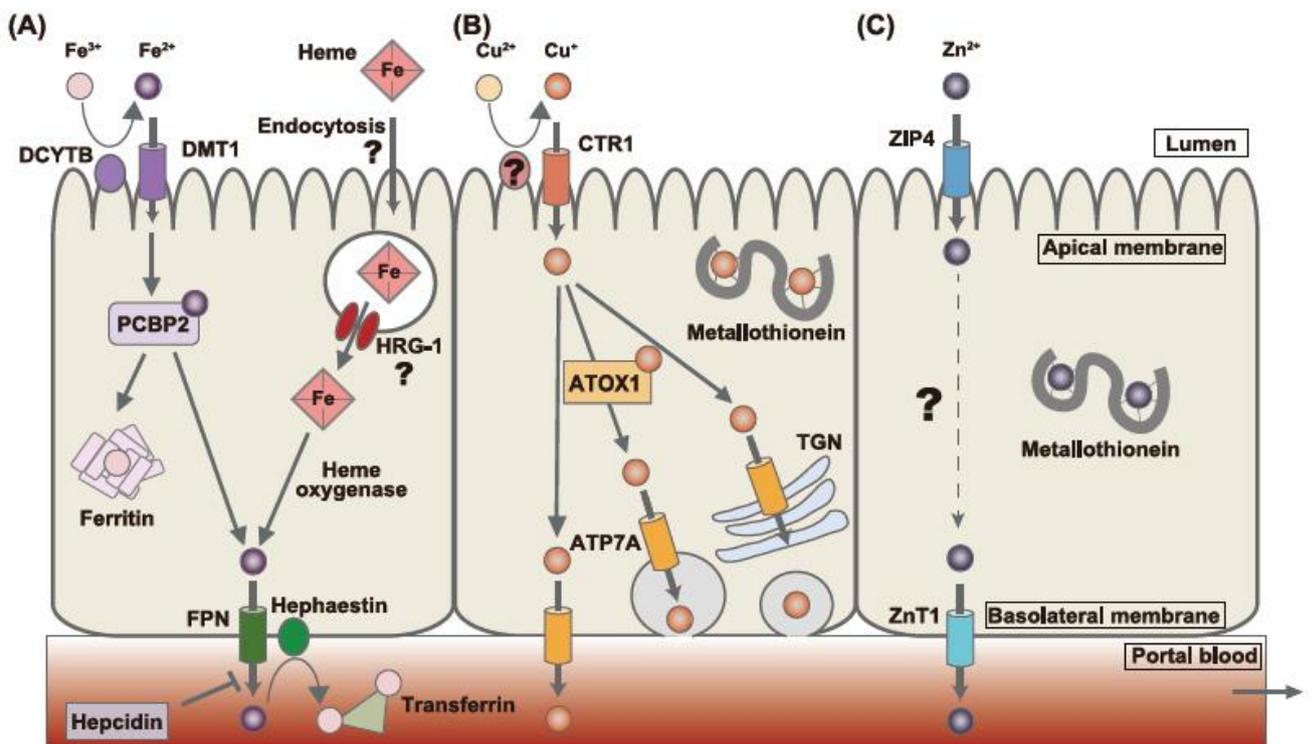


Рисунок 5 – Механизмы абсорбции ионов 3d-металлов: Fe^{2+} (A), Cu^{+} (B), Zn^{2+} (C) (цит. по: Nishito Y., Kambe T., 2018)

На фрагменте (А) показано восстановление негемового иона Fe^{3+} до Fe^{2+} при помощи белкового транспортера DCYTB и перенос с участием транспортера дивалентных катионов DMT-1 (состоящего из 561 аминокислоты с 12 трансмембранными доменами, вырабатываемыми в проксимальном отделе кишечника) к апикальной мембране. После поглощения часть Fe^{2+} связывается с ферритином – белком, состоящим из апоферритина и на 27 % от своей молекулярной массы из коллоидного гидроксида железа. Другая часть Fe^{2+} с помощью белкового транспортера PCBP2 переносится к базолатеральной мембране и затем – в кровь с участием ферропортина (FPN) - железорегуляторного протеина, являющегося цитоплазматическим экспортером железа, ответственным за выход железа в плазму, который присутствует в клетках всех экспортирующих железо тканей, включая, макрофаги, моноциты, гепатоциты, энтероциты (Шамов И.А., 2016).

Затем происходит окисление Fe^{2+} до Fe^{3+} при помощи гепестина – белка, участвующего в метаболизме железа, являющегося ферментом феррооксидазой, который содержит в своем составе 6 ионов меди и демонстрирует максимальную экспрессию в кишечнике.

Доставка железа к периферическим тканям происходит при помощи трансферрина – белка с молекулярной массой около 240 кДа, содержащего два железосвязывающих центра. Ион Fe^{2+} в составе гема может быть поглощен транспортером HRG-1 путем эндоцитоза, после этого гем деградирует с участием фермента гемоксигеназы. Далее ион Fe^{2+} , выделяемый из гема, переносится в портальную кровь с помощью FPN таким же образом, как и для негемового железа. При повышении концентрации железа регулятор гомеостаза железа гепсидин – олигопептид, состоящий из 25 аминокислот, участвующий в деградации ферропортина (FPN), отвечающего за выход ионов железа в кровь, снижает его содержание, что в итоге приводит к снижению уровня железа в плазме.

Ионы железа входят в состав гемоглобина, миоглобина, цитохромов, являющихся ферментами транспортной цепи электронов в митохондриях и

микросомального окисления с участием цитохромов P₄₅₀., входят в активный центр многих ферментов (каталаза, цитохромоксидаза, пероксидаза и др.). В составе ферментов ионы железа участвуют в различных метаболических процессах.

Одной из важнейших функций железа является образование активных форм кислорода, которые выполняют двойную функцию: в низких концентрациях стимулируют защитные силы клеток, а в высоких – приводят к развитию оксидативного стресса, окислительной модификации клеточных структур и, как следствие, к повреждению генетического аппарата клетки (Milto I.V. et al., 2016).

В то же время показано, что введение наночастиц железа играет существенную роль в регуляции свободно-радикального окисления (Бородулин В.Б. и др., 2015; Качесова П.С. и др., 2016). Экспериментально доказана также существенная роль ионов железа (II) в разнонаправленном влиянии на адипогенез: стимулирование у молодых и снижение у взрослых животных (Лебедева Е.Н. и др., 2015).

Биодоступность органических соединений железа значительно превышает неорганические (Zhang Y. et al., 2015). Как и другие двухвалентные катионы металлов, в числе которых Mn, Co, Cu, Zn, ионы железа поступают в энтероциты с помощью специальных транспортеров-переносчиков DMT1, которые обеспечивают также и их вывод из эндоцитарных везикул (Zeliha K. et al., 2015).

Влияние железа на иммунологическую реактивность организма человека реализуется двумя основными путями: 1 – блокирование потребления железа микроорганизмами; 2 – обеспечение необходимых метаболических процессов для реализации иммунного ответа.

При дефиците железа происходит снижение функциональной активности клеточного и гуморального звена врожденного иммунитета, что выражается в снижении показателей фагоцитоза и активности системы комплемента, являющейся источником опсонин для фагоцитоза (Воробьев и др., 2000; Леонов В.В. и др., 2012).

Необходимым условием фагоцитоза - универсального механизма

иммунитета, обеспечивающего защиту организма от патогенных агентов, является респираторный взрыв, для которого также необходимо поступление ионов железа (Вавилова Т.П. и др., 2005; Miethke M. et al., 2007).

Железо, являясь компонентом пероксидгенерирующих и нитроксидгенерирующих энзимов, а также интегральным компонентом миелопероксидазы, необходимо для активации фагоцитирующих клеток и реализации их функций. Фермент рибонуклеотидредуктаза также является Fe-зависимым, поэтому при дефиците железа нарушается синтез ДНК, а, следовательно, дифференцировка и рост клеток, в том числе и иммунных (Новикова И.А., 2012).

На схеме показано, как при стимуляции иммунитета в клетках моноцитарно-макрофагальной системы происходит нарушение обмена и распределения железа (рисунок 6).

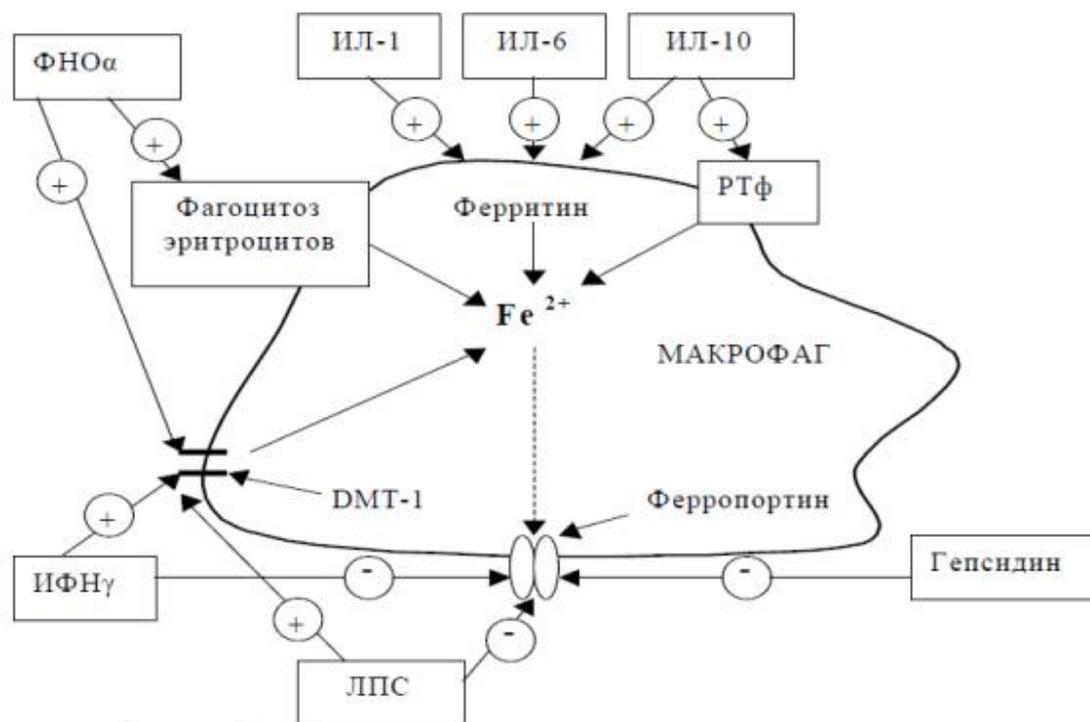


Рисунок 6 – Регуляция процессов распределения железа в клетках ретикулоэндотелиальной системы (РЭС): РТФ – рецептор к трансферрину; DMT-1 – дивалентный металлотранспортер; ЛПС – липополисахарид микроорганизмов (цит. по: Новикова И.А., 2012)

Также продемонстрировано, как выход Fe^{2+} из клеток ретикулоэндотелиальной системы блокируется белком гепсидином, липополисахаридом и ИФН γ . В результате этого происходит деградация белка ферропортина, транспортирующего Fe^{2+} из макрофагов, запускающая механизмы активации поглощения железа фагоцитами: повышение продукции цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-10, активирующих синтез ферритина; ИЛ-10 – синтез рецепторов к трансферрину; ФНО α , ИФН γ , ЛПС – синтез двухвалентного металлотранспортера DMT-1 на макрофагах, в которых концентрация Fe^{2+} поддерживается за счет фагоцитоза и распада эритроцитов при активации ФНО α .

Для активации иммунного ответа необходимо определенное метаболическое обеспечение, в котором железо является неотъемлемой частью, поскольку входит в состав коферментов ряда ключевых ферментов, участвующих в этих процессах.

Эффект железа на клеточно-опосредованный иммунный ответ реализуется через угнетение пролиферации иммунокомпетентных клеток, которая регулируется через рецепторы к трансферрину на активированных Т- и В-лимфоцитах, обеспечивая транспорт железа в пролиферирующие клетки.

При дефиците железа процессы пролиферации тормозятся. При этом установлено, что чувствительность двух типов Т-лимфоцитов к дефициту железа различна. Так Т-клетки хелперы второго типа (Th2) обладают большей способностью к хелатированию железа, поэтому при развитии дефицита железа в первую очередь страдают Th1. Вследствие этого недостаточное поступление железа приводит к угнетению клеточного иммунитета, опосредованного Th1-лимфоцитами (Леонов В.В. и др., 2011, 2016; Миронов А.Ю. и др., 2016).

В литературе имеются также данные о вовлечении железа в регуляцию продукции цитокинов, синтеза белков лимфоцитами (Stephen J., 2001). Показано, что при дефиците железа происходит угнетение продукции ИЛ-2, функциональной активности естественных киллеров (Beard J.L., 2001; Ahluwalia N., 2004).

В медицине железосодержащие соединения широко используются в

качестве антианемических агентов.

1.3.3. Ионы кобальта (Co)

Co^{2+} имеет способность, подобно Zn^{2+} , связывать 4-6 донорных атомов в разных координационных полиэдрах. Оба иона имеют одинаковые эффективные ионные радиусы для всех координационных чисел и сравнимые константы устойчивости в комплексах со многими лигандами. Геометрия комплексов зависит от стерических свойств лигандных групп.

Кобальт накапливается в печени, почках, поджелудочной железе, его суточная потребность составляет 0,05-0,1 мг.

Co известен как компонент витамина B_{12} , который хелатирован четырьмя пиррольными кольцами с образованием корринового макроцикла. Производные данного витамина являются коферментами ряда жизненно важных ферментов – рибонуклеозидтрифосфатредуктазы, метилтрансферазы, метилмалонил-CoA-мутаза, а также некоторых пирофосфатаз, пептидаз и аргиназы. Показано, что кобальт может влиять на активность ферментов, в частности, аденилатциклазы, а также на ферменты метаболизма гема (Курхалюк Н. и др., 2016).

По результатам некоторых исследований введение чрезмерного количества ионов Co (II) вызывает окислительный стресс, снижение уровня восстановленного глутатиона и повышение окисленного, активацию гексозомонофосфатного шунта, а также повреждение ДНК в результате чего происходит дисфункция и гибель клеток (Ганусова Г.В., 2006; ATSDR, 2004).

Имеются также данные о том, что кобальт генотоксичен и способен индуцировать окислительный стресс, апоптоз, имитировать в клетке состояние гипоксии, что приводит к активации гликолиза, ангиогенеза и эритропоэза (Lison D. et al., 2001; Pulido M.D. et al., 2003).

В основе очень многих проявлений влияния кобальта на окислительные функции живых организмов лежит один универсальный внутриклеточный механизм – активация индуцируемого гипоксией фактора HIF-1 (hypoxia inducible

factor). Основными органами, в которых продуцируется этот фактор, являются печень и почки. В оксигенированных клетках флавогемный белок функционирует как NADPH-оксидаза, перенося электроны по цепи к молекулярному кислороду (рисунок 7). При этом генерируется супероксид анион (O_2^-), который в присутствии железа превращается в гидроксильный радикал OH^\cdot и другие активные формы кислорода (АФК). Под действием АФК HIF-1 претерпевает окислительную модификацию, в результате чего узнается протеасомой и быстро деградирует. Co^{2+} , а также другие переходные металлы (Ni^{2+} и Mn^{2+}) могут блокировать железо-зависимую деградацию HIF-1, образуя гетеродимер с конститутивно экспрессированным HIF-1 β , тем самым активируя HIF-1, который переносится в ядро и связывается с элементами ответа в индуцируемых гипоксией генах (Ebert V.L. et al., 1999).

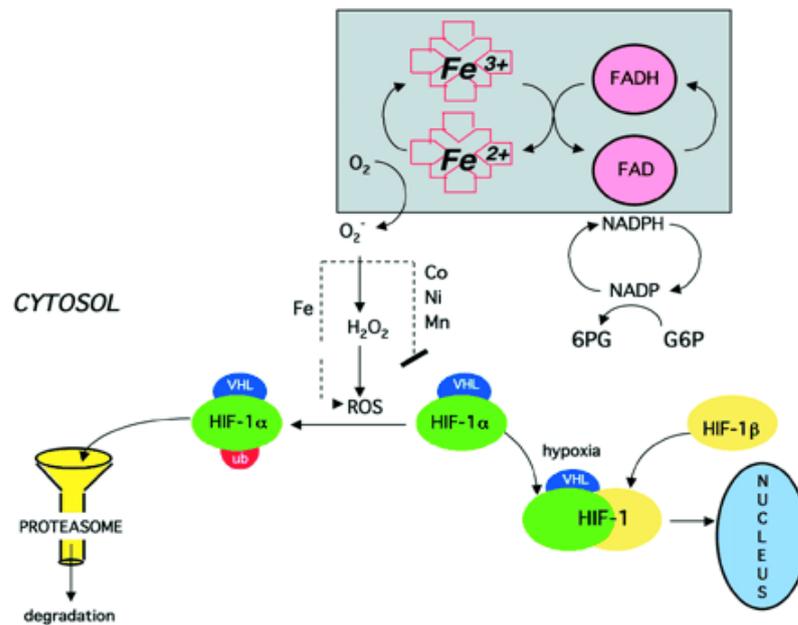


Рисунок 7 – Механизм влияния кобальта на активацию индуцируемого гипоксией фактора HIF-1 (цит. по: Ebert V.L. et al., 1999)

Кобальт играет также важную роль в обмене железа, способствуя всасыванию его из кишечника и катализируя переход депонированного железа в состав гемоглобина. Однако, сродство катиона кобальта к координационным связям азота больше чем у Fe^{2+} , за счет чего он может вытеснять железо из его

соединений. Показано, что при введении хлорида кобальта в гемоглобине происходит замена Fe^{2+} на Co^{2+} , блокировка SH-группы оксидоредуктаз, что вызывает стимуляцию синтеза эритропоэтина (Malard V. et al., 2007).

В то же время получены данные, доказывающие, что органические соединения кобальта могут проявлять антиоксидантные свойства (Тимошинова С.В. и др., 2004), оказывая благоприятное влияние на иммунитет, повышая фагоцитарную активность лейкоцитов (Лазурина Л.П. и др., 2006; Кудрин А.В. и др., 2007; Курхалюк Н. и др., 2016). Имеются сведения о том, что Co^{2+} может непосредственно взаимодействовать с белками иммунной системы, такими как иммуноглобулины и Fc-рецепторы. В опытах *in vitro* показано, что кобальт (II) снижает пролиферацию В- и Т-лимфоцитов, способствует высвобождению цитокинов ИЛ-2, ИЛ-6 и ИФН- γ . Также отмечено его действие на иммунитет через участие в синтезе тиреоидных гормонов (ATSDR, 2004).

В медицине используются несколько препаратов кобальта: цианокобаламин (витамин B_{12}), коамидум (комплексный препарат Co с амином никотиновой кислоты), которые вместе с препаратами железа используются для лечения анемий, заболеваний печени, нервной системы. Сульфат кобальта применяется при анемии, *radiocobalt-60* (^{60}Co) используется при лечении онкологических заболеваний.

1.3.4. Ионы меди (Cu)

Cu – один из важнейших химических элементов. В организме человека находится в двух формах: Cu(I) и Cu(II), которые легко связывают сульфгидрильную группу, а Cu(II) окисляет ее до дисульфидной, восстанавливаясь до Cu(I).

Установлено, что ключевым экспортером меди в энтероцитах кишечника является CUA-1, перераспределение которого регулируется уровнем ионов меди в клетке: в условиях избытка меди локализуется в лизосомах энтероцитов, а при недостатке - в мембране (Naarin C. et al., 2017).

На рисунке 5 (фрагмент В, глава 1.3.2) показано, что Cu^{2+} восстанавливается в Cu^+ с участием нескольких редуктаз. Затем поглощается с помощью рецептора CTR1 на плазматической мембране и переносится белковым транспортером ATOX1 на другой белковый транспортер ATP7A для экспорта в портальную вену. ATP7A может транспортировать медь на транспортер TGN или везикулы, для экспортирования в кровь. Экспортируемые ионы меди транспортируются в печень, а избыток цитозольных ионов связывается с металлотioneином, видимо для снижения токсичности.

Свободные ионы меди в клетке являются высокотоксичными, их избыток вызывает окислительно-восстановительные реакции, образующие активные формы кислорода. В норме у человека до 70% плазменной меди связано с церулоплазмином, который является основным источником хранения меди в организме человека (Linder M.C., 2016). Молекула церулоплазмина – α_2 -глобулина крови, содержит 6-7 атомов Cu , обуславливающих его оксидазную активность. Интересно, что Cu(I) и Cu(II) находятся в соотношении примерно 1:1, а два атома Cu(I) связаны с атомами серы.

Согласно имеющимся данным, церулоплазмин блокирует участие Fe^{2+} в образовании активных форм кислорода, т.е. обладает антиоксидантными свойствами (Hilal A.H. et al., 2017). Кроме того, этот белок оказывает позитивное влияние на ферментативное звено антиоксидантной защиты, и иммунные реакции (Varfolomeeva E.Y. et al., 2016).

Возможность меди легко захватывать и переносить электроны объясняет её важность в окислительных процессах. Катион меди необходим для функционирования многих Cu -зависимых ферментов, таких как лизилоксидаза, цитохром C оксидаза, тирозиназа, дофаминовая β -гидроксилаза, α -амидирующая монооксигеназа пептидилглицина, моноаминоксидаза, церулоплазмин, супероксиддисмутаза и других, биологическая роль которых связана с процессами гидроксирования, переноса электронов к молекуле кислорода, а также окислительного катализа.

Ключевой антиоксидантный фермент $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -супероксиддисмутаза (СОД), вызывающий обрыв цепных реакций, идущих по свободно-радикальному механизму, катализирует реакцию разложения супероксид-аниона до молекул воды и перекиси водорода (Слесарев В.И., 2000).

Ферроксидазы, содержащие в своем составе Cu^{2+} , транспортируют ионы железа, необходимые для метаболических процессов (тканевое дыхание, окислительное фосфорилирование и т.д.) (Kodama H. et al., 2012; González-Mendoza D. et al., 2013; Vashchenko G., MacGillivray R.T., 2013).

Показано, что катионы меди в клетке контролируют апоптоз следующим образом: ингибитор апоптоза XIAP (X-linked Inhibitor Apoptosis Protein), ингибирующий активность каспазы-3, содержит медь-связывающий мотив, при взаимодействии с катионами меди, комплекс XIAP-каспаза-3 диссоциирует, что вызывает активацию фермента и индукцию апоптоза (Mufti A.R. et al., 2007).

Для поддержания уровня меди в клетке в XIAP имеется еще один сайт, специфически связывающий цитоплазматический белок COMMD1, участвующий в выведении катиона. В результате такого связывания происходит деградация белка, и баланс меди сохраняется (Burstain E. et al., 2004).

Ионы меди необходимы также для поддержания иммунного гомеостаза, что находит подтверждение в повышенной восприимчивости к бактериальной инфекции животных, содержащихся на рационе с дефицитом этого 3d-металла.

Показана регулирующая роль меди в функционировании макрофагов (рисунок 8) (Lloyd M.M. et al., 2013; Freitas M., 2014). При этом, ведущую роль в регуляции поступления меди в макрофаги, по данным некоторых авторов, играют ИФН γ и липополисахариды (ЛПС) (Rehmani N.S., 2017).

Обнаружено влияние провоспалительных цитокинов на гомеостаз меди в макрофагах RAW264.7. Было показано, что ИФН- γ увеличивает экспрессию высокоаффинного импортера меди CTR1 и стимулирует поглощение меди, что сопровождалось медь-стимулированным транспортом экспортера меди ATP7A от аппарата Гольджи к фагосомам (White C. et al., 2009).

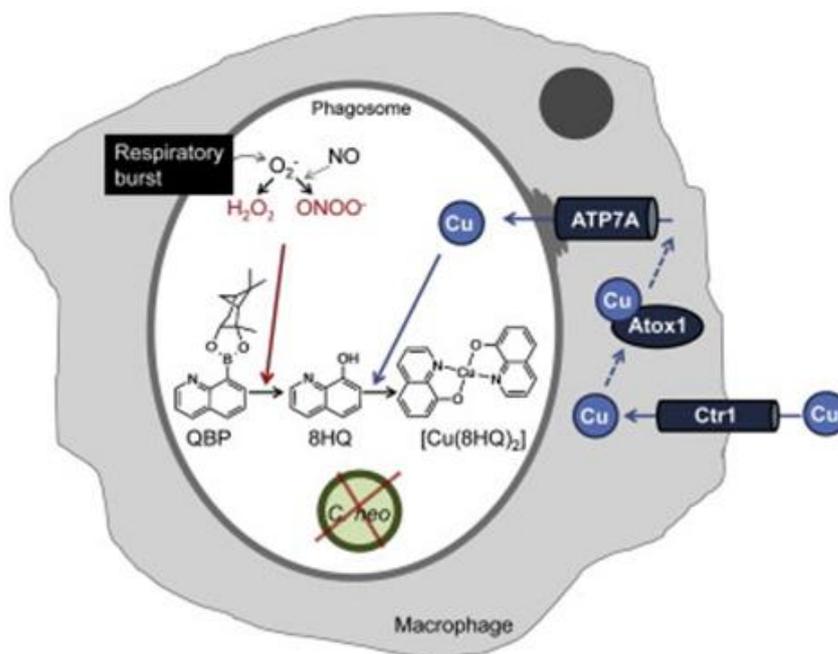


Рисунок 8 – Использование меди макрофагами (цит. по: Lloyd M.M. et al., 2013)

Показано, что при дефиците меди происходит снижение количества миелоидных предшественников в костном мозге, увеличение восприимчивости к инфекциям, нейродегенеративным заболеваниям (Jarosz S.A. et al., 2018), а также задержка в развитии лимфатических органов, снижение процента Т-лимфоцитов, особенно субпопуляции $TCD4^+$ и отношения $TCD4^+ / TCD8^+$, синтеза антител и фагоцитарного индекса клеток, нарушение синтеза белков острой фазы, в частности, цитокинов и церулоплазмينا (Loison F. et al., 2014).

В медицине из соединений меди применяется сульфат ($CuSO_4$), как антисептическое средство, которое используется в качестве противоядия при отравлении белым фосфором. Микродозы меди вводятся для лечения анемий.

Препараты меди используются в психиатрии, поскольку они оказывают успокаивающее действие. Медьсодержащие соединения вместе с йодом назначают для профилактики и лечения эндемического зоба.

1.3.5. Ионы цинка (Zn)

Zn - 3d-элемент с полностью заполненной d-орбиталью. Обычно степень окисления цинка равна +2, что соответствует потере двух 4s электронов. Цинк относится к жизненно важным (эссенциальным) элементам, и содержится в организме в большом количестве, уступая только Na, K, Ca, Mg. Значительная его часть в организме человека находится в мышцах, но наиболее высока его концентрация в ткани простаты, где она может достигать 15 ммоль/кг (в других тканях составляет обычно 0,3-0,5 ммоль/кг). В крови цинк содержится в эритроцитах, где выполняет функцию кофактора карбоангидразы. Резервный пул его в организме находится в составе металлотионеинов.

Механизмы абсорбции, транспорта и экскреции цинка связаны с двумя классами транспортеров (ZnT и Zip) (Шейбак В.М. и др., 2013; Fukada T. et al., 2011). Семейство Zip-транспортеров участвует в переносе цинка из внеклеточного пространства в цитоплазму клетки. Особенно большую роль в его абсорбции играет Zip4 (т.к. при его отсутствии возникает энтеропатический акродерматит).

На рисунке 5 (фрагмент С, подглава 1.3.2) показано, что Zn^{2+} через белковый транспортер ZIP4 транспортируется в базолатеральную мембрану или связывается с металлотионеином (молекулярный механизм этого процесса еще не выяснен). Затем ионы цинка экспортируются в портальную вену через транспортер ZnT1 и доставляются в периферические ткани.

Концентрация цинка может понижаться под действием стресс-гормонов. При этом, также возможно снижение концентрации альбумина, являющегося основным цинк-переносящим белком. Но уровень цинка зависит в большей степени от изменения активности и количества транспортеров, особенно Zip14 и печеночного металлотионеина, который является также антиоксидантом и модулятором абсорбции цинка (Li X.Y. et al., 2008).

Катионы цинка выполняют в клетках три основные функции: каталитическую, структурную и регуляторную. Цинк (II) в качестве кофактора входит в состав активного центра свыше 300 ферментов, в том числе

участвующих в обмене нуклеиновых кислот. Некоторые из этого ряда: металлопротеиназы, трансферазы (РНК- и ДНК-полимеразы, обратная транскриптаза, транскарбамилазы), гидролазы (щелочная фосфатаза, аминопептидаза), лиазы (альдолаза, карбоангидраза), оксиредуктазы (алкогольдегидрогеназа, супероксиддисмутаза) и др. Открытие цинк-фингерных участков в белках показало наличие у цинка структурной функции (Williams R.J., 2012).

Цинк принимает участие в процессах, связанных с иницированием деления клеток, определяет структуру факторов транскрипции, участвуя, таким образом, в синтезе ДНК, РНК. ДНК-метилтрансферазы. Гистоновые лизинметилтрансферазы и гистондеацилазы являются также цинк-содержащими ферментами (Ma X., 2014). Транскрипция серингидроксиметилтрансферазы регулируется цинком, что может указывать на регуляторный эффект цинка в метаболизме фолатов (Шейбак Л.Н., 2015). Избыток Zn может разбалансировать равновесие обмена других металлов.

Цинк играет регуляторную роль в иммунной системе (Naase H., Rink, L., 2009), проявляя как про-, так и противовоспалительные эффекты, которые связаны напрямую с секрецией цитокинов моноцитами. Молекулярной основой этих эффектов является взаимодействие цинка с сигнальной трансдукцией моноцитов. В частности, цинк активирует / ингибирует несколько сигнальных путей, которые оказывают влияние на передачу сигнала рецепторам чувствительным к патогенам, так называемым Toll-подобным рецепторам (TLR), активация которых приводит к секреции провоспалительных цитокинов.

Взаимодействие цинка с тирозинфосфатазой, протеинкиназой C, а также модуляция связывания липополисахарида с его рецептором (TLR-4) – все это приводит к усилению продуцирования цитокинов. Показано также влияние цинка на продукцию Ил-6, синтез белков острой фазы в печени, глюконеогенез, образование активных форм кислорода (АФК). Через сигнальные молекулы (оксид азота и циклический нуклеотид), ингибирование рецептора-киназы-1 (связанного с ИЛ-1) и ингибитора киназы каппа-В фактора цинк

противодействует продуцированию провоспалительных цитокинов (Haase H., Rink L., 2009).

Имеются данные, что ионы цинка активно участвуют в иммуногенезе, опосредованно влияя на синтез Т-лимфоцитов, стимулируют фагоцитарную активность нейтрофилов (Халиуллина С.В., 2013).

В литературе описаны и некоторые другие эффекты иммунной системы в ответ на поступление цинка (Rink L., Gabriel P., 2017), что указывает на его роль в иммунитете, но большинство из них на сегодняшний день недостаточно изучены.

Важность роли цинка в регуляторных процессах подчеркивает тот факт, что регулируемые им гены, находятся в тонкой кишке, тимусе и моноцитах.

Большинство из этих генов вовлечены в реакции иммунного ответа, стресса, окислительно-восстановительного процесса. Среди них инициированы гены рецепторов цитокинов Т-клеток, белков теплового шока и репарации повреждённой ДНК (Cousins R.J. et al., 2017).

В процессе иммунного ответа, ведущую роль играет нуклеарный фактор транскрипции – NF-κB, представляющий комплекс гомо- и гетеродимеров, состоящих из комбинации различных NF-κB/Rel-белков, связывающихся с ДНК, и контролирующей экспрессию многих генов, в том числе, кодирующих синтез цитокинов. NF-κB (p65/p50) присутствует в цитоплазме в виде комплекса, связанного с ингибитором – белком I-κB. Различные сигналы могут приводить к активации I-κB-киназного комплекса (ИКК), состоящего из субъединиц ИКК-α и ИКК-β, катализирующих фосфорилирование I-κB. Фосфорилированные субъединицы ингибитора I-κB в последующем подвергаются протеолизу, а димеры NF-κB переносятся из цитоплазмы в ядро клетки. К активации NF-κB могут приводить различные агенты, например, цитокины, продукция которых увеличивается при поступлении цинка: ИЛ-1, ИФН-γ, α-ФНО, ИЛ-6 (Кунцевич Н.В., 2012).

Препараты цинка широко применяются в медицине как для приема внутрь, так и мазей и помад, например, в виде стеарата - местного антисептика, как

зубной цемент ($Zn_3(PO_4)_2$), а также для кристаллизации препаратов инсулина ($Zn(OH)_2$).

Таким образом, данные литературы свидетельствуют о важной роли ионов 3d-металлов в метаболических процессах организма человека. При этом биологические эффекты координационных соединений 3d-металлов с глюконовой кислотой, увеличивающих биодоступность этих металлов, практически не рассматривались. Вопросы влияния их на оксидантно-антиоксидантный и иммунный гомеостаз мало изучены.

Остается не исследованным влияние глюконатов 3d-металлов на окислительный гомеостаз при иммунодефицитных состояниях.

Поэтому, необходимо было на модели экспериментального иммунодефицита с использованием химиотерапевтического препарата циклофосфида охарактеризовать влияние глюконатов 3d-металлов на:

- процессы ПОЛ и окислительной модификации белка,
- показатели ферментативной антиоксидантной системы,
- показатели клеточного и гуморального звеньев иммунной системы,
- рассмотреть возможные механизмы корректирующего действия данных соединений через связующие звенья иммунной системы: цитокины и комплемент.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом экспериментальных исследований *in vivo* явились беспородные белые мыши в количестве 378 особей – половозрелые 2,5-3-х месячные самцы массой 25-28 г., полученные из питомника лабораторных животных ГУП «Иммунопрепарат» г. Уфы.

Животные были отобраны примерно одного возраста, чтобы минимизировать возрастные различия исследуемых биохимических показателей. Содержались они 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 помещали по 12 штук в пластмассовые клетки (площадь клеток 1125 см²), на дно которых насыпали деревянные стружки. Мыши получали стандартный корм по рациону питания лабораторных животных (ГОСТ Р50258-92) и воду без ограничения. Животных содержали при температуре 20 – 25⁰ С и 65% влажности с естественным световым режимом.

Содержание животных, вывод из эксперимента, забор крови 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 штамм клеток мышинной миеломы линии Sp 2/0 Ag14 (Открытое акционерное общество «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения», Москва).

Используемые в экспериментах глюконаты 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu, Zn) были синтезированы в лаборатории координационной химии ОСП ФГБНУ Уфимского института химии УФИЦ РАН (Конкина И.Г. и др., 2002, 2003).

2.1. Моделирование у мышей иммунодефицита

Модель иммунодефицита создавали путем внутрибрюшинного введения цитостатика циклофосфамида (ЦФ) (50 мг/кг) («Бакстер АГ», Швейцария), поскольку такая модель считается наиболее удобной для изучения различных метаболических и иммунных нарушений (Маянская И. В. и др., 2013; Мельникова В.И. и др., 2013). Такой способ введения препарата обеспечивал равномерное поступление вещества в систему кровообращения, замедлял скорость выведения из организма, что позволяло формировать длительное по времени состояние вторичного иммунодефицита (Мавзютов А.Р. и др., 2017).

Достижение иммунодефицитного состояния подтверждалось путем экспериментального сравнения поглотительной и метаболической активности фагоцитов, а также концентрации IgG интактных и подвергавшихся воздействию циклофосфамида мышей. Было показано, что в крови мышей, отобранной на 16-е сутки, происходит достоверное снижение ФЧ на 57,4%, ФИ – на 23,8%, ИФИ – на 67,6%, НСТ-СП – на 35,5% и НСТ-ИН – на 29,6%, СЦК-СП – на 35,5%, СЦК-ИН – на 25,7%, ИС – на 45,8% и IgG – на 53% ($p < 0,05$).

В предварительных экспериментах, основываясь на литературных данных, использовали различные дозировки циклофосфамида – от 20 до 100 мг/кг (Конкина И.Г. и др., 2002; Князева О.А., 2008). Доза препарата 50 мг/кг была выбрана как наиболее оптимальная, поскольку обеспечивала формирование выраженного и стойкого иммунодефицитного состояния и не приводила к непредсказуемой гибели подопытных животных.

2.2. Введение глюконатов 3d-металлов и препаратов сравнения

Введение глюконатов 3d-металлов и препаратов сравнения начинали через 24 часа после инъекции циклофосфамида, и далее ежедневно перорально с помощью зонда в течение 14 дней.

В исследованиях иммунного гомеостаза в качестве препарата сравнения

использовали ликопид (4-О-(2-ацетиламино-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-N-ацетилмурамил)-L-аланил-D-α-глутамиламид) (ООО «Пептек», Россия) – синтетический аналог гликопептидов бактериальной стенки, обладающий высокой иммуномодулирующей активностью и слабой пирогенностью, который оказывает влияние на рост клеточной адгезии, поглощение микроорганизмов, образование активных форм кислорода, синтез цитокинов интерлейкина-1, фактора некроза опухоли, колониестимулирующих факторов, что стимулирует продукцию антител и пролиферацию Т- и В-лимфоцитов (Семенова И.Б., 1991; Лебединская Е.А. и др., 2012).

В качестве препарата сравнения в исследованиях окислительного, иммунного гомеостаза и цитокинового профиля использовали глюконат кальция.

Выбор данного препарата сравнения был обусловлен тем, что в комплексах изучаемых глюконатов 3d-металлов глюконовая кислота присутствует в виде глюконат-иона, и для сравнения необходимо было соединение, содержащее глюконат-ион, но не содержащее 3d-элемент.

Все препараты разводили в дистиллированной воде и вводили перорально по 0,18-0,20 мл (в зависимости от массы животного) ежедневно, через сутки после внутрибрюшинного инъектирования циклофосфамида в рассчитанных дозировках:

- ликопид – 0,025 мг/мл согласно инструкции (0,14-0,28 мг/кг);
- глюконат кальция (CaGl) – вводили в соответствии с принятой дозировкой для данного препарата, исходя из суточной дозы для человека (по инструкции 5-6 г), т.е. примерно 86 мг на 1 кг массы. В пересчете на средний вес мыши (25 г) составляет 2,15 мг, или $5 \cdot 10^{-6}$ моль;
- глюконаты 3d-металлов (3dMeGl) – в концентрации 10^{-2} моль/л, которая была использована, исходя из предыдущих исследований (Конкина И.Г. и др., 2002) и рассчитывалась по иону металла. Выбранные нами дозы соответствуют опубликованным ранее данным и дозам, принятым в медицинской практике.

Мыши контрольных групп получали дистиллированную воду в том же объеме.

На 16-е сутки мышей декапитировали под эфирным рауш-наркозом и осуществляли забор крови, часть которой вносили в стерильные емкости с антикоагулянтом (раствор гепарина 5000 ЕД/мл, Белмедпрепараты, Беларусь) для предотвращения свертывания крови, а другую часть центрифугировали для получения сыворотки крови.

2.3. Определение токсичности соединений 3d-металлов с глюконовой и хлористоводородной кислотой

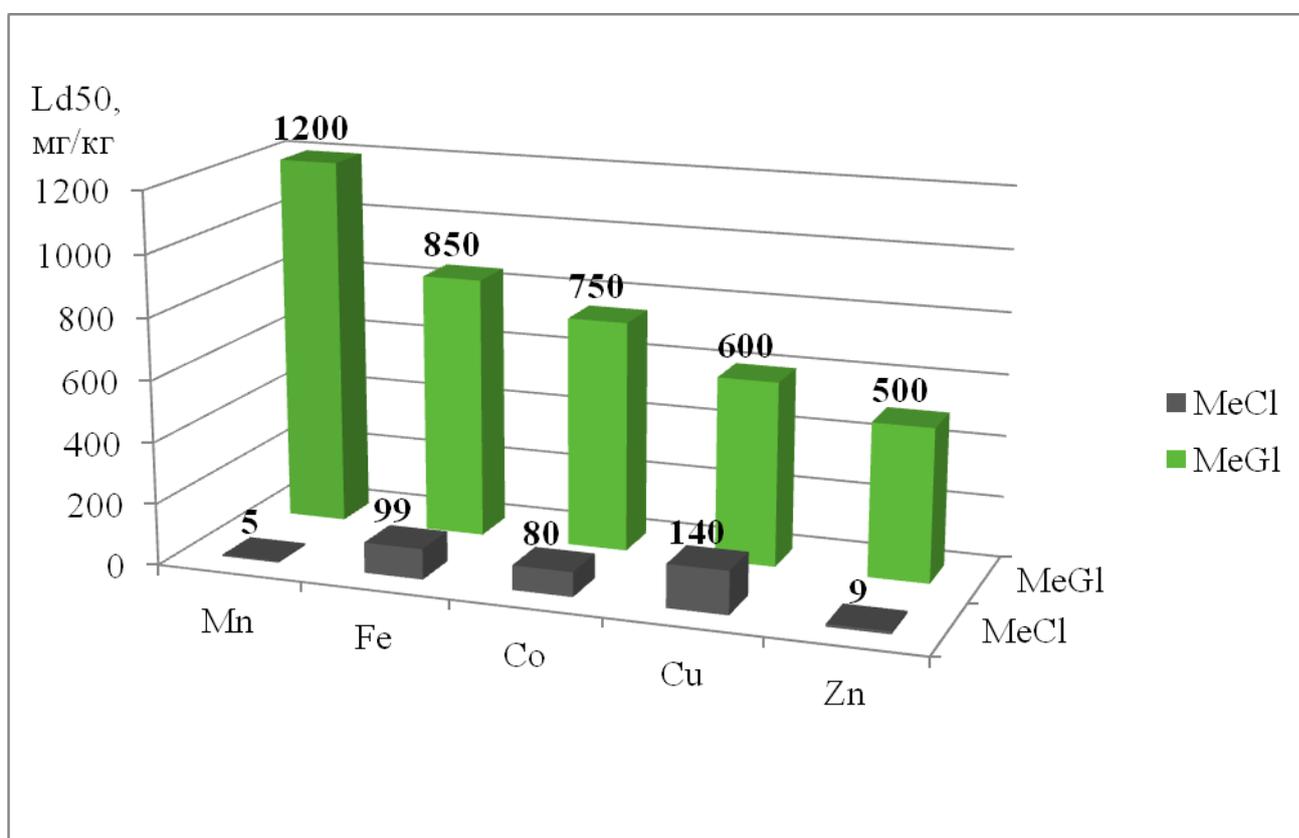


Рисунок 9 - Определение дозы введения соединений 3d-металлов (MeGl) с глюконовой кислотой в сравнении с хлористоводородной (MeCl) для мышей при пероральном введении, LD₅₀ мг/кг

Дозу введения глюконатов 3d-металлов (MeGl) определяли при пероральном введении беспородным мышам в сравнении с хлоридами 3d-металлов (MeCl). Соединения растворяли в дистиллированной воде, одну

дозировку исследовали на 6 мышах, которых наблюдали в течение 14 дней. Клиническую картину отравления мышей при введении данных солей отмечали по замедлению дыхания и развитию судорог. Среднелетальные дозы (Ld50) вычисляли по методу Литчфильда и Уилкоксона (Беленький М.Л., 1963).

Результаты определения Ld50 глюконатов 3d-металлов показаны на рисунке 9: MnGl – 1200 мг/кг, FeGl – 850 мг/кг, CoGl – 750 мг/кг, CuGl – 600 мг/кг, ZnGl – 500 мг/кг.

Значения Ld50 оказались значительно ниже аналогичных значений для солей данных 3d-металлов с неорганическим анионом Cl⁻: MnGl – в 240 раз, ZnGl – более, чем в 55; CoGl – более, чем в 9; FeGl – более, чем в 8 и CuGl – более, чем в 4 раза.

Полученные результаты свидетельствуют о хелатирующем эффекте D-глюконовой кислоты и доказывают, что глюконаты 3d-металлов не оказывают выраженной токсичности.

2.4. Культивирование клеток и определение цитотоксической активности глюконатов 3d-металлов *in vitro*

Цитотоксическое действие глюконатов 3d-металлов изучали *in vitro* - на культуре клеток мышинной миеломы штамма Sp2/0 Ag14 в концентрации $1,0 \cdot 10^6$ кл/мл.

Культивирование клеток осуществляли в питательной среде RPMI-1640 с 10% фетальной сывороткой (фирмы HyClone) в CO₂-инкубаторе при температуре 37⁰ С.

Концентрация исследуемых соединений составляла 10⁻² моль/л, время экспозиции – 24 часа.

2.5. Подсчет числа живых клеток при определении цитотоксичности

Подсчет числа живых клеток при определении цитотоксичности глюконатов

3d-металлов осуществляли следующим образом: к 0,2 мл суспензии клеток миеломы штамма Sp2/0 Ag14 в концентрации $\cdot 10^6$ кл/мл добавляли такой же объем красителя трипанового синего.

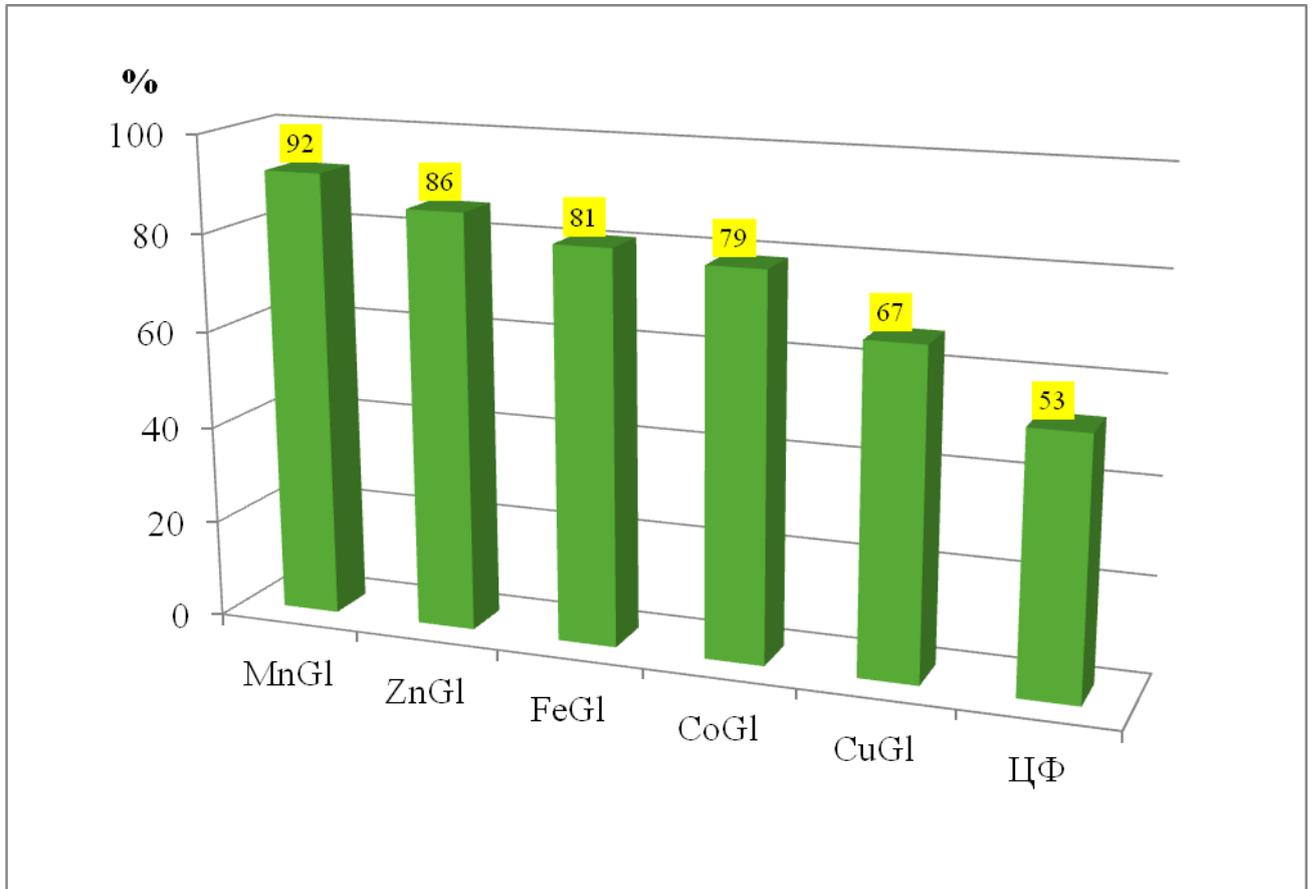


Рисунок 10 – Результаты определения цитотоксичности глюконатов 3d-металлов (3dMeGl) в сравнении с циклофосфамидом (ЦФ) *in vitro* – на культуре клеток мышинной миеломы Sp2/0 Ag14, по оси Y показан процент живых клеток

Краситель – трипановый синий отечественного производства (ХЧ), предварительно готовили, разведив его в забуференном физ.растворе (ЗФР) до концентрации 0,04%.

Смесь клеток с раствором красителя тщательно перемешивали и вносили в камеру Фукс-Розенталя.

Подсчет клеток вели под микроскопом в пяти квадратах по диагонали камеры: отдельно живые (бесцветные) и мертвые клетки (голубого цвета). Затем рассчитывали количество живых клеток в одном мкл по формуле:

$$X = A \cdot 160 / n,$$

где X – общее количество клеток; A – количество клеток в одном квадрате, n – количество квадратов.

За показатель цитотоксического действия принимали долю живых клеток от общего количества клеток в процентах.

Средние значения результатов определения цитотоксической активности глюконатов 3d-металлов *in vitro* в шести повторностях (на культуре клеток мышинной миеломы штамма Sp2/0 Ag14) представлены на диаграмме (рисунок 10). Сравнение результатов проводили с помощью программы «AtteStat».

Было определено, что все соединения 3d-металлов с глюконовой кислотой при концентрации 10^{-2} моль/л в различной степени проявляют цитотоксическое действие: MnGl – 92 %, ZnGl – 86%, FeGl – 81%, CoGl – 79% и CuGl – 67%. При этом доля живых клеток под действием циклофосфида составила 53 %, что значительно ниже, чем при использовании глюконатов 3d-металлов ($p < 0,05$).

2.6. Определение вторичного продукта перекисного окисления липидов – ТБК-реактивных соединений

Выявление и количественное определение ТБК-реактивных продуктов проводили по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (Коробейникова Э.Н., 1989).

Ткань печени гомогенизировали при температуре 4°C. Полученный гомогенат разводили 0,04 М Na-фосфатным буферным раствором до 1%. Затем 2 мл раствора депротенизировали путем добавления 1 мл 28% ТХУ и центрифугировали в течение 10 минут при 1500 g. После этого отбирали 2 мл депротенината, смешивали с 1 мл 0,8% раствора ТБК и затем помещали в кипящую водяную баню на 15 минут.

Оптическую плотность регистрировали на спектрофотометре при 532 нм в 1 см кювете против контрольной пробы, которую готовили также, как описано, но вместо исследуемого гомогената печени добавляли 0,04 М Na-фосфатный буферный раствор.

Расчет производили по формуле с использованием программы для расчета в «Microsoft Excel»:

$$C \text{ (мкмоль/г гомогената печени)} = (E \times 10^6 \times V \text{ (мл)}) / 1,56 \times 10^5 \times V, \text{ где}$$

E – оптическая плотность,

V – объем жидкости (мл);

10^6 – коэффициент пересчета в мкмоль;

$1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ – коэффициент молярной экстинкции;

V – исходный объем образца (мл).

2.7. Определение окислительной модификации белка по показателям карбонилирования белка

Определение окислительной модификации белков проводили по образованию динитрофенилгидразонов по методике, описанной в (Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., 1995).

Принцип этого метода заключается в том, что продукты свободно-радикального окисления белков при взаимодействии с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) образуют 2,4-динитрофенилгидразоны, которые определяют спектрофотометрически: альдегидфенилгидразоны – при длине волны 270 нм, и кетондинитрофенилгидразоны в интервале длин волн 360-370 нм.

Определение спонтанного и индуцированного карбонилирования белков (КБсп и КБинд) проводили в 0,1 мл 10% гомогената печени в фосфатном буфере (для КБинд добавляли $\text{Fe}^{2+} / \text{H}_2\text{O}_2$). После обработки 20% ТХУ в опытную пробу вносили 0,1 мл 0,1 М раствора 2,4-динитрофенилгидразина (2,4-ДНФГ), а в контрольную – 0,1 мл 2М раствора HCl . Далее пробы инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, и для получения белкового осадка центрифугировали при 3000 g в течение 15 минут. Осадок промывали 2 раза в 5 мл смеси этанол-этилацетат (1:1) для экстракции липидов и 2,4-ДНФГ, который не прореагировал с карбонильными группами модифицированных белков.

Образовавшийся осадок высушивали для удаления растворителей и растворяли в 2,5 мл 8 М раствора мочевины. Для лучшего растворения белкового осадка в каждую пробу добавляли 15 мкл 2М раствора HCl.

Степень окисления белков в сыворотке крови выражали в единицах экстинкции на 1 г белка.

2.8. Определение активности супероксиддисмутазы

Определение общей активности СОД (в гепатоцитах содержится СОД митохондриальная (Mn) и цитоплазматическая (Cu/Zn)), основанное на способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием (НСТ) за супероксидные анионы, образующиеся в результате взаимодействия НАДН+Н⁺ и феназинметасульфата, проводили, используя методику (Чевари С. и др., 1985).

Печень гомогенизировали при 4°C в 2 мл фосфатного буфера (рН 7,8) с 0,05 М ЭДТА. К 0,5 мл гомогената, добавляли 0,2 мл этанола и 0,1 мл хлороформа. Полученную смесь инкубировали при 4°C при постоянном помешивании 15 мин. Затем центрифугировали 15 минут при 1500 g, и отбирали супернатант, который смешивали с $3 \cdot 10^{-3}$ М фенилметасульфата и $1,25 \cdot 10^{-5}$ НСТ.

Параллельно готовили контрольную пробу, в которую вместо исследуемого образца добавляли этанол.

Реакцию запускали 0,15 мл 0,1 мМ НАДН+Н⁺, инкубировали 10 мин при 20 С в темном месте.

Оптическую плотность регистрировали при 540 нм против смеси, содержащей все компоненты, кроме НАДН+Н⁺. Активность СОД выражали в удельных единицах активности на 1 мг белка.

2.9. Определение активности каталазы

Определение активности фермента проводили в гомогенате печени, приготовленном так же, как в 2.9 по методике, описанной в (Королюк М.А. и др.,

1988).

Принцип метода основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стабильный окрашенный комплекс.

К 0,1 мл гомогената печени добавляли 2 мл 0,03 % раствора перекиси водорода. В контрольную пробу вместо сыворотки крови вносили 0,1 мл дистиллированной воды, а вместо перекиси водорода - 2 мл.

Останавливали реакцию через 10 минут путем добавления 1 мл 4% молибдата аммония.

Экстинкцию измеряли на спектрофотометре при длине волны 410 нм против контрольной пробы.

Расчет производили по формуле:

$$A = E \times V \times t \times K$$

A – активность каталазы в мкмоль/сек/мг белка

E – экстинкции опытной пробы относительно контрольной;

V – объем вносимой пробы (0,1 мл);

t – время инкубации – 600 сек;

K – коэффициент пересчета, равный $2,2 \times 10^6 \text{ мкМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$.

2.10. Определение активности глутатионпероксидазы

Определение активности глутатионпероксидазы в гомогенате печени, основанное на регистрации скорости накопления окисленного глутатиона, проводили по методике, описанной С.Н. Власовой и др. (1990).

0,2 мл гомогената печени, приготовленного так же, как в 2.9, смешивали с 1,0 мл 0,3 М фосфатного буфера, 12 мМ азида натрия, 6 мМ ЭДТА (рН 7,4), 0,5 мл 2,5 мМ глутатиона восстановленного. Реакцию запускали путем добавления 0,5 мл 1,8 мМ перекиси водорода и останавливали через 2 минуты с помощью 1,0 мл 10% ТХУ.

После остановки реакции смесь центрифугировали при 1500 g 15 мин, и в депротеинатах определяли поглощение восстановленного глутатиона при 260 нм.

Активность ГПО выражали в мкМ окисленного глутатиона на 1 мг белка за одну минуту.

2.11. Определение активности глутатионтрансферазы

Определение активности глутатионтрансферазы проводили, используя методику, описанную С.Н. Власовой и др. (1990).

Принцип данного метода основан на регистрации скорости образующихся в результате реакции глутатион-S-конъюгатов между восстановленным глутатионом и 1-хлор-2,4-динитробензолом (ХДНБ).

Готовили смесь из следующих компонентов:

2,5 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 6,5);

0,2 мл 0,015 М раствора GSH;

0,1 мл гомогената печени (в разведении 1:40).

Реакцию запускали путем внесения в смесь 0,2 мл 0,015 М ХДНБ. Вместе с опытной пробой готовили контрольную, в которую вносили 0,1 М К,Na-фосфатный буфер (рН 6,5) и 0,015 М раствор восстановленного глутатиона (GSH).

Экстинкцию регистрировали на спектрофотометре при длине волны 340 нм, при 23°C в течение 1,5 минут. Активность фермента рассчитывали, используя молярный коэффициент светопоглощения для ХДНБ-SG при длине волны 340 нм - $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, и выражали через образующиеся глутатион S-конъюгаты в мкмоль в минуту на 1 г белка.

Определение концентрации белка проводили по методу Лоури.

2.12. Оценка поглотительной активности фагоцитов периферической крови

Оценку поглотительной активности фагоцитов периферической крови, стабилизированной гепарином, проводили на модели поглощения частиц латекса.

Для этого 150 мкл крови смешивали с 50 мкл взвеси частиц монодисперсного полистерольного латекса диаметром 1,5 мкм (ПанЭко, РФ). Пробы инкубировали 30 минут в термостате при 37°C, затем встряхивали и готовили мазки, фиксировали их смесью Никифорова и окрашивали метиленовым синим (1% раствор, разведённый 1:4) в течение 1 минуты.

О поглотительной активности клеток судили по фагоцитарному числу (ФЧ) – количеству захваченных частиц на одну фагоцитирующую клетку – и по фагоцитарному индексу (ФИ) – проценту клеток, участвующих в фагоцитозе. Интегральный фагоцитарный индекс (ИФИ) рассчитывался по следующей формуле:

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

ИФИ – интегральный фагоцитирующий индекс,

ФИ – фагоцитарный индекс,

ФЧ – фагоцитарное число.

Процент активных фагоцитов подсчитывали в мазках с помощью иммерсионной микроскопии, учитывая среднее число частиц латекса на одну клетку (общее число фагоцитированных частиц делили на 100).

ФИ считали по количеству фагоцитов, поглотивших частицы латекса (исходя из 100 учтенных клеток).

2.13. Оценка метаболической активности фагоцитов по показателям НСТ-теста

Тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) позволяет оценить метаболическую активность гранулоцитов крови, выявляет резервные возможности внутриклеточных систем фагоцитов. НСТ-тест основан на восстановлении поглощенного фагоцитирующими клетками растворимого красителя нитросинего тетразолия в нерастворимый диформаза́н черного цвета (внутриядерные включения – глыбки диформаза́на) под действием супероксиданиона, образующегося в НАДФН-оксидазной реакции и

инициирующей процесс стимуляции фагоцитоза. Образующиеся глыбки диформаза визуально уитывали путем микроскопирования (Виксман М.Е. и др., 1979).

Индукцированный НСТ-тест (НСТ-ИН) проводили при стимуляции фагоцитирующих клеток.

Спонтанный НСТ-тест (НСТ-СП) – без стимуляции.

Ход работы. Для этого 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 индуцированного НСТ-теста в каждую лунку добавляли 20 мкл суспензии частиц монодисперсного полистерольного латекса (индуцированная 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.

2.14. Расчет показателей интенсивности метаболизма и энергетических процессов ферментных систем фагоцитов

В двухвариантном НСТ-тесте определяли состояние функционального резерва клеток, который представляет собой разницу между числом (интенсивностью) стимулированных диформазанпозитивных клеток и количеством (интенсивностью) спонтанно окисляющих диформазанпозитивных клеток. При постановке этого теста определяли показатель среднего цитохимического коэффициента в спонтанном тесте (СЦК-СП) и показатель среднего цитохимического коэффициента в индуцированном тесте (СЦК-ИН),

который отображает интенсивность энергетических процессов ферментных систем фагоцитирующих клеток. Наиболее информативным в отношении нейтрофильных резервов биоцидности является анализ динамики индекса стимуляции (ИС), который рассчитывается из показателей среднего цитохимического коэффициента спонтанного и стимулированного СЦК-ИН/СЦК-СП.

Полученные результаты оценивались полуколичественным методом, с вычислением среднего цитохимического коэффициента (СЦК).

При микроскопировании в каждом отдельном мазке при обзорном просмотре выбирали эталоны – клетки, содержащие исследуемое вещество. Отсутствие окраски цитоплазмы принимали за нулевую степень. Наличие в цитоплазме небольшого окрашенного участка, составляющего 1/4 часть всей цитоплазмы, соответствовало интенсивности реакции 1-й степени (А). Окрашивание 8/10 цитоплазмы принимали за 2-ю степень насыщения (В). При 3-й степени интенсивности реакции исследуемое вещество заполняло всю цитоплазму и даже выявлялось в ядре (С).

Затем, как при подсчете лейкоцитарной формулы, в разных участках мазка подсчитывали, не пропуская, 100 однотипных клеток и рассчитывали процентное содержание клеточных элементов с различной интенсивностью реакции.

Средний цитохимический коэффициент (СЦК) вычисляли по формуле (по Karlow):

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

При вычислении показателя активности, клетки с интенсивностью 0 исключались; к проценту клеток с интенсивностью 1 (А) прибавляли процент клеток с интенсивностью 2 (В), умноженный на коэффициент 2 и количество клеток с интенсивностью 3 (С), умноженное на коэффициент 3. Показатель активности в условных единицах от 0 до 300, СЦК 0–3% (Хейхоу Ф.Г. Дж., Кваглино Д., 1983).

Таким образом, для оценки фагоцитарной активности, интенсивности метаболизма и энергетических процессов ферментных систем фагоцитов нами

были использованы восемь показателей (таблица 1).

Таблица 1 – Показатели оценки поглотительной активности, интенсивности метаболизма и энергетических процессов ферментных систем фагоцитов

№	Показатель	Принцип расчета показателя
1	ФЧ	фагоцитарное число – среднее число частиц латекса на один фагоцит (общее число фагоцитированных частиц разделить на 100)
2	ФИ (%)	фагоцитарный индекс - количество фагоцитов, фагоцитировавших частицы латекса, по отношению к 100 изученным клеткам
3	ИФИ (%)	интегральный фагоцитирующий индекс – $\text{ИФИ} = (\text{ФИ} \times \text{ФЧ}) / 100$
4	НСТ-СП (%)	процент клеток с гранулами восстановленного НСТ (диформаза чернoго цвета) в спонтанном тесте
5	НСТ-ИН (%)	процент клеток с гранулами восстановленного НСТ (диформаза чернoго цвета) в индуцированном тесте
6	СЦК-СП (y.e.)	средний цитохимический коэффициент- $\text{СЦК} = (3\text{C} + 2\text{B} + \text{A}) / 100$ в спонтанном тесте
7	СЦК-ИН (y.e.)	средний цитохимический коэффициент- $\text{СЦК} = (3\text{C} + 2\text{B} + \text{A}) / 100$ в индуцированном тесте
8	ИС (y.e.)	индекс стимуляции – $\text{ИС} = \text{СЦК ИН} / \text{СЦК СП}$

2.15. Определение продукции цитокинов

(ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИФН- γ , α -ФНО) в сыворотке крови мышей

Уровень цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИФН- γ , α -ФНО) определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) с помощью тест-наборов (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург).

Результаты регистрировали на спектрофотометре «Stat Fax-2100» (США)

согласно протоколу производителя.

2.16. Определение продукции иммуноглобулинов G в сыворотке крови мышей

Определение IgG проводили в сыворотке крови методом ИФА с помощью специфических мышинных моноклональных антител, полученных в Федеральном государственном унитарном предприятии «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства (ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России).

Анализ основан на учете реакции антиген-антитело, в качестве метки, позволяющей обнаружить иммунный комплекс, использовали фермент - пероксидазу хрена.

ИФА проводили в специальных 96-луночных планшетах из полистирола, с круглыми плоскодонными лунками вместимостью 300 мкл по следующей схеме:

1. Лунки 96-ти луночного планшета заполняли исследуемым материалом (сыворотка крови мышей / стандартные растворы IgG) с дробным разбавлением (от $\frac{1}{2}$ до $\frac{1}{256}$) и инкубировали в течение одного часа для связывания антигена с антителом. Иммунизацию антигенов проводили в 0,05 М натрий-бикарбонатном буферном растворе (pH 9,2) на полистироловых 96-ти луночных плоскодонных планшетах по 50 мкл на лунку. В качестве антигенов использовали сыворотку крови мышей в конечном разведении 1:200.

2. Блокирование свободных центров проводили путем нанесения на полистироловые планшеты 10 %-го раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА по 100 мкл в лунку).

3. Конъюгат кроличьих антител против мышинных иммуноглобулинов G с пероксидазой из хрена вносили в забуференном физиологическом растворе с добавлением твина 20 (ЗФРТ) в разведении 1 : 1000 по 50 мкл в каждую лунку.

4. Затем готовили субстрат: раствор ортофенилендиамина (ОФД) – 5 мг на 10 мл 0,05 М цитратного буфера, pH 4,5, с добавлением 5 мкл 30% перекиси

водорода и разливали его по 100 мкл в каждую лунку планшета.

5. Останавливали реакцию путем внесения 5% серной кислоты по 50 мкл в каждую лунку спустя 10-20 минут инкубации на шейкере после развития окраски.

После каждого этапа (кроме последнего) планшеты с внесенными растворами инкубировали при 37°C в течение 1 часа. После 2, 3 и 4 этапов проводили отмывку холодной проточной водой не менее 6 раз и затем один раз путем внесения раствора ЗФРТ.

Результаты учитывали при длине волны 492 нм, оптическом пути 3 мм (соответствует 100 мкл раствора в лунке 96-ти луночного планшета) на спектрофотометре «Stat Fax-2100», производства США.

Концентрацию IgG определяли по калибровочному графику, построенному исходя из результатов титрования сыворотки крови интактных мышей (от 1/25 до 1/3200). На основании предыдущих исследований (Князева О.А., 2008), за среднее значение концентрации IgG (1,4 мг/мл) принимали разведение сыворотки 1:200.

2.17. Определение взаимодействия иммуноглобулинов G с субкомпонентом первого фактора комплемента - C1q по уровню комплексов C1q-IgG в сыворотке крови мышей

ИФА проводили также в специальных 96-луночных планшетах из полистирола, с круглыми плоскодонными лунками вместимостью около 300 мкл по следующей схеме:

1. В каждую лунку микропланшета вносились кроличьи антитела к C1q мыши (ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России) по 50 мкл в разведении 1:1000 раз в бикарбонатном буфере (pH=9,2). Исследуемые образцы оставляли на сутки при температуре 4°C и затем промывали 10 раз в холодной проточной воде с энергичным постукиванием перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

2. Для блокировки оставшихся групп в отдельные лунки микропланшета вносили 2% раствор в фосфатно-солевом буфере (pH=7,2) альбумина бычьего сывороточного по 100 мкл. Пробы инкубировали в течение часа при температуре

37⁰С.

3. После инкубации и очередной промывки в каждую лунку микропланшета вносили по 50 мкл разведенной в 50 раз сыворотки крови мышей (источника иммуноглобулинов G), после чего пробы инкубировали в течение часа при температуре 37⁰С.

4. После промывки в каждую из лунок планшета добавляли конъюгат кроличьих антител против мышинных иммуноглобулинов G с пероксидазой из хрена в забуференном физиологическом растворе (ЗФРТ) в разведении 1:1000 по 50 мкл в каждую лунку.

5. Затем готовили субстрат: раствор ортофенилендиамина (ОФД) – 5 мг на 10 мл 0,05 М цитратного буфера, рН 4,5, с добавлением 5 мкл 30% перекиси водорода и разливали его по 100 мкл в каждую лунку планшета.

6. Останавливали реакцию путем внесения 5% серной кислоты по 50 мкл в каждую лунку спустя 10-20 минут инкубации на шейкере после развития окраски.

Результаты учитывали на спектрофотометре «Stat Fax-2100», производства США при длине волны 492 нм, оптическом пути 3 мм (соответствует 100 мкл раствора в лунке 96-ти луночного планшета).

2.18. Получение конъюгатов антител с пероксидазой

Конъюгат антител с пероксидазой хрена получали по следующей схеме:

1. 4 мг пероксидазы хрена (ПХ) растворяли в 1 мл дистиллированной воды, добавляли 0,2 мл 0,1 М раствора периодата натрия и инкубировали на шейкере в темноте при комнатной температуре в течение 20 минут.

2. Окисленный раствор ПХ диализовали против 0,001 М раствора натрий-ацетатного буфера (рН 4,4) в течение ночи при 4 С.

3. После окончания диализа к раствору ПХ добавляли 20 мкл 0,2 М натрий-бикарбонатного буфера (рН 9,5), 6-10 мг МКАТ в 2 мл того же буфера и инкубировали на шейкере при комнатной температуре в течение 2 часов.

4. Затем с целью восстановления оснований Шиффа к смеси добавляли 0,1

мл свежеприготовленного водного раствора боргидрида натрия (4 мг/мл) и инкубировали на шейкере при 4 С в течение 2 часов.

5. Полученный конъюгат осаждали насыщенным раствором $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (конечная концентрация 40% от насыщения). Осадок растворяли в 1 мл буферного раствора ЗФР и затем диализовали против этого же раствора.

6. Для стабилизации в конъюгат добавляли 50%-ный глицерин и хранили при 4 С.

Используемые реактивы: пероксидаза хрена ("Boehringer", Австрия); мышинные моноклональные и кроличьи поликлональные антитела, остальные реактивы отечественного производства (ХЧ).

2.19. Оценка влияния глюконатов металлов на функциональную активность комплемента по классическому пути *in vitro*

1. 0,7 мл эритроцитов барана (Е) отмывали и разводили физраствором 1:14. К отмытой взвеси Е добавляли вероналовый буфер, содержащий Ca^{2+} и Mg^{2+} (VBS^{++}) в соотношении 1:1 (Тэтин С.Ю. и др., 1985).

2. Затем в полученную взвесь добавляли 1/400 часть гемолитической сыворотки (8,4 мл + 21 мкл) и инкубировали при 37°C в течение 40 минут.

3. После этого сенсibilизированные эритроциты (ЕА) отмывали четыре раза физ. раствором и один раз VBS^{++} .

4. В лунки 96-ти луночного планшета вносили по 50 мкл сыворотку здоровых доноров (пул=25) - источник C1q-субкомпонента комплемента, которую титровали от $\frac{1}{2}$ до 1/128 в VBS^{++} с 1 по 12 столбец рядов А-Г; ряд Н (8-12 ряд) в таком же объеме.

5. К сыворотке в каждую лунку 96-ти луночного планшета добавляли по 50 мкл исследуемые препараты: глюконаты 3d-металлов (MeGl), разведенные в физрастворе до концентрации 10^{-2}M : со 2 по 6 и с 8 по 12 ряды соответственно. В 1 ряд вносили глюконат кальция (препарат сравнения); в 7 ряд – контроль, в лунки этого ряда вместо препарата вносили по 50 мкл VBS^{++} . Содержимое всех

лунок перемешивали и оставляли на 30 минут при 4-6° С.

6. Затем в каждую лунку 96-ти луночного планшета добавляли по 50 мкл приготовленные ранее сенсibilизированные эритроциты (ЕА), содержимое осторожно и тщательно перемешивали и инкубировали в течение часа при 37° С.

7. После завершения инкубации из каждой лунки с помощью многоканальной пипетки отбирали по 50 мкл надосадочную жидкость, переносили на другой планшет в той же последовательности и измеряли ее оптическую плотность при длине волны 450 нм на иммуноферментном анализаторе «Stat Fax-2100», производства США.

2.20. Методы статистической обработки результатов исследования

Результаты обрабатывали статистически с помощью современных программных пакетов математико-статистического анализа. Применяли программы: «AtteStat», «Microsoft Excel» и «Statistica 10.0», работающие в операционной среде «Windows». Использовали уровень статистической значимости (Зайцев В.М. и др., 2006). Для описания количественных признаков в малых выборках рассчитывали средний показатель (M), среднее квадратичное отклонение (σ), медиану (Me) и интерквартильный размах (Q_1-Q_3).

Статистическую значимость различий количественных признаков между группами оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Корреляционный анализ между показателями оксидантного и иммунного гомеостаза проводили с помощью программы «AtteStat», определяя коэффициент Пирсона.

Отличия статистически значимыми считали при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изучение биохимических эффектов глюконатов 3d-металлов на оксидантно-антиоксидантную систему в печени мышей при экспериментальном иммунодефиците

В патогенезе вторичных иммунодефицитов определяющее значение имеют нарушения окислительно-восстановительного гомеостаза (Костюшов В.В. и др., 2010). Некоторыми авторами предлагается даже использовать показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты организма в качестве дополнительного критерия оценки тяжести иммунодефицитного состояния (Сабанчиева Ж.Х., 2007).

Повышенное образование свободных радикалов на фоне снижения активности антиоксидантной системы приводит к развитию окислительного стресса, который играет существенную роль в развитии различных заболеваний. В свою очередь, окислительный стресс приводит к усилению свободно-радикального окисления, процесса липопероксидации. Антиоксидантная система, напротив, связывая и модифицируя, свободные радикалы, препятствует образованию липоперекисей и обеспечивает их разрушение (Муравлева Л.Е. и др., 2010).

Прооксиданты оказывают также негативное влияние на различные классы биомолекул (белки, липиды, нуклеиновые кислоты), инактивируя или модифицируя их, вызывают дисбаланс в протеолитической системе, инактивируя антипротеазы, что в конечном итоге приводит к нарушению регуляторных и защитных реакций, иммунитета (Иванова М.Р., 2002; Нагоев Б.С., Маржохова М.Ю., 2004; Ehsaei M. at al., 2015).

По состоянию оксидантно-антиоксидантной системы организма можно адекватно оценивать окислительные процессы, протекающие при патологических состояниях, а также эффективность проводимых терапевтических воздействий.

Задачей данного этапа работы явилось исследование влияния глюконатов 3d-металлов на уровни перекисного окисления липидов и окислительной модификации белка, а также активность антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы в печени мышей с индуцированным иммунодефицитом.

Исследование проводилось на 96-ти лабораторных мышах – самцах массой 25-28 г. Животные были разделены на 8 групп, которые содержались на стандартном пищевом рационе и неограниченно потребляли воду местных источников. В 1-ю группу ($n = 12$) входили интактные животные, во 2-ю ($n = 12$) – мыши с моделированным иммунодефицитом без лечения, в 3-ю ($n = 12$) – животные с моделированным иммунодефицитом, которые получали препарат сравнения – CaGl. Мыши пяти опытных групп (4-8) получали исследуемые 3dMeGl: 4 - MnGl, 5 - FeGl, 6 - CoGl, 7 – CuGl и 8 – ZnGl (в каждой группе $n = 12$).

Животным на фоне экспериментального иммунодефицита в течение 2-х недель ежедневно перорально в дозе 0,18-0,20 мл вводились водные растворы глюконатов 3d-металлов (3dMeGl) в концентрации 10^{-2} моль/ л. Мыши 1-й и 2-й групп получали дистиллированную воду в том же объеме.

Иммунодефицит создавали путем однократного введения циклофосфамида. По окончании эксперимента животных под эфирным рауш-наркозом декапитировали, ткань печени гомогенизировали в физ.растворе 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), каталазы (КТ), глутатионпероксидазы (ГПО) и глутатионтрансферазы (ГТ). Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по содержанию ТБК-активных продуктов (ТБК-АП). Определение уровня спонтанной и металл-индуцируемой окислительной модификации белков проводили, оценивая спонтанное (КБ сп) и индуцированное (КБ инд) карбонилирование белков.

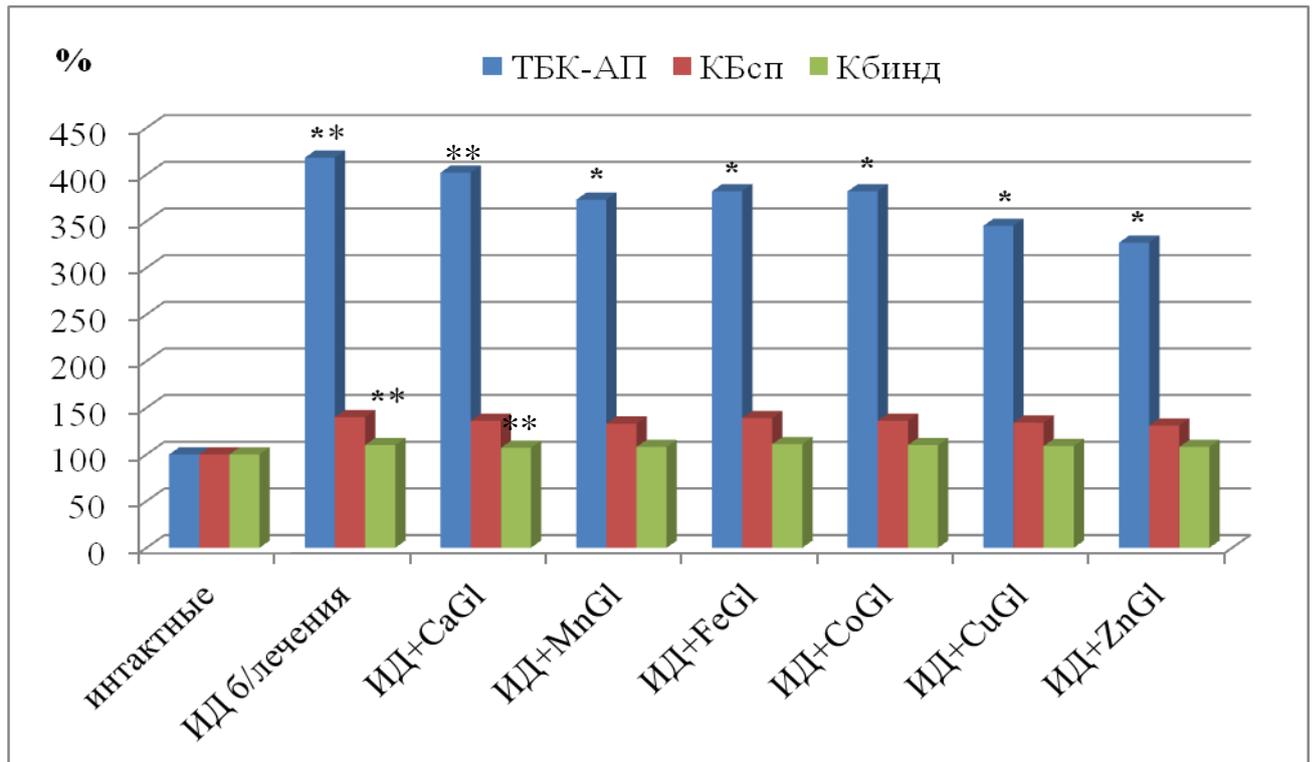
Таблица 2 – Влияние глюконатов 3d-металлов на показатели перекисного окисления липидов (ТБК-АП), окислительной модификации белков (КБсп, КБинд) и активность антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КТ), глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионтрансферазы (ГТ) в гомогенате печени иммунодефицитных мышей (ИД)

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 белка	ГТ, мкмоль/мин/г белка
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Контроль интактные (n=12)	M±σ Me (Q ₁ -Q ₃)	11,1±1,4 11 (9,9-12,4)	160±16 162 (146-174)	733±74 744 (671-799)	26,2±2,6 26,3 (24,8-28,7)	15,7±1,9 15,9 (14,1-17,4)	25,5±3,1 25,9 (22,8-28,3)	7,6±1,1 7,7 (6,6-8,6)
2. Контроль-ИД без леч. (n=12)	M±σ Me (Q ₁ -Q ₃) p-знач.	49,4±5,2 46 (44,6-48,8) <u>p₁₋₂≡ 0,00003</u>	224±22 227 (195-232) <u>p₁₋₂≡ 0,00003</u>	809±81 821 (741-882) <u>p₁₋₂≡ 0,0326</u>	7,3±1 7,5 (6,5-8,2) <u>p₁₋₂≡ 0,00003</u>	8,9±1,2 9,1 (7,9-9,9) <u>p₁₋₂≡ 0,00003</u>	2,4±0,5 2,5 (2,0-2,8) <u>p₁₋₂≡ 0,00003</u>	4,5±0,7 4,6 (3,9-5,1) <u>p₁₋₂≡ 0,00003</u>
3. ИД+CaGl (n=12)	M±σ Me (Q ₁ -Q ₃) p-знач.	45,3±4,7 44 (42,7-47,3) p ₂₋₃ = 0,184	221±21 224 (203-240) p ₂₋₃ =0,603	806±80 818 (739-878) p ₂₋₃ =0,729	7,6±0,9 7,8 (6,8- 8,4) p ₂₋₃ =0,312	9,1±1,0 9,3 (8,3-9,9) p ₂₋₃ =0,665	2,6±0,4 2,6 (2,3-2,9) p ₂₋₃ =0,248	4,7±0,6 4,7 (4,2-5,3) p ₂₋₃ =0,419
4. ИД+MnGl (n=12)	M±σ Me (Q ₁ -Q ₃) p-знач.	39,9±4,3 41 (37,3-42,4) <u>p₂₋₄=0,00003</u> <u>p₃₋₄=0,00003</u>	212±22 215 (193-232) p ₂₋₄ =0,1842 p ₃₋₄ =0,2731	793±80 805 (726-865) p ₂₋₄ =0,4529 p ₃₋₄ =0,2602	2,4±0,5 2,5 (2,0-2,8) <u>p₂₋₄=0,00003</u> <u>p₃₋₄=0,00003</u>	10,2±1,4 10,4 (9,0-11,4) <u>p₂₋₄=0,0376</u> <u>p₃₋₄=0,0003</u>	6,6±1 6,8 (5,7-7,5) <u>p₂₋₄=0,0003</u> <u>p₃₋₄=0,0003</u>	4,7±0,8 4,6 (4,2-5,3) p ₂₋₄ =0,6236 p ₃₋₄ =0,4266

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
5. ИД+FeGl (n=12)	M±σ Me (Q ₁ -Q ₃) p-знач.	42,3±4,53 42 (39,5-46,2) <u>p₂₋₅=0,00003</u> <u>p₃₋₅=</u> <u>0,00003</u>	223±24 226 (203-245) p ₂₋₅ =0,9539 p ₃₋₅ = 0,5236	812±83 825 (742-886) p ₂₋₅ =0,7728 p ₃₋₅ = 0,4626	4,9±0,8 4,9 (4,2-5,6) <u>p₂₋₅=0,00008</u> <u>p₃₋₅=</u> <u>0,00008</u>	8,4±1,1 8,5 (7,4-9,4) p ₂₋₅ =0,1939 p ₃₋₅ = 0,1926	18,3±2,1 18,6 (16,5-20,2) <u>p₂₋₅=</u> <u>0,00003</u> <u>p₃₋₅=</u> <u>0,00003</u>	1,6±0,5 1,5 (1,3-1,9) <u>p₂₋₅=</u> <u>0,00003</u> <u>p₃₋₅=</u> <u>0,00003</u>
6. ИД+CoGl (n=12)	M±σ Me (Q ₁ -Q ₃) p-знач.	41,1±4,3 42 (37,5-43,8) <u>p₂₋₆=0,00003</u> <u>p₃₋₆=0,00003</u>	227±24 220 (202-243) p ₂₋₆ =0,908 p ₃₋₆ =0,504	807±82 819 (738-809) p ₂₋₆ =0,729 p ₃₋₆ =0,423	3,8±0,7 3,9 (3,2-4,4) <u>p₂₋₆=0,00003</u> <u>p₃₋₆=0,00003</u>	10,1±1,3 10,3 (9,0-11,3) p ₂₋₆ =0,0376 p ₃₋₆ =0,0376	10,6±1,4 10,8 (9,4-11,8) <u>p₂₋₆=</u> <u>0,00003</u> <u>p₃₋₆=</u> <u>0,00003</u>	8,8±1,2 9,0 (7,8-9,8) <u>p₂₋₆=</u> <u>0,00003</u> <u>p₃₋₆=</u> <u>0,00003</u>
7. ИД+CuGl (n=12)	M±σ Me (Q ₁ -Q ₃) p-знач.	37,9±4,1 38 (36,4-39,6) <u>p₂₋₇=0,00003</u> <u>p₃₋₇=0,00003</u>	214±23 217 (195-235) p ₂₋₇ =0,2726 p ₃₋₇ =0,817	798±81 810 (730-871) p ₂₋₇ =0,6033 p ₃₋₇ =0,3211	7,2±1 7,4 (6,4-8,1) p ₂₋₇ =0,6236 p ₃₋₇ =0,4233	18,7±2,2 19,0 (16,8-20,7) <u>p₂₋₇=</u> <u>0,00003</u> <u>p₃₋₇=0,00003</u>	17,8±2,1 18,1 (16,1-19,7) <u>p₂₋₇=</u> <u>0,00003</u> <u>p₃₋₇=0,00003</u>	9,5±1,2 9,7 (8,5-10,5) <u>p₂₋₇=</u> <u>0,00003</u> <u>p₃₋₇=0,00003</u>
8. ИД+ZnGl (n=12)	M±σ Me (Q ₁ -Q ₃) p-знач.	35,6±3,86 36 (32,8-39,2) <u>p₂₋₈=0,00003</u> <u>p₃₋₈=0,00003</u>	209±22 212 (190-229) p ₂₋₈ =0,1059 p ₃₋₈ =0,1026	793±80 805 (726-865) p ₂₋₈ =0,4529 p ₃₋₈ =0,2546	11,5±1,3 11,7 (10,4-12,7) p ₂₋₈ =0,00003 p ₃₋₈ =0,00003	17,6±2,1 17,9 (15,8-19,5) <u>p₂₋₈=</u> <u>0,00003</u> <u>p₃₋₈=</u> <u>0,00003</u>	15,2±1,8 15,4 (13,7-16,8) <u>p₂₋₈=</u> <u>0,00003</u> <u>p₃₋₈=</u> <u>0,00003</u>	9,7±1,4 9,9 (8,5-10,9) <u>p₂₋₈=</u> <u>0,00003</u> <u>p₃₋₈=</u> <u>0,00003</u>

Данные, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что в печени иммунодефицитных мышей наряду со значительной активацией процессов ПОЛ (увеличение уровня ТБК-АП в 4,2 раза) и окислительной модификации белка (увеличение КБсп в 1,4; КБинд – в 1,1), происходило подавление активности антиоксидантных ферментов. Особенно глубокое снижение наблюдалось для ГПО – в 10,4 и СОД – в 3,5 раза. Активность КТ и ГТ снижалась в 1,7 раз.



Примечание ** – отличия достоверны относительно группы «интактные» ($p < 0,05$); * – отличия достоверны относительно группы «иммунодефицит без лечения» ($p < 0,05$)

Рисунок 11 – Показатели перекисного окисления липидов по уровню ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) и окислительной модификации белка по спонтанному (КБсп) и индуцированному карбонилированию (КБинд) при экспериментальном иммунодефиците (ИД) до и после курса введения глюконатов 3d-металлов (3dMeGl)

Такие результаты могут свидетельствовать о том, что данный способ моделирования иммунодефицита сопровождается нарастанием процессов ПОЛ и ОМБ, являющихся причиной усиления выработки АФК, которые повреждают

антиоксидантные ферменты, что является основной причиной снижения их активности. Накопление АФК инициирует также процессы ПОЛ и ОМБ.

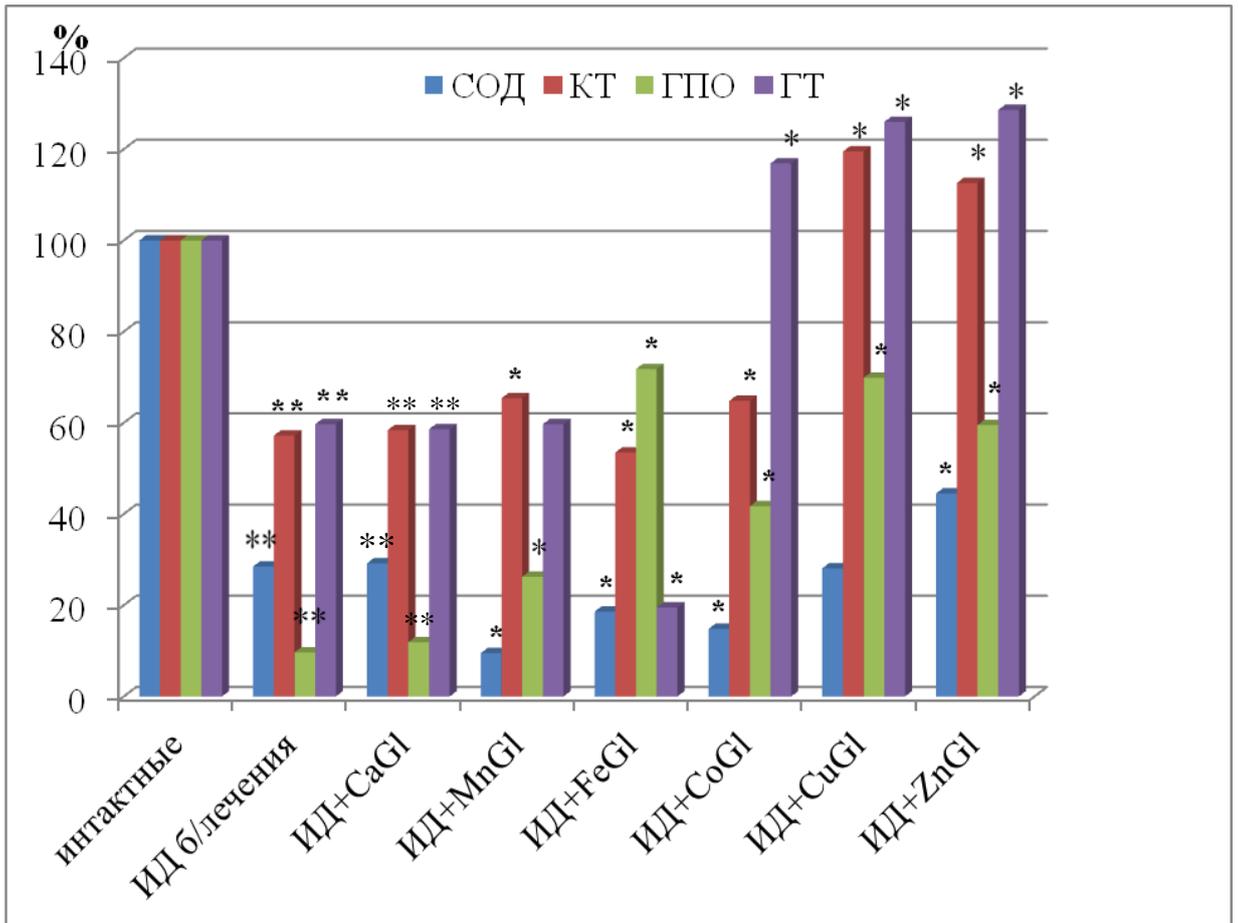
При сочетании индуцирования иммунодефицита с введением соединений $ZnMeGl$ интенсивность процессов ПОЛ снижалась на 36-91% по сравнению с результатами в группе 2. Уровень ОМБ в печени экспериментальных животных (группы 4-8) не имел статистически значимых отличий от показателей ОМБ в группе 2 (рисунок 11), что, возможно, связано с более развитой в этой ткани системой антиоксидантной защиты и утилизацией окислительно модифицированных белков (Фомина М.А., Терентьев А.А., 2018).

Активность исследуемых антиоксидантных ферментов изменялась различным образом в зависимости от применяемого $ZnMeGl$ (рисунок 12).

Влияние микроэлементов на СОД, за исключением $ZnGl$, оказалось негативным. Очевидно, дополнительное содержание в субстрате элементов, способных к редокс-взаимодействию, инактивирует реактивные центры в молекулах СОД, имеющих в своем составе металлы переменной валентности (Mn, Fe, Cu), которые способны инициировать новые АФК.

Такой результат может быть связан также с дополнительной координацией иона металла в координационном центре СОД глюконат-ионами, образующимися при диссоциации экспериментальных 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 после терапии $ZnGl$ повышалась на 16% по отношению к уровню в группе 2. Из литературных данных известно, что 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 $CuGl$ находится в октаэдрическом окружении (Конкина И.Г. и др., 2003), что возможно является одной из причин его не выраженной СОД-активности.



Примечание ** - отличия достоверны относительно группы «интактные» ($p < 0,05$); * – отличия достоверны относительно группы «иммунодефицит без лечения» ($p < 0,05$). За 100% приняты показатели интактных мышей

Рисунок 12 – Показатели активности антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КТ), глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионтрансферазы (ГТ) при экспериментальном иммунодефиците (ИД) до и после курса введения глюконатов 3d-металлов (3dMeGl)

Кажущееся противоречие между одновременным снижением активности СОД и уменьшением содержания ТБК-АП может быть объяснено, вероятно, наблюдающимся ростом активности ГПО. Он относится к группе ферментов, содержащих селен, которые способны катализировать не только процесс разложения пероксида водорода, но и восстановление гидропероксидов липидов, что и придает ему первоочередное значение в антиоксидантной защите организма (Shazia Q. et al., 2012).

Восстановление активности ГТ, наблюдающееся в данном эксперименте под воздействием 3dMeGl (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.

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, образуя трехкомпонентный комплекс и формируя препятствия для аминокислотных радикалов или конформационного изменения белка (Oteiza P.I., 2012). В представленном эксперименте также отмечено позитивное влияние на активность ГТ соединения цинка, при использовании которого уровень ГТ превышает результаты, полученные не только для группы 2, но и для интактных животных (группа 1). Понижение активности ГТ при использовании FeGl в данном случае, возможно, обусловлено инициацией под влиянием ионов железа известной реакции Фентона, являющейся дополнительным источником АФК, что, вероятно, оказывает влияние и на снижение активности СОД и КТ при его использовании.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о позитивном изменении уровней ТБК-АП, ГПО, КТ и ГТ в печени экспериментальных животных при использовании некоторых 3dMeGl на фоне иммунодефицита, инициированного введением цитостатика циклофосфамида. Представляется перспективным дальнейшее исследование биологической активности CuGl и ZnGl с целью их использования в качестве корректоров оксидантно-антиоксидантного гомеостаза при иммунодефицитных состояниях.

3.2. Оценка влияния глюконатов 3d-металлов на поглотительную и метаболическую активность фагоцитов при экспериментальном иммунодефиците

Показатели фагоцитарной активности лейкоцитов, по которым можно судить не только об иммунологической реактивности организма, но и степени влияния различных внешних и внутренних факторов, наиболее точно отражают функциональное состояние иммунитета (Мавзютов А.Р. и др., 2017).

На активацию фагоцитов оказывает значительное влияние хитозан (Mr 20000 Д) - гомополисахарид, выделяемый из хитина (Лялина Т.С., 2016).

Возможно, что фагоциты могут поглощать молекулы глюконатов при помощи рецепторов маннозы, глюкозамина, β -глюканов. Рецептор β -глюканов, Dectin-1 (β GP) широко экспрессирован на фагоцитирующих клетках, обеспечивает распознавание, фагоцитоз и продукцию ФНО α . Все это позволяет предположить механизм активации иммунитета, аналогичный для иммуномодуляторов полисахаридной природы.

Важным показателем естественной неспецифической реактивности организма является функциональное состояние фагоцитирующих клеток, ответственных за поглощение и внутриклеточное переваривание различных чужеродных агентов (Мавзютов А.Р. и др., 2012). В связи с этим, большое значение имеет исследование поглотительной и метаболической активности фагоцитов с помощью реакции с нитросиним тетразолием, имеющей общие закономерности с процессом фагоцитоза и раскрывающей его биохимические основы.

Биохимическим маркером активности пероксидазных систем является активация стимулированных лейкоцитов с восстановлением нитросинего тетразолия (НСТ-тест), который основан на поглощении фагоцитами нитросинего тетразолия из среды с его последующим восстановлением. По результатам НСТ-теста можно судить о функциональной активности ферментной системы

фагоцитирующих клеток и энзиматических дефектах клеточного иммунитета (Маркина А.А., 2012).

Задача данного этапа исследования – сравнительная экспериментальная оценка влияния соединений 3d-металлов с глюконовой кислотой на поглотительную и метаболическую активность фагоцитов крови лабораторных мышей с индуцированным иммунодефицитом.

Для решения поставленной задачи животные были разбиты на 9 экспериментальных групп (по 12 особей): 1-я группа – интактные, 2-9-я группы – с иммунодефицитом, индуцированным путем однократного внутрибрюшинного введения циклофосфида (50 мг/кг). В 3-й группе животным вводили иммуномодулирующий препарат сравнения ликопид, в 4-й группе – глюконат кальция. В 5-9 группах – исследуемые глюконаты 3d-металлов: 5 – $MnGl$, 6 – $FeGl$, 7 – $CoGl$, 8 – $CuGl$, 9 – $ZnGl$.

На 16-е сутки мышей под эфирным наркозом выводили из эксперимента в соответствии с Положением о гуманном отношении к животным (МЗ РФ от 19 июня 2003 г. №267) и отбирали кровь, которую стабилизировали гепарином. Оценивали поглотительную активность фагоцитов по трем показателям: фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ) и интегральный фагоцитарный индекс (ИФИ). Метаболическую активность клеток оценивали по пяти показателям в сравнительном двухвариантном НСТ-тесте (спонтанный/индуцированный) по проценту клеток с гранулами восстановленного НСТ (диформаза черной окраски), по среднему цитохимическому коэффициенту (СЦК) и индексу стимуляции (ИС) (Виксман М.Е., 1979). Результаты исследования представлены в таблице 3.

Сравнивая поглотительную активность фагоцитов первой контрольной группы мышей «контроль-интактные» (№ 1) и мышей второй группы с моделированным иммунодефицитом (№ 2), отчетливо видна разница между показателями: ФЧ статистически значимо снижался на 57,4%, ФИ – на 23,8%, ИФИ – на 67,6%.

Таблица 3 – Влияние глюконатов 3d-металлов на фагоцитарную и метаболическую активность фагоцитов крови мышей с экспериментальным иммунодефицитом (ИД)

Показатель	Группы мышей								
	1 (n=12)	2 (n=12)	3 (n=12)	4 (n=12)	5 (n=12)	6 (n=12)	7 (n=12)	8 (n=12)	9 (n=12)
	Контроль интактные	ИД б/лечения	ИД+ Ликопид	ИД+ CaGl	ИД+ MnGl	ИД+ FeGl	ИД+ CoGl	ИД+ CuGl	ИД+ ZnGl
Фагоцитарное число (ФЧ)									
М±σ	5,4±0,1	2,3±0,3	3,8±0,4	2,5± 0,4	4,3 ±0,3	3,3±0,4	3,4±0,2	4,0±0,1	4,0±0,2
Me	5,4	2,3	3,8	2,6	4,3	3,3	3,4	4,0	4,0
(Q ₁ -Q ₃)	(5,3-5,5)	(2,03-2,6)	(3,5-4,1)	(2,2-2,9)	(3,9-4,6)	(2,9-3,6)	(3,2-3,6)	(3,9-4,1)	(3,8-4,2)
p-знач.		<u>p₁₋₂≡ 0,00003</u>	<u>p₂₋₃≡ 0,00003</u>	p ₂₋₄ = 0,112	<u>p₂₋₅≡ 0,00003</u>	<u>p₂₋₆≡ 0,00006</u>	<u>p₂₋₇≡ 0,00003</u>	<u>p₂₋₈≡ 0,00003</u>	<u>p₂₋₉≡ 0,00003</u>
					p ₃₋₅ = <u>0,008</u>	<u>p₃₋₆≡ 0,009</u>	<u>p₃₋₇≡ 0,008</u>	p ₃₋₈ = 0,3708	p ₃₋₉ = 0,1842
					<u>p₄₋₅≡ 0,00003</u>	<u>p₄₋₆≡ 0,0003</u>	<u>p₄₋₇≡ 0,00003</u>	<u>p₄₋₈≡ 0,00003</u>	<u>p₄₋₉≡ 0,00003</u>
Фагоцитарный индекс (ФИ)									
М±σ	68,0±5,09	51,8±4,2	56,4±5,7	51,4±3,1	65,4±2,01	53,0±2,4	52,7 ±4,1	56,6±2,9	61,8±3,4
Me	68,8	52,4	57,06	51,9	65,7	53,3	52,8	56,9	62,3
(Q ₁ -Q ₃)	(63,7-72,6)	(48,3- 55,6)	(52,2- 61,9)	(48,7- 54,2)	(63,7- 67,2)	(50,9- 55,2)	(50,1- 56,8)	(54,1- 59,2)	(58,9- 64,9)
p-знач		<u>p₁₋₂≡ 0,00003</u>	<u>p₂₋₃≡0,049</u>	p ₂₋₄ = 0,641	<u>p₂₋₅≡ 0,00003</u>	p ₂₋₆ =0,603 p ₃₋₆ =0,119 p ₄₋₆ =0,157	p ₂₋₇ =0,386 p ₃₋₇ =0,083	<u>p₂₋₈≡0,009</u> p ₃₋₈ =0,908	<u>p₂₋₉≡ 0,00006</u>
					<u>p₃₋₅≡ 0,00006</u>		<u>p₄₋₇≡ 0,00003</u>	<u>p₄₋₈≡ 0,0014</u>	<u>p₃₋₉≡ 0,0209</u>
					p ₄₋₅ = <u>0,00003</u>				<u>p₄₋₉≡ 0,00003</u>

Интегральный фагоцитирующий индекс (ИФИ)									
M±σ	3,7±0,3	1,18±0,2	2,1±0,3	1,28±0,3	2,8±0,3	1,7±0,3	1,8±0,2	2,3±0,2	2,5±0,3
Me	3,7	1,2	2,1	1,3	2,8	1,7	1,8	2,3	2,5
(Q ₁ -Q ₃)	(3,4-3,9)	(1,03-1,3)	(1,9-2,3)	(1,02-1,5)	(2,5-3,1)	(1,5-1,9)	(1,6-1,9)	(2,08-2,4)	(2,2-2,7)
p-знач		<u>p₁₋₂≡</u> <u>0,00003</u>	<u>p₂₋₃≡</u> <u>0,00003</u>	p ₂₋₄ ≡ 0,273	<u>p₂₋₅≡</u> <u>0,00003</u>	<u>p₂₋₆≡</u> <u>0,0001</u>	<u>p₂₋₇≡</u> <u>0,00003</u>	<u>p₂₋₈≡</u> <u>0,00003</u>	<u>p₂₋₉≡</u> <u>0,00003</u>
					<u>p₃₋₅≡</u> <u>0,00008</u>	<u>p₃₋₆≡</u> <u>0,008</u>	p ₃₋₇ ≡ 0,0101	P ₃₋₈ =0,184	p ₃₋₉ =0,018
					<u>p₄₋₅≡</u> <u>0,000003</u>	<u>p₄₋₆≡</u> <u>0,002</u>	<u>p₄₋₇≡</u> <u>0,0005</u>	<u>p₄₋₈≡</u> <u>0,00003</u>	<u>p₄₋₉≡</u> <u>0,00003</u>
НСТ-СП (%)									
M±σ	7,6±1,4	5,0±0,8	6,6±1,1	5,2±1,0	7,2±1,0	5,6 ±0,6	6,0 ±0,5	7,2 ±2,1	6,6 ±1,1
Me	7,8	5,1	6,7	5,3	7,3	5,7	6,0	7,2	6,7
(Q ₁ -Q ₃)	(6,5-8,9)	(4,3-5,8)	(5,7-7,6)	(4,3-6,1)	(6,3-8,1)	(5,1-6,1)	(5,1-6,6)	(6,7-7,7)	(5,7-7,6)
p-знач		<u>p₁₋₂≡</u> <u>0,0001</u>	<u>p₂₋₃≡0,002</u>	p ₂₋₄ ≡ 0,4705	<u>p₂₋₅≡</u> <u>0,0001</u>	<u>p₂₋₆≡0,046</u> <u>p₃₋₆≡0,024</u>	<u>p₂₋₇≡0,037</u> p ₃₋₇ =0,184	<u>p₂₋₈≡</u> <u>0,00003</u>	<u>p₂₋₉≡ 0,002</u> p ₃₋₉ =1,0
					p ₃₋₅ =0,184 <u>p₄₋₅≡</u> <u>0,0005</u>	p ₄₋₆ ≡ 0,3407	p ₄₋₇ =0,064	p ₃₋₈ ≡ 0,2602	<u>p₄₋₉≡0,009</u>
								<u>p₄₋₈≡</u> <u>0,00005</u>	
НСТ-ИН (%)									
M±σ	60±6,6	41,6±10,8	54±3,8	44±6,1	56,4±3,9	52,2±1,8	49,7±2,7	56,2±4,7	55±2,7
Me	60,9	42,9	54,1	44,9	56,9	52,5	50,1	56,9	55,4
(Q ₁ -Q ₃)	(54,5-65,9)	(33,0-51,5)	(51,7-57,8)	(38,8-49,5)	(53,1-59,9)	(50,7-53,8)	(47,5-52,1)	(52,2-60,4)	(52,7-57,5)
p-знач		<u>p₁₋₂≡</u> <u>0,0002</u>	<u>P₂₋₃≡0,002</u>	p ₂₋₄ ≡ 0,772	<u>p₂₋₅≡</u> <u>0,0003</u>	<u>p₂₋₆≡0,009</u> p ₃₋₆ =0,166	<u>p₂₋₇≡</u> <u>0,012</u>	<u>p₂₋₈≡</u> <u>0,0005</u>	p ₂₋₉ ≡ 0,0004
					p ₃₋₅ =0,119	<u>p₄₋₆≡0,002</u>	P ₃₋₇ =0,007	P ₃₋₈ =0,194	P ₃₋₉ =0,603

					$\underline{p_{4-5} \equiv 0,00006}$		$p_{4-7}=0,015$	$\underline{p_{4-8} \equiv 0,0001}$	$\underline{p_{4-9} \equiv 0,00006}$
СЦК-СП (y.e.)									
$M \pm \sigma$	0,31±0,04	0,2±0,03	0,33±0,03	0,23±0,01	0,31±0,03	0,32±0,03	0,34±0,02	0,31±0,03	0,32±0,03
Me	0,31	0,2	0,33	0,23	0,31	0,32	0,34	0,31	0,32
(Q ₁ -Q ₃)	(0,27-0,34)	(0,17-	(0,3-0,35)	(0,22-	(0,28-	(0,29-	(0,32-	(0,28-	(0,29-
p-знач		0,22)	$\underline{p_{2-3} \equiv 0,00003}$	0,24)	0,33)	0,34)	0,35)	0,33)	0,34)
		$\underline{p_{1-2} \equiv 0,00004}$		$p_{2-4} = 0,113$	$\underline{p_{2-5} \equiv 0,00003}$	$\underline{p_{2-6} \equiv 0,00003}$	$\underline{p_{2-7} \equiv 0,00003}$	$\underline{p_{2-8} \equiv 0,00003}$	$\underline{p_{2-9} \equiv 0,00007}$
					$p_{3-5} = 0,1409$	$p_{3-6} = 0,312$	$p_{3-7} = 0,312$	$p_{3-8} = 0,1409$	$p_{3-9} = 0,312$
					$\underline{p_{4-5} \equiv 0,00002}$	$\underline{p_{4-6} \equiv 0,00004}$	$\underline{p_{4-7} = 0,011}$	$\underline{p_{4-8} \equiv 0,00002}$	$\underline{p_{4-9} \equiv 0,00004}$
							$\underline{p_{1-7} = 0,004}$		
СЦК-ИН (y.e.)									
$M \pm \sigma$	0,7±0,05	0,52±0,07	0,61±0,04	0,52±0,04	0,69±0,06	0,63±0,05	0,64±0,08	0,68±0,05	0,67±0,03
Me	0,7	0,52	0,65	0,52	0,69	0,63	0,64	0,68	0,67
(Q ₁ -Q ₃)	(0,65-0,74)	(0,46-	(0,61-	(0,48-	(0,64-	(0,58-	(0,58-0,7)	(0,63-	(0,65-
p-знач		0,58)	0,68)	0,55)	0,74)	0,67)	$\underline{p_{2-7} \equiv 0,0016}$	0,72)	0,69)
		$\underline{p_{1-2} \equiv 0,00003}$	$\underline{p_{2-3} \equiv 0,00008}$	$p_{2-4} = 0,817$	$\underline{p_{2-5} \equiv 0,00006}$	$\underline{p_{2-6} \equiv 0,00009}$	$p_{3-7} = 0,817$	$\underline{p_{2-8} \equiv 0,00005}$	$\underline{p_{2-9} \equiv 0,00003}$
					$p_{3-5} = 0,094$	$p_{3-6} = 0,273$	$\underline{p_{4-7} \equiv 0,00004}$	$p_{3-8} = 0,133$	$p_{3-9} = 0,2602$
					$\underline{p_{4-5} \equiv 0,00003}$	$\underline{p_{4-6} \equiv 0,00001}$		$\underline{p_{4-8} \equiv 0,00003}$	$\underline{p_{4-9} \equiv 0,00003}$
Индекс стимуляции (ИС)									
$M \pm \sigma$	2,3±0,5	1,3±0,1	2,0±0,2	1,5±0,1	2,2±0,4	2,0±0,3	1,9±0,3	2,3±0,3	2,1±0,2

Me (Q ₁ -Q ₃) p-знач	2,4 (1,9-2,7)	1,3 (1,2-1,4)	2,0 (1,8-2,2)	1,5 (1,4-1,6)	2,2 (1,9-2,6)	2,0 (1,7-2,3)	2,1 (1,7-2,06)	2,3 (2,03-2,6)	2,1 (1,9-2,3)
		<u>p₁₋₂</u> 0,00009	<u>p₂₋₃</u> 0,00003	<u>p₂₋₄</u> 0,005	<u>p₂₋₅</u> 0,00006	<u>p₂₋₆</u> 0,00006	<u>p₂₋₇</u> 0,0001	<u>p₂₋₈</u> 0,00003	<u>p₂₋₉</u> 0,00003
					p ₃₋₅ =0,204	p ₃₋₆ = 0,334	p ₃₋₇ = 0,4704	p ₃₋₈ = 0,045	p ₃₋₉ =0,193
					<u>p₄₋₅</u> 0,0002	<u>p₄₋₆</u> 0,0003	<u>p₄₋₇</u> =0,002	<u>p₄₋₈</u> 0,00003	<u>p₄₋₉</u> 0,00003

Метаболическая активность клеток в этой группе мышей также достоверно снижалась относительно показателей интактных мышей. Так, значения НСТ–СП становились ниже в среднем на 34,6%, НСТ–ИН – на 29,6%; показатели цитохимических коэффициентов СЦК–СП – на 35,5%, СЦК–ИН – на 25,7%. ИС у иммунодефицитных мышей снижался на 45,8%.

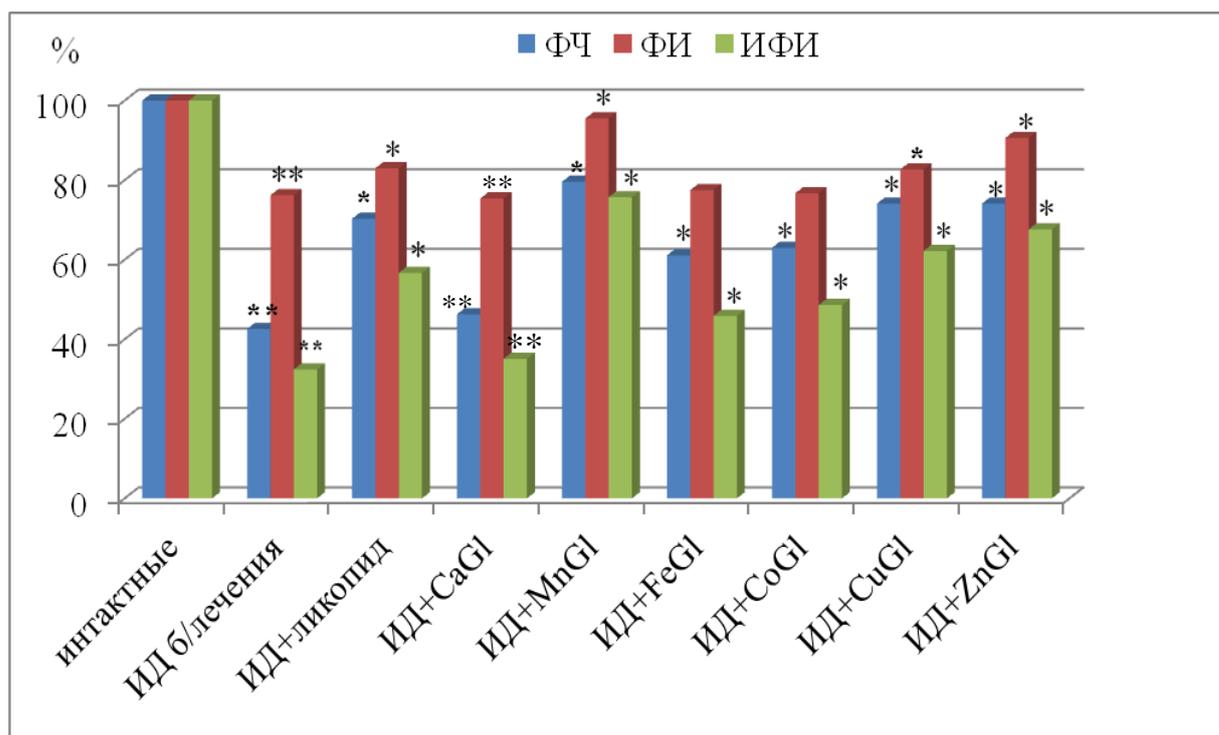
То есть представленные результаты свидетельствуют о том, что состояние мышей, вызванное инъекцированием циклофосфамида, можно отнести к вторично иммунодефицитному (Мавзютов А.Р. и др., 2017; Князева О.А. и др., 2018).

В группе сравнения (№ 3), в которой мыши получали иммуностимулирующий препарат «Ликопид», наблюдалась активация фагоцитоза следующим образом: показатель ФЧ повышался на 27,7%, ФИ – на 6,8%, ИФИ – на 24,3%, НСТ–СП – на 20,5%, НСТ–ИН – на 18,4%. Цитохимические коэффициенты также повышались: СЦК–СП – на 41,9%, СЦК–ИН – на 18,5%; ИС возрастал на 29,1% по сравнению с показателями иммуносупрессированных животных, не получавших лечения ($p < 0,05$) (таблица 4).

В другой группе сравнения (№4), в которой мыши получали глюконат кальция, статистически значимых отличий по данным показателям с группой №2 (иммунодефицит без лечения) выявлено не было.

Введение иммунодефицитным мышам глюконатов 3d-металлов приводило к значимой, сопоставимой с действием ликопида, активации фагоцитоза, что продемонстрировано на диаграммах (рисунки 16-18).

Результаты показывают, что наибольшее увеличение ФЧ наблюдалось в группе животных, получавших MnGl - (на 37%), что на 9,3% превысило действие ликопида ($p = 0,008$). Под действием ZnGl и CuGl данный показатель увеличивался на 31,5% (отличия с действием ликопида статистически не значимы). Введение FeGl и CoGl вызывало повышение ФЧ на 18,5 и 20,4% по сравнению с иммунодефицитными мышами без лечения, что оказалось менее эффективным относительно ликопида ($p < 0,05$) (рисунок 13).

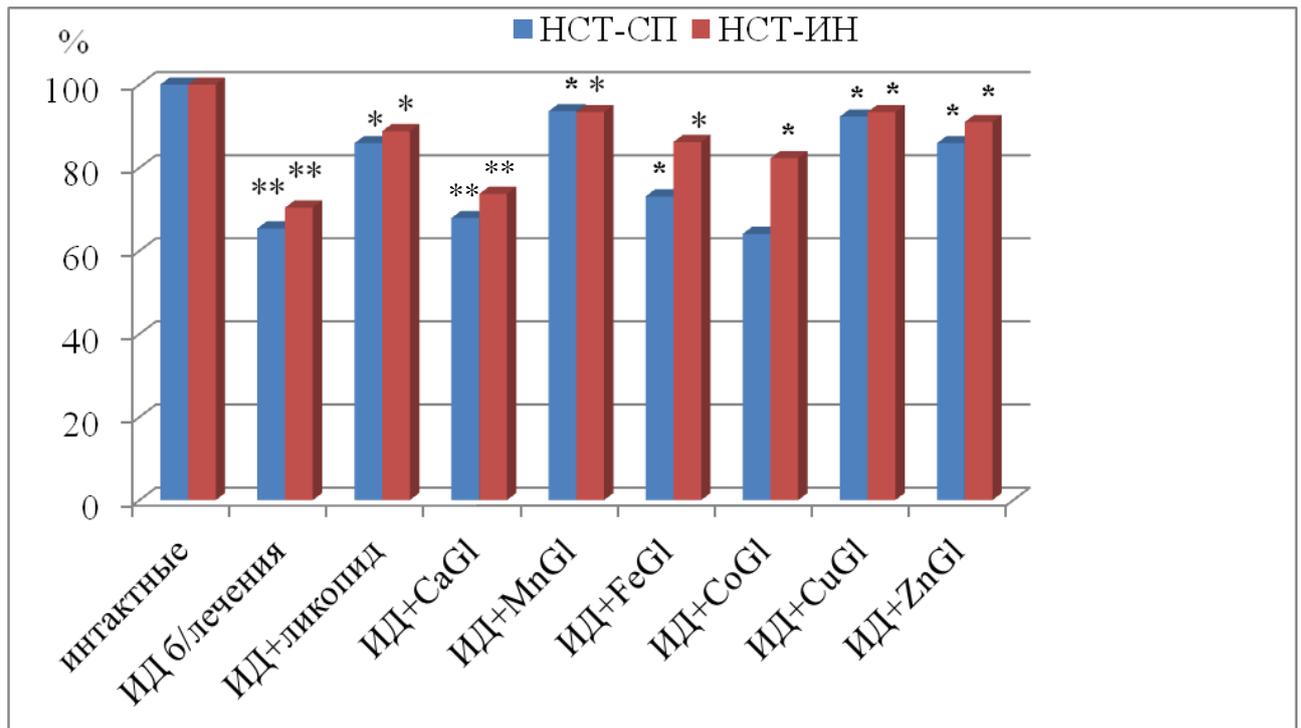


Примечание ** - отличия достоверны относительно группы «интактные» ($p < 0,05$); * - отличия достоверны относительно группы «иммунодефицит без лечения» ($p < 0,05$). За 100% приняты показатели интактных мышей

Рисунок 13 – Показатели поглотительной активности фагоцитов (ФЧ, ФИ, ИФИ) при экспериментальном иммунодефиците (ИД) до и после курса введения глюконатов 3d-металлов (3dMeGl) и препаратов сравнения (ликопид и CaGl)

ФИ под действием MeGl также повышался: в случае MnGl на 19,3%, ZnGl – на 14,4%, CuGl – на 6,5%. 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 иммуносупрессированных мышей составил 28,2% после терапии MnGl, 26,9% – CuGl, 20,5% – ZnGl, 7,7% – FeGl. Соответственно, значения НСТ–ИН (%) составили: на 16,2% – CoGl, 23% – MnGl и CuGl, 20,5% – ZnGl, 15,8% – FeGl и 11,9% – CoGl ($p < 0,05$) (рисунок 14).

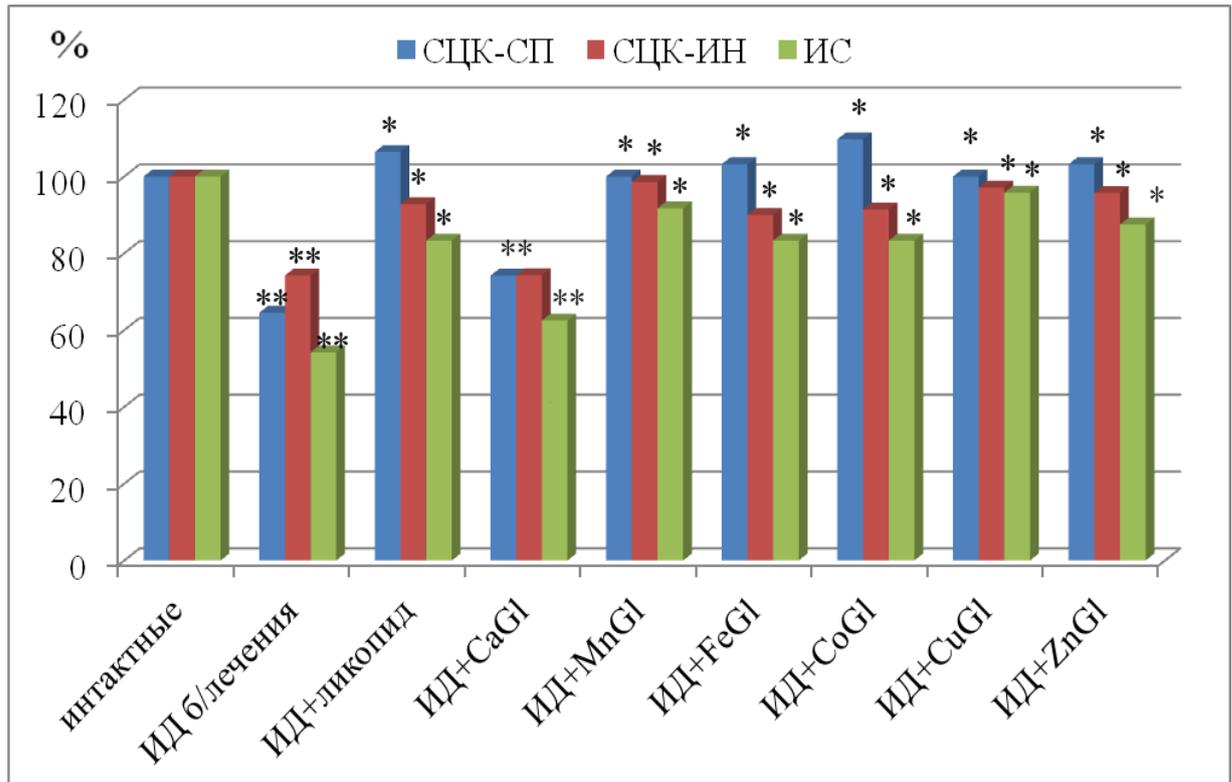


Примечание ** – отличия достоверны относительно группы «интактные» ($p < 0,05$); * – отличия достоверны относительно группы «иммунодефицит без лечения» ($p < 0,05$). За 100% приняты показатели интактных мышей

Рисунок 14 – Показатели метаболической активности фагоцитов (НСТ-СП и НСТ-ИН) при экспериментальном иммунодефиците (ИД) до после курса введения глюконатов 3d-металлов (3dMeGl) и препаратов сравнения (ликопид и CaGl)

Повышение цитохимических коэффициентов, а именно СЦК–СП, происходило практически до уровня интактных мышей, при этом разница с группой «ИД без лечения» составляла после терапии CoGl – 45,2%, ZnGl – 38,7%, MnGl, FeGl и CuGl – 35,5% ($p < 0,05$) (рисунок 15). Как видно, максимальная разница обнаруживалась после терапии CoGl, после его введения наблюдалось даже превышение уровня интактных животных на 9,7% ($p = 0,04$).

Показатели СЦК–ИН соответственно возрастали 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 иммуносупрессированных животных, не получавших лечения ($p < 0,05$).



Примечание ** - отличия достоверны относительно группы «интактные» ($p < 0,05$); * - отличия достоверны относительно группы «иммунодефицит без лечения» ($p < 0,05$). За 100% приняты показатели интактных мышей

Рисунок 15 – Показатели цитохимических коэффициентов (СЦК–СП и СЦК–ИН) и индекса стимуляции (ИС) при экспериментальном иммунодефиците (ИД) до и после курса введения глюконатов 3d-металлов (3dMeGl) и препаратов сравнения (ликопид и CaGl)

Информативным в отношении резервов биоцидности фагоцитирующих клеток является показатель индекса стимуляции (ИС), рассчитываемый по показателям среднего цитохимического коэффициента, который отображает интенсивность энергетических процессов ферментных систем фагоцитирующих клеток. Данный показатель изменялся следующим образом: значительно возрос после введения CuGl – на 41,6% и далее в порядке уменьшения: MnGl – на 37,5%, ZnGl – на 33,3%, FeGl и CoGl – на 29,1% (также как и после введения ликопида) ($p < 0,05$).

Таким образом, глюконаты 3d-металлов восстанавливают метаболическую систему фагоцитоза. Неизменность или незначительный рост фагоцитарной

активности под действием глюконата кальция подтверждает ведущую роль в иммунокорригировании 3d-металлов.

Известно, что активацию фагоцитов вызывает ИФН- γ , который также усиливает их противоопухолевую активность. В свою очередь, активированные макрофаги вырабатывают цитокины, среди которых важную роль играют ИЛ-1, ИЛ-6, и ФНО- α .

Поэтому на следующем этапе работы необходимо было провести исследование влияния глюконатов 3d-металлов на выработку данных цитокинов.

3.3. Оценка влияния глюконатов 3d-металлов на продукцию цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИФН- γ , ФНО- α) в сыворотке крови мышей при индуцированном иммунодефиците

Система цитокинов играет определяющую роль при развитии различных заболеваний, затрагивающих иммунную систему, что в настоящее время не вызывает сомнений.

Задача данного этапа исследования – оценка влияния глюконатов 3d-металлов на продукцию цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИФН- γ , ФНО- α) в сыворотке крови мышей с экспериментальным иммунодефицитом для рассмотрения возможных механизмов их действия.

Цитокины – группа гормоноподобных белков и пептидов, обладающих небольшой молекулярной массой (< 30 кДа), моделирующих клеточные взаимодействия в различных иммунных и воспалительных, процессах в организме (Baldo В.А., 2014). Они являются связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом.

ИЛ-1 (интерлейкин-1) является первым представителем семейства структурно связанных цитокинов, включающих две изоформы α и β . Семейство рецепторов ИЛ-1 (IL-1R) состоит из 10 представителей, сборка IL-1R происходит в виде гетеродимеров, действующих через MyD88-IRAK-NF κ B сигнальный путь

(Garlanda C. et al., 2013). Показано, что ИЛ-1 продуцируется в результате активации Ras-пути и является ключевым активатором NFκB–регулируемых генов, запускающим транскрипцию при воздействии различных агентов, обеспечивая таким образом выживание клетки (Wang W. et al., 2015).

ИЛ-6 является одним из ключевых провоспалительных цитокинов, играющих значительную роль в развитии многих заболеваний, его повышенный уровень наблюдается при хронических воспалительных процессах и злокачественных заболеваниях (Kumari N. et al., 2016). В то же время, он может проявлять и противовоспалительные свойства. Синтезируется активированными макрофагами и Т-клетками, вызывает стимуляцию иммунного ответа.

ИФН-γ активирует НК и фагоциты, стимулирует микробицидную активность макрофагов, индуцирует формирование гранул, играющих барьерную функцию против внутриклеточных патогенов.

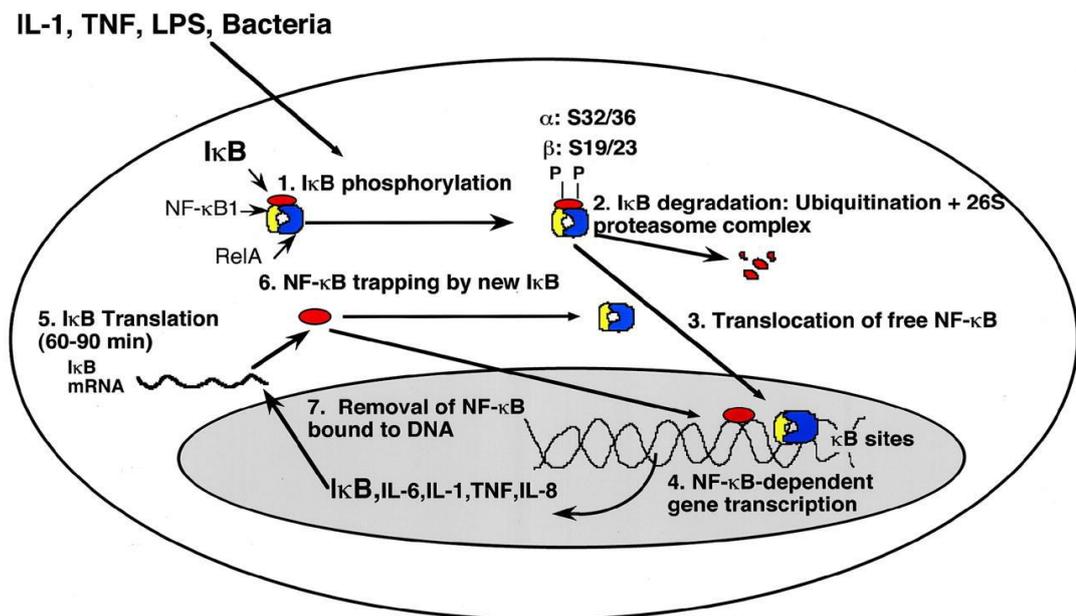


Рисунок 16 – Активация NF-κB посредством ФНО-α/TNFα, ИЛ-1/ИЛ-1 (цит. по: Jobin C., 2000)

Фактор некроза опухоли-α (ФНО-α) является провоспалительным цитокином, который синтезируется кроветворными и некроветворными клетками и считается агентом, связывающим воспаление с развитием опухоли (West N. R. et

al., 2015). ФНО- α действует, главным образом, через один из двух видов рецепторов, TNFR₁ (p55), активируя NF- κ B (Kotiyal S. et al., 2014) и, вызывая клеточный апоптоз за счет активация каспаз (рисунок 16) (Van Herreweghe F. et al., 2010).

Провоспалительное действие ФНО- α заключается в увеличении продукции различных молекул: факторов роста, металлопротеиназ, простагландинов, лейкотриенов и провоспалительных цитокинов (Nenu I. et al., 2015).

Для осуществления поставленной цели исследования по влиянию глюконатов 3d-металлов на продукцию цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИФН- γ , ФНО- α) при экспериментальном иммунодефиците, проводилось определение уровня цитокинов в сыворотке крови мышей, разделенных на 9 групп (в каждой из групп n=12):

1-я – представляла собой группу интактных животных;
 2-я – иммунодефицит без лечения,
 3-я – иммунодефицит в сочетании с введением ликопида,
 4-я – иммунодефицит в сочетании с введением глюконата кальция;
 5-9-я – группы мышей с иммунодефицитом в сочетании с введением глюконатов 3d-металлов: 5 – Mn, 6 – Fe, 7 – Co, 8 – Cu, 9 – Zn (Князева О.А. и др., 2018).

Результаты проведенного исследования представлены в таблице (таблица 4), а также продемонстрированы на диаграмме (рисунок 17).

Показано, что после введения цитостатика циклофосфида в сыворотке крови мышей наблюдалось подавление синтеза всех исследуемых цитокинов, что выражалось в снижении уровня: ИЛ-1 β – на 75%, ИЛ-6 – на 65,2%, ИФН- γ – на 61,6%, ФНО- α – на 55,6% ($p < 0,05$).

Введение иммуностимулирующего препарата ликопида вызывало повышение уровня цитокинов: ИЛ-1 β – на 61,8%, ИЛ-6 – на 54,6%, ИФН- γ – на 57,6%, ФНО- α – на 35,2%.

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

Группы мышей	Стат. показатель	Цитокины			
		ИЛ-1 β пкг/мл	ИЛ-6 пкг/мл	ИФН γ пкг/мл	ФНО α пкг/мл
1. Контроль интактные (n=12)	M \pm σ Me (Q ₁ -Q ₃)	5,6 \pm 0,6 5,64 (5,0-6,2)	47,5 \pm 4,8 48,2 (42,9-52,3)	7,5 \pm 0,8 7,6 (6,7-8,3)	30,9 \pm 3,2 31,3 (27,8-34,1)
2. Контроль-ИД без леч. (n=12)	M \pm σ Me (Q ₁ -Q ₃) p-знач.	1,4 \pm 0,2 1,41 (1,2-1,6) <u>p₁₋₂=0,00003</u>	16,6 \pm 1,7 16,8 (15,0-18,3) <u>p₁₋₂=0,00003</u>	2,9 \pm 0,4 2,92 (2,5-3,3) <u>p₁₋₂=0,0326</u>	13,4 \pm 1,4 13,6 (12,1-14,8) <u>p₁₋₂=0,00003</u>
3. ИД + ликопид (n=12)	M \pm σ Me (Q ₁ -Q ₃) p-знач.	4,8 \pm 0,6 4,84 (4,2-5,4) <u>p₂₋₃=0,00003</u>	42,5 \pm 4,5 43,1 (38,2-47,0) <u>p₂₋₃=0,00003</u>	7,2 \pm 0,8 7,3 (6,4-8,0) <u>p₂₋₃=0,00003</u>	24,5 \pm 2,6 24,6 (23,1-27,1) <u>p₂₋₃=0,00003</u>
4. ИД+CaGl (n=12)	M \pm σ Me (Q ₁ -Q ₃) p-знач.	1,5 \pm 0,16 1,5 (1,3-1,6) P ₂₋₄ =0,1939	17,3 \pm 1,8 17,5 (15,6-19,1) p ₂₋₄ =0,2482	3,2 \pm 0,4 3,22 (2,8-3,6) p ₂₋₄ =0,0734	13,8 \pm 1,5 14,0 (12,3-15,3) p ₂₋₄ =0,3263
5. ИД+MnGl (n=12)	M \pm σ Me (Q ₁ -Q ₃) p-знач.	2,7 \pm 0,3 2,73 (2,4-3,0) <u>p₂₋₅=0,00003</u> <u>p₃₋₅=0,00003</u> <u>p₄₋₅=0,00003</u>	26,3 \pm 2,7 26,6 (23,7-29,0) <u>p₂₋₅=0,00003</u> <u>p₃₋₅=0,00003</u> <u>p₄₋₅=0,00003</u>	4,9 \pm 1,6 5,1 (3,3-6,5) <u>p₂₋₅=0,0014</u> <u>p₃₋₅=0,0008</u> <u>p₄₋₅=0,0055</u>	20,9 \pm 2,1 21,2 (18,9-23) <u>p₂₋₅=0,00003</u> <u>p₃₋₅=0,0018</u> <u>p₄₋₅=0,00003</u>
6. ИД+FeGl	M \pm σ Me	2,3 \pm 0,3 2,33	20,4 \pm 2,2 20,7	3,5 \pm 0,4 3,52	14,3 \pm 1,5 14,5

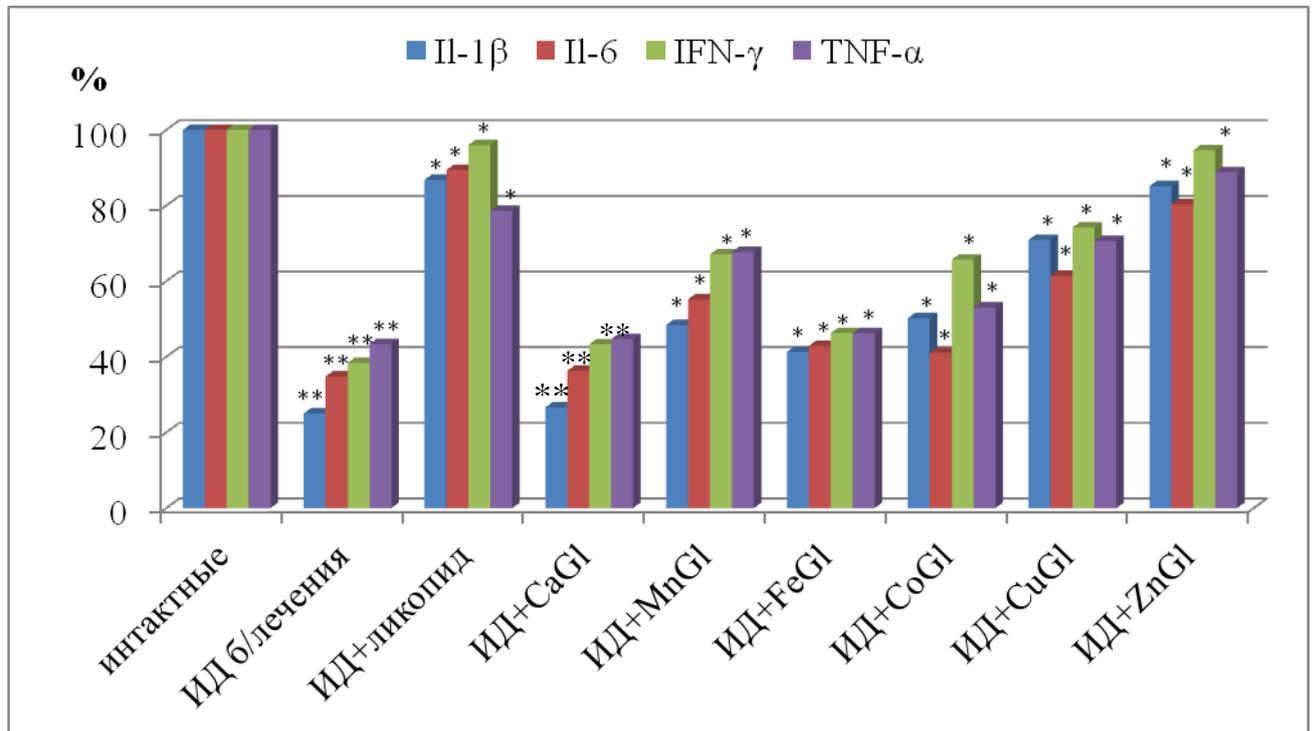
(n=12)	(Q ₁ -Q ₃) p-знач.	(2,0-2,6) <u>p₂₋₆=0,00003</u> <u>p₃₋₆=0,00003</u> <u>p₄₋₆=0,00003</u>	(18,3-22,6) <u>p₂₋₆=0,00004</u> <u>p₃₋₆=0,00004</u> <u>p₄₋₆=0,00038</u>	(3,1-3,9) <u>p₂₋₆=0,00038</u> <u>p₃₋₆=0,00003</u> <u>p₄₋₆=0,0734</u>	(12,8-15,8) <u>p₂₋₈=0,119</u> <u>p₃₋₆=0,00003</u> <u>p₄₋₆=0,3263</u>
7. ИД+CoGl (n=12)	M±σ Me (Q ₁ -Q ₃) p-знач.	2,8±0,3 2,83 (2,5-3,1) <u>p₂₋₇=0,00003</u> <u>p₃₋₇=0,00003</u> <u>p₄₋₇=0,00003</u>	19,6±2,0 19,8 (17,7-21,6) <u>p₂₋₇=0,0026</u> <u>p₃₋₇=0,00003</u> <u>p₄₋₇=0,0209</u>	4,9±0,5 5,0 (4,4-5,4) <u>p₂₋₇=0,00003</u> <u>p₃₋₇=0,00003</u> <u>p₄₋₇=0,00003</u>	16,4±1,7 16,6 (14,8-18,1) <u>p₂₋₇=0,00003</u> <u>p₃₋₇=0,00003</u> <u>p₄₋₇=0,0022</u>
8. ИД+CuGl (n=12)	M±σ Me (Q ₁ -Q ₃) p-знач.	3,9±0,5 4,0 (3,4-4,4) <u>p₂₋₈=0,00003</u> <u>p₃₋₈=0,0029</u> <u>p₄₋₈=0,00003</u>	29,2±3,0 29,6 (26,3-32,2) <u>p₂₋₈=0,00003</u> <u>p₃₋₈=0,00003</u> <u>p₄₋₈=0,00003</u>	5,6±0,6 5,64 (5,0-6,2) <u>p₂₋₈=0,00003</u> <u>p₃₋₈=0,0001</u> <u>p₄₋₈=0,00003</u>	21,8±2,2 22,1 (19,7-24) <u>p₂₋₈=0,00003</u> <u>p₃₋₈=0,0153</u> <u>p₄₋₈=0,00003</u>
9. ИД+ZnGl (n=12)	M±σ Me (Q ₁ -Q ₃) p-знач.	4,7±0,5 4,8 (4,2-5,2) <u>p₂₋₉=0,00003</u> <u>p₃₋₉=0,5833</u> <u>p₄₋₉=0,00003</u>	38,2±3,9 38,7 (34,5-42,1) <u>p₂₋₉=0,00003</u> <u>p₃₋₉=0,0326</u> <u>p₄₋₉=0,00003</u>	7,1±0,8 7,19 (6,2-7,9) <u>p₂₋₉=0,00003</u> <u>p₃₋₉=0,6236</u> <u>p₄₋₉=0,00003</u>	27,4±2,8 27,8 (24,7-30,2) <u>p₂₋₉=0,00003</u> <u>p₃₋₉=0,0326</u> <u>p₄₋₉=0,00003</u>

Глюконат кальция не оказывал значимого влияния на уровень цитокинов.

После введения глюконатов 3d-металлов уровень цитокинов, как провоспалительных (ИЛ-1β, ИЛ-6, ФНО-α), так и противовоспалительного (ИФН-γ), в основном повышался в зависимости от металла.

Под действием MnGl: ИЛ-1β – на 23,4%, ИЛ-6 – на 20,4%, ИФН-γ – на 28,7%, ФНО-α – на 24,3%; под действием FeGl: ИЛ-1β – на 16,3%, ИЛ-6 – на 8,1%,

ИФН- γ - на 7,9%; под действием CoGl: ИЛ-1 β – на 25,2%, ИЛ-6 – на 6,3%, ИФН- γ - на 27,3%, ФНО- α – на 9,6%; CuGl: ИЛ-1 β – на 45,9%, ИЛ-6 – на 26,6%, ИФН- γ - на 35,8%, ФНО- α – на 27,2%; ZnGl: ИЛ-1 β – на 60,1%, ИЛ-6 – на 45,5%, ИФН- γ - на 56,2%, ФНО- α – на 45,4%; ($p < 0,05$).



Примечание ** – отличия достоверны относительно группы «интактные» ($p < 0,05$); * – отличия достоверны относительно группы «иммунодефицит без лечения» ($p < 0,05$). За 100% приняты показатели интактных мышей

Рисунок 17 – Влияние глюконатов 3d-металлов на продукцию цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИФН- γ , ФНО- α) в сыворотке крови мышей с индуцированным иммунодефицитом (ИД)

Как уже было сказано выше, в процессе иммунного ответа большую роль играет нуклеарный фактор транскрипции NF- κ B, состоящий из комбинации различных NF- κ B/Rel-белков, связывающихся с ДНК (рисунок 16). Показано, что продукция провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-6) зависит от экспрессии синтеза данного ядерного фактора, который в норме находится в связанном состоянии с белком I κ B α . Провоспалительные цитокины (например,

ФНО- α , ИЛ-6) оказывают активирующее действие на комплекс I κ B киназы, катализирующей реакцию фосфорилирования белка I κ B α по серину (в положениях 32 и 36), что приводит к активации фактора NF- κ B и разрыву его связи с I κ B α . Активация NF- κ B, в свою очередь, вызывает увеличение синтеза ФНО- α и ИЛ-6, и, соответственно, способствует росту продукции других цитокинов (Rhodus N.L. et al., 2005).

По представленным результатам наиболее выраженное действие на выработку цитокинов проявлял глюконат цинка. Из данных литературы известно, что на активацию фактора NF- κ B существенное влияние оказывает поступление ионов цинка (Кунцевич Н.В., 2010).

Сопоставление полученных результатов с литературными данными о роли фактора NF- κ B, контролирующего экспрессию цитокинов и активирующегося при поступлении цинка, позволяет сделать вывод об иммуностимулирующем действии глюконата цинка за счет активации нуклеарного фактора транскрипции и выработки цитокинов, стимулирующих продукцию антител.

Значительное влияние введения 3dMeGl на синтез исследуемых цитокинов в сыворотке крови иммунодефицитных мышей также указывает на их весомую роль для иммунного гомеостаза.

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

Одним из главных и надежных методов оценки В-системы иммунитета для диагностики всех форм иммунодефицитов является определение уровня иммуноглобулинов.

Инициация классического пути системы комплемента начинается с взаимодействия субкомпонента первого фактора комплемента C1q, присутствующего в сыворотке крови в виде мультимолекулярного комплекса

C1q-2C1r-2C1s, с активатором, которым является, главным образом, IgG в составе комплекса антиген-антитело. Комплексы C1q-IgG-антиген формируются постоянно в результате иммунного ответа организма, так как они запускают каскад биохимических реакций системы комплемента по классическому пути и стимулируют активацию натуральных киллеров, привлекающих фагоциты и лимфоциты (Черемных Е.Г., 2015).

Задачей данного этапа работы явилось исследование влияния глюконатов 3d-металлов на продукцию иммуноглобулинов G и их взаимодействие с субкомпонентом первого фактора комплемента – C1q по содержанию комплексов C1q-IgG.

Эксперимент проводили на 108 особях 2,5-3-х месячных белых беспородных самцах мышей массой 25-28 г. Иммунодефицит индуцировали путем однократного внутрибрюшинного введения цитостатика циклофосфамида (50 мг/кг). Контролем служили две группы: интактные и иммунодефицитные животные («без лечения»), которым вводили дистиллированную воду.

Влияние глюконатов Mn, Fe, Co, Cu, Zn изучали в сравнении с двумя группами: введение препарата «Ликопид®» и глюконата кальция (CaGl).

На 16-е сутки в сыворотке крови определяли уровень IgG и (C1q-IgG).

Представленные в таблицах 5 и 6 результаты исследования показывают, что введение циклофосфамида вызывает снижение уровня IgG на 53%, а комплексов C1q-IgG - на 31,5% относительно группы интактных мышей, что указывает на побочное действие цитостатика, который вызывает 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 дискомплексации, дистрофическим и дегенеративным изменениям, приводящим к гибели по пути некроза или же потенцируя апоптоз.

Таблица 5 – Влияние глюконатов 3d-металлов на уровень IgG в сыворотке крови иммунодефицитных мышей

Стат.показат.	IgG, мг/мл								
	1- интактные (n=12)	2 – ИД без леч. (n=12)	3 – ИД +ликопид (n=12)	4 – ИД +GlCa (n=12)	5 – ИД +GlMn (n=12)	6 – ИД +GlFe (n=12)	7 – ИД +GlCo (n=12)	8 – ИД +GlCu (n=12)	9 – ИД +GlZn (n=12)
M± σ	1,48±0,23	0,69±0,09	0,84±0,12	0,7±0,09	0,94±0,11	0,76±0,11	1,07±0,16	1,02±0,15	1,16±0,14
Me	1,51	0,71	0,86	0,72	0,96	0,79	1,09	1,04	1,18
(Q ₁ - Q ₃)	(1,34-1,72)	(0,63- 0,76)	(0,74 – 0,93)	(0,63-0,78)	(0,89-0,99)	(0,73-0,85)	(0,98-1,21)	(0,92-1,12)	(1,07-1,24)
P-знач.		<u>p_{1,2}=0,00003</u>	<u>p_{2,3}=0,003</u>	<u>p_{2,4}=0,00729</u> <u>p_{3,4}=0,0130</u>	<u>p_{2,5}=0,0004</u> <u>p_{3,5}=0,00003</u> <u>p_{4,5}=0,0005</u>	<u>p_{2,6}=0,03</u> <u>p_{3,6}=0,3556</u> <u>p_{4,6}=0,0326</u>	<u>p_{2,7}=0,00006</u> <u>p_{3,7}=0,0009</u> <u>p_{4,7}=0,00006</u>	<u>p_{2,8}=0,0002</u> <u>p_{3,8}=0,0066</u> <u>p_{4,8}=0,0002</u>	<u>p_{2,9}=0,00003</u> <u>p_{3,9}=0,00005</u> <u>p_{4,9}=0,00003</u>

Таблица 6 – Влияние глюконатов 3d-металлов на уровень комплексов C1q-IgG в сыворотке крови иммунодефицитных мышей

Стат.показатель	C1q-IgG, ед. экстинкции								
	1-интактные (n=12)	2 – ИД без леч. (n=12)	3 – ИД +ликопид (n=12)	4 – ИД +CaGl (n=12)	5 – ИД +MnGl (n=12)	6 – ИД +FeGl (n=12)	7 – ИД +CoGl (n=12)	8 – ИД +CuGl (n=12)	9 – ИД +ZnGl (n=12)
M± σ	1,99±0,31	1,34±0,20	1,65±0,24	1,41±0,18	1,86±0,20	1,66±0,23	1,69±0,23	1,76±0,19	1,93±1,36
Me	2	1,37	1,66	1,43	1,87	1,67	1,74	1,77	1,95
(Q ₁ - Q ₃)	(1,72-2,24)	(1,28-1,42)	(1,54-1,77)	(1,31-1,53)	(1,73-2,02)	(1,56-1,84)	(1,6-1,83)	(1,65-1,87)	(1,94-1,44)
p-знач.		<u>p1,2=0,0002</u>	<u>p2,3=0,0093</u>	<u>p2,4=0,2726</u> <u>p3,4=0,011</u>	<u>p2,5=0,0001</u> <u>p3,5=0,0282</u> <u>p4,5=0,0002</u>	<u>p2,6=0,0101</u> <u>p3,6=0,7728</u> <u>p4,6=0,0209</u>	<u>p2,7=0,0038</u> <u>p3,7=0,4357</u> <u>p4,7=0,0051</u>	<u>p2,8=0,0005</u> <u>p3,8=0,2040</u> <u>p4,8=0,0011</u>	<u>p2,9=0,00003</u> <u>p3,9=0,00005</u> <u>p4,9=0,00003</u>

Примечание: ИД – индуцированный иммунодефицит

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

Двухнедельное введение глюконатов 3d-металлов приводило к существенному повышению концентрации IgG в сыворотке крови мышей (рис. 18) по сравнению с животными группы сравнения «ИД без лечения» ($p < 0,05$).

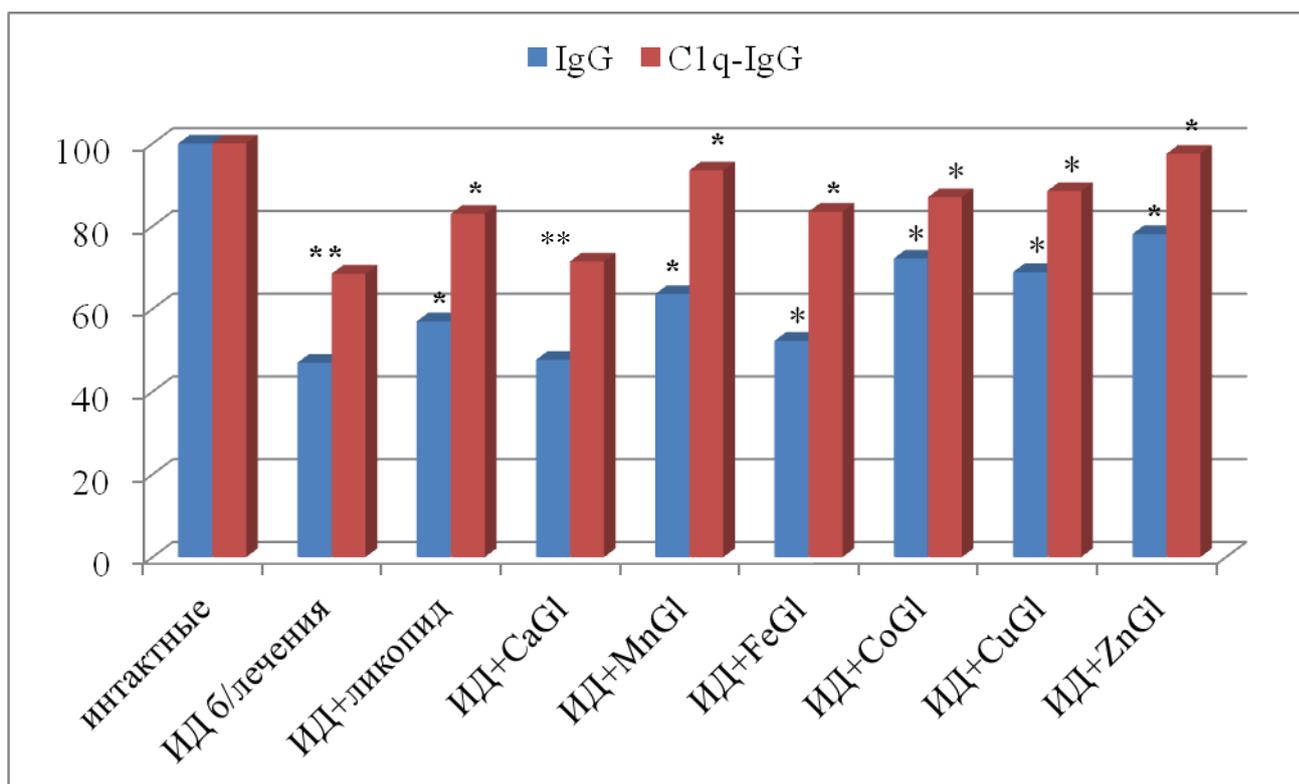
При введении глюконата цинка наблюдалось наибольшее повышение концентрации IgG – на 31 %, далее в порядке убывания следует CoG1 – на 25 %, CuG1 – на 22 %. В меньшей степени эффект проявлялся под действием глюконата марганца – около 17% и железа – 5%.

Аналогичная картина наблюдалась и в содержании комплексов C1q-IgG (рисунок 18). Здесь выраженное увеличение было отмечено в группах мышей, получавших ZnG1 (на 29 %), MnG1 (на 25 %) и CuG1 (на 20 %), в меньшей степени при введении CoG1 (на 18,5 %) и FeG1 (на 15 %).

Не исключено, что такое действие глюконатов 3d-металлов может быть связано со стимулированием дополнительной выработки IgG, а также с конкурирующим взаимодействием этих соединений с метаболитами распада, смещающим равновесие реакции C1q с IgG в сторону увеличения доли образования комплексов.

Поскольку в группе животных, получавших CaG1, наблюдалось лишь незначительное повышение уровня IgG (на 0,7%) и комплексов C1q-IgG (на 3%), относительно группы «без лечения», можно предположить, что определяющее влияние на изменение изучаемых показателей оказывают 3d-элементы.

Из приведенных данных также видно, что глюконаты 3d-металлов превосходят по корректирующему действию препарат сравнения «Ликопид» ($p < 0,05$).



Примечание ** – отличия достоверны относительно группы «интактные» ($p < 0,05$); * – отличия достоверны относительно группы «иммунодефицит без лечения» ($p < 0,05$). За 100% приняты показатели интактных мышей

Рисунок 18 – 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)

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что глюконаты 3d-металлов обладают иммунокорригирующими свойствами: повышают продукцию IgG, способствуют росту взаимодействия IgG с субкомпонентом первого фактора комплемента C1q, что выражается в увеличении содержания комплексов C1q-IgG, уровень которых значительно снижался в результате действия циклофосфида.

Наиболее выраженное влияние на продукцию IgG оказывал глюконат цинка, затем - глюконаты кобальта и меди. На его взаимодействие с C1q также в большей степени влиял глюконат цинка, далее – глюконаты марганца и меди.

Для сравнительной оценки влияния исследуемых глюконатов металлов на взаимодействие C1q-IgG-антиген на следующем этапе работы была разработана

новая методика.

3.5. Оценка влияния глюконатов 3d-металлов на взаимодействие субкомпонента C1q с комплексом антиген-антитело *in vitro*

Система комплемента является одним из важнейших регуляторов приобретенного иммунитета, ее роль существенна в патогенезе различных заболеваний, а также механизмах иммунологической толерантности. Основные ее биологические эффекты: – цитотоксический, который осуществляется в результате сборки на поверхности мембраны атакующего комплекса из активированных поздних (начиная с 5b) компонентов комплемента, образующих поры в мембране, приводящие к лизису клеток; – опсонизация чужеродных биологических поверхностей, повышающая фагоцитирующую способность клеток; – генерация анафилотоксинов.

Чаще всего активация системы комплемента по классическому пути начинается с присоединения к комплексу IgG-антиген C1q – субкомпонента первого фактора комплемента. В исследованиях механизмов этого процесса зачастую используются эритроциты барана, являющиеся удобной моделью, поскольку на поверхности мембраны имеют липополисахаридные антигены Форссмана, которые специально сенсibiliзируются антителами из сыворотки кролика (гемолитическая сыворотка) и используются в различных тестовых системах.

Известная тест-система, называемая реакцией связывания комплемента (РСК), в XX веке широко использовалась для диагностики различных инфекций. По этому методу сначала в сыворотке крови пациента с помощью стандартных сывороток выявляется наличие антигенов или антител. Затем добавляются комплемент и сенсibiliзированные эритроциты барана. При наличии в крови пациента антител к искомому патогену образуется иммунный комплекс, фиксирующий комплемент, в результате чего эритроциты не лизируются

(положительная реакция). При отсутствии антител происходит их гемолиз (отрицательная реакция). Впервые РСК была предложена немецким ученым Августом Вассерманом, который использовал ее для диагностики сифилиса (Wassermann A., 1902).

Оценку влияния глюконатов 3d-металлов на функциональную активность комплемента по классическому пути мы проводили по предложенной нами методике с использованием сенсibilизированных гемолитической сывороткой эритроцитов барана (Патент № 2669342).

Фиксацию комплемента (С %) сенсibilизированными эритроцитами в присутствии глюконатов металлов рассчитывали по формуле:

$$C \% = (E_o - E_k) / E_o \cdot 100 \%,$$

где E_o – оптическая плотность в присутствии препарата, E_k – оптическая плотность контрольной пробы (вместо исследуемого препарата добавляется вероналовый буфер) при длине волны 450 нм.

Таблица 7 – Влияние глюконатов 3d-металлов на фиксацию комплемента в тесте с сенсibilизированными эритроцитами барана

Показатель	Контроль (n=12)	CaGl (n=12)	MnGl (n=12)	FeGl (n=12)	CoGl (n=12)	CuGl (n=12)	ZnGl (n=12)
E_{450}	0,92± 0,09	0,95± 0,11	1,13± 0,13	0,76± 0,08	1,89± 0,96	0,85± 0,09	0,91± 0,09
Фиксация комплемента (С%), %	0	3,2±0,3	18,6± 1,93	-21,05± 2,1	51,3± 5,2	-8,2± 0,9	1,1± 0,12

Результаты определения влияния глюконатов 3d-металлов на

взаимодействие субкомпонента C1q с комплексом антиген-антитело по гемолизу сенсibilизированных эритроцитов барана представлены в таблице 7, а также наглядно продемонстрированы на рисунке 19.

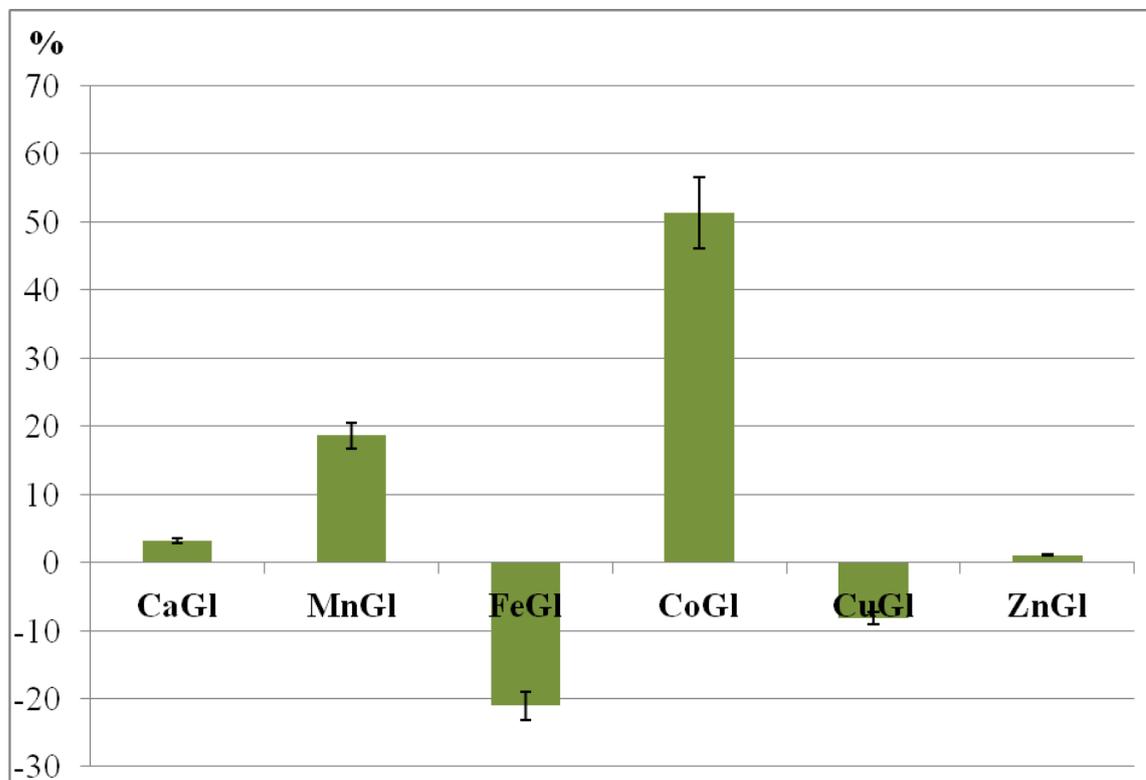


Рисунок 19 – Сравнительная оценка влияния глюконатов 3d-металлов на активность комплемента по классическому пути. По оси Y – С% – фиксация комплемента

Показано, что способностью оказывать стимулирующее действие на взаимодействие субкомпонента C1q с комплексом антиген-антитело, вызывающее активацию комплемента по классическому пути, обладают два соединения: CoGI (~51%) и, в меньшей степени, MnGI (~19%).

Два других соединения: FeGI (~21%) и CuGI (~8%), напротив, оказывали ингибирующее действие на взаимодействие субкомпонента C1q с сенсibilизированными рецепторами эритроцитов, что приводило к блокировке классического пути активации комплемента.

В то же время, глюконат цинка, обладающий, по нашим данным, наиболее

выраженной иммунокорректирующей способностью, оказывал на комплемент нейтральное действие.

Таким образом, на примере взаимодействия C1q с комплексом рецептор-антитело показано, что механизмы воздействия исследуемых соединений на белок-белковые взаимодействия различны.

3.6. Анализ взаимосвязи биохимических показателей оксидантно-антиоксидантной системы с показателями поглотительной и метаболической активности фагоцитов, синтеза цитокинов и иммуноглобулинов G

Для проверки гипотезы того, что иммунокорректирующее действие глюконатов биометаллов обусловлено влиянием ионов 3d-металлов на баланс про- и антиоксидантной активности, было необходимо провести корреляционный анализ между показателями оксидантного и иммунного гомеостаза.

Простейшей численной характеристикой тесноты линейной связи между двумя рядами переменных величин является коэффициент Пирсона, являющийся наиболее популярным среди других коэффициентов корреляции. Но для его использования необходимо, чтобы исследуемые переменные были распределены нормально. Для доказательства нормальности распределения мы использовали критерий Шапиро-Уилка. В результате его расчета было подтверждено, что гипотеза о нормальности распределения не отклоняется, и, следовательно, использование методики Пирсона для выявления корреляционных связей возможно.

Поэтому задачей настоящего этапа исследования было рассчитать коэффициент r-Пирсона и на основе полученных результатов проанализировать существование взаимосвязи между оксидантной и иммунной системами.

Ранее было показано, что между показателями окислительного гомеостаза в печени и крови существуют примерно одинаковые соотношения, которые сохраняются при окислительном стрессе, как без лечения, так и после

антиоксидантной терапии (Уразаева А.И. и др., 2014, 2014; Уразаева А.И., 2015). Поэтому, мы сочли возможным провести корреляционный анализ между полученными показателями оксидантной системы печени и иммунной системы крови экспериментальных животных.

В результате анализа была выявлена статистически значимая прямая корреляционная связь высокой силы между показателями оксидантной системы печени интактных мышей: ТБК-АП, КБсп, КБинд, СОД, КТ, ГПО и ГТ с показателями иммунного гомеостаза крови: ФЧ, ФИ, ИФИ, НСП-СП, НСП-ИН, СЦК-СП, СЦК-ИН, ИС, уровнем IgG и его комплекса с С1q (таблица 8), а также цитокинов: ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИФН- γ и ФНО- α (таблица 9).

Как известно, по спонтанному и индуцированному тесту с НСТ можно судить о состоянии кислородзависимых механизмов бактерицидности фагоцитов крови, характеризующих степень активации НАДФ-Н-оксидазной системы. Поэтому на основании полученных результатов можно утверждать, что как поглотительная, так и метаболическая активность фагоцитов находятся в прямой зависимости от процессов ПОЛ, ОМБ и активности антиоксидантных ферментов СОД, КТ, ГПО, ГТ. В такой же зависимости от оксидантной системы находились показатели продукции антител и цитокинов.

Ключевая роль в активации иммунитета отводится ИЛ-6, оказывающему наряду с провоспалительным и противовоспалительное действие за счет торможения синтеза провоспалительных факторов, в том числе ФНО- α , который в свою очередь стимулирует синтез ИЛ-6 (Шварц В., 2009). Важную роль в формировании противоинфекционного иммунитета играет также ИЛ-1 β (Насонов Е.А., Елисеев М.С., 2016). Из результатов корреляционного анализа следует, что выработка этих цитокинов, также как и ИФН- γ , участвующего в активации микробицидных механизмов фагоцитов и синтеза иммуноглобулинов (Луцкий А.А., 2015), тесно связана с активностью антиоксидантных ферментов (СОД, КТ, ГПО и ГТ) и показателями прооксидантной системы (ТБК-АП и ОМБ).

При индуцированном иммунодефиците прямая корреляционная связь

высокой силы между показателями иммунного гомеостаза и активности антиоксидантного фермента ГТ, играющего важную роль в снижении деструктивного действия окислительного стресса, способного вызывать дисфункции клеток иммунной системы (Бельских Э.С. и др., 2018), исчезла, и вместо нее появилась слабая, обратная, статистически незначимая (таблицы 10, 11).

После введения мышам глюконата марганца корреляционная связь между показателями иммунной защиты и показателем интенсивности ПОЛ ТБК-АП значительно снизилась, утратив свою статистическую значимость. При этом взаимосвязь с ГТ стала прямой, оставаясь такой же слабой, как при иммунодефиците без лечения (таблицы 12, 13).

После использования глюконата железа наблюдалась подобная картина, но слабая, статистически не значимая корреляционная связь с ТБК-АП и ГТ стала обратной (таблицы 14, 15).

В присутствии глюконата кобальта сильная корреляционная связь с ГТ восстановилась, а с ТБК-АП стала такой же, как и под действием глюконата железа, но при этом исчезла с показателем окислительной модификации белка КБсп (таблицы 16, 17).

После введения глюконата меди корреляционная взаимосвязь между всеми показателями оксидантного и иммунного гомеостаза стала такой же сильной, как у интактных животных (таблицы 18, 19).

Под действием глюконата цинка сильная корреляционная связь показателей иммунной защиты с активностью ГТ также восстанавливалась, но при этом исчезала с показателями ПОЛ ТБК-АП (таблица 20) и продукции противовоспалительного цитокина ИФН- γ (таблица 21), возрастающей в наибольшей степени после введения ZnGl (глава 3.3, рисунок 17). Возможно, это связано с тем, что его продукция не зависит от экспрессии синтеза нуклеарного фактора транскрипции NF- κ B, на активацию которого существенное влияние оказывает поступление ионов цинка (Кунцевич Н.В., 2010).

Также вызывает интерес тот факт, что после введения 3dMeG1 за исключением глюконата меди исчезала достоверная корреляционная связь между показателями иммунитета и ПОЛ, что может свидетельствовать о независимости изменения иммунной защиты от процессов липопероксидации под действием данных соединений.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что между всеми показателями оксидантно-антиоксидантного и иммунного гомеостаза существует тесная линейная корреляционная связь, которая нарушается при иммунодефиците, что выражается в утрате связи с антиоксидантным ферментом ГТ. Пероральное введение мышам глюконатов меди и цинка восстанавливает утраченные связи. Введение глюконатов марганца, железа, кобальта и цинка приводит к утрате зависимости состояния иммунной защиты от ПОЛ, а в случае CoG1 и от показателя окислительной модификации белка КБсп.

На основании полученных результатов можно предположить, что одним из механизмов иммуномодулирующего действия соединений 3d-металлов с глюконовой кислотой является их способность оказывать влияние на оксидантно-антиоксидантную систему.

Таблица 8 – Результаты корреляционного анализа между показателями оксидантно-антиоксидантного и иммунного гомеостаза у интактных мышей

Показатели иммунного гомеостаза	Показатели оксидантно-антиоксидантной системы						
	ТБК-АП	КБсп.	КБинд	СОД	КТ	ГПО	ГТ
1	2	3	4	5	6	7	8
ФЧ	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,95* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
ФИ	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,95* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
ИФИ	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,95* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
НСТ-СП	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,95* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
НСТ-ИН	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,95* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
СЦК-СП	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,94* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001

Продолжение таблицы 8							
1	2	3	4	5	6	7	8
СЦК-ИН	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,95* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
ИС	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,94* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
IgG	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p=0,11	r=0,95* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
C1q-IgG	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,95* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001

Примечание: коэффициент Пирсона $r < 0,3$ - слабая корреляция, $0,31-0,7$ – корреляция средней силы; $r > 0,71^*$ - сильная корреляция ($p < 0,05$)

Таблица 9 – Результаты корреляционного анализа между показателями оксидантно-антиоксидантного гомеостаза и продукции цитокинов у интактных мышей

Показатели синтеза цитокинов	Показатели оксидантно-антиоксидантной системы						
	ТБК-АП	КБсп.	КБинд	СОД	КТ	ГПО	ГТ
ИЛ-1 β	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
ИЛ-6	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,95* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
ИФН- γ	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,95* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
ФНО- α	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,95* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001

Примечание: коэффициент Пирсона $r < 0,3$ - слабая корреляция, $0,31-0,7$ – корреляция средней силы; $r > 0,71^*$ - сильная корреляция ($p < 0,05$)

Таблица 10 – Результаты корреляционного анализа между показателями оксидантно-антиоксидантного и иммунного гомеостаза у мышей с экспериментальным иммунодефицитом

Показатели иммунного гомеостаза	Показатели оксидантно-антиоксидантной системы						
	ТБК-АП	КБсп.	КБинд	СОД	КТ	ГПО	ГТ
1	2	3	4	5	6	7	8
ФЧ	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p<0,001	r= -0,17 p=0,595
ФИ	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=-0,16 p=0,619
ИФИ	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=-0,15 p=0,645
НСТ-СП	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=-0,17 p=0,588
НСТ-ИН	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=-0,19 p=0,547
СЦК-СП	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=-0,12 p=0,714

Продолжение таблицы 10							
1	2	3	4	5	6	7	8
СЦК-ИН	r=0,99* p< 0,001	r=-0,14 p=0,670					
ИС	r=0,99* p< 0,001	r=-0,13 p=0,682					
IgG	r=0,99* p< 0,001	r=-0,12 p=0,714					
C1q-IgG	r=0,99* p< 0,001	r=-0,15 p=0,643					

Примечание: коэффициент Пирсона $r < 0,3$ - слабая корреляция, $0,31-0,7$ – корреляция средней силы; $r > 0,71^*$ - сильная корреляция ($p < 0,05$)

Таблица 11 – Результаты корреляционного анализа между показателями оксидантно-антиоксидантного гомеостаза и продукции цитокинов у мышей с экспериментальным иммунодефицитом

Показатели синтеза цитокинов	Показатели оксидантно-антиоксидантной системы						
	ТБК-АП	КБсп.	КБинд	СОД	КТ	ГПО	ГТ
ИЛ-1 β	r=0,99* p< 0,001	r= 0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=-0,15 p=0,643
ИЛ-6	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=-0,17 p=0,605
ИФН- γ	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,98* p< 0,001	r=-0,17 p=0,590
ФНО- α	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99 p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=-0,16 p=0,607

Примечание: коэффициент Пирсона $r < 0,3$ - слабая корреляция, 0,31-0,7 – корреляция средней силы; $r > 0,71^*$ - сильная корреляция ($p < 0,05$)

Таблица 12 – Результаты корреляционного анализа между показателями оксидантно-антиоксидантного и иммунного гомеостаза у мышей с иммунодефицитом после введения глюконата марганца

Показатели иммунного гомеостаза	Показатели оксидантно-антиоксидантной системы						
	ТБК-АП	КБсп.	КБинд	СОД	КТ	ГПО	ГТ
1	2	3	4	5	6	7	8
ФЧ	r=0,42 p=0,173	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,13 p=0,699
ФИ	r=0,39 p=0,673	r=0,99* p< 0,001	r= 0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,14 p=0,619
ИФИ	r=0,43 p=0,159	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,13 p=0,685
НСТ-СП	r=0,41 p=0,181	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,14 p=0,668
НСТ-ИН	r=0,39 p=0,208	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,15 p=0,645
СЦК-СП	r=0,40 p=0,200	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,13 p=0,684

Продолжение таблицы 12							
1	2	3	4	5	6	7	8
СЦК-ИН	r=0,41 p=0,191	r=0,99* p< 0,001	r=0,13 p=0,688				
ИС	r=0,45 p=0,144	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,98* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,10 p=0,747
IgG	r=0,43 p=0,161	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,98* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=-0,14 p=0,668
C1q-IgG	r=0,42 p=0,172	r=0,99* p< 0,001	r=0,13 p=0,679				

Примечание: коэффициент Пирсона $r < 0,3$ - слабая корреляция, $0,31-0,7$ – корреляция средней силы; $r > 0,71^*$ - сильная корреляция ($p < 0,05$)

Таблица 13 – Результаты корреляционного анализа между показателями оксидантно-антиоксидантного гомеостаза и продукции цитокинов у мышей с иммунодефицитом после введения глюконата марганца

Показатели синтеза цитокинов	Показатели оксидантно-антиоксидантной системы						
	ТБК-АП	КБсп.	КБинд	СОД	КТ	ГПО	ГТ
ИЛ-1 β	r=0,42 p=0,169	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,13 p=0,677
ИЛ-6	r=0,42 p=0,199	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,14 p=0,671
ИФН- γ	r=0,38 p=0,220	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r= 0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,15 p=0,651
ФНО- α	r=0,40 p=0,200	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r= 0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,13 p=0,678

Примечание: коэффициент Пирсона $r < 0,3$ - слабая корреляция, 0,31-0,7 – корреляция средней силы; $r > 0,71^*$ - сильная корреляция ($p < 0,05$)

Таблица 14 – Результаты корреляционного анализа между показателями оксидантно-антиоксидантного и иммунного гомеостаза у мышей с иммунодефицитом после введения глюконата железа

Показатели иммунного гомеостаза	Показатели оксидантно-антиоксидантной системы						
	ТБК-АП	КБсп.	КБинд	СОД	КТ	ГПО	ГТ
1	2	3	4	5	6	7	8
ФЧ	r=-0,15 p=0,632	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=-0,50 p=0,097
ФИ	r=-0,13 p=0,694	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=-0,48 p=0,117
ИФИ	r=-0,13 p=0,683	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=-0,48 p=0,111
НСТ-СП	r=-0,09 p=0,767	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=-0,47 p=0,123
НСТ-ИН	r=-0,13 p=0,693	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=-0,48 p=0,118
СЦК-СП	r=-0,08 p=0,794	r=0,99* p< 0,001	r= 0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=-0,44 p=0,153

Продолжение таблицы 14							
1	2	3	4	5	6	7	8
СЦК-ИН	r=-0,07 p=0,818	r=0,99* p< 0,001	r=-0,43 p=0,164				
ИС	r=-0,13 p=0,681	r=0,99* p< 0,001	r=-0,49 p=0,105				
IgG	r=-0,13 p=0,691	r=0,99* p< 0,001	r=-0,47 p=0,127				
C1q-IgG	r=-0,15 p=0,652	r=0,99* p< 0,001	r=-0,49 p=0,108				

Примечание: коэффициент Пирсона $r < 0,3$ - слабая корреляция, $0,31-0,7$ – корреляция средней силы; $r > 0,71^*$ - сильная корреляция ($p < 0,05$)

Таблица 15 – Результаты корреляционного анализа между показателями оксидантно-антиоксидантного гомеостаза и продукции цитокинов у мышей с иммунодефицитом после введения глюконата железа

Показатели синтеза цитокинов	Показатели оксидантно-антиоксидантной системы						
	ТБК-АП	КБсп.	КБинд	СОД	КТ	ГПО	ГТ
ИЛ-1 β	r=-0,14 p=0,670	r=0,99* p< 0,001	r=-0,48 p=0,109				
ИЛ-6	r=-0,13 p=0,682	r=0,99* p< 0,001	r=-0,48 p=0,116				
ИФН- γ	r=-0,15 p=0,631	r=0,99* p< 0,001	r=-0,50 p=0,095				
ФНО- α	r=-0,12 p=0,116	r=0,99* p< 0,001	r=-0,48 p=0,712				

Примечание: коэффициент Пирсона $r < 0,3$ - слабая корреляция, $0,31-0,7$ – корреляция средней силы; $r > 0,71^*$ - сильная корреляция ($p < 0,05$)

Таблица 16 – Результаты корреляционного анализа между показателями оксидантно-антиоксидантного и иммунного гомеостаза у мышей с иммунодефицитом после введения глюконата кобальта

Показатели иммунного гомеостаза	Показатели оксидантно-антиоксидантной системы						
	ТБК-АП	КБсп.	КБинд	СОД	КТ	ГПО	ГТ
1	2	3	4	5	6	7	8
ФЧ	r=-0,26 p=0,407	r=0,10 p=0,759	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r= 0,99* p< 0,001
ФИ	r=-0,26 p=0,415	r=0,09 p=0,767	r=0,98* p< 0,001	r=0,97* p< 0,001	r=0,98* p< 0,001	r=0,98* p< 0,001	r=0,98* p< 0,001
ИФИ	r=-0,25 p=0,425	r=0,11 p=0,743	r=0,99* p< 0,001				
НСТ-СП	r=-0,28 p=0,362	r=0,11 p=0,738	r=0,99* p< 0,001				
НСТ-ИН	r=-0,27 p=0,395	r=0,11 p=0,742	r=0,99* p< 0,001				
СЦК-СП	r=-0,33 p=0,302	r=0,06 p=0,864	r=0,99* p< 0,001				

Продолжение таблицы 16							
1	2	3	4	5	6	7	8
СЦК-ИН	r=-0,31 p=0,331	r=0,10 p=0,761	r=0,99* p< 0,001				
ИС	r=-0,27 p=0,404	r=0,10 p=0,753	r=0,99* p< 0,001				
IgG	r=-0,25 p=0,428	r=0,10 p=0,754	r=0,99* p< 0,001				
C1q-IgG	r=-0,25 p=0,428	r=0,10 p=0,747	r=0,99* p< 0,001				

Примечание: коэффициент Пирсона $r < 0,3$ - слабая корреляция, $0,31-0,7$ – корреляция средней силы; $r > 0,71^*$ - сильная корреляция ($p < 0,05$)

Таблица 17 – Результаты корреляционного анализа между показателями оксидантно-антиоксидантного гомеостаза и продукции цитокинов у мышей с иммунодефицитом после введения глюконата кобальта

Показатели синтеза цитокинов	Показатели оксидантно-антиоксидантной системы						
	ТБК-АП	КБсп.	КБинд	СОД	КТ	ГПО	ГТ
ИЛ-1 β	r=-0,26 p=0,414	r=0,10 p=0,749	r=0,99* p< 0,001				
ИЛ-6	r=-0,26 p=0,406	r=0,11 p=0,740	r=0,99* p< 0,001				
ИФН- γ	r=-0,33 p=0,287	r=0,11 p=0,735	r=0,99* p< 0,001				
ФНО- α	r=-0,27 p=0,392	r=0,11 p=0,740	r=0,99* p< 0,001				

Примечание: коэффициент Пирсона $r < 0,3$ - слабая корреляция, $0,31-0,7$ – корреляция средней силы; $r > 0,71^*$ - сильная корреляция ($p < 0,05$)

Таблица 18 – Результаты корреляционного анализа между показателями оксидантно-антиоксидантного и иммунного гомеостаза у мышей с иммунодефицитом после введения глюконата меди

Показатели иммунного гомеостаза	Показатели оксидантно-антиоксидантной системы						
	ТБК-АП	КБсп.	КБинд	СОД	КТ	ГПО	ГТ
1	2	3	4	5	6	7	8
ФЧ	r=0,98* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
ФИ	r=0,98* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
ИФИ	r=0,98* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
НСТ-СП	r=0,98* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
НСТ-ИН	r=0,98* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
СЦК-СП	r=0,96* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001

Продолжение таблицы 18							
1	2	3	4	5	6	7	8
СЦК-ИН	r=0,98* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001					
ИС	r=0,98* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001					
IgG	r=0,98* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001					
C1q-IgG	r=0,98* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001					

Примечание: коэффициент Пирсона $r < 0,3$ - слабая корреляция, $0,31-0,7$ – корреляция средней силы; $r > 0,71^*$ - сильная корреляция ($p < 0,05$)

Таблица 19 – Результаты корреляционного анализа между показателями оксидантно-антиоксидантного гомостаза и продукции цитокинов у мышей с иммунодефицитом после введения глюконата меди

Показатели синтеза цитокинов	Показатели оксидантно-антиоксидантной системы						
	ТБК-АП	КБсп.	КБинд	СОД	КТ	ГПО	ГТ
ИЛ-1 β	r=0,97* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
ИЛ-6	r=0,97* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
ИФН- γ	r=0,98* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
ФНО- α	r=0,98* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001

Примечание: коэффициент Пирсона $r < 0,3$ - слабая корреляция, 0,31-0,7 – корреляция средней силы; $r > 0,71^*$ - сильная корреляция ($p < 0,05$)

Таблица 20 – Результаты корреляционного анализа между показателями оксидантно-антиоксидантного и иммунного гомеостаза у мышей с иммунодефицитом после введения глюконата цинка

Показатели иммунного гомеостаза	Показатели оксидантно-антиоксидантной системы						
	ТБК-АП	КБсп.	КБинд	СОД	КТ	ГПО	ГТ
1	2	3	4	5	6	7	8
ФЧ	r=-0,01 p=0,966	r=0,99* p< 0,001	r=0,95* p< 0,001				
ФИ	r=0,08 p=0,979	r=0,99* p< 0,001					
ИФИ	r=0,01 p=0,973	r=0,99* p< 0,001					
НСТ-СП	r=0,01 p=0,972	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r= 0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99 p< 0,001	r= 0,99* p< 0,001
НСТ-ИН	r=0,01 p=0,988	r= 0,99* p< 0,001	r=0,85* p< 0,001				
СЦК-СП	r=0,02 p=0,960	r=0,99* p< 0,001	r= 0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r= 0,99* p< 0,001

Продолжение таблицы 20							
1	2	3	4	5	6	7	8
СЦК-ИН	r=0,02 p=0,962	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r= 0,99* p< 0,001	r= 0,99* p< 0,001	r= 0,99* p< 0,001	r= 0,99* p< 0,001
ИС	r=-0,01 p=0,970	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
IgG	r=-0,01 p=0,969	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001	r=0,99* p< 0,001
C1q-IgG	r=-0,05 p=0,866	r=0,98* p< 0,001	r=0,98* p< 0,001	r=0,97* p< 0,001	r=0,98* p< 0,001	r=0,98* p< 0,001	r=0,98* p< 0,001

Примечание: коэффициент Пирсона $r < 0,3$ - слабая корреляция, $0,31-0,7$ – корреляция средней силы; $r > 0,71^*$ - сильная корреляция ($p < 0,05$)

Таблица 21 – Результаты корреляционного анализа между показателями оксидантно-антиоксидантного гомеостаза и продукции цитокинов у мышей с иммунодефицитом после введения глюконата цинка

Показатели синтеза цитокинов	Показатели оксидантно-антиоксидантной системы						
	ТБК-АП	КБсп.	КБинд	СОД	КТ	ГПО	ГТ
ИЛ-1 β	r=-0,01 p=0,985	r=0,99* p< 0,001					
ИЛ-6	r=-0,01 p=0,992	r=0,99* p< 0,001					
ИФН- γ	r=-0,20 p=0,529	r=-0,39 p=0,212	r=-0,39 p=0,206	r=-0,40 p=0,197	r=-0,40 p=0,202	r=-0,39 p=0,207	r=-0,39 p=0,206
ФНО- α	r=0,01 p=0,976	r=0,99* p< 0,001					

Примечание: коэффициент Пирсона $r < 0,3$ - слабая корреляция, $0,31-0,7$ – корреляция средней силы; $r > 0,71^*$ - сильная корреляция ($p < 0,05$)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование физиологического действия комплексов ионов 3d-металлов с глюконовой кислотой, их участия в процессах жизнедеятельности, а также возможностей применения в медицине, является одним из приоритетных направлений развития современной биохимии.

Удобной платформой для исследования участия таких соединений в защитных системах организма является модель экспериментального иммунодефицита, полученная на мышах с использованием введения цитостатика циклофосфана (циклофосфамида), поскольку круг заболеваний, обусловленных дисфункцией окислительного и иммунного гомеостаза, требующих корректирующей терапии, неуклонно растет. Рост неблагоприятных экологических факторов, стрессовых ситуаций, применение цитостатиков и антибиотиков способствуют нарушению окислительного и иммунного гомеостаза организма. Все это также обуславливает потребность в исследовании соединений, которые могут оказывать корректирующее действие на метаболические изменения в различных системах организма.

К настоящему времени, несмотря на актуальность, исследование биохимических основ их действия в литературе отражены недостаточно.

Практически не изучено действие комплексов 3d-металлов с глюконовой кислотой (лигандом, увеличивающим биодоступность и снижающим токсичность этих металлов), при иммунодефицитном состоянии, а также остаются не выясненными многие аспекты биохимических механизмов их действия.

Взаимодействие металлов с лигандами на фоне изменения степени окисления (валентности) металлов сопровождается заметными изменениями стереохимии комплексов, что влияет на их химические, физические и биологические свойства. Координационные соединения, в состав которых входят d-элементы, либо электронейтральны либо заряжены, поскольку распределение заряда на комплексоне происходит по всему иону, при этом общий заряд складывается из суммы зарядов составляющих элементов.

В отличие от репрезентативных элементов, 3d-металлы способны образовывать большое количество координационных комплексов. Ионы переходных металлов связываются с рядом анионов или нейтральных молекул в этих комплексах, например: $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-}$, $(\text{Co}(\text{NH}_3)_6)^{3+}$, $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{4-}$ и т.д. (Syrovaya A.O. et al., 2017).

Высокая склонность ионов переходных металлов к образованию комплексов обусловлена небольшими размерами атомов и ионов, высоким зарядом ядер, наличием свободных d-орбиталей и энергии для приема одиночных пар электронов, от других групп (лигандов).

В частности, ионы меди и железа участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, задействованы в ферментах тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, то есть основном энергетическом процессе живых клеток.

Ионы марганца оказывают большое влияние на минеральный обмен, способствуя ассимиляции фосфора и кальция. Кроме того, они обладают инсулиноподобным эффектом, снижая содержание глюкозы в крови и стимулируя синтез гликогена. Входят в состав некоторых ферментов, увеличивают скорость фагоцитоза, участвуют в синтезе гормонов паращитовидной железы.

Ионы кобальта стимулируют обмен веществ, метаболизм аскорбиновой кислоты, синтез никотиновой кислоты (витамина РР) и особенно цианокобаламина (витамина В₁₂), который играет важную роль в гемопоэзе и других процессах.

Ионы цинка являются кофакторами более чем 300 ферментов, активируют около 200 ферментных систем (Колесниченко Л.С., 2018). Ведущая роль цинка в регуляции ферментативной активности разнообразных процессов метаболизма позволила даже назвать его главным «неорганическим гормоном».

Все эти 3d-металлы необходимы для оптимальной работы иммунной системы, и дефицит любого из них приводит к повышенной восприимчивости бактериальной инфекции.

Целью диссертационной работы явилось оценить биологические эффекты синтезированных глюконатов 3d-металлов (Mn(II), Fe(II), Co(II), Cu(II), Zn(II)) на окислительный и иммунный гомеостаз у мышей с экспериментальным иммунодефицитом в сравнении с эффектами иммуностимулирующего препарата «Ликопид» и / или глюконата кальция на фоне иммунодефицита.

Были исследованы биохимические эффекты глюконатов 3d-металлов на основные показатели окислительно-антиоксидантного гомеостаза в печени иммунодефицитных мышей (Князева О.А. и др., 2018).

Для характеристики состояния ПОЛ в гомогенате печени определяли вторичные продукты свободнорадикального каскада – ТБК-активные соединения, антиоксидантной системы защиты от свободно-радикального окисления – активность основных антиокислительных ферментов: супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы.

При анализе полученных результатов было показано, что при экспериментальном иммунодефиците, вызванном введением цитостатика циклофосфамида, в печени мышей происходит значительная активация процессов ПОЛ при одновременном снижении активности антиоксидантных ферментов.

Известно, что усиление окислительных процессов при недостаточности системы антиоксидантной защиты вызывает «окислительный стресс», являющийся одним из основных механизмов повреждения не только липидов, но и окислительной модификации белков, что мы и наблюдали.

Двухнедельное пероральное введение глюконатов 3d-металлов оказывало позитивное влияние на показатели окислительно-антиоксидантного гомеостаза у иммунодефицитных мышей.

Одна из главных ролей в регуляции процессов ПОЛ отводится антиоксидантным ферментам, из которых ключевыми являются СОД, КТ, ГПО и ГТ. СОД, как известно, катализирует реакцию образования перекиси водорода с молекулярным кислородом в результате взаимодействия двух супероксид-анионов. Образующийся пероксид водорода используется фагоцитирующими

клетками для синтеза гипогалоидов, которые оказывают бактерицидное действие, или с участием ферментов КТ и ГПО разлагают его с образованием воды и молекулярного кислорода, или в известной реакции Фентона (в присутствии свободных ионов Fe^{+2}) превращают его в самую реактивную форму кислорода – гидроксильный радикал.

Было показано, что активность ферментов антиоксидантной системы под действием терапии 3dMeGl изменялась различным образом: под действием ZnGl активность СОД возрастала на 16%, под действием других глюконатов, напротив, снижалась, или оставалась неизменной (CuGl). Активность КТ возрастала под действием ZnGl и CuGl примерно на 55 и 62%, а после применения MnGl и CoGl ~ на 8%. Возрастание активности ГПО происходило после введения всех 3dMeGl. При этом, наибольшее (60-62%) – под действием CuGl и FeGl. Затем в порядке уменьшения: 50% - ZnGl, 32% - CoGl и около 17% - MnGl. Активность ГТ возрастала на 66-69% под действием CuGl и ZnGl, на 57% - под действием CoGl, не менялась после введения MnGl и снижалась под действием FeGl.

Т.е., по результатам данного исследования наиболее перспективными в поддержании окислительного гомеостаза представлялись ZnGl и CuGl.

В системе сохранения окислительного гомеостаза – поддержания прооксидантно-антиоксидантного равновесия, являющегося важным звеном общего гомеостаза, ведущую роль играют фагоциты, способные генерировать АФК. Между их активацией и интенсификацией ПОЛ имеется тесная взаимосвязь, поскольку активация фагоцитоза, сопровождается усилением образования АФК, приводящих к росту процессов ПОЛ. В то же время от концентрации АФК и ТБК-АП напрямую зависит активность антиоксидантных ферментов.

Поглотительную активность фагоцитов крови иммунодефицитных мышей до и после введения глюконатов 3d-металлов оценивали по фагоцитарному числу, фагоцитарному и интегральному фагоцитарному индексу. Метаболическую активность характеризовали по показателям НСТ в спонтанном и

индуцированном тестах, показателям среднего цитохимического коэффициента, как в спонтанном, так и индуцированном тестах, а также индексу стимуляции.

Одновременно в сыворотке крови определяли биологические эффекты исследуемых глюконатов 3d-металлов на продукцию IgG и способность их к взаимодействию с субкомпонентом первого фактора комплемента C1q по содержанию комплексов C1q-IgG.

Показано, что у мышей после введения цитостатика циклофосфида происходит снижение показателей поглотительной и метаболической активности фагоцитов: ФЧ – на 57,4%, ФИ – на 23,8%, ИФИ – на 67,6%, НСТ – на 34,6% (в спонтанном тесте) и на 29,6% (в индуцированном); также снижались показатели цитохимических коэффициентов – на 35,5% (в спонтанном тесте) и на 25,7% (в индуцированном). При этом ИС понижался на 45,8%, содержание IgG – на 53%, комплексов C1q-IgG – на 31,5%.

Введение глюконатов 3d-металлов приводило к значимой, сопоставимой с действием ликопида активации фагоцитоза, проявлявшейся в увеличении показателей поглотительной и метаболической активности фагоцитов: ФЧ от 18,5% (FeGl) до 37% (MnGl); ФИ от 6,5% (CuGl) до 19,3% (MnGl); ИФИ от 13,5% (FeGl) до 43,3% (MnGl); НСТ–СП от 7,7% (FeGl) до 28,2% (MnGl); НСТ–ИН (%) от 11,9% (CoGl) до 23% (MnGl и CuGl); СЦК–СП от 35,5% (FeGl и CuGl) до 45,2% (CoGl); СЦК–ИН от 15,7% (FeGl) до 22,8% (MnGl); ИС от 29,1% (FeGl и CoGl) до 41,6% (CuGl) относительно показателей у мышей с иммунодефицитом без лечения. Повышение уровня IgG происходило от 17% (MnGl) до 31% (ZnGl), а комплексов C1q-IgG на 25% (MnGl) и 28,5 (ZnGl).

Полученные результаты свидетельствуют о иммунокорригирующих свойствах глюконатов 3d-металлов, восстанавливающих поглотительную и метаболическую активность фагоцитов, а также увеличивающих продукцию антител и их способность к взаимодействию с C1q, с которого начинается активация классического пути комплемента.

В следующей серии исследований была проведена оценка влияния

глюконатов 3d-металлов на продукцию цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИФН- γ , ФНО- α) - медиаторов иммунной системы, являющихся связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом.

Наибольшее повышение продукции цитокинов в сыворотке крови мышей наблюдалось после введения иммунодефицитным мышам ZnGl, что указывает на его значительную роль в активации иммунной системы. Сопоставление полученных результатов с литературными данными о роли нуклеарного фактора NF- κ B, контролирующего экспрессию цитокинов и активирующегося при поступлении в ядро ионов цинка, позволило сделать предположение об иммуномодулирующих свойствах глюконата цинка за счет активации транскрипционного фактора NF- κ B, приводящего к росту продукции цитокинов, контролирующей синтез антител (Кунцевич Н.В., 2010).

Значимое влияние других глюконатов 3d-металлов на увеличение уровня цитокинов в сыворотке крови иммунодефицитных мышей указывает также и на их важную роль в активации синтеза этих медиаторов иммунного гомеостаза.

В серии экспериментов по исследованию механизмов иммуномодулирующего действия глюконатов 3d-металлов с помощью разработанной нами методики было показано, что глюконаты кобальта и марганца оказывают активирующее действие на взаимодействие C1q с комплексом антиген-антитело, глюконаты железа и меди – ингибирующее, и глюконат цинка – нейтральное, что указывает на различные механизмы воздействия исследуемых соединений на белок-белковые взаимодействия, которые, возможно, лежат в основе их корригирующих свойств.

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. Введение в организм мышей глюконатов 3d-металлов (кроме CuGl)

приводило также к утрате зависимости от процессов липопероксидации, а после введения CoG1 от показателя окислительной модификации белка КБсп. Восстановление ковалентных 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), либо ингибирование (глюконаты железа и меди) взаимодействия C1q с комплексом рецептор-антитело, а также 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 β , ИЛ-6, ИФН- γ , ФНО- α), 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 оказывать влияние на баланс оксидантно-антиоксидантной системы.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АОЗ – антиоксидантная защита
АОС – антиоксидантная система
АФК/ROS – активные формы кислорода
МДА – малоновый диальдегид
БСА – бычий сывороточный альбумин
ГПО – глутатионпероксидаза
ГТ – глутатионтрансфераза
ДНФГ – динитрофенилгидразин
ЗФР – забуференный физиологический раствор
ЗФРТ – забуференный физиологический раствор с 0,05% твином 20
ИД – иммунодефицит
ИЛ – интерлейкин
ИФН – интерферон
ИС – индекс стимуляции
ИФА – иммуноферментный анализ
ИФИ – интегральный фагоцитарный индекс
КБ – карбонилирование белков
КБинд – карбонилирование белков индуцированное
КБсп – карбонилирование белков спонтанное
КТ – каталаза
НСТ-ИН – нитросиний тетразолий-тест индуцированный
НСТ-СП – нитросиний тетразолий-тест спонтанный
ОМБ – процесс окислительной модификации белка
ОФД – ортофенилендиамин
ПОЛ – процесс перекисного окисления белков
ПХ – пероксидаза хрена
СОД – супероксиддисмутаза

СРО – свободно-радикальное окисление

СЦК ИН – средний цитохимический коэффициент в индуцированном тесте

СЦК СП – средний цитохимический коэффициент в спонтанном тесте

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ТБК-АП – ТБК-активные продукты

ТХУК – трихлоруксусная кислота

ФЭК – фотоэлектроколориметр

ФИ – фагоцитарный индекс

ФНО- α – фактор некроза опухоли α

ФЧ – фагоцитарное число

ЦФ – циклофосфан/циклофосфамид

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

C1q – субкомпонент первого компонента системы комплемента

Ig – иммуноглобулины

IgG– иммуноглобулины класса G

NF- κ B– нуклеарный фактор «каппа-би»

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Активность прооксидантных и антиоксидантных ферментов крови у крыс гипокортикоидными и гиперкортикоидными состояниями / А.И. Сеницкий, М.В. Комелькова, Д.А. Козочкин [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Образование, здравоохранение, физическая культура. – 2014. – Т. 14, № 1. – С. 73-77.
2. Антииммуносупрессивное действие глюконатов 3d-металлов при экспериментальном иммунодефиците / О.А. Князева, С.И. Уразаева, И.Г. Конкина [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Казанский медицинский журнал. – 2018. – № 2. – С. 255-259.
3. Бактыбаева, Л.К. Исследование гемостимулирующей активности соединения бив-30 на модели циклофосфановой миелосупрессии / Л.К. Бактыбаева. – Текст (визуальный) : непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2011. – Т. 74, № 3. – С. 10-12.
4. Барков, С.Ю. Динамика уровня общего белка и альбумина периферической крови крыс при индуцированной иммуносупрессии / С.Ю. Барков. – Текст (визуальный) : непосредственный // Смоленский медицинский альманах – 2017. – № 1. – С. 23-25.
5. Беленький, М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М.Л. Беленький. – 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: Медгиз, 1963. – 146 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.
6. Биоантиоксиданты (часть 1) / С.В. Гудков, В.И. Брусков, А.В. Куликов [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Альманах клинической медицины. – 2014. – № 31. – С. 61-64.
7. Бобиев, Г.М. Препараты на основе иммуноактивного дипептида и его координационных соединений с ионом цинка : специальность 14.04.02: автореф. дис. ... д-ра фарм. наук / Бобиев Гуломкодир Муккамоллович. – М., 2012. – 48 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

8. Борсук, О.С. Доклинические исследования препаратов природного происхождения в условиях цитостатического воздействия / О.С. Борсук, Н.В. Массная, А.А. Чурин. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биомедицина. – 2010. – № 2. – С. 53-64.
9. Виксман, М.Е. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия: Методические рекомендации / М.Е. Виксман, А.Н. Маянский. – Казань: Казанский НИИЭМ, 1979. – 11 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.
10. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю.А. Владимиров. – Текст (визуальный) : непосредственный // Соросовский общеобразовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 12. – С. 13–19.
11. Власова, С.Н. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей / С.Н. Власова, Е.И. Шабунина, И.А. Переслегина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Лабораторное дело. – 1990. – № 8. – С. 19–22.
12. Влияние глюконатов 3d-металлов на активность антиоксидантных ферментов и окислительные процессы *in vivo* при экспериментальном иммунодефиците / О.А. Князева, И.Г. Конкина, А.И. Уразаева, А.В. Князев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Медицинский Вестник Башкортостана. – 2018. – Т. 13, № 4 (76). – С. 48-52.
13. Влияние глюконатов 3d-металлов на поглотительную и метаболическую активность фагоцитов при экспериментальном иммунодефиците / О.А. Князева, С.И. Уразаева, И.Г. Конкина, Ю.И. Муринов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – № 4. – Электрон. дан. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/article/view?id=27852> (Дата обращения : 15.11.2018).
14. Влияние глюконатов переходных металлов на опухолевый рост клеток у мышей BALB/c при стрессорной нагрузке / О.А. Князева, С.И. Уразаева, И.Г. Конкина, С.А. Усачев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Материалы

VI Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы естественных наук – 2012». – Польша: Przemysl « Nauka I studia», 2012. – Т. 36: Медицина. – С. 75-77.

15. 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. – Текст (визуальный) : непосредственный // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2017. – № 3. – С. 84-90.

16. Влияние наночастиц железа на показатели свободнорадикального окисления в крови крыс с лимфосаркомой плисса / П.С. Качесова, А.С. Ефремова, И.В. Макарова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биомедицинская химия. – 2016. – Т. 62, № 5. – С. 555-560.

17. Влияние препарата «Граноцит» на мезенхимальные стволовые клетки костного мозга при моделировании вторичного иммунодефицита с помощью циклофосфана в эксперименте / А.Н. Байков, ИА. Горошинская, В.Б. Бородулин [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюллетень Сибирской медицины. – 2008. – Т. 7, № 3. – С. 5–8.

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

19. Влияние хронической интоксикации хромом и бензолом на антиоксидантный статус крыс / С.В. Тимошинова, А.А. Иванов, А. Манчини [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2004. – № 10. – С. 132-133.

20. Влияние Fe^{2+} на адипокиновую регуляцию и выраженность окислительного стресса / Е.Н. Лебедева, С.И. Красиков, Е.Л. Борщук [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Гигиена и санитария. – 2015. – Т. 94,

№ 4. – С. 48-51.

21. Влияние Mn (II) на ошибочную активность ДНК-полимеразы йота в экстрактах нормальных и опухолевых клеток человека / А.В. Лахин, Н.В. Шарапова, И.В. Михайлова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2013. – №1. – С.14-20.

22. Волыхина, В.Е. Супероксиддисмутазы: структура и свойства / В.Е. Волыхина, Е.В. Шафрановская. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник ВГМУ. – 2009. – Т.8, №4 – С. 6-12.

23. Ганусова, Г.В. Активность цитоплазматических NADP-зависимых дегидрогеназ и содержание цитохромов P-450 и в 5 в печени крыс при введении хлорида кобальта и хлорида ртути / Г.В. Ганусова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Днепропетровского университета. – 2006. – Т. 2, № 14. – С.54-57.

24. Григорьева, А.С. Оптимизация фармакотерапевтической активности биометаллов при комплексообразовании с НПВС / А.С. Григорьева. – Текст (визуальный) : непосредственный // Микроэлементы в медицине. – 2001. – Т. 2, вып. 1. – С. 17-22.

25. Дворецкий, Л.И. Железодефицитные анемии / Л.И. Дворецкий. – Текст (визуальный) : непосредственный // Русский медицинский журнал. – 1997. – Т. 5, № 19. – С. 1234-1242.

26. Действие циклофосфана на фагоцитарную активность мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров / А.Е. Малыкина, Я.Н. Тройнич, О.В. Лебединская, А.П. Годовалов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2012. – № 1. – С. 74.

27. Денисова, О.Ф. Синтез и применение тирозината меди для профилактики анемии у поросят-сосунов : специальность 03.00.04: дис. ... канд. биол. наук / Денисова Ольга Федоровна. – Воронеж, 1992. – 200 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

28. Диланян, Э.Р. Синтез и противоопухолевая активность новых бистиосемикарбазонов метилглиоксаля, глюкозона и их медных комплексов / Э.Р. Диланян, Г.М. Степанян, Т.Р. Овсепян. – Текст (визуальный) : непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 2000. – № 8. – С. 16-19.

29. Динамика изменений уровня цитокинов (TNF α , IFN γ , IL-1 β) и их роль в развитии полимодальных локальных и дистантных эффектов при прогрессирующих формах рака яичника / И.И. Антонеева, Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Цитокины и воспаление. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 43-49.

30. Дубинина, Е.Е. Окислительная модификация белков крови человека. Метод выделения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24-26.

31. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях / Е.Е. Дубинина, А.В. Пустыгина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Украинский биохимический журнал – 2008. – Т.80, № 6. – С. 5– 18.

32. Железозависимый синтез гемолизина Staphylococcus aureus / В.В. Леонов, В.В. Костерина, В.В. Варницына [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 153, № 1. – С. 49-51.

33. Зайцев, В.М. Прикладная медицинская статистика / В.М. Зайцев, В.Г. Лифляндский, В.И., Маринкин. – СПб.: Фолиант, 2006. – 432 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

34. Звездин, В.Н. Токсичность аэрозоля нанодисперсного оксида марганца при ингаляционной экспозиции / В.Н. Звездин, М.А. Землянова, Т.И. Акафьева. – Текст (визуальный) : непосредственный // Медицина труда и промышленная экология. – 2015. – № 12. – С. 13-16.

35. Звенигородская, Л.А. Перекисное окисление липидов и активность липопротеин-ассоциированной фосфолипазы A2 в сыворотке крови у больных неалкогольной жировой болезнью печени / Л.А. Звенигородская, Т.В. Нилова, А.В. Петраков. – Текст (визуальный) : непосредственный // Поликлиника. – 2015. – № 5. – С. 48-52.

36. Зильбер, Л.А. Фагоцитарная теория И.И. Мечникова / Л.А. Зильбер. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вопросы иммунитета: избр. труды. – М.: Изд-во АН СССР, 1951. – 673 с.

37. Зиновьева, В.Н. Свободно-радикальное окисление ДНК и его биомаркер окисленный гуанозин (8-oxodG) / В.Н. Зиновьева, О.В. Островский. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вопросы медицинской химии. – 2002 – Т. 48, №5. – С. 419-431.

38. Иванова, М.Р. Показатели активности супероксиддисмутазы и каталазы у больных вирусными гепатитами В и С / М.Р. Иванова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Известия КБЦ РАН. – 2002. – Т.3, №6. – С. 174-177.

39. Игнатов, А.В. Необъемные повреждения ДНК у человека: пути образования, репарации и репликации / А.В. Игнатов, К.А. Бондаренко, А.В. Макарова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Acta Naturae (русскаяязычная версия). – 2017. – Т. 9, № 3 (34). – С. 13-28.

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

41. Изучение биологического действия наночастиц железа / В.Б. Бородулин, И.А. Горошинская, П.С. Качесова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российские нанотехнологии. – 2015. – Т. 10, № 3-4. – С. 86-93.

42. Иммунодефициты: принципы диагностики и лечения / Н.Х. Сетдикова,

Т.В. Латышева, Б.В. Пинегин, Н.И. Ильина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский аллергологический журнал. – 2006. – Приложение. – 20 с.

43. Иммунологические и иммуногенетические маркеры хронической обструктивной болезни легких в условиях естественного дефицита / Л.М. Карзакова, Н.Д. Ухтерова, Л.В. Борисова, Л.Н. Иванов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Медицинская иммунология. – 2008. – Т. 10, № 6. – С. 513-51

44. 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, № 5. – С. 24-26.

45. Иммуномодулирующее и противоопухолевое действие глюконатов 3d-металлов / О.А. Князева, И.Г. Конкина, А.В. Князев [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Медицинская биохимия и клиническая лабораторная диагностика в аспекте модернизации системы научных исследований: материалы Всероссийской научно-практической конференции биохимиков и специалистов по лабораторной медицине / под ред. проф. В.Е. Высокогорского. – Омск: Изд-во ОмГМА, 2011. – С. 148-153.

46. Иммуномодуляторы эндогенной и экзогенной природы / Е.А. Лебединская, А.П. Годовалой, О.В. Лебединская [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13, № 4-5. – С. 524–525.

47. Иммуносупрессивное действие мезенхимальных стволовых (стромальных) клеток / И.В. Маянская, А.Ю. Гоганова, Н.И. Толкачева [и др.] . – Текст (визуальный) : непосредственный // Иммунология. – 2013. – Т. 34, № 2. – С. 122–128.

48. Интерферон- γ : биологическая функция и значение для диагностики клеточного иммунного ответа / А.А. Луцкий, А.А. Жирков, Д.Ю. Лобзин [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Журнал инфектологии. – 2015. – Т. 7, № 4. – С. 10-22.

49. Исследование окислительного стресса и функции митохондрий в мононуклеарных лейкоцитах крови у больных с хроническим бронхитом и с хронической обструктивной болезнью легких / Э.С. Бельских, О.М. Урясьев, В.И. Звягина, С.В. Фалетрова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Наука молодых. – 2018. – Т. 6, № 2. – С. 203-207.

50. Исследование физико-химических свойств фермента глутатионпероксидазы типа I и его комплексов с полиэлектrolитами как перспективных агентов для лечения заболеваний центральной нервной системы / И.С. Панина, Л.Ю. Филатова, А.В. Кабанов, Н.Л. Клячко. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Московского университета. Сер. 2. Химия. – 2014. – Т. 55, № 3. – С. 153-157.

51. Калетина, Н.И. Микроэлементы – биологические регуляторы / Н.И. Калетина, Г.И. Калетин. – Текст (визуальный) : непосредственный // Наука в России. – 2007. – № 1. – С. 12-19.

52. Калинина, Е.В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов / Е.В. Калинина, Н.Н. Чернов, М.Д. Новичкова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Успехи биологической химии. – 2014. – Т. 54. – С. 299-348.

53. Караулов, А.В. Клиническая иммунология и аллергология: учебное пособие / А.В. Караулов. – М.: Мед. информ. агентство, 2002. – 651 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

54. Карзакова, Л.М. Иммуногенетические исследования популяции здоровых людей и больных инфекционно-воспалительными заболеваниями легких, проживающих в регионе естественного дефицита цинка : специальность 14.00.36 : дис. ...д-ра мед. наук / Карзакова Луиза Михайловна. – М., 2005. – 211 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

55. Князева, О.А. Анализ комплементсвязывающей активности иммуноглобулинов G человека при неопластических процессах / О.А. Князева. – Текст (визуальный) : непосредственный // Медицинский Вестник

Башкортостана. – 2009. – Т. 4, № 6. – С. 44-48.

56. Князева, О. А. Взаимодействие комплемента с иммуноглобулинами G и конформационные изменения компонента C3 при неопластических процессах : специальность 03.00.04, 03.00.02 : дис. ... д-ра биол. наук / Князева Ольга Александровна. – Уфа, 2008. – 288 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

57. 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.

58. 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.

59. Комплементфиксирующая активность иммуноглобулина G в растворах этиленгликоля / С.Ю. Тэтин, К.А. Ефетов, Г.В. Троицкий [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биоорганическая химия. – 1985. – Т. 11, № 8. – С. 1068-1073.

60. Конформационное состояние и антигенные характеристики γ -глобулина человека, модифицированного связыванием катионов меди и цинка / С.Б. Чекнев, Е.А. Денисова, Е.Е. Бабаева [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Иммунология. – 2007. – № 5. – С. 274-280.

61. Коробейникова, Э.Н. Модификация определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой / Э.Н. Коробейникова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Лабораторное дело. – 1989. – № 7. – С. 8-10.

62. Королюк, М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16-17.

63. Костюк, В.А. Биорадикалы и биоантиоксиданты : монография / В.А. Костюк, А.И. Потапович. – Минск: Изд-во БГУ, 2004. – 179 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

64. Костюшов, В.В. Изучение активности ферментов антиоксидантной системы крови при ВИЧ-инфекции / В.В. Костюшов, И.И. Бокал, С.А. Петров. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56, вып. 5. – С. 596-601.

65. Кудрин, А.В. Микроэлементы в иммунологии и онкологии / А.В. Кудрин, О.А. Громова. – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2007. – 544 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

66. Кулинский В.И. Система глутатиона I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биомедицинская химия. – 2009. – Т.55, вып. 3. – С. 255– 277.

67. Кунцевич, Н.В. Роль нуклеарного фактора транскрипции p53 в развитии отторжения трансплантата / Н.В. Кунцевич. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – № 12(1). – С. 72-77.

68. Курхалюк, Н. Модуляторы каналов K-АТР в предотвращении окислительного стресса и улучшение антиоксидантной способности в сердце крысы с различной устойчивостью к гипоксии при обработке кобальтом / Н. Курхалюк, А. Ткаченко. – Текст (визуальный) : непосредственный // Журнал ветеринарных исследований. – 2016. – Т. 60, № 2. – С. 195-206.

69. Лебединская, Е.А. Изменение фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови здоровых доноров под действием циклофосфана / Е.А. Лебединская, Я.Н. Тройнич, А.Е. Малыкина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2011. – Т.35, № 2/2. – С. 36–37.

70. Леонов, В.В. Биопленкообразование оппортунистических

микроорганизмов в плазме крови в зависимости от содержания железа / В.В. Леонов, А.Ю. Миронов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61, № 1. – С. 52-54.

71. Леонов, В.В. Влияние железа на ростовые характеристики условно-патогенных бактерий / В.В. Леонов, Т.Н. Молчанова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Медицинская наука и образование Урала. – 2011. – Т. 12, № 4. – С. 41-43.

72. Лосева, Л.Ф. Индуцированная циклофосфаном иммуносупрессия и ее коррекция иммуномодулятором микробного происхождения : специальность 14.03.09 : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Лосева Любовь Федоровна. – М., 2011. – 26 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

73. Лосева, М.И. Железодефицитные состояния и использование Фенюльса при их лечении / М.И. Лосева, Л.Ю. Зюбина, Л.М. Маслова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Клиническая фармакология и клиническая медицина. – 1999. – № 3. – С. 8-10.

74. Лялина Т.С. Иммуногенные свойства белковых частиц капсулированных в полисахаридную матрицу : специальность 03.01.06 : дис. ... канд. биол. наук / Лялина Татьяна Сергеевна. – М., 2016. – 134 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

75. Маркина, А.А. Комплексное экспериментальное моделирование шоковых состояний / А.А. Маркина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Иммунология. – 2012. – № 5. – С. 250-254.

76. Металлокомплексы цинка и кобальта в восстановительном лечении гипоксических состояний / С.А. Лебедева, З.Х. Бабаниязова, И.А. Радионов, А.А. Скальный. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник восстановительной медицины. – 2013. – № 2. – С. 67-69.

77. Мирзаахмедова, К. Т. Влияние иммуномодулина и соединений фитина на показатели перекисного окисления липидов при экспериментальном токсическом гепатите / К.Т. Мирзаахмедова, А.А. Абдусаматов, А.Н. Набиев. –

Текст (визуальный) : непосредственный // Сибирский медицинский журнал. – 2009. – Т. 88, № 5. – С. 122-123.

78. Миронов, А.Ю. Железо, вирулентность и межмикробные взаимодействия условно-патогенных микробов / А.Ю. Миронов, В.В. Леонов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Успехи современной биологии. – 2016. – Т. 136, № 3. – С. 285-294.

79. Морфологические основы патологии / Н.К. Ахматова, М.И. Ахметова, Г.В. Белов [и др.]. – Новосибирск, 2015. – С. 83-92. – Текст (визуальный) : непосредственный.

80. Московцев, С. И. Антимикробная активность комплексов цинка, меди, кобальта и марганца с производным нитроимидазола и их влияние на течение инфекционного процесса : специальность 03.00.07: автореф. дис. ...канд. мед. наук / Московцев Сергей Иванович. – Саратов, 2004. – 22 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

81. Нагоев, Б.С. Состояние некоторых показателей прооксидантной и антиоксидантной систем крови у больных острой дизентерией / Б.С. Нагоев, М.Ю. Маржохова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2004. – №1. – С. 39-41.

82. Накопление тяжелых металлов в печени крыс в процессе хронической интоксикации медно-цинковой колчеданной рудой / Л.М. Саптарова, Ф.Х. Камилов, О.А. Князева, Э.Н. Когина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Башкирского университета. – 2017. – Т. 22, № 1. – С. 90-91. DOI: 10.17750/KMJ2015-070.

83. Насонов, Е.Л. Роль интерлейкина 1 в развитии заболеваний человека / Е.Л. Насонов, М.С. Елисеев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Научно-практическая ревматология. – 2016. – Т. 54, № 1. – С. 60-77.

84. Нейроанатомические основы травматической комы : клинические и магнитно-резонансные корреляты / А.А. Потапов, Н.Е. Захарова, В.Н. Корниенко, И.Н. Пронин. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вопросы

нейрохирургии. – 2014. – № 1. – С. 4-13.

85. Нейропептиды, цитокины и тимические пептиды как эффекторы взаимодействия тимуса и нейроэндокринной системы / Т.И. Торховская, О.В. Белова, И.В. Зимина [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2015. – Т. 70, № 6. – С. 727–733.

86. Новиков, В.Е. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция / В.Е. Новиков, О.С. Левченкова, Е.В. Пожилова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. – Т.4, № 13. – С. 13-20.

87. Новикова, И.А. Вторичные иммунодефициты: клинико–лабораторная диагностика / И.А. Новикова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Проблема здоровья и экологии. – 2009. – № 1 (19) – С. 29-34.

88. Новикова, И.А. Железо и иммунный ответ (лекция) / И.А. Новикова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Проблемы здоровья и экологии. – 2012. – №4 (30). – С. 42-48.

89. Новые гепатопротективные и противовоспалительные препараты пелоидов / А.С. Саратиков, В.Н. Буркова, А.И. Венгеровский, Е.А. Кураколова. – Томск : Изд-во ТГУ, 2004. – 178 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

90. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л.Е. Муравлева, В.Б. Молотов-Лучанский, Д.А. Клюев [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2010. – № 1. – С. 74-78.

91. Окислительная модификация белков плазмы крови больных психическими расстройствами (депрессия, деперсонализация) / Е.Е. Дубинина, М.Г. Морозова, Н.В. Леонова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вопросы медицинской химии. – 2000. – Т. 46, №4. – С. 398 – 409.

92. Окислительная модификация белков тимуса крыс под влиянием меди в ультрадисперсной форме / Ю.В. Абаленихина, М.А. Фомина, Г.И. Чурилов [и

др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Фундаментальные исследования*. – 2012. – № 11 (часть 6). – С. 1315-1319.

93. Особенности свободнорадикального окисления липидов и белков плазмы крови при дентальной имплантации и периимплантите / Д.В. Плюхин, В.Э. Цейликман, О.Б. Цейликман, А.И. Сеницкий. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Казанский медицинский журнал*. – 2015. – Т. 96, № 5. – С. 756-759.

94. Особенности цитокинового спектра крови у больных с базалиомами кожи: патогенетические и клинические аспекты / Л.В. Кузякина, Е.С. Снарская, А.Е. Дорофеев [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Цитокины и воспаление*. – 2006. – Т. 5, № 3. – С. 21-26.

95. Патент № 2669342 Российская Федерация, МПК G01N 33/53(2006.01). Способ определения влияния препаратов на взаимодействие комплекса с комплексом антиген-антитело : №2017120208, 2017.06.07 : заявл. 2017.06.07 : опубл. 10.10.18 / Князева О.А., Саптарова Л.М., Газдалиева Л.М., Уразаева С.И. – Бюл. 28. – Текст (визуальный) : непосредственный.

96. Патент № 2393480 Российская Федерация, МПК G01N33/53, G01N33/48. Способ оценки постмедикаментозного иммунодефицита : №2008132621/15 : заявл. 07.08.2008 : опубл. 27.06.2010 / Ю.М. Гринзайд, Н.И. Демешко, Л.А. Пигунова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный.

97. Пожилова, Е.В. Активные формы кислорода в физиологии и патологии клетки / Е.В. Пожилова, В.Е. Новиков, О.С. Левченкова. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. – 2015. – Т. 2, № 14. – С. 13-22.

98. Проскурнина Е.В. Свободные радикалы как участники регуляторных и патологических процессов / Е.В. Проскурнина, Ю.А. Владимиров. – Текст (визуальный) : непосредственный // *Фундаментальные науки – медицине. Биофизические медицинские технологии: сб. науч. ст.* – М.: МАКС Пресс, 2015. – Т.1. – С. 38-71.

99. Регистр лекарственных средств России (РЛС) / разработ.: Г.Л. Вышковский; гл. ред. Ю.Ф. Крылов. – М.: РЛС, 2000. – 1518 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

100. Роль церулоплазмина при развитии неопластических процессов / Т.П. Вавилова, Ю.Н. Гусарова, О.В. Королева, А.Е. Медведев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, вып. 3. – С. 263–275.

101. Рыдловская, А.В. Функциональный полиморфизм гена TNF α и патология / А.В. Рыдловская, А.С. Симбирцев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 4-10.

102. Сабанчиева, Ж.Х., Клинико-прогностическое значение оценки функционально-метаболической активности лейкоцитов, средне-молекулярных пептидов, системы про-антиоксидантной защиты крови у больных ВИЧ-инфекцией : специальность 14.00.10: автореф. дис. ...д-ра мед. наук / Сабанчиева Жанет Хусейновна. – М., 2007. – 40 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

103. Семенова, И.Б. Бактериальные экзотоксины и анатоксины как антигеннеспецифические иммуномодуляторы / И.Б. Семенова, А.К. Акатов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1991. – № 12. – С. 69 – 73.

104. Семочкин, С.В. Клиническая эффективность применения препарата Тотема в лечении железодефицитных состояний у взрослых / С.В. Семочкин. – Текст (визуальный) : непосредственный // Поликлиника. – 2013. – № 43. – С. 14-18.

105. Синтез и свойства глюконатов марганца(II) и меди(II). Физические методы исследования / И.Г. Конкина, С.П. Иванов, Ю.И. Муринов [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Журнал неорганической химии. – 2003. – Т. 48, № 6. – С. 979-983.

106. Системная эндотоксинемия как патогенетический фактор осложнения беременности / А.Р. Мавзютов, К.Р. Бондаренко, А.Н. Еникеев, В.М.

Бондаренко. – Текст (визуальный) : непосредственный // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2012. – № 5. – С. 16-21.

107. Скальная, М.Г. Микроэлементы: биологическая роль и значение для медицинской практики. Сообщение 1. Медь / М.Г. Скальная, А.В. Скальный. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2015. – № 1. – С. 15-31.

108. Слесарев, В.И. Химия: Основы химии живого / В.И. Слесарев. – М.: Химиздат, 2000. – 768 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

109. Созарукова, М.М. Сывороточный альбумин как источник и мишень свободных радикалов в патологии / М.М. Созарукова, Е.В. Проскурнина, Ю.А. Владимиров. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2016. – №1. – С. 61-67.

110. 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. – 2018. – Т. 6, № 4. – С. 548-560.

111. Уразаева, А.И. Влияние эфирных масел на метаболические изменения в эритроцитах у мышей с привитой миеломой / А.И. Уразаева, О.А. Князева, Э.Ф. Аглетдинов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Фармация. – 2014. – № 1. – С. 42-44.

112. Уразаева, А.И. Влияние эфирных масел *Lavandula vera* и *Salvia sclarea* в режиме ароматерапии на окислительную модификацию белков в плазме крови и печени BALB/c с привитой миеломой Sp 2/0 Ag14 на фоне стрессорной нагрузки / А.И. Уразаева, О.А.Князева, Э.Ф.Аглетдинов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Медицинский вестник Башкортостана. – 2014. – Т.9, №4. – С.49-51.

113. Уразаева, А.И. Механизмы влияния эфирных масел (*Lavandula Vera*, *Salvia Sclarea* и *Eucalyptus Globulus*) на рост и развитие мышинной миеломы Sp 2/0 Ag14

на фоне хронического стресса : специальность 14.03.03: дис. ... канд. мед. наук / Уразаева Альбина Ильясовна. – Уфа, 2015. – 147 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

114. 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.

115. Учение об инфекции: учебное пособие / А.А. Воробьев, А.Ю. Миронов, Ю.В. Несвижский, Д.Н. Нечаев; под ред. акад. РАМН А.А. Воробьева. – М.: Изд. дом «Русский врач», 2000. – 82 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

116. 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.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – Т. 36, № 1. – С. 18-21.

117. Фомина, М.А. Влияние аргинина на активность и компартиментализацию лизосомальных цистеиновых протеиназ паренхиматозных органов при оксидативном стрессе на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии / М.А. Фомина, А.А. Терентьев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2018. – Т. 26, № 2. – С. 195-212.

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

119. Хейхоу, Ф.Г.Дж. Гематологическая цитохимия / Ф.Г.Дж. Хейхоу, Д. Кваглино; под ред. Н.С. Кисляк. – М.: Медицина, 1983. – 319 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

120. Цитокины: каталог / Группа компаний «БиоХимМак». – 2007. – Т.1. – . – Текст (визуальный) : электронный. – URL: <https://biochemmask.ru>

/upload/uf/2d5/2d5659_ba30984_b167d39_f82_c83_a86_ae9.pdf (Дата обращения: 20.03.2017).

121. Чевари, С Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей. – Текст (визуальный) : непосредственный // Лабораторное дело. – 1985. – № 11. – С. 678 – 680.

122. Человеческий сывороточный γ -глобулин связывает катионы меди / Е.Е. Бабаева, У.А. Воробьева, М.С.Жаркова, С.Б. Чекнев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, № 1. – С. 59-62.

123. Черемных, Е.Г. Новый метод оценки функциональной активности системы комплемента / Е.Г. Черемных, П.А. Иванов, М.И. Фактор. – Текст (визуальный) : непосредственный // Медицинская иммунология. – 2015. – № 5. – С. 479-488.

124. Черешнев, В.А. Иммунология воспаления: роль цитокинов / В.А. Черешнев, Е.Ю. Гусев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Медицинская иммунология. – 2001. – № 3. – С. 361-368.

125. Чуян, Е.Н. Низкоинтенсивное электромагнитное излучение крайне высокой частоты оказывает антиоксидантное действие в условиях острого стресса / Е.Н. Чуян, М.Ю. Раваева, Е.А. Бирюкова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. – 2016. – Т. 14, №2. – С.71–75.

126. Шамов, И.А. Железо, абсорбция, транспорт / И.А. Шамов, П.О. Гасанова. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник гематологии. – 2016. – № 1. – С. 31-38.

127. Шварц, В. Регуляция метаболических процессов интерлейкином 6 / В. Шварц. – Текст (визуальный) : непосредственный // Цитокины и воспаление. – 2009. – Т. 8, № 3. – С. 3-10.

128. Шейбак, Л.Н. Биологическая роль и перспективы использования цинка в перинатологии / Л.Н. Шейбак. – Текст (визуальный) : непосредственный //

Медицинские новости. – 2003. – № 5. – С. 21-24.

129. Шейбак, В.М. Биологическая роль цинка при алкогольном и вирусном поражениях печени (обзор литературы) / В.М. Шейбак, М.В. Горецкая, А.Ю. Павлюковец. – Текст (визуальный) : непосредственный // Проблемы здоровья и экологии. – 2013. – № 2 (36.). – С. 14-20.

130. Шейбак, М.П. Недостаточность цинка у детей / М.П. Шейбак, Л.Н. Шейбак. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2000. – Т. 45, № 1. – С. 48–51.

131. Шейбак, Л.Н. Роль и значение цинка в перинатологии / Л.Н. Шейбак. – Текст (визуальный) : непосредственный // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2015. – № 2. – С. 30-34.

132. Экспрессия генов цитокинов в условиях индукции человеческим сывороточным γ -глобулином и его металлокомплексами с цинком / М.В. Мезенцева, И.М. Шаповал, А.Н. Наровлянский, С.Б. Чекнев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Медицинская иммунология. – 2010. – № 3. – С. 171-176.

133. Эффект влияния циклофосфана на уровень провоспалительных цитокинов в эксперименте у мышей / Е.А.Лебединская, Л.Ф. Лосева, О.В. Лебединская [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 96-97.

134. A novel role for XIAP in copper homeostasis through regulation of MURR1 / E. Burstein, L. Ganesh, R.D. Dick [et al.]. – Text : visual // Embo J. – 2004. – Vol. 23. – P.244-254.

135. A role for connexin43 in macrophage phagocytosis and host survival after bacterial peritoneal infection / R.J. Anand, S. Dai, S.C. Gribar [et al.]. – Text : visual // J. Immunol. – 2008. – Vol. 181, № 12. – P. 8534-8543.

136. A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity / C. WhiteWhite, J. Lee, T. Kambe [et al.]. – Text : visual // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol. 284, № 49. – P. 33949-56.

137. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Cobalt / US Department of Health and Human Services, Public Health Service. – Atlanta, GA, 2004. – 486 p. – Text : visual.

138. Ali, I. Catalase prevents myeloperoxidase self-destruction in response to oxidative stress / I. Ali, Sana N. Khan, Charalampos Chatzicharalampous. – Text : visual // *J. Inorg. Biochem.* – 2019. – Vol. 197. – P. 110706.

139. Allscher, T. Carbohydrate-Metal Complexes: Structural Chemistry of Stable Solution Species / T. Allscher, P. Klufers. – Text : visual // Springer Science. – 2008. – P. 1077-1139.

140. Amin, M.A. Study of complex formation in Al(III) – Gluconic acid system and the influence of UV light on the dissolution and passive behavior of Al / M.A. Amin, M.A. Refat. – Text : visual // *Arab. J. Chem.* – 2013. – Vol.6, №2. – P. 165-172.

141. Antioxidants in Translational Medicine / H.H.W. Schmidt Harald, R. Stocker, C. Vollbracht [et al.] . – Text : visual // *Antioxid Redox Signal.* – 2015. – Vol. 23, № 14. – P. 1130–1143.

142. Ayala, A. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal / A. Ayala, M.F. Muñoz, S. Argüelles. – Text : visual // *Oxid Med Cell Longev.* – 2014. – May. – P. 1-31.

143. Baldo, B.A. Side effects of cytokines approved for therapy / B.A. Baldo. – Text : visual // *Drug safety.* – 2014. – Vol. 37, №. 11. – P. 921-943.

144. Bastian, N.R. Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase / N.R. Bastian, J.B. Hibbs. – Text : visual // *Curr. Opin. Immunol.* – 1994. – Vol. 6. – P. 131–139.

145. Beard, J. L. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning / J. L. Beard. – Text : visual // *J. Nutr.* - 2001. – Vol. 131. – P. 568-580.

146. Biology of ageing and role of dietary antioxidants / C. Peng, X. Wang, J. Chen [et al.]. – Text : visual // *Biomed Res Int.* – 2014. – April. – P. 1-13.

147. Blood Manganese as an Exposure Biomarker: State of the Evidence / M. Baker, C. Simpson, B. Stover [et al.]. – Text : visual // *J. Occup. Environ. Hyg.* – 2014. – Vol.

11. – P. 210-217.

148. Bogomolski-Yahalom, V. Disorders of neutrophil function / V. Bogomolski-Yahalom, Y. Matzner. – Text : visual // *Blood Rev.* – 1995. – Vol. 9. – P. 183–190.

149. Bromelain is an accelerator of phagocytosis, respiratory burst and killing of *Candida albicans* by human granulocytes and monocytes / M. Brakebusch, U. Wintergerst, T. Petropoulou [et al.]. – Text : visual // *Eur. J. Med. Res.* – 2001. – Vol. 6. – P. 193–200.

150. Brown, D.I. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system / D.I. Brown, K.K. Griendling. – Text : visual // *J. Circ. Res.* – 2015. – Vol. 116, № 3. – P. 531-549.

151. Bruick, R.K. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor / R.K. Bruick. – Text : visual // *Genes Dev.* – 2003. – Vol. 17. – P. 2614–2623.

152. 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. – Text : visual // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* – 2011. – Vol. 63. – P. 47–58.

153. Ceruloplasmin decreases respiratory burst reaction during pregnancy / E.Y. Varfolomeeva, E. V. Semenova, A. V. Sokolov [et al.]. – Text : visual // *FreeRadical Res.* – 2016. – Vol. 50. – P. 909–919.

154. Characterization of an interesting selenium- dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) protecting cells against environmental stress: the camelus dromedarius erythrocytes Se-GPx / A. Chafik, Abdelkhalid Essamadi, Safinur Yildirim Çelik [et al.]. – Text : visual // *Biocatal. Agric. Biotechnol.* – 2019. – Vol. 18. – P. 1–9.

155. Chemotherapy – induced immunogenic modulation of tumor cells enhances killing by cytotoxic T lymphocytes and is distinct from immunogenic cell death / J.W. Hodge, C.T. Garnett, B. Farsaci [et al.]. – Text : visual // *Int. J. Cancer.* – 2013. – Vol. 133. – P. 624–636.

156. Chen, P. Manganese homeostasis in the nervous system / P. Chen, S. Chakraborty, S. Mukhopadhyay. – Text : visual // *J. of Neurochemistry.* – 2015. –

Vol. 134. – P. 601-610.

157. Comparative reactivity of the myeloperoxidase-derived oxidants hypochlorous acid and hypothiocyanous acid with human coronary artery endothelial cells / M.M. Lloyd, M.A. Grima, B.S. Rayner [et al.]. – Text : visual // *Free Radic. Biol. Med.* – 2013. – Vol. 65. – P. 1352–1362.

158. Connor, J.R. Iron regulation in the brain: histochemical, biochemical and molecular considerations / J.R. Connor, A. Bencovic. – Text : visual // *Ann. Neurol.* – 1992. – Vol. 32 (Suppl.). – P. 51-61.

159. Copper stress on photosynthesis of black mangle (*Avicennia germinans*) / D. González-Mendoza, F. Espadas Gil, F. Escoboza-Garcia [et al.]. – Text : visual // *An Acad Bras Cienc.* – 2013. – Vol. 85, № 2. – P. 665-670.

160. Correlation of Oxidative Stress with Serum Trace Element Levels and Antioxidant Enzyme Status in Beta Thalassemia Major Patients: A Review of the Literature / Q. Shazia, Z.H. Mohammad, T. Rahman, H.U. Shekhar. – Text : visual // *Anemia.* – 2012. – № 270923. – P. 1-7.

161. Current position of TNF- α in melanomagenesis / I. Nenu, D. Tudor, A.G. Filip, I. Baldea. – Text : visual // *Tumor Biology.* – 2015. – Vol. 36, № 9. – P. 6589-6602.

162. Dandekar, A. Cross Talk Between ER Stress, Oxidative Stress, and Inflammation in Health and Disease / A. Dandekar, R. Mendez, K. Zhang. – Text : visual // *Methods Mol Biol.* – 2015. – Vol. 1292. – P. 205-214.

163. Davis, C. Manganese metabolism in rats: an improved methodology for assessing gut endogenous losses / C. Davis, L. Zech, J. Greger. – Text : visual // *Proc Soc Exp Biol Med.* – 1993. – Vol. 202. – P. 103-108.

164. Decreased expression and DNA methylation levels of GATAD1 in preeclamptic placentas / X. Ma, J. Li, B. Brost [et al.]. – Text : visual // *Cell Signal.* – 2014. – Vol. 26, № 5. – P. 959-967.

165. Demkovich, A. Effects of flavonol quercetin on activity of lipid peroxide oxidation in experimental bacterial-immune periodontitis / A. Demkovich. – Text : visual // *Intervent. Med. Appl. Sci.* – 2019. – Vol. 11, №1 – P. 55– 59.

166. Diez, M. Serum and tissue trace metal levels in lung cancer / M. Diez, M. Arroyo, F.J. Cerdan. – Text : visual // *Oncology*. – 1989. – Vol. 46. – P. 230–234.
167. Differential influences of complement on neutrophil responses to *Neisseria meningitidis* infection / S. Krueger, Emma Eichler, Lea Strobel [et al.]. – Text : visual // *Pathog. Dis.* – 2018. – Vol. 76, №8. – doi: 10.1093/femspd/fty086.
168. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity / D. Chen, Q.C. Cui, H. Yang, Q.P. Dou. – Text : visual // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66. – P. 10425-33.
169. Ebert, B.L. Regulation of the Erythropoietin Gene / B.L. Ebert, H.F. Bunn. – Text : visual // *Blood*. – 1999. – Vol. 94. – P. 1864-1877.
170. Effect of vitamin A and vitamin C supplementation on oxidative stress in HIV and HIV-TB co-infection at Lagos University Teaching Hospital (LUTH) Nigeria / O. Makinde, K. Rotimi, V. Ikumawoyi [et al.]. – Text : visual // *Afr Health Sci.* – 2017. – Vol. 17, № 2. – P. 308-314.
171. Emerging cytokine networks in colorectal cancer / N.R. West, S. McCuaig, F. Franchini, F. Powrie. – Text : visual // *Nature Reviews Immunology*. – 2015. – Vol. 15. – P. 615.
172. Evaluation of anti-inflammatory effects of curcumin gel as an adjunct to scaling and root planing: a clinical study / B.R. Anuradha, Y.D. Bai, S. Sailaja [et al.]. – Text : visual // *J. Int.Oral. Health*. – 2015. – Vol. 7. – P. 90-93.
173. Ferroportin is a Manganese-Responsive Protein that Decreases Manganese Cytotoxicity and Accumulation / Z. Yin, H. Jiang, E. Lee [et al.]. – Text : visual // *J. Neurochem.* – 2010. – Vol. 112. – P. 1190-8.
174. Freeland-Graves, J. Requirements for Manganese / J. Freeland-Graves, T. Mousa, N. Sanjeevi. – Text : visual // *Issues in Toxicology: Manganese in Health and Disease* / ed.: M.A. Cosat. – Cambridge: The Royal Society of Chemistry; London, 2015. – P. 34-75.
175. Furfaro, L. The Nrf2/HO-1 axis in cancer cell growth and chemoresistance / L.

Furfaro, N. Traverso, C. Domenicotti. – Text : visual // *J. Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2016. – P. 14.

176. Garlanda, C. The interleukin-1 family: back to the future / C. Garlanda, C. A. Dinarello, A. Mantovani. – Text : visual // *Immunity.* – 2013. – Vol. 39, № 6. – P. 1003-1018.

177. Global gene expression profiling in human lung cells exposed to cobalt / V. Malard, F. Berenguer, O. Pratt [et al.]. – Text : visual // *BMS Genomics.* – 2007. – Vol. 8. – P. 147 – 164.

178. Gluconic acid: properties, applications and microbial production / S. Ramachandran, P. Fontanille, A. Pandey, C. Larroche. – Text : visual // *Food Technol. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 44, № 2. – P. 185-195.

179. Glycoscience: chemistry and chemical biology / B.O. Fraser Reid, K. Tatsuta, J. Thiem [et al.]. – Berlin; Heidelberg: Springer Science & Business Media, 2008. – P.1077-1139. – Text : visual.

180. Goldstein, S. The Fenton Reagents / S. Goldstein, D. Meyerstein, G. Czapski. – Text : visual // *Free Radical Biology and Medicine.* – 1993. – Vol. 15, № 4. – P. 435–445.

181. Galow, J.R. Livingston University of Washington High-Dose Cyclophosphamide, Mitoxantrone, and Etoposide Experience in Metastatic Breast Cancer: Unexpected Cardiac Toxicity / J.R. Galow, B. Robert. – Text : visual // *Journal of Clinical Oncology.* – 2010. – Vol. 19, № 18. – P. 3903–3904.

182. Graur, V. Synthesis, structure and biological activity of N(4)-ALLYL-3-thiosemicarbazones and their coordination compounds with some 3 d-metals / V. Graur. – Text : visual // *Studia universitatis Moldaviae. Seria: slinle reale si ale nature II.* – 2015. – Vol. 86, №6. – P. 130–141.

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

184. Haase, H. Signal transduction in monocytes: the role of zinc ions / H. Haase,

L. Rink. – Text : visual // *Biometals*. – 2007. – Vol. 20. – P. 579.

185. Habib, F.K. The zinc and copper content of blood leucocytes and plasma from patients with benign and malignant prostates / F.K. Habib, T.C. Dembinski, S.R. Stich. – Text : visual // *Clin Chim Acta*. – 1980. – Vol. 104. – P. 329–335.

186. Hagymási, K. Antioxidants--antioxidative stress: facts and questions / K. Hagymási, A. Egresi, G. Lengyel. – Text : visual // *Orv Hetil*. – 2015. – Vol. 156, № 47. – P. 1884-7.

187. Harris, S. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression / S. Harris, A. E. Treloar, S. Inoue. – Text : visual // *J. Cancer Cell*. – 2015. – Vol. 27. – P 211-222.

188. Hilal, A.H. Evaluation of Total Oxidant/Antioxidant Capacity and Ceruloplasmin Levels in Horses with Inflammatory Airway Disease / A.H. Hilal, G.D. Oktay, C.S. Metin. – Text : visual // *Acta Scientiae Veterinariae*. – 2017. – Vol. 45. – P. 1518.

189. Huang, Y.L. Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer / Y.L. Huang, J.Y. Sheu, T.H. Lin. – Text : visual // *Clin Biochem*. – 1999. – Vol. 32. – P. 131–136.

190. Ibs, K.H. Zinc-altered immune function / K.H. Ibs, L. Rink. – Text : electronic // *J. Nutr*. – 2003. – May. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730441> (Дата обращения: 20.03.2017).

191. Igielska-Kalwat, J. Carotenoids as natural antioxidants / J. Igielska-Kalwat, J. Gościańska, I. Nowak. – Text : visual // *Postepy Hig Med Dosw*. – 2015. – Vol. 69. – P. 418-28.

192. Ilenko, N.V. State lipid peroxidation and antioxidant protection oral liquid of patients with hiv status / N. V. Ilenko, T. A. Petrushanko, N.M. Ilenko. – Text : visual // *World Med. Biol*. – 2015. – Vol. 54, № 4 – P. 28-31.

193. Immune function is impaired in irondeficient, homebound, older women / N. Ahluwalia, J. Sun, D. Krause [et al.]. – Text : visual // *Am. J.Clin. Nutr*. – 2004. – Vol. 79. – P. 516-521.

194. Immunology / R.A. Goldsby, T.J. Kindt, J. Kuby, B.A. Osborne. – 5th ed. – London: W.H. Freeman & Company, 2002. – 553 p. – Text : visual.
195. Immunomodulatory effects of polysaccharopeptide in immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide / R. Huang, J. Zhang, Y. Liu [et al.]. – Text : visual // Mol. Med. Rep. – 2013. – Vol. 8, № 2. – P. 669-675.
196. 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.]. – Text : visual // Trans. Nonferrous Met. Soc. China. – 2015. – Vol. 25, № 11. – P. 3760–3766.
197. Investigation of the Bioavailability of Manganese from Organic vs. Inorganic Supplements, Proceed / J. Hall, H. Winger, P. Hole, R. Samford. – Text : visual // Western Section Am. Soc. Anim. Sci. – 2007. – Vol. 58. – P. 358-63.
198. Kennard, J. A brief history of the term Stress / J. Kennard. – Text : electronic // Health Central. – URL: <http://www.healthcentral.com/anxiety/c/1950/30437/history-term-stress> (Asseced. June, 10.2008).
199. Kodama, H. Inherited copper transport disorders: biochemical mechanisms, diagnosis, and treatment / H. Kodama, C. Fujisawa, W. Bhadhprasit. – Text : visual // Curr Drug Metab. – 2012. – Vol. 13, № 3. – P. 237-250.
200. Kotiyal, S. Breast cancer stem cells, EMT and therapeutic targets / S. Kotiyal, S. Bhattacharya. – Text : visual // Biochemical and biophysical research communications. – 2014. – Vol. 453, №. 1. – P. 112-116.
201. Levine, R.L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease / R.L. Levine. – Text : visual // Free Radic. Biol. Med. – 2002. – Vol. 32. – P. 790–796.
202. Leyva, D. SLC30A10 is a cell surface-localized manganese efflux transporter, and parkinsonism-causin mutations block its intracellular trafficking and efflux activity / D. Leyva, P. Chen, C. Zogzas. – Text : visual // Neuroscience. – 2014. – Vol. 34. – P. 14079-14095.
203. Li, S. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases / S. Li, H.Y. Tan, N.Wang. – Text : visual // Int J Mol Sci. – 2015. – Vol. 16, № 11. – P.

26087-124.

204. Linder, M.C. Ceruloplasmin and other copper binding components of blood plasma and their functions / M.C. Linder. – Text : visual // *Metallomics*. – 2016. – Vol. 8. – P. 887–905.

205. Liu, R.-M. Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: a perverse cycle for fibrosis / R.-M. Liu, L.P. Desai. – Text : visual // *J. Redox Biol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 565-577.

206. Loss-of-function alleles of P2RX7 and TLR4 fail to affect the response to chemotherapy in non-small cell lung cancer / E. Vacchelli, L. Galluzzi, V. Rousseau [et al.]. – Text : visual // *Oncoimmunology*. – 2012. – Vol. 1, № 3. – P. 271 – 278.

207. Maeda, H. The link between infection and cancer: tumor vasculature, free radicals, and drug delivery to tumors via the EPR effect / H. Maeda. – Text : visual // *Cancer Sci.* – 2013. – Vol. 104, №7 – P. 779–789.

208. 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.]. – Text : visual // *Immunity*. – 2018. – Vol. 48, № 4. – P. 675-687.

209. Manganese Transport via the Transferrin Mechanism / T. Gunter, K. Gunter, J. Malecki [et al.]. – Text : visual // *Neurotoxicol.* – 2013. – Vol. 34. – P. 118-140.

210. Massoco, C. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study / C. Massoco, J. Palermo-Neto. – Text : visual // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2003. – Vol. 95. – P. 11–19.

211. Mavangira, V. Role of lipid mediators in the regulation of oxidative stress and inflammatory responses in dairy cattle / V. Mavangira, L. M. Sordillo. – Text : visual // *Res. Vet. Sci.* – 2018. – Vol. 116 – P. 4–14.

212. Miethke, M. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control / M. Miethke, M.A. Marahiel. – Text : visual // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2007. – Vol. 71, № 3. – P. 413-451.

213. Molecular and Cellular Bases of Iron Metabolism in Humans (review) / I.V.

Milto, I.V. Suhodolo, V.D. Prokopieva [et al.]. – Text : visual // *Biochemistry (Moscow)*. – 2016. – Vol. 81, № 6. – P. 725-742.

214. Molecular dissection of the structural machinery underlying the tissue-invasive activity of MT1-MMP / X.Y. Li, I. Ota, I. Yana [et al.]. – Text : visual // *Mol. Biol. Cell*. – 2008. – Vol. 19. – P. 3221–3233.

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

216. Nayak, S.B. Copper and ceruloplasmin status in serum of prostate and colon cancer patients / S.B. Nayak, V.R. Bhat, D. Upadhyay. – Text : visual // *Indian J Physiol Pharmacol*. – 2003. – Vol. 47. – P. 108–110.

217. New insights into the role of zinc in the respiratory epithelium / A.Q. Truong-Tran, J. Carter, R. Ruffin, P.D. Zalewski. – Text : electronic // *Immunol Cell Biol*. – 2001. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264713> (Дата обращения: 21.03.2017).

218. Nishito, Y. Absorption Mechanisms of Iron, Copper, and Zinc: An Overview / Y. Nishito, T. Kambe. – Text : visual // *Nutr. Sci Vitaminol*. – 2018. – Vol. 64. – P. 1-7.

219. Okechukwu, I.B. Oxidative Stress, Redox Regulation and Elite Controllers of HIV Infection / I.B. Okechukwu. – Text : visual // *Towards a Functional Cure*. – 2015.

220. Oppenheimer, S.J. Iron and Its Relation to Immunity and Infectious Disease / J.S. Oppenheimer. – Text : visual // *J. Nutr*. – 2001. – Vol. 131. – P. 616–635.

221. Oteiza, P.I. Zinc and the modulation of redox homeostasis / P.I. Oteiza. – Text : visual // *Free Radic. Biol. Med*. – 2012. – Vol. 53, № 9. – P. 1748–1759.

222. 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. – Text : visual.

223. Owunari, G.U. Disulfiram and Copper Gluconate in Cancer Chemotherapy; a Review of the Literature / G.U. Owunari, S.I. Minakiri. – Text : visual // Cancer Research J. – 2014. – Vol. 2, № 5. – P. 88-92.

224. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay / A. Rahal, A.Kumar, V. Singh [et al.]. – Text : visual // Biomed Res Int. – 2014. – January. – P. 1-19.

225. Patel, M.N. Square pyramidal copper(II) complexes with fourth generation fluoroquinolone and neutral bidentate ligand: structure, antibacterial, SOD mimic and DNA-interaction studies / M.N. Patel, P.A. Parmar, D.S. Gandhi. – Text : visual // Bioorganic and Medicinal Chemistry. – 2010. – Vol. 18, № 3. – P. 1227–1235.

226. Patent US № 10991748. Method of making iron (III) gluconate complex / M. Justus, R. Hanseler. – Publication 17.05.2004. – Text : visual.

227. Patent U.S № 2006/0069276 A1. Cl. 556/146. Method of making iron (III) gluconate complex. – Pub. Date: Mar. 30, 2006. – Text : visual.

228. Pocusa, M. The Central Role of Biometals Maintains Oxidative Balance in the Context of Metabolic and Neurodegenerative Disorders / M. Pocusa, A.K. Tranchikova. – Text : visual // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2017. – P. 18. – Article ID 8210734. – P. 18.

229. Porsolt, R.D. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments / R.D. Porsolt, M.L. Pinchon. – Text : visual // Nature. – 1977. – Vol. 266. – P. 730-32.

230. Prooxidant –antioxidant balance in patients with traumatic brain injury / M. Ehsaei, Mehdi Khajavi, Mohammad Hassan Arjmand [et al.]. – Text : visual // Acta Neurol. Belg. – 2015. – Vol. 115, №1. – P. 69–73.

231. Protective humoral and CD4⁺ T cellular immune responses of Staphylococcus aureus vaccine MntC in a murine peritonitis model / W. Yu, D. Yao, S. Yu [et al.]. – Text : visual // Sci. Rep. – 2018. – Vol. 8. – P. 3580.

232. Proteinase 3-dependent caspase-3 cleavage modulates neutrophil death and inflammation / F. Loison, H. Zhu, K. Karatepe [et al.]. – Text : visual // J. Clin.

Investig. – 2014. – Vol. 124. – P. 4445-4458.

233. Pulido, M.D. Metal-induced apoptosis: mechanisms / M.D. Pulido, A.R. Parrish. – Text : visual // *Mutat Res.* – 2003. – Vol. 533. – P. 227–241.

234. Ramachandran, S. Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production / S. Ramachandran, P. Fontanille, A. Pandey. – Text : visual // *Food Technol. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 44, № 2. – P.185–195.

235. Reactive oxygen species in colorectal cancer: the therapeutic impact and its potential roles in tumor progression via perturbation of cellular and physiological dysregulated pathways / M-M. Reyhaneh, Seyed Mahdi Hassanian, Mehraneh Mehramiz [et al.]. – Text : visual // *J. Cell. Physiol.* – 2019. – Vol. 234, №7. – P. 10072-10079.

236. Regulation of zinc metabolism and genomic outcomes / R.J. Cousins, R.K. Blanchard, J.B. Moore [et al.]. – Text : electronic // *J. Nutr.* – 2003. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730457> (Дата обращения: 22.03.2017).

237. Rehmani, N.S. Copper-mediated DNA damage by the neurotransmitter dopamine and L-DOPA: A pro-oxidant mechanism / N.S. Rehmani. – Text : visual // *Toxicology in vitro.* – 2017. – P. 336-346.

238. Rink, L. Zinc and the immune system / L. Rink, P. Gabriel. – Text : electronic // *Proc Nutr. Soc.* – 2000. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11115789> (Дата обращения: 20.03.2017).

239. Rizk, S.L. Comparison between concentrations of trace elements in normal and neoplastic human breast tissue / S.L. Rizk, H.H. Sky-Peck. – Text : visual // *Cancer Res.* – 1984. – Vol. 44. – P. 5390–5394.

240. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance / N. Kumari, B. S. Dwarakanath, A. Das, A. N. Bhatt. – Text : visual // *Tumor Biology.* – 2016. – Vol. 37, №. 9. – P. 11553-11572.

241. ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms / L. Li, J. Tan, Y. Miao [et al.]. – Text : visual // *Cellular and Molecular Neurobiology.* – 2015. – Vol. 35, № 5. – P. 615–621.

242. Sadowska-Bartosz, I. Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity / I.Sadowska-Bartosz, G. Bartosz. – Text : visual // *Biomed Res Int.* – 2014. – March. – P. 1-17.
243. Sahu, P.K. Structure activity relationship, cytotoxicity and evaluation of antioxidant activity of curcumin derivatives / P.K. Sahu, P.L. Sahu, D.D. Agarwal. – Text : visual // *J. Bioorg.Med.Chem.Lett.* – 2016. – Vol. 26. – P. 1342-1347.
244. Sargent, B. Generating recombinant versions of human serum-derived proteins-transferrin and albumin / B. Sargent. – Text : electronic // *Cell culture dish.* – 2016. – May 10. – URL: <https://cellculturedish.com/generating-recombinant-versions-of-human-serum-derived-proteins-transferrin-and-albumin/> (Asseced, May, 10. 2016).
245. Schieber, M. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress / M. Schieber, S.Ch. Navdeep. – Text : visual // *Curr Biol.* – 2014. – Vol. 24, № 10. – P. 453-462.
246. Severe Refractory Immune Thrombocytopenia Successfully Treatedwith High-Dose Pulse Cyclophosphamide and Eltrombopag / A. Faiz, Y. Seongseok, N. Anju [et al.]. – Text : visual // *Case Reports in Hematology.* – 2015. – Juny. – Article ID 583451. DOI:10.1155/2015/583451.
247. Sillanpaa, M. Acute toxicity of gluconic acid, β -alaninediacetic acid, diethylenetriaminepentakismethylenephosphonic acid, and nitrilotriacetic acid determined by *Daphnia magna*, *Raphidocelis subcapitata* , and *Photobacterium phosphoreum* / M. Sillanpaa, K. Pirkanniemi, P. Dhondup. – Text : visual // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* – 2003. – Vol. 44, №3. – P. 332–335.
248. Structural insights into Nox4 and Nox2: motifs involved in function and cellular Localization / K. Von Loehneysen, Deborah Noack, Malcolm R. Wood [et al.]. – Text : visual // *Mol. Cell. Biol.* – 2010. – Vol.30, № 4. – P. 961-975.
249. Supplementing copper at the upper level of the adult dietary recommended intake induces detectable but transient changes in healthy adults / M. Araya, M. Olivares, F. Pizarro [et al.]. – Text : visual // *J. Nutr.* – 2005. – Vol. 135. – P. 2367-2371.

250. Synthesis of chlorinated flavonoids with anti-inflammatory and pro-apoptotic activities in human neutrophils / M. Freitas, D. Ribeiro, S. M. Tomé [et al.]. – Text : visual // *Eur. J. Med. Chem.* – 2014. – Vol. 86. – P. 153–164.

251. The application of selenium and copper nanoparticles modifies the biochemical responses of tomato plants under stress by *Alternaria solani* / T. Quiterio-Gutierrez, Hortensia Ortega-Ortiz, Gregorio Cadenas-Pliego [et al.]. – Text : visual // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, №8. – P. 1–16.

252. The effect of feed supplementation with a copper-glycine chelate and copper sulphate on selected humoral and cell-mediated immune parameters, plasma superoxide dismutase activity, ceruloplasmin and cytokine concentration in broiler chickens / S.A. Jarosz, Z. Marek, M. Grądzki [et al.]. – Text : visual // *Journal of animal physiology and animal nutrition.* – 2018. – Vol. 102. – P. 326-336.

253. The Intestinal Copper Exporter CUA-1 Is Required for Systemic Copper Homeostasis in *Caenorhabditis elegans* / H. Chun, A.K. Sharma, J. Lee [et al.]. – Text : visual // *J. Biol. Chem.* – 2017. – Vol. 292, № 1. – P. 1-14.

254. The Iron Transport Protein NRAMP2 is an Integral Membrane Glycoprotein that Colocalizes with Transferrin in Recycling Endosomes / S. Gruenheid, F. Canonne-Hergaux, S. Gauthier [et al.]. – Text : visual // *J. Exp. Med.* – 1999. – Vol. 189. – P. 831-841.

255. The role of oxidative stress during inflammatory processes / J. Lugrin, H.Y. Tan, N.Wang [et al.]. – Text : visual // *Biol Chem.* – 2014. – Vol. 395, № 2. – P. 203-30.

256. Toll-like receptor-MyD88 and Fc receptor pathways of mast cells mediate the thyroid dysfunctions observed during nonthyroidal illness / R. Rocchi, H. Kimura, S.C. Tzou [et al.]. – Text : visual // *Proc. Natl. Acad. Sei USA.* – 2007. – Vol. 104, № 14. – P. 6019-24.

257. Trinchieri, G. Function and clinical use of interleukin-12 / G.Trinchieri. – Text : visual // *Curr. Opin. Hematol.* – 1997. – Vol. 4, № 1. – P. 59-66.

258. Tripathi, K. Can metal ions be incorporated into drugs? / K.Tripathi. – Text :

visual // Asian J. Research Chem. – 2009. – Vol. 2, № 1. – P. 14-18.

259. Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question / F. Van Herreweghe, N. Festjens, W. Declercq, P. Vandenabeele. – Text : visual // Cellular and molecular life sciences. – 2010. – Vol. 67, №. 10. – P. 1567-1579.

260. Turecky, L Serum ceruloplasmin and copper levels in patients with primary brain tumors / L. Turecky, P. Kalina, E. Uhlikova. – Text : visual // Klin.Wochenschr. – 1984. – Vol. 62. – P. 187–189.

261. Tuschl, K. Manganese and the brain / K. Tuschl, P. Mills, P. T. Clayton. – Text : visual // Int. Rev. Neurobiol. – 2013. – Vol. 110. – P. 277-312.

262. Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds / D. Lison, M. De Boeck, V. Verougstraete, M. Kirsch-Volders. – Text : visual // Occup. Environ. Med. – 2001. – Vol. 58. – P. 619–625.

263. Vashchenko, G. Multi-copper oxidases and human iron metabolism / G. Vashchenko, R.T. MacGillivray. – Text : visual // Nutrients. – 2013. – Vol. 5, № 7. – P. 2289-313.

264. Vetvicka, V. Anti-stress action of several orally-given beta-glucans / V. Vetvicka, Z. Vancikova. – Text : visual // Biomed.papers-olomouc. – 2010. – Vol. 154, № 3. – P. 235-238.

265. Wang, W. Targeting the NFκB signaling pathways for breast cancer prevention and therapy / W. Wang, S. A. Nag, R. Zhang. – Text : visual // Curr. Med. Chem. – 2015. – Vol. 22, № 2. – P. 264-289.

266. Wassermann, A. Hemolysine, Cytotoxine und Precipitine / A. Wassermann. – Lpz., 1902. – Text : visual.

267. Weiss, G. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria / G. Weiss, U.E. Schaible. – Text : visual // Immunol.Rev. – 2015. – Vol. 264, № 1. – P. 182–203.

268. Wensen, J.J. Radioprotective effect on HepG2 cells of low concentrations of cobalt chloride: induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha and clearance of

reactive oxygen species / J.J. Wensen, S.X. Wang. – Text : visual // *J. Radiat Res.* – 2013. – № 54. – P. 203 – 209.

269. Whayne, T.F. Antioxidants in the Practice of Medicine; What Should the Clinician Know? / T.F. Whayne, S.P. Saha, D. Mukherjee. – Text : visual // *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* – 2016. – Vol. 16, № 1. – P. 13-20.

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

271. Yahata, T. Oxidative stress and Kawasaki disease: how is oxidative stress involved from the acute stage to the chronic stage? / T. Yahata, K. Hamaoka. – Text : visual // *Rheumatology (Oxford).* – 2017. – Vol. 56, № 1. – P. 6-13.

272. Yenice, E. Effects of Organic and Inorganic Forms of Manganese, Zinc, Copper, and Chromium on Bioavailability of These Minerals and Calcium in Late-Phase Laying Hens / E. Yenice, C. Mizrak. – Text : visual // *Biol.Trace Elem. Res.* – 2015. – Vol. 167. – P. 300-307.

273. Zeliha, K. Evaluation of the effect of divalent metal transporter 1 gene polymorphism on blood iron, lead and cadmium levels / K. Zeliha, A.D. Kaya, S. Tulin. – Text : visual // *Environ. Res.* – 2015. – Vol. 137. – P. 8-13.

274. Zhang, Y. Effects of ferrous carbamoyl glycine on iron state and absorption in an iron-deficient rat model / Y. Zhang, X. Sun, C. Xie. – Text : visual // *Genes Nutr.* – 2015. – Vol. 10, № 6. – P. 1-8.

275. Zinc homeostasis and signaling in health and disease / T. Fukada, S. Yamasaki, K. Nishida [et al.]. – Text : visual // *J. Biol. Inorg. Chem.* – 2011. – Vol. 16. – P. 1123–1134.