

DOI: <https://doi.org/10.17816/1028-9984-2021-26-2-39-48>

Оригинальное исследование



Фагоцитарная и хемилюминесцентная активность нейтрофилов крови у больных раком мочевого пузыря

А.А. Савченко^{1,2}, Р.А. Зуков^{2,3}, М.А. Фирсов^{2,4}, Е.В. Слепов^{1,3}, В.Д. Беленюк¹, И.И. Гвоздев¹, А.Г. Борисов^{1,2}

¹ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск, Российская Федерация;

² Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Российская Федерация;

³ Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского, Красноярск, Российская Федерация;

⁴ Краевая клиническая больница, Красноярск, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Опухолевое микроокружение модулирует (в том числе с помощью метаболитов) функциональную активность нейтрофилов, что способствует перепрограммированию из противоопухолевой активности в проопухолевую.

Цель. Изучение фагоцитарной и хемилюминесцентной активности нейтрофилов у больных раком мочевого пузыря (РМП) при воздействии метаболитов опухолевого микроокружения *in vitro*.

Методы. Обследовано 37 пациентов с немышечно-инвазивным РМП (T1, a, isN0M0) и 32 здоровых человека в качестве контрольной группы. Выделенные из крови нейтрофилы инкубировались *in vitro* с лактатом, аденозиндифосфатом (АДФ) и глутаматом. Фагоцитарная активность была исследована методом проточной цитометрии. Интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов изучали с помощью хемилюминесцентного анализа.

Результаты. У больных РМП снижены величины фагоцитарного индекса (ФИ) в контрольной пробе (без воздействия метаболитов *in vitro*) и при воздействии глутамата, в то время как воздействие лактата на клетки вызывает повышение фагоцитарного числа и ФИ. Под влиянием лактата *in vitro* снижается активность спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов. АДФ вызывает снижение показателей только спонтанной хемилюминесценции. Под влиянием глутамата понижаются показатели спонтанной и индуцированной хемилюминесценции.

Заключение. Под воздействием лактата и АДФ (продукты опухолевых клеток) стимулируется фагоцитарная активность популяции незрелых нейтрофилов, в составе которых определяются миелоидные супрессорные клетки, ингибирующие противоопухолевый иммунитет. Метаболиты опухолевого микроокружения модулируют активность респираторного взрыва нейтрофилов у больных РМП.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря; нейтрофилы; метаболиты; фагоцитарная активность; хемилюминесцентная активность.

Как цитировать:

Савченко А.А., Зуков Р.А., Фирсов М.А., Слепов Е.В., Беленюк В.Д., Гвоздев И.И., Борисов А.Г. Фагоцитарная и хемилюминесцентная активность нейтрофилов крови у больных раком мочевого пузыря // Российский онкологический журнал. 2021. Т. 26. № 2. С. 39–48.

DOI: <https://doi.org/10.17816/1028-9984-2021-26-2-39-48>

DOI: <https://doi.org/10.17816/1028-9984-2021-26-2-39-48>

Original study article

Phagocytic and chemiluminescent activity of blood neutrophils in patients with bladder cancer

Andrei A. Savchenko^{1,2}, Ruslan A. Zukov^{2,3}, Mikhail A. Firsov^{2,4}, Evgeniy V. Slepov^{1,3}, Vasiliy D. Beleniuk¹, Ivan I. Gvozdev¹, Alexander G. Borisov^{1,2}

¹ Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Separate Division of the Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

² Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;

³ A.I. Kryzhanovsky Krasnoyarsk Regional Clinical Oncology Center, Krasnoyarsk, Russian Federation;

⁴ Regional Clinical hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

ABSTRACT

BACKGROUND: Tumor microenvironment modulates (including with the help of metabolites) the functional activity of the neutrophils that contribute to the reprogramming of the antitumor activity into a protumor one.

AIMS: To study the phagocytic and chemiluminescent activity of neutrophils in patients with bladder cancer (BC) under the influence of metabolites of the tumor microenvironment in vitro.

MATERIALS AND METHODS: We examined 37 patients with superficial BC (T1,a, isN0M0) and considered 32 healthy individuals as a control group. Neutrophils isolated from their blood were incubated in vitro with lactate, ADP, and glutamate. Phagocytic activity was examined using flow cytometry, and the intensity of the respiratory burst of neutrophils was evaluated via chemiluminescent analysis.

RESULTS: In patients with BC, the phagocytic index (PhI) values are reduced compared to the control sample (without in vitro metabolite exposure) and when exposed to glutamate, while the effect of lactate on cells causes an increase in the phagocytic number and PhI. Moreover, under the influence of lactate in vitro, the activity of spontaneous and zymosan-induced chemiluminescence of neutrophils decreases. ADP causes a decrease in spontaneous chemiluminescence only. Finally, under the influence of glutamate, the indicators of spontaneous and induced chemiluminescence decrease.

CONCLUSIONS: Under the influence of lactate and ADP (products of tumor cells), the phagocytic activity of a population of immature neutrophils is stimulated, which leads to myeloid suppressor cells that inhibit antitumor immunity. Thus, metabolites of the tumor microenvironment modulate the activity of the respiratory burst of neutrophils in patients with BC.

Keywords: bladder cancer; neutrophils; metabolites; phagocytic activity; chemiluminescent activity.

To cite this article:

Savchenko AA, Zukov RA, Firsov MA, Slepov EV, Beleniuk VD, Gvozdev II, Borisov AG. Phagocytic and chemiluminescent activity of blood neutrophils in patients with bladder cancer. *Russian Journal of Oncology*. 2021;26(2):39–48. DOI: <https://doi.org/10.17816/1028-9984-2021-26-2-39-48>

Received: 04.05.2022

Accepted: 23.06.2022

Published: 20.09.2022

Рак мочевого пузыря (РМП) остаётся серьёзной социально-медицинской проблемой. Ежегодно в мире регистрируется около 550 тыс. новых случаев РМП, при этом у 10% пациентов на момент установки диагноза диагностируется метастатическое поражение [1, 2]. В России ежегодно регистрируется 20 тыс. первичных случаев РМП, что составляет практически 3% всех злокачественных опухолей [3, 4]. В связи с этим, актуальным является исследование патогенеза данного заболевания, на основе которого возможна разработка новых эффективных методов лечения.

Иммунопатогенез онкологических заболеваний и РМП в частности исследуется очень активно. Определена роль Т- и НК-лимфоцитов в механизмах противоопухолевого иммунитета [5–7]. Установлены контрольные точки иммунного ответа (immune checkpoint), на основе которых разработаны методы иммунотерапии онкологических заболеваний [8, 9].

В то же время значение нейтрофилов в системе противоопухолевого иммунитета в настоящее время определяется весьма неоднозначно. Доказано, что нейтрофильные гранулоциты составляют значительную часть опухолевого микроокружения (ТМЕ) [10, 11]. В работе Zeindler J. и соавт. (2019) показано, что прогноз выживания у больных раком молочной железы был выше для пациентов с высокой активностью нейтрофильного фагоцитоза [12]. Трогоптоз определяется как механизм антителозависимого киллинга опухолевых клеток нейтрофилами [13]. При взаимодействии с объектами фагоцитоза (включая опухолевые клетки) нейтрофилы реализуют механизмы респираторного взрыва. Было установлено, что у больных раком почки увеличение интенсивности респираторного взрыва нейтрофилов определяется повышением уровней синтеза первичных и вторичных активных форм кислорода (АФК) [14]. В то же время у нейтрофилов на фоне опухолевого роста выявляют и проопухолевую активность (иммуносупрессия, диссеминация опухолевых клеток, стимуляция ангиогенеза) [15–17]. В исследовании De Meo M.L. и Spicer J.D. (2022) было показано, что интенсивное формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET) усиливало послеоперационное прогрессирование рака и повышало вероятность рецидива онкологических заболеваний [18]. Доказано, что ингибирование образования NET в процессе лечения больных РМП повышало эффективность терапии и снижало риск рецидива заболевания [19].

Необходимо учитывать, что перепрограммирование противоопухолевой активности нейтрофилов в проопухолевую реализуется различными механизмами, включая формирование опухоли особого метаболического состава ТМЕ [20–22]. Следовательно, для разработки эффективных методов иммунотерапии больных РМП необходимо понимание механизмов реализации функциональной активности нейтрофилов при воздействии на них метаболических факторов ТМЕ.

Целью исследования явилось изучение фагоцитарной и хемилюминесцентной активности нейтрофилов у больных РМП при воздействии метаболитов опухолевого микроокружения *in vitro*.

В качестве метаболитов, формирующих особенности ТМЕ, исследовано регуляторное влияние лактата, аденозиндифосфата (АДФ) и глутамата. Концентрация данных метаболитов значительно меняется в составе ТМЕ, что за счёт метаболических и эпигенетических механизмов приводит к изменению функциональной активности клеток иммунной системы [23–25].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На базе КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского» обследовано 37 пациентов с немышечно-инвазивным РМП (T₁₋₂,a,ls N0M0) в возрасте 40–75 лет. Все больные были прооперированы в объёме трансуретральной резекции (ТУР) мочевого пузыря. Диагноз РМП был подтверждён морфологически. После ТУР всем пациентам проведена внутрипузырная химиотерапия. В качестве контроля обследовано 32 здоровых человека аналогичного возрастного диапазона.

Нейтрофилы выделяли из цельной гепаринизированной крови центрифугированием в двойном градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho=1,077$ г/см³ – для отделения лимфоцитов; $\rho=1,119$ г/см³ – для выделения нейтрофилов). Производили аликвотирование клеток в цитометрические кюветы на 4 пробы по 1 млн нейтрофилов в 200 мкл раствора Хенкса: контрольные пробы (добавлено 20 мкл раствора Хенкса), пробы с лактатом (1 мМ L-Lactic acid sodium salt, Sigma-Aldrich, США), глутаматом (15 мМ Glutamic acid monopotassium salt monohydrate, Fluka Chemie GmbH, Швейцария) и АДФ (1 мМ Adenosine 5'-diphosphate sodium salt, Sigma-Aldrich, США). После инкубации в течение 1 ч при температуре 37 °С в CO₂-инкубаторе (SANYO, Япония) изучали фагоцитарную и хемилюминесцентную активность нейтрофилов.

Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли во фракциях незрелых и зрелых клеток методом проточной цитометрии с помощью FITC-меченого стафилококкового белка А [26]. Для оценки фагоцитоза к 100 мкл суспензии нейтрофилов добавляли 10 мкл FITC-меченого белка А и инкубировали 30 мин при температуре 37 °С. Для гашения адгезированного на поверхности клеток FITC-меченого белка А к суспензии клеток добавляли раствор трипанового синего (0,2 мг/мл, ПанЭко, Россия). Анализ окрашенных нейтрофилов проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США) Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН. Для разделения общей популяции нейтрофилов на фракции незрелых и зрелых клеток использовали следующую панель моноклональных антител (Beckman Coulter, США): CD45-PC7

(phycoerythrin-cyanin 7), CD16-PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и CD14-PE (phycoerythrin). Незрелые нейтрофилы определялись по фенотипу CD45^{low}CD14^{-/low}CD16^{low}, зрелые клетки – по фенотипу CD45⁺CD14^{-/low}CD16⁺. Обработку полученных цитофлуориметрических результатов осуществляли с помощью программ Navios Software v. 1.2 и Kaluza v. 2.1.1 (Beckman Coulter, США). В каждой пробе анализировали не менее 50000 клеток. При определении фагоцитарной активности подсчитывали процент флуоресцирующих нейтрофилов (фагоцитарный индекс – ФИ) и средний уровень флуоресценции клеток (фагоцитарное число – ФЧ).

Состояние респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа [14]. В качестве индикатора хемилюминесценции использовали люцигенин. Выбор данного индикатора обусловлен тем, что люцигенин взаимодействует только с супероксид-радикалом, который определяется как первичная АФК и синтезируется НАДФН-оксидазой, локализованной на цитоплазматической мембране нейтрофилов [27, 28]. Оценка спонтанной и зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции осуществлялась в течение 90 мин на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «БЛМ-3607» (ООО «МедБиоТех», Россия). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (Tmax), максимальное значение интенсивности (Imax), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном,

оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции (Синд.) к площади спонтанной (Сспонт.) и определяли как индекс активации (ИА: Синд./Сспонт.).

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утверждёнными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Описание выборки производили с помощью подсчёта медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 1 и 3 квартилей (C₂₅–C₇₅). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США, 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При оценке фагоцитарной активности общая популяция нейтрофильных гранулоцитов была разделена на фракции незрелых и зрелых клеток. Обнаружено, что среди исследуемых параметров фагоцитоза у лиц контрольной группы наблюдается увеличение ФЧ при воздействии глутамата *in vitro* (табл. 1). Выявляются различия при сравнении показателей фагоцитарной активности нейтрофилов у лиц

Таблица 1. Фагоцитарная активность незрелых и зрелых нейтрофилов у больных РМП при воздействии метаболитов *in vitro* (Me (C₂₅–C₇₅))

Table 1. Phagocytic activity of immature and mature neutrophils in BC patients exposed to metabolites *in vitro* (Me (C₂₅–C₇₅))

Метаболиты	Контроль (n=32)		Больные РМП (n=37)		p
	ФИ, %	ФЧ, о.е.	ФИ, %	ФЧ, о.е.	
Незрелые нейтрофилы					
Контроль	15,32 (6,51–31,00)	3,80 (3,05–6,69)	10,62 (4,82–16,60)	3,13 (2,90–4,96)	ФИ=0,037
Лактат	19,95 (7,83–35,90)	4,12 (3,38–5,19)	16,42** (10,55–26,77)	4,32* (3,42–5,47)	
АДФ	15,84 (6,53–26,97)	3,75 (3,33–6,11)	15,81* (8,34– 0,30)	2,82 (2,67–5,17)	ФИ=0,040
Глутамат	18,80 (10,11–34,21)	4,48* (3,79–8,69)	12,52 (7,44–15,88)	3,90* (3,12–6,26)	
Зрелые нейтрофилы					
Контроль	21,10 (13,33–57,55)	4,13 (3,11–5,20)	19,13 (10,41–46,40)	3,60 (3,18–4,56)	ФИ=0,041
Лактат	38,44 (17,18–61,91)	4,24 (4,07–4,99)	21,55 (10,13–40,46)	3,52 (2,76–5,46)	
АДФ	22,32 (13,16–46,74)	4,01 (2,64–4,88)	25,87* (11,68–54,97)	2,81* (1,96–3,24)	ФЧ=0,044
Глутамат	20,26 (14,29–59,43)	3,80 (2,60–7,47)	19,78 (10,62–52,41)	3,31 (2,63–4,91)	

* , ** – p < 0,05 и p < 0,001 относительно ФИ и ФЧ нейтрофилов при инкубации без метаболитов (контроль); p – статистически значимые различия между показателями больных РМП и лиц контрольной группы.

контрольной группы и больных РМП. Так, при оценке фагоцитарной активности фракции незрелых нейтрофилов обнаружено, что у больных РМП снижены величины ФИ в контрольной пробе (без воздействия метаболитов *in vitro*) и при воздействии глутамата. При этом влияние глутамата *in vitro* на нейтрофилы проявляется в увеличении ФЧ как у лиц контрольной группы, так и больных РМП. Кроме того, у больных РМП воздействие лактата на клетки вызывает повышение ФЧ и ФИ, тогда как влияние АДФ – только в увеличении ФИ нейтрофилов.

При исследовании фагоцитарной активности зрелых нейтрофилов обнаружено, что у больных РМП снижены уровни ФИ при воздействии лактата *in vitro* и ФЧ под влиянием АДФ (см. табл. 1). При этом воздействие АДФ *in vitro* вызывало повышение ФИ и снижение ФЧ нейтрофилов у больных РМП. У лиц контрольной группы воздействие метаболитов *in vitro* не приводит к изменению фагоцитарной активности нейтрофилов.

При исследовании люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов обнаружено, что под влиянием метаболитов *in vitro* уровень и кинетика синтеза супероксид-радикала нейтрофилами лиц контрольной группы не изменяется (табл. 2). В то же время у больных РМП под воздействием метаболитов значительно изменяется активность люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов (табл. 3). Так, под влиянием лактата *in vitro* снижаются уровни I_{\max} и S спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов относительно исходных значений. АДФ вызывает снижение значений I_{\max} и S только спонтанной хемилюминесценции, что приводит к увеличению индекса активации нейтрофилов. Под влиянием глутамата понижаются уровни I_{\max}

и S спонтанной и индуцированной хемилюминесценции, но возрастает T_{\max} зимозан-индуцированной хемилюминесценции.

Выявляются различия в значениях хемилюминесцентных показателей нейтрофилов у лиц контрольной группы и больных РМП (см. табл. 2 и 3). При сравнении исходных (контроль) значений хемилюминесцентной активности обнаружено, что при РМП повышается S спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции ($p=0,048$) и I_{\max} и S зимозан-индуцированной хемилюминесценции ($p=0,024$ и $p=0,027$ соответственно) относительно контрольных значений. На фоне воздействия исследуемых метаболитов установлено, что при инкубации нейтрофилов *in vitro* с АДФ и глутаматом у больных РМП значительно повышаются величины индекса активации ($p=0,047$ и $p=0,024$ соответственно) относительно контрольных диапазонов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность противоопухолевых иммуновоспалительных механизмов во многом определяется функциональной активностью клеток иммунной системы. Нейтрофилы способны элиминировать опухолевые клетки механизмами фагоцитоза, внешнего киллинга и тропотоза [10, 13, 14]. При этом различные факторы ТМЕ (в том числе метаболические) способны не только ингибировать функциональную активность нейтрофилов, но и перепрограммировать клетки на реализацию проопухолевой активности [20–22]. Известно, что в ТМЕ уровни концентраций лактата и АДФ повышаются, тогда как содержание глутамата снижается [29, 30]. Нами обнаружено, что у больных РМП в крови снижено количество (ФИ)

Таблица 2. Показатели люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов у лиц контрольной группы (Ме ($C_{25} - C_{75}$))

Table 2. Indicators of lucigenin-dependent chemiluminescence of neutrophils in persons of the control group (Me ($C_{25} - C_{75}$))

Показатели	Контроль	Лактат	АДФ	Глутамат
Спонтанная хемилюминесценция				
T_{\max} , с	1720 (1200–2308)	1865 (1529–2309)	2072 (1864–2308)	2138 (1766–2330)
I_{\max} , о.е. $\times 10^3$	1,84 (0,82 – 3,34)	1,51 (0,82 – 3,65)	1,78 (0,83 – 3,94)	1,59 (0,97–4,97)
S , о.е. $\times \text{sec.}\times 10^6$	4,85 (2,63–10,28)	5,66 (3,27–10,50)	6,21 (2,86–11,90)	5,66 (3,67–13,73)
Зимозан-индуцированная хемилюминесценция				
T_{\max} , с	1775 (1163–1865)	1612 (1425–1953)	1708 (1421–1864)	1776 (1342–1784)
I_{\max} , о.е. $\times 10^3$	2,57 (1,21–4,01)	1,28 (1,01–2,35)	2,29 (1,29–4,08)	1,84 (1,05–2,57)
S , о.е. $\times \text{sec.}\times 10^6$	8,60 (4,12–12,41)	4,28 (3,37–7,73)	6,07 (4,47–13,26)	5,45 (3,89–8,25)
ИА	0,89 (0,55–4,14)	1,29 (0,60–1,54)	1,16 (0,70–2,20)	0,99 (0,70–1,43)

Таблица 3. Показатели люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов у больных РМП (Ме (C₂₅ – C₇₅))**Table 3.** Indicators of lucigenin-dependent neutrophil chemiluminescence in BC patients (Ме (C₂₅ – C₇₅))

Показатели	Контроль	Лактат	АДФ	Глутамат
Спонтанная хемилюминесценция				
Tmax, с	1643 (1474–2086)	1744 (1598–2397)	1862 (1487–2042)	1705 (1421–2197)
I _{max} , о.е.×10 ³	2,63 (1,74–5,15)	1,96** (0,97–3,10)	1,94** (1,23–2,70)	1,85** (1,20–3,25)
S, о.е.× sec.×10 ⁶	8,19 (5,79–15,61)	6,06** (3,07–9,86)	6,43** (4,12–8,69)	5,93* (4,09–9,85)
Зимозан-индуцированная хемилюминесценция				
Tmax, с	1527 (1125–1716)	1506 (1420–1835)	1475 (1243–1693)	1652** (1243–2103)
I _{max} , о.е.×10 ³	4,40 (2,16–8,14)	3,38*** (2,19–5,45)	4,61 (2,29–8,70)	3,23** (2,00–8,87)
S, о.е.× sec.×10 ⁶	15,07 (7,20–23,72)	10,89*** (6,47–16,69)	15,06 (7,99–24,91)	11,55** (6,30–23,90)
ИА	1,52 (1,06–3,09)	1,71 (1,22–3,73)	2,80* (1,06–4,15)	1,47 (1,09–4,55)

* , ** , *** – $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$ относительно показателей хемилюминесценции нейтрофилов при инкубации без метаболитов (контроль).

фагоцитирующих незрелых нейтрофилов, тогда как фагоцитарная активность зрелых клеток остаётся на уровне нормы. Однако реакция на воздействие метаболитов *in vitro* у лиц контрольной группы и больных РМП различается. Так, у лиц контрольной группы выявляется единственная реакция клеток на исследуемые метаболиты – увеличение ФЧ незрелых нейтрофилов при воздействии глутамата. В то же время у больных фагоцитарная активность нейтрофилов изменяется под воздействием всех исследуемых метаболитов, причём незрелая фракция клеток реагирует активнее. Так, лактат стимулирует фагоцитарную активность (за счёт увеличения фагоцитирующих клеток и интенсивности фагоцитоза) незрелых клеток, тогда как на фоне его воздействия у зрелых нейтрофилов снижается величина ФИ по сравнению с контрольными значениями. При инкубации с АДФ при РМП наблюдается повышение количества фагоцитирующих незрелых и зрелых нейтрофилов, а также снижение ФЧ фракции зрелых клеток. Кроме того, на фоне воздействия АДФ проявляются различия в величине ФЧ зрелых нейтрофилов между показателями контрольной группы и больных РМП. Воздействие глутамата на нейтрофилы больных РМП обуславливает снижение ФИ для незрелых нейтрофилов относительно контрольных значений и так же как и для лиц контрольной группы – увеличение ФЧ для фракции незрелых клеток.

Лактат способен метаболически и эпигенетически ингибировать функцию клеток иммунной системы, тогда как АДФ реализует своё воздействие через пуринергические рецепторы [30–32]. Глутамат используется клетками для белкового синтеза, сниженная его концентрация (за счёт метаболической активности опухолевых клеток)

ингибирует реактивность клеток иммунной системы [30]. Кроме того, необходимо отметить, что именно во фракции незрелых нейтрофилов в настоящее время выделяют популяцию миелоидных супрессорных клеток (МСК), которые ингибируют противоопухолевый иммунитет [33, 34]. Следовательно, стимулирование фагоцитарной активности фракции незрелых нейтрофилов лактатом и АДФ характеризует иммунопатогенетические процессы метаболической стимуляции опухолевых клеток (продуцирующих лактат и АДФ) супрессорных клеток, которые, ингибируя механизмы противоопухолевого иммунитета, стимулируют рост опухоли. Реакцию на данные метаболиты фракции зрелых клеток у больных РМП нельзя определить как стимулирующую. В свою очередь, воздействие глутамата на нейтрофилы лиц контрольной группы и больных РМП, по-видимому, реализуется преимущественно через стимуляцию белкового обмена. Соответственно, реакция на данный метаболит более выражена у фракции незрелых нейтрофилов.

Другой механизм функциональной активности нейтрофилов реализуется через механизмы внешнего киллинга и троптоза, в процессе которых активируется НАДФН-оксидаза и синтезируется супероксид-радикал, оказывающий цитотоксическое действие на клетку-мишени [13, 27, 28]. С помощью люцигенин-зависимой хемилюминесценции мы обнаружили, что уровень синтеза супероксид-радикала нейтрофилами больных РМП значительно выше, чем у лиц контрольной группы, причём и в реакциях спонтанной хемилюминесценции (нейтрофилы находятся в состоянии относительного покоя), и при зимозан-индуцированной хемилюминесценции (при индукции респираторного взрыва зимозаном). В литературе

отмечено, что высокий уровень синтеза АФК нейтрофилами в ТМЕ способствует повреждению здоровых клеток (в первую очередь эндотелиальных клеток), что дополнительно стимулирует развитие кровеносных сосудов и прогрессированию опухоли [20–22]. У лиц контрольной группы исследуемые метаболиты не вызывают изменения значений хемилюминесцентных показателей, тогда как у больных РМП изменяются величины показателей как спонтанной, так и зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Так, под влиянием лактата и глутамата *in vitro* у обследованных пациентов снижается интенсивность спонтанной и индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов. При этом при воздействии глутамата также повышается Тmax зимозан-индуцированной хемилюминесценции. Время выхода на максимум характеризует скорость развития респираторного взрыва до максимального уровня, что зависит от эффективности передачи регуляторных сигналов и метаболического состояния клеток [27]. АДФ снижает интенсивность спонтанной хемилюминесценции нейтрофилов, но повышает значения показателей индуцированной хемилюминесценции, что приводит к увеличению индекса активации, характеризующего уровень метаболических резервов в клетках для синтеза АФК. При этом на фоне изменений в показателях хемилюминесценции нейтрофилов у больных РМП также выявляется увеличение индекса активации при воздействии АДФ и глутамата относительно контрольных значений. Таким образом, исследуемые метаболиты по-разному модулируют люцигенин-зависимую хемилюминесценцию нейтрофилов, что, по-видимому, связано прежде всего с их влиянием на внутриклеточный метаболизм и, соответственно, активность НАДФН-оксидазы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нейтрофилы больных РМП более чувствительны к воздействию метаболитов ТМЕ, чем нейтрофилы здоровых людей. Под воздействием лактата и АДФ

(продукты опухолевых клеток) стимулируется фагоцитарная активность популяции незрелых нейтрофилов, в составе которых определяются миелоидные супрессорные клетки, ингибирующие противоопухолевый иммунитет. Метаболиты ТМЕ значительно модулируют активность респираторного взрыва нейтрофилов у больных РМП. Выявленные механизмы регуляторного влияния опухоли на нейтрофилы необходимо учитывать при планировании терапии онкологических заболеваний.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFO

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках проекта «Механизмы метаболического репрограммирования клеток врожденного иммунитета при опухолевом росте», финансируемого Краевым государственным автономным учреждением «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности».

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и написание статьи, прочли и одобрили направление рукописи на публикацию.

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Financing source. The study made according to the project “Metabolic reprogramming mechanisms of innate immunity cells during tumor growth”, funded by “Krasnoyarsk Regional Foundation for Research and Technical Activities Support”.

Author participation. All authors made a significant contribution to the implementation of the research and the preparation of the paper. The authors read and approved submission of the manuscript for publication.

Conflict of interests. All authors confirmed absence conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Носов А.К., Кротов Н.Ф., Беркут М.В. В поисках Атлантиды: предиктивные биомаркеры ответа на иммунотерапию // Онкоурология. 2021. Т. 17, № 1. С. 167–177. doi: 10.17650/1726-9776-2021-17-1-167-177
2. Rasteiro A.M., Sá e Lemos E., Oliveira P.A., Gil da Costa R.M. Molecular Markers in Urinary Bladder Cancer: Applications for Diagnosis, Prognosis and Therapy // Veterinary Sciences. 2022. Vol. 9, N 3. P. 107. doi: 10.3390/vetsci9030107
3. Пшихачев А.М., Михалева Л.М., Гусниев М.А., и др. Клинико-морфологические особенности немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря: влияние на лечение, прогноз и рецидив заболевания (обзор литературы) // Онкоурология. 2021. Т. 17, № 1. С. 134–141. doi: 10.17650/1726-9776-2021-17-1-134-141
4. Сучилова М.М., Николаев А.Е., Шапиев А.Н., и др. Современные возможности лучевой диагностики рака мочевого пузыря // Современная онкология. 2020. Т. 22, № 4. С. 101–108. doi: 10.26442/18151434.2020.4.200257
5. Guillerey C. NK Cells in the Tumor Microenvironment // Adv Exp Med Biol. 2020. Vol. 1273, P. 69–90. doi: 10.1007/978-3-030-49270-0_4
6. Tallon de Lara P., Castanon H., Sterpi M., van den Broek M. Antimetastatic defense by CD8(+) T cells // Trends Cancer. 2022. Vol. 8, N 2. P. 145–157. doi: 10.1016/j.trecan.2021.10.006
7. Zhao Y., Shao Q., Peng G. Exhaustion and senescence: two crucial dysfunctional states of T cells in the tumor microenvironment // Cell Mol Immunol. 2020. Vol. 17, N 1. P. 27–35. doi: 10.1038/s41423-019-0344-8

8. Sun Y., Chang W., Yao J., et al. Effect of immune checkpoint inhibitors in patients with gastric hepatoid adenocarcinoma: a case report and literature review // *J Int Med Res.* 2022. Vol. 50, N 4. P. 3000605221091095. doi: 10.1177/03000605221091095
9. Yanagisawa T., Mori K., Katayama S., et al. Hematological prognosticators in metastatic renal cell cancer treated with immune checkpoint inhibitors: a meta-analysis // *Immunotherapy.* 2022. Vol. 14, N 9. P. 709–725. doi: 10.2217/imt-2021-0207
10. Jin L., Kim H.S., Shi J. Neutrophil in the Pancreatic Tumor Microenvironment // *Biomolecules.* 2021. Vol. 11, N 8. P. doi: 10.3390/biom11081170
11. McFarlane A.J., Fercocq F., Coffelt S.B., Carlin L.M. Neutrophil dynamics in the tumor microenvironment // *J Clin Invest.* 2021. Vol. 131, N 6. P. doi: 10.1172/JCI143759
12. Zeindler J., Angehrn F., Droeser R., et al. Infiltration by myeloperoxidase-positive neutrophils is an independent prognostic factor in breast cancer // *Breast Cancer Res Treat.* 2019. Vol. 177, N 3. P. 581–589. doi: 10.1007/s10549-019-05336-3
13. Matlung H.L., Babes L., Zhao X.W., et al. Neutrophils Kill Antibody-Opsonized Cancer Cells by Troglitosis // *Cell Rep.* 2018. Vol. 23, N 13. P. 3946–3959 e3946. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.082
14. Савченко А.А., Борисов А.Г., Модестов А.А., и др. Особенности взаимосвязи фенотипа и хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных раком почки // *Медицинская иммунология.* 2016. Т. 18, № 3. С. 259–268. doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-259-268
15. Langju M., Palacios-Acedo A.L., Crescence L., et al. Neutrophils, Cancer and Thrombosis: The New Bermuda Triangle in Cancer Research // *Int J Mol Sci.* 2022. Vol. 23, N 3. P. doi: 10.3390/ijms23031257
16. Taucher E., Taucher V., Fink-Neuboeck N., et al. Role of Tumor-Associated Neutrophils in the Molecular Carcinogenesis of the Lung // *Cancers (Basel).* 2021. Vol. 13, N 23. doi: 10.3390/cancers13235972
17. Zhao Y., Rahmy S., Liu Z., et al. Rational targeting of immunosuppressive neutrophils in cancer // *Pharmacol Ther.* 2020. Vol. 212. P. 107556. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107556
18. De Meo M.L., Spicer J.D. The role of neutrophil extracellular traps in cancer progression and metastasis // *Semin Immunol.* 2021. Vol. 57. P. 101595. doi: 10.1016/j.smim.2022.101595
19. Mao C., Xu X., Ding Y., Xu N. Optimization of BCG Therapy Targeting Neutrophil Extracellular Traps, Autophagy, and miRNAs in Bladder Cancer: Implications for Personalized Medicine // *Front Med (Lausanne).* 2021. Vol. 8. P. 735590. doi: 10.3389/fmed.2021.735590
20. Giese M.A., Hind L.E., Huttenlocher A. Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment // *Blood.* 2019. Vol. 133, N 20. P. 2159–2167. doi: 10.1182/blood-2018-11-844548
21. Hinshaw D.C., Shevde L.A. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression // *Cancer Res.* 2019. Vol. 79, N 18. P. 4557–4566. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3962
22. Vitale I., Manic G., Coussens L.M., et al. Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment // *Cell Metab.* 2019. Vol. 30, N 1. P. 36–50. doi: 10.1016/j.cmet.2019.06.001
23. Kooshki L., Mahdavi P., Fakhri S., et al. Targeting lactate metabolism and glycolytic pathways in the tumor microenvironment by natural products: A promising strategy in combating cancer // *Biofactors.* 2022. Vol. 48, N 2. P. 359–383. doi: 10.1002/biof.1799
24. Pan T., Liu J., Xu S., et al. ANKRD22, a novel tumor microenvironment-induced mitochondrial protein promotes metabolic reprogramming of colorectal cancer cells // *Theranostics.* 2020. Vol. 10, N 2. P. 516–536. doi: 10.7150/thno.37472
25. Zou J., Du K., Li S., et al. Glutamine Metabolism Regulators Associated with Cancer Development and the Tumor Microenvironment: A Pan-Cancer Multi-Omics Analysis // *Genes (Basel).* 2021. Vol. 12, N 9. P. doi: 10.3390/genes12091305
26. Савченко А.А., Борисов А.Г., Беленюк В.Д., Мошев А.В. Изменение субпопуляционного состава и фагоцитарной активности моноцитов у больных раком почки при воздействии метаболитов *in vitro* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2021. Т. 171, № 3. С. 344–348. doi: 10.47056/0365-9615-2021-171-3-344-348
27. Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Борисов А.Г. Методы оценки и роль респираторного взрыва в патогенезе инфекционно-воспалительных заболеваний // *Инфекция и иммунитет.* 2017. Т. 7, № 4. С. 327–340. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-327-340
28. Wu Q., Gурpinar A., Roberts M., et al. Identification of the NADPH Oxidase (Nox) Subtype and the Source of Superoxide Production in the Micturition Centre // *Biology (Basel).* 2022. Vol. 11, N 2. P. doi: 10.3390/biology11020183
29. Bhagat T.D., Von Ahrens D., Dawlaty M., et al. Lactate-mediated epigenetic reprogramming regulates formation of human pancreatic cancer-associated fibroblasts // *Elife.* 2019. Vol. 8, N. P. doi: 10.7554/eLife.50663
30. Guerra L., Bonetti L., Brenner D. Metabolic Modulation of Immunity: A New Concept in Cancer Immunotherapy // *Cell Rep.* 2020. Vol. 32, N 1. P. 107848. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107848
31. Layhadi J.A., Fountain S.J. ATP-Evoked Intracellular Ca(2+) Responses in M-CSF Differentiated Human Monocyte-Derived Macrophage are Mediated by P2X4 and P2Y11 Receptor Activation // *Int J Mol Sci.* 2019. Vol. 20, N 20. P. doi: 10.3390/ijms20205113
32. Romero-Garcia S., Moreno-Altamirano M.M., Prado-Garcia H., Sanchez-Garcia F.J. Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance // *Front Immunol.* 2016. Vol. 7. P. 52. doi: 10.3389/fimmu.2016.00052
33. Blevе А., Consonni F.M., Porta C., et al. Evolution and Targeting of Myeloid Suppressor Cells in Cancer: A Translational Perspective // *Cancers (Basel).* 2022. Vol. 14, N 3. P. doi: 10.3390/cancers14030510
34. Sica A., Massarotti M. Myeloid suppressor cells in cancer and autoimmunity // *J Autoimmun.* 2017. Vol. 85. P. 117–125. doi: 10.1016/j.jaut.2017.07.010

REFERENCES

1. Nosov AK, Krotov NF, Berkut MV. Atlantis exploration: predictive biomarkers to immunotherapy response. *Cancer Urology.* 2021;17(1):167–177. (In Russ). doi: 10.17650/1726-9776-2021-17-1-167-177
2. Rasteiro AM, Sá e Lemos E, Oliveira PA, Gil da Costa RM. Molecular Markers in Urinary Bladder Cancer: Applications for Diagnosis, Prognosis and Therapy. *Veterinary Sciences.* 2022;9(3):107. doi: 10.3390/vetsci9030107

3. Pshikhachev AM, Mikhaleva LM, Gusniev MA, et al. Clinical and morphological features of non-muscle invasive bladder cancer: implications for treatment, prognosis and relapse of the disease (literature review). *Cancer Urology*. 2021;17(1):134–141. (In Russ). doi: 10.17650/1726-9776-2021-17-1-134-141
4. Suchilova MM, Nikolaev AE, Shapiev AN, et al. Modern possibilities of radiological diagnosis of bladder cancer. *Journal of Modern Oncology*. 2021;22(4):101–108. (In Russ). doi: 10.26442/18151434.2020.4.200257
5. Guillerey C. NK Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1273:69–90. doi: 10.1007/978-3-030-49270-0_4
6. Tallon de Lara P, Castanon H, Sterpi M, van den Broek M. Antimetastatic defense by CD8(+) T cells. *Trends Cancer*. 2022;8(2):145–157. doi: 10.1016/j.trecan.2021.10.006
7. Zhao Y, Shao Q, Peng G. Exhaustion and senescence: two crucial dysfunctional states of T cells in the tumor microenvironment. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(1):27–35. doi: 10.1038/s41423-019-0344-8
8. Sun Y, Chang W, Yao J, et al. Effect of immune checkpoint inhibitors in patients with gastric hepatoid adenocarcinoma: a case report and literature review. *J Int Med Res*. 2022;50(4):3000605221091095. doi: 10.1177/03000605221091095
9. Yanagisawa T, Mori K, Katayama S, et al. Hematological prognosticators in metastatic renal cell cancer treated with immune checkpoint inhibitors: a meta-analysis. *Immunotherapy*. 2022;14(9):709–725. doi: 10.2217/imt-2021-0207
10. Jin L, Kim HS, Shi J. Neutrophil in the Pancreatic Tumor Microenvironment. *Biomolecules*. 2021;11(8). doi: 10.3390/biom11081170
11. McFarlane AJ, Fercoq F, Coffelt SB, Carlin LM. Neutrophil dynamics in the tumor microenvironment. *J Clin Invest*. 2021;131(6). doi: 10.1172/JCI143759
12. Zeindler J, Angehrn F, Drosner R, et al. Infiltration by myeloperoxidase-positive neutrophils is an independent prognostic factor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2019;177(3):581–589. doi: 10.1007/s10549-019-05336-3
13. Matlung HL, Babes L, Zhao XW, et al. Neutrophils Kill Antibody-Opsonized Cancer Cells by Trogoptosis. *Cell Rep*. 2018;23(13):3946–3959 e3946. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.082
14. Savchenko AA, Borisov AG, Modestov AA, et al. Phenotypic features and chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes in the patients with renal cancer. *Medical Immunology (Russia)*. 2016;18(3):259–268. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-259-268
15. Langiu M, Palacios-Acedo AL, Crescence L, et al. Neutrophils, Cancer and Thrombosis: The New Bermuda Triangle in Cancer Research. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3). doi: 10.3390/ijms23031257
16. Taucher E, Taucher V, Fink-Neuboeck N, et al. Role of Tumor-Associated Neutrophils in the Molecular Carcinogenesis of the Lung. *Cancers (Basel)*. 2021;13(23). doi: 10.3390/cancers13235972
17. Zhao Y, Rahmy S, Liu Z, et al. Rational targeting of immunosuppressive neutrophils in cancer. *Pharmacol Ther*. 2020;212:107556. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107556
18. De Meo ML, Spicer JD. The role of neutrophil extracellular traps in cancer progression and metastasis. *Semin Immunol*. 2021;57:101595. doi: 10.1016/j.smim.2022.101595
19. Mao C, Xu X, Ding Y, Xu N. Optimization of BCG Therapy Targeting Neutrophil Extracellular Traps, Autophagy, and miRNAs in Bladder Cancer: Implications for Personalized Medicine. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:735590. doi: 10.3389/fmed.2021.735590
20. Giese MA, Hind LE, Huttenlocher A. Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood*. 2019;133(20):2159–2167. doi: 10.1182/blood-2018-11-844548
21. Hinshaw DC, Shevde LA. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res*. 2019;79(18):4557–4566. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3962
22. Vitale I, Manic G, Coussens LM, et al. Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Cell Metab*. 2019;30(1):36–50. doi: 10.1016/j.cmet.2019.06.001
23. Kooshki L, Mahdavi P, Fakhri S, et al. Targeting lactate metabolism and glycolytic pathways in the tumor microenvironment by natural products: A promising strategy in combating cancer. *Biofactories*. 2022;48(2):359–383. doi: 10.1002/biof.1799
24. Pan T, Liu J, Xu S, et al. ANKRD22, a novel tumor microenvironment-induced mitochondrial protein promotes metabolic reprogramming of colorectal cancer cells. *Theranostics*. 2020;10(2):516–536. doi: 10.7150/thno.37472
25. Zou J, Du K, Li S, et al. Glutamine Metabolism Regulators Associated with Cancer Development and the Tumor Microenvironment: A Pan-Cancer Multi-Omics Analysis. *Genes (Basel)*. 2021;12(9). doi: 10.3390/genes12091305
26. Savchenko AA, Borisov AG, Beleniuk VD, Moshev AV. Changes in the subsets and phagocytic activity of monocytes in patients with kidney cancer under the influence of metabolites in vitro. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2021;171(3):344–348. (In Russ). doi: 10.47056/0365-9615-2021-171-3-344-348
27. Savchenko AA, Kudryavtsev IV, Borisov AG. Methods of Estimation and the Role of Respiratory Burst in the Pathogenesis of Infectious and Inflammatory Diseases. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018;7(4):327–340. (In Russ). doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-327-340
28. Wu Q, Gurpinar A, Roberts M, et al. Identification of the NADPH Oxidase (Nox) Subtype and the Source of Superoxide Production in the Micturition Centre. *Biology (Basel)*. 2022;11(2). doi: 10.3390/biology11020183
29. Bhagat TD, Von Ahrens D, Dawlaty M, et al. Lactate-mediated epigenetic reprogramming regulates formation of human pancreatic cancer-associated fibroblasts. *Elife*. 2019;8. doi: 10.7554/eLife.50663
30. Guerra L, Bonetti L, Brenner D. Metabolic Modulation of Immunity: A New Concept in Cancer Immunotherapy. *Cell Rep*. 2020;32(1):107848. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107848
31. Layhadi JA, Fountain SJ. ATP-Evoked Intracellular Ca(2+) Responses in M-CSF Differentiated Human Monocyte-Derived Macrophage are Mediated by P2X4 and P2Y11 Receptor Activation. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20). doi: 10.3390/ijms20205113
32. Romero-Garcia S, Moreno-Altamirano MM, Prado-Garcia H, Sanchez-Garcia FJ. Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. *Front Immunol*. 2016;7:52. doi: 10.3389/fimmu.2016.00052
33. Blevie A, Consonni FM, Porta C, et al. Evolution and Targeting of Myeloid Suppressor Cells in Cancer: A Translational Perspective. *Cancers (Basel)*. 2022;14(3). doi: 10.3390/cancers14030510
34. Sica A, Massarotti M. Myeloid suppressor cells in cancer and autoimmunity. *J Autoimmun*. 2017;85:117–125. doi: 10.1016/j.jaut.2017.07.010

ОБ АВТОРАХ

Савченко Андрей Анатольевич, д.м.н., профессор;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5829-672x>;
eLibrary SPIN: 3132-8260;
e-mail: aasavchenko@yandex.ru

***Зуков Руслан Александрович**, д.м.н., профессор;
адрес: 660133, Россия, Красноярский край, г. Красноярск,
ул. 1-я Смоленская, д. 16;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7210-3020>;
eLibrary SPIN: 3632-8415;
e-mail: ethics.committee@mail.ru

Фирсов Михаил Анатольевич, к.м.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0887-0081>;
eLibrary SPIN: 6308-6260;
e-mail: firsma@mail.ru

Слепов Евгений Владимирович, к.биол.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3787-3126>;
eLibrary SPIN: 2097-0304;
e-mail: slepov99@mail.ru

Беленюк Василий Дмитриевич;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2848-0846>;
eLibrary SPIN: 6195-6630;
e-mail: dyh.88@mail.ru

Гвоздев Иван Игоревич;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1041-9871>;
eLibrary SPIN: 6203-4651;
e-mail: leshman-mult@mail.ru

Борисов Александр Геннадьевич, к.м.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9026-2615>;
eLibrary SPIN: 9570-2254;
e-mail: 2410454@mail.ru

AUTHORS INFO

Andrei A. Savchenko, MD, Dr. Sci. (Med.), Professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5829-672x>;
eLibrary SPIN: 3132-8260;
e-mail: aasavchenko@yandex.ru

***Ruslan A. Zukov**, MD, Dr. Sci. (Med.), Professor;
address: 16, 1st Smolenskaya St., Krasnoyarsk, Krasnoyarsk
region, 660133, Russia;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7210-3020>;
eLibrary SPIN: 3632-8415;
e-mail: ethics.committee@mail.ru

Mikhail A. Firsov, MD, Cand. Sci. (Med.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0887-0081>;
eLibrary SPIN: 6308-6260;
e-mail: firsma@mail.ru

Evgeniy V. Slepov, MD, Cand. Sci. (Biol.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3787-3126>;
eLibrary SPIN: 2097-0304;
e-mail: slepov99@mail.ru

Vasiliy D. Beleniuk;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2848-0846>;
eLibrary SPIN: 6195-6630;
e-mail: dyh.88@mail.ru

Ivan I. Gvozdev;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1041-9871>;
eLibrary SPIN: 6203-4651;
e-mail: leshman-mult@mail.ru

Alexander G. Borisov, MD, Cand. Sci. (Med.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9026-2615>;
eLibrary SPIN: 9570-2254;
e-mail: 2410454@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author