

Гребнев Дмитрий Юрьевич

**ВЛИЯНИЕ ЦИТОПРОТЕКТИВНОЙ ТЕРАПИИ ТИЗОЛЕМ
НА ПРОЦЕССЫ РЕГЕНЕРАЦИИ МИЕЛОИДНОЙ ТКАНИ
И ЭПИТЕЛИЯ ТОЩЕЙ КИШКИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ
ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

14.00.16 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Уральская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научный руководитель

Чл. – кор. РАМН, заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор

Ястребов Анатолий Петрович

Официальные оппоненты

Заслуженный деятель науки Республики Башкортостан,
доктор медицинских наук, профессор

Еникеев Дамир Ахметович

доктор медицинских наук, профессор

Ларионов Леонид Петрович

Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Челябинская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Защита состоится «___» _____ 2006 года, в «___» часов на заседании диссертационного совета Д 208.102.03 при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Уральская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Раскрытие новых механизмов регенерации тканей в экстремальных условиях позволяет определить и внедрить новые принципы патогенетической терапии, вести поиск новых активных факторов, влияющих на эти процессы. С этой целью используются биологически активные вещества, влияющие на митогенную активность, обладающие свойством адаптогенов, цитопротекторов и др. (Горизонтов П.Д., 1976, Меерсон Ф.З., 1986, Ястребов А.П., 2005).

Однако в настоящее время остается актуальной проблема восстановления регенерации тканей в условиях воздействия экстремальных факторов, а ее успешное решение во многом зависит от поиска новых активных препаратов, способных усиливать тканевую регенерацию.

В этом отношении наше внимание привлёк аквакомплекс глицеросольвата титана (тизол). Препарат тизоль рекомендован МЗ РФ (Р 001667/01 – 2002) в качестве лекарственного средства для местного применения как обладающий противовоспалительным действием, что послужило толчком для активного внедрения тизоля в клиническую практику и внесения в государственный реестр лекарственных средств МЗ РФ (Ларионов Л.П., Емельянова И.В., 2003). Химическая формула тизоля: $\text{TiO}_4 \cdot (\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2) \cdot (\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3) \cdot (\text{H}_2\text{O})_{40}$, молекулярная масса 2054.

Тизоль был разработан и выпускается предприятием «ОЛИМП» («Общество лабораторных исследований медицинских препаратов», г. Екатеринбург; Емельянова И.В., Лопатина Г.П., Филатова Е.А. 1988).

На основании ранее проведенных экспериментальных исследований установлено, что тизоль обладает радиопротекторным, противовоспалительным, анальгезирующим действием, а также проводниковой активностью при применении в комплексе с другими лекарственными препаратами (Знаменский В.В., Берзин С.А., Герасимов В.Б., Ларионов Л.П., 2003г.).

Тизоль не токсичен и не является потенциальным аллергеном. Выявлено, что при парентеральном введении тизоль депонируется в клетках паренхиматозных органов, а также в клетках быстро обновляющихся тканей (миелоидная ткань, эпителий кишечника). Через 2 недели после введения тизоля его содержание в организме (на основании исследования кинетики титана) соответствует значениям нормы, что свидетельствует о достаточно быстром выведении препарата из организма экспериментальных животных (Ларионов Л.П., 1989 г.).

Было показано также, что тизоль оказывает выраженный радиопротекторный эффект при энтеральном его введении до радиационного облучения экспериментальным животным. Между тем парентеральное введение этого препарата в клинической практике пока не используется вследствие отсутствия экспериментальных данных о его влиянии на органы и системы как в физиологических условиях, так и при патологических процессах, а также воздействии экстремальных факторов.

Известно, что результирующая клеточного обновления, дающая основание для оценки регенерации ткани, определяется учетом пролиферации клеток и программированной клеточной гибели (апоптоза). В этом отношении нельзя было исключить, что тизоль мог оказаться активным по отношению к обоим процессам.

Можно было предположить также, что действие препарата тизоль на регенерацию тканей могло быть усилено совместным использованием цитопротективных препаратов, действие которых направлено на генетический аппарат клетки (деринат, лейкоген и др.). Между тем, такая комбинация тизоля со стимуляторами клеточной пролиферации не исследовалась, в то время как сочетанное действие могло оказаться весьма благоприятным на исход клеточной репарации в условиях воздействия экстремальных факторов.

Среди экстремальных факторов наше внимание было сосредоточено на действии ионизирующего излучения, поскольку его повреждающее действие распространяется преимущественно на быстрообновляющиеся ткани, которые нуждаются в поддержании высокого регенераторного потенциала.

Все изложенное выше и позволило обосновать цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования. Изучить действие препарата тизоль при его парентеральном введении в физиологических условиях и в условиях воздействия ионизирующего излучения.

Задачи исследования:

1. Исследовать действие различных доз тизоля на регенераторную и мутагенную активность эпителия кишечника, а также изучить состояние кроветворения и регенерацию эпителия кишечника в физиологических условиях в различные сроки после парентерального введения тизоля.

2. Выяснить особенности течения регенераторных процессов, мутагенную активность в миелоидной ткани и в эпителии тонкого кишечника после воздействия различных доз ионизирующего излучения и введения тизоля.

3. Оценить возможность использования при постлучевом воздействии препарата деринат для усиления цитопротективного действия тизоля.

4. Охарактеризовать цитопротективное действие сочетанного парентерального введения тизоля и дерината при воздействии ионизирующего излучения.

5. Дать сравнительную характеристику механизму цитопротективного действия тизоля и дерината в условиях воздействия на организм экспериментальных животных ионизирующего излучения.

Научная новизна. В настоящей работе впервые выявлено, что при парентеральном введении препарат тизоль оказывает выраженное антиапоптогенное действие на радиочувствительные ткани (миелоидная ткань, эпителий тощей кишки). Показано, что снижение апоптоза при терапии тизолем имеет дозозависимый характер.

Антиапоптогенное действие тизоля усиливается после комбинированного введения цитопротектора тизоль и препарата деринат.

На фоне терапии тизолом, деринатом и комплексной терапии тизолом и деринатом отмечено снижение мутагенной активности. Однако при комбинированном введении препаратов снижение мутагенной активности в эпителии тощей кишки было достоверно более значимым.

Теоретическая и практическая значимость работы. В эксперименте показано терапевтическое действие на радиочувствительные ткани (миелоидная ткань и эпителий тощей кишки) на фоне терапии цитопротектором тизоль и комплексной терапии тизолом и деринатом. При этом наиболее предпочтительным является использование комплексной терапии, поскольку помимо антиапоптогенного действия здесь имело место более выраженное снижение мутагенной активности.

Обоснована возможность комбинированного введения цитопротектора обладающего антиапоптогенным действием и препарата стимулирующего регенерацию для терапии постлучевого синдрома, предшествующей интенсивной химиотерапии.

Апробация работы и публикации. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на:

1. Научно – практической конференции «Человек и здоровье: применение биокорректоров», г. Москва, 2005 г.
2. Научной конференции молодых ученых «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины», г. Санкт – Петербург, 2006 г.
3. IX Всероссийской научно – практической конференции «Человек и его здоровье», г. Санкт – Петербург, 2006 г.
4. 61 научной конференции студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения», г. Екатеринбург, 2006 г.
5. X Российский онкологический конгресс, г. Москва, 2006 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 работ.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Тизоль при парентеральном введении в условиях воздействия ионизирующего излучения оказывает антиапоптогенное действие, снижает мутагенную активность, стимулирует процессы клеточного обновления. Антиапоптогенное действие тизоля имеет дозозависимый характер, о чем свидетельствует снижение выраженности апоптоза при увеличении дозы вводимого препарата.
2. Тизоль при парентеральном введении в условиях воздействия ионизирующего излучения оказывает антиапоптогенное действие, снижает мутагенную активность, стимулирует процессы клеточного обновления. Антиапоптогенное действие тизоля имеет дозозависимый характер, о чем свидетельствует снижение выраженности апоптоза при увеличении дозы вводимого препарата.
3. Комплексное использование тизоля и репаранта деринат в условиях постлучевого повреждения оказывает наиболее существенный цитопротективный эффект. При этом цитопротективное действие дерината реализуется через стимуляцию митотической активности и снижение индуцированного мутагенеза, в

то время как тизоль обладает преимущественным действием на снижение апоптоза.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 216 страницах, содержит 99 таблиц, 10 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, двух глав собственных исследований, общего заключения, выводов и списка литературы, включающего 110 работ на русском языке и 160 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Общая характеристика лабораторных животных использованных в исследованиях.

Эксперименты выполнены на 234 крысах-самцах линии Wistar (возраста 6-8 месяцев, массой 200-220 г). Животные содержались в стандартных условиях лабораторного вивария при естественном освещении и сбалансированном рационе. Изучалось воздействие ионизирующего излучения дозами 0,5 и 3 Гр (мощность поглощенной дозы 15 сГр/мин). Тотальное облучение крыс осуществлялось однократно γ -излучением. В качестве источника γ -квантов был использован ^{60}Co . Контрольную группу составили животные, не подвергшиеся облучению. В каждой группе насчитывалось 72 крысы. Внутри группы было выделено 4 подгруппы по 9 животных в каждой в зависимости от используемого препарата.

В эксперименте, проведенном на 1 сутки после облучения дозой ионизирующего излучения 3 Гр, с целью изучения апоптоза после введения различных доз препарата тизоль, дополнительно было задействовано 18 подопытных крыс.

Дозы и способы введения препаратов.

Крысам парентерально вводили препараты:

- Животным первой подгруппы вводили препарат тизоль (50% водный раствор аквакомплекса глицеросольвата титана) внутривентриально 2,5 г/кг, что соответствует 50 мг микроэлемента титан на 1 кг веса животного.
- Животным второй подгруппы вводили деринат (1,5% водный раствор дезоксирибонуклеата натрия) внутримышечно 1 мг/кг;
- Животным третьей подгруппы вводили вышеуказанные препараты в половинных дозах: тизоль внутривентриально 1,25 г/кг (25 мг микроэлемента титан на 1 кг веса животного) и деринат внутримышечно 0,5 мг/кг совместно.
- Четвертая подгруппа крыс являлась контролем в каждой из групп. Животным вводили физиологический раствор – 1 мл внутривентриально.

Соответствующие препараты вводили через 1 час после облучения. Аутопсию участка тонкого кишечника (тощая кишка) и костного мозга осуществляли через 24 часа после облучения и однократного введения препаратов, а у крыс, у которых аутопсию участка тонкого кишечника (тощая кишка) и костного мозга осуществляли на 7 сутки после облучения, препараты вводили ежедневно в течение 5 суток в указанных выше дозах.

С целью получения более полной информации об активности апоптоза и изучения на предмет антиапоптогенного действия различных доз препарата тизоль были проведены дополнительные исследования.

В этом случае внутрибрюшинно вводили 0,8 мл 25 % водного раствора аквакомплекса глицеросольвата титана (1,0 г/кг, что соответствует 20 мг микроэлемента титан на 1 кг веса животного) и 0,4 мл 5 % водного раствора аквакомплекса глицеросольвата титана (0,1 г/кг, что соответствует 2 мг микроэлемента титан на 1 кг веса животного).

Морфологическое исследование крови и костного мозга.

Кровь для исследования брали у крыс из хвостовой вены.

Подсчет количества лейкоцитов проводили в счетной камере Горяева (Кост Е.А. 1975).

При определении числа ретикулоцитов их подсчитывали в окрашенных бриллиант – крезил – блау мазках крови на 2000 эритроцитов.

Мазки периферической крови окрашивали по Романовскому. Подсчет лейкоцитарной формулы проводили на 200 клеток.

Для исследования морфологии костного мозга его извлекали из бедренной кости. Мазки костного мозга окрашивали по Нохту (Кост Е.А., 1975). Подсчет миелограммы производили на 500 клеток.

Определяли общее количество миелокариоцитов в костном мозге бедренной кости (Груздев Г. П., 1965).

Были изготовлены цитологические препараты костного мозга, окрашенные азур II – эозином (для подсчета митотического, апоптотического индексов, уровня патологических митозов и анализа миелограммы) и по Паппенгейму (для выявления микроядер в ретикулоцитах).

Митотический индекс клеток эритроидного и гранулоцитарного дифферонов гемопоэза рассчитывался как отношение числа митотически делящихся элементов изучаемого роста к общему числу подсчитанных клеток, выраженное в процентах (Кост Е.А., 1975).

Апоптотический индекс определялся отношением клеток соответствующего роста в состоянии апоптоза к общему числу подсчитанных клеток, выраженное в процентах.

С целью количественной оценки интенсивности процессов регенерации в изучаемых дифферонах рассчитывали индекс клеточного обновления (ИКО), равный отношению митотического индекса к апоптотическому.

МЯТ рассчитывали как отношение числа ретикулоцитов с микроядрами к 1000 подсчитанных ретикулоцитов, выраженное в процентах (Методические рекомендации по оценке мутагенной активности химических веществ микроядерным тестом подготовлены Всесоюзным научно – исследовательским институтом дезинфекции и стерилизации Министерства здравоохранения СССР, Москва 1984).

Цитологические препараты костного мозга и периферической крови анализировали с помощью микроскопа Micros MC– 50 при увеличении 100*15.

Методы оценки регенераторных процессов в слизистой оболочке тощей кишки.

Были изготовлены гистологические препараты тощей кишки, срезы толщиной 5 мкм с соблюдением строгой ориентации ворсин и крипт, окрашенные гематоксилин - эозином (для определения митотического, апоптотического индексов, уровня патологических митозов и средней клеточности крипты).

Подсчет числа митотически делящихся клеток с учетом количества анализируемых крипт и количества клеток в них при общем числе просчитанных клеток от 3000 до 3500 позволил рассчитать митотический индекс, как отношение числа митотически делящихся клеток к общему числу просчитанных энтероцитов, выраженное в процентах. Среднюю клеточность в одной крипте определяли как отношение числа криптальных клеток к количеству анализированных крипт (Труфакин В.А. и др., 1990).

Апоптотический индекс определялся отношением клеток с морфологически выявляемой картиной апоптоза к общему числу просчитанных энтероцитов, выраженное в процентах.

С целью количественной оценки интенсивности процессов регенерации рассчитывали индекс клеточного обновления (ИКО), равный отношению митотического индекса к апоптотическому.

Гистологические препараты тощей кишки анализировали с помощью микроскопа Micros MC- 50 при увеличении 100*15.

Для выявления клеток, находящихся на различных стадиях программированной клеточной гибели и подсчета апоптотического индекса (АИ) производилась окраска срезов тощей кишки красителями акридиновым оранжевым и Appexin V, меченным флуоресценинизотиоцианатом (FITC).

Препараты анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа Micmed - 2 при увеличении 40*10 при длине волны световой абсорбции 495 нм.

Методы статистической обработки полученных результатов.

Для каждого ряда значений показателя вычисляли среднюю арифметическую, стандартную ошибку среднего. Достоверность отличий между подгруппами оценивали с помощью t - критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $P < 0,05$.

Сравнение изучаемых показателей лабораторных животных, которым вводились препараты, проводилось с контролем и контрольной подгруппой. В качестве контроля были выбраны лабораторные животные, не подвергшиеся воздействию ИИ и которым вводился физиологический раствор. Контрольной подгруппе соответствовали подопытные животные подвергшиеся воздействию ИИ в той же дозе, что и анализируемая опытная подгруппа. Животным контрольной подгруппы вводился физиологический раствор.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами исследования позволили установить влияние парентерально вводимого препарата тизоль на процессы регенерации миелоидной ткани и эпителии тощей кишки в физиологических условиях и в условиях воздействия ионизирующего излучения.

В физиологических условиях на седьмые сутки после введения препарата тизоль выявлено стимулирующее действие на эритроидный росток (Эр.эл.: $30,88 \pm 3,72$ %, + 26,0 %, $p < 0,05$ по сравнению с контролем), отмечено увеличение пролиферативной активности элементов данного ростка. В гранулоцитарном ростке костного мозга и в эпителии тощей кишки значимого изменения остаточных анализируемых показателей отмечено не было.

С целью изучения действия тизоля в условиях воздействия экстремального фактора были проведены исследования по изучению действия ИИ на интактных животных (контрольная подгруппа).

На первые сутки после воздействия ИИ, в контрольной подгруппе отмечено угнетение пролиферативной активности, повышение уровня апоптоза и мутагенной активности. При этом в костном мозге при облучении 0,5 Гр выявлен лимфоцитарный пик, снижение содержания эритроидных и гранулоцитарных элементов, в периферической крови лимфопения, ретикулоцитоз и гранулоцитоз, что свидетельствует о стресс реакции в этой ткани (Горизонтов П.Д., 1983; Юшков Б.Г., 2004).

При облучении подопытных крыс дозой 3 Гр не отмечено лимфоцитарного пика в костном мозге, что свидетельствует о преобладании специфического действия ионизирующего излучения над стресс-реакцией системы крови. Опустошение костного мозга и увеличение содержания ретикулоцитов и гранулоцитов в периферической крови было выражено в большей степени, чем при облучении дозой 0,5 Гр. Содержание эритроидных элементов было снижено на 72,0 %, а гранулоцитарных элементов на 52,8 % по сравнению с группой контроля.

Следует отметить, что эритроидный росток в целом проявил большую радиочувствительность, чем гранулоцитарный, что было показано и в других ранее выполненных работах (Жербин Е.А., Чухловин А.Б., 1989).

В тощей кишке в это время также отмечено угнетение пролиферативной активности (МИ $4,67 \pm 0,36$ %, - 44,5 %, $p < 0,05$), увеличение апоптоза (АИ $11,60 \pm 1,00$ %, + 204,4 %, $p < 0,05$) и мутагенной активности (ПМ 13,23 % $\pm 1,46$, + 109,3 %, $p < 0,05$), снижение клеточности крипты (СКК $48,83 \pm 2,50$, - 33,4 %, $p < 0,05$).

К 7 суткам в обоих изучаемых дифферонах произошло естественное восстановление митотической активности, но не отмечено восстановления общей численности элементов после облучения дозой 3 Гр. Иная картина наблюдалась в эпителии слизистой тощей кишки. Здесь произошло восстановление не только пролиферативной активности, но и клеточности крипты. Однако апоптоз (АИ $4,29 \pm 0,98$ %, + 32,8 %, $p < 0,05$) и уровень мутагенной активности (ПМ $8,58 \pm 0,96$ %, + 83,0 %, $p < 0,05$) оставались повышенными (табл. 1).

Таблица 1

Регенераторная и мутагенная активность элементов костного мозга и эпителия тощей кишки интактных лабораторных животных в физиологических условиях и в условиях воздействия ионизирующего излучения, $M \pm m$, $n = 8$

			Первые сутки			Седьмые сутки		
			0 Гр	0,5 Гр	3 Гр	0 Гр	0,5 Гр	3 Гр
Миелиновая ткань	МИ, %	Эр. эл.	5,59±1,43	2,34±0,36*	1,80±0,24*	4,53±0,40	4,46±0,60	4,24±0,70
		Гр. эл.	4,54±0,60	2,73±0,27*	1,48±0,21*	4,09±0,98	2,60±0,39	2,11±0,24
	АИ, %	Эр. эл.	2,42±0,65	5,50±0,30*	6,62±0,85*	2,71±0,62	2,48±0,34	3,91±0,42*
		Гр. эл.	2,70±0,51	4,83±0,31*	5,38±0,28*	2,33±0,41	2,50±0,58	2,19±0,42
	ИКО	Эр. эл.	2,68±1,12	0,43±0,06*	0,21±0,08*	1,85±0,24	1,84±0,31	1,09±0,16*
		Гр. эл.	1,88±0,59	0,57±0,04*	0,28±0,03	1,95±0,64	1,10±0,21	1,02±0,20
	ПМ, %	Эр. эл.	3,82±0,81	14,62±0,99*	18,38±1,32*	6,14±0,89	6,75±0,75	8,47±0,88*
		Гр. эл.	3,54±0,49	7,20±1,07*	11,13±2,00*	2,56±0,31	3,65±0,36	6,70±0,63*
	МЯТ, %		5,00±1,12	13,38±1,24*	-	5,10±0,37	7,17±1,49	9,15±0,75*
	МИ, %		8,41±0,28	6,10±0,40*	4,67±0,36*	8,73±0,36	8,18±0,58	8,33±0,48
Эпителий тощей кишки	АИ, %		3,81±0,41	6,51±0,44*	11,60±1,00* (13,49±0,81)	3,23±0,38	3,34±0,30	4,29±0,98*
		ИКО	2,25±0,26	0,94±0,09*	0,41±0,04*	2,76±0,27	2,48±0,27	2,08±0,52
	ПМ, %		6,32±0,64	9,24±0,93*	13,23±1,46*	4,69±0,87	5,71±0,69	8,58±0,96*
	СКК		73,33±2,52	62,43±2,65*	48,83±2,50*	77,14±3,59	72,13±3,38	73,13±3,84

Примечание: * отличие от группы интактных животных (контрольная группа), достоверно с $P < 0,05$. В скобке указано значение АИ, полученное с использованием флуоресцентных красителей (акридин оранжевым и annexin V-FITC).

В ходе дальнейших исследований по изучению цитопротективного действия тизоля в условиях воздействия ИИ было выявлено выраженное его антиапоптогенное действие. Так на первые сутки после воздействия ИИ снижение апоптоза отмечено в эритроидном и гранулоцитарном дифферонах (3 Гр: АИ $4,21 \pm 0,41$ %, - 36,3 %, $p < 0,05$ и $4,54 \pm 0,32$ %, - 15,6 %, $p < 0,05$ соответственно), а также в эпителии тощей кишки (3 Гр: АИ $8,71 \pm 0,42$ %, - 24,9 %, $p < 0,05$). Выраженный антиапоптогенный эффект нашел свое подтверждение и дополнение в гистологических препаратах тонкого кишечника, окрашенных Annexin-V FITC и акридиновым оранжевым с использованием флуоресцентной микроскопии. После того, как был выявлен антиапоптогенный эффект тизоля, решено было изучить действие различных доз препарата. С этой целью парентерально вводились следующие дозы препарата тизоль: минимальная терапевтическая доза - 0,1 г/кг, средняя терапевтическая доза 1,0 г/кг. В первом случае значимого влияния на апоптоз выявлено не было, однако после введения дозы 1,0 г/кг вновь установлено антиапоптогенное действие (3 Гр: АИ $11,39 \pm 0,99$ %, - 15,6 %, $p < 0,05$).

$p < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют, что антиапоптогенное действие тизоля носит дозозависимый характер, то есть с увеличением дозы вводимого препарата уменьшается выраженность апоптоза.

После получения данных об уровне апоптоза принципиально важным представлялся вопрос о влиянии препарата на уровень мутагенной активности. Для этого производился подсчет микроядерного теста в костном мозге; подсчет числа патологических митозов в костном мозге и в эпителии тонкого кишечника.

Было установлено, что в физиологических условиях тизоль не влияет на уровень мутагенной активности (также как и на уровень апоптоза).

После воздействия ИИ на фоне терапии тизолем установлено снижение мутагенной активности в эритроидном ростке (0,5 Гр: МЯТ $8,17 \pm 1,49 \%$, - $38,9 \%$, $p < 0,05$; ПМ 3 Гр $16,14 \pm 1,18 \%$, - $12,2 \%$, $p < 0,05$), эпителии тонкого кишечника (3 Гр на 1 сут: ПМ $10,90 \pm 0,73 \%$, - $17,6 \%$, $p < 0,05$), в гранулоцитарном ростке значимого снижения мутагенной активности не отмечено. После изучения влияния на мутагенную активность средней терапевтической дозы тизоля $2,5$ г/кг (Т1) были проведены исследования по изучению влияния меньших доз: средней терапевтической дозы - $1,0$ г/кг (Т2) и минимальной терапевтической дозы - $0,1$ г/кг (Т3). При этом не было выявлено значимого снижения мутагенной активности в изучаемых тканях.

Полученные результаты свидетельствуют о дозозависимом действии тизоля на апоптоз и уровень патологических митозов (с увеличением дозы вводимого парентерально препарата увеличивается его терапевтическое действие), а также о тропности препарата к эритроидному ростку костного мозга.

Впервые выявленное антиапоптогенное действие требовало ответа на вопрос о механизме действия тизоля. Механизм антиапоптогенного действия тизоля, вероятно, заключается в том, что микроэлемент титан, входящий в его состав может взаимодействовать с цитохромом *c*, содержащим в своей структуре химически близкородственный титану элемент - железо. Цитохром *c* является необходимым фактором для реализации каспаз-зависимого пути индукции апоптоза. Под действием индукторов апоптоза через каналы в наружной мембране митохондрий цитохром *c* выходит в цитоплазму, где связывается с белком АРАФ-1. Данный комплекс подвергается олигомеризации с образованием апоптосомы, которая необходима для активации вначале иницирующих, а затем эффекторных каспаз (каспазы 9 и 3 соответственно). Мы предполагаем, что при выходе цитохрома *c* из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму, вследствие резкого изменения pH, ослабевают связи атома железа с белком (аминокислотами гистидин в положении 18 и метионин в положении 80). А при накоплении в цитоплазме большого количества химически близкородственного, но более реакционно-способного титана, вероятно, возможна замена атома железа на атом титана в структуре цитохрома *c*, что инактивирует его как апоптогенный фактор. В этом случае, иммортализация клетки является временной, так как экзогенный титан элиминируется из организма (через 24 часа после введения тизоля - на 52% , Ларионов Л.П., 1989), а цитохром *c* выхо-

дящий из митохондрий при продолжении действия индукторов апоптоза остается интактным и способным к взаимодействию с APAF-1 и активации каспаз. Таким образом, клетка, в которой произошла индукция апоптоза, может получить дополнительное время на устранение генетической нестабильности (ферменты репарации инактивируются только после активации каспаз). Однако если генетическая нестабильность будет сохраняться, программа апоптоза будет реализована.

С целью подтверждения гипотезы был проведен эксперимент, в котором анализировалось содержание свободного фотометрически-определяемого железа в растворе при инкубации смеси цитохрома *c* и тизоля в соотношении чистых веществ 1:300. Это согласно проведенным расчетам соответствует соотношению цитохрома *c* (Шаронов Г.В., 2006) и тизоля (Ларнонов Л.П., 1989) в цитоплазме клеток при введении последнего в дозе 2,5 г/кг. Инкубация проводилась при температуре 37°C⁰ в течение 24 часов. Кроме того, оценивалось содержание свободного железа в растворах цитохрома *c* и тизоля.

Определение свободного железа производилось с использованием набора реагентов для определения концентрации железа в сыворотке и плазме крови колориметрическим методом без депротеинизации «Iron E-FL». Исследуемый раствор в объеме 0,2 мл (0,12 мл 50 % раствора тизоля + 0,08 мл 0,25 % раствора цитохрома *c*) добавлялся к 4 мл рабочего реагента (3,8 мл реагента № 1 + 0,2 реагента № 2). По прошествии 10-минутной инкубации при комнатной температуре производилось определение экстинкции раствора при помощи фотометра КФК-3 в кюветках с толщиной поглощающего слоя 1 см при длине волны 578 нм. Расчет концентрации свободного железа в растворе проводился относительно калибровочной пробы (0,1 мл реагента №3; содержание железа – 30 мкмоль/л).

Концентрация свободного железа в 0,2 мл 0,25% (0,0005 г) раствора цитохрома *c* составила 32,72±2,60 мкмоль/л. С титаном, входящим в состав препарата тизоль (0,2 мл) реактив «Iron E-FL» дает перекрестную реакцию с образованием окрашенного продукта и концентрацией свободного металла в растворе 53,80±2,73 мкмоль/л (табл. 2).

Таблица 2

Содержание свободного металла в исследуемых растворах, мкмоль/л, $M \pm m$, $n = 8$

I	II	III	IV
Цитохром <i>c</i> (0,2 мл 0,25 %)	Тизоль (0,2 мл 50 %)	Совместная инкубация цитохрома <i>c</i> (0,08 мл 0,25 %) и тизоля (0,12 мл 50%)	Значение суммы раздельной инкубации цитохрома <i>c</i> (0,08 мл 0,25 %) и тизоля (0,12 мл 50 %)
32,72±2,60	53,80±2,73	58,05±2,54*	45,37±2,06

Примечание: * - Различия между пробами III и IV достоверны при $P=0,003$

Выявлено, что концентрация свободного металла в растворе при инкубировании цитохрома *c* и тизоля, определенная фотометрически (0,12 мл 50 % тизоля и 0,08 мл 0,25 % цитохрома *c* $58,05 \pm 2,54$ мкмоль/л) достоверно выше расчетной концентрации, т.е. суммы концентраций железа в растворах цитохрома *c* и тизоля с учетом их соотношения (0,12 мл 50 % тизоля и 0,08 мл 0,25 % цитохрома *c* $45,37 \pm 2,06$ мкмоль/л при $P < 0,05$).

Приrost концентрации, очевидно, обусловлен выходом в раствор свободного железа из цитохрома *c*. Данный факт доказывает наличие взаимодействия между тизолем и цитохромом *c* с выходом атома железа из структуры последнего.

Проведенные исследования дают основания высказать соображения о механизме антиапоптогенного действия препарата через образование титансодержащего цитохрома – *c*, который уже не способен приводить к активации каспаз и последующему развитию апоптоза.

Для оценки тканевой регенерации производилось определение количественного содержания клеток в изучаемых тканях при парентеральном введении тизоля. С этой целью в костном мозге производился подсчет миелограммы, в периферической крови подсчет ретикулоцитов, гранулоцитов, лимфоцитов, а в кишечнике определялась средняя клеточность крипты.

При значительном лучевом воздействии цитопротективное действие на эритроцит отмечено уже в ранние сроки (Эр.эл. 3 Гр: $8,03 \pm 1,08$ %, + 30,84 %, $p < 0,05$). Увеличения общего содержания элементов гранулоцитарного ростка установлено не было. Следствием антиапоптогенного действия тизоля было увеличение содержания крипального эпителия, поскольку пролиферативная активность эпителиоцитов при этом не изменилась.

Подсчет МЯТ на первые сутки при дозе облучения 3 Гр был невозможен в силу значительной редукции клеточности КМ, аналогичные результаты были получены и в других ранее проведенных исследованиях (Григоров Л. и др., 1981).

На седьмые сутки после воздействия ИИ, также как и в физиологических условиях, выявлено стимулирующее действие тизоля на эритропоэз (Эр.эл. 0,5 Гр: $19,98 \pm 1,47$ %, + 19,75 %, $p < 0,05$).

Таким образом, цитопротективное действие тизоля при парентеральном введении в условиях воздействия ионизирующего излучения приводит к стимуляции эритропоэза, нормализации показателей средней клеточности крипты в тонком кишечнике, снижению индуцированной ионизирующим излучением мутагенной активности в изучаемых тканях (табл. 3).

После выявленного цитопротективного действия препарата тизоль вводился парентерально в условиях воздействия ионизирующего излучения, было решено сравнить действие тизоля с одним из препаратов (деринат), с установленным действием на тканевую регенерацию.

Этот препарат используется в клинике для лечения радиационных поражений, нарушений гемопоэза. Тем не менее, оставалось не изученным действие дерината в условиях воздействия экстремального фактора на мутагенную активность, а также на апоптоз, являющегося одним из механизмов, определяющих состояние регенерации.

Таблица 3

Регенераторная и мутагенная активность элементов костного мозга и эпителия тощей кишки после введения тизоля в физиологических условиях и в условиях воздействия ионизирующего излучения, $M \pm m$, $n = 8$

			Первые сутки			Седьмые сутки		
			0 Гр	0,5 Гр	3 Гр	0 Гр	0,5 Гр	3 Гр
Миелиодная ткань	МИ, %	Эр. эл.	5,38±2,19	2,66±0,71*	2,02±0,15*	7,49±1,77*	5,70±0,85**	4,51±0,61
		Гр. эл.	4,84±0,42	2,79±0,29*	1,60±0,14*	3,89±0,63	2,70±0,65	2,33±0,36
	АИ, %	Эр. эл.	2,66±0,44	3,89±0,66* **	4,21±0,41* **	2,22±0,66	2,65±0,51	2,83±0,24**
		Гр. эл.	2,46±0,26	4,18±0,38***	4,54±0,32* **	2,38±0,41	2,69±0,39	2,43±0,31
	ИКО	Эр. эл.	2,22±1,19	0,62±0,22*	0,42±0,14* **	3,84±1,42*	2,21±0,29**	1,64±0,33**
		Гр. эл.	1,99±0,29	0,68±0,10*	0,36±0,06* **	1,68±0,27	1,02±0,22	1,00±0,25
	ПМ, %	Эр. эл.	4,71±0,77	13,38±1,09*	16,14±1,18* **	4,84±0,97	6,36±0,60	7,29±0,56* **
		Гр. эл.	3,38±0,61	7,64±0,85*	10,94±1,68*	3,26±0,46	2,55±0,64	5,93±0,82*
	МЯТ, %		3,83±0,51	8,17±1,49**	-	3,14±0,41	3,38±0,50**	5,93±1,00**
	МИ, %		8,11±0,30	6,24±0,36*	4,37±0,34*	8,62±0,40	8,40±0,40	8,49±0,37
Эпителий тощей кишки	АИ, %	Т 1	3,50±0,34	5,28±0,48* **	8,71±0,42* ** (9,44±0,63**)	3,59±0,37	3,80±0,38	3,47±0,53* **
		Т 2	-	-	(11,39±0,99**)			
		Т 3	-	-	(13,63±0,79**)			
	ИКО		2,36±0,21	1,20±0,14* **	0,50±0,03* **	2,44±0,24	2,25±0,28	2,52±0,39
	ПМ, %		5,43±0,46	8,40±0,50*	10,90±0,73***	5,60±0,56	6,35±0,56	7,24±0,93* **
	СКК		75,25±1,50	62,50±4,50*	58,43±1,92* **	75,22±1,58	73,75±1,81	75,44±2,17

Примечание: * отличие от группы интактных животных (контрольная группа), достоверно с $P < 0,05$; ** отличие от подгруппы интактных животных (контрольная подгруппа), подвергшихся воздействию ИИ, достоверно с $P < 0,05$. Т 1 - введение тизоля в дозе 2,5 г/кг; Т 2 - введение тизоля в дозе 1,0 г/кг; Т 3 - введение тизоля в дозе 0,1 г/кг. В скобках указаны значения АИ, полученные с использованием флуоресцентных красителей (акридин оранжевым и annexin V-FITC).

В отсутствии действия экстремального фактора на седьмые сутки после введения препарата деринаг выявлена стимуляция эритропоэза и гранулоцитопоза, что заключалось в увеличении количества митозов, увеличении содержания эритроидных и гранулоцитарных элементов указанных ростков в кост-

ном мозге (0,5 Гр: $34,58 \pm 3,27$ %, $+41,1$ %, $p < 0,05$ и $75,05 \pm 7,03$ %, $+19,0$ %, $p < 0,05$ соответственно). Эти изменения нашли свое отражение в показателях периферической крови, где наблюдался ретикулоцитоз и увеличение содержания гранулоцитов. Также имело место увеличение пролиферации эпителия и клеточности крипты в слизистой оболочке тощей кишки. В этом отношении наши данные соответствуют результатам выполненных ранее исследований (Каплина Э.Н., 2005), в которых показана способность дерината активировать тканевую регенерацию.

На апоптоз и мутагенную активность изучаемых тканей препарат в этом случае значимого действия не оказывал (табл. 4).

Таблица 4
Регенераторная и мутагенная активность элементов костного мозга и эпителия тощей кишки после введения дерината в физиологических условиях и в условиях воздействия ионизирующего излучения, $M \pm m$, $n = 8$

		Первые сутки			Седьмые сутки		
		0 Гр	0,5 Гр	3 Гр	0 Гр	0,5 Гр	3 Гр
Миелоидная ткань	МИ, %	Эр. эл. $7,17 \pm 0,81^*$	$2,50 \pm 0,63^*$	$1,81 \pm 0,31^*$	$9,40 \pm 2,33^*$	$7,55 \pm 1,14^{**}$	$5,14 \pm 0,55$
		Гр. эл. $4,31 \pm 0,77$	$4,23 \pm 0,38^{**}$	$1,65 \pm 0,25^*$	$6,52 \pm 1,58^*$	$4,16 \pm 0,83^{**}$	$4,29 \pm 0,41^{**}$
	АИ, %	Эр. эл. $2,32 \pm 0,49$	$4,85 \pm 0,94^*$	$6,37 \pm 0,77^*$	$2,56 \pm 0,40$	$2,36 \pm 0,68$	$2,94 \pm 0,45^{**}$
		Гр. эл. $2,31 \pm 0,32$	$4,06 \pm 0,42^{**}$	$5,12 \pm 0,25^*$	$2,28 \pm 0,26$	$2,30 \pm 0,33$	$2,39 \pm 0,34$
	ИКО	Эр. эл. $3,22 \pm 0,81$	$0,56 \pm 0,17^*$	$0,29 \pm 0,04^*$	$3,91 \pm 1,51^*$	$3,48 \pm 0,88^{**}$	$1,79 \pm 0,33^{**}$
		Гр. эл. $1,92 \pm 0,39$	$1,05 \pm 0,08^{**}$	$0,32 \pm 0,05^*$	$2,87 \pm 0,61^*$	$1,89 \pm 0,55^{**}$	$1,89 \pm 0,30^{**}$
	ПМ, %	Эр. эл. $4,52 \pm 0,58$	$12,59 \pm 1,42^{**}$	$16,72 \pm 2,08^*$	$4,21 \pm 0,92$	$5,90 \pm 0,75^{**}$	$6,23 \pm 0,87$
		Гр. эл. $2,88 \pm 0,55$	$6,69 \pm 0,84^*$	$8,28 \pm 1,02^{**}$	$3,81 \pm 0,39$	$3,18 \pm 0,58$	$3,86 \pm 0,76^{**}$
	МЯТ, %		$9,20 \pm 1,24^{**}$	-	$4,50 \pm 0,62$	$4,50 \pm 1,24$	$7,52 \pm 0,75$
			$7,21 \pm 0,33^{**}$	$4,58 \pm 0,39^*$	$12,11 \pm 1,68^*$	$9,36 \pm 0,74^{**}$	$8,73 \pm 0,71$
Эпителий тощей кишки	АИ, %		$5,94 \pm 0,62^*$	$9,58 \pm 0,32^{**}$ ($12,03 \pm 0,59^{**}$)	$3,61 \pm 0,46$	$3,08 \pm 0,37$	$3,90 \pm 0,73^{**}$
	ИКО		$1,24 \pm 0,17^{**}$	$0,48 \pm 0,04^*$	$3,48 \pm 0,60^*$	$3,10 \pm 0,34^{**}$	$2,36 \pm 0,57$
	ПМ, %		$8,16 \pm 0,59^*$	$11,02 \pm 1,26^*$	$6,36 \pm 0,61$	$5,29 \pm 0,49$	$5,30 \pm 0,45^{**}$
	СКК		$68,14 \pm 4,12^{**}$	$51,50 \pm 3,17^*$	$91,56 \pm 2,40^*$	$86,25 \pm 3,50^{**}$	$71,29 \pm 2,24$

Примечание: * отличие от группы интактных животных (контрольная группа), достоверно с $P < 0,05$; ** отличие от подгруппы интактных животных (контрольная подгруппа), подвергшихся воздействию ИИ, достоверно с $P < 0,05$. В скобке указано значение АИ, полученное с использованием флуоресцентных красителей (акридин оранжевым и annexin V-FITC).

На первые сутки после воздействия ИИ на фоне введения препарата деринат выявлена стимуляция регенерации гранулоцитарного ростка в костном мозге и эпителия тощей кишки. Регенераторный ответ в данном случае обеспечен влиянием препарата на пролиферативную активность, а также выявленным снижением апоптоза в изучаемых тканях.

Следствием действия препарата на процессы регенерации было увеличение количества криптального эпителия (0,5 Гр: СКК $68,14 \pm 4,12$, + 19,6 %, $p < 0,05$). В то же время значимого увеличения содержания гранулоцитов в костном мозге и, как следствие в периферической крови, отмечено не было. Мутагенная активность в изучаемых тканях оценивалась по данным микроядерного теста в костном мозге, а также количеству патологических митозов в костном мозге и в эпителии тощей кишки.

В ранние сроки было выявлено снижение мутагенной активности в костном мозге (0,5 Гр: МЯТ $9,20 \pm 1,24$, -31,2 %, $p < 0,05$) и отсутствие значимого влияния на этот показатель в эпителии кишечника.

На седьмые сутки после воздействия ИИ выявлено увеличение количества митозов в гранулоцитарном и эритроидном дифференцах костного мозга; восстановление выраженности апоптоза в эритроидном ростке, в то время как в контрольной подгруппе он оставался повышенным. Следствием влияния препарата на регенерацию было увеличение общего содержания в костном мозге эритроидных и гранулоцитарных элементов (0,5 Гр: $21,98 \pm 1,25$ %, +31,7 %, $p < 0,05$ и $62,60 \pm 2,63$ %, +20,3 %, $p < 0,05$ соответственно). В периферической крови установлено восстановление содержания ретикулоцитов и гранулоцитов.

В эпителии тонкого кишечника также наблюдалось увеличение митотической активности криптального эпителия, увеличение численности эпителия крипт (0,5 Гр: СКК $86,25 \pm 3,50$, + 19,6 %, $p < 0,05$).

На фоне проводимой терапии произошло восстановление мутагенной активности в костном мозге и в эпителии тонкого кишечника.

После получения экспериментальных данных о цитопротективном действии тизоля и терапевтическом действии дерината представлял интерес их возможного комбинированного использования, поскольку тизоль действовал на регенерацию преимущественно через снижение апоптоза, а деринат преимущественно через увеличение митотической активности.

В отсутствии действия экстремального фактора при комбинированном введении препаратов тизоля и дерината выявлено увеличение пролиферативной активности гемопоэтических клеток костного мозга и эпителия тощей кишки. Значимого изменения уровня апоптоза и мутагенной активности в изучаемых тканях не установлено.

На первые сутки после воздействия ИИ на фоне комплексной терапии отмечено увеличение пролиферативной активности, снижение апоптоза в гранулоцитарном и эритроидном ростках костного мозга, а также снижение мутагенной активности и увеличение содержания элементов указанных ростков. При этом содержание эритроидных элементов (3 Гр: $9,63 \pm 0,86$ %) было достоверно больше, чем после введения тизоля и дерината (+ 19,9 %, $p < 0,05$, и + 53,9

%, $p < 0,05$ соответственно). Содержание гранулоцитарных элементов (3 Гр: $39,26 \pm 2,52$ %) на 20,1 % ($p < 0,05$) превышало аналогичный показатель после введения дерината.

На митотическую активность в тонком кишечнике значимого действия препараты не оказывали. Увеличение клеточности крипты в этом случае достигалось за счет антиапоптогенного действия, которое проявлялось при выраженной радиационной нагрузке. Показатель средней клеточности крипты после комбинированного введения препаратов на 12,7 % (3 Гр: $p < 0,05$) превышал этот показатель после введения дерината.

Выявлено снижение индуцированной ионизирующим излучением мутагенной активности, этот эффект отмечен как в костном мозге, так и в эпителии кишечника. Уровень патологических митозов эритроидного ростка (3 Гр: ПМ $13,18 \pm 1,48$ %) на 18,3 % ($p < 0,05$) был достоверно ниже, чем после введения тизоля и на 21,1 % ($p < 0,05$) ниже, чем после введения дерината. В гранулоцитарном ростке уровень патологических митозов на 26,4 % (3 Гр: $p < 0,05$) был ниже, чем после введения тизоля. В эпителии кишечника снижение мутагенной активности после комбинированного введения препаратов было статистически более выраженным, чем после введения тизоля (3 Гр: ПМ - 22,9 %, $p < 0,05$;) и дерината (3 Гр: ПМ - 23,8 %, $p < 0,05$;).

На седьмые сутки после воздействия ИИ, установлено стимулирующее действие на гранулоцитопоз и эритроцитоз. Общее содержание эритроидных элементов (3 Гр: $14,83 \pm 2,14$ %) и гранулоцитарных элементов (3 Гр: $52,16 \pm 2,62$ %) после комбинированного введения препаратов было достоверно больше, чем после введения дерината (+ 30,1 %, $p < 0,05$) и тизоля (+ 19,9 %, $p < 0,05$) соответственно.

Установлено снижение апоптоза в элементах эритроидного ростка костного мозга и в эпителии кишечника.

В изучаемых тканях выявлено снижение мутагенной активности. В гранулоцитарном ростке отмечено более выраженное снижение индуцированной мутагенной активности по сравнению с лабораторными животными, которым вводился препарат тизоль (3 Гр: ПМ - 39,8 %, $p < 0,05$;).

Уровень патологических митозов в эпителии кишечника на 19,5 % (3 Гр: $p < 0,05$) ниже сравнимого показателя после введения препарата тизоль (табл. 5).

Указанные терапевтические эффекты наиболее существенно проявляются при значительной лучевой нагрузке (3 Гр).

Таким образом, при парентеральном введении впервые выявлено антиапоптогенное действие на фоне терапии тизолем, а также при комбинированном введении тизоля и дерината. При этом в первом случае снижение апоптоза более значимое, чем на фоне комплексной терапии тизолем и деринатом. В настоящей работе также впервые выявлено снижение мутагенной активности на фоне терапии тизолем, деринатом и при их комбинированном введении. Наиболее существенное снижение индуцированной мутагенной активности выявлено при комплексном использовании препаратов. Данный факт отмечен как в миелоидной ткани, так и в эпителии тощей кишки. На фоне комплексной цито-

протективной терапии установлено увеличение скорости клеточного обновления и, как следствие, увеличения количества клеточных элементов в изучаемых тканях. Указанные изменения при значительном лучевом воздействии (3 Гр) были выражены в большей степени, чем после терапии тизолом или деринатом.

Таблица 5

Регенераторная и мутагенная активность элементов костного мозга и эпителии тощей кишки после комбинированного введения тизоля и дерината в физиологических условиях и в условиях воздействия ионизирующего излучения, $M \pm m$, $n = 8$

			Первые сутки			Седьмые сутки		
			0 Гр	0,5 Гр	3 Гр	0 Гр	0,5 Гр	3 Гр
Миелиодная ткань	МИ, %	Эр. эл.	4,39 $\pm 0,61$	4,12 $\pm 0,75^{**}$	2,19 $\pm 0,21^{* **}$	7,37 $\pm 1,94^{*}$	7,36 $\pm 0,81^{**}$	5,70 $\pm 0,66^{**}$
		Гр. эл.	4,75 $\pm 0,64$	2,90 $\pm 0,26^{*}$	1,82 $\pm 0,18^{* **}$	5,88 $\pm 1,16^{*}$	4,28 $\pm 1,42^{**}$	3,83 $\pm 1,03^{**}$
	АИ, %	Эр. эл.	2,61 $\pm 0,65$	4,34 $\pm 0,41^{* **}$	5,43 $\pm 0,40^{* **}$	2,60 $\pm 0,69$	2,74 $\pm 0,56$	2,56 $\pm 0,44$
		Гр. эл.	2,64 $\pm 0,22$	4,76 $\pm 0,40^{*}$	4,78 $\pm 0,42^{* **}$	2,82 $\pm 0,40$	2,39 $\pm 0,34$	2,51 $\pm 0,24$
	ИКО	Эр. эл.	1,98 $\pm 0,75$	0,82 $\pm 0,30^{* **}$	0,41 $\pm 0,06^{* **}$	3,03 $\pm 1,14$	2,80 $\pm 0,60^{**}$	2,34 $\pm 0,50^{**}$
		Гр. эл.	1,82 $\pm 0,31$	0,62 $\pm 0,07^{*}$	0,38 $\pm 0,06^{* **}$	2,15 $\pm 0,39$	1,75 $\pm 0,58^{**}$	1,52 $\pm 0,34^{**}$
	ПМ, %	Эр. эл.	5,86 $\pm 0,51$	11,60 $\pm 1,71^{***}$	13,18 $\pm 1,48^{* **}$	5,20 $\pm 0,73$	6,14 $\pm 0,69^{**}$	6,31 $\pm 0,78$
		Гр. эл.	3,09 $\pm 0,40$	5,04 $\pm 1,33^{* **}$	8,05 $\pm 0,92^{* **}$	2,33 $\pm 0,36$	2,84 $\pm 0,57$	3,57 $\pm 0,65^{**}$
	МЯТ, %	Эр. эл.	5,57 $\pm 0,75$	6,86 $\pm 1,74^{**}$	-	4,33 $\pm 0,53$	5,00 $\pm 0,25$	6,05 $\pm 0,42^{**}$
		Гр. эл.	8,59 $\pm 0,46$	6,54 $\pm 0,39^{*}$	5,17 $\pm 0,44^{*}$	7,37 $\pm 1,94^{*}$	9,95 $\pm 0,38^{**}$	8,29 $\pm 0,56$
Эпителий тощей кишки	МИ, %		8,59 $\pm 0,46$	6,54 $\pm 0,39^{*}$	5,17 $\pm 0,44^{*}$	7,37 $\pm 1,94^{*}$	9,95 $\pm 0,38^{**}$	8,29 $\pm 0,56$
	АИ, %		3,34 $\pm 0,52$	5,33 $\pm 1,14^{* **}$	10,12 $\pm 0,56^{* **}$ (11,50 $\pm 1,25^{**}$)	5,88 $\pm 1,16^{*}$	3,38 $\pm 0,48$	3,84 $\pm 0,28^{* **}$
			2,63 $\pm 0,38$	1,31 $\pm 0,37^{* **}$	0,51 $\pm 0,05^{* **}$	2,60 $\pm 0,69$	3,01 $\pm 0,41^{**}$	2,17 $\pm 0,24$
	ПМ, %		4,79 $\pm 0,33$	7,47 $\pm 0,49^{* **}$	8,40 $\pm 1,27^{* **}$	2,82 $\pm 0,40$	5,36 $\pm 0,64$	5,83 $\pm 0,86^{**}$
	СКК		74,29 $\pm 3,47$	65,00 $\pm 2,29^{*}$	58,03 $\pm 4,04^{* **}$	3,03 $\pm 1,14$	83,38 $\pm 4,63^{**}$	75,29 $\pm 3,10$

Примечание: * отличие от группы интактных животных (контрольная группа), достоверно с $P < 0,05$; ** отличие от подгруппы интактных животных (контрольная подгруппа), подвергшихся воздействию ИИ, достоверно с $P < 0,05$. В скобке указано значение АИ, полученное с использованием флуоресцентных красителей (акридин оранжевым и annexin V-FITC).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что комплексное введение тизоля и дерината является наиболее предпочтительным для терапии лучевых повреждений.

На основании проведенных исследований терапевтическое действие препарата тизоль при парентеральном введении после воздействия ионизирующего излучения представлено на рис. 1, где также отражена возможность усиления его цитопротективного действия введением дерината.

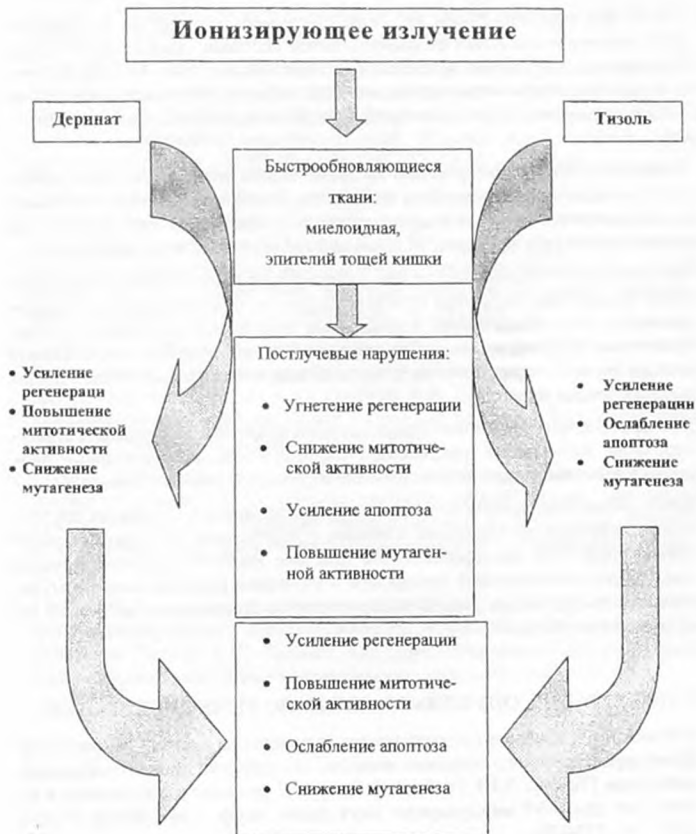


Рис. 1. Цитопротективное действие препаратов тизоля и дерината

ВЫВОДЫ

1. Тизоль при парентеральном введении в физиологических условиях оказывает стимулирующее действие на эритропоэз. Это действие реализуется за счет повышения митотической активности элементов пролиферативного пула. На пролиферативную активность эпителия кишечника тизоль не влияет.
2. Тизоль при парентеральном введении в условиях воздействия ионизирующего излучения оказывает антиапоптогенное действие, снижает мутагенную активность, стимулирует процессы клеточного обновления. Антиапоптогенное действие тизоля имеет дозозависимый характер, о чем свидетельствует снижение выраженности апоптоза при увеличении дозы вводимого препарата.
3. Выявленное при парентеральном введении тизоля антиапоптогенное действие, снижение индуцированного мутагенеза, повышение скорости клеточно-обновления позволяют охарактеризовать аквакомплекс глицеросолявата титана (тизоль) как препарат, обладающий цитопротективным действием.
4. Цитопротективное действие тизоля опосредуется преимущественным влиянием на снижение величины апоптоза. Одним из механизмов такого действия может быть образование в цитоплазме клетки титансодержащего цитохрома – с, который не способен образовывать полноценную апоптосому, вследствие чего нарушается активация каспаз, имеющих решающее значение в индукции апоптоза.
5. Препарат деринат в условиях радиационного повреждения оказывает стимулирующее действие на эритропоэз, гранулоцитопоэз, регенераторные процессы в эпителии тощей кишки; снижает индуцированный мутагенез.
6. Комплексное использование тизоля и репаранта деринат в условиях постлучевого повреждения оказывает наиболее существенный цитопротективный эффект. При этом цитопротективное действие дерината реализуется через стимуляцию митотической активности и снижение индуцированного мутагенеза, в то время как тизоль обладает преимущественным действием на снижение апоптоза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИСЕРТАЦИИ

1. Гребнев Д.Ю. Влияние ионизирующего излучения на систему гемопоэза на фоне парентерального введения веществ, обладающих цитопротекторным действием [Текст] / Д.Ю. Гребнев, А.Е. Друй // Здоровье и образование в 21 веке: тез. докл. VI междунаrodn. науч.-практ. конф. - М.: Изд-во РУДН, 2005. – С. 137-138.

2. Гребнев Д.Ю. Состояние генома гемопоэтических клеток при воздействии ионизирующего излучения на фоне введения цитопротекторов [Текст] / Д.Ю. Гребнев, А.Е. Друй // Вестник РГМУ. - 2006. - №2 (49). - С. 356.
3. Гребнев Д.Ю. Оценка цитопротекторного действия нового биологически активного препарата тизоль на основании исследования гемопоэтической ткани при воздействии ионизирующего излучения [Текст] / А.Е. Друй, Д.Ю. Гребнев // Вестник РГМУ. - 2006. - №2 (49). - С. 363.
4. Гребнев Д.Ю. Действие препаратов, обладающих цитопротекторным действием на гемопоэтическую ткань при воздействии ионизирующего излучения [Текст] / Д.Ю. Гребнев, А.Е. Друй // Здоровье и образование в 21 веке: тез. докл. IX Всероссийск. мед.-биол. конф. молодых исследователей «Человек и его здоровье». - СПб: Изд-во СПбГЭТУ, 2006. - С. 77-78.
5. Гребнев Д.Ю. Нарушения, возникающие в гемопоэтической ткани при воздействии ионизирующего излучения и их коррекция цитопротекторами, вводимыми парентерально [Текст] / Д.Ю. Гребнев, А.Е. Друй // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения: тез. докл. 61 межвузовск. науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов с международным участием. - Екатеринбург, 2006. - С. 281-283.
6. Гребнев Д.Ю. Комплексная оценка состояния клеток гемопоэтической ткани при воздействии ионизирующего излучения и парентеральном введении цитопротекторов [Текст] / Д.Ю. Гребнев, А.Е. Друй // Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины: тез. докл. науч.-практ. конф. молодых ученых. - СПб, 2006. - С. 241-242.
7. Гребнев Д.Ю. Использование некоторых гематологических индексов для оценки состояния гемопоэтических клеток в условиях воздействия ионизирующего излучения и введения цитопротекторов [Текст] / А.П. Ястребов, Д.Ю. Гребнев, А.Е. Друй // Госпитальный вестник. - Екатеринбург, 2006. - С. 20-24.
8. Гребнев Д.Ю. Влияние ионизирующего излучения на систему гемопоэза на фоне парентерального введения веществ, обладающих цитопротекторным действием [Текст] / Д.Ю. Гребнев, А.Е. Друй // Материалы XIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». - М., 2006. - С. 82.

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

АИ	-	апоптотический индекс
Гр.эл.-		гранулоцитарные элементы
ИИ	-	ионизирующее излучение
ИКО	-	индекс клеточного обновления
КМ	-	костный мозг
МИ	-	митотический индекс
МЯТ	-	микроядерный тест
ПМ	-	патологические митозы
СКК	-	средняя клеточность крипты
Эр.эл.-		эритроидные элементы
АРАФ - 1		apoptosis protease activating factor – 1

Гребнев Дмитрий Юрьевич

ВЛИЯНИЕ ЦИТОПРОТЕКТИВНОЙ ТЕРАПИИ ТИЗОЛЕМ НА
ПРОЦЕССЫ РЕГЕНЕРАЦИИ МИЕЛОИДНОЙ ТКАНИ И ЭПИТЕ-
ЛИЯ ТОЩЕЙ КИШКИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО
ИЗЛУЧЕНИЯ

14.00.16 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Подписано в печать 01. 11. 2006. Формат 60x84/16

Усл. печ. л. 1,3. Тираж 100 экз.

Заказ №_77_. Отпечатано в типографии УГМА, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3.