

На правах рукописи

В печать
Председатель диссертационного
совета 68.1.005.01
11.11.2025  В.А. Баранов



ВАКУНЕНКОВА

Ольга Александровна

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ВЫБОРА СРЕДСТВ ПРОФИЛАКТИКИ
ГАСТРОЭНТЕРОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ
МИЕЛОАБЛЯЦИОННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

3.3.4. Токсикология

Автореферат диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства»

Научный руководитель: **Рейнюк Владимир Леонидович**
доктор медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты: **Сидоров Сергей Павлович**
доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, Научно-исследовательский испытательный центр (медико-биологической защиты), начальник отдела

Борщев Юрий Юрьевич
кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научно-исследовательский отдел физиологической микроэндоэкологии Института экспериментальной медицины, заведующий отделом

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ»)

Защита состоится «__» _____ 2026 года в _____ часов на заседании диссертационного совета **68.1.005.01**, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства» (192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке и на сайте (<http://www.toxicology.ru>) Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства»

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета 68.1.005.01
доктор медицинских наук, профессор



Луковникова Любовь Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Миелоабляция – необратимое опустошение костного мозга под влиянием супралетальных доз ионизирующего излучения или токсикантов цитостатического действия. Термин предложен в 1952 году для обозначения гематологических изменений у мышей после общего однократного облучения в дозе 10 Гр [Lorenz E. et al., 1952]. Сегодня миелоабляцию применяют для подготовки реципиентов к пересадке стволовых кроветворных клеток. Она включает в себя назначение общего равномерного γ -, R $\ddot{o}$ - облучения и (или) цитостатических лекарственных средств в дозах, подавляющих кроветворение полностью или почти полностью. Для полного подавления кроветворения пациентов облучают в 1-3 фракции в суммарной дозе 8-12 Гр [Bacigalupo A. et al., 2009; Konuma T. et al., 2021] или применяют вещества цитостатического действия: циклофосамид (ЦФ), треосульфат, бусульфат и другие [Qian X. et al., 2020; Ramzi M. et al., 2020; Seydoux C. et al., 2021]. Дозы миелоабляционных воздействий превышают дозовый порог острого лучевого или цитостатического желудочно-кишечного мукозита. Кишечный синдром – совокупность его клинических проявлений, оказывающих негативное влияние на исход трансплантации стволовых кроветворных клеток. Защитной реакцией организма на первую стадию острого желудочно-кишечного мукозита является ЖКС – желудочно-кишечный стаз [Sangild P.T. et al., 2017]. Он препятствует питанию пациентов, делает невозможным пероральное назначение им лекарственных средств, способствует поступлению из желудочно-кишечного химуса в кровь липополисахаридов грамотрицательных бактерий, что провоцирует системное воспаление [Buchholz B.M. et al., 2010] и сепсис [Chapman M.J. et al., 2011]. Перечисленные нарушения приумножают страдания и повышают риск гибели реципиентов до пересадки стволовых кроветворных клеток. Поэтому влияние на ЖКС – необходимый критерий отбора средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий.

В норме вегетация бактерий в ЖКТ уравновешена их удалением в результате секреции, моторики и бактерицидного действия жёлчи. Транзитное время составляет 10–48 мин для желудка, 2,5–4,0 ч для тонкой кишки и 25–40 ч для толстой кишки [Sender R. et al., 2016]. При ЖКС транзит кишечного химуса замедляется, что ведёт к накоплению в ЖКТ бактерий. Рост бактериальной массы при ЖКС стремителен: при частоте деления 3 ч^{-1} (средний показатель для *Escherichia coli* при 37°C) можно ожидать её восьмикратного увеличения за час. Избыточный рост кишечной микрофлоры ведёт к реализации «кворум-эффекта»: интенсификации образования ею токсичных веществ, формированию эндотоксемии и эндотоксикоза [Patel R. et al., 2023]. Поэтому влияние лекарственных средств на феномен избыточного бактериального роста – ещё один

необходимый критерий отбора средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий.

Миелоабляционные воздействия на организм возможны не только при подготовке реципиентов к трансплантации стволовых кроветворных клеток, но и при воздействии на человека ипритов, проникающей радиации ядерного взрыва, γ -излучения выпавших на местность продуктов ядерного взрыва или аварийного радионуклидного выброса [Башарин В.А. и др., 2023]. В этих случаях, как и при миелоабляционной терапии, возможны потенциально летальные гастроэнтеротоксические эффекты.

Таким образом, отсутствие средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов препятствует полной реализации возможностей трансплантации стволовых кроветворных клеток, спасению пострадавших от оружия массового поражения и при радиационных авариях. Влияние на ЖКС и на избыточный рост кишечной микрофлоры, спровоцированные миелоабляционным воздействием – перспективные критерии идентификации таких средств. Перечисленное определяет актуальность темы исследования.

Степень разработанности темы. Известно, что цитостатические лекарственные средства и ионизирующее излучение обладают способностью нарушать регенерацию эпителия. Это определяет возможность снижения барьерной функции стенок ЖКТ по отношению к биологически активным веществам, содержащимся в химусе. Негативное влияние этого побочного эффекта на исход миелоабляционных воздействий не оспаривается, однако меры его профилактики не разработаны. Гипотетически, профилактика острой кишечной эндотоксемии в период проведения миелоабляционных воздействий может быть обеспечена применением медикаментозных средств, предупреждающих повреждение ЖКТ. Данная гипотеза ранее не формулировалась, а её проверка не проводилась.

Цель и задачи исследования. Цель работы – выбор медикаментозных средств профилактики острой гастроэнтеротоксичности миелоабляционных агентов.

Для достижения указанной цели предстояло решить следующие основные задачи:

1. Теоретически обосновать направления поиска медикаментозных средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий.
2. Разработать экспериментальные модели миелоабляционных воздействий, пригодные для скрининга средств профилактики её гастроэнтеротоксических эффектов.
3. Разработать методы скрининга средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий.
4. По итогам скрининга идентифицировать потенциальные средства профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий.

5. Оценить влияние потенциальных средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий на выраженность желудочно-кишечного стаза, эритроцитопении и острой кишечной эндотоксемии.

6. Оценить влияние потенциальных средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий на функциональное состояние организма в сроки, соответствующие периоду подготовки реципиентов к пересадке стволовых кроветворных клеток.

7. Разработать практические рекомендации по апробации потенциальных средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий.

Научная новизна работы. Путём разработки экспериментальных моделей созданы необходимые условия для оценки влияния медикаментозных средств на выраженность гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий. В том числе определены параметры фармакологического и лучевого воздействий, пригодных для экспериментального моделирования миелоабляционных воздействий, изучена зависимость изменения массы тела, летальности и средних сроков гибели животных от дозы этих воздействий, интерполированы значения их $LD_{99/30 \text{ сут}}$, выявлены значения супралетальных доз, при которых животные переживали 3 сут (время, соответствующее подготовке реципиента к пересадке стволовых кроветворных клеток) и, большая их часть, 5 сут (латентное время манифестации кишечного синдрома).

Обоснован выбор показателей для скрининга потенциальных энтеропротекторов, в том числе суточной экскреции индикана с мочой и относительной массы желудочного химуса. Первый из этих показателей характеризует поток эндогенного токсиканта бактериального происхождения, индола, из желудочно-кишечного химуса в портальную кровь [Мартынов В.Л. и др., 2017; Фридлянд И.Б., 1980], а второй – выраженность гастростаза, являющегося универсальной для млекопитающих [Dorval E.D. et al., 1985; Erickson B.A. et al., 1994] дозозависимой [Breiter N. et al., 1989] защитной реакцией на повреждение тонкой кишки миелоабляционными агентами. Разработан план доклинических исследований по идентификации медикаментозных средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий, включающий три этапа: (а) анализ литературных данных о фармакологической активности перспективных медикаментозных средств, (б) экспресс-оценка их влияния на выраженность ЖКС и избыточного бактериального роста у крыс при моделировании миелоабляционных воздействий и (в) оценка влияния отобранных по итогам скрининга медикаментозных средств на функциональное состояние энтерогематического барьера и организма в целом в условиях экспериментального моделирования миелоабляционных воздействий.

Впервые установлено, что пероральное назначение гидрокарбоната натрия – перспективный подход к экстренной профилактике гастростаза при миелоабляционной химиотерапии циклофосфамидом (ЦФ), создающий необходимое условие для последующего

перорального назначения пациентам медикаментозных средств лечения острого цитостатического мукозита тонкой кишки. Показано, что вводимый в желудок цистамина дигидрохлорид перспективен для апробации на крупных животных в качестве селективного средства экстренной профилактики гастростаза при лучевом миелоабляционном воздействии.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Доказано, что моделирование на крысах миелоабляционных воздействий ведёт к желудочно-кишечному стазу, повреждению слизистой оболочки тонкой кишки и формированию острой кишечной эндотоксемии, а профилактика этих гастроэнтеротоксических эффектов является необходимым и достаточным условием предупреждения летальности, угнетения газообмена и спонтанной двигательной активности животных в сроки, соответствующие подготовке реципиентов к трансплантации стволовых кроветворных клеток.

Предложены два критерия первичного отбора потенциальных медикаментозных средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий: способность снижать выраженность гастростаза и гипериндиганурии. Применение этих критериев не требует высокотехнологичного оборудования и сужает круг потенциальных профилактических средств, подлежащих последующему доклиническому исследованию. Разработанные на основе этих критериев методы скрининга способны снизить трудоёмкость поиска медикаментозных средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий. С использованием разработанных методов скрининга выявлены перспективные фармакологические средства экстренной профилактики гастростаза: гидрокарбонат натрия при миелоабляционном воздействии ЦФ и цистамина дигидрохлорид при лучевом миелоабляционном воздействии.

Методология и методы исследования. Методология исследования основана на последовательном применении индуктивного метода познания: выводе общих умозаключений из статистически обработанных экспериментальных данных. Целями логического анализа были выбор условий экспериментального моделирования гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий и разработка методов скрининга средств их профилактики. Для получения исходных данных применены токсикологические, радиобиологические, физиологические, химические, биохимические, гематологические, гистологические методы исследования. Экспериментальные исследования проведены в соответствии с нормативной документацией: ГОСТ 33044-2014 от 01.08.2015 «Принципы надлежащей лабораторной практики (OECD Guide 1:1998 OECD Principles of good laboratory practice (Принципы надлежащей лабораторной практики))», ГОСТ 33215-2014 от 01.07.2016 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур, рекомендациями №33 ЕЭК от 14.11.2023 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований».

Положения, выносимые на защиту:

1. На экспериментальных моделях, пригодных для скрининга средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов, показано возникновение при миелоабляционных воздействиях потенциально летальных осложнений: острого желудочно-кишечного мукозита, желудочно-кишечного стаза и острой кишечной эндотоксемии смешанного типа.

2. Определение экскреции индикана с мочой и показателя «относительная масса желудочного химуса» являются неспецифическими, скоростными и высокочувствительными методами экспресс-оценки гастроэнтеротоксичности миелоабляционных воздействий и эффективности средств их профилактики.

3. Внутривентрикулярное введение гидрокарбоната натрия предупреждает гибель крыс, нарушения их газообмена и спонтанной двигательной активности в течение 3 сут после воздействия циклофосфида в миелоабляционной дозе.

4. Защитное действие гидрокарбоната натрия и цистамина дигидрохлорида на желудочно-кишечный тракт при моделировании миелоабляционных воздействий на крысах является избирательным в отношении желудочно-кишечного тракта и не распространяется на кроветворную систему.

Степень достоверности и апробация результатов. Степень достоверности результатов определяется достаточным и репрезентативным объемом выборки, соблюдением принципов рандомизации и формирования экспериментальных групп, выбором корректной экспериментальной модели, методов исследования и проведенных расчётов. Получено заключение о соответствии эксперимента принципам и нормам биоэтики № 16/21 от 15.12.2021.

Основные результаты работы доложены на V Всероссийской научно-практической конференция молодых учёных «Медико-биологические аспекты химической безопасности», Санкт-Петербург, 2023, и Всероссийской межведомственной научно-практической конференции «Острые радиационные поражения: профилактика, диагностика и лечение, современные вызовы и решения», Санкт-Петербург, 2024.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 7 статей в отечественных научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, 4 переводные статьи и 1 статья в сборнике научной конференции.

Внедрение результатов. Разработанная в ходе диссертационного исследования экспериментальная модель внедрена в практическую деятельность ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России (акт внедрения от 09.07.2025г.) и в учебный процесс кафедры военной токсикологии и медицинской защиты федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М.

Кирова» Министерства обороны Российской Федерации в рамках дополнительной профессиональной программы профессиональной переподготовки по специальности «Токсикология», дисциплины «Токсикология» по теме «Медицинские средства профилактики и оказания помощи при радиационных и химических поражениях», акт внедрения от 14.07.2025 г.

Личный вклад соискателя. Тема, план диссертации, план экспериментального исследования, цели и задачи работы разработаны совместно с научным руководителем. Результаты исследований, изложенные в диссертационном исследовании, получены автором лично, статистически обработаны, обобщены, визуализированы и сформулированы. Автором подготовлены статьи и доклады по теме диссертационного исследования.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания в ходе прикладной научно-исследовательской работы по теме: «Скрининг фармакологических средств защиты энтерогематического барьера при острых радиационно-химических поражениях» (шифр: «Диаскоп»), номер государственного учёта НИОКТР 122040500066-6, в соответствии с тематическим планом осуществления научных исследований и разработок в сфере здравоохранения, выполняемых ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России. Соискатель был ответственным исполнителем этой научно-исследовательской работы.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения и глав: «Анализ состояния проблемы», «Материалы и методы исследования», «Разработка экспериментальных моделей и методов скрининга», четырех глав, содержащих результаты собственных экспериментальных исследований, одной главы, посвящённой их обсуждению, заключения, выводов, научно-практических рекомендаций и списка литературы. Диссертация изложена на 181 странице машинописного текста, иллюстрирована 8 таблицами и 54 рисунками. Список литературы содержит 223 источников, в том числе 66 отечественных и 157 иностранных.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. В работе приведены новые экспериментальные данные по выбору медикаментозных средств профилактики острой гастроэнтеротоксичности миелоабляционных агентов. Диссертация соответствует паспорту специальности 3.3.4 Токсикология (направление: Экспериментальная токсикология. Раздел токсикологии, изучающий принципы практической оценки токсичности соединений и способы ее снижения).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен обзор современной научной литературы по проблеме гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий, включая данные по критическим тканевым системам, принципам выбора критериев оценки гастроэнтеротоксичности и критериев оценки влияния миелоабляционных агентов на функциональное состояние организма, а также обоснованию выбора потенциальных медикаментозных средств защиты энтерогематического барьера. Во второй главе представлены материалы и методы исследований.

В третьей, четвертой, пятой, шестой и седьмой главах представлены результаты исследований. Полученные результаты обсуждены в восьмой главе и обобщены в виде заключения, выводов и практических рекомендаций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальное исследование проведено в следующей последовательности:

- 1) разработка экспериментальных моделей миелоабляционных воздействий;
- 2) разработка методов скрининга средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий;
- 3) пробный скрининг медикаментозных средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий;
- 4) изучение влияния потенциальных энтеропротекторов на состояние слизистой оболочки желудка и тонкой кишки;
- 5) изучение влияния перспективных энтеропротекторов на функциональное состояние организма.

Использовали самцов крыс-альбиносов 161-190 г, приобретённых в питомнике ФГУП «ПЛЖ Рапполово» национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Животных до начала исследования содержали 4 дня для адаптации особей к группам. При содержании соблюдали 12-часовой цикл освещения, температура воздуха составляла 19-25 °С, относительная влажность – 30-70 % в соответствии с ГОСТ 33215-2014 от 01.07.2016, корм и вода выдавались *ad libitum*. По группам животных распределяли путём рандомизации. Каждому из них присваивали индивидуальный номер при сплошном порядке нумерации. За 12 ч перед миелоабляционными воздействиями животных лишали доступа к корму без ограничения доступа к воде. На следующий день их до окончания трёхдневного наблюдения, по продолжительности отвечавшего миелоабляционному кондиционированию у человека, помещали в клетки с решётчатым полом при доступе только к воде.

Для изучения дозовой зависимости показателей цитостатического поражения крысам в латеральную вену хвоста вводили ЦФ в дозах от 50 до 500 мг/кг, для моделирования фармакологической миелоабляции – ЦФ в супралетальной дозе 390 мг/кг, составлявшей 1,7 LD_{99/30 сут}. Для сравнения, миелоабляцию моделировали общим однократным относительно равномерным Rö-облучением в супралетальной дозе 9,64 Гр, составлявшей 1,1 LD_{99/30 сут}. Для её идентификации предварительно изучили зависимость показателей поражения крыс от дозы излучения в интервале 5,78– 11,57 Гр. Rö-облучение осуществляли в передвижной рентгеновской установке производства ЗАО «ЭЛТЕХ-Мед» (Россия). Продолжительность наблюдения за животными для расчёта значения LD_{99/30 сут} составляла 30 сут, для расчёта значения LD_{99/5 сут} – 5 сут.

Для изучения влияния потенциальных энтеропротекторов на пропульсивную функцию желудка и тонкой кишки, проявления острой кишечной эндотоксемии, состояние слизистой оболочки желудка и тонкой кишки и функциональное состояние организма после миелоабляционных воздействий были сформированы следующие группы животных: интактные — крысы, не получавшие медикаментозных средств; ЦФ — получившие только циклофосамид в объёме 5 мл/кг в дозе 390 мг/кг; ГКН+ЦФ — внутрижелудочное (в.ж.) введение 4 % раствора гидрокарбоната натрия (ГКН) в объёме 15 мл/кг за 30 мин до ЦФ; ГКН+ЦФ+ГКН — введение 4 % раствора ГКН в объёме 15 мл/кг за 30 мин до и тотчас после ЦФ; ГКН+ЦФ+3·ГКН — введение раствора ГКН в объёме 15 мл/кг за 30 мин до, тотчас после, через 1 и 2 ч после ЦФ; HCl +ЦФ+3 HCl — введение в.ж. 0,3% раствора соляной кислоты (HCl) за 30 мин, до и тотчас после ЦФ. При моделировании лучевой миелоабляции формировали группы животных: облучение — Rö-облучение в дозе 9,64 Гр при отсутствии профилактики; Цистамин + облучен. — введение в.ж. цистамина дигидрохлорида в дозе 120 мг/кг в объёме 10 мл/кг за 30 мин до начала облучения; Индралин + облучен. — введение в.ж. индралина в дозе 40 мг/кг в объёме 10 мл/кг за 10 мин до начала облучения; Цистамин + индралин + облучен. — введение цистамина дигидрохлорида в дозе 120 мг/кг за 30 мин до начала облучения и индралина в дозе 40 мг/кг за 10 мин до начала облучения.

Методы гематологических исследований. Верификацию панцитопенического эффекта миелоабляционных агентов осуществляли с помощью общеклинического исследования крови, отобранной из *v. cavae caudalis*. Пробы исследовали на автоматическом гематологическом анализаторе Advia 2120i фирмы Siemens: измеряли содержание лейкоцитов (нейтрофилы, моноциты, эозинофилы, базофилы, лимфоциты) и ретикулоцитов.

Методы биохимических исследований. Кишечную эндотоксемию оценивали по содержанию в плазме портальной крови эндотоксина, который определяли с LAL-реактивом в модификации «гель-тромб тест» с помощью набора «ALPYR Test» производства ООО «Альгимед Техно», Россия. Для повышения чувствительности метода, до разведения и смешивания с LAL-реактивом пробы инкубировали при плюс 70 °С в течение 15 мин, этим переводя эндотоксин из связанного с альбумином в свободное состояние [Dawson, M.E., 1985]. Косвенным показателем кишечной эндотоксемии служила концентрация в плазме крови мочевины, которую определяли с использованием набора «Мочевина UV» (Biosystems, Испания) на биохимическом анализаторе A-25 (BioSystems, Испания). Энтероцитопению количественно оценивали по активности в тканях *duodenum*, *jejunum* и *ileum* маркёров плазмалеммы энтероцитов [Kühn F. et al., 2021; Sine J.P. et al., 1985]: холинэстеразы (ХЭ) и щелочной фосфатазы (ЩФ). В супернатанте определяли содержание белка по Бредфорду [Bradford, M.M., 1976]. Активность ХЭ определяли методом Элмана [Ellman, G.L. et al., 1961] на биохимическом анализаторе ChemWell 2910 (Awareness Tech., США) с ацетилтиохолина йодидом (Sigma-Aldrich, США) в качестве субстрата. Активность ЩФ

определяли кинетическим методом при 37 С на биохимическом анализаторе ChemWell 2910 (Awareness Tech., США). Верификацию миелоабляционного эффекта осуществляли с помощью показателей массы и клеточности кроветворных органов – костного мозга и селезёнки – до, а также через 1, 2 и 3 сут после миелоабляционных воздействий. Клеточность костного мозга и селезёнки рассчитывали по среднему содержанию в ткани ДНК, которую определяли с реактивом Дише [Збарский И.Б., 1968] и выражали в миллиграммах на грамм ткани. В качестве косвенного показателя острой эндотоксемии кишечного происхождения использовали экскрецию индикана с мочой [Мартынов В.Л. и др., 2017]. Использовали количественный колориметрический метод определения индикана в моче с реактивом Обермайера [Балаховский С.Д. и др., 1953; Джорджеску П. и др., 1963] в собственной модификации.

Методы химических исследований. В качестве специфического критерия оценки проницаемости энтерогематического барьера использовали абсолютную концентрацию и соотношение концентраций лактулозы и маннитола в портальной крови крыс после интрадуоденального введения смеси растворов этих сахаров. Лактулозу и маннитол определяли в плазме крови с помощью ультраэффективного жидкостного хроматографа Acquity UPLC с масс-спектрометрическим детектором Xevo TQD, Waters (США).

Методы морфологических исследований. Для качественной оценки влияния цитостатических агентов на структуру энтерогематического барьера выполняли морфологическое исследование двенадцатиперстной, тощей, подвздошной, слепой и ободочной кишок. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали с помощью светового микроскопа 3DHISTECH Pannoramic MIDI (ООО «Карл Цейсс», Германия). Подсчитывали число, измеряли длину кишечных ворсинок на 58-73 срезах каждого отдела тонкой кишки от трёх животных. Результаты обрабатывали с помощью программы Case Viewer – 3DHISTECH Ltd.

Методы, применённые для изучения функционального состояния организма. При изучении функционального состояния организма использовали показатели динамики выживаемости и массы тела, интенсивности газообмена и внешнего дыхания в покое, спонтанной двигательной активности животных. Крыс ежедневно, за исключением выходных дней, взвешивали, регистрировали случаи гибели. Среднюю ожидаемую продолжительность жизни рассчитывали как среднее арифметическое значение индивидуальных сроков гибели животных, павших в течение периода наблюдения, составлявшего 30 сут. Газообмен и внешнее дыхание животных изучали в аппарате Миропольского непосредственно до, через 4, 24, 48 и 72 ч после миелоабляционного воздействия. Спонтанную двигательную активность изучали в итальянской клетке активности Ugo Basile с инфракрасными излучателями до и ежедневно в течение 3 сут после миелоабляционного воздействия. Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета программ Origin (OriginLab Corporation).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка экспериментальных моделей миелоабляционных воздействий и методов скрининга средств профилактики её гастроэнтеротоксических эффектов. ЦФ при внутривенном (в. в.) введении является фармакологическим средством миелоабляции. Однократное его введение животным отвечает задаче скрининга энтеропротекторов. При выборе дозы ЦФ учитывали, что в течение 3 сут животные не должны погибнуть, а динамика клеточности их кроветворных органов и гематологических показателей должна указывать на формирование миелоабляции и необратимой панцитопении. На рисунке 1 представлена графическая аппроксимация результатов изучения дозовой зависимости летальности и средней продолжительности жизни (СПЖ) после введения циклофосамида. Она показывает, что доза ЦФ, лежащая в интервале 300-390 мг/кг, удовлетворяет трём условиям, необходимым для моделирования миелоабляционного цитостатического воздействия: обеспечивает $СПЖ \geq 5$ сут, что указывает на гибель животных от костномозгового синдрома, позволяет им дожить до 3 сут после цитостатического воздействия и при этом является абсолютно летальной.

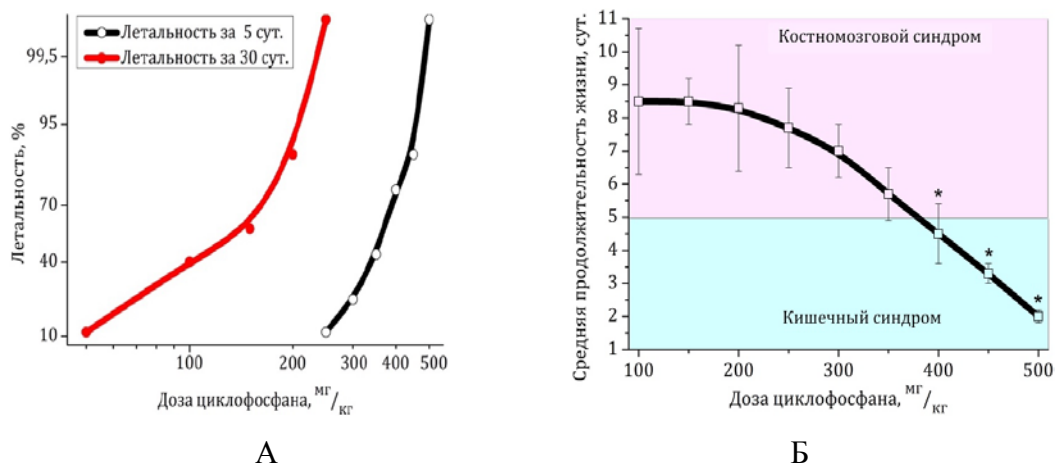


Рисунок 1 – Линии трендов дозовой зависимости летальности (А) и средней продолжительности жизни (Б) крыс после введения циклофосамида

*–Значимое различие со средней продолжительностью жизни, $M \pm m$, сут, после введения циклофосамида в дозе 100 мг/кг, $p < 0,05$

Для верификации миелоабляционного эффекта изучена динамика клеточности кроветворных органов и содержания форменных элементов крови в течение 3 сут после воздействия ЦФ. Это вело к гипоплазии кроветворных органов. За трое суток массовые коэффициенты селезёнки и красного костного мозга снижались на 64% и 40 %, соответственно (рисунок 2, А). Это было обусловлено убылью кариотических клеток: содержание ДНК в тканях селезёнки и костного мозга снижалось на 44 и 46 %, соответственно (рисунок 2, Б).

Полученные данные свидетельствуют о том, что на 3 сут после введения ЦФ в селезёнке оставались лишь клетки стромы, эритроциты и небольшое число созревающих клеток миелоидного ряда, в то время как клетки пролиферативного и стволового пулов отсутствовали. Таким образом, внутривенным введением крысам ЦФ в дозе 390 мг/кг достигался миелоабляционный эффект, то есть, в соответствии с исходным определением этого термина [Lorenz, E. et al., 1952], гибель полипотентных стволовых кроветворных клеток и клеток пролиферативного пула кроветворной ткани.

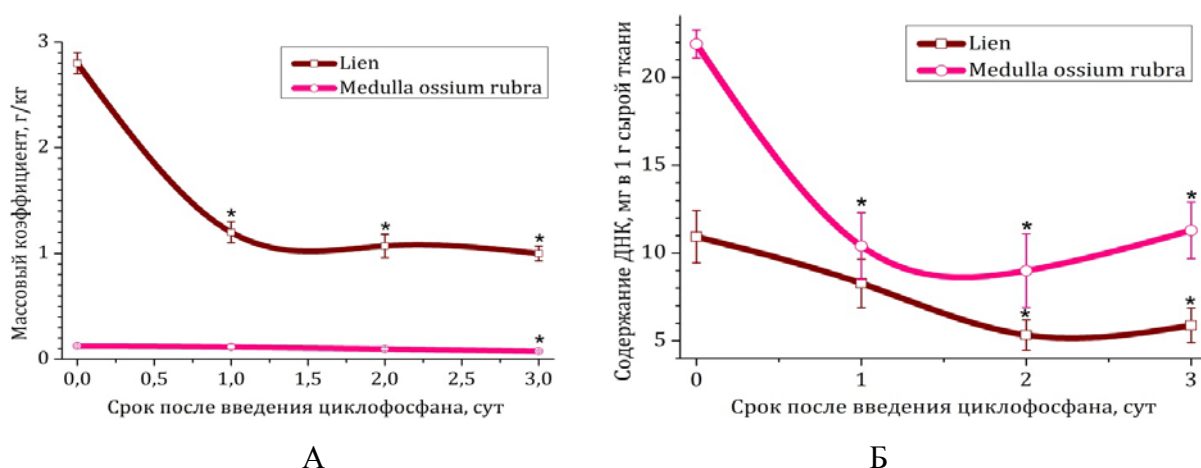


Рисунок 2 – Массовые коэффициенты костного мозга правого бедра и селезёнки крыс и содержание ДНК в этих органах после внутривенно введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг, $M \pm m$, $n = 6$ (А – массовый коэффициент органа, г на 1 кг массы тела; Б – содержание ДНК, мг в 1 г сырой ткани).

Примечания: 1 – 0 сут – исходное значение;

2 – * – Значимое различие с исходным значением, $p < 0,05$;

3 – Представлен массовый коэффициент костного мозга из правой бедренной кости)

Внутривенное введение крысам ЦФ в дозе 390 мг/кг вызывало падение через 3 сут содержания в периферической крови лейкоцитов и ретикулоцитов. Содержание форменных элементов гранулоцитарного ряда снижалось к 3 сут в 7-17 раз, что указывало на формирование у животных панцитопенического синдрома – необходимого условия для трансплантации аллогенных стволовых кроветворных клеток.

Для верификации энтеротоксичности ЦФ в дозе 390 мг/кг выполняли морфологическое исследование двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишок. Через 3 сут после введения ЦФ наблюдали выраженные воспалительные изменения в тонкой кишке. Таким образом, введение крысам ЦФ вело к некротическим и воспалительным изменениям в эпителии всех отделов тонкой кишки с тенденцией к более выраженному поражению её дистального отдела. Данное воздействие пригодно для экспериментального моделирования миелоабляционного цитостатического воздействия и может быть использовано при скрининге медикаментозных средств профилактики её гастроэнтеротоксических эффектов.

Для сравнения миелоабляцию моделировали общим однократным относительно равномерным R $\ddot{o}$ -облучением в дозе 9,64 Гр. Оно вело к формированию через 3 сут миелоабляции и необратимой панцитопении, воспалительных изменений в эпителии всех отделов тонкой кишки с тенденцией к более выраженному поражению её дистального отдела.

Ранее задача выбора медикаментозных средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционного воздействия не ставилась, что обусловило необходимость разработки надлежащих методов скрининга. Последний предполагалось осуществлять с использованием легко выявляемых проявлений гастроэнтеротоксичности, в том числе ЖКС и острой кишечной эндотоксемии.

Ввиду отсутствия у крыс рвотного центра [Horn C.C. et al., 2013] эметическая реакция у них не возникает, что при наличии пилороспазма и (или) гастропареза способствует накоплению химуса в желудке. Через трое суток после миелоабляционных воздействий желудок оказывался переполненным даже в тех случаях, когда доступ к корму был прекращён. При моделировании лучевой миелоабляции стаз, хотя и менее выраженный, наблюдался у них также в слепой кишке. У интактных животных на третий день голодания желудок оказывался пустым (рисунок 3).

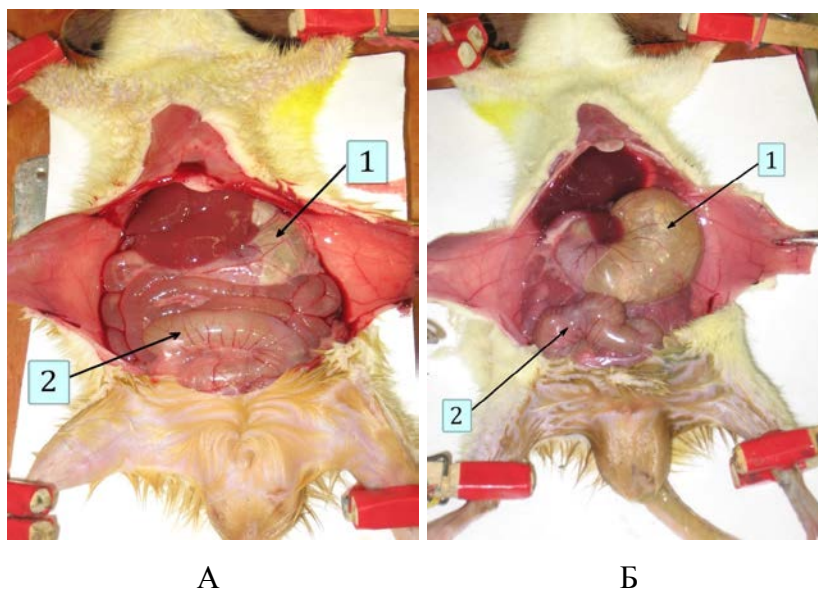


Рисунок 3 – Органы брюшной полости крыс, лишённых доступа к корму за 48 ч до лапаротомии (А – интактная, Б – через 72 ч после в. в. введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг). Стрелками обозначены: 1 – желудок; 2 – слепая кишка

Количественная оценка ЖКС показала высокую чувствительность применённых для этого показателей «относительная масса желудочного химуса» и «относительная масса слепки кишечного химуса» после трёхдневного голодания. Значение относительной массы желудочного химуса возрастало на порядок от контрольных животных на 3 сут после миелоабляционных воздействий. Относительная масса слепки кишечного химуса увеличивалась лишь после облучения. Относительная масса желудочного химуса отрицательно коррелировала с массой тела животных,

выраженной в процентах от её значения до введения циклофосфида или R $\ddot{o}$ -облучения (рисунок 4). Таким образом, разработан метод оценки влияния потенциальных энтеропротекторов на выраженность ЖКС, предполагающий измерение относительной массы желудочного и слепкишечного химусов через 72 часа после миелоабляционного воздействия и 48 часов после лишения доступа к корму.

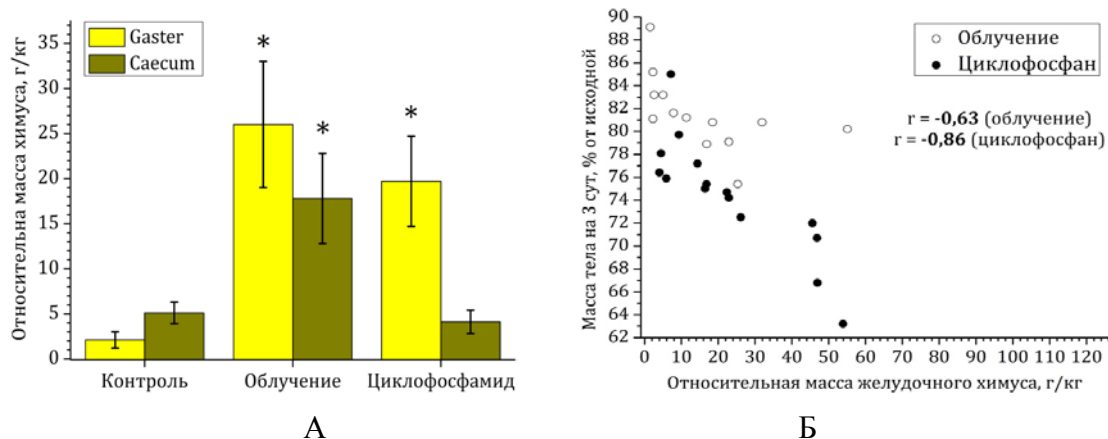


Рисунок 4 – Относительная масса желудочного и слепкишечного химусов (А) и связь относительной массы желудочного химуса с массой тела крыс на 3 сут после миелоабляционных воздействий (Б), $M \pm m$, $n = 13$

* – значимое различие с контролем, $p < 0,05$.

В качестве экспресс-метода оценки выраженности острой кишечной эндотоксемии использовали определение суточной экскреции индикана с мочой. В литературе отсутствует работоспособный метод для количественного определения индикана в моче при работе с крысами. Такой метод, основанный на использовании реактива Обермайера, разработан в ходе исследования (рисунок 5).

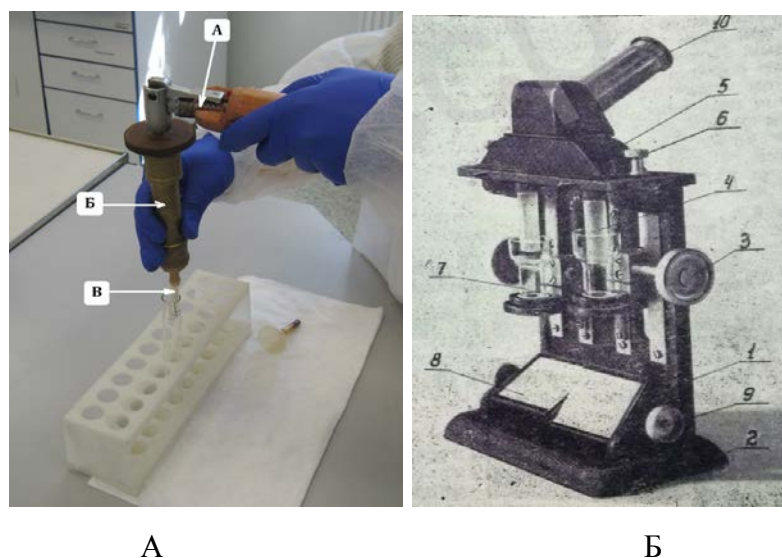


Рисунок 5 – Фильтрующий модуль высокого давления (А) и визуальный колориметр Дюбоска с набором кювет (Б) (А – шланг к компрессору; Б – цилиндр высокого давления; В – сменный фильтрующий картридж; 1 – массивная стойка; 2 – основание; 3 – маховики, управляющие положением кювет; 4 –хрустальные цилиндры; 5 – съёмный оптический модуль; 6 –

винты крепления съёмного оптического модуля; 7 – цилиндрические кюветы на прозрачных поддонах; 8 – светоотражательные экраны; 9 – ручки управления светоотражательными экранами; 10 – окуляр)

Влияние потенциальных энтеропротекторов на изменение пропульсивной функции желудка и тонкой кишки, вызванное миелоабляционными воздействиями. Относительная масса желудочного химуса была у крыс, получивших циклофосфамид, в 7,5 раз больше, чем у интактных. Двукратное введение в желудок ГКН частично предотвращало ЖКС: относительная масса желудочного химуса была в среднем в 1,6 раза меньше, чем у незащищённых крыс, хотя и оставалась втрое большей, чем у интактных. Снижение относительной массы слепокишечного химуса было представлено в виде тенденции. Введение ГКН частично предупреждало увеличение соотношения масс желудочного и слепокишечного химусов. Четырёхкратное введение ГКН было не эффективнее двукратного, а однократное профилактическое введение ГКН было малоэффективным (рисунок 6, А). Таким образом, двукратный приём ГКН в дозе, для взрослого человека биоэквивалентной 175 мл 4 % раствора за 0,5 ч до и тотчас после воздействия циклофосфамида, перспективен для апробации в качестве средства профилактики гастростаза при фармакологической миелоабляции. Для экстренной профилактики гастроэнтеротоксических эффектов лучевого миелоабляционного воздействия крысам вводили в желудок радиопротекторы: цистамина дигидрохлорид и (или) индралин. Введение в желудок цистамина в дозе, для взрослого человека биоэквивалентной 1,2 г за 30 мин до начала облучения, предотвращало гастростаз, вызванный облучением в миелоабляционной дозе (рисунок 6, Б). Введение в желудок энтеропротекторов мало влияло на вызванную миелоабляционными воздействиями гипотрофию селезёнки (рисунок 6, А и Б).

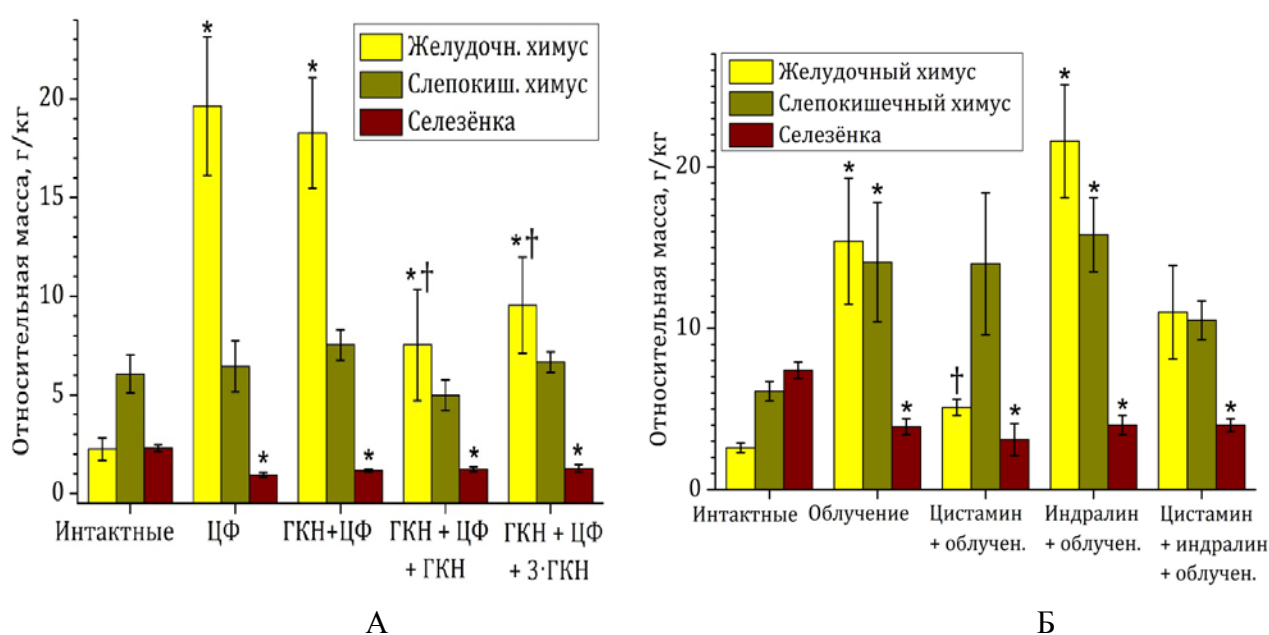


Рисунок 6 – Относительная масса желудочного, слепокишечного химусов и селезёнки у крыс через 72 ч после внутривенного введения

циклофосфамида в дозе 390 мг/кг (А), $M \pm m$, $n = 10$ или после общего однократного Rö-облучения в дозе 9,64 Гр (Б), $M \pm m$, $n = 8$

Влияние потенциальных энтеропротекторов на проявления острой кишечной эндотоксемии, вызванной миелоабляционными воздействиями. Экскреция индикана с мочой после изолированного воздействия циклофосфамида была в среднем в 1,9 раза выше, чем у интактных крыс; на фоне двукратного введения в желудок ГКН это превышение было 1,4-кратным, проявляясь лишь в виде тенденции (рисунок 7, А). Экскреция индикана с мочой после изолированного воздействия Rö-облучения была, в среднем, в вдвое выше, чем у интактных крыс; радиопротекторы не оказывали существенного влияния на индиканурию (рисунок 7, Б). Таким образом, с помощью разработанного метода показано, что миелоабляционные агенты увеличивают экскрецию индикана с мочой, а гидрокарбонат натрия снижает значение этого показателя острой кишечной эндотоксемии при миелоабляции циклофосфамидом.

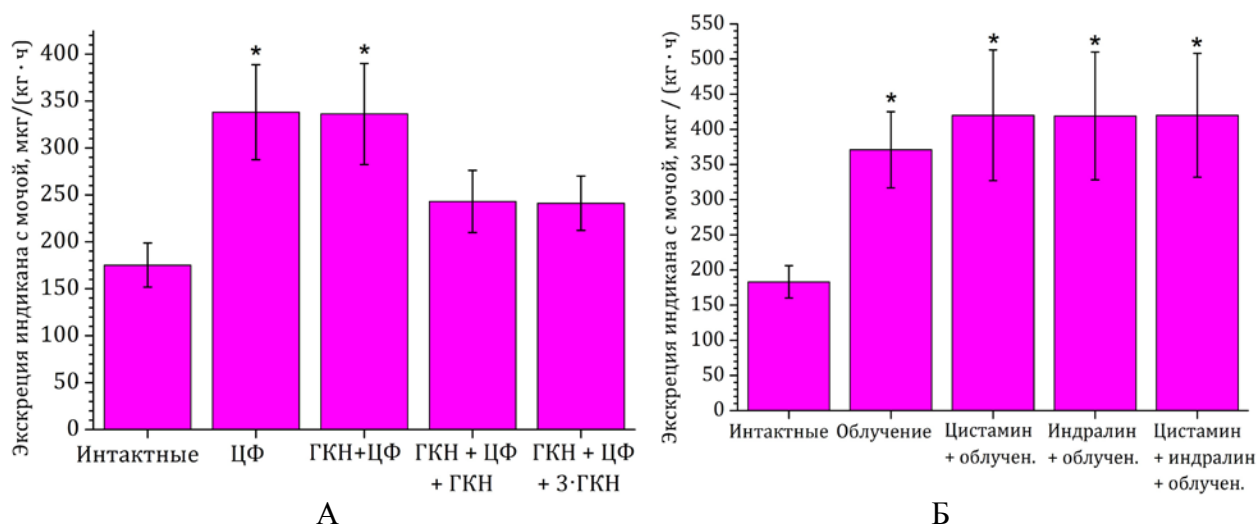


Рисунок 7 – Экскреция индикана с мочой у крыс через 72 ч после внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг (А), $M \pm m$, $n = 10$, и после общего однократного Rö-облучения в дозе 9,64 Гр (Б), $M \pm m$, $n = 8$

* – значимое различие с интактной группой, $p < 0,05$

При миелоабляционных воздействиях возможны три механизма острой кишечной эндотоксемии: перераспределительный, продукционный и ретенционный. Прямое доказательство участия перераспределительного механизма получено с использованием лактулозо-маннитолового теста. Смеси сахаров вводили животным интрадуоденально с последующим их определением в крови из воротной вены. Повышение у таких животных соотношения концентраций лактулозы и маннитола указывает на повышение парацеллюлярной проницаемости эпителия тонкой кишки. Абсолютные значения концентрации лактулозы или маннитола в плазме портальной крови существенно не различались с контрольными. При этом наблюдалось кратное увеличение, в сравнении с контролем, соотношения концентраций лактулозы и маннитола в плазме крови. Для группы, которой вводили циклофосфамид, эти изменения были значимы, для группы, подвергшейся Rö-облучению – представлены в виде тенденции (рисунок 8, А). Маркёром

продукционной кишечной эндотоксемии было повышение в 1,5 раза уровня мочевины в крови, чем у интактных животных (рисунок 8, Б). Содержание эндотоксина могло увеличиваться из-за гастростаза, а слепокишечный стаз увеличивал продолжительность контакта эндотоксина с сорбирующей поверхностью, поэтому портальная эндотоксинемия могла быть как продукционной, так и перераспределительной (рисунок 8, В). Таким образом, миелоабляционное воздействие вызывало формирование у крыс острой кишечной эндотоксемии смешанного типа. Профилактическое введение в желудок ГКН не устраняло острую кишечную эндотоксемию. Однако ГКН может быть полезен как лекарственный препарат, обеспечивающий доставку из желудка в кишечник средств подавления вегетации толстокишечной микрофлоры – особенно в сочетании с энтеральной детоксикацией (энтеросорбцией, кишечным лаважем), проводимой с целью удаления эндогенных токсикантов из мест их образования [Хубутя М.Ш., и др, 2016].

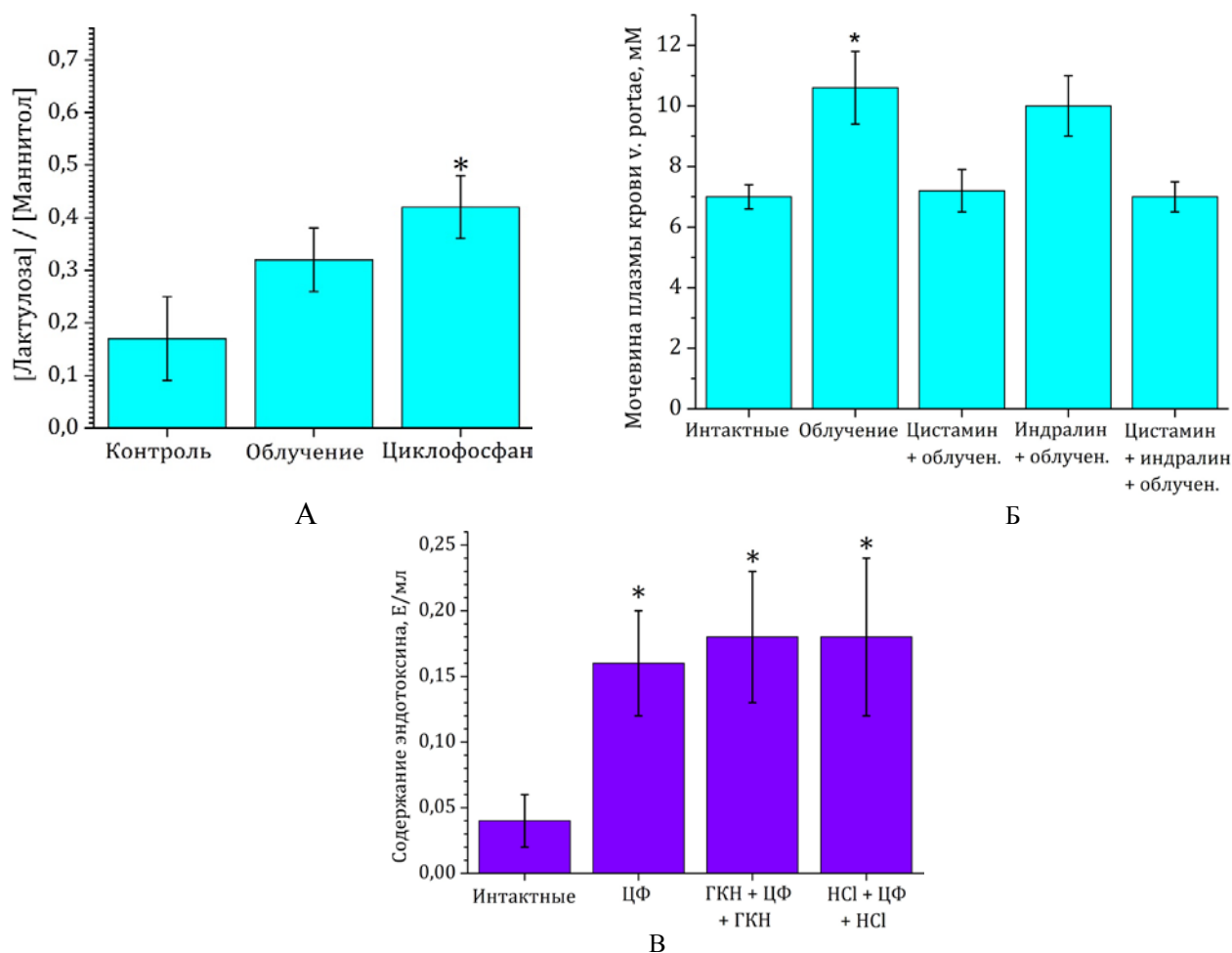


Рисунок 8 – Отношение концентрации лактулозы и маннитола в плазме портальной крови после их интрадуоденального введения крысам через 3 сут после Rö-облучения или введения циклофосфамида (А); $M \pm m$, $n = 6$; Содержание мочевины в крови, отобранной из *v. portae* у крыс через 72 ч после общего однократного Rö-облучения в дозе 9,64 Гр (Б), $M \pm m$, $n = 8$; Содержание эндотоксина в плазме портальной крови у крыс через 72 ч после внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг (В), $M \pm m$, $n = 10$

* – значимое различие с контрольной или интактной группой, $p < 0,05$

Влияние потенциальных энтеропротекторов на состояние слизистой оболочки желудка и тонкой кишки после миелоабляционных воздействий. Через 3 сут после введения ЦФ в тонкой кишке наблюдались изменения (полнокровие, воспаление, атрофия), тяжесть которых нарастала в направлении от двенадцатиперстной до подвздошной кишок. Существенно сокращалась средняя длина кишечных ворсинок, отметили и тенденцию к уменьшению их числа на кольцевом срезе органа. В подвздошной кишке ворсинки были атрофированы. У крыс, которым кроме ЦФ вводили двукратно ГКН, эти изменения не наблюдали (рисунок 9).

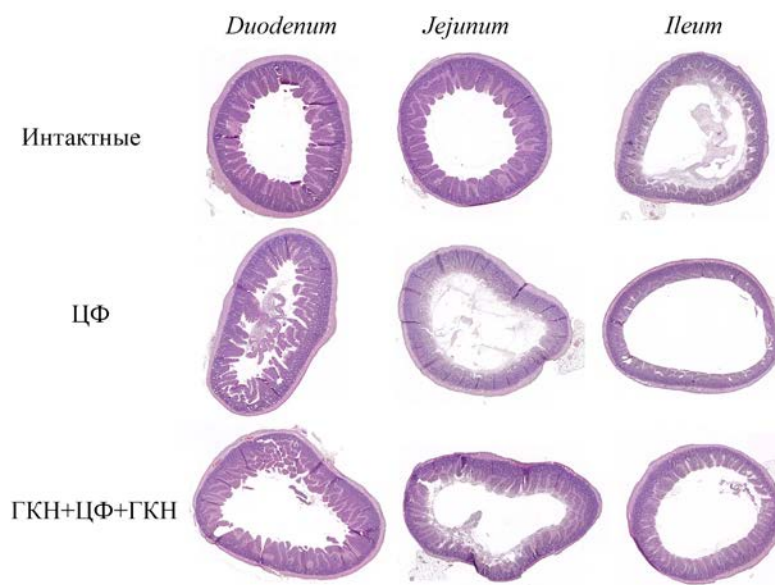


Рисунок 9 – Кольцевые срезы *duodenum*, *jejunum* и *ileum* у крыс через 72 ч после внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 50$

Активность ЩФ, находящейся в щёточной кайме, снижалась во всей тонкой кишке, а активность АХЭ – только в *jejunum* и *ileum*. Двукратное введение ГКН судя по ЩФ, оказало защитное действие на *duodenum*, а HCl – нет. АХЭ ни на ГКН, ни на HCl не отреагировала (рисунок 10).

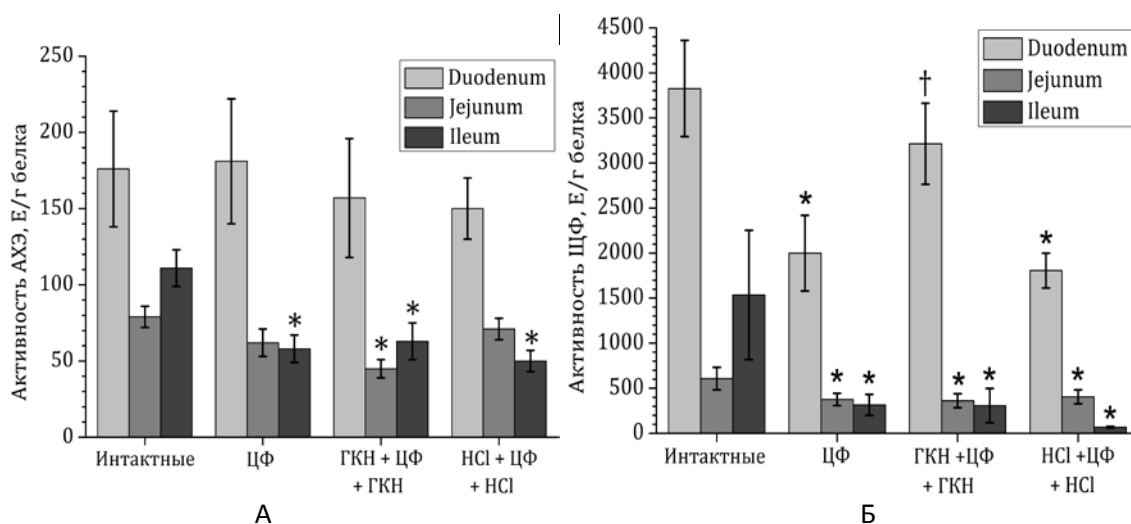


Рисунок 10 – Активность ацетилхолинэстеразы (А) и щелочной фосфатазы (Б) тканей тонкой кишки крыс через 72 ч после внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг, $M \pm m, n=10$

* — значимое различие с интактной группой, $p < 0,05$;

† — значимое различие с группой циклофосфамид, $p < 0,05$

Таким образом, ГКН, введённый за 30 мин до и тотчас после введения ЦФ, обладал защитным действием на слизистую оболочку двенадцатиперстной кишки.

Влияние перспективных энтеропротекторов на функциональное состояние организма после миелоабляционных воздействий. Животные, получившие ГКН, гибли в более поздние сроки, чем в контроле, однако это различие наблюдалось лишь в ближайшие 6 сут после введения ЦФ, т. е. в период проявлений кишечного синдрома (рисунок 11, А). Такое влияние ГКН на динамику летальности и массы тела указывает на его энтеропротективное действие при поражении крыс циклофосфамидом. Этот вывод подкрепляется тенденцией к положительным привесам у получавших ГКН крыс в первые сутки после миелоабляционного воздействия, в то время как в контроле привесы были отрицательными (рисунок 11, Б).

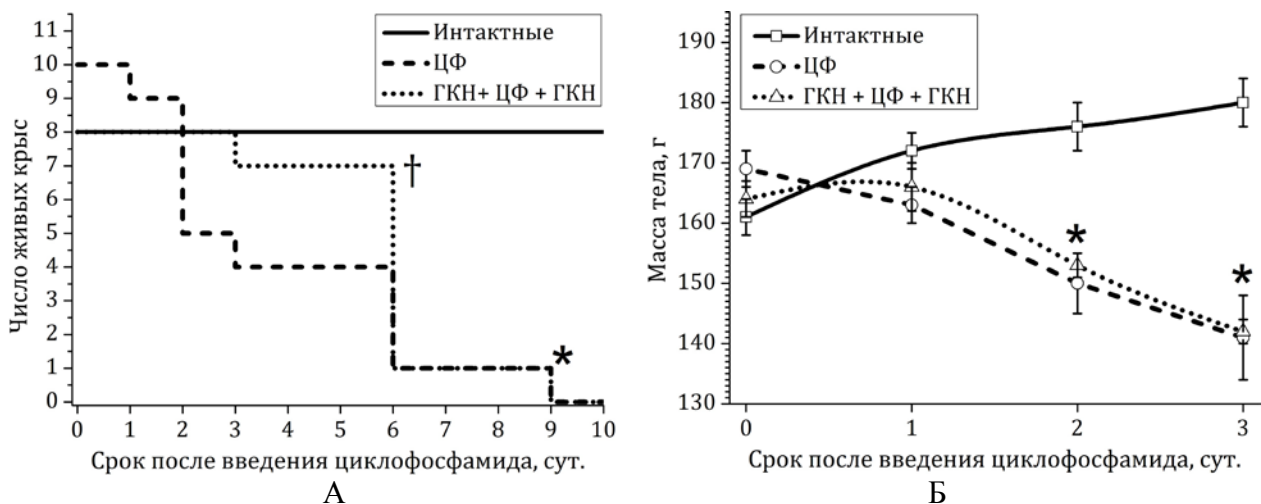


Рисунок 11 – Динамика летальных исходов (А) и массы тела крыс (Б) после внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг

* — значимое различие с интактной группой, $p < 0,05$;

† — значимое различие с группой «ЦФ», $p < 0,05$

В течение 2 сут после введения ЦФ потребление кислорода незащищёнными животными было в 1,4-1,8 раз меньше, чем у интактных особей; при расчёте на дыхательный цикл это различие было двукратным. У крыс, получивших ГКН, эти показатели газообмена были значимо снижены лишь через 4 ч после введения ЦФ. Межгрупповые различия значений частоты дыхательных движений (ЧДД) были статистически несущественными. Двукратное введение ГКН предупреждало угнетение газообмена (рисунок 12). Это указывает на способность ГКН предупреждать не только гастростаз (рисунок 6 А), но также острую кишечную эндотоксемию (рисунок 7 А) и сопряжённые с нею нарушения энергетического обмена.

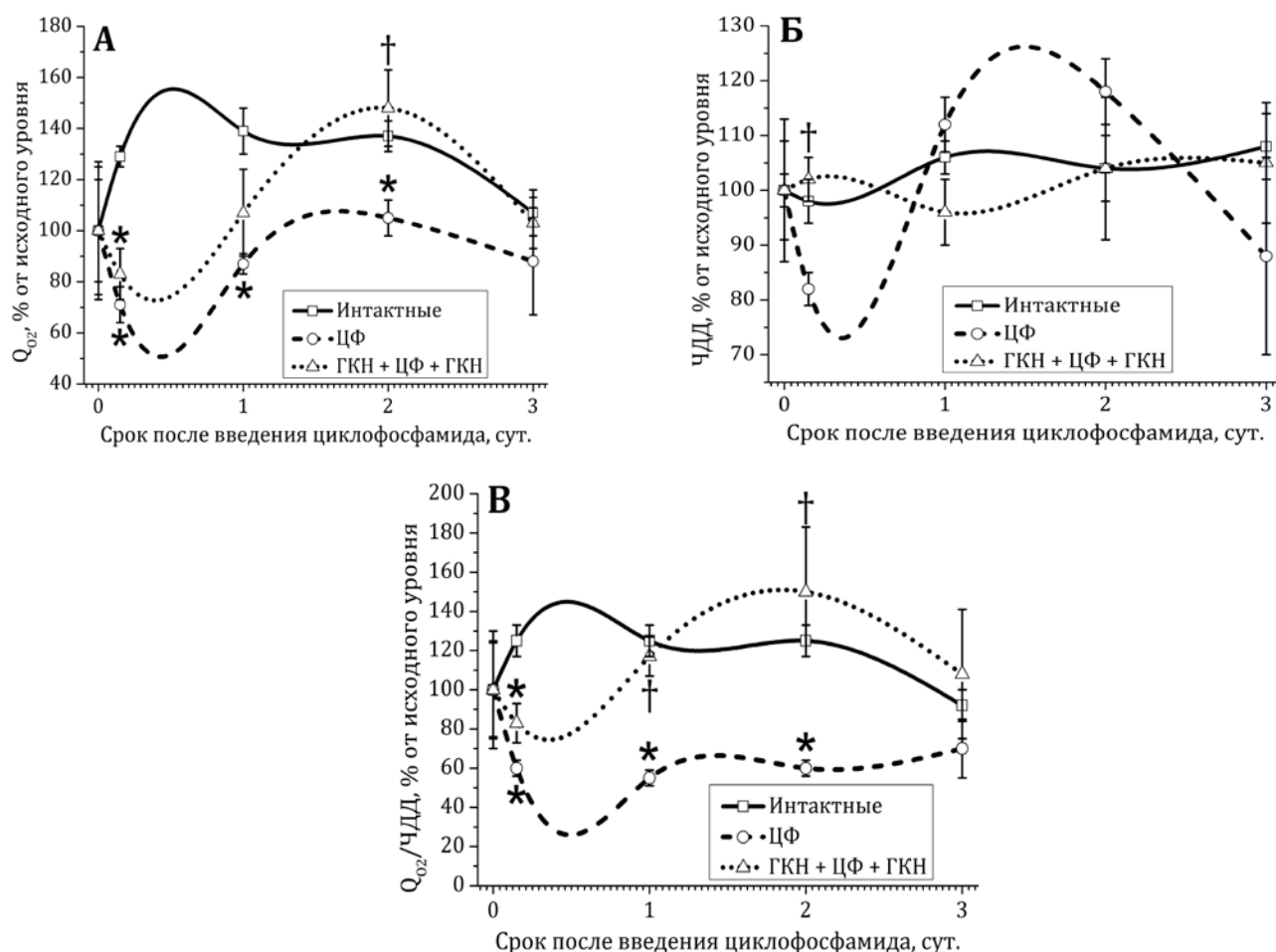


Рисунок 12 – Потребление кислорода организмом (А), частота дыхательных движений (Б) и потребление кислорода в среднем за один дыхательный цикл (В) после внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг, $M \pm m$, $n = 8$ для ближайших двух сут и $n = 4$ для 3 сут

Q_{O_2} — потребление кислорода организмом, мл/(кг·мин);

ЧДД — частота дыхательных движений, мин⁻¹;

$Q_{O_2}/\text{ЧДД}$ — потребление кислорода организмом за один дыхательный цикл, мл/кг;

* — значимое различие с интактной группой, $p < 0,05$;

† — значимое различие с группой «ЦФ», $p < 0,05$

Спонтанная двигательная активность (СДА) незащищённых крыс, получивших циклофосфамид, во все сроки наблюдения была снижена; для вертикальной активности это снижение было значимым в ближайшие сутки. На фоне применения ГКН показатели СДА были выше, чем без защиты – на 3 сут после введения циклофосфамида значимо (рисунок 13, А и Б). Получившие ЦФ крысы меньше ухаживали за шёрстным покровом; на фоне применения ГКН эта тенденция отсутствовала (рисунок 13, В). У всех крыс, получивших ЦФ, наблюдалась тенденция к снижению числа актов дефекации (рисунок 13, Г).

Таким образом, введение крысам в желудок 4 % раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до и тотчас после введения ЦФ проявляло энтеропротективное действие: (1) увеличивало среднюю продолжительность жизни в ближайшие 5 сут после введения ЦФ; (2) отсрочивало

начало потери массы тела; предупреждало (3) угнетение газообмена и (4) поведенческие нарушения.

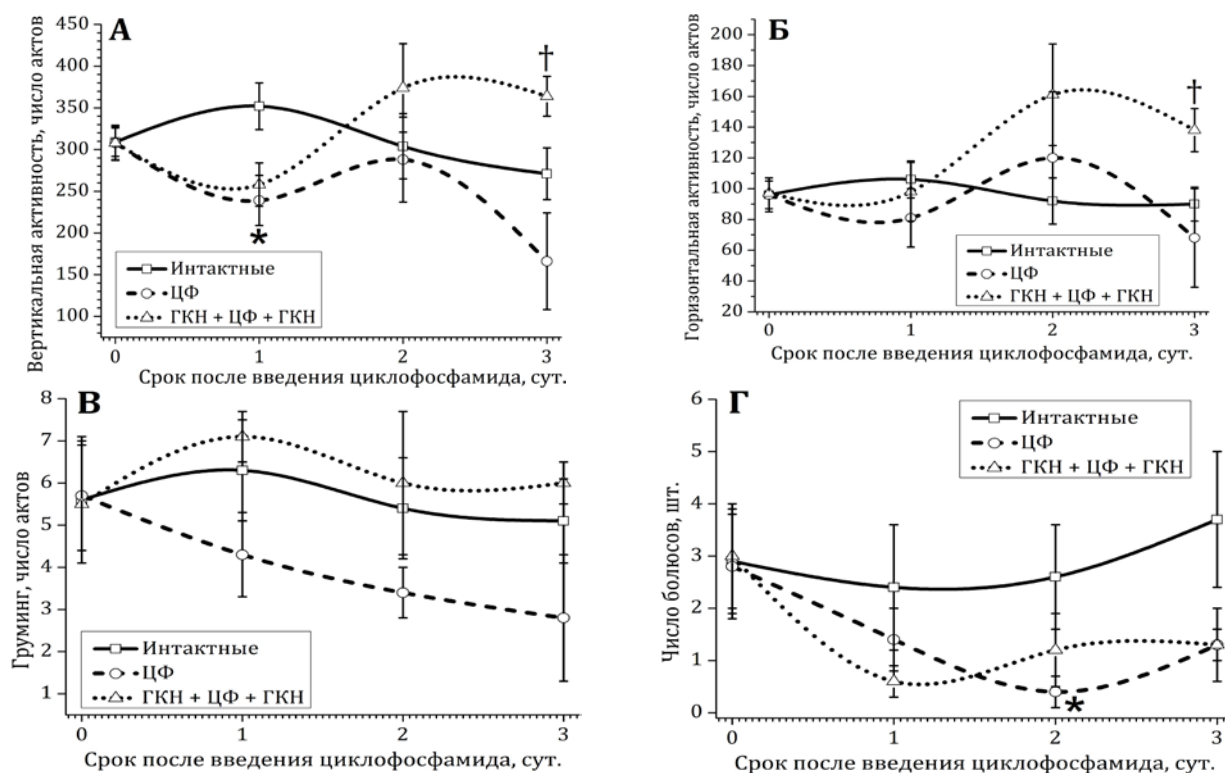


Рисунок 13 – Вертикальная (А), горизонтальная (Б) двигательная активность, активность по уходу за шёрстным покровом (В) и число болюсов (Г) у крыс после внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг, $M \pm m$, $n = 8$ для ближайших двух сут и $n = 4$ для 3 сут

* — значимое различие с интактной группой, $p < 0,05$;

† — значимое различие с группой «ЦФ», $p < 0,05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги работы. Для идентификации потенциальных энтеропротекторов разработаны модели острых миелоабляционных воздействий. Интерполированы дозы, применяемые для миелоабляционных воздействий у крыс: это 390 мг/кг при в.в. введении циклофосфамида либо 9,64 Гр при общем однократном относительно равномерном R $\ddot{o}$ -облучении. Эти дозы удовлетворяют трём условиям, необходимым для моделирования миелоабляционных воздействий: обеспечивают СПЖ ≥ 5 сут, что указывает на гибель животных от костномозгового синдрома, позволяют им дожить до 3 сут после цитостатического воздействия и являются абсолютно летальными. При этом через 3 сут после воздействий у крыс формируются миелоабляционный и панцитопенический эффекты, а также морфологически подтверждённое энтеротоксическое действие на отделы тонкой кишки. Эти данные подтверждают адекватность разработанных экспериментальных моделей для скрининга энтеропротекторов.

Для экспресс-оценки профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий обосновано использование двух показателей: (1) выраженность гастростаза и (2) выраженность острой кишечной эндотоксемии на 3 сут после миелоабляционных воздействий.

Разработаны методы количественного определения этих показателей в эксперименте на крысах, в том числе определение относительной массы желудочного химуса и экскреции индикана с мочой.

С помощью указанных методов выполнен скрининг медикаментозных средств профилактики энтеротоксичности миелоабляционных агентов. Идентифицированы перспективные энтеропротекторы: гидрокарбонат натрия при фармакологической миелоабляции циклофосфамидом и цистамина дигидрохлорид при лучевом миелоабляционном воздействии.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Разработанные в ходе исследования методы скрининга способны снизить трудоёмкость поиска медикаментозных средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий. Идентифицированные с их использованием фармакологические средства экстренной профилактики гастростаза: гидрокарбонат натрия при миелоабляционном воздействии ЦФ и цистамина дигидрохлорид при лучевом миелоабляционном воздействии – перспективны для апробации с участием добровольцев; соответствующие предложения сформулированы.

ВЫВОДЫ

1. Теоретически обоснован выбор медикаментозных средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий. В качестве основного критерия такого выбора рассматривали их способность предотвращать развитие желудочно-кишечного стаза. Выбор осуществляли из числа средств, препятствующих токсификации цитостатических фармацевтических субстанций алкилирующего действия, и из числа радиопротекторов.

2. Разработаны экспериментальные модели миелоабляционных воздействий, пригодные для скрининга средств профилактики её гастроэнтеротоксических эффектов. Обосновано применение с этой целью внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг или общего однократного рентгеновского облучения крыс в дозе 9,64 Гр.

3. Выявлено повышение у крыс через 3 сут после миелоабляционных воздействий показателей «относительная масса желудочного химуса» и «экскреция индикана с мочой», обосновано использование этих феноменов в целях скрининга средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий, разработаны соответствующие экспресс-методы.

4. Выбраны потенциальные средства профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий. В эксперименте на крысах обосновано внутрижелудочное введение с этой целью гидрокарбоната натрия в качестве средства профилактики токсификации циклофосфамида и цистамина дигидрохлорида в качестве радиопротектора.

5. Внутрижелудочным введением крысам гидрокарбоната натрия в дозе по 600 мг/кг за 30 мин до и тотчас после введения циклофосфамида достигнуто частичное предупреждение гастростаза, гипериндиканурии, энтероцитопении, дисфункции энтерогематического барьера,

нарушений газообмена, спонтанной двигательной активности, положительное влияние на динамику массы тела и улучшение функций дожития в течение 3 сут, которые соответствуют срокам проведения миелоабляционных воздействий при подготовке к пересадке стволовых кроветворных клеток человеку.

6. Внутривенным введением крысам цистамина дигидрохлорида в дозе 120 мг/кг за 30 мин до облучения достигнуто частичное предупреждение гастростаза, положительное влияние на динамику массы тела и улучшение функций дожития без существенного влияния на показатели энтероцитопении, слепокишечного стаза, выраженность гипериндиканурии, интенсивность газообмена и внешнего дыхания.

7. Разработаны практические рекомендации по апробации потенциальных средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО АПРОБАЦИИ ГИДРОКАРБОНАТА НАТРИЯ И (ИЛИ) ЦИСТАМИНА ДИГИДРОХЛОРИДА В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВ ЭКСТРЕННОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ГАСТРОЭНТЕРОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ МИЕЛОАБЛЯЦИОННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

1. Рекомендуется привлекать к испытаниям пациентов, которым назначены системное введение цитостатических лекарственных препаратов алкилирующего действия и (или) общее облучение. Испытуемые подлежат рандомизации и стратификации по следующим критериям: наименование и доза цитостатического лекарственного препарата, доза ионизирующего излучения, диагноз, возраст, пол. К участию в испытаниях не привлекать пациентов, которым, помимо системной цитостатической терапии, назначено хирургическое лечение, а также имеющим индивидуальную непереносимость гидрокарбоната натрия и (или) цистамина дигидрохлорида.

2. Рекомендуется назначать гидрокарбонат натрия внутрь натошак в виде 4 % водного раствора двумя равными дозами в два приёма: за 0,5 ч до и тотчас после сеанса внутривенного введения цитостатического лекарственного препарата алкилирующего действия. Цистамина дигидрохлорид (цистамин) назначать натошак внутрь в виде порошка или таблеток по 0,2 г [Машковский М.Д., 2012] за 0,5 ч до сеанса общего облучения. Препарат запивают водой. Таблетки необходимо глотать, не разжёвывая. Дозирование осуществлять с использованием коэффициентов пересчёта доз, применяемых для их межвидовой экстраполяции [Хабриев Р.У., 2005].

3. Рекомендуется клинические исследования проводить в соответствии с требованиями [Правила надлежащей клинической практики, 2016]. В качестве критериев эффективности исследуемых лекарственных средств рассматривать их влияние на выраженность гастростаза [Ивницкий Ю.Ю., 2023] и на экскрецию индикана с мочой [Мартынов В.Л., 2017]. Для

количественной оценки выраженности гастростаза у пациентов использовать соответствующие методы лучевой диагностики (ультразвуковое исследование или компьютерную томографию органов брюшной полости). Для определения экскреции индикана его количественно определять [Балаховский С.Д., 1953] в моче, собранной за сутки, и выражать в микрограммах на килограмм массы тела в час. Обследование с использованием указанных методов проводить ежедневно.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Ивницкий, Ю.Ю. Острый кишечный эндотоксикоз в медицине экстремальных ситуаций /, Ю.Ю. Ивницкий, В.Л. Рейнюк, Т.В. Шефер, **О.А. Вакуненко** // Кремлевская медицина. Клинический вестник. – 2024. – №1. – С. 81-86
2. **Вакуненко, О.А.** Влияние внутрижелудочного введения гидрокарбоната натрия или соляной кислоты на кишечную эндотоксемию у крыс при миелоабляции циклофосфамидом / О.А.Вакуненко, Е.А.Золотоверхая, Т.Б. Печурина, Т.В.Шефер, Ю.Ю.Ивницкий // Медицина экстремальных ситуаций. – 2024. – Т. 26, № 2. – С. 27-32.
3. **Вакуненко, О.А.** Экстренная профилактика гастростаза у крыс при моделировании миелоабляционной химиотерапии циклофосфаном / О.А.Вакуненко, Ю.Ю.Ивницкий, К.А. Краснов, А.А Краснова //Medline.ru. Российский биомедицинский журнал. – 2023. – Т. 24, № 1. – С. 360-370.
4. **Вакуненко, О.А.** Влияние гидрокарбоната натрия на формирование гастростаза у крыс при моделировании миелоабляционной химиотерапии / О.А.Вакуненко, Ю.Ю.Ивницкий, О.Н.Гайкова, А.А. Козлов, Т.В. Шефер.// Медицина экстремальных ситуаций. – 2023. – Т. 25, № 2. – С. 98-104.
5. **Vakunenkova, O.A.** Effect of cystamine on gastric propulsive function and gas exchange in the rat model of radiation-induced myeloablation / O.A. Vakunenkova, Ju.Ju. Ivnitsky, O.A. Danilova, T.V. Schäfer, V.L. Rejniuk // Medicine of Extreme Situations. – 2023. – Vol. 25, N. 4. – P. 71-78.
6. Шефер, Т.В. Энтерогематический барьер при критических состояниях организма/ Т.В. Шефер, **О.А.Вакуненко**, Ю.Ю.Ивницкий. А.И.Головко //Успехи современной биологии. – 2022. – Т. 142, № 2. – С. 138-152.
7. Ивницкий, Ю.Ю. Вторичная дисфункция энтерогематического барьера в патогенезе осложнений острых экзогенных отравлений / Ю.Ю.Ивницкий, Т.В. Шефер, В.Л.Рейнюк, **О.А.Вакуненко** // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2022. – Т. 108, № 7. – С. 807-835.

Материалы научной конференции

1. Вакуненко, О.А. Гидрокарбонат натрия предупреждает гастростаз, эндотоксикоз и тонкокишечный мукозит при химической миелоабляции у крыс / О. А. Вакуненко, А. А. Козлов

// Медико-биологические аспекты химической безопасности: Сборник научных трудов V Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, Санкт-Петербург, 27–29 сентября 2023 года. – Санкт-Петербург: Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА, 2023. – С. 9-10.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АХЭ	– ацетилхолинэстераза
в. в.	– внутривенное введение
в. ж.	– внутрижелудочное введение
ГКН, NaHCO_3	– гидрокарбонат натрия
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ	– желудочно-кишечный тракт
ЖКС	– желудочно-кишечный стаз
СДА	– спонтанная двигательная активность
СПЖ	– средняя продолжительность жизни
ХЭ	– холинэстераза
ЦФ	– циклофосфамид
ЧДД	– частота дыхательных движений
ЩФ	– щелочная фосфатаза
ЭГБ	– энтерогематический барьер
LAL	– <i>Limulus ameboycte lysate</i> , лизат амёбоцитов мечехвостов рода <i>Limulus</i>
$\text{LD}_{99/\text{N сут}}$	– доза вещества или излучения, соответствующая 99% летальности в срок, указанный после знака « / »
М	– среднее арифметическое значение
m	– средняя ошибка среднего арифметического значения
pH	– водородный показатель
Q_{O_2}	– интенсивность потребления кислорода организмом (в уравнениях)
Rö-	– рентгеновский (-ская, -ское)