

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА С.Н. ГОЛИКОВА
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»

На правах рукописи

ВАКУНЕНКОВА
ОЛЬГА АЛЕКСАНДРОВНА

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ВЫБОРА СРЕДСТВ ПРОФИЛАКТИКИ
ГАСТРОЭНТЕРОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ
МИЕЛОАБЛЯЦИОННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

3.3.4. Токсикология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
Рейнюк Владимир Леонидович
доктор медицинских наук, доцент

Санкт-Петербург – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	8
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	17
ГЛАВА 1 ГАСТРОЭНТЕРОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ МИЕЛОАБЛЯЦИОННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ: АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ПРОБЛЕМЫ.....	17
1.1 Критические тканевые системы при миелоабляционном кондиционировании.....	17
1.2 Теоретическое обоснование выбора критериев оценки гастроэнтеротоксичности.....	20
1.2.1 Структура и функции нормального энтерогематического барьера.....	21
1.2.2 Энтероцитопения как критерий энтеротоксичности миелоабляционных агентов	23
1.2.3 Острая дисфункция энтерогематического барьера как критерий энтеротоксичности миелоабляционных агентов	27
1.2.4 Нарушение пропульсивной функции желудочно-кишечного тракта как критерий энтеротоксичности миелоабляционных агентов.....	32
1.2.5 Острая кишечная эндотоксемия как критерий энтеротоксичности миелоабляционных агентов	36
1.2.6 Экскреция индикана с мочой как критерий энтеротоксичности миелоабляционных агентов	39
1.3 Теоретическое обоснование выбора критериев оценки влияния миелоабляционных агентов на функциональное состояние организма	40
1.4 Выбор потенциальных медикаментозных средств защиты энтерогематического барьера при миелоабляционных воздействиях	42
1.4.1 Выбор потенциальных средств экстренной профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционного воздействия	43

1.4.2	Выбор потенциальных средств купирования гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий.....	50
1.5	Постановка задач исследования	53
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ		55
2.1	План исследования.....	55
2.2	Животные.....	55
2.3	Химические реактивы и медикаментозные средства.....	56
2.4	Средства моделирования миелоабляционных воздействий на организм.....	58
2.4.1	Средства моделирования лучевого воздействия на организм	58
2.4.2	Средства моделирования химического воздействия на организм... ..	59
2.5	Методы гематологических исследований	60
2.6	Методы биохимических исследований	60
2.6.1	Исследование портальной крови.....	60
2.6.2	Исследование ткани тонкой кишки	61
2.6.3	Методы оценки изменения массы и клеточности кроветворных органов	62
2.6.4	Экскреция индикана с мочой.....	64
2.7	Методы химических исследований.....	64
2.8	Методы морфологических исследований.....	68
2.9	Методы, применённые для изучения функционального состояния организма	68
2.10	Методы статистической обработки полученных данных.....	71
ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ МИЕЛОАБЛЯЦИОННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ И МЕТОДОВ СКРИНИНГА СРЕДСТВ ПРОФИЛАКТИКИ ЕЁ ГАСТРОЭНТЕРОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ.....		72
3.1	Разработка экспериментальных моделей миелоабляционных воздействий	72

3.1.1	Обоснование режима цитостатического воздействия	72
3.1.2	Обоснование режима лучевого воздействия.....	78
3.2	Разработка методов скрининга энтеропротекторов	89
3.2.1	Разработка метода экспресс-оценки желудочно-кишечного стаза .	89
3.2.2	Идентификация оптимальных сроков внутрижелудочного введения потенциальных энтеропротекторов с целью их скрининга.....	94
3.2.3	Разработка метода экспресс-оценки выраженности острой кишечной эндотоксемии в целях скрининга энтеропротекторов	95
3.3	Разработка методов доклинического исследования влияния энтеропротекторов, отобранных в результате скрининга, на проницаемость энтерогематического барьера	98
ГЛАВА 4 ВЛИЯНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЭНТЕРОПРОТЕКТОРОВ НА ИЗМЕНЕНИЕ ПРОПУЛЬСИВНОЙ ФУНКЦИИ ЖЕЛУДКА И ТОНКОЙ КИШКИ, ВЫЗВАННОЕ МИЕЛОАБЛЯЦИОННЫМИ ВОЗДЕЙСТВИЯМИ.....		
4.1	Влияние потенциальных энтеропротекторов на пропульсивную функцию желудка и тонкой кишки при воздействии цитостатических лекарственных препаратов.....	102
4.1.1	Влияние внутрижелудочного введения гидрокарбоната натрия на пропульсивную функцию желудка и тонкой кишки при моделировании фармакологической миелоабляции	102
4.1.2	Влияние двукратного профилактического внутрижелудочного введения гидрокарбоната натрия или соляной кислоты на пропульсивную функцию желудка и тонкой кишки при фармакологической миелоабляции	104
4.2	Влияние потенциальных энтеропротекторов на пропульсивную функцию желудка и тонкой кишки при облучении	106
4.2.1	Влияние цистамина дигидрохлорида и (или) индралина на пропульсивную функцию желудка и тонкой кишки при облучении	106

4.2.2	Влияние сока подорожника на пропульсивную функцию желудка и тонкой кишки при облучении.....	107
4.2.3	Влияние фитобальзама «Чёрный орех» на пропульсивную функцию желудка и тонкой кишки при облучении	109
ГЛАВА 5 ВЛИЯНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЭНТЕРОПРОТЕКТОРОВ НА ПРОЯВЛЕНИЯ ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ ЭНДОТОКСЕМИИ, ВЫЗВАННОЙ МИЕЛОАБЛЯЦИОННЫМИ ВОЗДЕЙСТВИЯМИ.....		
5.1	Влияние потенциальных энтеропротекторов на экскрецию индикана с мочой при воздействии цитостатических лекарственных препаратов	111
5.2	Влияние потенциальных энтеропротекторов на экскрецию индикана с мочой при моделировании лучевого миелоабляционного воздействия.....	113
5.2.1	Влияние радиопротекторов на экскрецию индикана с мочой при моделировании лучевого миелоабляционного воздействия	113
5.2.2	Влияние предполагаемых средств купирования гастроэнтеротоксических эффектов лучевого миелоабляционного воздействия на экскрецию индикана с мочой.....	114
5.3	Влияние потенциальных энтеропротекторов на биохимические показатели крови при воздействии миелоабляционных агентов	116
5.3.1	Влияние двукратного профилактического внутрижелудочного введения гидрокарбоната натрия или соляной кислоты на содержание эндотоксина в крови при моделировании фармакологической миелоабляции	116
5.3.2	Влияние цистамина дигидрохлорида и (или) индралина на содержание мочевины в крови при облучении.....	117
ГЛАВА 6 ВЛИЯНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЭНТЕРОПРОТЕКТОРОВ НА СОСТОЯНИЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА И ТОНКОЙ КИШКИ ПОСЛЕ МИЕЛОАБЛЯЦИОННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ.....		
		119

6.1	Влияние потенциальных энтеропротекторов на состояние слизистой оболочки желудка и тонкой кишки при воздействии цитостатических лекарственных препаратов.....	119
6.1.1	Влияние гидрокарбоната натрия на морфометрические показатели повреждения тонкой кишки после внутривенного введения циклофосфида	119
6.1.2	Влияние введения гидрокарбоната натрия или соляной кислоты на биохимические показатели повреждения тонкой кишки после внутривенного введения циклофосфида	121
6.2	Влияние потенциальных энтеропротекторов на состояние слизистой оболочки желудка и тонкой кишки при облучении	121
6.2.1	Влияние цистамина дигидрохлорида и (или) индралина на биохимические показатели повреждения тонкой кишки при облучении.	122
ГЛАВА 7 ВЛИЯНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЭНТЕРОПРОТЕКТОРОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНИЗМА ПОСЛЕ МИЕЛОАБЛЯЦИОННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ.....		
7.1	Влияние потенциальных энтеропротекторов на функциональное состояние организма после воздействия цитостатических лекарственных препаратов	124
7.1.1	Влияние гидрокарбоната натрия на функции дожития и динамику массы тела после введения циклофосфида	124
7.1.2	Влияние гидрокарбоната натрия на газообмен и внешнее дыхание крыс после введения циклофосфида.....	125
7.1.3	Влияние гидрокарбоната натрия на спонтанную двигательную активность после введения циклофосфида.....	126
7.2	Влияние потенциальных энтеропротекторов на функциональное состояние организма после облучения.....	128
7.2.1	Влияние цистамина дигидрохлорида на функции дожития и динамику массы тела после облучения	128

7.2.2 Влияние цистамина на газообмен и внешнее дыхание после облучения.....	129
ГЛАВА 8 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	131
8.1 Характеристика гастроэнтеротоксичности миелоабляционных воздействий	131
8.2 Анализ результатов фармакологической профилактики обусловленного миелоабляционными воздействиями нарушения пропульсивной функции желудочно-кишечного тракта.....	135
8.3 Анализ результатов фармакологической профилактики острой кишечной эндотоксемии, вызванной миелоабляционными воздействиями	139
8.4 Анализ результатов фармакологической профилактики острого тонкокишечного мукозита при миелоабляционных воздействиях	140
8.5 Анализ результатов оценки влияния средств фармакологической коррекции энтеротоксичности миелоабляционных агентов на функциональное состояние организма.....	141
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	145
ВЫВОДЫ	147
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО АПРОБАЦИИ ГИДРОКАРБОНАТА НАТРИЯ И (ИЛИ) ЦИСТАМИНА ДИГИДРОХЛОРИДА В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВ ЭКСТРЕННОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ГАСТРОЭНТЕРОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ МИЕЛОАБЛЯЦИОННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ	149
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	153
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	178
СПИСОК ТЕРМИНОВ	180

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность 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 [149]. 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 [73, 135], или применяют вещества цитостатического действия: циклофосфамид (ЦФ), тресульфан, бусульфан и другие [168, 171, 183]. 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 [179]. 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 [82] и сепсис [86]. 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 [182]. 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 [165]. 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 [5]. 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, энтероцитопении 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 исследования. 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, бóльшая 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 [33, 57], а второй – выраженность гастростаза, являющегося универсальной для млекопитающих [99, 104] дозозависимой [80] 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 работы. 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 гипериндиканурии. 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», Постановление главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 № 4 об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

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, но 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 циклофосфамида 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.

Личный вклад автора. 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.

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 конференции 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.

Внедрение результатов исследования. 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.

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.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения и глав: «Анализ состояния проблемы», «Материалы и методы исследования», «Разработка экспериментальных моделей и методов скрининга», четырёх 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).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1 ГАСТРОЭНТЕРОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ МИЕЛОАБЛЯЦИОННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ: АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ПРОБЛЕМЫ

1.1 Критические тканевые системы при миелоабляционном кондиционировании

Миелоабляционное кондиционирование – уничтожение кроветворной системы реципиента с целью его подготовки к пересадке стволовых кроветворных клеток. Поскольку кроветворная система представлена в различных частях тела, для миелоабляционного кондиционирования применяют системные цитотоксические воздействия: общее γ - или R \ddot{o} -облучение и (или) внутривенное введение цитостатических лекарственных препаратов. Дозы этих воздействий рассчитаны на необратимое подавление кроветворной ткани при сохранении жизнеспособности других тканей организма. Такая избирательность возможна благодаря межтканевым различиям чувствительности к миелоабляционным воздействиям. «Радиочувствительность ткани» – термин, далее используемый в значении «радиопоражаемость ткани». Она характеризуется дозой ионизирующего излучения, уменьшающей число клеток в единичном объёме или единичной массе ткани на заданную величину. «Согласно правилу Бергонье и Трибондо, чем выше пролиферативная активность клеток ткани, тем эти ткани более радиочувствительны» [цит. по: 5]. Показателем пролиферативной активности служит митотический индекс – доля клеток ткани, пребывающих в митозе. В ткани радиорезистентного органа – интактной печени – он составляет 0,02 % [43]; в эпителии тонкой кишки крыс – от 5,5 до 7,8 % [2], а в костном мозгу – 8,8 % [6]. Поэтому эпителий тонкой кишки занимает в организме

млекопитающих второе место, после кроветворной ткани, по радиочувствительности [7].

Именуемая далее миелоабляционной дозой общего облучения, уничтожающая кроветворную ткань, вызывает несовместимый с жизнью эффект – необратимую панцитопению. Поэтому облучение в минимальной абсолютно летальной дозе вызывает гибель организма от совокупности клинических проявлений панцитопении: костномозгового синдрома. Однако если доза облучения является супралетальной, т.е. превышает минимальное абсолютно летальное значение, то возникает возможность гибели не от костномозгового, а от кишечного синдрома – совокупности клинических проявлений острого тонкокишечного мукозита. Он развивается в более ранние сроки, чем костномозговой синдром. Поэтому при общем однократном облучении в супралетальных дозах кишечный синдром может помешать достижению цели миелоабляционного кондиционирования: трансплантации реципиенту стволовых кроветворных клеток.

Как костномозговой, так и кишечный синдром являются детерминированными радиобиологическими эффектами. Это означает, что для возникновения каждого из них доза облучения должна достигнуть порогового значения. У млекопитающих дозовые пороги костномозгового и кишечного синдромов близки к 1 и 10 Гр, соответственно [7]. Кроме того, как было показано выше, оба синдрома являются летальными радиобиологическими эффектами. Это означает, что по достижении дозой общего γ - или R \ddot{o} -облучения порогового значения животные погибнут в сроки, определяемые дисфункцией либо кроветворной системы, либо слизистой оболочки тонкой кишки. Данные о зависимости средней продолжительности жизни от дозы облучения, полученные на мышах, крысах, морских свинках и обезьянах, представлены на рисунке 1.

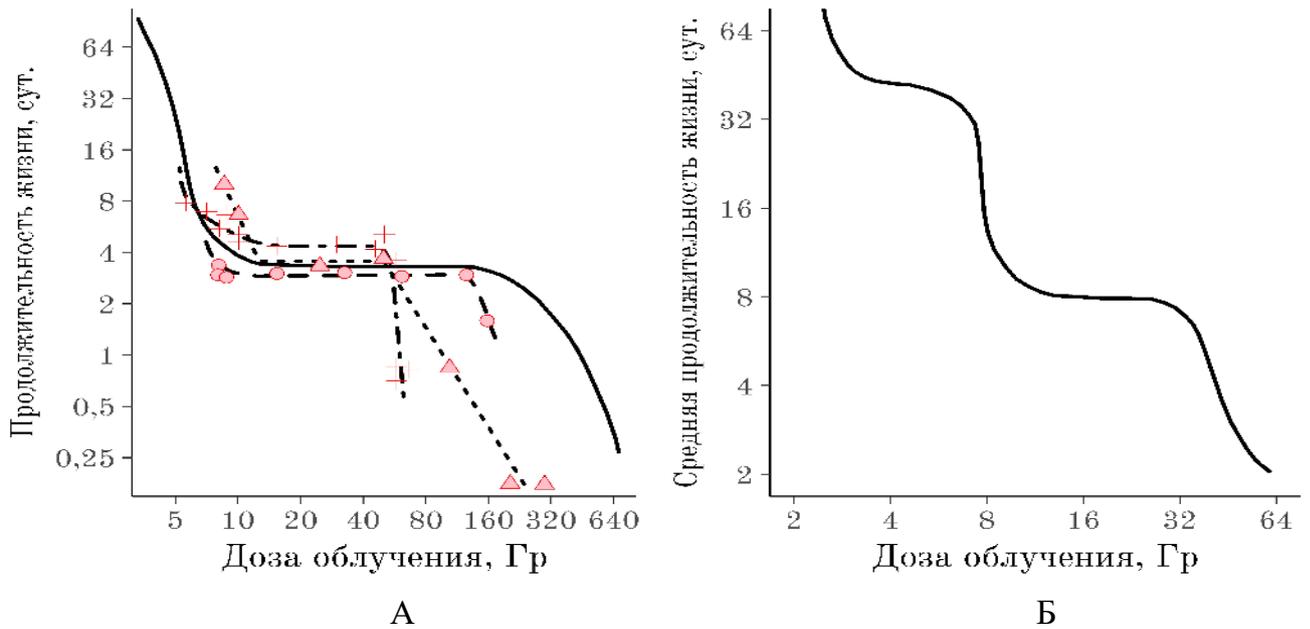


Рисунок 1 — Дозовая зависимость средней продолжительности жизни млекопитающих после однократного рентгеновского или γ -облучения.

Оси графика проградуированы в логарифмическом масштабе.

(А – сплошная линия – мыши; кружки – крысы; крестики – морские свинки; треугольники – обезьяны [170], Б – обезьяны [69]).

Как видно из этих обобщённых данных, кишечный синдром ведёт к более скорой гибели, чем костномозговой: у приматов – через 7-8 и 30-40 сут, соответственно. У грызунов при развитии кишечного синдрома средняя продолжительность жизни (СПЖ) составляет 4-7 сут, а при облучении в дозах, не достигающих его порога – в несколько раз больше. Следовательно, с появлением эффективного средства профилактики кишечного синдрома открывалась бы возможность скачкообразного продления жизни облучённого организма, что позволило бы использовать выигранное время для жизнеспасающей операции: трансплантации стволовых кроветворных клеток.

Сходная последовательность событий наблюдается и после введения животным цитостатических лекарственных препаратов [122]. Примерами моделирования миелоабляционной химиотерапии могут служить однократное внутривенное (в.в.) введение крысам циклофосфамида в дозе 400 мг/кг [112], треоосульфана в дозе 500 мг/кг [175], либо двукратное, за трое и двое суток до трансплантации стволовых кроветворных клеток, внутрижелудочное введение

(в.ж.) бусульфана в дозе 16 мг/кг с последующим однократным в. в. введением циклофосфана в дозе 250 мг/кг [84].

С увеличением дозы фармакологического или лучевого воздействия происходит смена критической тканевой системы. При достижении определённой дозы эта роль скачкообразно переходит от кроветворной системы к тонкокишечному эпителию. Дозы, используемые для миелоабляционных воздействий, лежат вблизи точки этого перехода, что создаёт опасность развития лучевого поражения по нежелательному «сценарию» формирования кишечного синдрома. Защита тонкокишечного эпителия направляет танатогенез по альтернативному пути. Таким образом, смысл профилактики кишечного синдрома при миелоабляционном кондиционировании – исключение тонкокишечного эпителия из числа критических, т.е. лимитирующих продолжительность жизни организма, тканевых систем.

С учётом того, что сроки гибели от костномозгового синдрома – больше сроков ожидаемой пересадки стволовых кроветворных клеток реципиенту, это позволит ему дожить до трансплантации. Если удастся защитить тонкокишечный эпителий селективно, т.е. без неуместной в данной ситуации защиты кроветворной системы, это повысит шансы на успех лечения основного заболевания. Что и определяет актуальность поиска медикаментозных средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий. Такие средства далее именуются энтеропротекторами. Для выбора энтеропротекторов необходимо оценить их влияние на выраженность гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных агентов.

1.2 Теоретическое обоснование выбора критериев оценки гастроэнтеротоксичности

Термином «гастроэнтеротоксичность» далее обозначена способность физического, химического или биологического агента, действуя немеханическим путём на ЖКТ, вызывать нарушение его структуры и функций. Ниже обоснованы

подходы к оценке проявлений гастроэнтеротоксичности, вовлечённых в танатогенез при кишечном синдроме: уменьшения числа клеток эпителия, нарушения барьерной, пропульсивной функций, а также функции образования биологически активных веществ, вовлечённых в формирование острой кишечной эндотоксемии.

1.2.1 Структура и функции нормального энтерогематического барьера

Энтерогематический барьер (ЭГБ) – система диффузионных препятствий, разделяющих кишечный химус и кровь. Ранее этот термин употребляли в значении «эпителий слизистой оболочки кишечника» [172]. Сегодня в ЭГБ включают также ассоциированных с эпителием симбионтных бактерий [116], муцин [148] и эндотелий кровеносных и лимфатических капилляров подслизистого слоя [146]. Вещества, ускользнувшие от абсорбции капиллярной сетью кишечной стенки, на своем пути в кровь преодолевают дополнительные элементы ЭГБ: гладкую мускулатуру кишки, два слоя брюшинного мезотелия (висцеральный, париетальный), слой смачивающей их брюшинной жидкости средней толщиной 0,5 мм и эндотелий гемо- и лимфокапилляров париетальной брюшины.

ЭГБ здорового человека малопроницаем для бактерий, обитающих в кишечнике. ДНК кишечной микрофлоры (*Escherichia coli*, *Bacteroides*) обнаруживают в плазме крови лишь при повреждении ЭГБ [185]. Вещества, подлежащие удалению из организма, проникают из желудочно-кишечного химуса в кровь путем пассивной диффузии. Их абсорбцию приближенно описывают уравнением первого закона диффузии Фика для мембран:

$$J = D \times (C_i - C_0),$$

где J – плотность потока вещества, моль·м⁻²·с⁻¹, D – коэффициент проницаемости мембраны, м·с⁻¹, C_i и C_0 – концентрация вещества с эпителиальной и эндотелиальной сторон мембраны, моль·м⁻³. Биодоступность токсичных

продуктов жизнедеятельности кишечной микрофлоры повышается при увеличении множителей ($C_i - C_0$) или D . Первый из них лимитирован содержанием этих веществ в химусе, а второй – состоянием эпителия и сосудистого эндотелия ЖКТ. Предположительно, абсорбция возрастает при повышении гидростатического давления химуса в результате усиленного газообразования или гладкомышечного спазма [144].

Таким образом, функции ЭГБ – поддержание градиента концентрации веществ между желудочно-кишечным химусом и кровью, а также селективная абсорбция этих веществ. Движение веществ по такому градиенту схематически показано на рисунке 2.

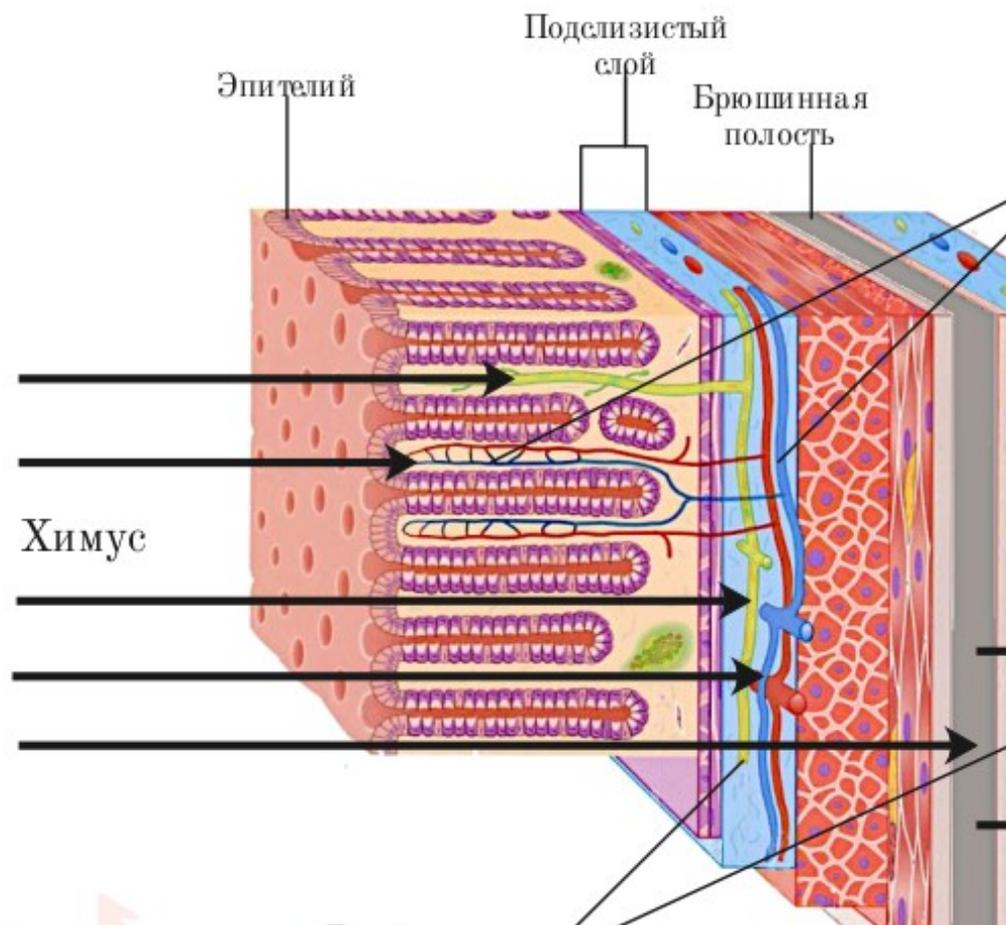


Рисунок 2 — Диффузия веществ из химуса толстой кишки в кровь и лимфу. Стрелками показаны направления диффузии. При подготовке рисунка использованы данные, резюмированные в обзоре литературы [60]

Некоторые ксенобиотики и их метаболиты непосредственно повреждают ЭГБ, нарушая его барьерную функцию. В их числе – не только химически

агрессивные вещества, поступающие в организм перорально, но и системно действующие токсиканты. Энтеротоксичность цитостатиков, применяемых при трансплантации стволовых кроветворных клеток – один из факторов, лимитирующих выживаемость пациентов [158].

Увеличение проницаемости ЭГБ – результат не только прямого повреждения эпителия и сосудистого эндотелия кишечника ионизирующим излучением, ксенобиотиком или продуктами его метаболизма. Такими же могут быть эффекты острой гипоксии [24, 133, 180], гладкомышечного спазма органов ЖКТ [29, 151, 203] и желудочно-кишечного стаза [124, 201, 222], часто наблюдаемых при острых отравлениях. Действуя совместно, перечисленные факторы повреждают эпителий слизистой оболочки тонкой кишки.

1.2.2 Энтероцитопения как критерий энтеротоксичности миелоабляционных агентов

В основе гастроэнтеротоксичности миелоабляционных агентов – нарушение физиологической регенерации эпителия, наиболее выраженное в тонкой кишке. Энтероцитопения – главный и прямой показатель энтеротоксичности.

Эпителий слизистой оболочки тонкой кишки, как и кроветворная ткань, представляет собою систему клеточного обновления. На дне крипт находятся стволовые клетки. По мере их деления и последующего созревания эпителизируется устье крипты, далее – стенка ворсинки и ее верхушка, откуда энтероциты sluщиваются в просвет кишки. Утрата клеток ворсинками сбалансирована притоком вновь образованных клеток из крипт. У человека путь клетки от дна крипты до верхушки ворсинки занимает около четырёх суток.

Как и в других системах клеточного обновления, в эпителии кишки после облучения наступает временный блок митозов. Погибают стволовые и другие делящиеся клетки. Созревающие и функциональные клетки, будучи радиорезистентными, продолжают продвижение к верхушкам ворсинок и sluщиваются. Эпителиальная выстилка кишки в течение четырёх суток исчезает,

ворсинки оголяются [7]. Эти процессы, объясняющие сроки манифестации летальной дисфункции ЭГБ, показаны на рисунке 3. Сходная последовательность событий наблюдается и после введения животным цитостатических лекарственных препаратов [122].

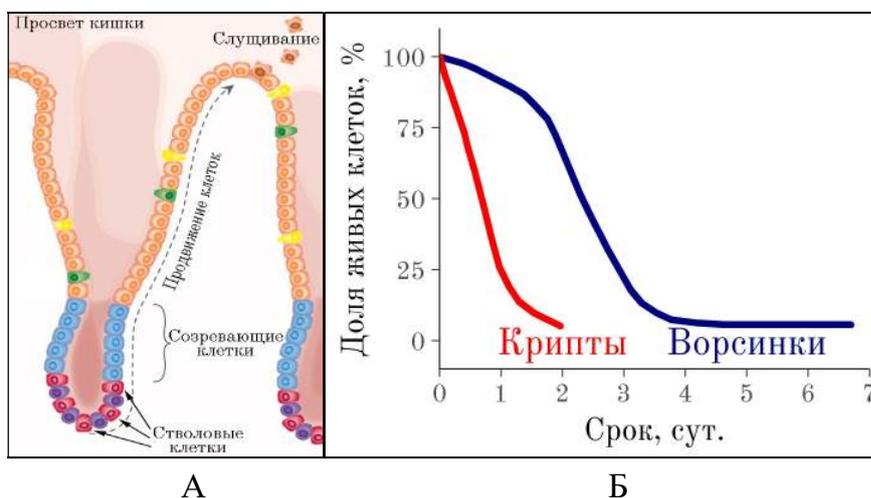


Рисунок 3 — Эпителий ворсинки тонкой кишки (А) и графики цитопении в эпителии тонкой кишки (Б) после облучения мыши в дозе 30 Гр. При подготовке рисунка использован материал монографии [7]

Стволовые клетки кишечного эпителия имеют более эффективные системы пострадиационной репарации, чем стволовые кроветворные клетки. Поэтому необратимая цитопения эпителия тонкой кишки возникает при более высоких дозах γ - или R \ddot{o} -излучения, ≥ 10 Гр, или цитостатических лекарственных средств (чаще всего, дериватов азотистого иприта), чем необратимая панцитопения. Процесс развивается быстро, за четверо суток вызывая оголение подслизистого слоя [7]. Денудация эпителия слизистой оболочки тонкой кишки становится триггером эндотоксемии и её клинического проявления – летального эндотоксикоза, возникающих вследствие массивного поступления в кровь токсичных продуктов жизнедеятельности кишечной микрофлоры. Поэтому критерием гибели грызунов от проявлений кишечного синдрома считают СПЖ ≤ 5 сут [170].

При миелоабляционном кондиционировании перечисленные нарушения являются причиной гибели части реципиентов, несмотря на последующую

пересадку им стволовых кроветворных клеток, то есть являются фактором, лимитирующим продолжительность их жизни [106, 115, 131]. Энтероцитопения и денудация эпителия слизистой оболочки являются характерными, хотя и побочными, эффектами миелоабляционного кондиционирования, поэтому их необходимо учитывать при оценке адекватности разрабатываемых экспериментальных моделей. Энтероцитопения является основным патогенетическим механизмом дисфункции ЭГБ при миелоабляционных воздействиях.

Детализацию структурных изменений ЭГБ осуществляют с помощью световой микроскопии в различных отделах кишечника. После цитостатических миелоабляционных воздействий снижается доля слизистой оболочки тонкой кишки в её общей массе. Это подтверждается микрофотографиями гистологических препаратов тонкой кишки приматов через 4-12 сут после общего γ -облучения в дозе 7,4 Гр [210], а также тощей и подвздошной кишки мышей через 3 сут после внутрибрюшинного (в. б.) введения циклофосфана в дозе 500 мг/кг [143], на которых слизистая оболочка выглядит атрофичной, хотя её общая толщина на гистологических препаратах тощей кишки крыс через 3 сут после общего R \ddot{o} -облучения в дозе 10 Гр существенно не изменена [147]. С целью количественной оценки выраженности острого цитостатического или лучевого тонкокишечного мукозита ткани тонкой кишки подвергают морфометрическому исследованию с подсчётом числа ворсинок и их длины: при мукозите ворсинки укорачиваются и их становится меньше [100, 213].

С учётом основной роли цилиндрического эпителия как структурного элемента ЭГБ [148], масса энтероцитов в навеске ткани тонкой кишки – показатель его состоятельности. Щелочную фосфатазу, сосредоточенную, преимущественно, в щёточной кайме энтероцитов [56], рассматривают как функциональный компонент кишечного барьера, детоксифицирующий липополисахариды грамотрицательных бактерий. Её активация препятствует, а угнетение способствует развитию мукозита тонкой кишки [139]. Функции

холинэстеразы энтероцитов меньше исследованы, но известно её широкое распространение в клетках кишечной слизистой оболочки [188]. Предположительно, определение этих маркёров в крови, отобранной из воротной вены, или в навеске ткани тонкой кишки, может служить показателем функционального состояния ЭГБ, положительно зависящим от суммарной массы энтероцитов и отрицательно – от выраженности энтероцитопенического эффекта.

Возможным биомаркером повреждения слизистой оболочки кишечника у онкологических больных после трансплантации стволовых клеток и (или) лучевой терапии считают уровень цитруллина в сыворотке крови [109]. Концентрация этого специфичного для энтероцитов метаболита положительно коррелирует с остаточной массой энтероцитов в организме [94], а, следовательно, отрицательно – с тяжестью повреждения и атрофией ворсинок кишечника. Цитруллин измеряют в небольшой объеме плазмы крови или спинномозговой жидкости, от 30 мкл, методом ионообменной (колончатой) хроматографии [97]. Этот метод не самый доступный, поэтому вряд ли подойдёт для скрининга энтеропротекторов.

У крысы в каждом клеточном ядре с диплоидным набором хромосом содержится 6 пг ДНК, что составляет более 98 % всей ДНК клетки [152]. Эта закономерность может быть использована для количественной оценки энтероцитопении. Ведущими механизмами энтероцитопении при лучевом поражении [7] и отравлении цитостатиками [122] являются интерфазная гибель стволовых и репродуктивная гибель делящихся клеток кишечного эпителия, ведущие к уменьшению численности хромосомных наборов в единичной массе ткани. Простой мерой оценки обусловленной этими процессами цитопении может служить определение содержания ДНК в ткани с расчётом косвенного показателя клеточности: среднего числа диплоидных хромосомных наборов в 1 г сырой ткани. Нетрудно видеть, что для расчёта этого числа выраженное в пикограммах содержание ДНК в навеске ткани массой 1 г необходимо разделить на 6. Таким образом, морфометрические показатели эпителия слизистой оболочки тонкой

кишки, активность щелочной фосфатазы и холинэстеразы, содержание ДНК в навесках этого органа могут быть полезны как при проверке адекватности экспериментальных моделей миелоабляционного кондиционирования, так и при доклиническом изучении энтеропротекторов.

1.2.3 Острая дисфункция энтерогематического барьера как критерий энтеротоксичности миелоабляционных агентов

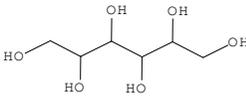
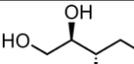
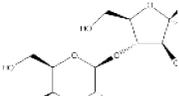
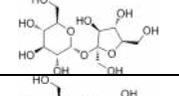
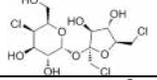
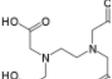
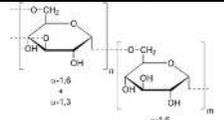
Дисфункция ЭГБ – нарушение его способности поддерживать градиенты концентрации веществ между желудочно-кишечным химусом и кровью, либо селективно абсорбировать эти вещества. В результате повреждения ЭГБ миелоабляционными агентами его проницаемость для продуктов жизнедеятельности кишечной микрофлоры возрастает, что ведёт к повышению их концентрации в крови и лимфе. Для интегральной оценки проницаемости ЭГБ в крови или моче определяют содержание веществ, назначенных внутрь либо продуцируемых кишечной микрофлорой; такие вещества именуют активными и пассивными маркерами проницаемости ЭГБ, соответственно. Идеальные активные маркеры проницаемости – биохимически инертные вещества, преодолевающие ЭГБ путём пассивной диффузии. Из маркеров, определяемых в моче, предпочтение отдают не реабсорбируемым в почечных канальцах. В случае повышения экскреции с мочой или концентрации в крови таких веществ, постулируют повышенную проницаемость ЭГБ и для других, близких к ним по размеру молекулы [201].

Молекулярная масса, липофильно-гидрофильный баланс (характеризуемый показателем $\log P_{\text{октанол/вода}}$) и количество образуемых молекулой водородных связей – априорные показатели преобладания трансцеллюлярного или парацеллюлярного транспорта вещества сквозь ЭГБ в норме (таблица 1). Как видно, преобладают маркеры парацеллюлярного транспорта, вклад которого в проницаемость ЭГБ при миелоабляционных воздействиях, после гибели части

энтероцитов, может возрасти или даже оказаться основным. Для выбора активных маркёров проницаемости, пригодных в целях настоящего исследования, представляется логичным применение гидрофильных (имеющих отрицательное значение $\log P_{\text{октано́л/вода}}$) и образующих возможно большее число водородных связей веществ. Предпочтение следует отдать искусственным веществам, в норме отсутствующим в рационе и организме лабораторных животных: это уменьшит вероятность артефактов при анализе биопроб. Молекулярная масса таких веществ может быть использована для приблизительной оценки диаметра каналов их утечки из просвета кишечника в кровь и лимфу. Для повышения информативности исследования, целесообразно применять маркёры парацеллюлярного транспорта в сочетании с маркёрами трансцеллюлярного транспорта. Перечисленным условиям в наибольшей мере отвечает тест с использованием лактулозы и маннитола.

Оценивая проницаемость ЭГБ с помощью маркёров, исходят из допущения об их преимущественной абсорбции в том или ином отрезке ЖКТ. Сахарозу применяют для оценки проницаемости ЭГБ в желудке, сукралозу – в толстой кишке [98]. Однако не исключено, что при патологических состояниях или под влиянием их лечения место абсорбции изменяется. Так, лактулоза и маннитол абсорбируются, преимущественно тонкой кишкой, поскольку в толстой они быстро расщепляются кишечной микрофлорой [98]. Но на фоне подавления кишечной микрофлоры антибиотиками (применяемыми при подготовке пациентов к кондиционированию) лактулоза и маннитол могут накапливаться в толстокишечном химусе, что может вести к их абсорбции из толстой кишки.

Таблица 1 — Некоторые вещества, применявшиеся в качестве маркёров проницаемости энтерогематического барьера

Название вещества	Химическая формула	Молекулярная масса, Да	Диаметр молекулы, нм	log P**	Число водородных связей		Преобладающий тип проницаемости ЭГБ	Источник ***
					Донорных	Акцепторных		
Полиэтиленгликоль 400*	$C_{2n}H_{4n}+2O_{n+1}$, n от 8,2 до 9,1	380–420	0,53	–1,43 (0,61)	2	8	Парацеллюлярная	[223]
Полиэтиленгликоль 4000*	n от 82 до 91	3800–4200	1,00	–0,93 (0,98)	2	80	Парацеллюлярная	[223]
Маннитол		397,6	0,89	–4,96 (0,38)	6	0	Трансцеллюлярная	[65, 98, 223]
Эритрол		122,1	0,86	–3,16 (0,35)	4	0	Парацеллюлярная	[216]
Лактулоза		322,3	1,33	–3,92 (0,50)	8	3	Парацеллюлярная	[65, 98, 216, 130]
Сахароза		342,3	1,31	–3,65 (0,43)	8	3	Парацеллюлярная	[216]
Сукралоза		397,6	1,26	0,88 (0,65)	5	5	Трансцеллюлярная	[216]
ЭДТА****		292,2	1,45	–4,43 (1,30)	4	6	Парацеллюлярная	[216]
Декстран		$3 \cdot 10^3$ – $20 \cdot 10^3$	5,5-10,0	—	$3n+2$	$2n+1$	Парацеллюлярная	[130]

Примечания: * — С молекулярной массой, указанной в графе 3; ** — log Роктанол/вода (погрешность оценки);

*** — Работа, в которой вещество применено для исследования ЭГБ или представлены данные, характеризующие состояние ЭГБ,

**** — Расчёты приведены для молекулы ЭДТА при pH=7.

При оценке проницаемости ЭГБ у пациентов с гемобластозами экскреция с мочой лактулозы, L-рамнозы, D-ксилозы, 3-О-метил-D-глюкозы была повышена через неделю после начала миелоабляционного кондиционирования, проводившегося по схеме: идарубицин в дозе 42 мг/м^2 в течение первых двух дней + циклофосфамид в дозе 120 мг/кг в течение следующих двух дней + общее гамма-облучение в дозе 9 Гр в две фракции по $4,5 \text{ Гр}$ на 5-й и 6-й дни кондиционирования [150]. Сходные результаты получены и при других режимах миелоабляционного кондиционирования [114]. Это доказывает возможность использования перечисленных плохо метаболизируемых олигосахаридов для интегральной оценки барьерной функции тонкой кишки. Но порог чувствительности методов колориметрического определения моносахаридов – несколько мг/л [11], а ожидаемая их концентрация в моче – десятые доли мг/л [110]. Это определяет необходимость высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, дорогостоящего метода со сложной пробоподготовкой, для определения таких веществ в крови или моче, что неприемлемо при скрининге лекарственных средств. Вместе с тем, их целесообразно использовать для верификации данных, получаемых с помощью экспресс-методов скрининга, а также для детектирования искомого фармакологического эффекта на этапе доклинического исследования средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий.

Вызываемая цитостатиками дисфункция ЭГБ настолько значительна, что лимитирует их переносимые дозы [181]. Повышение проницаемости ЭГБ при миелоабляционной цитостатической терапии документировано с использованием ^{51}Cr -ЭДТА [77] и олигосахаридов [77, 166] в качестве маркёров.

Для интегральной оценки проницаемости ЭГБ вводимые в желудок вещества-маркёры можно определять не только в крови или моче, но и в солевых растворах, вводимых в.б. В этом случае маркёры диффундируют в исследуемый раствор из кишечного химуса, минуя печень. Преимуществом такого подхода

является возможность применения в качестве маркёров проницаемости не только биохимически инертных веществ, но и аммиака или эндотоксина [27,51].

Избирательную оценку проницаемости эпителия слизистой оболочки кишечника выполняют *ex vivo*. Для этого изолированные петли отрезка кишки заполняют раствором вещества-маркёра, лигируют и инкубируют в буферном растворе. Скорость накопления в нём маркёра считают показателем проницаемости эпителия, поскольку кровообращение, а, значит, и эндотелиальный барьер, в этих условиях не функционируют [223]. В таких исследованиях в качестве маркёров проницаемости используют полиэтиленгликоли (ПЭГ), ЭДТА, соединения, меченные радиоактивными изотопами. Вариантами указанного подхода к оценке проницаемости кишечного эпителия являются измерение *in vitro* трансэпителиального сопротивления и трансэпителиальной диффузии различной маркёров сквозь образцы кишечного эпителия в камере Уссинга [147, 153]. Недостатки таких методов – их чрезмерно низкая для решения задач скрининга производительность и невозможность интегральной оценки проницаемости ЭГБ.

Барьерную функцию сосудистого эндотелия ЖКТ можно оценить с помощью красителей (Эванс синий, флюоресцеин) либо меченых изотопами соединений [214]. Ценными дополнениями к такому исследованию ЭГБ и его отдельных структур являются интравитальная микроскопия [71] и микроскопия тканей ЖКТ *ex vivo* [122].

Представляет интерес идентификация в крови конкретных веществ, вовлечённых в формирование эндотоксемии при миелоабляционном цитостатическом воздействии. Примерами таких веществ являются эндотоксин и аммиак. Оба вещества даже в норме преодолевают ЭГБ и определяются в крови мезентериальных вен. Аммиак – амфифильное вещество ($\log P_{\text{октанол/вода}} = 0,23$), способное к неполярным взаимодействиям с липидными компонентами биомембран [55]. Это, как и малые размеры молекулы аммиака (молекулярная масса 17 Да, эффективный диаметр сечения молекулы 0,1 нм), способствует его

трансцеллюлярному транспорту сквозь ЭГБ. Для липополисахаридов размер молекул значительно больше (2,5-70 Да, 100 нм). Хотя механизм преодоления ими интактного ЭГБ не установлен, после денудации кишечного эпителия механизм абсорбции эндотоксина является *a priori* парацеллюлярным. Поэтому аммиак и эндотоксин теоретически пригодны в качестве маркёров проницаемости ЭГБ. Однако недостатками таких маркёров являются токсичность, вариабельность исходного содержания в кишечном химусе [75, 135] и неизвестное значение доли свободной формы этих веществ, в которой они могут быть выявлены в крови. Часть аммиака в энтероцитах может вовлекаться в состав глутамина. Часть эндотоксина в крови связывается с альбумином, ускользая от современных методов анализа [81].

Представленные данные указывают на перспективность известных подходов к оценке проницаемости ЭГБ как основы для разработки методов скрининга энтеропротекторов. Однако в существующем виде ни один из методов оценки проницаемости ЭГБ не адаптирован ни к условиям миелоабляционных цитостатических воздействий, ни к условиям скрининга энтеропротекторов. Наиболее чувствительные и специфичные методы, пригодные для нецелевого химического анализа биопроб на факторы острой кишечной эндотоксемии, слишком сложны и дороги [37, 202]. Это определяет потребность в экспресс-методах оценки энтеротоксичности миелоабляционных агентов и влияния на неё потенциальных энтеропротекторов.

1.2.4 Нарушение пропульсивной функции желудочно-кишечного тракта как критерий энтеротоксичности миелоабляционных агентов

Стадии развития цитостатического кишечного мукозита представлены на рисунке 4.



Рисунок 4 — Стадии развития острого цитостатического кишечного мукозита. При подготовке рисунка использован материал статьи [192]

Начиная со вторых суток после цитостатического воздействия, в тонкой кишке развиваются патологические изменения (воспалительная инфильтрация, энтероцитопения, избыточный рост условно патогенной микрофлоры, денудация эпителия с оголением подслизистого слоя, бактериальная транслокация). Защитной реакцией на эти изменения является желудочно-кишечный стаз (ЖКС), возникающий уже на первой стадии формирования острого цитостатического кишечного мукозита. Триггером этой координированной двухэтапной защитной реакции служит раздражение хеморецепторов желудка. У человека её первым этапом является спазм пилорического сфинктера, вторым – рвотный акт. Такая реакция – одно из характерных осложнений цитостатической терапии [13]. У крыс рвотный центр отсутствует [120], поэтому из упомянутых этапов реализуется лишь первый: спазм *pylorus*, ведущий к гастростазу – переполнению желудка химусом и газами. Он наблюдался у крыс при острых отравлениях алкилирующими токсикантами: на рисунке 5 показано расположение рентгенологической тени сульфата бария у крыс, получивших суспензию сульфата бария через зонд тотчас после в.б., подкожного (п.к) или в.ж. введения циклофосфида в дозе 1000 мг/кг [63]. Налицо резкое угнетение пропульсивной

активности всех отделов ЖКТ, наиболее выраженное при в.ж. введении токсиканта.

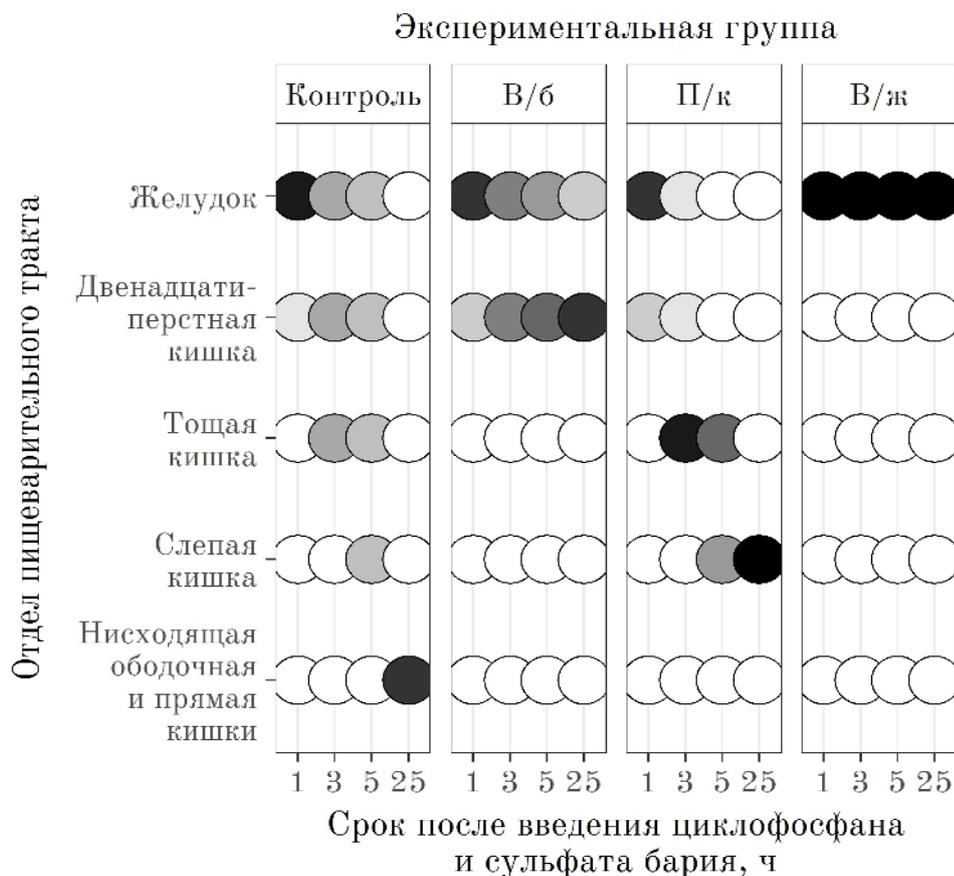


Рисунок 5 — Схема расположения рентгенологической тени сульфата бария в желудочно-кишечном тракте крыс после введения циклофосфана и бариевой взвеси. Тон кружков пропорционален доле площади тени рентгеноконтрастного вещества в соответствующем отделе желудочно-кишечного тракта. Чёрные кружки: 100 % от введённого количества сульфата бария. Белые кружки: отсутствие сульфата бария. При подготовке рисунка использован материал статьи [63]

При ЖКС вегетация бактерий не компенсируется их удалением, в результате чего тип взаимоотношений нормальной кишечной микрофлоры с хозяином перестает быть мутуалистическим и приближается к паразитизму. Увеличивается не только суммарная люминальная концентрация продуцируемого бактериями аммиака ($[\text{NH}_3] + [\text{NH}^4]$), но и рН химуса, а, следовательно, и доля аммиака, представленного в высокопенетрантной форме NH_3 [68]. Поэтому

выраженность ЖКС является косвенным показателем интенсивности образования в ЖКТ цитотоксичного вещества: NH_3 . Цитотоксическое действие NH_3 сокращает жизненный цикл колоноцитов [205] и продукцию муцина [220], что может повреждать ЭГБ и повышать биодоступность веществ, продуцируемых микрофлорой толстой кишки. Поэтому выраженность ЖКС является также косвенным показателем интенсивности поступления продуктов жизнедеятельности кишечной микрофлоры из химуса в кровь и лимфу.

Значительное газообразование, характерное для желудочно-кишечного стаза, может интенсифицировать диффузию веществ через ЭГБ. Оно повышает барометрическое давление в просвете кишечника и, согласно первому закону Дальтона, – парциальное давление паров летучих веществ. Согласно второму закону Дальтона это увеличивает напряжение соответствующих газов, растворенных в химусе. Повреждение ЭГБ и повышенное напряжение летучих веществ в химусе – потенциальные факторы повышения их биодоступности при желудочно-кишечном стазе.

Клиническая значимость ЖКС обусловлена его негативным влиянием на исход химиотерапии. Он препятствует питанию пациентов, лишает смысла пероральное назначение им медикаментозных средств; сопровождающий его избыточный рост кишечной микрофлоры ведёт к реализации кворум-эффекта [165], интенсификации образования ею токсичных веществ, формированию эндотоксемии и эндотоксикоза. ЖКС способствует повреждению энтерогематического барьера с поступлением в кровь липополисахаридов грамотрицательных бактерий, развитием системного воспаления [82] и сепсиса [86]. ЖКС вовлечён в патогенез поздней цитостатической рвоты; однако назначение таким пациентам противорвотных [111, 221], прокинетических или спазмолитических средств [111] не устраняет острый цитостатический желудочно-кишечный мукозит, защитной реакцией на первую стадию которого, предположительно, является ЖКС [179].

Таким образом, ЖКС играет двойственную роль в патогенезе энтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий. С одной стороны, он является защитной реакцией на повреждение энтероцитов, биологическим смыслом которой является предотвращение их дополнительной травматизации химусом. С другой стороны, ЖКС способствует избыточному бактериальному росту и гиперпродукции цитотоксических метаболитов кишечной микрофлоры, препятствует доставке в тонкую кишку лекарственных средств. Поскольку ЖКС – ранняя, чувствительная и дозозависимая реакция ЖКТ на повреждение его слизистой оболочки, он является удобным критерием энтеротоксичности миелоабляционных агентов. Количественная оценка ЖКС проста и пригодна для решения задач скрининга энтеропротекторов, однако её методы, применимые в целях настоящего исследования, не разработаны.

1.2.5 Острая кишечная эндотоксемия как критерий энтеротоксичности миелоабляционных агентов

Для успешной трансплантации стволовых кроветворных клеток пациент, подвергнутый миелоабляционному кондиционированию, должен дожить до неё. Этому может воспрепятствовать эндотоксикоз – совокупность клинических проявлений острой кишечной эндотоксемии, обусловленной острой дисфункцией ЭГБ. Дисфункция ЭГБ, вызываемая миелоабляционными агентами, настолько значительна, что провоцируемая ею эндотоксемия лимитирует их переносимые дозы [181]. Эндотоксемия – накопление в крови биологически активных веществ, образовавшихся в организме. Исходя из представления о последнем как об экосистеме, составной частью которой является кишечная микробиота [174, 196], соединения, продуцируемые последней, классифицируются как эндогенные вещества. К ним относятся: аммиак, триметиламин-N-оксид, индоксил сульфат, индоксилацетат, моноамины, бактериальный эндотоксин, а также неопределённое множество других веществ. Эндотоксин и аммиак, продуцируемые нормальной микробиотой кишечника, вовлечены в патогенез

критических состояний организма: шока, сепсиса, вторичных острых поражений лёгких и острой церебральной недостаточности. Обусловленная повреждением ЭГБ эндотоксемия характерна для острого отравления алкилирующими веществами [36] и для кишечной формы острой лучевой болезни [191].

Эндотоксемию часто оценивают по содержанию в крови эндотоксина и веществ с низкой и средней молекулярной массой [154]. У пациентов с неосложнённым отравлением психофармакологическими препаратами среднее содержание в крови веществ средней молекулярной массы превышало таковое у здоровых доноров на 32%, а среднее содержание в крови эндотоксина – в 10 раз [155]. После промывания кишечника уровень веществ средней молекулярной массы в крови снизился на 18 %, эндотоксина – наполовину, а без промывания эти показатели эндотоксемии продолжали расти. Как видно, у таких пациентов химус толстой кишки является основным фактором эндотоксемии.

Повышенное содержание эндотоксина в крови документировано при тяжёлом остром отравлении колхицином [119], верапамилем [67], этанолом [87]. Накопление эндотоксина в крови характерно для миелоабляционного кондиционирования и обусловлено тонкокишечным мукозитом [78, 150]. Эндотоксинемия положительно зависела от дозы циклофосфана или 5-фторурацила при противоопухолевой терапии [163]. Эндотоксинемия, достигавшая пика на 2-й день после общего γ -облучения в дозе 9 Гр, наблюдалась у кроликов [212]. Накопление эндотоксина в крови и, как следствие, системная воспалительная реакция при таком лечении фатальны [115, 131].

Эндотоксин вызывает тромбоксан-зависимую лёгочную вазоконстрикцию [215]; при более высоких концентрациях, характерных для септического шока – системную вазодилатацию и лёгочную гипертензию [92]. Эндотоксинемия повышает проницаемость ГЭБ как для самого эндотоксина, так и для других веществ [209, 218], повышает проницаемость лёгочных капилляров, вызывает некардиогенный отёк лёгких [211], нарушает функции печени [128, 190] и почек [161].

ЭГБ и купферовские клетки печени задерживают часть эндотоксина на пути в общий кровоток. В крови эндотоксин представлен в высокопенетрантной свободной форме или в виде комплексов с белками, обычно не определяемых в лабораторных тестах [184]. Можно предположить, что в условиях характерной для ряда острых заболеваний гипопроотеинемии повышены как доля эндотоксина крови, представленного в свободной форме, так и проявления его токсичности.

Утрата щелочной фосфатазы щёточной каймой энтероцитов и нарушение межклеточных контактов между ними, повреждение печени ведут к снижению энтерогематического градиента концентрации эндотоксина [200]. У человека при среднем значении объёма толстокишечного химуса 0,4 л [182] и содержании эндотоксина в нём 2,5 г/л, пул эндотоксина химуса составляет 1 г. В случае одновременного равномерного распределения этого количества между химусом, 5 л крови и 2 л лимфы концентрация эндотоксина в плазме крови достигла бы $13,5 \cdot 10^7$ нг/л, то есть значений, в 27000 раз превышающих порог цитокинового «шторма» и сепсиса. Это характеризует предел изолированного влияния эндотоксина кишечного происхождения на функциональное состояние организма.

Таким образом, поддержание энтерогематических градиентов концентрации веществ, продуцируемых кишечной микробиотой, зависит от морфологической целостности эпителия слизистой оболочки кишечника и энергетического обеспечения процессов детоксикации, протекающих в энтероцитах и печени. При одновременной утрате этих градиентов и (или) гипоксии висцеральных органов создаются предпосылки для перераспределительной кишечной эндотоксемии – накопления в крови токсикантов кишечного происхождения. Частное проявление эндотоксемии – эндотоксинемия – может служить критерием энтеротоксичности миелоабляционных агентов и эффективности соответствующих предупредительных мер. Ввиду высокой стоимости количественного определения эндотоксина, [16, 39, 40], оно более уместно при доклиническом исследовании энтеропротекторов, чем при их скрининге.

1.2.6 Экскреция индикана с мочой как критерий энтеротоксичности миелоабляционных агентов

Наиболее известным маркёром острой кишечной эндотоксемии является индикан – калиевая соль индоксилсерной кислоты [57]. Это продукт ацилирования в печени индола с образованием индоксилсульфата и индоксилацетата. Индол продуцируется нормальной кишечной микрофлорой из триптофана в кишечнике [33]. Образовавшиеся индоксилсульфат и индоксилацетат эндотелиотоксичны. Их накопление в крови ассоциировано с риском сердечно-сосудистых заболеваний и хронической почечной недостаточностью [93, 145, 219]. Содержание индоксилсульфата в плазме крови составляет от 10^{-7} до $2,4 \cdot 10^{-6}$ моль/л в норме и от $2,5 \cdot 10^{-4}$ до $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л при хронической почечной недостаточности [156].

При увеличении потока индола из кишечного химуса в кровь индикан накапливается в ней; повышается его экскреция с мочой [33, 57]. Повышенная экскреция индикана с мочой – признак увеличения массы кишечной микрофлоры, продуцирующей индол, но не метаболизирующей его. При количественном определении индикана, основанном на предложенной в 1890 году пробе Обермайера, индол превращается в индоксил, который конденсируется с тимолом и, в присутствии $FeCl_3$ в кислой среде, окисляется с образованием синего индиго. Индиго экстрагируют хлороформом и колориметрируют. При концентрации индикана 0,5 мкг/мл хлороформный экстракт имеет едва различимый невооружённым глазом нежно-розовый цвет. Эту концентрацию считают порогом чувствительности метода, которая достаточна для определения индикана в моче здорового человека: 7-10 мкг/мл, что легко экстраполировать по значениям его экскреции с мочой [49]. Для достижения цели настоящего исследования количественное определение экскреции индикана с мочой необходимо адаптировать к условиям исследования на крысах.

Таким образом, на стадии скрининга потенциальных энтеропротекторов определение суточной экскреции индикана с мочой – информативный и простой показатель энтеротоксичности, характеризующий поток токсиканта бактериального происхождения, индола, из желудочно-кишечного химуса в портальную кровь.

1.3 Теоретическое обоснование выбора критериев оценки влияния миелоабляционных агентов на функциональное состояние организма

Функциональное состояние организма – его способность к осуществлению целенаправленной деятельности [53]. Поскольку лабораторным животным целенаправленная деятельность не присуща, для прогнозирования с их помощью изменений функционального состояния, возможных у человека, применяют косвенные показатели, характеризующие жизнеспособность организма, его обеспеченность энергией и успешность в реализации необходимых для выживания паттернов двигательной активности.

Интегральным показателем влияния миелоабляционных агентов на функциональное состояние организма является средняя продолжительность жизни. Как было показано в разделе 1.1, она существенно различается при гибели от проявлений кишечного и костномозгового синдромов, составляя у грызунов 4-7 сут и несколько недель, соответственно. Предупреждение кишечного синдрома, ведущее к увеличению доли особей, гибнущих от проявлений костномозгового синдрома, способно существенно изменить медианное значение этого показателя для экспонированной популяции. Поэтому среднее арифметическое значение продолжительности жизни – не только простой, но и высокочувствительный показатель влияния миелоабляционных агентов и энтеропротекторов на функциональное состояние организма.

Интегральным показателем обеспеченности организма энергией является динамика массы тела животного. Она отражает соотношение интенсивности анаболических и катаболических процессов. Гастростаз затрудняет поступление

нутриентов в тонкую кишку, а тонкокишечный цитостатический мукозит – их ферментацию и резорбцию, что тормозит анаболизм и определяет информативность динамики массы тела как показателя влияния энтеропротекторов на функциональное состояние организма при миелоабляционных воздействиях.

Миелоабляционные воздействия могут затрагивать и процессы катаболизма. Расширенный в результате гастростаза желудок способен ограничивать экскурсию диафрагмы, нарушая внешнее дыхание, и вызывать компрессию чревного ствола, ограничивая кровоснабжение органов брюшной полости. Медиаторы кишечного эндотоксикоза – бактериальный эндотоксин и *п*-крезилсульфат – способны повреждать альвеолярно-капиллярный барьер с формированием отёка лёгких [85, 176] и нарушая снабжение организма кислородом. Индоксилсульфат [198] и бактериальный эндотоксин [134] повреждают митохондрии, нарушая утилизацию кислорода на клеточном уровне. Аммиак обладает несколькими механизмами влияния на энергетический обмен центральной нервной системы (ЦНС): аминирование α -кетоглутарата и оксалоацетата, ведущее к оттоку этих кетокислот из цикла Кребса [22, 32], интенсификация гидролиза АТФ и окисления НАДФ·Н₂ в ходе реакций обезвреживания аммиака – синтеза глутамина и глутамата [22, 32], образование аммиакатов с катионами металлов в активных центрах цитохромов [25], нарушение мозгового кровотока вследствие набухания астроглии при накоплении в ней продукта обезвреживания аммиака – глутамина [105, 129]. Возникновение любого из перечисленных эффектов отразится на интегральном показателе интенсивности катаболических процессов – потреблении кислорода организмом, что оправдывает его использование для оценки влияния энтеропротекторов на функциональное состояние организма.

У человека воздействие цитостатических агентов вызывает через 1–14 ч ранние преходящие неврологические нарушения, способные ухудшить функциональное состояние организма: слабость, атаксию, головокружение,

головную боль, тошноту, рвоту [62]. Отсутствие у грызунов рвотного центра [120] не позволяет оценивать с их помощью проявления эметического синдрома. Однако для оценки нарушений спонтанной двигательной активности, мышечной силы, выносливости, равновесия и координации движений предложен ряд тестов, некоторые из которых удобны при осуществлении скрининга энтеропротекторов [3, 54, 62]

Двигательная активность животных – как спонтанная, так и в условиях функциональной нагрузки – отражает функциональное состояние ЦНС, которая, в свою очередь, высокочувствительна к энергетическому дефициту. С учётом роли кислорода в энергетическом обеспечении жизнедеятельности организма, показатели газообмена и внешнего дыхания целесообразно использовать для оценки влияния энтеропротекторов на функциональное состояние организма при экспериментальном моделировании миелоабляционной терапии [20].

1.4 Выбор потенциальных медикаментозных средств защиты энтерогематического барьера при миелоабляционных воздействиях

Для защиты ЭГБ от химического или лучевого повреждения предложен ряд средств и способов, предусматривающих назначение веществ или их композиций [31, 44, 45, 46, 47, 83, 204]. Однако введение в желудок энтеропротекторов или радиопротекторов в терапевтическом режиме не может быть эффективным ввиду гастростаза, осложняющего миелоабляционное кондиционирование [127, 186]. Поскольку ЖКС является защитной реакцией на повреждение тонкокишечного эпителия, перспективным подходом к его профилактике является применение медикаментозных средств, повышающих устойчивость энтероцитов к цитостатическому воздействию.

1.4.1 Выбор потенциальных средств экстренной профилактики гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционного воздействия

В литературе обсуждаются нейромедиаторные механизмы нарушения моторной функции ЖКТ при поражениях ионизирующим излучением [80, 89, 99, 104, 164] и цитостатическими лекарственными препаратами [132]. Идентификация некоторых из этих механизмов легла в основу предложений о применении лекарственных препаратов, обладающих свойствами антиэметиков, спазмолитиков или прокинетиков, для профилактики рвоты и гастростаза – в том числе и при цитостатической терапии [30, 36, 193, 221]. Агентством по пищевым продуктам и лекарствам североамериканских соединённых штатов для лечения гастропареза рекомендован только антагонист дофаминовых D_2 -рецепторов метоклопрамид [204]. Однако такой подход, нацеленный на получение симптоматического эффекта, оправдан лишь в случаях, когда этиология ЖКС неизвестна. Какие-либо данные о влиянии противорвотных, спазмолитических или прокинетических медикаментов на формирование цитостатического мукозита, предполагаемой причины гастростаза, не приводятся. Само такое влияние представляется маловероятным в свете современных представлений о цитопении и воспалении как ведущих механизмах энтеротоксичности ионизирующего излучения [7, 23, 106] и цитостатических лекарственных препаратов [122, 179].

Для выбора патогенетически обоснованного подхода к профилактике ЖКС, сопровождающего миелоабляционные воздействия, имеют значение следующие экспериментальные данные [89]:

– торможение моторной функции ЖКТ после облучения является пороговым дозозависимым эффектом (пороговая доза для крыс составляет 1 Гр; с увеличением дозы возрастают амплитуда и продолжительность торможения);

– снижению пропульсивной активности ЖКТ предшествует кратковременное (до 1 ч) её усиление;

– кратковременное усиление пропульсивной активности ЖКТ отменяется ваготомией или введением атропина, адреналина, никотина или кураре, но потенцируется физостигмином или ацетилхолином;

– снижение пропульсивной активности ЖКТ является обратимым радиобиологическим эффектом и наблюдается лишь в период до 7 сут, совпадающий со временем пострадиационной регенерации эпителия тонкой кишки;

– пострадиационное снижение пропульсивной активности ЖКТ не наблюдается у животных, область живота которых во время облучения экранирована, но развивается при локальном облучении живота.

Из перечисленных данных следует, что энтеротоксические эффекты миелоабляционного воздействия могут быть предупреждены местными воздействиями на эпителий желудка и тонкой кишки, препятствующими развитию энтероцитопении. На рисунке 6 представлены подходы к экстренной профилактике острой вторичной дисфункции ЭГБ.



Рисунок 6 — Направления экстренной медикаментозной профилактики острой вторичной дисфункции энтерогематического барьера при миелоабляционных воздействиях, перспективные для экспериментальной апробации [5, 30, 36]

В пункте 1.2.4 показана способность ЖКС снижать биодоступность лекарственных препаратов в тонкую кишку при миелоабляционных воздействиях. Назначение пациентам противорвотных или спазмолитических средств для купирования гастростаза не устраняет цитостатический мукозит, защитной реакцией на первую стадию развития которого, предположительно, является ЖКС [179]. Из этого следует необходимость экстренной профилактики повреждения слизистой оболочки ЖКТ как необходимого условия предупреждения ЖКС. При лучевых воздействиях это радиопротекторы. Для селективной защиты ЭГБ предпочтительны быстродействующие радиопротекторы, к которым относят меркаптоалкиламины и радиопротекторы «сосудосуживающего» действия, представленные индолилалкиламинами и имидазолилами, а из последних – предназначенные для назначения *per os*.

Меркаптоалкиламины обеспечивают наиболее выраженное, по сравнению с другими радиопротекторами кратковременного действия, защитное действие на организм при общем внешнем облучении [28]. Частным проявлением их противолучевого эффекта служит предупреждение лучевого мукозита [74]. Из меркаптоалкиламинов получили практическое применение цистеамин, его транспортная дисульфидная форма (цистамин), аминоэтилизотиуроний, гаммафос (амифостин), цистафос и др. Хлористоводородная соль цистамина – цистамина дигидрохлорид (*Cystaminum dihydrochloricum*) – в течение длительного времени была единственным серосодержащим радиопротектором, зарегистрированным в нашей стране. На рисунке 7 представлены данный препарат в таблетках массой 0,2 г и его структурная формула. Под обозначением РС-1 цистамин входил в медикаментозную группу аптек индивидуальных АИ-1, АИ-1М и АИ-2, сумки медицинской санитары СМС и сумки медицинской войсковой СМВ [41]. В дозе 1,2 г (6 таблеток) он подлежал приёму внутрь, с запиванием водой, за 30-40 мин до предполагаемого облучения в дозах, превышающих 1 Гр.

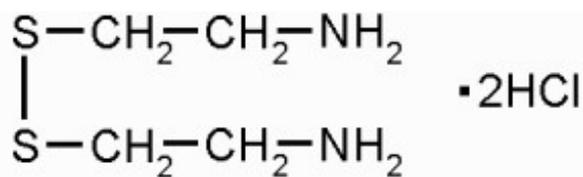


Рисунок 7 — Структурная формула и лекарственная форма цистамина дигидрохлорида

Номинальное значение фактора изменения дозы (ФИД) при приёме человеком цистамина дигидрохлорида в указанной дозе составляет 1,4, а продолжительности противолучевого эффекта – до 6 ч [19]. При межвидовом переносе на крыс, такой порядок применения препарата соответствует его в. ж. введению в дозе 120 мг/кг за 30 мин до облучения.

В экспериментах на крысах ФИД цистамина дигидрохлорида, вводимшегося внутримышечно (в. м.) в сублетальной дозе 50 мг/кг (0,4 LD₅₀), составлял 1,2-1,4. При облучении мышей в абсолютно летальных дозах 8-14 Гр препарат в дозе 150 мг/кг при в. м. введении оказывал защитное действие по критерию убыли сухой массы проксимального отрезка тонкой кишки длиной 10 см [28]. По этому показателю цистамин превосходил гаммафос – наиболее эффективный из серосодержащих радиопротекторов – при дозах γ -облучения до 8 Гр, вызывающих у млекопитающих костномозговой синдром.

При защите цистамином в эпителии тонкой кишки более интенсивен пострадиационный синтез ДНК в криптах, то есть в энтероцитах пролиферативного пула [208]. Для профилактики ЖКС может иметь значение не только предотвращение цистамином нарушений митотической активности энтероцитов, но и его противовоспалительное действие, обусловленное ингибированием трансаминазы кишечника [102]. Учитывая, что основным молекулярным механизмом противолучевого действия цистамина является прямое влияние на тиол-дисульфидный обмен, можно ожидать положительной зависимости противолучевого эффекта от концентрации цистамина в

энтероцитах. Исходя из этого, в. ж. введение препарата – перспективный подход к обеспечению частичной селективности его противолучевого действия на слизистую оболочку тонкой кишки.

Возможным препятствием к профилактике ЖКС путём в. ж. введения цистамина может оказаться способность его тиоловой формы, цистеамина, стимулировать секрецию соляной кислоты париетальными клетками желудка [123] и, как следствие, тормозить эвакуацию желудочного содержимого. Однако этот эффект цистамина, введённого п. к. крысам, был обратимым: он достигал максимума к 3 ч и продолжался не более 12 ч [167, 195].

По состоянию на 19 мая 2025 г. цистамин не значится в Государственном реестре лекарственных средств [17], однако накоплен большой массив сведений, характеризующих его противолучевую эффективность, безопасность и устойчивость при хранении. Поэтому целесообразно экспериментально апробировать на крысах цистамина дигидрохлорид, вводимый в желудок в дозе 120 мг/кг за 30 мин до общего однократного R₀-облучения, в качестве средства экстренной профилактики острого лучевого поражения тонкой кишки, ведущего к формированию ЖКС и острой вторичной дисфункции ЭГБ.

Официальные радиопротекторы сосудосуживающего действия относятся к группам индолилалкиламинов и имидазолинов. Они обладают наиболее быстрым противолучевым эффектом. К официальным препаратам, апробированным с этой целью, относятся имидазолины: индралин (Б-190) и лечебно-профилактический радиопротектор экстренного действия на основе нафазолина (РС-12). Последний производится в растворе для в. м. введения и представлен в шприц-тюбиках, что создало бы проблемы при попытке переноса экспериментальных данных, полученных в условиях в. ж. введения радиопротектора, на человека. Для обеспечения относительно избирательной защиты слизистой оболочки ЖКТ более удобным представляется препарат индралин (Б-190), предназначенный для приёма человеком внутрь в дозе 450 мг (3 таблетки) за 10-15 мин до предполагаемого облучения. При переносе на крыс

этот порядок применения соответствует в. ж. введению в дозе 45 мг/кг за 10 мин до облучения. Структурная формула и упаковка индралина представлена на рисунке 8.

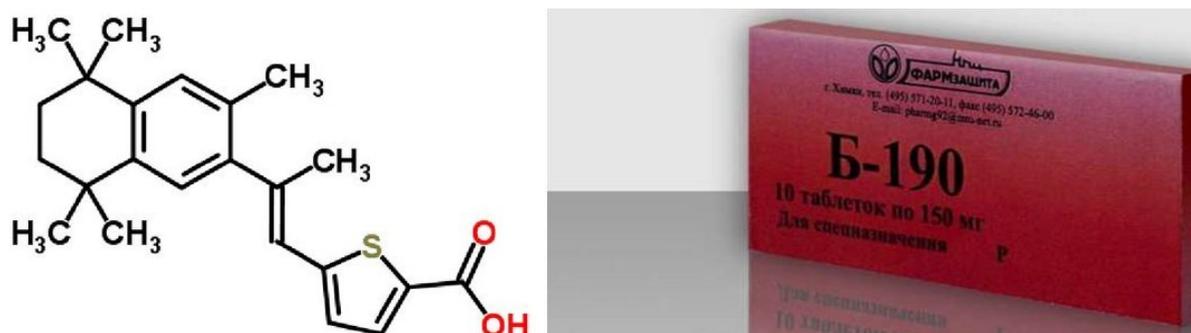


Рисунок 8 — Индралин

Сравнительная характеристика основных радиопротекторов возможна с использованием данных [5], резюмированных в таблице 2.

Таблица 2 — Сравнительная характеристика отечественных радиопротекторов

Показатель	Лекарственное средство		
	Цистамин	Индралин	Нафтизин
Лекарственная форма	Таблетки	Таблетки	0,1% раствор в шприц-тюбике
Путь введения	Внутрь	Внутрь	Внутримышечно
Оптимальная доза, г	1,2	0,45	0,001
Латентный период эффекта, мин.	30 – 40	5 – 15	3 – 5
Продолжительность действия, ч	3	0,4	2
ФИД	1,3	1,2	1,3
Противолучевой индекс	2 – 5	40 – 50	15 – 18
Срок годности, годы	7 – 10	2	3

Серосодержащие радиопротекторы обладают определённым защитным действием на организм и при острой интоксикации цитостатическими агентами алкилирующего действия [76, 90, 101, 108, 141, 189]. Это действие проявляется и в отношении цитостатического мукозита [88]. В целях экстренной профилактики

острой вторичной дисфункции ЭГБ, вызванной ЦФ, целесообразно экспериментально апробировать цистамина дигидрохлорид, вводимый в желудок в дозах, эквивалентных рекомендуемым для препарата РС-1. Для оценки эффективности такой профилактики достаточно однократного введения этого радиопротектора, поскольку продолжительность его действия после приёма внутрь, у человека составляющая 5-6 ч [34], приблизительно соответствует периоду полувыведения ЦФ после в. в. введения: $T_{1/2} = 4-7$ ч [157].

Другой патогенетический подход к экстренной профилактике острой вторичной дисфункции ЭГБ при моделировании миелоабляционных воздействий может быть основан на коррекции рН желудочно-кишечного химуса. С повышением рН биосред замедляется спонтанный гидролиз образовавшегося в печени активного метаболита ЦФ, альдофосфамида, и тормозится накопление более токсичных метаболитов: акролеина и фосфорамидного иприта [72], повышается активность ключевого фермента, обеспечивающего детоксификацию ЦФ – альдегиддегидрогеназы, оптимум рН которой лежит в щелочном интервале значений [138]. Более низкие, в сравнении с нормальными клетками, значения рН в цитоплазме опухолевых клеток способствуют их избирательному поражению при химиотерапии ЦФ [199]. Поражающее действие ЦФ усугублялось при закислении химуса крыс в. ж. введением слабых растворов кислот [64] или лактулозы [50]. ЦФ, введённый в желудок, вызывал у крыс более выраженный ЖКС, чем при в. в. введении в той же дозе, что может быть отчасти обусловлено более интенсивной токсификацией этого лекарственного средства в кислом желудочном содержимом [63]. Эти данные указывают на повышение рН желудочного и тонкокишечного химуса как на перспективный подход к замедлению токсификации ЦФ.

Повреждающее действие азотистого иприта на митохондрии характеризуется резким сдвигом энергетического обеспечения клетки от окислительного к гликолитическому фосфорилированию [159], а сопряжённое с этим снижение рН ведёт к экспрессии про-апоптотических белков, активирующих

каспазы, что способствует цитопеническому эффекту [194]. Оптимум pH для ферментов, отвечающих за репарацию ДНК, лежит в интервале значений, близких к нейтральным (6,5-7,5), поэтому ацидоз, сопровождающий токсическое действие ипритов на митохондрии [91, 177], может нарушать репарацию ДНК. Из этих данных следует гипотеза о возможности защитного эффекта ощелачивающих агентов при острой интоксикации не только ЦФ, но и другими цитостатическими агентами алкилирующего действия.

Так как эффективные средства профилактики острого цитостатического кишечного мукозита доселе не разработаны [192], можно предположить, что ощелачивающие агенты, вводимые в желудок при моделировании на крысах миелоабляционного воздействия ЦФ, проявят профилактическую активность в отношении ЖКС. Для экспериментальной проверки этой гипотезы могут быть применены официальные препараты [35]: натрия гидрокарбонат (*Natrii hydrocarbonas*), калия гидрокарбонат (*Kalii hydeocarbonas*), натрия бензоат (*Natrii benzoas*), pH 1-4 % растворов которых превышает 8.

1.4.2 Выбор потенциальных средств купирования гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционных воздействий

В случае выявления эффективности какого-либо из перечисленных выше потенциальных средств экстренной профилактики вторичной дисфункции ЭГБ, представляет интерес оценка купирующего влияния на неё медикаментозных средств, проявляющих обволакивающие, дубящие, противовоспалительные, антиоксидантные или цитопротекторные свойства. Перспективные подходы к купированию острой вторичной дисфункции ЭГБ при миелоабляционных воздействиях представлены на рисунке 9.

Нормальная микрофлора ЖКТ продуцирует в небольшом количестве вещества, проявляющие цитотоксичность: бактериальный эндотоксин, белки, обладающие свойствами экзотоксинов, низкомолекулярные продукты распада

нутриентов, такие как аммиак, вазоактивные амины, фенолы, гетероциклы. При избыточном росте кишечной микрофлоры, характерном для ЖКС, продукция этих токсикантов интенсифицируется и они усугубляют вторичную дисфункцию ЭГБ, обусловленную экзогенными цитотоксическими агентами [126].

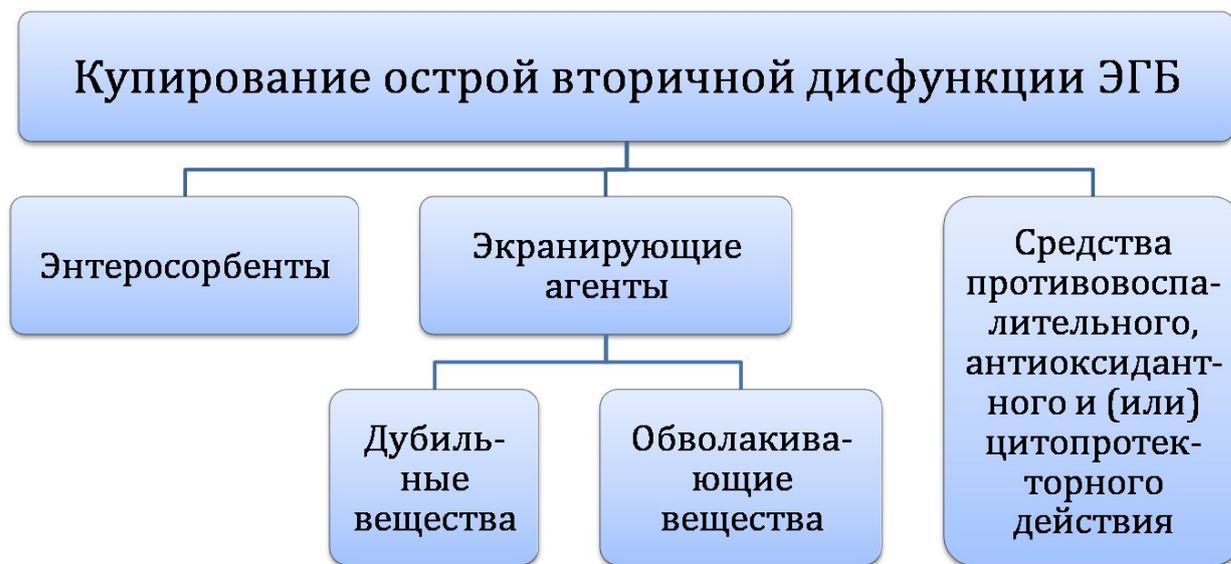


Рисунок 9 — Перспективные направления экспериментальной апробации медикаментозных средств купирования острой вторичной дисфункции энтерогематического барьера при миелоабляционных воздействиях [5, 30, 36]

Возможным подходом к защите слизистой оболочки ЖКТ от токсикантов микробного происхождения является её экранирование с использованием лекарственного препарата – сока чёрного ореха. Орех черный (*Juglans nigra L.*) – вид деревьев из рода орех (*Juglans*) семейства ореховые (*Juglandaceae*), естественный ареал обитания которого – Северная Америка [21]. Сок чёрного ореха – БАД-парафармацевтик – содержит вещества, обладающие вяжущими свойствами – то есть способные коагулировать белки на поверхности слизистой оболочки. Эти природные фенольные соединения являются производными пирогаллола, пирокатехина, флороглюцина и имеют молекулярную массу от 1000 до 20000 [1]. Наиболее известным из дубильных веществ чёрного ореха является юглон. Кроме того, препарат содержит биофлавоноиды, витамины, эфирные масла и органические кислоты. Схема апробации БАД «Сок чёрного ореха» или

«Юглон» может состоять в пятикратном, в период с 24 по 56 ч после цитостатического воздействия, введении крысам в желудок в объёме 15 мл/кг втрое разведённого водой препарата. При этом суммарная доза препарата, 25 мл/кг, биоэквивалентна его дозе для человека 291 мл в течение двух суток.

В патогенез миелоабляционных воздействий вовлечены интенсификация свободнорадикального окисления, воспаления, апоптоза, падение митотической активности эпителиальных клеток [12]. Сок подорожника препятствует этим тенденциям, и может быть полезным как средство смягчения цитопенического эффекта в тонкой кишке. Является специфическим энтеропротектором с малоизученным механизмом действия. Подорожник большой (*Plantago major L.*) – распространенное в различных климатических зонах многолетнее травянистое лекарственное растение, занесённое в Государственную Фармакопею Российской Федерации XIV издания [10]. Для большинства основных биологически активных веществ, содержащихся в листьях подорожника большого, характерны антиоксидантное, противовоспалительное, противоопухолевое, вазопротекторное, гепатопротекторное, гипохолестеринемическое, противогрибковое и сосудорасширяющее действие. Предполагают, что антиоксидантные, антигипоксантные, бактерицидные и противовоспалительные свойства сока подорожника обусловлены входящими в его состав аукубином и другими иридоидами [178]. Аукубин является представителем иридоидных гликозидов, которые относятся к группе монотерпеноидных горечей (ирридоидов) [21].

Имеются экспериментальные данные о защитном действии сока подорожника на крыс при острой интоксикации циклофосфамидом. На фоне однократного, за час до в. б. введения циклофосфамида в дозе 600 мг/кг, в.ж. введения крысам впятеро разведённого водой сока подорожника в объёме 20 мг/кг, смягчались ранние неврологические проявления токсического действия циклофосфамида. Продолжительность виса животных на перевернутой решетке была на 20, а продолжительность жизни – на 30 % больше, чем в контроле; наблюдали тенденцию к увеличению средней продолжительности удерживания

на стеклянной сфере [61]. Подлежит экспериментальной проверке гипотеза о том, что защитное действие сока подорожника проявится и в отношении ЭГБ. Для этого, путём применения средств экстренной профилактики гастростаза, будет обеспечена возможность поступления сока подорожника в тонкую кишку.

1.5 Постановка задач исследования

Таким образом, применение средств профилактики гастроэнтеротоксичких эффектов миелоабляционных воздействий позволяет перевести цитостатическое или лучевое поражение организма из кишечной в костномозговую форму. Критерии отбора необходимых для этого профилактических средств не разработаны, а нецелевой поиск нецелесообразен в силу большого числа вариантов. Это диктует необходимость теоретического обоснования выбора направлений поиска средств профилактики гастроэнтеротоксичких эффектов миелоабляционных воздействий.

Задача профилактики гастроэнтеротоксичких эффектов миелоабляционных воздействий ранее не ставилась, поэтому экспериментальные модели фармакологических и лучевых воздействий, применяемых с целью миелоабляционного кондиционирования, отсутствуют. Это определяет необходимость разработки экспериментальных моделей миелоабляционных воздействий, пригодных для скрининга средств профилактики её гастроэнтеротоксических эффектов.

Ни один из существующих методов оценки проницаемости ЭГБ не адаптирован ни к условиям миелоабляционных воздействий, ни к условиям скрининга энтеропротекторов. Поэтому необходима разработка методов скрининга средств профилактики гастроэнтеротоксичких эффектов миелоабляционных воздействий.

Перспективными критериями идентификации средств экстренной профилактики гастроэнтеротоксических эффектов служат их влияние на ЖКС и

показатели острой кишечной эндотоксемии. С учётом этих критериев по итогам скрининга необходимо идентифицировать потенциальные средства профилактики гастроэнтеротоксичких эффектов миелоабляционных воздействий.

Для верификации результатов скрининга энтеропротекторов по косвенным показателям их эффективности необходимы данные о влиянии этих лекарственных препаратов на ключевые звенья патогенеза кишечного синдрома: энтероцитопению, острую дисфункцию ЭГБ и острую кишечную эндотоксемию. Такие данные необходимо получить с использованием прямых показателей выраженности этих патологических состояний.

Функциональное состояние организма отражает состояние основных систем его жизнеобеспечения. Основным фактором, влияющим на функциональное состояние организма в первые 3 сут после миелоабляционного воздействия, является гастроэнтеротоксичность. Это определяет необходимость оценки влияния потенциальных средств профилактики гастроэнтеротоксичких эффектов миелоабляционных воздействий на функциональное состояние организма в сроки, соответствующие периоду подготовки реципиентов к пересадке стволовых кроветворных клеток.

Идентификация энтеропротекторов может способствовать не только повышению переносимости системной цитостатической терапии реципиентами при их подготовке к пересадке стволовых кроветворных клеток, но и разработке методов фармакологической защиты организма от острого воздействия лучевых поражающих факторов ядерного взрыва или аварийного радионуклидного выброса, от острого резорбтивного действия азотистых ипритов в летальных дозах. Для осуществления такой возможности необходимо разработать методические рекомендации по апробации потенциальных средств профилактики гастроэнтеротоксичких эффектов миелоабляционных воздействий с участием человека.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 План исследования

Экспериментальные исследования проведены на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова федерального медико-биологического агентства». Последовательность экспериментальных работ:

- 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.

2.2 Животные

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. В это время крыс ежедневно осматривали. Животных с обнаруженными отклонениями исключали. 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. Эти показатели измеряли гигрометром психрометрическим ВИТ-2 (Россия) и фиксировали в журнале. Рацион состоял из стандартного корма ЛБК-120 Тосненского комбикормового завода в соответствии с ГОСТ 34566-2019 «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия» от 01.10.2020. Питьевую воду давали *ad libitum* в соответствии с ГОСТ Р 51232-98 «Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества».

При работе с животными выполняли директиву Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей». По группам животных распределяли путём рандомизации. Каждому из них присваивали индивидуальный номер при сплошном порядке нумерации. Численность групп указана в главах 5-7.

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. В экспериментах по изучению влияния энтеропротекторов на функциональное состояние организма (глава 7) доступ крыс к корму после миелоабляционных воздействий не ограничивали.

2.3 Химические реактивы и медикаментозные средства

Химические реактивы и медикаментозные средства, использованные при выполнении экспериментальных исследований, представлены в таблице 3.

Порядок применения диагностических препаратов и реактивов указан в разделе 2.4, введения медикаментозных средств животным – в главе 3.

Таблица 3 — Реактивы и медикаментозные средства

Название	Характеристика	Производитель
Цитостатические лекарственные средства		
Эндоксан (циклофосфамид)	Порошок для приготовления раствора для инъекций	Бакстер Хелскэа Корпорейшен, Германия
Циклофоцил (циклофосфамид)	Порошок для приготовления раствора для инъекций	Фармасинтез – Норд АО
Средства экспериментальной коррекции проявлений интоксикации		
Натрия гидрокарбонат	Раствор для инфузий	ОАО «ДАЛЬХИМФАРМ»
Натрия хлорид	0,9 %-ный раствор для инфузий	ОАО «Биохимик»
Подорожника большого сок	Сок	ЗАО «Вифитех»
Цистамина дигидрохлорид	Субстанция	синтезирован в ГНИИИ ВМ МО РФ
Индралин	Субстанция	синтезирован в ГНИИИ ВМ МО РФ
Диагностические препараты и реактивы		
Лактулоза (Дюфалак)	Сироп	Солвей Биолоджиалз Б.В., Нидерланды
Трихлорметан	х. ч.	АО «Вектон»
D-(–)-Маннит	раствор для инфузий	ПАО «Биохимик»
Метиленовый синий	ч. д. а.	АО «ЛенРеактив»
Мочевина	ч. д. а.	ЗАО «Вектон»
Эозин	Конц.	ООО «ЭргоПродакшн»
Гематоксилин	Раствор	ООО «ЭргоПродакшн»
Формалин 10% забуференный	Раствор	ООО «ЭргоПродакшн»
Гидроксид калия	х. ч.	АО «ЛенРеактив»
Тимол	ч.	АО «ЛенРеактив»
Генцианвиолет	ч. д. а.	Индия
Натрий хлористый	х. ч.	АО «ЛенРеактив»
Соляная кислота	Стандарт-титр 0,1 н.	ООО «Экохим»
Соляная кислота	Конц.	АО «ЛенРеактив»
Железо треххлористое (FeCl ₃ × 6H ₂ O)	ч.	АО «ЛенРеактив»
Формиат аммония		Fluka, Швейцария
Ацетонитрил	сорт 0	Криохром, Россия
Метилен хлористый	х. ч.	Вектон, Россия
Ацетальдегид	раствор	АО «ЛенРеактив»
Натрия дезоксирибонуклеат	раствор для инъекций	АО «ЛенРеактив»
Трихлоруксусная кислота	ч.	АО «ЛенРеактив»
Трис-HCl буфер	Конц.	НПО РЕНАМ

2.4 Средства моделирования миелоабляционных воздействий на организм

2.4.1 Средства моделирования лучевого воздействия на организм

Для изучения дозовой зависимости показателей лучевого поражения крыс облучали в дозах от 5,78 до 11,57 Гр, для моделирования лучевого миелоабляционного воздействия – в супралетальной дозе, составлявшей 1,1 LD_{99/30 сут.} Общее однократное относительно равномерное R_o-облучение осуществляли в передвижной рентгеновской установке производства ЗАО «ЭЛТЕХ-Мед» (Россия). На время облучения животных, по 8 особей, помещали в пеналы из полиэтилентерефталата, установленные в штативе из полиметилметакрилата (рисунок 10).



А

Б

Рисунок 10 — Фиксация пенала с крысой в штативе – А; штатив в камере многофункциональной передвижной рентгеновской установки –Б

Миелоабляционное воздействие моделировали R \ddot{o} -облучением крыс в дозе, в геометрическом центре тела составлявшей 9,64 Гр. С учётом кратности ослабления излучения конструкционными элементами пеналов и штатива, а также эксцентричного расположения животных относительно оси пучка излучения, его доза на панели прибора была в 4,15 раз большей и составляла 40 Гр. Облучение выполняли в 3 фракции продолжительностью 11, 11 и 9 мин с интервалом 5 мин. Параметры излучения: анодное напряжение 90 Кв, анодный ток 8 Ма, фокусное расстояние 564 мм, фильтр [8 мм полиметилметакрилат + 0,4 мм полиэтилентерефталат], коэффициент неравномерности в кранио-каудальном направлении 1,1, в дорсо-вентральном направлении 2,0.

Продолжительность наблюдения за животными для расчёта значения LD_{99/30 сут} составляла 30 сут, для расчёта значения LD_{99/5 сут} – 5 сут. Изменения, возникавшие в сроки, соответствующие миелоабляционному кондиционированию у человека, регистрировали в течение 3 сут. Ежедневно регистрировали массу тела, особенности внешнего вида (цвет шерсти, мочи, цвет и консистенцию выделений из анального отверстия), поведения (подвижность, реакцию на корм), случаи гибели.

2.4.2 Средства моделирования химического воздействия на организм

Для изучения дозовой зависимости показателей цитостатического поражения крысам в латеральную вену хвоста вводили циклофосфамид в дозах от 50 до 500 мг/кг, для моделирования фармакологической миелоабляции – в супралетальной дозе 390 мг/кг, составлявшей 1,7 LD_{99/30 сут}. Для расчёта значения LD_{99/30 сут} за животными наблюдали 30 сут, для расчёта значения LD_{99/5 сут} – 5 сут; при наблюдении регистрировали те же показатели, что и после облучения. Процедура внутривенного введения крысам циклофосфамида представлена на рисунке 11.



А



Б

Рисунок 11 —Циклофосфамид (эндоксан) – (А); внутривенное введение циклофосфамида крысе – (Б)

2.5 Методы гематологических исследований

Верификацию панцитопенического эффекта миелоабляционных агентов осуществляли с помощью общеклинического исследования крови, отобранной из *v. cavae caudalis*, каудальнее впадения в неё *v.v. hepaticae*, в пробирки, содержавшие в качестве антикоагулянта ЭДТА. Пробы тщательно перемешивали и через ≤ 2 ч после отбора исследовали на автоматическом гематологическом анализаторе Advia 2120i фирмы Siemens: измеряли содержание лейкоцитов (нейтрофилы, моноциты, эозинофилы, базофилы, лимфоциты) и ретикулоцитов.

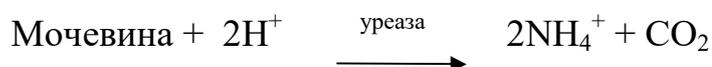
2.6 Методы биохимических исследований

2.6.1 Исследование портальной крови

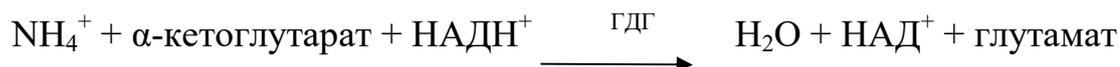
Кишечную эндотоксемию оценивали по содержанию в плазме портальной крови эндотоксина, который определяли с LAL-реактивом в модификации «гель-тромб тест» с помощью набора «ALPYR Test» производства ООО «Альгимед Техно», Россия. Для повышения чувствительности метода, до разведения и смешивания с LAL-реактивом пробы инкубировали при плюс 70 °С в течение

15 мин, этим переводя эндотоксин из связанного с альбумином в свободное состояние [96].

Косвенным показателем кишечной эндотоксемии служила концентрация в плазме крови мочевины, которую определяли с использованием набора «Мочевина UV» (Biosystems, Испания). Принцип метода: мочевина в присутствии уреазы гидролизуеться с образованием аммиака и CO_2 . Образовавшийся аммиак в присутствии глутаматдегидрогеназа (ГДГ) реагирует с α -кетоглутаратом и НАДН^+ с образованием глутамата и НАД^+ .



Индикаторная реакция:



Снижение абсорбции вследствие снижения концентрации НАДН^+ в единицу времени пропорционально концентрации мочевины. Аммиак, который образуется в результате различных процессов распада, также определяется этим методом. Единицы измерения: ммоль/л [117].

Кровь отбирали из *v. portae* в сухой вакутейнер и центрифугировали при 3000 об/мин при плюс 4°C в течение 10 мин. Исследовали сыворотку или плазму, не имевшую признаков гемолиза. Использовали биохимический анализатор А-25 (BioSystems, Испания) с использованием наборов фирмы BioSystems. Качество исследований контролировали материалами BioSystems для внутренней оценки качества, которые соответствуют требованиям, установленным ISO 15189.

2.6.2 Исследование ткани тонкой кишки

Энтероцитопению количественно оценивали по активности в тканях *duodenum*, *jejunum* и *ileum* маркёров плазмалеммы энтероцитов [137, 187]: холинэстеразы (ХЭ) и ЩФ. Образцы двенадцатиперстной, тощей или

подвоздошной кишок массой 60-80 мг каждый гомогенизировали с помощью гомогенизатора IKA T10 Standard в 15-кратном объёме 50 Мм трис-HCl буфера (рН 7,4), замораживали при минус 20 С. Через 15 ч размораживали при плюс 4 °С и центрифугировали 10 мин при 2000 об/мин. В супернатанте определяли содержание белка по Бредфорду [79]. Активность ХЭ определяли методом Элмана [103] 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).

2.6.3 Методы оценки изменения массы и клеточности кроветворных органов

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. В указанные сроки красный костный мозг вымывали изотоническим раствором NaCl с помощью туберкулинового шприца из диафиза бедренной кости. Массу костного мозга в расчёте на 1 бедренную кость определяли по разности масс её диафиза до и после извлечения костного мозга. Рассчитывали отношение массы костного мозга или селезёнки к массе тела. Клеточность костного мозга и селезёнки рассчитывали по среднему содержанию в ткани ДНК, которую определяли с реактивом Дише [58]. Ввиду соответствия одного диплоидного набора хромосом крысы шести пикограммам ДНК [58], число диплоидных наборов хромосом в тканях костного мозга и селезёнки находили делением содержания ДНК в ткани (С, пг на 1 г сырой ткани) на 6 пг. Процедура определения ДНК изложена ниже.

Готовили калибровочные растворы с содержанием дезоксирибонуклеата Na 0,01; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 1,50 мг/мл. Суспензию клеток костного мозга вносили в стеклянную пробирку, содержащую 2 мл 10 % трихлоруксусной

кислоты, перемешивали, закрывали парафильмом и ставили на 15 минут в кипящую водяную баню. 0,2 мл 10 % гомогената селезенки помещали в стеклянную пробирку, содержащую 1,8 мл 10 % трихлоруксусной кислоты, перемешивали, закрывали парафильмом и нагревали 15 мин в кипящей водяной бане. После охлаждения центрифугировали 15 мин при 1200 об/мин для суспензии клеток костного мозга и при 3000 об/мин для гомогенатов селезенки; 2 мл супернатанта отбирали в пробирку Эппендорфа и хранили в холодильнике. К 1 мл супернатанта приливали 2 мл реактива Дише и ставили на кипящую водяную баню на 10 мин. После охлаждения фотометрировали в спектрофотометре ($\lambda=595$ нм) против 10% раствора трихлоруксусной кислоты [58].

Рассчитывали содержание ДНК в костном мозгу одного диафиза бедренной кости (А, мг/диафиз) по уравнению (1):

$$A = 4 \times C, \quad (1)$$

где 4 – число миллилитров трихлоруксусного экстракта, которое соответствует костному мозгу из одного диафиза бедренной кости, С – содержание ДНК в 1 мл трихлоруксусного экстракта, мг/мл.

Рассчитывали число диплоидных наборов хромосом в костном мозгу одного диафиза бедренной кости (Б, диафиз-1) по уравнению (2):

$$B = A \times 10^9 : 6, \quad (2)$$

где 10^9 – число пикограммов в 1 мг, 6 – число пикограммов ДНК в 1 диплоидном наборе хромосом крысы.

Рассчитывали содержание ДНК в 1 г селезенки (В, мг/г) по уравнению (3):

$$B = 100 \times C, \quad (3)$$

где 100 – суммарная кратность разведения ДНК в процессе приготовления 10 % гомогената ткани и его последующего депротенинирования девятикратным объемом ТХУ, С – полученное содержание ДНК в 1 мл трихлоруксусного экстракта, мг/мл.

Рассчитывали число диплоидных наборов хромосом в 1 г органа (Γ , мг/г) по уравнению (4):

$$\Gamma = B \times 109 : 6, \quad (4)$$

где 109 – число пикограммов в 1 мг, 6 – содержание ДНК в 1 диплоидном наборе хромосом крысы (в пикограммах).

2.6.4 Экскреция индикана с мочой

В качестве косвенного показателя острой эндотоксемии кишечного происхождения использовали экскрецию индикана с мочой [33]. Через 48 ч после миелоабляционного воздействия крыс помещали в метаболические камеры («Ugo Basile», Италия) для сбора мочи; в мочеуприемники вносили по 50 мкл 10 % раствора трихлоруксусной кислоты в качестве консерванта. Через 72 ч после острого цитостатического воздействия объем собранной за сутки мочи измеряли и в ней определяли индикан. Использовали количественный колориметрический метод определения индикана в моче с реактивом Обермайера [4, 18] в собственной модификации, описанной в пункте 3.2.3.

2.7 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. Разработанный для этого метод интрадуоденального введения активных маркеров проницаемости ЭГБ представлен в подразделе 3.3. Лактулозу и маннитол определяли в плазме крови с помощью ультраэффективного жидкостного хроматографа Acquity UPLC с масс-спектрометрическим детектором Xevo TQD, Waters (США).

Для приготовления подвижной фазы использовали 126 мг аммония формиата, который помещали в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяли в 500 мл деионизованной воды, доводили объём до метки тем же растворителем и перемешивали.

Для приготовления раствора для внесения в мерную колбу вместимостью 100 мл помещали соответственно 0,6 и 2,67 мл растворов лактулозы и маннитола для медицинского применения. Довели объём до метки водой и перемешали. Концентрация по каждому компоненту в полученном растворе 1 равна 4 мг/мл. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещали 0,5 мл раствора 1 и довели объём до метки водой. Концентрация каждого углевода – лактулозы и маннитола – в полученном растворе 2 составила 200 мкг/мл.

Для приготовления градуировочных растворов плазмы крови с концентрацией лактулозы и маннитола 20 мкг/мл, 10 мкг/мл, 5 мкг/мл, 2 мкг/мл, 1 мкг/мл в мерную колбу вместимостью 10 мл помещали соответственно 1 мл, 0,5 мл, 0,25 мл, 0,1 мл, 0,05 мл раствора 2 и 1 мл плазмы крови крыс. Затем доводили объём раствора до метки водой и перемешивали. Растворы использовали свежеприготовленными.

Хроматографическую колонку промывали подвижной фазой в соответствии с программой, приведенной ниже, и кондиционировали в течение 20 минут. По окончании задавали рабочие условия для жидкостного хроматографа и масс-спектрометрического детектора.

Градуировочные растворы последовательно хроматографируют, в следующих условиях:

Колонка	Atlantis Dc18 3 мкм (3,9 x 150) мм
Подвижная фаза	2 Мм водный раствор формиата аммония
Режим хроматографического элюирования	Изократический
Скорость потока элюента	0,5 мл/мин
Температура термостата колонки	40 °С
Температура термостата автосамплера	25 °С
Объём пробы	5 мкл

Тип ионизации	Ионизация электростатическим распылением при атмосферном давлении (ESI)
Детектируемые переходы в режиме MRM (Да), напряжение на конусе и энергия столкновений (В):	
Маннитол	181 > 89,1; напряжение на конусе: 52 энергия столкновений: 14
Лактулоза	341 > 160,9; напряжение на конусе: 50 энергия столкновений: 6
Полярность детектируемых ионов	Детектирование отрицательных ионов
Температура газа-осушителя	350 °С
Напряжение на капилляре	3,0 кВ
Скорость потока газа-осушителя	650 л/час

Строили графики зависимости площади хроматографического пика сахара от его концентрации в градуировочных образцах с использованием программного обеспечения хроматографической системы.

Градуировочные характеристики во всем диапазоне измеряемых концентраций аналитов имели коэффициент корреляции не менее 0,99, который определялся автоматически без вмешательства оператора. Градуировочные характеристики проверяли ежедневно путем введения двух выборочных градуировочных образцов и измерения в них концентрации аналита по градуировочной характеристике. Отношение разности измеренного и табличного значений к табличному значению содержания аналита для каждого из градуировочных растворов не превышало $\pm 10\%$.

Для подготовки к измерению массовой концентрации лактулозы и маннитола в обычную пробирку *Vacurette* вместимостью 9 мл вносили 1 мл биологического образца и 2 мл ацетонитрила. Пробы встряхивали на аппарате при скорости 400 колебаний в минуту в течение 10 мин. Осажденные белки отделяли центрифугированием при скорости 5 000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант декантировали в пробирку типа *Falcon* вместимостью 15 мл и добавляли 5 мл хлористого метилена с целью удаления из проб липофильных соединений.

Экстракцию проводили на аппарате для встряхивания при скорости 400 колебаний в минуту в течение 10 мин и центрифугировали при скорости 3 000 об/мин в течение 5 мин. 0,1 мл супернатанта помещали в хроматографическую виалу, прибавляли 0,9 мл воды и перемешивали.

Для идентификации лактулозы и маннитола в исследуемых образцах в хроматомасс-спектрометрическую систему попеременно вводили по 5 мкл испытуемого раствора биообразца и градуировочного раствора с концентрацией лактулозы и маннитола по 20 мкг/мл. Используя систему сбора и обработки данных, идентификацию лактулозы и маннитола в биопробах производили по сходству между экспериментальными данными и теоретическими характеристиками целевых аналитов.

За результат идентификации принимали:

- соответствие времени удерживания ($t_{уд}$) пиков лактулозы и маннитола на хроматограммах градуировочного и испытуемых растворов, мин;
- присутствие характеристичных переходов в масс-спектрах идентифицируемых компонентов.

Концентрацию целевых аналитов в анализируемых образцах находили с помощью градуировочной характеристики и программы обработки данных. Если найденная величина превышала верхний предел соответствующего градуировочного графика, то образец разбавляли водой и анализировали повторно. Определение проводили для каждого из двух параллельных определений. Получали значения концентраций препарата C_1 и C_2 в хроматографируемых пробах и вычисляли средней результат.

Окончательный результат измерений массовой концентрации лактулозы и маннитола в плазме крови лабораторных животных в мкг/мл вычисляли по формуле, учитывающей также 10-кратное разбавление исходных проб в соответствии с уравнением (5):

$$\bar{C} = \frac{C_1 + C_2}{2} \times 10 \quad (5)$$

Внутрилабораторная валидация методики произведена по показателям «Линейность», «Правильность» и «Воспроизводимость».

2.8 Методы морфологических исследований

Для качественной оценки влияния цитостатических агентов на структуру энтерогематического барьера выполняли морфологическое исследование двенадцатиперстной, тощей, подвздошной, слепой и ободочной кишок. Отрезки указанных отделов кишечника длиной по 2 см немедленно по извлечении помещали в 10% раствор формалина, обезвоживали спиртовыми растворами восходящей концентрации и ксилолом, заливали парафином и готовили срезы толщиной 4 мкм. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали с помощью светового микроскопа 3DHISTECH Panoramic MIDI (ООО «Карл Цейсс», Германия). Сроки исследования составляли: до воздействия цитостатических агентов, 1, 2 и 3 сут после воздействия цитостатических агентов. Подсчитывали число, измеряли длину кишечных ворсинок на 58-73 срезах каждого органа от трёх животных. Результаты обрабатывали с помощью программы Case Viewer – 3DHISTECH Ltd.

2.9 Методы, применённые для изучения функционального состояния организма

При изучении функционального состояния организма использовали следующие показатели:

- (1) динамика выживаемости и массы тела;
- (2) интенсивность газообмена и внешнего дыхания в покое;
- (3) спонтанная двигательная активность животных.

Для изучения динамики выживаемости и массы тела, до и после цитостатического воздействия 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. На рисунке 12 представлен аппарат Миропольского с респирометрической камерой ёмкостью 2 л [125], в котором определяли потребление кислорода организмом непосредственно до, через 4, 24, 48 и 72 ч после миелоабляционного воздействия. Трёхдневная продолжительность исследования отвечала сроку трансплантации стволовых кроветворных клеток реципиентам при миелоабляционной цитостатической терапии человека.



Рисунок 12 — Исследование газообмена и внешнего дыхания у крысы в аппарате Миропольского; животное дремлет в эксикаторе

В течение двух дней до начала исследования животных приучали к респирометрической камере. Интенсивность потребления кислорода организмом – Q_{O_2} , мл/(кг·мин) – находили из уравнения (6):

$$Q_{O_2} = V \cdot F / (m \cdot \Delta t), \quad (6)$$

где V – объём манометрической жидкости, поступившей в бюретку, мл, F – коэффициент для приведения объёма кислорода к нормальным условиям, определённый по таблицам [42], m – масса тела животного, кг, Δ – время пребывания крысы в герметизированной камере, мин.

Продолжительность измерения составляла 3 мин, его абсолютная погрешность – 0,1 мл ($\leq 2\%$ величины V), объём респирометрической камеры – 0,9 л. Животных не фиксировали, они свободно располагались в респирометрической камере и выглядели заторможенными. В это время у них подсчитывали частоту дыхательных движений (ЧДД, мин^{-1}), которую использовали в качестве показателя интенсивности внешнего дыхания. Показателем эффективности внешнего дыхания служило среднее потребление кислорода организмом за 1 дыхательный цикл (мл/кг), которое рассчитывали как отношение Q_{O_2} и ЧДД. Значения Q_{O_2} , ЧДД и $Q_{O_2}/\text{ЧДД}$, найденные после введения ЦФ или облучения, выражали в % от исходного уровня, который принимали за 100 %.

Спонтанную двигательную активность животных изучали в итальянской клетке активности Ugo Basile с инфракрасными излучателями (рисунок 13) до и ежедневно в течение 3 сут после миелоабляционного воздействия.



Рисунок 13 — Клетка активности Ugo Basile с печатающим устройством

Принцип действия прибора: при перемещении по прозрачной акриловой клетке крыса прерывает один или несколько инфракрасных лучей, источники которых расположены на решётке с одной стороны клетки, а детекторы – с другой. Нижняя решётка датчиков контролирует горизонтальное перемещение, верхняя решетка – вертикальное (подъем на задние лапки). Количество разрывов луча коррелирует с количеством движений по клетке. Движения подсчитывали в течение 3 мин и регистрировали с помощью автоматического печатающего устройства. Груминг и количество болюсов подсчитывали в это же время визуально.

2.10 Методы статистической обработки полученных данных

Результаты представляли в виде среднего значения и его ошибки ($M \pm m$). Для оценки влияния цитостатических агентов на количественные показатели использовали общие линейные модели. В случаях нескольких регистрируемых показателей в одном экспериментальном плане проводили многомерный дисперсионный анализ. При наличии значимого влияния какого-либо фактора выполняли одномерный дисперсионный, регрессионный и (или) ковариационный анализ с соответствующим количеством влияющих факторов для каждого показателя [121]. Межгрупповое сравнение средних величин выполняли с помощью апостериорного критерия Тьюки [152]. Значимость межгрупповых различий величин, распределённых по закону, отличному от нормального, при невозможности нормализации определяли с помощью критериев Краскела-Уоллиса и Манна-Уитни [152, 169]; значимость межгрупповых различий выживаемости – точным методом Фишера и с помощью критерия χ^2 [14]. Для определения летальных доз пользовались методом пробит-анализа Литчфилда-Вилкоксона [14]. Межгрупповые различия функций дожития оценивали с использованием критерия Гехана-Вилкоксона [197]. Связь между признаками выражали с помощью рангового коэффициента корреляции Спирмена r_s . Уровень значимости α приняли равным 0,05.

ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ МИЕЛОАБЛЯЦИОННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ И МЕТОДОВ СКРИНИНГА СРЕДСТВ ПРОФИЛАКТИКИ ЕЁ ГАСТРОЭНТЕРОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ

3.1 Разработка экспериментальных моделей миелоабляционных воздействий

3.1.1 Обоснование режима цитостатического воздействия

Для миелоабляционного воздействия фармакологических агентов оптимально их в. в. введение в супралетальной дозе, немного превышающей абсолютно летальную. Циклофосфамид при в. в. введении является апробированным фармакологическим средством миелоабляции. Однократное его введение животным отвечает задаче скрининга энтеропротекторов. При выборе дозы циклофосфамида 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. Для изучения дозовой зависимости летальности, СПЖ и динамики массы тела животных случайным образом распределили по 10 особей в 10 групп, в каждой из которых вводили циклофосфамид в дозах 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 мг/кг. Животных подсчитывали, осматривали и взвешивали в течение 30 сут. На рисунке 14 представлена графическая аппроксимация результатов изучения дозовой зависимости летальности и СПЖ после введения циклофосфамида. Она показывает, что доза циклофосфамида, 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.

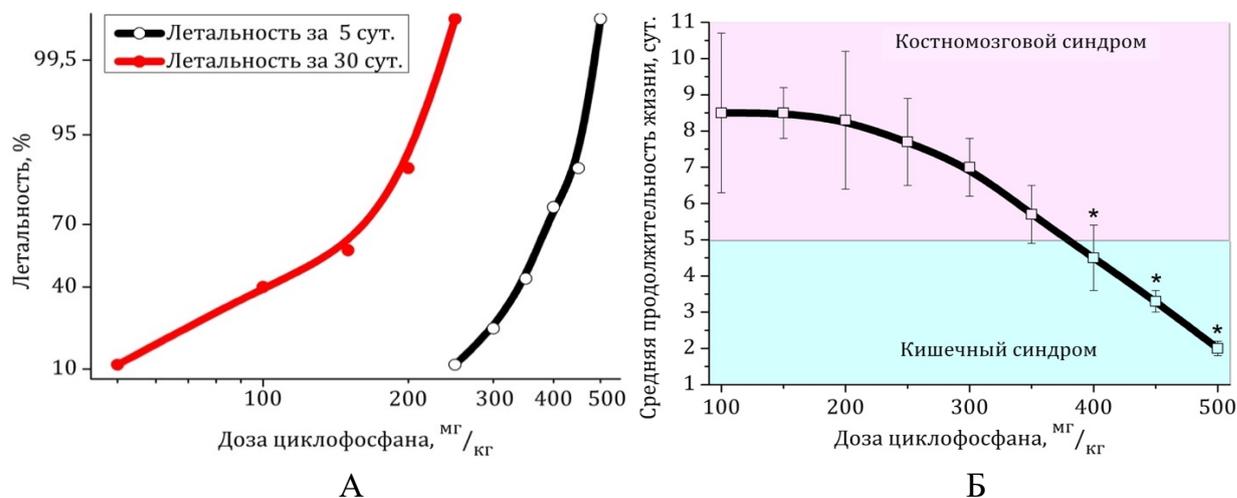


Рисунок 14 — Линии трендов дозовой зависимости летальности, % (А) и средней продолжительности жизни, $M \pm m$, сут (Б) крыс после введения циклофосфамида в дозе 100 мг/кг. * — Значимое ($p < 0,05$) различие со средней продолжительностью жизни.

Пробит-анализ зависимости «доза-летальность» показал (таблица 4), что доза 390 мг/кг, составляет 1,7 LD₉₉, то есть является супралетальной.

Таблица 4 — Результаты пробит-анализа дозовой зависимости пятисуточной и тридцатисуточной летальности крыс после в. в. циклофосфамида

Показатель дозовой зависимости	Срок учёта летальности	
	5 сут	30 сут
LD ₅₀ ± m, мг/кг	351,9 ± 21,9	125,7 ± 15,5
min LD ₅₀ , мг/кг	308,2	94,2
max LD ₅₀ , мг/кг	395,7	157,2
LD ₁₆ , мг/кг	229,2	59,9
LD ₈₄ , мг/кг	474,7	191,5
LD ₉₉ , мг/кг	536,1	224,3

Динамика массы тела крыс (рисунок 15) характеризовалась их похудением в течение ближайших 5 сут после введения циклофосфамида в дозах ≥ 200 мг/кг,

чего не было при дозах 50 или 100 мг/кг. Таким образом, даже при отсутствии у большинства животных кишечного синдрома, при дозах ≥ 200 мг/кг имело место преобладание катаболизма над анаболизмом, что косвенно указывает на гастроэнтеротоксичность миелоабляционного агента.

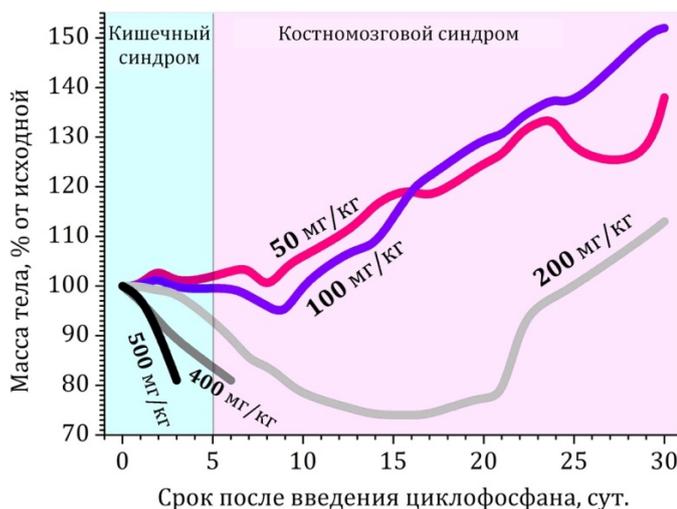


Рисунок 15 — Динамика массы тела крыс после внутривенного введения циклофосфамида, линии тренда

Для верификации миелоабляционного эффекта изучена динамика клеточности кроветворных органов и содержания форменных элементов крови в течение 3 сут после воздействия циклофосфамида. Препарат вводили внутривенно в виде свежеприготовленного водного раствора в объеме 5 мл/кг в дозе 390 мг/кг. Это вело к гипоплазии кроветворных органов. За трое суток массовые коэффициенты селезенки и красного костного мозга снижались на 64% и 40%, соответственно (рисунок 16, А). Это было обусловлено убылью кариотических клеток: содержание ДНК в тканях селезенки и костного мозга снижалось на 44% и 46%, соответственно (рисунок 16, Б).

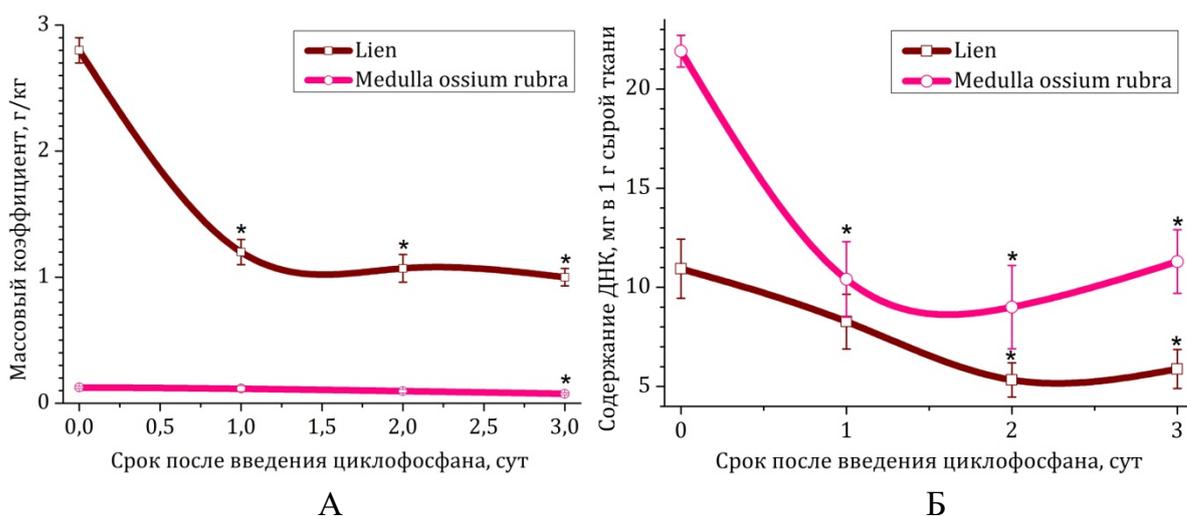


Рисунок 16 — Массовые коэффициенты костного мозга правого бедра и селезёнки крыс и содержание ДНК в этих органах после внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг, $M \pm m$, $n = 6$.

(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)

Полученные данные свидетельствуют о том, что на 3 сут после введения циклофосфамида 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 циклофосфамида в дозе 390 мг/кг достигался миелоабляционный эффект, то есть, в соответствии с исходным определением этого термина [149], гибель полипотентных стволовых кроветворных клеток и клеток пролиферативного пула кроветворной ткани.

Внутривенное введение крысам циклофосфамида в дозе 390 мг/кг вызывало падение через 3 сут содержания в периферической крови лейкоцитов и ретикулоцитов. Наиболее быстро и существенно снижалось содержание в крови клеток, гибнущих интерфазно: уже через сутки численность лимфоцитов сокращалась в 28 раз, а на 3 сут – в 278 раз. Падение числа ретикулоцитов в 58 раз указывало на истощение к 3 сут после введения цитостатика пролиферативного

пула клеток эритроцитарного ряда. Преходящий нейтрофильный лейкоцитоз на 1 сут после введения циклофосфида отражал неспецифическую адаптационную реакцию, стресс. Содержание форменных элементов гранулоцитарного ряда снижалось к 3 сут в 7-17 раз, что указывало на быстрое развитие агранулоцитоза (рисунок 17).

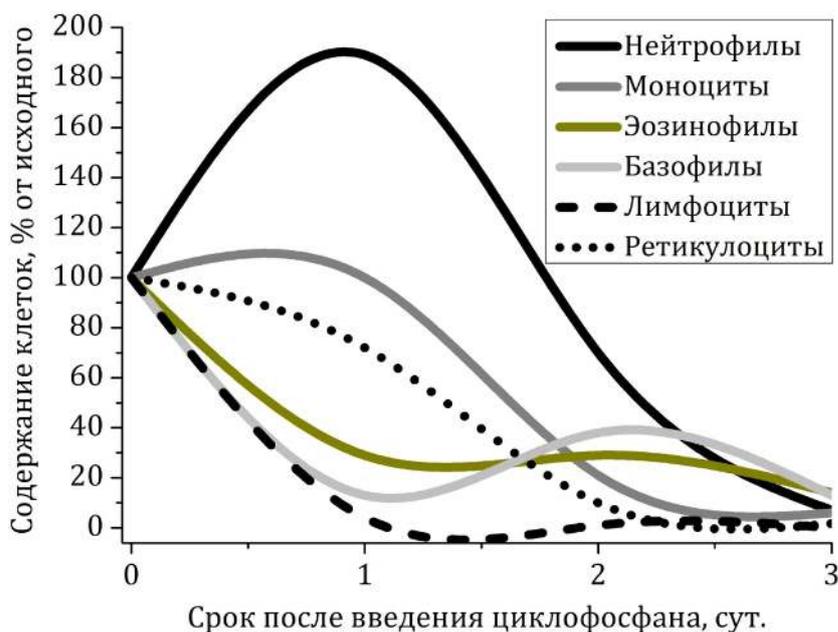


Рисунок 17 —Содержание лейкоцитов и ретикулоцитов в крови крыс после внутривенного введения циклофосфида в дозе 390 мг/кг, линии тренда значимые ($p < 0,05$, $n = 6$) различия с исходным уровнем для всех клеток на третьи сутки, для нейтрофилов – на первые и третьи сутки, а для моноцитов и лимфоцитов – во все сроки после введения циклофосфида

Таким образом, динамика содержания форменных элементов в периферической крови крыс в ближайшие 3 сут после введения крысам циклофосфида в дозе 390 мг/кг указывает на формирование у животных панцитопенического синдрома – необходимого условия для трансплантации аллогенных стволовых кроветворных клеток.

Для верификации энтеротоксичности циклофосфида в дозе 390 мг/кг выполняли морфологическое исследование двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишок. Через 3 сут после введения циклофосфида наблюдали

выраженные воспалительные изменения в тонкой кишке. В *jejunum*, кроме того, отмечали умеренно выраженные некротические изменения, а в *ileum* – инфильтрацию слизистой оболочки лимфоцитами и фагоцитами на всю толщину (рисунки 18–20).

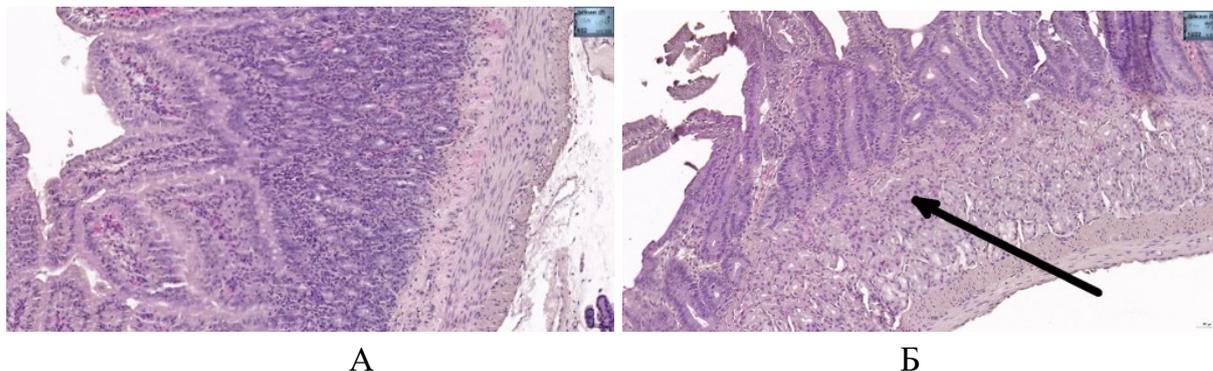


Рисунок 18 — Гистологические препараты двенадцатиперстной кишки крыс после внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$
(А – контроль, Б – 3 сут после воздействия; стрелкой указана слабовыраженная лимфо-макрофагальная инфильтрация на всю глубину слизистой оболочки)

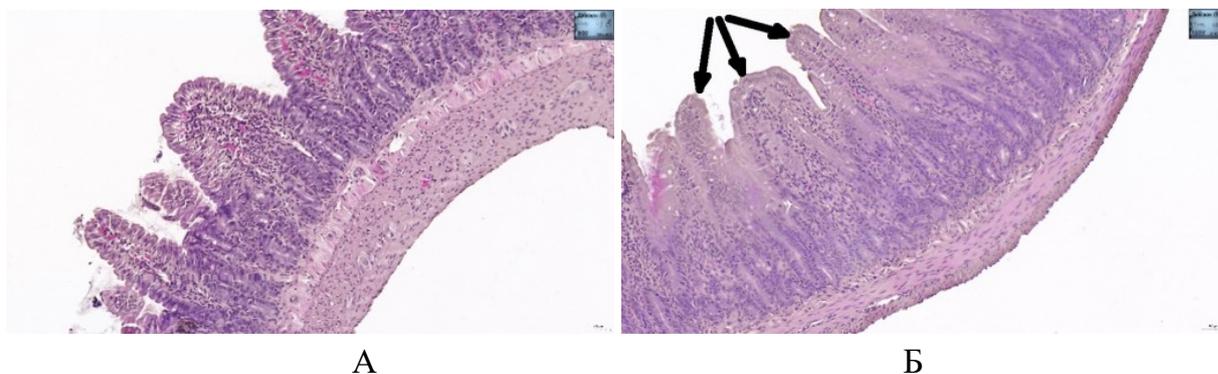


Рисунок 19 — Гистологические препараты тощей кишки крыс после внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$
(А – контроль, Б – 3 сут после воздействия, стрелки указывают поверхностные отделы слизистой оболочки, которые не содержат ядер или содержат изменённые ядра со слабо окрашенной кариоплазмой)

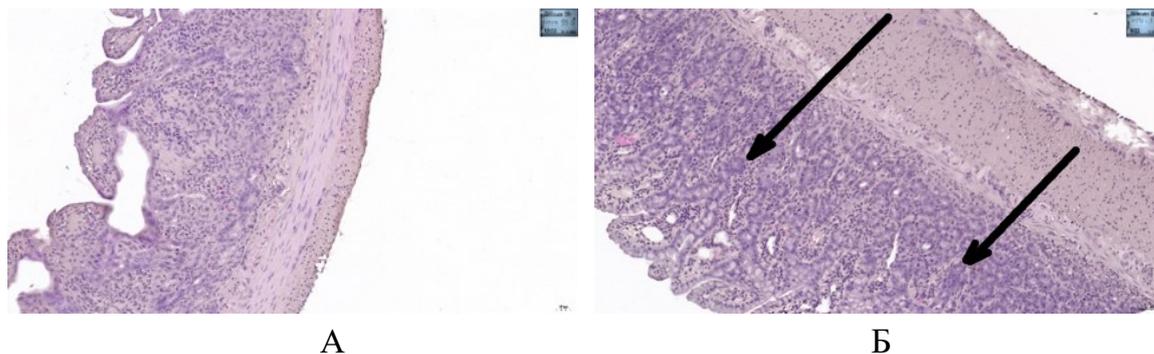


Рисунок 20 — Гистологические препараты подвздошной кишки крыс после внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$ (А – контроль, Б – 3 сут после воздействия, стрелками указаны: лимфо- и макрофагальная инфильтрация на всю глубину слизистой оболочки)

Таким образом, введение крысам циклофосфамида в дозе 390 мг/кг вело к некротическим и воспалительным изменениям в эпителии всех отделов тонкой кишки на 3 сут с тенденцией к более выраженному поражению дистального отдела тонкой кишки. Данное воздействие пригодно для экспериментального моделирования миелоабляционного цитостатического воздействия и может быть использовано при скрининге медикаментозных средств профилактики её гастроэнтеротоксических эффектов.

3.1.2 Обоснование режима лучевого воздействия

При выборе дозы лучевого воздействия, позволяющей моделировать миелоабляцию, необходимо убедиться в выполнении двух условий: (1) доза излучения должна гарантировать возникновение у всех экспонированных животных необратимой панцитопении; (2) при облучении в этой дозе число крыс, гибнущих от поражения кишечника, должно быть минимальным. Первое условие соблюдается при гибели всех животных за максимальное время проявлений лучевого костномозгового синдрома у грызунов составляющее 30 сут: $D \geq LD_{99/30 \text{ сут}}$. На практике искомая доза излучения D должна немного превышать

$LD_{99/30 \text{ сут}}$, то есть быть супралетальной: $LD_{99/30 \text{ сут}} < D \leq 1,1 LD_{99/30 \text{ сут}}$. Критерием выполнения второго условия является $СПЖ > 5 \text{ сут}$ [170].

Полипотентные стволовые кроветворные клетки сосредоточены преимущественно в кроветворных органах, однако благодаря миграции с током крови присутствуют практически в любой точке организма [38]. Для моделирования миелоабляции предпочтительным вариантом лучевого воздействия является общее равномерное облучение, но достичь его невозможно. На практике применяют такое, при котором дозы, поглощённые различными точками тела, различаются не более чем втрое («относительно равномерное облучение»). Для обеспечения относительной равномерности распределения дозы в теле учитывали и проникающую способность тормозного излучения, количественной характеристикой которой является линейный коэффициент ослабления μ (см^{-1}). Его значение для воды – одного из биоэквивалентных веществ – и фотонного излучения заданной энергии находили в справочной таблице [15]. Рассчитывали по формуле (7) слой половинного ослабления d (см), то есть толщину слоя биотканей, уменьшающего поглощённую дозу излучения вдвое:

$$d = \frac{0,693}{\mu}. \quad (7)$$

Для многофункциональной передвижной рентгеновской установки наибольшим из достижимых является анодное напряжение $U = 90 \text{ кВ}$, что соответствует энергии фотонов тормозного излучения $E = 90 \text{ кэВ}$ и значению линейного коэффициента ослабления $\mu = 0,190 \text{ см}^{-1}$. Получили значение d для условий настоящего исследования: $d = 3,65 \text{ см}$, что близко к сагиттальному размеру туловища крысы. То есть при дорсо-вентральном облучении крыс обращённая к рентгеновской трубке спина животного получала дозу тормозного излучения, приблизительно вдвое большую, чем вентральная поверхность тела. Такое распределение дозы классифицируется как относительно равномерное

облучение, что отвечает условиям моделирования миелоабляционного кондиционирования.

Для равномерного распределения дозы в горизонтальной плоскости отношение доз облучения наиболее удалённой от анода каудальной и наиболее близкой к аноду краниальной точек тела не должно быть меньше 0,9. С учётом обратной квадратичной зависимости мощности дозы излучения от расстояния до источника, минимальное значение фокусного расстояния F находили из уравнения (8):

$$F = \sqrt{0,9 \cdot L^2}, \quad (8)$$

где F – фокусное расстояние, L – расстояние от анода до каудальной точки тела.

Согласно теореме Пифагора (9):

$$L^2 = R^2 + F^2, \quad (9)$$

где F – фокусное расстояние, R – расстояние от краниальной до каудальной точки.

Подставляя это выражение в уравнение (8), получили (9):

$$F = 3 \cdot R. \quad (10)$$

Решив уравнение (10) для $R = 15$ см, получаем $F = 45$ см. Следовательно, фокусное расстояние при моделировании миелоабляционного кондиционирования на крысах должно быть не меньше 45 см ($F \geq 45$ см). Таким образом, для экспериментального моделирования миелоабляционного кондиционирования применяли общее однократное дорсо-вентральное Rö-облучение крыс в супралетальной дозе при анодном напряжении $U = 90$ кВ, фильтрах, обеспечивающих кратность ослабления $K_{\text{осл.}} \geq 4$, и фокусном расстоянии $F \geq 45$ см.

С целью идентификации миелоабляционных доз Rö-излучения изучили дозовую зависимость летальности, СПЖ и динамики массы тела. Для этого животных случайным образом распределили по 16 особей в 9 групп. В каждой из этих групп доза излучения в центре тела составила 5,76, 6,75, 7,71, 8,67, 9,64,

10,60, 11,57, 12,53, или 13,25 Гр. Облучённых в этих дозах крыс подсчитывали, осматривали и взвешивали в течение 30 сут. На рисунке 21 представлена графическая аппроксимация результатов изучения дозовой зависимости летальности и СПЖ после облучения. Она позволила идентифицировать 9,64 Гр как дозу излучения, удовлетворяющую трём условиям, необходимым для моделирования миелоабляционной цитостатической терапии: она обеспечивает $СПЖ \geq 5$ сут, дожитие всех облучённых животных до 3 сут, и, при этом, является абсолютно летальной.

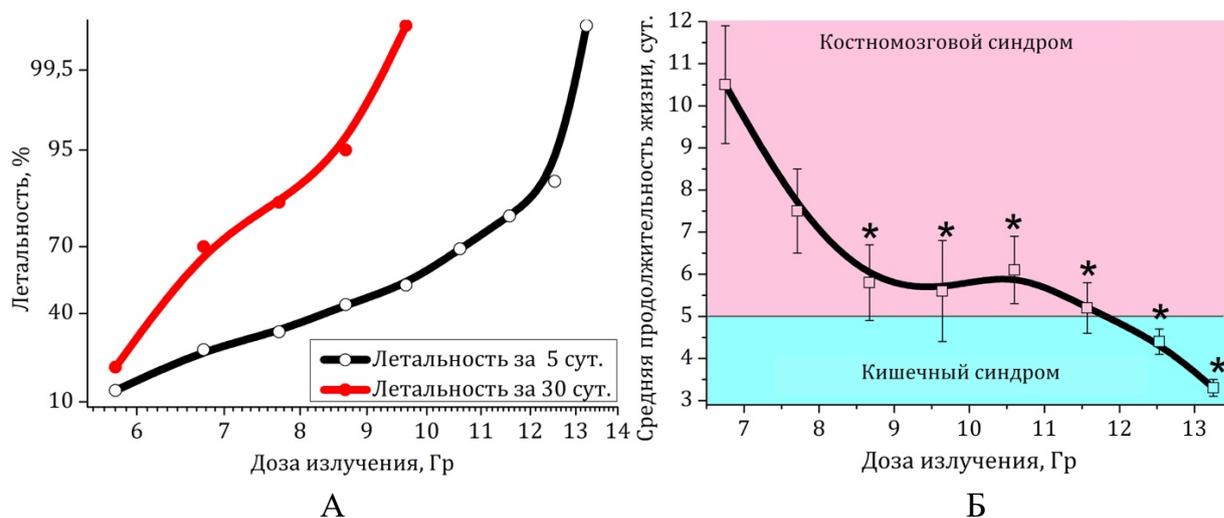


Рисунок 21 — Линии трендов дозовой зависимости летальности (А) и средней продолжительности жизни (Б), $M \pm m$, сут, крыс после общего однократного Rö-облучения в дозе 6,75 Гр.

* — Значимое различие со средней продолжительностью жизни, $p < 0,05$

Пробит-анализ зависимости «доза-летальность» (таблица 5) показал, что доза 9,64 Гр составляет 1,1 LD_{99} , то есть является супралетальной.

Таблица 5 — Результаты пробит-анализа дозовой зависимости пятисуточной и тридцатисуточной летальности крыс после общего однократного Rö-облучения

Показатель дозовой зависимости	Срок учёта летальности	
	5 сут	30 сут
1	2	3
$LD_{50} \pm m$ Гр	$9,07 \pm 0,37$	$6,50 \pm 0,26$
$\min LD_{50}$, Гр	8,33	5,98

Продолжение таблицы 5

1	2	3
max LD ₅₀ , Гр	9,80	7,03
LD ₁₆ , Гр	6,20	5,02
LD ₈₄ , Гр	11,94	7,99
LD ₉₉ , Гр	13,37	8,74

Динамика массы тела крыс характеризовалась значительным снижением, начинавшимся через сутки после R \ddot{o} -облучения в дозах $\geq 9,64$ Гр, чего не было после облучения в дозах 5,78 или 6,75 Гр (рисунок 22). Это косвенно указывает на то, что даже при отсутствии у большинства животных кишечного синдрома после облучения в дозе 9,64 Гр имело место преобладание катаболизма над анаболизмом, что косвенно указывает на гастроэнтеротоксичность лучевого агента.

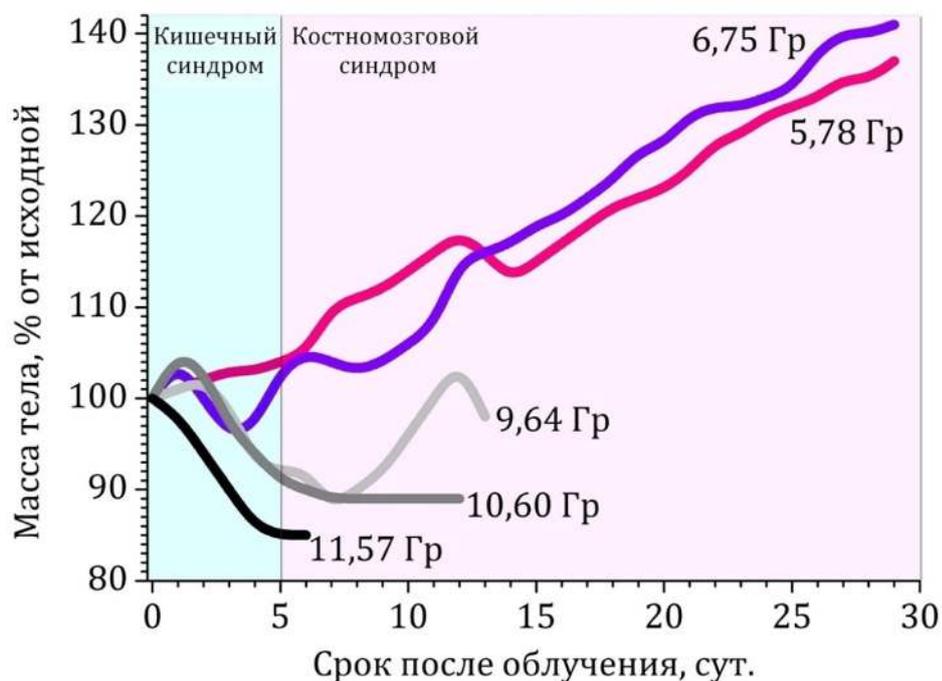


Рисунок 22 — Динамика массы тела крыс после общего однократного рентгеновского облучения, линии тренда
Заметно необратимое снижение массы тела на 1–5 сут после облучения в дозах 9,64, 10,60 и 11,57 Гр. Дозы 5,78 и 6,75 Гр существенного снижения массы тела в указанные сроки не вызывали

Результаты изучения дозовой зависимости летальности, СПЖ и массы тела указывают на дозу общего однократного относительно равномерного R \ddot{o} -облучения 9,64 Гр как на позволяющую моделировать на крысах лучевое миелоабляционное воздействие. При этой дозе все животные доживали до 3 сут (времени предполагаемой трансплантации стволовых кроветворных клеток), большинство погибало позже 5 сут (что указывало на костномозговой синдром как на преобладающий механизм танатогенеза) и все погибали в течение 30 сут (что характеризует данную дозу как супралетальную). Получены косвенные доказательства гастроэнтеротоксических эффектов лучевого воздействия в этой дозе.

Выбранный вариант лучевого воздействия вёл к гипоплазии кроветворных органов. За трое суток массовые коэффициенты селезёнки и красного костного мозга снижались на 62% и 41 %, соответственно (рисунок 23, А). Это было обусловлено убылью кариотических клеток: содержание ДНК в тканях селезёнки и костного мозга снижалось в 2 и 1,9 раз, соответственно (рисунок 23, Б).

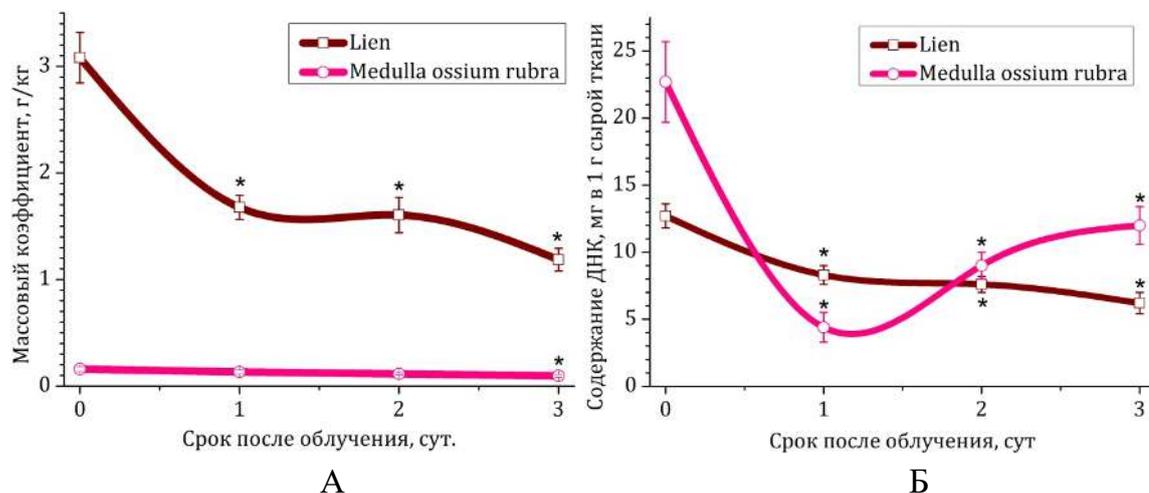


Рисунок 23 — Массовые коэффициенты костного мозга правого бедра и селезёнки и содержание ДНК в этих органах после общего однократного R \ddot{o} -облучения крыс в дозе 9,64 Гр, $M \pm m$, $n = 7$
 (А – массовый коэффициент органа, г на 1 кг массы тела;
 Б – содержание ДНК, мг в 1 г сырой ткани)
 Примечания: 1 – 0 сут – исходное значение;
 2 – * – Значимое различие с исходным значением, $p < 0,05$;
 3 – Представлен массовый коэффициент костного мозга из правой бедренной кости)

Эти данные свидетельствуют о том, что на 3 сут после облучения в селезёнке оставались лишь клетки стромы, эритроциты и небольшое число созревающих клеток миелоидного ряда, в то время как радиочувствительные клетки пролиферативного и стволового пулов отсутствовали. Таким образом, общим однократным относительно равномерным R \ddot{o} -облучением крыс в дозе 9,64 Гр достигался миелоабляционный эффект, то есть, в соответствии с исходным определением этого термина [149], гибель полипотентных стволовых кроветворных клеток и клеток пролиферативного пула.

Общее R \ddot{o} -облучение крыс в дозе 9,64 Гр наиболее существенно влияло на содержание в периферической крови клеток, гибнущих интерфазно: уже через сутки численность лимфоцитов снижалась в 82 раза. Такая лимфопения на 1-2 сут после облучения является диагностическим признаком острой лучевой болезни крайне тяжёлой степени [5]. Оставшиеся лимфоциты, судя по данным литературы [140], пребывали на разных стадиях апоптоза. Падение числа ретикулоцитов в 54 раза указывало на истощение к 3 сут после облучения пролиферативного пула клеток эритроцитарного ряда. Содержание клеток гранулоцитарного ряда снижалось к 3 сут в 4,5-30 раз, раньше развития агранулоцитоза, при такой дозе приходящегося на сроки > 5 сут после облучения [5]. Динамика содержания форменных элементов в периферической крови крыс в ближайшие 3 сут после облучения в дозе 9,64 Гр (рисунок 24) указывает на формирование у животных панцитопенического синдрома – необходимого условия для трансплантации аллогенных стволовых кроветворных клеток.

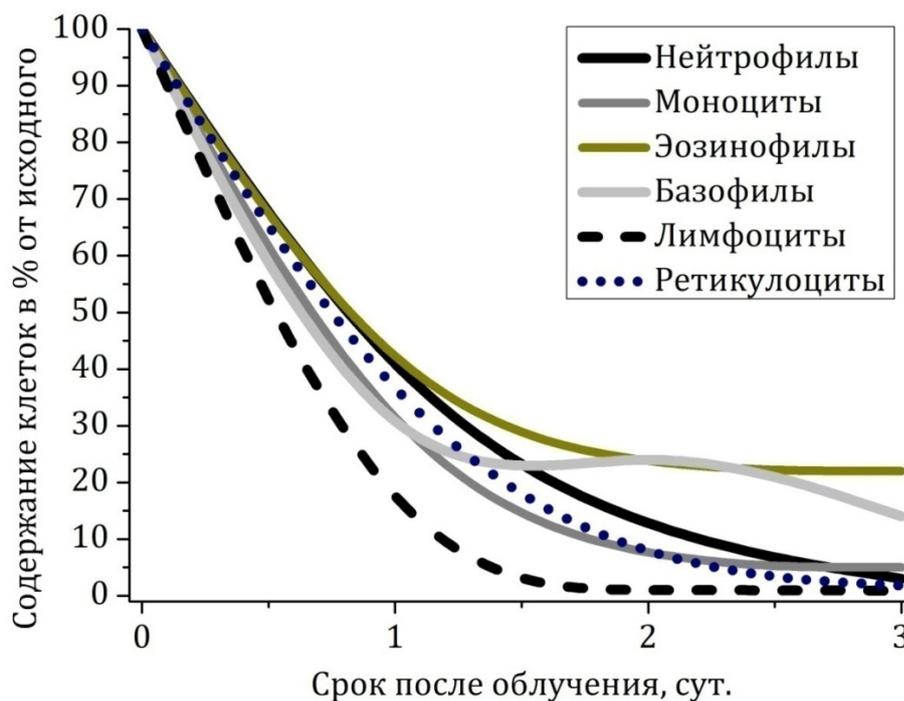
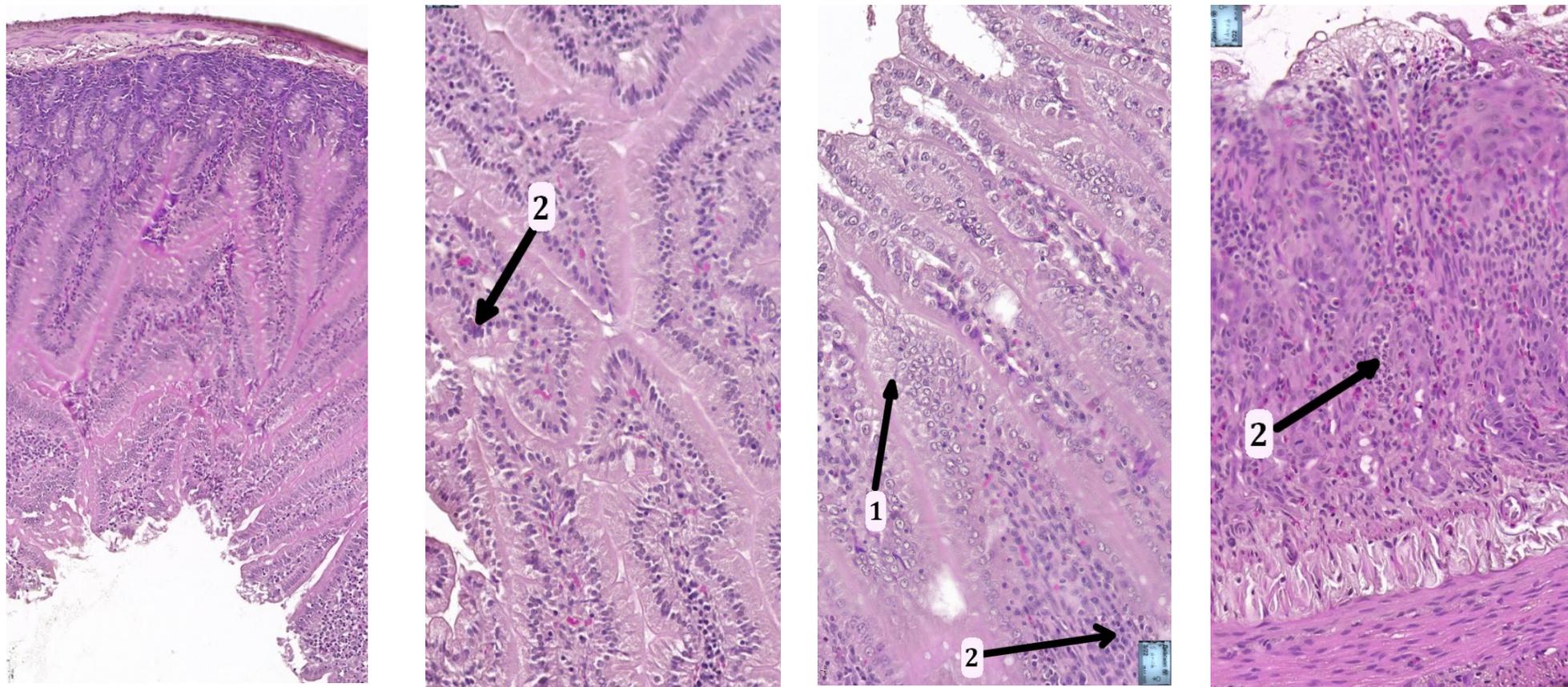


Рисунок 24 —Содержание лейкоцитов и ретикулоцитов в крови крыс после общего однократного R \ddot{o} -облучения в дозе 9,64 Гр, линии тренда.

Значимые ($p < 0,05$, $n = 7$) различия с исходным уровнем для всех клеток во все сроки

Полученные данные свидетельствуют о формировании миелоабляционного и панцитопенического эффектов на 3 сут после общего однократного относительно равномерного R \ddot{o} -облучения крыс в дозе 9,64 Гр, что отвечает требованиям, предъявляемым к экспериментальной модели лучевого миелоабляционного воздействия.

Для верификации энтеротоксического действия R \ddot{o} -облучения в дозе 9,64 Гр выполняли морфологическое исследование двенадцатиперстной, тощей, подвздошной кишок. В течение 1-3 сут после рентгеновского облучения нарастали некротические и воспалительные изменения в тонкой кишке, наиболее выраженные в *ileum*. На 3 сут после облучения отмечались лимфо - макрофагальная инфильтрация на всю глубину слизистой оболочки и потеря ядер клетками эпителия (рисунки 25-27).



А

Б

В

Г

Рисунок 25 — Гистологические препараты двенадцатиперстной кишки крыс после общего однократного рентгеновского облучения в дозе 9,64 Гр. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$. (А — до облучения (контроль), Б — 1 сут после облучения, В — 2 сут после облучения, Г — 3 сут после облучения; стрелки: 1 — отделы слизистой оболочки, не содержащие ядер; 2 — очаговая лимфо-макрофагальная инфильтрация)

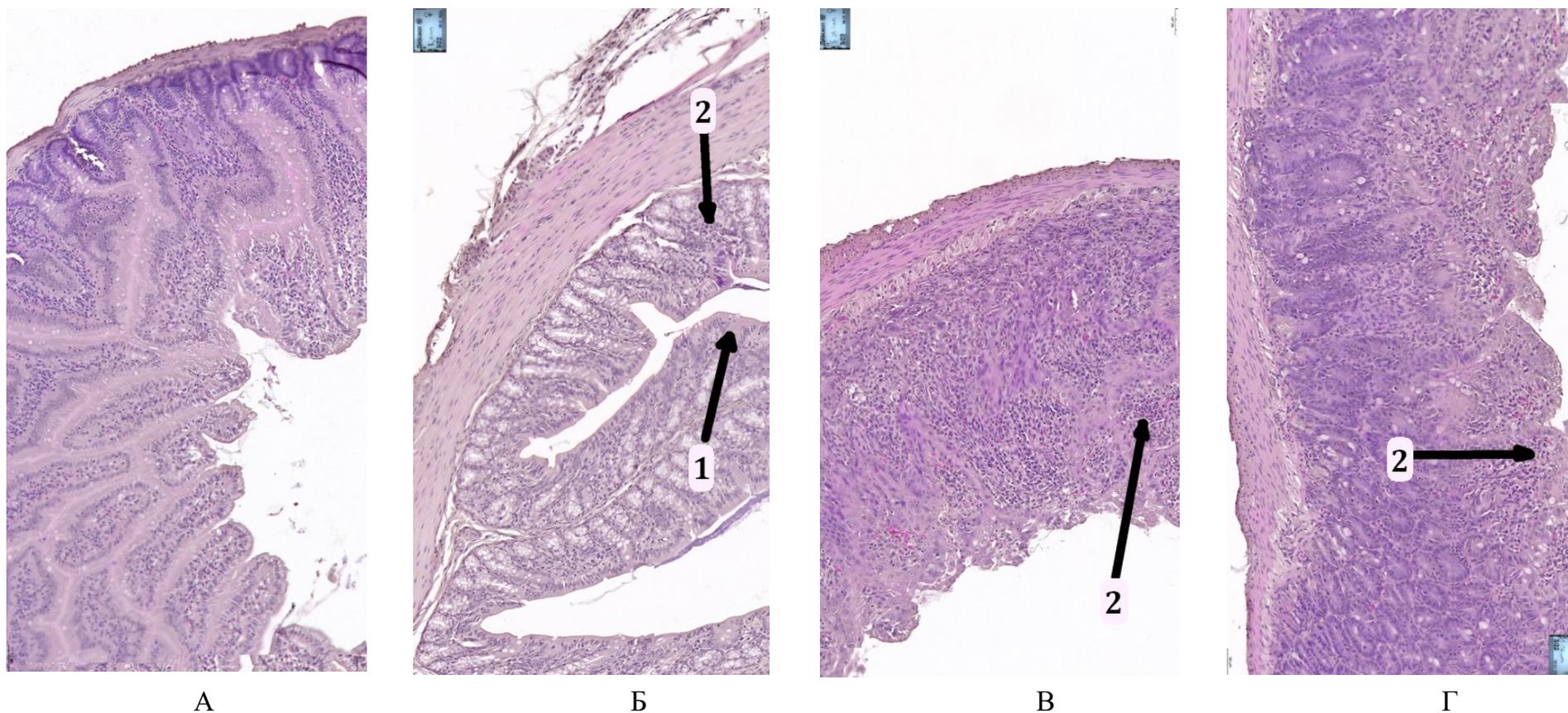
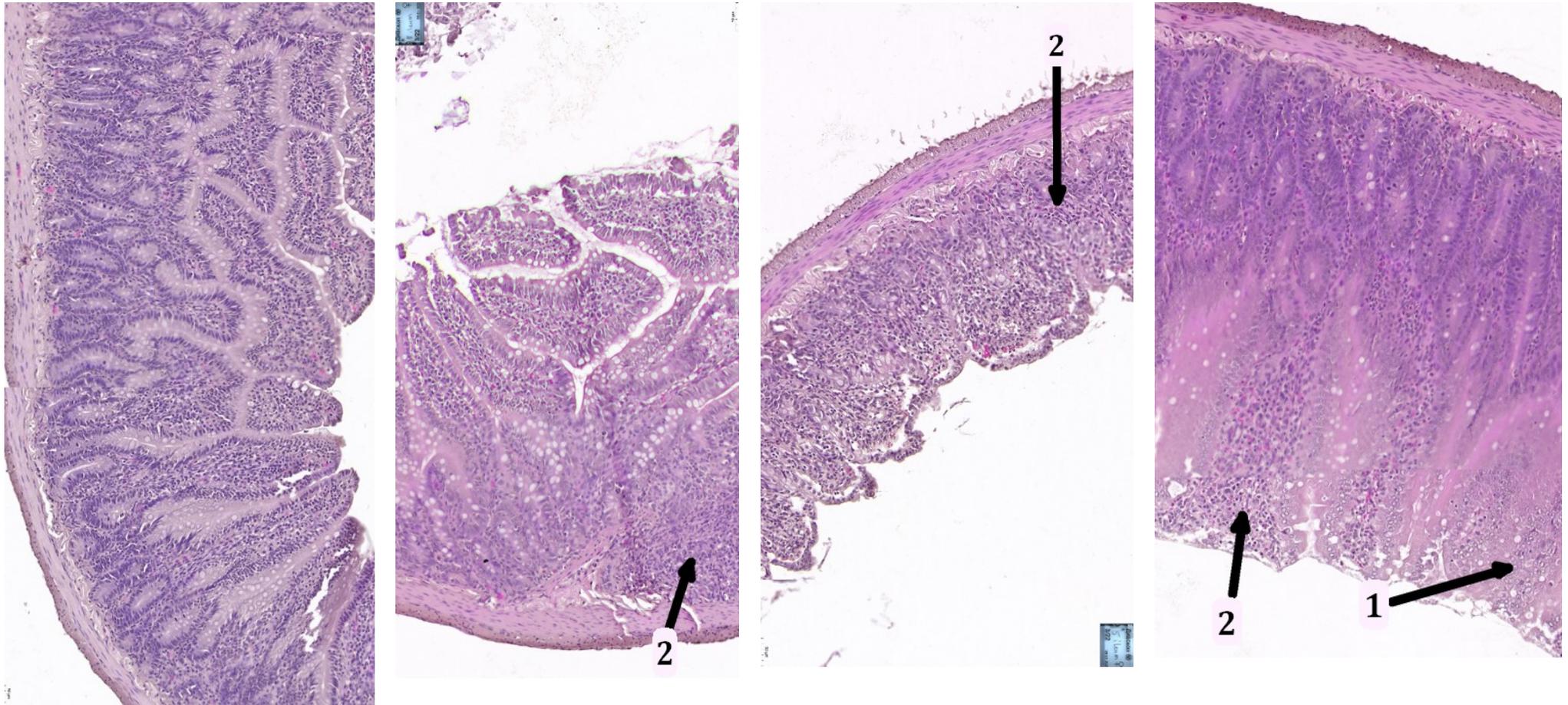


Рисунок 26 — Гистологические препараты тощей кишки крыс после общего однократного рентгеновского облучения в дозе 9,64 Гр. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$. (А – до облучения (контроль), Б – 1 сут после облучения, В – 2 сут после облучения, Г – 3 сут после облучения; стрелки: 1 – отделы слизистой оболочки, не содержащие ядер; 2 – очаговая лимфо-макрофагальная инфильтрация)



А

Б

В

Г

Рисунок 27 — Гистологические препараты подвздошной кишки крыс после общего однократного рентгеновского облучения в дозе 9,64 Гр. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$. (А — до облучения (контроль), Б — 1 сут после облучения, В — 2 сут после облучения, Г — 3 сут после облучения; стрелки: 1 — отделы слизистой оболочки, не содержащие ядер; 2 — очаговая лимфо-макрофагальная инфильтрация)

Таким образом, общее однократное относительно равномерное R \ddot{o} -облучение у крыс в дозе 9,64 Гр вело к прогрессирующим в течение последующих трёх суток некротическим и воспалительным изменениям в эпителии всех отделов тонкой кишки. Наблюдала тенденцию к более выраженному поражению дистального отдела тонкой кишки. Данное воздействие пригодно для экспериментального моделирования лучевого миелоабляционного воздействия и может быть использовано при скрининге медикаментозных средств профилактики её гастроэнтеротоксических эффектов.

3.2 Разработка методов скрининга энтеропротекторов

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

3.2.1 Разработка метода экспресс-оценки желудочно-кишечного стаза

У человека эндотоксемия и (или) раздражение хеморецепторов желудка служит триггером координированной двухэтапной защитной реакции, включающей в себя спазм пилорического сфинктера и рвотный акт. Ввиду отсутствия у крыс рвотного центра [120] эметическая реакция у них не возникает, что способствует накоплению химуса в желудке. Через трое суток после облучения крыс или введения им циклофосфида в миелоабляционных дозах желудок оказывался переполненным даже в тех случаях, когда тотчас после этих воздействий доступ к корму был прекращён. Стаз, хотя и менее выраженный, наблюдался у них также в слепой кишке. У интактных животных на третий день голодания желудок оказывался пустым (рисунок 28).

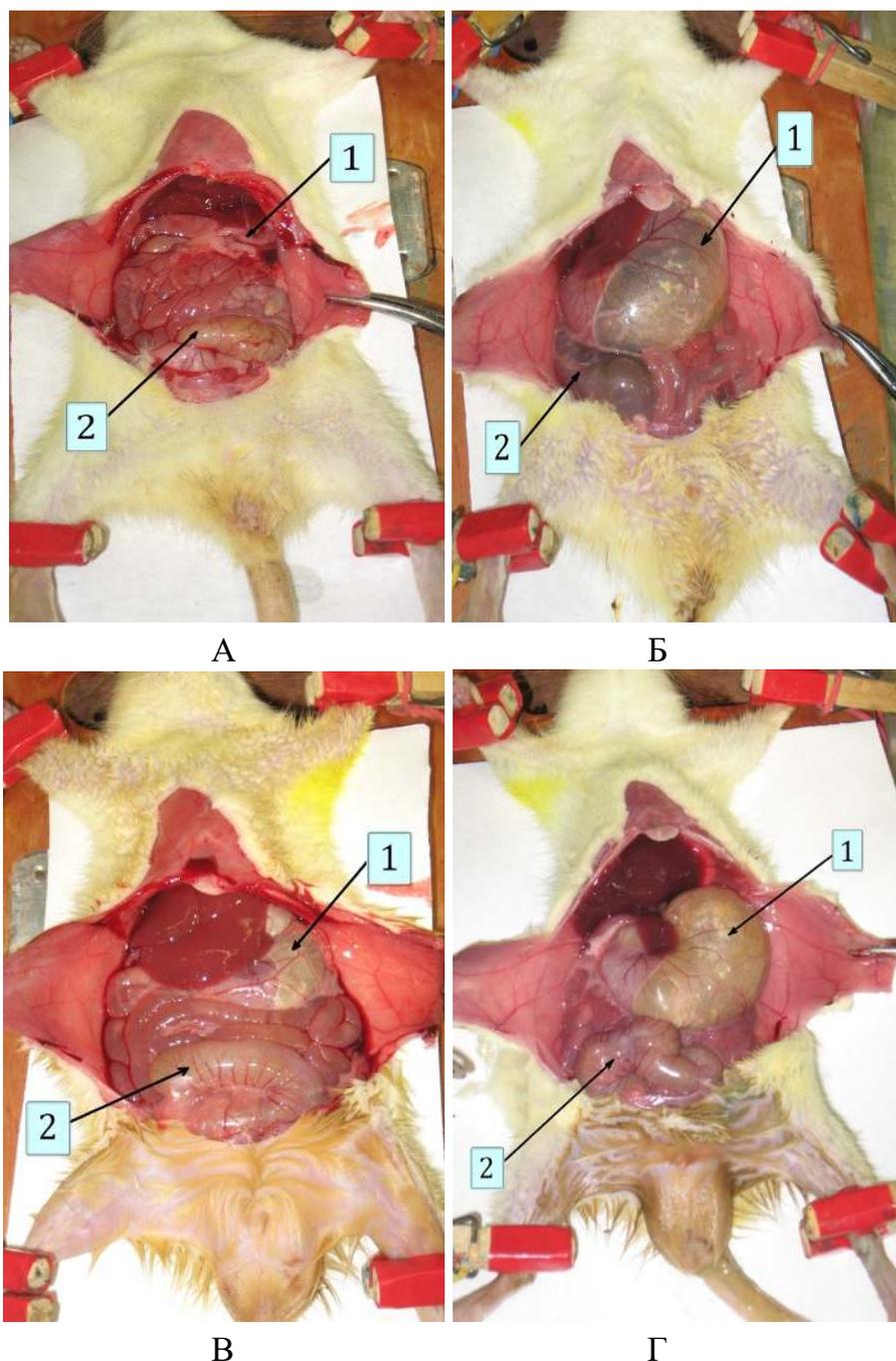


Рисунок 28 — Органы брюшной полости крыс, лишённых доступа к корму за 48 ч до лапаротомии (А, В – интактная, Б – через 72 ч после общего однократного рентгеновского облучения в дозе 9,64 Гр, Г – через 72 ч после в. в. введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг). Стрелками обозначены: 1 – желудок; 2 – слепая кишка

С целью использования описанного выше явления в качестве критерия отбора средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов лучевого миелоабляционного воздействия изучили динамику формирования ЖКС после облучения в дозе 9,64 Гр. Для этого животных распределили в восемь групп, из

которых четыре были представлены особями, лишёнными доступа к корму через 2, 24, 48 или 72 ч после облучения, остальные – лишёнными корма в те же сроки, но не облучёнными, при свободном доступе к воде. В указанные сроки после облучения их поместили на 3 дня в клетки с полом в виде металлической решётки, исключая копрофагию и заглатывание элементов подстилки. Животных не кормили, при неограниченном доступе к воде. Через 72 ч после воздействия крыс наркотизировали, фиксировали в дорсо-вентральном положении и лапаротомировали. Лигатуры накладывали на пищевод ниже диафрагмы и на проксимальную часть *duodenum*. Извлекали и взвешивали желудок с содержимым. Желудок рассекали и удаляли химус. Промывали желудок водой, просушивали с внутренней и наружной сторон фильтровальной бумагой. Пустой желудок взвешивали. Рассчитывали относительную массу желудочного химуса (ОМХ, г/кг) с помощью уравнения (11):

$$\text{ОМХ} = (\text{МЖ}_{\text{полн}} - \text{МЖ}_{\text{пуст}}) : \text{М}, \quad (11)$$

где $\text{МЖ}_{\text{полн}}$ — масса полного желудка, г, $\text{МЖ}_{\text{пуст}}$ — масса пустого желудка, г, М — масса тела крысы, кг.

Корм, съеденный после облучения, задерживался в желудке, поэтому относительная масса желудочного химуса положительно зависела от срока лишения животных корма. Накопление химуса в слепой кишке было более медленным, что вело к увеличению соотношения масс желудочного и слепокишечного химусов в 2-6 раз, в зависимости от продолжительности доступа к корму, в сравнении с соответствующими показателями у необлучённых животных. Все эти изменения начинались не позднее чем через 2 ч после облучения (рисунок 29).

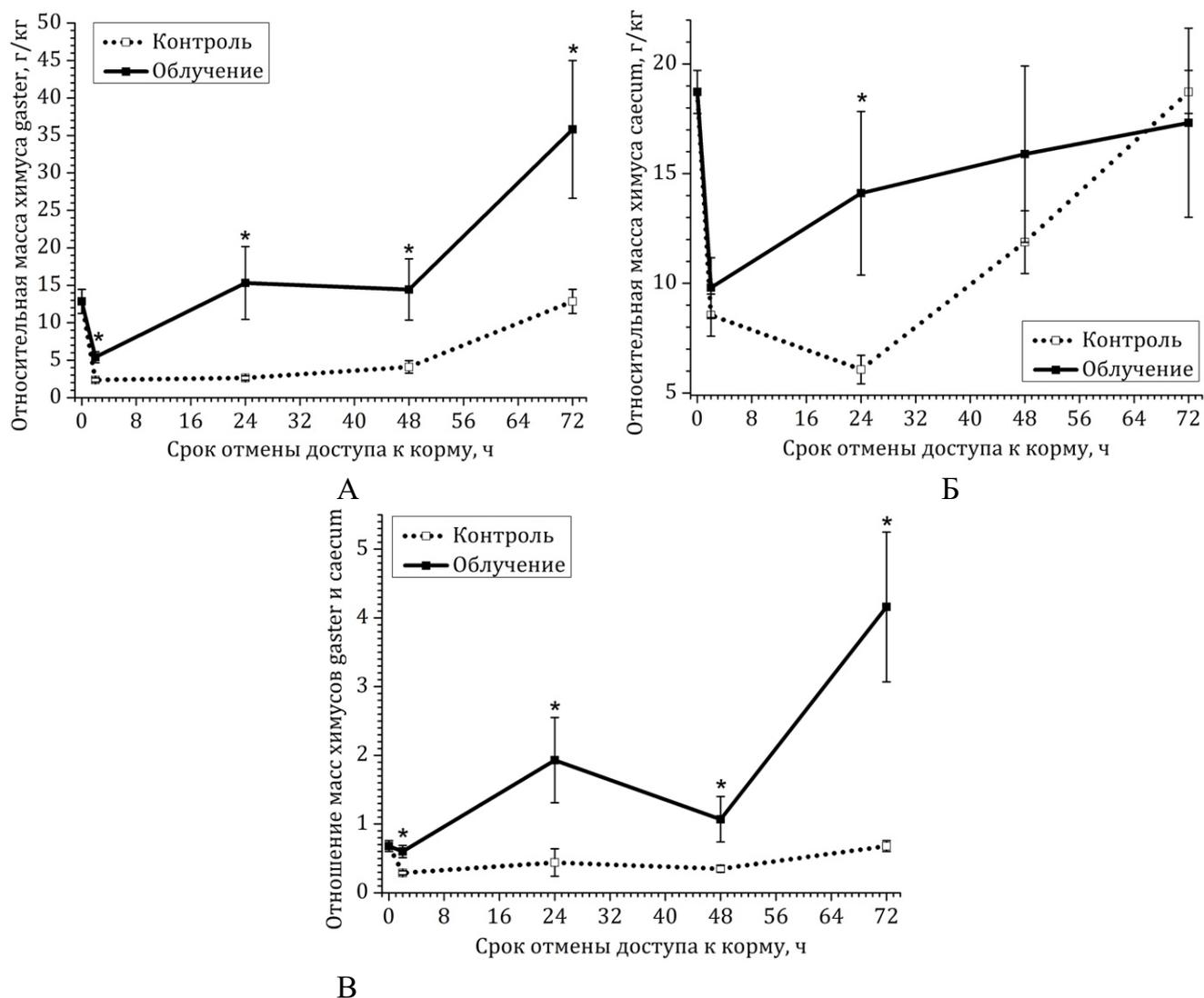


Рисунок 29 — Относительная масса желудочного (А), слепкишечного (Б) химусов и их соотношение (В) у крыс через 72 ч после общего однократного рентгеновского облучения в дозе 9,64 Гр, $M \pm m$, $n = 8$, в зависимости от продолжительности доступа к корму с момента облучения. Контроль — необлучённые животные. В начале оси абсцисс — значения в группе необлучённых крыс, имевших неограниченный доступ к корму.

* — значимое различие с контролем, $p < 0,05$

Количественная оценка ЖКС, наблюдавшегося у крыс после облучения в миелоабляционной дозе показала высокую чувствительность применённых для этого показателей «относительная масса желудочного химуса» и «относительная масса слепкишечного химуса» после трёхдневного голодания. Значение относительной массы желудочного химуса составило у интактных крыс

(контроль) $2,05 \pm 0,24$ г/кг и возрастало на порядок на 3 сут после однократного R \ddot{o} -облучения в дозе 9,64 Гр или в. в. введения циклофосфама в дозе 390 мг/кг. Относительная масса слепкишечного химуса увеличивалась лишь после облучения. Относительная масса желудочного химуса отрицательно коррелировала с массой тела животных, выраженной в процентах от её значения до R \ddot{o} -облучения или введения циклофосфама (рисунок 30).

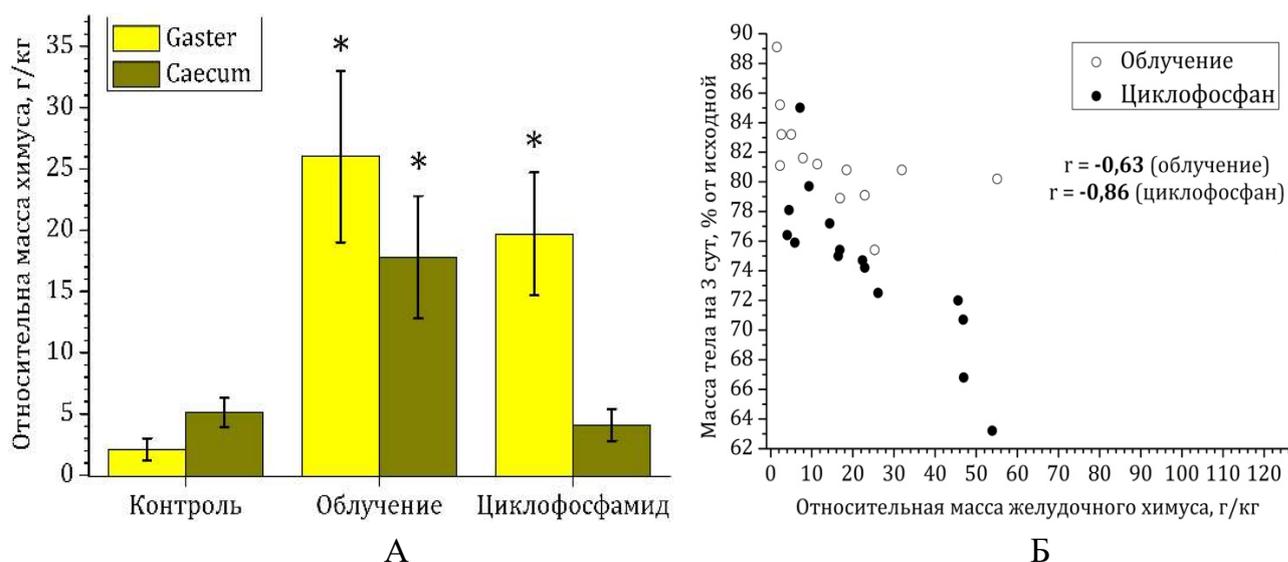


Рисунок 30 — Относительная масса желудочного и слепкишечного химусов (А) и связь относительной массы желудочного химуса с массой тела крыс на 3 сут после миелоабляционных воздействий (Б), $M \pm m$, $n = 13$

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

Учитывая защитную функцию пилороспазма в отношении тонкой кишки, а также дозозависимый характер выраженности гастростаза после R \ddot{o} -облучения живота крыс [80], полученные данные позволяют использовать относительную массу желудочного химуса для экспресс-оценки тяжести повреждения тонкой кишки в качестве косвенного, но высокочувствительного показателя выраженности гастроэнтеротоксических эффектов миелоабляционного воздействия на стадии скрининга потенциальных энтеропротекторов.

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.

3.2.2 Идентификация оптимальных сроков внутрижелудочного введения потенциальных энтеропротекторов с целью их скрининга

Можно предположить, что местное действие энтеропротекторов на слизистую оболочку – необходимое условие селективности их профилактической активности. Чтобы судить о том, имеет ли место контакт раствора, введённого в желудок со слизистой оболочкой того или иного отдела ЖКТ, нужно знать скорость продвижения этого раствора. Ввиду отсутствия в литературе таких сведений, изучили динамику распространения вдоль ЖКТ раствора, введённого крысам в желудок. Для наблюдения за введённым раствором его подкрашивали метиленовым синим. Краситель вводили в желудок в дозе 100 мг/кг в виде 1 % водного раствора в объеме 10 мл/кг. Локализацию раствора красителя, просвечивавшего сквозь полупрозрачные стенки желудочно-кишечного тракта, определяли визуально и выражали с помощью показателя «Средняя заполненность» (С). Для желудка, двенадцатиперстной, слепой и ободочной кишок его рассчитывали как выраженную в процентах долю животных, у которых в соответствующий срок после введения раствора красителя он был замечен в указанных отделах ЖКТ. Для тонкой кишки, исключая двенадцатиперстную, значение С находили из уравнения (12):

$$C = (p_1 + p_2 + \dots + p_n) : n, \quad (12)$$

где С – средняя заполненность, %; p_1, p_2, p_i – выраженная в процентах доля суммарной длины тощей и подвздошной кишок, которую у крыс 1, 2, ..., n, составлял отрезок, заполненный раствором красителя; n – число крыс в группе.

У всех животных раствор красителя наблюдали в желудке через 0,5 ч после введения; тонкая кишка на всю длину заполнялась за 4 ч; к этому времени слепая

кишка оказывалась заполненной не более чем у трети, а проксимальная часть ободочной – не более чем у $\frac{1}{6}$ части крыс (рисунок 31).

Из полученных данных следует, что местное действие вводимых крысам энтеропротекторов на слизистую оболочку желудка обеспечивается не позднее чем через 0,5 ч, а всех отделов тонкой кишки – в течение 4 ч после их в. ж. введения.

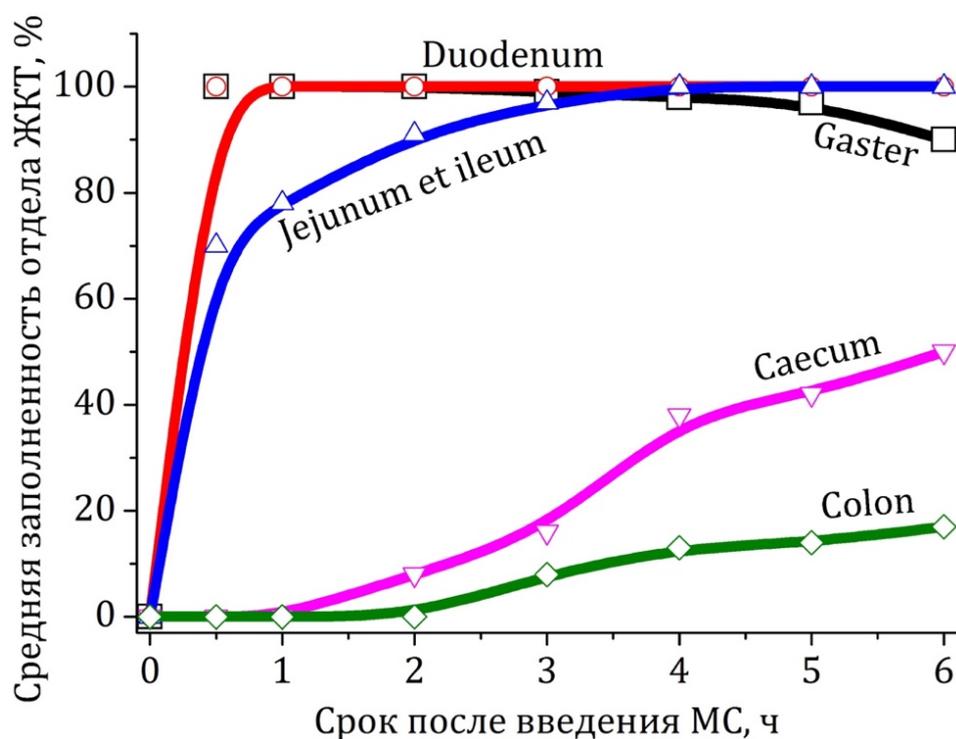


Рисунок 31 — Заполненность желудочно-кишечного тракта крыс 1 % раствором метиленового синего после введения в желудок в объёме 10 мл/кг; усреднённые данные в сроки 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 и 6 ч, по 12 животных на каждый срок

3.2.3 Разработка метода экспресс-оценки выраженности острой кишечной эндотоксемии в целях скрининга энтеропротекторов

В качестве экспресс-метода оценки выраженности острой кишечной эндотоксемии использовали определение суточной экскреции индикана с мочой. Ввиду отсутствия в литературе работоспособного при работе с крысами метода

количественного определения индикана в моче, в рамках настоящего исследования таковой был разработан и описывается ниже.

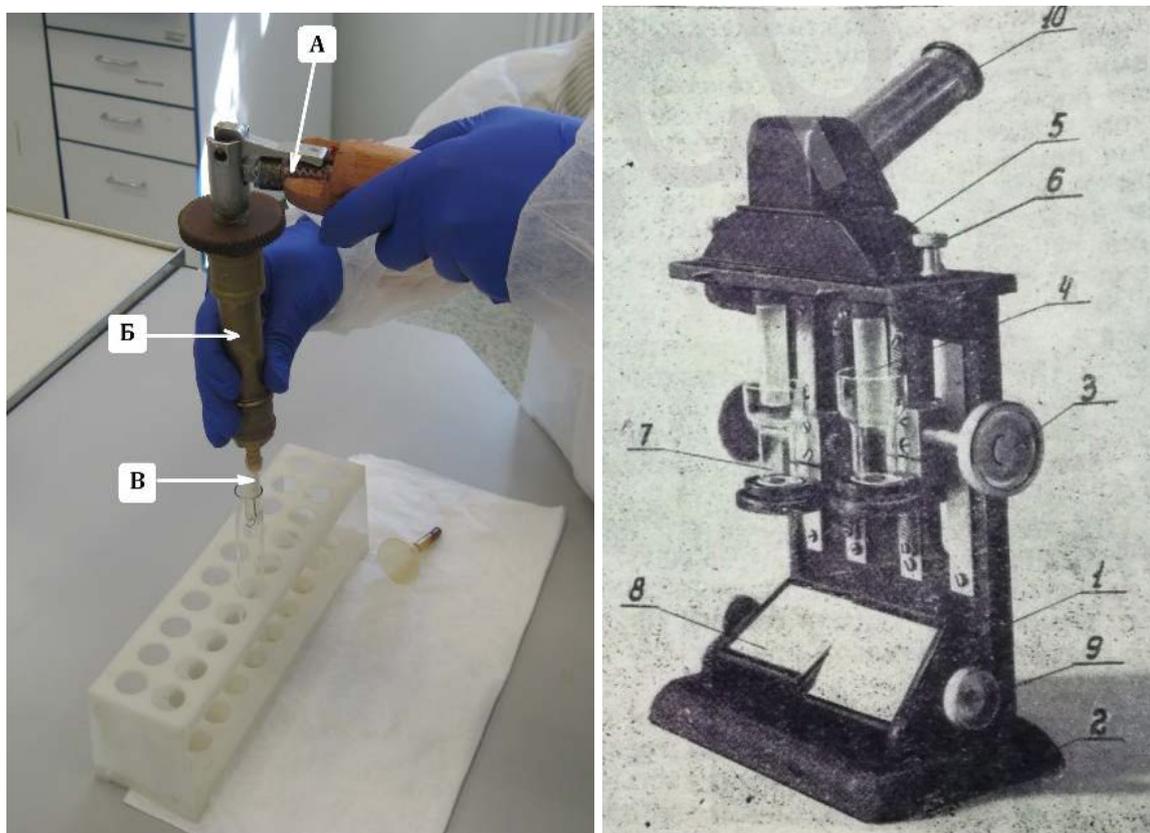
Измерив диурез, мл/(кг · ч), мочу обрабатывали реактивом Обермайера. Через 2 ч образовавшиеся окрашенные продукты окисления индикана – индигорубин и индиготин – экстрагировали хлороформом; после удаления водоструйным насосом водного слоя хлороформные экстракты поочерёдно помещали в специально изготовленный цилиндр высокого давления (рисунок 32, А) и фильтровали под давлением 5 бар через сменные фильтрующие картриджи, содержавшие по 120 мг хлопкового волокна (ГОСТ 5556-81). Концентрацию индикана рассчитывали по концентрации окрашенных продуктов его окисления в хлороформных экстрактах, которую определяли против стандартных растворов с помощью визуального колориметра Дюбоска, тип 831 («Красногвардеец», СССР, 1959 г.), рисунок 32, Б. Экскрецию индикана с мочой выражали в микрограммах на килограмм массы тела в час. Рассчитывали экскрецию индикана с мочой (\mathcal{E} , мкг/кг×ч) из уравнения (13):

$$\mathcal{E} = C \times V : t : M, \quad (13)$$

где C – содержание индикана в 1 мл мочи, V – диурез, мл, t – продолжительность сбора мочи, ч, M – масса тела крысы по извлечению из метаболической камеры, кг. Ошибка измерения определялась ценой деления шкалы колориметра Дюбоска и не превышала 10% измеряемого значения.

Таким образом, разработана модификация метода определения экскреции индикана с мочой, отличающаяся от прототипов возможностью применения в эксперименте на крысах. Экскреция индикана с мочой прямо пропорциональна индолпродуцирующей активности кишечной микрофлоры и массопереносу индола из кишечника в кровь и далее в мочу. После воздействия миелоабляционных агентов создаётся предпосылка к накоплению индикана в крови и ускорению его поступления в мочу по градиенту концентрации: увеличение массы индолпродуцирующих бактерий в ЖКТ. Поэтому экскреция индикана с мочой характеризует уровень индиканемии – частного показателя

кишечной эндотоксемии. В описанной модификации разработанный метод обеспечивает экспресс-оценку влияния потенциальных энтеропротекторов на острую кишечную эндотоксемию, осложняющую миелоабляционное воздействие, и может быть использован в целях их скрининга.



А

Б

Рисунок 32 —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)

3.3 Разработка методов доклинического исследования влияния энтеропротекторов, отобранных в результате скрининга, на проницаемость энтерогематического барьера

Важнейший критерий эффективности энтеропротектора – его способность предотвращать дисфункцию ЭГБ. Прямая оценка этой способности при скрининге энтеропротекторов проблематична и должна выполняться на стадии доклинического исследования эффективности тех из них, которые были отобраны в результате скрининга. Для клинической оценки кишечной проницаемости применяется соотношение экскреции с мочой маннитола и лактулозы после их совместного перорального назначения. Однако неизвестно, не нарушается ли экскреция этих сахаров с мочой в условиях воздействия цитостатических агентов в потенциально нефротоксических миелоабляционных дозах. Кроме того, пероральное введение маркёров кишечной проницаемости не обеспечивает валидности результатов исследования. Поэтому в целях настоящего исследования для экспресс-оценки проницаемости ЭГБ использовано отношение концентраций лактулозы и маннитола не в моче, а в крови из *v. portae*.

После миелоабляционных воздействий поступлению в кровь лактулозы и маннитола после их приёма внутрь может препятствовать гастростаз. Поэтому вторым отличием от описанной в литературе процедуры [207] явилось интрадуоденальное, а не в. ж. введение смеси растворов сахаров. Это позволило нейтрализовать влияние гастростаза на доставку активных маркёров кишечной проницаемости к месту их резорбции: в тонкую кишку. Ниже описано выполнение лактулозо-маннитолового теста с учётом внесённых в него изменений.

Для отбора крови и получения из неё плазмы, крыс наркотизировали, лапаротомировали. *Duodenum* лигировали дистальнее привратника, пересекали и вводили в дистальный отрезок смесь растворов лактулозы и маннитола, в которой конечная концентрация этих сахаров составляла 60 и 40 г/л, соответственно, в

объёме 25 мл/кг массы тела. Зажимы накладывали на тонкую кишку у места пересечения и перед илеоцекальным углом. Через 10 мин пунктировали воротную вену и аспирировали 1-2 мл крови в вакуумные пробирки *Vacurette* вместимостью 5,0-6,0 мл с Na-гепарином. Плазму крови отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 6000 об/мин, замораживали при минус 18 °С и хранили до химического анализа. На рисунке 33 показан момент аспирации крови из *v. portae*. Для наглядности, раствор, использованный для заполнения тонкой кишки, окрашен метиленовым синим. Зажимы «Москит» наложены на *duodenum* дистальнее *pylorus* и на *ileum* проксимальнее илеоцекального сфинктера. Тонкая кишка заполнена окрашенным раствором. *V. portae* пунктирована для отбора пробы крови в шприц, показанный в центре рисунка.

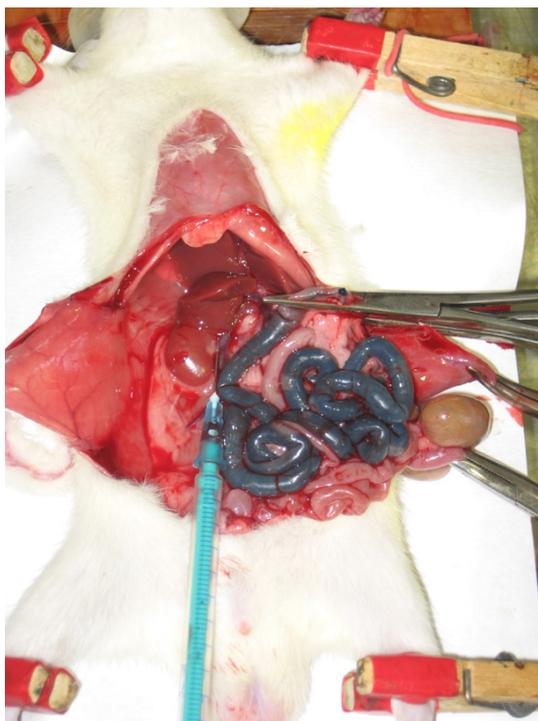


Рисунок 33 —Аспирации крови из *v. portae* крысы

Процедура химического исследования проб крови на содержание лактулозы и маннитола представлена в подразделе 2.7. 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 R \ddot{o} -облучению – представлены в виде тенденции (рисунок 34).

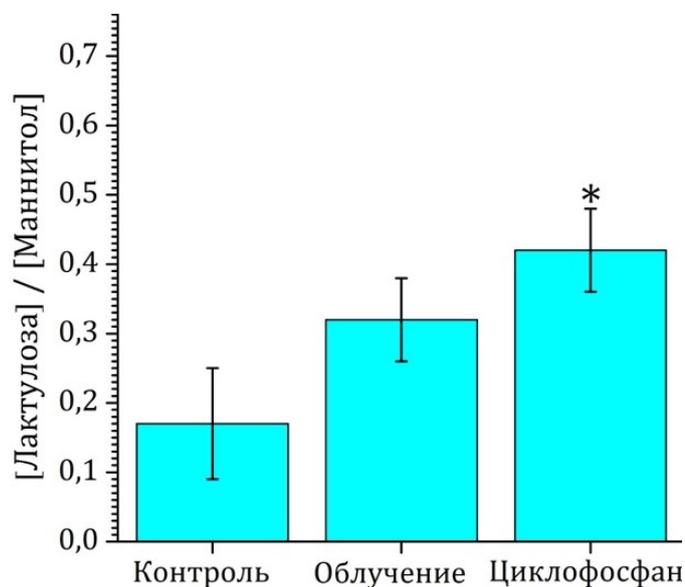


Рисунок 34 — Отношение концентрации лактулозы и маннитола в плазме портальной крови после их интрадуоденального введения крысам через 3 сут после R \ddot{o} -облучения или введения циклофосфамида;

$M \pm m$, $n = 6$.

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

Преимущественное увеличение проницаемости для лактулозы в сравнении с маннитолом специфично для повышения парацеллюлярной проницаемости ЭГБ. В описанной модификации изучение влияния потенциальных энтеропротекторов на проницаемость тонкой кишки может быть использовано на этапе доклинической оценки их эффективности.

Таким образом, выбраны дозы и режимы воздействий для разработки экспериментальных моделей миелоабляционного воздействия. Состояние животных через 3 сут после воздействий с использованием общего однократного относительно равномерного R \ddot{o} -облучения в дозе 9,64 Гр или внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг характеризовалось наличием миелоабляции и панцитопенического синдрома. Это делает разработанные

модели адекватными для скрининга средств профилактики гастроэнтеротоксических эффектов лучевого миелоабляционного воздействия. Разработаны простые, но чувствительные методы экспресс-оценки: (1) желудочно-кишечного стаза по относительным массам химуса; (2) острой кишечной эндотоксемии по экскреции индикана с мочой. Установлены оптимальные сроки профилактического внутрижелудочного введения потенциальных энтеропротекторов крысам: 0,5 ч – для защиты слизистой оболочки желудка и 4 ч – для защиты всех отделов тонкой кишки. Разработан высокоспецифичный метод доклинического исследования влияния отобранных на стадии скрининга энтеропротекторов на проницаемость ЭГБ, предполагающий интрадуоденальное введение животным смеси растворов лактулозы и маннитола с последующим определением этих сахаров в крови из *v. portae*.

ГЛАВА 4 ВЛИЯНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЭНТЕРОПРОТЕКТОРОВ НА ИЗМЕНЕНИЕ ПРОПУЛЬСИВНОЙ ФУНКЦИИ ЖЕЛУДКА И ТОНКОЙ КИШКИ, ВЫЗВАННОЕ МИЕЛОАБЛЯЦИОННЫМИ ВОЗДЕЙСТВИЯМИ

Применение медикаментозных средств, повышающих устойчивость энтероцитов к цитостатическому воздействию, является перспективным подходом к профилактике ЖКС при миелоабляционном кондиционировании. В пункте 1.4.1 обоснованы подходы к экстренной профилактике острой вторичной дисфункции ЭГБ при моделировании миелоабляционного воздействия. Результаты экспериментальной апробации этих подходов представлены ниже.

4.1 Влияние потенциальных энтеропротекторов на пропульсивную функцию желудка и тонкой кишки при воздействии цитостатических лекарственных препаратов

4.1.1 Влияние внутрижелудочного введения гидрокарбоната натрия на пропульсивную функцию желудка и тонкой кишки при моделировании фармакологической миелоабляции

Для моделирования экстренной профилактики острого поражения ЭГБ при фармакологической миелоабляции крысам в желудок вводили 4 % раствор NaHCO_3 ($\text{pH} = 8,34$) в объёме 15 мл/кг за 30 мин до введения циклофосфамида. Двумя другими схемами применения NaHCO_3 были его двух- или четырёхкратное введение: NaHCO_3 за 30 мин до циклофосфамида дополняли повторным введением NaHCO_3 в той же дозе тотчас после циклофосфамида, либо введением NaHCO_3 тотчас после, через 60 и 120 мин после циклофосфамида.

Относительная масса желудочного химуса была у крыс, получивших циклофосфамид, в 7,5 раз больше, чем у интактных. Двукратное введение в желудок NaHCO_3 частично предотвращало ЖКС: относительная масса

желудочного химуса была в среднем в 2,6 раза меньше, чем у незащищённых крыс, хотя и оставалась втрое большей, чем у интактных. Снижение относительной массы слепокишечного химуса было представлено в виде тенденции. Четырёхкратное введение NaHCO_3 было не эффективнее двукратного, а однократное профилактическое введение NaHCO_3 было малоэффективным. Введение NaHCO_3 мало влияло на вызванную ЦФ гипотрофию селезёнки (рисунок 35).

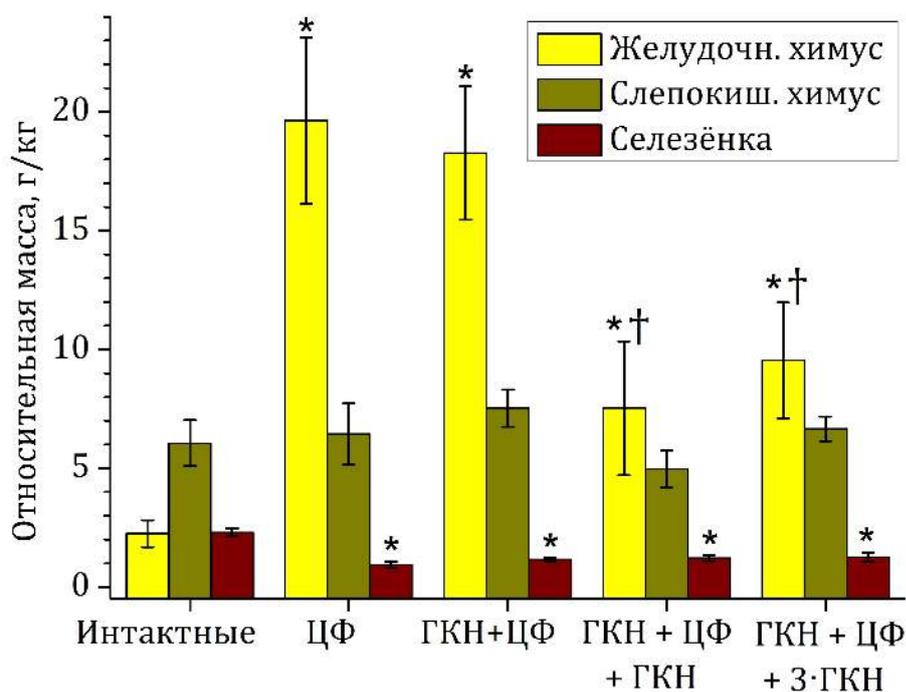


Рисунок 35 — Относительная масса желудочного, слепокишечного химусов и селезёнки у крыс через 72 ч после внутривенного введения циклофосамида в дозе 390 мг/кг, $M \pm m$, $n = 10$

Интактные — крысы, не получавшие медикаментозных средств

ЦФ — получившие только ЦФ;

ГКН+ЦФ — введение 4 % раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до ЦФ;

ГКН+ЦФ+ГКН — введение 4 % раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до и тотчас после ЦФ;

ГКН+ЦФ+3·ГКН — введение 4% раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до, тотчас после, через 1 и 2 ч после ЦФ;

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

† — значимое различие с группами ЦФ и ГКН+ЦФ, $p < 0,05$

У лишённых корма в течение двух суток интактных крыс масса химуса в слепой кишке была вдвое больше, чем в желудке. Цитостатическое воздействие

нарушало это физиологическое соотношение: после введения циклофосфида оно шестикратно возрастало. Введение NaHCO_3 частично предупреждало увеличение соотношения масс желудочного и слепокишечного химусов.

4.1.2 Влияние двукратного профилактического внутрижелудочного введения гидрокарбоната натрия или соляной кислоты на пропульсивную функцию желудка и тонкой кишки при фармакологической миелоабляции

Из представленных в пункте 4.1.1 данных видно, что двукратное введение NaHCO_3 было эффективным. Для проверки гипотезы о противоположном влиянии закисляющего агента на проявления желудочного и слепокишечного стаза, вводили в желудок 4 % раствор NaHCO_3 или 0,3 % раствор HCl в объёме 15 мл/кг за 0,5 ч до и сразу после воздействия циклофосфида.

Относительная масса желудочного химуса у крыс, получивших циклофосфамид, была в 10,5 раз больше, чем у интактных. Введение в желудок NaHCO_3 частично предотвращало гастростаз: относительная масса желудочного химуса была, в среднем, в 1,6 раза меньше, чем у незащищённых крыс, хотя и оставалась в 6,6 раза большей, чем у интактных. Введение в желудок соляной кислоты частично предотвращало гастростаз: относительная масса желудочного химуса была, в среднем, в 2,4 раза меньше, чем у незащищённых крыс, хотя и оставалась в 4,6 раза большей, чем у интактных. Снижение относительной массы слепокишечного химуса было представлено в виде тенденции (рисунок 36).

У интактных крыс масса химуса в желудке была втрое меньше, чем в слепой кишке. После введения циклофосфида это соотношение возрастало в десять раз. Введение NaHCO_3 или HCl частично предупреждало увеличение соотношения масс желудочного и слепокишечного химусов.

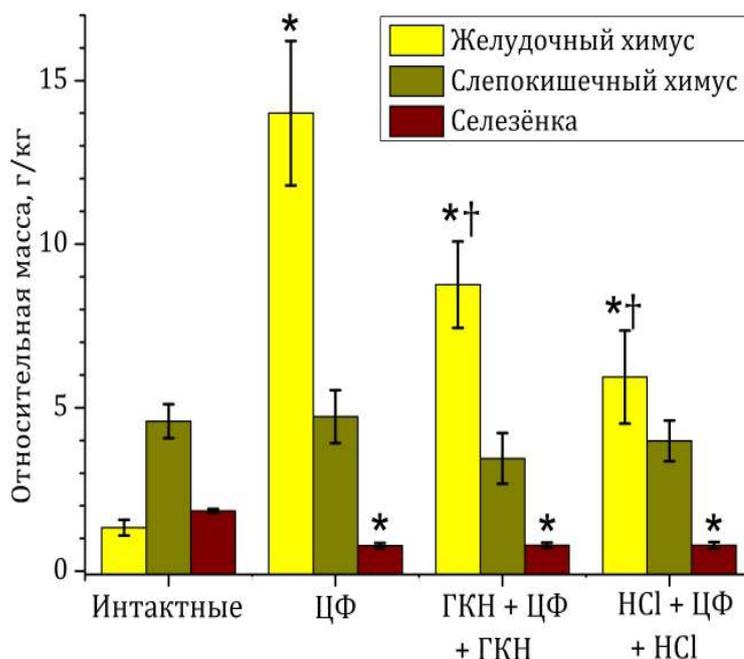


Рисунок 36 — Относительная масса желудочного, слепокишечного химусов и селезёнки у крыс через 72 ч после внутривенного введения циклофосаида в дозе 390 мг/кг, $M \pm m$, $n = 10$

Интактные — крысы, не получавшие медикаментозных средств;

ЦФ — получившие только циклофосаид;

ГКН+ЦФ+ГКН — введение 4% раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до и тотчас после циклофосаида;

НС1 +ЦФ+3 НС1 — введение 0,3% раствора соляной кислоты за 30 мин, до и тотчас после циклофосаида;

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

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

У интактных крыс масса химуса в желудке была втрое меньше, чем в слепой кишке. После введения циклофосаида это соотношение возросло в десять раз. Введение NaHCO_3 или HCl частично предупреждало увеличение соотношения масс желудочного и слепокишечного химусов.

4.2 Влияние потенциальных энтеропротекторов на пропульсивную функцию желудка и тонкой кишки при облучении

4.2.1 Влияние цистамина дигидрохлорида и (или) индралина на пропульсивную функцию желудка и тонкой кишки при облучении

Для моделирования экстренной профилактики гастроэнтеротоксических эффектов лучевого миелоабляционного воздействия крысам вводили в желудок радиопротекторы: цистамина дигидрохлорид в дозах, биоэквивалентных рекомендуемым к применению человеком: 120 мг/кг в объёме 10 мл/кг за 30 мин до начала облучения и (или) индралин в дозе 40 мг/кг в объёме 10 мл/кг за 10 мин до начала облучения.

На третьи сутки после облучения относительная масса желудочного химуса была у облучённых крыс, в среднем, вшестеро больше, чем у интактных. Введение в желудок цистамина дигидрохлорида частично предотвращало гастростаз: относительная масса желудочного химуса была, в среднем, втрое меньше, чем у незащищённых крыс, хотя и проявляла тенденцию к двукратному превышению этого показателя у интактных. Индралин не предотвращал развитие гастростаза и препятствовал профилактическому влиянию цистамина на формирование гастростаза. Относительная масса слепки кишечного химуса после облучения была в 2,3 раза большей, чем у интактных животных; это увеличение не предотвращалось применением радиопротекторов. Введение в желудок радиопротекторов мало влияло на вызванную облучением гипотрофию селезёнки (рисунок 37).

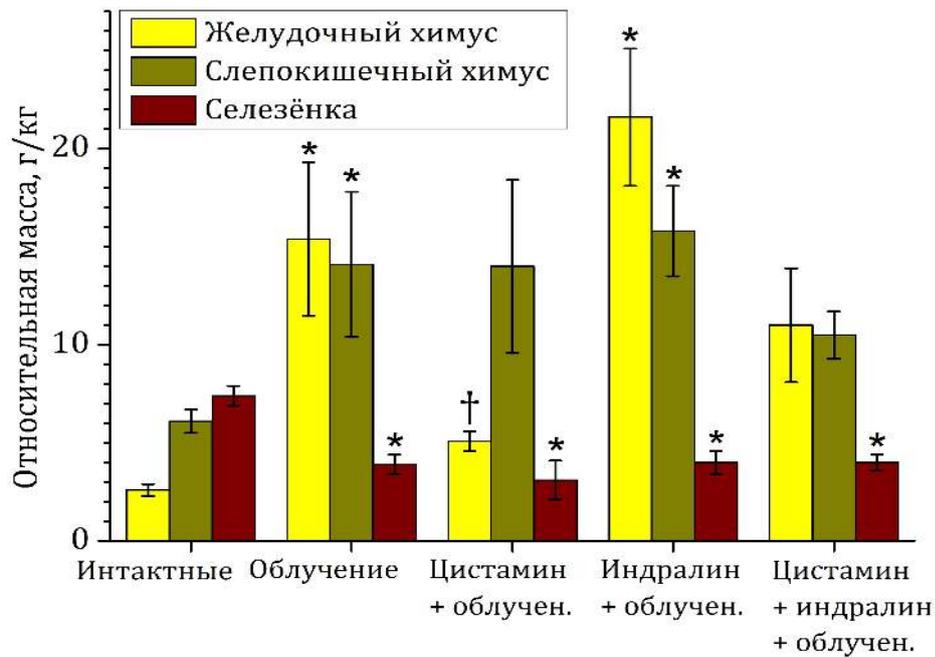


Рисунок 37 — Относительная масса желудочного, слепокишечного химусов и селезёнки у крыс через 72 ч после общего однократного Rö-облучения в дозе 9,64 Гр, $M \pm m$, $n = 8$

Интактные — крысы, не подвергшиеся облучению;

Облучение — Rö-облучение в дозе 9,64 Гр при отсутствии профилактики;

Цистамин + облучен. — введение цистамина дигидрохлорида в дозе 120 мг/кг за 30 мин до начала облучения;

Индралин + облучен. — введение индралина в дозе 40 мг/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;

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

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

4.2.2 Влияние сока подорожника на пропульсивную функцию желудка и тонкой кишки при облучении

В пункте 1.4.2 представлены литературные данные о терапевтической эффективности сока подорожника при моделировании на крысах острой интоксикации циклофосфамидом. Для оценки защитного действия сока подорожника в режиме экстренной профилактики при Rö-облучении животным

вводили втрое разбавленный сок в объеме 15 мл/кг за 3 ч до, сразу после облучения или дважды: за 3 ч до облучения и сразу после.

Относительная масса желудочного химуса была у облученных крыс, в среднем, в 7 раз больше, чем у интактных. Введение в желудок сока подорожника не предотвращало формирование гастростаза. Относительная масса слепокишечного химуса после облучения была в 4 раза большей, чем у интактных животных; это увеличение не предотвращалось применением сока в группах, которым вводили его до облучения или сразу после. В группе с двукратным введением относительная масса слепокишечного химуса была в 2 раза большей, чем в интактной группе, но и 2 раза меньшей, чем в группе с облучением (рисунок 38).

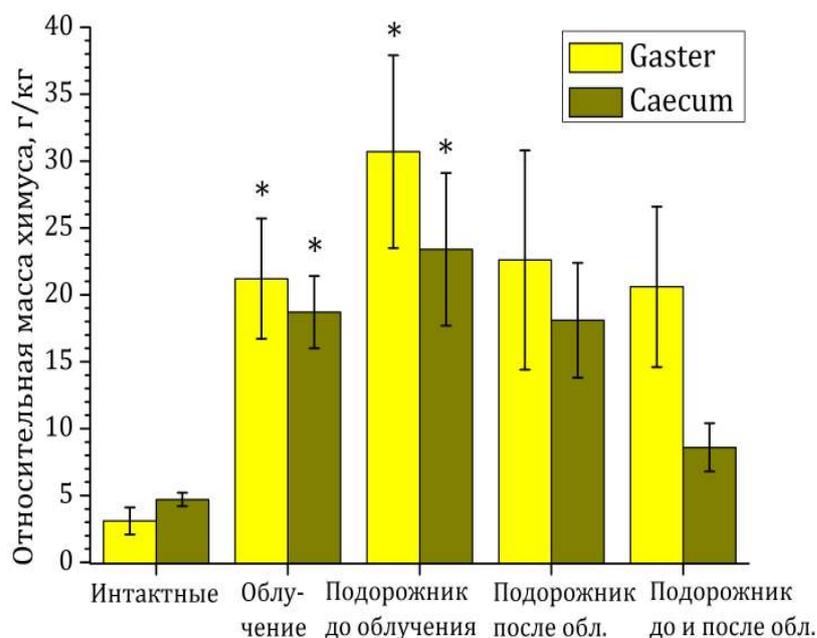


Рисунок 38 — Относительная масса желудочного, слепокишечного химусов у крыс через 72 ч после общего однократного R \ddot{o} -облучения в дозе 9,64 Гр, $M \pm m$, $n = 8$

Интактные — крысы, не подвергшиеся облучению;

Облучение — R \ddot{o} -облучение в дозе 9,64 Гр при отсутствии профилактики;

Сок + облучен. — введение сока втрое разбавленного в объеме 15 мл/кг за 3 ч до начала облучения;

Облучен. + сок — сразу после облучения сок втрое разбавленный в объеме 15 мл/кг;

Сок + облучен. + сок — введение сока втрое разбавленного в объеме 15 мл/кг за 3 ч до начала облучения и сразу после;

* — значимое различие с Интактной группой, $p < 0,05$.

Соотношение значений массы желудочного и слепокишечного химусов после R \ddot{o} -облучения возрастало в 1,7 раза. Применение сока подорожника увеличивало это соотношение в группе, получившей раствор двукратно, в 3,6 раза.

4.2.3 Влияние фитобальзама «Чёрный орех» на пропульсивную функцию желудка и тонкой кишки при облучении

Фитобальзам «Чёрный орех» вводили по схеме, представленной в пункте 4.2.2.

Относительная масса желудочного химуса была у облучённых крыс, в среднем, в 15 раз больше, чем у интактных. Введение в желудок фитобальзама не предотвращало ЖКС, однако в группе, получившей «Чёрный орех» сразу после облучения, была в 10 раз большей, чем у интактных животных. Относительная масса слепокишечного химуса после облучения была в 4,1 раза большей, чем у интактных животных; это увеличение имело тенденцию к снижению на фоне применения радиопротектора (рисунок 39).

Соотношение значений массы желудочного и слепокишечного химусов после R \ddot{o} -облучения возрастало в 3,7 раза. Применение фитобальзама тормозило эти изменения, однако его влияние было представлено лишь в виде тенденции.

Таким образом, по критерию влияния на выраженность гастростаза было эффективным внутрижелудочное введение 4 % раствора гидрокарбоната натрия либо 0,3 % раствора соляной кислоты в объёме 15 мл/кг, введённого за 30 мин до и тотчас после внутривенного введения циклофосфамида. Цистамина дигидрохлорид в дозе 120 мг/кг проявлял профилактическое действие при введении в желудок за 30 мин до облучения. Повышение отношения масс желудочного и слепокишечного химусов частично предотвращалось введением цистамина дигидрохлорида в дозе 120 мг/кг за 30 мин до начала облучения, двукратным введением 0,3 % раствора соляной кислоты или 4 % раствора

гидрокарбоната натрия за 30 мин до, тотчас после циклофосфида. Внутривентрикулярное введение втрое разбавленного сока подорожника в объёме 15 мл/кг после облучения частично предупреждало увеличение соотношения масс желудочного и слепкишечного химусов.

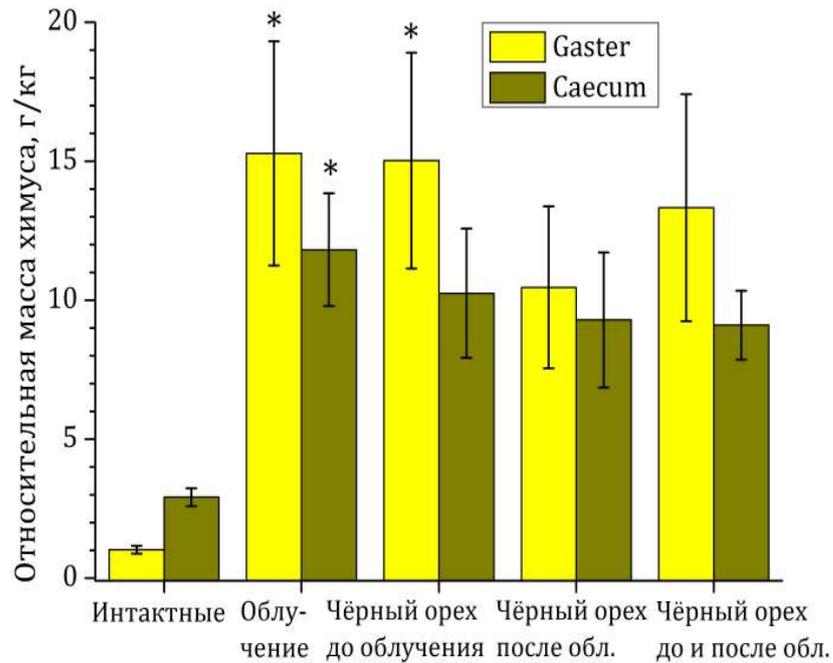


Рисунок 39 — Относительная масса желудочного, слепкишечного химусов у крыс через 72 ч после общего однократного R \ddot{o} -облучения в дозе 9,64 Гр, $M \pm m$, $n = 8$

- Интактные — крысы, не подвергшиеся облучению;
 Облучение — R \ddot{o} -облучение в дозе 9,64 Гр при отсутствии профилактики;
 «Чёрный орех» + облучен. — введение «Чёрного ореха» за 3 ч до начала облучения;
 Облучен. + «Чёрный орех» — «Чёрный орех» сразу после облучения;
 «Чёрный орех» + облучен. + «Чёрный орех»;
 * — значимое различие с Интактной группой, $p < 0,05$.

ГЛАВА 5 ВЛИЯНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЭНТЕРОПРОТЕКТОРОВ НА ПРОЯВЛЕНИЯ ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ ЭНДОТОКСЕМИИ, ВЫЗВАННОЙ МИЕЛОАБЛЯЦИОННЫМИ ВОЗДЕЙСТВИЯМИ

5.1 Влияние потенциальных энтеропротекторов на экскрецию индикана с мочой при воздействии цитостатических лекарственных препаратов

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 NaHCO_3 это превышение было 1,4-кратным, проявляясь лишь в виде тенденции (рисунок 40). У крыс, получивших циклофосфамид, этот показатель обнаруживал сильную отрицательную корреляцию ($r = -0,77$, $p < 0,01$) с массой тела в день лапаротомии, выраженной в процентах от массы тела до воздействия. Экскреция индикана крысами, получившими только циклофосфамид, положительно коррелировала с относительной массой слепокишечного химуса ($r = 0,66$, $p < 0,05$); при введении, кроме циклофосфамида, NaHCO_3 корреляция была слабой ($r = 0,15$).

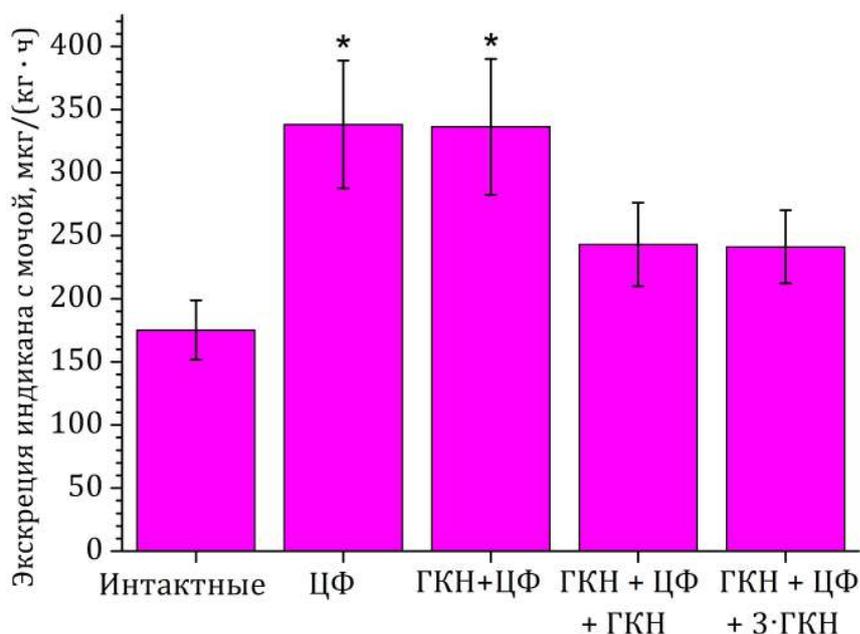


Рисунок 40 — Экскреция индикана с мочой у крыс через 72 ч после внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг, $M \pm m$, $n = 10$

Интактные — крысы, не получавшие медикаментозных средств;

ЦФ — получившие только циклофосфамид;

ГКН+ЦФ — введение 4 % раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до циклофосфамида;

ГКН+ЦФ+ГКН — введение 4 % раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до и тотчас после циклофосфамида;

ГКН+ЦФ+3·ГКН — введение 4 % раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до, тотчас после, через 1 и 2 ч после циклофосфамид;

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

Экскреция индикана с мочой после введения циклофосфамида была в среднем в 1,9 раза выше, чем у интактных крыс; на фоне двукратного введения в желудок NaHCO_3 это превышение было 1,5-кратным, проявляясь лишь в виде тенденции; при введении HCl экскреция индикана была сопоставима с таковой в группе крыс, получивших циклофосфамид (рисунок 41).

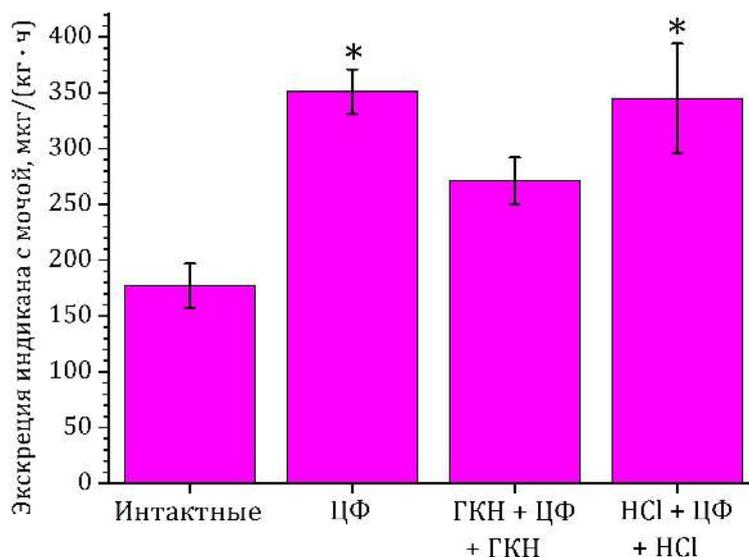


Рисунок 41 — Экскреция индикана с мочой у крыс через 72 ч после внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг, $M \pm m$, $n = 10$

Интактные — крысы, не получавшие медикаментозных средств;

ЦФ — получившие только циклофосфамид;

ГКН+ЦФ+ГКН — введение 4 % раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до и тотчас после циклофосфамида;

НСI +ЦФ+3 НСI — введение 0,3 % раствора соляной кислоты за 30 мин до, тотчас после циклофосфамида;

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

5.2 Влияние потенциальных энтеропротекторов на экскрецию индикана с мочой при моделировании лучевого миелоабляционного воздействия

5.2.1 Влияние радиопротекторов на экскрецию индикана с мочой при моделировании лучевого миелоабляционного воздействия

Экскреция индикана с мочой после изолированного воздействия R α -облучения была, в среднем, в вдвое выше, чем у интактных крыс; радиопротекторы не оказывали существенного влияния на индиканурию (рисунок 42).

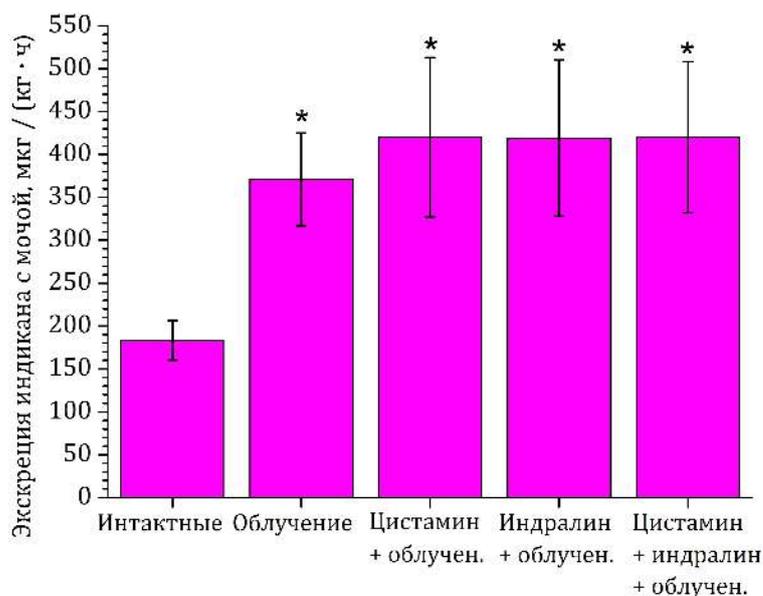


Рисунок 42 — Экскреция индикана с мочой у крыс через 72 ч после общего однократного R \ddot{o} -облучения в дозе 9,64 Гр, $M \pm m$, $n = 8$

Интактные — крысы, не подвергшиеся облучению;

Облучение — R \ddot{o} -облучение в дозе 9,64 Гр при отсутствии профилактики;

Цистамин + облучен. — введение цистамина дигидрохлорида в дозе 120 мг/кг за 30 мин до начала облучения;

Индралин + облучен. — введение индралина в дозе 40 мг/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;

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

5.2.2 Влияние предполагаемых средств купирования гастроэнтеротоксических эффектов лучевого миелоабляционного воздействия на экскрецию индикана с мочой

При оценке эффективности сока подорожника, экскреция индикана с мочой после изолированного воздействия R \ddot{o} -облучения была в среднем в 2,6 раза выше, чем у интактных крыс; при однократном введении сока подорожника за 3 ч до воздействия возрастала в 2,7 раза; при однократном введении сока сразу после R \ddot{o} -облучения возрастала в 5,3 раза; на фоне двукратного введения в желудок сока

подорожника это превышение было 2,4-кратным, проявляясь в виде тенденции (рисунок 43).

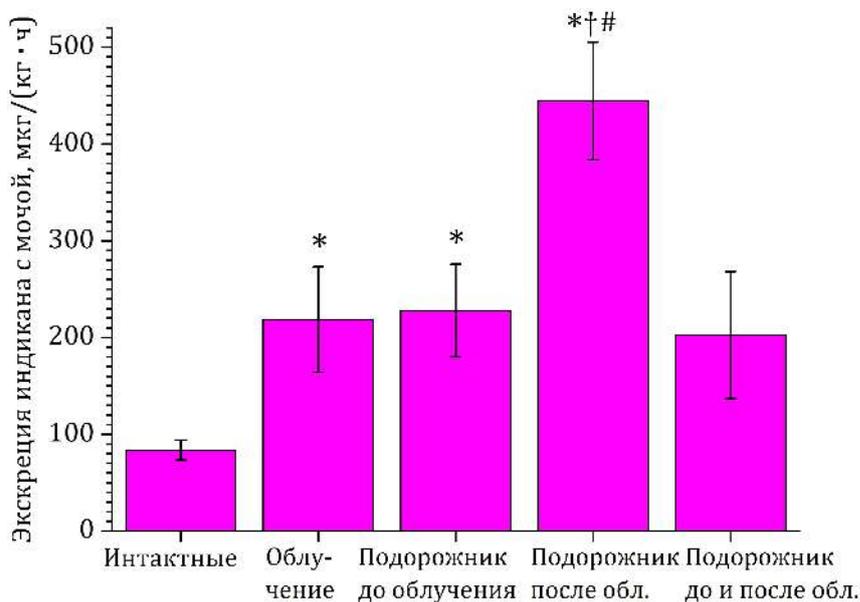


Рисунок 43 — Экскреция индикана с мочой у крыс через 72 ч после общего однократного R \ddot{o} -облучения в дозе 9,64 Гр, $M \pm m$, $n = 8$

Интактные — крысы, не подвергшиеся облучению;

Облучение — R \ddot{o} -облучение в дозе 9,64 Гр при отсутствии профилактики;

Сок + облучен. — введение сока втрое разбавленного в объеме 15 мл/кг за 3 ч до начала облучения;

облучен. + сок — сразу после облучения сок втрое разбавленный в объеме 15 мл/кг;

Сок + облучен. + сок — введение сока втрое разбавленного в объеме 15 мл/кг за 3 ч до начала облучения и сразу после;

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

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

— с группами Облучен. + сок и Сок + облучен. + сок.

При оценке эффективности фитобальзама «Чёрный орех», экскреция индикана с мочой после изолированного воздействия R \ddot{o} -облучения была в среднем в 2,9 раза выше, чем у интактных крыс; при однократном введении за 3 ч до воздействия возрастала в 2,7 раза; при однократном введении фитобальзама сразу после R \ddot{o} -облучения возрастала в 3,5 раза; на фоне двукратного введения в желудок фитобальзама «Чёрного ореха» это превышение было 2,4-кратным, проявляясь в виде тенденции (рисунок 44).

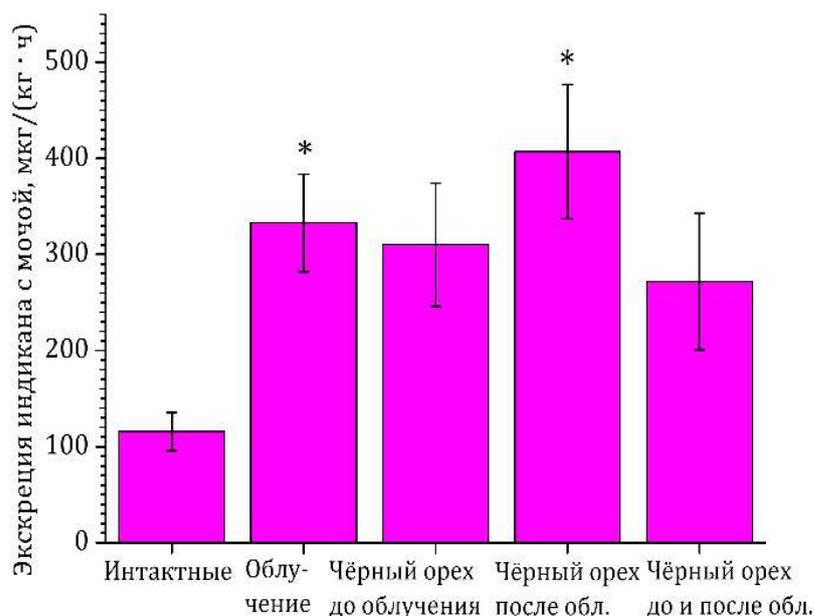


Рисунок 44 — Экскреция индикана с мочой у крыс через 72 ч после общего однократного R \ddot{o} -облучения в дозе 9,64 Гр, $M \pm m$, $n = 8$

Интактные — крысы, не подвергшиеся облучению;

Облучение — R \ddot{o} -облучение в дозе 9,64 Гр при отсутствии профилактики; «Чёрный орех» + облучен. — введение «Чёрного ореха» за 3 ч до начала облучения;

облучен. + «Чёрный орех» — сразу после облучения «Чёрный орех»; «Чёрный орех» + облучен. + «Чёрный орех»;

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

5.3 Влияние потенциальных энтеропротекторов на биохимические показатели крови при воздействии миелоабляционных агентов

5.3.1 Влияние двукратного профилактического внутрижелудочного введения гидрокарбоната натрия или соляной кислоты на содержание эндотоксина в крови при моделировании фармакологической миелоабляции

Содержание эндотоксина в крови, отобранной из воротной вены, у крыс на третьей сутки после введения циклофосфамида было в 4 раза выше, чем у интактных. Двукратное введение NaHCO_3 или HCl не изменило содержания эндотоксина относительно группы с изолированным введением циклофосфамида, и было в 4,5 раза выше, чем у интактных (рисунок 45).

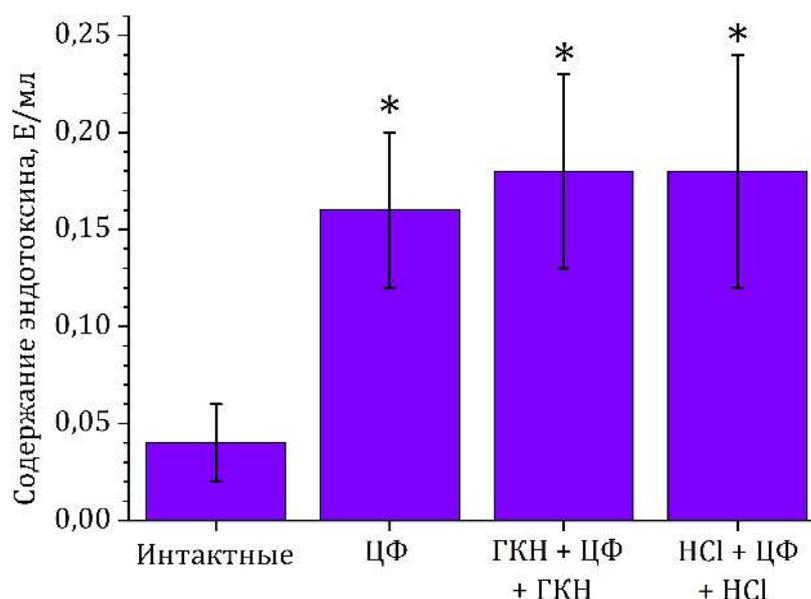


Рисунок 45 — Содержание эндотоксина в плазме портальной крови у крыс через 72 ч после внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг, $M \pm m$, $n = 10$

Интактные — крысы, не получавшие медикаментозных средств;

ЦФ — получившие только циклофосфамид;

ГКН+ЦФ+ГКН — введение 4 % раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до и тотчас после циклофосфамида;

НСІ +ЦФ+3 НСІ — введение 0,3 % раствора соляной кислоты за 30 мин до, тотчас после циклофосфамида;

- — значимое различие с интактной группой, $p < 0,05$.

5.3.2 Влияние цистамина дигидрохлорида и (или) индралина на содержание мочевины в крови при облучении

Содержание продукта обезвреживания аммиака, мочевины, в крови, отобранной из воротной вены у крыс на третьи сутки после облучения, было в 1,5 раза выше, чем у интактных. На фоне применения цистамина или его сочетания с индралином этот показатель нормализовался, а применение индралина не оказывало на него существенного влияния (рисунок 46).

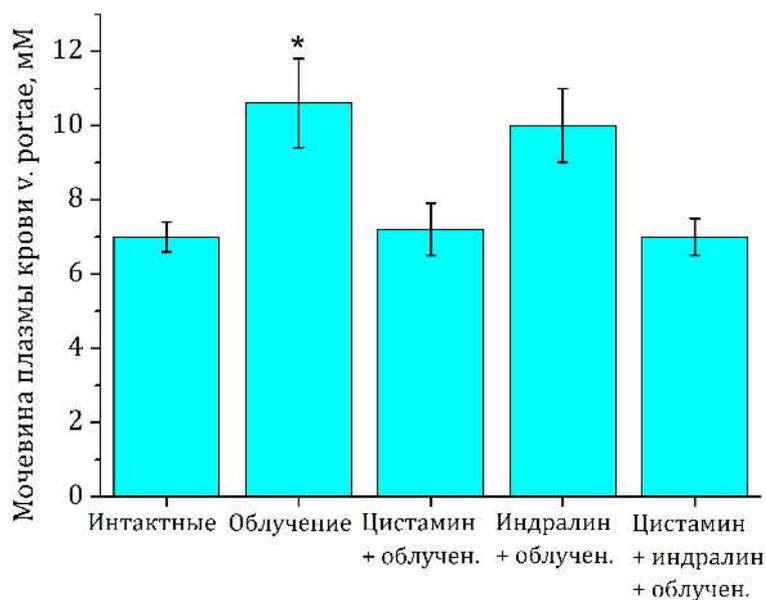


Рисунок 46 — Содержание мочевины в крови, отобранной из *v. portae* у крыс через 72 ч после общего однократного R \ddot{o} -облучения в дозе 9,64 Гр, $M \pm m$, $n = 8$

Интактные — крысы, не подвергшиеся облучению;

Облучение — R \ddot{o} -облучение в дозе 9,64 Гр при отсутствии профилактики;

Цистамин + облучен. — введение цистамина дигидрохлорида в дозе 120 мг/кг за 30 мин до начала облучения;

Индралин + облучен. — введение индралина в дозе 40 мг/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;

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

Таким образом, по критерию влияния на проявления острой кишечной эндотоксемии эффективен NaHCO $_3$ в дозе, эквивалентной 350 мл его 4 % раствора для человека, введённый за 30 мин до и тотчас после внутривенного введения циклофосфамида, а при облучении — цистамина дигидрохлорид в дозе 120 мг/кг за 30 мин до воздействия.

ГЛАВА 6 ВЛИЯНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЭНТЕРОПРОТЕКТОРОВ НА СОСТОЯНИЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА И ТОНКОЙ КИШКИ ПОСЛЕ МИЕЛОАБЛЯЦИОННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

6.1 Влияние потенциальных энтеропротекторов на состояние слизистой оболочки желудка и тонкой кишки при воздействии цитостатических лекарственных препаратов

6.1.1 Влияние гидрокарбоната натрия на морфометрические показатели повреждения тонкой кишки после внутривенного введения циклофосфида

Через 3 сут после введения циклофосфида 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 циклофосфида вводили двукратно NaHCO_3 , эти изменения не наблюдали (таблица 6; рисунок 47).

Таблица 6 — Морфологические проявления острого тонкокишечного цитостатического мукозита у крыс через 72 ч после внутривенного введения циклофосфида в дозе 390 мг/кг

Экспериментальная группа	Среднее число ворсинок, $M \pm m$	Средняя длина ворсинки, $M \pm m$, мкм	Основной качественный признак
1	2	3	4
<i>Duodenum</i>			
Интактные	$39,0 \pm 2,9$	366 ± 8	Нет
ЦФ	$34,5 \pm 3,7$	$294 \pm 9^*$	Полнокровие
$\text{NaHCO}_3 + \text{ЦФ} + \text{NaHCO}_3$	$40,1 \pm 2,0$	$355 \pm 10^\dagger$	Нет
<i>Jejunum</i>			
Интактные	$31,5 \pm 2,4$	305 ± 7	Нет
ЦФ	$27,0 \pm 3,6$	$208 \pm 8^*$	Воспаление
$\text{NaHCO}_3 + \text{ЦФ} + \text{NaHCO}_3$	$35,0 \pm 3,9$	$292 \pm 5^\dagger$	Нет
<i>Ileum</i>			
Интактные	$36,2 \pm 2,5$	230 ± 6	Нет

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4
ЦФ	Ворсинки отсутствуют		Атрофия
NaHCO ₃ + ЦФ + NaHCO ₃	43,0 ± 2,5	239 ± 5	Нет
Примечания: 1 Интактные — Крысы, не получавшие медикаментозных средств 2 ЦФ — Получившие только циклофосфамид 3 NaHCO ₃ + ЦФ + NaHCO ₃ — Введение в желудок 4 % раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до и тотчас после циклофосфамида 4 * — Значимое различие с интактной группой, p < 0,05 5 † — Значимое различие с группой ЦФ, p < 0,05			

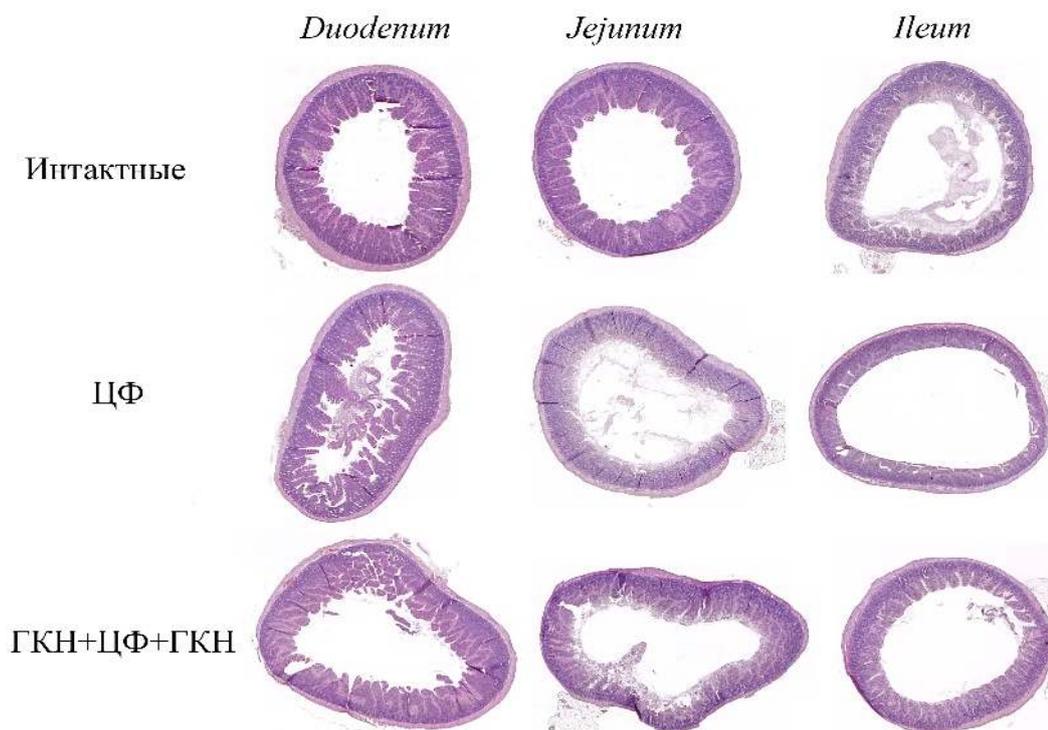


Рисунок 47 — Кольцевые срезы *duodenum*, *jejunum* и *ileum* у крыс через 72 ч после внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение × 50.

Интактные — крысы, не получившие медикаментозных средств. Во всех отделах тонкой кишки слизистая оболочка представлена высокими ворсинками, равномерно расположенными по всему периметру кишки и покрытыми эпителием;

ЦФ — крысы, получившие только циклофосфамид. В просвете *duodenum* свободно лежащие ворсинки и клетки кишечного эпителия, ворсинки сохранены.

В *ileum* слизистая оболочка истончена, ворсинки практически отсутствуют;

Группа ГКН + ЦФ + ГКН — крысы, которым введён в желудок 4 % раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до и тотчас после циклофосфамида. Во всех отделах тонкой кишки слизистая оболочка сохранена, ворсинки высокие, не везде равномерно распределены по периметру

6.1.2 Влияние введения гидрокарбоната натрия или соляной кислоты на биохимические показатели повреждения тонкой кишки после внутривенного введения циклофосфида

Активность ЩФ, находящейся в щёточной кайме, снижалась во всей тонкой кишке, а активность АХЭ – только в *jejunum* и *ileum*. Двукратное введение NaHCO_3 судя по ЩФ, оказало защитное действие на *duodenum*, а HCl – нет. АХЭ ни на NaHCO_3 , ни на HCl внятно не отреагировала (рисунок 48).

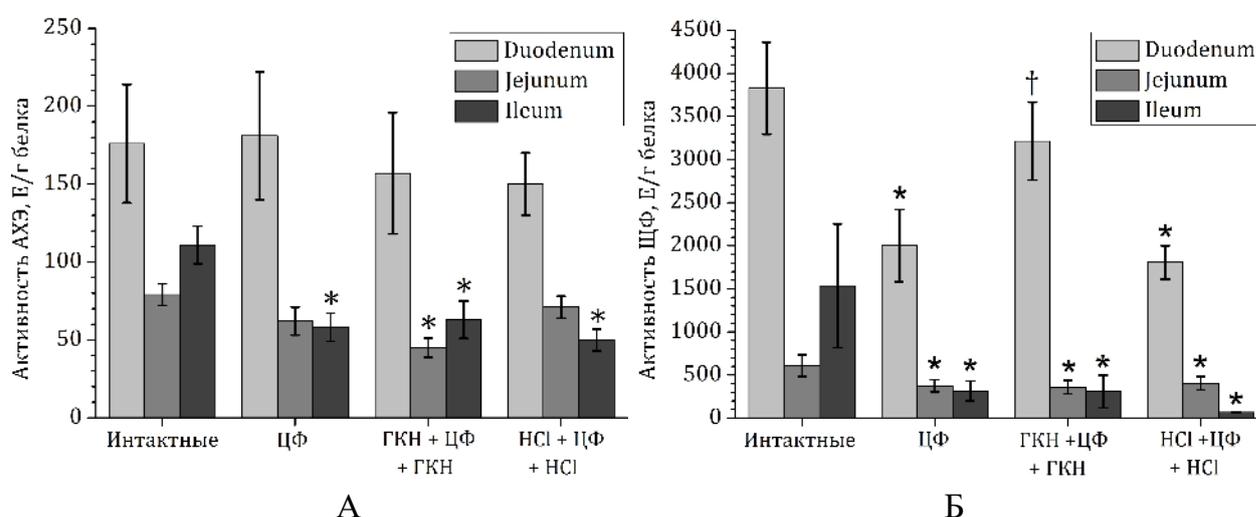


Рисунок 48 — Активность ацетилхолинэстеразы (А) и щелочной фосфатазы (Б) тканей тонкой кишки крыс через 72 ч после внутривенного введения циклофосфида в дозе 390 мг/кг, $M \pm m, n = 10$
 Интактные — крысы, не получавшие медикаментозных средств;
 ЦФ — получившие только циклофосфамид;
 ГКН+ЦФ+ГКН — введение 4 % раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до и тотчас после циклофосфида;
 НСІ +ЦФ+3 НСІ — введение 0,3 % раствора соляной кислоты за 30 мин до, тотчас после циклофосфида;
 * — значимое различие с интактной группой, $p < 0,05$;
 † — значимое различие с группой циклофосфамид, $p < 0,05$.

6.2 Влияние потенциальных энтеропротекторов на состояние слизистой оболочки желудка и тонкой кишки при облучении

6.2.1 Влияние цистамина дигидрохлорида и (или) индралина на биохимические показатели повреждения тонкой кишки при облучении

Облучение существенно снижало активность маркёров плазматической мембраны энтероцитов – АХЭ и ЩФ в тканях тонкой кишки крыс. Наиболее существенно, в 4,8 раза, снижалась активность АХЭ в подвздошной кишке. При профилактическом введении цистамина во всех отделах тонкой кишки была заметна тенденция к увеличению активности АХЭ, в сравнении с незащищёнными животными. Введение индралина не проявляло защитного действия и препятствовало таковому при совместном с цистамином введении (рисунок 49).

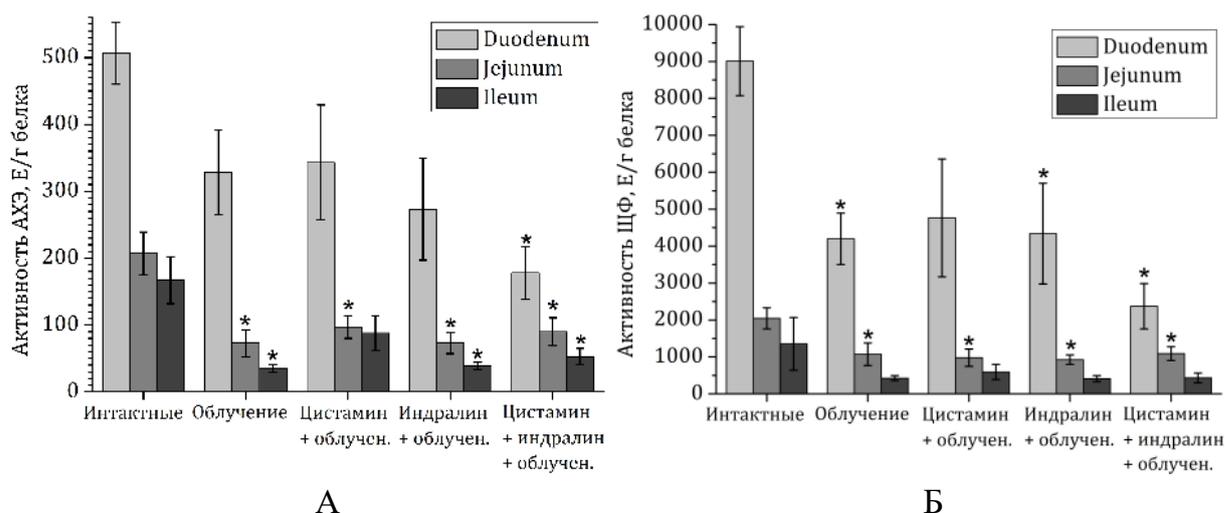


Рисунок 49 — Активность ацетилхолинэстеразы (А) и щелочной фосфатазы (Б) тканей тонкой кишки крыс через 72 ч после общего однократного R \ddot{o} -облучения в дозе 9,64 Гр, $M \pm m$, $n = 8$

Интakтные — крысы, не подвергшиеся облучению;

Облучение — R \ddot{o} -облучение в дозе 9,64 Гр при отсутствии профилактики;

Цистамин + облучен. — введение цистамина дигидрохлорида в дозе 120 мг/кг за 30 мин до начала облучения;

Индралин + облучен. — введение индралина в дозе 40 мг/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;

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

Таким образом, по критерию влияния на состояние слизистой оболочки желудка и тонкой кишки эффективен NaHCO_3 в дозе, эквивалентной 350 мл его 4 % раствора для человека, введённый за 30 мин до и тотчас после внутривенного введения циклофосфида, а при облучении – цистамина дигидрохлорид в дозе 120 мг/кг за 30 мин до воздействия.

ГЛАВА 7 ВЛИЯНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЭНТЕРОПРОТЕКТОРОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНИЗМА ПОСЛЕ МИЕЛОАБЛЯЦИОННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

7.1 Влияние потенциальных энтеропротекторов на функциональное состояние организма после воздействия цитостатических лекарственных препаратов

7.1.1 Влияние гидрокарбоната натрия на функции дожития и динамику массы тела после введения циклофосфида

Первые случаи гибели после введения циклофосфида отмечены через 1 сут в группе незащищённых крыс и через 3 сут – в группе получивших NaHCO_3 . Различие функций дожития между этими группами было значимым ($p < 0,01$). Продолжительность жизни крыс, получивших NaHCO_3 , превышала таковую у незащищённых животных лишь в ближайшие 5 сут после введения циклофосфида. В последующем графики дожития защищённых и незащищённых животных совпадали. В обеих группах продолжительность жизни не превышала 9 сут с момента введения циклофосфида (рисунок 50, А). Значения СПЖ составили $3,9 \pm 0,8$ сут без защиты и $6,0 \pm 0,6$ сут в случае введения NaHCO_3 (межгрупповое различие представлено в виде тенденции). Все получившие циклофосфамид крысы теряли массу тела: незащищённые – с первого, а получившие NaHCO_3 – со второго дня, в то время как у интактных животных привесы оставались положительными (рисунок 50, Б).

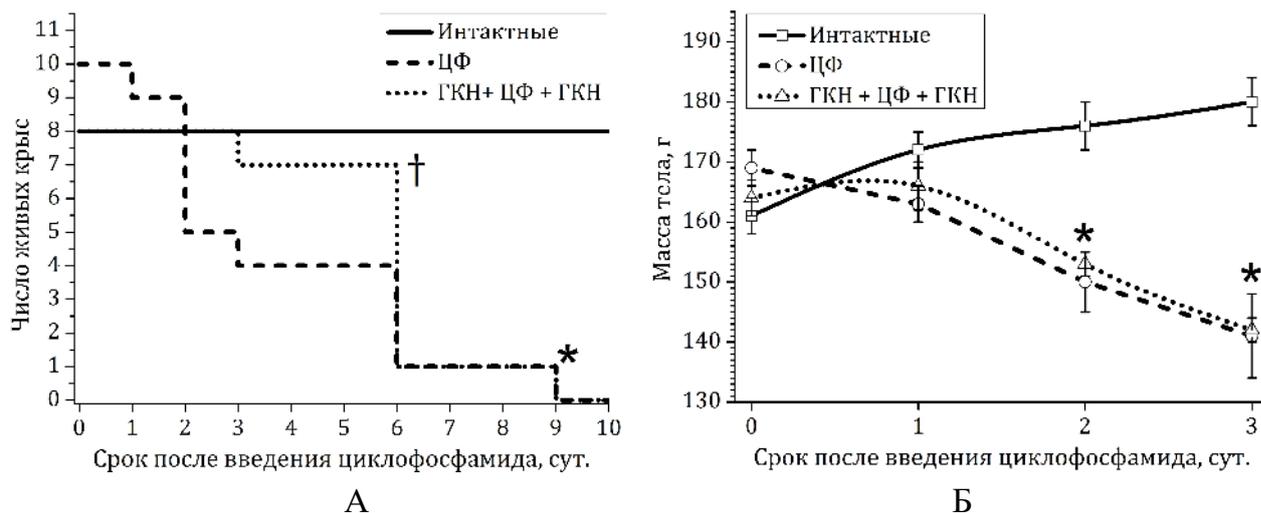


Рисунок 50 — Динамика летальных исходов (А) и массы тела крыс (В) после внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг

Интактные — крысы, не получавшие медикаментозных средств;

ЦФ — получившие только циклофосфамид;

ГКН+ЦФ+ГКН — введение 4 % раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до и тотчас после ЦФ;

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

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

7.1.2 Влияние гидрокарбоната натрия на газообмен и внешнее дыхание крыс после введения циклофосфамида

В течение 2 сут после введения циклофосфамида 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 NaHCO_3 , эти показатели газообмена были значимо снижены лишь через 4 ч после введения циклофосфамида. Межгрупповые различия значений ЧДД были статистически несущественными. Двукратное введение гидрокарбоната натрия предупреждало угнетение газообмена (рисунок 51).

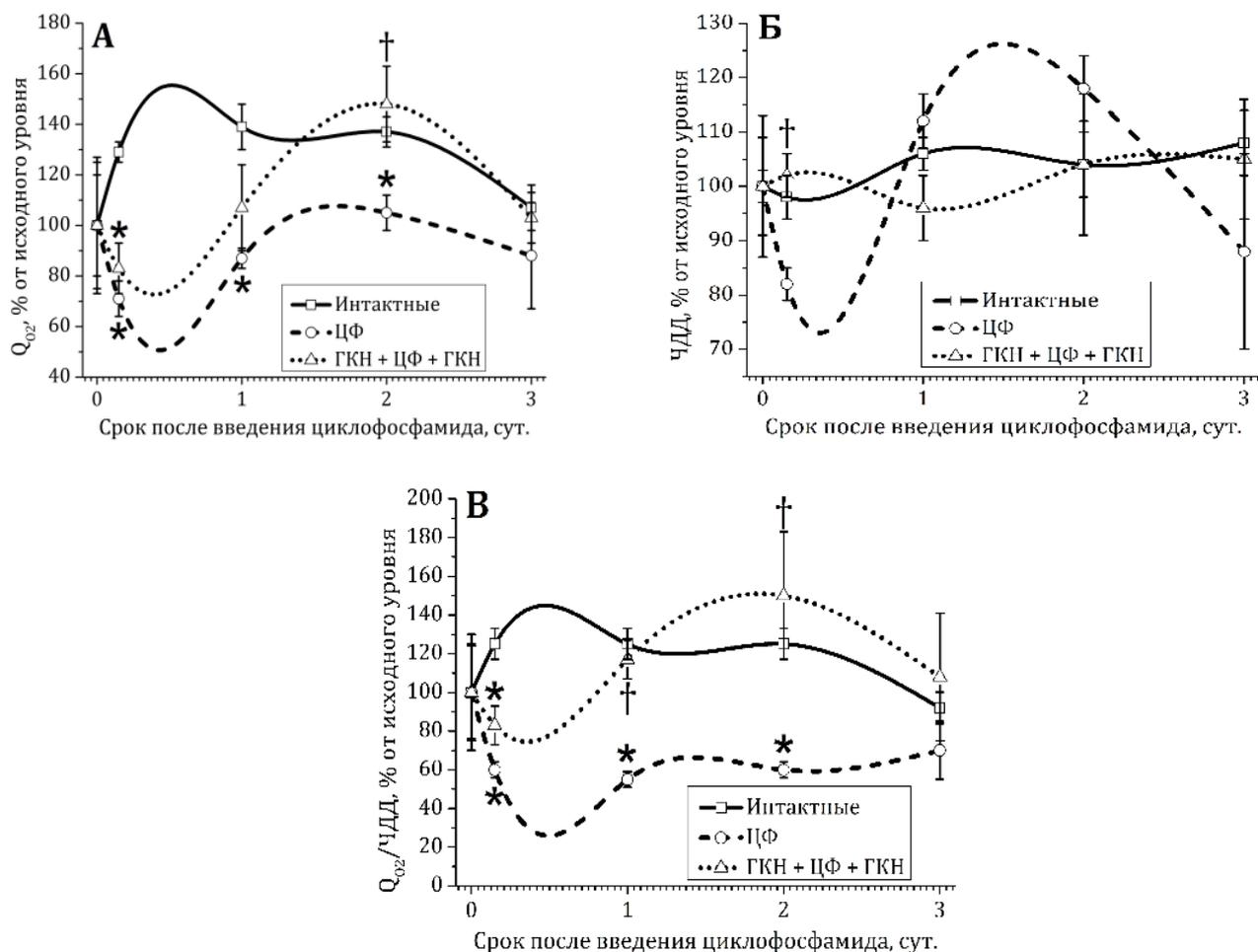


Рисунок 51 — Потребление кислорода организмом (А), частота дыхательных движений (Б) и потребление кислорода в среднем за один дыхательный цикл (В) после внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг, $M \pm m$, $n = 8$ для ближайших двух сут и $n = 4$ для 3 сут

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

ЧДД — частота дыхательных движений, мин^{-1} ;

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

Интактные — крысы, не получавшие медикаментозных средств;

ЦФ — получившие только циклофосфамид;

ГКН+ЦФ+ГКН — введение 4 % раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до и тотчас после ЦФ;

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

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

7.1.3 Влияние гидрокарбоната натрия на спонтанную двигательную активность после введения циклофосфамида

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 NaHCO_3 показатели СДА были выше, чем без защиты – на 3 сут после введения циклофосфамида значимо (рисунок 52, А и Б). Получившие циклофосфамид крысы меньше ухаживали за шерстным покровом; на фоне применения NaHCO_3 эта тенденция отсутствовала (рисунок 52, В). У всех крыс, получивших циклофосфамид, наблюдалась тенденция к снижению числа актов дефекации (рисунок 52, Г).

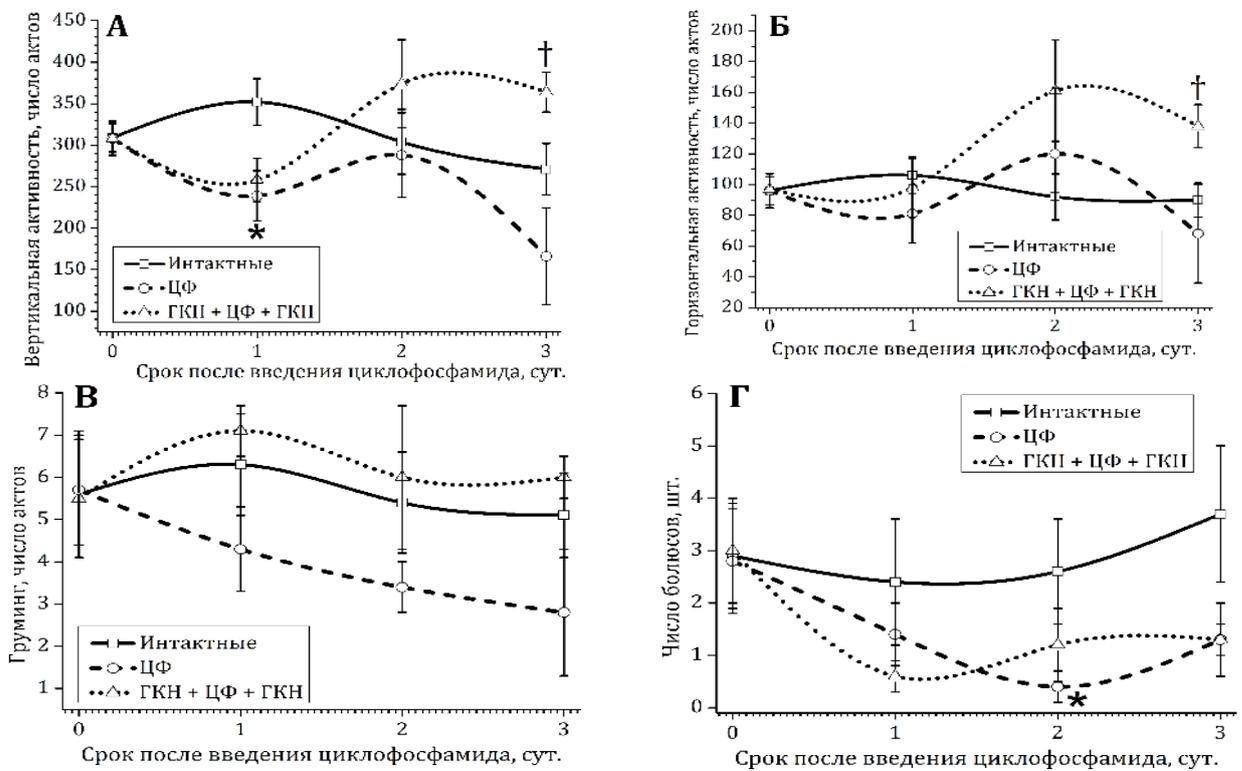


Рисунок 52 —Вертикальная (А), горизонтальная (Б) двигательная активность, активность по уходу за шерстным покровом (В) и число болюсов (Г) у крыс после внутривенного введения циклофосфамида в дозе 390 мг/кг, $M \pm m$, $n = 8$ для ближайших двух сут и $n = 4$ для 3 сут

Интактные — крысы, не получавшие медикаментозных средств;

ЦФ — получившие только циклофосфамид;

ГКН+ЦФ+ГКН — введение 4 % раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до и тотчас после ЦФ;

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

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

Таким образом, введение крысам в желудок 4 % раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до и тотчас после введения циклофосфамида проявляло энтеропротективное действие: (1) увеличивало среднюю продолжительность жизни в ближайшие 5 сут после введения циклофосфамида; (2) отсрочивало начало потери массы тела; (3) предупреждало угнетение газообмена; (4) предупреждало поведенческие нарушения.

7.2 Влияние потенциальных энтеропротекторов на функциональное состояние организма после облучения

7.2.1 Влияние цистамина дигидрохлорида на функции дожития и динамику массы тела после облучения

Ни в одной из облучённых групп случаи гибели в результате кишечного синдрома не отмечались (рисунок 53, А). Первый случай гибели после облучения отмечен через 6 сут в группе незащищённых животных и через 10 сут – в группе получавших цистамин. Различие функций дожития между этими группами было значимым ($p < 0,01$). Средняя ожидаемая продолжительность жизни крыс в момент облучения составила в случае введения цистамина $16,8 \pm 3,3$ сут, что значимо превышало таковую у незащищённых животных: $9,1 \pm 1,1$ сут ($M \pm m$, $p < 0,05$). Все облучённые крысы теряли массу тела: незащищённые – со второго, а получившие цистамин – с третьего дня, в то время как у интактных животных привесы оставались положительными (рисунок 53, Б).

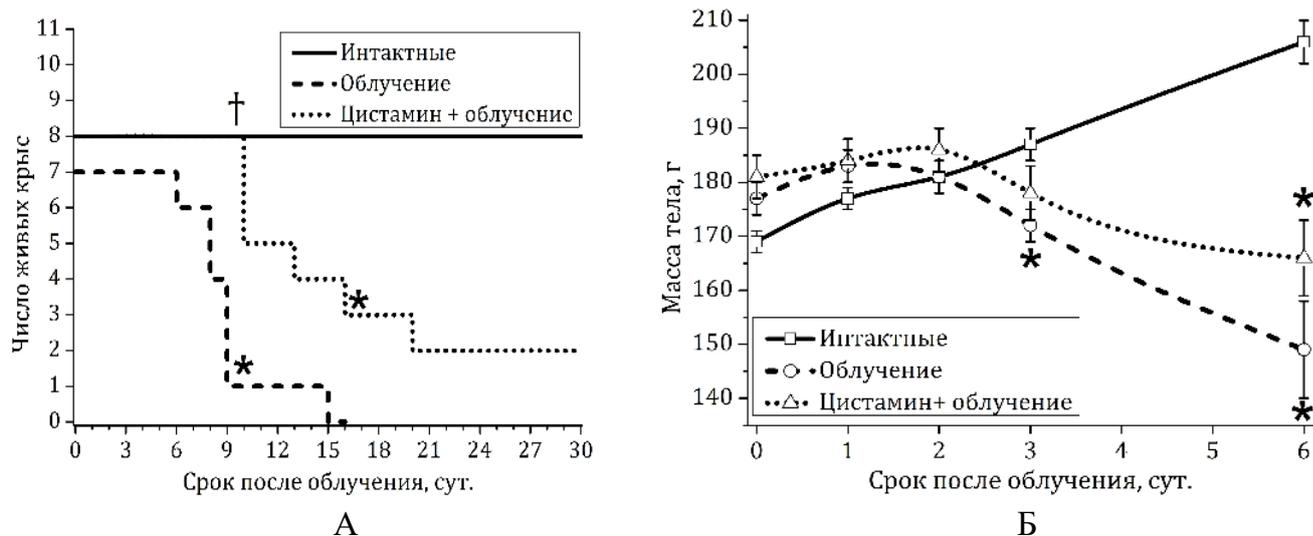


Рисунок 53 — Динамика летальных исходов (А) и массы тела (Б) ($M \pm m$) у крыс после однократного рентгеновского облучения в дозе 9,64 Гр
 Интактные — крысы, не облучённые и не получавшие медикаментозных средств;
 Облучение — облучённые в дозе 9,64 Гр;
 Цистамин + облучение — получившие внутрижелудочно цистамина дигидрохлорид в дозе 120 мг/кг за 30 мин до облучения;
 * — значимое различие с интактной группой, $p < 0,05$;
 † — значимое различие с группой «Облучение», $p < 0,05$.

7.2.2 Влияние цистамина на газообмен и внешнее дыхание после облучения

Во все сроки после облучения потребление кислорода организмом было на 10-30 % меньше, чем у интактных особей. На 3 сут эта тенденция была значимой при расчёте как на единицу времени, так и на дыхательный цикл; в последнем случае она была более выраженной. Межгрупповые различия значений ЧДД были несущественными. Введение цистамина не оказывало существенного влияния на показатели газообмена и внешнего дыхания (рисунок 54).

Таким образом, внутрижелудочное введение цистамина дигидрохлорида в дозе 120 мг/кг за 30 мин до облучения существенно снижало вероятность гибели животных и снижение массы тела в сроки проявления у них кишечного синдрома.

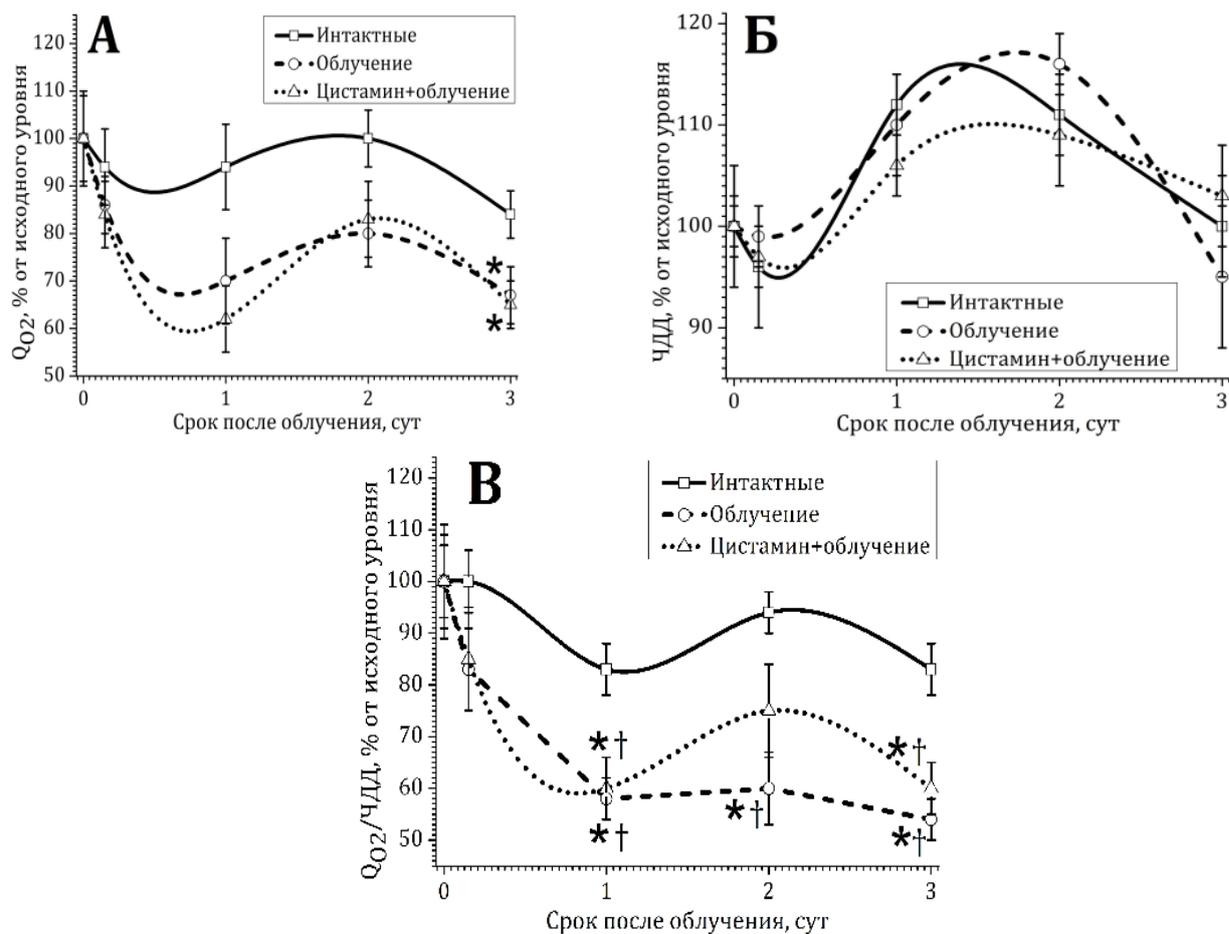


Рисунок 54 — Потребление кислорода организмом (А), частота дыхательных движений (Б) и потребление кислорода в среднем за один дыхательный цикл (В) после общего однократного рентгеновского облучения в дозе 9,64 Гр, $M \pm m$, $n = 8$

QO_2 — потребление кислорода организмом, мл/(кг · мин);

ЧДД — частота дыхательных движений, мин⁻¹;

$QO_2/ЧДД$ — потребление кислорода организмом за один дыхательный цикл, мл/кг;

Интakтные — крысы, не подвергшиеся облучению;

Облучение — R \ddot{o} -облучение в дозе 9,64 Гр при отсутствии профилактики;

Цистамин + облучен. — введение цистамина дигидрохлорида в дозе 120 мг/кг за 30 мин до начала облучения;

* — значимое различие с исходным уровнем, $p < 0,05$;

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

ГЛАВА 8 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

8.1 Характеристика гастроэнтеротоксичности миелоабляционных воздействий

Разработанные в ходе настоящего исследования экспериментальные модели миелоабляционных воздействий характеризовались проявлениями у животных как миело-, так и энтеротоксичности. Введение крысам циклофосфида в дозе 390 мг/кг или их общее однократное относительно равномерное R \ddot{o} -облучение в дозе 9,64 Гр 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 (подраздел 3.1). Таким образом, были созданы условия для рассмотрения предмета исследования: острой энтеротоксичности миелоабляционных агентов.

Моделирование на крысах миелоабляционной терапии сопровождалось неожиданным эффектом: глубоким торможением пропульсивной функции желудка, формировавшимся в ближайшие часы после облучения или введения циклофосфида (рисунок 30). Транзит содержимого желудка превышал 3 сут. У здорового человека он составляет 10-48 мин [162], поэтому можно предположить, что гастростаз сопровождает бóльшую часть курса миелоабляционного кондиционирования реципиентов стволовых кроветворных клеток, составляющего 3-5 сут [183].

Представляет интерес место гастростаза в контексте влияния миелоабляционных агентов на пропульсивную функцию всего ЖКТ. В пункте 1.2.4 показано, что гастростаз является защитной реакцией, направленной на предупреждение травматизации химусом наиболее чувствительного к цитостатическим агентам отдела ЖКТ — тонкой кишки. Если бы изменение моторики ЖКТ ограничивалось гастростазом, то поступление химуса в слепую

кишку отставало бы от её опорожнения, вследствие чего относительная масса слепокишечного химуса уменьшалась бы. Однако на фоне воздействия циклофосфамида она существенно не изменялась (рисунки 35, 36), а после облучения даже увеличивалась (рисунки 37-39). Из этого следует, что миелоабляционные воздействия вели к торможению пропульсивной функции не только желудка, но и толстой кишки. Таким образом, ЖКС явился одним из обязательных осложнений миелоабляционных воздействий на крыс.

Для достижения цели исследования необходимо определить причинную связь между ЖКС и другими проявлениями гастроэнтеротоксичности миелоабляционных агентов. Данные, полученные при гистологическом изучении тонкой кишки, выявили её повреждение циклофосфамидом, которое проявлялось энтероцитопенией (рисунок 47). На неё же указывает и снижение содержания маркёров энтероцитов в тканях тонкой кишки после миелоабляционных воздействий (рисунки 48, 49). Эти проявления острого желудочно-кишечного мукозита позволили рассматривать ЖКС как защитную реакцию на повреждение слизистой оболочки тонкой кишки и использовать его выраженность в качестве одного из показателей энтеротоксичности миелоабляционных агентов. Простота измерения делает этот показатель ценным для экспресс-оценки энтеротоксичности.

Одним из следствий гастростаза могло быть ограничение доставки субстратов бактериям, вегетирующим в просвете толстой кишки. В её химусе удельное содержание бактерий — на восемь порядков больше, чем в химусе желудка [182], что характеризует роль толстокишечной микрофлоры как источника эндотоксемии. Однако отмеченная выше тенденция к накоплению химуса в слепой кишке, значимая после облучения, свидетельствует о возрастании массы слепокишечной микрофлоры, что, в свою очередь, является одним из условий острой кишечной эндотоксемии. Её классическим лабораторным показателем служит индиканурия. Индикан — маркёр кишечной эндотоксемии. Это конечный продукт метаболизма индола, единственным

источником которого в условиях эксперимента была реакция, катализируемая триптофаназой кишечной микрофлоры. Гипериндиканурия – валидный показатель избыточного роста индолпродуцирующих бактерий в ЖКТ [33]. Экскреция индикана с мочой интенсифицировалась после введения крысам циклофосамида (рисунки 40, 41) или их облучения (рисунки 42, 43, 44). Наряду с гипериндиканурией, после введения циклофосамида отмечены порталная эндотоксинемия (рисунок 45) и повышение содержания в крови мочевины (рисунок 46) – продукта детоксикации другого продукта жизнедеятельности кишечной микрофлоры: аммиака. Из перечисленных показателей наиболее пригодным для количественной экспресс-оценки острой кишечной эндотоксемии у человека является экскреция индикана с мочой, методика измерения которой в эксперименте на крысах разработана в ходе настоящего исследования. Поэтому вторым показателем гастроэнтеротоксичности миелоабляционных агентов, который удалось применить в настоящей работе, явилась выраженность индиканурии.

Представляют интерес механизмы острой кишечной эндотоксемии при миелоабляционных воздействиях. *A priori* возможны три её механизма: перераспределительный, продукционный и ретенционный. Прямое доказательство участия перераспределительного механизма в формировании острой кишечной эндотоксемии при миелоабляции циклофосамидом получено с использованием лактулозо-маннитолового теста в модификации, разработанной в ходе настоящего исследования. Повышение у таких животных соотношения концентраций лактулозы и маннитола после введения их раствора в тонкую кишку (рисунок 34) указывает на повышение парацеллюлярной проницаемости эпителия тонкой кишки для веществ малой и средней молекулярной массы [65, 107]. Наиболее вероятной причиной этого явления служит показанная выше энтероцитопения: денудация подслизистого слоя позволяет продуктам бактериального синтеза диффундировать из кишечного химуса в кровь в обход энтероцитов. Таким образом, миелоабляционные воздействия создавали условия

для перераспределительной кишечной эндотоксемии в сроки формирования энтероцитопении (рисунки 25-27, 47).

Субстратные ограничения, обусловленные гастростазом, могли сдерживать рост слепокишечной микрофлоры, тормозя таким образом развитие продукционной кишечной эндотоксемии. Однако ЖКС не мог воспрепятствовать жизнедеятельности аммиакпродуцирующей пристеночной микрофлоры, субстратами для которой служат вещества, диффундирующие к люминальной поверхности слизистой оболочки ЖКТ из крови, в частности, мочевины [135]. Аммиак, продуцируемый кишечной микрофлорой, в печени вовлекается в состав мочевины. Поэтому можно предположить, что представленное на рисунке 46 повышение в 1,5 раза уровня мочевины в крови через 3 сут после облучения было маркёром продукционной кишечной эндотоксемии.

Источником эндотоксина в организме являются грамотрицательные бактерии. У животных, получивших циклофосфамид, они могли быть сосредоточены в желудке и слепой кишке, поскольку другие отделы ЖКТ были свободны от химуса. Содержание эндотоксина в толстокишечном химусе близко к 2,5 г/л [75], а его высвобождение из бактерий могло интенсифицироваться в результате их гибели из-за субстратных ограничений, обусловленных гастростазом. Слепокишечный стаз увеличивал продолжительность контакта эндотоксина с сорбирующей поверхностью, поэтому порталная эндотоксинемия после введения циклофосфамида (рисунок 45) могла быть как продукционной, так и перераспределительной.

Ретенционная эндотоксемия возникает в результате нарушения выведения из организма эндогенных токсичных веществ с мочой, калом или выдыхаемым воздухом [66]. Наиболее частой её причиной служит нарушение фильтрационной функции почек [57]. Однако повышение экскреции с мочой беспорогово фильтрующегося метаболита индоксил сульфата (рисунки 40-44) делает маловероятной вовлечённость предполагаемой нефротоксичности миелоабляционных агентов в формирование острой кишечной эндотоксемии.

Задержка в организме летучих энтерогенных токсикантов могла иметь место в результате нарушения их выведения с выдыхаемым воздухом, однако динамика ЧДД после миелоабляционных воздействий (рисунки 51 и 54) не даёт оснований для соответствующей гипотезы. Более вероятной в моделировавшихся условиях была задержка в организме малорастворимых в воде токсикантов вследствие снижения пропульсивной функции кишечника, на что прямо указывает уменьшение после воздействия циклофосфамида числа актов дефекации (рисунок 52 Г). Это наблюдение отражало показанное выше накопление в организме кишечного химуса, т.е. доказывало возникновение условий и для ретенционной эндотоксемии.

Таким образом, миелоабляционные воздействия вызывали формирование у крыс острой кишечной эндотоксемии смешанного типа.

8.2 Анализ результатов фармакологической профилактики обусловленного миелоабляционными воздействиями нарушения пропульсивной функции желудочно-кишечного тракта

Двукратное ведение в желудок NaHCO_3 в дозе, которая для человека эквивалентна 350 мл 4 % раствора, хотя и не полностью, но в существенной мере позволило сохранить пропульсивную функцию желудка. Наиболее эффективным NaHCO_3 был в сроки, не превышавшие значения $T_{1/2}$ циклофосфамида после внутривенного введения крысам: 0,5 ч [217]. Из этого следует, что в механизме профилактического действия NaHCO_3 преобладало торможение токсификации циклофосфамида.

Профилактический эффект NaHCO_3 мог быть обусловлен торможением образования акролеина и фосфорамидного иприта в эпителиоцитах желудка и (или) тонкой кишки за счёт слабо-щелочной реакции этой соли и способности её к резорбции слизистой оболочкой ЖКТ. В литературе имеются данные и о наличии у добавленного в питьевую воду NaHCO_3 системного противовоспалительного действия [70,173]. Однако наблюдавшаяся в настоящей работе неспособность

NaHCO_3 предупреждать вызывавшуюся циклофосфамидом гипотрофию селезёнки указывает на отсутствие системного действия при введении раствора питьевой соды в желудок. Это можно объяснить буферными свойствами крови, не позволявшими в сопоставимой мере повысить рН клеток стволового или пролиферативного пулов кроветворной системы. То есть защитное действие NaHCO_3 на пропульсивную функцию ЖКТ было избирательным, что благоприятствует апробации этого лекарственного средства при заболеваниях, требующих миелоабляционных воздействий. Вместе с тем, введение крысам NaHCO_3 не предотвращало вызванное циклофосфамидом переполнение слепой кишки (рисунок 35), что является ограничением NaHCO_3 как потенциального средства профилактики ЖКС при миелоабляционном применении циклофосфамида. Ощелачивающее действие NaHCO_3 было преимущественно местным, поскольку предотвращало энтероцитопению лишь в *duodenum*, но не в дистальных отделах тонкой кишки (рисунок 48). Это подкрепляет гипотезу об уменьшении цитостатического повреждения эпителия слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки как о вероятном механизме профилактического действия NaHCO_3 на гастростаз, вызванный циклофосфамидом.

Можно было предположить, что закисление желудочного химуса, в противоположность его ощелачиванию, вызовет усугубление вызванного циклофосфамидом гастростаза. Однако проверка этой гипотезы дала неожиданный результат: HCl , как и NaHCO_3 , частично предотвращала развитие у крыс переполнения желудка (рисунок 36), в то время как энтероцитопению частично предотвращало лишь введение в желудок NaHCO_3 . Частичное предупреждение переполнения желудка введением в него HCl могло быть обусловлено повышением в её присутствии активности пепсина [118] и ускорением переваривания корма, потреблённого животными в последующие 24 ч, что подкрепляется данными об угнетающем действии циклофосфамида на желудочную секрецию [206]. Таким образом, предотвращение гастростаза

внутрижелудочным введением NaHCO_3 , но не HCl , отражало защитное действие препарата на слизистую оболочку желудка и проксимальных отделов тонкой кишки при миелоабляционном применении циклофосфида.

ЖКС, возникавший у крыс после облучения в миелоабляционной дозе, был реакцией на местное повреждение ЖКТ. Это следует из литературных данных, согласно которым после местного облучения живота у крыс возникает ЖКС, в то время как общее облучение в равных дозах при экранировании живота ЖКС не вызывает [89]. Профилактическое в. ж. введение цистамина предупреждало гастростаз при отсутствии существенного влияния на слепокишечный стаз и пострadiационную гипотрофию селезёнки (рисунок 37). Эти данные указывают на то, что триггеры ЖКС локализованы в слизистой оболочке соответствующих отделов ЖКТ и могут быть «отключены» местным воздействием цистамина. Однако для практического использования цистамина в качестве средства профилактики гастростаза при лучевой миелоабляционной терапии необходимо, чтобы местный противолучевой эффект не сопровождался системным. У крыс, судя по отсутствию влияния на лучевую гипотрофию селезёнки, системный противолучевой эффект введённого в желудок цистамина был несущественным.

Местного противолучевого действия цистамина, проявившегося снижением выраженности гастростаза, оказалось достаточно для благоприятного влияния этого радиопротектора на сроки гибели животных (рисунок 53А). Вместе с тем, из представленных в пункте 1.4.1 данных следует, что, в отличие от крыс, при приёме внутрь цистамина в рекомендуемой дозе 1,2 г человеком предупреждение гастростаза будет сопровождаться системным противолучевым действием. Такое действие было бы нежелательным при подготовке пациентов к трансплантации стволовых кроветворных клеток. Поэтому избирательность экстренной профилактики гастростаза цистамином при облучении крыс в миелоабляционной дозе не может быть безоговорочно экстраполирована на человека. Требуется выявление, с использованием крупных животных, условий

реализации способности цистамина предупреждать гастростаз, не оказывая миелопротективного действия.

Несмотря на то, что противолучевая эффективность индралина показана как на мелких, так и на крупных животных, как при системном [8], так и при местном применении [9], индралин, контактировавший со слизистой оболочкой желудка до и во время облучения, не предупреждал ЖКС. Как противолучевые, так и радиомитигирующие свойства индралина при облучении в супралетальных дозах изучались, как правило, в условиях экранирования живота [8], что оставило неизвестным соотношение эффектов, которые препятствовали, или способствовали формированию лучевого желудочного мукозита. В их числе могли быть циркуляторная гипоксия, снижение напряжения кислорода в цитоплазме вследствие интенсификации клеточного дыхания, серотонинергическая активность. С другой стороны, нарушение энергетического обеспечения пострадиационной репарации в условиях циркуляторной гипоксии могло усугублять поражение эпителия. Для эпителиальных клеток, которым свойственна зависимость от аэробного ресинтеза АТФ и высокая активность репаративных процессов [113, 142], этот фактор является существенным. Таким образом, индралин, введённый в желудок за 10 мин до облучения в дозе 40 мг/кг, не предупреждает возникновение ЖКС. Причины этого требуют дополнительных исследований.

Внутрижелудочное введение сока подорожника после облучения частично предупреждало увеличение соотношения масс желудочного и слепкишечного химусов (рисунок 38). Вместе с тем, благоприятный эффект сока подорожника был умеренным, поэтому рекомендации по его применению при остром цитостатическом тонкокишечном мукозите могут быть сформулированы лишь по результатам более длительного курса введения с использованием бóльшего набора показателей эффективности.

Таким образом, двукратный приём NaHCO_3 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. Назначение внутрь цистамина в дозе, для взрослого человека биоэквивалентной 1,2 г за 30 мин до начала облучения, предотвращает гастростаз, вызванный облучением в миелоабляционной дозе, однако требует изучения в качестве средства профилактики гастростаза при лучевом миелоабляционном воздействии.

8.3 Анализ результатов фармакологической профилактики острой кишечной эндотоксемии, вызванной миелоабляционными воздействиями

Выраженность кишечной эндотоксемии зависит от интенсивности образования токсикантов кишечной микрофлорой, проницаемости для них ЭГБ и скорости их выведения из организма. У получивших циклофосфамид крыс цитостатическое повреждение ЖКТ наиболее выражено в тонкой кишке [95]. Однако при настоящем исследовании кишечная микрофлора была сосредоточена, преимущественно, в желудке и слепой кишке. Эпителий слизистой оболочки этих органов более резистентен к цитостатикам. Поэтому острая кишечная эндотоксемия, знаменовавшая миелоабляционное воздействие циклофосфамида, не была прямым следствием цитостатического повреждения тонкой кишки. Об этом свидетельствует отсутствие существенного влияния NaHCO_3 , уменьшавшего выраженность энтероцитопении, на уровень эндотоксина в портальной крови (рисунок 45) и на выраженность индиканурии (рисунки 40, 41) у таких животных. Положительная корреляция между накоплением химуса в слепой кишке и индиканурией при острой интоксикации циклофосфамидом (рисунки 35, 36, 40, 41) указывает на то, что в этих случаях эндотоксемия была опосредована слепокишечным стазом.

Таким образом, профилактическое введение в желудок NaHCO_3 не устраняло острую кишечную эндотоксемию. Однако NaHCO_3 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 [59].

Данные, характеризующие влияние радиопротекторов на показатели пострадиационной кишечной эндотоксемии, представлены на рисунках 42 и 46. Содержание мочевины в крови облучённых крыс было выше, чем у интактных, что могло быть обусловлено повышенной продукцией в желудке и кишечнике продукта бактериальной деградации кормового белка: аммиака (рисунок 46). Цистамин или его сочетания с индралином нормализовали этот показатель, а применение индралина было неэффективным. Предупреждение цистамином уремического эффекта облучения могло быть обусловлено снижением суммарной массы желудочного и кишечного химусов (рисунок 37), а значит, и суммарной массы аммиакпродуцирующих микроорганизмов. Вместе с тем, можно предположить, что отсутствие значимого влияния цистамина и (или) индралина на экскрецию индикана с мочой (рисунок 42) было результатом отсутствия существенного снижения массы слепокишечного химуса (рисунок 37). Таким образом, приём цистамина в дозе, для взрослого человека биоэквивалентной 1,2 г, за 30 мин до облучения, может корригировать нарушения обмена аммиака при лучевом миелоабляционном воздействии, однако не предупреждает проявлений эндотоксемии, связанных с жизнедеятельностью индолпродуцирующей кишечной микрофлоры.

8.4 Анализ результатов фармакологической профилактики острого тонкокишечного мукозита при миелоабляционных воздействиях

Моделирование миелоабляционной цитостатической терапии было сопряжено с повреждением тонкой кишки, выраженность которого возрастала в

дистальном направлении. Возможная причина этого в том, что содержание бактерий в химусе *ileum* – на 4 порядка выше, чем в *duodenum* [182]. Применение NaHCO_3 предупреждало дистрофические изменения во всех отделах тонкой кишки (таблица 7, рисунок 47). Для двенадцатиперстной и проксимальной части тощей кишок это объясняется локальным ощелачиванием. В отношении подвздошной кишки механизм защитного действия NaHCO_3 требует дальнейшего изучения. Связано это с тем, что время её достижения раствором NaHCO_3 (по нашим предварительным данным, не менее 3 ч), существенно превышает $T_{1/2}$ циклофосамида для крыс при его в.в. введении [217]. Вызванная миелоабляционными агентами энтероцитопения проявлялась и снижением активности маркёров плазматической мембраны энтероцитов в тканях тонкой кишки (рисунки 48, 49). Двукратное введение NaHCO_3 судя по активности ЩФ в ткани, оказало защитное действие на *duodenum*.

При профилактическом введении цистамина отмечена лишь тенденция к увеличению активности АХЭ. Из-за анатомических особенностей желудка крысы профилактически введённые в него растворы радиопротекторов до окончания облучения контактировали в основном со слизистой оболочкой желудка и не успевали поступить в тонкую кишку.

Таким образом, NaHCO_3 , введённый за 30 мин до и тотчас после введения циклофосамида, обладал защитным действием на слизистую оболочку двенадцатиперстной кишки, а цистамин за 30 мин до воздействия не оказывал существенного влияния на показатели энтероцитопении.

8.5 Анализ результатов оценки влияния средств фармакологической коррекции энтеротоксичности миелоабляционных агентов на функциональное состояние организма

Животные, получившие NaHCO_3 , гибли в более поздние сроки, чем в контроле, однако это различие наблюдалось лишь в ближайшие 6 сут после

введения циклофосфамида, т. е. в период проявлений кишечного синдрома (рисунок 50, А). Такое влияние NaHCO_3 на динамику летальности и массы тела указывает на его энтеропротективное действие при поражении крыс циклофосфамидом. Этот вывод подкрепляется тенденцией к положительным привесам у получавших NaHCO_3 крыс в первые сутки после миелоабляционного воздействия, в то время как в контроле привесы были отрицательными (рисунок 50, Б). Поскольку при получении обсуждаемых данных доступ животных к корму после миелоабляционных воздействий не ограничивали, такой результат с высокой вероятностью обусловлен наблюдавшейся ранее (рисунки 35, 36) способностью препарата предотвращать развитие индуцированного циклофосфамидом гастростаза, а следовательно, и создавать условия для кормления.

В подразделе 1.3 показано, что миелоабляционные воздействия могут отразиться на показателе интенсивности катаболических процессов – потреблении кислорода организмом. Поскольку газообмен изучали в условиях, близких к основному обмену, снижение потребления кислорода не могло быть результатом заторможенного состояния животных. Отсутствие существенного влияния циклофосфамида на ЧДД (рисунок 51, Б) подтверждает, что угнетение газообмена не могло быть обусловлено и уменьшением дыхательного объёма в результате ограничения растянутым желудком экскурсии диафрагмы. Угнетение газообмена вследствие прямого влияния на энергетический обмен циклофосфамида могло быть лишь в ближайшие часы, но не через трое суток после его введения, так как $T_{1/2}$ циклофосфамида для крыс составляет 0,5 ч [217]. По литературным данным, существенное снижение потребления кислорода крысами в ближайшие 3 ч после введения циклофосфамида даже в дозе 600 мг/кг не возникает [66]. В последующие сроки снижение потребления кислорода могло быть проявлением острого кишечного эндотоксикоза. Двукратное введение NaHCO_3 предупреждало угнетение газообмена (рисунок 51, А, В). Это указывает на способность NaHCO_3 предупреждать не только гастростаз (рисунки 35, 36), но

также острую кишечную эндотоксемию (рисунки 40, 41) и сопряжённые с ним нарушения энергетического обмена.

Двигательная активность животных отражает функциональное состояние ЦНС. Поведенческим признаком успешной адаптации крыс к стрессовой ситуации является груминг: чем больше число эпизодов груминга, тем меньше уровень тревожности у крыс [3]. Частота актов дефекации, напротив, положительно коррелирует с уровнем тревожности у животных [54]. Применение NaHCO_3 положительно влияло на показатели активности у крыс (рисунок 52, А, Б). Предположительно, отсутствие на фоне применения NaHCO_3 тенденции к снижению числа актов груминга (рисунок 52, В) отражает более низкий, в сравнении с незащищёнными животными, уровень болевой импульсации из перегруженных химусом желудка и слепой кишки.

Таким образом, введение крысам в желудок NaHCO_3 в дозе, эквивалентной 350 мл его 4 % раствора для человека, за 30 мин до и сразу после введения циклофосамида, в существенной мере предупреждает ухудшение функционального состояния организма и снижает вероятность гибели во время миелоабляционного кондиционирования.

При облучении ни в одной из групп летальность в период манифестации кишечного синдрома не отмечали (рисунок 53, А). Первый случай гибели в группе, получившей цистамин, зафиксировали через 10 дней, что превышало таковой в контроле – 6 дней. Влияние цистамина на динамику летальности и массы тела указывает на его энтеропротективное действие при облучении крыс. Этот вывод подкрепляется тенденцией к положительным привесам получавших цистамин крыс с третьего дня после облучения, в то время как в контроле привесы были отрицательными (рисунок 53, Б). Поскольку условия содержания животных при облучении были идентичны таковым при введении циклофосамида, увеличение массы тела при введении цистамина, вероятно, объясняется способностью цистамина предотвращать развитие гастростаза

(рисунок 37) и этим способствовать нутритивному обеспечению процессов пострадиационного восстановления кроветворной системы.

Потребление кислорода у облучённых животных было снижено на 10-30% в сравнении с интактными (рисунок 54, А). Это согласуется с сообщением о снижении потребления кислорода крысами в течение 3 сут после их рентгеновского облучения в дозах 300-1000 Р [160]. Газообмен изучали в тех же условиях, что и при введении циклофосфида, поэтому снижение потребления кислорода облучёнными животными не могло быть результатом их заторможенного состояния. Отсутствие существенного влияния облучения на ЧДД (рисунок 54, Б) подтверждает, что угнетение газообмена не могло быть обусловлено уменьшением дыхательного объёма в результате ограничения растянутым желудком экскурсии диафрагмы. В литературе отсутствуют данные прямого повреждающего действия излучения в применённой дозе на тканевой энергетический обмен. Более вероятным представляется косвенный характер такого действия, опосредованного острой кишечной эндотоксемией. Профилактическое введение цистамина не оказывало существенного влияния на показатели газообмена и внешнего дыхания (рисунок 54). Гипотеза о вовлечённости острой кишечной эндотоксемии в эффект пострадиационного снижения газообмена подкрепляется отсутствием влияния на последний цистамина, профилактическое введение которого не предотвращало гипериндиканурию (рисунок 42). Таким образом, введение крысам в желудок цистамина в дозе, для взрослого человека биоэквивалентной 1,2 г, за 30 мин до облучения может существенно снижать вероятность гибели животных, положительно влияет на динамику массы тела животных, однако не оказывает существенного влияния на показатели газообмена и внешнего дыхания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кишечный синдром, возникающий при миелоабляционных воздействиях, оказывает негативное влияние на исход трансплантации стволовых кроветворных клеток и лимитирует вероятность безрецидивного течения постоперационного периода. Повреждающие ЭГБ цитостатические вещества и (или) облучение организма, включающее область живота, ведут к потенциально летальным осложнениям: острому желудочно-кишечному мукозиту, желудочно-кишечному стазу и избыточному бактериальному росту в ЖКТ. Поэтому для обеспечения безопасности подготовки пациентов к пересадке им стволовых кроветворных клеток нужны средства профилактики и лечения дисфункции ЭГБ. Энтеропротекторы могут быть полезны и при техногенных авариях, сопряжённых с системным воздействием алкилирующих веществ и редкоионизирующего излучения, а также при поражениях ядерным и химическим оружием. Такая задача ранее не ставилась, а необходимые для её решения медикаментозные средства не идентифицированы.

Для идентификации потенциальных энтеропротекторов разработаны модели острых миелоабляционных воздействий. Интерполированы дозы, применяемые для миелоабляционных воздействий у крыс: для фармакологической это 390 мг/кг циклофосфамид при в.в. введении, а для лучевой — 9,64 Гр при общем однократном относительно равномерном R₀-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 циклофосфаном и цистамина дигидрохлорид при лучевом миелоабляционном воздействии. Кроме того, в ходе скрининга средств купирования проявлений энтеротоксичности выявлено умеренное нормализующее влияние сока подорожника на пропульсивную функцию ЖКТ.

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 на с. 150.

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 циклофосфида 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 циклофосфида 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 циклофосфида 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 гипериндиганурии, 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 Характеристика контингентов участников апробации

1.1 Критерии включения

К испытаниям привлекать 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.

1.2 Критерии исключения

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 Порядок назначения энтеропротекторов

2.1 Порядок назначения гидрокарбоната натрия

Гидрокарбонат натрия назначать 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. Раствор дозировать с использованием коэффициентов пересчёта доз, применяемых для их межвидовой экстраполяции [52]. В таблице 7

представлены значения объёма 4 % водного раствора гидрокарбоната натрия, назначаемого пациентам с различной массой тела. При массе тела пациента, отличной от приведённых в таблице, объём раствора находят интерполяцией ближайших большего и меньшего его значений.

Таблица 7 — Объём 4 % водного раствора гидрокарбоната натрия, назначаемого внутрь за 0,5 ч до и тотчас после сеанса внутривенного введения цитостатического лекарственного препарата, в зависимости от массы тела

Масса тела, кг	Объём раствора при сроках его приёма, мл	
	за 0,5 ч до сеанса	тотчас после сеанса
5	25	25
10	43	43
15	61	61
20	78	78
30	105	105
40	126	126
50	144	144
60	158	158
70	175	175
80	190	190
90	204	204
100	217	217
110	228	228
120	239	239

2.2 Порядок назначения цистамина дигидрохлорида

Цистамина дигидрохлорид (цистамин) назначать натошак внутрь в виде порошка или таблеток по 0,2 г [35] за 0,5 ч до сеанса общего облучения. Препарат запивают водой. Таблетки необходимо глотать, не разжёвывая. Дозирование осуществлять с использованием коэффициентов пересчёта, применяемых для межвидовой экстраполяции [52]. В таблице 8 представлены значения дозы цистамина и объёма воды для пациентов с различной массой тела. При использовании цистамина в таблетках его дозу определять как ближайшую к

значению, найденному во второй графе таблицы 8. При массе тела пациента, отличной от приведённых в таблице, дозу цистамина и объём воды находить интерполяцией соответствующих ближайших большего и меньшего значений.

Таблица 8 — Доза цистамина дигидрохлорида и объём воды для его запивания, назначаемых внутрь за 0,5 ч до сеанса общего облучения, в зависимости от массы тела

Масса тела, кг	Доза цистамина, мг	Объём воды, мл
5	175	51
10	291	85
15	418	122
20	535	156
30	717	209
40	864	252
50	984	287
60	1083	316
70	1200	350
80	1303	380
90	1399	408
100	1485	433
110	1563	456
120	1639	478

3 Порядок оценки эффективности медикаментозных средств защиты энтерогематического барьера

Клинические исследования проводить в соответствии с требованиями [48]. В качестве критериев эффективности исследуемых лекарственных средств рассматривать их влияние на выраженность гастростаза [26] и на экскрецию индикана с мочой [33].

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 [4] в моче, собранной за сутки, и выражать в микрограммах на килограмм массы тела в час. Обследование с использованием указанных методов проводить ежедневно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альшин, С.К. Дубильные вещества / С.К. Альшин // Инновационное развитие агропромышленного комплекса для обеспечения продовольственной безопасности Российской Федерации. Сборник материалов Международной научно-практической конференции. – Тюмень: Б.и., 2020. – С. 8-12.
2. Анасевич, Я.Н. Морфологическое состояние тканей тонкой кишки крыс при недостатке мелатонина /Я.Н. Анасевич // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10 (часть Б). – С. 1734-1738.
3. Ахмадеев, А.В. Половые различия груминга и уровней тревожности у предпочитающих алкоголь крыс / А.В. Ахмадеев, Л.Ф. Галиева, Н.Ф. Леушкина // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – С. 622.
4. Балаховский, С.Д. Методы химического анализа крови/ С.Д. Балаховский, И.С. Балаховский. – 3-е изд. – М.: Медгиз, 1953. – 746 с.
5. Башарин, В.А. Военная токсикология, радиология и медицинская защита / В.А. Башарин, Н.Г. Венгерович, А.И. Головкин, Ю.Ю. Ивницкий, Т.В. Шефер и др.; Под ред. Г.А. Софронова и Е.В. Крюкова. – СПб.: ВМедА, 2023. – 616 с.
6. Богатов, Л.В. Митотический индекс различных типов нормальных клеток костного мозга крыс / Л.В. Богатов // Бюл. Эксперим. Биол. Мед. – 1970. – Т. 69, №2. – С. 103-105.
7. Бонд, В. Радиационная гибель млекопитающих / В. Бонд, Т. Флиндер, Д Аршамбо, пер. с англ. А.Г. Свердлова, В.С. Барсукова, О.В. Малиновского, Т.А. Шейкиной. – М.: Атомиздат, 1971. – 316 с.
8. Васин, М.В. Препарат Б-190 (индралин) в свете истории формирования представлений о механизме действия радиопротекторов / М.В. Васин // Рад. Биол. Радиоэкол. – 2020. – Т. 60, № 4. – С. 378-395.
9. Васин, М.В. Радиопротектор индралин при ранних и поздних проявлениях местных лучевых поражений / М.В. Васин, И.Б. Ушаков, В.Ю. Ковтун // Вопр. Онеол. – 2016. – Т. 62, № 3. – С. 406-412.

10. Верлина, А.А. Прогноз видов фармакологической активности компонентов сока подорожника большого *in silico* и оценка его антиоксидантной активности *in vitro* / А.А. Верлина, А.В. Бузлама, А.С. Уйманова, А.А. Гудкова // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2021. – № 4. – С. 61-67.

11. Вешняков, В.А. Изучение взаимодействия моносахаридов с катионами ртути(II) и меди(II) и разработка методов определения углеводов в технологических средах химической переработки древесины: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 05.21.03/ Вешняков Вячеслав Александрович. – Архангельск, 2010. – 20 с.

12. Военная токсикология, радиология и медицинская защита / под ред. Г.А. Софронова и Е.В. Крюкова. – СПб.: ВМедА, 2023. – 616 с.

13. Галстян, Г.М. Лечение ботулотоксином гастропареза у больного после трансплантации аллогенного костного мозга / Г.М. Галстян, М.В. Пашкова, О.Ю. Попова и др.// Терап. Архив.– 2018. – № 1. – С. 60-64.

14. Генес, В.С. Таблицы достоверных различий между группами наблюдений по качественным показателям / В.С. Генес. – М.: Медицина, 1964. – 80 с.

15. Голиков, И.Г. Лекции по дозиметрии и защите / И.Г. Голиков // СПб.: Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 2016. – С.38.

16. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издания. Том 1. М.: ФЭМБ, 2015. – 1469 с.

17. Государственный реестр лекарственных средств, 2020 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx>.

18. Джорджиеску, П. Биохимические методы анализа и исследования / П. Джорджиеску, Б. Пэунеску. – Бухарест.: Медицинское издательство, 1963. – 499 с.

19. Драчёв, М.С. Острые поражения, возникающие в результате внешнего облучения организма человека // Военная токсикология, радиология и

медицинская защита / М.С. Драчёв, В.В. Зацепин, А.В. Иванченко, Ю.Ю. Ивницкий, Е.В. Крюков, А.Б. Селезнёв; под ред. Г.А. Софронова и Е.В. Крюкова. – СПб.: ВМедА, 2023. – С. 507-539.

20. Елизарова, О.Н. Пособие по токсикологии для лаборантов / О.Н. Елизарова, Л.В. Жидкова, Т.А. Кочеткова. – Москва: Медицина, 1974. – 168с.

21. Жохова, Е.В. Фармакогнозия / Е.В. Жохова, М.Ю. Гончаров, М.Н. Повьдыш, С.В. Деренчук. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 81 с.

22. Зайчик, А.Ш. Основы патохимии / А.Ш. Зайчик, Л.П. Чурилов.– СПб.: Элби, 2000.– 687 с.

23. Зацепин, В.В. Биологические эффекты ионизирующего излучения / В.В. Зацепин, А.В. Иванченко, Ю.Ю. Ивницкий, Т.В. Шефер // Токсикология, радиология и медицинская защита; под ред. Г.А. Софронова и Е.В. Крюкова. – СПб.: ВМедА, 2023. – С. 487-506.

24. Звенигородская, Л.А. Хроническая ишемическая болезнь органов пищеварения: алгоритм диагностики и лечения / Л.А. Звенигородская, Н.Г. Самсонова, А.С. Топорков // Рус мед журн. – 2010. – Т. 9. – С. 544–548.

25. Зеленин, К.Н. Химия / К.Н. Зеленин.– СПб.: Специальная литература, 1997.– 687 с.

26. Ивницкий, Ю.Ю. Влияние гидрокарбоната натрия на формирование гастростаза у крыс при моделировании миелоабляционной химиотерапии циклофосфаном /Ю.Ю. Ивницкий, О.А. Вакуненко, О.Н. Гайкова, А.А. Козлов, Т.В. Шефер // Мед. Экстремальн. Сит. – 2023. – № 2. – С.98-104.

27. Ивницкий, Ю.Ю. Перераспределение аммиака между пищеварительным трактом и кровью при моделировании алкогольной комы: роль в формировании летального исхода / Ю.Ю. Ивницкий, Т.В. Шефер, В.Л. Рейнюк // Патол. Физиол. Эксперим. Тер. – 2010. – № 3. – С. 34-37.

28. Куна, П. Химическая радиозащита / П. Куна; пер. с чешск. Е.А. Павлюкова, под ред. Е.Ф. Романцева – М.: Медицина, 1989. – 192 с.

29. Куценко, С.А. Основы токсикологии/ С.А. Куценко. – СПб.: Фолиант, 2004. – 715 с.
30. Легеза, В.И. Эметический синдром / В.И. Легеза, И.Ш. Галеев, Е.А. Селезнёв. – СПб.: Фолиант, 2005. – 144 с.
31. Легеза, В.И. Эметический синдром (этиология, патогенез, профилактика и терапия)/ В.И. Легеза, И.С. Драчёв, А.Б. Селезнёв. – СПб.: Спецлит, 2021. – 223 с.
32. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х т. Том 2 / А. Ленинджер; пер с англ В.В. Борисова и др.; под ред. В.А. Энгельгардта, Я.М. Варшавского.– М.: Мир, 1985. – 386 с.
33. Мартынов, В.Л. Индикан мочи и водородный дыхательный тест как методы скрининг-диагностики синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке / В.Л. Мартынов, А.Г. Семёнов, А.А. Тулупов, А.А. Чесноков, В.А. Курилов, Н.В. Казарина // Мед. Альманах. – 2017. – Т.47, № 2. – С. 117-121.
34. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: в 2 т. Изд. 13-е / М.Д. Машковский. – Харьков: Торсинг, 1997. – 592 с.
35. Машковский, М.Д. Лекарственные средства. / М.Д. Машковский. – 16-е изд, перераб., испр. и доп. – М.: Новая Волна, Умеренков, 2012. – 1216 с.
36. Медикаментозная профилактика ранних проявлений острого резорбтивного действия алкилирующих веществ: Методические рекомендации МР ФМБА России 12.52.12 – 2012: утв. зам. рук. ФМБА России 16.11.12: введ. в действие 16.11.12 / ФМБА России, ФГБГУН ИТ ФМБА России. –2012. – 44 с.
37. Мильман, Б.Л. Популярность химических соединений. О чем это? / Б.Л. Мильман, И.К. Журкович // Аналитика. – 2020.– Т. 10, № 6. – С. 464.
38. Морозова, В.Т. Особенности морфогенеза стволовых клеток кроветворных органов / В.Т. Морозова // Гематология.– 2017. – Т. 62, № 2. – С. 88-90.

39. Набор реагентов «ALPYR Test» для проведения гель-тромб теста [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://algimed-techno.com/catalog/alpyr/alpyr-test/>.

40. Набор реагентов для проведения гель тромб теста (тендер №73460803). [Электронный ресурс].– Режим доступа: <https://www.tenderguru.ru/tender/73460803>.

41. Об утверждении сборника описей комплектов медицинского имущества для войскового звена медицинской службы Вооружённых Сил Российской Федерации на военное время: Приказ начальника ГВМУ МО РФ от 12 июля 2011 г. – Т 77. – М., 2011. – 332 с.

42. Ольянская, Р.П. Методы исследования газового обмена человека и животных/ Р.П. Ольянская, Л.А. Исаакян. – М.: Медгиз, 1959. – 180 с.

43. Онищенко, Н.А. Роль апоптотических клеток костного мозга при активации регенерационных процессов в печени / Н.А. Онищенко, А.О. Никольская, З.З. Гоникова, Л.А. Кирсанова, М.Ю. Шагидулин, В.И. Севастьянов // Вестн. Трансплантол. Искусств. Органов. – 2021. – Т. 23, № 4. – 110-118.

44. Пат. RU 2019135203, МПК А61К 38/18. Композиция и способы лечения или профилактики расстройств связанных с кишечной проницаемостью / Демири Кристиан Санино, Алессандро Ресцигно, Мария Зохар Йишай, Чикуетте Элэйн, Сильвестри Алессандра, заявитель Джелесис ЭлЭлСи (US). – 2019135203; заявл. 16.04.2018, опубл. 14.05.2021, Бюл. № 14. – 4 с.

45. Пат. RU 94039212, МПК А61 К 33/00. Способ лечения заболеваний желудочнокишечного тракта и мочеполовой сферы / Фишер О.А., Фишер Л.Н. – 94039212/14; заявл. 18.10.1991, опубл. 20.09.1996. – 9 с.

46. Пат. RU2437581, МПК А23L 1/29, А23L 1/30, А61К 31/202, А61К 31/7068, А61К 31/7072, А61К 31/7076, А61Р 1/12, А23С 9/20. Способ стимуляции целостности кишечного барьера после родов не через естественные пути / Шмитт Йоахим., Бем Гюнтер, Беерманн Кристофер, патентообладатель Н.В. Нютрисиа, NL. – 2008120024/13; заявл. 06.10.2006, опубл. 27.12.2011, Бюл. № 36. – 19 с.

47. Пат. RU2577302, МПК А61К 38/07 А61Р 1/14. Терапевтическое средство против желудочно-кишечного заболевания / Нисида Теруо, Инуи Макото, Мацуура Кендзи, Накамура Масацугу, Нагано Такаси, патентообладатели Ямагути Университи (Сантен Фармасьютикал Ко ЛТД, JP), Р-ТЕК УЕНО, ЛТД. (JP). – 2012123992/15; заявл. 10.11.2010, опубл.10.03.2016, Бюл. № 7. – 10 с.

48. Правила надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза. – Утв. Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 79.

49. Пятак, О.А. Международная система единиц в клинической медицине / О.А. Пятак. – Киев: Здоров'я, 1983. – 88 с.

50. Рейнюк, В.Л. Влияние циклофосфана и лактулозы на поступление аммиака и веществ средней молярной массы из кишечника в кровь у крыс / В.Л. Рейнюк Т.В. Шефер, К.А. Краснов, Ю.Ю. Ивницкий // Бюл. Эксперим. Биол. Мед. – 2012. – Т. 154, № 10. – С. 455-459.

51. Рейнюк, В.Л. Интенсификация диффузии аммиака из пищеварительного тракта крыс при острой барбитуратной интоксикации / В.Л. Рейнюк, Т.В. Шефер, Ю.Ю. Ивницкий // Бюл. Эксп. Биол. Мед. – 2008. – Т. 145, № 1. – 20-23.

52. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/ под ред. Р.У. Хабриева. – 2-е изд, перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 49.

53. Сапов, И.А. Состояние функций организма и работоспособность моряков / И.А. Сапов, А.С. Солодков. – Л.: Медицина, 1980. – 192 с.

54. Сашков, В.А. Взаимосвязь уровня половых стероидов в мозге с поведением и тревожностью у самок-крыс с разным гормональным статусом / В.А. Сашков // Вестн. Новых Мед. Технол. – 2009. – Т.16, № 3. – С. 21-25.

55. Сигида, Е.Н. Характеристика состава липополисахарида галотолерантных бактерий *Azospirillum haloraeferens* Au4 / Е.Н Сигида, Ю.П. Федоненко, М.П. Чернышова, В.С. Гринёв, С.А. Коннова, В.В. Игнатов //

Изв. Сарат. Ун-та Нов.Сер.Химия Биология Экология. – 2014. – Т.14, вып. 3. – С. 88-94.

56. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных / под ред. В.Г. Макарова и М.Н. Макаровой. – СПб.: Изд-во «Лема», 2013. – 116 с.

57. Фридлянд, И.Б. Индикан / И.Б. Фридлянд // Большая Мед. Энцикл. – 3-е изд. / под ред. Б.В. Петровского. – М.: Советская энциклопедия, 1980. – Т. 9. – С. 146.

58. Химия и биохимия нуклеиновых кислот / под ред. И.Б. Збарского и С.С. Дебова. – Л.: Медицина, 1968. – 438 с.

59. Хубутя, М.Ш. Прогноз развития клинической токсикологии в России./ М.Ш. Хубутя, С.А. Кабанова, Ю.С. Гольдфарб, В.А. Маткевич, П.М. Богопольский, А.В. Бадалян // Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь». – 2016. – № 3. – С. 26-31.

60. Шефер, Т.В. Энтерогематический барьер при критических состояниях организма / Т.В. Шефер, О.А. Вакуненко, Ю.Ю. Ивницкий, А.И. Головкин // Успехи современной биологии. – 2022. – Т. 142, № 2. – С. 138-152.

61. Шефер, Т.В. Влияние сока подорожника на проявления и исход острой интоксикации циклофосфаном у крыс / Т.В. Шефер, Ю.Ю. Ивницкий, В.Л. Рейнюк // Биопрепараты. – 2015. – Т.55, № 3. – С. 61-64.

62. Шефер, Т.В. Патогенетические основы медикаментозной коррекции ранних проявлений острого резорбтивного действия ипритов. Развитие концепции эндотоксикоза: дис. ... д-ра мед. наук: 14.03.04 / Шефер Тимур Васильевич. – СПб., 2015. – 309 с.

63. Шефер, Т.В. Моделирование миелоабляционной цитостатической терапии сопровождается желудочно-кишечным стазом у крыс / Т.В. Шефер, Ю.Ю. Ивницкий, В.Л. Рейнюк // Медицина экстремальных ситуаций. – 2022. – №1. – с 51-55.

64. Шефер, Т.В. Отягощение острых неврологических расстройств, вызванных циклофосфаном, при искусственном снижении рН химуса у крыс / Т.В. Шефер, В.Л. Рейнюк, В.Н. Малаховский, Ю.Ю. Ивницкий // Бюл. Эксперим. Биол. Мед. – 2012. – Т. 153, № 6. – С. 841-846.

65. Шефер, Т.В. Повышение циклофосфаном проницаемости тонкой кишки крыс для содержащихся в её просвете вещества средней молекулярной массы / Т.В. Шефер, В.Л. Рейнюк, К.А. Краснов, Ю.Ю. Ивницкий // Medline.Ru. – 2011. – Т.12, Ст. 118. – С. 1437-1449.

66. Шефер, Т.В. Патогенетические основы медикаментозной коррекции ранних проявлений острого резорбтивного действия ипритов. Развитие концепции эндотоксикоза: Автореф. дис. ... д -ра. мед. наук / Тимур Васильевич Шефер. – С.-Пб., 2015. – 44 с.

67. Aburto-Fernández, M.D.C. Secondary colonic necrosis. Case report. / M.D.C. Aburto-Fernández, A. Araujo-López, I.U. García-Godoy [et al.] // Cir Cir. – 2019. – V. 87, № S1. – P. 33-37.

68. Agostini, L. Faecal ammonia and pH during lactulose administration in man: comparison with other cathartics/ L. Agostini, P.F. Down, J. Murison [et al.] //bmj. – 1972. – V. 13, № 11. – P. 859-866.

69. Allen, R.G. Acute effects of gamma radiation in primates /R. G .Allen, F.A. Brown, L.C. Logie, [et al.] // Radiat. Res., 1960. – V. 12. – P. 532-559.

70. Alvarez, M. The immunomodulatory effect of oral NaHCO₃ is mediated by the splenic nerve: multivariate impact revealed by artificial neural networks / M. Alvarez, H. Alkaissi, A. Rieger, [et al.] // J. Neuroinflammation. – 2024. – V. 21, № 1. – P. 79-99.

71. Alves, N. Endothelial protrusions in junctional integrity and barrier function / N. Alves , Z. Motawe, S. Yuan [et al.] // Curr. Top. Membr. – 2018. – V. 82. – P. 93-140.

72. Anderson, L.W. Cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide / aldophosphamide kinetics in patients receiving high-dose cyclophosphamide

chemotherapy / L.W. Anderson, T. L. Chen, O.M. Colvin, [et al.] // Clin. Cancer Res. – 1996. – V. 2, № 9. – P. 1481-1487.

73. Bacigalupo, A. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions / A. Bacigalupo, K. Ballen, D. Rizzo [et al.] // Biol. Blood Marrow Transplant. – 2009. – V. 15, № 12. – P. 1628-1633.

74. Bensadoun, R. Amifostine in the management of radiation-induced mucositis/ R. Bensadoun, M. Schubert, R. Lalla [et al.] // Support. Care Cancer. – 2006. – V. 14, № 6. – P. 566-572.

75. Bested, A.C. Intestinal microbiota, probiotics and mental health: from Metchnikoff to modern advances: Part II – contemporary contextual research / A.C. Bested, A.C. Logan, E.M. Selhub // Gut Pathog. – 2013. – № 5. – P. 3.

76. Bhattacharya, R. Protective effects of amifostine and its analogues on sulfur mustard toxicity in vitro and in vivo / R. Bhattacharya, P. Rao, S. Pant [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2001. – V. 176. – P. 24-33.

77. Bjarnason, I. Intestinal permeability: an overview / I. Bjarnason, A. Macpherson, D. Hollander // Gastroenterology. – 1995. – V. 108. – P. 1566-1581.

78. Blijlevens, N. Identification of single nucleotide polymorphism in hematopoietic cell transplant patients affecting early recognition of, and response to, endotoxin / N. Blijlevens, C. Palmer, C. Mancuso [et al.] // Innate Immun. – 2014. – V. 205, № 7 – P. 697-711.

79. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Analyt. Biochem. – 1976. – V. 72. – P. 248-254.

80. Breiter, N. Effect of X-irradiation on the stomach of the rat / N. Breiter, K.R. Trott, T. Sassy // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 1989. – V.17, № 4. – P. 779-784.

81. Brown, G.C. The endotoxin hypothesis of neurodegeneration / G.C. Brown // J. Neuroinflammation. – 2019. – V. 16. – P. 180.

82. Buchholz, B.M. Membrane Tlr signaling mechanisms in the gastrointestinal tract during sepsis/ B.M. Buchholz, A.J. Bauer // *Neurogastroenterology and motility*. – 2010. – V. 22, № 3 – P. 232-245.

83. Cangemi, D. Gastroparesis: myths, misconceptions, and management/ D. Cangemi, B. Laci // *Clin. Exp. Gastroenterol.* – 2023. – V. 16. – P. 65-78.

84. Carr, M. A rat model of syngenic bone marrow transplantation during breast cancer therapy / M. Carr, M. Lerner, J. Hanas [et al.] // *Bone Marrow Translant.*– 2003. – V. 31, № 11. – P. 1037-1041.

85. Chang, J. Translational medicine in pulmonary-renal crosstalk: therapeutic targeting of p-Cresyl sulfate triggered nonspecific ROS and chemoattractans in dyspneic patients with uremic lung injury / J. Chang, S. Liang, P. Thanasekaran [et al.] // *J. Clin. Med.* – 2018. – V. 7, № 9. – P. 266.

86. Chapman, M.J. Gastrointestinal dysmotility: clinical consequences and management of the critically ill patient/ M.J. Chapman, N.Q. Nguyen, A.M. Deane // *Gastroenterol Clin North Am.* – 2011. – V. 40, № 4. – P.725-739.

87. Chaung, W.W. Recombinant human milk fat globule-EGF factor VIII (rhMFG-E8) as a therapy for sepsis after acute exposure to alcohol / W.W. Chaung, M. Brenner, H.-T. Yen [et al.] // *Mol Med Camb Mass.* – 2019. – V. 25, № 1. – P. 52.

88. Chen, C. Protective effect of amifostine on high-dose methotrexate-induced small intestinal mucositis in mice / C. Chen, L. Tian, M. Zhang [et al.] // *Dig. Dis. Sci.* – 2013. – V. 58. – P. 3134-3143.

89. Conard, R.A. Effect of X-irradiation on intestinal motility of the rat / R.A. Conard // *Am. J. Physiol.* – 1951. – V. 165, № 2. – P. 375-385.

90. Contractor, S.F. Protection against nitrogen mustard by cysteine and related substances, investigated using (3H)methyl-di-(2-chloroethyl)amine / S.F. Contractor // *Biochim. Pharmacol.* – 1963. – P. 821-832.

91. Cook, J.R. A double-label technique that monitors sulfur mustard damage to nuclei and mitochondria of normal human epidermal keratinocytes in vitro / J.R. Cook, R.G. Van Buskirk // *Toxicol. Pathol.* – 1997. – V. 25, № 5. – P. 481-486.

92. Correa, T. Regional venous-arterial CO₂ to arterial-venous O₂ content difference ratio in experimental circulatory shock and hypoxia / T. Correa, A. Pereira, J. Yakala [et al.] // *Intensive Care Exp.* – 2020. – V. 8, № 1. – P. 65.

93. Cosola, C. Microbiota metabolites: Pivotal players of cardiovascular damage in chronic kidney disease / C. Cosola, M.T. Rocchetti, A. Cupisti [et al.] // *Pharmacol. Res.* 2018. – V. 130. – P. 132-142.

94. Crenn, P. Messing Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction / P. Crenn, B. Messing, L. Cynober // *Clin. Nutr.* – 2008. – V. 27, № 3. – P. 328-329.

95. Dahlgren, D Chemotherapeutics-induced intestinal mucositis: pathophysiology and potential treatment strategies/ D. Dahlgren, M. Sjöblom, P. Hellström [et al.] // *Front Pharmacol.* – 2021. – V. 12, № 681417. – P. 1-12

96. Dawson, M.E. A wealth of options. Choosing an LAL test method / M.E. Dawson // Associates of Cape Cod, Inc., Woods Hole, Massachusetts. LAL Update. – 1985. – V. 13, № 3. – P. 1-6

97. Demacker, P.N. Plasma citrulline measurement using UPLC tandem mass-spectrometry to determine small intestinal enterocyte pathology / P.N. Demacker, A.M. Beijers, H. van Daal [et al.] // *J Chromatogr B Analyt Technol Bio- med.* – 2009. – V. 877, № 4. – P. 387-392

98. Di Paolo, D. Increased colonic permeability and lifestyles contributing factors to obesity and liver steatosis / D. Di Paolo, G. Garruti, A. Di Ciaula [et al.] // *Nutrients* – 2020. – V. 12, № 2. – P. 564.

99. Dorval, E.D. Effect of ionizing radiation on gastric secretion and gastric motility in monkeys / E.D. Dorval, G.P. Mueller, R.R. Eng [et al.] // *Gastroenterol.* – 1985. – V. 89, № 2. – P. 374-380

100. Driák, D. Morphological changes of rat jejunum after whole body gamma-irradiation and their impact in biodosimetry / D. Driák, J. Osterreicher, J. Vávrová [et al.] // *Physiol. Res.* – 2008. – V. 57, № 3. – P. 475-479.

101. Dunjic, A. On the subject of the protective action of cysteamine and cystamine in rats having received lethal doses of Myleran / A. Dunjic // *Pathol. Biol.* – 1966. – V. 14, № 9. – P. 554-558
102. Elli, L. Beneficial effects of treatment with transglutaminase inhibitor cystamine on the severity of inflammation in a rat model of inflammatory bowel disease / L. Elli, M. Ciulla, G. Busca [et al.] // *Lab. Invest.* – 2011. – V. 91, № 3. – P. 452-461
103. Ellman, G.L. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity / G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres [et al.] // *Biochemical Pharmacology.* – 1961. – V. 7. – P. 88-95.
104. Erickson, B.A. Altered motility causes the early gastrointestinal toxicity of irradiation / B.A. Erickson, M.F. Otterson, J.E. Moulder [et al.] // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 1994. – V. 28, № 4. – P. 905-912
105. Felipo, V. Neurobiology of ammonia / V. Felipo, R.F. Butterworth // *Prog. Neurobiol.* – 2002. – V. 67, № 4. – P. 259-279
106. François, A. Inflammation and immunity in radiation damage to the gut mucosa / A. François, F. Milliat, O. Guipaud [et al.] // *Biomed Res. Int.* – 2013. – P. 123241
107. Gad, Shayne C. Toxicology of the gastrointestinal tract / Shayne S. Gad. – Boca Raton-London-New York: CRC Press, 2007. – 384 p.
108. Goldenthail, E. A study of comparative protection against lethality of trimethylamine, nitrogen mustard, and X-irradiation in mice / E. Goldenthail, M. Nadkarni, P. Smith // *Radiat. Res.* – 1959. – V. 10, № 5. – P. 571-583
109. Gosselin, K.B. Serum citrulline as a biomarker of gastrointestinal function during hematopoietic cell transplantation in children/ K.B. Gosselin, H.A. Feldman, A.L. Sonis [et al.] // *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* – 2014. – V. 58, № 6. – P. 709-714.
110. Graziani, C. Intestinal permeability in physiological and pathological conditions: major determinants and assessment modalities / C. Graziani, C. Talocco, R. de Sire [et al.] // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2019. – V. 23. – P. 795-810

111. Grover, M. Gastroparesis: a turning point in understanding and treatment / M. Grover, F. Gianrico, V. Stanghellini // *Gut*. – 2019. – V. 68, № 12. – P. 2238-2250
112. Gryn, J. Pentostatin increases the acute toxicity of high dose cyclophosphamide / J. Gryn, R. Gordon, A. Bapat [et al.] // *Case Reports*. – 1993. – V.12, № 3. – P. 217-220
113. Guerbette, T. Saturated fatty acids differently affect mitochondrial function and intestinal epithelial barrier depending on their chain length in the in vitro model of IPEC-J2 enterocytes / T. Guerbette, V. Rioux, M. Bostoën [et al.] // *Front. Cell. Dev. Biol.* – 2024. – V. 12. – P.1266842.
114. Guinan, E. Prospective evaluation of gut mucosal barrier injury following various myeloablative regimens for haematopoietic stem cell transplant / E. Guinan, J. Donnelly, B. de Paun // *Bone Marrow Transplant* – 2005. – V. 35, № 7. – P. 707-711.
115. Guinan, E.C. Identification of single nucleotide polymorphisms in hematopoietic cell transplant patients affecting early recognition of, and response to, endotoxin/ E.C. Guinan, C.D. Palmer, C.J. Mancuso [et al.] // *Innate Immun* . – 2014. – V. 20, № 7. – P. 697-711.
116. Gurwara, S. Alcohol use alters the colonic mucosa-associated gut microbiota in humans / S. Gurwara, A. Dai, N. Ajami [et al.] // *Nutr. Res.* – 2020. – V.83. – P. 119-128.
117. Gutmann, I. *Methods of enzymatic Analysis*/ I. Gutmann, H.U. Bergmeyer. – NY.: Academic Press, 1974. – Vol. 4. – P.1794-1798.
118. Heda, R. *Physiology, pepsin*/ R. Heda, F. Toro, C.R. Tombazzi. – StatPearls Publishing, 2024. – PMID: 30725690.
119. Horioka, K. Acute Colchicine Poisoning Causes Endotoxemia via the Destruction of Intestinal Barrier Function: The Curative Effect of Endotoxin Prevention in a Murine Model / K. Horioka, H. Tanaka, S. Isozaki [et al.]// *Dig Dis Sci*. – 2020. – V. 65, № 1. – P. 132-140.

120. Horn, C.C. Why can't rodents vomit? A comparative behavioral, anatomical and physiological study / C.C. Horn, B.A. Kimbal, Hong Wang [et al.] // PLOS One. – 2013. – V. 8, № 4. – P. 1-16.

121. Hothorn T. Simultaneous inference in general parametric models / T. Hothorn, F. Bretz, P. Westfall // Biometr. J. – 2008. – V. 50, № 3. – P. 346 – 363

122. Ijiri, K. Response of intestinal cells of different topographical and hierarchical status to ten cytotoxic drugs and five sources of radiation / K. Ijiri, C. Potten // Brit. J. Cancer. 1983. – V. 47, № 2. – P. 175-185.

123. Ishii, Y. Gastric acid stimulating action of cysteamine in the rat / Y. Ishii, Y. Fujii, M. Homma // Eur. J. Pharmacol. – 1976. – V. 36, № 2. – P. 331-336.

124. Ivnitsky, Ju.Ju. Fulminant hyperammonaemia induced by thiopental coma in rats / J.J. Ivnitsky, V.R. Rejniuk, T.V. Schäfer [et al.] // Toxicology. – 2006. – V. 224, № 3. – P. 184- 190.

125. Ivnitsky, Ju.Ju. Succinate and artificial maintenance of normal body temperature synergistically correct lethal disorders in thiopental coma rat / Ju.Ju. Ivnitsky, V.L. Rejniuk, T.V. Schäfer [et al.] // Toxicology. – 2006. – V. 218, № 1. – P.22-29.

126. Ivnitsky, Ju.Ju. Endogenous humoral determinants of vascular endothelial dysfunction as triggers of acute poisoning complications / Ju.Ju. Ivnitsky, T.V. Schäfer, V.L. Rejniuk [et al.] // J. Appl. Toxicol. – 2023. – V.43. – P. 47-65.

127. Jacobse, J. Long-term aprepitant for nausea and vomiting associated with gastroparesis in hematopoietic cell transplantation / J. Jacobse, H. Mensink, M. Eileen [et al.] // Bone Marrow Transplantation. – 2018. – V.53, № 10. – P. 1372-1374.

128. Jadhav, K. Can you trust your gut? Implicating a disrupted intestinal microbiome in the progression of NAFLD/NASH / K. Jadhav, T. Cohen // Front. Endocrinol. (Lausanne) – 2020. – V. 11. – P. 592157.

129. Jalan, R. The molecular pathogenesis of hepatic encephalopathy / R. Jalan, D. Shawcross, N. Davies // Int. J. Biochem. Cell. Biol. – 2003. – V. 35, № 8. – P. 1175-1181.

130. Jiang, Y. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of intestines in murine polymicrobial sepsis with hydrogen gas treatment / Y. Jiang, Y. Bian, N. Lian [et al.] // *Drug Des. Devel. Ther.* – 2020. – V. 14. – P. 4885-4900.

131. Johansson, J-E. Gut protection by palifermin during autologous haematopoietic SCT / J.-E. Johansson, B. Hasséus, P. Johansson [et al.] // *Bone Marrow Transplant.* – 2009. – V. 43, № 10. – P. 807-811.

132. Kamiya, A. Administration of cyclophosphamide to rats induces pica and potentiates 5-hydroxytryptamine synthesis in the intestine without causing severe intestinal injury / A. Kamiya, T. Machida, M. Hirano [et al.] // *J. Pharmacol. Sci.* – 2021. – V. 147, № 3. – P. 251-259.

133. Khyzhnyak, S.V. Oxidative phosphorylation in mitochondria of small-intestinal enterocytes at chronic and single exposure to low power ionizing radiation. / S.V. Khyzhnyak, L.K. Bezdobna, L.I. Stepanova [et al.] // *Probl Rad Med Radiobiol.* – 2014. – V. 19. – P. 482–489.

134. Kim, Y-S. The effect of mitochondrial transplantation on sepsis depend on the type of cell from which they are isolated / Y-S. Kim, H. Lee, M. Lee [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – V. 24, № 12. – P. 10113.

135. Kim, K. Feeding diets containing high levels of milk products or cellulose decrease urease activity and ammonia production in rat intestine / K. Kim, W. Lee, N.J. Benevenga // *J. Nutr.* – 1998. – V. 128. – P. 1186-1191.

136. Konuma, T. Total body irradiation-based versus busulfan-based myeloablative conditioning for single-unit cord blood transplantation in adults / T. Konuma, J. Ooi, M. Oiwa [et al.] // *Leuk. Lymphoma.* – 2021. – V. 63, № 5. – P. 1191-1201.

137. Kühn, F. Targeting the intestinal barrier to prevent gut-derived inflammation and disease: a role for intestinal alkaline phosphatase / F. Kühn, R. Duan, M. Ilmer [et al.] // *Visc. Med.* – 2021. – V. 37, № 5. – P. 383-393.

138. Kuris, G. Human aldehyde dehydrogenase / G. Kuris, W. Ambroziak, R. Pietruszko // *J. Biol. Chem.* – 1989. – V. 264, № 8. – P. 4715-4721.

139. Lallès, J.-P. Recent advances in intestinal alkaline phosphatase, inflammation, and nutrition / J.-P. Lallès // *Nutrit. Rev.* – 2019. – V. 77, № 10. – P. 710-724.

140. Lapierre, A. Tumor and normal tissue radiosensitivity / A. Lapierre, S. Gourgou, M. Brengues [et al.] // *Cancer Radiother.* – 2022. – V. 26, №. 1-2. – P. 96-103.

141. Larionov, L.F. The protective effect of AET, cystamine and cystaphos when using lethal doses of antineoplastic drugs / L.F. Larionov, I.G. Spasskaia // *Vopr. Onkol.* – 1968. – V. 14, № 12. – P. 33-39.

142. Lian, P. Beyond heat stress: intestinal integrity disruption and mechanism-based intervention strategies/ P. Lian, S. Braber, J. Garssen [et al.] // *Nutrients.* – 2020. – V. 12, № 3. – P. 734.

143. Lim, D. Lipocalin2 induced by bacterial flagellin protects mice against cyclophosphamide mediated neutropenic sepsis / D. Lim, H. Kim, J. Jeong [et al.] // *Microorganisms.* – 2020. – V. 8. – P. 646.

144. Lin, H. Bacterial concepts in irritable bowel syndrome / H. Lin, M. Pimentel // *Rev. Gastroenterol. Dis.* – 2005. – V. 5. – P. S3-S9.

145. Lin, C.J. Indoxyl sulfate impairs endothelial progenitor cells and might contribute to vascular dysfunction in patients with chronic kidney disease / C.J. Lin, C.J. Wu, P.C. Wu [et al.] // *Kidney Blood Press Res.* – 2016. – V. 41, № 6. – P. 1025-1036.

146. Liu, S. The concept revolution of gut barrier: from epithelium to endothelium / S. Liu, P. Song, F. Sun [et al.] // *Int. Rev. Immunol.* – 2021. – V. 40, № 6.– P. 401-408.

147. Livanova, A.A. Dose and time dependence of functional impairments in rat jejunum following ionizing radiation exposure / A.A. Livanova, A.A. Fedorova, A.V. Zavirsky [et al.] // *Physiol. Reports.* – 2021. – V.15. – P. e14960.

148. Lopetuso, L.R. The therapeutic management of gut barrier leaking: the emerging role for mucosal barrier protectors / L.R. Lopetuso, F. Scaldaferrri, G. Bruno [et al.] // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2015. – V. 19, № 6. – P. 1068-1076.

149. Lorenz, E. Modification of acute irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections / E. Lorenz, C Congdon, D. Uphoff // *Radiology.* – 1952. – V. 58, № 6. – P. 863-887.

150. Lutgens, L. Monitoring myeloablative therapy-induced small bowel toxicity by serum citrulline concentration: a comparison with sugar permeability tests / L. Lutgens, N. Blijlevens, N. Deutz [et al.] // *Clinical Trial.* – 2005. – V. 103, № 1. – P. 191-199.

151. Lychkova, A.E. Gradients of serotonergic innervation of the large intestine/ A.E. Lychkova // *Bull Exp Biol Med* 1. – 2005. – V. 139 – P. 550-553.

152. Mann, H.B. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other / H.B. Mann, D.R. Whitney // *Ann. Math. Stat.* – 1947. – V. 18. – P. 50-60.

153. Markov, A.G. Circulating ouabain modulates expression of claudins in rat intestine and cerebral blood vessels / A.G. Markov, A.A. Fedorova, V.V. Kravtsova [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21, № 14. – P. 5067.

154. Matkevich, V.A. The role of intestinal translocation in the origin of endotoxemia in acute poisoning and detoxification effect of intestinal lavage/ V.A. Matkevich, E.A. Luzhnikov, M.V. Belova [et al.] // *Russ Sklifosovsky J Emerg Med Care.* – 2015, – V. 4. – P. 16-21.

155. Matkevich, V.A. Violations of homeostasis parameters in acute poisonings and ways of their correction / V.A. Matkevich, M.M. Potskhveriya, Yu.S. Goldfarb [et al.] // *Toxicol Rev.* – 2018. – V. 3. – P. 18-26.

156. Matsumoto, T. Acute exposure to indoxyl sulfate impairs endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta / T. Matsumoto, K. Takayanagi, M. Kojima [et al.] // *Int. J. Med. Sci.* – 2019. – V. 20, № 2. – P. 338.

157. McCune, J.S. Cyclophosphamide following targeted oral busulfan as conditioning for hematopoietic cell transplantation: pharmacokinetics, liver toxicity, and mortality / J.S. McCune, A. Batchelder, H.J. Deeg [et al.] // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2007. – V. 13. – P. 853-862.

158. McMillen, K. Optimization of nutrition support practices after hematopoietic cell transplantations / K. McMillen, T. Coghlin-Dickson, P. Adintori // *Bone Marrow Transplant.* – 2020. – V. 56, №. 10. – P. 314-326.

159. Miura, Y. Studies on the metabolism of rat-ascites-tumor with nitrogen mustard sensitive and resistant strains. II. On the oxygen consumption and oxydative phosphorylation / Y. Miura, N. Okamoto, M. Goto // *J. Biochem.* – 1961. – V. 49. – P. 508-513.

160. Mole, R.H. The effect of X-irradiation on the basal oxygen consumption of the rat / R.H. Mole // *Q.J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.* – 1953. – V. 38, №.2. – P. 69-74.

161. Nežic, L. Protective effects of simivastin on tndotoxin-induced acute kidney injury through activation of tubular epithelial cells' survival and hibdering cytochrome C- mediated apoptosis / L. Nežic, R. Škrbic, L. Amidžic [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – P. 7236.

162. O'Grady, J. Defining gastrointestinal transit time using video capsule endoscopy: a study of healthy subjects/ J. O'Grady, C.L. Murphy, L. Burry[et al.]// *Endosc. Int. Open.* – 2020. – V. 8, № 3. – P. E396-E400.

163. Okubo, S. Clinical and experimental studies on DIC found in carcinoma; correlation between anti-cancer drug administration and endotoxemia / S. Okubo, K. Yasunaga // *Gan No Rinsho.* – 1983. – V. 29, № 7. – P. 803-806.

164. Otterson, M.F. Effects of radiation upon gastrointestinal motility / M.F. Otterson // *World J. Gastroenterol.* – 2007. – V.13, № 19. – P. 2684-2692.

165. Patel, R.A. clash of quorum sensing vs quorum sensing inhibitors: an overview and risk of resistance / R. Patel, M. Soni, B. Soyantar [et al.]// *Arch Microbiol.* – 2023. – V. 205, № 4. – P. 107.

166. Pontoppidan, P. Associations between gastrointestinal toxicity, micro RNA and cytokine production in patients undergoing myeloablative allogenic stem cell transplantation / P. Pontoppidan, K. Jordan, A. Carisen [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2015. – V. 25, № 1. – P. 180-188.

167. Poulsen S. Role of delayed gastric emptying in the pathogenesis of cysteamine-induced duodenal ulcer in the rat / S. Poulsen, P. Kirkegaard, P. Olsen [et al.] // *Scand. J. Gastroenterol.* – 1982. – V. 17, № 3. – P. 325-330.

168. Qian, X. Successful umbilical cord blood transplantation in children with leukocyte adhesion deficiency type 1 / X. Qian, P. Wang, H. Wang [et al.] // *Transl. Pediatr.* – 2020. – V. 9, № 1. – P. 34-42.

169. R: A language and environment for statistical computing / R Core Team. – Vienna: R Foundation for Statistical Computing [Electronic resource]. – 2014. – Available at: <http://www.r-project.org/>

170. Rajewsky, B. *Strahlendosis und Strahlenwirkung*/ B. Rajewsky. – Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1956. – 280 p.

171. Ramzi, M. Evaluation of reversed administration order of busulfan (Bu) and cyclophosphamide (CY) as conditioning on liver toxicity in allogenic hematopoietic stem cell transplantation (ALL-HSTT) / M. Ramzi, N. Namdari, S. Haghighat [et al.] // *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res.* – 2020. – V. 4, № 3. – P. 171-176.

172. Rao, J.N. Regulation of gastrointestinal mucosal growth/ J.N. Rao, J.Y. Wang // San Rafael: Morgan and Claypool Life Sciences. – 2010. – PMID: 21634069

173. Ray, S. Oral NaHCO₃ activates a splenic anti-inflammatory pathway: evidence that cholinergic signals are transmitted via mesothelial cells / S. Ray, B. Baban, M. Tucker [et al.] // *J. Immunol.* – 2018. – V. 200, № 10. – P. 3568-3586.

174. *Role of gut bacteria in human toxicology and pharmacology* / edited by M.J. Hill. – UK: Taylor & Francis, 2005. – 280 p.

175. Romanski, M. Disposition of treosulfan and its active monoepoxide in a bone marrow, liver, lungs, brain, and muscle: studies in a rat model with clinical

relevance / M. Romanski, A. Kasprzyk, M. Walczak. [et al.]// Eur. J. Pharm. Sci. – 2017. – V. 109. – P. 616-623.

176. Russ, M. Surfactant depletion combined with injurious ventilation results in a reproducible model of the acute respiratory distress syndrome (ARDS) / M. Russ, E. Boerger, P. von Platen [et al.] // J. Vis. Exp. – 2021. – V. 7, № 170. – P. e62327.

177. Sahu, K. Crosstalk between anticancer drugs and mitochondrial functions / K. Sahu, U. Langeh, C. Singh [et al.] // Curr. Res. Pharmacol. Drug Discov. – 2021. – № 2. – P. 100047.

178. Samuelsen, A.B. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. F review / A.B. Samuelsen // J. Ethnopharmacology. – 2000. – V. 71. – P. 1-21.

179. Sangild, P.T. Animal models of chemotherapy-induced mucositis: translational relevance and challenges / P.T. Sangild, R.L. Shen, P. Pontoppidan [et al.]// Am. J. Physiol. Gastrointest. Tract Liver. – 2017. – V. 314, № 2. – P. G231-G246.

180. Saxena, A. Reduced intestinal epithelial mitochondrial function enhances in vitro interleukin-8 production in response to commensal *Escherichia coli* / A. Saxena, F. Lopes, D.M. McKay // Inflamm Res. – 2018. – V. 67, №. 10 – P.829–837.

181. Selby, P. Cyclophosphamide priming reduces intestinal damage in man following high dose melphalan chemotherapy / P. Selby, N. Lopes, J. Mundy [et al.] // Br. J. Cancer. – 1987. – V. 55. – P. 531-533.

182. Sender, R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body / R. Sender, S. Fuchs. // PLoS Biol. – 2016. – V. 14, № 8. – P. e1002533.

183. Seydoux, C. Busulfan-cyclophosphamide versus cyclophosphamide-busulfan as conditioning regimen before allogeneic hematopoietic cell transplantation: a prospective randomized trial/ C. Seydoux, M. Medinger, S. Gerull [et al.]// Ann. Hematol. – 2021. – V. 100, № 1. – P. 209-216.

184. Shendi, A. Systemic endotoxin in peritoneal dialysis patients/ A. Shendi, N. Davies, A. Davenport // Perit Dial Int. – 2018. – V. 38, № 5. – P. 381-384.

185. Shi, K. Gut bacterial translocation may aggravate microinflammation in hemodialysis patients / K. Shi, F. Wang, H. Jiang [et al.] // *Dig. Dis. Sci.* – 2014. – V. 59. – P. 2109-2117.

186. Shivarudraiah, M. Acute severe gastroparesis (mega-stomach), an unusual complication of autologous stem cell transplant: a case report / M. Shivarudraiah, A. Patel, S. Singh // *Canc. Res., Statistics Treat.* – 2022 – V. 5, № 3. – P. 584-587.

187. Sine, J.P. Presence and characterization of acetylcholinesterase in brush-border and basolateral membranes of rabbit enterocytes/ J.P. Sine, B. Coals // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – V. 817, № 1. – P. 190-192.

188. Sine, J.P. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the gut mucosal cells of various mammal species: distribution along the intestine and molecular forms / J.P. Sine, R. Ferrand, B. Colas // *Compar. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol. Toxicol.* – 1988. – V. 91, № 2. – P. 597-602.

189. Smirnov, A.D. Modifying effect of cystamine in some mutagenic influences on the human organism / A.D. Smirnov // *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* – 1971. – V. 199, № 4. – P. 937-939.

190. Sole, C. Alterations in gut microbiome in cirrhosis as assessed by quantitative metagenomics: relationship with acute-on chronic liver failure and prognosis / C. Sole, S. Guilly, K. Da Silva [et al.]// *Gastroenterology.* – 2020. – V. 160, № 1. – P. 206-218.

191. Somosy, Z. Morphological aspects of ionizing radiation response of small intestine / Z. Somosy, G. Horváth, A. Telbisz [et al.]// *Micron.* – 2002. – V. 33, № 2. – P. 167-178.

192. Sougiannis, A. Understanding chemotherapy-induced intestinal mucositis and strategies to improve gut resilience / A. Sougiannis, B. VanderVeen, A. Murphy // *Am. J. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2021. – V. 320, № 2. – P. G712-G719.

193. Subissi, A. Effect of spasmolytics on K⁺-induced contraction of rat intestine in vivo / A. Subissi, P. Brunori, M. Bachi // *Eur. J. Pharmacol.* – 1983. – V. 96, № 3-4. – P. 295-301.

194. Sunil, V. Impaired energy metabolism and altered functional activity of alveolar type II epithelial cell following exposure of rats to nitrogen mustard / V. Sunil, K. Vayas, J. Radbel // *Toxicol Appl. Pharmacol.* – 2022. – V. 456. – P. 116257.

195. Tanaka H. Role of accumulated gastric content in the pathogenesis of cysteamine- and mepirizole-induced duodenal ulcers in the rat / H. Tanaka, K. Takeuchi, S. Okabe // *J. Intern. Med. Suppl.* – 1990. – V.732. – P. 69-75.

196. Tang, W. Gut microbiota in cardiovascular health and disease / W. Tang, T. Kitai, L. Hazen // *Circ. Res.* – 2017. – V. 120, N 7. – P. 1183-1196.

197. Therneau, T.A. A package for survival analysis in S.R. package version 2.37-4 [Electronic resource]. – 2013. – Available at: <http://cran.r-project.org/package=survival>.

198. Thome, T. Uremic metabolites impair skeletal muscle mitochondrial energetics through disruption of the electron transport system and matrix dehydrogenase activity / T. Thome, Z. Salyers, R. Kumar [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2019. – V. 317, № 4. – P. 701-713.

199. Tieze, L. Proton-mediated liberation of aldophosphamide from a nontoxic prodrug: a strategy for tumor-selective activation of cytotoxic drug / L. Tieze, M. Neumann, R. Fischer [et al.] // *Cancer Res.* – 1989. – V. 49, № 15. – P. 4179-4184.

200. Tornai, D. A novel score of IL-13 and age predicts 90-day mortality in severe alcohol-associated hepatitis: a multicenter plasma biomarker analysis/ D. Tornai, M. Mitchell, C. McClain [et al.] // *Hepatol Commun.* – 2023. – V. 7, № 12. – P. e0296.

201. *Toxicology of the gastrointestinal tract* / edited by Shayne C. Gad. – Boca Raton, L., N.Y.: Taylor & Francis Group, 2007. – 384 p.

202. Ulrich, E.M. EPA's non-targeted analysis collaborative trial (ENTACT): genesis, design, and initial findings / E.M. Ulrich, J.R. Sobus, C.M. Grulke [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* – 2018. – V. 411 – P.853-866.

203. Uno, Y. Hypothesis: Mechanism of irritable bowel syndrome in inflammatory bowel disease / Y. Uno // *Med Hypotheses.* – 2019. – V. 132 – P. 109324.

204. Usai-Satta, P. Gastroparesis: new insights into an old disease/ P. Usai-Satta , M. Bellini, O. Morelli [et al.]// World J. Gastroenterol. – 2020. – V. 26, № 19. – P. 2333-2348.
205. Visek, W.J. Effects of urea hydrolysis on cell life-span and metabolism/ W.J. Visek //Fed Proc. – 1972. – V. 31, № 3. – P. 1178-1193.
206. Visnovsky, P. The effect of cyclophosphamide and methotrexate on gastric emptying and secretion in rats/ P. Visnovsky // Bratisl. Lek. Listy. – 1992. – V.93, № 2. – P. 90-92.
207. Visser, J. Restoration of impaired intestinal barrier function by hydrolysed casein diet contributes to the prevention of vtype 1 diabetes in the diabetes-prone BioBreeding rat / J. Visser, A. Lammers, A. Hoogendijk [et al.] // Diabetologia.– 2010. – V. 53. –P. 2621-2628.
208. Vladimirov, V.G. Mechanisms of the protective action of sulfur-containing radioprotectors on the intestinal erithelium / V.G. Vladimirov, E.V. Grigor'eva // Radiobiologiia. – 1990. – V. 30, № 3. – P. 348-352.
209. Vutukuri, R. Alteration of sphingolipid metabolism as a putative mechanism underlying LPS-induced BBB disruption / R. Vutukuri, R. Brunkhorst, R. Kestner[et al.] // J. Neurochem. – 2018. – V. 144. – P. 172–185.
210. Wang, J. Total body irradiation in the “Hematopoietic” dose range induces substantial intestinal injury in non-human primates / J. Wang, H. Hendrickson, L. Liu [et al.]// Radiat. Res. – 2015. – V. 184. – P. 545-553.
211. Wang, L. Ablation of endothelial Pfkfb3 protects mice from acute lung injury in LPS-induced endotoxemia / L. Wang, Y. Cao, B. Gorshcov [et al.] // Pharmacol. Res. – 2019. – V. 146. – P. 104292.
212. Wells, M. Radiation induced gram negative bacteremia and endotoxemia in rabbits: modification by anti-lipopolysaccharide hyperimmune equine plasma / M. Wells, S. Gaffin, J. Jordaan // Life Sci. – 1987. – V. 40, № 26. – P. 2543-2550.

213. Wenqin, D. Armillariella oral solution ameliorates small intestinal damage in a mouse model of chemotherapy-induced mucositis / D. Wenqin, Z. Yaodong, S. Wanji [et al.] // *Nutr. Cancer.* – 2019. – V. 71, № 7. – P. 1142-1152.

214. Wick, M. An optimized Evans blue protocol to assess vascular leak in the mouse / M. Wick, J. Herral, Z. Loomis [et al.] // *J. Vis. Exp.* – 2018. – V. 139. – P. 57037.

215. Widerman, R.F. Intravenous endotoxin triggers pulmonary vasoconstriction and pulmonary hypertension in broiler chickens / R.F. Widerman, G.F. Erf, M.E. Chapman // *Poult. Sci.* – 2001. – V. 80, № 5. – P. 647-655.

216. Wilms, E. The impact of pectin supplementation on intestinal barrier function in healthy young and healthy elderly / E. Wilms, J. Donkers, H. Savelkoul [et al.] // *Nutrients.* – 2019. – V. 11, № 7. – P. 1554.

217. Yang, L Effects of ketoconazole on cyclophosphamide metabolism: evaluation of CYP3A4 inhibition effect using the in vitro and in vivo models / L. Yang, C. Yan, F. Zhang [et al.] // *Exp. Anim.* – 2018. – V. 67, N 1. – P. 71-82.

218. Yeo, I. Antifungal drug miconazole ameliorated memory deficit in a mouse model of LPS-induced memory loss through targeting iNOS / I. Yeo, J. Yun, D. Son [et al.] // *Cell. Death Dis.* – 2020. – V. 11, № 8. – P. 623.

219. Zhang, L.S. Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions / L.S. Zhang, S.S. Davis // *Genome Med.* – 2016. – V. 8, № 1. – P. 46.

220. Zhao, J. Serum ammonia levels on admission for predicting sepsis patient mortality at D28 in the emergency department: A 2-center retrospective study/ J. Zhao, Y. He, P. Xu [et al.] // *Medicine (Baltimore).* – 2020. – V. 99, № 11. – P. e19477.

221. Zheng, T. Management of gastroparesis / T. Zheng, M. Camilleri // *Gastroenterol. Hepatol.* – 2021. – V. 17, № 11. – P. 515-525.

222. Zhou, W. Implication of gut microbiota in cardiovascular diseases / W. Zhou, Y. Cheng, P. Zhu [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2020. – PMID: 33062141.

223. Zijlstra, F. Effect of pharmacologically induced smooth muscle activation on permeability in murine colitis / F. Zijlstra, M. van Meeteren, I. Gareldis [et al.] // *Mediators Inflamm.* – 2003. – V. 12, № 1. – P. 21-27.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

FeCl ₃	— хлорид железа
HCl	— соляная кислота
LAL	— <i>Limulus ameobocyte lysate</i> , лизат амёбоцитов мечехвостов рода <i>Limulus</i>
LD _{16/N сут.}	— доза вещества или излучения, соответствующая 16% летальности в срок, указанный после знака « / »
LD _{50/N сут.}	— доза вещества или излучения, соответствующая 50% летальности в срок, указанный после знака « / »
LD _{84/N сут.}	— доза вещества или излучения, соответствующая 84% летальности в срок, указанный после знака « / »
LD _{99/N сут.}	— доза вещества или излучения, соответствующая 99% летальности в срок, указанный после знака « / »
M	— среднее арифметическое значение
m	— средняя ошибка среднего арифметического значения
NaCl	— хлорид натрия
NaHCO ₃	— гидрокарбонат натрия
NH ₃	— аммиак (неионизированная форма)
NH ₄ ⁺	— аммиак (ионизированная форма)
pH	— водородный показатель
Q _{O₂}	— интенсивность потребления кислорода организмом (в уравнениях)
Rö-	— рентгеновский (-ская, -ское)
АЦХ	— ацетилхолинэстераза
БАД	— биологически активная добавка
в. б.	— внутрибрюшинное введение
в. в.	— внутривенное введение
в. м.	— внутримышечное введение
в. ж.	— внутрижелудочное введение
ГДГ	— глутаматдегидрогеназа

- ГКН — гидрокарбонат натрия
- ГЭБ — гематоэнцефалический барьер
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЖКТ — желудочно-кишечный тракт
- ЖКС — желудочно-кишечный стаз
- ЛП — лекарственный препарат
- ОМХ — относительная масса желудочного химуса
- п. к. — подкожное введение
- ПЭГ — полиэтиленгликоль
- СДА — спонтанная двигательная активность
- СПЖ — средняя продолжительность жизни
- ТХУ — трихлоруксусная кислота
- ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова федерального медико-биологического агентства»
- ФИД — фактор изменения дозы
- ХЭ — холинэстераза
- ЦНС — центральная нервная система
- ЦФ — циклофосфамид
- ЧДД — частота дыхательных движений
- ЩФ — щелочная фосфатаза
- ЭГБ — энтерогематический барьер
- ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ТЕРМИНОВ

Гастроэнтеротоксичность: способность физического, химического или биологического агента, действуя немеханическим путём на желудочно-кишечный тракт, вызывать его повреждение.

Гипераммония: циркуляция в крови аммиака в концентрации, превышающей нормальную.

Инттоксикация: патологическое состояние организма, вызванное нарушением химического гомеостаза вследствие действия токсичных веществ экзогенного и (или) эндогенного происхождения.

Иприты: бис- β -галогенированные тиоэфиры и бис(трис)- β -галогенированные вторичные и третичные N-алкиламины.

Кишечный синдром: совокупность клинических проявлений острой гастроэнтеротоксичности миелоабляционных агентов.

Кондиционирование: подавление кроветворения реципиента для последующей пересадки ему аллогенных стволовых кроветворных клеток.

Костномозговой синдром: совокупность клинических проявлений панцитопении лучевой или химической этиологии.

Лечение (терапия): мероприятия, осуществляемые медицинским персоналом, направленные на противодействие патологическому процессу.

Миелоабляция: уничтожение с помощью цитостатических агентов стволового и пролиферативного клеточных пулов кроветворной системы, ведущее к необратимой панцитопении.

Люминальный: находящийся в просвете, ограниченный стенками.

Общее облучение: облучение всего тела

Однократное облучение: облучение за время, не превышающее 4 суток

Острая токсичность: токсикометрическая характеристика вещества, отражающая его способность вызывать гибель животных при однократном или неоднократном (в течение не более чем суток) введении

Относительно равномерное облучение: облучение, при котором поглощённые дозы излучения в наиболее и наименее облучённой точках тела различаются не более чем втрое

Панцитопения: функционально недостаточное содержание в крови форменных элементов вследствие истощения пула созревающих клеток кроветворной системы

Равномерное облучение: облучение, при котором поглощённые дозы излучения в наиболее и наименее облучённой точках тела различаются не более чем на 10 %

Скрининг: стратегия научного исследования направленная на выявление фармакологической активности у ряда веществ.

Токсемия: накопление в крови биологически активных веществ в токсических концентрациях.

Токсикант: вещество, действуя на биологические системы немеханическим путём, вызывает их повреждение или гибель.

Токсикоз: совокупность клинических проявлений токсемии.

Химус: содержимое желудка и кишечника.

Эндотоксемия: накопление в крови биологически активных эндогенных веществ (в том числе продуктов жизнедеятельности симбионтной микрофлоры).

Эндотоксикоз: совокупность клинических проявлений эндотоксемии.

Эндотоксин: сумма липополисахаридов внешней стенки грамотрицательных бактерий.

Эндотоксинемия: накопление в крови эндотоксина.