

Медико-биологические проблемы жизнедеятельности

Научно-практический рецензируемый журнал

№ 1(9)

2013 г.

Учредитель

Государственное учреждение
«Республиканский научно-
практический центр
радиационной медицины
и экологии человека»

Журнал включен в:

- Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования диссертационных исследований по медицинской и биологической отраслям науки (31.12.2009, протокол 25/1)
- Перечень журналов и изданий ВАК Минобрнауки РФ (редакция май 2012г.)

Журнал зарегистрирован

Министерством информации
Республики Беларусь,
Свид. № 762 от 6.11.2009

Подписано в печать 29.04.13.
Формат 60×90/8. Бумага офсетная.
Гарнитура «Times New Roman».
Печать цифровая. Тираж 211 экз.
Усл. печ. л. 18,9. Уч.-изд. л. 16,2.
Зак. 1178.

Издатель ГУ «Республиканский
научно-практический центр
радиационной медицины и экологии
человека»
ЛИ № 02330/619 от 3.01.2007 г.,
продлена до 03.01.2017

Отпечатано в Филиале БОРБИЦ
РНИУП «Институт радиологии».
220112, г. Минск,
ул. Шпилевского, 59, помещение 7Н

ISSN 2074-2088

Главный редактор

А.В. Рожко (д.м.н., доцент)

Редакционная коллегия

В.С. Аверин (д.б.н., зам. гл. редактора), В.В. Аничкин (д.м.н., профессор), В.Н. Беляковский (д.м.н., профессор), Ю.В. Висенберг (к.б.н., отв. секретарь), Н.Г. Власова (к.б.н., доцент), А.В. Величко (к.м.н., доцент), В.В. Евсеенко (к.п.с.н.), С.А. Игумнов (д.м.н., профессор), А.В. Коротаев (к.м.н.), А.Н. Лызииков (д.м.н., профессор), А.В. Макарчик (к.м.н., доцент), С.Б. Мельнов (д.б.н., профессор), Э.А. Надыров (к.м.н., доцент), И.А. Новикова (д.м.н., профессор), Э.Н. Платошкин (к.м.н., доцент), Э.А. Повелица (к.м.н.), Ю.И. Рожко (к.м.н.), М.Г. Русаленко (к.м.н.), А.Е. Силин (к.б.н.), А.Н. Стожаров (д.б.н., профессор), О.В. Черныш (к.м.н.), А.Н. Цуканов (к.м.н.), Н.И. Шевченко (к.б.н.)

Редакционный совет

А.В. Аклеев (д.м.н., профессор, Челябинск), С.С. Алексинин (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Д.А. Базыка (д.м.н., профессор, Киев), А.П. Бирюков (д.м.н., профессор, Москва), А.Ю. Бушманов (д.м.н., профессор, Москва), И.И. Дедов (д.м.н., академик РАМН, Москва), Ю.Е. Демидчик (д.м.н., член-корреспондент НАН РБ, Минск), В.И. Жарко (министр здравоохранения Республика Беларусь, Минск), М.П. Захарченко (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Л.А. Ильин (д.м.н., академик РАМН, Москва), Я.Э. Кенигсберг (д.б.н., профессор, Минск), К.В. Котенко (д.м.н., профессор, Москва), В.Ю. Кравцов (д.б.н., профессор, Санкт-Петербург), Н.Г. Кручинский (д.м.н., Минск), Т.В. Мохорт (д.м.н., профессор, Минск), Д.Л. Пиневиц (Минск), В.Ю. Рыбников (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), В.П. Сытый (д.м.н., профессор, Минск), Н.Д. Тронько (д.м.н., профессор, Киев), В.П. Филонов (д.м.н., профессор), В.А. Филонюк (к.м.н., доцент, Минск), А.Ф. Цыб (д.м.н., академик РАМН, Обнинск), Р.А. Часнойть (к.э.н., Минск), В.Е. Шевчук (к.м.н., Минск)

Технический редактор

С.Н. Никонович

Адрес редакции

246040 г. Гомель, ул. Ильича, д. 290,
ГУ «РНИЦ РМ и ЭЧ», редакция журнала
тел (0232) 38-95-00, факс (0232) 37-80-97
<http://www.mbr.rcrm.by> e-mail: mbr@rcrm.by

© Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический
центр радиационной медицины и
экологии человека», 2013

№ 1(9)

2013

Medical and Biological Problems of Life Activity

Scientific and Practical Journal

Founder

Republican Research Centre
for Radiation Medicine
and Human Ecology

Journal registration
by the Ministry of information
of Republic of Belarus

Certificate № 762 of 6.11.2009

© Republican Research Centre
for Radiation Medicine
and Human Ecology

ISSN 2074-2088

Обзоры и проблемные статьи

- А.Н. Котеров, А.П. Бирюков**
Неоднозначность связи между повышением уровня цитогенетических повреждений и риском развития рака 6
- А.С. Подгорная, Т.С. Дивакова**
Современные технологии в лечении меноррагий у женщин 23
- А.Ф. Цыб, Е.В. Абакушина, Д.Н. Абакушин, Ю.С. Романко**
Ионизирующее излучение как фактор риска развития лучевой катаракты 34

Медико-биологические проблемы

- К.Н. Апсаликов, Т.Ж. Мулдагалиев, Т.И. Белихина, З.А. Танатова, Л.Б. Кенжина**
Анализ и ретроспективная оценка результатов цитогенетических обследований населения Казахстана, подвергавшегося радиационному воздействию в результате испытаний ядерного оружия на Семипалатинском полигоне, и их потомков 42
- Н.Г. Власова**
Апробация алгоритма расчета индивидуализированных накопленных доз внутреннего облучения включенных в Государственный регистр лиц, подвергшихся радиационному воздействию вследствие катастрофы на Чернобыльской АЭС, других радиационных аварий 50
- А.С. Горячева, А.А. Лузянина, О.С. Изместьева, Л.П. Жаворонков, В.И. Дейгин**
Изучение механизмов регуляции начальных этапов гемопоэза трипептидом – dAla-dGlu-(dTrp)-OH 56
- Н.Н. Казачёнок, И.Я. Попова, В.А. Костюченко, В.С. Мельников, Г.В. Полянчикова, Ю.П. Тихова, К.Г. Коновалов, Г.Б. Россинская, А.И. Копелов**
Современная радиоэкологическая обстановка и источники радиоактивного загрязнения на реке Теча 63

Reviews and problem articles

- A.N. Koterov, A.P. Biryukov**
Ambiguous relationship between elevated levels of cytogenetic damages and cancer risk 6
- A.S. Podgornaya, T.S. Divakova**
Modern technologies in the treatment of menorrhagia in women 23
- A.F. Tsyb, E.V. Abakushina, D.N. Abakushin, Yu.S. Romanko**
Radiation as risk factor of Development the Radiation-induced Cataract 34

Medical-biological problems

- K.N. Apsalikov, T.J. Muldagaliev, T.I. Belikhina, Z.A. Tanatova, L.B. Kenzhina**
Retrospective analysis and evaluation of the results of cytogenetic studies of Kazakhstan's population has been subjected to radiation and their descendants, as a result of nuclear tests at the Semipalatinsk test site 42
- N.G. Vlasova**
Approval of algorithm for calculation of individualized accumulated internal doses at persons engaged in the State registry of the Chernobyl affected people 50
- A.S. Goryacheva, A.A. Luzyanina, O. S. Izmetieva, L. P. Zhavoronkov, V.I. Deigin**
The studying of the mechanism of regulation of the initial stages of hematopoiesis by tripeptide – dAla-dGlu-(dTrp)-OH 56
- N.N. Kazachonok, I.Y. Popova, V.A. Kostyuchenko, V. Melnikov, G.V. Polyanchikova, Y.P. Tihova, K.G. Kononov, G.B. Rossinskaya, A.I. Kopelov**
Modern radioecological situation and sources of radioactive contamination in the river Tеча 63

В.В. Кляус
Воздействие на население инновационных ядерных энергетических систем в режиме нормальной эксплуатации 71

Е.Р. Ляпунова, Л.Н. Комарова
Изучение генетической нестабильности популяции *Chlorella vulgaris* после действия ионизирующего излучения разного качества 77

Н.П. Мишаева, В.А. Горбунов, А.Н. Алексеев
Влияние тяжелых металлов на биологию иксодовых клещей и их зараженность возбудителями природно-очаговых инфекций 83

Клиническая медицина

В.А. Доманцевич
Ультразвуковая диагностика адгезивного капсулита плечевого сустава 88

А.В. Жарикова
Неврологические и метаболические нарушения при гипотиреозе 94

О.А. Котова, И.А. Байкова, О.А. Теслова, О.А. Иванцов
Тревожно-депрессивные реакции и ощущение безнадежности у пациентов с различной давностью спинальной травмы 103

Т.Ж. Мулдагалиев, Е.Т. Масалимов, Р.Т. Болеуханова, Ж.К. Жагиппарова
Состояние вегетативного гомеостата среди экспонированного радиацией населения Восточно-Казахстанской области и их потомков в отдаленном периоде после формирования доз облучения 109

Г.Д. Панасюк, М.Л. Лушик
Особенности аутоиммунного тиреоидита у детей Гомельской области 116

О.Н. Шишко, Т.В. Мохорт, И.В. Буко, Е.Э. Константинова, Н.Л. Цапаева
Изменения системы глутатиона и микроциркуляторного русла у пациентов с нарушениями углеводного обмена 122

V.V. Kliaus
Impact on the population of innovative nuclear energy systems under normal operation

E.R. Lyapunova, L.N. Komarova
Study of genetic instability of *Chlorella vulgaris* population after effect of ionizing radiation of different quality

N.P. Mishaeva, V.A. Gorbunov, A.N. Alekseev
Influence of heavy metals on the biology of ixodid ticks and their infection pathogens of natural focal infections Nations

Clinical medicine

V.A. Domantsevich
Ultrasound diagnostics of adhesive capsulitis of the shoulder joint

A.V. Zharikova
Neurological and metabolic disorders in hypothyroidism

O.A. Kotova, I.A. Baykova, O.A. Teslova, O.A. Ivantsov
Anxiety, depression and hopelessness in patients with spinal injury of various durations

T.J. Muldagaliev, E.T. Masalimov, R.T. Boleuhanova, Z.K. Zhagipparova
Condition of vegetative system among the population of the East Kazakhstan area exhibited by radiation and their descendants in the remote period after formation of doses of radiation

G.D. Panasyuk, M.L. Luschik
Features autoimmunnygo tiroidita children from Gomel region

O.N. Shyshko, T.V. Mokhort, I.V. Buko, E.E. Konstantinova, N.L. Tsapaeva
Changes in glutathione system and microcirculation in patients with prediabetes and type 2 diabetes

Обмен опытом

- Г.А. Романова**
Эффективность многолетнего скрининга заболеваний у населения Брянской области, проживающего на загрязненных радионуклидами территориях 130
- И.К. Хвостунов, Н.Н. Шепель, А.В. Севанькаев, В.Ю. Нугис, О.Н. Коровчук, Л.В. Курсова, Ю.А. Рагулин**
Совершенствование методов биологической дозиметрии путем анализа хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови человека при облучении *in vitro* и *in vivo* 135
- Р.А. Сакович**
Мультиспиральная компьютерная томография в кардиологической практике 148
- Правила для авторов 157

Experience exchange

- G.A. Romanova**
The effectiveness of long-term disease screening in the population of the Bryansk region, living in radionuclide contaminated territories
- I.K. Khvostunov, N.N. Shepel, A.V. Sevan'kaev, V.Yu. Nugis, O.N. Korovchuk, L.V. Kursova, Yu.A. Ragulin**
The improvement of methods of biological dosimetry by analysis of chromosomal aberrations induced in human blood lymphocytes *in vitro* and *in vivo*
- R.A. Sakovich**
Multislice computed tomography in cardiology practice

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПОВ ГЕМОПОЭЗА ТРИПЕПТИДОМ – dALA-dGLU-(dTRP)-OH

¹ ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, г. Обнинск, Россия

² ФГБУ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова, РАН, г. Москва, Россия

В работе продемонстрировано наличие биологической активности в отношении клеток-предшественников кроветворения у нового линейного трипептида dAla-dGlu-(dTrp)-OH. Влияние препарата на гемопоэз оценивали в различных тестах. На модели клонирования стволовых кроветворных клеток костного мозга в селезёнках летально облучённых мышей оценивали влияние трипептида на интактный костный мозг, с помощью проточной цитофлуориметрии определяли содержание CD34+ гемопоэтических клеток в костном мозге и периферической крови; с помощью метода «тимидиновое самоубийство» оценивали процентное содержание КОЕ-С-8 в S-фазе клеточного цикла. Получены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что воздействие трипептида на интактное кроветворение связано с ускорением пролиферации КОЕ-С под влиянием препарата. У мышей, получавших dAla-dGlu-(dTrp)-OH, отмечается выраженное увеличение относительной численности CD34+ предшественников в периферической крови и костном мозге, что также свидетельствует о пролиферации данной клеточной популяции.

Ключевые слова: колониеобразующие единицы селезёночные (КОЕ-С), тимидиновое самоубийство, CD34+ клетки, мыши

Введение

Была установлена важная роль тимических пептидов в регуляции процессов иммуно- и гемопоэза [1, 2]. Исследования в этом направлении позволили синтезировать ряд соединений, регулирующих состояние важнейших физиологических систем у нормальных, а также облучённых животных. В результате исследований были созданы и внедряются в практику здравоохранения препараты «Тимоген», «Тимодепрессин», «Стемокин» [3, 4].

Тимодепрессин dGlu-(dTrp) – уникальный лекарственный препарат, избирательно взаимодействующий со стволовыми клетками костного мозга, открыл новый класс синтетических пептидных препаратов, селективно блокирующих процессы пролиферации клеток-предшественников иммуно- и гемопоэза. Препарат способен сохранять стволовые клетки в период ра-

диационного и химиотерапевтического воздействия, что позволяет ускорить выход из миелотоксической гранулоцитопении.

При переходе к классу трипептидов на базе изученного Тимодепрессина был синтезирован ряд новых химических соединений, нами проанализирована их активность в отношении гемопоэза [5]. Установлено, что наибольшей биологической активностью обладает трипептид dAla-dGlu-(dTrp)-OH.

В интактном организме существенное изменение активности в продуцировании новых клеточных элементов возможно только на относительно короткий период, после чего механизмы регуляции, действующие по принципу обратной связи, возвращают эту систему в состояние к близко исходному, «устрашающему» организм в отношении потребности клеточных элементов. В свете этих соображений можно

предположить, что препараты или способы, позволяющие существенно активировать нормальное кроветворение, будут достаточно высоко эффективны в условиях частично супрессированного гемопоэза. С учётом этих обстоятельств *целью работы* являлось более основательное экспериментальное изучение возможных механизмов реализации эффектов стимуляции гемопоэза трипептидом – dAla-dGlu-(dTrp)-ОН.

Материал и методы исследования

В работе использовано соединение пептидной природы – dAla-dGlu-(dTrp)-ОН. Препарат синтезирован в ООО «Пептос Фарма», г. Москва. Конечный продукт очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в градиенте 0,1% AcOH/изопропанольного буфера (5-30%). Чистоту и структуру пептида подтверждали данными тонкослойной хроматографии, ВЭЖХ и ЯМР-спектроскопии высокого разрешения.

Эксперименты проводились на 2-3 месячных мышках-самках (СВАхС57Bl/6)F₁, с массой тела 22-25 г, полученных из питомника РАН «Столбовая» и содержащихся в стандартных условиях и на стандартном рационе. Перед опытами мыши находились на карантине в течение 2 недель. Работы с животными были проведены в соответствии с законодательством Российской Федерации и положениями, изложенными в руководстве [6].

Механизмы реализации эффектов dAla-dGlu-(dTrp)-ОН – {a-e(w)} исследовали с использованием различных экспериментальных моделей. При этом выбрана оптимальная доза препарата – 100 мкг/кг, исходя из данных, полученных нами ранее [5]. В первой серии экспериментов у интактных мышечных доноров через 2 суток после внутрибрюшинной (в/б) инъекции препарата производили забор костного мозга и периферической крови и с помощью проточной цитофлуориметрии определяли в образцах процентное содержание CD34+ гемопоэтических клеток. Клетки костного мозга и периферической

крови инкубировали с моноклональными антителами к CD34 и CD45, меченными фикоэритрином и флуоресцеинизотиоцианатом, соответственно («Pharmigen Becton Dickinson», США). Окрашенные образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Vantage («Becton Dickinson Immunocytometry Systems» – BDIS, США). Компьютерную обработку проводили с использованием программы Cell Quest («BDIS», США). На графике распределения клеток по интенсивности светорассеяния выделяли регион неповрежденных клеток с низким боковым светорассеянием. Среди выделенных клеток идентифицировали CD34+CD45^{low} гемопоэтические предшественники и определяли их относительное количество. Также у животных определяли колониобразующую способность костного мозга и периферической крови по методу Till и McCulloh [7]. Для этого реципиентам, облученным в дозе 8 Гр на установке «Луч-1» (Россия, ⁶⁰Co, мощность дозы 0,5 Гр/мин), вводили внутривенно костномозговые клетки (примерно 0,9×10⁵-1,1×10⁵) или стабилизированную гепарином периферическую кровь (0,2 мл/мышь) с целью получения в селезенке реципиентов (через 8 суток после миелотрансфузии) оптимального для подсчета количества колоний.

При исследовании влияния трипептида на пролиферацию КОЕ-С в S-фазе клеточного цикла был использован метод «тимидинового самоубийства» [8]. В качестве доноров были взяты интактные и облученные (4 Гр) мыши. Мышей облучали на установке «Луч-1» (⁶⁰Co) (Россия) (мощность дозы 0,5 Гр/мин). За 2 суток до извлечения костного мозга контрольной и облученной группам мышечных инъекций пептид внутрибрюшинно в дозе 100 мкг/кг. На 8-е сутки по разнице между числом селезеночных колоний из необработанного и обработанного изотопом костного мозга оценивали интенсивность пролиферации. Более подробная методика приводится ниже по тексту.

Приготовление растворов пептида для инъекций осуществлялось в день

введения из субстанции, поставляемой в виде порошка.

Мышей умерщвляли дислокацией шейных позвонков.

Для всех полученных вариационных рядов были подсчитаны средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Для определения значимости межгрупповых различий были использованы параметрические критерии (t-критерий Стьюдента, F-критерий Фишера) и непараметрические (U-Вилкоксона-Манна-Уитни, Вардена, медианный критерий χ^2) [9]. Различия между группами признавали статистически значимыми при значении интеграла вероятности p , не превышающем 0,05.

Статистический анализ проводился с помощью программы Origin 6.0 («MicroCal Software», США).

Результаты исследования

Раннее мы продемонстрировали, что трипептид – dAla-dGlu-(dTrp)-ОН при введении мышам-донорам увеличивает как относительное, так и абсолютное содержание КОЕ-С-8 в костном мозге, причем эффект зависит от дозы препарата. Линейный трипептид, примененный за 48 часов до извлечения костного мозга, оказывает стимулирующее влияние на популяцию коммитированных колониеобразующих клеток нормального костного мозга – число колоний после его воздействия при введении в/б увеличивается в широком диапазоне доз (10-1000 мкг/кг) [5].

Причинами наблюдаемого повышения содержания КОЕ-С-8 в костном мозге интактных мышей под действием исследуемого пептида может быть или подавление миграции данной клеточной популяции в периферическую кровь, или стимуляция их пролиферации. Для проверки этих предположений были проведены две серии экспериментов, в первой из которых изучали влияние {a-e(w)} на миграцию КОЕ-С-8 (по содержанию этих клеток в костном мозге и периферической крови). У нормальных мышей-доноров через 2 суток после инъекции препарата (100 мкг/кг) брали костный

мозг и кровь, с помощью проточной цитометрии определяли в этих образцах процентное содержание CD34+ предшественников гемопоэза. Результаты, приведенные в таблице 1, свидетельствуют, что под влиянием пептида в костном мозге и периферической крови увеличивается относительное содержание CD34+ гемопоэтических клеток. Таким образом, воздействие трипептида не приводит к подавлению миграции кроветворных предшественников, более того, препарат обладает способностью стимулировать выброс клеток данной популяции из костного мозга в периферическую кровь. Следует отметить, что «базовый» препарат «Тимодепрессин®» способен ингибировать миграцию CD34+ клеток из костного мозга в периферическую кровь при нормальном кроветворении [10].

Образование колоний на селезенке – процесс кооперативный, в котором, кроме колониеобразующей клетки, задействован ряд клеточных и гуморальных факторов микроокружения. Одним из его компонентов, необходимых для полноценного функционирования начальных этапов кроветворения, являются акцессорные Т-лимфоциты [11]. Роль данной клеточной популяции в регуляции начальных этапов кроветворения – контроль процессов пролиферации КОЕ-С. Удаление Т-клеток при обогащении костного мозга фракцией стволовых клеток или при обработке суспензии сывороткой против костного мозга мышей приводит к замедлению темпов пролиферации [12]. Полученные ранее данные [13] свидетельствуют о том, что ингибирование колониеобразования «Тимодепрессином®» связано не только с прямым воздействием препарата на колониеобразующие клетки, но и с опосредованным действием через акцессорные Т-лимфоциты, которые, как известно, необходимы для запуска пролиферации стволовых клеток кроветворения. Можно предположить, что и эффект стимуляции колониеобразования интактным костным мозгом может быть связан с альтернативно направленным воздействием dAla-dGlu-(dTrp)-ОН на кроветворное ми-

кроокружение, а именно, на акцессорные Т-лимфоциты. Это предположение и было проверено в следующей серии опытов в двух экспериментальных системах – на интактных и на облученных донорах.

Суть метода «тимидиновое самоубийство» состоит в том, что включение клетками, находящимися в S-фазе клеточного цикла, меченного тритием тимидина с высокой удельной активностью приводит к их гибели. Определяя при помощи тестов селезеночного колониеобразования разницу в содержании КОЕ-С во взвесах миелокарицитов животных опытных и контрольных групп (соответственно, с $^3\text{H-TdR}$ и без него), судят о количестве клеток, находившихся на этот период в S-фазе клеточного цикла, т.е. делящихся клеток.

В качестве источника КОЕ-С использовали в разных опытах интактный или же стимулированный облучением костный мозг, содержащий более значительное количество пролиферирующих клеток.

В первом случае интактным мышам вводили $\text{dAla-dGlu-(dTrp)-OH}$ внутривентриально в дозе 100 мкг/кг за двое суток до взятия костного мозга. Взвеси миелокарицитов (2×10^6 клеток/мл, 2 мл), полученные путем вымывания костного мозга физиологическим раствором из бедренных костей контрольных мышей-доноров и опытных (получавших препараты) групп разделяли (каждую) на две части и инкубировали в течение 20 мин на водяной бане при 37°C с $^3\text{H-TdR}$ (7,4 МБк/пробу). Контрольные пробы инкубировали с «холодным» тимидином (2,0 мкг/мл). Суспензии разводили до нужной концентрации и вводили их внутривенно облученным накануне (8 Гр) реципиентам (шесть группам). Через 8 суток после миелотрансфузии реципиентов забивали, извлекали у них селезенки и определяли число макроскопически видимых колоний. По разности между значениями КОЕ для суспензии с $^3\text{H-TdR}$ и без него судили о количестве КОЕ, погибших в результате воздействия трития, т.е. находившихся в S-фазе.

Следует отметить, что общая клеточность костного мозга бедра мышей после

введения пептида и «Тимодепрессина» не отличалась от содержания миелокарицитов бедренной кости контрольной группы мышей и составляла в среднем 24×10^6 . Из результатов, представленных в таблице 2, видно, что трипептид стимулирует в интактном костном мозге пролиферацию предшественников кроветворения, увеличивая процент клеток, находящихся в S-фазе цикла, в отличие от использованного как препарат сравнения «Тимодепрессина®», который не влияет на число КОЕ-С-8 в S-фазе клеточного цикла в данной экспериментальной модели, что воспроизводит данные, полученные ранее Семиной О.В. [14]. Однако на такой модели эксперимента трудно судить о модифицирующем действии пептидов на процессы пролиферации, так как в интактном костном мозге доля КОЕ-С-8 в S-фазе составляет лишь 3-15%, и разницу при таком базовом уровне показателя зарегистрировать не всегда возможно. Кроме того, целесообразно было оценить пределы модулирующих эффектов на интактном и восстанавливаемом после повреждения гемопоэза, полагая наличие «максимума» у таких эффектов.

Для такого, как представлялось, более адекватного анализа мы использовали «разогнанный» костный мозг, находящийся в фазе активного восстановления после дозированного лучевого повреждения. Этим требованиям соответствует костный мозг мышей на 7-е сутки после облучения животных в дозе 4 Гр. Мышей облучали в дозе 4 Гр, на 5-е сутки после облучения эти животные получали инъекцию $\text{dAla-dGlu-(dTrp)-OH}$ или «Тимодепрессина» внутривентриально в дозе 100 мкг/кг, и ещё через двое суток (т.е. на 7-е сутки после облучения) в костном мозге у них определяли количество КОЕ-С-8 в S-фазе клеточного цикла. Костномозговую суспензию, полученную от мышей-доноров (2×10^6 клеток/мл, 2 мл) инкубировали 20 мин при 37°C с ^3H -тимидином (7,4 МБк/пробу), разводили до нужной концентрации, и вводили летально (8 Гр) облученным мышам-реципиентам. Контрольные пробы инкубировали с аликвотами «хо-

лодного» тимидина. На 8-е сутки так же по разнице между числом селезеночных колоний из необработанного и обработанного изотопом костного мозга оценивали интенсивность пролиферации стволовых гемопоэтических клеток.

Необходимо сразу отметить, что общая клеточность костного мозга мышей, облученных в дозе 4 Гр, и мышей, которые после облучения получали пептид или «Тимодепрессин», была на одном уровне и составляла в среднем $19,3 \times 10^6$. Анализ полученных результатов представлен в таблице 3, свидетельствует о том, что три-

пептид – dAla-dGlu-(dTrp)-ОН не вызывает ни существенного снижения, ни увеличения числа КОЕ-С в цикле. Представленные данные по действию «Тимодепрессина®» на активно пролиферирующий костный мозг подтверждают ранее сделанные выводы, что этот дипептид dGlu-(dTrp), инъекцированный за 2 суток до взятия костного мозга (на 5-е сутки после облучения), ингибирует пролиферацию, снижая процент делящихся клеток даже ниже уровня интактного контроля [15].

Известно, что S-фаза составляет по времени около половины клеточного цик-

Таблица 1 – Влияние dAla-dGlu-(dTrp)-ОН на содержание КОЕ-С-8 и CD34+ гемопоэтических клеток в костном мозге и периферической крови интактных мышей

Группа	Костный мозг		Периферическая кровь	
	Число колоний на селезёнке на 10^5 миелокариоцитов (M±m)	Доля CD34+ клеток (%) (M±m)	Число колоний на селезёнке на 0,2 мл крови (M±m)	Доля CD34+ клеток (%) (M±m)
Контроль	10,5±0,3	0,6±0,06	3,9±0,7	0,4±0,09
dAla-dGlu-(dTrp)-ОН	15,2±0,7*	1,3±0,2*	13,4±0,5*	0,7±0,004*

* – значимость различий ($p \leq 0,01$) рассчитана по отношению к группе «Контроль»;

Примечание: каждая экспериментальная группа включала в себя 12 мышей

Таблица 2 – Влияние dAla-dGlu-(dTrp) и «Тимодепрессина®» на процентное содержание КОЕ-С-8 в S-фаза клеточного цикла в костном мозге интактных доноров

Группа	Число мышей	Среднее кол-во колоний на селезёнке (на 10^5 клеток костного мозга), (M±m)	% КОЕ-С в S-фаза
Интактный контроль	20	10,5±0,9	8,6
Интактный контроль + ^3H	20	9,6±0,4	
«Тимодепрессин®»	15	6,6±0,1	6,1
«Тимодепрессин®»+ ^3H	15	6,2±0,2	
dAla-dGlu-(dTrp)-ОН	15	13,4±0,3*	41,8
dAla-dGlu-(dTrp)-ОН+ ^3H	15	7,8±0,3	

* – значимость различий ($p \leq 0,01$) рассчитана по отношению к группе «интактный контроль»

Таблица 3 – Влияние dAla-dGlu-(dTrp)-ОН и «Тимодепрессина®» на содержание КОЕ-С-8 в S-фаза клеточного цикла в активно пролиферирующем костном мозге облученных (4 Гр) доноров

Группа	Число мышей	Среднее кол-во колоний на селезёнке (на 10^5 клеток костного мозга), (M±m)	% КОЕ-С в S-фаза
Интактный контроль	20	12,7±0,7	9,4
Интактный контроль + ^3H	20	11,5±0,5	
4 Гр	20	4,4±0,2	43,2
4 Гр + ^3H	20	2,5±0,2	
4 Гр + «Тимодепрессин®»	15	5,2±0,1	3,8
4 Гр + «Тимодепрессин®»+ ^3H	15	5,0±0,2	
4 Гр + dAla-dGlu-(dTrp)-ОН	15	6,3±0,3	34,9
4 Гр + dAla-dGlu-(dTrp)-ОН+ ^3H	15	4,1±0,15	

ла. Если допустить, что в результате включения меченого тимидина при часовой инкубации погибли все клетки, находившиеся в данный момент в S-периоде, а также клетки, выходящие из него и вошедшие за это время в фазу синтеза ДНК, то приведенные выше данные позволяют сделать вывод, что на 8 сутки после облучения практически все стволовые клетки у животных опытных групп находятся в клеточном цикле.

Вероятно, действительно существует некий предел активации пролиферации, который естественным путём достигается после облучения в данной дозе, и индуцируется на интактном гемопоэзе при помощи пептида.

Заключение

Таким образом, из результатов, представленных в статье, можно сделать заключение: при оценке влияния трипептида на гемопоэз выявлено, что при воздействии его *in vivo* (инъекция донору костного мозга) он заметно влияет на начальные этапы гемопоэза, увеличивая количество коммитированных клеток-предшественников (КОЕ-С-8). С помощью метода «тимидиновое самоубийство» получены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что воздействие трипептида на интактное кроветворение связано с ускорением пролиферации КОЕ-С под влиянием препарата. У мышей, получавших dAla-dGlu-(dTrp)-ОН, отмечается выраженное увеличение относительной численности CD34+ предшественников в периферической крови и костном мозге, что также свидетельствует о пролиферации данной клеточной популяции.

Работа выполнена в рамках НИОКР «Структурно-функциональные исследования биологически активных пептидов и пептидомиметиков, влияющих на систему кроветворения интактных и облучённых животных» программы «УМНИК-Сколковец», а также при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (№ 14.740.11.0180., №

14.740.11.0116). Работа отмечена почётным знаком II степени им. Е.Р. Дашковой (постановление губернатора Калужской области от 28.11.2011).

Библиографический список

1. Поверенный, А.М. Геморегуляторные синтетические пептиды / А.М. Поверенный, Ю.Э. Виноградова, В.И. Дейгин // Терапевтический Архив. – 2000. – №7. – С. 74-76.
2. Влияние оптических изомеров синтетического пептида iEW на колониеобразующую способность костного мозга *in vivo* / О.В. Семина [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т.140, №9. – С.335-338.
3. Применение Тимогена для лечения больных с заболеваниями системы крови. 2. Влияние Тимогена на гранулоцитарный росток гемопоэза у больных с депрессиями кроветворения / Ю.Э. Виноградова [и др.] // Российский онкологический журнал. – 1999. – №2. – С. 45-48.
4. Влияние тимических пептидов тимодепрессина и неогена на пролиферацию кроветворных клеток-предшественников / Е.Б. Владимирская [и др.] // Гематол. и переливание крови. – 2000. – Т. 45, №4. – С. 6-10
5. Изучение влияния синтетических трипептидов на стволовые гемопоэтические клетки в норме и при γ -облучении / А.А. Лузянина [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2012. – Т. 52, №3. – С.257-260.
6. Каркищенко, Н.Н. Лабораторные животные: Положение и руководство / под ред. Н.Н. Каркищенко. – М.: Изд-во ВПК, 2003. – 138 с.
7. Till, J.E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells / J.E. Till, E.A. McCulloch // Radiat. Res. – 1961. – V. 14. – P. 213-222.
8. The effect of differing demands for blood cells production on DNA synthesis by haemopoietic colony-forming cells of mice / A. Becker [et al.] // Blood. – 1965. – V. 26. – P. 296-303.

9. Жаворонков, Л.П. Основы прикладной медико-биологической статистики. / Л.П. Жаворонков // Методическое пособие. Обнинск: ФГБУ МРНЦ Минздравсоцразвития России, 2012. – 60 с.
10. Тимодепрессин ингибирует миграцию CD34+ клеток из костного мозга при нормальном и стимулированном Г-КСФ кроветворении / О.В. Семина [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т.144, № 12. – С. 682-686.
11. Probable mechanism of spleen colony formation suppression with rabbit antimouse brain antiserum / A.M. Poverenny [et al.] // Exp. Hematol. – 1980. – V. 8. – P. 1221-1228.
12. Visser, J.V.M. *In vivo* studies on the regeneration kinetics of enriched populations of haemopoietic spleen colony forming cells from normal bone marrow / J.V.M. Visser, J.F. Eliason // Cell Tissue Kinet. – 1983. – V. 16. – P. 385-392.
13. Reciprocal effect of optical isomerism of EW-dipeptides on immune response / V.I. Deigin [et al.] // Immunol. Lett. – 1999. – V.67. – №1. – P. 41-46.
14. Роль оптической изомерии аминокислотных составляющих низкомолекулярных пептидов в проявлении их биологических свойств / О.В. Семина [и др.] // Труды регионального конкурса научных проектов в области естественных наук. Вып. 7. – Калуга: Полиграф-Информ, 2004. – С. 447-459.
15. Синтетический пептид D-(iEW) (тимодепрессин) защищает КОЕ-С костного мозга от воздействия ионизирующей радиации / О.В. Семина [и др.] // Радиационная биол. Радиоэкология. – 2000. – Т.40, №3. – С. 315-318.

A.S. Goryacheva, A.A. Luzyanina, O. S. Izmestieva, L. P. Zhavoronkov, V.I. Deigin

THE STUDYING OF THE MECHANISM OF REGULATION OF THE INITIAL STAGES OF HEMATOPOIESIS BY TRIPEPTIDE – dAla-dGlu-(dTrp)-OH

In the work the presence of biological activity against hematopoietic progenitor cells in a new linear tripeptide dAla-dGlu-(dTrp) was demonstrated. The effect of drug on hematopoiesis was evaluated in various tests. On the model of cloning hematopoietic stem cells of the bone marrow in the spleens of lethally irradiated mice it was evaluated the influence of the tripeptide on the intact bone marrow by flow cytometry determined the content of CD34 + hematopoietic cells in the bone marrow and peripheral blood using the method «thymidine suicide» estimate the percentage of CFU-C-8 in the S-phase of the cell cycle. It was found that the observed increase the numbers of CFU-S-8, and CD34 + of hematopoietic cells in the bone marrow of normal mice from exposure dAla-dGlu-(dTrp) is most likely due to more intensive proliferation cells of this compartment.

Key words: *spleen colony-forming units (CFU-C), thymidine suicide, CD34+ cells, mouse*

Поступила 18.01.13