



ГУЛИК ЕЛЕНА СЕРГЕЕВНА

**ВЛИЯНИЕ ХИТАБИСА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ
СОСТОЯНИЕ ОРГАНИЗМА ЖИВОТНЫХ
ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ**

03.03.01 – физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в отделе физиологии обособленного структурного подразделения «Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Костеша Николай Яковлевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Замощина Татьяна Алексеевна

доктор биологических наук, профессор
Ласукова Татьяна Викторовна

Ведущая организация НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН
(г. Томск)

Защита состоится «23» июня 2010 г. в 10-00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.267.10 при ГОУ ВПО «Томский государственный университет» по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ГОУ ВПО «Томский государственный университет» по адресу: г. Томск, пр. Ленина, 34а.

Автореферат разослан « ____ » мая 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат биологических наук



Е.Ю.Просекина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и постановка проблемы. Одним из самых важных свойств всех биологических систем является адаптация или способность живой системы приспосабливаться к изменениям среды, отвечать общими, неспецифическими реакциями на разнообразные воздействия. Биологический смысл и характер таких реакций заключаются в мобилизации функциональных резервов организма, необходимых для поддержания гомеостаза и обеспечения относительного динамического постоянства живой системы (Гаркави и др., 1999; Даренская, Короткевич, 2001).

В рамках представлений о молекулярных механизмах неспецифических реакций организма сформировалась концепция усиления свободнорадикального окисления при действии на организм неблагоприятных факторов и ответной реакции антиоксидантной системы, принимающей непосредственное участие в молекулярных механизмах формирования неспецифической резистентности организма (Соколовский, 1984). Умеренная активация свободнорадикальных процессов является частью общего адаптационного механизма, направленного на поддержание клеточного гомеостаза (Меерсон, Пшенникова, 1988). Длительный и чрезмерный по интенсивности стресс резко усиливает свободнорадикальное окисление в клетках (Меерсон, 1981; Журавлев, 1982), в дальнейшем вызывая повреждения мембранных структур, нарушение активности антиоксидантов и ряда мембранных ферментов (Каган и др., 1986; Кулинский, 1999; Зенков и др., 2001). Наиболее выраженная активация реакций свободнорадикального окисления наблюдается при действии ионизирующего излучения (Тарусов, 1963; Эмануэль, 2006), при этом нарушается функционирование системы кроветворения и тонкого кишечника (Даренская, 2004). Многие исследователи для создания модели окислительного стресса использовали радиационное воздействие (Эмануэль, 2006; Корягин и др., 2006; Данилин, 2010).

В связи с этим вызывает интерес применение веществ с антиоксидантными свойствами, которые повышают устойчивость организма к действию различных неблагоприятных факторов среды. Биологически активные вещества природного происхождения имеют широкий спектр действия, гораздо менее токсичны по сравнению с химическими веществами (Барабой, 1984; Алехина и др., 2003; Овсянникова и др., 2007). В последние годы ведутся интенсивные исследования хитозана (сополимера D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина), выделенного из панциря крабовых, установлены его сорбционные, детоксицирующие, антимикробные, антиоксидантные свойства (Комаров и др., 2001; Червинец и др., 2001; Xie et al., 2001; Feng et al., 2007; Sun et al., 2007; 2008), обнаружено выраженное противолучевое действие этого препарата при внутривенном введении как до, так и после облучения (Андрианова, 2001). Имеются данные об изменении динамики проникновения хитозана в ткани и органы при его введении в настоях фитосборов (Комаров и др., 2001), что усиливает адсорбционные, и комплексообразующие свойства хитозана, обуславливающие увеличение его антитоксического и

антибактериального действия. В лаборатории радиационной физиологии НИИ биологии и биофизики Томского государственного университета ранее был исследован водный экстракт пихты сибирской – абисиб, установлены его бактерицидные, противовоспалительные, гемо- и иммуностимулирующие свойства (Костеша и др., 2004). Исходя из данных о повышении биологического действия хитозана при использовании его с растительными экстрактами, сделано предположение о повышении биологической активности хитозана при совместном его использовании с абисибом.

Цель исследования: изучить влияние биологически активных веществ из природного сырья растительного (абисиб) и животного (хитозан) происхождения и их комплекса (хитабис) на функциональное состояние организма животных при окислительном стрессе.

Задачи исследования:

1. Оценить антиоксидантную активность хитозана, абисиба, хитабиса в условиях *in vitro*.
2. Исследовать влияние абисиба, хитозана, хитабиса на антиоксидантную активность плазмы крови и кишечной слизи мышей *in vitro* и *in vivo*.
3. Изучить влияние хитабиса и его компонентов на состояние кроветворной системы и надэпителиального слизистого слоя тонкого кишечника животных в условиях окислительного стресса.
4. Оценить влияние хитабиса и его компонентов на интегральные показатели жизнедеятельности экспериментальных животных – выживаемость и среднюю продолжительность жизни – при окислительном стрессе, индуцированном рентгеновским излучением в дозе LD_{90/30}.

Научная новизна. Впервые установлено, что:

- в условиях *in vitro* хитозан проявляет наибольшую антиоксидантную активность по сравнению с хитабисом и абисибом;
- применение хитабиса в условиях *in vivo* достоверно увеличивает антиоксидантную активность кишечной слизи; антиоксидантная активность плазмы крови при этом не изменяется;
- действие хитабиса на систему кроветворения проявляется в выраженном увеличении количества лейкоцитов в периферической крови и клеточности костного мозга экспериментальных крыс после радиационного воздействия;
- хитабис оказывает выраженное защитное действие, оцениваемое по интегральным показателям: выживаемости и средней продолжительности жизни, при окислительном стрессе (рентгеновское облучение).

Практическая значимость. Особенности изменения антиоксидантной активности кишечной слизи и плазмы крови в опытах *in vitro* и *in vivo* при действии исследованных веществ могут служить обоснованием использования такого подхода при исследовании других веществ с антиоксидантной активностью. Результаты работы являются основанием перорального применения хитозана, растворенного в абисибе (хитабис), в качестве средства, повышающего неспецифическую резистентность организма. Сочетанное применение препаратов из хитозана и растительных экстрактов может быть

использовано для коррекции системы кроветворения и желудочно-кишечного тракта в условиях окислительного стресса.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Хитабис и его компоненты – хитозан и абисиб – усиливают защитные свойства кишечной слизи за счет увеличения антиоксидантной активности, что способствует повышению резистентности организма.
2. Действие хитабиса реализуется путем стимуляции системы кроветворения и формирования более устойчивого к разрушению слизистого геля тонкого кишечника, что обуславливает повышение выживаемости и увеличение средней продолжительности жизни облученных животных.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены на XIX съезде физиологического общества им. И.П.Павлова (Санкт-Петербург, 2004); V Сибирском физиологическом съезде (Томск, 2005); международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Казань, 2006); международной научной конференции «Механизмы индивидуальной адаптации» (Томск, 2006); III всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2007); научной конференции с международным участием «Нейрогуморальные механизмы регуляции органов пищеварительной системы в норме и при патологии» (Томск, 2007); II съезде физиологов СНГ (Кишинев, 2008), научной конференции с международным участием «Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных органов и систем в норме и при патологии» (Томск, 2009); международной конференции «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов» (Щелково, Московской обл., 2009).

Публикации. Автором опубликовано 11 работ по теме диссертации, из которых 1 статья в рецензируемом научном журнале, рекомендованном ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка используемой литературы. Работа изложена на 115 страницах машинописного текста, включает 13 таблиц и 10 рисунков. Библиографический список включает 242 источника, из них 62 иностранных.

Вклад автора. Работа выполнена в отделе физиологии НИИ биологии и биофизики ТГУ под научным руководством доктора биологических наук, профессора Н.Я.Костеши, которому диссертант выражает глубокую благодарность. Автор выражает благодарность старшему научному сотруднику ОСП НИИББ ТГУ Заевой О.Б. – за содействие в выполнении работы по исследованию антиоксидантной активности; научному сотруднику ОСП НИИББ ТГУ Борило Г.А. и младшему научному сотруднику ОСП НИИББ ТГУ Булатовой У.А. за техническую помощь; д.б.н., профессору ВНИТИ БП (г. Щелково, Московской обл) Албулову А.И. за предоставленный препарат хитозан-гидрохлорид. Все результаты получены автором самостоятельно.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы исследования. Исследования проведены на беспородных белых мышах-самцах массой 18–22 г и крысах-самцах массой 180–220 г. Общая характеристика материала и распределение животных представлены в таблице 1.

Таблица 1
Общая характеристика материала исследований

№	Задача исследования	Животные	Кол-во
1.	Исследование влияния абисиб, хитозана и хитабиса на антиоксидантную активность плазмы крови и кишечной слизи	Мыши	60
2.	Изучение влияние хитабиса и его компонентов на состояние кроветворной системы экспериментальных животных	Мыши Крысы	59 132
3.	Исследование влияние хитабиса и его компонентов на функциональное состояние НэСС тонкого кишечника облученных крыс	Крысы	104
4.	Изучение активности абисиб, хитозана, хитабиса по интегральным показателям: выживаемости и средней продолжительности жизни облученных животных	Мыши Крысы	22 145

В экспериментах использовали водный экстракт пихты сибирской – абисиб (производство «НПЦ БИОЭПЛ», г. Томск), низкомолекулярный водорастворимый хитозан-гидрохлорид (ММ 23 кДа), (ВНИИТИ БП, г. Щелково Московской обл.). Хитозан растворяли либо в воде, либо в абисиб (хитабис) в концентрации 0,1% и вводили перорально по 1 мл через желудочный зонд ежедневно экспериментальным крысам в течение 10 дней после облучения. Абисиб крысам вводили по той же схеме. Интактным и облученным мышам препараты добавляли в пищу. Контрольные животные получали воду при той же форме введения препаратов, как и опытные.

Для создания модели активации свободнорадикального окисления и развития окислительного стресса использовали воздействие однократного общего рентгеновского излучения на аппарате РУМ-17. Условия облучения: напряжение 200 кВ, сила тока 15 мА, фильтры 0,5 мм Cu + 1 мм Al, фокусное расстояние 60 см. Мышей облучали в дозе 4,5 Гр, крыс – 5,5 и 7,5 Гр.

Методы исследований.

Антиоксидантную активность (АОА) плазмы крови и кишечной слизи определяли методом ингибирования люминолзависимой хемилюминесценции, модифицированным в лаборатории пищеварения отдела физиологии НИИ

биологии и биофизики ТГУ (Krivova et al., 2003; Заева, 2007). В проведенных исследованиях для хемилюминесцентного метода был использован следующий состав стандартных растворов: 16 мл дистиллированной воды (подогретой до 38°C); 1 мл 1,25 мМ раствора DPPH (дифенилпикрилгидразил) в этаноле; 0,5 мл 0,01Н раствора люминола в фосфатном буфере (рН=8,0) и 0,4 мл 70% перекиси водорода. Источником супероксид аниона является DPPH.

Исследования проводили на хемилуминометре, работающем в режиме счета фотонов, ФЭУ и в программном обеспечении производства «Ангстрем». Камера для кювет, обеспечивающая термостатирование (37°C) и перемешивание, разработана в отделе фотоники молекул Сибирского физико-технического института. Время экспозиции 0,1 секунды. Благодаря высокой чувствительности прибора для определения антиоксидантной активности было достаточно 50 мкл исследуемой пробы.

Измерения проводили трижды, на максимальном плато свечения контрольного образца, которое наблюдалось в течение 90 секунд. Антиоксидантную активность опытной пробы рассчитывали как среднюю величину из трех замеров.

Количественные величины антиоксидантной активности (АОА) выражали в (фотонах/мл)/сек и вычисляли по формуле:

$$АОА = (J^0 - J) \cdot n/t$$

где: J^0 – количество регистрируемых фотонов контрольной пробы;

J – количество регистрируемых фотонов опытной пробы;

n – разведение пробы;

t – время экспозиции.

Физиологическое состояние интактных животных, получавших разные препараты, оценивали по внешнему виду, поведению и показателям крови.

О состоянии животных после облучения судили по поведению животных, состоянию шерстного покрова, времени возникновения диареи, выживаемости и средней продолжительности жизни животных. Выживаемость оценивали по 30-суточному тесту; среднюю продолжительность жизни (СПЖ) экспериментальных животных рассчитывали по Р.А. Бесядовскому и соавт. (1978). Морфологическую картину периферической крови оценивали по общепринятым методикам определения количества эритроцитов, лейкоцитов, содержания гемоглобина (Ронин, Старобинец, 1989) и клеточности костного мозга.

Для определения **клеточности костного мозга** тщательно выделяли бедренную кость, удаляли эпифизы, канал промывали фиксированным количеством (4 мл) 5%-ого раствора уксусной кислоты. После извлечения клетки костного мозга диспергировали до однородной взвеси при помощи шприца. Подсчет клеток осуществляли в камере Горяева по общепринятой методике и рассчитывали по формуле с учетом разведения:

$$X = 2 \cdot N \cdot 10^5,$$

где X – общее количество клеток на бедро,

N – количество клеток в 5 больших квадратах камеры Горяева.

Функциональную активность кишечника у интактных и облученных крыс оценивали по состоянию надэпителиального слизистого слоя тонкого кишечника. Определение биохимического состава полимеризованных и деградированных гликопротеинов проводили в соответствии с модифицированной методикой Н.А.Кривовой (1994; 2002). Для характеристики состава структурных гликопротеинов рассчитывали суммарную концентрацию всех моносахаров и парциальное содержание отдельных моносахаров в структурных гликопротеинах.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением методов вариационной статистики (Лакин, 1980). Достоверность различий между выборками определяли при помощи критерия Манн-Уитни, используя программу «Statistica 6,0».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Антиоксидантная активность хитозана, абисиба, хитабиса в условиях *in vitro*

Результаты исследования антиоксидантной активности (АОА) препаратов представлены в таблице 2. Хитозан (0,1%-ный и 0,2%-ный водные растворы) и хитабис (0,2%-ный раствор хитозана в абисибе) обладают антиоксидантной активностью. Увеличение концентрации хитозана в 2 раза в реакционной смеси (с 0,1% до 0,2%) увеличивает АОА препарата в 4,5 раза. Абисиб и хитабис (0,1%-ный раствор хитозана в абисибе) антиоксидантной активностью не обладают (табл. 2).

Таблица 2

Антиоксидантная активность хитозана, хитабиса и абисиба

препарат		АОА (DPPH) x 10 ⁶ [(фотонов/мл)/сек]
Хитозан (0,1%)	n = 3	0,139 ± 0,019
Хитозан (0,2%)	n = 4	0,633 ± 0,056
Хитабис (0,1% хитозана в абисибе)	n = 3	Не обладает
Хитабис (0,2% хитозана в абисибе)	n = 4	0,292 ± 0,060
Абисиб	n = 3	Не обладает

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о высокой акцепторной активности хитозана, что можно объяснить его структурными особенностями. Антиоксидантная активность хитозана главным образом связана с содержанием активных гидроксильных и аминогрупп в его полимерных цепях (Xie et al., 2001; Je and Kim, 2006). Некоторые исследователи полагают, что механизм взаимодействия свободных радикалов и хитозана заключается в том, что гидроксил и супероксид анионные радикалы могут реагировать с активными атомами водорода хитозана, перехватываясь с образованием наиболее стабильного макромолекулярного радикала (Je and Kim, 2006). По классификации К.Е.Кругляковой, Л.Н.Шишкиной (1992), хитозан по

механизму действия может быть отнесен к «мусорщикам» (scavenger of free radicals), которые очищают организм от всех свободных радикалов. Снижение АОА хитабиса может быть связано с тем, что выступающий в качестве растворителя водный экстракт пихты сибирской абисиб не обладает АОА.

В модельных опытах *in vitro* установлено, что АОА плазмы крови возрастает в 1,5–2 раза после добавления хитозана в плазму (0,1% и 0,2% концентрации соответственно). АОА кишечной слизи при добавлении хитозана достоверно снижается. Внесение абисиб и хитабиса снижает АОА плазмы крови и кишечной слизи (табл. 3).

Таблица 3

Антиоксидантная активность комплексов «плазма крови + препарат» и «слизь кишечника + препарат», смешанных в соотношении (1:1)

Исследуемый комплекс	АОА $\times 10^6$ [(фотонов/мл)/сек]
Плазма крови + д. Н ₂ О (контроль) n = 10	44,29 $\pm$ 3,59
Плазма крови +хитозан (0,1%) n = 10	67,13 $\pm$ 2,97 *
Плазма крови +хитозан (0,2%) n = 10	88,47 $\pm$ 2,19 *
Плазма крови +хитабис (0,1%) n =9	37,33 $\pm$ 1,37**
Плазма крови +хитабис (0,2%) n =9	12,27 $\pm$ 4,91*/**
Плазма крови +абисиб n = 6	0**
Слизь кишечника + д.Н ₂ О (контроль) n = 10	13,45 $\pm$ 1,23
Слизь кишечника +хитозан (0,1%) n = 10	9,90 $\pm$ 1,23*
Слизь кишечника +хитозан (0,2%) n = 10	9,17 $\pm$ 0,76*
Слизь кишечника +хитабис (0,1%) n =10	4,37 $\pm$ 0,81*/**
Слизь кишечника +хитабис (0,2%) n =6	1,34 $\pm$ 0,80*/**
Слизь кишечника +абисиб n = 6	0**

Примечание: * – статистически значимые отличия показателей от соответствующего контроля ($p < 0,05$);

** – статистически значимые отличия уровня антиоксидантной активности комплексов от вариантов с соответствующей концентрацией хитозана ($p < 0,05$).

Таким образом, выраженной АОА в условиях *in vitro* обладает только хитозан; с ростом концентрации хитозана в комплексе достоверно возрастает АОА плазмы крови.

2. Влияние курсового применения хитабиса и его компонентов на антиоксидантную активность плазмы крови и кишечной слизи

В опытах *in vivo* не выявлено статистически значимых различий АОА плазмы крови между контрольными и опытными группами, получавшими хитозан, абисиб или хитабис в течение 12 и 33 дней. Через 12 дней приема препаратов отмечено достоверное увеличение АОА слизи кишечника в группе

животных, получавшей хитабис по сравнению с контрольной группой и группами, получавшими абисиб и хитозан. АОА слизи кишечника достоверно увеличилась во всех группах через 33 дня приема препаратов: в группе, получавшей абисиб – в 1,8 раза по сравнению с контролем, в группах, получавших хитозан и хитабис – в 2,7 раза и 2,5 раза, соответственно (табл. 4).

Таблица 4

Антиоксидантная активность плазмы крови и слизи кишечника у интактных мышей, получавших *per os* хитозан, хитабис и абисиб

Группы животных	Плазма крови (АОА $\times 10^6$)		Слизь кишечника (АОА $\times 10^6$)	
	12 дней	33 дня	12 дней	33 дня
контроль (вода)	109,43 $\pm$ 25,64 n = 8	154,38 $\pm$ 19,63 n = 7	10,20 $\pm$ 1,66 n = 8	8,08 $\pm$ 2,1 n = 7
абисиб	108,71 $\pm$ 31,88 n = 7	124,68 $\pm$ 25,44 n = 8	13,13 $\pm$ 1,66 n = 8	14,65 $\pm$ 1,96* n = 8
хитозан	128,88 $\pm$ 20,95 n = 8	147,10 $\pm$ 29,22 n = 8	11,13 $\pm$ 2,29 n = 7	22,20 $\pm$ 1,98* n = 8
хитабис	89,95 $\pm$ 29,22 n = 8	170,30 $\pm$ 16,18 n = 6	20,34 $\pm$ 3,91*/** n = 8	20,30 $\pm$ 3,92* n = 6

Примечание: * – статистически значимые отличия показателей от соответствующего контроля ($p < 0,05$);

** – статистически значимое отличие уровня антиоксидантной активности в варианте с хитабисом от вариантов с абисибом и хитозаном ($p < 0,05$).

Таким образом, АОА кишечной слизи возрастает после курсового применения абисиба, хитозана, хитабиса, наибольший эффект проявляет хитабис.

3. Влияние абисиба, хитозана, хитабиса на физиологическое состояние животных

Проведенные исследования показали, что состояние белых мышей-самцов, которым в корм добавляли в течение 12 или 33 дней хитозан, абисиб или хитабис, не отличалось от контрольных животных, они нормально питались и прибавляли в весе. Шерстный покров у всех животных был ровным, чистым. Показатели периферической крови и клеточности костного мозга экспериментальных мышей достоверно не отличались от соответствующих показателей контрольных животных (табл. 5).

Пероральное введение хитабиса интактным крысам в течение 10 и 28 дней также не отражалось на поведении и внешнем виде животных. Не отмечено разницы в массовых индексах ряда органов (селезенка, тимус, надпочечники),

показателях периферической крови, клеточности костного мозга контрольных и опытных животных (табл. 6).

Таблица 5

Показатели периферической крови и клеточности костного мозга мышей после курсового приема хитозана, абисиба, хитабиса

серия	препарат	Кол-во эритроцитов, $\times 10^{12}/л$	Кол-во лейкоцитов, $\times 10^9/л$	Содержание гемоглобина, г/л	Клеточность костного мозга, $\times 10^6/бедро$
12 дней приема препаратов	Вода (контроль) $n = 7$	$6,12 \pm 0,43$	$5,42 \pm 0,93$	$142,0 \pm 8,1$	$16,03 \pm 1,91$
	Хитозан $n = 8$	$5,61 \pm 0,44$	$3,91 \pm 0,78$	$135,0 \pm 10,8$	$15,08 \pm 1,91$
	Абисиб $n = 7$	$6,08 \pm 0,85$	$5,76 \pm 1,12$	$128,0 \pm 10,8$	$13,78 \pm 0,97$
	Хитабис $n = 8$	$6,49 \pm 0,47$	$3,91 \pm 0,30$	$147,0 \pm 8,5$	$13,45 \pm 1,09$
33 дня приема препаратов	Вода (контроль) $n = 7$	$6,44 \pm 0,49$	$4,83 \pm 0,57$	$156,0 \pm 12,3$	$15,14 \pm 2,51$
	Хитозан $n = 8$	$7,52 \pm 0,63$	$3,78 \pm 0,21$	$168,0 \pm 10,8$	$17,28 \pm 1,54$
	Абисиб $n = 8$	$6,87 \pm 0,29$	$4,27 \pm 0,58$	$155,0 \pm 7,3$	$15,28 \pm 1,42$
	Хитабис $n = 6$	$7,12 \pm 1,34$	$4,14 \pm 0,51$	$172,0 \pm 16,0$	$15,87 \pm 2,32$

Примечание: $p > 0,05$ во всех группах.

4. Влияние хитабиса и его компонентов на интегральные показатели жизнедеятельности организма при радиационном воздействии

В предварительных исследованиях на мышах было установлено, что большее влияние на интегральные показатели жизнедеятельности организма оказывает введение в рацион питания мышей хитабиса в течение 12 дней после облучения в дозе 4,5 Гр по сравнению с введением его в рацион за 12 дней до облучения. СПЖ составила 83 и 29,4 суток (17,8 суток – в контроле), а выживаемость – 71,4% и 37,5% (28,5% – в контроле) соответственно. В связи с этим эффектом мы сосредоточили дальнейшие исследования на изучении действия хитабиса и его компонентов: абисиба и хитозана при введении после облучения.

Облучение крыс в дозе 7,5 Гр приводило к 90%-ной смертности, СПЖ животных составляла 15,4 суток. Применение водорастворимого хитозана в 2,5 раза повышало выживаемость и увеличивало СПЖ на 6,4 суток по

Таблица 6

Показатели периферической крови, клеточности костного мозга и массовые индексы некоторых органов крыс
после перорального приема хитабиса

Время введения	Группа животных	Кол-во эритроцитов, $\times 10^{12}/л$	Кол-во лейкоцитов, $\times 10^9/л$	Содержание гемоглобина, г/л	Клеточность костного мозга, $\times 10^6/бедро$	Массовый индекс, мг органа/г тела		
						селезенка	тимус	надпочечники
10 дней	Контроль (вода) n = 7	4,8 ± 0,45	7,86 ± 1,06	125,0 ± 3,7	142,94 ± 5,34	0,507 ± 0,048	0,163 ± 0,026	0,0159 ± 0,0019
	Хитабис n = 7	5,15 ± 0,54	6,51 ± 0,36	123,2 ± 2,8	152,43 ± 13,66	0,531 ± 0,038	0,132 ± 0,048	0,0120 ± 0,0008
28 дней	Контроль (вода) n = 7	5,25 ± 0,25	7,10 ± 1,00	132,0 ± 2,0	137,63 ± 10,74	0,480 ± 0,035	0,136 ± 0,007	0,0105 ± 0,0002
	Хитабис n = 7	5,86 ± 0,30	5,53 ± 0,66	128,0 ± 2,0	165,20 ± 12,88	0,492 ± 0,021	0,128 ± 0,010	0,0099 ± 0,0005

Примечание: $p > 0,05$ по всем показателям

сравнению с облученным контролем (табл. 7). Не обнаружено выраженного эффекта абисиба при введении его после облучения, что согласуется с данными Н.Я. Костеши (2001) и З.К. Вымятниной и соавт. (2000) о более выраженном профилактическом действии абисиба по сравнению с его применением после облучения. Введение хитабиса после облучения оказывает достоверное защитное действие: выживаемость крыс увеличилась в 3,5 раза, а СПЖ возросла почти в 2 раза по сравнению с облученным контролем (табл. 7).

Таблица 7

Противолучевая эффективность абисиба, хитозана и хитабиса при облучении крыс в дозе 7,5 Гр

Вариант	Число повтор-ностей	Число живот-ных	Выживае-мость, %	Средняя продолжи-тельность жизни, сутки
Облучение 7.5 Гр (контроль)	5	48	$9,8 \pm 7,8$	$15,4 \pm 2,3$
Облучение +абисиб	4	26	$18,8 \pm 9,4$	$16,3 \pm 3,6$
Облучение + хитозан	3	33	$25,0 \pm 2,9$	$21,8 \pm 4,5$
Облучение + хитабис	4	38	$34,0 \pm 3,5^*$	$28,4 \pm 3,1^*$

Примечания: * – статистически значимые отличия показателей от облученного контроля ($p < 0,05$).

Действие хитабиса наиболее отчетливо проявлялось в сроки с 8-х по 19-е сутки после облучения, когда наблюдалась наибольшая смертность у животных контрольной группы.

Животные опытных групп объективно выглядели лучше, чем в контрольной. Симптомы желудочно-кишечного синдрома у животных, получавших хитозан и хитабис, были менее выражены, чем в контрольной группе, что может быть связано с большей сохранностью кишечного эпителия за счет сорбционных свойств хитозана (Тарасенко, 1999). Наиболее выраженная противолучевая активность хитабиса возможно связана с влиянием абисиба на изменение динамики распределения и содержания хитозана в крови и различных органах опытных животных. В исследованиях Б.А. Комарова и соавт. (2001) показана тенденция увеличения содержания хитозана в крови (при его пероральном введении в виде настоя сбора лекарственных растений) на 40% по сравнению с контрольным опытом (введение водных подкисленных растворов). Немаловажную роль при введении хитабиса, вероятно, играет стимуляция восстановительных процессов в системе крови, большая сохранность эпителия и структуры надэпителиального слизистого слоя тонкого кишечника у животных после введения абисиба (Костеша и др., 2004).

5. Изменение состояния кроветворной системы облученных животных под воздействием хитабиса и его компонентов

Облучение крыс в дозе 5,5 Гр (контрольная группа) приводило к выраженным и стойким изменениям картины периферической крови. Резкая лейкопения отмечалась во все сроки наблюдения – на 7, 14, 26 сутки после облучения. Наименьшее содержание гемоглобина и эритроцитов отмечено на 14-е сутки после облучения: количество эритроцитов составило 50%, а содержание гемоглобина – 60% от интактного уровня. В этот же срок отмечено максимальное опустошение костного мозга (клеточность костного мозга в 2 раза ниже, чем соответствующие показатели в интактной группе животных) (табл. 8).

Десятидневный прием абисиб, хитозана, хитабиса после облучения способствовал большей сохранности лейкоцитов периферической крови на 7-е и 14-е сутки после воздействия ионизирующего излучения. Наиболее выраженный эффект отмечен у крыс, получавших хитабис. На 14-е сутки после облучения у животных, получавших хитозан и хитабис, клеточность костного мозга была достоверно выше, чем у соответствующего облученного контроля на 22% и 20%, соответственно. В этот же срок отмечено достоверное увеличение содержания гемоглобина в периферической крови крыс, получавших хитозан (на 33% выше значения облученного контроля). На 26-е сутки после облучения у крыс, получавших абисиб, отмечено достоверное увеличение содержания гемоглобина в периферической крови (на 17% выше значения облученного контроля) (табл. 8).

Таким образом, введение хитозана после облучения увеличивает содержание гемоглобина и количество лейкоцитов в периферической крови, клеточность костного мозга опытных животных по сравнению с контрольными на 14-е сутки после воздействия ионизирующего излучения. Абисиб проявляет гемостимулирующее действие в восстановительный период (26-е сутки после облучения). Противолучевая активность комплексного препарата хитабис наиболее выражена по отношению к белому кровяному ростку и является результатом синергизма его отдельных компонентов.

6. Влияние хитабиса и его компонентов на состояние надэпителиального слизистого слоя тонкого кишечника облученных крыс

Пристеночный слой слизи ЖКТ выполняет многие важные функции: защитную (механическое и химическое воздействие), барьерную, пищеварительную, транспортную. Его структурная основа – полимеризованные гликопротеины (Гп). Также в составе пристеночного слизистого слоя находятся частично или полностью деградированные Гп, потерявшие свои гелеобразующие функции и состоящие из фрагментов гликопротеинов разного размера.

Защитную функцию надэпителиального слизистого слоя (НЭСС) косвенно характеризует суммарное содержание моносахаров структурных

Таблица 8

Показатели периферической крови и клеточности костного мозга крыс, облученных в дозе 5,5 Гр, после 10-дневного введения абисаба, хитозана, хитабиса

Время после облучения	Группы	Количество эритроцитов, $\times 10^{12}/л$	Количество лейкоцитов, $\times 10^9/л$	Содержание гемоглобина, г/л	Клеточность костного мозга, $\times 10^6/бедро$
-	Интактный контроль n = 10	$6,00 \pm 0,22$	$13,19 \pm 0,86$	$142,1 \pm 6,6$	$108,75 \pm 5,16$
7 суток	Контроль (облучение) n = 8	$4,49 \pm 0,04^*$	$0,95 \pm 0,06^*$	$144,0 \pm 9,0$	$72,40 \pm 3,47^*$
	Облучение + абисаб n = 8	$3,81 \pm 0,11^* / **$	$1,29 \pm 0,04^* / **$	$115,6 \pm 6,0^* / **$	$66,96 \pm 6,09^*$
	Облучение + хитозан n = 8	$3,07 \pm 0,21^* / **$	$1,20 \pm 0,03^* / **$	$116,4 \pm 6,6^* / **$	$69,56 \pm 3,07^*$
	Облучение + хитабис n = 8	$4,80 \pm 0,19^*$	$1,58 \pm 0,08^* / **$	$152,9 \pm 7,8$	$56,16 \pm 3,07^* / **$
14 суток	Контроль (облучение) n = 8	$2,96 \pm 0,28^*$	$1,36 \pm 0,11^*$	$85,5 \pm 10,1^*$	$58,70 \pm 3,10^*$
	Облучение + абисаб n = 8	$2,64 \pm 0,20^*$	$1,99 \pm 0,27^* / **$	$70,8 \pm 6,1^*$	$60,76 \pm 6,33^*$
	Облучение + хитозан n = 8	$3,70 \pm 0,25^*$	$2,31 \pm 0,28^* / **$	$114,1 \pm 4,7^* / **$	$82,50 \pm 2,61^* / **$
	Облучение + хитабис n = 8	$3,68 \pm 0,32^*$	$2,77 \pm 0,32^* / **$	$101,4 \pm 8,4^*$	$80,72 \pm 9,81^* / **$
26 суток	Контроль (облучение) n = 7	$4,40 \pm 0,07^*$	$4,14 \pm 0,34^*$	$130,7 \pm 1,7$	$117,26 \pm 1,79$
	Облучение + абисаб n = 8	$3,69 \pm 0,23^* / **$	$3,28 \pm 0,48^*$	$152,5 \pm 5,1^{**}$	$103,96 \pm 1,47^{**}$
	Облучение + хитозан n = 8	$3,61 \pm 0,15^* / **$	$3,09 \pm 0,16^* / **$	$123,7 \pm 1,5^*$	$97,86 \pm 3,67^{**}$
	Облучение + хитабис n = 7	$3,38 \pm 0,09^* / **$	$3,78 \pm 0,33^*$	$127,7 \pm 3,6$	$109,66 \pm 5,52^{**}$

Примечание: * – статистически значимые отличия показателей от интактного контроля ($p < 0,05$);

** – статистически значимые отличия показателей от соответствующего облученного контроля ($p < 0,05$).

гликопротеинов (Гп) (Тарасенко и др., 1991). Резкое снижение концентрации моносахаров при облучении указывает на ослабление защитной функции слизи во все сроки наблюдения у крыс после облучения в дозе 5,5 Гр. В группе животных, получавших хитабис, отмечено достоверное увеличение суммарного содержания моносахаров на 7-е и 14-е сутки после облучения (табл. 9). На 14-е и 26-е сутки после облучения в группе крыс, получавших хитозан, отмечено увеличение суммарного содержания моносахаров (табл. 9).

Облучение приводило к увеличению суммы моносахаров внеструктурных (деградированных) Гп, на 7-е сутки их содержание в контрольной группе увеличивалось более чем в 2 раза (табл. 10). Данные факты свидетельствуют о деструктивных процессах, происходящих в облученном организме. При введении препаратов после облучения сумма моносахаров деградированных Гп на 7-е сутки возрастала в меньшей степени (табл. 10). На 14-е и 26-е сутки после облучения наименьшая сумма моносахаров внеструктурных Гп отмечена в контрольной группе животных. Применение препаратов увеличивало их содержание на 14-е и 26-е сутки после воздействия ионизирующего излучения во всех опытных группах за исключением крыс, получавших абисиб (табл. 10). Исследованиями Н.В. Бочкаревой и соавт. (1999) было показано, что деградированные Гп обладают очень высокой неферментативной антиоксидантной активностью. Можно предположить, что в восстановительный период, когда в группах крыс, которые получали после облучения абисиб, хитозан, хитабис, отмечено достоверное увеличение деградированных Гп, последние выполняют защитную антиоксидантную функцию, особенно актуальную при облучении.

Для характеристики строения олигосахаридных цепочек структурных Гп рассчитывали парциальное содержание отдельных моносахаров. Известно, что основной функцией структурных Гп НэСС является образование слизистого геля, который образуется за счет нековалентных взаимодействий между гликозилированными участками разных молекул Гп (Slomiany et al., 1985; Sellers et al., 1988). Эти взаимодействия осуществляются благодаря терминально расположенными остатками фукозы и нейраминовой кислоты, а также наличием дисульфидных связей (Кривова и др., 2002). По количеству терминально расположенных фукозы и нейраминовой кислоты, по-видимому, можно судить об устойчивости слизистого геля к разрушению.

Облучение контрольных животных приводит к изменению парциального состава углеводных компонентов олигосахаридных цепочек Гп. Суммарное содержание фукозы и нейраминовой кислоты снижается как в облученном контроле, так и при применении абисоба (табл. 11).

Введение хитозана и хитабиса существенно изменяет соотношение углеводных компонентов слизи по сравнению с соответствующими показателями у облученного контроля. На 7-е сутки после облучения у животных, получавших хитозан, суммарное содержание концевых углеводных компонентов составляет 49,9%, что превышает их содержание в интактном контроле, а на 14 и 26 сутки оно значительно снижается (до 24,6% и 22,3%

Таблица 9

Состав структурных гликопротеинов пристеночного слизистого слоя тонкого кишечника крыс, облученных в дозе 5,5 Гр

Срок после облучения	группа	Гексозамины, мкмоль/мл	Галактоза, мкмоль/мл	Фруктоза, мкмоль/мл	Нейраминовая кислота, мкмоль/мл	Сумма моносахаров мкмоль/мл
	Интактный контроль n = 10	5,31 ± 0,81	23,3 ± 4,0	18,1 ± 5,3	0,966 ± 0,133	47,7 ± 5,2
7 суток	Контроль (облучение) n = 8	5,30 ± 0,30	14,43 ± 1,11*	7,21 ± 1,18*	0,999 ± 0,004	27,9 ± 1,16*
	Облучение + абисиб n = 8	5,6 ± 0,21	14,71 ± 1,49*	5,62 ± 0,63*	0,866 ± 0,100	26,8 ± 1,46*
	Облучение + хитозан n = 8	4,2 ± 0,25**	8,38 ± 0,97**	11,41 ± 2,07	1,099 ± 0,230	25,1 ± 2,01*
	Облучение + хитабис n = 8	5,3 ± 0,21	16,71 ± 1,63*	9,62 ± 1,76*	1,265 ± 0,110	32,6 ± 1,60**
14 суток	Контроль (облучение) n = 8	3,75 ± 0,21	7,05 ± 0,69*	2,77 ± 0,23*	1,216 ± 0,180	14,8 ± 0,50*
	Облучение + абисиб n = 8	4,93 ± 0,38**	8,49 ± 1,30*	3,65 ± 0,30*	1,485 ± 0,110	18,6 ± 1,20**
	Облучение + хитозан n = 8	3,07 ± 0,15**	14,21 ± 2,38**	3,93 ± 0,26**	1,698 ± 0,180*	22,9 ± 2,20**
	Облучение + хитабис n = 8	3,25 ± 0,10*	10,66 ± 1,31**	4,12 ± 0,16**	1,375 ± 0,070	19,4 ± 1,30**
26 суток	Контроль (облучение) n = 7	3,39 ± 0,15*	8,38 ± 1,17*	4,46 ± 0,51*	1,399 ± 0,100	17,6 ± 1,10*
	Облучение + абисиб n = 8	3,25 ± 0,14*	9,27 ± 0,94*	4,03 ± 0,31*	1,765 ± 0,030**	18,3 ± 0,80*
	Облучение + хитозан n = 8	3,35 ± 0,34*	43,0 ± 3,32**	12,42 ± 0,58**	0,902 ± 0,100**	59,7 ± 3,20**
	Облучение + хитабис n = 7	2,71 ± 0,27*	5,00 ± 0,34**	4,69 ± 0,55*	1,775 ± 0,120**	14,2 ± 0,30*

Примечание: * – статистически значимые отличия от интактного контроля ($p < 0,05$);

** – статистически значимые отличия от соответствующего облученного контроля ($p < 0,05$).

Таблица 10

Содержание углеводных компонентов во внеструктурных гликопротеинах надэпителиального слизистого слоя крыс, облученных в дозе 5,5 Гр

Срок после облучения	группа	Гексозамины, мкмоль/мл	Галактоза, мкмоль/мл	Фруктоза мкмоль/мл	Нейраминовая кислота, мкмоль/мл	Сумма моносахаров, мкмоль/мл
	Интактный контроль n = 10	0,319± 0,036	1,48 ± 0,33	0,67 ± 0,14	0,126 ± 0,026	2,58 ± 0,31
7 суток	Контроль (облучение) n = 8	1,311 ± 0,063*	3,719 ± 0,158*	2,32 ± 0,12*	0,584 ± 0,075*	7,93 ± 0,14*
	Облучение + абисиб n = 8	1,234 ± 0,180*	2,792 ± 0,247**	1,57 ± 0,25**	0,474 ± 0,050*	6,07 ± 0,24*
	Облучение + хитозан n = 8	1,175 ± 0,121*	3,458 ± 0,188*	1,90 ± 0,09**	0,668 ± 0,065*	7,20 ± 0,18*
	Облучение + хитабис n = 8	1,211 ± 0,165*	2,775 ± 0,259**	0,91 ± 0,19**	0,328 ± 0,048**	5,22 ± 0,25**
14 суток	Контроль (облучение) n = 8	1,013 ± 0,059*	2,858 ± 0,620	1,22 ± 0,10	0,401 ± 0,045*	5,49 ± 0,58
	Облучение + абисиб n = 8	1,365 ± 0,067**	2,614 ± 0,360	1,00 ± 0,08	0,691 ± 0,047**	5,67 ± 0,30*
	Облучение + хитозан n = 8	1,370 ± 0,144**	5,345 ± 0,800**	4,25 ± 0,82**	0,556 ± 0,036**	11,52 ± 0,78**
	Облучение + хитабис n = 8	1,089 ± 0,140*	9,343 ± 0,330**	1,12 ± 0,21	0,455 ± 0,053*	10,92 ± 0,29**
26 суток	Контроль (облучение) n = 7	1,370 ± 0,105*	0,844 ± 0,003	1,30 ± 0,09	0,375 ± 0,040*	3,89 ± 0,09
	Облучение + абисиб n = 8	1,546 ± 0,050*	4,218 ± 0,930**	4,22 ± 0,90	0,604 ± 0,020**	10,59 ± 0,91**
	Облучение + хитозан n = 8	1,587 ± 0,105*	35,48 ± 6,130**	11,31 ± 0,96**	0,791 ± 0,046**	49,17 ± 5,17**
	Облучение + хитабис n = 7	1,990 ± 0,164**	3,447 ± 0,380**	2,23 ± 0,20**	0,578 ± 0,056**	8,25 ± 0,33**

Примечание: * – статистически значимые отличия показателей от интактного контроля (p < 0,05);

** – статистически значимые отличия от соответствующего облученного контроля (p < 0,05).

соответственно) (табл. 11). Такая динамика, вероятно, связана с тем, что действие хитозана проявлялось только в период введения препарата (10 суток). Этот эффект, вероятно, связан с сорбционными свойствами хитозана и малым его проникновением из желудочно-кишечного тракта в кровоток.

Таблица 11

Содержание углеводных компонентов (%) структурных гликопротеинов надэпителиального слизистого слоя тонкого кишечника у крыс, получавших абисиб, хитозан и хитабис в течение 10 дней после облучения в дозе 5,5 Гр

		Гексоз-амины	Галактоза	Фукоза	Нейраминовая кислота	Сумма фукоза+нейрамин. к-та
Интактный контроль		11,0	49,0	38,0	2,0	40,0
Облученный контроль	7 суток	19,0	51,7	25,8	3,5	29,3
	14 суток	25,4	47,7	18,7	8,2	26,9
	26 суток	19,3	47,5	25,3	7,9	33,2
Облучение + абисиб	7 суток	21,0	55,0	21,0	3,0	24,0
	14 суток	26,6	45,7	19,7	8,0	27,7
	26 суток	17,8	50,6	22,0	9,6	31,6
Облучение + хитозан	7 суток	16,7	33,4	45,5	4,4	49,9
	14 суток	13,4	62,0	17,2	7,4	24,6
	26 суток	5,6	72,0	20,8	1,5	22,3
Облучение + хитабис	7 суток	16,0	51,0	29,0	4,0	33,0
	14 суток	16,8	55,0	21,2	7,0	28,2
	26 суток	19,0	35,0	33,0	12,5	45,5

При введении хитабиса суммарное содержание концевых углеводных компонентов во все сроки наблюдения выше, чем соответствующие показатели в облученном контроле, а на 26 сутки превышает соответствующие показатели интактного контроля (табл. 11). Полученные данные свидетельствуют о пролонгированном действии хитабиса, что вероятно связано с сорбционными, гемо- и иммуностимулирующими эффектами хитозана и абисиба, возможным увеличением проникающей способности хитабиса и большей степенью его накопления в различных органах по сравнению с отдельным применением компонентов препарата.

Таким образом, на модели окислительного стресса показана эффективность хитабиса и его компонентов как корректоров функционального состояния критических систем организма при радиационном воздействии.

Совокупность литературных и собственных данных позволяет предположить, что защитное действие хитабиса и его компонентов является проявлением ряда механизмов: один из них – их антиоксидантная активность.

Кроме того, можно говорить о стабилизирующем влиянии хитабиса и его компонентов на определенные звенья гемопоэза и нормализующем воздействии на НЭСС тонкого кишечника.

Наиболее выраженная эффективность хитабиса может быть связана с влиянием абисиба на изменение динамики распределения и содержания хитозана в крови и различных органах опытных животных. Гетерогенность комплексного препарата (хитабис) дает синергизм защитного действия – гемо- и иммуностимулирующее действие абисиба усиливается сочетанием с сорбционными свойствами хитозана.

Таким образом, в результате проведенного исследования можно сделать заключение о выраженном защитном действии комплексного препарата хитабис в отношении свободнорадикальных процессов.

ВЫВОДЫ

1. Антиоксидантная активность хитабиса и его компонентов *in vitro* зависит от концентрации хитозана в реакционной среде и возрастает в ряду абисиб → хитабис → хитозан.
2. Пероральное введение хитабиса интактным мышам в течение 12 дней достоверно увеличивает антиоксидантную активность кишечной слизи по сравнению с контрольной группой и группами, получавшими абисиб и хитозан; при пролонгированном введении абисиба, хитозана, хитабиса в течение 33 дней антиоксидантная активность кишечной слизи достоверно увеличивается во всех группах по сравнению с контрольными животными.
3. Действие хитабиса на систему кроветворения в условиях активации свободнорадикальных процессов, индуцированных ионизирующим излучением, проявляется в смягчении выраженности лейкопении и большей сохранности клеточности костного мозга по сравнению с облученным контролем.
4. Применение хитабиса способствует формированию более устойчивого к разрушению слизистого геля тонкого кишечника в условиях окислительного стресса: увеличивается суммарное содержание терминальных углеводных компонентов – фукозы и нейраминовой кислоты – в структурных гликопротеинах слизи.
5. Применение хитабиса стабилизирует функциональное состояние организма животных, что проявляется при окислительном стрессе, индуцированном рентгеновским излучением, в увеличении выживаемости экспериментальных крыс на 24% и средней продолжительности жизни на 13 суток относительно облученного контроля.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работа, опубликованная в рецензируемом научном журнале, включенном в Перечень изданий, рекомендованных ВАК:

1. Гулик Е.С., Костеша Н.Я. Противолучевая активность хитозана, растворенного в экстракте пихты сибирской // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2004. – Т. 44, вып. 5. – С. 563–565.

Работы, опубликованные в других изданиях:

2. Гулик Е.С., Костеша Н.Я. Противолучевое действие хитабиса // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. Тезисы докладов XIX Съезда физиологического общества им. И.П.Павлова. – СПб: Наука – 2004. – Т. 90, № 8. – С. 273.

3. Костеша Н.Я., Гулик Е.С., Борило Г.А. Противолучевое действие комплексного препарата хитабис // Вестник Томского государственного университета. Бюллетень оперативной научной информации «Современные исследования в биологии». – 2004. – № 30. – С. 78–83.

4. Гулик Е.С., Иванова Л.А., Борило Г.А., Костеша Н.Я. Влияние хитабиса на морфологические показатели тонкого кишечника облученных крыс // Бюллетень сибирской медицины. Приложение 1: Тезисы докладов V Сибирского физиологического общества. – 2005. – Т.4. – С. 125–126.

5. Костеша Н.Я., Иванова Л.А., Гулик Е.С. Влияние хитабиса на структуру тонкого кишечника облученных крыс // Вестник Томского государственного университета. Приложение: Материалы международных, всероссийских, региональных научных конференций, семинаров, симпозиумов, школ, проводимых в ТГУ. – 2006. – № 21. – С. 72–73.

6. Костеша Н.Я., Гулик Е.С., Албулов А.И., Шинкарев С.М., Кузнецов П.А., Банникова Г.А., Авдеева Т.А. Противолучевая активность препаратов хитозана с растительными экстрактами // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. Материалы восьмой международной конференции. – Казань. – 2006. – С. 178–181.

7. Гулик Е.С., Борило Г.А., Костеша Н.Я. Состояние надэпителиального слизистого слоя тонкого кишечника облученных крыс, леченных хитозаном // Нейрогуморальные механизмы регуляции органов пищеварительной системы в норме и при патологии. Материалы научной конференции с международным участием. – Томск: СибГМУ. – 2007. – С. 99–102.

8. Гулик Е.С., Заева О.Б., Борило Г.А., Костеша Н.Я. Антиоксидантная активность хитозана *in vitro* и *in vivo* // Сибирский консилиум. Материалы третьей Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов». – Новосибирск. – 2007. – № 7 (62). – С. 182.

9. Костеша Н.Я., Гулик Е.С., Борило Г.А., Заева О.Б. Влияние хитабиса на антиоксидантную активность плазмы крови и кишечной слизи крыс // 2-й съезд физиологов СНГ. – Кишинев: НТЛ. – 2008. – С. 161.

10. Гулик Е.С., Костеша Н.Я., Борило Г.А. Влияние хитабиса на функциональное состояние тонкого кишечника облученных крыс // Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных органов и систем в норме и при патологии. Материалы научной конференции с международным участием. – Томск: СибГМУ. – 2009. – С. 58–60.

11. Гулик Е.С., Костеша Н.Я., Борило Г.А., Фролова М.А., Албулов А.И. Влияние хитозана и хитабиса на состояние надэпителиального слизистого слоя тонкого кишечника // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов. Материалы международной научно-практической конференции. – Щелково. – 2009. – С. 481–484.