

на правах рукописи

БРАШ Алексей Александрович

ВЛИЯНИЕ ЭМОКСИПИНА НА НЕКОТОРЫЕ ПАРАМЕТРЫ
СИСТЕМЫ МЕГАКАРИОЦИТ-ТРОМБОЦИТ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ
ХОЛОДОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ (В ЭКСПЕРИМЕНТЕ)

14 00 25 – Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Владивосток

2004

Работа выполнена в ГОУ ВПО Амурская государственная
медицинская академия

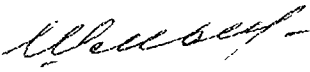
- Научный руководитель заслуженный деятель науки РФ,
академик ПНИ, доктор
медицинских наук, профессор
Доровских Владимир Анатольевич
- Официальные оппоненты Доктор медицинских наук, профессор
Кириллов Олег Иванович
- Доктор медицинских наук, профессор
Маркелова Елена Владимировна
- Ведущая организация ГОУ ВПО Алтайский
государственный медицинский
университет

Защита " ____ " _____ в ____ часов на заседании

Диссертационного совета К 208 007 02 при Владивостокском
государственном медицинском университете (690950, г Владивосток,
пр-т Острякова, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Владивостокского
государственного медицинского университета.

Автореферат разослан " ____ " _____ 2004г

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат медицинских наук  И И Шмыкова

2006-4
20394

2201152

3

Актуальность проблемы.

Значительная часть населения России проживает в климатогеографических условиях которые Женевской конференцией 1964 г рекомендовано называть «высокими широтами» В 1980 г В П Казначеев отмечал, что для человека высокоширотные территории являются субэкстремальными. Хроническому поражению холодом лиц проживающих в этих условиях способствует сочетание низкой температуры среды с другими климатическими факторами

Процесс холодовой адаптации связан с глубокой перестройкой практически всех функциональных систем организма (Грибанов А В Данилова Р И. 1994) Так длительное холодовое воздействие сопровождается изменениями жирового углеводного и белкового обменов приводит к нарушению метаболизма и регенерации тканей (Ю В Владимиров И А Арчаков 1972) Изменяется течение гипертонической болезни (Машин А А Касаткина И Е 1989) снижается иммунитет (Новицкий И А., 1991, Грибанов А В, Данилова Р И 1994)

Холодовое воздействие вызывает изменения в коагуляционном и тромбоцитарном гемостазе - уменьшается количество тромбоцитов в периферической крови (Доровских В А . 1987 г) При длительном воздействии холода повышается адгезивная и агрегационная активность тромбоцитов и активируется коагуляционное звено гемостаза.

Применение препаратов, обладающих антиоксидантными свойствами, позволяет предупредить изменения тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза в период адаптации к длительному холодовому воздействию Однако вопрос о влиянии эмоксипина на систему мегакариоцит-тромбоцит при длительном холодовом воздействии не изучался.

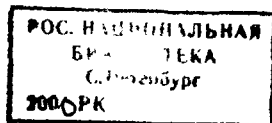
В доступной нам литературе данных по данному вопросу нам обнаружить не удалось. С целью выяснения этого вопроса мы провели данное экспериментальное исследование.

Цель исследования:

Целью настоящего экспериментального исследования является: изучить влияние препарата эмоксипин на систему мегакариоцит-тромбоцит при длительном холодовом воздействии в сравнении с влиянием ацетилсалициловой кислоты и альфа-токоферола ацетата.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние длительного холодового воздействия на систему мегакариоцит-тромбоцит у лабораторных животных (крыс)
2. Изучить влияние аспирина на фоне длительного воздействия холода на систему мегакариоцит-тромбоцит у лабораторных животных (крыс)
3. Изучить влияние α -токоферола ацетата на фоне длительного воздействия холода на систему мегакариоцит-тромбоцит у лабораторных животных (крыс)
4. Изучить влияние эмоксипина на фоне длительного воздействия холода на систему мегакариоцит-тромбоцит у лабораторных животных (крыс)
5. Сравнить эффективность применения аспирина α -токоферола ацетата и эмоксипина на фоне длительного холодового воздействия с целью коррекции



изменений в системе мегакариоцит-тромбоцит возникающие при длительном холодовом воздействии

Новизна исследования.

Впервые выполнено комплексное исследование с использованием морфологических и функциональных методов системы мегакариоцит-тромбоцит влияния аспирина, токоферола и эмоксипина на параметры системы мегакариоцит-тромбоцит на фоне длительного холодового воздействия. Впервые сравнены изменения изучаемых нами параметров при применении аспирина, токоферола ацетата и эмоксипина при длительном холодовом воздействии

Положения выносимые на защиту

1. Длительное холодовое воздействие активирует систему мегакариоцит-тромбоцит у лабораторных животных (крыс)
2. Применение эмоксипина на фоне длительного холодового воздействия вызывает нормализацию показателей системы мегакариоцит-тромбоцит
3. Эмоксипин является наиболее эффективным препаратом для предотвращения влияния холода на систему мегакариоцит-тромбоцит в сравнении с аспирином и альфа-токоферола ацетатом

Научно-практическая ценность работы.

Определены направленность и выраженность изменений в системе мегакариоцит – тромбоцит возникающие при длительном холодовом воздействии. Произведена комплексная оценка эффективности влияния эмоксипина в сравнении с препаратами различных фармакологических групп (аспирин, токоферол) при длительном холодовом воздействии. Дана оценка влияния каждого из исследуемых препаратов на систему мегакариоцит-тромбоцит при длительном воздействии холода

Апробация работы

Основные положения и материалы диссертации доложены на IV региональной научно-практической конференции "Молодежь XXI века шаг в будущее" (Благовещенск, 2003), на Четвертой международной научно-практической конференции "Здоровье и образование в XXI веке" (Москва, 2003), зарегистрирована заявка на изобретение.

Структура и объем диссертации.

Работа состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, указателя литературы. Диссертация изложена на 139 листах машинописного текста, иллюстрирована 20 таблицами и 31 рисунком. Библиографический указатель включает 198 источников, из которых 67 - российских и 131 – зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная модель длительного холодового воздействия

Модель длительного холодового воздействия создавали ежедневно помещая животных в климатикамеру Fentron ГДР создающую режим постоянного

охлаждения (-15°C) с постоянным притоком воздуха. Экспериментальных животных помещали в климатокамеру ежедневно на три часа утром в одно и то же время. Животных интактной группы для контроля также помещали во включенную климатокамеру ежедневно на 3 часа при температуре $+24^{\circ}\text{C}$.

В качестве экспериментальных животных мы использовали самцов крыс массой от 200 до 250 г. Всех животных мы распределили на 5 экспериментальных групп: 1) Интактная (контроль1) группа – животные содержались в обычных условиях, не получали каких-либо фармакологических веществ и не подвергались воздействию холода. 2) Группа Холод (контроль2) – животные подвергались длительному холодовому воздействию, не получали каких-либо фармакологических веществ. 3) Группа Аспирин (подопытная1) – животные подвергались воздействию холода, получали ацетилсалициловую кислоту. 4) Группа Токоферол (подопытная2) – животные подвергались охлаждению, получали альфа-токоферола ацетат. 5) Группа Эмоксипин (подопытная3) – животные подвергались длительному воздействию низкой температуры, получали эмоксипин. Для забора экспериментального материала крыс наркотизировали этиминалом натрия. После забора материала животных подвергали эвтаназии путем введения летальной дозы этиминала натрия.

Применяемые в эксперименте фармакологические препараты

Мы применяли аспирин как общепризнанное средство, обладающее антиагрегационными свойствами, как стандарт сравнения. Ацетилсалициловую кислоту вводили зондом в желудок из расчета 150 мг/кг, так как в данной дозировке у крыс аспирин снижает агрегацию тромбоцитов в два раза, в течение двух суток (С.Л. Галян и др., 1996; А.А. Вакулин, 1998; К.М. Лакин, В.П. Балуда, 1981; И.А. Дементьева, 1998). Мы использовали масляный раствор альфа-токоферола ацетата (витамин Е) как традиционное средство, обладающее антиоксидантными свойствами из расчета 10 мг/кг, вводили витамин Е - per os, так как в данной дозировке он проявляет свои антиоксидантные свойства. Мы применяли водорастворимый раствор эмоксипина, выпускаемый Таллинским фармзаводом. Препарат вводили внутримышечно ежедневно в дозе 10 мг/кг (С.В. Салкина, 1999). Все препараты вводили за 30 минут до охлаждения экспериментальных животных.

Морфологические исследования тромбоцитов в периферической крови

Кровь для определения количества тромбоцитов брали у наркотизированных крыс из хвостовой вены. Подсчет количества тромбоцитов крови проводили пробирочным способом в камере Бюркера с сеткой Горяева с использованием фазовоконтрастного микроскопа при зеленом светофильтре (Feisly, Ludvin, 1949). Одновременно с подсчетом общего количества тромбоцитов в камере определяли абсолютное число пластинок больших размеров (мегатромбоциты диаметром более 2,5 мкм) с помощью окулярометрической сетки, в последующем мы вычисляли их процентное содержание относительно общего количества тромбоцитов. Для морфологических исследований пластинок готовили мазки крови. В тромбоцитограмме определяли процентное содержание юных, зрелых, старых, дегенеративных и вакуолизованных тромбоцитов (Кост, 1975). После определения относительного содержания тромбоцитов различной степени зрелости

рассчитывали их абсолютное количество в крови в пересчете на 1 мкл объема крови животного

Исследование функциональной активности тромбоцитов

Функциональную активность тромбоцитов изучали в плазме крыс, богатой тромбоцитами. Функциональную активность тромбоцитов у подопытных крыс изучали при опрессии и индуцированной агрегации тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме с использованием агрегометра AP2110 (Solar Биотрус) и ПСМ (субъединица) компьютерного программного обеспечения, поставленного производителем прибора. В качестве индуктора агрегации использовали АДФ в концентрации 2 мкг/мл, производимый фирмой "Технология – Стандарт". Приготовление раствора АДФ и определение агрегации тромбоцитов производили в соответствии с инструкциями изготовителя прибора и диагностического набора "АДФ".

При анализе агрегатограмм учитывали степень, скорость, время агрегации и степени дезагрегации. Степень дезагрегации оценивали по уровню светопропускания плазмы через 5 минут после внесения индуктора агрегации, измеряли в процентах.

Морфологические исследования костного мозга

В костном мозге животных определяли абсолютное количество миелокариоцитов, находящихся в канале всей бедренной кости (Mantz, 1957). Определив в камере Горяева содержание миелокариоцитов в 1 мкл, полученной взвеси с известной степенью разбавления, вычисляли их абсолютное количество в костном мозге всей бедренной кости экспериментальных животных. Данные представляли в пересчете на 100 грамм массы животного. Для морфологических исследований из костного мозга бедренной кости готовили мажи. После определения относительного содержания миелокариоцитов вычисляли их абсолютное количество во всем костном мозге бедренной кости в пересчете на 100 граммов массы животного (крыс). В мегакариоцитограмме определяли количество мегакариоцитов I-й, II-й и III-й степени зрелости (Odell, Jackson, 1968, 1970). После определения относительного содержания мегакариоцитов различной степени зрелости рассчитывали их абсолютное содержание в костном мозге всей бедренной кости в пересчете на 100 граммов массы животного.

Статистическая обработка полученных результатов

Все экспериментальные данные были подвергнуты статистической обработке. На первом этапе определяли тип распределения исследуемого признака. Для принятия решения о типе распределения признака в группах полученных данных статистическая обработка результатов эксперимента проводилась с использованием W критерия Шапиро – Уилка (Shapiro-Wilk's W test). В связи с тем, что в нашем эксперименте опыты заканчивались гибелью животных, мы использовали критерии сравнения для независимых групп. В дальнейшем использовали T – критерий Стьюдента для независимых групп или U – критерий Манна – Уитни (Mann-Whitney U-test) в зависимости от типа определения. Для описания распределения исследуемого признака для групп с непараметрическим распределением изучаемого

признака в выборке. мы использовали медиану, нижний и верхний квартили: для групп с параметрическим типом распределения медиану и стандартное отклонение

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние изучаемых препаратов на систему мегакариоцит-тромбоцит на 7 день эксперимента

Значения изучаемых нами параметров системы мегакариоцит-тромбоцит на 7 день эксперимента у всех экспериментальных групп представлены в таблицы 1а и 1б

В костном мозге подопытных животных (крыс) на 7 день охлаждения отмечались изменения характерные для напряжения мегакариоцитопоэза наиболее выраженные в группе холод. Препараты в различной степени компенсируют изменения происходящие в костном мозге. Однако следует отметить различное влияние на мегакариоцитогранию применяемых в опытах препаратов. Токоферол способствует наилучшему сохранению количества мегакариоцитов I степени зрелости в то время, как аспирин наилучшим образом компенсирует изменения количества мегакариоцитов II и III степени зрелости. Эмоксипин в целом оказывает средний по выраженности эффект на мегакариоцитогранию крыс подвергшиеся холодовому воздействию в течение 7 дней, в сравнении с аспирином и токоферолом. Длительное холодовое воздействие вызывает уменьшение общего количества тромбоцитов в крови и увеличение процентного и абсолютного количества юных тромбоцитов и мегатромбоцитов, и уменьшение количества зрелых и старых тромбоцитов. Применяемые препараты способствуют снижению выраженности этих изменений, препараты оказывают разнонаправленный эффект, так аспирин в наибольшей степени препятствует снижению общего количества тромбоцитов, снижению количества зрелых и старых тромбоцитов, а эмоксипин и токоферол способствуют нормализации количества и процентного содержания юных тромбоцитов и мегатромбоцитов, этот эффект наиболее выражен у эмоксипина. Обращает на себя внимание, что применение аспирина на фоне длительного холодового воздействия вызывает появление вакуолизированных тромбоцитов. Измерение агрегационной активности так же показало, что препараты имеют разно направленный характер и если аспирин наилучшим образом способствует нормализации степени агрегации, скорости агрегации и времени агрегации тромбоцитов, то эмоксипин и токоферол в большей степени влияют на степень агрегации тромбоцитов на 5 минуте, нормализуя дезагрегацию тромбоцитов

Влияние изучаемых препаратов на систему мегакариоцит-тромбоцит на 14 день эксперимента

Значения изучаемых нами параметров системы мегакариоцит-тромбоцит на 14 день эксперимента у всех экспериментальных групп представлены в таблицы 2а и 2б

В костном мозге подопытных животных (крыс) на 7 день охлаждения отмечались изменения характерные для напряжения мегакариоцитопоэза наиболее выраженные в группе холод. Препараты в различной степени и разнонаправленно компенсируют изменения, происходящие в костном мозге. Различное влияние на

Таблица 1а.

Уровень изучаемых параметров в экспериментальных группах на 7 день эксперимента

| показатель | интактная | | холест | | аспирин | | тоферол | | моксипип | |
|---|-----------|-------------|-------------|-----------------|-----------|-----------------|--------------|----------------|--------------|-----------------|
| | М | НК/ВК | М | НК/ВК | М | НК/ВК | М | НК/ВК | М | НК/ВК |
| Абс. МПЦ (*10 ⁶ клеток/100г) | 39.9 | 39.7/40.2 | 43.6** | 42.9' 44.1 | 37.7 | 35.6 39.5 | 42.3' ** | 42.1 42.2 | 42.2' ** | 41.9 42.5 |
| Отн. МГЦ I (%) | 0.2 | 0.20/0.20 | 0.31** | 0.29' 0.31 | 0.22 | 0.18 0.31 | 0.37' ** | 0.26 0.38 | 0.28' ** | 0.28 0.3 |
| Абс. МГЦ I (*10 ⁶ клеток/100г) | 0.08 | 0.078/0.081 | 0.131* * | 0.124' 0.137 | 0.078 | 0.069' 0.113 | 0.136' ** | 0.152 0.160 | 0.111' ** | 0.118/ 0.126 |
| Отн. МГЦ I (%) | 20.3 | 20.2/20.5 | 24.3** | 23.9' 24.5 | 23.0 * | 21.2 23.5 | 19.9 * | 18.0 20.2 | 22.0' * | 21.9 22.1 |
| Отн. МГЦ II (%) | 64.9 | 64.8/65.0 | 32.4** | 31.6' 32.8 | 63.2 | 62.0 64.8 | 41.2 ** | 40.1 42.1 | 8.6 * | 46.9/ 50.1 |
| Отн. МГЦ III (%) | 14.8 | 14.5/14.8 | 43.6** | 42.6' 43.9 | 14.6 | 12.5 16.8 | 39.2 * | 37.6 39.8 | 29.5' ** | 27.0 31.2 |
| Абс. МГЦ I (*10 ⁶ клеток/100г) | 0.016 | 0.016/0.017 | 0.032* * | 0.030' 0.034 | 0.018 | 0.016 0.023 | 0.031' ** | 0.030 0.032 | 0.026' ** | 0.026 0.028 |
| Абс. МГЦ II (*10 ⁶ клеток/100г) | 0.052 | 0.050/0.052 | 0.043* * | 0.041' 0.045 | 0.050 | 0.045 0.059 | 0.064' ** | 0.064 0.065 | 0.058' ** | 0.055/ 0.065 |
| Абс. МГЦ III (*10 ⁶ клеток/100г) | 0.012 | 0.011/0.013 | 0.057* * | 0.054' 0.059 | 0.011 | 0.009' 0.019 | 0.061' ** | 0.058 0.064 | 0.030' ** | 0.035/ 0.036 |
| Количество тромбоцитов 10 ¹⁰ /литр | 441 | 433/451 | 331 ** | 328 345 | 412.5 | 380.0' 430.0 | 398 * | 383' 410 | 355.0' ** | 380.0/ 400.0 |
| Количество МГр 10 ¹⁰ /литр | 48 | 47.1/48.5 | 59.9 ** | 57.4 62.3 | 47.5 | 40.0 62.0 | 52.0 * | 51.4 55.0 | 46.0 * | 45.0/ 51.0 |
| Отн. МГр % | 10.9 | 10.6/11.2 | 17.7 ** | 17.3 18.0 | 13.0 | 9.1 14.8 | 13.3 ** | 13.0 13.6 | 12.3' ** | 11.8 12.9 |

Примечания

М – медиана, НК – нижний квартиль, ВК – верхний квартиль, в сравнении с исходным уровнем * уровень P<0.05 ** уровень P<0.005;

Таблица 16

Уровень изучаемых параметров в экспериментальных группах на 7 день эксперимента (продолжение таб. 1а)

| группа | ингаляционная | | холод | | аспирин | | | токоферол | | эмоксипин | |
|---|---------------|-------------|-------------|----------------|-------------|---------------|-------------|----------------|-------------|----------------|--|
| | М | НК/ВК | М | НК/ВК | М | НК/ВК | М | НК/ВК | М | НК/ВК | |
| Юные тромбоциты % | 10 | 9.7/10.1 | 19.5 ** | 19.0 20.0 | 15.5 ** | 4.0 18.0 | 13.3 ** | 13.0 14.0 | 12.0 * | 11.4 12.0 | |
| Зрелые тромбоциты % | 89.3 | 88.9/90.3 | 80.0 ** | 80.0 81.0 | 84.0 ** | 51.0 86.0 | 85.2 ** | 85.0 86.0 | 88.0 * | 86.9 88.2 | |
| Старые тромбоциты % | 0.8 | 0.6/1.1 | 0.0 *** | 0.0 0.0 | 0.5 0.0 | 1.5 1.5 | 0.6 0.6 | 0.4 0.6 | 0.1 * | 0.0 0.1 | |
| Дегенеративные тромбоциты % | 0 | -/- | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.0 | 0.0/0.1 | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.0 | 0.0/0.0 | |
| Вакуолизированные тромбоциты % | 0 | -/- | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.1 | 0.0/0.2 | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.0 | 0.0/0.0 | |
| Юные тромбоциты 10 ¹⁰ /л | 44.1 | 43.7/44.6 | 65.9 ** | 62.9 67.4 | 61.7 ** | 8.6 79.2 | 54.3 * | 51.3 56.0 | 45.4 * | 43.2 46.7 | |
| Зрелые тромбоциты 10 ¹¹ /л | 393.8 | 393.4/402.3 | 266.9 ** | 264.8 276.0 | 355.4 ** | 13.5 359.1 | 338.7 ** | 319.2 352.6 | 338.5 ** | 330.2 356.8 | |
| Старые тромбоциты 10 ¹¹ /л | 3.5 | 2.6/4.6 | 0.0 *** | 0.0 | 2.3 | 1.0 6.6 | 2.3 | 1.4 2.1 | 0.4 ** | 0.0 0.1 | |
| Дегенеративные тромбоциты 10 ⁹ /л | 0 | -/- | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.0 | 0.0/0.4 | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.0 | 0.0/0.0 | |
| Вакуолизированные тромбоциты 10 ⁹ /л | 0 | -/- | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.2 | 0.0/0.8 | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.0 | 0.0/0.0 | |
| Сильность агрегации (%) | 66.1 | 65.8/66.5 | 81.3 ** | 79.7 86.4 | 71.7 ** | 0.9 72.1 | 77.6 ** | 76.8 77.7 | 78.4 ** | 77.4 78.9 | |
| Время агрегации (мин. сек) | 3:00 | 2:52/3:08 | 2:33* * | 2:24 2:36 | 2:42 * | 37 2:59 | 2:32 * | 2:24 2:40 | 2:33 ** | 2:30 2:41 | |
| Скорость агрегации (°/мин) | 64.15 | 63.2/64.7 | 71.5 ** | 69.9 72.0 | 64.1 * | 64.1 64.0 | 67.0 ** | 67.5 68.1 | 68.1 ** | 68.3 69.4 | |
| Агрегация на 5 минуте (°) | 57.45 | 54.9/59.9 | 67.15 ** | 63.2 68.4 | 55.3 * | 73.0 77.8 | 44.5 ** | 44.0 45.0 | 37.2 ** | 36.4 37.8 | |

Примечания

М – медиана, НК – нижний квартиль, ВК – верхний квартиль; в сравнении с исходным уровнем * уровень P<0.05 ** уровень P<0.005;

мегакариоцитограмму применяемых в опытах препаратов заключается в следующем. так токоферол и эмоксипин действуют сходным образом однако выраженность влияния эмоксипина более значима в сравнении с токоферолом. Влияние аспирина в целом выражается в предотвращении увеличения количества мегакариоцитов но за счет

незрелых форм. Эмоксипин преимущественно сохраняет абсолютное количество и процентное соотношение в популяции зрелых форм (мега и прототипы I и II степени зрелости) и вызывает увеличение количества мегакариоцитов в костном мозге – эмоксипин так же как *vit E* оказывает сходные эффекты а аспирин вызывает резкий дисбаланс в мегакариоцитограмме в сторону незрелых форм. Длительное холодовое воздействие на 14 день вызывает уменьшение общего количества тромбоцитов в крови и увеличении процентного и абсолютного количества юных тромбоцитов и мегатромбоцитов и уменьшение количества зрелых и старых тромбоцитов. Применяемые препараты способствуют снижению выраженности этих изменений. препараты оказывают разнонаправленный эффект так эмоксипин в наибольшей степени препятствует снижению общего количества тромбоцитов увеличению количества мегатромбоцитов увеличению их процентного содержания. в наибольшей степени предупреждает увеличение юных тромбоцитов аспирин, напротив, усиливает влияние холода снижая общее количество тромбоцитов, снижая количество мегатромбоцитов юных и зрелых тромбоцитов ниже уровня интактной группы. Применение аспирина на фоне длительной Холодовой нагрузки вызывает увеличение количества старых тромбоцитов количество которых превышает уровень интактной группы. Кроме того применение аспирина вызывает появление вакуолизированных и дегенеративных форм тромбоцитов.

Агрегационная активность тромбоцитов на 14 день охлаждения увеличена во всех экспериментальных группах. наименее выражена в группе аспирина. однако в наибольшей степени на дезагрегационную активность тромбоцитов влияет эмоксипин, снижая больше всех изучаемых нами препаратов степень агрегации на 5 минуте.

В целом на 14 день охлаждения влияние изучаемых нами препаратов складывалось следующим образом: эмоксипин и токоферол оказывали однонаправленные эффекты, направленные на компенсацию холодового воздействия, причем эмоксипин проявлял большую эффективность чем токоферол. Применение аспирина на фоне длительного холодового воздействия привело к усилению действия низкой температуры, выражающееся в резком смещении мегакариоцитограммы влево, более выраженном снижении количества тромбоцитов, появлением в периферической крови дегенеративных и вакуолизированных форм тромбоцитов. Возможно, именно функциональная не состоятельность тромбоцитов образующихся при применении аспирина обуславливает его эффективные агрегационные свойства.

Таблица 2а

Уровень изучаемых параметров в экспериментальных группах на 14 день эксперимента

| показатели | пентаксия | | нолол | | аспирин | | гидроперит | | моксипин | |
|---|-----------|-------------|-------------|-----------------|---------|-----------------|------------|----------------|-------------|-----------------|
| | М | НК/ВК | М | НК/ВК | М | НК/ВК | М | НК/ВК | М | НК/ВК |
| Абс. МПЦ (*10 ⁶ клеток/100г) | 39.9 | 39.7/40.2 | 56.7** | 55.9 57.2 | 49.5** | 48.9 49.9 | 50.0** | 50.0 51.0 | 55.5** | 45.6 45.9 |
| Отн. МПЦ (%) | 0.2 | 0.20/0.20 | 0.53** | 0.51 0.56 | 0.4** | 0.4' 0.5 | 0.49** | 0.48 0.50 | 0.41** | 0.40 0.42 |
| Абс. МПЦ (*10 ⁶ клеток/100г) | 0.08 | 0.078/0.081 | 0.296* * | 0.288' 0.318 | 0.210** | 0.185 0.240 | 0.246** | 0.242 0.252 | 0.188** | 0.183' 0.193 |
| Отн. МПЦ I (%) | 20.3 | 20.2/20.5 | 29.4** | 29.0 30.0 | 62.0** | 60.0 64.0 | 26.8** | 26.0 27.0 | 22.8** | 22.1' 24.0 |
| Отн. МПЦ II (%) | 64.9 | 64.8/65.0 | 34.2** | 33.0 35.0 | 33.0** | 30.0 35.0 | 40.0** | 39.0 41.0 | 52.1* * | 50.0 53.0 |
| Отн. МПЦ III (%) | 14.8 | 14.5/14.8 | 36.4** | 35.7 37.7 | 4.5** | 2.0 10.0 | 33.3** | 32.0 34.0 | 27.7* * | 23.0' 26.0 |
| Абс. МПЦ I (*10 ⁶ клеток/100г) | 0.016 | 0.016/0.017 | 0.086* * | 0.085' 0.094 | 0.132** | 0.111 0.147 | 0.066** | 0.068 0.068 | 0.044* * | 0.043' 0.044 |
| Абс. МПЦ II (*10 ⁶ клеток/100г) | 0.052 | 0.050/0.052 | 0.102* * | 0.095 0.108 | 0.069** | 0.060 0.072 | 0.100** | 0.095 0.093 | 0.099* * | 0.091 0.104 |
| Абс. МПЦ III (*10 ⁶ клеток/100г) | 0.012 | 0.011/0.013 | 0.110* * | 0.107 0.113 | 0.010** | 0.004 0.018 | 0.081** | 0.080 0.086 | 0.048** | 0.044' 0.051 |
| Количество тромбоцитов 10 ¹¹ /лнгр | 441 | 433/451 | 284.0** | 282.0 286.0 | 251.5** | 241.0' 254.0 | 293** | 280 300 | 62** | 359 365 |
| Количество МТр 10 ¹⁰ /лнгр | 48 | 47.1/48.5 | 59.8** | 59.6 61.0 | 28.0** | 25.0 34.0 | 51.2* * | 50.0 55.0 | 52.1* * | 52.0 54.0 |
| Отн. МТр % | 10.9 | 10.6/11.2 | 21.1** | 20.6 21.3 | 11.3 | 10.0 13.6 | 17.8** | 17.0 18.1 | 15.5* * | 14.3 15.0 |

Примечания

М – медиана, НК – нижний квартиль, ВК – верхний квартиль; в сравнении с исходным уровнем: * уровень P < 0.05, ** уровень P < 0.005;

Уровень изучаемых параметров в экспериментальных группах на 14 день эксперимента (продолжение таб. 2а)

| Группа показатели | интактная | | холод | | аспирин | | токоферол | | моксипин | |
|--|-----------|-------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|
| | М | НК/ВК | М | НК/ВК | М | НК/ВК | М | НК/ВК | М | НК/ВК |
| Юные тромбоциты % | 10 | 9.7/10.1 | 19.5 ** | 19.0 20.0 | 12.0 * | 10.0 12.0 | 17.0 ** | 16.0 17.0 | 13.0 ** | 13.0 13.0 |
| Зрелые тромбоциты % | 89.3 | 88.9/90.3 | 80.0 ** | 80.0 81.0 | 77.5 ** | 77.0 79.0 | 83.0 ** | 82.4 84.0 | 87.0 ** | 86.9 87.0 |
| Старые тромбоциты % | 0.8 | 0.6/1.1 | 0.0 *** | 0.0 0.0 | 11.0 ** | 10.0 12.0 | 0.0 * | 0.0 0.0 | 0.0 ** | 0.0 0.0 |
| Дегенеративные тромбоциты % | 0 | -/- | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.1 | 0.0/0.1 | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.0 | 0.0/0.0 |
| Вкуноцирированные тромбоциты % | 0 | -/- | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.1 | 0.0/0.5 | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.0 | 0.0/0.0 |
| Юные тромбоциты 10 ¹¹ /л | 44.1 | 43.7/44.6 | 65.9 ** | 62.9 67.4 | 30.0 ** | 25.4 30.5 | 49.7 * | 48.0 50.4 | 47.1 ** | 47.5 47.5 |
| Зрелые тромбоциты 10 ¹¹ /л | 393.8 | 393.4/402.3 | 266.9 ** | 264.8 276.0 | 194.0 ** | 190.4 198.1 | 241.9 ** | 235.2 252.0 | 314.8 ** | 312.3 317.6 |
| Старые тромбоциты 10 ¹⁰ /л | 3.5 | 2.6/4.6 | 0.0 ** | 0.0 0.0 | 27.4 ** | 23.1 30.5 | 0.0 * | 0.0 0.0 | 0.0 ** | 0.0 0.0 |
| Дегенеративные тромбоциты 10 ¹⁰ /л | 0 | -/- | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.2* | 0.0/0.3 | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.0 | 0.0/0.0 |
| Вкуноцирированные тромбоциты 10 ¹⁰ /л | 0 | -/- | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.2 | 0.0/1.2 | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.0 | 0.0/0.0 |
| Степень агрегации (%) | 66.1 | 65.8/66.5 | 84.7 ** | 84.2 85.1 | 72.5 ** | 72.4 73.2 | 77.4 ** | 77.0 77.8 | 76.1 ** | 75.7 76.5 |
| Время агрегации (мин.сек) | 3:00 | 2:52/3:08 | 2:20* | 2:14 2:26 | 2:33 * | 2:27 2:43 | 3:27 | 2:58 3:40 | 2:31 * | 2:16 2:30 |
| Скорость агрегации (°/мин) | 64.15 | 63.2/64.7 | 81.3 ** | 80.3 82.3 | 67 ** | 66.4 68.0 | 73.0 ** | 72.0 73.9 | 73.7 ** | 72.7 74.5 |
| Агрегация на 5 минуте (%) | 57.45 | 54.9/59.9 | 70.9 ** | 67.5 73.7 | 62.0 * | 59.6 65.9 | 61.1 | 59.6 64.4 | 48.2 ** | 43.1 50.9 |

Примечания

М – медиана, НК – нижний квартиль, ВК – верхний квартиль, в сравнении с исходным уровнем * уровень P<0.05. ** уровень P<0.005.

Влияние изучаемых препаратов на систему мегакариоцит-тромбоцит на 21 день эксперимента Значения изучаемых нами параметров системы мегакариоцит-тромбоцит на 21 день эксперимента у всех экспериментальных групп представлены в таблицы 3а и 3б

В костном мозге подопытных животных (крыс) на 7 день охлаждения отмечались изменения характерные для напряжения мегакариоцитопоэза наиболее выраженные в группе холод. Препараты в различной степени и разнонаправленно компенсируют изменения происходящие в системе. В целом можно сказать что изменения в группе холод и влияние препаратов на фоне длительного холодового воздействия на 21 день сходны с таковыми на 14 день охлаждения однако влияние холода менее выражено а компенсирующее действие препаратов эмоксипин и токоферол более выражено. В тоже время влияние аспирина по своей направленности не изменилось, и, по сути, усиливает действие низких температур на систему мегакариоцит-тромбоцит. Применяемые нами препараты, токоферол и эмоксипин действуют сходным образом однако влияние эмоксипина более выражено в сравнении с vit E. Влияние аспирина в целом выражается в предотвращении увеличения количества мегакариоцитов но за счет незрелых форм. Эмоксипин преимущественно сохраняет абсолютное количество и процентное соотношение в пользу более зрелых форм (мегакариоциты I и II степени зрелости). На 21 день охлаждения наиболее эффективно предупреждает изменения в костном мозге – эмоксипин т.к vit E оказывает сходные эффекты а аспирин вызывает резкий дисбаланс в мегакариоцитогамме в сторону незрелых форм. Длительное холодовое воздействие, на 21 день, вызывает уменьшение общего количества тромбоцитов в крови и увеличении процентного и абсолютного количества юных тромбоцитов и мегатромбоцитов и уменьшение количества зрелых и старых тромбоцитов. Применяемые препараты способствуют снижению выраженности этих изменений препараты оказывают разнонаправленный эффект, так эмоксипин в наибольшей степени препятствует снижению общего количества тромбоцитов, увеличению количества мегатромбоцитов, увеличению их процентного содержания, в наибольшей степени предупреждает увеличение юных тромбоцитов, аспирин, напротив, усиливает влияние холода, снижая общее количество тромбоцитов, снижая количество мегатромбоцитов, юных и зрелых тромбоцитов ниже уровня интактной группы. Применение аспирина на фоне длительной Холодовой нагрузки вызывает увеличение количества старых тромбоцитов количество которых превышает уровень интактной группы. Кроме того, применение аспирина вызывает появление вакуолизированных и дегенеративных форм тромбоцитов.

Агрегационная активность тромбоцитов на 21 день охлаждения увеличена во всех экспериментальных группах, наименее выражена в группе аспирин, однако в наибольшей степени на дезагрегационную активность тромбоцитов влияет эмоксипин снижая больше всех изучаемых нами препаратов степень агрегации на 5 минуте. В целом можно сказать что изменения в группе холод и влияние препаратов на фоне длительного холодового воздействия на 21 день сходны с

Уровень изучаемых параметров в экспериментальных группах на 21 день эксперимента

| показатели | интактная | | холод | | аспирин | | гомоферон | | эустихин | |
|--|-----------|-------------|-------------|-----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|-----------------|
| | М | НК/ВК | М | НК/ВК | М | НК/ВК | М | НК/ВК | М | НК/ВК |
| Абс. МПЦ (*10 ⁶ клеток/100г) | 39.9 | 39.7/40.2 | 44.8** | 44.6/ 44.9 | 44.7 ** | 44.6 44.8 | 42.9 ** | 42.8 43.0 | 40.1 | 39.0 42.1 |
| Отн. МПЦ (%) | 0.2 | 0.20/0.20 | 0.488* * | 0.46/ 0.48 | 0.4 ** | 0.4 0.4 | 0.41 ** | 0.40 0.42 | 0.39 ** | 0.36 0.4 |
| Абс. МПЦ (*10 ⁶ клеток/100г) | 0.08 | 0.078/0.081 | 0.211* * | 0.207/ 0.214 | 0.165 ** | 0.161 0.166 | 0.177 ** | 0.170 0.180 | 0.158 ** | 0.144/ 0.164 |
| Отн. МПЦ I (%) | 20.3 | 20.2/20.5 | 70.5** | 70.0/ 72.0 | 65.0 ** | 65.0 68.0 | 26.5 ** | 26.0 29.0 | 40.5 ** | 39.0 43.0 |
| Отн. МПЦ II (%) | 64.9 | 64.8/65.0 | 20.5** | 20.0/ 21.0 | 26.5 ** | 26.0 28.0 | 61.7 ** | 61.0 63.0 | 49.5* * | 39.0 52.0 |
| Отн. МПЦ III (%) | 14.8 | 14.5/14.8 | 9.0** | 7.0/ 10.0 | 8.0 ** | 7.0 9.0 | 10.8 ** | 10.0 12.0 | 10.0 | 9.0 10.0 |
| Абс. МПЦ I (*10 ⁶ клеток/100г) | 0.016 | 0.016/0.017 | 0.150* * | 0.143/ 0.153 | 0.109 ** | 0.102 0.113 | 0.047 ** | 0.046 0.050 | 0.062 ** | 0.062/ 0.067 |
| Абс. МПЦ II (*10 ⁶ клеток/100г) | 0.052 | 0.050/0.052 | 0.043* * | 0.041/ 0.044 | 0.045 ** | 0.041 0.046 | 0.110 ** | 0.109 0.110 | 0.076 ** | 0.071/ 0.080 |
| Абс. МПЦ III (*10 ⁶ клеток/100г) | 0.012 | 0.011/0.013 | 0.019* * | 0.015/ 0.021 | 0.013 ** | 0.011 0.015 | 0.019 ** | 0.018 0.020 | 0.015 | 0.014/ 0.016 |
| Количество тромбоцитов 10 ¹⁰ /мл гр | 441 | 433/451 | 297 ** | 284/ 300 | 356.5 ** | 350.0 360.0 | 405 ** | 390 410 | 422 * | 413 425 |
| Количество МПг 10 ⁴ /мл гр | 48 | 47.1/48.5 | 50.0 * | 49.0 51.0 | 23.0 ** | 20.0 21.0 | 31.2 * | 50.0 52.0 | 39.5 ** | 39.0 40.0 |
| Отн. МПг % | 10.9 | 10.6/11.2 | 17.1 ** | 16.7/ 17.5 | 6.4 ** | 5.6 6.9 | 12.8 ** | 12.0 13.1 | 9.5 ** | 8.9 9.9 |

Примечания

М – медиана, НК – нижний квартиль, ВК – верхний квартиль, в сравнении с исходным уровнем * уровень P<0.05, ** уровень P<0.005,

Уровень изучаемых параметров в экспериментальных группах на 21 день эксперимента (продолжение таб. 3а)

| группа | интактная | | холост | | аспирин | | теколелот | | асклин | |
|---|-----------|-------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|
| | М | НК/ВК | М | НК/ВК | М | НК/ВК | М | НК/ВК | М | НК/ВК |
| Юные тромбоциты % | 10 | 9.7/10.1 | 24.5 ** | 23.0 25.0 | 8.5 | 7.0 10.0 | 12.9 ** | 12.0 13.4 | 11.0 | 9.9 10.0 |
| Зрелые тромбоциты % | 89.3 | 88.9/90.3 | 75.5 ** | 75.0 77.0 | 76.3 ** | 74.0 79.0 | 85.7 ** | 84.0 86.2 | 79.0 * | 78.0 80.0 |
| Старые тромбоциты % | 0.8 | 0.6/1.1 | 0.0 ** | 0.0 0.0 | 15.3 ** | 14.0 17.0 | 2.0 | 0.7 2.7 | 0.0 ** | 10.8 12.0 |
| Дегенеративные тромбоциты % | 0 | -/- | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.2* | 0.1/0.2 | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.0 | 0.0/0.0 |
| Вакуолированные тромбоциты % | 0 | -/- | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.1 | 0.0/0.2 | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.0 | 0.0/0.0 |
| Юные тромбоциты 10 ¹¹ /мл | 44.1 | 43.7/44.6 | 72.2 ** | 68.8 75.0 | 29.8 ** | 24.5 33.9 | 52.0 * | 49.2 52.3 | 37.2 | 40.0 42.5 |
| Зрелые тромбоциты 10 ¹¹ /мл | 393.8 | 393.4/402.3 | 223.3 ** | 217.6 230.2 | 270.6 ** | 256.8 283.6 | 346.2 ** | 333.3 353.4 | 331.0 ** | 329.9 336.0 |
| Старые тромбоциты 10 ¹⁰ /мл | 3.5 | 2.6/4.6 | 0.0 ** | 0.0 0.0 | 55.4 ** | 50.8 59.0 | 7.8 11.1 | 2.3 | 4.6 ** | 44.0 50.8 |
| Дегенеративные тромбоциты 10 ¹⁰ /мл | 0 | -/- | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.5* | 0.4/0.7 | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.0 | 0.0/0.0 |
| Вакуолированные тромбоциты 10 ¹⁰ /мл | 0 | -/- | 0.0 | 0.0/0.0 | 0.2 | 0.0/0.7 | 0.1 | 0.0/0.0 | 0.0 | 0.0/0.0 |
| Скорость агрегации (%) | 66.1 | 65.8/66.5 | 8.7 ** | 7.0 77.3 | 69.5 ** | 69.1 69.8 | 71.7 * | 73.7 74.5 | 71.1 * | 71.1 71.8 |
| Время агрегации (мин.сек) | 3.00 | 2.52/3.08 | 2.20* | 2.24 2.33 | 2.58 | 2.51/ 3.09 | 2.27 * | 2.21 2.36 | 2.42 | 2.36 2.52 |
| Скорость агрегации (%/мин) | 64.15 | 63.2/64.7 | 81.3 ** | 67.0 68.7 | 69.2 ** | 68.3 70.0 | 65 | 64.3 66.1 | 63.0 * | 63.1 66.7 |
| Агрегация на 5 минуте (%) | 57.45 | 54.9/59.9 | 70.9 ** | 64.0 70.7 | 61.2 | 58.5/ 64.7 | 61.7 * | 59.1 65.6 | 60.0 | 57.5 63.5 |

Примечания

М – медиана, НК – нижний квартиль, ВК – верхний квартиль; в сравнении с исходным уровнем * уровень P < 0,5, ** уровень P < 0,005.

такowymi на 14 день охлаждения однако влияние холода менее выражено а компенсирующее влияние препаратов эмоксипин и токоферол более выражено В тоже время влияние аспирина по своей направленности не изменилось и по сути усиливает действие низких температур на систему мегакариоцит-тромбоцит Возможно именно функциональная не состоятельность тромбоцитов образующихся при применении аспирина обуславливает его эффективные агрегационные свойства

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом материалы данной работы свидетельствуют что длительно воздействие низкой температуры приводит к активации системы мегакариоцит-тромбоцит Приводящее к напряжению тромбоцитопоза и увеличению агрегационной активности тромбоцитов Применение фармакологических препаратов позволяет снижать выраженность процессов протекающих в системе мегакариоцит-тромбоцит Среди изученных нами препаратов аспирин, токоферол, эмоксипин наиболее перспективным для применения в клинической практике (после проведения клинических испытаний) является эмоксипин

ВЫВОДЫ

1) Длительное холодовое воздействие вызывает активацию системы мегакариоцит-тромбоцит, выражающемся в увеличении количества миелокариоцитов в костном мозге, увеличением процентного и абсолютного количества мегакариоцитов, сдвигом мегакариоцитарной формулы влево уменьшением общего количества тромбоцитов, увеличением количества юных тромбоцитов и увеличением количества мегатромбоцитов, увеличением степени агрегации и скорости агрегации тромбоцитов и уменьшением времени агрегации и дезагрегации тромбоцитов.

2) Применение аспирина на фоне длительного холодового воздействия усиливает воздействие низкой температуры, приводя к более раннему и более выраженному сдвигу мегакариоцитограммы влево, появлением в периферической крови дегенеративных и вакуолизированных тромбоцитов.

3) Применение α -токоферола ацетата позволяет в незначительной степени корригировать изменения в системе мегакариоцит-тромбоцит возникающие при длительном холодовом воздействии, в результате происходит увеличение количества тромбоцитов в периферической крови, снижается выраженность изменений в мегакариоцитограмме, уменьшается агрегационная активность тромбоцитов

4) Применение эмоксипина позволяет корригировать изменения в системе мегакариоцит-тромбоцит выражающиеся в снижении процентного и абсолютного содержания мегакариоцитов в сравнении с группой холод нормализацией абсолютного количества мегакариоцитов различной степени зрелости увеличении общего количества тромбоцитов уменьшении количества юных тромбоцитов и

мегаг тромбоцитов, увеличении количества зрелых тромбоцитов, снижение агрегационной активности тромбоцитов в сравнении с группой холод

5) Из изученных нами препаратов наиболее перспективным является применение эмоксипина. т к α -токоферола ацетат вызывает сходные эффекты но в гораздо менее выраженной форме, а применение аспирина вызывает диффузные цитовальные нарушения в системе мегакариоцит-тромбоцит

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- 1) Провести клинические исследования, позволяющие детально описать изменения в системе мегакариоцит тромбоцит у людей при длительном воздействии холода и приеме ацетилсалициловой кислоты
- 2) В практическом здравоохранении следует с осторожностью назначать аспирин и препараты, содержащие ацетилсалициловую кислоту пациентам подвергающимся холодовому воздействию
- 3) Представляются перспективными исследования эмоксипина как корректора изменений системы мегакариоцит-тромбоцит возникающих у человека при длительном холодовом воздействии
- 4) Перспективными является изучение возможности применения в клинической практике эмоксипина при длительном воздействии холода и нарушениях в системе мегакариоцит тромбоцит

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1 Браш А.А. Влияние токоферола на количество тромбоцитов при тромбоцитопозэстимулирующем состоянии у крыс, в начальный период холодовой адаптации //Тезисы докладов 2-межвузовской научно-практической конференции "Молодежь XXI века шаг в будущее" – Благовещенск, 2001, с. 36-37
- 2 Браш А.А., Доровских В.А. «Влияние эмоксипина на агрегационную активность тромбоцитов *in vitro*» Всероссийский съезд фармакологов - Москва, 2003, - с. 230
3. Браш А.А., Доровских В.А. «Влияние кислоты ацетилсалициловой на тромбоцитарный гемостаз в период адаптации к длительному холодовому воздействию» Материалы четвертой региональная конференция молодежь XXI шаг в будущее, Благовещенск, 2003г, С 225-226
4. Браш А.А., Доровских В.А. «Влияние альфа-токоферола ацетата на тромбоцитарный гемостаз в период адаптации к длительному холодовому воздействию» Материалы четвертой региональная конференция молодежь XXI шаг в будущее, Благовещенск, 2003г, С 243-244
- 5 Браш А.А. «Влияние препаратов различных фармакологических групп на показатели системы мегакариоцит-тромбоцит при длительном холодовом воздействии в эксперименте» Научные труды 4-й Международная научно-практическая конференция «Здоровье и образование в XXI веке» Москва, 2003 год, с 103

- 6 Браш А А., В А Доровских, В А. Максименко, В И Тиханов, А П Матыцин Изменение количества мегакариоцитов в костном мозге крыс под влиянием холода Тезисы докладов X Российско-Японского медицинского симпозиума Якутск. 2003 с 97-98
- 7 Браш А А., В А Доровских, В И Тиханов А П Матыцин, В А Максименко Изменение количества мегакариоцитов в костном мозге крыс при приеме аспирина и действии холода Тезисы докладов X Российско-Японского медицинского симпозиума Якутск 2003 с 98-99
- 8 Браш А А В А Доровских А П Матыцин В А Максименко В И Тиханов Изменение количества миеоцитов и мегакариоцитов в костном мозге крыс при приеме эноксипина и действии холода Тезисы докладов X Российско-Японского медицинского симпозиума Якутск. 2003 с 99

Лицензия ПДЛ №34-28 от 25.10.2001г. Зак. 56пр. Формат60x84 1/16. Усл. П. л. 1,00. Тираж 100 эк.

Подписано в печать 04.10.2004г. Печать офсетная с оригинала. Заказчика

Отпечатано в типографии «Зоря»

67500 г. Благоевещенск ул. Ленина 167

РНБ Русский фонд

2006-4

20394

1111
1111
1111