

На правах рукописи

ГРЕБЕНЮК

Оксана Анатольевна

**СОСТОЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО ОБМЕНА  
В КРОВЕТВОРНОЙ ТКАНИ ПРИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ  
ВОЗДЕЙСТВИЯХ НА ОРГАНИЗМ**

(14.00.16 — патологическая физиология)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Екатеринбург 1997

Работа выполнена в Уральской государственной медицинской академии на кафедре патологической физиологии.

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор,  
заслуженный деятель науки РФ,  
академик РАЕН А.П. Ястребов.

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук,  
профессор А.Г. Васильев

доктор медицинских наук,  
профессор С.В. Цвиренко

Ведущее учреждение: Челябинская государственная  
медицинская академия

Защита диссертации состоится "26" июня 1997 г.  
в 10 часов на заседании диссертационного совета КР. 084.10.03.

**Актуальность проблемы.** В настоящее время может считаться доказанным существование тесной взаимосвязи между энергетическими и пластическими процессами в клетках. Это позволяет предположить существование еще одного механизма регуляции регенерации тканей - метаболического. Поскольку при экстремальных воздействиях на организм происходит срочное вовлечение кроветворной системы в процессы адаптации и аварийного регулирования, участие метаболических факторов в этих условиях может оказаться весьма существенным (С.В. Цвиренко, 1979; О.Г. Макеев, 1981; А.П. Ястребов, 1988; В.В. Базарный, 1992; Б.Г. Юшков, 1994; М. Tavassoli, 1973). Можно допустить участие в такой регуляции метаболитов, способных включаться как в энергетические, так и пластические процессы - аминокислот (АК) (F. Kiyotaka et al, 1983; К.Е. Nichols, 1989; G. Zunic et al, 1993).

В качестве экспериментальных моделей для изучения состояния обмена АК в кроветворной ткани в процессе индуцированного гемопоэза были выбраны ионизирующее излучение и гистотоксическая гипоксия. Имеются немногочисленные сведения, характеризующие состояние АК обмена при действии этих экстремальных факторов, причем данные касаются, в основном, плазмы крови (Л.Н. Кобылянский, 1978; Т.А. Лаптева, 1988; А.П. Довганский, 1989; Л.А. Безкровная, 1990; Л.И. Нефедов, 1993; А.М. Al-Bekari, 1989; J.C. Oki, 1989; M.J. Martinez, 1993; J.B. Deijen, 1994). В единичных работах отражен АК спектр костного мозга (Л.В. Портная, 1973; Б.М. Курцер, 1980; В.А. Павлов, 1987), однако без дифференцированного анализа их содержания в миелокариocyтах и экстрацеллюлярной жидкости. Известно, что процессы пролиферации, дифференцировки и созревания различных клеток костного мозга обеспечиваются определенным составом межклеточной среды, включающим в том числе и АК. Поэтому без отдельного анализа АК спектра в миелокариocyтах и костно-мозговой жидкости не представляется возможным вести целенаправленный поиск АК, способных повлиять на гемопоэз.

Кроме того, детальное изучение состояния обмена АК в кроветворной ткани при действии на организм экстремальных факторов позволит пролить свет на участие АК в процессах гемопоэза в этих условиях.

Все вышеизложенное и явилось основанием для постановки основной цели и задач настоящего исследования.

**Цель:** Охарактеризовать состояние аминокислотного обмена в кроветворной ткани при экстремальных воздействиях, сопровождающихся изменением гемопоэза.

**Задачи:**

1. Изучить аминокислотный состав костного мозга (экстрацеллюлярной жидкости и миелокариоцитов) и плазмы крови в различные сроки после действия нитрата кобальта и ионизирующего излучения на организм.
2. На основании изменений аминокислотного спектра костного мозга и плазмы крови предложить использование отдельных аминокислот или их смесей для коррекции аминокислотного метаболизма и оптимизации процессов регенерации кроветворной ткани при действии экстремальных факторов.
3. Исследовать действие природных растительных адаптогенов на аминокислотный состав костного мозга в условиях хронического облучения в "малых" дозах.

**Научная новизна и теоретическая значимость.** В работе впервые с помощью современного метода ионообменной хроматографии дана количественная и качественная оценка состояния АК фонда миелокариоцитов и костно-мозговой жидкости. Описан АК пул в костном мозге и плазме крови в динамике после действия экстремальных факторов. Установлены специфические изменения в костно-мозговой ткани при гипоксии и ионизирующем излучении. Обнаружено, что наблюдаемые изменения в костно-мозговой жидкости, миелокариocyтах и плазме крови, зависят от продолжительности действия экстремального фактора на организм. Установлено, что снижение концентрации отдельных АК в костном мозге может лимитировать его регенерацию. Показана возможность путем введения АК, находящихся в дефиците в костно-мозговой ткани, активировать гемопоэз в условиях гистотоксической гипоксии, вызванной введением нитрата кобальта. Обнаружено корригирующее действие природных растительных экстрактов-золотого корня и чаги на состояние АК пула костного мозга в условиях хронического облучения.

**Практическая ценность.** Полученные результаты расширяют представления о механизмах метаболической регуляции кроветворения при действии на организм экстремальных факторов. Проведенные исследования обосновывают воз-

возможность направленного влияния на гемопоз через АК при различных экстремальных воздействиях.

Исследование особенностей АК обмена костного мозга при лучевой патологии имеет важное значение в связи с оценкой перспективности лечебного применения отдельных аминокислот и их смесей для парентерального питания.

**Реализация результатов исследования.** Результаты работы используются в учебном процессе на кафедрах патологической физиологии и биохимии Уральской Государственной Медицинской Академии при преподавании следующих разделов: экстремальные состояния, система крови, белковый и аминокислотный обмен, регенерация органов и тканей.

Освоенная методика определения свободных АК в различных средах организма внедрена в ОДКБ № 1 (г. Екатеринбург).

**Апробация работы и публикации.** По теме диссертации опубликовано 7 работ. Основные положения диссертации изложены и обсуждены на 49-й и 50-й годовичных конференциях молодых ученых УрГМА (г. Екатеринбург, 1994; 1995); на научной конференции, посвященной 30-летию ЦНИЛ (г. Екатеринбург, 1994); на III Международном семинаре "Проблемы безопасности в трансфузионной медицине" (г. Екатеринбург, 1995); на научной сессии УрГМА "Актуальные вопросы медицины" (г. Екатеринбург, 1995); на I-ом Российском конгрессе по патофизиологии с международным участием (Москва, 1996). По материалам диссертации сделаны сообщения на заседаниях Екатеринбургского отделения Уральского общества патофизиологов (г. Екатеринбург, 1995; 1996; 1997).

**Объем и структура.** Диссертация изложена на 210 страницах машинописного текста. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, двух глав результатов собственных исследований, общего заключения, выводов и списка литературы, включающего 391 источник, из которых 283 работы на русском и 108 на иностранных языках. Работа иллюстрирована 41 таблицей и 16 рисунками.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материал и методы исследования.** Эксперименты выполнены на 242 половозрелых крысах-самцах породы Wistar, массой от 150 до 200 г.

В качестве экстремальных воздействий, вызывающих возмущение гемопоза, использовали введение нитрата кобальта и внешнее облучение.

Нитрат кобальта вводили внутривенно из расчета 3 мг/кг веса животного (А.П. Ястребов, 1965) в 2-х режимах: остром и хроническом. При остром воздействии нитрат кобальта вводили однократно, при хроническом - ежедневно, в течение 7 дней.

Внешнее облучение осуществляли от цезиевого источника на установке ИГУР-1 в 2-х режимах, в связи с чем животные были подразделены на группы. Первую группу составили животные, облученные однократно в поглощенной дозе 2 Гр. Животных второй группы облучали по 0.5 Гр с интервалом в 5 дней до получения суммарной поглощенной дозы - 2 Гр.

На основании изучения изменений АК состава плазмы крови, костно-мозговой жидкости и миелокарицитов, в процессе 7-кратного действия нитрата кобальта, были выбраны АК, которые, по нашему мнению, могли повлиять на течение гемопоза. В условиях хронического действия нитрата кобальта, на протяжении всего периода его введения, экспериментальные животные получали внутримышечные инъекции смеси АК ( $pH=7.3-7.4$ ), включающей аспартат (30 мг/кг) (В.С. Якушев, 1972); глутамат (120 мг/кг) (О.Н. Глотова, 1985); аргинин (120 мг/кг) (Н.П. Милюткина, В.С. Шугалей и др., 1990).

В процессе хронического действия ионизирующего излучения, в связи с "малой" используемой дозой (А.М. Кузин, 1991), в качестве препаратов, способных изменить состояние АК обмена и течение регенераторных процессов в костно-мозговой ткани использовали экстракты родиолы розовой (в виде 0.25% суспензии) и чаги (2.5% суспензии). Указанные препараты вводили внутривенно через зонд, ежедневно, в течение 30 дней от начала облучения, из расчета 2 мл на 200 г. веса животного.

На основании гемопозестимулирующей способности некоторых АК (Л.В. Портная, 1973; В.К. Рудзит, 1973; М.И. Шиенок, 1989; В.Г. Белокрылов, 1991; В.В. Базарный, 1992; D.A. Lipschitz, 1986) для исследования была выбрана аспараги-

новая кислота, в связи с отсутствием данных об ее использовании при действии ионизирующего излучения. В условиях хронического облучения проводили внутримышечные инъекции аспартата (100 мкг/кг) на протяжении 15 дней после 1-го облучения с последующим изучением гематологических показателей и АК пула костно-мозговой ткани и плазмы крови на 30 сутки. В условиях однократного облучения (2 Гр) животные получали внутримышечные инъекции аспартата (30 мкг/кг) в течение первых 7 дней. Забой проводили на 15 сутки после облучения.

Для характеристики состояния гемопоэза определяли содержание в крови эритроцитов, ретикулоцитов, гемоглобина, лейкоцитов, а также подсчитывали лейкоцитарную формулу и клеточность костного мозга.

Состояние АК обмена в кроветворной ткани оценивали методом ионообменной хроматографии (Т.Д. Казаренко, 1975) с помощью автоматического анализатора аминокислот ААА-339 М (Микротехна, Прага) (А.Р. Williams, 1986).

АК пул определяли в 3-х биологических средах организма: плазме крови, костно-мозговой жидкости и миелокариocyтах. Подготовку образцов к исследованию проводили по стандартной методике, включающей добавление к исследуемой жидкости 50% сульфосалициловой кислоты, 7% гидроксида лития и норлейцина (2.5 мкмоль/мл) в качестве внутреннего стандарта (A. Charles et al, 1985; S. Sahai, 1985; A. Briddon, 1987; L.B. James, 1987; A. Schaefer, 1987). Для каждой исследуемой жидкости на хроматограмме прописывали весь спектр свободных АК. Расшифровку хроматограммы проводили на основании идентификации полученных пиков со стандартным раствором АК, представляющим собой хроматографически гомогенную смесь из 36 АК.

После идентификации, для каждой АК определяли ее концентрацию и выражали для плазмы в [мкмоль/л], для костномозговой жидкости и миелокариocyтов в [нмоль/10<sup>6</sup> клеток].

Кроме того, рассчитывали суммарные концентрации: 1) незаменимых АК; 2) заменимых АК; 3) протеиногенных АК; 4) гликогенных АК; 5) кетогенных АК (группа АцКоА); 6) АК с разветвленной углеводородной цепью (АКРУЦ): валин, лейцин, изолейцин; 7) ароматических АК (фенилаланин и тирозин).

Проводили анализ содержания отдельных АК по месту включения их в ЦТК. На основании этого АК были подразделены на следующие группы: 1) груп-

па пирувата (ПВК); 2) группа  $\text{AcCoA}$ ; 3) группа оксалоацетата (ОА); 4) группа  $\alpha$ -кетоглутарата ( $\alpha$ -КГ); 5) группа сукцинил КоА.

Математическую обработку полученных результатов осуществляли на ЕС-1061 по стандартным пакетам программ. Определяли стандартные эмпирические статистики (среднее, дисперсию, коэффициент вариации) (Ю.И. Иванов, 1990). Для определения количественных связей между изучаемыми признаками использовали метод корреляционного анализа (коэффициент корреляции Пирсона).

**Результаты собственных исследований и их обсуждение.** Однократное введение нитрата кобальта (3 мг/кг) вызывает развитие гистотоксической гипоксии и сопровождается индукцией гемопоэза. Известно, что действие нитрата кобальта приводит к усилению продукции эритропоэтина, с последующей активацией эритроидного кроветворения и развитием (на 48 часов) ретикулоцитоза. Между тем, относя воздействие кобальта к факторам экстремальным, изменение ряда показателей крови укладывается в рамки стресс-реакции, с известными неспецифическими проявлениями в организме. Так, на протяжении 1-х суток после воздействия, в периферической крови отмечалось снижение общего количества лимфоцитов и эозинофилов. В связи с этим значительная часть изменений АК состава плазмы, отмеченных за 24 часа, также может быть отнесена к неспецифическим. Исходя из данных литературы (M.J. Martinez, 1993), к ним отнесли повышение концентрации таурина и снижение содержания глутамина и аспарагина.

На протяжении всего периода после однократного действия нитрата кобальта отмечается снижение суммарной концентрации свободных АК плазмы (табл.1), среди которых наиболее всего снижалось содержание АК следующих метаболитических групп: ПВК,  $\alpha$ -кетоглутарата и оксалоацетата. Данные изменения следует рассматривать, как компенсаторную реакцию, направленную на усиление потока субстратов к ЦТК для адекватного энергообеспечения различных тканей в условиях энергодифицита, развивающегося при гипоксии.

На протяжении первых часов (3, 6, 12) после однократного действия нитрата кобальта суммарная концентрация свободных АК в костно-мозговой жидкости и миелокарицитах поддерживалась в пределах нормальных величин, за счет усиленного потребления АК из плазмы крови. Наблюдаемая в этот период гипоглициемия в определенной мере зависит от усиленного поглощения АК

Таблица 1

Содержание свободных АК в плазме крови крыс при однократном действии нитрата кобальта.

| Аминокислоты,<br>мкмоль/л | Контроль<br>n=15 | С р о к и      п о с л е      в о з д е й с т в и я |                 |                 |                 | 24 часа<br>n=5 | 48 часов<br>n=10 |
|---------------------------|------------------|-----------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|------------------|
|                           |                  | 6 часов<br>n=10                                     | 12 часов<br>n=5 | 12 часов<br>n=5 | 12 часов<br>n=5 |                |                  |
| Цистеинов.к-та            | 24.1 ± 4.1       | 41.5 ± 5.3*                                         | 37.3 ± 9.1      | 22.7 ± 4.2      | 42.4 ± 9.2*     |                |                  |
| Таурин                    | 307.1 ± 20.0     | 363.3 ± 54.8                                        | 310.6 ± 39.5    | 273.7 ± 21.1    | 256.2 ± 24.8    |                |                  |
| Аспарагинов.к-та          | 61.8 ± 2.6       | 59.0 ± 6.9                                          | 64.5 ± 4.2      | 50.4 ± 7.2      | 44.1 ± 5.3*     |                |                  |
| Треонин                   | 324.7 ± 30.2     | 287.5 ± 47.5                                        | 373.6 ± 81.3    | 321.8 ± 107.0   | 247.4 ± 32.4    |                |                  |
| Серин                     | 505.4 ± 41.4     | 404.3 ± 83.2                                        | 321.0 ± 57.3*   | 518.1 ± 32.4    | 477.7 ± 34.2    |                |                  |
| Аспарагин                 | 126.0 ± 6.6      | 77.5 ± 7.9*                                         | 67.3 ± 9.8*     | 135.1 ± 12.7    | 111.3 ± 7.1     |                |                  |
| Глутаминов.к-та           | 178.3 ± 16.1     | 139.0 ± 22.7                                        | 87.9 ± 15.4*    | 131.9 ± 16.8    | 125.4 ± 14.5*   |                |                  |
| Глутамин                  | 877.7 ± 52.1     | 723.6 ± 64.9                                        | 734.6 ± 85.5    | 956.5 ± 64.7    | 792.4 ± 51.7    |                |                  |
| Пролин                    | 470.8 ± 51.0     | 178.5 ± 31.8*                                       | 297.2 ± 22.1*   | 265.0 ± 5.4*    | 317.3 ± 16.4*   |                |                  |
| Глицин                    | 910.2 ± 69.0     | 638.8 ± 51.6*                                       | 609.7 ± 99.8*   | 853.9 ± 77.5    | 648.2 ± 49.5*   |                |                  |
| Аланин                    | 886.4 ± 68.2     | 378.1 ± 42.1*                                       | 593.0 ± 93.9*   | 753.0 ± 61.7    | 657.9 ± 31.2*   |                |                  |
| Валин                     | 182.7 ± 8.6      | 151.4 ± 9.1*                                        | 85.7 ± 12.3*    | 140.4 ± 9.3*    | 118.5 ± 18.1*   |                |                  |
| Цистин                    | 78.8 ± 3.2       | 62.3 ± 7.0*                                         | 43.5 ± 6.3*     | 36.0 ± 3.9*     | 71.5 ± 8.1      |                |                  |
| Метионин                  | 59.8 ± 3.9       | 49.0 ± 4.4                                          | 51.3 ± 9.4      | 72.4 ± 4.7      | 49.9 ± 3.2      |                |                  |
| Изолейцин                 | 78.8 ± 2.9       | 89.1 ± 12.8                                         | 68.0 ± 9.2      | 72.7 ± 4.5      | 67.0 ± 3.5      |                |                  |
| Лейцин                    | 166.8 ± 2.9      | 124.1 ± 10.6*                                       | 103.9 ± 37.0*   | 127.7 ± 6.6*    | 110.5 ± 13.5*   |                |                  |
| Тирозин                   | 76.2 ± 8.3       | 91.6 ± 8.6                                          | 90.4 ± 9.6      | 75.3 ± 6.3      | 107.3 ± 12.1    |                |                  |
| Фенилаланин               | 85.1 ± 5.7       | 90.1 ± 9.1                                          | 51.4 ± 6.7*     | 75.2 ± 6.4      | 67.7 ± 6.1*     |                |                  |
| Орнитин                   | 99.3 ± 7.8       | 153.5 ± 17.0*                                       | 88.7 ± 11.7     | 82.5 ± 3.0      | 125.7 ± 10.0    |                |                  |
| Лизин                     | 181.9 ± 9.2      | 256.2 ± 37.2*                                       | 264.2 ± 42.0*   | 422.6 ± 46.0*   | 171.1 ± 11.5    |                |                  |
| Гистидин                  | 80.5 ± 5.4       | 27.3 ± 2.3*                                         | 37.0 ± 3.5*     | 37.4 ± 3.8*     | 68.8 ± 8.0      |                |                  |
| Аргинин                   | 160.8 ± 6.5      | 42.6 ± 11.6*                                        | 146.0 ± 7.5     | 143.7 ± 9.3     | 114.2 ± 9.6*    |                |                  |
| Общ.кол-во св.АК          | 5860.7±252.6     | 4208.7±214.6*                                       | 4328.3±204.5*   | 5381.4±242.2    | 4680.6 ±183.1*  |                |                  |

Примечание : \* -показатели достоверно отличаются от контроля, где  $p \leq 0.05-0.001$ .

костным мозгом. На 24-48 часов суммарная концентрация свободных АК в костно-мозговой жидкости и миелокариocyтах снижалась, что связано с повышением функциональной активности костного мозга и усиленным потреблением АК миелокариocyтами из экстрацеллюлярного пространства и их дальнейшим использованием в синтетических процессах.

Снижение суммарной концентрации свободных АК в миелокариocyтах на 24-48 часов происходило практически за счет всех изученных метаболических групп АК (рис. 1). Так, наблюдалось снижение концентрации протеиногенных АК, кетогенных АК, АК группы ПВК,  $\alpha$ -кетоглутарата, сукцинил КоА, а также заменимых и незаменимых АК. Таким образом, усиленная пролиферация эритроидного ростка костного мозга, индуцированная однократным действием кобальта, сопровождалась снижением суммарной концентрации свободных АК различных метаболических групп в миелокариocyтах на фоне более стабильного их поддержания в костно-мозговой жидкости. Наибольший дефицит костно-мозговая ткань испытывала в незаменимых и кетогенных АК. Возможно, что в условиях гистотоксической гипоксии, субстратами окисления в костномозговой ткани могут быть не только жиры и кетокислоты, но также и такие ценные субстраты, как АК.

На основании проведенного анализа можно полагать, что АК, концентрация которых снижена во всех 3-х исследуемых жидкостях (плазме крови, костно-мозговой жидкости и миелокариocyтах), способны лимитировать гемопоэз в условиях однократного введения нитрата кобальта в организм: аспарат, глутамат, пролин, глицин, аланин, валин, лейцин, аргинин.

При 7-кратном введении нитрата кобальта активность эритропоэза существенно возрастала, о чем свидетельствует значительный ретикулоцитоз в периферической крови.

Среди изменений содержания свободных АК в плазме крови после 7-кратного введения нитрата кобальта следует выделить снижение суммарной концентрации АК групп ПВК (на 23%),  $\alpha$ -кетоглутарата (на 27%), оксалоацетата (на 14%). Известно, что образовавшиеся, в том числе из АК,  $\alpha$ -кетоглутарат и сукцинат при гипоксии окисляются интенсивнее, чем глюкоза, что и обеспечивает нормальное течение субстратного фосфорилирования и адекватное энергообеспечение в условиях хронической гипоксии. Снижение концентрации АК в плазме

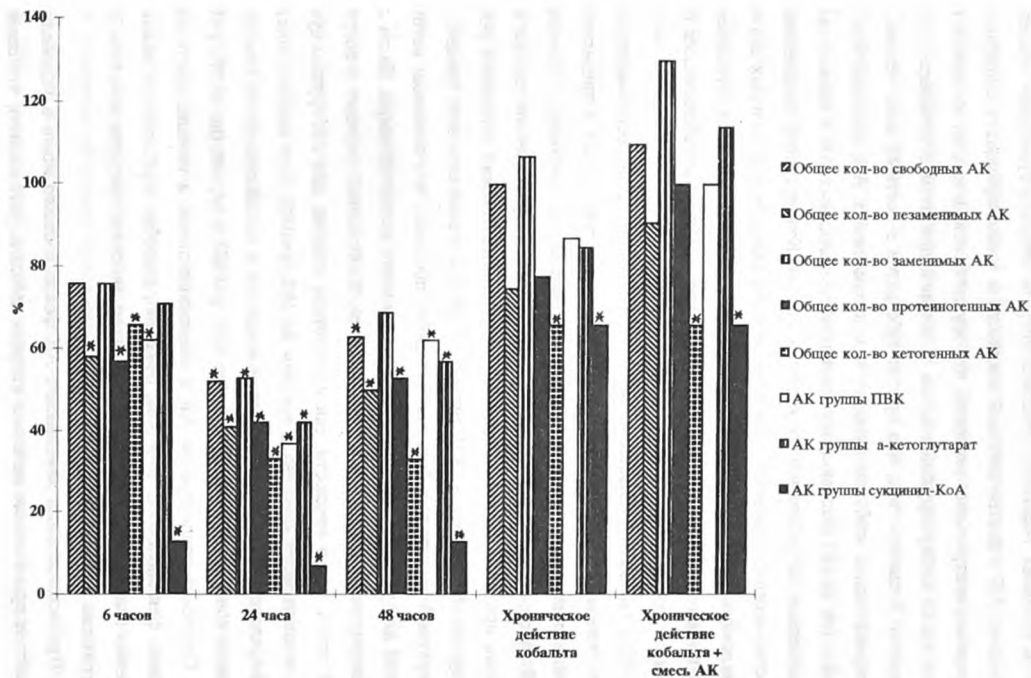


Рис. 1. Содержание различных групп свободных АК в миелокариocyтах при однократном и хроническом действии нитрата Со и на фоне использования АК смеси (в % от контроля, принятого за 100%), \*  $p \leq 0.05-0.001$ .

происходило за счет пролина, глицина, аланина, валина, цистеина, фенилаланина, гистидина, аргинина.

В условиях 7-кратного действия нитрата кобальта суммарная концентрация свободных АК в костно-мозговой жидкости и миелокариocyтах поддерживалась в пределах контрольных значений, что осуществлялось за счет активного потребления их из циркулирующей крови, в которой при этом отмечалась гипоаминоацидемия. В связи с тем, что приток субстратов в костный мозг усилен, а кровеносная ткань особенно нуждается в незаменимых АК, наблюдаемое значительное (на 23,4%) снижение концентрации незаменимых АК в плазме связано с интенсивным потреблением их костным мозгом. Концентрация незаменимых АК в костно-мозговой жидкости при этом не отличалась от контрольных значений, а в миелокариocyтах незначительно снижалась, что связано с их активным участием в протеосинтезе, гемоглобинообразовании и других метаболических превращениях.

При анализе отдельных метаболических групп АК в костно-мозговой жидкости отмечено сохранение концентрации большинства из них в пределах нормы на фоне снижения их концентрации в миелокариocyтах (особенно кетогенных АК и АК группы сукцинил КоА) (рис. 1). Активация энергетических систем костного мозга при этом является одним из неперенных условий усиленной регенерации эритроидного роста (А.П. Ястребов, 1965), а ограничить этот процесс может субстратный дефицит. В большинстве работ показано, что основным источником энергии для усиления регенерации костного мозга являются жиры. Наши данные иллюстрируют участие АК в этом процессе. Наибольший дефицит в костно-мозговой ткани, как в жидкости, так и в клетках отмечен для АК группы сукцинил КоА, концентрация снижена в среднем на 45% ( $p < 0.02$ ). При анализе концентрации отдельных АК в костно-мозговой жидкости и миелокариocyтах отмечено повышение концентрации аспартата (на 45%,  $p < 0.05$ ) и серина (на 86,7%,  $p < 0.001$ ).

Снижение концентрации АК в миелокариocyтах, а именно: цистеина, изолейцина, фенилаланина, аргинина, очевидно, способно ограничивать дальнейшее усиление гемопоэза в условиях 7 кратного действия нитрата кобальта за счет субстратного дефицита.

При исследовании измененного АК фонда костного мозга в условиях однократного и хронического действия нитрата кобальта установлено, что повышение

его пролиферативной активности протекает при дефиците некоторых АК. В этой связи представляет интерес вопрос, не влияет ли наблюдаемый дисбаланс на характер гемопоэза в этих условиях. Учитывая вышесказанное, было решено ввести внутримышечно смесь из 3 АК (глутамата, аспартата, аргинина), снижение концентрации которых отмечалось в нашем эксперименте, а благоприятный эффект от их действия описан в литературе для различных видов гипоксий.

При использовании АК смеси в условиях 7-кратного действия нитрата кобальта отмечали повышение количества ретикулоцитов крови в среднем на 36.6% ( $p < 0.1$ ) и клеточности костного мозга в среднем на 20.4% ( $p > 0.1$ ). Данные изменения свидетельствуют о том, что дополнительное поступление субстратов с АК смесью усиливает регенераторный ответ костного мозга.

Концентрация отдельных метаболических групп свободных АК в костно-мозговой жидкости при использовании АК смеси в условиях хронического действия кобальта повышалась по сравнению с группой без ее использования. Так, отмечалось повышение концентрации АК группы  $\alpha$ -КГ на 40.7% ( $p < 0.001$ ), группы ПВК на 66% ( $p < 0.05$ ), сукцинил-КоА до уровня контрольных значений. Все это свидетельствовало о более полном АК обеспечении костного мозга в условиях введения АК смеси по сравнению с хроническим действием кобальта без ее использования.

Концентрация отдельных метаболических групп свободных АК в миелокариocyтах при использовании АК смеси не отличалась от контрольных значений (рис. 1), за исключением сниженного содержания кетогенных АК. Наиболее значительно в миелокариocyтах снижалась концентрация цистеина, изолейцина, лейцина, фенилаланина, лизина, аргинина.

Таким образом, использование АК смеси в условиях хронического введения нитрата кобальта способствует поддержанию концентрации отдельных АК и их метаболических групп в миелокариocyтах на уровне контрольных значений, а в костно-мозговой жидкости незначительно превышая их.

Среди разнообразных экстремальных факторов ионизирующее излучение до сих пор привлекает к себе пристальное внимание исследователей. В остром опыте животных облучали однократно в дозе 2 Гр. При этом наблюдалось снижение общего количества эритроцитов в крови на 4-5 сутки после облучения на 29% и 33%, с последующей нормализацией их количества к 15 суткам. Концент-

рация гемоглобина была сниженной на протяжении всего постлучевого периода вплоть до 30 суток. Общее количество лейкоцитов при остром облучении снижалось начиная с 1 суток, причем как за счет лимфоцитов, число которых уменьшалось на 68% ( $p \leq 0.001$ ), так и за счет нейтрофильных гранулоцитов. К 15 суткам общее количество лейкоцитов достигало контроля. Лимфопения сохранялась до 30 суток, составляя 81% от контроля ( $p \leq 0.05$ ). Облучение в указанной дозе приводит к опустошению костного мозга. На 1 сутки отмечалось снижение клеточности костного мозга на 73.3% от контроля ( $p \leq 0.001$ ). К 5 суткам происходило частичное восстановление клеточности костного мозга до 52% ( $p \leq 0.001$ ) от контрольных значений. Низкий уровень клеточности костного мозга сохранялся до 30 суток. Таким образом, анализ полученных результатов показал, что при однократном облучении крыс в дозе 2 Гр частичное восстановление гематологических показателей наступает к 15 суткам. Однако окончательной нормализации не происходит даже спустя месяц после воздействия ионизирующей радиации, т. к. сохраняется анемия, ретикулоцитоз, лимфопения, сдвиг лейкоцитарной формулы влево, поддерживается на низком уровне клеточность костного мозга.

При однократном облучении в дозе 2 Гр наблюдалось снижение суммарной концентрации свободных АК плазмы крови на 1-5 сутки на 13.5% и 35.2% ( $p \leq 0.05$ ) соответственно, причем наиболее всего за счет незаменимых АК и АКРУЦ. Известно, что ранний постлучевой период сопровождается развитием энергодифицита (Е.Ф. Романцев и др., 1980; Б.Б. Мороз и др., 1987). И хотя непосредственный вклад АК в реакции энергетического обмена невелик, он существенно возрастает в экстремальных условиях (М.Н. Кондрашова, 1991). Поэтому, наблюдаемое снижение в плазме крови концентрации АК следующих групп: сукцинил КоА, ПВК, АцКоА, АКРУЦ, расценивается нами, как адаптивная реакция, направленная на покрытие энергетического дефицита. Отдельные АК плазмы также претерпевают существенные изменения. На 1 сутки после облучения отмечается снижение концентрации: серина, глутаминовой кислоты, глицина, валина, цистеина, лейцина, фенилаланина и аргинина в плазме. Повышение концентрации отмечено для тирозина и таурина. Повышение концентрации таурина в плазме на 1 сутки (на 30.2% ( $p \leq 0.05$ )) является ранней дозозависимой реакцией на действие ионизирующей радиации (Л.А. Коннова, 1986) и обусловлено деструкцией радиочувствительных тканей (Л.И. Нефедов, 1990, Е.И. Ярцев, 1975). На-

блюдаемая гипертауринемия сопровождалась максимальной лейкопенией, лимфопенией, снижением клеточности костного мозга. Кроме того, наиболее значительно в плазме крови снижалась концентрация цистеина, входящего в состав группы эндогенных радиопротекторов организма. До конца исследования (30 суток) в плазме крови оставалась сниженной концентрация глицина, лейцина, аргинина, аспарагиновой кислоты, треонина.

Суммарная концентрация свободных АК и их метаболитических групп в костно-мозговой жидкости после однократного облучения (2 Гр) превышала контрольные значения, наиболее всего на 1 и 30 сутки (рис. 2). Повышение концентрации свободных АК костно-мозговой жидкости происходило за счет таурина, аспарагиновой кислоты, треонина, серина, глутамина, валина, цистеина, изолейцина, лейцина, тирозина, гистидина. Наблюдаемые изменения в ранний период (на 1 сутки) после облучения обусловлены массовым разрушением миелокариоцитов (клеточность костного мозга снижается при этом на 75%) и выходом их содержимого в экстрацеллюлярную среду, а в более поздние сроки (на 30 сутки), возможно, активным потреблением АК из циркулирующей крови. Повышение концентрации свободных АК костно-мозговой жидкости, скорее всего, следует расценивать как благоприятное метаболитическое условие, так как на этом фоне клеточность костного мозга на 5 сутки повышалась на 95.5% по сравнению с первыми сутками облучения.

Концентрация ряда АК в миелокариоцитах на 1 сутки после однократного облучения снижалась, в особенности аспартата, валина, цистеина, изолейцина, лейцина, гистидина, аргинина (табл. 2), а также АК групп  $\text{AcCoA}$  и сукцинил  $\text{CoA}$  (рис. 3). Возможно, что снижение концентрации указанных АК в миелокариоцитах в поздний период (15-30 сутки) способно лимитировать гемопоэз в данных условиях (табл. 2).

Хроническое облучение сопровождалось менее значительными изменениями гематологических показателей, чем острое. Что касается аминокислот, то содержание большинства из них в крови, костно-мозговой жидкости и клетках снижалось. Интересно, что на фоне сниженной концентрации АК в миелокариоцитах (рис. 3) клеточность костного мозга поддерживалась в пределах нормы. Очевидно, это свидетельствует об усиленном включении АК в синтетические процессы.

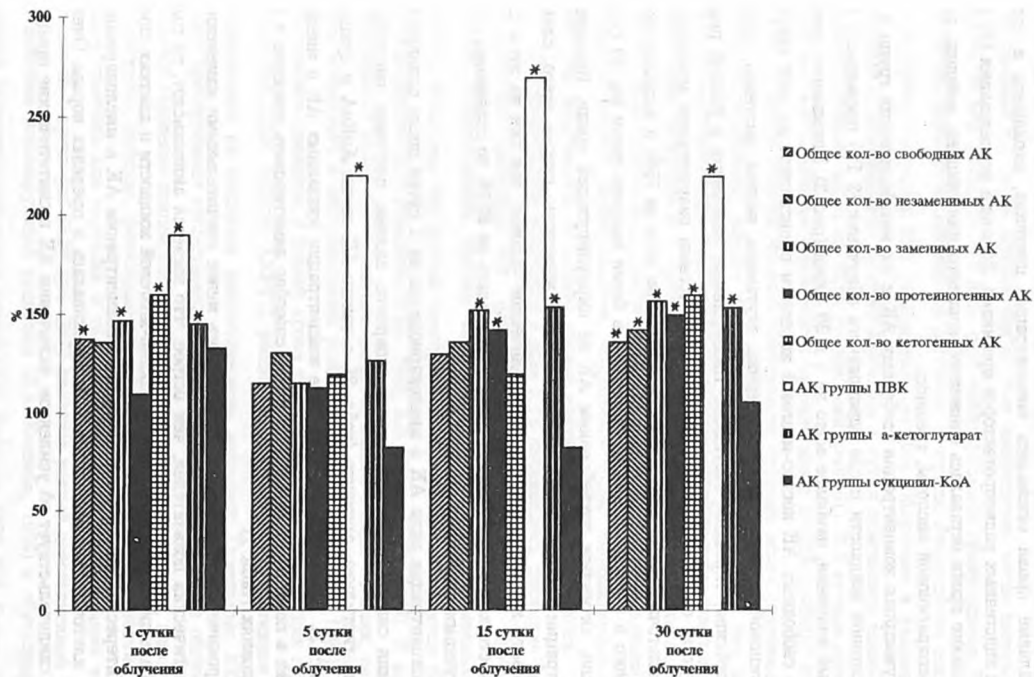


Рис. 2. Содержание различных групп свободных АК в костномозговой жидкости в различные сроки после однократного облучения в дозе 2 Гр (в % от контроля, принятого за 100%), \*  $p \leq 0.05-0.001$ .

Таблица 2

Содержание свободных аминокислот в миелокариацитах крыс в условиях острого облучения ( 2 Гр )

| Аминокислоты,<br>нмоль/10 <sup>6</sup> клеток | С р о к и   п о с л е   в о з д е й с т в и я |                |                |                 |                 |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
|                                               | Контроль<br>n=15                              | 1 сутки<br>n=5 | 5 сутки<br>n=5 | 15 сутки<br>n=5 | 30 сутки<br>n=5 |
| Цистеинов.к-та                                | 0.538 ± 0.037                                 | 0.507 ± 0.079  | 0.377 ± 0.034* | 0.300 ± 0.021*  | 0.525 ± 0.067   |
| Таурин                                        | 13.272 ± 1.378                                | 17.427 ± 1.413 | 11.150 ± 1.393 | 7.110 ± 0.543*  | 11.517 ± 0.392  |
| Аспарагинов.к-та                              | 4.450 ± 0.451                                 | 2.353 ± 0.317* | 1.973 ± 0.187* | 3.715 ± 0.721   | 2.586 ± 0.289*  |
| Треонин                                       | 1.334 ± 0.162                                 | 1.472 ± 0.442  | 4.303 ± 0.467* | 0.655 ± 0.095*  | 0.844 ± 0.036   |
| Серин                                         | 1.371 ± 0.206                                 | 1.307 ± 0.180  | 1.301 ± 0.300  | 0.750 ± 0.112   | 0.936 ± 0.183   |
| Глутаминов.к-та                               | 3.012 ± 0.329                                 | 3.700 ± 0.313  | 4.150 ± 0.247  | 2.628 ± 0.223   | 3.908 ± 0.444   |
| Глутамин                                      | 0.944 ± 0.108                                 | 2.567 ± 0.540* | 1.177 ± 0.103  | 0.950 ± 0.090   | 2.056 ± 0.161*  |
| Глицин                                        | 2.944 ± 0.290                                 | 3.807 ± 0.560  | 4.457 ± 0.427* | 3.083 ± 0.487   | 3.599 ± 0.190   |
| Аланин                                        | 2.071 ± 0.193                                 | 3.053 ± 0.387* | 2.699 ± 0.150  | 1.760 ± 0.260   | 3.269 ± 0.032*  |
| Валин                                         | 0.666 ± 0.049                                 | -----*         | 0.319 ± 0.051* | 0.220 ± 0.020*  | 0.424 ± 0.099*  |
| Изолейцин                                     | 0.771 ± 0.077                                 | -----*         | 0.239 ± 0.012* | 0.155 ± 0.016*  | 0.357 ± 0.051*  |
| Лейцин                                        | 0.908 ± 0.100                                 | -----*         | 0.393 ± 0.017* | 0.338 ± 0.026*  | 0.590 ± 0.088   |
| Тирозин                                       | 2.259 ± 0.202                                 | 3.060 ± 0.167* | 1.361 ± 0.323* | 1.405 ± 0.096*  | 1.838 ± 0.221   |
| Фенилаланин                                   | 0.664 ± 0.047                                 | 0.193 ± 0.015* | 0.227 ± 0.020* | 0.275 ± 0.040*  | 0.319 ± 0.025*  |
| Лизин                                         | 0.859 ± 0.088                                 | 1.300 ± 0.173* | 1.227 ± 0.040* | 0.646 ± 0.114   | 0.792 ± 0.064   |
| Гистидин                                      | 0.178 ± 0.020                                 | -----*         | 0.190 ± 0.019  | 0.146 ± 0.008   | 0.197 ± 0.039   |
| Аргинин                                       | 0.722 ± 0.048                                 | -----*         | 0.388 ± 0.027* | 0.262 ± 0.051*  | 0.417 ± 0.033*  |
| Общ.кол-во св.АК                              | 38.405 ± 4.033                                | 39.459 ± 3.985 | 36.529 ± 3.010 | 24.370 ± 2.309* | 34.399 ± 0.413  |

Примечание : \* -показатели достоверно отличаются от контроля, где  $p \leq 0.05-0.001$ .

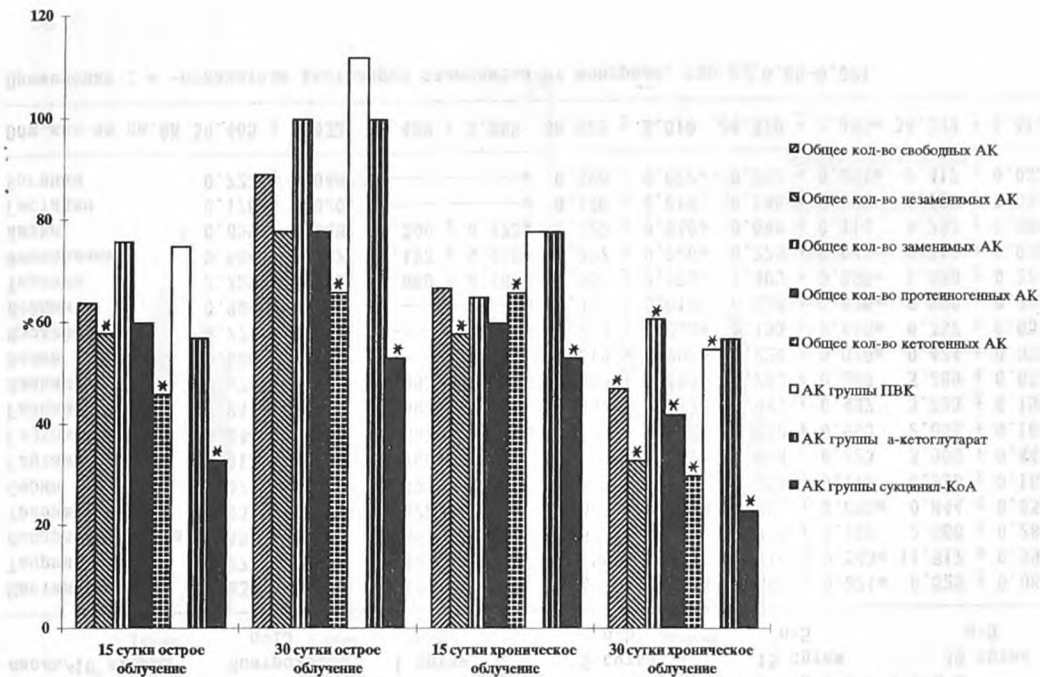


Рис. 3. Содержание различных групп свободных АК в миелокариocyтах на 15-30 сутки в режимах “острого” и “хронического” облучения (в % от контроля, принятого за 100%), \* $p \leq 0.05-0.001$ .

С целью защиты кроветворной ткани от повреждающего действия внешне-ионизирующего излучения применяют разнообразные средства. Наиболее перспективным в условиях действия "малых" доз облучения является поиск таких веществ, которые бы повышали неспецифическую резистентность организма и ускоряли постлучевую регенерацию гемопоэтической ткани. Этим требованиям отвечают препараты растительного происхождения, проявляющие свойства адаптогенов (П.К. Булатов и др., 1959; А.С. Саратиков, 1974; Е.В. Симанина, 1988; Е.Д. Гольдберг, 1995). Кроме растительных препаратов, к числу наиболее эффективных адаптогенов, относят некоторые витамины, микроэлементы и АК (М.Г. Зотова, 1969; П.П. Саксонов, 1976).

При использовании аспарагиновой кислоты (30 мг/кг) на фоне острого облучения происходило снижение концентрации отдельных АК и их метаболитических групп в костно-мозговой жидкости до уровня контрольных значений параллельно с повышением их концентрации до уровня контроля в миелокариоцитах. Однако такие изменения аминокислот в костномозговой ткани существенного влияния на характер гемопоэза не оказали.

Использование аспартата в "микродозах" (100 мкг/кг) в условиях хронического облучения не привело к изменениям в АК спектре кроветворной ткани по сравнению с группой без его использования и не повлияло на течение гемопоэза в этих условиях, повышая лишь концентрацию гемоглобина.

Использование экстрактов золотого корня и чаги в условиях хронического облучения оказывает заметный защитный эффект на кроветворную ткань, снижая степень постлучевой лейкопении и лимфопении, повышая уровень гемоглобина. Так, уже на 1 сутки после облучения, отмечено менее значительное снижение общего количества лейкоцитов - на 48.7% при использовании золотого корня и на 19.7% при использовании чаги, по сравнению с уменьшением их количества на 67.9% ( $p < 0.01$ ) в условиях облучения без их применения. Однако полной нормализации показателей крови в этих условиях не происходит даже по истечению месяца после облучения.

На 30 сутки от начала хронического облучения концентрация большинства АК в миелокариоцитах снижена: таурина, аспартата, треонина, серина, глутамата, глицина, аланина, лейцина, лизина, гистидина, аргинина, а также аминокислот следующих метаболитических групп: ПВК,  $\text{AcCoA}$ ,  $\alpha\text{-KG}$ , сукцинил

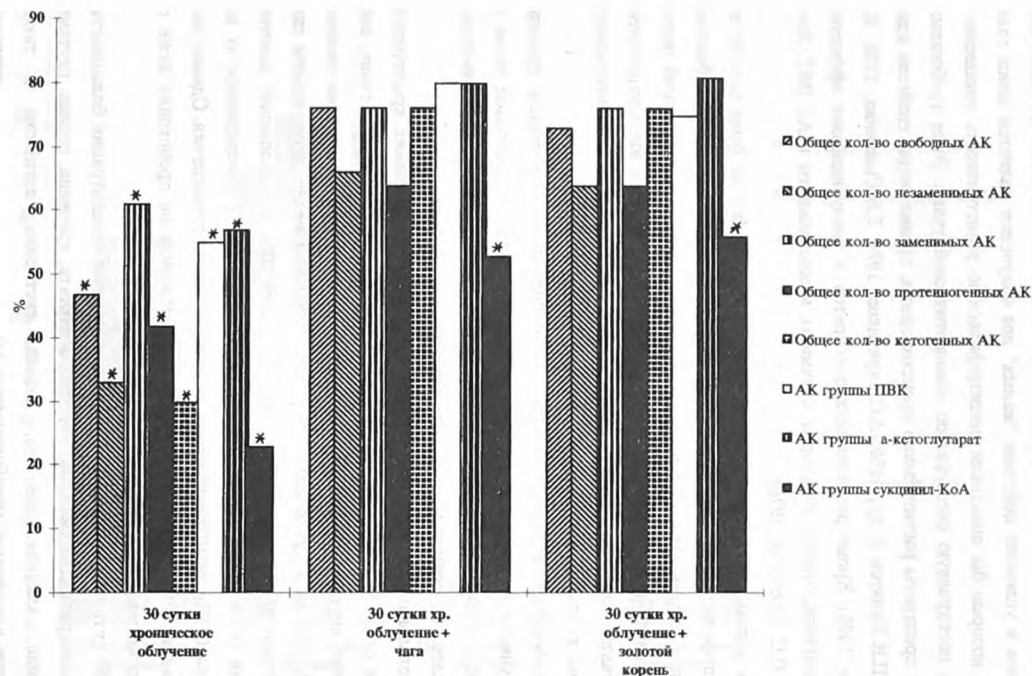


Рис. 4. Содержание различных групп свободных АК в миелокариocyтах на 30 сутки хронического облучения на фоне использования природных растительных экстрактов - золотого корня и чаги (в % от контроля, принятого за 100%), \* $p < 0.05-0.001$ .

КоА. При использовании растительных экстрактов в условиях хронического облучения в миелокариocyтах отмечалось повышение концентрации указанных АК и их метаболических групп до уровня контрольных значений (рис. 4).

Таким образом, при использовании растительных экстрактов отмечалось более экономное расходование костно-мозговой ткани таких ценных субстратов, как АК на энергетические нужды. Это происходит благодаря усиленному вовлечению в энергообразование углеводов и жиров, а также дополнительному субстратному обеспечению, в том числе АК и интермедиатами ЦТК, поступившими с растительными препаратами (А.С. Саратиков, 1974; В.А. Куркин и др., 1986). Таким образом, нормализация до уровня контрольных значений концентрации АК различных метаболических групп (кроме сукцинил КоА) в миелокариocyтах и костно-мозговой жидкости, является, на наш взгляд, благоприятным метаболическим условием, способным обеспечить при этом регенерацию. Зарегистрированная более полная субстратная обеспеченность костного мозга позволяет поддерживать его пролиферативный потенциал на высоком уровне, тогда как формирующийся при хроническом облучении дефицит отдельных АК, возможно, является лимитирующим фактором, тормозящим регенераторные процессы в костно-мозговой ткани в этих условиях.

При сравнении групп с использованием золотого корня или чаги на фоне хронического облучения достоверных различий между ними по гематологическим показателям и АК составу исследуемых жидкостей не выявлено, что позволяет предположить существование единого механизма их действия.

Результаты проведенных исследований позволили качественно и количественно оценить состояние АК обмена в кроветворной ткани при экстремальных воздействиях на организм и дали основание для описания возможного влияния его изменений на характер гемопоэза.

## ВЫВОДЫ

1. При действии нитрата кобальта и ионизирующего излучения в кровеносной ткани происходит перестройка азотистого метаболизма, проявляющаяся количественными сдвигами АК состава плазмы крови, костномозговой жидкости и миелокариоцитов. В условиях действия экстремальных факторов вклад АК в реакции энергетического и пластического обменов возрастает, о чем свидетельствует усиленное их расходование костно-мозговой тканью для адекватного обеспечения процессов пролиферации и дифференцировки. Наблюдается перераспределение АК фондов между плазмой крови, костно-мозговой жидкостью и миелокариоцитами.

2. На основании проведенного анализа изменений содержания отдельных АК в плазме крови, костно-мозговой жидкости и миелокариоцитах, в условиях усиленной пролиферации эритроидного ростка при однократном введении нитрата кобальта, выделены АК, концентрация которых во всех трех исследуемых средах снижена, вследствие чего они способны лимитировать гемопоэз: аспартат, глутамат, пролин, глицин, аланин, валин, лейцин, аргинин.

3. В сравнении с однократным действием кобальта при его хроническом введении в костном мозге отмечается более экономное расходование свободных АК в различных метаболических процессах. Незначительный дефицит, в процессе индуцированного 7-кратным действием кобальта эритропоэза, миелокариоциты испытывали в цистеине, изолейцине, фенилаланине и аргинине, а также в АК группы  $\text{AcCoA}$  и сукцинил  $\text{CoA}$ , на фоне поддержания их концентрации (кроме сукцинил  $\text{CoA}$ ) в пределах контрольных значений в костно-мозговой жидкости.

4. Использование АК смеси (аспартат, глутамат, аргинин) в условиях хронического действия нитрата кобальта способствует более полному обеспечению костного мозга аминокислотами, поддерживая концентрацию отдельных АК и их метаболических групп в миелокариоцитах на уровне контрольных значений, а в костно-мозговой жидкости выше их, что обеспечивает дополнительную субстратную стимуляцию эритропоэза, проявляющуюся в виде прироста ретикулоцитов периферической крови.

5. Наиболее значительно на 1 сутки после однократного облучения в мие-локариоцитах снижалась концентрация аспартата, валина, цистеина, изолейцина, лейцина, гистидина, аргинина. Концентрация указанных АК поддерживалась на сниженном уровне вплоть до 30 суток на фоне повышения их содержания в экстрацеллюлярной среде и снижения в плазме. Данное перераспределение АК на фоне частичного восстановления клеточности костного мозга свидетельствует об активном их использовании в процессах гемопоэза, а их низкий уровень в мие-локариоцитах следует рассматривать как один из факторов, лимитирующих гемопоэз в этих условиях.

6. В условиях хронического облучения отмечается снижение концентрации отдельных АК и их метаболитических групп в костно-мозговой жидкости и мие-локариоцитах (незаменимых, заменимых, АК групп сукцинил-КоА, ПВК,  $\alpha$ -КГ), а при введении природных растительных экстрактов чаги и золотого корня - повышение их концентрации, что является благоприятным метаболитическим услови-ем, способствующим более эффективному восстановлению гемопоэза.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Изменение аминокислотного обмена в кроветворной ткани при действии острого облучения // Актуальные вопросы гигиены и эпидемиологии: Сб. научн. трудов. - Екатеринбург, 1993. - С. 129-132. Соавтор А.П. Ястребов.
2. Изменение содержания свободных аминокислот в плазме крови в условиях гистотоксической гипоксии // 30 лет Центральной научно-исследовательской лаборатории: Тез. докл. научн. конф. - Екатеринбург, 1994. - С. 89-90.
3. Оценка радиопротекторных свойств препаратов золотого корня и чаги в эксперименте по показателям эффективной концентрации альбумина и антиоксидантов // 30 лет Центральной научно-исследовательской лаборатории: Тез. докл. научн. конференции. - Екатеринбург, 1994. - С. 122-124. Соавторы: Л.Т. Шмелева, Л.П. Ларионов, О.Л. Андреева и др.
4. Использование растительных экстрактов для коррекции гемопоэза и аминокислотного обмена в условиях внешнего облучения // Радиационный фактор и здоровье человека на Урале: Сб. научн. трудов. - Екатеринбург, 1995.
5. Использование смеси аминокислот для коррекции гемопоэза в условиях гипоксии и внешнего облучения // Проблемы безопасности в трансфузионной медицине: Тез. докл. и сообщений III Международного научно-практического семинара. - Екатеринбург, 1995. - С. 36. Соавтор А.П. Ястребов.
6. Динамика изменений аминокислотного состава костного мозга в условиях гистотоксической гипоксии // Актуальные вопросы теоретической и практической медицины: Тез. докл. 49-50 научн.-практич. конференции студентов и молодых ученых. - Екатеринбург, 1995. - С. 64-65.
7. Содержание аминокислот в кроветворной ткани в условиях гистотоксической гипоксии // Первый Российский конгресс по патофизиологии с международным участием: Тез. докл. - Москва, 1996. - С. 102. Соавтор А.П. Ястребов.