

3 +  
А-71

**ВСЕСОЮЗНЫЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА ИНСТИТУТ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ  
ВСЕСОЮЗНОЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА АКАДЕМИИ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК ИМЕНИ В. И. ЛЕНИНА**

---

**На правах рукописи**

**Аспирант ПОПОВ  
Петр Андреевич**

**ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ  
НА ФЕРМЕНТЫ КРОВИ У ОВЕЦ**

**(03.00.01 — радиобиология)**

**АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Москва — 1973 г.**

ВСЕСОЮЗНЫЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА ИНСТИТУТ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ  
ВСЕСОЮЗНОЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА АКАДЕМИИ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК ИМЕНИ В. И. ЛЕНИНА

---

На правах рукописи

Аспирант ПОПОВ  
Петр Андреевич

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ  
НА ФЕРМЕНТЫ КРОВИ У ОВЕЦ

(03.00.01 — радиобиология)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва — 1973 г.



57:539.16  
А 71

Работа выполнена в лаборатории физиологии и патологической физиологии сельскохозяйственных животных Всесоюзного ордена Ленина института экспериментальной ветеринарии (директор — доктор ветеринарных наук, академик ВАСХНИЛ Я. Р. КОВАЛЕНКО).

Научный руководитель — Заслуженный деятель науки РСФСР, доктор биологических наук, профессор А. А. КУДРЯВЦЕВ.

Диссертация оформлена в виде отдельной рукописи объемом в 149 страниц машинописного текста и включает:

1. Оглавление — 2 стр.
2. Введение — 3 стр.
3. Обзор литературы — 35 стр.
4. Обоснование целей экспериментов и подбор ферментов в исследованиях — 2 стр.
5. Методики работы и собственные исследования — 56 стр.
6. Обсуждение экспериментального материала — 19 стр.
7. Выводы — 3 стр.
8. Список литературы — 29 стр.

Официальные оппоненты:

1. Доктор биологических наук В. Г. ИЛЬИН.
  2. Кандидат ветеринарных наук В. Т. КРУГЛОВ.
- Ведущее учреждение — Всесоюзный научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания с.-х. животных.

Автореферат разослан *20 августа* 1973 г.

Защита состоится *17 октября* 1973 г. в 14 часов на заседании Ученого Совета Всесоюзного ордена Ленина института экспериментальной ветеринарии (Москва, 109472, Кузьминки, ВИЭВ). С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВИЭВ.

Ученый секретарь Совета ВИЭВ,  
кандидат биологических наук

В. В. КАЛУГИН



## ВВЕДЕНИЕ

Открытие радиоактивности веществ и установление биологического действия ионизирующей радиации на живой организм послужило причиной всестороннего изучения изменений, происходящих в организме под влиянием радиации.

Радиобиология располагает многочисленными данными о влиянии ионизирующей радиации на разные виды животных, в том числе и на сельскохозяйственных: А. А. Кудрявцев, 1956, 1967—1972; М. Н. Андреев, 1963, 1968; В. Т. Круглов, 1964; П. И. Притулин, 1965; В. А. Горбатов, 1965; Т. П. Кудрявцева, 1966; В. Г. Егоров, 1966; В. А. Липин, 1966; И. Е. Пустовгар, 1966; Г. Г. Воккен, 1967; В. В. Калугин; Н. А. Гармаш, 1970; А. А. Фарахат, 1970; А. Д. Белов, 1972 и др.).

Проведенные работы свидетельствуют об известных успехах в раскрытии отдельных сторон патогенеза лучевой болезни, однако остается еще много неясных вопросов, в частности, почти не изучено влияние ионизирующего излучения на активность ферментов сыворотки крови.

В последние годы в медицине и ветеринарии стали широко использоваться ферментные методы исследования. В будущем, как указывают Д. Грин, Р. Гольдбергер (1968), эти исследования станут основными, так как в аспекте современных проблем, большинство заболеваний обуславливается нарушением определенных ферментных систем.

Имеющиеся в настоящее время в литературе сведения о характере изменения активности ферментов при рентгеновом облучении животных немногочисленны и противоречивы: А. М. Кузин, 1962; М. Н. Андреев, 1970; В. Д. Сыпин, 1969; А. П. Левницкий, И. В. Савицкий, 1968; Zanolla W., 1967; Dalos B., 1961; Rösler B., 1970 и др.

Большинство проведенных экспериментов с изучением ферментных систем на фоне действия радиации, на наш взгляд, были непродолжительны или не имели связи с клинико-гематологическим состоянием животных, что, в конечном результате, снижало значимость этих работ. Кроме того, у сельскохозяйственных животных и, в частности, у овец изменение активности ферментов освещено лишь в отдельных работах

(В. Д. Сыпін, 1969; М. Н. Андреев, 1970, А. А. Фарахат, 1970). Описанные изменения активности одного, двух ферментов не отражают в полной мере динамики острой лучевой патологии. Вместе с тем, наибольший интерес представляет изучение не отдельных ферментов, а ферментных констелляций, что увеличивает диагностическую ценность исследований, так как при этом каждое заболевание получает более полную характеристику и биохимический профиль патологии вырисовывается более четко (А. А. Покровский, 1962).

Это послужило основанием для исследования активности ферментов под влиянием различных доз рентгеновского облучения. Одновременно проведено исследование активности ферментов при предварительном введении нативной крови и сыворотки крови от ранее облученных животных на фоне рентгеновского облучения. Таких данных в доступной литературе мы не нашли.

Нами изучалась в динамике активность ферментов, позволяющих судить об окислительно-восстановительных процессах (пероксидаза), о функциях печени, связанных с процессами переаминирования, гликолиза (аспартат-аминотрансфераза), о состоянии межклеточных обменов: углеводного — (кетозо-1-фосфат альдолаза), минерального — (щелочная фосфатаза), жирового — (карбоксилэстераза).

В процессе экспериментов изучались также клинические и гематологические показатели, позволяющие, в известной мере, судить о тяжести лучевого повреждения.

Данная работа является логическим продолжением исследований, выполненных в лаборатории нормальной и патологической физиологии (М. Н. Андреев, В. Г. Егоров, В. В. Калугин, Н. А. Гармаш, А. А. Фарахат и др.) под руководством Заслуженного деятеля науки РСФСР, доктора биологических наук, профессора А. А. Кудрявцева.

## МАТЕРИАЛ, УСЛОВИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 26 клинически здоровых овцематках породы прекос в возрасте 2—2,5 года, весом от 37 до 52 кг.

Овцы были подобраны по принципу аналогов, содержались в условиях вивария на обычном кормовом рационе. Опыты проводились на животных адаптированных к условиям проведения экспериментов.

С целью выяснения физиологического состояния овец исследовали клинико-гематологические показатели и активность следующих ферментов: пероксидазы крови (К. Ф. — 1.11.1.7), аспартат-аминотрансферазы (К. Ф. — 2.6.1.1), кетозо (фрук-

тозо)-1-фосфат альдолазы (К. Ф. — 4.1.2.7), щелочной фосфатазы (К. Ф. — 3.1.3.1) и карбоксилэстеразы (К. Ф. — 3.1.1.4) сыворотки крови.

Исходными данными считались последовательно полученные стабильные величины по определяемым тестам.

Подопытные животные были разделены на 5 групп и облучены рентгеновыми лучами в дозах: 400 и 2000 р, овцы группы № 1 и № 2. Трех овцам группы № 3 за 4 дня до облучения в дозе 1200 р внутривенно вводили нативную кровь (в количестве 80 мл), которую получали от овцы-донора по истечении 3 дней с момента облучения в дозе 2000 р.

Трех овцам группы № 4 за 4 дня до облучения в дозе 1200 р вводили сыворотку крови (в количестве 80 мл.), которая была получена от овцы-донора по истечении 18 дней с момента облучения в дозе 2000 р. Трех овцам группы № 5 за 5 дней до облучения в дозе 1200 р внутривенно вводили сыворотку крови (в количестве 80 мл.), которую получали от овцы-донора, облученного в дозе 1200 р по истечении года с момента облучения.

Для групп № 3, 4 и 5 были подобраны контрольные животные (три группы по три животных), которым вводилась нативная кровь и сыворотка крови, взятая у тех же доноров, в те же сроки и в таком же количестве. Животные контрольных групп облучению не подвергались и исследовались в течение месяца.

Облучение овец проводили по рентгеновской установке РУМ-11. Условия облучения: напряжение — 180 KV, сила тока — 20 mA, фильтр — Al — 3,00 mm, кожно-фокусное расстояние — 1 м, мощность дозы — 19,4 р/мин. В пострadiационный период исследование проводили: при облучении овец в дозе 400 р на 1, 3, 5, 7, 10, 15, 30, 45, 60, 75 и 90 сутки; при облучении овец в дозе 2000 р — на 1, 3, 5, 7, 9 и вплоть до гибели. Животные 3, 4, 5 групп исследовались на 1, 3, 5, 7, 10, 15, 30, 45, 60, 90 сутки после облучения.

Количество гемоглобина определяли колориметрическим гематинным методом по Сали (1899). Число эритроцитов и лейкоцитов подсчитывали в камере с сеткой Горяева, а разведение форменных элементов крови проводили по методу М. Н. Николаева (1954). Содержание общего белка в сыворотке крови определяли с помощью рефрактометра ИРФ—22 с пересчетом количества (в г%) по таблице Рейса. Гематокритную величину устанавливали с помощью микроцентрифуги по Шкляру (модель 824).

Вес животных, температуру, количество пульсовых ударов и дыхательных движений, лейкоцитарную формулу устанавливали по общепринятым методикам.

Активность пероксидазы определяли по методу Баха и Зубковой (С. Д. Балаховский, 1953). Метод основан на способности гемоглобина катализировать окисление субстрата—гваякола—перекисью водорода. Данным методом определялась общая пероксидазная активность крови. Об активности фермента судят по количеству окрашенных продуктов окисления гваякола, установленному колориметрически. Активность пероксидазы выражали в гамм/мл/мин.

Для установления активности аспарат—аминотрансферазы использовали микрометод А. А. Покровского, Л. В. Павлихиной и Ю. Г. Ключковского (1964). Метод основан на определении суммарной экстинкции динитрофенилгидразонов пировиноградной кислоты, являющихся продуктом реакции, и альфа-кетоглутаровой кислоты, служащей исходным веществом при реакции переаминирования. Субстратом служат ДЛ-аспарагиновая и альфа-кетоглутаровая кислоты. Активность аспарат-аминотрансферазы выражали в мкк/мл/мин.

Активность кетозо-1-фосфат альдолазы в сыворотке крови определяли по методу А. А. Покровского, А. И. Арчакова, Л. Н. Болтуновой и И. И. Мусина (1968). Принцип метода основан на расщеплении субстрата (фруктозо-1-монофосфата) под действием фермента, содержащегося в сыворотке крови, на два более простых соединения — глицериновый альдегид и фосфодиоксиацетон. Активность фермента выражали в мкк/мл/мин.

Для определения активности щелочной фосфатазы использовали метод А. А. Покровского и А. И. Щербакова (1969). В основу метода положена способность щелочной фосфатазы гидролизовать эфирную связь в паранитрофенилфосфате (субстрат). В результате освобождается паранитрофенол, дающий в щелочной среде желтое окрашивание. Интенсивность окраски, отображающую активность определяемого фермента, устанавливают с помощью фотоэлектроколориметра ФЭК-М с оптической приставкой. Активность щелочной фосфатазы выражали в мкк/мл/мин.

Активность карбоксилэстеразы определяли по способу А. А. Покровского и Л. Г. Пономаревой (1964). Принцип метода определения активности фермента состоит в установлении времени, необходимого для расщепления 1,5 мкк/мл/мин трибутирина (субстрат). Время реакции определяют по скорости изменения цвета индикатора (бромтимоловый синий) в стандартном буферном растворе, происходящего вследствие освобождения кислоты при гидролизе трибутирина карбоксилэстеразой сыворотки крови. Колориметрическое сравнение проводят со стандартным раствором, цвет которого соот-

ветствует конечной окраске смеси. Активность фермента выражают количеством микромолей субстрата (трибутирина), расщепленного 1 мл сыворотки крови за 1 минуту.

Весь материал обработан методом вариационной статистики (В. С. Асатнани, 1965).

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 1. Изменение общего состояния животных и гематологических показателей после рентгеновского облучения в дозах 400 и 2000 р.

Облучение овец в дозе 400 р вызывало легкую форму острой лучевой болезни; при этом отмечалось незначительное угнетение общего состояния. Температура тела животных была подвержена незначительным колебаниям. Частота пульсовых ударов после облучения возрастала в первые три дня на 9%, в остальные дни исследований количественно и качественно пульс оставался на уровне исходных данных. Число дыхательных движений увеличивалось в течение недели. В дальнейшем оно практически было в пределах обычных физиологических величин. Рентгенооблучение в дозе 2000 р вызывало у подопытных овец тяжелую форму острой лучевой болезни со смертельным исходом. В период заболевания наиболее постоянным клиническим признаком было: повышение температуры тела в первые дни после облучения. Перед гибелью животных отмечалось снижение температуры на  $0,3^{\circ}$ — $1,1^{\circ}$  по сравнению с исходными данными. Затрудненное дыхание. В агональный период у отдельных животных число дыхательных движений снижалось до 18—24 в минуту. Тахикардия. Максимальное увеличение количества пульсовых ударов установлено на 3—11 день перед гибелью животных (до 150—210 ударов в минуту). В этот период у овец отмечалось угнетенное общее состояние, отсутствие аппетита, частые позывы к мочеиспусканию и дефекации, кал жидкой консистенции с примесью крови. На 3—5 сутки появились эпилепсия и отдельные точечные кровоизлияния. В предагональный период лучевой болезни отмечались нарушения со стороны нервной системы. В состоянии полупараличей наступала гибель животных на 5, 11, 15 и 30 сутки. После облучения овец в дозе 400 р отмечалась лейкопения; количество лейкоцитов уменьшалось до  $3,3 \text{ тыс.} \pm 0,7236$  (при фоновых данных  $7,7 \text{ тыс.} + 0,7417$  в  $1 \text{ мм}^3$ ), приближаясь к минимальному уровню исходных величин к 45 дню. Количество гемоглобина, как и количество эритроцитов, имело тенденцию к снижению с восстановлением к 30—45 сут-

кам после облучения. Снижение числа эритроцитов и содержания гемоглобина после облучения, по-видимому, происходит за счет укорочения продолжительности жизни эритроцитов, гемолиза, подавления эритропоэза. Повышение концентрации гемоглобина и количества эритроцитов в начале лучевой болезни, при тяжелой форме, по всей вероятности, связано с нарушением водно-солевого обмена и дегидратацией организма (М. Н. Андреев, 1968; Г. П. Груздев, 1968; В. Г. Егоров, 1966; А. П. Белоусов, 1957). Уменьшенным было и количество общего белка сыворотки крови, которое на 30 суток приближалось к минимальному уровню исходных величин. В лейкоцитарном профиле отмечалось небольшое уменьшение лимфоцитов с  $58,5 \pm 3,2562$  до  $54,5 \pm 3,2261$  и моноцитов с  $2,25 \pm 0,2744$  до  $1,25 \pm 0,3275$ . Одновременно с уменьшением количества лимфоцитов и моноцитов, продолжавшимся в течение 20—30 дней после облучения, увеличивалось количество сегментоядерных и палочкоядерных нейтрофилов. Число сегментоядерных нейтрофилов, составляющее  $28,25 \pm 3,075\%$ , возросло уже в первые сутки после облучения до  $29,25 \pm 1,6281\%$ . Пиком увеличения сегментоядерных клеток крови считаются седьмые сутки, когда количество их превышало  $48,5 \pm 4,8843$ ,  $P < 0,02$ . Палочкоядерные нейтрофилы, составляющие у подопытных овец  $2,0 \pm 0,7236\%$ , в первые и, особенно, на пятые сутки резко увеличивались и составляли  $7,75 \pm 3,1944$  и  $8,5 \pm 1,0854$  ( $P < 0,012$ ). Затем количество палочкоядерных понизилось и на 20 сутки после облучения было в пределах  $1,5 \pm 0,5427$ . Количество эозинофилов увеличивалось, с 20 дня и в последующие дни исследований процентное соотношение этих клеток было на уровне исходных величин. Следует отметить, что на 3, 5, 7 сутки пострадиационного периода в периферической крови овец появились клетки Тюрка, составляющие 4—6%.

У животных второй группы, облученных в дозе 2000 р, отмечено на 3, 7, 9, 11 и 14 сутки также снижение количества белых кровяных телец. В последующем количество лейкоцитов оставалось сниженным вплоть до гибели животных. Следует отметить, что у отдельных овец количество лейкоцитов не превышало 550—800 клеток в  $1 \text{ мм}^3$  крови, что свидетельствует о высокой радиочувствительности лимфоидной ткани. У этих животных количество эритроцитов было несколько снижено по сравнению с фоновыми данными, хотя в отдельные дни количество повышалось. Содержание гемоглобина повышалось до гибели животных и было в пределах  $9,45 \pm 0,3124$  —  $10,6 \pm 0,5808 \text{ г\%}$  при исходных данных, равных  $9,17 \pm 0,1266 \text{ г\%}$ . Во все дни исследований общий белок также был

снижен. На 11 сутки после облучения количество общего белка было наименьшим, чем в другие дни эксперимента, и не превышало  $5,03 \pm 0,0968 \text{ г\%}$  (при фоновых данных  $6,31 \pm 0,1682$ ). Снижение общего белка как при облучении в дозе 400 р, так и при 2000 р связано с угнетением процессов переминирования, нарушением функции печени и других органов, принимающих участие в образовании белков. Изменения лейкоцитарной формулы носили аналогичный характер, как и при облучении овец в дозе 400 р, но отмеченные сдвиги были ярче выражены и наблюдались до гибели животных. На основании анализа считаем, что наши выводы не противоречат заключениям других исследователей (Т. П. Кудрявцева, 1966; В. Г. Егоров, 1966; В. В. Калугин, 1969 и др.); отмечавших увеличение количества незрелых клеток, зависящее от тяжести лучевой болезни.

## 2. Активность ферментов крови у овец в норме и ее изменения после рентгеновского облучения в дозах 400 и 2000 р.

Пероксидазная активность крови в исходный период в среднем составляла  $3,54 \pm 0,4034$  гамм/мл/мин, при облучении овец в дозе 400 р ингибировалась. Наиболее низкая активность энзима отмечена на 5 сутки и составляла —  $1,97 \pm 0,2713$  гамм/мл/мин. Частичное восстановление активности фермента происходило через 20—30 суток после облучения. Увеличение дозы облучения вызывало увеличение степени ингибирования, нараставшего вплоть до гибели животных. Пределом снижения следует считать девятые сутки, когда активность фермента составляла 29%. Ранние лучевые повреждения связаны с поражением различных звеньев дыхательной цепи, взаимосвязанных с нарушением окислительно-восстановительных процессов, отмечали также многие исследователи: А. М. Кузин и Е. В. Будилова, 1951; Ван Беккум, с соавт., 1957; В. Г. Егоров, 1967; В. Д. Сыпин, 1969 и др. Полученные данные свидетельствуют о том, что облучение рентгеновыми лучами оказывает ингибирующее влияние на аспартат-аминотрансферазу сыворотки крови. Характер изменения активности энзима зависел от дозы облучения. Выраженное угнетение активности фермента у животных 1 группы (облучение в дозе 400 р) отмечено уже через сутки —  $0,014 \pm 0,0009$  мкд/мл/мин, 53,8% ( $P < 0,01$ ). На 5, 7, 10, 15 сутки активность аспартат-аминотрансферазы была угнетена и не превышала  $0,019$  мкд/мл/мин. Достоверность угнетения энзима сопряжена с клинико-физиологическим состоянием облученных животных. В остальные дни экс-

перимента последовало повышение активности энзима. Через 90 суток активность данного фермента была несколько повышенной и составляла  $0,029 \pm 0,0023$  мкд/мл/мин при фоновых данных  $0,026 \pm 0,001$  мкд/мл/мин.

При облучении овец в дозе 2000 р активность аспартат-аминотрансферазы, составляющая  $0,032 \pm 0,0025$  мкд/мл/мин., была снижена до конца эксперимента. Перед смертью активность фермента снижалась у отдельных животных до  $0,011$  мкд/мл/мин. Снижение активности аспартат-аминотрансферазы может быть объяснено связыванием свободных SH-групп ферментов (В. Rösler, 1970; N. Markwardt, 1953 и др.). С 20 дня происходит усиление процессов переаминирования и ослабление процессов ингибирования при облучении овец в дозе 400 р. В период повышения активности аспартат-аминотрансферазы наблюдается почти полное восстановление у животных клинических и гематологических показателей. Данное обстоятельство позволяет считать, что в этот момент пострадиационного периода полной физиологической нормализации, равно как и восстановления структуры органов и тканей, не происходит, и не утрачиваются созданные связи, способствующие сохранению повышенной проницаемости клеточных мембран и вымыванию внутриклеточных ферментов из тканей.

Активность кетозо-1-фосфат альдолазы у овец при действии рентгеновых лучей в дозе 400 р носила волнообразный характер. В первые 7 дней после облучения активность энзима нарастала и составляла  $0,021 \pm 0,0029$  мкд/мл/мин при фоновых данных  $0,014 \pm 0,0025$  мкд/мл/мин. В последующем повышение активности фермента сменялось понижением на 10 и 15 сутки. Значения, близкие к исходным, устанавливались через месяц пострадиационного периода. Активность фермента при облучении животных в дозе 2000 р повышалась в течение всего эксперимента (при  $P < 0,001$  на 3 и 5 сутки после облучения). Отмечено, что в преагональный и агональный периоды активность фермента оставалась резко повышенной. В механизме повышения активности кетозо-1-фосфат альдолазы следует признать — как одну из основных причин — повышенную проницаемость клеточных мембран, способствующую выходу энзима из печени, сердца, кишечника (М. Н. Андреев, 1969; В. Dalos, 1961; В. Rösler, 1970 и др.), что, в определенной степени, подтверждается патолого-анатомическими данными.

Активность щелочной фосфатазы облученных животных в дозе 400 р колебалась с общей тенденцией к увеличению. Наибольшие отклонения от исходного уровня ( $0,024 \pm 0,0014$  мкд/мл/мин) получены на 7—10 сутки —  $0,034 \pm 0,0013$  и  $0,032 \pm 0,0014$  мкд/мл/мин — соответственно, ( $P < 0,05$ ) — в разгар

заболевания. Восстановление активности отмечено через 45 суток после облучения. Активность щелочной фосфатазы при облучении животных в дозе 2000 р повышалась в течение всего эксперимента. Отмечено также резкое повышение активности фермента (в 2—2,5 раза) перед гибелью животных, что может служить в качестве диагностического теста степени проявления лучевой болезни. Повышение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови, по всей вероятности, связано не только с образованием большого количества молодых форм лейкоцитов и перераздражением костного мозга, но и повышенной резорбцией фермента из органов пищеварения (М. Ф. Нестерин, 1958; К. В. Смирнов, 1958; М. Б. Камалов, 1966; Н. А. Гармаш, 1970 и др.).

Недостаточное участие азотистых соединений в обмене веществ клетки независимо от того, чем оно вызвано: отсутствием или невозможностью их использования, — ведет к изменению направленности синтеза жиров и липондов. Это находит подтверждение в изменении активности карбоксилэстеразы. До облучения активность фермента у овец в сыворотке крови равнялась  $1,249 \pm 0,0799$  мкд/мл/мин с индивидуальными колебаниями  $1,127$  —  $1,415$  мкд/мл/мин. После облучения активность фермента снижалась в течение 15 суток. Самая низкая активность отмечалась на 5 сутки пострадиационного периода, составлявшая  $0,820 \pm 0,170$  мкд/мл/мин. В последующем, к 20 суткам активность фермента превышала уровень исходных величин и равнялась  $1,246 \pm 0,0918$  мкд/мл/мин. В остальные дни исследования отмечалось повышение активности, через 2,5 месяца она приближалась к минимальному уровню исходных величин и была равна  $1,236 \pm 0,0355$  мкд/мл/мин. В заключительный день исследования, через 90 суток после облучения активность фермента была повышенной и равнялась  $1,269 \pm 0,1555$  мкд/мл/мин. Доза 2000 р оказывает настолько сильное влияние на обменные процессы в организме, что происходит не только угнетение переаминирования белков, но и резкое снижение активности карбоксилэстеразы, что не позволяет недоокисленным продуктам азотного и углеводного обмена переходить в жир и липонды, поэтому клинически животные выглядят крайне истощенными. В исходный период активность карбоксилэстеразы у овец составляла  $1,437 \pm 0,0387$  мкд/мл/мин. В последующие дни после облучения активность фермента угнеталась, особенно на 5, 7 и 9 день, составляя 40%, 49,4% и 34,6% ( $P < 0,001$ ). Перед гибелью животных активность фермента оставалась также пониженной.

Обобщая результаты проведенных исследований и учитывая ту огромную роль, которую играют в живом организме

ферменты, необходимо отметить, что последние, как и организм в целом, быстро реагируют на действие радиации. Даже облученные овец в дозе 400 р оказывает заметное влияние на многие жизненно важные процессы животных, нарушает окислительно-восстановительные процессы (пероксидаза), процессы переаминирования (аспартат-аминотрансфераза), а также отражается на обмене углеводов, жиров и минеральных веществ (кетозо-1-фосфат альдолаза, карбоксилэстераза и щелочная фосфатаза). Причем с увеличением дозы облучения отклонения в нарушении ферментных систем выражены глубже.

### 3. Изменение реактивности организма овец при введении нативной крови и сыворотки крови от ранее облученных доноров на фоне рентгеновского облучения

Защита биологических объектов от радиационных поражений и изыскание эффективных протекторных средств, отвечающих практическим требованиям, остается одной из актуальных проблем. В работах Н. Н. Клепарской с соавт. (1958), А. Т. Кравченко, В. И. Фофанова (1961), В. Ф. Сосовой (1965), Р. В. Петрова (1962) отмечено, что введение животным перед облучением гетерологичных и гомологичных белков повышает их устойчивость к действию ионизирующих излучений.

Для выяснения этого вопроса мы поставили цель — изучить клинко-гематологические показатели и состояние ферментных систем организма при предварительном введении нативной крови и сыворотки крови от ранее облученных доноров. У подопытных животных определяли вес, температуру тела, пульс, дыхание, количество гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, общего белка сыворотки крови, лейкоцитарную формулу, гематокритную величину и активность ферментов крови. Кроме вышеперечисленных показателей определяли насыщение артериальной крови кислородом, резистентность сосудистой стенки, капилляроскопию, артериальное давление, осуществляли запись биотоков сердца, сфигмографию. Эта часть работы выполнялась кандидатом биологических наук В. Г. Егоровым. Проведенная совместная работа, с нашей точки зрения, повысила достоверность тестов и, в определенной мере, помогла полнее интерпретировать полученные результаты.

Животный организм представляет сложную биологическую систему, где в процессе эволюции, в целях сохранения жизни, адаптирован ряд защитно-приспособительных механизмов, из которых ферментные реакции являются одними из ведущих.

Овцы группы № 3, облученные в дозе 1200 р, которым за 4

дня до облучения вводили нативную кровь облученного донора, были крайне угнетены, слабо реагировали на внешние раздражители, отмечалось повышение температуры тела, наблюдался полный отказ от корма и воды, снижение веса. Отмечалось интенсивное выделение из полостей носа, хрипы, болезненное покашливание.

Количество лейкоцитов, составляющее  $7,745 \pm 0,6244$ , снижалось до конца эксперимента с минимальными значениями на 5 и 15 сутки —  $1,969 \pm 0,2532$  и  $1,087 \pm 0,1416$  — соответственно. Степень достоверности отклонений больше 95% была на 3, 5, 6, 7 сутки после облучения. Сниженными у этих животных оставались общий белок и концентрация гемоглобина. Изменения количества красных кровяных телец носили волнообразный характер с тенденцией к снижению. Исходные данные гематокритной величины  $19 \pm 0,8712$ . Через сутки после облучения отмечено резкое повышение гематокритной величины, достигавшей  $29 \pm 1,452$  ( $P < 0,05$ ), в дальнейшем гематокрит оставался повышенным. Следует отметить, что перед гибелью животных гематокритная величина увеличивалась в 2—2,5 раза.

В лейкоформуле количество лимфоцитов и моноцитов уменьшалось, максимально приближаясь к уровню исходных величин к 90 суткам после облучения. Количество сегментоядерных нейтрофилов повышалось и оставалось повышенным: до конца исследований ( $P < 0,05$  на 3, 6, 7 и 8 сутки). Количество палочкоядерных нейтрофилов и эозинофилов имело тенденцию к увеличению; к 60—90 суткам количество несколько восстановилось.

Изменения активности пероксидазы носили фазовый характер: в первые сутки активность повышалась до  $3,73 \pm 0,09$  гамм/мл/мин при фоновых данных до облучения  $3,21 \pm 0,51$  гамм/мл/мин; дальнейшее повышение активности отмечено на 3 и 5 сутки после облучения. В последующий период отмечено резкое угнетение активности, особенно на 6 день —  $1,88 \pm 0,3484$  ( $P < 0,05$ ) — и 7 сутки —  $1,02 \pm 0,0871$  гамм/мл/мин ( $P < 0,01$ ). Повышенной активности пероксидазы оставалась до конца эксперимента.

В данной группе животных снижалась активность аспартат-аминотрансферазы сыворотки крови, составлявшая перед облучением  $0,033 \pm 0,002$  мкд/мл/мин, и доходила в отдельные дни до  $0,018 \pm 0,0014$  мкд/мл/мин, пониженной активности аспартат-аминотрансферазы была вплоть до конца исследований.

Исходные данные активности карбоксилэстеразы составляли  $1,369 \pm 0,0831$  мкд/мл/мин. В первые сутки после облуче-



ния активность фермента повысилась до  $1,489 \pm 0,0218$  мкд/мл/мин. В последующем отмечено снижение активности энзима до конца эксперимента: так, активность через 90 суток после облучения не превышала  $1,344 \pm 0,056$  мкд/мл/мин.

Активность же других ферментов: кетозо-1-фосфат альдолазы и щелочной фосфатазы имела общую тенденцию к повышению. Так, активность кетозо-1-фосфат альдолазы у клинически здоровых овец в сыворотке крови равнялась  $0,009 \pm 0,0014$  мкд/мл/мин; в первые сутки после облучения активность энзима понизилась до  $0,007 \pm 0,002$  мкд/мл/мин. В дальнейшем активность нарастала; так, на 7 день она была повышена в 5 раз. Достоверные отклонения были получены на 5, 6, 7 сутки после облучения. В конце исследования (90 суток) активность энзима также оставалась повышенной и равнялась  $0,018 \pm 0,0021$  мкд/мл/мин.

Активность щелочной фосфатазы была понижена в первые трое суток после облучения до  $0,019 \pm 0,0014$  мкд/мл/мин при фоновых данных  $0,028 \pm 0,0009$  мкд/мл/мин. Затем последовало повышение активности энзима.

В контрольной группе животных (к-3) изменения активности пероксидазы, аспартат-аминотрансферазы и карбоксилэстеразы были незначительные. Активность ферментов восстанавливалась на 5—15 сутки после введения нативной крови. Активность щелочной фосфатазы и кетозо-1-фосфат альдолазы практически не изменялась.

У животных группы № 4, перед облучением которым вводилась сыворотка крови облученных доноров, выявлены следующие закономерности: активность пероксидазы, в исходный период равная  $3,14 \pm 0,1277$  гамм/мл/мин, заметно снижалась в первые сутки после облучения ( $2,43 \pm 0,1103$  гамм/мл/мин,  $P < 0,05$ ). На 3 и 5 сутки активность фермента повышалась. Через 7, 10, 15 суток активность пероксидазы понизилась с минимальным значением на 15 день после облучения ( $1,23 \pm 0,0291$  гамм/мл/мин). С 30 суток и в остальные дни эксперимента активность фермента колебалась в пределах минимальных величин здоровых животных.

Активность аспартат-аминотрансферазы в сыворотке крови овец была сниженной на 1 сутки после облучения и составляла  $0,029 \pm 0,0021$  мкд/мл/мин ( $P < 0,05$ ) при исходных данных  $0,037 \pm 0,0017$  мкд/мл/мин. В последующие 15 суток активность фермента оставалась уменьшенной с наименьшей активностью на 7 сутки после облучения ( $0,013 \pm 0,0018$  мкд/мл/мин.). Проведенной статистической обработкой показано, что на 3, 5, 7, 10 и 15 сутки степень достоверности была больше 95%. В остальные дни исследований активность аспартат-

аминотрансферазы колебалась в пределах исходных величин.

Активность кетозо-1-фосфат альдолазы до облучения и введения сыворотки крови была  $0,010 \pm 0,0006$  мкд/мл/мин. В первые и третьи сутки пострадиационного периода снижалась до  $0,006 \pm 0,0012$  мкд/мл/мин. Через 5, 7, 10 и 15 суток активность фермента достоверно повышалась. Восстановление активности фермента относится к 60 суткам после облучения.

Активность щелочной фосфатазы в течение первых двух недель после облучения была повышенной (при достоверных значимых отклонениях на 1, 3 и 7 сутки). Через 30 суток и до конца эксперимента активность щелочной фосфатазы была на уровне исходных величин, установленных у здоровых животных.

Активность карбоксилэстеразы снижалась в течение 45 суток после облучения. Через 60—90 дней активность максимально приближалась к уровню исходных величин.

Количество лейкоцитов закономерно снижалось и только через 60—90 дней после облучения было близко к уровню исходных величин. Концентрация гемоглобина увеличивалась в первые 10 суток. В последующий период количество гемоглобина было в пределах установленных норм. Количество красных кровяных клеток крови в течение месяца со дня облучения было повышенным, на 30—45 сутки уменьшилось, но не доходило до уровня исходных величин, на 60 сутки и до конца эксперимента количество эритроцитов было несколько повышенным. Общий белок снижался с восстановлением к 45 дню. Показатель гематокритной величины носил фазовый характер с тенденцией к повышению и приближению к минимальному уровню исходных величин к 60—90 суткам. В лейкоформуле также отмечен сдвиг ядра влево. Уменьшалось количество лимфоцитов и моноцитов. Количество сегментоядерных и палочкоядерных нейтрофилов и эозинофилов увеличивалось. Количественное перераспределение клеток крови до естественного уровня относится к 45 дню. Окончательное количество эозинофилов восстанавливалось к 90 суткам после облучения.

У животных 5 группы, которым вводилась сыворотка крови, полученная в отдаленные сроки после облучения донора, на фоне рентгеновского облучения отмечено: угнетение животных, отсутствие аппетита, на 5—6 сутки появилась эпилепсия с выраженным геморрагическим синдромом. Наблюдалась отечность окологлазных тканей.

Концентрация гемоглобина и количество эритроцитов снижались и лишь к 90 суткам после облучения приближались к исходному уровню. Сниженным осталось количество белых

кровеных телец до конца эксперимента. Как и в предыдущих двух группах отмечались аналогичные изменения в лейкоформуле и показателях общего белка. Гематокритная величина оставалась повышенной.

Активность ферментов крови претерпевала следующие изменения: активность пероксидазы после облучения снижалась, с восстановлением активности до уровня исходных величин на 60—90 сутки. Активность аспартат-аминотрансферазы носила переменный характер с тенденцией к снижению. Процесс нормализации активности фермента отмечен к 90 суткам. Активность кетозо-1-фосфат альдолазы повышалась и оставалась повышенной до конца исследования, но это повышение было незначительным и составляло 0,002 мкд/мл/мин. Активность щелочной фосфатазы носила фазовый характер, достигая максимума исходных величин к 60 суткам после облучения. Активность карбоксилэстеразы повышалась в течение недели, в остальной период снижалась, с приближением к уровню исходных величин к 60—90 суткам.

Овец 4 и 5 групп клиническое течение лучевой болезни несколько сглажено. К 15—30 суткам отмечено улучшение общего состояния, особенно у животных группы № 4 и позже — в группе № 5.

В контрольных группах (к—4 и к—5) наблюдались небольшие колебания в активности ферментов и они носили невыраженный, волнообразный характер.

Разбор ферментативных сдвигов в крови животных, проведенный по группам, позволяет заключить, что сыворотка крови донора, взятая через 18 дней после облучения в дозе 2000 р, оказывает более положительное влияние на активность ферментов, течение и исход лучевой болезни у реципиентов, чем сыворотка крови донора, взятая через год после облучения. Кровь, полученная через 3 дня после облучения донора, оказывает более сильное ингибирующее влияние на активность ферментов, что сказалось также и на клинико-гематологических показателях и привело к летальному исходу 66% подопытных животных. Известно, что в развитии лучевой болезни важную роль играют биохимические реакции, которые в облученных тканях ведут к радиолизу воды, вследствие чего в тканях накапливаются продукты, обладающие высокой окислительной способностью, типа семихинонов, ортохинонов, липидов и др., которые ряд авторов называют как «радиотоксины»: А. М. Кузин, 1956, 1968; Н. Н. Кузнецова, 1958; Ю. Б. Кудряшов с соавт., 1966; Ellinger F., 1953; Ludwig F., 1958 и др., что нашло подтверждение также и в наших исследованиях (имеется авторское свидетельство). Основываясь на

высоком проценте выживаемости и восстановлении активности в ферментных системах, можем предполагать, что радиоэффект сыворотки крови животных, перенесших лучевую болезнь, обусловлен содержанием в ней специфических биологически активных веществ, появляющихся в крови облученных животных не в первые дни, а в отдаленные сроки. По-видимому, эти вещества улучшают функциональное состояние ретикуло-эндотелиальной системы, тем самым повышая резистентность облученного организма. Не исключена возможность, что при лучевой болезни, механизмы профилактического действия облученной сыворотки могут быть обусловлены благоприятным действием находившихся в сыворотке крови иммунных антител, обладающих десенсибилизирующим влиянием (И. П. Мищенко, М. М. Фоменко, 1934; Л. А. Зильбер с соавт., 1956; Н. Н. Клемпарская с соавт., 1972 и др.).

## ВЫВОДЫ

1. Тотальное облучение овец лучами Рентгена в дозе 400 р вызывает изменение клинико-гематологических показателей и активности ферментов сыворотки крови с последующим восстановлением. Доза 2000 р подавляет ферментативную активность, что приводит к гибели животных.

2. Активность пероксидазы крови при облучении овец в дозе 400 р ингибировалась в течение 15 суток. Двадцатые сутки после облучения можно считать восстановительным периодом, так, активность ферментов у всех животных составляла в среднем 102,2%. Облучение в дозе 2000 р вызывало четкое снижение активности фермента, нараставшее вплоть до гибели животных. Максимум снижения активности фермента отмечен на девятые сутки, когда активность не превышала 29 процентов от исходных величин.

3. Активность кетозо-1-фосфат альдолазы — специфического фермента печени — в сыворотке крови овец, облученных рентгеновыми лучами в дозе 400 р, приобретала волнообразный характер с общей тенденцией к повышению. Сроки нормализации активности фермента удлинялись до 30—45 суток.

При облучении животных в дозе 2000 р активность этого фермента нарастала в течение всего периода исследований. Увеличенная активность фермента, отражающая дисфункцию печени, может служить как диагностический тест функционального состояния печени и сердца.

4. В течение пятнадцати дней пострадиационного периода у овец, облученных в дозе 400 р, активность аспартат-аминотрансферазы снижалась до 0,019 мкд/мл/мин, увеличиваясь в

последующие 20—30 дней до минимальных исходных величин. В дальнейшем на протяжении всего эксперимента активность энзима была повышенной и равнялась 0,029 мкк/мл/мин. Активность аспартат-аминотрансферазы у овец при дозе 2000 р во все периоды лучевой болезни была снижена и не превышала 0,011 мкк/мл/мин.

5. У животных, облученных в дозе 400 р, активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови колебалась с тенденцией к увеличению. Восстановление активности отмечено через 45 суток после облучения. При облучении в дозе 2000 р активность щелочной фосфатазы повышалась в течение всего эксперимента. Нарастание активности фермента в 2—2,5 раза, как правило, возникало за 1—2 дня до гибели животных, что может прогнозировать исход лучевой болезни.

6. При облучении овец в дозе 400 р в активности карбоксилэстеразы, равной 1,249 мкк/мл/мин, отмечено два периода: период снижения активности энзима в первые пятнадцать суток и период увеличения ее в последующие дни эксперимента, однако показатель активности не превышал 1,351 мкк/мл/мин.

При дозе 2000 р на протяжении всего исследования отмечено стойкое угнетение активности карбоксилэстеразы.

7. В проявлении симптомокомплекса лучевой патологии, гематологических и ферментных сдвигов у овец, подвергшихся радиации в дозе 400 р и 2000 р, отмечены параллели, а именно: изменение общего состояния и поведенческих реакций, в определенной мере, сопряжено с уменьшением количества лейкоцитов, гемоглобина, эритроцитов, общего белка, сдвигами ядра влево в лейкоцитарной формуле. Степень выраженности лейкопении, лимфопении, гемоконцентрации прямо пропорциональна увеличению дозы радиации.

8. Сыворотка крови облученных доноров, полученная в восстановительный период, не оказывает существенного влияния на общее состояние интактных животных. У реципиентов, которым перед облучением в дозе 1200 р вводилась сыворотка облученных животных, течение лучевой болезни сглажено. Период восстановления ферментной активности и гематологических показателей уменьшен до 30—60 дней. Активность щелочной фосфатазы повышалась незначительно и кратковременно.

9. У овец, которым перед облучением в дозе 1200 р вводилась нативная кровь, взятая в первые дни после облучения доноров, уменьшалась активность пероксидазы, аспартат-аминотрансферазы и нарастала активность кетозо-1-фосфатальдозазы, карбоксилэстеразы. Период повышения активности щелочной фосфатазы был продолжительным. Увеличива-

лась в 2—2,5 раза гематокритная величина, уменьшалось количество лейкоцитов, гемоглобина, общего белка. У животных проявлялись симптомокомплексы лучевой болезни с летальным исходом в 66% случаев.

10. Введение овцам перед облучением в дозе 1200 р сыворотки крови доноров, полученной в отдаленные сроки пострадиационного периода, сглаживает течение лучевой болезни. Процесс восстановления активности исследованных ферментов происходит в течение 60—90 дней после облучения.

#### Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Авторское свидетельство на изобретение.
2. Определение гематокритной величины у сельскохозяйственных животных (в соавторстве).  
Бюллетень Всесоюзного ордена Ленина института экспериментальной ветеринарии, М., 1973, выпуск 15, стр. 42—43.
3. Ферментативные сдвиги в крови овец и радиорезистентность реципиентов (в соавторстве).  
Бюллетень Всесоюзного ордена Ленина института экспериментальной ветеринарии, М., 1973, выпуск 15, стр. 81—83.
4. Влияние внешнего облучения на пероксидазу и аспартат-аминотрансферазу крови овец.  
Бюллетень Всесоюзного ордена Ленина института экспериментальной ветеринарии, М., 1973, выпуск 15, стр. 94—95.

#### Материалы диссертации доложены:

На заседании Ученого Совета Всесоюзного ордена Ленина института экспериментальной ветеринарии, 10 декабря 1972 г.  
Ответственный за выпуск — профессор А. А. Кудрявцев.

Подп. к печ. 5/VI—73 г. Зак. 1051 Тир. 200

Типография Московской ордена Трудового Красного Знамени ветеринарной академии им. К. И. Скрябина