

УДК: 616.71-018.46:612.014.48

## МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОСТНОМОЗГОВЫХ КЛЕТОК НА ЭТАПАХ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ГЕМОПОЭЗА У ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ И МИЕЛОТРАНСПЛАНТАЦИИ

Е.А. Романова

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

### РЕЗЮМЕ

Исследована интенсивность метаболизма миелокариоцитов в период с 10-х по 90-е сутки после летального облучения мышей и трансплантации клеток костного мозга *per se*, а также обогащенных тимоцитами. Изучены активность ферментов энергетического обмена и состояние системы перекисное окисление – антиокислительная защита миелокариоцитов. Показано, что на этапе интенсивного восстановления клеточности костного мозга происходит значительное повышение активности ферментов миелокариоцитов. В это же время отмечается активизация процессов ПОЛ, сопровождаемая увеличением антиоксидантных ресурсов, позволяющих эффективно контролировать свободнорадикальное окисление в костномозговых клетках.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** метаболизм, костный мозг, трансплантация

### ВВЕДЕНИЕ

Характер и полноценность восстановления миело- и лимфопоэза после облучения и миелотрансплантации в существенной степени определяются метаболическими процессами, протекающими в клетках. Особое место в их обеспечении занимают ферменты. От уровня активности ферментных систем зависит интенсивность процессов пролиферации и дифференцировки клеток, способность к реализации свойственных им функций. Учитывая это, целью настоящей работы явилось исследование активности ферментов энергетического обмена и процессов свободнорадикального окисления, интегрально отражающих метаболизм клеток, на этапах восстановления костного мозга облученных животных, защищенных с помощью сингенной миело- и лимфомиелотрансплантации.

трацией через капроновый фильтр. Клетки о<sup>108</sup>мывали путем двукратного центрифугирования 250 г в течение 10 минут, после чего ресуспендировали в свежем растворе «Гемодез».

Активность гексогеназы (КФ 2.7.1.1), 6-фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11), пируваткиназы (КФ 2.7.1.40), лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) определяли при помощи спектрофотометрических методов, в основе которых лежит использование сопряженных систем окисления или восстановления никотинамидных коферментов [1]. Конечные концен-

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на мышах линии СВА 8-10 недельного возраста массой 20-22 г. Мышей-реципиентов облучали в дозе 9 гр на установке РУМ-17. Костный мозг ( $5 \times 10^6$  клеток/мышь) и тимоциты ( $20 \times 10^6$  клеток/мышь) вводили внутривенно в первые 24 часа после облучения.

Эксперименты проведены на 2-х группах мышей:

- облученных животных, получивших клетки костного мозга;
- облученных животных, получивших клетки костного мозга и тимоциты.

Клетки костного мозга выделяли путем вымывания из бедренных костей раствором «Гемодез». Тимоциты получали на среде Игла, содержащей 20% сыворотки, путем мягкой гомогенизации органов с последующей филь-

трации компонентов реакционных смесей были следующими:

- для определения активности гексокиназы – 5.10-4М глюкозы, 1.10-3М АТФ, 5.10-4М  $MgCl_2$ , 5.10-4М НАДФ+, 0,3 МЕ глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы;
- для определения активности 6-фосфофруктокиназы – 7.10-4М фруктозо-6-фосфата, 1.10-3М АТФ, 1.10-3М  $MgCl_2$ , 5.10-5М НАДФ, 7.10-3М цистеина, 0,3 МЕ фруктозобисфосфатальдозазы, 0,3 МЕ триозофосфатизомеразы, 0,3 МЕ глицерол – 3-фосфатдегидрогеназы (НАД+);
- для определения активности пируваткина-

- зы – 1.10-3М фосфоенолпирувата, 1.10-2М КСl, 5.10-3М MgCl<sub>2</sub>, 1.10-3М АДФ, 5.10-5М НАДН, 0,3 МЕ лактатдегидрогеназы;
- для определения активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы – 1.10-3М глюкозо-6-фосфата, 5.10-4М НАДФ+, 5.10-3М MgSO<sub>4</sub>;
- для определения активности лактатдегидрогеназы – 1.10-3М пирувата натрия, 5.10-5М НАДН, 3.10-3М MgCl<sub>2</sub>;
- для определения активности НАДФ-изоцитратдегидрогеназы – 5.10-4М НАДФ+, 1.10-3М MgSO<sub>4</sub>, 1,5.10-3М DL-изоцитрата.

Содержание первичных продуктов ПОЛ-диеновых (ДК), триеновых (ТК), оксодиеновых (ОДК) и тетраеновых конъюгатов, которые являются в данном случае продуктами окислительной деструкции полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) с различным количеством двойных связей в молекуле, определяли электрофотометрически [2]; содержание вторичных продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (МДА) – колориметрически [3]. Содержание витамина А, каротина, витамина Е и его метаболитов: димеров токоферола (ОТФ) и токоферилхинона (ТФХК), определяли спектрофотометрически. Содержание данных веществ пересчитывали по коэффициентам молярной экстинкции: для ДК – 27 000 М<sup>-1</sup>×см<sup>-1</sup>; для ТК- 43 400; для ОДК– 22 000; для ретинола – 52 480; для каротина – 2 580; для токоферола – 3 170; для ОТФ-8 600 М<sup>-1</sup>×см<sup>-1</sup> [4]. Общую антиокислительную активность (АОА) определяли в модели термического автоокисления метилолеата в присутствии изучаемых образцов [5].

Полученные данные обработаны статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате изучения динамики восстановления количественных показателей костного мозга облученных реципиентов нами было установлено, что общая клеточность органа у животных, получивших миелотрансплантат, восстанавливается к 30-м пострадиационным суткам, тогда как у реципиентов лимфомиелотрансплантата этот показатель нормализуется уже к 20-м суткам.

Наши исследования метаболической активности клеток костного мозга после облучения и миелотрансплантации показали, что она отличается волнообразным характером. Выявленная закономерность касалась всех изученных ферментов и была присуща животным и 1-ой, и 2-ой группы (Табл.1.) Так, с 5-х по 15-е

посттрансплантационные сутки в 1-й и 2-й группах животных наблюдалась пониженная, по сравнению с показателями нормальных взрослых животных, ферментативная активность в миелокариоцитах. С 20-х по 30-е сутки во 2-й группе животных и с 20-х по 45-е сутки в 1-й группе активность ферментов энергетического обмена в клетках костного мозга возрастала, превышая показатели нормы. В последующие сроки скорость ферментативных реакций у животных 2-й группы стабилизировалась на уровне нормы взрослых особей и сохранялась такой до конца периода исследования (90-х суток), а у животных 1-й группы вновь испытывала некоторое снижение, нормализуясь лишь к 90-м посттрансплантационным суткам.

Полученные данные свидетельствуют о том, что энергетический метаболизм костномозговых клеток на начальных этапах восстановления миелопоэза характеризуется низкой активностью, свойственной незрелым клеткам, тогда как во время периода интенсивного восстановления клеточности органа он приобретает признаки постнатального гемопоэза, демонстрируя достоверную активизацию ферментных систем миелокариоцитов. Добавление тимоцитов к миелотрансплантату оказывает стимулирующий эффект на интенсивность ферментативных процессов в период восстановления клеточности костного мозга и стабилизирующее влияние на метаболизм клеток – после завершения этого периода.

В результате исследования процессов ПОЛ в клетках костного мозга после облучения и миелотрансплантации установлено, что восстановление клеточности органа и гемопоэза протекает на фоне их некоторой активизации, что наблюдается у 2-й группы реципиентов вплоть до 30-х суток после трансплантации, а у 1-й группы – до 45-х, нося при этом более выраженный характер (Табл.2). Так, у животных 1-й группы в этот период наблюдалось повышение уровня ОДК в 1,6-2,2 раз, тетраенов – в 1,8-2,8 раз, а также некоторое повышение содержания ДК, ТК и МДА. У животных 2-й группы отмечалось повышение содержания ОДК в 1,3-1,7 раз, тетраенов – в 1,3-2,0 раз, заметного роста уровня других продуктов ПОЛ не наблюдалось.

Параллельно этому процессу в 1-й и 2-й группах происходило достоверное увеличение уровня активных метаболитов токоферола: димеров токоферола – в 1,4-1,8 раз и 1,5-2,0 раз, токоферилхинона – в 1,3-1,9 и 1,4-2,0 раз соответственно (Табл.3.). Следует заметить,

что наблюдаемая активизация процессов ПОЛ на этапах восстановления миелопоэза как в 1-й, так и во 2-й группе животных происходит в пределах физиологической нормы и сопровождается превалирующим усилением функционирования редокс-системы витамина E, что обеспечивает увеличение общей антиоксидантной активности клеток костного мозга. Ресурсы АО системы миелокариоцитов в этих условиях достаточно для эффективного контроля ПОЛ.

Таким образом, из полученных нами данных можно заключить, что после облучения и миелотрансплантации процессы энергетического метаболизма в клетках костного мозга нормализуются позднее, чем происходит восстановление клеточности органа. При этом восстановление их у реципиентов миелокариоцитов *per se* и в комбинации с тимоцитами имеет одинаковые закономерности с преимуществом во времени нормализации показателей метаболизма у животных, получивших лимфомиелотрансплантат.

**Таблица 1**  
**Активность ферментов энергетического обмена в клетках костного мозга животных после облучения и трансплантации миелокариоцитов *per se* (1) и миелокариоцитов в сочетании с тимоцитами (2)**

Сутки после трансплантации	Группы животных	Гексокиназа	6-фосфофруктокиназа	Пируваткиназа	Лактатдегидрогеназа	Изоцитратдегидрогеназа	Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
5	1	10,6 ± 0,5*	91,1 ± 5,2*	21,4 ± 1,2*	60,7 ± 3,1*	4,1 ± 0,2*	28,3 ± 1,2*
	2	12,3 ± 0,6**	118,8 ± 5,6**	27,5 ± 1,4***	69,2 ± 3,2***	4,9 ± 0,3***	35,6 ± 1,4***
10	1	11,9 ± 0,6*	100,6 ± 5,4*	29,6 ± 1,5*	66,1 ± 3,4*	5,0 ± 0,3*	39,6 ± 1,5*
	2	14,9 ± 0,7**	128,4 ± 6,3**	34,3 ± 1,7***	71,5 ± 3,5*	5,7 ± 0,3***	44,9 ± 1,7***
15	1	17,0 ± 0,8*	129,7 ± 6,7*	33,9 ± 1,6*	70,1 ± 3,4*	5,6 ± 0,3*	43,7 ± 1,8*
	2	17,5 ± 0,8*	135,9 ± 6,8*	37,7 ± 1,9***	73,0 ± 3,5*	6,0 ± 0,4*	50,4 ± 1,9***
20	1	23,4 ± 1,2*	178,6 ± 8,9*	49,7 ± 2,5*	89,2 ± 4,0*	7,6 ± 0,3*	62,7 ± 2,2*
	2	24,2 ± 1,2*	189,2 ± 8,6*	50,9 ± 2,5*	95,4 ± 4,5*	7,9 ± 0,4*	64,1 ± 2,2*
30	1	23,9 ± 1,2*	190,1 ± 8,8*	51,6 ± 2,6*	91,3 ± 4,3*	7,5 ± 0,3*	63,9 ± 2,2*
	2	24,1 ± 1,2*	190,6 ± 8,8*	49,9 ± 2,5*	90,6 ± 4,3*	7,7 ± 0,4*	64,0 ± 2,2*
45	1	22,8 ± 1,0*	179,6 ± 8,5*	49,2 ± 2,5*	89,2 ± 4,0*	7,5 ± 0,3*	62,5 ± 2,1*
	2	20,3 ± 1,0**	162,5 ± 7,9**	46,9 ± 2,4	86,3 ± 4,0	6,8 ± 0,3**	59,1 ± 2,0
60	1	17,4 ± 0,8*	140,4 ± 7,0*	37,6 ± 1,9*	77,3 ± 3,7	6,2 ± 0,3*	53,1 ± 2,0*
	2	20,1 ± 1,0**	156,9 ± 7,6**	43,0 ± 2,2**	83,4 ± 3,9	6,9 ± 0,3**	57,0 ± 2,0
75	1	17,5 ± 0,8*	140,1 ± 7,0*	38,7 ± 1,9*	78,4 ± 3,5	6,4 ± 0,3*	53,5 ± 2,0*
	2	19,5 ± 0,9**	158,6 ± 7,2**	43,4 ± 2,2**	81,9 ± 3,9	6,8 ± 0,3	57,7 ± 2,0
90	1	18,8 ± 0,9	150,9 ± 7,6	41,5 ± 2,1	79,1 ± 3,9	6,7 ± 0,3	55,9 ± 2,0
	2	19,2 ± 0,9	153,8 ± 7,4	43,0 ± 2,3	81,7 ± 3,9	6,9 ± 0,3	57,6 ± 1,9
Норма		19,3 ± 0,9	157,4 ± 7,6	43,6 ± 2,3	81,0 ± 3,9	6,9 ± 0,3	57,6 ± 1,8

- Активность гексокиназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы выражали в нмоль НАДФ+/мин×мг белка; 6-фосфофруктокиназы, пируваткиназы, лактатдегидрогеназы – в нмоль НАДН/мин×мг белка
- \* - достоверность различий показателей по сравнению с нормой (p<0,05)  
\*\* - достоверность различий показателей у животных группы 2 по сравнению с показателями у животных группы 1 (p<0,05)

**Таблица 2**  
**Интенсивность ПОЛ и общей АОА в костном мозге облученных животных после трансплантации миелокариоцитов *per se* (1) и в комбинации с тимоцитами (2)**

Сутки после трансплантации	Группы животных	Показатели					
		ДК	ТК	ОДК	Тетраены	МДА	АОА
10	1	0,038±0,004	0,023±0,003	0,068±0,007*	1,44±0,15*	0,27±0,03	0,50±0,06*
	2	0,037±0,004	0,022±0,003	0,057±0,006*	1,15±0,12***	0,26±0,03	0,56±0,06*
20	1	0,041±0,005*	0,024±0,003	0,083±0,009*	2,01±0,22*	0,30±0,03*	0,88±0,09*
	2	0,039±0,005	0,022±0,003	0,064±0,007***	1,45±0,15***	0,28±0,03	1,13±0,12***
30	1	0,039±0,005	0,022±0,003	0,072±0,008*	1,51±0,16*	0,28±0,03	1,01±0,11*
	2	0,035±0,004	0,020±0,003	0,049±0,005***	0,94±0,10***	0,27±0,03	1,19±0,12*
45	1	0,037±0,004	0,020±0,003	0,061±0,007*	1,29±0,13*	0,26±0,03	0,93±0,11*
	2	0,034±0,004	0,020±0,003	0,046±0,005**	0,83±0,09**	0,24±0,03	0,90±0,11*
60	1	0,037±0,004	0,019±0,003	0,045±0,005	0,86±0,09	0,26±0,03	0,57±0,07*
	2	0,034±0,004	0,019±0,003	0,040±0,004	0,80±0,09	0,24±0,03	0,62±0,07*

75	1	0,033±0,004	0,020±0,003	0,041±0,005	0,81±0,09	0,23±0,02	0,52±0,06
	2	0,032±0,004	0,019±0,003	0,041±0,004	0,71±0,08	0,23±0,02	0,53±0,06
90	1	0,033±0,004	0,019±0,002	0,039±0,004	0,75±0,08	0,24±0,02	0,47±0,05
	2	0,033±0,003	0,019±0,002	0,038±0,004	0,73±0,08	0,23±0,02	0,46±0,05
Норма		0,032±0,003	0,019±0,002	0,038±0,004	0,72±0,07	0,23±0,02	0,44±0,04

1. ДК-диеновые, ТК- триеновые, ОДК- оксидиеновые, тетраены-тетраеновые конъюгаты ПОЛ, МДА- малоновый диальдегид, АОА- общая антиоксидантная активность.
2. Количество тетраенов выражено в единицах Д/мл; АОА- в относительных единицах, остальные параметры – в мкмоль/мл.
3. \* - достоверность различий показателей по сравнению с нормой (p<0,05);  
\*\* - достоверность различий показателей у животных группы 2 по сравнению с показателями у животных группы 1 (p<0,05).

Таблица 3

Содержание жирорастворимых витаминов и метаболитов токоферола в костном мозге облученных животных после трансплантации миелокариоцитов *per se* (1) и в комбинации с тимоцитами (2)

Сутки после трансплантации	Группы животных	Показатели				
		Токоферол	Димеры токоферола	Токоферил-хинон (Д/мл)	Ретинол	Каротин
10	1	0,39 ± 0,05	0,78 ± 0,04*	1,36 ± 0,12*	0,010 ± 0,002	0,37 ± 0,04
	2	0,42 ± 0,05	0,86 ± 0,05***	1,57 ± 0,15*	0,012 ± 0,002	0,38 ± 0,04
20	1	0,44 ± 0,05	0,91 ± 0,05*	1,88 ± 0,19*	0,009 ± 0,002	0,44 ± 0,004
	2	0,46 ± 0,05*	1,02 ± 0,06***	2,10 ± 0,22*	0,010 ± 0,002	0,48 ± 0,004
30	1	0,44 ± 0,05	0,92 ± 0,05*	1,99 ± 0,20*	0,011 ± 0,002	0,44 ± 0,04
	2	0,43 ± 0,05	0,81 ± 0,05***	1,47 ± 0,15***	0,011 ± 0,002	0,49 ± 0,04
45	1	0,43 ± 0,05	0,71 ± 0,04*	1,38 ± 0,14*	0,012 ± 0,002	0,46 ± 0,04
	2	0,42 ± 0,05	0,58 ± 0,03***	1,35 ± 0,14*	0,012 ± 0,002	0,47 ± 0,04
60	1	0,41 ± 0,04	0,61 ± 0,04*	1,34 ± 0,14*	0,011 ± 0,002	0,38 ± 0,04
	2	0,38 ± 0,04	0,55 ± 0,03	1,25 ± 0,15	0,012 ± 0,002	0,39 ± 0,04
75	1	0,38 ± 0,04	0,54 ± 0,03	1,27 ± 0,13	0,010 ± 0,002	0,41 ± 0,04
	2	0,36 ± 0,04	0,54 ± 0,03	1,25 ± 0,13	0,011 ± 0,002	0,40 ± 0,04
90	1	0,37 ± 0,04	0,52 ± 0,03	1,07 ± 0,12	0,011 ± 0,002	0,42 ± 0,04
	2	0,36 ± 0,04	0,52 ± 0,03	1,07 ± 0,12	0,010 ± 0,002	0,43 ± 0,04
Норма		0,36 ± 0,04	0,51 ± 0,02	1,05 ± 0,11	0,011 ± 0,002	0,42 ± 0,04

1. Количество веществ выражено в мкмоль/мл.
2. \* - достоверность различий показателей по сравнению с нормой (p<0,05);  
\*\* - достоверность различий показателей у животных группы 2 по сравнению с показателями у животных группы 1 (p<0,05).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Астауров Б.Л. Методы биологии развития М.:Наука. 1974. С. 349-350.
2. Powell W.S. Chromatography of Lipids for Biomedicine Research and Clinical Diagnostic. // Amsterdam: Elsev. Sci. Publ. 1987. P. 76-106.
3. Спиричев В.Б., Матусис И.И., Бронштейн Л.М. Экспериментальная витаминология. Минск: Наука и техника. 1979. С. 20-57.
4. Паранич Л.И., Паранич А.В., Василенко Н.М., Бугай Е.В. Действие нитробензола и его хлорпроизводных на некоторые показатели антиокислительного гомеостаза в тканях крыс //Бюлл. эксперим. биол. и мед. 1993. №10. С. 402-405.
5. Паранич А.В. Кониасо А., Бугай Е.В., Копылов А.В. О роли жирорастворимых витаминов А и Е в профилактике биологических эффектов ионизирующего излучения в различных тканях крыс //Радиобиология. 1992. Т.32. Вып.5. С.743-750.

## МЕТАБОЛІЧНА АКТИВНІСТЬ КІСТКОВОМОЗКОВИХ КЛІТИН НА ЕТАПАХ ВІДНОВЛЕННЯ ГЕМОПОЕЗУ У ТВАРИН ПІСЛЯ ОПРОМІНЕННЯ ТА МІЄЛОТРАНСПЛАНТАЦІЇ

О.А. Романова

Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна

### РЕЗЮМЕ

Досліджено інтенсивність метаболізму мієлокаріоцитів у період з 10-ої по 90-у добу після летального опромінення мишей і трансплантації клітин кісткового мозку *per se*, а також збагачених тимоцитами. Вивчено активність ферментів енергетичного обміну та стан системи перекисне окислення – антиокислювальний захист мієлокаріоцитів. Показано, що на етапі інтенсивного відновлення клітинності кісткового мозку відбувається значне підвищення активності ферментів мієлокаріоцитів. Водночас спостерігається ак-

тивізація процесу ПОЛ, що супроводжується збільшенням антиоксидантних ресурсів, які дозволяють ефективно контролювати вільнорадикальне окислення у кістковомозкових клітинах.

**КЛЮЧЕВІ СЛОВА:** метаболізм, кістковий мозок, трансплантація

## **THE METABOLIC ACTIVITY OF MEDULLAR CELLS AT STAGES OF HAEMOPOESIS RECOVERING OF THE ANIMALS AFTER IRRADIATION AND MYELOTRANSPLANTATION**

*E.A. Romanova*

The Karazin National University of Kharkov

---

### **SUMMARY**

The intensity of myelocariocytes metabolism from the tenth day after lethal irradiation of mice till the ninetieth and transplantation of medullar cells was studied. The activity of energetic metabolic enzymes and the state of the lipid peroxidation — antioxidation protection system of myelocaryocytes was investigated. It was shown that a significant activity increase of myelocaryocytes enzymes took place at the stage of medullar cells recovery. At the same time the activation of lipid peroxidation processes is accompanied by an increase of antioxidant resources enabling effective control of free-radical oxidation in medullar cells.

**KEY WORDS:** metabolism, marrow, transplantation