РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

УДК 535.33/34+621.373.826

# А.И. ДЬЯЧЕНКО<sup>1,2</sup>, Ю.А. ШУЛАГИН<sup>2</sup>, Е.В. СТЕПАНОВ<sup>1</sup>, А.Г. ЗИЗИНА<sup>2</sup>, В.П. КРОТОВ<sup>2</sup>, В.М. ПЕТРОВ<sup>2</sup>, Т.Е. БУРКОВСКАЯ<sup>2</sup>

## МОНИТОРИНГ БИОЛОГИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ У ПРИМАТОВ ПО ВЫДЕЛЕНИЮ ЭНДОГЕННОГО СО С ВЫДЫХАЕМЫМ ВОЗДУХОМ И ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМ ПАРАМЕТРАМ

**Ключевые слова:** эндогенный СО, гемоглобин, лейкоциты, ретикулоциты, радиация, математическое моделирование, техника мониторинга, лазерный спектральный анализ, перестраиваемые диодные лазеры

**Keywords:** endogeneous CO, hemoglobin, leukocytes, reticulocytes, radiation, mathematical modeling, monitoring technique, laser spectral analysis, tunable diode lasers

#### 1. Введение

Эндогенный оксид углерода (СО) играет значительную роль в жизнедеятельности организма [1]. Около 85% СО в организме производится в результате ферментативно-управляемого катаболизма гем-содержащих соединений, таких как гемоглобин, цитохромы, миоглобин, каталаза и пероксидаза. Гемоглобин из красных кровяных телец обеспечивает от 80 до 90% гема для образования СО [2]. Катаболизм гема наиболее интенсивно проходит в клетках печени, селезенки и костном мозге.

Л. Тиунов и В. Кустов [3] впервые наблюдали увеличение выделения эндогенного СО у крыс вследствие сильного радиационного воздействия. Они объяснили этот рост в первую очередь увеличением катаболизма гемоглобина. К сожалению, использованные этими авторами методы хроматографии не обеспечивали достаточной чувствительности и скорости анализа для того, чтобы исследовать выделение СО с выдыхаемым воздухом в режиме монито-

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, г. Москва.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, г. Москва.

<sup>©</sup> Коллектив авторов, 2012.

ринга. В [4] для неинвазивного мониторинга проявлений радиационного воздействия у людей по изменению выделения эндогенного СО с выдыхаемым воздухом нами было предложено использовать методы высокочувствительного спектрального анализа с использованием перестраиваемых диодных лазеров. Для оценки радиационного воздействия такой подход может оказаться эффективным в ходе будущих полетов на Марс, когда космонавты/астронавты могут подвергнуться воздействию космической радиации.

Разработка данного метода мониторинга требует проведения предварительных экспериментов с животными как в космическом пространстве, так и на Земле. Эксперименты можно проводить как с малыми лабораторными животными, такими как грызуны, так и с достаточно крупными животными. Тестирование предложенного метода на обезъянах, как наиболее близких человеку живых объектах, является важным шагом в этих исследованиях.

Целью данного исследования было: 1) разработать неинвазивный метод оценки эффекта радиационного воздействия на обезьян, основанный на применении лазерного анализа содержания эндогенного СО в выдыхаемом воздухе, и 2) провести апробацию данного подхода в эксперименте.

#### 2. Методы

В целом в радиационном эксперименте были использованы семь обезьян вида макака-резус (Macaca mulatta): три в контрольной и четыре в опытной группах. Программа исследования была одобрена биоэтической комиссией ГНЦ РФ ИМБП РАН.

Животные опытной группы подвергались гамма-облучению от источника <sup>60</sup>Со. Сначала животные подвергались двухкратному (с перерывом в 5 дней) фракционированному облучению (ФО) с дозой 0.66 Гр в каждом сеансе облучения. Таким образом, суммарная доза ФО составила 1.32 Гр. Спустя три месяца после ФО обезьяны были подвергнуты однократному облучению (ОО) в дозе 1.32 Гр с длительностью экспозиции 6 час. Такая форма радиационного воздействия имитирует радиационное воздействие, которому могут подвергнуться космонавты/астронавты при полете на Марс. Обе группы обезьян находились в одном помещении за исключением времени радиационного воздействия. Контрольная группа не облучалась.

Для измерения газообмена использованы подгруппы из контрольной и опытной групп. Каждая подгруппа состояла из двух обезьян одинакового возраста (3.5 года) и близкого веса (4.0–4.6 кг). Исследования газообмена проводились перед и после ОО.

Животных помещали в фиксирующее кресло в прозрачную пластиковую герметичную емкость объемом около 54 л (рис. 1). Перемешивание газа в емкости обеспечивалось вентилятором. Микрокомпрессор начинал прокачивать воздух через этот гермообъем с постоянной скоростью в диапазоне от 1.5 до 2.0 л/мин сразу после помещения животных в гермообъем.

Применялись следующие техники и оборудование газового анализа.

1. Близкий к реальному времени мониторинг выделения эндогенного CO с помощью спектральной аналитической системы на основе перестраиваемого



Рис. 1. Экспериментальная установка

диодного лазера (ПДЛ). Детали разработанного анализатора СО описаны в [5–7], а особенности высокочувствительного лазерного анализа СО указаны ниже.

2. Мониторинг  $O_2$  и  $CO_2$  с помощью газоанализаторов фирмы Beckman типа OM-11 и LB-2 для измерений  $O_2$  и CO<sub>2</sub> соответственно.

3. Измерение потока с помощью ультразвукового датчика Спиросенс-7.8 (Московский государственный горный университет).

В ходе обследования каждой обезьяны в течение 25 мин измерялись потоки и концентрации газов O<sub>2</sub>, CO и CO<sub>2</sub> во входящем и выходящем из гермообъема воздухе.

Периферическая кровь была исследована у четырех обезьян опытной группы и трех обезьян контрольной группы. Кровь исследовалась сразу после завершения первой серии ФО, а затем на 3–4, 24, 37, 51, 65, 81 сутки после завершения второй серии ФО. После ОО гематологические исследования провели на 8, 20, 36, 57, 85 и 180 сутки.

Определяли число лейкоцитов и ретикулоцитов в 1 мкл крови, величину гематокрита, содержание гемоглобина и лейкоцитарную формулу. Все полученные данные были подвергнуты статистической обработке с использованием критерия Стьюдента.

Лазерный анализатор СО включает следующие основные компоненты: 1) оптический блок, в состав которого входят ПДЛ и ИК-фотоприемник в криостатах, многоходовая аналитическая кювета (МХК) и юстировочные элементы (зеркала и линзы); 2) электронный блок управления и регистрации; 3) персональный компьютер. Излучение ПДЛ пропускается через анализируемую газовую среду, находящуюся в МХК, и затем детектируется с помощью фотоприемника. Использование МХК, в которой за счет применения специальной зеркальной оптики обеспечивается многократное прохождение лазерного луча через исследуемую среду, позволяет увеличить чувствительность анализа и минимизировать объем, занимаемый этой средой. Последнее приводит к уменьшению времени, необходимого для полной замены газовой среды в кювете, и позволяет повысить быстродействие системы. При объеме МХК около 1.2 л нами реализован оптический путь ~18 м. При прокачке газа через кювету со скоростью около 1.5 л/мин это обеспечивает смену газа в кювете за 48 с.

Поглощение в отдельных линиях СО измерялось с помощью импульснопериодического режима накачки ПДЛ, при котором исследуемый спектральный участок сканируется в течение каждого лазерного импульса за счет джоулева разогрева активной области лазерного кристалла при прохождении через него импульса тока. Частота повторения лазерных импульсов составляет ~100 Гц, длительность импульсов от 1 до 5 мс. Перестройка диодного лазера в течение импульса обеспечивает сканирование участка спектра протяженностью 4–7 см<sup>-1</sup>. Спектральное разрешение системы составляет менее  $10^{-3}$  см<sup>-1</sup>. Высокая воспроизводимость спектра генерации лазера от импульса к импульсу, достигающаяся за счет высокоточной (~10-3 К) стабилизации температуры хладопровода, на котором монтируется лазер, позволяет накапливать регистрируемые спектры и повышать чувствительность спектрального анализа за счет снижения уровня белых шумов системы. Для регистрации спектров используется специально разработанная высокоскоростная система оцифровки. Частота оцифровки спектров составляет 5 МГц, разрядность 16 бит. Связь спектральной аналитической системы с управляющим персональным компьютером осуществляется через высокоскоростной порт USB 2.0 (частота передачи информации ~400 Мегасэмплов/с). Это позволяет проводить оцифровку формы лазерных спектров поглощения с временным разрешением до 200 нс. При этом скорость регистрации лазерных спектров составляет от 100 мкс (одиночный короткий лазерный импульс без накопления) до нескольких минут (суммирование более 10000 импульсов длительностью 4 мс, 20000 точек на спектр, при частоте повторения 100 Гц). При этом высокая скорость оцифровки сигнала и обмена данными между системой регистрации и управляющим компьютером позволяет регистрировать без пропусков все лазерные импульсы в двух регистрирующих каналах одновременно. Регистрация формы лазерных импульсов с такими характеристиками позволяет осуществить качественную запись контуров линий поглощения, детектируемых с помощью ПДЛ, и их производных, что важно для достижения требуемых характеристик спектрального анализа по точности, чувствительности, селективности и быстродействию. Использование высокоскоростного протокола USB 2.0 для передачи данных в компьютер позволяет избежать потери полезной информации и увеличить быстродействие системы.

Схематика и технические параметры разработанной лазерной аналитической системы позволяют обеспечить реализацию следующей совокупности метрологических параметров, необходимых для высокоточной, высокочувствительной и высокоскоростной регистрации лазерных спектров поглощения:

- два независимых канала цифровой регистрации (измерительный и опорный);
- частота оцифровки данных в каждом канале 5 МГц;
- разрядность оцифровки 16 бит;

- обмен данными с компьютером по шине USB 2.0 со скоростью 480 Мб/с;
- неограниченные возможности накопления данных;
- встроенные алгоритмы цифровой фильтрации и корреляционной обработки; возможность обработки по специальным алгоритмам;
- работа под OC WindowsXP/Vista.

В результате достигнуты следующие основные параметры анализатора CO: чувствительность детектирования содержания CO  $\sim$ 5 ppb, точность детектирования  $\sim$ 3%, селективность детектирования  $\sim$ 100%, время измерения концентрации CO  $\sim$ 5 с, время непрерывного мониторинга не ограничено.

В данном эксперименте выбрано время измерения концентрации 8 с.

Типичная динамика концентрации СО на выходе из гермообъема показана на рис. 2. Обнаружены изменения концентрации (различия между двумя последовательными измерениями концентрации СО) с характерными временами от 8 с до сотен секунд (на временах, превышающих время смены концентрации газа в кювете). Колебания концентрации на временах порядка десятков секунд порождены шумом сигнала анализатора СО, связанным с колебаниями характеристик системы (температуры, влажности и т.д.). Поэтому они должны быть отфильтрованы (сглажены). Изменения с характерным временем порядка сотен секунд могут отражать реальное изменение концентрации газа в измерительной кювете. Вопрос о возможности фильтрации (сглаживания) этих изменений должен решаться на основе априорной информации о характере изучаемого процесса. По-видимому, в рассматриваемой задаче колебания с характерным временем порядка сотен секунд тоже должны быть сглажены. Возможными причинами появления таких колебаний могут быть дрейф пара-



**Рис. 2.** Концентрация СО, измеренная во время нахождения макаки-резус в гермообъеме, на третий день после ОО. Двухэкспоненциальная аппроксимация экспериментальных результатов из уравнения (8) обозначена жирными кривыми. Четыре кривые соответствуют четырем разным животным, указанным номерами 171, 707, 203, 206

метров анализатора и реальные колебания концентрации СО в емкости с животным, связанные с физиологическими колебаниями газообмена животного. Эти факторы практически невозможно учесть в анализе данных, поэтому для сглаживания экспериментальных данных в этой работе применена модель газообмена, основанная на представлении о постоянной вентиляции и газообмене животного, а также о полном перемешивании газов в резервуаре.

#### 3. Результаты

Кривые динамики концентрации СО на выходе из гермообъема аппроксимировали двухэкспоненциальными функциями (см. рис. 2). Причина использования двухэкспоненциальной аппроксимации экспериментальных данных объяснена в разд. 4. Далее были найдены значения продукции и потребления газов в течение последних двух минут 25-минутного периода нахождения животного в гермообъеме. В табл. 1 представлены данные газообмена, полученные в течение первого измерения газообмена за 13 дней до ОО. На рис. 3 представлено среднее нормированное выделение СО, вычисленное за последние 2 мин мониторинга СО во всех проведенных измерениях.





**Рис. 3.** Отношение выделения СО в опытной группе к выделению СО в контрольной группе, измеренным в один день

**Таблица 1.** Динамика средних величин потребления  $O_2$  и выделения  $CO_2$  и CO у обезьян объединенной выборки (контрольной и опытной групп) до и после ОО (средние величины  $\pm$  SD)

Дни	VO <sub>2</sub> , мл/мин/кг	VCO <sub>2</sub> , мл/миг/кг	VCO, наномоль/мин/кг
-13	7.65±0.83	6.17±0.68	5.18±0.29
3	6.88±0.54	5.41±0.46	4.34±0.97
18	$7.82 \pm 1.00$	5.83±1.03	3.44±0.31
28	$7.50 \pm 1.01$	$6.56 \pm 0.88$	4.07±0.34

Заметно, что выделение СО на третий день после ОО в опытной группе примерно в 1.6 раз больше, чем в контрольной группе. Выделение СО на 18 день после воздействия приблизительно одинаково в обеих группах и не отличается от значения выделения СО до воздействия. Выделение СО на 28 день после ОО в тестируемой группе приблизительно на 16% ниже, чем в контрольной группе.

Средние величины потребления кислорода и выделения углекислого газа достоверно не изменялись (статистическая значимость по парному критерию Стьюдента для связанных выборок P > 0.05), а выделение CO изменялось. В объединенной выборке средние величины выделения СО на 18 и 28 дни после облучения были ниже, чем до облучения (соответственно P = 0.023 и P == 0.034). На выделение СО влияют вариации содержания СО в атмосферном воздухе (F<sub>1</sub><sup>CO</sup>). Это одна из причин отличий скорости выделения СО животными в разные дни исследования. Оценка стандартного отклонения скорости выделения СО в объединенной выборке по критерию Фишера показала достоверное отличие отклонения на третий день после облучения от отклонения до облучения (F = 9.28, P < 0.001). Стандартные отклонения в объединенной выборке на 18 и 28 дни после облучения не отличались от отклонения до облучения (соответственно F = 1.51, P > 0.05 и F = 1.16, P > 0.05). Значительное увеличение стандартного отклонения скорости выделения СО в объединенной выборке, выявленное на третий день после облучения, предполагает наличие возмущающего воздействия, отличного от воздействия вариаций СО в атмосферном воздухе.

Статистический анализ индивидуальных величин выделения СО животными показал, что на третий день после радиационного воздействия у животных опытной группы скорость выделения СО была достоверно выше (P < 0.05), чем у животных контрольной группы. Скорость выделения в опытной группе у обезьяны 707 была в доверительном интервале от 21.5 до 22.0 нмоль/мин и у обезьяны 171 от 19.9 до 20.8 нмоль/мин, а в контрольной группе у обезьяны 203 от 14.6 до 14.8 нмоль/мин и у обезьяны 206 от 13.1 до 13.3 нмоль/мин.

На 28 день после радиационного воздействия наблюдалась обратная картина: скорость выделения СО в контрольной группе была достоверно выше (P < 0.05), чем в опытной группе. Скорость выделения СО в опытной группе у обезьяны 707 была в доверительном интервале от 17.2 до 17.5 нмоль/мин и у обезьяны 171 от 16.0 до 16.2 нмоль/мин, а в контрольной группе у обезьяны 203 от 20.1 до 20.4 нмоль/мин и у обезьяны 206 от 20.3 до 20.6 нмоль/мин.

Для выяснения связи найденных изменений содержания СО в воздухе с воздействием радиации на кровь мы провели анализ клеточного состава как красной, так и белой компонент крови обезьян.

Показатель гематокрита у контрольных животных на протяжении всего периода наблюдения (в том числе до ФО) был больше, чем в опытной группе (рис. 4). Временный ретикулоцитоз (увеличение количества ретикулоцитов), выраженный на 24 и 37 сутки, свидетельствует об активации эритропоэза (рис. 5). Различие количества ретикулоцитов у опытной группы с контролем и исходными величинами статистически достоверно только в эти сроки. Кроме



**Рис. 4.** Динамика изменений гематокрита у обезьян:  $\Phi O$  — фракционированное гамма-облучение, OO — однократное гамма-облучение. Заполнение колонок серым цветом показывает разницу между опытной и контрольной группой обезьян. Знак ошибки представляет ошибку среднего (*m*). Указана статистическая значимость различий между опытной и контрольной группами, \* — P < 0.05



**Рис. 5.** Динамика изменений ретикулоцитов у обезьян:  $\Phi O$  — фракционированное гамма-облучение, OO — однократное гамма-облучение. Заполнение колонок серым цветом показывает разницу между опытной и контрольной группой обезьян. Знак ошибки представляет ошибку среднего (*m*). Указана статистическая значимость различий между опытной и контрольной группами, \*\* — P < 0.01



**Рис. 6.** Динамика изменений числа лейкоцитов у обезьян:  $\Phi O$  — фракционированное гамма-облучение. ОО — однократное гамма-облучение. Заполнение колонок серым цветом показывает разницу между опытной и контрольной группой обезьян. Знак ошибки представляет ошибку среднего (*m*). Указана статистическая значимость различий между опытной и контрольной группами, \* — P < 0.05; \*\* — P < 0.01

радиационного фактора активация эритропоэза может быть обусловлена повышенным запросом в связи с умеренной кровопотерей, вызванной забором крови для исследований.

Таким образом, ФО вызвало однонаправленные изменения в периферической крови, обусловленные повреждением кроветворной ткани: снижение числа лейкоцитов и повышение числа ретикулоцитов.

Анализ результатов гематологических исследований после ОО выявил четкую однонаправленную реакцию со стороны как красной, так и белой компонент крови у всех облученных животных.

Наиболее выраженные цитопенические реакции имели место в лейкоцитарной компоненте крови. Содержание лейкоцитов в циркулирующей крови достоверно понизилось у всех опытных обезьян как относительно данных, полученных непосредственно перед однократным облучением, так и относительно исходного фона (рис. 6).

Максимальное падение числа лейкоцитов в опытной группе отмечено на восьмые сутки после ОО и составляло в среднем 53% от значений, полученных перед ОО. В последующие сроки наблюдения в течение двух месяцев происходила постепенная нормализация числа лейкоцитов. Однако статистически значимое различие с контрольной группой сохранялось во все сроки этого периода.

Цитопенический эффект ОО имел место и в эритроцитарной компоненте крови (см. рис. 4).

Однако в силу сравнительно длительного периода выведения эритроцитов из циркуляции эритроцитарная масса, показателем которой является величина гематокрита, заметно уменьшилась только спустя месяц после ОО. Следует отметить, что к концу реадаптационного периода после предыдущего ФО (81 сутки) гематокрит у обезьян опытной группы не отличался от исходных значений. После ОО показатель гематокрита у обезьян опытной группы был ниже исходного фона и контроля во все сроки до конца наблюдения. Различия с контрольной группой статистически достоверны на 8 и 57 сутки. Спустя 6 месяцев после ОО величина гематокрита восстановилась у обезьян опытной группы до уровня, предшествующего ОО.

По-видимому, снижение гематокрита обусловлено как увеличением катаболизма гемоглобина, так и угнетением эритроидного кроветворения и переходом его на пониженный уровень функционирования и, в результате, уменьшением костномозговой продукции эритроцитов. Это подтверждает отсутствие ретикулоцитоза в период восстановления после ОО (см. рис. 5). Таким образом, наблюдаемые цитопенические реакции в зрелом функциональном пуле клеток периферической крови после ФО в суммарной дозе 1.32 Гр были более выраженными после ОО в дозе 1.32 Гр с более длительным периодом восстановления. Отсутствие ретикулоцитоза после ОО у большинства обезьян, видимо, обусловлено угнетением эритроидного кроветворения и переходом его на пониженный уровень функционирования.

## 4. Обсуждение

Представленные данные относятся к газообмену между гермообъемом и внешним пространством. В ходе накопления газа в гермообъеме и теле животного непосредственно измеренные величины могут отличаться от реальных значений потребления/продукции газов в теле животного.

Для оценки эффекта накопления на измеренных скоростях потребления  $O_2$  и продукции CO, CO<sub>2</sub>, использована модель газообмена в емкости. Гермообъем и животное представлены как открытые системы с вентиляциями  $\dot{V}$  и  $\dot{V}_E$  соответственно.

Уравнения баланса СО в емкости и животном имеют вид

$$\frac{dM_{\rm b}^{\rm CO}}{dt} = \dot{V}_{\rm E} \Big( F_{\rm aE}^{\rm CO} - F_{\rm bE}^{\rm CO} \Big) + \dot{V} \Big( F_{\rm I}^{\rm CO} - F_{\rm bE}^{\rm CO} \Big), \tag{1}$$

$$\frac{dM_{\rm a}^{\rm CO}}{dt} = \dot{V}^{\rm CO} + \dot{V}_{\rm E} \Big( F_{\rm bE}^{\rm CO} - F_{\rm aE}^{\rm CO} \Big).$$
(2)

Здесь  $M_b^{CO}$  и  $M_a^{CO}$  — количества СО в емкости и животном;  $\dot{V}^{CO}$  — скорость продукции СО в тканях животного;  $F_1^{CO}, F_{bE}^{CO}$  — фракции СО входящего и выходящего воздуха из гермообъема;  $F_{aE}^{CO}$  — фракция СО в выдыхаемом животным воздухе.

Предполагаем, что количество СО в емкости и животном пропорционально  $F_{\rm bE}^{\rm CO}$  и  $F_{\rm aE}^{\rm CO}$  соответственно, тогда

$$M_{\rm b}^{\rm CO} = R_{\rm b}^{\rm CO} F_{\rm bE}^{\rm CO},\tag{3}$$

$$M_{\rm a}^{\rm CO} = R_{\rm a}^{\rm CO} F_{\rm aE}^{\rm CO}.$$
(4)

Параметрами в данных соотношениях являются эффективные емкости для СО резервуаров гермообъема и животного,

$$R_{\rm b}^{\rm CO} = V_{\rm b} - V_{\rm a},\tag{5}$$

$$R_{\rm a}^{\rm CO} = V_{\rm Alv} + V_{\rm T} \alpha_{\rm T}^{\rm CO} + V_{\rm bl} \alpha_{\rm bl}^{\rm CO} + \frac{N^{\rm CO} M S_{\rm Hb}^{\rm O_2}}{F^{\rm O_2}}.$$
 (6)

Уравнение (5) означает, что эффективная емкость гермообъема, подходящая для накопления СО, составляет объем гермообъема  $V_b$  минус объем животного  $V_a$ . Эквивалентная емкость животного включает накопление газа в легких, тканях и крови животного. Здесь  $V_{Alv}$  — альвеолярный объем животного,  $V_T$  — объем тканей животного,  $\alpha_T^{CO}$  — растворимость СО в тканях животного,  $V_{bl}$  — объем крови,  $\alpha_{bl}^{CO}$  — растворимость СО в крови животного,  $N^{CO}$  — емкость крови для СО, M — относительное сродство гемоглобина к окиси углерода и кислороду. В данной оценке мы предполагаем, что насыщение гемоглобина кислородом  $S_{Hb}^{O_2}$  и фракция кислорода  $F^{O_2}$  постоянны и парциальное давление СО в тканях равно парциальному давлению СО в воздухе.

Из уравнений (1)-(6) мы получаем систему в виде двух линейных дифференциальных уравнений

$$\frac{dF_{bE}^{CO}}{dt} + \frac{F_{bE}^{CO}(\dot{V} + \dot{V}_{E})}{R_{b}^{CO}} - \frac{F_{aE}^{CO}\dot{V}_{E}}{R_{b}^{CO}} = \frac{F_{I}^{CO}\dot{V}}{R_{b}^{CO}},$$

$$\frac{dF_{aE}^{CO}}{dt} + \frac{F_{aE}^{CO}\dot{V}_{E}}{R_{a}^{CO}} - \frac{F_{bE}^{CO}\dot{V}_{E}}{R_{a}^{CO}} = \frac{\dot{V}^{CO}}{R_{a}^{CO}}.$$
(7)

В уравнениях (7) мы принимаем в расчёт разность между концентрациями газа в гермообъеме и в животном в стационарном состоянии.

Теперь мы можем предположить, что во время нахождения животного в гермообъеме все параметры газообмена животного постоянны. Мы также не принимаем в расчет эффект изменения степени насыщения гемоглобина СО при изменении концентрации кислорода, т.е.  $MS_{\rm Hb}^{O_2}/F^{O_2}$  считается константой. Уравнения (7) принимают форму дифференциальных уравнений с двумя зависимыми переменными  $F_{\rm bE}^{\rm CO}$ ,  $F_{\rm aE}^{\rm CO}$  и независимой переменной *t*. Уравнения (7) имеют решение

$$F_{bE}^{CO}(t) = C_{b} + B_{l} \exp(-\beta_{l}t) + B_{2} \exp(-\beta_{2}t),$$
  

$$F_{aE}^{CO}(t) = C_{a} + A_{l} \exp(-\alpha_{1}t) + A_{2} \exp(-\alpha_{2}t),$$
(8)

где  $C_{\rm b} = F_{\rm I}^{\rm CO} + \dot{V}^{\rm CO} / \dot{V}$ . Это означает, что можно найти реальную продукцию CO по параметру  $C_{\rm b}$ .

Измерения и оценка дают следующие параметры:  $\dot{V} = 1.5$  л/мин,  $\dot{V_E} = 0.5$  л/мин,  $R_b^{CO} = 50$  л,  $F_1^{CO} = 0.5 \cdot 10^{-6}$ ,  $R_a^{CO} = 100$  л,  $\dot{V}^{CO} = 4.7 \cdot 10^{-7}$  л/мин,  $\beta_1 = 0.04$  мин<sup>-1</sup>,  $\beta_2 = 0.0034$  мин<sup>-1</sup>.

Сглаживание экспериментальных данных  $F_{\rm bE}^{\rm CO}(t)$  с помощью уравнения (8) (см. рис. 2) и для разных животных в разные дни дает параметры  $\beta_1$  от 0.01 до 0.001 л/мин и  $\beta_2$  от 0.0023 до 0.0006 л/мин со среднеквадратичным отклонением порядка или даже больше, чем значения самих величин. Необходимо сделать три замечания к аппроксимации. Во-первых, ожидали получить большое стандартное отклонение, так как регистрация данных продолжалась 25 мин, а мы искали аппроксимацию для процесса продолжительностью нескольких часов. Во-вторых, теоретическая оценка параметров модели предсказывала более быстрые процессы установления равновесия, чем в полученных нами экспериментальных величинах. Дело в том, что модель, описываемая уравнениями (1)-(6), предполагает одинаковые парциальные давления газов во всем теле животного. Она не принимает в расчет газопередачу между альвеолярным резервуаром с одной стороны и кровью/тканями с другой. В-третьих, найденное значение  $\dot{V}^{\rm CO}$  (равное средним величинам  $C_{\rm b}$ ) на третий день после облучения примерно в 1.2 раза больше у облученных обезьян опытной группы, чем у необлученных животных контрольной группы. Этот рост выделения СО облученными животными меньше, чем указанный на рис. 3, но также подтверждает рост продукции СО после облучения.

В соответствии с выражением (8) концентрация выдыхаемого СО зависит от многих параметров, включая скорость метаболической продукции СО и концентрации СО во вдыхаемом воздухе в течение нескольких часов и даже дней до эксперимента. В нашей работе обе группы обезьян находились в одной комнате за исключением времени радиационного облучения. Выделения СО в обеих группах, в контрольной и тестируемой, подвергались влиянию концентрации СО во вдыхаемом воздухе одинаково. Проанализированное отношение выделения СО в обеих группах истинно независимо от изменений содержания СО во вдыхаемом воздухе.

Поскольку было всего по два животных и в опытной группе, и в контрольной подгруппах, наша работа дает скорее подготовительные результаты. Более широкое изучение, анализ статистической достоверности результатов тема дальнейших экспериментов. Здесь мы рассматриваем структуру такого проекта на основе наших и опубликованных результатов.

В настоящее время известно, что картина клеточного опустошения в костном мозге и периферической крови в пострадиационный период определяется гибелью части пролиферирующего пула и снижением продукции клеток-предшественников. Клеточный состав крови при дозах облучения, примененных в данном эксперименте, нормализуется в течение нескольких месяцев (9–11).

Анализ проб крови контрольных и тестируемых обезьян в нашем эксперименте также показал снижение уровня гематокрита, по крайней мере на седьмой день после ОО (см. рис. 4). Мы получили рост выделения СО на третий день после ОО, но не позже (см. рис. 3). Такой результат поддерживает дальнейшие исследования вопроса о том, насколько значение выделения CO обладает прогностической ценностью как фактор снижения гематокрита и концентрации гемоглобина. Можно предположить, что если перед ОО не будет предшествующего ФО, то изменения продукции CO будут значительнее, так как не будет истощения кроветворения.

## 5. Выводы

1. С помощью разработанного лазерного СО-метра можно проводить непрерывный мониторинг выделения эндогенного СО у макак-резус в открытой системе.

2. Разработана математическая модель газообмена у животного, находящегося в вентилируемом гермообъеме. Модель описывает динамику СО в организме животного, в выдыхаемом воздухе и в воздухе, выходящем из гермообъема.

3. На основе измеренных данных и применения математической модели показано, что на третий день после острого радиационного воздействия интенсивностью 1.32 Гр увеличивается выделение СО с выдыхаемым воздухом.

4. Потребление кислорода и выделение двуокиси углерода не изменилось после данного острого радиационного облучения.

5. Установлено, что острое радиационное воздействие интенсивностью 1.32 Гр вызывает гематологические изменения у макак-резус, причем наблюдаемые изменения выделения СО предшествуют изменениям состава крови. Таким образом, мониторинг СО в ходе радиационного воздействия может использоваться для оценки воздействия радиации на систему крови.

Авторы благодарят Ю.В. Гордеева и других сотрудников Приматологического Центра ГНЦ РФ ИМБП РАН за возможность выполнения экспериментальной части работы на животных, а также А.В Демина за помощь в обработке данных.

Работа выполнена в рамках государственного контракта ГК № 16.740.11.0010 и Соглашения № 8248 Федеральной целевой программы «Научные и педагогические кадры инновационной России», а также Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» и проекта РФФИ 11-01-91163-ГФЕН а.

### ABSTRACT

The purpose of this study was a development of a noninvasive estimation technique of a biological effect of radiation exposure on living organisms by mens of a laser analysis of endogenous carbon monoxide (CO) content in exhaled air and hematological parameter study. Technique was tested in the experiment with acute radiation exposure on monkeys. A control and a test groups in gas exchange part of this study consisted of two rhesus monkeys each. The test group was exposed to 6-hour radiation with 1.32 Gy dose produced by gamma-rays. We measured the changes in endogenous CO excretion in animals with laser analyzer. For this purpose we placed monkeys into vented hermetic box. We found that CO excretion increased on the 3rd day after radiation exposure. Consumption of oxygen and excretion of carbon dioxide did not change after the exposure. Acute radiation exposure with 1.32 Gy dose induces hematological changes in peripheral blood (reduction of leukocytes and hematocrit). The observed changes in CO excretion preceded to observed changes in blood composition.

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1. *Wu L., Wang R.* Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications // Pharmacol. Rev. 2005. Vol. 57. P. 585–630.
- 2. Vreman H.J., Mahoney J.J., Stevenson D.K. Carbon monoxide and carboxyhemoglobin // Adv. Pediatrics. 1995. Vol. 42. P. 303–334.
- 3. *Тиунов Л.А., Кустов В.В.* Продукты метаболизма при радиационном поражении. М.: Атомиздат. 1980, 104 с.
- 4. Шулагин Ю.А., Степанов Е.В., Дьяченко А.И. Возможности лазерного мониторинга эндогенной окиси углерода в гермообъеме для оценки радиационного воздействия на организм во время космического полета // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2008. Т. 42, № 6(1). С. 50–53.
- Stepanov E.V., Moskalenko K.L. Gas analysis of human exhalation by tunable diode laser spectroscopy //Opt. Eng. 1992. Vol. 32, N 2. P. 361–367.
- Stepanov E.V., Zyrianov P.V., Miliaev V.A., Shulagin Y.A., Diachenko A.I. Endogenous CO monitoring in exhalation with tunable diode lasers: applications to clinical and biomedical diagnostics // Proc. SPIE. 1999. Vol. 3829. P. 77–87.
- 7. *Stepanov E.V.* Methods of highly sensitive gas analysis of molecular biomarkers in study of exhaled air // Phys. Wave Phenom. 2007. Vol. 15, N 3. P. 149–181.
- Дьяченко А.И., Зизина А.Г., Степанов Е.В., Шулагин Ю.А. Математическая модель динамики содержания эндогенной моноокиси углерода в организме человека // Препринт ИОФ РАН. 2008. № 3. 63 с.
- 9. Bond V.P., Fliedner T.M., Archambeau J.O. Mammalian Radiation Lethality. A Disturbance in Cellular Kinetics. N.Y., London: Academic Press, 1969.
- Drouet M., Delaunay C., Grenier N., Garrigou P., Mayol J.-F., Hérodin F. Cytokines in combination to treat radiation-induced myelosuppresssion: evaluation of SCF + glycosylated EPO + pegylated G-CSF as an emergency treatment in highly irradiated monkeys // Haematologica. 2008. Vol. 93, N 3. P. 465–466.
- 11. Груздев Г.П. Острый радиационный костномозговой синдром. М.: Медицина, 1988.