

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРОЛОКСА, МЕДНОГО ХЛОРОФИЛЛИНА И РИБОКСИНА ПРИ ВНУТРИБРЮШИННОМ ВВЕДЕНИИ МЫШАМ ПОСЛЕ ОСТРОГО ОБЛУЧЕНИЯ

© 2025 г. Л.А. Ромодин^{*,#}, О.В. Никитенко^{*,**}, Т.М. Бычкова^{*,**},
Е.Д. Родионова^{***}, А.А. Московский^{*,****}

^{*}Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России, ул. Живописная, 46, Москва, 123098, Россия

^{**}Государственный научный центр РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Хорошевское шоссе, 76а, Москва, 123007, Россия

^{***}Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Миусская площадь, 9, Москва, 125047, Россия

^{****}Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Каширское шоссе, 31, Москва, 115409, Россия

[#]E-mail: rla2904@mail.ru

Поступила в редакцию 16.08.2024 г.

После доработки 16.08.2024 г.

Принята к публикации 04.09.2024 г.

Изучены радиозащитные свойства медного хлорофиллина, рибоксина (инозина) и тролокса (водорастворимой формы витамина Е) после облучения аутбредных мышей самцов ICR (CD-1) SPF-категории рентгеновским излучением в дозе 6.5 Гр. Исследуемые вещества вводили мышам внутрибрюшинно через час после облучения, далее с суточными интервалами препараты были введены еще 3 раза. Объем вводимых препаратов составил 0.32 мл. Дозировки при каждом введении: тролокс – 200 мкг/г массы тела, медный хлорофиллин – 50 мкг/г или 100 мкг/г, рибоксин – 200 мкг/г. Мыши были подвергнуты эвтаназии через 4 суток после облучения. Радиозащитная эффективность оценивалась на основании 30-суточной выживаемости и на основании следующих показателей через 4 суток после облучения: массы тела, массы тимуса и селезенки, гематологических показателей (лейкоциты, лимфоциты, моноциты, гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, гемоглобин, гематокрит, тромбокрит), количества ядросодержащих клеток в костном мозге, содержания тиобарбитурат-реактивных продуктов в печени. Облучение вызвало снижение массы тимуса и селезенки, содержания лейкоцитов и тромбоцитов в крови, числа ядросодержащих клеток в костном мозге. Изучаемые вещества при использовании приведенной схемы применения не способствовали повышению указанных параметров. Облучение привело к повышению содержания тиобарбитурат-реактивных продуктов в печени мышей, что является маркером вызванного им перекисного окисления липидов. Все изучаемые вещества способствовали снижению данного критерия, кроме хлорофиллина, вводимого в дозировке 100 мкг/г (общая дозировка 400 мкг/г). Однако только в этом случае наблюдалось повышение выживаемости по сравнению с группой облученного контроля. Тролокс и рибоксин способствовали снижению содержания конечных продуктов липидной перекисидации у большинства мышей из соответствующей группы. Однако у некоторых из них данного эффекта абсолютно не наблюдалось. Применение медного хлорофиллина в используемом нами режиме приводило к появлению у мышей признаков химического отравления. Это мы объясняем проявлением им токсических свойств за счет наличия в составе его молекулы атома меди. Перспективным представляется повторение исследования с использованием производного хлорофилла, не содержащего меди.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, хлорофиллин, тролокс, рибоксин, инозин, мыши.

DOI: 10.31857/S0006302925010223, **EDN:** LTTIDN

Проблема поиска эффективного, и при том не токсичного, радиозащитного препарата продол-

жает оставаться актуальной и в настоящее время. Это связано с высокой химической токсичностью всех по-настоящему эффективных радиопротекторов [1]. Большое внимание в последнее время

Сокращение: ТБК – тиобарбитуровая кислота.

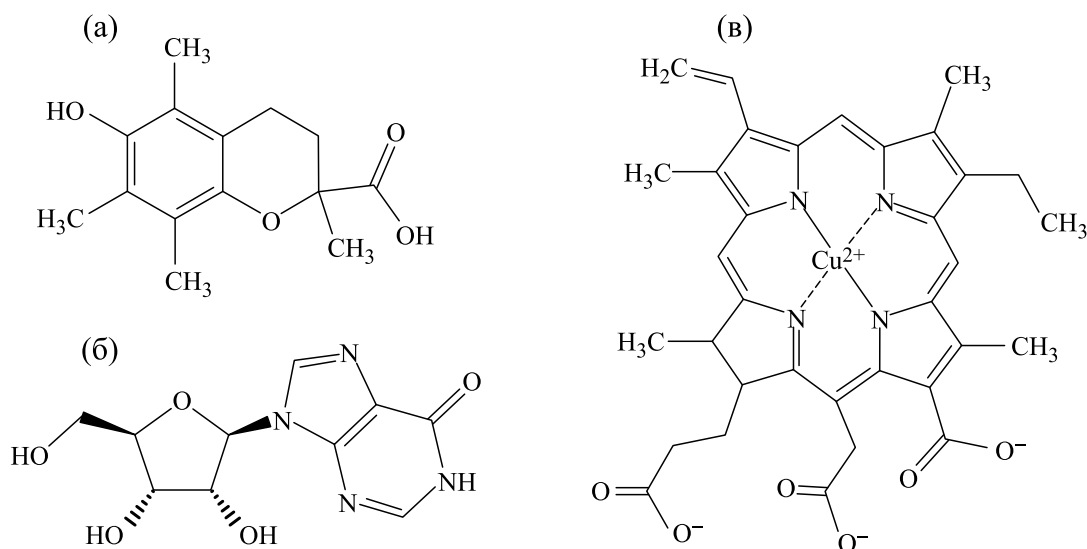


Рис. 1. Структурные формулы изучаемых веществ: (а) тролокс, (б) рибоксин (инозин), (в) медный хлорофиллин в форме хлорина e_6 .

уделяется изучению радиозащитных свойств природных соединений, чаще всего — растительного происхождения [2, 3].

В качестве примера подобных работ можно привести исследования радиозащитных свойств препаратов на основе зеленого пигмента растений хлорофилла [4–10]. При этом большее внимание уделяется не самому хлорофиллу, а водорастворимому продукту его омыления — хлорофиллину [6–10].

Рибонуклеозид, содержащий гипоксантин, — рибоксин, также называемый инозином, — можно считать веществом с признанными радиозащитными свойствами [1, 11–14]. Однако механизм его радиозащитного действия не установлен. Он может заключаться как в непосредственном антиоксидантном действии [13, 14], так и во влиянии на процессы трансляции белков, что может приводить в конечном итоге к повышению резистентности клеток [15]. По причине наличия аргументов в пользу обеих версий мы считаем, что оба механизма в конечном итоге обуславливают радиозащитные свойства рибоксина.

Говоря о радиозащитных препаратах, необходимо посвятить несколько слов их классификации и терминологии. Наиболее удачный, по нашему мнению, их вариант изложен в работах М.В. Васина [1, 11]. Собственно радиопротекторами корректно называть лишь те радиозащитные препараты, которые действуют в момент облучения, на стадии радиационно-химических реакций. Радиомитигаторы ускоряют пострadiационное восстановление тканей через активацию провоспалительных сигнальных путей и усиление секреции гемопоэтических ростовых факто-

ров. Радиомодуляторы повышают неспецифическую резистентность организма, именно к этой группе следует относить различные антиоксиданты и т.п. К трем другим группам радиозащитных препаратов относятся средства профилактики или купирования первичных реакций на облучение (противорвотные и антидиарейные препараты), сорбенты и комплексоны, связывающие радионуклиды, а также элементы-антагонисты радионуклидов, конкурирующие с ними за место в метаболических путях [1, 11].

Судя по биологическим свойствам хлорофиллина и рибоксина, их можно отнести к группе радиомодуляторов. В отличие от радиопротекторов, радиомодуляторы способны действовать и при введении после облучения.

Цель настоящей работы — сравнение радиозащитного эффекта медного хлорофиллина, рибоксина и эталонного антиоксиданта тролокса при внутрибрюшинном введении мышам-самцам линии ICR (CD-1) после их облучения рентгеновским излучением в дозе 6.5 Гр по критерию 30-суточной выживаемости и на основании ряда физиологических параметров: гематологических показателей, массы тела, массы печени, селезенки и тимуса, содержания тиобарбитурат-реактивных продуктов в печени, — через 4 суток после облучения.

Изучение эффектов тролокса, наряду с такими для хлорофиллина и рибоксина, в настоящей работе обусловлено тем, что для последних двух описаны антиоксидантные свойства [13, 14, 16–19], а тролокс является эталонным антиоксидантом, с эффектами которого часто сравнивают эффекты других антиоксидантов [20]. Структур-

ные формулы изучаемых веществ приведены на рис. 1.

В наших предыдущих работах мы исследовали на мышах радиопротекторные свойства хлорофиллина, рибоксина и тролокса. Было установлено, что фактор изменения дозы — отношения дозы ионизирующего излучения, вызывающей гибель половины облученных животных, получивших препарат, к дозе, вызывающей гибель половины не получавших его животных — для хлорофиллина, тролокса и рибоксина, вводимых мышам внутрибрюшинно в дозировке 100 мкг/г перед облучением, равен 1.1, 1.0 [21] и 1.07 [22] соответственно. То есть хлорофиллин показал более выраженные радиопротекторные свойства, чем рибоксин, являющийся признанным радиозащитным препаратом. Тролокс же вообще не проявил никакого радиопротекторного действия.

Однако даже значение фактора изменения дозы для медного хлорофиллина, равное 1.1, не является достаточным, чтобы считать вещество эффективным радиопротектором [23]. Но данные вещества могут проявлять радиозащитное действие по механизму радиомодулятора. И это актуализирует исследование их радиозащитных свойств при введении после облучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены на 150 аутбредных самцах мышей линии ICR (CD-1) SPF-категории, с исходной массой тела 33.8 ± 0.2 г. Мышей содержали по 5 или 10 особей в конвенциональных условиях в стандартных клетках, в которых мыши имели свободный доступ к брикетированному корму и воде.

Однократное кратковременное одностороннее тотальное облучение мышей осуществляли на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (Россия), мощность дозы в контейнере с мышами составляла 0.85 Гр/мин $\pm 10\%$, анодное напряжение 200 кВ, алюминиевый фильтр 1.5 мм. Доза излучения — 6.5 Гр.

Исследуемые вещества вводили мышам внутрибрюшинно через час после облучения, далее с суточными интервалами препараты были введены еще 3 раза. Объем вводимых препаратов составил 0.32 мл, препараты были растворены в 0.2% растворе уротропина (производство АО «Мосагроген», Россия). Дозировки изучаемых веществ при каждом из четырех введений составляли: для тролокса (Sigma-Aldrich, Merck, США) — 200 мкг/г, для медного хлорофиллина (Macklin, Китай) — 50 мкг/г или 100 мкг/г, для рибоксина (ОАО «Дальхимфарм», Россия) — 200 мкг/г. Мышам из группы облученного контроля мы вводили 0.2% раствор уротропина в объеме 0.32 мл.

Для оценки радиозащитной эффективности препаратов были использованы выживаемость и следующие показатели через 4 суток после облучения: масса тела, масса тимуса и селезенки, параметры крови (лейкоциты, лимфоциты, моноциты, гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, гемоглобин, гематокрит, тромбокрит), количество ядросодержащих клеток в костном мозге, содержание тиобарбитурат-реактивных продуктов в печени.

Выживаемость мышей оценивали за 30 суток после облучения. Кумулятивную выживаемость рассчитывали по Каплану—Майеру [24]. Кривые выживаемости были проанализированы log-rank тестом — сравнение выживаемости групп с учетом всего периода наблюдения. Статистически значимыми считали различия при $p(\text{log-rank test}) < 0.05$.

Массу тела животных определяли в одни и те же часы, у всех животных массу определяли индивидуально. Определение массы тимуса и селезенки проводили взвешиванием на электронных весах Adventurer AR3130 (OHAUS Corp., Швейцария) с ценой деления 1 мг. Определение форменных элементов крови проводили с помощью ветеринарного гематологического анализатора Mindray BC-2800 Vet (Китай).

Для определения тиобарбитурат-реактивных продуктов в печени мышей за основу были взяты методики В.Б. Гаврилова с соавторами [25] и С.Ю. Зайцева с соавторами [26] с внесенными нами модификациями. Исследование было проведено по следующему алгоритму.

Предварительно взвешенную печень мышей помещали в пробирку с 1 мл деионизированной воды, после чего подвергали гомогенизации при добавлении еще 9 мл деионизированной воды. Далее полученные гомогенаты интенсивно встряхивали и центрифугировали в течение 30 мин при 2000 g. 0.2 мл перемешанной надосадочной жидкости вносили в пробирки, в которые предварительно было внесено по 3 мл 2% H_3PO_4 (ООО «ЛС», Россия) и 1 мл 0.8% тиобарбитуровой кислоты (ТБК, CDH, Индия), в дополнительную референсную пробу вместо надосадочной жидкости вносили 0.2 мл деионизированной воды, данную пробу в дальнейшем использовали для обнуления значений оптической плотности при проведении спектрофотометрических измерений. Далее полученные пробы инкубировали в течение 1 ч при 95°C . После инкубации в пробы было внесено по 5 мл *n*-бутанола (АО «Экос-1», Россия), далее пробы были интенсивно перемешаны, после чего их центрифугировали при 2000 g в течение 30 мин. После центрифугирования на спектрофотометрическое исследование отбирали верхнюю, бутанольную фракцию. На спектрофотометре Cary 60 фирмы Agilent Technologies (США) были зарегистрированы спектры

Таблица 1. Действие изучаемых веществ при 4-разовом внутрибрюшинном введении после острого облучения рентгеновским излучением в дозе 6.5 Гр через 4 суток после облучения на иммуногематологические показатели самцов мышей ICR (CD-1)

№ группы	Опытная группа, разовая дозировка вводимого вещества	Число мышей в группе	Масса тела, г	Масса селезенки, мг	Масса тимуса, мг	Масса печени, мг
1	Виварный контроль	10	35.7 ± 1.1	143.1 ± 11.7	69.5 ± 6.2	2198.1 ± 127.8
2	Облученный контроль	10	33.7 ± 0.9	34.2 ± 2	15.8 ± 1.7	1950.9 ± 44
3	Хлорофиллин, 50 мкг/г	5	34.6 ± 1.8	37.2 ± 2.7	11.4 ± 0.9*,**	1985 ± 83.8
4	Хлорофиллин, 100 мкг/г	5	31.8 ± 1.3	45.8 ± 3.7*	17 ± 2.4	1905.4 ± 90.6
5	Тролокс, 200 мкг/г	10	33.1 ± 0.9	33.4 ± 1.6**	13.4 ± 1.06	1871.4 ± 58.3
6	Рибоксин, 200 мкг/г	10	33.1 ± 0.7	33 ± 1.5	14.2 ± 1.04	1831.3 ± 76.4

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm m$. * – Статистически значимая разница по сравнению с группой 2, $p \leq 0.05$; ** – статистически значимая разница по сравнению с группой 4, $p \leq 0.05$.

оптической плотности в диапазоне длин волн 500–600 нм. Содержания ТБК-реактивных продуктов в печени определяли по формуле:

$$M = \frac{8.1 + 1060 \cdot (A_{585} - A_{580})}{m},$$

где M – содержание ТБК-реактивных продуктов, нмоль/г печени, A_{535} – значение оптической плотности бутанольной фракции на длине волны 535 нм при длине оптического пути 1 см, A_{580} – значение оптической плотности бутанольной фракции на длине волны 580 нм при длине оптического пути 1 см, m – масса печени, взятой на исследование, г.

Полученные значения были разделены на среднее значение содержания ТБК-реактивных продуктов в печени в группе виварного контроля. Таким образом, данный показатель мы выражали в относительных единицах по отношению к виварному контролю.

Статистический анализ полученных результатов проводили общепринятыми методами вариационной статистики (t -критерий Стьюдента и U -критерий Манна–Уитни). Данные представлены в виде среднего значения \pm ошибка среднего ($M \pm m$). Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследовании были использованы 150 мышей: 100 мышей для оценки 30-суточной выживаемости, 50 – для изучения ряда физиологических показателей.

Эвтаназию мышей для оценки исследуемых физиологических параметров осуществляли спустя 4 суток после облучения и спустя сутки с момента последнего, четвертого, введения изучаемых веществ. Суммарные дозировки изучаемых веществ с учетом всех четырех введений составили: 800 мкг/г для тролокса и рибоксина и 200 или 400 мкг/г для медного хлорофиллина.

При вскрытии мышей соответствующей группы мы наблюдали кристаллы тролокса на брюшине. Таким образом, вводимые дозировки тролокса оказались в некотором роде избыточными: реальная усвоенная дозировка вещества на момент эвтаназии была меньше. Однако, с другой стороны, мы можем говорить о том, что поступление тролокса в организм при данных условиях эксперимента было постоянным, так как все время происходило растворение определенного количества вещества с его дальнейшим усвоением.

В табл. 1 приведены сведения о массе тела мышей в день эвтаназии, а также массе их селезенки, тимуса и печени. Облучение мышей рентгеновским излучением в дозе 6.5 Гр привело к статистически значимому снижению массы селезенки и массы тимуса во всех опытных группах по сравнению с группой виварного контроля. Ни одно из изучаемых веществ не способствовало восстановлению данных показателей у облученных животных к таковым, характерным для виварного контроля.

Мы провели гематологическое исследование, в ходе которого разницы между группами по показателям содержания эритроцитов, гемоглобина и гематокрита выявлено не было. В то же время имели место выраженные тромбоцитопения

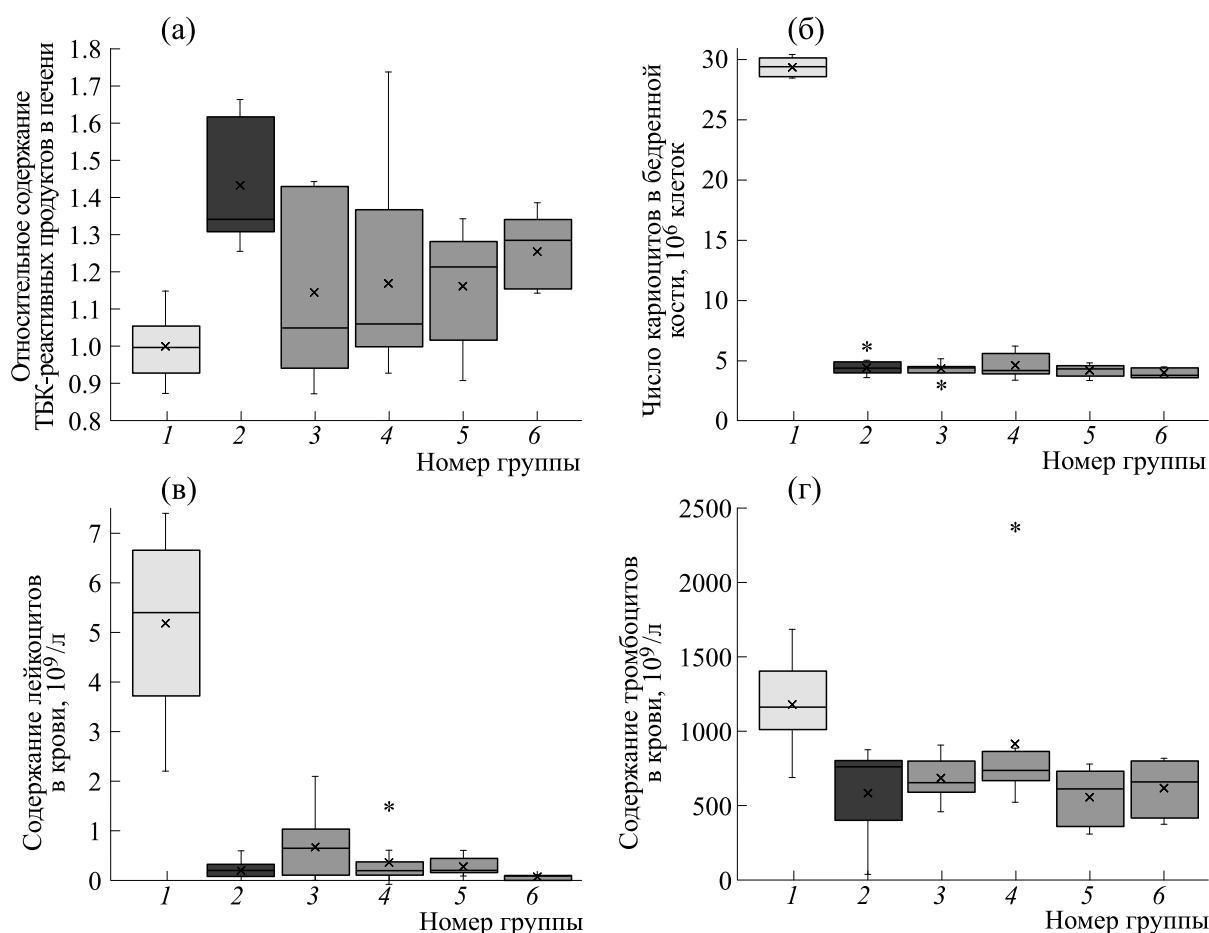


Рис. 2. Относительное содержание тиобарбитурат-реактивных продуктов в печени (а), содержание кариоцитов в бедренной кости (б), содержание лейкоцитов (в) и тромбоцитов (г) в крови мышей: 1 – виварный контроль; 2–6 – мыши, подвергнутые воздействию рентгеновского излучения в дозе 6.5 Гр: 2 – облученный контроль; 3 – введение тролокса, 200 мкг/г; 4 – введение рибоксина, 200 мкг/г; 5 – введение хлорофиллина, 50 мкг/г; 6 – введение хлорофиллина, 100 мкг/г. Препараты вводили 4 раза после облучения с суточными интервалами. Приведены показатели через 4 суток после облучения.

и лейкопения у всех животных, подвергнутых воздействию рентгеновского излучения в дозе 6.5 Гр. Эти проявления были настолько значимы, что провести анализ по содержанию конкретных популяций лейкоцитов (лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов) для многих мышей не удалось. Данные по содержанию лейкоцитов и тромбоцитов проиллюстрированы на рис. 2в и 2г соответственно.

Облучение вызвало резкое снижение числа ядросодержащих клеток в костном мозге. Мы оценивали данный показатель для бедренной кости (рис. 2б). Данный результат вполне коррелирует со снижением массы тимуса и селезенки. Собственно, гибель клеток в кроветворных органах и привела к снижению содержания лейкоцитов и тромбоцитов в крови.

Мы также оценили содержание тиобарбитурат-реактивных продуктов в печени мышей. Данные результаты представлены на рис. 2а.

Уровень ТБК-реактивных продуктов характеризует содержание конечных продуктов перекисного окисления липидов (образующих с ТБК окрашенный комплекс), главным образом – малонового диальдегида. Данный показатель характеризует силу протекания реакций перекисного окисления липидов [25, 27], и по нему можно оценивать, насколько интенсивно протекал метаболизм липидных радиотоксинов, играющий важную роль в патогенезе лучевой болезни [28].

Как видно из данных, представленных на рис. 2а, исследуемые вещества при применении после облучения способствовали снижению содержания малонового диальдегида в печени мышей, по сравнению с группой облученного контроля, через 4 суток после облучения. Однако ни одно из них не снизило данный показатель до значений, характерных для группы виварного контроля.

Таблица 2. Влияние действия изучаемых веществ на течение острого лучевого синдрома после однократного воздействия рентгеновским излучением в дозе 6.5 Гр на самцов мышей ICR (CD-1)

Группа, дозировка введенного препарата при каждом введении	Количество мышей	Выживаемость		$p(\log\text{-rank test})$		Средняя продолжительность жизни павших животных, сутки
		абс.	%			
Облученный контроль (1)	20	10	50	—		14.5 ± 0.58
Хлорофиллин 100 мкг/г (2)	10	6	60	$p_4 = 0.004$	$p_5 = 0.003$	8.5 ± 2.02
Хлорофиллин 50 мкг/г (3)	10	5	50	$p_5 = 0.001$		14.6 ± 1.75
Тролокс 200 мкг/г (4)	20	8	40			13.4 ± 0.68

Примечание. p_K — $p(\log\text{-rank test})$ по сравнению с контролем, p_n — по сравнению с указанной группой.

Анализ 30-суточной выживаемости самцов мышей после облучения рентгеновским излучением в дозе 6.5 Гр показал, что внутрибрюшинное введение хлорофиллина в дозировках 50 и 100 мкг/г массы тела, а также рибоксина или тролокса в дозировке 200 мкг/г 4 раза после облучения с суточными интервалами нельзя считать эффективным. Введение данных веществ, часто представленных в литературе как радиопротекторы, в большинстве случаев привело даже к снижению уровня 30-суточной выживаемости по сравнению с группой облученного контроля. Все мыши из группы виварного контроля оставались живыми и внешне здоровыми к концу срока наблюдения.

В табл. 2 и на рис. 3 приведены данные о динамике смертности мышей и средней продолжительности жизни умерших животных.

Если говорить о статистически значимой разнице между группами мышей, получавших различные изучаемые вещества, то хлорофиллин в дозировке 100 мкг/г обладает выраженным эффектом в сравнении с тролоксом в дозировке 200 мкг/г. Также отмечено значимое повышение выживаемости мышей, получавших хлорофиллин в дозировке 100 мкг/г и 50 мкг/г по сравнению с группой мышей, которым вводили рибоксин в дозировке 200 мкг/г (различия статистически значимы, $p < 0.05$, $\log\text{-rank test}$). Введение изучаемых препаратов не привело к статистически значимым различиям по сравнению с группой облученного контроля по показателю 30-суточной выживаемости.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируя динамику смертности мышей (рис. 3), можно заметить быструю гибель животных, получавших медный хлорофиллин в дози-

ровке 100 мкг/г массы тела. Мы это объясняем химическим отравлением данным веществом, что усугубило действие радиации в начальный период лучевой болезни. Однако в начале второй недели после облучения, когда началась массовая гибель мышей из других групп, падеж мышей, получавших до этого после облучения хлорофиллин в дозировке 100 мкг/г, прекратился. В итоге 30-суточная выживаемость мышей из данной группы оказалась самой высокой.

Таким образом, хлорофиллин показал себя в целом как классический радиопротектор, эффективная концентрация которого с точки зрения защиты от радиации оказывается опасной с точки зрения химической токсичности [29]. (В данной

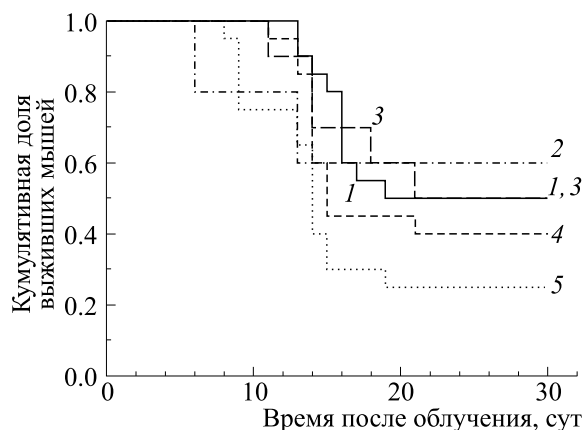


Рис. 3. Динамика выживаемости самцов мышей ICR (CD-1) по Каплану—Майеру после воздействия рентгеновского излучения в дозе 6.5 Гр. 1 — Облученный контроль; введение препаратов 4 раза после облучения с суточными интервалами (указаны разовые дозировки вводимых веществ); 2 — хлорофиллин, 100 мкг/г; 3 — хлорофиллин, 50 мкг/г; 4 — тролокс, 200 мкг/г; 5 — рибоксин, 200 мкг/г.

работе, строго говоря, мы изучали не радиопротекторные, а радиомодуляторные свойства изучаемых веществ, так как радиопротектор применяется непосредственно перед облучением [11].) Хлорофиллин в дозировке 50 мкг/г по сути никак не повлиял на смертность мышей по сравнению с группой облученного контроля.

Большое удивление вызывает повышение смертности облученных мышей на фоне применения после облучения тролокса и рибоксина. Тролокс — это эталонный антиоксидант [20], который, по идее, не должен негативно влиять на течение лучевого синдрома. Рибоксин же вообще многими авторами признается в качестве радиозащитного препарата [30, 31]. При этом сообщается именно об эффективности применения рибоксина после облучения [30]. В нашем исследовании рибоксин при использовании после облучения оказался, по сути, вредным веществом, хотя используемая дозировка в целом соответствовала используемой авторами, называемыми рибоксин радиозащитным препаратом [31]. Показанный нами эффект требует дополнительного изучения.

Анализируя данные, представленные на рис. 2 и в табл. 1, легко прийти к выводу, что при 4-разовом внутрибрюшинном введении мышам после облучения изучаемые вещества не могут нивелировать панцитопенический синдром лучевой болезни. Однако при этом наблюдается некоторое смягчение метаболизма липидных радиотоксинов.

Необходимо помнить, что помимо воздействия излучения, экспериментальные группы также подвергались и воздействию изучаемых веществ, которое не обязательно было позитивным, а также воздействию процедуры их введения. В нашем эксперименте мышам внутрибрюшинно 4 раза было введено по 0.32 мл растворов. Это достаточно много, и могло оказать на них некоторый негативный эффект. Отметим, что при вскрытии явное механическое повреждение органов, которое могло бы быть вызвано слишком большим объемом вводимого раствора, обнаружено не было.

Также вещества могут оказывать негативное воздействие за счет химической токсичности. Так, все самые эффективные радиопротекторы обладают высокой химической токсичностью. Это относится и к российскому табельному радиопротектору индралину [32], и к главному радиопротектору в странах Запада — амифостину [33]. Авторы работы [34] приводят данные о том, что вещества в разных дозировках и при разном способе введения могут как смягчать негативные последствия действия ионизирующего излучения, так и усиливать его. Авторы работы [12], изучавшие радиозащитный эффект рибоксина при

внутреннем облучении, обусловленном пероральным введением солей плутония при совместном применении с сорбентом, сообщают о том, что в данных условиях рибоксин оказывал защитный эффект лишь при пероральном введении, не проявляя такового при внутрибрюшинном. Однако механизмы, которые могли бы объяснить данный феномен, в работе [12] не приводятся.

Если верить данным о том, что LD_{50} рибоксина при внутрибрюшинном введении мышам составляет 3175 мкг/г [35], получается, что данное соединение не может проявлять явных токсических эффектов при используемом нами режиме введения. По данным на рис. 1а и 1г можно сказать, что рибоксин проявил различное действие в организме разных мышей соответствующей экспериментальной группы. Так, уровень тромбоцитов у одного облученного животного, подвергнутого воздействию рибоксина, оказался даже выше, чем у животных из группы виварного контроля. Однако необходимо учитывать, что это может быть обусловлено индивидуальными различиями, не связанными с действием рибоксина.

Весьма неоднозначным оказалось и влияние рибоксина на метаболизм липидных радиотоксинов (рис. 1а). Если смотреть на среднее медианное значение, то оно не сильно выше, чем соответствующее группе виварного контроля. Это означает, что в организме большинства мышей рибоксин существенно ингибировал радиационно-индуцированные процессы перекисного окисления липидов, но в некоторых случаях антиоксидантное действие он не проявил. В целом схожая ситуация наблюдается и при применении тролокса. Но так как по причине плохой растворимости данного вещества (как уже указывалось, при вскрытии на брюшине были обнаружены его кристаллы) мы не можем говорить о том, какая реальная дозировка вещества вступила в метаболические реакции в организме мышей, мы не можем с точностью утверждать и об эффектах вещества в организме. По данному вопросу мы с уверенностью можем сказать только то, что тролокс снизил выраженность радиационно-индуцированного окислительного стресса в тех органах, в которые он попал. Но сказать, в какие органы попало вещество, а в особенности, какова была скорость его проникновения туда, мы не можем. При этом не исключена ситуация, когда тролокс попал в орган уже после того, как в клетках данного органа произошли необратимые изменения, вызванные действием излучения. По причине низкой растворимости и вытекающей из нее низкой усвояемости тролокса в будущих исследованиях мы планируем отказаться от применения данного вещества в экспериментах на животных.

В нашей недавней работе [36] мы определили тролокс как технически нетоксичное вещество

при внутрибрюшинном введении мышам. К слову, в той же работе мы показали, что медный хлорофиллин токсичнее, чем предполагалось ранее. Широко известно, что при пероральном применении медный хлорофиллин — это практически нетоксичное соединение [37]. В паспорте безопасности данного вещества указывается, что при внутрибрюшинном введении мышам LD_{50} медного хлорофиллина составляет 7000 мкг/г массы тела. Однако мы показали, что при внутрибрюшинном введении LD_{50} медного хлорофиллина при разовом введении по критерию выживаемости мышей существенно ниже и составляет 633.0 ± 37.2 мкг/г [36].

В настоящей работе разовые дозировки медного хлорофиллина составляли 50 или 100 мкг/г. Вещество в указанных дозировках вводилось 4 раза с суточными интервалами. Таким образом, общая дозировка хлорофиллина составила 200 или 400 мкг/г. Разовое введение данного вещества в последней дозировке уже вызывало гибель некоторых животных в эксперименте по оценке острой токсичности медного хлорофиллина, единомоментно введенная дозировка, равная 200 мкг/г, гибели мышей не вызывала, но вызывала снижение массы тела, что является признаком отравления [36]. Однако необходимо помнить, что дозировка хлорофиллина в настоящем исследовании была разбита на 4 введения, а хорошая растворимость данного соединения в воде должна была способствовать его хорошему выведению из организма. Но, тем не менее, возможный токсический эффект хлорофиллина при анализе результатов настоящего исследования необходимо иметь в виду.

Если судить по физиологическим критериям (рис. 1), хлорофиллин при введении в разовой дозировке 100 мкг/г подействовал хуже, чем при введении в разовой дозировке 50 мкг/г. Но при этом, по итогу, именно первый режим применения хлорофиллина смог хоть и незначительно, но повысить 30-суточную выживаемость облученных мышей (рис. 3). Однако на фоне введений хлорофиллина в данной дозировке после облучения снижение содержания ТБК-реактивных продуктов в печени не наблюдалось. Данное снижение, хотя и менее выраженное, чем в случае применения тролокса или рибоксина, наблюдалось при применении хлорофиллина в разовой дозировке 50 мкг/г массы тела.

Показанный незначительный эффект мы связываем с токсичностью данного вещества, которая, по нашему предположению, обусловлена наличием в его составе меди, которая может запускать процессы липидной перекисидации [38, 39]. Введение атома меди в состав молекулы хлорофиллина, используемого в качестве пищевого красителя, производится с целью увеличения

срока хранения вещества за счет того, что медная форма хлорофиллина более устойчива по сравнению с магниевым или безметаллическим хлорофиллином [40]. Кроме того, медная форма хлорофиллина обладает более ярким и насыщенным зеленым цветом, что также обуславливает использование именно медного хлорофиллина в пищевой промышленности [41].

Таким образом, медный хлорофиллин мог одновременно как ингибировать липидную перекисидацию, индуцированную воздействием излучения, за счет антиоксидантных свойств порфириновой группировки, так и усиливать данный процесс за счет наличия в его составе ионов меди.

Приведенное выше предположение можно подтвердить данными авторов работы [5], которые разово вводили мышам хлорофилл, не содержащий меди, в примерной дозировке 300 мкг/г до или после облучения в дозе 5 Гр. В описываемой работе хлорофилл снижал содержание малонового диальдегида в крови и печени мышей. При этом эффект был более выражен при введении хлорофилла до облучения.

На основании этого мы считаем целесообразным проведение эксперимента, подобного представленному в настоящей работе, с использованием хлорофилла или хлорофиллина, не содержащего в своей молекуле атома меди. В данном случае, по нашему предположению, антиоксидантный эффект хлорофиллина будет выше, так как в организм не будет вводиться медь, обладающая прооксидантными свойствами, а хлорофилл и его производные способствуют интенсификации работы системы антиоксидантной защиты клетки [37].

Относительно разработки эффективной терапевтической схемы лечения лучевой болезни с использованием изученных в настоящей работе веществ целесообразным представляется их совместное применение с другими веществами с подбором наиболее оптимального способа их применения: способ введения и дозировки, сроки применения, форма лучевой болезни и др.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящей работы по изучению радиомодуляторных свойств рибоксина, вводимого мышам внутрибрюшинно в дозировке 200 мкг/г, тролокса, вводимого в дозировке 200 мкг/г, и медного хлорофиллина, вводимого в дозировке 50 или 100 мкг/г, при 4-разовом с суточными интервалами введении после острого воздействия рентгеновского излучения в дозе 6.5 Гр выраженные радиозащитные свойства, оцененные по ряду физиологических параметров через 4 суток после облучения и по параметру 30-суточной выживаемости, обнаружены не были.

Небольшое повышение выживаемости по сравнению с группой облученного контроля обеспечило только использование медного хлорофиллина в дозировке 100 мкг/г при каждом введении. Однако в данном случае имела место гибель нескольких мышей на фоне применения хлорофиллина. Данный эффект мы связываем с токсичностью вещества, обусловленной наличием в его составе атома меди. Поэтому мы считаем целесообразным проведение подобного исследования с использованием хлорофилла или его производного, молекулы которого не содержат медь.

Рибоксин и тролокс не нивелировали панци-топенический синдром лучевой болезни, однако способствовали снижению содержания ТБК-реактивных продуктов в печени большинства мышей через 4 суток после облучения. Ввиду низкой растворимости и вытекающей из нее низкой усвояемостью тролокса в будущих исследованиях мы планируем отказаться от применения данного вещества. Что же касается рибоксина, для данного соединения нам представляется целесообразным изучение его радиозащитных свойств при использовании в составе комбинированной терапевтической схемы, предполагающей использование нескольких веществ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-24-00383, <https://rscf.ru/project/23-24-00383/>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы настоящей статьи заявляют, что не имеют конфликта интересов касательно материалов, представленных в работе.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Исследование было одобрено Этическим комитетом ФГБУ ГНЦ ФМБЦ имени А.И. Бурназяна (выписка из протокола № 113 от 07.02.2024 г.) и выполнено в соответствии с Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных (International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, 1985).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Васин М. В. *Противолучевые лекарственные средства* (Книга-Мемуар, М., 2020).
- Shivappa P. and Bernhardt G. V. Natural radioprotectors on current and future perspectives: A mini-review. *J. Pharmacy Bioallied Sci.*, **14** (2), 57–71 (2022). DOI: 10.4103/jpbs.jpbs_502_21
- Raj S., Manchanda R., Bhandari M., and Alam M. S. Review on natural bioactive products as radioprotective therapeutics: present and past perspective. *Curr. Pharmaceut. Biotechnol.*, **23** (14), 1721–1738 (2022). DOI: 10.2174/1389201023666220110104645
- Поздеев А. В. и Лысенко Н. П. Повышение радиационной устойчивости организма млекопитающих при применении препаратов хлорофилла в условиях радиоактивного загрязнения окружающей среды. *Изв. Междунар. академии аграрного образования*, **42** (2), 60–62 (2018).
- Поздеев А. В. и Гугало В. П. Влияние препарата хлорофилла на содержание малонового диальдегида при радиационной патологии. *Вестн. Курской гос. с.-х. академии*, **2**, 107–109 (2012).
- Geric M., Gajski G., Mihaljevic B., Miljanic S., Domijan A. M., and Garaj-Vrhovac V. Radioprotective properties of food colorant sodium copper chlorophyllin on human peripheral blood cells *in vitro*. *Mutation Res. Genetic Toxicol. Environ. Mutagenesis*, **845**, 403027 (2019). DOI: 10.1016/j.mrgentox.2019.02.008
- Kumar S. S., Shankar B., and Sainis K. B. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes *in vitro* and *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1672** (2), 100–111 (2004). DOI: 10.1016/j.bbagen.2004.03.002
- Morales-Ramirez P. and Garcia-Rodriguez M. C. *In vivo* effect of chlorophyllin on gamma-ray-induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells. *Mutation Res.*, **320** (4), 329–334 (1994). DOI: 10.1016/0165-1218(94)90085-x
- Morales-Ramirez P. and Mendiola-Cruz M. T. *In vivo* radioprotective effect of chlorophyllin on sister chromatid exchange induction in murine spermatogonial cells. *Mutation Res.*, **344** (1–2), 73–78 (1995). DOI: 10.1016/0165-1218(95)90041-1
- Zimmering S., Olvera O., Hernandez M. E., Cruces M. P., Arceo C., and Pimental E. Evidence for a radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*. *Mutation Res.*, **245** (1), 47–49 (1990). DOI: 10.1016/0165-7992(90)90024-e
- Васин М. В. Классификация противолучевых средств как отражение современного состояния и перспективы развития радиационной фармакологии. *Радиац. биология. Радиоэкология*, **53** (5), 459–467 (2013). DOI: 10.7868/S0869803113050160
- Вернигорова Л. А., Жорова Е. С., Попов Б. А. и Парфенова И. М. Совместное профилактическое применение рибоксина и альгисорба при поступлении в желудочно-кишечный тракт крыс ^{239}Pu . *Радиац. биология. Радиоэкология*, **45** (2), 201–206 (2005).
- Gudkov S. V., Shtarkman I. N., Chernikov A. V., Usacheva A. M., and Bruskov V. I. Guanosine and inosine (riboxin) eliminate the long-lived protein radicals induced X-ray radiation. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **413** (1), 50–53 (2007). DOI: 10.1134/S1607672907020032
- Gudkov S. V., Shtarkman I. N., Smirnova V. S., Chernikov A. V., and Bruskov V. I. Guanosine and inosine as natural antioxidants and radioprotectors for mice exposed to lethal doses of γ -radiation. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **407** (1), 47–50 (2006). DOI: 10.1134/S1607672906020013

15. Srinivasan S., Torres A. G., and Ribas de Pouplana L. Inosine in biology and disease. *Genes*, **12** (4), 600 (2021). DOI: 10.3390/genes12040600
16. Ozcan M., Aydemir D., Bacanlı M., Anlar H. G., Ulusu N. N., and Aksoy Y. Protective effects of antioxidant chlorophyllin in chemically induced breast cancer model *in vivo*. *Biol. Trace Element Res.*, **199** (12), 4475–4488 (2021). DOI: 10.1007/s12011-021-02585-6
17. Perez-Galvez A., Viera I., and Roca M. Carotenoids and chlorophylls as antioxidants. *Antioxidants*, **9** (6), 505 (2020). DOI: 10.3390/antiox9060505
18. Ромодин Л. А. Угнетение хлорофиллином хемиллюминесценции, сопровождающей катализируемую комплексом цитохрома *c* с кардиолипином квазилипоксигеназную реакцию. *Изв. Саратовского ун-та. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология*, **20** (4), 427–432 (2020). DOI: 10.18500/1816-9775-2020-20-4-427-432
19. Ромодин Л. А. Хлорофиллин ингибирует липидную пероксидацию, запускаемую реакцией Фентона. *Биофизика*, **69** (1), 5–9 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924010013
20. Зерний Е. Ю., Головастова М. О., Бакшеева В. Е., Кабанова Е. И., Ишутина И. Е., Ганчарова О. С., Гусев А. Е., Савченко М. С., Лобода А. П., Сотникова Л. Ф., Замятнин А. А., Филиппов П. П. и Сенин И. И. Изменения биохимических свойств слезной жидкости при развитии хронической формы синдрома сухого глаза в посленаркозный период. *Биохимия*, **82** (1), 137–148 (2017).
21. Ромодин Л. А., Никитенко О. В., Бычкова Т. М., Зрилова Ю. А., Родионова Е. Д. и Бочаров Д. А. Сравнительная оценка радиопротекторных свойств медного хлорофиллина, тролокса и индралина в эксперименте на мышах. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **177** (3), 316–321 (2024). DOI: 10.47056/0365-9615-2024-177-3-316-321
22. Ромодин Л. А., Никитенко О. В., Бычкова Т. М., Зрилова Ю. А., Родионова Е. Д. и Бочаров Д. А. Сравнение радиопротекторных свойств рибоксина (инозина) и индралина при профилактическом введении в дозировках 100 мг/кг по критерию выживаемости облученных мышей. *Мед. радиология и радиац. безопасность*, **69** (2), 18–23 (2024). DOI: 10.33266/1024-6177-2024-69-2-18-23
23. Легеза В. И., Ушаков И. Б., Гребенюк А. Н. и Антушевич А. Е. *Радиобиология, радиационная физиология и медицина: словарь-справочник. 3-е изд., испр. и доп.* (Фолиант, СПб., 2017).
24. Kaplan E. L. and Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, **53** (282), 457–481 (1958). DOI: 10.1080/01621459.1958.10501452
25. Гаврилов В. Б., Гаврилова А. Р. и Магуль Л. М. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой. *Вопросы медицинской химии*, **33** (1), 118–122 (1987).
26. Zaitsev S., Mishurov A., and Bogolyubova N. Comparative study of the antioxidant protection level in the Duroc boar blood based on the measurements of active products of the thiobarbituric acid. In: *Fundamental and Applied Scientific Research in the Development of Agriculture in the Far East (AFE-2021)*, Ed. by A. Muratov and S. Ignateva (Lecture Notes in Networks and Systems, Springer, 2021), v. 354, pp. 500–506. DOI: 10.1007/978-3-030-91405-9_55
27. Камышников В. С. *Справочник по клинко-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике: 3-е издание* (МЕДпрессинформ, М., 2009).
28. Кузин А. М. *Структурно-метаболическая теория в радиобиологии* (Наука, М., 1986).
29. Рождественский Л. М. Проблемы разработки отечественных противолучевых средств в кризисный период: поиск актуальных направлений развития. *Радиация. биология. Радиоэкология*, **60** (3), 279–290 (2020). DOI: 10.31857/S086980312003011X
30. Попова Н. Р., Гудков С. В. и Брусков В. И. Природные пуриновые соединения как радиозащитные средства. *Радиация. биология. Радиоэкология*, **54** (1), 38–49 (2014). DOI: 10.7868/S0869803114010135
31. Сычёва Л. П., Лисина Н. И., Щеголева Р. А. и Рождественский Л. М. Антимутagenное действие противолучевых препаратов в эксперименте на мышах. *Радиация. биология. Радиоэкология*, **59** (4), 388–393 (2019). DOI: 10.1134/S086980311904012X
32. Ильин Л. А., Рудный Н. М., Суворов Н. Н., Чернов Г. А., Антипов В. В., Васин М. В., Давыдов Б. И. и Михайлов П. П. *Индралин – радиопротектор экстренного действия. Противолучевые свойства, фармакология, механизм действия, клиника* (Вторая типография Министерства здравоохранения Российской Федерации, М., 1994).
33. Kuna P., Dostal M., Neruda O., Knajfl J., Petyrek P., Podzimek P., Severa J., Svoboda V., Šimša J., Špelda S., Vavrova J., Heřmanská J., Prouza Z., Pitterman P., Listík E., Navrátil L., Spurný F., Konrad F., Vilasova Z., and Havrankova R. Acute toxicity and radioprotective effects of amifostine (WR-2721) or cystamine in single whole body fission neutrons irradiated rats. *J. Appl. Biomed.*, **2**, 43–49 (2004).
34. Петин В. Г., Дергачева И. П. и Жураковская Г. П. Комбинированное биологическое действие ионизирующих излучений и других вредных факторов окружающей среды. *Радиация и риск (Бюл. нац. радиац.-эпидемиол. регистра)*, **12**, 117–134 (2001).
35. Eliseev V. V. and Marikhina B. L. Comparative study of antihypoxic properties of some nucleosides and nucleotides. *Pharmaceut. Chem. J.*, **20**, 160–162 (1986). DOI: 10.1007/BF00758559
36. Ромодин Л. А., Никитенко О. В., Бычкова Т. М., Зрилова Ю. А., Родионова Е. Д. и Бочаров Д. А. Оценка острой токсичности хлорофиллина и тролокса для возможности изучения их радиопротекторных свойств. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **177** (1), 53–56 (2024). DOI: 10.47056/0365-9615-2024-177-1-53-56
37. Hayes M. and Ferruzzi M. G. Update on the bioavailability and chemopreventative mechanisms of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Res.*, **81**, 19–37 (2020). DOI: 10.1016/j.nutres.2020.06.010
38. Фадеева Ю. И., Слободскова В. В., Кавун В. Я. и Челомин В. П. Влияние наночастиц оксида меди (II) и иона Си на образование продуктов перекисного окисления липидов в жабрах мидии Грея *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) (Bivalvia: Mytilidae) в условиях лабораторного эксперимента. *Вестн. Моск. гос. обл.*

- ун-та. Серия: Естественные науки, **3**, 74–83 (2016). DOI: 10.18384/2310-7189-2016-3-74-83
39. Li R., Tao J., Huang D., Zhou W., Gao L., Wang X., Chen H., and Huang H. Investigating the effects of biodegradable microplastics and copper ions on probiotic (*Bacillus amyloliquefaciens*): Toxicity and application. *J. Hazardous Mater.*, **443** (Pt A), 130081 (2023). DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.130081
40. Березин Б. Д., Румянцева С. В., Морыганов А. П. и Березин М. Б. Химические превращения хлорофилла и его использование для создания экологически чистых красителей нового поколения. *Успехи химии*, **73** (2), 197–207 (2004).
41. Савченкова Е. Цвета, созданные природой. *Молочная промышленность*, **9**, 52–54 (2019).

Evaluation of the Effectiveness of Trolox, Copper Chlorophyllin and Riboxin when Administered Intraperitoneally to Mice after Acute Irradiation

L.A. Romodin*, O.V. Nikitenko*, **, T.M. Bychkova*, **, E.D. Rodionova***, and A.A. Moskovskij*, ****

*State Scientific Center of the Russian Federation – Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan, FMBA of Russia, Zhivopisnaya ul. 46, Moscow, 123098 Russia

**SSC RF Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoye shosse 76a, Moscow, 123007 Russia

***D.I. Mendeleev Russian University of Chemical Technology, Miusskaya pl. 9, Moscow, 125047 Russia

****National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Kashirskoe shosse 31, Moscow, 115409 Russia

The radioprotective properties of copper chlorophyllin, riboxin (inosine) and trolox (a water-soluble form of vitamin E) were studied after irradiation of outbred male mice of the ICR (CD-1) SPF category with X-ray radiation at a dose of 6.5 Gy. The test substances were administered intraperitoneally to mice an hour after irradiation, then the drugs were administered 3 more times at daily intervals. The volume of administered drugs was 0.32 ml. Dosages for each administration: trolox – 200 µg/g body weight, copper chlorophyllin – 50 or 100 µg/g, riboxin – 200 µg/g. Mice were euthanized 4 days after irradiation. Radioprotective efficacy was assessed based on 30-day survival and on the basis of the following indicators 4 days after irradiation: body weight, weight of the thymus and spleen, hematological indicators (leukocytes, lymphocytes, monocytes, granulocytes, erythrocytes, platelets, hemoglobin, hematocrit, thrombocrit), the number of nucleated cells in the bone marrow, the content of thiobarbiturate-reactive products in the liver. Irradiation caused a decrease in the mass of the thymus and spleen, the content of leukocytes and platelets in the blood, and the number of nucleated cells in the bone marrow. The studied substances, when using the given application scheme, did not contribute to an increase in these parameters. Irradiation led to an increase in the content of thiobarbiturate-reactive products in the liver of mice, which is a marker of lipid peroxidation caused by it. All studied substances contributed to a decrease in this criterion, except for chlorophyllin, administered at a dosage of 100 µg/g (total dosage 400 µg/g). However, only in this case was there an increase in survival compared to the irradiated control group. Trolox and riboxin contributed to a decrease in the content of end products of lipid peroxidation in the majority of mice from the corresponding group. However, in some of them this effect was not observed at all. The use of copper chlorophyllin in the regimen we used led to the appearance of signs of chemical poisoning in mice. We explain this by its manifestation of toxic properties due to the presence of a copper atom in its molecule. It seems promising to repeat the study using a chlorophyll derivative that does not contain copper.

Keywords: ionizing radiation, chlorophyllin, trolox, riboxin, inosine, mice