

А.Н. Гребенюк, В.А. Башарин, Р.А. Тарумов,  
В.Ю. Ковтун, А.А. Антушевич

## Сравнительное изучение эффективности генистеина, мексидола, литана и цитохрома С как средств профилактики и ранней терапии радиационных поражений

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

**Резюме.** Представлена сравнительная оценка радиозащитной эффективности антиоксидантов – генистеина, мексидола, литана и цитохрома С, по показателям 30-суточной выживаемости мышей при остром рентгеновском облучении. Все препараты вводили внутривенно: генистеин в дозе 200 мг/кг, мексидол в дозе 5 мг/кг, литан в дозе 30 мг/кг, цитохром С в дозе 10 мг/кг. Установлено, что при профилактическом введении за 1 ч до облучения наибольшую радиозащитную эффективность продемонстрировал генистеин, фактор изменения дозы которого составил  $1,48 \pm 0,19$ . При однократном терапевтическом использовании через 1 ч после радиационного воздействия все изученные препараты повышали выживаемость облученных животных, но фактор изменения дозы не превышал  $1,20 \pm 0,13$ . В условиях курсового введения в течение 5 сут. после облучения наиболее выраженная противолучевая активность зарегистрирована у мексидола (фактор изменения дозы составил  $1,30 \pm 0,14$ ).

**Ключевые слова:** облучение, радиационные поражения, профилактика, лечение, генистеин, мексидол, литан, цитохром С, выживаемость, мыши.

**Введение.** Несмотря на разработку многочисленных лекарственных препаратов и биологически активных добавок для профилактики и лечения различных форм радиационных поражений, проблема поиска новых фармакологических средств противорадиационной защиты человека по-прежнему остается актуальной [3, 17]. Связано это, с одной стороны, с постоянным расширением контактов людей с источниками ионизирующих излучений, что неминуемо приводит к повышенному радиационному воздействию на человека участвовавшими в последнее время аварийными ситуациями на объектах атомной энергетики, а также перспективами длительных пилотируемых космических полетов, в ходе которых риск переоблучения организма существенно возрастает. С другой стороны, существующие радиозащитные препараты не всегда в состоянии обеспечить защиту организма в условиях воздействия широкого диапазона доз радиации при пролонгированных и фракционированных вариантах облучения. Кроме того, применение радиопротекторов часто ограничивается вследствие их высокой токсичности, выраженных побочных эффектов и короткого срока действия.

В связи с этим до настоящего времени продолжают работы по созданию радиозащитных препаратов, в равной степени эффективных, безопасных и удобных в применении [13]. Еще одним требованием к разрабатываемым средствам является возможность их применения как до, так и после радиационного воздействия. Желательно также, чтобы созданный радиозащитный препарат мог найти применение и в обычной медицинской практике, т.е. имел бы двойное назначение.

Среди широкого спектра изученных химических соединений перечисленным требованиям, наряду с достаточно высокой радиозащитной эффективностью, обладают антиоксиданты – вещества, в малых концентрациях тормозящие процессы окисления органических соединений кислородом в модельных системах по различным механизмам [16]. В настоящее время разработано большое количество препаратов, обладающих свойствами антиоксидантов. Эти препараты малотоксичны, безопасны в применении, широко используются в клинической практике для лечения множественных заболеваний. Учитывая тот факт, что в патогенезе радиационных поражений ведущую роль играет оксидантный стресс, проявляющийся в резком усилении продукции активных кислородных метаболитов, инициации процессов перекисного окисления липидов, с одной стороны, и снижении активности различных компонентов антиоксидантной системы с другой, использование антиоксидантов в качестве радиозащитных препаратов представляется обоснованным [12, 16].

**Цель исследования.** Сравнительная оценка радиозащитной эффективности отечественных препаратов антиоксидантов – генистеина, мексидола, цитохрома С и литана, по показателям 30-суточной выживаемости мышей после острого внешнего облучения.

**Материалы и методы.** Экспериментальные исследования выполнены на самцах 504 белых беспородных мышей, полученных из питомника Россий-

ской академии медицинских наук «Рапполово» (пос. Рапполово Ленинградской обл.).

Животных содержали в условиях вивария, не более 12 особей в одной клетке. Кормление животных осуществлялось 1 раз в сут. с 10.00 до 13.00 ч, доступ к стандартному гранулированному корму и воде у животных был постоянно. При проведении исследования выполняли требования нормативно-правовых актов о порядке экспериментальной работы с использованием животных, в том числе по гуманному отношению к ним [7]. По завершении эксперимента эвтаназия животных осуществлялась в соответствии с Федеральным Законом Российской Федерации «О защите животных от жестокого обращения» [5].

В качестве изучаемых противолучевых средств в работе использовали отечественные препараты, обладающие выраженной антиоксидантной активностью: генистеин (Научно-производственный центр «Фармзащита» Федерального медико-биологического агентства России), мексидол («Научно-производственная компания «Фармасофт»), литан (Закрытое акционерное общество «ВАМ»), цитохром С (Общество с ограниченной ответственностью «Самсон-Мед»). Все изучаемые антиоксиданты вводили внутривенно в объеме 0,1 мл/10 г веса животного: генистеин в дозе 200 мг/кг, мексидол в дозе 5 мг/кг, литан в дозе 30 мг/кг и цитохром С в дозе 10 мг/кг. В качестве растворителя для мексидола, литана и цитохрома С использовали физиологический раствор, для генистеина – 50% раствор диметилсульфоксида (ДМСО) (генистеин растворяли в 100 % растворе ДМСО, а затем добавляли равный ему объем физиологического раствора). Препараты вводили однократно за 1 ч до облучения или через 1 ч после облучения, а также курсом из 5 инъекций – один раз в день в течение 5 сут. после воздействия радиации.

Мышей подвергали общему равномерному рентгеновскому облучению на установке «РУМ-17» при напряжении 180 кВ, силе тока 10 мА, фильтре 0,5 мм Cu + 1,0 мм Al, при направлении облучения спина – грудь, кожно-фокусном расстоянии 50 см, мощности экспозиционной дозы 0,206 мА/кг (38,2 Р/мин). Дозиметрический контроль проводили с помощью индивидуального дозиметра «ИД-11» с последующей оценкой показаний прибора на аппарате «ГО-32».

Радиозащитную эффективность препаратов оценивали путём изучения 30-суточной выживаемости и средней продолжительности жизни (СПЖ) погибших от облучения мышей и расчета фактора изменения дозы (ФИД), представляющего собой отношение дозы излучения, вызывающей гибель половины получивших препарат особей, к дозе того же излучения, смертельной для половины особей незащищенной (контрольной) группы.

Полученные данные подвергали стандартной статистической обработке с вычислением среднего значения показателя и его ошибки. Средняя величина относительных показателей (выживаемости) и её ошибка определялись с помощью таблиц процентов и их ошибок В.С. Генеса [2]. Достоверность различий

средних значений показателей выживаемости оценивали с использованием точного метода Фишера, показателей средней продолжительности жизни погибших от облучения животных – по t-критерию Стьюдента. Вероятность ошибки  $p \leq 0,05$  считали достаточной для вывода о статистической значимости различий полученных данных. Величину ФИД рассчитывали методом пробит-анализа по Финни.

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что изучаемые антиоксиданты в различной степени защищали облученных в дозах СД50-100/30 мышей от лучевой гибели, а выраженность их радиозащитного эффекта зависела от схемы введения препаратов. Так, при профилактическом применении за 1 ч до облучения наиболее выраженным радиозащитным действием обладал генистеин. Его введение в дозе 200 мг/кг позволяло увеличить выживаемость облученных в дозе 7 Гр мышей на 40%, в дозе 8 Гр – на 46% ( $p \leq 0,05$ ), в дозе 9 Гр – на 58% ( $p \leq 0,05$ ), таблица 1. Расчетное значение ФИД для генистеина при введении за 1 ч до облучения составило  $1,48 \pm 0,19$ . При облучении в дозе 9 Гр генистеин почти на двое суток ( $p \leq 0,05$ ) увеличивал среднюю продолжительность жизни погибших от облучения животных.

Применение мексидола, литана или цитохрома С за 1 ч до облучения в дозах СД50-100/30 способствовало незначительному повышению выживаемости мышей и не оказывало существенного влияния на среднюю продолжительность жизни погибших от облучения животных опытных групп (см. табл. 1). При данной схеме введения изучаемых препаратов расчетное значение ФИД составило: для мексидола  $1,17 \pm 0,13$ , для литана –  $1,12 \pm 0,10$ , для цитохрома С –  $1,07 \pm 0,07$ .

На следующем этапе оценивали эффективность изучаемых антиоксидантов при их использовании в качестве средств ранней (экстренной) терапии радиационных поражений. Установлено, что при однократном введении через 1 ч после облучения все изучаемые препараты способствовали повышению выживаемости облученных в дозах СД<sub>50-100/30</sub> животных в среднем на 15–25%, однако статистически значимых отличий от контроля не выявлено (табл. 2). Рассчитанная по показателям выживаемости величина ФИД при однократном раннем терапевтическом использовании генистеина составила  $1,17 \pm 0,12$ , мексидола –  $1,20 \pm 0,13$ , литана –  $1,10 \pm 0,09$ , цитохрома С –  $1,13 \pm 0,10$ . При этом изучаемые антиоксиданты практически не влияли на среднюю продолжительность жизни погибших от облучения мышей и только генистеин при облучении в дозе 9 Гр повышал СПЖ почти на трое суток ( $p \leq 0,05$ ).

Результаты изучения эффективности курсового (ежедневные однократные инъекции препаратов в течение 5 сут. после облучения, начиная через 24 ч после радиационного воздействия) применения изучаемых антиоксидантов в качестве средств терапии радиационных поражений представлены в таблице 3.

Выявлено, что в условиях ежедневного введения в течение 5 сут. после острого облучения в дозах

Таблица 1

**Влияние профилактического (за 1 ч до облучения) введения генистеина, мексидола, литана и цитохрома С на выживаемость и среднюю продолжительность жизни белых беспородных мышей-самцов, подвергнутых острому рентгеновскому облучению,  $M \pm m_x$**

Условия эксперимента	Доза облучения, Гр	Количество выживших животных / общее количество животных в группе	Выживаемость, %	СПЖ, сут
Облучение (контроль)	6,5	6/10	60±16	10,25±1,37
	7	5/10	50±17	14,00±2,73
	7,5	5/11	45±16	13,00±2,01
	8	3/11	27±14	11,12±1,05
	8,5	2/12	17±11	6,60±0,77
	9	0/12	0+8	6,91±0,59
Генистеин + облучение	7	9/10	90±10	17,00
	8	8/11	73±14#	14,00±3,00
	9	7/12	58±15#	8,80±0,58*
Мексидол + облучение	7	6/10	60±16	12,50±0,64
	8	4/11	36±15	11,37±0,98
	9	1/12	8±8	8,63±0,69
Литан + облучение	7	5/10	50±17	9,00±1,09
	8	3/11	27±14	10,00±0,59
	9	0/12	0±8	8,45±0,74
Цитохром С + облучение	7	5/10	50±17	11,20±1,57
	8	3/11	27±14	10,00±1,14
	9	1/12	8±8	8,63±0,69

**Примечание:** # – различие с группой «облучение» по точному критерию Фишера; \* – по t-критерию Стьюдента,  $p \leq 0,05$ .

Таблица 2

**Влияние лечебного (через 1 ч после облучения) введения генистеина, мексидола, литана и цитохрома С на выживаемость и среднюю продолжительность жизни белых беспородных мышей-самцов, подвергнутых острому рентгеновскому облучению,  $M \pm m_x$**

Условия эксперимента	Доза облучения, Гр	Количество выживших животных / общее количество животных в группе	Выживаемость, %	СПЖ, сут
Облучение (контроль)	6,5	6/10	60±16	10,25±1,37
	7	5/10	50±17	14,00±2,73
	7,5	5/11	45±16	13,00±2,01
	8	3/11	27±14	11,12±1,05
	8,5	2/12	17±11	6,60±0,77
	9	0/12	0+8	6,91±0,59
Генистеин + облучение	7	6/10	60±16	12,75±0,75
	8	4/11	36±15	8,85±0,91
	9	2/12	17±11	9,70±0,49*
Мексидол + облучение	7	7/10	70±15	13,66±0,88
	8	6/11	55±16	11,80±1,98
	9	1/12	8±8	9,27±1,17
Литан + облучение	7	7/10	70±15	9,66±2,84
	8	4/11	36±15	11,00±0,65
	9	1/12	8±8	7,70±0,77
Цитохром С + облучение	7	7/10	70±15	13,66±0,88
	8	6/11	55±16	11,00±2,34
	9	2/12	17±11	8,80±0,71

**Примечание:** \* – различие с группой «облучение» по t-критерию Стьюдента,  $p \leq 0,05$ .

СД<sub>50-100/30</sub> наиболее выраженную противолучевую активность продемонстрировал мексидол. Использование этого препарата сопровождалось повышением выживаемости облученных в дозе 7 Гр животных на 40% ( $p \leq 0,05$ ), в дозе 8 Гр – на 28%, в дозе 9 Гр – на 33% ( $p \leq 0,05$ ). Кроме того, курсовое применение мексидола позволило почти в 2 раза ( $p \leq 0,05$ ) увеличить среднюю продолжительность жизни облученных в дозе 9 Гр мышей. Расчетное значение ФИД мексидола при данной схеме его использования для лечения острой лучевой болезни составило  $1,30 \pm 0,14$ .

Курсовое введение генистеина, литана и цитохрома С в течение 5 сут. после радиационного воздействия также позволило защитить часть мышей, подвергнутых действию рентгеновского излучения, от лучевой гибели. Величина ФИД этих препаратов при терапевтическом применении составила: для генистеина –  $1,08 \pm 0,07$ , для литана –  $1,18 \pm 0,11$ , для цитохрома С –  $1,19 \pm 0,12$ . При этом литан более чем на трое суток ( $p \leq 0,05$ ) увеличивал среднюю продолжительность жизни животных, погибших после облучения в дозе 9 Гр.

В большинстве случаев как профилактическое, так и лечебное применение изучаемых антиоксидантов не оказывало существенного влияния на среднюю продолжительность жизни животных, погибших от рентгеновского излучения (см. табл. 1–3). Основная часть мышей опытных и контрольных групп погибала на 8–14-е сутки после облучения, что соответствует типичным срокам гибели мелких лабораторных животных при костномозговой форме острой лучевой болезни.

Таким образом, в условиях острого воздействия рентгеновского излучения в дозах СД<sub>50-100/30</sub> все изучаемые антиоксидантные препараты проявляли противолучевое действие при применении как до, так и после облучения. При профилактическом ведении за 1 ч до радиационного воздействия наибольшую радиозащитную эффективность продемонстрировал генистеин – фитоэстроген, способный ингибировать тирозинкиназу – изофлавоноида, выделенного из сои, были показаны ранее [9, 10, 14]. Обнаружено, что и синтетический аналог этого природного антиоксиданта также обладает выраженными противолучевыми свойствами. Механизм радиозащитного действия генистеина связывают с его способностью предотвращать переход гемопоэтических клеток в радиочувствительную G<sub>2</sub>/M фазу клеточного цикла и стимулировать гемопоэз посредством индукции целого ряда цитокинов, что в конечном итоге и приводит к повышению выживаемости облученных животных [8, 13, 17].

При использовании в качестве средств экстренной терапии радиационных поражений (однократное введение через 1 ч после облучения) все изученные антиоксидантные препараты практически в равной степени хоть и незначительно, но повышали выживаемость облученных животных. Более эффективно было их курсовое применение в течение 5 сут. после облучения, при этом самая выраженная противолучевая активность зарегистрирована у мексидола. Показано, что антиоксиданты способны снижать выраженность поражающего действия радиации путем предотвращения оксидантного стресса

Таблица 3

**Влияние лечебного (в течение 5 сут. после облучения) введения генистеина, мексидола, литана и цитохрома С на выживаемость и среднюю продолжительность жизни белых беспородных мышей-самцов, подвергнутых острому рентгеновскому облучению,  $M \pm m_x$**

Условия эксперимента	Доза облучения, Гр	Количество выживших животных / общее количество животных в группе	Выживаемость, %	СПЖ, сут
Облучение (контроль)	6,5	6/10	60±16	10,25±1,37
	7	5/10	50±17	14,00±2,73
	7,5	5/11	45±16	13,00±2,01
	8	3/11	27±14	11,12±1,05
	8,5	2/12	17±11	6,60±0,77
	9	0/12	0+8	6,91±0,59
Генистеин + облучение	7	4/10	40±16	7,60±0,60
	8	4/11	36±15	11,0±0,84
	9	0/12	0+8	8,00±0,69
Мексидол + облучение	7	9/10	90±10#	11,00
	8	6/11	55±16	9,20±1,15
	9	4/12	33±15#	13,50±1,38*
Литан + облучение	7	6/10	60±16	9,52±0,54
	8	4/11	36±15	11,71±1,22
	9	1/12	8±8	10,30±0,94*
Цитохром С + облучение	7	8/10	80±13	11,50±0,50
	8	4/11	36±15	11,42±1,04
	9	1/12	8±8	7,45±0,69

**Примечание:** # – различие с группой «облучение» по точному критерию Фишера; \* – по t-критерию Стьюдента,  $p \leq 0,05$ .

(в т.ч. за счет перехвата свободных радикалов, образующихся в процессе радиационно-индуцированного свободно-радикального окисления), блокады апоптоза, повышения эффективности постлучевой репарации дезоксирибонуклеиновой кислоты и др. [15]. Механизм лечебного действия мексидола и литана также может быть связан с их способностью увеличивать пролиферативную активность клеток костного мозга и стимулировать выработку колониестимулирующих факторов [1, 4]. Эти эффекты в дальнейшем реализуются в ускорении восстановления нарушенного после облучения гемопоеза, вследствие чего и повышается выживаемость облученных животных.

### Выводы

1. Отечественные антиоксидантные препараты генистеин, мексидол, литан и цитохром С могут рассматриваться в качестве перспективных средств профилактики и терапии острых радиационных поражений.

2. Наиболее выраженным радиопротекторным эффектом при остром облучении мышей обладает генистеин: при внутрибрюшинном введении в дозе 200 мг/кг за 1 ч до воздействия рентгеновского излучения в дозах  $СД_{50-100/30}$  расчетное значение ФИД для этого препарата составило  $1,48 \pm 0,19$ .

3. При однократном лечебном применении через 1 ч после острого радиационного воздействия изученные антиоксидантные препараты незначительно (на 15–25%) увеличивали выживаемость облученных мышей и не влияли на среднюю продолжительность жизни погибших животных.

4. В условиях курсового применения в течение первых 5 сут. после облучения, наиболее выраженная лечебная эффективность зарегистрирована у мексидола: значение ФИД мексидола при его введении в суточной дозе 5 мг/кг составило  $1,30 \pm 0,14$ .

### Литература

1. Антушевич, А.А. Гемостимулирующая активность литиевой соли окисленного глутатиона при гемодепрессиях радиационного и химического генеза / А.А. Антушевич, А.Е. Антушевич, А.Н. Гребенюк // Актуальные проблемы токсикологии и радиобиологии: тезисы докл. Росс. науч. конф. с междунар. участием. – СПб.: Фолиант, 2011. – С. 215.

2. Генес, В.С. Некоторые простые методы кибернетической обработки данных диагностических и физиологических исследований / В.С. Генес. – М.: Наука, 1967. – 190 с.
3. Гребенюк, А.Н. Радиационные аварии: опыт медицинской защиты и современная стратегия фармакологического обеспечения / А.Н. Гребенюк, В.И. Легеза, В.В. Зацепин // Радиационная гигиена. – 2012. – Т. 5, № 3. – С. 53–57.
4. Мороз, Б.Б. Влияние мексидола на пострадиационное восстановление кроветворной системы / Б.Б. Мороз [и др.] // Радиационная биология. Радиозоология. – 2009. – Т. 49, № 1. – С. 90–96.
5. Федеральный Закон Российской Федерации «О защите животных от жестокого обращения». – М., 1999. – 35 с.
6. Хельсинкская декларация. Всемирная медицинская ассоциация. – М., 2001. – 52 с.
7. Bhata, A.L. Radiation protection by an isoflavone genistein: a study on the survivability of mice / A.L. Bhata [et al.] // Nucl. technol. radiat. protection. – 2007. – № 1. – P. 34–39.
8. Davis, T.A. Subcutaneous administration of genistein prior to lethal irradiation supports multilineage, hematopoietic progenitor cell recovery and survival / T.A. Davis [et al.] // Int. j. radiat. biol. – 2007. – Vol. 83. – P. 141–151.
9. Landauer, M.R. Genistein treatment protects mice from ionizing radiation injury / M. Landauer, V. Srinivasan, T. Seed // J. appl. toxicol. – 2003. – Vol. 23. – P. 379–385.
10. Landauer, M.R. Protection against lethal irradiation by genistein / M.R. Landauer [et al.] // Int. j. toxicol. – 2000. – Vol. 19. – P. 37–43.
11. Papazisis, K.T. Protein tyrosine kinase inhibitor, genistein, enhances apoptosis and cell cycle arrest in K562 cells treated with gamma-irradiation / K.T. Papazisis [et al.] // Cancer Lett. – 2000. – Vol. 160. – P. 107–113.
12. Seed, T.M. Radiation protectants: current status and future prospects / T.M. Seed // Health Phys. – 2005. – Vol. 89, № 5. – P. 531–545.
13. Singh, V.K. Effects of genistein administration on cytokine induction in whole-body gamma irradiated mice / V.K. Singh [et al.] // Int. immunopharmacol. – 2009. – Vol. 9, № 12. – P. 1401–1410.
14. Song, L.H. Protective effects of soybean isoflavone against gamma-irradiation induced damages in mice / L.H. Song, H.L. Yan, D.L. Cai // J. radiat. res. (Tokyo). – 2006. – Vol. 47. – P. 157–165.
15. Weiss, J.F. Radioprotection by antioxidants / J.F. Weiss, M.R. Landauer // Ann. N.Y. Acad. sci. – 2000. – Vol. 899. – P. 44–60.
16. Xiao, M. Pharmacological countermeasures for the acute radiation syndrome / M. Xiao, M.H. Whitnall // Cur. mol. pharmacol. – 2009. – Vol. 2. – P. 122–133.
17. Zhou, Y. Genistein stimulates hematopoiesis and increases survival in irradiated mice / Y. Zhou, M. Mi // J. radiat. res. (Tokyo). – 2005. – Vol. 46. – P. 425–433.

A.N. Grebenyuk, V.A. Basharin, R.A. Tarumov, V.Yu. Kovtun, A.A. Antushevich

### Comparative study of the effectiveness of genistein, mexidol, litan and cytochrome C as means of prophylaxy and early treatment of radiation injuries

**Abstract.** The comparative estimation of the radioprotective efficacy of antioxidants – genistein, mexidol, litan and cytochrome C, at parameters of 30-day survival rate of irradiated mice after acute X-ray irradiation. All antioxidants were intraperitoneum administrated: genistein in a doze of 200 mg/kg, mexidol in a doze of 5 mg/kg, litan in a doze of 30 mg/kg, and cytochrome C in a doze of 10 mg/kg. It is established, that at use 1 hour before irradiation genistein showed the greatest radioprotective efficacy, dose reduction factor of which has made  $1,48 \pm 0,19$ . At unitary therapeutic use in 1 hour after irradiation all investigated antioxidants increased survival rate of the irradiated animals, but the dose reduction factor did not exceed  $1,20 \pm 0,13$ . In condition of course therapeutic use during 5 days after irradiation the most expressed radioprotective efficacy has been registered in mexidol (the dose reduction factor has made  $1,30 \pm 0,14$ ).

**Key word:** irradiation, radiation injuries, radioprotection, treatment, genistein, mexidol, litan, cytochrome C, survival rate, mice.

Контактный телефон: 8 (812) 329-71-60; e-mail: tarumov\_ra@mail.ru