

Л.В. Деримедвідь,
Л.І. Симонова,
В.З. Гертман

Національний
фармацевтичний університет,
Інститут медичної радіології
ім. С.П. Григор'єва
АМН України,
м. Харків

Експериментальне дослідження протипроменевої властивості рекомбінантної супероксиддисмутази

Experimental study of antiradiation properties
of recombinant superoxide dismutase

Цель работы: Исследование противолучевых свойств нового антиоксидантного препарата рекомбинантной супероксиддисмутазы (СОДгес), полученного путем генной инженерии, в эксперименте на мышах при действии ионизирующей радиации в летальных дозах.

Материалы и методы: Опыты проведены на 250 беспородных белых мышах-самцах массой 18–22 г. Животные подвергались общему однократному рентгеновскому облучению в среднелетальной (5,8 Гр) и минимальной абсолютно летальной (7,5 Гр) дозах. На протяжении 30 суток изучали показатели выживаемости, средней продолжительности жизни погибших животных, динамику гибели. Исследовали эффективность введения препарата СОДгес по 3 схемам: а) введение препарата за 1 час до облучения в дозе 0,200 мг/кг внутривентриально; б) через 1 час после облучения в дозе 0,065 мг/кг; в) введение препарата до и после облучения в указанные сроки в тех же дозах.

Результаты: Показано, что препарат рекомбинантной супероксиддисмутазы обладает выраженными радиозащитными свойствами. Эксперименты, проведенные на животных, подвергавшихся воздействию ионизирующей радиации в абсолютно и среднелетальных дозах, демонстрируют существенное повышение выживаемости, средней продолжительности жизни погибших животных, смещение пиков летальности на более поздние сроки, уменьшение процента животных с кишечным синдромом. Наиболее эффективной в указанных дозах облучения оказалась схема двойного введения препарата — за 1 час до и через 1 час после облучения.

Выводы: Новый антиоксидантный препарат рекомбинантной супероксиддисмутазы проявляет выраженные радиозащитные свойства при действии ионизирующей радиации в летальных дозах. Радиозащитное действие препарата способствует модификации основных клинических проявлений острой лучевой болезни.

Ключевые слова: рекомбинантная супероксиддисмутаза, ионизирующая радиация, летальные дозы, выживаемость.

Objective: To study antiradiation properties of a new antioxidant preparation, genetic-engineering recombinant superoxide dismutase in the experiment with mice exposed to lethal doses of ionizing radiation.

Material and Methods: The study involved 250 mongrel white male mice weighing 18–22 g. The animals were exposed to single x-ray irradiation at a mean lethal dose (5.8 Gy) and minimal absolute lethal dose (7.5 Gy). The indices of survival, mean life span and death rate of the animals were studied. The efficacy of the preparation was investigated according to 3 protocols: a) administration of the preparation 1 hour before the exposure at a dose of 0.2000 mg/kg, intraabdominally; b) 1 hour after the exposure at a dose of 0.065 mg/kg; c) administration of the preparation before and after the exposure in the above doses.

Results: It was shown that the preparation had a marked radioprotective effect. The experiments on animals exposed to ionizing radiation at a absolute and mean lethal doses demonstrate considerable increase of survival rate, mean life span of the dead animals, shifts in the peaks of lethality to later terms, reduction in the percentage of animals with intestinal syndrome. The most effective was the protocol of double administration of the preparation, i.e. 1 hour before and 1 hour after the exposure.

Conclusion: A new antioxidant preparation, recombinant superoxide dismutase has marked radioprotective properties at lethal doses of ionizing radiation. Radioprotective effect of the preparation provides modification of main clinical manifestation of acute radiation sickness.

Key words: recombinant superoxide dismutase, ionizing radiation, lethal doses, survival.

Згідно з сучасними уявленнями про механізми променевої ушкодження, у їх виникненні особливе значення має активація процесів вільнорадикального окиснення (ВРО) [1, 2]. Встановлено, що в забезпеченні радіорезистентності клітини важливу роль відіграють антиоксидантні властивості її біохімічних компонентів [2]. Тому практично від самого початку вивчення розвитку процесів ВРО при дії іонізуючої радіації проводилися також і

роботи з дослідження можливих радіозахисних властивостей різних антиоксидантів. Було встановлено, що ряд антиоксидантів, переважно природного походження, виявляють певні радіозахисні властивості [2–4]. Їх антирадіаційний ефект пов'язаний із захистом ліпідного бішару мембран, що вважається в даний час другою, після ядерного хроматину, основною мішенню дії іонізуючої радіації [4]. Відомо, що більшість із традиційних антиоксидантів

не забезпечують надійного захисту клітинного генома, а чимало з них (наприклад, біофлавоноїди) під дією радіотоксинів можуть набувати прооксидантних властивостей [2–4]. Теоретично перспективнішим було б використання антиоксидантних ферментів клітини. Проте одержання чистих активних ферментативних препаратів пов'язане з великими труднощами. Однак розвиток генноінженерних методів одержання біологічних препаратів останнього часу відкриває нові перспективи у цьому напрямку [5–7].

Зокрема, широкий спектр радіобіологічних досліджень був проведений із вивченням радіозахисних властивостей одного з найважливіших антиоксидантних ферментів — супероксиддисмутази (СОД) [1, 3, 5–13]. Як відомо, СОД дисмутує супероксидний аніон-радикал ($O_2^{\cdot-}$) і перетворює його на менш реакційноспроможний перекис водню. Супероксиддисмутаза — єдиний серед відомих антиоксидантних ферментів, що безпосередньо забезпечують обривання вільнорадикальних реакцій у клітинах аеробних організмів на так званій «нульовій» стадії ВРО [3, 5–13].

Уперше радіозахисні властивості СОД виявлені в дослідженнях на мікроорганізмах, коли було показано, що рівень активності цього антиоксидантного ферменту прямо корелює з радіостабільністю різних бактеріальних штамів [3, 9–11].

Згодом було встановлено, що вміст ендогенної СОД в органах ссавців тісно пов'язаний з їх радіостабільністю. Так, у відносно радіорезистентних органах (печінка, нирки, серцевий м'яз, надниркові залози) рівень ферменту СОД значуще вищий порівняно з радіочутливими органами (кістковий мозок, селезінка) [3]. В експериментах на мікроорганізмах і клітинних культурах показано радіозахисний ефект екзогенної СОД [3, 10].

Радіопротекція вищих тварин за допомогою екзогенної СОД була вперше продемонстрована А. Petkau et al. (1975) на мишах. Внутрішнє введення їм активного ферменту істотно збільшувало 30-добову виживаність тварин після загального опромінення в діапазоні доз від сублетальних до абсолютно летальних [8–10].

Застосування СОД захищало кровотворні клітини й сприяло найшвидшому відновленню складу периферичної крові [9]. Високий радіозахисний ефект СОД підтверджений у ряді робіт [9, 10].

Після одержання фармакологічних препаратів СОД були зроблені спроби використовувати радіозахисні властивості цього антиоксиданту при опромінюванні людини. Препарат СОД, отриманий з еритроцитів великої рогатої худоби — пероксинорм (міжнародна назва — орготеїн), успішно застосовувався у променевої терапії раку сечовивідних шляхів, зменшуючи кількість променевих ускладнень, у тому числі з боку системи кровотворення [10].

У 80–90-ті рр. ХХ століття для зниження радіотоксичності променевої терапії використовували й інші препарати СОД, одержувані з еритроцитів великої рогатої худоби і людини [10]. Втім, незважаючи на їх значну ефективність, ці препарати мають водночас низку недоліків, і насамперед, це ризик виникнення при їх введенні алергічних реакцій [6, 7]. Крім того, при застосуванні препаратів, отриманих з великої рогатої худоби, не виключене виникнення пріонних інфекцій, а отриманих із крові людини — гепатиту, ВІЛ-інфекції та ін.

Все це диктує необхідність проведення подальших досліджень для пошуку ефективних і безпечних препаратів СОД. Досить перспективним є використання генноінженерних розробок. У Санкт-Петербурзькому ВАТ «РЭСБИО» з культури штаму дріжджів — продуцентів *Sacharomycess cerevisie* Y-2134 було отримано препарат рекомбінантної СОД (СОДгес) — рексод [6].

У попередніх дослідах щодо порівняльного вивчення фармакологічних властивостей цього препарату (протизапальної, гепатозахисної, кардіопротекторної) встановлено дещо вищу його активність, ніж у орготеїну [6, 7, 13]. Однак протипроменеві властивості препаратів СОД, отриманих шляхом генної інженерії, дотепер не вивчені. Тому метою даної роботи стало дослідження протипроменевих властивостей СОДгес в експерименті на мишах при дії летальних доз іонізуювальної радіації.

Методика дослідження

Для оцінки впливу препарату СОДгес на опромінені тварин було вивчено насамперед такі інтегральні характеристики: виживаність, середня тривалість життя тварин, що загинули; динаміка їхньої загибелі. Вибір доз препарату СОДгес спирався на попередні наші дослідження щодо встановлення його ЕД₅₀. Для препаратів СОД, отриманих з еритроцитів людини та методом генної інженерії, встановлено кілька ЕД₅₀ — 0,20 та 0,65 мг/кг [7, 13]. Попередні скринінгові дослідження показали, що при опромінюванні кращий результат спостерігається при застосуванні препаратів СОД у вищій дозі. Тож для подальших радіобіологічних досліджень ми використовували дозу СОДгес — 0,65 мг/кг маси.

Досліди проводили на 250 безпорідних білих мишах-самцях масою 18–22 г. Тварин піддавали загальному одноразовому ікс-променевому опромінюванню в мінімальній абсолютно летальній і середньолетальній дозах, встановлених експериментально.

Для мишей летальна доза (ЛД) 50/30 складала 5,8 Гр, мінімальна абсолютно летальна 100/30 — 7,5 Гр.

Тварин опромінювали на ікс-променевої установці РУМ-17 при таких технічних умовах: напруга — 150 кВ, сила струму — 7 мА, фільтри 1 мм Cu + 1 мм Al, потужність дози — 0,35 Гр/хв. Експериментальних мишей розподілили на такі групи:

1. Контрольна (псевдоопромінені).
2. Група опромінені (Ro) тварин без лікування (нелікований контроль).

3. Опромінені тварини, що одержували препарат СОДгес за такими схемами введення (дослідні групи):

- а) внутріочеревинно (в/оч) за 1 год до опромінювання в дозі 0,195 мг/кг, що дорівнює трьом ЕД₅₀ (П 1);
- б) через 1 год після опромінювання в дозі 0,065 мг/кг (ЕД₅₀) в/оч (П 2);

в) до і після опромінювання в/оч у зазначений термін у тих же дозах (П 1 + П 2).

4. Опромінені тварини, що одержували внутрим'язово еталонний антиоксидантний препарат альфа-токоферол у дозі 0,150 мг/кг (ЕД₅₀) (лікований контроль).

Тварин спостерігали протягом 30 діб. Статистично обробляли отримані дані на ПЕОМ за допомогою пакета програм «Statistica», а дані щодо виживаності — використовуючи програму Survival analysis. Вірогідність розбіжностей при порівнянні показників оцінювали за допомогою критерію Log-rank test.

Результати та їх обговорення

Дані про виживаність опроміненіх мишей, що одержували препарат СОДгес за трьома схемами, наведені в табл. 1 і 2.

Як свідчать дані експерименту, найефективнішим виявилось введення препарату СОДгес за 1 год до опромінювання в дозі 0,195 мг/кг (3 ЕД₅₀). При опроміненні в середньоле-

Таблиця 1 — Протипроменеві ефекти препарату СОДгес у мишей при опроміненні в середньолетальній дозі (5,8 Гр)

Administration effect of recombinant superoxide dismutase in mice at a mean lethal dose (5.8 Gy)

Група	Вид дії	Вихідна кількість тварин (n)	Кількість тварин, що вижили до 30-ї доби	Вживаність до 30-ї доби, %	СТЖ, діб
1	Псевдоопромінення	15	15	100	—
2	Ro 5,8 Гр	24	11	45,8	17,4 ± 2,48
3а	П ₁ + Ro	24	16	66,7*	26,4 ± 1,24*
3б	Ro + П ₂	24	13	54,2	22,3 ± 1,66
3в	П ₁ + Ro + П ₂	24	21	87,5* **	28,8 ± 0,7* **
4	α-T _к + Ro + α-T _к	24	15	62,5*	25,4 ± 1,5*

Примітка. * — p < 0,05 порівняно з нелікованим (гр. 2), ** — p < 0,05 — з лікованим контролем (гр. 4).

Таблиця 2 — Протипроменеві ефекти препарату СОДгес у мишей при опроміненні в мінімальній абсолютно летальній дозі (7,5 Гр)

Administration effect of recombinant superoxide dismutase at a minimum absolute lethal dose (7.5 Gy)

Група	Вид дії	Вихідна кількість тварин (n)	Кількість тварин, що вижили до 30-ї доби	Вживаність до 30-ї доби, %	СТЖ, діб
1	Псевдоопромінення	15	15	100	—
2	Ro 7,5 Гр	20	0	0	6,7 ± 0,67
3а	П ₁ + Ro	20	3	15* **	14,5 ± 1,9* **
3б	Ro + П ₂	20	0	0	9,8 ± 1,43
3в	П ₁ + Ro + П ₂	20	4	20* **	16,2 ± 1,9* **
4	α-T _к + Ro + α-T _к	20	0	0	8,7 ± 1,14

Примітка. * — p < 0,05 порівняно з нелікованим (гр. 2), ** — p < 0,05 — з лікованим контролем (гр. 4).

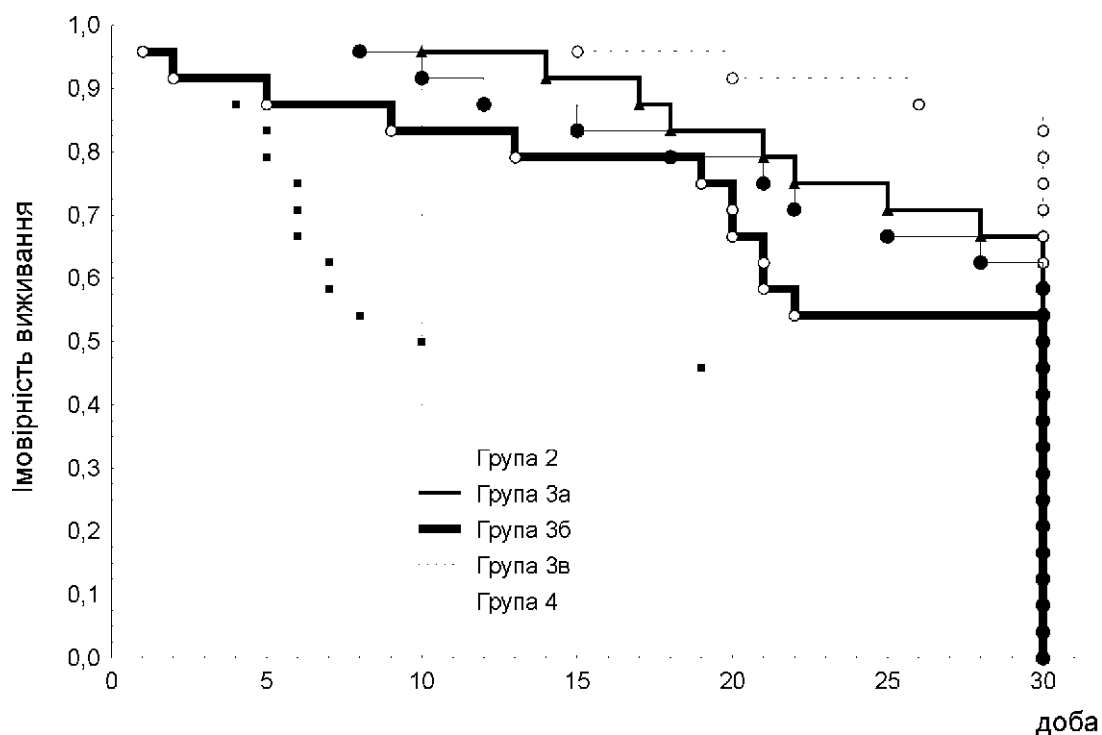


Рис. 1 — Вплив препарату СОДгес на динаміку загибелі мишей, опромінених у середньолетальній дозі (5,8 Гр)
 Fig. 1 — Influence of superoxide dismutase on the death rate in mice exposed to a mean lethal dose (5.8 Gy)

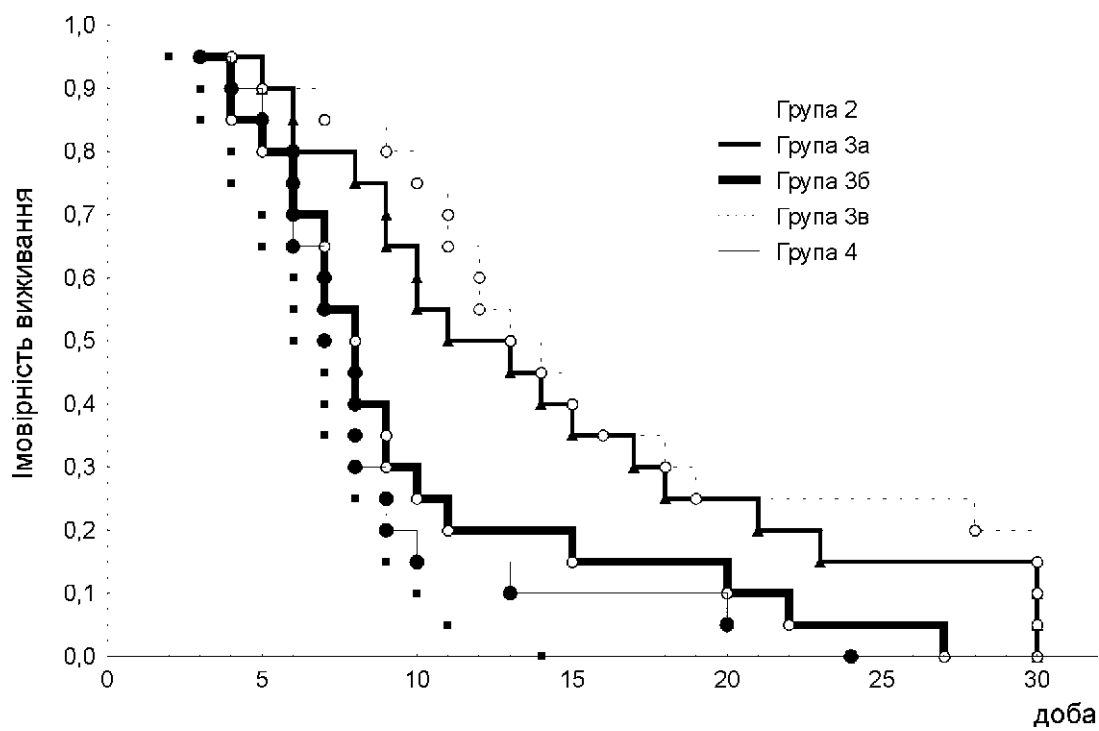


Рис. 2 — Вплив препарату СОДгес на динаміку загибелі мишей, опромінених у мінімальній абсолютно летальній дозі (7,5 Гр)
 Fig. 2 — Influence of superoxide dismutase on the death rate in mice exposed to a minimum absolute lethal dose (7.5 Gy)

тальній дозі (5,8 Гр) збільшення кількості тварин, що вижили до 30-ї доби спостереження, склало приблизно 20 %, а середня тривалість життя (СТЖ) загиблих тварин збільшилася на 9 діб ($p < 0,05$) порівняно із опроміненими мишами без лікування (група 2). Введення препарату після опроміювання (через 1 год) сприяло збільшенню виживаності опромінених мишей (на 10 %) зі зростанням СТЖ. Оптимальною виявилася схема подвійного введення препарату — до і після опроміювання (група 3в). При цій схемі виживаність опромінених тварин збільшувалася на 41 % ($p < 0,01$), а СТЖ — на 11 діб порівняно із опроміненим нелікованим контролем ($p < 0,01$). У цій же групі тварин показники виживаності були вірогідно вищими на 25 %, ніж у групі 4, тобто там, де миші одержували еталонний антиоксидантний препарат альфа-токоферол за аналогічною схемою.

Аналіз розподілу загибелі тварин за період спостереження (рис. 1) показав, що максимальні значення летальності в гр. 2 (опромінений у дозі 5,8 Гр контроль) фіксувалися на 5–7-му добу, тобто в період розпаду гострої променевої хвороби (ГПХ). Цей пік летальності відповідає кістковомозковій загибелі опромінених тварин [14]. У наших експериментах для всіх груп, опромінених у середньолетальній дозі, які одержували антиоксидантні препарати, піки летальності зміщувалися на значно пізніші терміни (з 5–10-ї на 20–25-ту добу). При подвійному введенні препарату СОДгес мишам, опроміненим у середньолетальній дозі (гр. 3в), пік летальності дослідних тварин відповідав найпізнішому періоду — 25–30-й добі. Цей факт може свідчити про вплив досліджуваного препарату на перебіг кістковомозкового синдрому.

Аналогічні тенденції можна відзначити також і при дії препарату СОДгес на мишей, опромінених у мінімальній абсолютно летальній дозі (див. табл. 2). При цій дозі радіації (7,5 Гр) у контрольній групі опромінених тварин (гр. 2) була зафіксована 100 %-ва загибель до 30-ї доби спостереження. Введення еталонного антиоксидантного препарату альфа-токоферолу не впливало на виживаність і СТЖ дослідних мишей.

Певний ефект спостерігався при введенні препарату СОДгес після опромінення в абсолютно летальній дозі. Це виражалося у деякому збільшенні СТЖ приблизно на 3 доби ($p > 0,05$). Однак уведення досліджуваного препарату перед опроміюванням створювало значнішу захисну дію. Препарат СОДгес, уведений за 1 год до опроміювання (гр. 3а), викликав ефект відносного зменшення дози, тобто появу в даних групах (гр. 3а і 3в) 15 і 20 % відповідно тварин, що вижили, а також збільшення СТЖ тварин майже в 2 рази ($p < 0,05$).

Крива загибелі експериментальних тварин при опроміненні в абсолютно летальній дозі (рис. 2) демонструє істотний зсув піків летальності в гр. 3а і 3в (уведення препарату СОДгес до опроміювання) на більш пізні терміни — з 3–5-ї на 10–15-ту добу.

Відомо, що при опроміненні в абсолютно летальних дозах рання загибель експериментальних тварин відбувається на 3–5-ту добу за рахунок репаративної загибелі ентероцитів і розвитку кишкового синдрому [14, 15]. У наших експериментах клінічні ознаки кишкового синдрому (діарея) зафіксовані в гр. 2 (опромінений контроль) у 80 % мишей до моменту їх загибелі. Аналогічна картина була і в гр. 3б та 4. Однак у гр. 3а і 3в (уведення препарату СОДгес за 1 год до опроміювання) виражений кишковий синдром спостерігали тільки в 50 % тварин. Це свідчить про те, що радіозахисна дія препарату СОДгес може виявлятися також і в пом'якшенні кишкового синдрому ГПХ.

Таким чином, радіобіологічні експерименти, проведені на тваринах, що зазнавали впливу йонізуючої радіації у 2 дозових діапазонах (середньолетальні й абсолютно летальні дози), переконливо свідчать про наявність виражених протипроменевих властивостей препарату СОДгес, отриманого за допомогою генноінженерних методів. Уведення досліджуваного препарату за 1 год до опроміювання істотно підвищувало виживаність опромінених тварин, збільшувало середню тривалість життя загиблих тварин, змінювало динаміку їх загибелі зі зсувом піків летальності на більш пізні терміни. Найефективнішою у всіх дозових діапазо-

нах виявилася схема подвійного введення препарату — за 1 год до і через 1 год після опромінювання. Отримані дані дають підстави вважати, що радіозахисна дія препарату СОДгес реалізується за допомогою зниження активності процесів ВРО зі стабілізацією мембран клітин кісткового мозку й кишечника, що сприяє модифікації основних синдромів променевої хвороби — кістковомозкового і кишкового.

ВИСНОВКИ

1. Новий препарат рекомбінантної супероксиддисмутази виявив значну радіозахисну дію в експериментах на мишах, які зазнали опромінення в середньолетальній та мінімально абсолютно летальній дозах.

2. У тварин, які зазнали опромінення у цих дозових діапазонах, введення препарату рекомбінантної супероксиддисмутази значно підвищувало виживаність та середню тривалість життя загиблих тварин; пом'якшувало перебіг кістковомозкового й кишкового синдромів.

3. Найбільш ефективною для радіозахисту виявилася схема подвійного введення препарату — за 1 год до і через 1 год після опромінювання.

Література

1. Абанькин В.П. Свободнорадикальное окисление и его роль в биологических процессах (обзор) // Биологический скрининг, механизм действия и токсикометрия новых продуктов органического синтеза. — Пермь, 1986. — С. 3–22.
2. Кобилінська Л.І., Тимочко М.Ф. // Експерим. та клін. фізіол. і біохімія. — 2000. — Т. 4, № 12. — С. 52–57.
3. Гусев В.А., Брусов О.С., Панченко Л.Ф. // Вопр. мед. химии. — 1980. — Т. 26, вып. 3. — С. 291–301.
4. Чекман И.О. // Фитотер. в Укр. — 2000. — № 2. — С. 5–7.
5. Flohe L., Kim S.M., Otting F. et al. Comparison of human Cu/Zn superoxide dismutase derived from erythrocytes, recombinant *E. coli* and recombinant yeast. — In: *Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry Biology and Medicine*. — Giuseppe Rotilio (Ed.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New-York: Oxford. — 1986. — P. 266–269.
6. Чурилова И.В., Водейко Л.П., Исаков В.А. // Цитол. — 1999. — Т. 41, № 9. — С. 829–830.
7. Деримедвідь Л.В. // Вісн. фармації. — 2001. — Т. 3, № 27. — С. 142.
8. Mc Cord J. M., Fridovich I. // *J. Biol. Chem.* — 1969. — Vol. 244. — P. 6049–6055.
9. Fridovich I. // *Ibid.* — 1997. — Vol. 272. — P. 18515–18517.
10. Бекманн Р., Флое Л., Вильсман К. 10 лет терапевтического применения супрооксиддисмутаза. Фирма «Грюненталь», Аахен: Исследовательский центр, 1995. — 21 с.
11. Казанина Г.А., Селезнева А.А. // Приклад. биохимия и микробиол. — 1992. — Т. 28, вып. 2. — С. 165–173.

12. Луцзяк В.И. // Биохимия. — 2001. — Т. 66, вып. 5. — С. 592–609.
13. Деримедвідь Л.В. // Ліки. — 1999. — № 3–4. — С. 14–17.
14. Ярмоненко С.П. Радиобиология человека и животных. — М.: Высш. шк., 1988. — 424 с.
15. Гродзинський Д.М. Радиобиологія. — К.: Либідь, 2000. — 448 с.

Дата надходження: 22.09.2003.

Адреса для листування:
Симонова Лариса Іванівна,
ІМР ім. С.П. Григор'єва АМНУ, вул. Пушкінська, 82,
Харків, 61024, Україна