

МОДИФИКАЦИЯ РАДИАЦИОННЫХ ЭФФЕКТОВ

УДК 616-03:636.3:539.1.047

ОЦЕНКА ЛЕЧЕБНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОДИГИОЗАНА В ОПЫТАХ НА ОБЛУЧЕННЫХ ОВЦАХ

© 2018 г. В. А. Бударков^{1,*}, Н. В. Грехова¹, Г. В. Козьмин²

¹Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии, пос. Вольгинский, Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, Обнинск, Россия

* E-mail: budarkovva@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.08.2017 г.

Проведена оценка противолучевой лечебной эффективности препарата продигиозан путем изучения при кроветворной форме острой лучевой болезни овец общего содержания в венозной крови эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, фагоцитарной активности нейтрофилов, бактерицидной, лизоцимной, интерферогенной активности сыворотки крови, концентрации кортизола, уровней аутоантител к лизату эритроцитов, клеткам селезенки и семенников в сыворотке крови, уровней цАМФ и цГМФ в плазме крови, выживаемости животных. Установлено, что однократное внутримышечное введение продигиозана в дозе 5 мкг/кг через 10–20 мин, 3, 24 ч после внешнего общего γ -облучения квантами ¹³⁷Cs в дозе 4 Гр (СД_{80–100/60}) при мощности дозы 0.8 Гр/ч позволяет уменьшить выраженность геморрагического синдрома, постлучевой тромбоцитопении и лейкопении, активировать функцию коры надпочечников, стимулировать образование эндогенного интерферона, повысить фагоцитарную емкость нейтрофилов, концентрацию цАМФ плазмы крови, что в конечном итоге обеспечивает 60-суточную выживаемость 87% облученных животных при 33%-ной выживаемости в группе контроля.

Ключевые слова: острая лучевая болезнь, овцы, продигиозан, лейкоциты, нейтрофилы, кортизол, интерферон, циклические нуклеотиды

DOI: 10.1134/S0869803118040045

События на Чернобыльской атомной электростанции продемонстрировали значение использования комплексной защиты от радиационных поражений. Наряду с методами физической защиты – экранированием инженерными сооружениями, сокращением времени нахождения в опасной зоне, являющимися наиболее надежными, но не всегда осуществимыми, предполагается применение лечебных препаратов [1–3]. Направление исследований сместилось на поиск средств усиления/ускорения процессов пострадиационного восстановления клеточной репарации в кроветворном стволовом пуле [4]. Основным методом патогенетической терапии лучевой патологии является раннее применение противолучевых средств – в период от нескольких часов до 2–4 сут после облучения в дозах, вызывающих костномозговой синдром. В эту группу, названную радиомитигаторами, относят высокомолекулярные препараты микробного, растительного или животного происхождения (вакцины, эндотоксины, полисахариды, липополисахариды, полинуклеотиды) [5]. В организме они действуют не только как экзогенные иммуномодуляторы, но и как индукторы естественных иммуномодуляторов – ци-

токинов, которые способствуют активации различных ростков костного мозга и, как следствие, увеличению количества зрелых клеток в кровеносном русле [6–10].

Одним из препаратов, обладающих выраженным противолучевым действием, является бактериальный липополисахарид продигиозан, выделенный из *Bakt. prodigiosum* [11]. Он является средством, стимулирующим факторы неспецифической и специфической резистентности организма. Показано, что введение продигиозана лабораторным животным (крысы, мыши, морские свинки) повышало выживаемость при облучении рентгеновскими лучами [12]. Продигиозан по механизму действия и времени назначения входит в группу “Средства ранней патогенетической терапии” и рекомендован для противолучевого медицинского применения [13].

Цель настоящей работы – экспериментальное исследование возможности лечения продигиозаном костномозговой формы острой лучевой болезни овец, вызванной внешним общим γ -облучением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Опыты проведены на 69 овцах породы прекос в возрасте от 8 до 24 мес., массой тела от 30 до 60 кг. Животные имели ветеринарный сертификат, прошли 20-дневный карантин в виварии Федерального исследовательского центра вирусологии и микробиологии (ФГБНУ ФИЦВИМ). Содержались животные в отапливаемых боксах, в соответствии с нормами группового размещения в условиях искусственного освещения с принудительной 16-кратной вентиляцией при температуре 18–20°C на подстилке из древесных стружек. Животные получали свободный доступ к питьевой воде и корм из сена и концентратов.

Животных подвергали общему внешнему двустороннему облучению γ -квантами ^{137}Cs на γ -установке ГУС-4000 в дозе 4 Гр ($\text{СД}_{80-100/60}$) при мощности дозы 0.8 Гр/ч, которая вызывает костномозговую форму острой лучевой болезни. Равномерность облучения овец достигалась путем возвратно-поступательного движения тележки, на которой находились животные (равномерность поля облучения $\pm 10\%$). Дозиметрический контроль осуществляли клиническим дозиметром 27012 с камерой VA-G-18 (Германия), который прошел поверку в ФГУП “Всероссийский научно-исследовательский институт физико-технических и радиотехнических измерений”.

В опытах использовали 0.005%-ный раствор продигозана (производитель “Фармацевтическое объединение”, г. Москва), который вводили внутримышечно в дозах от 1 до 25 мкг/кг массы тела через 10–20 мин, 3 и 24 ч после облучения.

Экспериментальное изучение продигозана в качестве средства терапии радиационного поражения овец проводили в соответствии с Методическими указаниями [14]. Лечебную эффективность продигозана оценивали по общему клиническому состоянию, массе тела, гематологическим, биохимическим, иммунологическим показателям, выживаемости животных.

Изучение массы тела, температуры, общего состояния, содержания гемоглобина, числа лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитарной формулы проводили по общепринятым методикам [15].

Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали по [16]. О функциональной активности коры надпочечников судили по концентрации в сыворотке крови кортизола, который определяли с помощью набора РИА-КОРТИЗОЛ-СТ (г. Минск); концентрацию циклических нуклеотидов (цАМФ и цГМФ) в плазме крови — с помощью наборов фирмы “Amersham” (Великобритания).

В сыворотке крови по методике [17] определяли активность лизоцима, бактерицидную активность сыворотки крови оценивали по методике [18].

Уровень аутоантител к лизату эритроцитов, клеткам селезенки и семенников изучали по методике Уанье в модификации [19]. Активность интерферона в сыворотке крови оценивали по вирусстатическому действию в культуре клеток [20]. Суть методики заключается в том, что интерферон обладает антивирусной активностью, проявляющейся в торможении репродукции вируса. При этом титр вируса выражают в логарифмах 50%-ной экспериментальной инфекционной дозы вируса (lgID_{50}), регистрируемого по снижению цитопатического действия (ЦПД).

Исследования проводили до начала радиационного воздействия, через 3 ч, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 5, 60 сут после него.

Цифровые данные экспериментов обрабатывали стандартными методами вариационной статистики [21]. Межгрупповые различия оценивали по *t*-критерию Стьюдента и непараметрическим методом по данным автоматического расчета *U*-критерия Манна–Уитни [22]. Различия 60-суточной выживаемости оценивали по точному методу Фишера. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

С учетом литературных данных для исследований на облученных овцах были использованы дозы продигозана 1, 5 и 25 мкг/кг.

На 1-м этапе эксперименты были проведены на облученных овцах с массой тела 40.0 ± 0.8 кг. Исползовано 12 овец, которых подвергали γ -облучению в дозе 4.0 Гр, вызывающей острую лучевую болезнь тяжелой степени. Животные по принципу аналогов были разделены на четыре группы по три овцы в каждой. Животным 1-, 2- и 3-й групп продигозан вводили внутримышечно через 10–20 мин после окончания облучения в дозах 1, 5 и 25 мкг/кг массы тела соответственно. Овцы 4-й группы препарат не получали и служили контролем.

Установлено, что первоначальная клиническая реакция на введение продигозана в дозе 1 мкг/кг у облученных овец была слабо выраженной. На введение препарата в дозах 5 и 25 мкг/кг животные реагировали угнетением общего состояния, повышением температуры тела на 1.1–2.5° (норма 38.5–40.0°C). Через сутки после введения продигозана в дозе 5 мкг/кг и через 2 сут после введения в дозе 25 мкг/кг состояние овец нормализовалось. Все облученные овцы, получившие продигозан, выжили. Из трех овец в контрольной группе к 45-м сут выжила одна овца. Таким образом, после введения сразу после облучения продигозана в дозе 1, 5 и 25 мкг/кг выявлен выраженный терапевтический эффект.

Таблица 1. Влияние различных доз продигиозана на общее количество лейкоцитов в крови облученных в дозе 4 Гр овец, $\times 10^9/\text{л}$

Доза препарата, мкг/кг	Срок исследования					
	до облучения	3 ч	7 сут	10 сут	25 сут	45 сут
1	8.8 ± 1.0	4.5 ± 1.4	2.5 ± 0.2	2.9 ± 0.4	1.3 ± 0.2	1.6 ± 0.2
5	8.1 ± 1.4	2.7 ± 1.9	2.5 ± 1.1	1.9 ± 0.6	1.7 ± 0.7	3.3 ± 1.3
25	5.9 ± 0.9	1.5 ± 0.3	2.4 ± 0.3	4.2 ± 0.7	1.7 ± 0.4	1.8 ± 0.2
Контроль	6.3 ± 0.8	5.5 ± 1.1	1.6 ± 0.2	1.9 ± 0.1	0.8 ± 0.3	2.5

Под влиянием γ -облучения в крови овец всех групп уже через 3 ч регистрировали снижение общего количества лейкоцитов, которое происходило, главным образом, за счет лимфоцитов (табл. 1).

Наименьшее влияние на показатели белой крови оказал продигиозан, введенный в дозе 1 мкг/кг, наибольшее – в дозе 25 мкг/кг. Однако после введения препарата в дозе 25 мкг/кг отклонения от нормы в общем состоянии были более продолжительными и глубокими, медленнее восстанавливались реакции на внешние раздражители и аппетит. С учетом клинических и гематологических наблюдений дальнейшие исследования проведены при использовании препарата в дозе 5 мкг/кг.

На 2-м этапе в двух сериях опытов оценивали терапевтическую эффективность продигиозана в дозе 5 мкг/кг при γ -облучении в дозе 4 Гр 35 овец (с учетом интактных животных) различного возраста и массы тела. В серии I использовано 21 животное массой тела 36.5 ± 0.8 кг, во серии II – восемь овец массой тела 50.3 ± 1.3 кг. В каждой серии животные с учетом массы тела были разделены на две сходные по общему состоянию и массе тела группы. Облученные овцы 1-й серии служили контролем, животным 2-й серии (подопытные) вводили продигиозан. Биологическим контролем для овец 1- и 2-й серий служили интактные необлученные животные аналогичного возраста и массы тела (по три овцы в каждой серии).

Через 3 ч после облучения у молодых и взрослых животных контрольной группы существенных изменений общего состояния не отмечено.

Введение продигиозана облученным овцам в количестве 5 мкг/кг массы тела вызывало те же изменения клинического состояния, что были описаны выше. У облученных животных, получивших продигиозан, через 3 ч после введения препарата развивалось угнетение общего состояния, температура тела повышалась до $40.7 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ($38.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ в контроле). Такое различие между подопытными и контрольными овцами наблюдали в течение 6–8 ч. Через сутки состояние всех овец нормализовалось. Спустя 5–7 сут у всех овец снова отмечали угнетение общего состояния, ко-

торое продолжалось последующие 20–25 сут. С 10-х сут у подопытных и с 12–15-х сут у контрольных овец началась эпилепсия. Шерсть выпала преимущественно на спине и шее. В последующем, к 50–60-м сут, шерсть вновь начинала отрастать. Различия между группами не выявлены.

В разгар лучевой болезни (15–25 сут) у двух овец контрольных групп наблюдали диарею с примесью крови, а на 20–27-е сут у трех овец этих же групп – носовые кровотечения. Наличие крови в выделениях у подопытных овец не отмечено. От овцы, получившей после воздействия γ -лучей продигиозан, через 37 сут от начала облучения родился ягненок (ярочка) с массой тела 2.5 кг. Общее состояние и картина венозной крови новорожденного соответствовала показателям нормы.

Масса тела овец в первые 3 сут после γ -облучения понижалась до 94 и 97% от исходного уровня в подопытных и контрольных группах соответственно. В дальнейшем наблюдали ее увеличение. У выживших овец она к 60-м сут составляла 107% от первоначальной.

В 1-й серии погибло 10 овец (семь овец на 18–25-е сут и три овцы – на 27-е, 30-е и 37-е сутки). Лечение продигиозаном достоверно повышало выживаемость облученных животных серии II как при 55%-ной, так и 100%-ной гибели в контроле (табл. 2).

Динамика изменений большинства гематологических показателей у овец каждой группы из серий I и II под влиянием облучения была сходной, несмотря на некоторые статистически незначимые различия в первоначальных гематологических показателях. Поэтому в последующем полученные результаты были представлены в виде средних значений для подопытных и контрольных групп. В каждую группу вошли данные исследований 4–10 животных (табл. 3).

У животных из группы биологического контроля ($n = 6$) показатели венозной крови в период наблюдений колебались в пределах физиологической нормы (лейкоциты – $(6–11) \times 10^9/\text{л}$, тромбоциты – $(270–500) \times 10^9/\text{л}$, эритроциты – $(7.5–12.5) \times 10^{12}/\text{л}$).

Таблица 2. Выживаемость овец, подвергнутых γ -облучению в дозе 4.0 Гр и введению продигозана в дозе 5 мкг/кг через 10–20 мин после облучения

Серия	Масса овец, кг	Группа	Число животных	Выжило	Выживаемость, %	Уровень значимости, <i>p</i>
I	36.5 ± 0.8	Облучение	11	5	45.5	—
	50.3 ± 1.3	Облучение	4	0	0	—
	Итого:		15	5	33.3	—
II	36.5 ± 0.8	Облучение + продигозан	10	10	100	<0.025
	50.3 ± 1.3	Облучение + продигозан	4	4	100	<0.025
	Итого		14	14	100	<0.025

Примечание: Статистическая значимость различий между опытом и контролем оценена точным методом Фишера.

Число эритроцитов в крови облученных овец недостоверно понижалось. Понижение уровня тромбоцитов у овец контрольной группы по сравнению с подопытными на 30-е сут было статистически значимым ($p \leq 0.05$).

Количество лейкоцитов у овец подопытной группы через 3 ч после введения продигозана уменьшилось до $(1.1 \pm 0.29) \times 10^9/\text{л}$, а через сутки возросло до $(4.7 \times 0.48) \times 10^9/\text{л}$. Однако на всех сроках исследования содержание лейкоцитов у подопытных овец было ниже исходного уровня.

У контрольных овец в разгар острой лучевой болезни число лейкоцитов понижалось в большей степени, чем у животных, получавших продигозан. Статистически значимые различия между группами отмечали с 15-х до 60-х сут ($p \leq 0.05$).

Сдвиги в лейкоцитарной формуле у облученных животных в первые 10 сут характеризовались лимфопенией. Наибольшие изменения отмечали через 3 ч и на 1–3-и сут.

Через 3 ч и 1 сут у контрольных и через 1 сут у подопытных овец, по сравнению с исходным

уровнем, отмечали нейтрофилез, который, начиная с 3-х сут, сменялся стойкой нейтропенией. Различия между группами через 3 ч выражались достоверным понижением уровня сегментоядерных нейтрофилов в подопытной группе, по сравнению с контрольной. С 15-х по 60-е сут в подопытной группе число нейтрофилов было существенно выше, чем в контрольной ($p \leq 0.05$).

Фагоцитарная способность нейтрофилов у облученных овец обеих групп понижалась с минимумом на 20–25-е сут от начала радиационного воздействия. При этом у подопытных овец фагоцитарная емкость нейтрофилов после кратковременного значительного понижения через 3 ч была выше, чем у контроля, во все последующие сроки наблюдения ($p \leq 0.05$).

Бактерицидная активность сыворотки крови понижалась у облученных животных обеих групп со статистически значимым отличием от исходного уровня в первые 5 сут и через 45 сут от начала облучения.

Активность лизоцима у подопытных и контрольных овец изменялась однотипно: через 3 ч достоверно возрастала по отношению к уровню до начала облучения, через сутки приближалась к первоначальным значениям, затем понижалась, с минимумом на 30–45-е сут и восстанавливалась к 60-м сут. Но существенных различий по уровням бактерицидной и лизоцимной активности между группами не обнаружено.

Уровень кортизола в первую декаду после облучения существенно увеличивался, максимум его наблюдали через 3 ч после облучения (рис. 1), причем в подопытной группе это увеличение было выражено сильнее ($p \leq 0.05$). Следовательно, действие продигозана на фоне облучения приводило к дополнительной стимуляции коры надпочечников.

После облучения в разгар лучевой болезни у овец обеих групп в сыворотке крови повышался уровень антител к различным органам и тканям

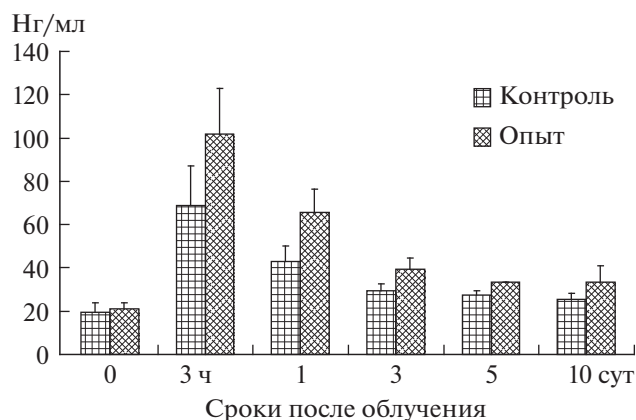


Рис. 1. Влияние продигозана на концентрацию кортизола в крови облученных в дозе 4 Гр овец.

Таблица 3. Влияние продигиозана на показатели естественной иммунологической резистентности облученных в дозе 4 Гр овец

Показатель	Группа	Сроки исследования, сут												
		до облучения	после облучения											
			3 ч	1	3	5	7	10	15	20	25	30	45	60
Фагоцитарная активность, %	облучение	91.5 ±0.7	86.9 ±3.6	87.3 ±1.9	92.1 ±1.3	89.6 ±1.6	91.2 ±1.6	94.4 ±2.1	89.9 ±1.0	87.3 ±2.6	82.2 ±6.0	83.7 ±5.5	81.6 ±2.1	
		91.8 ±0.7	89.9 ±2.1	89.8 ±2.0	92.6 ±1.3	90.1 ±2.2	94.3 ±0.8	92.2 ±2.9	95.1 ±1.6*	88.8 ±2.4	85.3 ±2.5	85.2 ±2.0	89.6 ±1.4	
Фагоцитарный индекс, кокк/активный нейтрофил	облучение	12.0 ±0.4	10.8 ±0.6	12.0 ±0.8	11.6 ±0.6	11.1 ±1.2	9.70 ±0.4	11.5 ±0.5	11.9 ±1.6	9.98 ±1.7	10.6 ±1.9	11.5 ±1.2	11.2 ±1.0	
		11.4 ±0.4	10.1 ±0.6	14.3 ±0.8*	11.4 ±1.2	9.9 ±1.0	10.6 ±0.8	11.3 ±1.2	11.4 ±1.4	10.0 ±0.5	11.7 ±0.8	10.6 ±0.6	10.4 ±1.0	
Фагоцитарное число, кокк/нейтрофил	облучение	11.0 ±0.4	9.8 ±0.8	10.5 ±0.8	10.3 ±0.5	9.9 ±1.0	8.8 ±0.4	10.9 ±0.5	10.5 ±1.6	8.7 ±1.3	8.9 ±1.9	9.6 ±1.1	9.1 ±1.0	
		10.4 ±0.4	9.1 ±0.5	12.9 ±0.4	10.6 ±0.8	9.0 ±1.0	10.3 ±0.8	10.7 ±1.4	11.8 ±1.6	8.9 ±0.6	10.0 ±0.4	9.1 ±0.5	9.4 ±1.0	
Фагоцитарная емкость кокк/мкл крови	облучение	24.9 ±2.2	27.5 ±4.5	9.8 ±2.6	6.4 ±0.6	8.7 ±1.2	10.5 ±1.8	7.7 ±1.2	10.3 ±0.3	1.3 ±0.5	2.2 ±0.6	8.3 ±3.7	7.4 ±3.2	
		28.4 ±2.3	42.8 ±1.4	13.2 ±2.0	8.8 ±1.4	9.9 ±1.5	12.7 ±1.5	12.5 ±1.7*	5.1 ±1.5*	3.5 ±0.8*	8.6 ±2.8*	12.6 ±1.9	10.5 ±1.3	
Бактерицидная активность сыворотки крови, %	облучение	86.8 ±4.3	46.0 ±7.7	59.9 ±6.7	70.2 ±4.6	—	87.7 ±5.6	74.2 ±5.9	82.9 ±8.6	—	73.2 ±3.0	63.6 ±7.6	93.7 ±4.8	
		91.06 ±3.4	39.1 ±8.1	58.3 ±7.4	69.1 ±5.7	—	85.7 ±5.7	70.3 ±9.2	89.2 ±2.7	—	85.5 ±4.7	72.3 ±6.0	84.8 ±3.7	
Лизоцимная активность сыворотки крови, %	облучение	37.0 ±2.1	40.2 ±2.9	29.4 ±2.9	26.2 ±2.9	—	29.3 ±3.9	26.6 ±4.4	24.2 ±4.5	—	13.9 ±9.8	18.0 ±14.2	47.0 ±14.0	
		31.2 ±3.4	41.6 ±4.0	28.8 ±6.8	24.8 ±3.7	—	25.4 ±4.4	24.5 ±5.0	37.7 ±6.3	—	17.3 ±8.4	17.2 ±6.4	39.5 ±5.1	

Примечание. Прочерк – не исследовали.

Таблица 4. Влияние продигозана на уровень аутоантител к лизату эритроцитов, клеткам селезенки, семенников облученных в дозе 4 Гр овец, баллы

Показатель	Группа	Срок исследования, сут										
		после облучения										
	до облучения	3 ч	1	3	5	10	15	20	30	45	60	
К лизату эритроцитов	Облучение	1.67 ±0.27	2.17 ±0.71	0.83 ±0.71	1.50 ±0.53	3.00 ±0.36	3.67 ±0.18	2.67 ±0.71	3.00 ±0.71	2.25 ±0.28	2.33 ±0.42	1.00 ±0.84
	Облучение + продигозан	0.44 ±0.20	3.00 ±0.535	1.08 ±0.71	1.67 ±0.71	2.16 ±0.71	3.67 ±0.36	3.17 ±0.71	2.20 ±0.71	3.67 ±0.18*	3.00 ±0.35	2.17 ±0.35
	Облучение	1.77 ±0.28	2.73 ±0.30	2.50 ±0.53	2.50 ±0.53	2.17 ±0.53	2.08 ±0.61	2.17 ±0.53	2.75 ±0.40	2.71 ±0.45	2.67 ±0.42	2.33 ±0.42
К клеткам селезенки	Облучение + продигозан	1.71 ±0.53	2.91 ±0.40	2.17 ±0.36	2.00 ±0.53	2.00 ±0.36	3.83 ±0.17*	3.00 ±0.35	2.29 ±0.45	3.30 ±0.43	3.00 ±0.53	2.75 ±0.71
	облучение	1.92 ±0.34	2.75 ±0.62	1.83 ±0.71	1.50 ±0.53	2.17 ±0.71	3.00 ±0.17	3.30 ±0.36	2.75 ±0.40	2.57±0.30	2.67 ±0.17	2.00 ±0.36
	Облучение + продигозан	1.47 ±0.29	3.67 ±0.17	2.83 ±0.53	2.17 ±0.36	2.50 ±0.35	3.50 ±0.36	3.50 ±0.36	3.29 ±0.30	3.60 ±0.32*	3.36 ±0.71	1.33 ±0.53

(табл. 4). У леченых животных на большинстве сроков наблюдения содержание аутоантител было больше, чем у только облученных, со статистически значимым различием к лизату эритроцитов на 30-е сут, к тканям селезенки и семенников соответственно на 10- и 30-е сут.

Введение продигиозана вызывало образование интерферона в сыворотке крови, которое проявлялось в снижении накопления вируса на 1–20-е сут после введения препарата на 3–4 lgИД_{50/мл} (рис. 2). Сыворотка крови облученного контроля таким действием не обладала (табл. 3). По этому показателю между подопытной и контрольной группами за весь период наблюдений регистрировали статистически значимые различия ($p \leq 0.05$).

Исследования цАМФ и цГМФ в плазме крови проведены через 3 ч, 1, 3, 5, 10 и 15 сут после облучения на 12 овцах, которые были разделены по принципу аналогов на две группы по шесть овец в каждой [23].

Установлено, что к 5-м сут уровень цАМФ у леченных продигиозаном облученных животных достоверно повышался, а у не леченых был существенно ниже исходной концентрации ($p \leq 0.01$). Достоверное различие между подопытной и контрольной группами отмечено на 5- и 15-е сут. При исследовании концентрации цГМФ значительный подъем его уровня наблюдали как в контрольной, так и в подопытной группах овец через 3 ч после облучения. При этом в подопытной группе этот пик существенно превосходил уровень цГМФ в контрольной группе. При анализе соотношения циклических нуклеотидов статистически значимое межгрупповое различие в виде повышенного уровня цАМФ по сравнению с цГМФ выявлено на 3-, 5- и 10-е сут после облучения.

На 3-м этапе исследована терапевтическая противолучевая эффективность продигиозана при отсроченных сроках введения препарата — через 3 и 24 ч от момента облучения овец в дозе 4 Гр.

Опыты были проведены на 22 овцах массой тела 44 ± 0.7 кг, разделенных на три группы. В первую группу включили шесть, во вторую — 10, в третью — шесть животных. Всех животных подвергали общему внешнему облучению γ -лучами ¹³⁷Cs в дозе 4 Гр, при мощности дозы 0.8 Гр/час. Животным 1-й и 2-й групп внутримышечно вводили продигиозан в дозе 5 мкг/кг соответственно через 3 и 24 ч после облучения. Животным 3-й группы продигиозан не вводили. У животных изучали общее состояние, выживаемость.

Опытами установлено, что введение продигиозана через 3 и 24 ч после радиационного воздействия, так же как и после введения через 10–20 мин после облучения, снижало степень тяжести клинических проявлений лучевой болезни и повышало выживаемость животных. В течение 60 дней после облучения и лечения через 3 и 24 ч

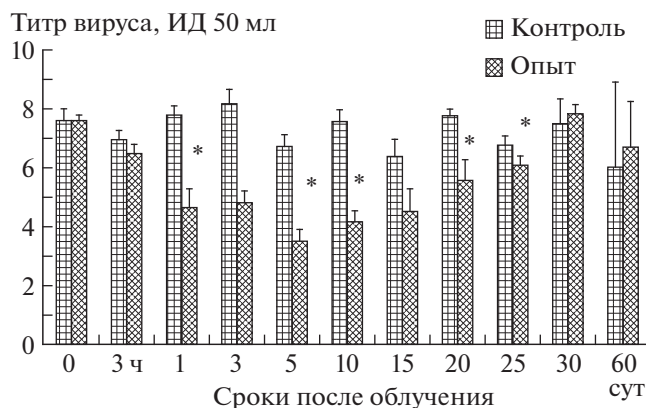


Рис. 2. Интерферогенная способность продигиозана у облученных в дозе 4 Гр овец.

выжили соответственно три из шести и восемь из 10, в контроле — две из шести овец.

Обобщенные данные о влиянии продигиозана на выживаемость овец при острой лучевой болезни приведены в табл. 5.

Представленные в табл. 5 данные свидетельствуют о благоприятном влиянии внутримышечного введения продигиозана в диапазоне доз от 1 до 25 мкг/кг через 10–20 мин, 3, 24 ч после облучения на выживаемость овец при костномозговой форме острой лучевой болезни. О лечебной эффективности препарата свидетельствует повышение выживаемости в 2.6 раз (на 53.9%). Различие между опытом и контролем, оцененное по точному методу Фишера, было значимо при $p \leq 0.01$.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе в эксперименте на овцах изучена терапевтическая противолучевая эффективность продигиозана. Препарат использовали в варианте однократного внутримышечного применения после воздействия на животных общего внешнего γ -излучения в дозе, вызывающей кровяную форму острой лучевой болезни.

В ходе проведенных работ вначале были определены оптимальные дозы и сроки введения продигиозана для лечения острой лучевой болезни овец, вызванной общим внешним γ -облучением в дозе 4 Гр ($СД_{80-100/60}$). Для дальнейшего изучения на облученных овцах была избрана доза препарата с минимальным побочным действием — 5 мкг/кг, которая оказала достоверное положительное влияние на течение и исход лучевой болезни овец с массой тела от 30 до 60 кг. Эта доза препарата находится на нижней границе диапазона доз продигиозана профилактического и терапевтического противолучевого действия, установленных для облученных мышей, морских свинок, собак и человека [12].

Таблица 5. Лечебная эффективность продигиозана при γ -облучении овец в дозе 4 Гр по критерию выживаемости

Время введения продигиозана после облучения	Доза продигиозана, мкг/кг	Всего овец	Выжило	% выживаемости
10–20 мин	1	3	3	100
	5	3	3	100
	25	3	3	100
	контроль	3	1	33.3
3 ч	5	14	14	100
	контроль	15	5	33.3
24 ч	5	6	3	50
	контроль	10	8	80
Всего: 10–20 мин – 24 ч	1–25	6	2	33.3
	контроль	39	34	87.2
		24	8	33.3

Аналогичным эффектом обладает раннее применение противолучевых средств патогенетической терапии из группы радомитигаторов – от нескольких часов до 2–4 сут после облучения [24–28]. Механизм их противолучевого эффекта связан со способностью ускорять процессы пострadiационной регенерации клеток кроветворной системы и, прежде всего, восстановления миелопоэза, причем безотносительно пути, по которому ими достигнут данный фармакологический эффект. Это, например, может быть как следствие генной экспрессии под действием эстрогенов, либо реализация действия адьювантов иммунологических реакций.

В соответствии с новейшей бинарной классификацией противолучевых средств продигиозан находится в группе экзогенных иммуномодуляторов с Толл-подобной рецепцией сигнала через рецепторы цитокинов [29]. Далее сигнал переходит на гены, в результате экспрессии которых появляются белки эффекторы, реализующие противолучевой эффект. Эффект этот состоит в активации процессов врожденного неспецифического иммунитета, включающего в качестве обязательного компонента усиленную мобилизацию, активацию и пролиферацию клеток гранулоцитарного и лимфоидного ряда. В организме экзогенные иммуномодуляторы действуют как индукторы естественных иммуномодуляторов – цитокинов, которые способствуют активации различных ростков костного мозга и, как следствие, увеличению количества зрелых клеток в кровеносном русле [30–32].

Этот эффект в наших исследованиях был четко выражен во влиянии продигиозана на динамику содержания лейкоцитов в венозной крови облученных овец. Одной из точек приложения действия продигиозана оказались нейтрофилы, чис-

ло которых у облученных животных повышалось с одновременной стимуляцией фагоцитарной активности гранулоцитов.

В конечном итоге, как указывают литературные данные, имеет место стимуляция секреции клетками ретикулоэндотелиальной системы цитокинов, вызывающих инициацию у Т-лимфоцитов, фибробластов и эндотелиальных клеток продукции эндогенных гемопоэтических ростовых факторов, напрямую ведущих к активации миелопоэза [33–35].

Формирование повышенной радиорезистентности под воздействием продигиозана требует определенного времени. В наших опытах выраженный противолучевой эффект отмечен при его применении в период от нескольких минут и часов до 1 сут после облучения в дозе, вызывающей кроветворный синдром. Это предоставляет возможность его применения в качестве средств неотложной и ранней терапии острой лучевой болезни.

По своему фармакологическому действию продигиозан является также средством, стимулирующим функцию коры надпочечников [36]. В наших опытах об этом свидетельствовало повышение уровня кортизола в сыворотке крови облученных овец. Можно предполагать, что в реализации защитного действия продигиозана важное место занимают стимуляция синтеза и эмиссия кортикостероидных гормонов надпочечниками. Тем самым препарат стимулировал фагоцитарную активность лейкоцитов и ретикулоэндотелиальную систему, повышал активность некоторых гормональных факторов иммунитета, инициировал образование эндогенного интерферона.

Полученные нами данные о проявлении интерферогенной активности сыворотки крови под влиянием продигиозана позволяют полагать,

что образование интерферона стимулирует радиорезистентность организма.

ВЫВОДЫ

1. Впервые в опытах на овцах выявлена высокая противолучевая терапевтическая эффективность бактериального полисахарида продигиозана. Однократное внутримышечное введение продигиозана в дозе 5 мкг/кг в течение первых суток после γ -облучения дозе 4 Гр_(80–100/60) приводит к стимуляции комплекса защитных реакций организма, способствует восстановлению неспецифической резистентности организма.

2. Продигозан производится отечественной промышленностью, применяется в небольших дозировках и методами, близкими к групповым (внутримышечно), побочные реакции незначительны и быстропроходящи, и обеспечивает, по сравнению с контролем, снижение интенсивности проявления геморрагического синдрома, положительное влияние на показатели венозной крови, естественную иммунологическую реактивность и повышенную выживаемость более чем на 50%.

Работа выполнена при поддержке субсидии Министерства образования и науки Российской Федерации по соглашению № 14.601.21.0016, уникальный идентификатор соглашения: RFME-FI60117X0016.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов А.Е., Рождественский Л.М. Аналитический обзор схем лечения острой лучевой болезни, используемых в эксперименте и клинике // Радиационная биология. Радиоэкология. 2008. Т. 48. № 3. С. 287–302.
2. Андрущенко В.Н., Иванов А.А., Мальцев В.Н. Противолучевое действие веществ микробного происхождения // Радиационная биология. Радиоэкология. 1996. Т. 36. № 2. С. 195–208.
3. Васин М.В. Противолучевые лекарственные средства. М.: Изд-во РМАПО, 2010. 180 с.
4. Васин М. В. Классификация противолучевых средств как отражение современного состояния и перспективы развития радиационной фармакологии // Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53. № 5. С. 459–467.
5. Васин М.В. Классификация средств профилактики лучевых поражений как формирование концептуального базиса современной радиационной фармакологии // Радиационная биология. Радиоэкология. 1999. Т. 29. № 2–3. С. 212–222.
6. Васин М.В. Средства профилактики и лечения лучевых поражений: Учебное пособие. М.: Бюро оперативной полиграфии ГНИИИ военной медицины МО РФ, 2000. 264 с.
7. Гребенюк А.Н., Аксёнова Н.В., Зацепин В.В. и др. Влияние препарата В-190 и интерлейкина-1 β на динамику количества клеток периферической крови и функциональный статус нейтрофилов облученных мышей // Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53. № 3. С. 290–295.
8. Гребенюк А.Н., Легеза В.И. Противолучевые свойства интерлейкина-1. СПб.: ООО “Изд-во ФОЛИАНТ”, 2012. 216 с.
9. Легеза В.И., Чигарева Н.Г., Абдуль Ю.А., Галеев И.Ш. Цитокины как средства ранней патогенетической терапии радиационных поражений. Эффективность и механизм действия // Радиационная биология. Радиоэкология. 2000. Т. 40. № 4. С. 420–424.
10. Рождественский Л.М., Коровкина Э.П., Дешевой Ю.Б. Применение рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 β (бета-лейкина) для экстренной терапии острой лучевой болезни тяжелой степени у собак // Радиационная биология. Радиоэкология. 2008. Т. 48. № 2. С. 185–194.
11. Антибиотики, бактериальные полисахариды, интерферон / Под ред. З.В. Ермольевой. М., 1968. 255 с.
12. Ермольева З.В., Вайсберг Г.Е. Стимуляция неспецифической резистентности организма и бактериальные полисахариды. М.: Медицина, 1976. 183 с.
13. Чертков К.С., Андрианова И.Е., Андрущенко В.Н. и др. Достижения и перспективы комплексной терапии острой лучевой болезни в эксперименте // Радиационная биология. Радиоэкология. 1999. Т. 39. № 5. С. 563–567.
14. Методические указания по экспериментальному и клиническому изучению средств терапии радиационных поражений и медико-биологические требования к этим средствам. М., 1978. 48 с.
15. Кондрахин И.П. и др. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии. М.: Агропромиздат, 1985. 287 с.
16. Кост Е.А. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. М.: Медицина, 1975. 360 с.
17. Грант Х.Я., Яворковский Л.И., Блумберг И.А. Сравнительная оценка некоторых методов количественного определения лизоцима в сыворотке крови // Лаб. Дело. 1973. № 5. С. 300–303.
18. Смирнова О.В. Определение бактерицидной активности сыворотки крови методом фотонейтриметрии // ЖМЭИ. 1966. № 4. С. 8–11.
19. Клемпарская Н.Н., Раева Н.В. Исследование аутосенсбилизации при лучевой болезни методом Уанье // Бюл. эксперим. биол. мед. 1961. Т. 58. № 5. С. 77–81.
20. Садыхов А.С., Еришов Ф.И., Новохатский А.С. и др. Индукторы интерферона. Ташкент: ФАН, 1975. 305 с.
21. Урбах В.Ю. Биометрические методы. М.: Наука, 1964. 415 с.
22. Автоматический расчет U-критерия Манна–Уитни. <http://math.semestr.ru/corel/mann-whitney.php>.
23. Прилепская Е.П., Грехова Н.В., Бударков В.А. Уровень циклических нуклеотидов в плазме крови облученных гамма-лучами овец при лечении продигиозаном // Мат. науч. конф., посвященная 25-летию ВНИИВВиМ. (Секция Ветеринарная радиобиология). Покров, 1984. С. 52–53.

24. *Рождественский Л.М.* Цитокины в аспекте патогенеза и терапии острого лучевого поражения // Радиационная биология. Радиоэкология. 1997. Т. 37. Вып. 4. С. 590–596.
25. *Лебедев В.Г., Мороз Б.Б., Дешевой Ю.Б. и др.* Исследование механизмов противолучевого действия интерлейкина-1 бета на модели длительных культур костного мозга // Радиационная биология. Радиоэкология. 2002. Т. 42. № 1. С. 60–64.
26. *Рогачева С.А., Симбирцев А.С., Муксинова К.Н.* Экспериментальное изучение противолучевых эффектов интерлейкин-1бета // Радиационная биология. Радиоэкология. 1994. Т. 34. № 3. С. 419–423.
27. *Shannon M.F., Coles L.S., Vadas M.A., Cockerill P.N.* Signals for activation of the GM-CSF promoter and enhancer in T cells // Crit. Rev. Immunol. 1997. V. 17. P. 301–323.
28. *Aggarwal B.B., Takada Y., Shishodia S. et al.* Nuclear transcription factor NF-kappa B: role in biology and medicine // Ind. J. Exp. Biol. 2004. V. 42. № 4. P. 341–353.
29. *Рождественский Л.М.* Классификация противолучевых средств в аспекте их фармакологического сигнала и сопряженности со стадией развития лучевого поражения // Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. Т. 57. № 2. С. 117–135.
30. *Chung Y.J., Park B.B., Kang Y.J. et al.* Unique effects of Stat3 on the early phase of hematopoietic stem cell regeneration // Blood. 2006. V. 108. P. 1208–1215.
31. *Qin H., Wilson C.A., Lee S.J. et al.* LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kB and Stat-lalpha in macrophages and microglia // Blood. 2005. V. 106. P. 3114–3122.
32. *Neta R., Oppenheim J.J.* Cytokines in therapy of radiation injury // Blood. 1988. V. 72. P. 1093–1095.
33. *Herodin F., Bourin P., Mayol J.F. et al.* Short-term injection of antiapoptotic cytokine combinations soon after lethal gamma-irradiation promotes survival // Blood. 2003. V. 101. P. 2609–2616.
34. *Лебедев В.Г., Мороз Б.Б., Дешевой Ю.Б. и др.* Исследование механизмов противолучевого действия интерлейкина-1 бета на модели длительных культур костного мозга // Радиационная биология. Радиоэкология. 2002. Т. 42. № 1. С. 60–64.
35. *Рогачева С.А., Симбирцев А.С., Муксинова К.Н.* Экспериментальное изучение противолучевых эффектов интерлейкин-1бета // Радиационная биология. Радиоэкология. 1994. Т. 34. № 3. С. 419–423.
36. *Крыжановский С. А., Вититнова М. Б.* Современные лекарственные средства: Новейший справочник. М.: Рипол-Классик, 2016. 800 с.

Evaluation of Therapeutic Efficacy of Prodigiosan in Experiments on Irradiated Sheep

V. A. Budarkov^{a, #}, N. V. Grekhova^a, G. V. Kozmin^b

^aFederal State Budgetary Scientific Institution “Federal Research Center for Virology and Microbiology”, Volginsky, Russia

^bRussian Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk, Russia

[#]E-mail: budarkovva@yandex.ru

Radioprotective therapeutic efficacy of prodigiosan was evaluated through examination of the levels of total erythrocytes, thrombocytes, leucocytes, neutrophils, lymphocytes, and the phagocytic activity of neutrophils in venous blood; also studied was bactericidal blood serum, lysozyme and interfering activity indices, cortisol concentrations, levels of autoantibodies against the hemolysate, spleen cells and testis lysates in blood sera, cAMP and cGMP levels in blood plasma, and survival of the sheep affected by a medullary form of the acute radiation syndrome. It is found that a single intramuscular injection of prodigiosan at a dose of 5 mg/kg administered within 10 to 20 min, 3 and 24 hours after external γ -irradiation with ^{137}Cs quanta at a dose of 4 Gy ($\text{LD}_{80-100/60}$), with the dose rate intensity of 0.8 Gy/hour, can reduce the severity of the hemorrhagic syndrome, post-radiation thrombocytopenia and leukopenia, as well as activate the adrenal cortex function, stimulate the endogenous interferon formation, enhance the phagocytic capacity of neutrophils, raise the cAMP concentration in blood plasma and the level of autoantibody against testis lysate, which results in the survival rates that are 54.2% higher in the sheep exposed to radiation as compared to the controls.

Keywords: acute radiation sickness, sheep, prodigiosan, leukocytes, neutrophils, cortisol, interferon, cyclic nucleotides