

УДК 615.849

# Радиозащитные свойства препарата «Димефосфон» на модели лучевого поражения *in vivo*

Д. А. Киселёва<sup>1\*</sup>, М. А. Мельченко<sup>1,2</sup>, О. И. Яровая<sup>1,2</sup>, Н. В. Басов<sup>1,2</sup>, А. Д. Рогачев<sup>1,2</sup>,  
А. Г. Покровский<sup>2</sup>, Н. Ф. Салахутдинов<sup>1</sup>, Т. Г. Толстикова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения РАН, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>2</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

\*E-mail: dasha.halikova@mail.ru

Поступила в редакцию 26.03.2025

Принята к печати 02.07.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27662

**РЕФЕРАТ** Лучевая терапия является одним из наиболее широко используемых видов терапии опухолей. Однако применение лучевой терапии ограничивается ее токсичностью по отношению к здоровым тканям. Поиск эффективных радиозащитных средств остается одной из главных целей радиационной онкологии и радиобиологии. В данной работе радиозащитные свойства препарата «Димефосфон», обладающего антиацидотическими, противоопухолевыми, антиоксидантными свойствами, изучали на животных с экспериментальным лучевым поражением. Показано, что 14-дневное введение препарата в дозе 750 мг/кг после однократного облучения мышей CD-1 в дозе 5 Гр оказывает локальный радиозащитный эффект, уменьшая тяжесть радиационно-индуцированного повреждения кишечного эпителия и капсулы селезенки. По результатам метаболомного исследования выявлено достоверное увеличение содержания ключевых метаболитов, отвечающих за антиоксидантные свойства, таких как альфа-токоферол, рибозид никотинамида, N-карбамоил-L-аспартат, аденилосукцинат, что свидетельствует о повышении уровня антиоксидантной защиты под действием препарата «Димефосфон».

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** радиозащитные свойства, лучевое поражение, Димефосфон, метаболомный скрининг.

## ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания остаются одной из ведущих причин смерти во всем мире. По состоянию на 2023 г. в Российской Федерации выявлено более 670 тысяч новых случаев злокачественных новообразований, прирост данного показателя по сравнению с 2022 г. составил 8.0% [1]. Лучевая терапия (ЛТ) относится к эффективным способам борьбы со злокачественными новообразованиями. Считается, что примерно 50% онкологических больных получают ЛТ, при этом около 70% нуждаются в ее применении, причем в ряде случаев ЛТ является единственным методом лечения рака [2]. Основным фактором, ограничивающим применение ЛТ, является отсутствие селективности в отношении опухолевых клеток, в результате чего происходит нарушение метаболических процессов в здоровых клетках и органах с развитием тяжелых осложнений, в том числе с возникновением лучевого поражения [3]. Появление более селективных методов ЛТ не исключает токсичности по отношению к здоровым тканям, поэтому активно раз-

рабатываются подходы, в которых лучевая терапия сочетается с системной терапией радиопротекторными препаратами. Важно подчеркнуть, что зарегистрированные на территории Российской Федерации радиозащитные средства обладают серьезными побочными эффектами, такими как разрыв селезенки, острый респираторный дистресс-синдром, альвеолярное кровотечение, атриовентрикулярная блокада, что является ограничивающим фактором их широкого применения [4–6]. По этой причине в настоящее время активно изучаются природные соединения на предмет их радиозащитной активности, однако все разработки находятся на стадии доклинических исследований [7, 8]. В связи с этим, поиск эффективных, низкотоксичных препаратов, защищающих здоровые ткани от повреждающего воздействия ионизирующего излучения во время проведения курса ЛТ, остается важной задачей радиационной онкологии и радиобиологии.

Для проведения доклинических исследований новых радиозащитных средств и оптимизации стра-

тегий лечения различных видов опухолей необходимо иметь адекватные животные модели лучевого поражения, которые позволяют надежно и точно воспроизводить основные клинические проявления и патогенетические механизмы развития поражения у человека. Ранее была продемонстрирована пригодность применения излучения рентгеновского спектра с пиковым напряжением 320 кВ для формирования лучевых поражений на моделях *in vivo* [9].

Нами разработана методика экспериментального лучевого поражения лабораторных животных (мышей), позволяющая оценить эффективность и безопасность радиозащитных средств. Для отработки методики в качестве радиопротекторного средства был выбран оригинальный отечественный препарат «Димефосфон». Этот препарат представляет собой водный раствор диметилового эфира 1,1-диметил-3-оксобутилфосфоновой кислоты (рис. 1), он обладает низкой токсичностью, высокой биодоступностью, легко проникает через гистогематические барьеры [10, 11].

В 1983 г. препарат в виде 15% раствора для перорального и наружного применения был одобрен для клинического использования в качестве антиацидотического и вазоактивного средства [12–14]. Позднее была проведена оценка эффективности трех радиопротекторных соединений (масло облепихи, масляный раствор Евдощенко, препарат «Димефосфон») при лучевой терапии рака гортани. Применение препарата «Димефосфон» приводило к наименьшим количественным различиям в толщине воздушного столба гортани, характеризующей проявление острой лучевой реакции, до начала ЛТ и после получения дозы в 40 Гр [15].

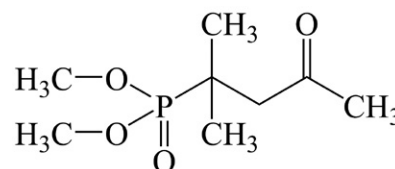
## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Животные

Все манипуляции с животными проводили в строгом соответствии с законодательством РФ, решением «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» от 03.11.2016 г. № 81 и положениями Директивы 2010/63/EU Парламента ЕС и Совета Европейского союза от 22.09.2010 г. о защите животных, используемых в научных целях, и были одобрены биоэтической комиссией ЛФИ НИОХ СО РАН (протокол № Р-14-2025-01-01 от 10.01.2025 г.).

Самки аутбредных мышей CD-1 массой 25–30 г были получены из вивария SPF Института цитологии и генетики СО РАН, Россия. Животных содержали при оптимальных условиях температуры ( $21 \pm 1.5^\circ\text{C}$ ), влажности (40–60%), с 12-часовым

Рис. 1. Структурная формула активного вещества препарата «Димефосфон»



циклом день/ночь со свободным доступом к воде и гранулированному корму. Перед экспериментами мышей в течение недели адаптировали к условиям помещения.

### Исследуемое соединение

В работе использовали препарат Димефосфон® (ОАО «Татхимфармпрепараты», г. Казань, Россия), который вводили внутривенно в дозе 750 мг/кг по 0.1 мл на 10 г массы тела. Первую дозу вводили за 3 ч до облучения, а затем препарат вводили однократно в этой же дозе каждые 24 ч в течение 14 дней.

### Дизайн эксперимента и установка

Для экспериментального моделирования лучевого поражения у мышей использовали рентгеновскую установку X-RAD 320 (Precision X-Ray Inc., Branford, CT, США) с фиксированным расстоянием от источника излучения (SSD 50 см), с фильтром средней жесткости (0.75 мм олово, 0.25 мм медь, 1.5 мм алюминий). Общее облучение мышей ( $n = 6$ ) проводили однократно в дозах 5 и 7.5 Гр при мощности дозы  $\sim 0.98$  Гр/мин. Затем на 4, 7, 11 и 14 сутки после облучения оценивали выживаемость животных, что позволило выбрать дозу облучения для изучения радиозащитного действия препарата.

На следующем этапе оценивали радиозащитные свойства препарата «Димефосфон» на мышках, однократно облученных подобранной дозой. Животных случайным образом делили на три группы ( $n = 8$ ): мыши первой группы (1) получали препарат «Димефосфон» в дозе 750 мг/кг (ДМФН); (2) – «Димефосфон» в дозе 750 мг/кг + общее облучение (ДМФН+ОБЛ); (3) – общее облучение (ОБЛ).

До облучения (0 точка), а затем на 4, 7, 11 и 14 сутки определяли массу тела животных, производили забор крови из ретроорбитального синуса для проведения метаболического и гематологического анализа. На 14 день всех мышей умерщвляли, органы (тимус, сердце, легкие, печень, селезенка) взвешивали для расчета индекса их массы и забирали для гистологического исследования.

### Гематологическое исследование

Общий анализ крови проводили с помощью автоматического гематологического анализатора MINDRAY BC-2800 Vet (Shenzhen Mindray Animal Medical Technology Co. Ltd., Китай). Использовали образцы

периферической крови (20 мкл), собранные в пробирки со стандартным количеством изотонического разбавителя. Определяли общее количество лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов, содержание гемоглобина и гематокрит.

### Гистологическое исследование

Полученный материал (тимус, сердце, легкие, печень, селезенка) взвешивали для расчета массовых коэффициентов (то есть процентного отношения массы органа к массе тела), а затем селезенку и тонкий кишечник фиксировали в нейтральном забуференном формалине (10%), обезживали в этаноле и ксилоле различных концентраций на комплексе MICROM (Carl Zeiss, Германия), после чего образцы тканей заливали в парафин. Срезы толщиной 4 мкм получали на ротационном микротоме, окрашивали гематоксилином-эозином. Образцы исследовали на световом микроскопе при увеличении  $\times 100$  с предварительной настройкой света по Келлеру. Морфометрический анализ снимков гистологических препаратов и подсчет расстояния между ворсинками, длины ворсинок кишечного эпителия, а также толщины капсулы селезенки проводили в программном обеспечении AxioVision для оценки степени повреждения органов.

### Метаболомный скрининг

**Пробоподготовка.** Для метаболомного анализа готовили образцы сухих пятен цельной крови. Аликвоту крови объемом 10 мкл наносили на абсорбционные карты Whatman 903<sup>TM</sup> (GE Healthcare, #10534612, США) и высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 3 ч. Образцы помещали на хранение при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  до момента пробоподготовки, которую проводили в соответствии с протоколом, описанным в работе [16]. Сухие пятна крови вырезали полностью, помещали в полипропиленовые пробирки объемом 0.5 мл и добавляли 150 мкл предварительно охлажденной смеси  $\text{MeOH}-\text{ACN}-\text{H}_2\text{O}$  (40:40:20, об/об/об). Образец инкубировали при  $+4\dots+5^{\circ}\text{C}$  в течение 20 мин, затем центрифугировали при 16 000 об/мин (около 24000 g, центрифуга Eppendorf 5417R) в течение 10 мин при  $+4^{\circ}\text{C}$ . Супернатант переносили в пластиковые вставки для хроматографических виал и анализировали.

### Анализ образцов

Образцы анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС) согласно [17]. Хроматографическое разделение проводили с использованием хроматографа LC-20AD

Prominence (Shimadzu, Япония), оснащенного автодозатором SIL-20AC (Shimadzu, Япония) и термостатом для колонок CTO-10ASvp. Подвижная фаза состояла из элюента А (раствор 20 мМ карбоната аммония в воде, доведенный 25% водным раствором аммиака до pH 9.8, и 5 об.% ацетонитрила) и элюента Б (100% ацетонитрил). Каждый образец анализировали дважды: в режимах гидрофильной (ГФХ) и обращенно-фазовой (ОФХ) хроматографии. Хроматографию проводили в следующих условиях. Градиент ГФХ: 0 мин – 98% Б, 2 мин – 98% Б, 6 мин – 0% Б, 10 мин – 0% Б. Далее колонку уравнивали в течение 4 мин. Градиент ОФХ: 0 мин – 0% Б, 1 мин – 0% Б, 6 мин – 98% Б, 16 мин – 98% Б. Далее колонку уравнивали в течение 3 мин. Скорость потока в каждом анализе – 300 мкл/мин. Объем пробы 2 мкл. Анализ в обоих режимах хроматографии проводили с использованием монолитной колонки ( $2 \times 60$  мм) на основе 1-винил-1,2,4-триазола. Монолитный материал колонки был синтезирован согласно [18]: в стеклянной трубке с внутренним диаметром 2 мм проводили сополимеризацию смеси, состоящей из мономеров стирол/дивинилбензол/1-винил-1,2,4-триазол в объемном соотношении 10 : 50 : 40 соответственно.

Масс-спектрометрическую детекцию проводили с использованием масс-спектрометра API 6500 QTRAP (AB SCIEX, США), оснащенного источником ионизации электрораспылением. Детектировали 489 метаболитов в режиме MRM (multiple reaction monitoring, мониторинг множественных реакций) в области положительной и отрицательной ионизации с переключением полярности. Основные масс-спектрометрические параметры: напряжение источника ионов (IS) 5500 В для положительной и  $-4500$  В для отрицательной ионизации; температура газа-осушителя –  $475^{\circ}\text{C}$ , газ в ячейке соударений (CAD) – «высокий», давление газа-распылителя (GS1), газа-осушителя (GS2) и газовой завесы (CUR) – 33, 33 и 30 фунт/дюйм<sup>2</sup> соответственно. Потенциал декластеризации (DP) составлял  $\pm 91$  В, потенциал входа (EP)  $\pm 10$  В, потенциал на выходе из ячейки соударений (CXP)  $\pm 9$  В. Время сканирования перехода MRM (dwell time) – 3 мс. Управление устройством и сбор информации осуществляли с помощью программного обеспечения Analyst 1.6.3 (AB SCIEX). Переходы ионов-предшественников и фрагментных ионов, названия метаболитов, время фрагментации и соответствующие энергии столкновений адаптированы из [19, 20].

### Статистическая обработка данных

Статистический анализ производили с использованием программного обеспечения Statistica

10.0 (StatSoft, США). Нормальность полученных данных проверяли с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Для выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, при отсутствии нормального распределения U-критерий Манна–Уитни. Результаты представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm SEM$ ) или среднего  $\pm$  доверительный интервал для непараметрической выборки. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0.05$ . Графики построены с использованием библиотеки Seaborn (Python) и программы Origin.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Оценка выживаемости животных после облучения в дозах 5 и 7.5 Гр

На первом этапе исследования подбирали оптимальную дозу облучения для моделирования лучевого поражения у экспериментальных животных. Общее облучение животных в дозе 7.5 Гр сопровождалось 100% летальностью на 11 сутки эксперимента (рис. 2). Таким образом была установлена абсолютно летальная (гибель 100% животных) доза облучения, последующее использование которой не представлялось целесообразным. После однократного облучения мышей в дозе 5 Гр на конец эксперимента (14 сутки) 50% животных оставались живыми, что соответствует сублетальной (гибель 50% животных,  $LD_{50}$ ) дозе облучения.

### Выживаемость, средняя масса и гематологические показатели мышей после облучения в дозе 5 Гр на фоне введения препарата «Димефосфон»

На втором этапе оценивали влияние перорального введения препарата «Димефосфон» на организм экспериментальных животных, подвергнутых однократному общему облучению в дозе 5 Гр.

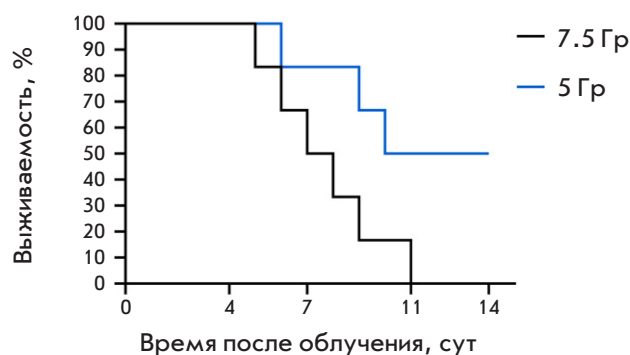


Рис. 2. Выживаемость мышей CD-1 после однократного облучения в дозах 5 и 7.5 Гр ( $n = 6$ )

Применение препарата «Димефосфон» не увеличило выживаемость животных после воздействия рентгеновского излучения (рис. 3А). На 14 сутки эксперимента выживаемость в группе ОБЛ составляла 50%, в группе ДМФН+ОБЛ — около 40%, что, вероятно, связано с различной радиационной чувствительностью животных [21], поскольку  $LD_{50}$  при пероральном введении препарата у мышей составляет 3 г/кг [10]. Кроме того, наблюдалось достоверное снижение средней массы облученных животных относительно исходных значений без статистической разницы между облученными (ДМФН+ОБЛ, ОБЛ) и необлученными (ДМФН) группами (рис. 3Б).

Согласно опубликованным данным, в развитии лучевого поражения выделяют три синдрома: гемопоэтический (возникает при дозах свыше 1 Гр), желудочно-кишечный (доза от 6 до 15 Гр) и цереброваскулярный (доза более 20 Гр), то есть после воздействия ионизирующего излучения в первую очередь повреждаются кроветворная система, селезенка, тимус, эпителий кишечника [22].

Динамика гематологических показателей в группах облученных животных была идентичной. На 4

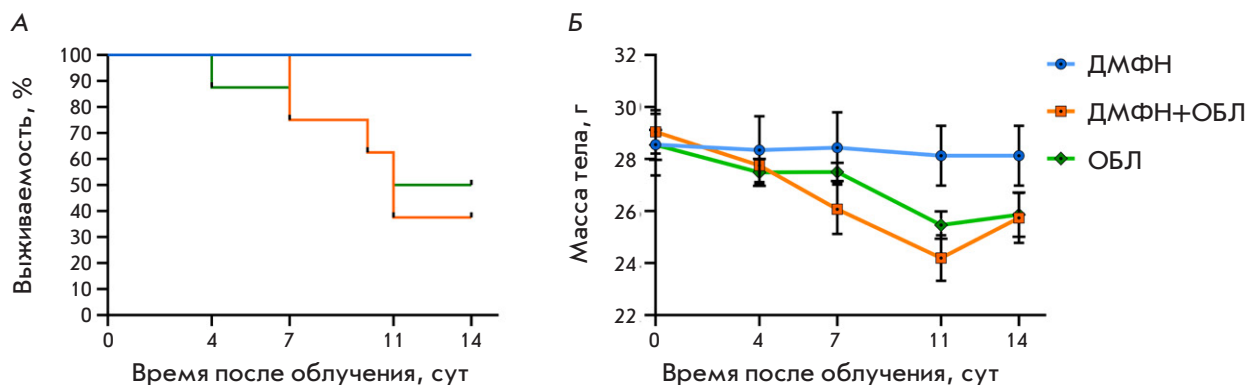
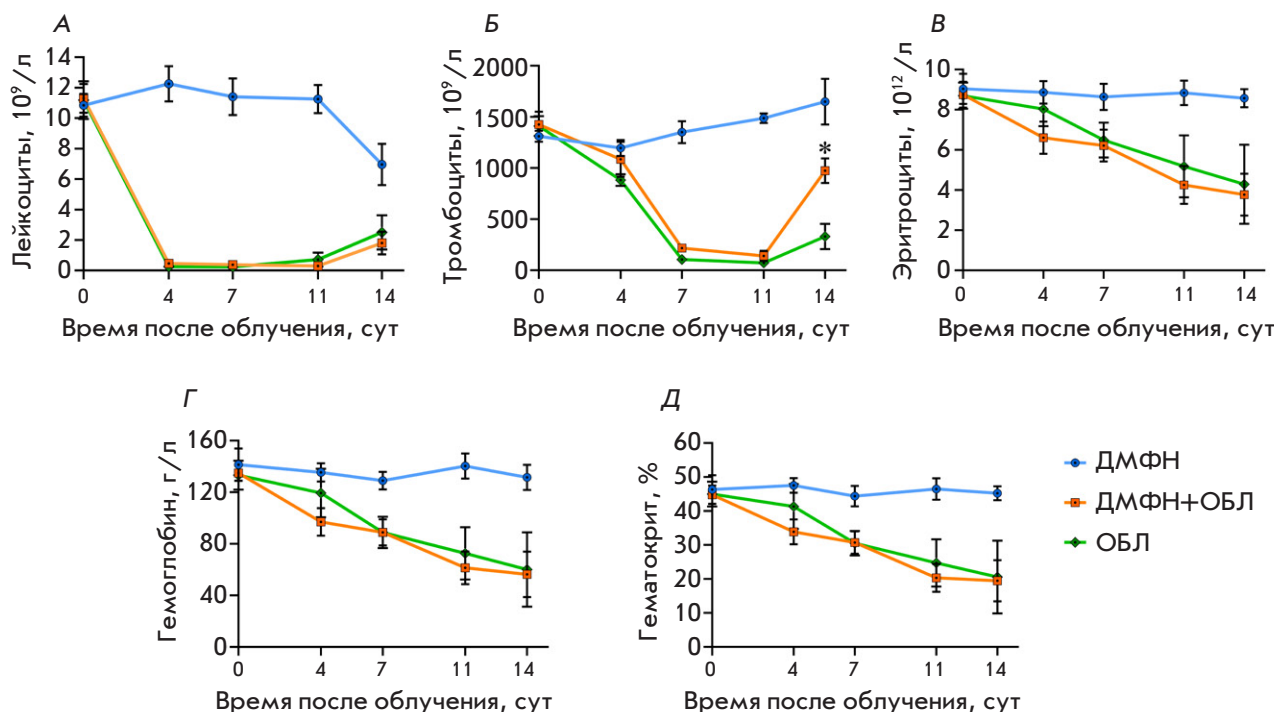


Рис. 3. Эффект перорального введения препарата «Димефосфон» в дозе 750 мг/кг за 3 ч до и ежедневно после общего облучения в дозе 5 Гр у мышей CD-1 ( $n = 8$ ,  $M \pm SEM$ ). А — выживаемость животных, Б — динамика средней массы тела животных





**Рис. 4.** Динамика гематологических показателей крови мышей CD-1 ( $n = 8$ ,  $M \pm SEM$ ) под действием препарата «Димефосфон» после облучения в дозе 5 Гр. А – лейкоциты, Б – тромбоциты, В – эритроциты, Г – гемоглобин и Д – гематокрит на 4-, 7-, 11-, 14-й день после облучения. Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни, \* $p < 0.05$  по сравнению с ОБЛ

день после облучения у мышей ДМФН+ОБЛ и ОБЛ наблюдалась острая лейкопения, причем восстановление количества лейкоцитов в обеих группах началось на 14-й день после облучения (рис. 4А). Снижение количества эритроцитов было связано с одновременным снижением гематокрита и гемоглобина с 4-го по 14-й день (рис. 4В–Д). Уровень тромбоцитов резко снизился на 7-й день, но начал восстанавливаться на 14-й день после облучения. Введение препарата «Димефосфон» способствовало статистически значимому ускорению восстановления только уровня тромбоцитов на 14-й день у облученных животных (рис. 4Б).

#### Гистологическое исследование внутренних органов мышей после облучения в дозе 5 Гр на фоне введения препарата «Димефосфон»

Воздействие рентгеновского излучения привело к статистически значимому изменению массового коэффициента тимуса (табл. 1). Наблюдаемая острая инволюция тимуса (уменьшение массового коэффициента более чем в 2 раза) в группах ДМФН+ОБЛ и ОБЛ, вероятно, связана с резким сокращением количества Т-лимфоцитов и эпителиальных клеток тимуса [23]. У мышей облученных групп также наблюдалось увеличение массового ко-

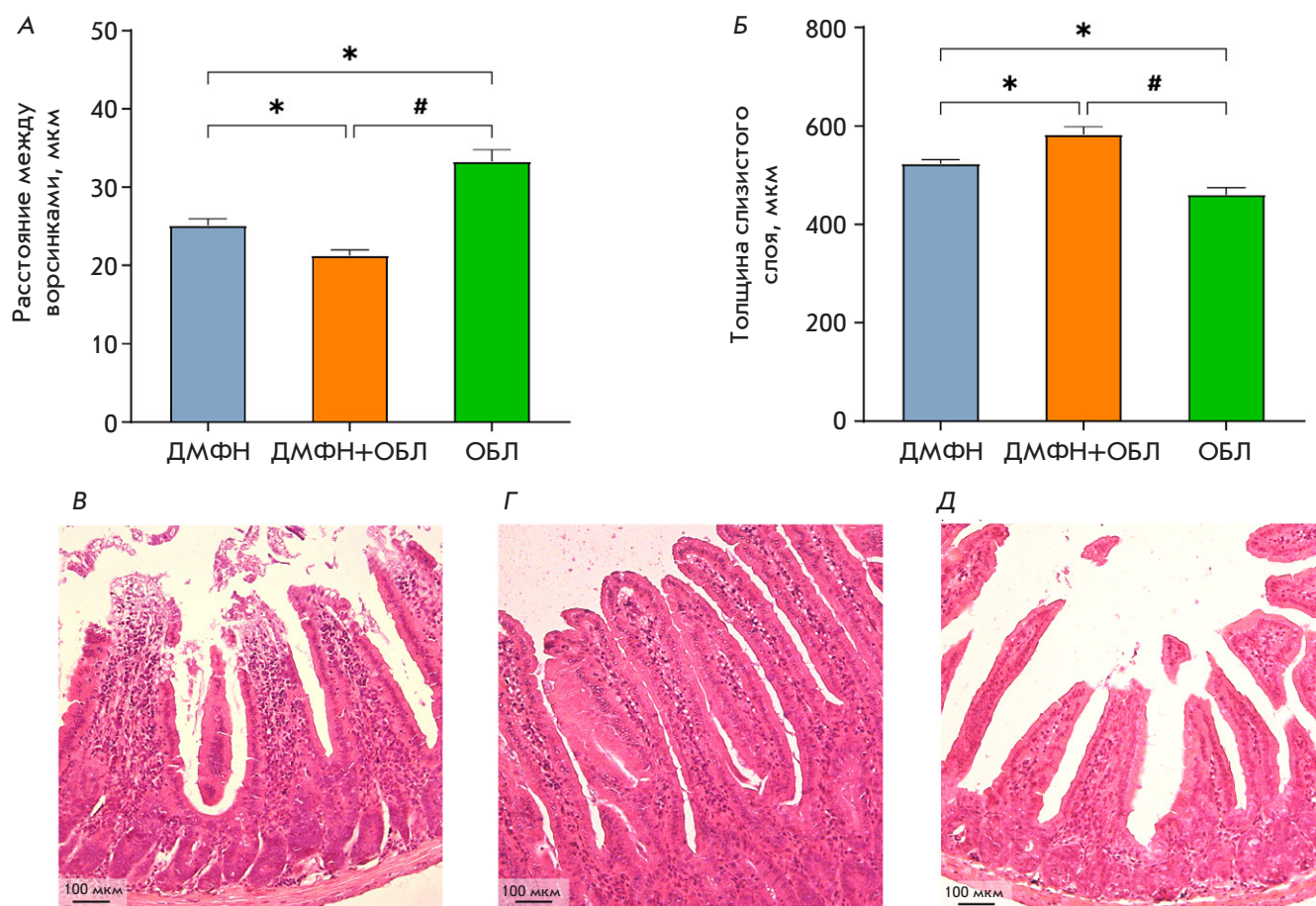
эффициента селезенки, однако эффект не был статистически значимым.

Согласно результатам гистологического исследования, мыши группы ДМФН имели типичное строение тонкого кишечника с нормальной длиной ворсинок и глубиной крипт (рис. 5В). Напротив, в группе ОБЛ выявлено радиационно-индуцированное повреждение тонкого кишечника: дегенерация и укорочение ворсинок, увеличение расстояния между ними (рис. 5А,Д). Кроме того, толщина слизистой тонкого кишечника была меньше, чем у мышей ДМФН, ДМФН+ОБЛ (рис. 5Б).

**Таблица 1.** Массовый коэффициент органов (%) мышей CD-1 после общего облучения в дозе 5 Гр ( $M \pm SEM$ )

Орган	ДМФН	ДМФН+ОБЛ	ОБЛ
Тимус	$0.38 \pm 0.01$	$0.15 \pm 0.02^*$	$0.11 \pm 0.03^*$
Сердце	$0.52 \pm 0.02$	$0.53 \pm 0.01$	$0.46 \pm 0.02$
Легкие	$0.98 \pm 0.07$	$1.05 \pm 0.07$	$0.96 \pm 0.05$
Печень	$5.85 \pm 0.27$	$4.78 \pm 0.60$	$5.34 \pm 0.44$
Селезенка	$0.74 \pm 0.11$	$1.18 \pm 0.40$	$1.29 \pm 0.23$

Примечание. Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни, \* $p < 0.05$  по сравнению с ДМФН.



**Рис. 5.** Влияние препарата «Димефосфон» на повреждение тонкого кишечника мышей CD-1, вызванное облучением. А – расстояние между ворсинками, Б – толщина слизистого слоя тонкого кишечника ( $M \pm SEM$ ). Гистологическая картина тонкого кишечника в группах ДМФН (В), ДМФН+ОБЛ (Г) и ОБЛ (Д). Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 100$ . Статистический анализ проводился с использованием  $t$ -критерия Стьюдента,  $*p < 0.05$  по сравнению с ДМФН,  $\#p < 0.05$  по сравнению с ДМФН+ОБЛ

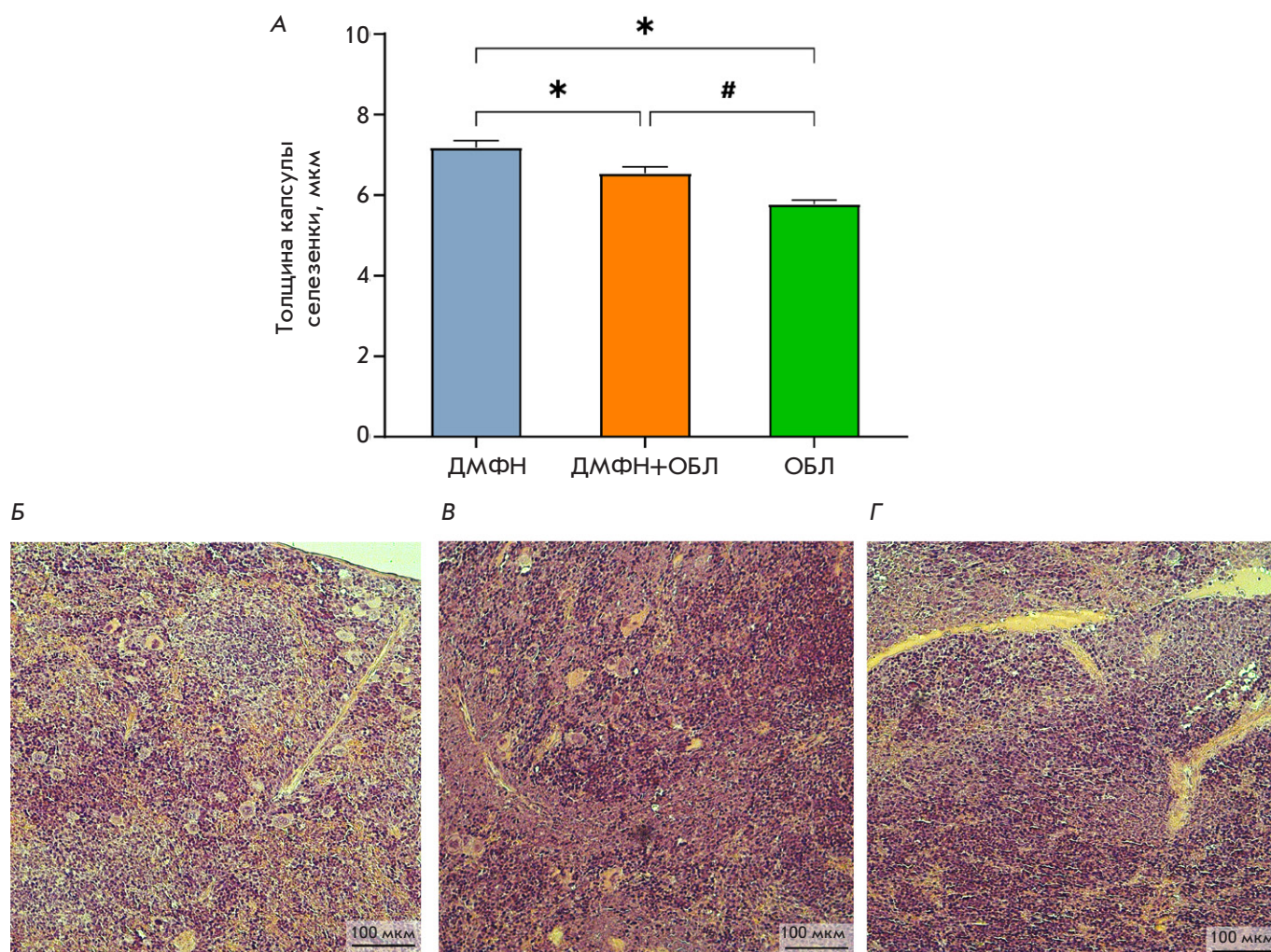
Введение препарата «Димефосфон» на фоне облучения уменьшило радиационно-индуцированное повреждение, что проявлялось в увеличении длины ворсинок, уменьшении расстояния между ними и увеличении глубины крипт (рис. 5А,Г). Толщина слизистого слоя в группе ДМФН+ОБЛ была больше, чем в группе ДМФН, что, вероятно, связано с усилением процессов регенерации в кишечном эпителии (рис. 5Б).

Структура селезенки животных группы ДМФН имела типичное строение и была образована белой и красной пульпой, разделенных маргинальной зоной и покрытой соединительнотканной капсулой (рис. 6Б). На 14 день после облучения структура селезенки изменилась: белая пульпа расширилась за счет клеточной пролиферации, а четкая граница между красной и белой пульпой исчезла (рис. 6Г). Наблюдалась массивная инфильтрация красной пульпы лимфоцитами, которые первоначально рас-

полагались в синусоидах и селезеночных связках. Синусоидальные пространства стали больше, увеличилось их кровенаполнение. Более того, в группе ОБЛ произошло уменьшение толщины капсулы селезенки по сравнению с контрольной группой (рис. 6А), что согласуется с наблюдаемой тенденцией к увеличению массового коэффициента данного органа (табл. 1) и является показателем спленомегалии [24]. Введение препарата «Димефосфон» на фоне облучения не изменило структуру паренхимы селезенки, однако способствовало восстановлению нормальной толщины капсулы селезенки (рис. 6А,В).

Таким образом, результаты гистологического исследования позволяют предположить местную радиозащитную активность препарата «Димефосфон», выраженную в уменьшении радиационно-индуцированного повреждения тонкого кишечника и воспаления селезенки.





**Рис. 6.** Влияние препарата «Димефосфон» на повреждение селезенки мышей CD-1, вызванное облучением. А – толщина капсулы селезенки ( $M \pm SEM$ ). Гистологическая картина селезенки в группах ДМФН (Б), ДМФН+ОБЛ (В), ОБЛ (Г). Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 100$ . Статистический анализ проводили с использованием  $t$ -критерия,  $*p < 0.05$  по сравнению с ДМФН,  $\#p < 0.05$  по сравнению с ДМФН+ОБЛ

### Метаболомный скрининг образцов крови мышей после облучения в дозе 5 Гр на фоне введения препарата «Димефосфон»

Проведено метаболомное исследование 489 метаболитов в группах ДМФН+ОБЛ и ОБЛ в ключевые точки эксперимента. Алгоритм статистического анализа включал исследование метаболитов между 0 и 11 днем, среди которых были выбраны статистически значимо различающиеся метаболиты. Далее проанализировали пересечения множеств и нашли метаболиты, уникальные для одной из групп. Обнаружены 208 метаболитов с отрицательной динамикой (153 метаболита показали отрицательную динамику в обеих группах, 13 – только в группе ОБЛ, 42 – только в группе ДМФН+ОБЛ) и 26 метаболитов с положительной динамикой (15 метаболитов показали положительную динамику

в обеих группах, 5 – характерны только для ОБЛ, 6 – для ДМФН+ОБЛ) (рис. 7).

После облучения в группе ОБЛ произошли нарушения метаболизма токоферола, выраженные в постепенном снижении его содержания на протяжении эксперимента, что делает организм чувствительным к воздействию свободных радикалов. Из рис. 8А видно, что у животных группы ДМФН+ОБЛ содержание токоферола в крови не снижалось, в отличие от группы облученных животных. Альфа-токоферол является мощным жирорастворимым антиоксидантом, эффекты которого заключаются в антиоксидантной и радиозащите посредством поглощения свободных радикалов [25] и непрямого действия на выработку определенных факторов роста и цитокинов [26]. Таким образом, наблюдаемая динамика содержания альфа-токоферо-

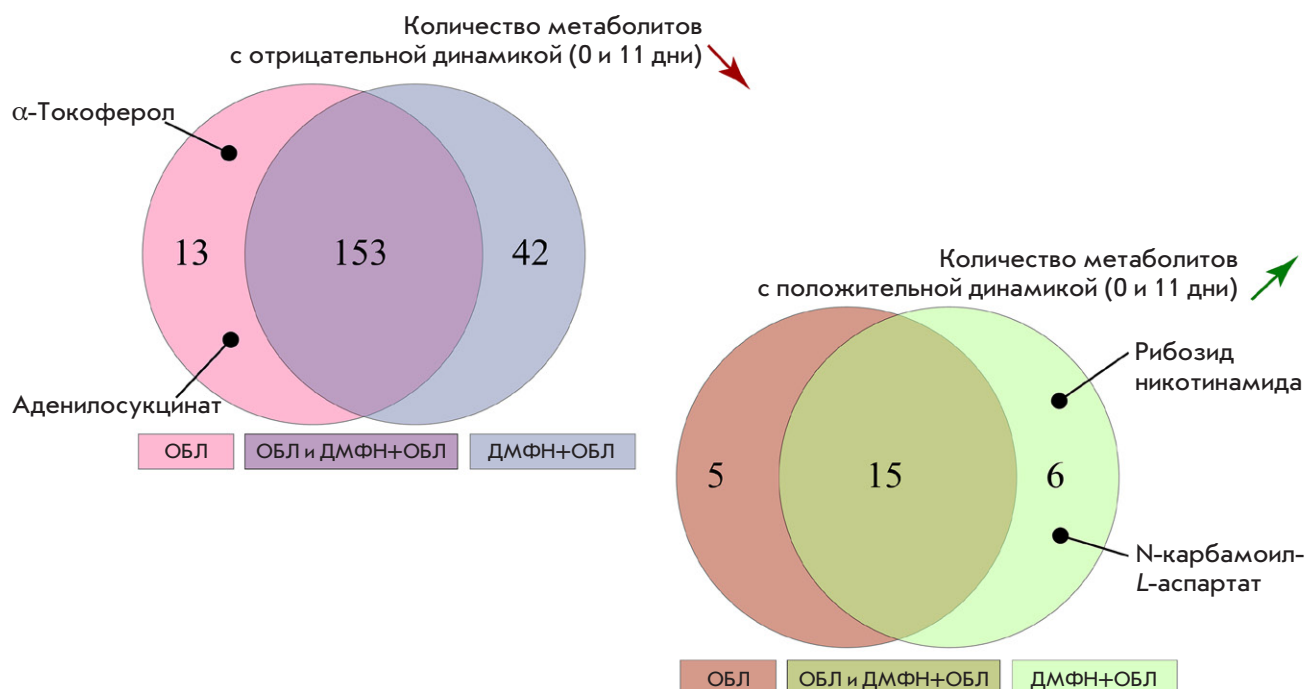


Рис. 7. Диаграммы Эйлера для метаболитов с положительной и отрицательной динамикой

ла может опосредованно свидетельствовать о радиопротекторном механизме препарата.

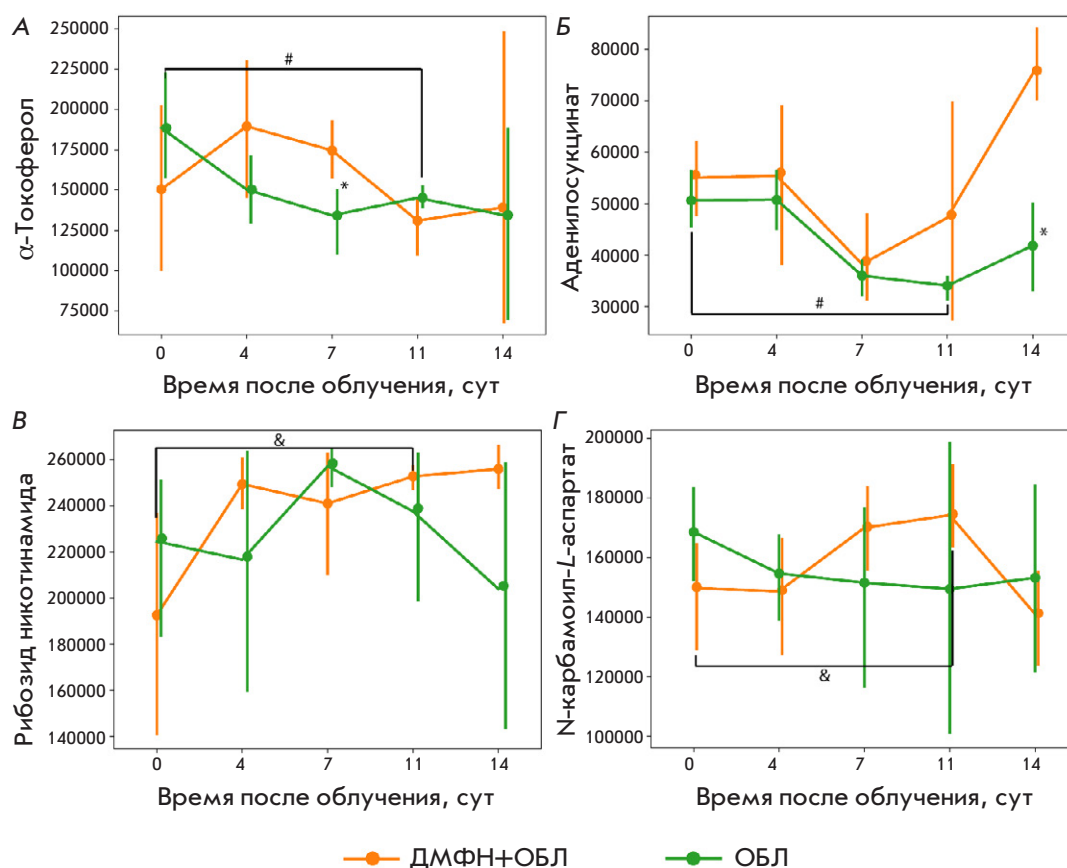
Содержание аденилосукцината (рис. 8Б) резко снижается в обеих группах до 7 дня после облучения, после чего в группе ДМФН+ОБЛ происходит значимый рост содержания метаболита, не наблюдавшийся в группе ОБЛ. Аденилосукцинат принимает участие в рециркуляции пуринов, энергетическом гомеостазе, а также в снижении воспаления и других форм клеточного стресса [27]. Важно отметить, что содержание пуриновых метаболитов в крови коррелирует с устойчивостью клеток к радиации, причем их экзогенное введение способствует репарации двухцепочечных разрывов ДНК после воздействия радиации [28]. Таким образом, введение препарата «Димефосфон» компенсировало воздействие облучения, увеличивая содержание аденилосукцината в крови, что может свидетельствовать о способности препарата повышать устойчивость организма к радиационному воздействию.

Содержание рибозид никотинамида практически не изменялось после облучения с небольшим подъемом к 7 дню, однако введение препарата привело к резкому повышению содержания данного метаболита в крови мышей к 4 дню, которое сохранялось на этом уровне до окончания эксперимента (рис. 8В). Рибозид никотинамида является предшественником NAD<sup>+</sup>, который выступает как кофермент многих клеточных реакций, участвующих в физиоло-

гическом гомеостазе различных органов и систем. Показано, что этот метаболит влияет на течение острого лучевого синдрома, а его пероральное применение оказывает радиопротекторный эффект, заключающийся в ингибировании клеточного старения селезенки и нормализации профиля метаболитов в сыворотке крови мышей [29]. Кроме того, недавние исследования доказали, что предшественники NAD<sup>+</sup> (в частности, рибозид никотинамида) играют решающую роль в поддержании целостности кишечного барьера [30]. Наблюдаемая в нашем исследовании положительная динамика рибозид никотинамида согласуется с результатами гистологического исследования и может объяснить радиопротекторный эффект препарата в тонком кишечнике.

В группе ОБЛ содержание N-карбамоил-L-аспартата оставалось постоянным, тогда как применение препарата «Димефосфон» приводило к повышению его содержания на 7 и 11 дни (рис. 8Г). Согласно данным [31], уровень этого метаболита снижается в тканях кишечника мышей после однократного общего гамма-облучения. N-карбамоил-L-аспартат представляет собой ранний интермедиат *de novo* синтеза пиримидинов, необходимого для пролиферации клеток и восстановления поврежденной ткани. N-карбамоил-L-аспартат образуется при конденсации карбамоилфосфата с аспартатом, катализируемой аспартат-карбамоилтрансферазой. Повышение содержания N-карбамоил-L-аспартата





**Рис. 8.** Динамика содержания статистически значимо различающихся метаболитов в крови мышей CD-1 групп ДМФН+ОБЛ и ОБЛ. А – альфа-токоферол, Б – аденилосукцинат, В – рибозид никотинамида, Г – N-карбамоил-L-аспартат. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  доверительный интервал для непараметрической выборки. Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни, \* $p < 0.05$  между группами ДМФН+ОБЛ и ОБЛ, # $p < 0.05$  между 0 и 11 днями в группе ОБЛ, & $p < 0.05$  между 0 и 11 днями в группе ДМФН+ОБЛ

в группе ДМФН+ОБЛ может отражать активацию синтеза пиримидинов, направленного на репарацию эпителия, и участие этого соединения в адаптивном ответе на радиационно-индуцированное повреждение. Это согласуется с установленным нами восстановлением слизистой оболочки кишечника под действием препарата.

В ходе исследования выявлено изменение содержания альфа-токоферола, аденилосукцината, рибозида никотинамида и N-карбамоил-L-аспартата. Установленные различия в их уровнях между группами ОБЛ и ДМФН+ОБЛ могут служить биохимическими маркерами радиозащитного эффекта препарата. Перечисленные метаболиты участвуют в антиоксидантных процессах в клетках, а обнаруженные метаболомные изменения отражают процессы, которые на уровне тканей проявляются снижением повреждений слизистой оболочки тонкого кишечника и уменьшением толщины капсулы селезенки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты позволили выбрать дозу облучения и охарактеризовать основные пока-

затели поражения организма для дальнейшего изучения потенциально перспективных радиозащитных средств. Также установлено, что препарат «Димефосфон» уменьшает радиационно-индуцированное повреждение слизистой оболочки тонкого кишечника и капсулы селезенки, способствует восстановлению количества тромбоцитов в крови мышей CD-1 на фоне однократного облучения. При этом анализ других основных гематологических показателей и выживаемости животных не выявил проявлений радиозащитного эффекта препарата «Димефосфон». Полученные данные метаболомного анализа, а именно достоверное увеличение содержания альфа-токоферола, рибозида никотинамида, N-карбамоил-L-аспартата, аденилосукцината в крови животных, получавших «Димефосфон», согласуются с результатами гистологического исследования слизистой кишечника и селезенки и свидетельствуют о наличии антиоксидантной активности у препарата «Димефосфон». ●

Работа выполнена при финансовой поддержке  
Российского научного фонда  
(проект № 25-25-00119).

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Каприн АД, Старинский ВВ, Шахзадова АО. Состояние онкологической помощи населению России в 2023 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. 262 с.
- Martin OA, Martin RF. Cancer Radiotherapy: Understanding the Price of Tumor Eradication. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:261. doi: 10.3389/fcell.2020.00261
- Вельшер ЛЗ, Космынин АА, Бяхов МЮ, Дудицкая ТК, Решетов ДН. Таргетная терапия — новый подход в лечении местно-распространенного рака орофарингеальной зоны. *Acta Naturae.* 2012;4(1):84–87.
- Dale DC, Crawford J, Klippel Z, Reiner M, Osslund T, Fan E, Morrow PK, Allcott K, Lyman GH. A Systematic Literature Review of The Efficacy, Effectiveness, and Safety of Filgrastim. *Support Care Cancer.* 2018;26(1):7–20. doi: 10.1007/s00520-017-3854-x
- Lee M, Yee J, Kim JY, Kim JY, An SH, Lee KE, Gwak HS. Risk Factors for Neutropenia and Febrile Neutropenia Following Prophylactic Pegfilgrastim. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2019;15(4):231–237. doi: 10.1111/ajco.13152
- Andreassen CN, Grau C, Lindegaard JC. Chemical Radioprotection: A Critical Review of Amifostine as a Cytoprotector in Radiotherapy. *Semin Radiat Oncol.* 2003;13(1):62–72. doi: 10.1053/srao.2003.50006
- Mun GI, Kim S, Choi E, Kim CS, Lee YS. Pharmacology of Natural Radioprotectors. *Arch Pharm Res.* 2018;41(11):1033–1050. doi: 10.1007/s12272-018-1083-6
- Raj S, Manchanda R, Bhandari M, Alam MS. Review on Natural Bioactive Products as Radioprotective Therapeutics: Present and Past Perspective. *Curr Pharm Biotechnol.* 2022;23(14):1721–1738. doi: 10.2174/1389201023666220110104645
- Scott BR, Lin Y, Saxton B, Chen W, Potter CA, Belinsky SA. Modeling Cell Survival Fraction and Other Dose-Response Relationships for Immunodeficient C.B-17 SCID Mice Exposed to 320-kV X Rays. *Dose Response.* 2021;19(2):15593258211019887. doi: 10.1177/15593258211019887
- Визель АА, Визель АО, Шукина ЛИ. Диметилхлорбутилфосфонилдиметилат (Димефосфон): применение в пульмонологии и фтизиатрии. *Практическая пульмонология.* 2013;(3):40–44.
- Максимов МЛ, Малыхина АИ, Шикалева АА. Фармакотерапия, проверенная временем: от механизмов к клинической эффективности. *РМЖ.* 2020;9:71–76.
- Студенцова ИА, Данилов ВИ, Хафизьянова РХ, Гараев РС, Мокринская ИС, Визель АО, Муслинкин АА. Итоги клинической апробации димефосфона как вазоактивного средства, нормализующего функции нервной системы. *Казанский медицинский журнал.* 1995;76(5):214–218.
- Mironov VF, Buzykin BI, Garaev RS, Tatarinov DA, Kashapov LR, Chestnova RV, Nabiullin VN, Il'yasov AV, Zobova VV. Dimethosphonate analogs: A pharmacological aspect. *Russ Chem Bull.* 2014;63:2114–2125. doi:10.1007/s11172-014-0708-2
- Полужетов МГ, Подымова ИГ, Голубев ВЛ. Возможности применения препарата димефосфон в неврологии и нейрохирургии. *Доктор.Ру.* 2015;106-107(5-6):5–10.
- Гилева ТГ, Лукин АВ, Ньюшкин АА, Агачев АР, Студенцова ИА, Визель АО. Оценка эффективности радиопротекторных соединений при лучевой терапии рака гортани. *Казанский медицинский журнал.* 1994;75(5):374–375. doi: 10.17816/kazmj90563
- Li K, Naviaux JC, Monk JM, Wang L, Naviaux RK. Improved Dried Blood Spot-Based Metabolomics: A Targeted, Broad-Spectrum, Single-Injection Method. *Metabolites.* 2020;10(3):82. doi: 10.3390/metabo10030082
- Basov NV, Rogachev AD, Aleshkova MA, Gaisler EV, Sotnikova YS, Patrushev YV, Tolstikova TG, Yarovaya OI, Pokrovsky AG, Salakhutdinov NF. Global LC-MS/MS Targeted Metabolomics Using a Combination Of HILIC and RP LC Separation Modes on an Organic Monolithic Column Based on 1-vinyl-1,2,4-triazole. *Talanta.* 2024;267:125168. doi: 10.1016/j.talanta.2023.125168
- Patrushev YV, Sotnikova YS, Sidel'nikov VN. A Monolithic Column with a Sorbent Based on 1-Vinyl-1,2,4-Triazole for Hydrophilic HPLC. *Prot Met Phys Chem Surf.* 2020;56:49–53. doi:10.1134/S2070205119060248
- Yuan M, Breitkopf SB, Yang X, Asara JM. A Positive/Negative Ion-Switching, Targeted Mass Spectrometry-Based Metabolomics Platform for Bodily Fluids, Cells, and Fresh and Fixed Tissue. *Nat Protoc.* 2012;7(5):872–881. doi: 10.1038/nprot.2012.024
- Li K, Naviaux JC, Bright AT, Wang L, Naviaux RK. A robust, single-injection method for targeted, broad-spectrum plasma metabolomics. *Metabolomics.* 2017;13(10):122. doi: 10.1007/s11306-017-1264-1
- Таирбеков МГ, Петров ВМ. Медико-биологические эффекты ионизирующих излучений. М.: МИФИ, 2005. 106 с.
- Macià I Garau M, Lucas Calduch A, López EC. Radiobiology of the Acute Radiation Syndrome. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2011;16(4):123–130. doi: 10.1016/j.rpor.2011.06.001
- Horie K, Namiki K, Kinoshita K, Miyauchi M, Ishikawa T, Hayama M, Maruyama Y, Hagiwara N, Miyao T, Murata S, Kobayashi TJ, Akiyama N, Akiyama T. Acute Irradiation Causes a Long-Term Disturbance in the Heterogeneity and Gene Expression Profile of Medullary Thymic Epithelial Cells. *Front Immunol.* 2023;14:1186154. doi: 10.3389/fimmu.2023.1186154
- Tripathi AM, Khan S, Chaudhury NK. Radiomitigation by Melatonin in C57BL/6 Mice: Possible Implications as Adjuvant in Radiotherapy and Chemotherapy. *In Vivo.* 2022;36(3):1203–1221. doi: 10.21873/in vivo.12820
- Tucker JM, Townsend DM. Alpha-tocopherol: Roles in Prevention and Therapy of Human Disease. *Biomed Pharmacother.* 2005;59(7):380–387. doi: 10.1016/j.biopha.2005.06.005
- Singh VK, Beattie LA, Seed TM. Vitamin E: Tocopherols and Tocotrienols as Potential Radiation Countermeasures. *J Radiat Res.* 2013 Nov 1;54(6):973–988. doi: 10.1093/jrr/rrt048
- Rybalka E, Kourakis S, Bonsett CA, Moghadaszadeh B, Beggs AH, Timpani CA. Adenylosuccinic Acid: An Orphan Drug with Untapped Potential. *Pharmaceuticals (Basel).* 2023;16(6):822. doi: 10.3390/ph16060822
- Zhou W, Yao Y, Scott AJ, Wilder-Romans K, Dresser JJ, Werner CK, Sun H, Pratt D, Sajjakulnukit P, Zhao SG, Davis M, Nelson BS, Halbrook CJ, Zhang L, Gatto F, Umemura Y, Walker AK, Kachman M, Sarkaria JN, Xiong J, Morgan MA, Rehemtulla A, Castro MG, Lowenstein P, Chandrasekaran S, Lawrence TS, Lyssiotis CA, Wahl DR. Purine Metabolism Regulates DNA Repair and Therapy Resistance in Glioblastoma. *Nat Commun.* 2020;11(1):3811. doi: 10.1038/s41467-020-17512-x
- Li W, Wang X, Dong Y, Huo Q, Yue T, Wu X, Lu L, Zhang J, Zhao Y, Dong H, Li D. Nicotinamide Riboside Intervention Alleviates Hematopoietic System Injury of Ionizing Radiation-Induced Premature Aging Mice. *Aging Cell.* 2023;22(11):e13976. doi: 10.1111/accel.13976
- Niño-Narvi6n J, Rojo-L6pez MI, Martinez-Santos P, Rossell J, Ruiz-Alcaraz AJ, Alonso N, Ramos-Molina B, Mauricio D, Julve J. NAD<sup>+</sup> Precursors and Intestinal Inflammation: Therapeutic Insights Involving Gut Microbiota. *Nutrients.* 2023;15(13):2992. doi: 10.3390/nu15132992
- Cheema AK, Suman S, Kaur P, Singh R, Fornace AJ Jr, Datta K. Long-Term Differential Changes in Mouse Intestinal Metabolomics after  $\gamma$  and Heavy Ion Radiation Exposure. *PLoS One.* 2014;9(1):e87079. doi: 10.1371/journal.pone.0087079