

Винахід відноситься до медицини і, зокрема, до радіобіології і полягає у застосуванні відомих лікарських засобів - амінокислоти L-аргініну і біологічно активної рідини (БАР) "Горобина чорноплідна", що у композиції, запропонованій авторами, підвищують резистентність організму до дії іонізуючої радіації.

Проблема пошуку ефективних способів лікування радіаційних уражень організму є актуальною галуззю біології і медицини у зв'язку з аварією на Чорнобильській АЕС, широким використанням ядерної енергетики, а також неухильним зростанням частоти онкологічних захворювань, що потребують застосування променевої терапії.

Препарати, що спроможні протидіяти змінам, що виникають після дії радіації, були описані у медичній, біологічній та фармакологічній літературі [1]. Однак, захисні дози радіопротекторів зазвичай є близькими до токсичних. Тому триває пошук радіопротекторів нетоксичних, зокрема речовин рослинного походження у вигляді харчових додатків.

Аналогами засобу, що пропонується, є засоби захисту організму від дії іонізуючого випромінювання за допомогою каротиновміщуючого препарату ліпохромін [2], за допомогою лікарського засобу, що вміщує *Spimilina platensis* [3]. Недоліком їх є те, що при цьому не визначений захисний вплив препарату на клітини крові і морфологічну структуру різних органів.

Прототипом засобу, що пропонується, є засіб захисту організму від дії іонізуючого випромінювання за допомогою ліпофільного комплексу з радіопротекторною активністю, який був отриманий з рослини *Aronia melanocarpa* Elliot (чорноплідної горобини) [4]. При застосуванні цього засобу підвищувалася виживаємість опромінених експериментальних тварин. Недоліком цього засобу є те, що не була показана можливість захисту окремих органів від ураження, що викликається іонізуючим випромінюванням.

У засобі, що заявляється, для підвищення радіопротекторного ефекту БАР "Горобина чорноплідна" шляхом підсилення гомеостатичної та антиоксидантної активності додається амінокислота L-аргінін, яка є джерелом оксиду азоту, що є виключно важливим регулятором багаточисельних фізіологічних функцій в організмі людини і тварин. Нашими дослідженнями виявлені радіопротекторні властивості амінокислоти L-аргінін (табл. 1,2,3 та приклад 1).

Серед відомих аналогів і прототипів не були виявлені препарати, що мають радіопротекторні властивості, у склад яких входить L-аргінін.

Задача винаходу - знайти речовину (композицію), котра захищає від радіаційного ураження. З цієї метою ми використовували амінокислоту L-аргінін, розчинену в рідкому водному екстракті горобини чорноплідної. Отримана композиція забезпечує позитивний вплив на систему гомеостазу, захищає органи від променевого ураження.

Даний винахід відрізняється тим, що в організм поряд з екстрактом горобини додатково вводиться амінокислота L-аргінін, яка має, радіопротекторні властивості.

В дієту тварин додавали композицію, що складається з рідкого водного екстракту горобини чорноплідної у кількості 0,35мл/кг та L-аргініну у кількості 15мг/кг ваги тварини (у цілому 365мг/кг, якщо врахувати, що 1мл отриманої композиції важить 1г). Вперше пропонується використовувати амінокислоту L-аргінін у суміші з водним екстрактом горобини чорноплідної - у раціоні тварин у вигляді композиції для підвищення резистентності організму до дії іонізуючої радіації. Для вивчення радіопротекторної ефективності запропонованої композиції експериментальним тваринам (щери) давали її *per os* у кількості 0,035мл на 100г маси тварини впродовж 18 діб, починаючи з першого дня після опромінення. Опромінення щурів у дозі 3Гр було здійснено на установці "РОКУС" з потужністю дози випромінювання 0,54Гр/хв. Джерелом випромінювання був <sup>60</sup>Co.

В основу винаходу покладена задача створити такий спосіб підвищення резистентності організму до дії іонізуючого випромінювання, у якому введення у оптимальній дозі комплексу БАР "Горобина чорноплідна" з додаванням L-аргініну забезпечить позитивний вплив на стан гомеостазу організму та захистить органи від променевого ураження.

Поставлена задача вирішується наступним способом: до відомої речовини - водного екстракту горобини чорноплідної (БАР "Горобина чорноплідна" ТУ У 15.8-06733459-005-2001) у дозі 0,35 мл/кг, що має радіопротекторні властивості, додавали амінокислоту L-аргінін у дозі 15,0 мг/кг на добу впродовж 18 днів після одноразового опромінення у дозі 3 Гр, що забезпечує зниження процесів ліпопероксидації, підвищення активності каталази плазми крові, нормалізацію окислювального фосфорилування, кислотної резистентності еритроцитів, позитивно впливає на відновлення складу лейкоцитів периферичної крові, на регенеративні властивості гепатоцитів і загальну реактивність слизової оболонки, відновлює рівень лізоциму у плазмі крові.

Результати досліджень показали, що запропонована композиція забезпечує збереження вільнорадикальних процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) у тканинах і сироватці крові на рівні показників до опромінення (табл.1).

Таблиця 1

Вплив іонізуючого опромінення (3 Гр) і композицій з L-аргініном у раціоні щурів на вміст малонового діальдегіду (нмоль/мг тканини) у гомогенатах тканин їх органів та плазмі крові (M±m)

Групи тварин	Плазма крові	Тканини		
		Серця	Печінки	Аорти
1. Контроль	2,6±0,19	6,2±0,34	6,10±0,41	5,11±0,32
2. Опромінені	4,7±0,19*	8,3±0,48*	8,3±0,91	9,2±0,35*
3. Опромінені+L-аргінін	3,0±0,19**	6,9±0,54	7,7±1,05	8,1±0,66*
4. Опромінені + L-аргінін + БАР "Горобина чорноплідна"	2,9±0,12**	7,0±0,26	6,8±1,05	6,0±0,35**

Примітки: 1. \* - різниця вірогідна (p<0,05) по відношенню до контрольної групи тварин;

2. \*\* - різниця вірогідна (p<0,05) по відношенню до групи опромінених тварин.

Як впливає з табл. 1, при опроміненні рівень МДА у тканинах органів, що вивчаються, істотно підвищувався, а при застосуванні препаратів з L-аргініном він не був настільки підвищеним, наближаючись до контрольних значень у печінці і аорті при застосуванні рідкого водного екстракту горобини чорноплідної та L-аргініну. При цьому особливо наближались показники рівня МДА до контрольних при використанні композиції в тканинах печінки і аорти опромінених тварин.

Вірогідна відмінність цього показника у тканинах аорти від показників групи опромінених тварин спостерігалася лише при застосуванні запропонованої композиції. У плазмі крові на 18-й день після опромінення рівень МДА також істотно підвищувався, а застосування L-аргініну і особливо композиції L-аргініну з БАР "Горобина чорноплідна" сприяло збереженню показників у межах нормальних значень. При цьому показники МДА плазмі крові вірогідно відрізнялись при застосуванні L-аргініну і, особливо, композиції L-аргініну з БАР "Горобина чорноплідна" від таких у групі опромінених тварин.

Збереження метаболізму мітохондрій під впливом композиції показано в табл. 2.

Таблиця 2

Вплив іонізуючого випромінювання (3 Гр) і композиції з БАР "Горобина чорноплідна" + L-аргінін на показники окислювального фосфорилування ( $M \pm m$ ).

№	Група тварин	Швидкість дихання $V_z$ , нанограм-атоми кисню/мг білку хв.
1.	Контроль	31,1±1,39
2.	Опромінені 3 Гр	26,5±1,07*
3.	Опромінені + L-аргінін	29,6±2,79
4.	Опромінені + L-аргінін + БАР "Горобина чорноплідна"	29,9±1,63

Примітка: \* - різниця вірогідна ( $p < 0,05$ ) по відношенню до контрольної групи

Позитивна дія композиції була підтверджена авторами винаходу за допомогою методу визначення окислювального фосфорилування за Чансом [5], що дозволив визначити стан окислювального фосфорилування мітохондрій, де показник  $U_z$  представляє швидкість дихання після додавання АДФ. На 18 добу після опромінення у опромінених щурів відмічено вірогідне зниження швидкості тканинного дихання (окислювального фосфорилування). Застосування L-аргініну в комплексі з БАР "Горобина чорноплідна" відновлювало окислювальне фосфорилування мітохондрій після впливу іонізуючого випромінювання.

Відомо, що під впливом радіації відбувається руйнування частини лейкоцитів, у яких вміст лізоциму надзвичайно великий, і вони є головним джерелом лізоциму у плазмі крові. Зменшення кількості лейкоцитів під дією радіації сприяє збільшенню рівня лізоциму у сироватці крові (табл. 3). Композиція, що пропонується, не тільки сприяє підтриманню кількості лейкоцитів на достатньому рівні, але й збереженню рівня лізоциму у сироватці крові, який вірогідно не відрізнявся від групи опромінених тварин (табл. 3).

Таблиця 3

Рівень лейкоцитів і лізоциму у експериментальних тварин після опромінення (3 Гр) та застосування композиції L-аргінін і БАР "Горобина чорноплідна" ( $M \pm m$ )

Група тварин	Рівень лейкоцитів ( $\times 10^9$ /л)	Рівень лізоциму (г/л)
1. Контроль	9,0±0,35	0,026±0,003
2. Опромінені	4,8±0,55*	0,036±0,004*
3. Опромінені + L-аргінін	5,5±0,40*	0,027±0,005
4. Опромінені + L-аргінін + БАР "Горобина чорноплідна"	6,0±0,15	0,022±0,001**

Примітки: \* - різниця вірогідна по відношенню до контролю ( $p < 0,05$ );

\*\* - різниця вірогідна по відношенню до групи опромінених тварин ( $p < 0,05$ ).

При застосуванні тільки L-аргініну рівень лейкоцитів хоча і був вищим, ніж у групі опромінених тварин, але все ж ще вірогідно не відрізнявся від контролю. У той же час використання композиції, що пропонується, підтримувало рівень лейкоцитів таким, що істотно не відрізнявся від рівня лейкоцитів неопромінених тварин.

Захист від дистрофічних змін, що спричиняються іонізуючим опроміненням, у органах запропонованою композицією способом показаний у наступному прикладі (приклад 1).

Приклад 1. Опромінення щурів у дозі 3Гр спричиняло дистрофічні зміни в клітинах печінки, що характеризувались порушенням мікроциркуляції з залученням імунокомпетентних клітин та інтерстиції. У тонкому кишечнику опромінених тварин відмічалися значні атрофічні зміни у епітелії, що обумовило порушення абсорбційної функції і призвело до зменшення і порушення слизоутворення та до змін у ендокринних клітинах.

При використанні у дієті опромінених щурів домішки L-аргінін у кількості 15 мг/кг, спостерігалися менші зміни структури, зменшення ступеню дистрофічних змін у печінці. У тонкому кишечнику зменшувалась виразність атрофічного процесу, відмічалася відновлення і активація слизоутворення. Однак порушення абсорбції зберігалися, регенерація мала неповний характер, але без патологічних змін. Відновлювальний процес характеризувався переважанням ексудативних процесів, що у цілому свідчило про підвищення реактивності.

У групі опромінених щурів, які отримували композицію з L-аргініном та БАР "Горобина чорноплідна", дистрофічні зміни печінки були найменшими у порівнянні з іншими групами. У даній групі найменшими у порівнянні з іншими групами опромінених тварин були атрофічні зміни слизової оболонки тонкого кишечника, де різко активізувалися процеси відновлення, що позитивно вплинуло на основні функції кишкової стінки: зменшилися порушення абсорбції, підсилилось слизоутворення. Запальні зміни зменшилися з переходом процесу запалення у стадію проліферації.

Безпечність композиції, що заявляється, перевірена у дослідях на тваринах у двох серіях експериментів шляхом вивчення гострої токсичності. У одній серії порівнювався вплив композиції L-аргініну і БАР "Горобина чорноплідна" у дозі 5000 мг/кг (14-кратне збільшення однократної дози) з препаратом порівняння - папаверину гідрохлоридом (1 мл 2% розчину підшкірно, виробництва ТОВ "Фармацевтична компанія "Здоров'я", м. Харків), а у іншій - з інтактними тваринами (без спеціальних домішок). Було показано, що істотних змін в організмі під впливом високих доз композиції L-аргініну та БАР "Горобина чорноплідна" (гостра токсичність), не відбувається, що підтверджується сталою температурою тіла, частотою дихання, незмінним артеріальним тиском, швидкістю згортання крові та поведінкою тварин. Гістологічні дослідження структури органів піддослідних тварин (серце, аорта, печінка, нирки, селезінка, мозок, гіпофіз) не виявили змін у порівнянні з контролем. У той же час при введенні офіційного препарату папаверину гідрохлориду відмічалось різке зниження артеріального тиску у перші години після введення експериментальним тваринам. Вони були пасивні, загальмовані та переставали реагувати на біль, що вказує на токсичну дію препарату порівняння.

Таким чином, запропонована композиція поєднаного застосування амінокислоти L-аргініну і водного екстракту БАР "Горобина чорноплідна" є нетоксичною та спричиняє позитивний радіопротекторний ефект.

Позитивними якостями композиції, що заявляється, є пероральний шлях введення, нешкідливість та відсутність токсичної дії, наявність ефекту підвищення резистентності організму до дії радіації на рівні клітин крові та тканин різних органів.

Список використаних джерел

1. Кудряшов Ю.Б., Гончаренко Е.Н. Современные проблемы противолучевой защиты организмов// Радиационная биология. Радиозкология. - 1999. - Т. 39. - № 2-3. - С. 197-211.
2. Пат. № 17503 А, UA, МПК5 А61К35/78 / Харківський НДІ мед. радіології - 3. № 95083773; Заявл. 11.08.95; Опубл. 31.10.97. Спосіб лікування радіаційних уражень організму.
3. Пат. № 14527 С2, UA, МПК6 А61К35/80 / Будзай І.Г. Стахорський І.Є. Чекман І.С. та інш. - 3. № 96103891; Заявл. 11.10.96; Опубл. 15.09.2000. Лікарський засіб для профілактики передчасного старіння, лікування вікової патології, який має радіопротекторні та ентеросорбційні властивості.
4. Пат. № 19231 С1, UA, МПК5 А61К35/78 /Державний науковий центр лікарських засобів. - 3 № 95321119; Заявл. 28.10.93; Опубл. 25.12.97. Речовина, що має радіопротекторну дію.
5. Chance B., Williams G.R., 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation // J. Biol Chem. -1955. - Vol. 217, N.I. -P. 383-393.
6. Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів. Методичні рекомендації Державного фармакологічного Центру МОЗ України, - Київ-2000. - 43 с.