

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2002

Э. А. Тарахтий¹, Б. В. Голомолзин², Н. П. Пасенко²

О МЕХАНИЗМЕ РАДИОЗАЩИТНОГО ЭФФЕКТА 2-АЦИЛОКСИПРОИЗВОДНЫХ 1,3-ДИАМИНОПРОПАНОЛОВ-2 НА КРОВЕТВОРНОЙ ТКАНИ МЫШЕЙ

¹ Институт экологии растений и животных УрО РАН,

² Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург

При взаимодействии биологически активных соединений, в том числе радиопротекторов, с рецепторами клеточной мембраны существенная роль принадлежит липидному микроокружению, обеспечивающему необходимую для связывания лиганда конформацию белка [1 – 6].

Ранее нами при испытании вновь синтезированных потенциальных радиопротекторов — 2-ацилоксипроизводных 1,3-диаминопропанолов-2 — было обнаружено, что степень радиозащитного эффекта, оцененного по тесту выживания мышей, имеет связь с длиной цепи атомов углерода жирнокислотного остатка [7].

В настоящей работе с целью изучения механизма радиозащитного действия синтезированных производных исследовано влияние жирнокислотного остатка на величину радиоактивной метки в клетках костного мозга в условиях *in vitro*, а также изучена способность соединений защищать радиочувствительную кроветворную ткань, ответственную за выживание организма при сублетальном гамма облучении в условиях целого организма.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что в клетках костного мозга облученных мышей количество радиоактивной метки снижается более чем вдвое относительно интактного контроля и достоверно увеличивается под влиянием соединений II и III (табл. 1).

У необлученных мышей только соединение III вызывает достоверное снижение содержания метки в клетках костного мозга. В целом в ряду соединений I – III отмечается тенденция к снижению величины радиоактивной метки с увеличением длины цепи жирнокислотного остатка.

В стимулированных (с помощью ФГА) клетках костного мозга мышей, которым введены до облучения соединения II и III, получены минимальные значения индекса стимуляции (ИС) (табл. 1). Эти данные свидетельствуют об увеличении биодоступности соединений с ростом длины цепи жирнокислотного остатка.

Существенное влияние соединения III на содержание радиоактивной метки в клетках костного мозга в разных условиях опыта позволяет полагать, что его эффект реализуется по механизму ингибирования синтеза ДНК. Степень ингибирования и доля выживших мышей, защищенных веществом III, сопоставимы с таковыми 2-амино-4-фенилтиазола, механизм радиозащитного действия которого связывают с кратковременным угнетением синтеза ДНК [8, 9]. Количество радиоактивного вещества в костном мозге коррелирует ($r = -0,30, p < 0,05$) с радиозащитным эффектом соединений I – IV, оцененным по интегральному показателю — 30-суточной выживаемости облученных мышей.

С помощью дисперсионного анализа [10] изучено влияние соединения III и облучения на показатели костного мозга и периферической крови (табл. 2). Показано, что под влиянием соединения III отмечается увеличение как общего количества клеток, так и клеток стволового пула костного мозга, при этом количество эритроцитов в периферической крови не изменяется, а число лейкоцитов даже уменьшается, что может быть следствием задержки поступления их из костного мозга, большей радиочувствительностью и меньшей продолжительностью жизни, чем у эритроцитов.

Таблица 1
Влияние соединений I – IV на величину радиоактивного вещества в клетках костного мозга облученных и необлученных мышей

Варианты опыта	Костный мозг			
	Необлученные		Облученные	
	$M \pm m$	Индекс стимуляции	$M \pm m$	Индекс стимуляции
Контроль	100,0 ± 22,6	1,00	38,4 ± 0,9*	1,78
I	78,1 ± 11,7	0,95	38,8 ± 0,7*	1,30
II	64,4 ± 15,1	1,13	76,9 ± 1,0**	0,50
III	50,8 ± 11,2*	2,10	53,6 ± 13,4**	0,61
IV	68,6 ± 23,1	1,23	40,5 ± 1,2*	1,51

* — $p < 0,05$ относительно интактного контроля,

** — относительно облученного контроля.

Таким образом, соединение III, содержащее 14 атомов углерода, проявило выраженный радиозащитный эффект и на клеточном, и на системном уровнях. Можно полагать, что механизм радиозащитного действия этого вещества связан с временным угнетением синтеза ДНК в радиочувствительных клетках, что обеспечивает условия для постлучевой репарации макромолекул и сохранение целостности клеток костного мозга, особенно его стволового пула.

Экспериментальная биологическая часть

Для исследования взяты дигидрохлориды 1,3-дипиперидино-2-пропионилоксипропана (I), 1,3-дипиперидино-2-лауроилоксипропана (II), 1,3-дипиперидино-2-пальмитилоксипропана (III), гидрохлорид 1-(2-оксопирролидинил-1)-2-стеарилокси-3-гексаметилениминопропана (IV), радиозащитная активность которых по тесту выживания соответствует их липофильности (длине жирнокислотного остатка) [7].

Соединения I – IV в виде водных растворов вводили мышам-самкам 3-х месячного возраста линии BALB внутрибрюшинно в дозе 1,43, 0,085, 0,2 и 0,29 мМ/кг, соответственно, что составляет 1/2 СД₁₆, рассчитанной пробит-методом [11]. Время введения до облучения 15 мин для I – III и 45 мин для IV — время максимальной радиозащитной активности по тесту выживания мышей в течение 30 сут.

Основываясь на положении о том, что механизм радиозащитного действия соединений, подобных исследуемым, обусловлен способностью веществ проникать в клетку и защищать главную ее мишень ДНК, в работе использована реакция бласттрансформации

лимфоцитов с введением Н³-тимидина [12]. При выборе показателей и сроков исследования учитывалось, что деградации ДНК в радиочувствительных тканях (костный мозг, тимус, тонкий кишечник) достигает минимальных величин на первые сутки после облучения [4], количество ДНК отражает число клеток в органах [5, 6], величина радиоактивности в образцах клеточной суспензии органов отражает реактивность клеток.

Клеточная суспензия костного мозга получена от 66 мышей, сформированных в группы по 6 – 9 особей в каждой: необлученные — контроль (1), получившие соединения I – IV (2), облученный контроль (3), облученные с предварительным введением соединений I – IV (4). Мышей групп 3 и 4 облучали гамма-лучами ¹³⁷Cs в дозе 7,4 Гр, мощность дозы 1,03 Гр/мин, установка “Игур”. Через сутки после облучения при соблюдении условий стерильности в стерильном боксе животных опытных и контрольных групп забивали дислокацией шейных позвонков, готовили на среде 199 клеточную суспензию костного мозга (1 · 10⁶ клеток/мл), с добавлением RPMI 1640, эмбриональной телячьей сыворотки, антибиотика, ФГА (в контроле вместо ФГА добавляли среду RPMI 1640). Клетки инкубировали с добавлением Н³-тимидина. Ответ клеток на введение ФГА (фитогемагглютинин) представлен индексом стимуляции (ИС-отношение величины радиоактивного вещества в стимулированных с помощью ФГА клетках костного мозга к не стимулированным) [12]. Количество радиоактивного вещества (имп/мин) в образцах измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике “Изакап-300”, модификация

Таблица 2

Влияние соединения III на показатели кроветворной ткани облученных и защищенных мышей

Показатель	Вариант	Доза облучения, Гр			p < 0,05
		7,0 (a)	7,4 (b)	7,7 (c)	
		M ± m	M ± m	M ± m	
Число эритроцитов, млн/мкл	Контроль	12,48 ± 2,18	12,15 ± 1,3	12,86 ± 0,42	
	Опыт	11,24 ± 0,39	9,6 ± 0,75	13,48 ± 1,24	b – c
Число лейкоцитов, тыс/мкл	Контроль	2,30 ± 0,20	1,91 ± 0,21	1,11 ± 0,14	c – a, b
	Опыт	1,68 ± 0,26*	1,65 ± 0,27	1,1 ± 0,08	
Число клеток костного мозга, млн	Контроль	4,68 ± 0,93	4,36 ± 0,34	4,02 ± 0,75	
	Опыт	9,79 ± 0,62*	7,02 ± 0,46*	3,94 ± 0,63	a – b, c, b – c
Масса селезенки, мг	Контроль	61,5 ± 1,59	73,3 ± 2,41	62,7 ± 3,42	b – a, c
	Опыт	72,4 ± 4,32*	80,8 ± 4,89*	55,0 ± 3,63*	c – a, b
Клеточность селезенки, млн	Контроль	40,33 ± 6,83	39,33 ± 1,93	40,33 ± 5,18	
	Опыт	32,46 ± 2,37	48,67 ± 3,89*	35,09 ± 3,91	b – a, c
Масса тела, г, % исходного	Контроль	95,2 ± 0,61	
	Опыт	99,4 ± 0,74	95,6 ± 1,36	96,5 ± 0,70	a – b, c
Число КОЕ	Контроль	3,91 ± 0,77	1,27 ± 0,09	1,4 ± 0,51	a – b, c
	Опыт	3,33 ± 0,52	2,34 ± 0,52*	3,11 ± 0,54*	a – c
Число животных	Контроль	11	9	10	
	Опыт	12	9	9	

* p < 0,05 относительно соответствующего контроля.

MARK-11 Nuclear Chicago. Результаты (среднее и ошибка среднего) выражали в процентах от необлученного контроля, принятого за 100. Каждая величина включает от 2 до 9 повторностей опыта, в каждой повторности взяты органы двух мышей.

В экспериментах *in vivo* на примере соединения III изучена его способность защищать стволовой пул клеток костного мозга [13], общую клеточность кровяных органов и периферической крови общепринятыми методами. Мышей облучали в дозах 7,0, 7,4 и 7,7 Гр. Через сутки после воздействия в периферической крови, взятой из хвостовой вены облученных и предварительно защищенных животных, подсчитывали количество лейкоцитов, эритроцитов. Далее мышам забивали дислокацией шейных позвонков, готовили клеточную суспензию селезенки (гомогенизацией в 5 % уксусной кислоте) и костного мозга бедренной кости (в среде 199 на холоду). Общую клеточность органов определяли в камере Горяева, выражали в абсолютных величинах. В каждом варианте опыта использовано по 6 мышей.

Для оценки сохранности стволового пула суспензию костного мозга ($1 \cdot 10^6$ клеток) контрольных и опытных мышей вводили внутривенно летально облученным реципиентам (от 9 до 12 мышей на точку), у которых на 9-е сутки подсчитывали число колоний на селезенке [13].

Экспериментальные данные анализировали с помощью стандартных статистических методов (дисперсионный анализ, метод парных и множественных срав-

нений) [4]. Зависимость изменения клеточности костного мозга, числа КОЕ_{селезенки} от дозы облучения оценена с помощью пробит-метода [11].

Работа выполнена при поддержке РФФИ 99-04-49022.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Ф. Романцев, Е. Н. Прянишникова, *Радиобиол.*, 27(3), 291 – 296 (1987).
2. А. И. Дворецкий, А. М. Шаинская, Г. В. Панченко и др., *Радиобиол.*, 28(4), 470 – 473 (1988).
3. Б. А. Король, С. Р. Уманский, *Радиобиол.*, 24(5), 646 – 649 (1984).
4. Л. С. Исупова, В. С. Балабуха, *Мед. радиология*, 6(8), 36 – 41 (1961).
5. L. O. Jacobson, E. L. Simmons, E. K. Marks, et al, *J. Lab. Clin. Med.*, 37, 683 – 691 (1951).
6. С. М. Пучкова, сб. “Соврем. вопр. радиац. мед. и радиобиол.”, Москва (1975), сс. 91 – 92.
7. Б. В. Голомолзин, И. И. Мудрецова, Э. А. Тарахтий и др., *Хим.-фарм. журн.*, 24(11), 31 – 34 (1990).
8. В. Г. Владимиров, Ю. В. Стрельников, Н. И. Либикова и др., *Радиобиол.*, 28(5), 686 – 690 (1988).
9. В. Г. Владимиров, И. И. Красильников, О. В. Арапов, *Радиопротекторы: структура и функция*, Наукова думка, Киев (1989), сс. 107 – 108.
10. М. Кендалл, А. Стьюарт, *Многомерный статистический анализ и временные ряды*, Наука, Москва (1976), с. 737.
11. D. J. Finney, *Probit Analysis*, Cambridge Univ. Press, London (1947), p. 333.
12. Г. Фримел (ред., пер. с нем.), *Иммунологические методы*, Медицина, Москва (1987), сс. 294 – 302.
13. G. S. Till and E. A. McCulloch, *Rad. Res.*, 14, 213 – 222(1961).

Поступила 11.09.00