

МАТЕРИАЛЫ МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ “ПРОБЛЕМЫ
ХИМИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ И РЕПАРАЦИИ ПРИ РАДИАЦИОННЫХ
ВОЗДЕЙСТВИЯХ” (Дубна, 30–31 мая 2018 г.)

УДК [57+61]:615:577.15:616-03:616-001:539.1.047

ИНГИБИТОРЫ NOS КАК СРЕДСТВА ПРОФИЛАКТИКИ И ТЕРАПИИ
КОМБИНИРОВАННЫХ РАДИАЦИОННО-ТЕРМИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ

© 2019 г. Е. А. Чеснакова, М. В. Филимонова*, В. М. Макаrchук, А. С. Самсонова,
Т. С. Корнеева, Л. И. Шевченко, В. И. Суринова, А. С. Филимонов

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба –

филиал Научного медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия

** E-mail: mari_fil@mail.ru*

Поступила в редакцию 30.07.2018 г.

Показана высокая эффективность ингибиторов NOS T1004 и T1023 при их использовании в малотоксичных дозах (составляющих 1/8–1/12 ЛД₁₆) на модели комбинированного радиационно-термического поражения (КРТП) по критерию 30-суточной выживаемости животных. Для моделирования КРТП мышей подвергали воздействию γ -излучения ⁶⁰Co (МД = 0.25 Гр/мин) на установке “Луч-2” в дозе 7 Гр, после чего наносили термический ожог степени ШБ 10% общей площади поверхности тела. Применение T1004 через 5 мин или через 4 ч после КРТП статистически значимо, по сравнению с контрольной группой, повышало выживаемость животных (до 90–100%), средняя продолжительность жизни (СПЖ) мышей контрольной группы составила 10.9 ± 5.6 сут. Кратное (через 4 ч, на 2-е, 5-е, 6-е сут) применение T1004 или T1023 после КРТП сопровождалось повышением выживаемости подопытных животных на 40%, тогда как в контроле выживаемость составляла 20%. СПЖ павших животных контрольной группы и группы с применением T1004 статистически значимо не отличалась и составляла 12.5 ± 9.5 сут и 12.7 ± 7.4 сут соответственно, тогда как в группе применения T1023 наблюдалась устойчивая тенденция к увеличению СПЖ (18.2 ± 6.9 сут) по сравнению с контрольной группой.

Ключевые слова: комбинированные радиационно-термические поражения, ингибиторы NOS, лечение, выживаемость, динамика гибели, средняя продолжительность жизни, мыши

DOI: 10.1134/S0869803119020036

Наряду с новыми технологиями современного мира радиационная компонента стала неотъемлемой частью жизни человека. Так, результатами научных достижений ядерной физики стали новые виды топлива и оружия, а вместе с ними и новые угрозы: аварии на атомных электростанциях, хранилищах радиоактивных материалов, угроза ядерного и радиационного терроризма. Примерами таких событий стали атомная бомбардировка Хиросимы и Нагасаки, аварии на атомных подводных лодках, на Чернобыльской и других АЭС. В результате таких инцидентов и катастроф в большинстве случаев (свыше 65%) у пострадавших развивались не изолированные радиационные поражения, а комбинированные (КРП) – сочетание общего или локального облучения с механической и/или ожоговой травмой, а также с воздействием химических веществ [1–3]. Каждый из поражающих компонентов вносит свой вклад в патогенез и в результате взаимного патогенетического отягощения существенно усугубляет развитие поражения, повышая вероятность негативных исходов [4].

Эффективность существующих методов ранней терапии КРП, включающих хирургическое лечение и обработку ран и ожогов, антибактериальную и иммуностимулирующую терапию, инфузию кровезаменителей и электролитов, остается пока достаточно низкой [2, 5].

В этой связи очевидно, что разработка эффективных методов терапии многокомпонентных патологических состояний КРП требует детального изучения таких патологий и развития новых подходов, во многом отличных от лечения изолированных лучевых повреждений, ожогов и травм. Однако, к сожалению, большинство отечественных исследований по проблемам КРП и, в частности, комбинированного радиационно-термического поражения (КРТП), относятся к концу прошлого века и нередко ограничены частными аспектами.

Известна роль эндогенного NO во многих физиологических и патофизиологических процессах организма, в частности, при комбинированных радиационно-термических поражениях [5].

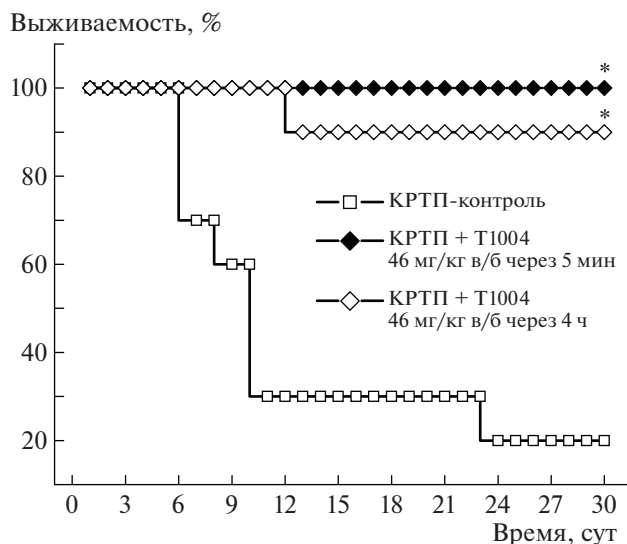


Рис. 1. Влияние Т1004 (46 мг/кг внутрибрюшинно) на 30-суточную выживаемость самцов мышей F1 (СВА × С57ВL6j) после комбинированного радиационно-термического поражения. * Статистически значимые различия ($p < 0.05$) по точному критерию Фишера.

МРНЦ им. А.Ф. Цыба с 1980-х годов имеет обширный опыт в патогенетических исследованиях КРТП и экспериментальной разработке средств терапии КРТП. В частности, были начаты исследования возможности применения модификаторов оксида азота (NO) в профилактике и лечении КРТП [6–11].

Ранее нами была показана противошоковая и противолучевая эффективность ряда оригинальных N,S-замещенных изотиомочевин, обладающих свойствами ингибиторов синтаз оксида азота (NOS-ингибиторов) [12], что явилось основанием для изучения целесообразности их применения в лечении комбинированных радиационных, в частности, радиационно-термических поражений. Целью данной работы было изучение влияния ингибиторов NOS при однократном и кратном применении на выживаемость животных при КРТП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Исследования проведены на самцах мышей F₁ (СВА × С57ВL6j) по 12–15 особей в группе. Для моделирования КРТП мышей подвергали воздействию γ -излучения ⁶⁰Со при мощности дозы 0.25 Гр/мин на установке “Луч-2” в дозе 7 Гр, после чего наносили термический ожог степени ШБ 10% общей площади поверхности тела. Шесть галогеновых ламп устанавливали параллельно обжигаемой поверхности кожи на расстоянии от нее 10 мм при мощности светового потока

550 кДж/м², длительность световой вспышки составляла 2 с.

В качестве исследуемых соединений использованы производные изотиомочевин, обладающие свойствами ингибиторов NOS, под шифрами Т1004 и Т1023, синтезированные и охарактеризованные в лаборатории радиационной фармакологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба. Проведено две серии экспериментов, в которых испытуемые соединения вводили по следующим схемам:

1) однократное, через 5 мин или через 4 ч после КРТП применение соединения Т1004 в дозе 46 мг/кг (1/8 ЛД₁₆) внутрибрюшинно;

2) кратное, через 4 ч, на 2-е, 5-е, 6-е сут после КРТП применение Т1004 в дозе 30 мг/кг (1/12 ЛД₁₆) внутрибрюшинно либо Т1023 в дозе 30 мг/кг (1/10 ЛД₁₆) внутривентрикулярно.

Эффективность терапии оценивали по 30-суточной выживаемости подопытных животных. Проверку значимости межгрупповых различий проводили, используя непараметрические критерии: точный критерий Фишера и U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$, значения записывали в виде $M \pm S.D$. Статистические расчеты проведены с использованием программных пакетов Origin 7.5 (OriginLab, США) и Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США) [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для адекватной оценки роли каждого из поражающих факторов и вклада ингибиторов NOS в развитие патологического процесса нами была использована модель КРТП, которая включает ожоговую компоненту, не вызывающую на протяжении 30 сут гибели подопытных животных, и лучевую компоненту, при изолированном воздействии предполагающую гибель 40–60% животных. Сочетание обеих компонент значительно отягощает состояние животных в сравнении с изолированным воздействием ожога или тотального облучения и сопровождается гибелью 80–85% животных. Нами проведены предварительные пилотные исследования по тестированию модели и возможности применения ингибиторов NOS для терапии КРТП (собственные неопубликованные данные).

Результаты первого исследования, при однократном применении ингибитора NOS Т1004 в терапии КРТП, представлены на рис. 1. Видно, что соединение Т1004 при его введении через 5 мин или через 4 ч после КРТП статистически значимо ($p < 0.025$) повышало 30-суточную выживаемость животных до 90–100%, в то время как в контрольной группе выживаемость составляла 20%.

Динамика гибели контрольных животных показывает, что начало гибели в группе из 10 кон-

трольных мышей наблюдалось на 7-е сут после КРТП, что свидетельствует о начале костномозговой формы острой лучевой болезни, при этом СПЖ павших животных составила 10.9 ± 5.6 сут. В группе из 10 мышей с применением Т1004 через 4 ч единственный случай гибели зарегистрирован на 13-е сут после КРТП. А в группе применения Т1004 через 5 мин гибели животных в течение 30 сут не наблюдалось.

Во второй серии экспериментов было установлено (рис. 2), что 4-кратное применение как Т1004, так и Т1023 после КРТП повышало выживаемость животных до 60%, тогда как в контрольной группе выживаемость также не превышала 20%. Средняя продолжительность жизни павших животных в контроле и в группе применения Т1004 статистически значимо не различалась. В группе применения Т1023 наблюдалась устойчивая тенденция к увеличению СПЖ по сравнению с контрольной группой (таблица 1).

При анализе динамики гибели контрольных животных на этой модели КРТП видно, что 25–30% мышей погибает в первые 3 сут, что, скорее всего, обусловлено развитием болевого и ожогового шока, асептической эндотоксемии. В дальнейшем летальное действие КРТП в этой группе возобновлялось с 10–12-х сут и, вероятно, было уже обусловлено развитием костномозговой формы острой лучевой болезни и сепсиса (рис. 2).

Сопоставление динамики гибели контрольных животных и мышей, получавших Т1004 и Т1023, по нашему мнению, свидетельствует, что применение ингибиторов NOS после нанесения КРТП в данном исследовании предупреждало раннюю летальность, обусловленную ожоговой болезнью, — предотвращало развитие тяжелых форм шока на фоне выраженной эндотоксемии и гиповолемии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Начальный период ожоговой болезни представляет собой асептическую эндотоксемию и воспалительную реакцию, что способствует активации индуцибельной синтазы (iNOS) и значительному повышению концентрации NO [14, 15]. Поздние стадии острой лучевой болезни также сопровождаются повышенной выработкой NO в организме [16, 17]. В условиях КРТП даже сравнительно легкие ожоги вносят существенный вклад в отягощение течения лучевой болезни и приводят к снижению доли выживших животных после радиационного воздействия [6, 18, 19]. Сочетание пострadiационной миелосупрессии и бактериальной эндотоксемии приводит к развитию генерализованного инфекционного процесса — сепсиса, сопровождающегося значительным и стойким повышением продукции NO в органах

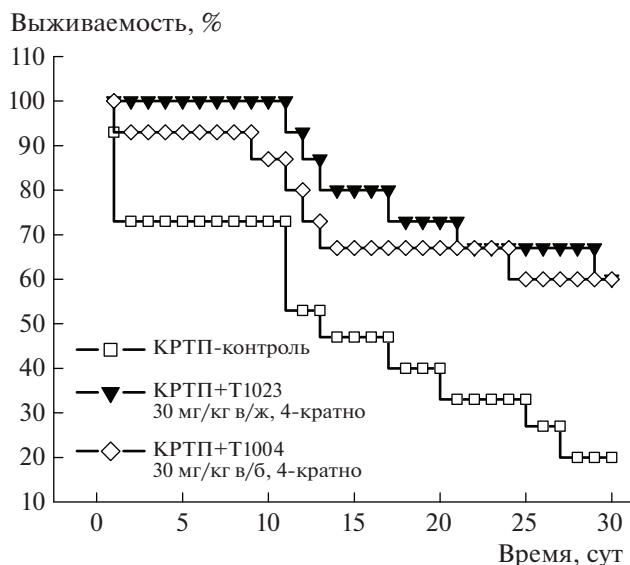


Рис. 2. Влияние 4-кратного применения Т1004 (30 мг/кг внутрибрюшинно) и Т1023 (30 мг/кг внутривенно) на 30-суточную выживаемость самцов мышей F1 (СВА × С57ВL6j) после комбинированного радиационно-термического поражения. Статистически значимых различий по точному критерию Фишера нет.

и тканях, что способствует формированию глубоких циркуляторных нарушений, таких, как вазодилатация, снижение периферического сосудистого сопротивления, повышение проницаемости сосудов, вплоть до эндотоксемического и септического шока [18–20]. Нередко такие нарушения приводят к развитию угрожающих осложнений: полиорганной дисфункции, дистресс-синдрома и рефрактерных вазоплегий — патологических состояний, слабо поддающихся терапии и приводящих к резкому возрастанию летальности [21, 22].

В мире активно ведутся работы по исследованию патогенеза КРП и поиску молекулярных маркеров таких патологических состояний [21–27], средств терапии и повышения качества жизни

Таблица 1. Влияние Т1023 при внутривенном и Т1004 при внутрибрюшинном введении в дозе 30 мг/кг на показатели средней продолжительности жизни самцов мышей F1 (СВА × С57ВL6j) на фоне КРТП ($M \pm S.D.$)

СПЖ, сут		
Контроль (n = 15)	Т1004 через 4 ч (n = 15)	Т1023 через 4 ч (n = 15)
12.5 ± 9.5	12.7 ± 7.4	18.2 ± 6.9 сут

Примечание. Различия в СПЖ опытных и контрольной групп статистически не значимы по U-критерию Вилкоксона–Манна–Уитни.

ни пациентов с комбинированными радиационно-механическими, радиационно-термическими и сочетанными радиационными повреждениями.

Одним из рациональных подходов к предотвращению развития эндотоксемии при терапии КРТП является, на наш взгляд, модификация синтеза NO. Собственные опубликованные данные [28] показывают, что ингибиторы NOS из класса производных изотиомочевинны эффективны при тяжелом эндотоксемическом шоке у крыс, что проявляется статистически значимым повышением артериального давления на протяжении не менее 2 ч.

Экспериментальные исследования возможности использования ингибиторов NOS в терапии КРТП были начаты С.Я. Проскураковым, Л.П. Ульяновой, Р.С. Будаговым. Было показано, что обработка мышей дифетуром приводит к практически полному ингибированию синтеза NO в печени как в контроле, так и у животных с КРТП, а также повышает выживаемость подопытных животных на 40–50% [9].

Результаты проведенных нами исследований демонстрируют эффективность ингибиторов NOS T1004 и T1023 при внутрибрюшинном и внутривенном введении однократно и курсом на модели КРТП, что проявляется в повышении 30-суточной выживаемости животных (60%, 90–100%) в сравнении с контролем (20%). Это подтверждает перспективность ингибиторов NOS из класса производных изотиомочевинны для разработки эффективных схем терапии КРТП как изолированно, так и, в частности, в сочетании со стимуляторами гемопоэза.

Дальнейшие исследования в этой области, несомненно, внесут вклад в понимание патогенеза КРП и КРТП и создадут новые возможности в разработке лекарственных средств, остро необходимых при чрезвычайных ситуациях мирного и военного времени.

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов выражает благодарность сотрудникам лаборатории МРИНЭ МРНЦ им. А.Ф. Цыба Л.П. Ульяновой и Т.А. Ерёмовой за помощь в проведении пилотных экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Комбинированные радиационные поражения: патогенез, клиника, лечение / А.И. Бритун, Р.С. Будагов, Е.А. Вагнер и др.; под ред. А.Ф. Цыба, М.Н. Фаршатов. М.: Медицина 1992. 288 с.
2. Лезега В.И., Гребенюк А.Н., Бояринцев В.В. Комбинированные радиационные поражения и их компоненты. СПб.: Фолиант, 2015. 216 с.
3. DiCarlo A.L., Ramakrishnan N., Hatchett R.J. Radiation combined injury: overview of NIAID research // Health Phys. 2010. V. 98 (6). P. 863–867.
4. Заргарова Н.И., Гребенюк А.Н., Лезега В.И., Владимирова О.О. Об особенностях феномена взаимного отягощения при сочетанных радиационных поражениях // Вестн. Рос. воен.-мед. академии. 2013. № 2 (42). С. 91–95.
5. Forstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function // Eur. Heart J. 2012. V. 33. № 7. P. 829–837.
6. Ульянова Л.П., Кетлинский С.А., Будагов Р.С. Исследование эффективности интерлейкина-1β при лечении комбинированных радиационно-термических поражений // Радиационная биология. Радиоэкология. 1997. Т. 37. Вып. 2. С. 175–181.
7. Будагов Р.С., Ульянова Л.П. Интерлейкин-6 в патогенезе комбинированных радиационно-термических поражений // Радиационная биология. Радиоэкология. 2004. Т. 44. № 4. С. 398–402.
8. Будагов Р.С., Ульянова Л.П. Влияние средств микробного происхождения на уровень цитокинов в сыворотке крови, гематологический статус и выживаемость мышей при комбинированных радиационных поражениях // Радиационная биология. Радиоэкология. 2001. Т. 41. № 1. С. 38–42.
9. Будагов Р.С., Ульянова Л.П. Эффекты модуляторов уровня цитокинов на выживаемость мышей и крыс при комбинированных радиационно-термических поражениях // Радиационная биология. Радиоэкология. 2004. Т. 44. № 4. С. 392–397.
10. Проскураков С.Я., Ульянова Л.П., Скворцов В.Г., Будагов Р.С. Оценка роли оксида азота в отягощении исходов комбинированных радиационно-термических поражений // Радиационная биология. Радиоэкология. 2005. Т. 45. № 3. С. 316–319.
11. Хлоповская Е.И., Будагов Р.С., Сморганова О.А., Ротт Г.М. Участие металлотioneинов в регуляции активности макрофагов при комбинированном радиационно-термическом поражении // Биохимия. 1997. Т. 62. Вып. 3. С. 344–347.
12. Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Макачук В.М. и др. Радиозащитные свойства ингибитора NO-синтазы T1023: I. Показатели противолучевой активности и взаимодействие с другими радиопротекторами // Радиационная биология. Радиоэкология. 2015. Т. 55. № 3. С. 250–259.
13. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера, 2002. 312 с.
14. Abo El-Noor M.M., Elgazzar F.M., Alshenawy H.A. Role of inducible nitric oxide synthase and interleukin-6 expression in estimation of skin burn age and vitality // J. Foren. Legal Med. 2017. V. 52. P. 148–153.
15. Rawlingson A. Nitric oxide, inflammation and acute burn injury // Burns. 2003. V. 29. I. 7. P. 631–640.
16. Ohta S., Matsuda S., Gunji M., Kamogawa A. The Role of Nitric Oxide in Radiation Damage // Biol. Pharm. Bull. 2007. V. 30. № 6. 1102–1107.
17. Leach J.K., Black S.M., Schmidt-Ullrich R.K., Mikelsen R.B. Activation of Constitutive Nitric-oxide Synthase Activity Is an Early Signaling Event Induced

- by Ionizing Radiation // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 18. P. 15400–15406.
18. *Dudzinski D.M., Michel T.* Life history of eNOS: Partners and pathway // *Cardiovasc. Res.* 2007. V. 75. № 2. P. 247–260.
 19. *Cauwels A.* Nitric oxide in shock // *Kidney Int.* 2007. V. 72. № 5. P. 557–565.
 20. *Gkisioti S., Mentzelopoulos S.D.* Vasogenic shock physiology // *Open Acc. Emerg. Med.* 2011. V. 3. doi: 10.2147/OAEM.S10388
 21. *Carter S.R., Zabs A., Palmer J.L. et al.* Intestinal Barrier Disruption as a Cause of Mortality in Combined Radiation and Burn Injury // *Shock.* 2013. V. 40. № 4. P. 281–289.
 22. *Palmer J.L., Deburghraeve C.R., Bird M.D. et al.* Development of a Combined Radiation and Burn Injury Model // *J. Burn. Care Res.* 2011. V. 32. № 2. P. 317–323.
 23. *Kiang J.G., Garrison B.R., Gorbunov N.V.* Radiation Combined Injury: DNA Damage, Apoptosis, and Autophagy // *Adaptive Med.* 2010. V. 2. № 1. P. 1–10.
 24. *Kiang G., Jiao W., Cary L.H. et al.* Wound Trauma Increases Radiation-Induced Mortality by Activation of iNOS Pathway and Elevation of Cytokine Concentrations and Bacterial Infection // *Radiat. Res.* 2010. V. 173. P. 319–332.
 25. *Kiang J.G., Garrison B.R., Gorbunov N.V.* Radiation Combined Injury: DNA Damage, Apoptosis, and Autophagy // *Adaptive Med.* 2010. V. 2. № 1. P. 1–10.
 26. *Mendoza A.E., Neely C.J., Charles A.G. et al.* Radiation Combined with Thermal Injury Induces Immature Myeloid Cells // *Shock.* 2012. V. 38. № 5. P. 532–542.
 27. *Ran X., Cheng T., Shi C. et al.* The effects of total-body irradiation on the survival and skin wound healing of rats with combined radiation-wound injury // *J. Trauma.* 2004. V. 57. P. 1087–1093.
 28. *Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Суринова В.И. и др.* Влияние N-припионил-S-изопропил-изотиомочевины на продукцию биогенного оксида азота (NO) и гемодинамические параметры животных при эндотоксическом шоке // *Вопр. биол., мед. и фарм. химии.* 2011. № 9. С. 35–39.

NOS Inhibitors as Agents for Prevention and Therapy of Combined Radiation-Thermal Injuries

**E. A. Chesnakova, M. V. Filimonova[#], V. M. Makarchuk, A. S. Samsonova, T. S. Korneeva,
L. I. Shevchenko, V. I. Surinova, and A. S. Filimonov**

*A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia*

[#] *E-mail: mari_fil@mail.ru*

A high efficiency of NOS inhibitors T1004 and T1023 is shown when they are used at low-toxic doses (1/8–1/12 LD₁₆) on the model of a combined radiation-thermal injury (CRTI) by the criterion of 30-day survival of animals. CRTI included total body γ -irradiation at a dose of 7 Gy and then III B degree thermal burn of 10% body surface with the aid of powerful flash light. The use of T1004 5 min or 4 h after CRTI showed a statistically significant increase of the survival rate of animals up to 90–100%; life expectancy in the control group was 10.9 ± 5.6 days. The multiple (every 4 hours, on days 2, 5, 6) application of T1004 or T1023 after CRTI was accompanied by an increase in the survival of the experimental animals by 40%, whereas the survival rate was 20% in the control. Life expectancy in the control group did not differ statistically significantly with the group treated with T1004 and it was 12.5 ± 9.5 days and 12.7 ± 7.4 days, whereas we observed the tendency to the increased life expectancy in the group treated with T1023: as compared to the control group it was 18.2 ± 6.9 days.

Keywords: combined radiation-thermal injuries, NOS inhibitors, survival, treatment, death rate, life expectancy, mice