DOI: 10.21870/0131-3878-2018-27-4-155-169

УДК 615.849.015.25:546.172.6-31

Противолучевые эффекты ингибитора синтаз оксида азота T1023 в нормальных и малигнизированных тканях

Филимонова М.В., Самсонова А.С., Корнеева Т.С., Шевченко Л.И.,
Сабуров В.О., Филимонов А.С.

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск

Цель работы – исследование способности к эффективной и избирательной противолучевой защите нормальных соматических тканей ингибитора NOS из класса N,S-замещённых изотиомочевин (соединения T1023). На интактных мышах и моделях радиотерапии солидной карциномы Эрлиха (КЭ) изучали влияние T1023 на развитие острых лучевых повреждений кожи и противоопухолевые эффекты γ -излучения, а также проводили сравнительную оценку эффективности и селективности противолучевой защиты нормальных тканей между соединением T1023 и амифостин. Результаты свидетельствуют, что исследованный ингибитор NOS T1023 в дозе, оптимальной для профилактики ОЛБ (75 мг/кг), выражено и избирательно ограничивает лучевые повреждения кожи и подлежащих тканей и снижает тяжесть острого лучевого ожога. ФИД по показателю острой лучевой реакции кожи составляет 1,46. При этом в тканях КЭ, развивающейся на облучённой конечности животных, радиозащитное действие T1023 не реализуется и не влияет на терапевтическую эффективность лучевой терапии. В оптимальных радиозащитных дозах амифостин (250 мг/кг) и T1023 (75 мг/кг) обеспечивают равную по эффективности избирательную защиту нормальных тканей. Однако T1023 реализует это действие при дозе в 2 раза более безопасной (26% ЛД₁₆), чем амифостин (50% ЛД₁₆). Эффективность и селективность противолучевой защиты нормальных соматических тканей, реализуемой T1023 при относительно безопасных дозах, свидетельствуют о его перспективности в качестве основы для создания эффективного и безопасного лекарственного средства, предотвращающего осложнения лучевой терапии.

Ключевые слова: *ионизирующее излучение, радиационная фармакология, радиопротекторы, лучевые повреждения, белые аутбредные мыши, рецидивный рост опухоли, экспериментальная неоплазия, экспериментальная радиотерапия, осложнения радиотерапии, селективная защита нормальных тканей, ингибиторы синтаз оксида азота.*

Введение

Проблемы лечения и профилактики осложнений радиационных терапевтических и диагностических воздействий сохраняют свою высокую актуальность для всех стран мира. Так, по данным МНИОИ им. П.А. Герцена, в Российской Федерации на учёте с онкологическими заболеваниями состоит около 3 млн больных, каждый второй из них получает курс радикальной или комбинированной радиотерапии [1]. При этом, несмотря на совершенствование радиологической аппаратуры и методов радиотерапии, в России и в развитых странах мира частота развития осложнений лучевой терапии остаётся на высоком уровне – от 10-15% до 40%. Такие осложнения, особенно поздние лучевые повреждения, имеющие, во многом, необратимое течение, слабо поддаются консервативной терапии, они не только приносят страдания пациентам, являются причиной инвалидизации и потери социальной активности, но и способны даже при излечении онкологического заболевания самостоятельно определять негативный прогноз у таких больных. И пока современные подходы к лечению поздних лучевых повреждений не принесли в полной мере удовлетворительных результатов [2, 3]. По мнению многих специалистов

Филимонова М.В.* – зав. лаб., д.б.н.; Самсонова А.С. – мл. науч. сотр.; Корнеева Т.С. – мл. науч. сотр.; Шевченко Л.И. – вед. науч. сотр., к.х.н.; Сабуров В.О. – инженер; Филимонов А.С. – науч. сотр. МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

*Контакты: 249036, Калужская обл., Обнинск, ул. Королёва, 4. Тел.: +7 (484) 399-71-36; e-mail: mari_fil@mail.ru.

преодоление такой негативной картины требует как совершенствования медицинских радиационных источников и методов планирования лучевых воздействий, так и внедрения в клиническую практику фармакологических средств, способных к эффективной профилактике и лечению лучевых осложнений [4, 5].

В последние годы в лаборатории радиационной фармакологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба было показано, что некоторые N,S-замещённые изотиомочевины, являющиеся эффективными субстрат-подобными ингибиторами синтаз оксида азота (NOS), обладают радиозащитным действием [6]. Подавляя активность eNOS и блокируя эндотелий-зависимый сигнальный путь релаксации сосудов (NOS/sGC/cGMP), такие соединения оказывают длительное сосудосуживающее действие. А при применении таких ингибиторов NOS в относительно высоких дозах (свыше $1/8$ ЛД₅₀) выраженное сосудосуживающее действие вызывает рефлекторные изменения в гемодинамике, сопровождающиеся существенным и длительным снижением сердечного выброса. Развивающаяся при этом острая гипоксия и определяет противолучевую активность этих соединений [7].

В ряду исследованных изотиомочевин по способности к профилактике острой лучевой болезни выделялось производное Т1023 (1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины гидробромид; далее – соединение Т1023), которое в эффективности не уступало известным радиопротекторам: фактор изменения дозы (ФИД) для него составлял 1,4-1,8 [8].

Вместе с тем, противолучевое действие приемлемых для клинического применения фармакологических средств профилактики осложнений лучевой терапии должно быть избирательным (селективным) к нормальным тканям, не ослабляющим противоопухолевую эффективность лучевой терапии [4, 5]. В этой связи, с целью оценки перспективности разработки Т1023 в качестве средства профилактики осложнений лучевой терапии в данной работе проведено исследование противолучевой активности этого соединения в нормальных соматических тканях и малигнизированных тканях экспериментальных солидных неоплазий лабораторных животных.

Материалы и методы

Исследуемые соединения. Производное Т1023 является хорошо растворимым в воде, умеренно токсичным соединением: для мышей при внутрибрюшинном (в/б) введении показатели ЛД₅₀ и ЛД₁₀ составляют 270 и 410 мг/кг. Т1023 проявляет высокую ингибирующую активность в отношении индуцибельной и эндотелиальной NOS – показатели ИК₅₀ для nNOS, iNOS и eNOS составляют 47,5, 3,2 и 5,1 мкмоль.

Для проведения исследований соединение Т1023 было наработано в лаборатории радиационной фармакологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба. Применяли Т1023 в виде 0,75% асептических растворов. В качестве препарата сравнения в работе использовали известный аминотиоловый радиопротектор амифостин, который в настоящее время используется в качестве средства профилактики осложнений радио- и химиотерапии. Амифостин использовали в фармакопейной форме лиофилизата для приготовления инъекционных растворов (этирон, Sigma-Aldrich, Германия) и применяли в виде 3% асептических растворов. Растворы Т1023 и амифостина изготавливали непосредственно перед введением на основе 0,9% раствора натрия хлорида (Дальхимфарм, РФ).

Лабораторные животные. Исследование выполнено на 169 самках белых аутбредных мышей в возрасте на начало экспериментов 2-2,5 месяцев с массой тела 21-24 г. Мышей со-

держали в помещениях вивария МРНЦ в клетках Т-3 в условиях естественного освещения, при температуре 18-20 °С и относительной влажности воздуха 40-70%, на подстиле из простерилизованных древесных стружек со свободным доступом к питьевой воде и стандартному брикетированному корму для грызунов ПК-120-1.

Опухолевая модель. В качестве опухолевой модели в исследованиях использовали солидную карциному Эрлиха (КЭ). У мышей удаляли шерстный покров на латеральной поверхности правого бедра, в эту область трансплантировали КЭ путём п/к введения $2,5 \cdot 10^6$ опухолевых клеток в 0,1 мл суспензии на основе среды 199 (Пан-Эко, Россия).

Лучевое воздействие. Осуществляли локальное воздействие γ -излучением в дозах, превышающих порог толерантности кожи [2, 3] – 20-35 Гр, на правую заднюю конечность интактных животных и мышей с привитой на эту лапу неоплазией. Для этого каждую мышь помещали в пластиковый контейнер, из которого выводили и фиксировали конечность в поле облучения, а тело экранировали свинцовыми пластинами. Лучевое воздействие проводили на установке Луч-1 (РФ) с источником ^{60}Co при мощности дозы 21,6 мГр/с.

Схемы экспериментов. Выполнено три независимых эксперимента. В первом эксперименте, проведённом на 60 интактных мышах, изучалась противолучевая активность соединения Т1023 в нормальных соматических тканях. Для этого животные были распределены в 7 экспериментальных групп (по 8-9 особей в каждой) – четыре контрольные и три опытные группы. Мыши контрольных групп получали локальное воздействие γ -излучением в дозах 20, 25, 30 и 35 Гр; мыши опытных групп – в дозах 25, 30 и 35 Гр. При этом животным опытных групп за 30 минут до облучения однократно внутрибрюшинно вводили соединение Т1023 в оптимальной для профилактики острой лучевой болезни дозе – 75 мг/кг [8].

Второй и третий эксперименты проведены на моделях лучевой терапии КЭ. Мышей-опухоленосителей брали в эксперимент на 7-е сутки после трансплантации КЭ, когда опухолевый узел у всех животных достигал измеряемого размера. Во втором эксперименте 40 мышей были распределены в 3 экспериментальные группы: контрольную (17 особей) и две опытные группы (по 11-12 особей). Мыши контрольной группы в дальнейшем не получали каких-либо воздействий. Животным обеих опытных групп на 7-е сутки роста КЭ проводили локальное воздействие γ -излучением в дозе 35 Гр на конечность с перевитой неоплазией. При этом животным второй опытной группы за 30 минут до лучевого воздействия однократно внутрибрюшинно вводили соединение Т1023 в дозе 75 мг/кг.

В третьем эксперименте 69 мышей были распределены в 4 экспериментальные группы: контрольную (21 особь) и три опытные группы (по 16 особей). Мыши контрольной группы в дальнейшем не получали каких-либо воздействий. Животным всех опытных групп на 7-е сутки роста КЭ проводили локальное воздействие γ -излучением в дозе 32 Гр на конечность с перевитой неоплазией. При этом за 30 минут до облучения животным второй опытной группы однократно внутрибрюшинно вводили амифостин в оптимальной радиозащитной дозе [9, 10] – 250 мг/кг, а животным третьей опытной группы – однократно внутрибрюшинно вводили соединение Т1023 в дозе 75 мг/кг.

Оценка и анализ эффектов. Во всех экспериментах лучевое повреждение нормальных соматических тканей у подопытных животных изучали по клинико-морфологической картине острой лучевой реакции кожи и прилегающих тканей на облучённой конечности. Тяжесть лучевых повреждений качественно и количественно оценивали по классификации Радиотерапевти-

ческой онкологической группы и Европейской организации по исследованию и лечению рака RTOG/EORTC-95 [11]. Противолучевое действие соединения T1023 и амифостина в отношении нормальных тканей оценивали путём сравнения объективных клинических проявлений острого лучевого ожога и путём статистического межгруппового сравнения его тяжести на различных сроках наблюдения. Для оценки противолучевой эффективности соединения T1023 в защите нормальных соматических тканей применён регрессионный анализ, выполненный с помощью программного пакета Mathematica 9.

Противоопухолевое действие γ -излучения и модифицирующие эффекты T1023 и амифостина в малигнизированных тканях оценивали по динамике роста КЭ, числу излеченных животных и средней продолжительности жизни мышей-опухоленосителей в экспериментальных группах. Для оценки роста неоплазии с 7-х суток после трансплантации КЭ у всех животных периодически измеряли линейные размеры опухолевых узлов и рассчитывали их объёмы в приближении $V = (a \times b \times c) \times (\pi/6)$, где a , b и c – диаметры в ортогональных плоскостях. Излеченными полагались животные, у которых наблюдался выраженный регресс опухолевого узла после воздействия γ -излучения и отсутствовал рецидивный рост в последующие 60 суток.

Статистическая обработка. Оценку значимости межгрупповых различий регистрируемых показателей проводили: при множественном сравнении – путём дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса с применением Q-критерия Данна; при парном сравнении – с помощью U-критерия Манна-Уитни и точного критерия Фишера. Статистические расчёты выполнены с помощью программного пакета BioStat 2007 (AnalystSoft, США). Межгрупповые различия полагали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Полученные ранее экспериментальные данные о способности T1023 к эффективной профилактике острой лучевой болезни и его влиянии на течение острого костномозгового синдрома [8, 12] отражают выраженное радиозащитное действие этого соединения в отношении критических органов – красного костного мозга и кишечного эпителия. Но способность T1023 к защите других нормальных соматических тканей, лучевое повреждение которых определяет развитие осложнений радиотерапии, оставалась, по существу, неисследованной. В этой связи целью первого исследования являлась экспериментальная оценка противолучевой эффективности T1023 в защите нормальных соматических тканей лабораторных животных.

Полученные в этом эксперименте результаты показали: при дозах γ -излучения 20-35 Гр к концу первой недели после локального лучевого воздействия у контрольных животных манифестировали проявления острого лучевого ожога, клинико-морфологическая тяжесть которого достигала максимума к 20-25 суткам. Как показано на рис. 1, в целом, тяжесть острого лучевого повреждения кожи и подлежащих тканей на облучённой конечности животных возрастала с увеличением дозы γ -излучения.

При дозе 20 Гр картина лучевого ожога отражала существенную сохранность и функциональную состоятельность эпидермиса: у большей части животных проявления были ограничены эпиляцией шерстного покрова, умеренной эритемой и стойким сухим эпидермитом, который лишь у части особей местами приобретал характер островкового экссудативного. При дозе 25 Гр возрастал масштаб поражения эпидермиса и дермы: у всех животных развивался влажный островковый эпидермит, который у некоторых особей на фоне усиления отёка приобретал

сливной характер. Полное поражение эпидермиса наблюдалось при дозе 30 Гр: у всех животных развивалась яркая эритема, выраженный отёк и распространённый сливной влажный эпидермит с последующим отторжением эпидермиса. При дозе 35 Гр отмечались проявления не только тотального поражения эпидермиса, но и значительных повреждений дермы и подлежащих тканей, и ожог приобретал язвенно-некротический характер: у части особей сливной экссудативный эпидермит осложнялся кровотечениями, формированием глубоких язв и, реже, развитием радионекроза с последующим отторжением части конечности.

Рис. 1. Влияние соединения Т1023 в дозе 75 мг/кг на тяжесть острой лучевой реакции кожи белых аутбредных мышей при локальном воздействии γ -излучения в дозах 20-35 Гр. Тёмные символы и кривая 1 – показатели контрольных животных; светлые символы и кривая 2 – показатели животных, получавших Т1023; разброс в точках соответствует $\pm$ SME; символом * отмечено статистически значимое различие ($p < 0,05$) по U-критерию Манна-Уитни.

У подопытных мышей, получавших соединение Т1023 перед облучением в дозах 25, 30 и 35 Гр, в целом, клинко-морфологическая тяжесть острого лучевого ожога была объективно ниже, чем у контрольных животных, и отражала существенную сохранность и регенераторную состоятельность эпидермиса даже при воздействии γ -излучения в дозе 35 Гр. При лучевом воздействии в дозах 25 и 30 Гр у большинства этих животных проявления лучевого ожога были ограничены умеренной эритемой и сухим эпидермитом, и лишь у части особей местами развивался островковый влажный эпидермит. При высокой дозе γ -излучения (35 Гр) в разгар проявлений ожога наблюдался островковый экссудативный эпидермит, который у некоторых особей сопровождался усилением эритемы и отёком, но не приобретал распространённый сливной и язвенно-некротический характер.

Способность Т1023 ограничивать лучевое повреждение нормальных соматических тканей в этом исследовании подтверждалась и статистически. Как отмечено на рис. 1, количественные показатели тяжести лучевого ожога у мышей, получавших Т1023, при всех дозах γ -излучения были статистически значимо ниже, чем у контрольных животных.

Следует отметить, что в данном эксперименте не наблюдалось влияния T1023 на воспалительные и регенераторные процессы. У животных контрольных и опытных групп со сходной степенью, масштабом и характером лучевых повреждений, независимо от применения T1023, сроки манифестации ожога, протекание воспаления и регенерации проходило без каких-либо отличий и особенностей. Следовательно, все наблюдаемые различия определялись снижением степени и масштаба лучевой альтерации кожи и подлежащих тканей, и, по существу, являлись клиническими проявлениями профилактического радиозащитного действия соединения T1023 в отношении нормальных соматических тканей. И полученные данные позволяли провести количественную оценку эффективности этого радиозащитного действия.

В токсикологических и фармакологических исследованиях зависимость доза-эффект часто имеет сигмовидную форму, и такую зависимость в области среднеэффективных доз, нередко, удаётся удовлетворительно описать логлинейной регрессией формулы (1):

$$E = a + b \cdot \ln D, \quad (1)$$

где E – величина эффекта, D – доза действующего фактора.

В своих расчётах в качестве величины эффекта мы использовали среднюю тяжесть лучевого ожога по шкале RTOG/EORTC-95, которая наблюдалась в экспериментальных группах в период максимального проявления лучевой травмы. Результаты расчётов показали (табл. 1, рис. 2), что зависимость тяжести острой лучевой реакции кожи от дозы γ -излучения у контрольных животных надёжно описывалась такой регрессией ($p < 0,01$). И при допущении о постоянстве угла наклона (параметра b) удалось получить аналогичную регрессию, так же удовлетворительно ($p < 0,05$) описывающую дозовую зависимость тяжести лучевого ожога и у мышей, получавших соединение T1023.

Таблица 1

Показатели регрессии формулы (1) зависимости тяжести лучевого ожога от дозы γ -излучения у контрольных и опытных животных

Показатель	Контроль	T1023
Параметр a	$-8,85 \pm 0,56$	$-10,14 \pm 0,10$
Параметр b	$3,43 \pm 0,27$	
Статистическая значимость	$\chi^2/\text{DoF}=0,04; R^2=0,96; p<0,01$	$\chi^2/\text{DoF}=0,03; R^2=0,88; p<0,05$

Рис. 2. Регрессионное описание дозовой зависимости тяжести острой лучевой реакции кожи у контрольных и опытных животных.

Тёмные символы – показатели контрольных животных; светлые символы – показатели животных, получавших T1023; разброс в точках соответствует $\pm\text{SME}$. Наклонные прямые – графики регрессий формулы (1) для контрольных (1) и опытных (2) животных.

Приемлемый уровень статистической значимости такого регрессионного описания позволяет получить надёжную оценку противолучевой эффективности Т1023 – ФИД γ -излучения, равный отношению доз лучевого воздействия, вызывающих ожог равной тяжести у опытных и контрольных животных. При таком описании ФИД имеет постоянную величину на всех уровнях эффекта: $\text{ФИД} = \text{Exp}((a_o - a_k)/b)$, где a_o , a_k и b – параметры регрессий формулы (1) для опытных и контрольных животных, приведённые в табл. 1. Рассчитанная таким путём оценка ФИД составила 1,46 (1,19÷1,85). Столь высокая величина ФИД свидетельствует, что соединение Т1023 способно высокоэффективно защищать и нормальные соматические ткани при воздействии редкоизионизирующих излучений.

Целью второго эксперимента являлось изучение на модели лучевой терапии экспериментальной неоплазии радиозащитных эффектов соединения Т1023 в нормальных соматических тканях и малигнизированных тканях солидного новообразования для оценки селективности противолучевого действия.

Результаты этого исследования показали, что, как и в первом эксперименте у интактных мышей, локальное воздействие γ -излучения в дозе 35 Гр вызывало у контрольных мышей-опухоленосителей, не получавших соединения Т1023, развитие выраженных лучевых повреждений нормальных тканей облучённой конечности (табл. 2). Проявления острого лучевого ожога у этих животных отражали полное поражение эпидермиса и значительные повреждения дермы и подлежащих тканей: на 2-3 неделе после лучевого воздействия у 80% этих мышей экссудативный эпидермит усиливался отёком и приобретал сливной характер, а у 25-30% особей осложнялся кровотечениями и формированием глубоких язв, приводивших впоследствии к атрофии и деформации конечности у 18% животных.

Таблица 2

Динамика тяжести острого лучевого ожога в экспериментальных группах по классификации RTOG-95 ($M \pm SD$)

Время наблюдения, сутки	Группа, число животных	
	35 Гр (n=11-10)	Т1023 + 35 Гр (n=12-10)
22	2,09 $\pm$ 0,70	0,67 $\pm$ 0,49*
26	2,72 $\pm$ 0,47	0,90 $\pm$ 0,32*
30	2,91 $\pm$ 0,30	1,00*
34	2,91 $\pm$ 0,30	1,00*
37	2,90 $\pm$ 0,57	1,10 $\pm$ 0,32*

Примечание: * – статистически значимое различие ($p < 0,01$) по U-критерию Манна-Уитни с опытной группой, не получавшей Т1023.

Однократное введение Т1023 в дозе 75 мг/кг перед лучевым воздействием сопровождалось у мышей-опухоленосителей объективным снижением тяжести острого лучевого ожога после воздействия γ -излучения в дозе 35 Гр. Характер лучевых повреждений нормальных тканей у этих животных отражал значительную сохранность и регенераторную состоятельность эпидермиса: у 90% этих мышей проявления лучевого ожога были ограничены эпиляцией шерстного покрова, умеренной эритемой и распространённым сухим эпидермитом, и лишь у 10% особей отмечалось развитие умеренного отёка и яркой эритемы. Наличие выраженного радиозащитного действия соединения Т1023 в нормальных соматических тканях мышей-опухоленосителей в этом эксперименте подтверждалось и статистически. Как видно из табл. 2, количественные по-

казатели тяжести лучевого ожога у мышей, получавших перед облучением соединение Т1023, были статистически значимо ниже ($p < 0,01$), чем у мышей, получавших только лучевое воздействие.

Таблица 3

Динамика роста солидной карциномы Эрлиха в экспериментальных группах

Время наблюдения, сутки	Средний объём опухоли, отн. ед. ($M \pm SD$)**		
	Контроль (n=17-15)	35 Гр (n=11-10)	Т1023 + 35 Гр (n=12-10)
7	1,00	1,00	1,00
10	$3,35 \pm 1,59$	$1,36 \pm 0,52$	$1,41 \pm 0,46^*$
14	$5,57 \pm 3,14$	$1,36 \pm 0,52^*$	$1,56 \pm 0,71^*$
18	$8,12 \pm 5,14$	$1,56 \pm 0,73^*$	$2,33 \pm 1,83^*$
22	$13,56 \pm 9,69$	$2,22 \pm 1,21^*$	$2,95 \pm 2,90^*$
26	$21,27 \pm 12,57$	$3,60 \pm 2,63^*$	$3,97 \pm 3,37^*$
30	$30,62 \pm 19,63$	$4,56 \pm 3,67^*$	$4,47 \pm 3,54^*$
34	$41,06 \pm 26,00$	$5,84 \pm 4,30^*$	$5,70 \pm 4,02^*$

Примечания: здесь и в табл. 6, * – статистически значимое различие ($p < 0,05$) с контрольной группой по Q-критерию Данна; ** – показатели нормированы на исходную величину объёма (на 7-е сутки роста КЭ).

Вместе с тем, в тканях солидной КЭ, растущей на облучённой конечности этих подопытных животных, противолучевое действие соединения Т1023 практически не реализовалось. Как показано в табл. 3, Т1023 не вызывало сколько-нибудь значимой модификации лучевых эффектов по отношению к КЭ. Независимо от применения Т1023 воздействие γ -излучения в дозе 35 Гр оказывало выраженное, равное по эффективности противоопухолевое действие, и на всех этапах наблюдения развитие облучённой КЭ у мышей опытных групп статистически не различалось. В обеих опытных группах лучевое воздействие вызывало задержку роста КЭ на 14,8-15,2 суток, и общий темп развития облучённой неоплазии резко замедлялся – время трёхкратного увеличения объёма опухолевого узла в 6-6,4 раза превышало аналогичный показатель КЭ у контрольных мышей.

Таблица 4

Показатели «терапевтического» эффекта радиотерапии карциномы Эрлиха в экспериментальных группах

Показатель	Контроль	35 Гр	Т1023 + 35 Гр
Доля излеченных животных	0/17	3/11	3/12
Средняя продолжительность жизни, сутки ($M \pm SD$)	$35,2 \pm 5,5$	$44,5 \pm 6,7^*$	$44,8 \pm 8,4^*$

Примечание: здесь и в табл. 7, * – статистически значимое различие ($p < 0,05$) с контрольной группой по Q-критерию Данна.

Т1023 не ослабляло и показатели «терапевтической» эффективности лучевой терапии КЭ. Как показано в табл. 4, однократное воздействие γ -излучения в дозе 35 Гр, независимо от применения Т1023, приводило к излечению экспериментальной неоплазии у 25-28% особей и статистически значимо повышало (на 27%) среднюю продолжительность жизни погибших подопытных животных после перевивки КЭ.

Таким образом, результаты этого эксперимента показали, что противолучевое действие соединения Т1023 реализуется в значительной мере избирательно: преимущественно в нормальных тканях и практически отсутствует в малигнизированных тканях солидной КЭ.

Целью третьего эксперимента являлось сравнительное изучение на модели лучевой терапии КЭ эффективности и селективности к нормальным тканям противолучевого действия соединения Т1023 и препарата сравнения – амифостина, который в настоящее время используется в качестве средства профилактики осложнений радиотерапии.

Результаты этого эксперимента показали, что, как и в предыдущих опытах, локальное воздействие γ -излучения в дозе 32 Гр вызывало у контрольных мышей-опухоленосителей, не получавших амифостин и Т1023, выраженные лучевые повреждения нормальных тканей облученной конечности (табл. 5). Характер клинических проявлений лучевого ожога у этих животных отражал значительные повреждения эпидермиса, дермы и подлежащих тканей: на 2-й неделе после лучевого воздействия у 70% этих мышей развивался островковый влажный эпидермит, который в дальнейшем у 15% мышей принимал сливной характер и нередко осложнялся кровотечениями и изъязвлениями.

Таблица 5

Динамика тяжести острого лучевого ожога в экспериментальных группах по классификации RTOG-95 ($M \pm SD$)

Время наблюдения, сутки	Группа, число животных		
	32 Гр (n=16-11)	Амифостин + 32 Гр (n=16-14)	Т1023 + 32 Гр (n=16-13)
18	1,69 $\pm$ 0,75	0,81 $\pm$ 0,40*	0,80 $\pm$ 0,56*
22	1,85 $\pm$ 0,69	0,75 $\pm$ 0,45*	0,93 $\pm$ 0,27*
26	1,85 $\pm$ 0,80	0,75 $\pm$ 0,45*	0,86 $\pm$ 0,36*
30	1,92 $\pm$ 0,95	0,67 $\pm$ 0,50*	0,86 $\pm$ 0,36*
34	1,92 $\pm$ 1,03	0,67 $\pm$ 0,50*	0,77 $\pm$ 0,44*

Примечание: * – статистически значимое различие ($p < 0,05$) по Q-критерию Данна с опытной группой, не получавшей амифостин и Т1023.

Однократное введение перед лучевым воздействием амифостина или Т1023 в дозах, оптимальных для профилактики острой лучевой болезни (250 и 75 мг/кг соответственно), сопровождалось равным по клинической выраженности, статистически значимым снижением тяжести острого лучевого ожога у подопытных мышей (табл. 5). Характер проявлений ожога у этих животных отражал существенную сохранность и регенераторную состоятельность эпидермиса: у 10-20% этих мышей вообще не отмечалось каких-либо проявлений лучевой реакции кожи в течение всего срока наблюдения, а у большей же части животных наблюдалась частичная эпиляция шерстного покрова, умеренная эритема и сухой эпидермит. При этом статистически значимых различий по тяжести лучевого ожога между группами, получавшими амифостин или Т1023, на всех сроках наблюдения, не отмечалось.

Таблица 6

Динамика роста солидной карциномы Эрлиха в экспериментальных группах

Время наблюдения, сутки	Средний объем опухоли, отн. ед. ($M \pm SD$)**			
	Контроль (n=21-16)	32 Гр (n=16-13)	Амифостин + 32 Гр (n=16)	Т1023 + 32 Гр (n=16-14)
7	1,00	1,00	1,00	1,00
10	2,02 $\pm$ 0,61	1,42 $\pm$ 0,37*	1,84 $\pm$ 0,65	1,29 $\pm$ 0,52*
14	4,57 $\pm$ 2,00	1,72 $\pm$ 1,06*	2,35 $\pm$ 1,29*	1,38 $\pm$ 0,53*
18	6,80 $\pm$ 2,44	2,18 $\pm$ 1,54*	2,71 $\pm$ 1,45*	1,49 $\pm$ 0,55*
22	9,57 $\pm$ 2,56	3,01 $\pm$ 2,26*	3,98 $\pm$ 2,69*	1,78 $\pm$ 0,79*
26	21,45 $\pm$ 7,79	4,50 $\pm$ 4,06*	6,80 $\pm$ 5,16*	3,44 $\pm$ 2,38*

Примечание: обозначения аналогичны табл. 3.

Как и в предыдущем эксперименте, радиозащитное действие и амифостина, и Т1023 в тканях экспериментальной неоплазии, растущей на облучённой конечности подопытных животных, практически не реализовалось. Как показано в табл. 6, и амифостин, и соединение Т1023 не вызвали значимой модификации лучевых эффектов по отношению к КЭ. Независимо от применения амифостина и Т1023 воздействие γ -излучения в дозе 32 Гр оказывало выраженное, равное по эффективности противоопухолевое действие, и на всех этапах наблюдения развитие облучённой КЭ у мышей опытных групп статистически не различалось. Во всех трёх опытных группах γ -излучение вызывало задержку роста КЭ на 12,3-17,1 суток и общий темп развития облучённой неоплазии замедлялся: время 3-кратного увеличения объёма опухолевого узла в 2,8-3,7 раза превышало аналогичный показатель КЭ у контрольных мышей-опухоленосителей.

При этом и амифостин, и соединение Т1023 не ослабляли показатели «терапевтической» эффективности лучевой терапии КЭ. Как показано в табл. 7, однократное воздействие γ -излучения в дозе 32 Гр, независимо от применения амифостина или Т1023, приводило к излечению экспериментальной неоплазии у 13-25% особей и статистически значимо повышало (на 21-27%) среднюю продолжительность жизни погибших подопытных животных после перевивки КЭ.

Таблица 7

Показатели «терапевтического» эффекта радиотерапии карциномы Эрлиха в экспериментальных группах

Показатель	Контроль	32 Гр	Амифостин + 32 Гр	Т1023 + 32 Гр
Доля излеченных животных	0/21	2/16	3/16	4/16
Средняя продолжительность жизни, сутки ($M \pm SD$)	34,9 $\pm$ 6,3	42,6 $\pm$ 6,5*	42,4 $\pm$ 6,2*	44,4 $\pm$ 7,8*

Примечание: обозначения аналогичны табл. 4.

Таким образом, полученные в этом эксперименте данные свидетельствуют, что Т1023 и препарат сравнения – амифостин, использованные в оптимальных радиозащитных дозах, обеспечивают равную по эффективности селективную противолучевую защиту нормальных соматических тканей подопытных мышей-опухоленосителей, не ослабляющую эффективность лучевой терапии солидной опухоли.

Обсуждение

В настоящее время к клиническому применению для профилактики осложнений лучевой терапии опухолей допущено только два лекарственных средства – разработанный в США в 1970-80 годах аминокилтиоловый радиопротектор амифостин и разработанный в последние годы в Швеции препарат палифермин.

Палифермин – препарат на основе рекомбинантного фактора роста кератиноцитов человека, судя по данным литературы, проявляет умеренное профилактическое, но и выраженное терапевтическое действие в отношении острых лучевых повреждений эпителиальных структур кожи, слизистых ЖКТ и дыхательных путей. Так, в клинических исследованиях при радиохимиотерапии опухолей головы и шеи палифермин умеренно снижал частоту развития острого орального мукозита (с 69 до 54%), но резко сокращал продолжительность тяжёлой формы мукозита (с 26 до 5 суток) [13]. В целом, лечебно-профилактический потенциал палифермина при осложнениях радиотерапии до конца неясен. Неисследованными пока остаются его возможности в отношении лучевых повреждений не эпителиальных тканей, паренхиматозных органов и способности к профилактике отдалённых лучевых повреждений.

Более исследованы возможности амифостина, который уже около 15 лет применяется многими радиологическими центрами мира для профилактики осложнений лучевой терапии.

По устоявшимся представлениям, противолучевое действие амифостина реализуется, главным образом, его метаболитом WR1065, который образуется в тканях в реакции дефосфорилирования, катализируемой щелочной фосфатазой. Имеющий свободную тиоловую группу, WR1065 является эффективным акцептором электронов и, повышая восстановительный потенциал тканей, ограничивает их поражение свободными радикалами, возникающими при воздействии ионизирующих излучений [14].

Избирательность противолучевого действия амифостина к нормальным тканям исследована в ряде работ, где было установлено, что метаболит WR1065 в меньшей степени накапливается в тканях солидных опухолей, чем в нормальных тканях, что авторы связывают с низким кровотоком в опухолях и более высокой активностью щелочной фосфатазы в нормальных клетках. И, вероятно, в связи с такими особенностями фармакокинетики и метаболизма, амифостин эффективно защищает нормальные ткани, но слабо влияет на лучевое поражение тканей солидных опухолей [15].

В клинических исследованиях установлено, что амифостин выраженно снижает частоту и тяжесть острых лучевых повреждений нормальных тканей, таких, как острая лучевая ксеростомия, острый мукозит, эзофагит, пульмонит и энтероколит. Показана также способность амифостина к профилактике отдаленных лучевых повреждений, таких, как поздняя хроническая ксеростомия, эзофагальный фиброз, лучевой пневмофиброз и панкреатический фиброз, но эти данные пока менее убедительны, вероятно, в связи с их высокой статистической неоднородностью [16].

Вместе с тем, опыт клинического применения амифостина обозначил и его существенные недостатки, обусловленные особенностями фармакодинамики всех известных аминотиоловых радиопротекторов: их эффективное радиозащитное действие реализуется только при применении в высоких, субтоксических дозах [14]. В этой связи, низкая переносимость и потенциальная токсичность эффективных радиозащитных доз амифостина (20-25 мг/кг внутривенно в течение 2-3 минут) требует детальной подготовки пациента и тщательного врачебного контроля, поскольку угрожает рисками острых негативных эффектов, которые развиваются при его применении у 30-40% больных. При этом, наиболее угрожающие из них – резкое снижение артериального давления, нарушения сердечного ритма, тошнота и многократная рвота, требуют немедленной коррекции и, нередко, становятся основанием для прекращения применения препарата, особенно при наличии в анамнезе пациента сердечно-сосудистой патологии, инсульта, почечной или печеночной недостаточности. Этим обусловлены и возрастные ограничения – амифостин не рекомендован детям и пациентам старше 70 лет [17, 18].

Таким образом, ограниченность выбора имеющихся средств профилактики и лечения осложнений лучевой терапии и их недостатки стимулируют поиски новых, более безопасных средств. Результаты, полученные в данной работе, свидетельствуют, что эффективная и избирательная противолучевая защита нормальных соматических тканей может быть реализована путём транзитного подавления эндогенного синтеза оксида азота ингибиторами NOS и, в частности – соединением T1023.

Вазоактивный, гипоксический механизм противолучевого действия, судя по всему, позволяет T1023 в равной степени эффективно защищать как критические для развития ОЛБ органы, так и другие нормальные ткани: величина ФИД 1,46 (1,19±1,85), полученная в этой работе по

острой лучевой реакции кожи, практически совпадает с величиной ФИД 1,44 ($1,26 \div 1,65$), полученной ранее по выживаемости животных при воздействии средне- и сверхлетальных доз γ -излучения [8].

Вместе с тем, в тканях солидных экспериментальных неоплазий противолучевое действие Т1023 практически не реализуется. Об этом свидетельствуют как данные, полученные в этой работе на моделях лучевой терапии КЭ, так и результаты ранее проведенных исследований на моделях лучевой терапии саркомы М-1 у крыс [19]. Причём, способность к избирательной защите нормальных тканей на моделях радиотерапии солидных неоплазий проявляют и ряд других N,S-замещённых изотиомочевин, близких по структуре к Т1023 и также являющихся эффективными ингибиторами NOS [20].

Избирательность гипоксического противолучевого действия Т1023 к нормальным тканям, скорее всего, обусловлена атипичной ангиоархитектурой и функциональной недостаточностью васкулярной сети солидных неоплазий, приводящих к развитию в тканях таких новообразований хронической гипоксии. В таких условиях острая транзиторная циркуляторная гипоксия, индуцированная Т1023, судя по всему, существенно не углубляет внутриопухолевую гипоксию и значимо не модифицирует радиочувствительность тканей солидных неоплазий.

Заключение

Результаты сравнительного исследования противолучевого действия соединения Т1023 и амифостина на модели радиотерапии солидной КЭ показали, что оба радиопротектора при их применении в дозах, оптимальных для профилактики ОЛБ, обеспечивают равную по эффективности, селективную защиту нормальных тканей и при этом не ослабляют противоопухолевые эффекты γ -излучения. В то же время, в этом исследовании присутствует и существенное отличие между Т1023 и амифостином, касающееся безопасности таких воздействий. Использованная в эксперименте оптимальная радиозащитная доза амифостина (250 мг/кг) близка к максимально переносимым и составляет 50% от ЛД₁₆ для таких животных и при таком способе введения [9, 10], а оптимальная радиозащитная доза Т1023 (75 мг/кг) составляет 26% от ЛД₁₆ для таких животных и при таком способе введения [8]. И, следовательно, наблюдаемое в этом эксперименте равное по селективности к нормальным тканям и противолучевой эффективности радиозащитное действие соединения Т1023 реализует при дозе, в 2 раза более безопасной, в сравнении с амифостином.

Как отмечено выше, основные недостатки и ограничения амифостина связаны не с его лечебно-профилактической эффективностью, а с безопасностью – низкой переносимостью и рисками негативных эффектов. В этой связи, отмеченное различие уровня безопасности оптимальных доз, по нашему мнению, отражает потенциальное преимущество Т1023 и свидетельствует о перспективности дальнейшей разработки этого соединения как основы нового эффективного и безопасного фармакологического средства профилактики осложнений лучевой терапии.

Данная работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-44-400256p_a.

Литература

1. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) /под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, В.Г. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. 250 с.
2. **Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю.** Современная лучевая патология человека: проблемы методологии исследований, этиологии, патогенеза и классификации. Обнинск: ФГБУ МРНЦ МЗ РФ, 2012.
3. **Аклеев А.В.** Радиобиологические закономерности реакции нормальных тканей при лучевой терапии опухолей //Радиац. биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54, № 3. С. 241-255.
4. **Prasanna P.G., Stone H.B., Wong R.S., Capala J., Bernhard E.J., Vikram B., Coleman C.N.** Normal tissue protection for improving radiotherapy: Where are the gaps? //Transl. Cancer Res. 2012. V. 1, N 1. P. 35-48.
5. **Kim J.H., Jenrow K.A., Brown S.L.** Mechanisms of radiation-induced normal tissue toxicity and implications for future clinical trials //Radiat. Oncol. J. 2014. V. 32, N 3. P. 103-115.
6. **Филимонова М.В., Проскуряков С.Я., Шевченко Л.И., Шевчук А.С., Лушникова Г.А., Макаrchук В.М., Арзамасцев Е.В., Малиновская К.И., Левицкая Е.Л.** Радиозащитные свойства производных изотиомочевина с NO-ингибирующим механизмом действия //Радиац. биология. Радиоэкология. 2012. Т. 52, № 6. С. 593-601.
7. **Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Трофимова Т.П., Макаrchук В.М., Шевчук А.С., Лушникова Г.А.** К вопросу о механизме радиозащитного действия ингибиторов NO-синтаз //Радиац. биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54, № 5. С. 500-506.
8. **Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Макаrchук В.М., Чеснакова Е.А., Измestьева О.С., Корнеева Т.С., Филимонов А.С.** Радиозащитные свойства ингибитора NO-синтаз T1023: I. Показатели противолучевой активности и взаимодействие с другими радиопротекторами //Радиац. биология. Радиоэкология. 2015. Т. 55, № 3. С. 250-259.
9. **Kuna P., Krajcovic C.** Acute toxicity and radioprotective effectiveness of WR-2721 (Gammaphos) in rats //Cas. Lek. Cesk. 1981. V. 120, N 25. P. 776-778.
10. **Куна П.** Острая токсичность и противолучевая эффективность гаммафоса при внутримышечном введении мышам //Радиобиология. 1985. Т. 25, № 1. С. 59-62.
11. **Wells M., MacBride S.** Radiation skin reactions //Supportive care in radiotherapy. Churchill Livingstone, 2003. P. 135-159.
12. **Макаrchук В.М., Филимонова М.В., Измestьева О.С., Чеснакова Е.А., Самсонова А.С., Корнеева Т.С., Шевченко Л.И., Филимонов А.С.** Радиозащитные свойства ингибитора NO-синтаз T1023: III. Механизмы противолучевого действия in vivo //Радиац. биология. Радиоэкология. 2016. Т. 56, № 6. С. 590-597.
13. **Le Q.T., Kim H.E., Schneider C.J., Muraközy G., Skladowski K., Reinisch S., Chen Y., Hickey M., Mo M., Chen M.G., Berger D., Lizambri R., Henke M.** Palifermin reduced severe mucositis in definitive chemoradiotherapy of locally advanced head and neck cancer: a randomized, placebo-controlled study //J. Clin. Oncol. 2011. V. 29, N 20. P. 2808-2814.
14. **Васин М.В.** Средства профилактики и лечения лучевых поражений. М., 2006. 340 с.
15. **Kouvaris J.R., Kouloulis V.E., Vlahos L.J.** Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector //Oncologist. 2007. V. 12, N 6. P. 738-747.
16. **Devine A., Marignol L.** Potential of amifostine for chemotherapy and radiotherapy-associated toxicity reduction in advanced NSCLC: Meta-analysis //Anticancer Res. 2016. V. 36, N 1. P. 5-12.
17. **Hensley M.L., Hagerty K.L., Kewalramani T., Green D.M., Meropol N.J., Wasserman T.H., Cohen G.I., Emami B., Gradishar W.J., Mitchell R.B., Thigpen J.T., Trotti A. 3rd, von Hoff D., Schuchter L.M.** American Society of Clinical Oncology 2008 clinical practice guideline update: use of chemotherapy and radiation therapy protectants //J. Clin. Oncol. 2009. V. 27, N 1. P. 127-145.

18. Brunton L., Chabner B., Knollman B. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th ed. NY: McGraw Hill Professional, 2010. 1808 p.
19. Филимонова М.В., Ульяненко С.Е., Шевченко Л.И., Кузнецова М.Н., Макачук В.М., Чеснакова Е.А., Самсонова А.С., Филимонов А.С. Радиозащитные свойства ингибитора NO-синтаз T1023: II. Способность к селективной защите нормальных тканей при лучевой терапии новообразований //Радиац. биология. Радиоэкология. 2015. Т. 55, № 3. С. 260-266.
20. Филимонова М.В., Самсонова А.С., Корнеева Т.С., Шевченко Л.И., Филимонов А.С. Исследование способности нового ингибитора синтаз оксида азота INOS1 селективно защищать нормальные ткани на модели лучевой терапии карциномы Эрлиха //Радиация и риск. 2018. Т. 27. № 2. С. 37-45.

The radioprotective effects of nitric oxide synthase inhibitor T1023 on normal and malignant tissues

Filimonova M.V., Samsonova A.S., Korneeva T.S., Shevchenko L.I.,
Saburov V.O., Filimonov A.S.

A. Tsyb MRRC, Obninsk

The aim of this research was to study ability of the new NOS inhibitor, N,S-substituted isothiourea (compound T1023), to effectively and selectively protect the normal somatic tissues from radiation-induced adverse effects. Methods of investigation included the study of T1023 influence on the development of skin acute radiation damage and antitumor effects of γ -radiation on intact mice and on the models of solid Ehrlich carcinoma (CE) for studying radiotherapy-induced effects; comparative estimation of the radioprotective efficacy and selectivity of T1023 and amifostine in normal tissues. The results of the experiments showed that T1023 at the optimal dose for prevention of ARS development (75 mg/kg), significantly reduced the radiation-induced alteration of the skin and underlying tissues, as well as the severity of acute radiation burns. DRF for acute radiation-induced skin reaction is 1.46. It is important to stress that no radioprotective effect of T1023 on the CE tissues, growing on the irradiated limb of animals was observed, the NOS inhibitor did not reduce the therapeutic effectiveness of radiation therapy. Amifostine (250 mg/kg) and T1023 (75 mg/kg), used in optimal radioprotective doses, were equally effective for selective protection of normal tissues. However, optimal dose of T1023 was twice as safe (26% LD₁₆) than amifostine (50% LD₁₆). T1023 manifests protective efficacy and selective protection of normal somatic tissues from radiation-induced damage at relatively safe doses. The protective properties of T1023 allow us to continue the study of this compound as the basis for development of an effective and safe pharmacological agent for the prevention of adverse effects of radiotherapy.

Key words: *ionizing radiation, radiation pharmacology, radioprotectors, radiation-induced damage, white auto-bred mice, cancer recurrence, experimental neoplasia, experimental radiotherapy, complications from radiotherapy, selective protection of health tissues, inhibitors of nitric oxide synthase.*

References

1. *Malignant neoplasms in Russia in 2015 (morbidity and mortality)*. Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, V.G. Petrova. Moscow, P. Herzen MORI, 2017, 250 p. (In Russian).
2. Lushnikov E.F., Abrosimov A.Yu. Modern radiation pathology of a person: the problems of the methodology of research, etiology, pathogenesis and classification. Obninsk, MRRC, 2012. (In Russian).
3. Akleev A.V. Radiobiological regularities of the reaction of normal tissues during radiation therapy of tumors. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya – Radiation Biology. Radioecology*, 2014, vol. 54, no. 3, pp. 241-255. (In Russian).

Filimonova M.V.* – Head of Lab., D. Sc., Biol.; Samsonova A.S. – Researcher; Korneeva T.S. – Researcher; Shevchenko L.I. – Lead. Researcher, C. Sc., Chem.; Saburov V.O. – Engineer; Filimonov A.S. – Researcher. A. Tsyb MRRC.

*Contacts: 4 Korolyov str., Obninsk, Kaluga region, Russia, 249036. Tel.: +7 (484) 399-71-36; e-mail: mari_fil@mail.ru.

4. **Prasanna P.G., Stone H.B., Wong R.S., Capala J., Bernhard E.J., Vikram B., Coleman C.N.** Normal tissue protection for improving radiotherapy: Where are the gaps? *Transl. Cancer Res.*, 2012, vol. 1, no. 1, pp. 35-48.
5. **Kim J.H., Jenrow K.A., Brown S.L.** Mechanisms of radiation-induced normal tissue toxicity and implications for future clinical trials. *Radiat. Oncol. J.*, 2014, vol. 32, no. 3, pp. 103-115.
6. **Filimonova M.V., Proskuryakov S.Ya., Shevchenko L.I., Shevchuk A.S., Lushnikova G.A., Makarchuk V.M., Arzamastsev E.V., Maltnovskaya K.I., Levitskaya E.L.** Radioprotective properties of isothiurea derivatives with NO-inhibitory mechanism of action. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya – Radiation Biology. Radioecology*, 2012, vol. 52, no. 6, pp. 593-601. (In Russian).
7. **Filimonova M.V., Shevchenko L.I., Trofimova T.P., Makarchuk V.M., Shevchuk A.S., Lushnikova G.A.** On the mechanism of radioprotective effect of NO-synthase inhibitors. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya – Radiation Biology. Radioecology*, 2014, vol. 54, no. 5, pp. 500-506. (In Russian).
8. **Filimonova M.V., Shevchenko L.I., Makarchuk V.M., Chesnakova E.A., Izmet'seva O.S., Korneeva T.S., Filimonov A.S.** Radioprotective properties of NO-synthase inhibitor T1023: I. Indicators of radioprotective activity and interaction with other radioprotectors. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya – Radiation Biology. Radioecology*, 2015, vol. 55, no. 3, pp. 250-259. (In Russian).
9. **Kuna P., Krajcovic C.** Acute toxicity and radioprotective effectiveness of WR-2721 (Gammaphos) in rats. *Cas. Lek. Cesk.*, 1981, vol. 120, no. 25, pp. 776-778.
10. **Kuna P.** Acute toxicity and radioprotective effectiveness of Gammaphos by intramuscularly administered to mice. *Radiobiologiya – Radiobiology*, 1985, vol. 25, no. 1, pp. 59-62. (In Russian).
11. **Wells M., MacBride S.** Radiation skin reactions. *Supportive care in radiotherapy*. Churchill Livingstone, 2003, pp. 135-159.
12. **Makarchuk V.M., Filimonova M.V., Izmet'seva O.S., Chesnakova E.A., Samsonova A.S., Korneeva T.S., Shevchenko L.I., Filimonov A.S.** Radioprotective properties of NO-synthase inhibitor T1023: III. Mechanisms of radioprotective action in vivo. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya – Radiation Biology. Radioecology*, 2016, vol. 56, no. 6, pp. 590-597. (In Russian).
13. **Le Q.T., Kim H.E., Schneider C.J., Muraközy G., Skladowski K., Reinisch S., Chen Y., Hickey M., Mo M., Chen M.G., Berger D., Lizambri R., Henke M.** Palifermin reduced severe mucositis in definitive chemoradiotherapy of locally advanced head and neck cancer: a randomized, placebo-controlled study. *J. Clin. Oncol.*, 2011, vol. 29, no. 20, pp. 2808-2814.
14. **Vasin M.V.** *Agents for the prevention and treatment of radiation damage*. Moscow, 2006. 340 p. (In Russian).
15. **Kouvaris J.R., Kouloulis V.E., Vlahos L.J.** Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector. *Oncologist*, 2007, vol. 12, no. 6, pp. 738-747.
16. **Devine A., Marignol L.** Potential of amifostine for chemotherapy and radiotherapy-associated toxicity reduction in advanced NSCLC: Meta-analysis. *Anticancer Res.*, 2016, vol. 36, no. 1, pp. 5-12.
17. **Hensley M.L., Hagerty K.L., Kewalramani T., Green D.M., Meropol N.J., Wasserman T.H., Cohen G.I., Emami B., Gradishar W.J., Mitchell R.B., Thigpen J.T., Trotti A. 3rd, von Hoff D., Schuchter L.M.** American Society of Clinical Oncology 2008 clinical practice guideline update: use of chemotherapy and radiation therapy protectants. *J. Clin. Oncol.*, 2009, vol. 27, no. 1, pp. 127-145.
18. **Brunton L., Chabner B., Knollman B.** Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12th ed. NY, McGraw Hill Professional, 2010, 1808 p.
19. **Filimonova M.V., Ulyanenko S.E., Shevchenko L.I., Kuznetsova M.N., Makarchuk V.M., Chesnakova E.A., Samsonova A.S., Filimonov A.S.** Radioprotective properties of NO-synthase inhibitor T1023: II. The ability for selective protection of normal tissue during radiotherapy of tumors. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya – Radiation Biology. Radioecology*, 2015, vol. 55, no. 3, pp. 260-266 (In Russian).
20. **Filimonova M.V., Samsonova A.S., Korneeva T.S., Shevchenko L.I., Filimonov A.S.** Study of the ability of a new nitric oxide synthase inhibitor INOS1 to selectively protect the normal tissue in the Ehrlich carcinoma radiotherapy model. *Radiatsiya i risk – Radiation and Risk*, 2018, vol. 27, no. 2, pp. 37-45. (In Russian).