DOI: 10.21870/0131-3878-2020-29-1-45-56

УДК 615.849.015.25:546.172.6-31

Лактатемия как возможный фармакологический маркер радиорезистентности при действии ингибитора NOS T1023

Макарчук В.М., Филимонова М.В., Филимонов А.С., Шевченко Л.И.,
Изместьева О.С., Сабурова А.С.

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

Целью исследования являлось изучение динамики лактатемии и кислотно-основного состояния как возможного показателя гипоксического и радиозащитного действия ингибитора синтазы оксида азота (NOS) T1023. Методы исследования включали оценку содержания лактата, газового и кислотно-основного состава артериальной крови и сопоставление этих данных с кардиоваскулярными и противолучевыми эффектами соединения T1023. Результаты исследований показали, что динамика содержания лактата и компенсаторных сдвигов в газовом и кислотно-основном составе, препятствующих развитию ацидоза, детально отражали гипоксическое действие T1023 и отчётливо коррелировали с кардиоваскулярными эффектами, индуцирующими транзиторную гипоксию. Сопоставление этих данных с радиобиологическими эффектами T1023 показало наличие выраженной корреляции между противолучевым действием T1023 и индуцированной им лактатемией. При этом выявленная взаимосвязь количественно описывалась простыми линейными моделями. Полученные данные показывают, что использованные доступные лабораторные методы адекватно отражают гипоксическое и радиозащитное действие ингибитора NOS T1023 в динамике. Это свидетельствует о том, что лактатемия может являться фармакологическим маркером изменения радиорезистентности. Полная верификация такого маркера, потенциально, может позволить T1023 преодолеть существующие препятствия клинических испытаний радиопротекторов.

Ключевые слова: ингибиторы NOS, гипоксический радиопротектор, лактатемия, кислотно-основное состояние, фармакологический маркер.

Введение

При испытаниях и нормативном утверждении лекарственных средств (ЛС), предназначенных для профилактики и лечения опасных для жизни человека состояний, вызванных высокотоксичными воздействиями, такими как ионизирующее излучение, основной проблемой является ограничение возможности их клинического изучения [1]. Если исследования переносимости и безопасности таких ЛС для человека проводятся с участием здоровых добровольцев, то прямые клинические исследования их лечебно-профилактической эффективности в отношении, например, острой лучевой болезни уже не представляются возможными. Наиболее приемлемым путём преодоления этого препятствия в настоящее время является доклиническое обоснование и верификация фармакологических маркеров специфической активности таких ЛС, позволяющих экстраполицию противолучевых эффектов на человека.

В области наших научных и прикладных интересов уже длительное время находятся вопросы фармакологии модификаторов эндогенного синтеза оксида азота [2]. В частности, в лаборатории радиационной фармакологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба было показано, что оригинальный ингибитор NOS – 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевин гидробромид (далее – соединение T1023) – проявляет выраженную активность, характерную для гипоксических радиопротекторов [3]. Имеющиеся на сегодняшний день экспериментальные данные, отражающие

Макарчук В.М. – ст. научн. сотр., к.б.н.; Филимонова М.В.* – зав. лаб., д.б.н.; Филимонов А.С. – науч. сотр.; Шевченко Л.И. – вед. научн. сотр., к.х.н.; Изместьева О.С. – вед. научн. сотр., к.б.н.; Сабурова А.С. – научн. сотр. МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

*Контакты: 249035, Калужская обл., Обнинск, ул. Королёва, 4. Тел.: +7 (484) 399-71-36; e-mail: mari_fil@mail.ru.

высокую радиозащитную эффективность и относительную безопасность T1023 [4], а также его способность к избирательной противолучевой защите немалигнизированных тканей [5] свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки этого соединения как в качестве радиопротектора, так и в качестве ЛС профилактики осложнений лучевой терапии.

В этой связи, актуальность приобретает вопрос идентификации фармакологических маркеров радиозащитной активности соединения T1023. Исходя из молекулярных и физиологических механизмов его действия – ингибирование NOS и индукция тканевой гипоксии, возможными маркерами противолучевой активности T1023 может являться количественный уровень эндогенного синтеза NO или содержание O_2 в тканях. Но имеющиеся методы точного количественного измерения NO и pO_2 в тканях (полярография, флуоресцентная оксиметрия, ЭПР-спектрометрия) применительно к человеку требуют достаточно редкого оборудования, сертифицированного к клиническому применению, а сам процесс измерений при этом является нестандартной инвазивной процедурой, сопряжённой с соответствующими рисками. Вместе с тем, в клинко-лабораторной диагностике широко применяется другое исследование, которое, по нашему мнению, может быть использовано для выявления как гипоксического действия, так и противолучевой активности соединения T1023.

При ограничении доставки O_2 в митохондрии возрастает активность анаэробного гликолиза, конечным продуктом которого является пирувиноградная кислота. В условиях дефицита O_2 происходит восстановление пирувата до лактата [6, 7]. Увеличение содержания лактата в крови является одним из наиболее ранних признаков неадекватного снабжения тканей O_2 и развития тканевой гипоксии [8, 9]. Поскольку избыточная продукция лактата может развиваться при многих патологиях, методы исследования лактатемии и изменений газового состава и кислотно-основного равновесия крови являются общепринятыми диагностическими стандартами.

Целью данной работы являлось изучение влияния соединения T1023 на содержание лактата, газовый и кислотно-щелочной состав крови животных и экспериментальная оценка возможности использования уровня лактатемии в качестве фармакологического маркера радиорезистентности при действии T1023.

Материалы и методы

Изучаемые соединения. Для проведения исследований субстанция T1023 была наработана и стандартизирована в лаборатории радиационной фармакологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. В качестве препарата-сравнения в работе использовали 5-метокситриптами́н (мексамин; Sigma Aldrich, США), являющийся известным серотонинергическим гипоксическим радиопротектором [10]. Применяли T1023 и мексамин внутривенно (в/в) в виде 0,2-1,5% асептических водных растворов, которые изготавливали непосредственно перед введением на основе 0,9% раствора натрия хлорида (Дальхимфарм, РФ).

Лабораторные животные. Исследования выполнены на 75 самцах крыс линии Wistar в возрасте 2,5-3,0 месяцев с массой тела 250-330 г. Животные были получены из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии МРНЦ. Содержались животные в клетках Т-4 в условиях естественного освещения с принудительной 10-кратной вентиляцией, при температуре 18-20 °С и относительной влажности воздуха 40-70%, на подстилке из древесных стружек, со свободным доступом к питьевой воде и брикетированному корму ПК-120-1 (Лабораторснаб, РФ). Работы с лабораторными животными бы-

ли выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур, принятых в МРНЦ, которые соответствуют правилам Европейской конвенции ETS 123.

Операционные манипуляции, схемы экспериментов. Наркотизированному животному (тиопентал натрия 80 мг/кг в/б) проводили трахеотомию, устанавливали трахеостому и катетеризовали правую сонную артерию. Через 30 мин после завершения этих манипуляций у всех животных определяли частоту дыхательных движений (ЧДД) и производили забор крови (0,25 мл) из правой сонной артерии для определения исходных показателей. Затем животным опытных групп вводили однократно в/б растворы Т1023 или мексамина, а контрольным крысам – эквивалентные объёмы физиологического раствора. Через 5-120 мин после инъекции (в зависимости от схемы опытов) у всех животных проводили повторное определение ЧДД и повторный забор артериальной крови. Плановую эвтаназию проводили путём воздушной эмболии под тиопенталовым наркозом.

Клинико-лабораторные исследования. Изучение кислотно-щелочного и газового состава артериальной крови животных проводили на анализаторе ABL80 FLEX CO-OX (Radiometer Medical ApS, Дания) сразу после забора крови. В пробах измеряли и рассчитывали: напряжение кислорода (p_aO_2) и углекислого газа (p_aCO_2), концентрацию гемоглобина (cHb), сатурацию гемоглобина (s_aO_2), содержание оксигемоглобина (FO_2Hb) и метгемоглобина ($FCOHb$), концентрацию ионов бикарбоната ($cHCO_3$), избыток или дефицит буферных оснований ($cBase$), кислотность (pH). Концентрацию лактата в сыворотке артериальной крови определяли в течение 30 мин после забора пробы с помощью биохимического анализатора Randox RX Monza (Randox, Великобритания).

Статистический анализ. Для всех экспериментальных данных были рассчитаны стандартные параметры вариационной статистики и их величины приведены в виде $M \pm SD$. При парном сравнении значимость межгрупповых различий оценивали по U-критерию Манна-Уитни; при множественном – путём рангового дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса с применением Q-критерия Данна. Значимость регрессий оценивали по χ^2 -критерию.

Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов проводили сравнительную оценку изменений лактатемии, газового и кислотно-щелочного состава артериальной крови крыс через 30 мин после однократного введения мексамина в эффективной радиозащитной дозе 20 мг/кг, и соединения Т1023 в дозах 25-150 мг/кг.

Результаты этих экспериментов показали (табл. 1), что мексамин и Т1023 в использованных дозах не оказывали какого-либо влияния на процессы оксигенации и кислородтранспортную функцию крови – содержание гемоглобина, оксигемоглобина и сатурация гемоглобина кислородом у подопытных крыс оставались на уровне, характерном для контрольных животных.

В то же время, индуцированная мексamiном гипоксия через 30 мин после введения проявлялась значительным, более чем в 2 раза, повышением содержания лактата. Сдвиг гомеостаза в сторону ацидоза в этом случае предотвращался с участием всех компенсаторных механизмов. В первую очередь, на связывание ионов H^+ расходовалась буферная система крови – наблюдалось существенное снижение $cHCO_3$ и общий баланс буферных оснований становился резко дефицитным ($cBase < 0$). Полная компенсация снижения pH у этих животных достигалась с выраженным участием респираторного механизма.

Таблица 1

**Показатели содержания лактата, газового и кислотно-щелочного состава
в артериальной крови крыс Wistar в контроле и при воздействии мексамина
и соединения Т1023 (5-7 животных в группе)**

Показатели	Время, мин	Контроль	Мексамин, 20 мг/кг	Соединение Т1023			
				25 мг/кг	40 мг/кг	75 мг/кг	150 мг/кг
Лактат, мм/л	0	17,7±3,9	18,6±3,0	20,7±4,8	17,2±3,3	20,2±2,3	19,1±3,3
	30	18,9±5,4	41,0±7,5 *	24,9±7,2	25,8±7,9	40,5±8,2 *	38,8±9,1 *
p _a CO ₂ , мм Hg	0	45,2±1,3	44,5±1,0	44,3±2,5	42,9±2,3	45,6±1,3	44,4±2,2
	30	47,3±2,1	35,1±1,6 *	40,6±3,3	36,8±4,1 *	32,8±2,0 *	33,0±1,8 *
p _a O ₂ , мм Hg	0	89,3±5,3	83,3±9,3	85,8±3,8	86,7±6,9	89,2±6,1	82,0±5,1
	30	101,0±13,5	94,0±15,5	104,2±11,2 *	99,7±5,2 *	113,4±8,8 *	111,8±7,2 *
сНб, г/л	0	15,0±0,8	15,4±0,9	15,7±0,6	15,2±0,6	16,2±1,1	14,8±1,2
	30	15,4±0,7	16,4±1,0	16,5±1,1	16,6±1,3	17,4±1,8	15,8±1,2
s _a O ₂ , %	0	97,5±2,6	94,6±2,8	95,8±2,3	95,6±2,5	97,4±2,0	96,7±2,2
	30	99,6±2,1	94,9±5,7	98,8±3,2	97,3±1,6	98,7±1,8	99,0±2,5
FO ₂ Hb, %	0	95,4±2,4	92,2±2,8	93,2±1,3	91,9±3,9	95,4±1,9	94,9±2,9
	30	97,2±1,9	93,0±5,3	96,6±3,6	95,6±2,5	97,9±2,8	97,6±3,4
FCONb, %	0	1,4±0,2	1,2±0,2	1,3±0,2	1,2±0,2	1,2±0,1	1,1±0,3
	30	1,3±0,2	1,0±0,1	1,2±0,2	1,2±0,2	1,1±0,4	1,1±0,3
ЧДД, мин ⁻¹	0	82,0±8,0	75,5±14,7	82,4±7,4	80,3±11,8	73,6±10,0	79,7±11,3
	30	80,0±9,2	68,5±15,8	73,2±15,8	72,0±15,3	66,8±10,0	69,5±11,3
pH	0	7,39±0,02	7,38±0,01	7,39±0,04	7,37±0,01	7,37±0,01	7,38±0,02
	30	7,39±0,01	7,33±0,03 *	7,36±0,05	7,37±0,08	7,41±0,06	7,39±0,03
сHCO ₃ , мм/л	0	25,5±0,4	24,9±0,9	24,9±1,1	24,7±0,7	25,2±0,6	25,0±0,8
	30	26,0±0,6	19,3±2,4 *	21,8±0,5 *	21,0±1,1 *	20,1±0,9 *	20,6±1,1 *
сBase, мм/л	0	2,30±0,62	3,03±0,59	0,02±0,93	0,58±2,69	1,30±1,32	0,93±1,24
	30	3,00±0,87	-5,65±2,60 *	-2,62±1,16 *	-1,80±2,76	-2,34±1,09 *	-2,83±0,98 *

Примечание: * – статистически значимое различие (p<0,05) с исходным значением показателя по U-критерию Манна-Уитни.

Бикарбонатный буфер, связывая H⁺, высвобождает в кровь углекислый газ:

При этом, возрастание в крови содержания CO₂ стимулирует активность дыхательного центра и усиливает лёгочную вентиляцию. У животных это не повышало ЧДД, но через 5-10 мин после введения мексамина или Т1023 у подопытных крыс объективно возрастала амплитуда экскурсии грудной клетки и брюшной стенки. При этом, усиление альвеолярной вентиляции выражено, на 20-30%, снижало содержание CO₂ (p_aCO₂), и в несколько меньшей степени, на 10-15%, повышало содержание O₂ (p_aO₂) в артериальной крови этих животных. Поскольку выведение молекулы CO₂ эквивалентно выведению иона H⁺ (1), этот механизм уже обеспечивал полную компенсацию кислотно-основного состояния при избыточной продукции лактата – значения pH сохранялись в пределах нормы.

В целом, аналогичные изменения в различной степени выраженности наблюдались и у крыс через 30 мин после введения Т1023 в дозах 25-150 мг/кг. При дозах Т1023, не обладающих радиозащитным действием (25 мг/кг), и минимальных радиозащитных дозах (40 мг/кг) возрастание лактамии оставалось в пределах статистической тенденции, а компенсаторные сдвиги со стороны систем регуляции гомеостаза носили ограниченный характер. Но при применении в оптимальной радиозащитной дозе (75 мг/кг) и сверхоптимальной дозе (150 мг/кг) соединение Т1023 вызывало у крыс такие же по характеру и выраженности изменения, какие были индуцированы мексamiном в эффективной радиозащитной дозе 20 мг/кг.

Полученные данные свидетельствуют, что, несмотря на различие молекулярных механизмов действия, соединение Т1023 – ингибитор NOS, блокирующий NOS/sGC/cGMP – путь

релаксации сосудов, и мексамин – агонист 5HT₂-рецепторов, активирующий вазопрессорный PLC/IP3/PKC-путь, имеют общий физиологический механизм действия и реализуют свои противолучевые эффекты преимущественно гипоксическим путём.

Во второй серии экспериментов изучали динамику содержания лактата, газового и кислотно-щелочного состава артериальной крови крыс при однократном воздействии T1023 в оптимальной радиозащитной дозе 75 мг/кг.

В работе [3] мы показали, что соединение T1023 в радиозащитных дозах оказывает выраженное и длительное сосудосуживающее действие, за счёт чего способно значительно (в 2 раза) ограничивать интенсивность системного кровотока и, таким образом, судя по всему, индуцировать развитие транзиторной гипоксии. Циркуляторная депрессия при введении соединения T1023 проявляется в течение первых 5-10 мин после инъекции и начинает ослабевать через 75-100 мин по мере ослабления действия исследуемого вещества и нормализации тонуса сосудов.

Между такой динамикой кардиоваскулярных эффектов и наблюдавшимися изменениями лактатемии, газового и кислотно-основного состава артериальной крови крыс, индуцированными T1023 в эффективной радиозащитной дозе (табл. 2), прослеживалось отчётливое соответствие. Значительное повышение содержания лактата наблюдалось уже через 5 мин после инъекции T1023. Баланс кислотно-основного состояния животных в этот момент поддерживался только ресурсами буферных систем крови, поэтому компенсация была неполной – отмечался сдвиг *pH* в сторону ацидоза. И, хотя к 15-й минуте уровень лактатемии ещё больше возрастал, участие в балансе уже и респираторного механизма с этого момента и до конца опыта обеспечивало нормальные показатели *pH*. Повышенное содержание лактата, подобно циркуляторной депрессии, поддерживалось до 90-й минуты, возвращение к естественному уровню лактатемии отмечалось к 120-й минуте наблюдения.

Таблица 2

**Динамика содержания лактата, газового и кислотно-щелочного состава
в артериальной крови крыс Wistar в контроле и при воздействии соединения T1023
в дозе 75 мг/кг (5-7 животных в группе)**

Показатель	Группа	Исходно	5 минут	15 минут	30 минут	60 минут	90 минут	120 минут
Лактат, мМ/л	Контроль	17,7±3,9	15,35±3,7	17,5±5,2	18,9±5,4	17,1±5,7	15,1±7,1	14,7±6,7
	T1023	20,2±2,3	27,2±3,4 *	38,8±6,7 *	40,5±8,2 *	32,5±9,2 *	25,9±5,7 *	23,9±7,2
p _a CO ₂ , мм Hg	Контроль	43,0±5,3	43,9±1,8	44,7±2,1	44,4±2,1	44,6±1,8	43,5±1,3	42,5±3,9
	T1023	44,4±3,8	43,9±4,4	37,6±3,8 *	31,9±3,8 *	37,4±3,3 *	39,3±6,1	38,9±6,6
p _a O ₂ , мм Hg	Контроль	90,6±6,2	91,7±7,0	95,8±8,8	103,0±17,6	99,0±11,2	104,2±8,7	106,4±11,0
	T1023	87,2±7,9	89,8±6,2	99,3±11,3	101,2±13,6	99,3±13,2	101,8±15,1	105,8±9,0
cHb, г/л	Контроль	15,5±1,0	16,0±0,8	15,5±1,0	14,9±0,9	15,1±0,8	14,3±0,7	13,8±1,3
	T1023	15,1±1,0	15,7±0,6	15,7±0,9	15,3±1,2	15,2±1,0	14,9±1,0	14,6±1,0
s _a O ₂ , %	Контроль	97,9±1,5	97,2±1,8	98,7±1,4	98,8±2,5	99,4±1,0	100,3±1,6	100,3±1,7
	T1023	96,8±1,7	96,0±2,4	98,7±1,6	99,2±2,4	98,8±2,3	99,5±1,6	100,2±2,2
FO ₂ Hb, %	Контроль	95,5±2,4	95,1±1,6	96,2±1,2	96,2±2,4	97,8±1,7	97,8±1,3	97,1±1,5
	T1023	93,4±5,7	94,0±3,8	95,4±3,0	96,7±2,4	95,8±2,3	96,8±2,2	97,7±0,9
FCOHb, %	Контроль	1,5±0,3	1,2±0,1	1,4±0,2	1,4±0,2	1,4±0,3	1,2±0,4	1,3±0,3
	T1023	1,2±0,3	1,2±0,2	1,4±0,5	1,2±0,2	1,3±0,2	1,1±0,3	1,1±0,3
ЧДД, мин ⁻¹	Контроль	82,8±7,6	80,0±17,8	78,0±11,4	78,0±10,2	76,0±9,9	75,6±9,7	72,8±9,8
	T1023	73,3±6,9	75,5±6,4	70,7±8,2	66,7±13,2	61,3±17,0	59,0±17,0	58,7±17,5
pH	Контроль	7,39±0,01	7,39±0,02	7,38±0,02	7,38±0,02	7,38±0,02	7,39±0,04	7,38±0,03
	T1023	7,38±0,01	7,33±0,02 *	7,39±0,04	7,40±0,05	7,37±0,05	7,37±0,04	7,39±0,04
cHCO ₃ , мМ/л	Контроль	24,5±2,9	26,1±1,8	26,2±2,0	25,7±2,0	26,0±1,5	25,5±2,6	24,4±3,4
	T1023	24,8±1,1	22,4±1,9 *	20,7±1,4 *	18,4±0,8 *	20,7±1,1 *	21,0±1,5 *	21,6±1,3
cBase, мМ/л	Контроль	0,10±2,49	1,23±1,72	1,18±1,85	0,70±2,01	1,06±1,42	0,70±2,78	-0,44±3,23
	T1023	0,44±1,04	-3,06±1,84 *	-2,50±0,69 *	-4,30±0,44 *	-3,90±2,01 *	-3,70±2,09 *	-3,10±1,98

Примечание: * – статистически значимое различие (p<0,05) с контролем по U-критерию Манна-Уитни.

Совокупность этих данных свидетельствует в пользу доминирования гипоксического механизма в реализации противолучевого действия соединения Т1023. Кроме того, эти результаты подтверждают, что воздействие соединения Т1023 в оптимальной радиозащитной дозе 75 мг/кг (менее 1/4 ЛД₅₀), реализующее высокоэффективное противолучевое действие (ФИД – 1,4-1,8 [4]), является относительно безопасным. Все кардиоваскулярные эффекты (рис. 1) и изменения кислотно-основного состояния (табл. 2), индуцированные Т1023, носят транзиторный, компенсированный характер и без какой-либо фармакологической коррекции самостоятельно регрессируют по мере ослабления сосудосуживающего и гипоксического действия.

Рис. 1. (А) Влияние соединения Т1023 в дозе 75 мг/кг при однократном в/б введении в различные сроки до облучения на число селезёночных эндоколоний (КОЕ-С-8) у самцов мышей F₁ (СВА×С₅₇ВL_{6j}) на 8-е сутки после воздействия γ -излучения в дозе 6 Гр (из работы [11]). (Б) Те же экспериментальные данные по числу КОЕ-С-8 в зависимости от изменения лактатемии у крыс в различные сроки после воздействия Т1023 в дозе 75 мг/кг (из табл. 3). Прямая – график соответствующей линейной регрессии.

Таблица 3

Относительная динамика лактатемии (%) в артериальной крови крыс Wistar в контроле и при воздействии различных доз соединения Т1023 (6-7 животных в группе)

Время, мин	Контроль	Т1023			
		25 мг/кг	40 мг/кг	75 мг/кг	150 мг/кг
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
5	89,3±13,6	94,5±30,7	114,9±47,5	135,5±19,0 *	165,4±25,0 *
15	93,8±11,2	127,4±33,7	152,6±42,5 *	191,9±24,3 *	200,5±31,1 *
30	102,2±10,5	123,3±42,3	148,3±40,8 *	203,5±49,8 *	205,4±42,5 *
60	92,1±12,2	107,4±28,3	135,7±46,0	166,5±50,4 *	165,2±33,3 *
90	87,5±20,8	89,4±18,9	119,2±35,5	143,6±35,3 *	153,7±38,9 *
120	84,6±19,2	78,0±10,6 *	113,9±43,3	120,6±45,7	147,5±18,4 *

Примечание: * – статистически значимое различие ($p < 0,05$) с исходным значением по Q-критерию Данна.

В третьей серии экспериментов нами предпринята попытка оценить, насколько изменение уровня лактата может отражать изменение радиорезистентности биологических объектов. Для этого изучали динамику лактатемии у крыс при однократном введении соединения Т1023 в различных дозах и сопоставляли эти данные с полученными ранее результатами радиобиологических исследований. Как показано в табл. 3, при однократном введении Т1023 в дозах 25-150 мг/кг максимальный уровень лактатемии наблюдался через 15-30 мин после инъекции. Выраженность и длительность гиперлактатемии напрямую зависели от дозы Т1023. При низкой, не-

эффективной дозе Т1023 (25 мг/кг) значимого повышения содержания лактата не наблюдалось, а в конце наблюдения отмечалась статистически значимая гиполактатемия. При минимальной радиозащитной дозе Т1023 (40 мг/кг) наблюдалось умеренное (до 45-50%) и краткосрочное (на 15-30-й мин) повышение содержания лактата. При оптимальной радиозащитной дозе Т1023 (75 мг/кг) существенное возрастание лактатемии (на 45-105%) прослеживалось в период с 15 по 90 минут, а при сверхоптимальной дозе Т1023 (150 мг/кг) такой уровень повышения лактата отмечался на всех сроках наблюдения.

Эти данные позволили провести предварительную оценку взаимосвязи лактат-радиорезистентность. В исследованиях временной зависимости радиозащитного действия Т1023 мы показали [11], что его эффективность существенно различалась в разные сроки после инъекции (рис. 1А): нарастала в первые 15 мин, далее до 90-й мин оставалась почти неизменной (с умеренным максимумом на 30-й мин) и ослабевала к 120-й мин. Сопоставление этих данных с динамикой лактатемии при применении соединения Т1023 в соответствующей дозе (табл. 3 и рис. 1Б) позволило выявить отчётливую корреляцию между уровнем лактатемии и радиозащитным действием, которая описывается с высоким уровнем статистической значимости ($p < 0,001$) линейной регрессией.

Рис. 2. (А, В) Влияние соединения Т1023 в дозах 25-200 мг/кг при однократном в/б введении за 30 мин до облучения на выживаемость ГКО клеток у мышей F_1 (СВА $\times$ С₅₇BL_{6j}) при воздействия γ -излучения в дозе 5 Гр (А) и 30-суточную выживаемость мышей F_1 (СВА $\times$ С₅₇BL_{6j}) при воздействия γ -излучения в дозе 10 Гр (В) (из работы [4]). (Б, Г) Те же экспериментальные данные по выживаемости ГКО клеток (Б) и 30-суточной выживаемости мышей (Г) в зависимости от изменения лактатемии у крыс через 30 мин после воздействия соответствующих доз Т1023 (из табл. 3). Прямые – графики соответствующей линейно-логарифмической и линейной регрессии.

Совокупность данных о радиозащитном действии соединения T1023 позволяет оценить взаимосвязь лактат-радиорезистентность и с учётом дозовой зависимости противолучевых эффектов этого вещества. В работе [4] мы показали, что минимальное значимое противолучевое действие T1023 проявляется при введении в дозах порядка 40 мг/кг, затем радиозащитный эффект возрастает с повышением дозы T1023 и выходил на плато в области 75 мг/кг, дальнейшее повышение дозы T1023 не усиливало его противолучевое действие (рис. 2А и 2В).

Сопоставление этих экспериментальных данных с уровнями лактатемии через 30 мин после инъекции T1023 в разных дозах (табл. 3) показывает, что прослеживается отчётливая корреляция между уровнем лактатемии и выраженностью радиозащитного действия, которое оценивали по выживаемости гемопозитических колониеобразующих (ГКО) клеток (рис. 2Б), и 30-суточной выживаемости мышей (рис. 2Г). Причём, выявленная зависимость с высоким уровнем статистической значимости ($p < 0,01$) описывается линейно-логарифмической и линейной регрессиями.

Таким образом, результаты первичного сопоставления лактатемии с радиобиологическими эффектами показывают наличие выраженной корреляции противолучевого действия T1023 с индуцированными изменениями содержания лактата. При этом количественная взаимосвязь между лактатемией и различными измеряемыми радиобиологическими эффектами надёжно укладывается в рамки простых линейных моделей. Это, по нашему мнению, служит весомым аргументом в пользу того, что лактатемия может являться реальным фармакологическим маркером противолучевой активности T1023, отражающим индуцированные им изменения радиорезистентности биологических объектов.

Радиорезистентность является сравнительной характеристикой, и её изменения возможно оценивать только в порядковых категориях. И, исходя из полученных в этой работе количественных соотношений, изменения радиорезистентности подопытных животных, индуцированные T1023, в первом приближении можно классифицировать по 4-м категориям уровня изменения лактатемии (табл. 4), характеризующимся качественным возрастанием радиозащитного эффекта.

Таблица 4

Возможная классификация индуцированных соединением T1023 изменений радиорезистентности по изменению лактатемии

Степень	Изменение лактатемии	Радиорезистентность	30-суточная выживаемость мышей при 10 Гр
0	Уменьшение или возрастание до 35%	Естественный уровень	0%
1	Возрастание на 40-60%	Минимально значимое повышение	20-30%
2	Возрастание на 65-85%	Среднее эффективное повышение	40-50%
3	Возрастание на 90-120%	Максимальное повышение	60-80%

Заключение

Таким образом, результаты, полученные в этой работе, свидетельствуют, что динамика лактатемии, газового и кислотно-основного состава крови достаточно адекватно отражает гипоксический механизм действия ингибитора NOS T1023, мексамина и, возможно, других вазоактивных гипоксических радиопротекторов.

Сопоставление лактамии с радиобиологическими эффектами, проведённое на данном этапе исследований, выявило наличие выраженной корреляции противолучевого действия Т1023 с индуцированными изменениями содержания лактата, и такая взаимосвязь описывается простыми линейными моделями. Таким образом, лактаемия может являться фармакологическим маркером противолучевой активности Т1023, отражающим изменения радиорезистентности.

При дальнейшей фармакологической разработке соединения Т1023 в качестве радиопротектора необходима полноценная доклиническая верификация этого маркера на моделях, близких по физиологическим и радиобиологическим характеристикам к человеку. Использованный метод оценки, потенциально, может позволить новому радиопротектору преодолеть существующие принципиальные препятствия клинических испытаний.

Данная работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-34-00372 мол-а.

Литература

1. **Singh V.K., Seed T.M.** A review of radiation countermeasures focusing on injury-specific medicinals and regulatory approval status: part I. Radiation subsyndromes, animal models and FDA-approved countermeasures //Int. J. Radiat. Biol. 2017. V. 93, N 9. P. 851-869.
2. **Проскурняков С.Я., Кучеренко Н.Г., Тришкина А.И., Филимонова М.В., Шевчук А.Г., Штейн Л.В., Верховский Ю.Г., Коноплянников А.Г., Мандругин А.А., Федосеев В.М., Скворцов В.Г.** NO-ингибирующая и вазотропная активность некоторых соединений, содержащих тиамидиновую группу //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002. Т. 134, № 10. С. 393-396.
3. **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.
4. **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.
5. **Филимонова М.В., Самсонова А.С., Корнеева Т.С., Шевченко Л.И., Сабуров В.О., Филимонов А.С.** Противолучевые эффекты ингибитора синтаз оксида азота T1023 в нормальных и малигнизированных тканях //Радиация и риск. 2018. Т. 27, № 4. С. 155-169.
6. **Шмидт Р.Ф., Тевс Г.** Физиология человека. Том 2 /пер. с англ. Н.Н. Алипова, О.В. Левашова, М.С. Морозовой /под ред. П.Г. Костюка. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 314 с.
7. **Бочков В.Н., Добровольский А.Б., Кушлинский Н.Е., Логинов В.А., Панченко Е.П., Ратнер Е.И., Творогова М.Г., Титов В.Н., Ткачук В.А.** Клиническая биохимия. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 512 с.
8. **Дементьева И.И.** Лабораторная диагностика и клиническая оценка нарушений гомеостаза у больных в критическом состоянии. М.: Российский научный центр хирургии РАМН, 2005. 85 с.
9. **Шейд П.** Фундаментальная и клиническая физиология. Раздел 11. Кислотно-щелочное равновесие /пер. с англ. И.С. Киселёвой, М.А. Каменской /под ред. А.Г. Камкина, А.А. Каменского. М.: Академия, 2003. с. 840-858.
10. **Рождественский Л.М., Федотова М.И., Романов А.И., Белоусова О.И.** О путях реализации и механизмах противолучевого действия PC-10, меркамина и мексамина //Радиац. биология. Радиоэкология. 2017. Т. 57, № 5. С. 540-544.
11. **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.

Lactatemia as a possible pharmacological marker of NOS-inhibitor T1023 induced radioresistance

Makarchuk V.M., Filimonova M.V., Filimonov A.S., Shevchenko L.I.,
Izmestieva O.S., Saburova A.S.

A. Tsyb MRRC, Obninsk

The aim was to study the dynamics of lactatemia and acid-base balance as a possible indicator of hypoxic and radioprotective effect of the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor T1023. The research methods included the assessment of lactate content, blood gases content and acid-base balance of arterial blood and comparison of these data with cardiovascular and radioprotective effects of compound T1023. The results show that the dynamics of lactate content and compensatory shifts in blood gases and acid-base balance, that prevent the development of acidosis, are the results of hypoxic effect of T1023 and such effects clearly correlate with cardiovascular effects that induce transient hypoxia. Comparison of these data with radiobiological effects of T1023 revealed the pronounced correlation between radioprotective effect of this compound and induced by it lactatemia. At the same time, the revealed correlation is quantitatively described by simple linear models. The obtained data show that hypoxic and radioprotective effects of NOS-inhibitor T1023 that change over time can be revealed using available laboratory methods. This suggests that lactatemia can be used as a pharmacological marker of changes in biological object's radioresistance. Full verification of such marker could potentially allow T1023 to overcome existing obstacles in the clinical trials of radioprotectors.

Key words: NOS inhibitors, hypoxic radioprotector, lactatemia, acid-base balance, pharmacological marker.

References

1. Singh V.K., Seed T.M. A review of radiation countermeasures focusing on injury-specific medicinals and regulatory approval status: part I. Radiation subsyndromes, animal models and FDA-approved countermeasures. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2017, vol. 93, no. 9, pp. 851-869.
2. Proskuryakov S.Y., Kucherenko N.G., Trishkina A.I., Filimonova M.V., Shevchuk A.G., Shtein L.V., Verkhovsky Y.G., Konoplyannikov A.G., Skvortsov V.G., Mandrugina A.A., Fedoseev V.M., Skvortsov V.G. NO-inhibiting and vasotropic activity of some compounds with thioamidine group. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2002, vol. 134, no. 4, pp. 338-341. (In Russian).
3. 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. Radioecologiya – Radiation Biology. Radioecology*, 2014, vol. 54, no. 5, pp. 500-506. (In Russian).
4. Filimonova M.V., Shevchenko L.I., Makarchuk V.M., Chesnakova E.A., Izmestieva 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. Radioecologiya – Radiation Biology. Radioecology*, 2015, vol. 55, no. 3, pp. 250-259. (In Russian).
5. Filimonova M.V., Samsonova A.S., Korneeva T.S., Shevchenko L.I., Saburov V.O., Filimonov A.S. The radioprotective effects of nitric oxide synthase inhibitor T1023 on normal and malignant tissues. *Radiatsiya i risk – Radiation and Risk*, 2018, vol. 27, no. 4, pp. 155-169. (In Russian).
6. Schmidt R.F., Thews G. Human Physiology. Vol. 2. Russ. eds.: P.G. Kostuk. Moscow, GEOTAR-Media, 2004. 314 p. (In Russian).

Makarchuk V.M. – Senior Researcher, C. Sc., Biol.; Filimonova M.V.* – Head of Lab., D. Sc., Biol.; Filimonov A.S. – Researcher; Shevchenko L.I. – Lead. Researcher, C. Sc., Chem.; Izmestieva O.S. – Lead. Researcher, C. Sc., Biol.; Saburova A.S. – Researcher. A.Tsyb MRRC.

*Contacts: 4 Korolyov str., Obninsk, Kaluga region, Russia, 249035. Tel.: +7 (484) 399-71-36; e-mail: mari_fil@mail.ru.

7. **Bochkov V.N., Dobrovol'skij A.B., Kushlinskij N.E., Loginov V.A., Panchenko E.P., Ratner E.I., Tvorogova M.G., Titov V.N., Tkachuk V.A.** Clinical biochemistry. Moscow, GEOTAR-Media, 2004. 512 p. (In Russian).
8. **Dementieva I.I.** Laboratory diagnosis and clinical assessment of disorders of homeostasis in critically ill patients. Moscow, Russian Scientific Center of Surgery of RAMS, 2005. 85 p. (In Russian).
9. **Sheid P.** Fundamental and clinical physiology. Section 11: Acid-base equilibrium. Russ. eds.: A.G. Kamkin, A.A. Kamensky. Moscow, Akademiya, 2003, pp. 840-858. (In Russian).
10. **Rozhdestvensky L.M., Fedotova M.I., Romanov A.I., Belousova O.I.** Mechanisms of counteraction to radiation of pharmaceutical preparations RS-10, merkamine and mexamine. *Radiatsionnaia biologiya. Radioecologiya. – Radiation Biology. Radioecology*, 2017, vol. 57, no. 5, pp. 540-544. (In Russian).
11. **Makarchuk V.M., Filimonova M.V., Izmistieva 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. *Radiatsionnaia biologiya. Radioecologiya. – Radiation Biology. Radioecology*, 2016, vol. 56, no. 6, pp. 590-597 (In Russian).