

СОВРЕМЕННАЯ МЕДИЦИНА И ФАРМАЦЕВТИКА

УДК 615.2, 615.31

К ВОПРОСУ О РАДИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВАХ ПРЕПАРАТА ТАМЕРОН ON THE ISSUE OF RADIOPROTECTIVE PROPERTIES OF TAMERON

Артём Михайлович Ермаков
кандидат биологических наук
ведущий специалист-исследователь
МОУ «ИИФ»
ведущий научный сотрудник
Институт теоретической и
экспериментальной биофизики РАН
Адрес: 142290, Московская обл.,
г. Пущино, ул. Институтская, д. 3
Тел. +7 (4967) 73-94-28
E-mail: ao_ermakovy@rambler.ru

Елена Александровна Царькова
Генеральный директор
Медицинская клиника «АксиоМед»
Адрес: 142210, Московская обл., г. Серпухов,
ул. 2-я Московская, д. 6, к. 5, помещ. 4А
Тел.: +7 (4967) 12-84-88
E-mail: axiomed@mail.ru

Кристина Александровна Каменских
химик-разработчик
МОУ «ИИФ»
младший научный сотрудник
Институт теоретической и
экспериментальной биофизики РАН
E-mail: kristina.kamensk@mail.ru

Ольга Юрьевна Антонова
кандидат биологических наук
ведущий химик – технолог
МОУ «ИИФ»
научный сотрудник
Институт теоретической и
экспериментальной биофизики РАН
E-mail: olga.antonova.iteb@gmail.com

Ольга Юрьевна Кочеткова
старший специалист – исследователь
МОУ «ИИФ»
научный сотрудник
Институт теоретической и
экспериментальной биофизики РАН
E-mail: o.y.kochetkova@gmail.com

Данила Денисович Колманович
химик-технолог
МОУ «ИИФ»
младший научный сотрудник
Институт теоретической и
экспериментальной биофизики РАН
E-mail: kdd100996@mail.ru

Аннотация

В статье рассматривается проблема возможности применения препарата **ТАМЕРОН**, производимого в Институте инженерной физики, в качестве эффективного радиопротекторного средства. Была проведена серия биологических исследований на примере модели регенерирующих планарий и культуры стволовых клеток человека. В ходе работы показано, что **ТАМЕРОН** защищает от радиационного поражения ДНК клеток, значительно ускоряя при этом репаративные процессы, а также способствует выживанию стволовых клеток и сохранению регенераторного потенциала. Дальнейшие исследования позволят выяснить механизмы активности препарата **ТАМЕРОН** при облучении биологических объектов ионизирующим излучением, а также выявить наиболее эффективные схемы его применения в качестве радиопротектора.

Ключевые слова: **ТАМЕРОН**, аминодигидрофтализиндион натрия, ионизирующее излучение, радиопротектор, антиоксидант, активные формы кислорода.

Summary

The article deals with the problem of the possibility of using **TAMERON**, produced at Institute of Engineering Physics, as an effective radioprotective agent. A series of biological studies was carried out using the model of regenerating planarians and human stem cell culture as an example. In the course of the work, it was shown that **TAMERON** protects cells from radiation damage to DNA, while significantly accelerating reparative processes, and also contributes to the survival of stem cells and the preservation of regenerative potential. Further studies will make it possible to elucidate the mechanisms of activity of the drug **TAMERON** during irradiation of biological objects with ionizing radiation, as well as to identify the most effective schemes for its use as a radioprotector.

Keywords: **TAMERON**, aminodihydrophthalazinedione sodium salt, ionizing radiation, radioprotector, antioxidant, reactive oxygen species.

Как было показано ранее [2], производимый в МОУ «Институт инженерной физики» препарат **ТАМЕРОН** обладает значительной антиок-

сидантной активностью, проявляемой как на уровне прямого химического взаимодействия активного начала препарата – аминодигидроф-

талазиндиона натрия со свободными радикалами кислорода и азота, так и посредством активации сигнального каскада транскрипционного фактора NRF2 [1,2]. Стабилизация этого фактора за счет подавления окисления белка приводит к активации транскрипции генов, ответственных за антиоксидантную защиту клетки – глутатионпероксидаз, глутатионредуктаз, тиоредоксинредуктаз и других [3].

Известно, что основным повреждающим фактором при воздействии ионизирующего излучения на живой организм и его клетки являются свободные радикалы, образующиеся при ионизации воды [4]. Поэтому действие распространенных радиопротекторных препаратов (например, ацетилцистеина, амифостина) направлено как раз на нейтрализацию свободных радикалов за счет химического взаимодействия с ними (скавенжинга) [5,6]. Учитывая высокую антиоксидантную активность препарата **ТА-МЕРОН**, нами было выдвинуто предположение о том, что он может выступать в качестве эффективного радиопротекторного средства. Это предположение было проверено в серии исследований на примере регенерирующих планарий и культуры мезенхимальных стволовых клеток человека.

Материалы и методы

Регенерирующие планарии

В работе были использованы планарии *Schmidtea mediterranea*, бесполовая лабораторная раса плоских червей. Планарий содержали в «искусственной прудовой воде» (смесь водопроводной и дистиллированной воды в пропорции 2:1) при комнатной температуре, кормили раз в неделю личинками двукрылых. Для экспериментов отбирали животных длиной около 10 мм и прекращали их кормление за 7 дней до опытов. Планарий за сутки перед облучением рентгеном помещали в раствор препарата **ТА-МЕРОН** в концентрации 10^{-3} М, далее облучали рентгеновским излучением в дозе 10 и 15 Гр. После облучения производили ампутацию 1/5 части тела планарий, содержащей головной ганглий, наблюдалась регенерация отсеченной части тела и отслеживали рост головной бластемы. Динамику роста регенерационной почки (бластемы) планарий оценивали методом прижизненной морфометрии. Метод базируется на регистрации фотоконтраста между старыми (пигментированными) и новыми (прозрачными) частями тела. Молодая формирующаяся бластема в первые дни не покрыта пигментным эпителием, что позволяет четко выделить ее область на фоне пигментированной остаточной старой

части тела [7]. Стандартные изображения регенерирующих планарий получали на 3 день после декапитации с помощью комплекса, включающего фотокамеру MRc (Carl Zeiss, Германия), смонтированную на окуляре бинокулярного микроскопа МБС-10.

Программой Plana 4.4 (разработано А.А. Девым (ИТЭБ РАН)), определяли общую площадь тела животного и площадь бластемы. Количественным критерием роста служил индекс регенерации $R=s/S$, где s – площадь бластемы, S – площадь всего тела регенеранта. Каждое из измеряемых значений R – результат усреднения измерений по 30 животным.

Культура клеток человека

Эксперименты проводились на культуре мезенхимальных стволовых клеток (МСК), которые были выделены из зачатка третьего моляра, извлеченного по ортодонтическим показаниям у здорового 16-летнего пациента. Клетки экстрагировали в среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия), содержащей 200 ЕД/мл пенициллина и 200 мг/мл стрептомицина (Life Technologies, США), шприцем, вставленным в верхушку зуба, с последующей обработкой 0,25% трипсином + 0,02% ЭДТА (Life Technologies) Technologies, США) в течение 30 мин при 37°C. Выделенные клетки центрифугировали в течение 2 мин при 1500 об/мин и ресуспендировали до состояния единичных клеток в культуральной среде, состоящей из DMEM/F12 (1:1; Life Technologies) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС). Полученный раствор перенесли во флаконы по 25 мл и культивировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C с добавлением 10% ЭБС (HyClone), 100 ЕД/мл пенициллина/стрептомицина, 2 мМ L-глутамин в DMEM (ПанЭко, Россия). При достижении состояния субконфлюэнтных клеток культивируемые клетки обрабатывали 0,25% раствором ЭДТА/трипсин и добавляли во флаконы объемом 75 см² в соотношении 1:3. Клетки культивировали в среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% ЭБС, 100 ЕД/мл пенициллина/стрептомицина и 2 мМ L-глутамин. В нашем исследовании использовали культуры клеток 3-4 пассажей.

Облучение планарий и клеточных культур рентгеном

Облучение планарий и культуры клеток проводили с использованием терапевтического рентгеновского аппарата РУТ-15 (Мосрентген, Россия). Для планарий использовали дозы 10 и 15 Гр, для клеточных культур – 1,5 Гр при мощности дозы 1 Гр/мин, напряжении 200 кВ, фокусном расстоянии 37,5 см и токе 20 мА. Планарий облучали в чашках Петри на слое фильтроваль-

ной бумаги, смоченной водой. Клетки облучали в 96 луночных культуральных планшетах или культуральных флаконах.

Анализ двунитевых разрывов ДНК

Клетки высевали с плотностью $2 \cdot 10^4$ см², культивировали 16 часов (overnight) и вносили **TAMERON** в различных концентрациях (0,25, 0,5 и 1 мМ). Далее клетки культивировались в присутствии препарата в течение 24 часов и подвергались облучению рентгеновскими лучами в дозе 1,5 Гр. Анализ количества двунитевых разрывов ДНК проводили через 1 и 4 часа после облучения. После облучения клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS, рН 7,4). Затем клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида в PBS в течение 10 минут, пермеабилizировали с использованием 0,3% раствора Triton X-100 в PBS в течение 5 минут, тщательно промывали PBS, блокировали в 1% BSA в PBS в течение 30 минут при комнатной температуре. Для иммуноокрашивания использовали первичные антитела, моноклональные мышиные γ H2AX (ab195188 Recombinant, Anti-gamma H2A.X (фосфо S139), (Alexa Fluor® 488), Abcam)). Получение изображений очагов репарации ДНК проводилось с помощью инвертированной микроскопии Zeiss Axiovert Observer 200M (Carl Zeiss Microscopy, Йена, Германия) с использованием объектива 63x. Анализ клеток, окрашенных γ H2AX, проводили с помощью подключаемого модуля FindFoci ImageJ для автоматического распознавания очагов. Для каждой экспериментальной группы анализировалось не менее 20 полей зрения.

Статистическая

обработка экспериментальных данных

Статистический анализ проводился программой GraphPad Prism 8.0. Все эксперименталь-

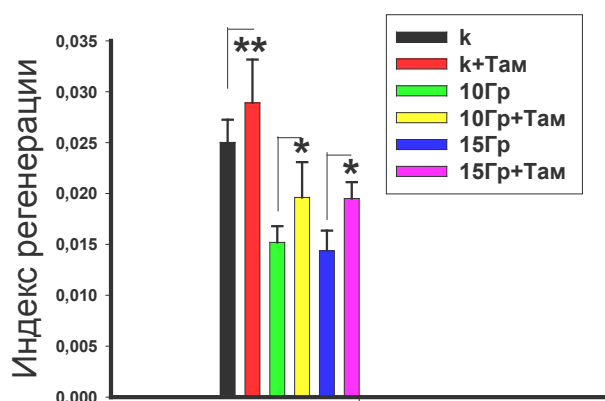
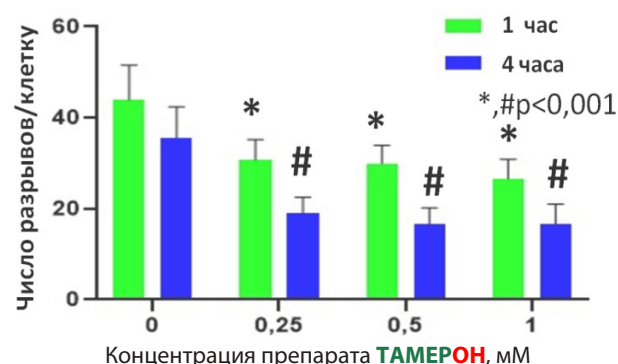


Рис. 1. Площадь бластемы планарий на 3 сутки регенерации в контроле и после облучения в дозе 10 и 15 Гр без препарата **TAMERON** (Там) и в присутствии препарата в концентрации 10^{-3} М. * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$

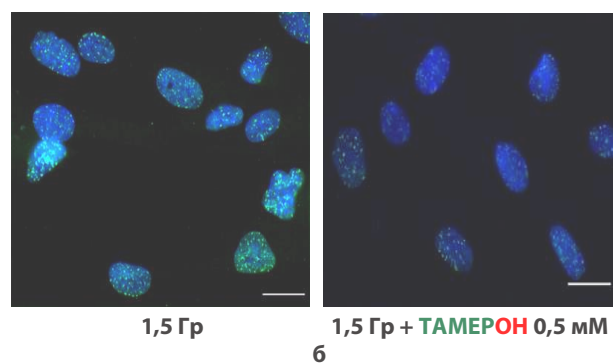
ные данные были представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (SD) и были проверены на наличие статистически значимых различий с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Различия между экспериментальными группами считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования регенерации планарий после облучения рентгеном без препарата и с препаратом **TAMERON** представлены на рисунке 1. Стоит отметить, что сам препарат в концентрации 10^{-3} М стимулирует рост бластемы по сравнению с контролем на 15%. Воздействие ионизирующего излучения приводило к значительному снижению скорости регенерации головной части планарий. Так в частности облучение в дозе 10 и 15 Гр ингибировало рост бластемы в среднем на 40%, тогда как присутствие препарата **TAMERON** приводило к тому,



а



б

Рис. 2. Радиопротекторные свойства препарата **TAMERON**, тест на двунитевые разрывы ДНК после рентгеновского облучения в дозе 1,5 Гр мезенхимальных стволовых клеток (МСК); а – подсчет количества фокусов разрывов ДНК в культивируемых клетках через 1 и 4 часа после облучения рентгеном в дозе 1,5 Гр в контроле и в присутствии препарата, б – визуализация разрывов ДНК в ядрах МСК на микрофотографиях. Линейка – 10 мкм; *# – отличие от облученного контроля (без препарата)

что бластема была больше, чем у облученных животных без препарата в среднем на 30%.

Анализ количества двунитевых разрывов ДНК методом иммуноокрашивания после облучения стволовых клеток человека рентгеновскими лучами в дозе 1.5 Гр представлен на *рисунке 2*. Предобработка МСК человека препаратом **ТАМЕРОН** во всех исследованных концентрациях (0.25-1 мМ) через 1 час после облучения выявил достоверное снижение количества двунитевых разрывов ДНК по сравнению с необработанным контролем ($p \leq 0.0001$ для 0.25 мМ, $p \leq 0.0012$ для 0.5 мМ, $p \leq 0.0001$ для 1 мМ). При этом и через 4 часа после облучения наблюдалась значимая активация репаративных процессов ДНК в присутствии препарата в диапазоне всех исследуемых концентраций ($p \leq 0.001$ для 0.25 мМ, $p \leq 0.001$ для 0.5 мМ, $p \leq 0.001$ для 1 мМ).

Ранее нами было показано, что регенерирующие планарии могут служить эффективной моделью для изучения радиопротекторных свойств фармакологических препаратов [8]. При воздействии ионизирующего излучения у этих планарий происходит гибель стволовых клеток, которые обеспечивают регенеративные процессы, поэтому рост бласты значительно замедляется [9]. Очевидно, что присутствие препарата **ТАМЕРОН** способствует сохранению стволовых клеток в теле животных при воздействии ионизирующего излучения, и это сопровождается более быстрой регенерацией головного конца планарий.

Эту гипотезу подтверждают данные, полученные на культуре стволовых клеток человека. Так в присутствии препарата **ТАМЕРОН** в МСК после воздействия ионизирующего излучения наблюдали более быстрые репаративные процессы разрывав ДНК. Очевидно, что препарат за счет антиоксидантной активности значительно снижает количество свободных радикалов, которые повреждают ДНК. При этом не стоит преуменьшать роль ферментных систем антиоксидантной защиты, которые активирует **ТАМЕРОН** посредством транскрипционного фактора NRF2, о чем могут свидетельствовать эффекты значительных репаративных процессов на 4 час после облучения клеток рентгеном [1]. Известно, что за счет особой структуры хроматина, стволовые и активно делящиеся клетки являются наиболее чувствительными к ионизирующему излучению [10]. Поэтому ускорение репаративных процессов и стабилизация хроматина ядра на фоне радиопротекторного действия **ТАМЕРОН** приводят к повышенной выживаемости стволовых клеток млекопитающих и планарий.

Таким образом, предсказанная радиопротективная эффективность препарата **ТАМЕРОН** была продемонстрирована в серии исследований на примере модели регенерирующих планарий и культивируемых стволовых клеток. Дальнейшие исследования позволят выяснить механизмы активности препарата при облучении биологических объектов ионизирующим излучением, а также выявить наиболее эффективные схемы его применения в качестве радиопротектора.

Литература

1. Scofield V.L., Yan M., Kuang X., Kim S.J., Wong P.K. The drug monosodium luminol (GVT) preserves crypt-villus epithelial organization and allows survival of intestinal T cells in mice infected with the ts1 retrovirus // *Immunol Lett.*, 2009. 122(2). Pp.150-158.
2. Ермаков А.М., Царькова Е.А. К вопросу об антиоксидантной активности препарата Тамерон // *Известия Института инженерной физики*, 2020. №3(57). С.103-106.
3. Tonelli C., Chio Ch., Tuveson D. Transcriptional regulation by Nrf2 // *Antioxidants & Redox Signaling*, 2018. Pp.1727-1745.
4. Kawamura K., Qi F., Kobayashi J. Potential relationship between the biological effects of low-dose irradiation and mitochondrial ROS production // *J Radiat Res.*, 2018. 59 (suppl_2). Pp.91-97.
5. Kouvaris J.R., Kouloulis V.E., Vlahos L.J. Amifostine: The First Selective-Target and Broad-Spectrum Radioprotector // *The Oncologist*, 2007. Vol.12(6). Pp.738-747.
6. Reliene R., Pollard J.M., Sobol Z., Trouiller B., Gatti R.A., Schiestl R.H. N-acetyl cysteine protects against ionizing radiation-induced DNA damage but not against cell killing in yeast and mammals // *Mutat Res.*, 2009. 665(1-2). Pp.37-43.
7. Ermakova O.N., Ermakov A.M., Tiras H.P. Lednev V.V. The effect of melatonin on the regeneration of planaria *Girardia tigrina* // *Ontogenesis*, 2009. №6. Pp.466-469.
8. Ermakov A.M., Kamenskikh K.A., Ermakova O.N., Blagodatsky A.S., Popov A.L., Ivanov V.K. Planarians as an In Vivo Experimental Model for the Study of New Radioprotective Substances // *Antioxidants*. 2021, 10(11). P. 1763.
9. Scimone M.L., Kravarik Kellie M., Lapan Sylvain W., Reddien Peter W. Neoblast Specialization in Regeneration of the Planarian *Schmidtea mediterranea* // *Stem cell reports*, 2014. 3(2). Pp.339-352.
10. Fabbri M.R., Warshowsky K.E., Zobel C.L. et al. Molecular and epigenetic regulatory mechanisms of normal stem cell radiosensitivity // *Cell Death Discovery*, 2018. 4. P.117.