

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА РАДИОЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕПАРИНА В ОПЫТАХ НА МЫШАХ

*Власенко Т.Н.*¹, *Лукашин Б.П.*, *Гребенюк А.Н.*²

*1. Филиал (г.Москва) Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова Минобороны России,
107392 г. Москва, ул. Малая Черкизовская, 7, тел. 8(499)-168-95-78, e-mail:*

vlasenko_t_n@mail.ru

*2. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени
академика И.П. Павлова Министерства здравоохранения РФ*

Резюме: Цель исследования – экспериментальная оценка радиозащитной эффективности гепарина и изучение возможных механизмов его радиозащитного действия. Экспериментальные исследования выполнены на самцах белых беспородных мышей, мышей линии BALB/c и гибридах первого поколения мышей линий (СВА х С57В1), которых подвергали острому тотальному гамма-облучению. Гепарин вводили внутривентрально в дозе 250 Ед/кг за 3 сут до облучения; в качестве препарата сравнения использовали радиопротектор цистамин, который вводили внутривентрально в дозе 150 мг/кг за 20 мин до облучения. Радиозащитную эффективность гепарина и цистамина оценивали путем изучения 30-суточной выживаемости и средней продолжительности жизни погибших животных, а также расчета фактора изменения дозы. Для выявления возможных механизмов радиозащитного действия гепарина исследовали массу тимуса, общее число лейкоцитов крови, количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в периферической крови и костном мозге. Установлено, что цистамин проявляет высокую и практически одинаковую радиозащитную эффективность на всех видах мышей, в то время как гепарин обладает более низким радиозащитным эффектом, который проявлялся увеличением выживаемости только у радиочувствительных мышей линии BALB/c и белых беспородных мышей. Гепарин оказывал стимулирующее влияние на миграцию гемопоэтических клеток: инъекция гепарина позволила вдвое увеличить количество КОЕ в периферической крови мышей BALB/c и достоверно снизить их число в костном мозге. Обсуждаются возможные механизмы радиозащитного действия гепарина, основанные на стимуляции кроветворения и повышении неспецифической резистентности организма.

Ключевые слова: облучение, гепарин, цистамин, радиопротектор, выживаемость, гемопоэз.

EXPERIMENTAL EVALUATION OF RADIOPROTECTIVE EFFICACY OF HEPARIN IN EXPERIMENTS ON MICE

Vlasenko T.N.¹, Lukashin B.P., Grebenyuk A.N.²

1. Branch of the S.M. Kirov Military Medical Academy, Moscow, Russia

*2. First St. Petersburg State Medical University named after academician I.P. Pavlova of the
Ministry of Health of the Russian Federation*

Summary: The study was aimed at the experimental evaluation of the radioprotective efficacy of heparin and estimation of the possible mechanisms of its radioprotective effect. Experimental studies were performed on male outbred mice, BALB/c mice, and hybrids of the first generation of line mice (CBA x C57Bl), which were subjected to acute total gamma irradiation. Heparin was administered intraperitoneally at a dose of 250 U / kg 3 days before irradiation. The radioprotector cystamine was used as a reference preparation; it was administered intraperitoneally at a dose of 150 mg / kg 20 minutes before irradiation. The estimation of efficacy of heparin and cystamine was based on the 30-day survival rate and average life expectancy of dead animals, as well as calculating the dose modifying factor. To reveal possible mechanisms of radioprotective effects of heparin the thymus mass, number of leukocytes and colony formation units (CFU) in peripheral blood and bone marrow were studied. It was found that cystamine exhibits high and almost identical radioprotective efficacy in all types of mice, while heparin has a lower radioprotective effect, which was manifested by an increase in survival rate only in BALB/c radiosensitive mice and outbred white mice. Heparin has revealed a stimulatory effect on migration of haemopoietic cells: injection of heparin doubles the number of CFU in peripheral blood of BALB/c mice and reliably decreases it in bone marrow. Possible mechanisms of radioprotective action of heparin based on stimulation of hematopoiesis and increase of nonspecific resistance of the organism are discussed.

Key words: *irradiation, heparin, cystamine, radioprotector, survival rate, hemopoiesis.*

Введение. Гепарин – это высокосульфатированный неразветвленный гликозаминогликан [20]. Исторически считалось, что молекулы гликозаминогликанов, описанные как «измельченные вещества» и «мукополисахариды», выполняют функцию заполнения пространства, необходимую для ориентации и организации внеклеточного матрикса [12, 23]. Достижения в области гликобиологии показали, что активное участие

гликозаминогликанов и их протеогликановой магистральной важно в различных клеточных коммуникациях, прежде всего в процессах воспаления и восстановления [14, 19]. Гепарин может изменять клеточные сигналы и реакции адгезии, связываясь с белками внеклеточного матрикса, включая фибронектин, ламинин, тромбоспондин и витронектин [7]. Важные классы лигандов для гепарина/гепарансульфатов включают факторы роста и макромолекулы внеклеточного матрикса [6, 23].

В результате существующих у гепарина различных механизмов действия возможность его использования в терапии различных патологических состояний, помимо как антикоагулянта непрямого действия, стала предметом многих исследований, в которых показана перспективность использования гепарина в качестве лекарственного средства, эффект которого не связан с его противосвертывающей активностью [9, 17, 20].

Одним из интересных подходов к повышению эффективности радиозащиты и лечения радиационных поражений является использование стимуляторов кроветворения, неспецифической резистентности и иммунитета [3, 4, 13, 22]. Показано, что гепарин способен модулировать биологическую активность факторов роста и цитокинов, в том числе отвечающих за повышение радиорезистентности организма [6, 14, 19]. Кроме того, он может стимулировать репарацию поврежденных радиацией слизистых оболочек ротовой полости и кишечника [15, 25]. В связи с этим, изучение возможности применения гепарина в качестве противолучевого средства представляет весьма перспективным.

Цель исследования: экспериментальная оценка радиозащитной эффективности гепарина и изучение возможных механизмов его радиозащитного действия в условиях острого тотального γ -облучения мышей различных линий.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования выполнены на самцах белых беспородных мышей, мышей линии BALB/с и гибридов F1 мышей линий (СВА х С57В1). В исследование отбирали мышей в возрасте 80-90 дней с массой 18-20 г.

Животных содержали в стандартных условиях вивария, кормили гранулированным кормом и давали воду *ad libitum* до конца эксперимента. В ходе экспериментов соблюдались правила этического обращения с лабораторными животными.

Мышей подвергали острому однократному облучению гамма-лучами Co^{60} с мощностью дозы 0,703 мА/кг (130 Р/мин) при кожно-фокусном расстоянии 1 м. Дозиметрический контроль условий облучения проводился ферро-сульфатным методом.

Гепарин, растворенный в 0,2 мл физиологического раствора, вводили мышам всех экспериментальных групп внутривентрально в дозе 250 Ед/кг за 3 сут до облучения. В

качестве препарата сравнения использовали радиопротектор цистамин, который вводили внутривенно за 20 мин до облучения в дозе 150 мг/кг [16]. Животным контрольных групп в те же сроки и тем же путем вводили такие же объемы физиологического раствора (физ. раствор).

Радиозащитное действие гепарина и цистамина изучали на основе оценки 30-суточной выживаемости и средней продолжительности жизни погибших мышей. Радиозащитную эффективность гепарина и цистамина оценивали путем расчета фактора изменения дозы (ФИД) – отношение значения полуметальной дозы в опыте (с препаратом) к контролю (без препарата). Для выявления возможных механизмов радиозащитного действия гепарина была исследована масса тимуса, количество лейкоцитов и колониеобразующих единиц (КОЕ) в периферической крови и костном мозге на 9-е сутки после облучения [24]. Результаты трех аналогичных экспериментов были обобщены, в таблицах представлены средние данные по всем экспериментам.

На основе данных, полученных в экспериментах, были рассчитаны средние значения показателей и стандартная ошибка ($X \pm m_x$). Среднесмертельные дозы ($СД_{50/30}$) и фактор изменения дозы (ФИД) были рассчитаны с помощью пробит-логарифмического анализа. Статистическая значимость различий между отдельными группами была установлена с использованием *t*-критерия Стьюдента на уровне $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

В ранее результате проведенных исследований было установлено, что однократное применение гепарина за 3 сут до воздействия гамма-лучей эффективно защищает мышей, облученных в дозах $СД_{70-80/30}$, от лучевой гибели (табл. 1).

Таблица 1 – Сравнительная оценка радиозащитной эффективности цистамина и гепарина по критериям выживаемости облученных мышей с различной радиочувствительностью

Препарат	Доза облучения, Гр								
	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Мыши BALB/c									
Физ. раствор	14/20	8/20	6/20	2/20	0/11				
Цистамин		15/19	13/20	8/20	4/19	4/19	1/10		
Гепарин	18/20	16/20	10/20	4/20	0/10				
Мыши белые беспородные									
Физ. раствор	9/17	10/20	2/20	2/20	0/10				

Цистамин		15/19	13/20	8/20	4/19	4/19	1/10		
Гепарин				18/24	10/24	12/24	4/24	1/12	
Мыши гибриды F ₁ (CBA x C57Bl)									
Физ. раствор		16/16	16/20	10/20	4/20	0/12			
Цистамин					19/22	16/20	8/20	2/18	0/15
Гепарин		15/15	17/20	12/20	8/20	2/20			

Примечание: в числителе – количество выживших животных; в знаменателе – общее количество животных в группе.

Сравнительное исследование влияния гепарина, введенного за 3 сут до облучения, и цистамина (за 20 мин до облучения) на мышах с различной радиорезистентностью, показало, что радиозащитное действие цистамина у радиочувствительных мышей линии BALB/c было сходным с таковым у более резистентных самцов гибридов F₁ мышей линий (CBA x C57Bl). Как видно из данных, представленных в таблице 1, гепарин увеличивал выживаемость только у радиочувствительных мышей BALB/c и беспородных мышей, но практически не оказывал защитного действия на радиорезистентных мышей-гибридов F₁ (CBA x C57Bl).

Следует также отметить, что ни цистамин, ни гепарин практически не оказывали влияния на среднюю продолжительность жизни погибших от облучения животных. Несмотря на различия в радиочувствительности, мыши всех изученных линий погибали, в основном, на 8–14 сутки после радиационного воздействия, что полностью соответствует срокам гибели мелких грызунов от костномозговой формы острой лучевой болезни.

Результаты расчета основного показателя радиозащитной эффективности противолучевых средств – фактора изменения дозы (ФИД) у мышей с различной радиочувствительностью приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Значения фактора изменения дозы цистамина и гепарина у облученных мышей с различной радиочувствительностью

Группа животных	СД _{50/30} , Гр	Фактор изменения дозы	
		Цистамин	Гепарин
Мыши BALB/c	5.0	1.50	1.20
Мыши белые беспородные	5.8	1.47	1.16
Мыши гибриды F ₁ (CBA x C57Bl)	6.9	1.48	1.06

Как видно из представленных в таблице 2 данных, радиопротектор цистамин проявляет высокую и практически одинаковую радиозащитную эффективность на всех видах мышей, в то время как гепарин обладает более низким радиозащитным эффектом, который проявляется только у беспородных мышей и радиочувствительных животных линии BALB/c. Тем не менее, радиозащитный эффект у гепарина есть, а его выраженность сопоставима с другими препаратами из группы радиомитигаторов [3, 4, 13].

При изучении возможных механизмов радиозащитного действия гепарина было показано, что облучение в сублетальных дозах приводило к снижению массы тимуса у мышей линии BALB/c и гибридов (CBAxС57Bl) первого поколения (табл. 3).

Таблица 3 – Влияние гепарина на пострadiaционное восстановление массы тимуса у облученных мышей с различной радиочувствительностью, % к исходному уровню

Сроки исследования, сут	Группа животных			
	Мыши BALB/c, облученные в дозе 4 Гр		Мыши гибриды F ₁ (CBA x C57Bl), облученные в дозе 5 Гр	
	Контроль (физ. раствор)	Опыт (гепарин)	Контроль (физ. раствор)	Опыт (гепарин)
12	68.8 ± 7.1	570 ± 6.1	62.3 ± 5.9	63.1 ± 6.1
16	44.0 ± 7.8	53.4 ± 5.6	82.8 ± 5.9	62.8 ± 6.0
20	32.0 ± 3.4	49.2 ± 5.2 *	50.7 ± 5.8	49.0 ± 5.8
30	59.7 ± 6.2	82.0 ± 10.0	82.7 ± 9.5	80.0 ± 9.5

Примечание: * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем (облучение с физ. раствором)

Как видно из таблицы 3, изменения массы тимуса у мышей были двухфазными, при этом степень вторичного уменьшения массы тимуса зависела от радиорезистентности мышей. Так, на 20-е сут после облучения масса тимуса у мышей BALB/c уменьшилась в 3 раза, а у гибридов – в 2 раза. После инъекции гепарина пострadiaционная динамика восстановления массы тимуса у радиочувствительных мышей линии BALB/c была такой же, как и у радиорезистентных мышей гибридов первого поколения линии (CBA x C57Bl). Полученные данные позволяют предположить, что гепарин активирует генетически обусловленные запасы радиорезистентности животных.

В ходе дальнейших исследований было показано, что гепарин оказывает стимулирующее влияние на миграцию клеток (табл. 4).

Таблица 4 – Влияние гепарина на количество лейкоцитов и число КОЕ в периферической крови и костном мозге облученных мышей линии BALB/c

Показатель	Группа животных	
	Контроль (физ. раствор)	Опыт (гепарин)
Количество лейкоцитов крови, $\times 10^6/\text{л}$	7.6 ± 0.4	$12.7 \pm 0.6^*$
Число КОЕ / 10^6 лейкоцитов крови	5.2 ± 0.6	6.4 ± 0.5
Число КОЕ в 1 мл крови	39.0 ± 4.0	$81.0 \pm 6.0^*$
Число КОЕ / 10^5 миелоцитов в костном мозге	17.0 ± 0.6	$13.1 \pm 0.9^*$

Примечание: * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем (облучение с физ. раствором)

Так, однократная инъекция гепарина приводила к удвоению количества КОЕ в 1 мл периферической крови интактных мышей BALB/c и достоверно снижала их число в костном мозге (табл. 4). Через 5 ч после облучения наблюдалось 5-6-кратное увеличение количества лейкоцитов в периферической крови мышей, которым вводили гепарин.

Таким образом, в ходе проведенного исследования было показано, что предварительное введение гепарина позволяет увеличить выживаемость после облучения радиочувствительных мышей BALB/c – СД_{50/30} увеличилась с 5.0 Гр до 6.0 Гр. В основе данного феномена может лежать то, что гепарин способен усиливать миграцию кроветворных клеток, а также вызывать изменения пролиферации и дифференцировки стволовых клеток в костном мозге. Ранее было показано, что под влиянием гепарина соотношение лейко/эритробластов в костном мозге увеличилось с 4.1 до 7.6 [18].

Действительно, при изучении механизмов защитного действия гепарина на костный мозг установлено, что профилактическое применение гепарина способствует уменьшению выраженности постлучевых нарушений костномозгового кроветворения. Так, например, по данным теста экзогенного колониеобразования у облученных мышей было выявлено увеличение под влиянием гепарина количества КОЕ. Это свидетельствует о том, что гепарин действует преимущественно на костномозговой пул, сохраняя часть покоящихся клеток от гибели и интенсифицируя в дальнейшем их пролиферацию. Подтверждением возможности этого механизма является ранее описанная способность индуцировать синтез и продукцию различных факторов роста, в том числе гемопоэтических цитокинов [6, 14].

Полагаем, что у животных, подвергшихся облучению, за счет введения гепарина стимулируется гемопоэз, что позволяет в дальнейшем увеличить число зрелых клеток в периферической крови. Подтверждением этого является выявленное в ходе проведенных исследований статистически значимое повышение уровня лейкоцитов у мышей,

получавших гепарин, по сравнению с контролем (табл. 4). Подобный эффект отмечается также при комплексном использовании табельного радиопротектора Б-190 и средства экстренной терапии радиационных поражений интерлейкина-1 β , а также при применении некоторых радиомитигаторов [2, 4].

Таким образом, полученные нами данные о радиозащитной эффективности гепарина согласуются с данными других авторов [1, 10, 11], дополняют их и расширяют представления о механизме действия этого препарата. Следует также отметить большую радиозащитную широту и низкую токсичность гепарина, что позволяет применять его в качестве противолучевого препарата при различных вариантах облучения и разных формах лучевых поражений [3, 15, 25]. Наличие этого препарата в арсенале медицинских средств противорадиационной защиты существенно расширяет возможности как профилактики лучевых поражений, так и оказания терапевтической помощи при возникновении массовых санитарных потерь радиационного профиля [5, 8, 21].

Выводы

1. Гепарин увеличивает выживаемость у радиочувствительных инбредных мышей BALB/c и беспородных белых мышей, но не оказывает существенного влияния на смертность/выживаемость радиорезистентных мышей гибридов (СВАхС57Bl) F1.
2. Гепарин способен стимулировать миграцию гемопозитических клеток: введение препарата позволило вдвое увеличить количество КОЕ в периферической крови мышей BALB/c и достоверно снизить их число в костном мозге.

Литература

1. Аргутинская С.В., Салганик Р.И. Защитное действие полианионов в процессе рентгеновского летального облучения мышей // Радиобиология. – 1963. – Т. 3, № 2. – С. 276–279.
2. Гребенюк А.Н., Аксенова Н.В., Зацепин В.В. и др. Влияние препарата Б-190 и интерлейкина-1 β на динамику количества клеток периферической крови и функциональный статус нейтрофилов облученных мышей // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2013. – Т. 53, № 3. – С. 290–295.
3. Гребенюк А.Н., Гладких В.Д. Современное состояние и перспективы разработки лекарственных средств для профилактики и ранней терапии радиационных поражений // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2019. – Т. 59, № 2. – С. 132–149.

4. Легеза В.И., Гребенюк А.Н., Драчев И.С. Радиомитигаторы: классификация, фармакологические свойства, перспективы применения // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2019. – Т. 59, № 2. – С. 161–169.
5. Легеза В.И., Гребенюк А.Н., Зацепин В.В. Медицинская защита при радиационных авариях: некоторые итоги и уроки Чернобыльской катастрофы // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2011. – Т. 51, № 1. – С. 70–75.
6. Лукашин Б.П., Гребенюк А.Н., Зацепин В.В. Гепарин и факторы роста // Цитокины и воспаление. – 2009. – Т. 8, № 3. – С. 16-21.
7. Лукашин Б.П., Гребенюк А.Н. Глюкозамингликаны: биологическая роль в системе межклеточных взаимодействий // Успехи современной биологии. – 2010. – Т. 130, № 2. – С. 165–179.
8. Халимов Ю.Ш., Гребенюк А.Н., Карамуллин М.А. и др. Современные возможности оказания терапевтической помощи при возникновении массовых санитарных потерь радиационного профиля // Военно-медицинский журнал. – 2012. – Т. 333, № 2. – С. 24-31.
9. Beneš S., Rotreklova E. Rate of synthesis and stability of DNA in bone marrow in heparin // *Fol. Biol.* – 1970. – Vol. 16. – P. 196–204.
10. Brückner V. Zum Wirkungsmechanismus des Heparins bei der Strahlenresistenzheremmung von Mäusen // *Strahlentherapie.* – 1976. – Vol. 151. – P. 347–350.
11. Chaubal K.A., Codbole C.S. Radiobiological effect of heparin in Swiss mice, human omnion cells and E. coli bacteria irradiated with ⁶⁰Co rays // *Radit. Environ. Biophys.* – 1983. – Vol. 22. – P. 281–291.
12. Forsberg E., Kjellen L. Heparan sulfate: lessons from knockout mice // *J. Clin. Invest.* 2001. – Vol. 108, № 2. – P. 175–180.
13. Grebenyuk A., Zatsepin V., Aksenova N., Timoshevsky A. Effects of early therapeutic administration of interleukin-1 β on survival rate and bone marrow haemopoiesis in irradiated mice // *Acta Medica (Hradec Kralove).* – 2010. – Vol. 53, № 4. – P. 221–224.
14. Harmer N.S. Insights into the role of heparan sulphate in fibroblast growth factor signaling // *Biochem. Soc. Trans.* – 2006. – Vol. 34, № 3. – P. 442–448.
15. Kowaliuk M., Schröder I., Kuess P., Dörr W. Heparin treatment mitigates radiation-induced oral mucositis in mice by interplaying with repopulation processes // *Strahlentherapie und Onkologie.* – 2019. – Vol. 195, Is. 6. – P. 534–543.
16. Kuna P., Dostál M., Neruda O. et al. Radioprotective effects of amifostine (WR-2721) or cystamine in single whole body fission neutrons irradiated rats // *J. Appl. Biomed.* – 2004. – Vol. 2, № 1. – P. 43–49.

17. Lane D.H., Adams L. Non-anticoagulant uses of heparin // N. Engl. J. Med. – 1993. – Vol. 329. – P. 129–130.
18. Micklem H.S., Ogden D.A. Migration of haemopoietic stem cells between bones // Abstracts of 6th International Congress of Radiation Research. – Evian, 1970. – P. 146.
19. Mulloy B., Rider C.C. Cytokines and proteoglycans: an introductory overview // Biochem. Soc. Trans. – 2006. – Vol. 34. – P. 409–413.
20. Oduah E, Linhardt R, Sharfstein S. Heparin: past, present, and future // Pharmaceuticals (Basel). – 2016. – Vol. 9, № 3. – P. 38.
21. Singh V.K., Hanlon B.K., Santiago P.T., Seed T.M. A review of radiation countermeasures focusing on injury-specific medicinals and regulatory approval status: part III. Countermeasures under early stages of development along with 'standard of care' medicinal and procedures not requiring regulatory approval for use // Int. J. Radiat. Biol. – 2017. – Vol. 93, № 9. – P. 885–906.
22. Singh V.K., Newman V.L., Romaine P.L. et al. Radiation countermeasure agents: an update (2011–2014) // Expert. Opin. Ther. Pat. – 2014. – Vol. 24, № 11. – P. 1229–1255.
23. Taylor K.R., Gallo R.L. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation // JASEB J. – 2006. – Vol. 20. – P. 4–22.
24. Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // Rad. Res. – 1961. – Vol. 14, № 2. – P. 213–222.
25. Wang J., Zheng H., Qui X. et al. Modulation of the intestinal response to ionizing radiation by anticoagulant and non-anticoagulant heparins // Thromb. Haemost. – 2005. – Vol. 94, № 5. – P. 1054–1059.