

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРА ПОЛИ-АДФ-РИБОЗИЛИРОВАНИЯ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ В ВЫСОКИХ ДОЗАХ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Ремизов Д.В., Тихомиров П.В., Кондаков А.Ю., Драчев И.С.

*ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации
195043, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая д. 4*

Резюме.

Представленная работа посвящена изучению механизмов развития ранних пострadiaционных нарушений неврологической симптоматики у облученных животных. Наиболее выраженные изменения при облучении в сверхвысоких дозах возникают в ГАМК-ергической системе тесно связанной с бензодиазепиновыми рецепторами и являются одной из причин возникновения ранних пострadiaционных нарушений неврологической симптоматики, характерных для церебрального лучевого синдрома. Профилактическое применение ингибиторов АДФ-рибозилирования может препятствовать развитию таких проявлений. *Цель исследования.* Изучение состояния ГАМК-бензодиазепиновой системы на фоне применения ингибитора поли-АДФ-рибозилирования (никотинамида) при сверхлетальном облучении. *Материалы и методы.* Работа выполнена на нелинейных белых крысах, которых облучали в кранио-каудальном направлении на установке ИГУР-1 в дозах 100 и 150 Гр. Оценивали характер спонтанной и вызванной двигательной активности, ориентировочные и исследовательские реакции, отмечали время появления и выраженность внешних признаков нарушения церебральных функций (тремор, атаксия, дезориентировка и др.). Для оценки состояния ГАМК-ергической системы использовали метод определения связывания ^3H -ГАМК и ^3H -диазепама синаптосомальными мембранами головного мозга. *Результаты исследования.* В ходе исследования установлено, что в течение первых 5-10 мин после облучения в дозах 100 и 150 Гр у 60-70 % животных происходит развитие гиперреактивности. При этом у всех облученных крыс регистрировали снижение целенаправленной двигательной активности. Кроме того, у экспериментальных животных происходило угнетение ГАМК-ергических рецепторов: ^3H -ГАМК – на 90 % и ^3H -диазепам – на 82 %. Профилактическое применение никотинамида в дозе 100 мг/кг способствовало купированию ранних неврологических расстройств (атаксия, тремор, асимметрия позы и др.) и препятствовало снижению активности ферментов: ^3H -ГАМК – в 6 раз, ^3H -диазепам – 1,7 раза. *Заключение.* Таким образом, облучение в сверхвысоких дозах вызывает снижение чувствительности ГАМК- и бензодиазепиновых рецепторов, что приводит к развитию ранних неврологических расстройств. Применение никотинамида способствует

восстановлению чувствительности рецепторов до исходных значений уже к первому часу исследования.

Ключевые слова: радиационное воздействие; центральная нервная система; никотинамид; неврологические расстройства; ГАМК-бензодиазепиновые рецепторы

EFFICIENCY OF A POLY-ADP-RIBOSYLATION INHIBITOR UNDER HIGH DOSES IRRADIATION (EXPERIMENTAL STUDY)

Remizov D.V., Tikhomirov P.V., Kondakov A.Yu., Drachev I.S.

Federal State Budgetary Institution «State Scientific Research Test Institute of military medicine»

Ministry of Defense of the Russian Federation,

195043, Russian Federation, Saint Petersburg, Lesoparkovaya str., 4

Summary. The present work is devoted to the study of the mechanisms of development of early post-radiation disorders of neurological symptoms in irradiated animals. The most pronounced changes in irradiation at ultrahigh doses occur in the GABAergic system closely associated with benzodiazepine receptors and are one of the causes of early post-irradiation disorders of neurological symptoms characteristic of cerebral radiation syndrome. Prophylactic use of ADP-ribosylation inhibitors may prevent the development of such manifestations. *Purpose of the study.* Study of the state of the GABA benzodiazepine system against the background of the use of an inhibitor of poly-ADP-ribosylation (nicotinamide) during superlethal irradiation. *Materials and methods.* The work was performed on non-linear white rats, which were irradiated in the cranio-caudal direction using the IGUR 1 device at doses of 100 and 150 Gy. The nature of spontaneous and induced motor activity, orienting and exploratory reactions were assessed, the time of appearance and severity of external signs of cerebral dysfunction (tremor, ataxia, disorientation, etc.) were noted. To assess the state of the GABAergic system, we used the method of determining the binding of ³H-GABA and ³H diazepam by synaptosomal brain membranes. *Research results.* During the study, it was found that during the first 5-10 minutes after irradiation at doses of 100 and 150 Gy, hyperreactivity develops in 60-70% of animals. At the same time, a decrease in purposeful motor activity was recorded in all irradiated rats. In addition, in experimental animals there was an inhibition of GABAergic receptors: ³H GABA - by 90% and ³H diazepam - by 82%. Prophylactic use of nicotinamide at a dose of 100 mg/kg contributed to the relief of early neurological disorders (ataxia, tremor, postural asymmetry, etc.) and prevented a decrease in the activity of enzymes: ³H GABA - 6 times, ³H diazepam - 1.7 times. *Conclusion.* Thus, exposure to ultrahigh doses causes a decrease in the sensitivity of GABA and benzodiazepine receptors, which leads to the development

of early neurological disorders. The use of nicotinamide contributes to the restoration of receptor sensitivity to the initial values by the first hour of the study.

Keywords: radiation exposure; central nervous system; nicotinamide; neurological disorders; GABA benzodiazepine receptors

Введение

При анализе роли нарушений нейромедиаторных систем в патогенезе церебрального лучевого синдрома (ЦЛС) следует иметь в виду, что процесс функционирования медиаторов ЦНС зависит от ряда факторов: места локализации данных рецепторных образований в головном мозге, состояния клеточных мембран, интенсивности процессов синтеза и распада, а также от конечных эффектов нейромедиатора, реализуемых через действие вторичных мессенджеров – цАМФ и цГМФ [1-3]. Оценивая роль тех или иных нейромедиаторных систем в формировании ЦЛС, необходимо учитывать и особенности функциональных взаимосвязей между отдельными нейромедиаторными системами в реализации нарушения церебральных функций. В процессе центральной регуляции и координации двигательной активности принимают участие различные нейрохимические структуры: холин-, адреналин-, дофамин-, ГАМК-, бензодиазепин-, глутамат-, глицинергические и др. Изменение активности любой из них может приводить к формированию неврологической симптоматики [4-7].

По современным данным ГАМК является медиатором тормозного действия, поддерживающим в ЦНС баланс между процессами возбуждения и торможения. Установлено также, что ГАМК-ергическая система тесно связана с бензодиазепиновыми рецепторами [8].

Анализ состояния нейромедиаторных систем при воздействии ионизирующих излучений показал, что наиболее выраженные изменения при облучении в сверхсмертельных дозах возникают в ГАМК-ергической системе. После гамма-облучения в дозе 100 Гр уже в самые ранние сроки и, в частности, в период развития гиподинамии, в головном мозге наблюдались нарушения азотистого обмена, подавление процессов трансаминирования и ослабление роли метаболического ГАМК-шунта, являющегося альтернативной по отношению к α -кетоглутаратдегидрогеназной реакции цикла трикарбоновых кислот [9]. Лучевое поражение сопровождалось нарушением реакций окислительного декарбоксилирования α -кетокислот и системы стабилизации ГАМК в мозге. Активность фермента, участвующего в синтезе ГАМК (глутаматдекарбоксилазы), при этом не изменялась. Предполагается, что повышение уровня ГАМК может быть связано с пострadiaционной гипоксией, поскольку наблюдался параллелизм между увеличением

содержания ГАМК и снижением интенсивности окислительного метаболизма в митохондриях клеток коры головного мозга [5].

В последние десятилетия произошел значительный прорыв в профилактике неврологических нарушений при сверхлетальном облучении. Для профилактики ЦЛС возможно применение ингибиторов АДФ-рибозилирования, к числу которых относится ретроингибитор этого процесса – никотинамид, его структурные аналоги и производные (бензамид, 3-аминобензамид, алкил- и ацил-аминобензамиды) [10, 11].

Цель исследования. Изучение состояния ГАМК-бензодиазепиновой системы на фоне применения ингибитора поли-АДФ-рибозилирования (никотинамида) при сверхлетальном облучении.

Материалы и методы исследования. Эксперименты были выполнены на нелинейных белых крысах – самцах массой 180-200 г. Животные поступили из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (Россия, Всеволожский р-н, Ленинградская обл., д. Рапполово), которых в течение двух недель выдерживали в карантине. При работе с экспериментальными животными соблюдали требования Приказа Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», «Этического кодекса» (1985 г.), Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.), рекомендациями Федерации европейских научных ассоциаций по содержанию и использованию лабораторных животных в научных исследованиях (FELASA).

Животных облучали в кранио-каудальном направлении на установке ИГУР-1 в дозах 100 и 150 Гр, при мощности дозы 22,1 Гр/мин. Распределение поглощенной дозы в теле животного определяли фантомно-дозиметрическим методом. В различных точках по длине и по глубине фантома результаты измерений по данным дозиметрии различаются не более, чем на 10 %. Для контроля поглощенной дозы применяли дозиметр ИД-11.

Препарат никотинамид вводили внутривенно за 30 мин до облучения в дозе 100 мг/кг.

При экспериментальном моделировании крайне тяжелых форм острой лучевой болезни на крысах, сопровождающихся ранним (в первые минуты, часы после облучения) развитием поведенческих и неврологических расстройств, в течение 60 мин после экспериментальных воздействий (облучение, «ложное» облучение, введение препаратов и др.) осуществляли непрерывное визуальное наблюдение за общим состоянием и поведением животных. В ходе наблюдения обращали внимание на состояние позного тонуса, характер спонтанной и вызванной двигательной активности, наличие в структуре поведения ориентировочных и исследовательских реакций, сложных поведенческих стереотипов и др.,

отмечали время появления и выраженность внешних признаков нарушения церебральных функций (тремор, атаксия, дезориентировка, и др.).

Для оценки состояния ГАМК-ергической системы использовали метод определения связывания ^3H -ГАМК и ^3H -дiazепама синаптосомальными мембранами головного мозга. Принцип метода основан на способности связывания меченых лигандов с соответствующими рецепторами клеточных мембран [12].

Данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента. Оценку значимости различий частот наблюдений осуществляли по χ^2 -критерию Пирсона. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В ходе экспериментального исследования было изучено влияние облучения в дозах 100 и 150 Гр на проявления неврологических расстройств у крыс. Проведенные исследования показали, что в первые минуты после локального облучения головы наблюдается выраженная неврологическая симптоматика (таблица 1).

Таблица 1.

Частота появления неврологической симптоматики у крыс, подвергнутых кранио-каудальному облучению в дозах 100 и 150 Гр ($M \pm m$)

Клинические признаки	Доза облучения, Гр	Частота появлений, % (n=20)	
		время после облучения <5 мин	время после облучения 5-10 мин
Гиперреактивность	100	60±10	0±0
	150	70±9	0±0
Снижение или утрата целенаправленной двигательной активности	100	100±0	60±11
	150	100±0	80±9
Вращение вокруг вертикальной оси	100	80±9	10±7
	150	70±10	0±0
Маятникообразные движения	100	60±11	0±0
	150	70±10	0±0
Атаксия	100	60±11	70±10
	150	80±9	100±0*
Тремор	100	10±7	20±9
	150	30±10*	40±11
Примечание: * — различие между группами значимо, $p < 0,05$			

Показано, что сразу после облучения у 60-70 % крыс регистрировали период гиперреактивности, который заканчивался через 5-10 мин. В течение первых 5 мин после облучения происходило снижение целенаправленной двигательной активности у 100 % экспериментальных животных. В то же время у 60-80 % крыс выявили нарушения координации, проявляющиеся во вращении вокруг вертикальной оси и маятникообразными

движениями. В дальнейшие сроки активность исследуемых показателей снижалась, вплоть до полного исчезновения. Установлено, что облучение в сверхвысоких дозах вызывает однотипные нарушения, однако после радиационного воздействия в дозе 150 Гр они были более выраженными.

Для изучения модифицирующего влияния никотинамида на клиническое течение церебральной формы острой лучевой болезни была отобрана доза 150 Гр. Результаты исследования показали, что применение никотинамида способствовало купированию таких неврологических расстройств, как атаксия, тремор, асимметрия позы и др. (таблица 2).

Таблица 2.

Влияние никотинамида на частоту появления неврологической симптоматики у крыс, подвергнутых кранио-каудальному облучению в дозе 150 Гр ($M \pm m$)

Клинические признаки	Группа опытов	Частота появлений, % (n=20)	
		время после облучения <5 мин	время после облучения 5-10 мин
Гиперреактивность	облучение	70±10	0±0
	никотинамид	0±0*	0±0
Снижение или утрата целенаправленной двигательной активности	облучение	100±0	80±9
	никотинамид	0±0*	0±0*
Атаксия	облучение	80±9	100±0
	никотинамид	0±0*	0±0*
Асимметрия позы	облучение	40±11	100±0
	никотинамид	0±0*	0±0*
Тремор	облучение	30±10	40±11
	никотинамид	0±0*	0±0*
Примечание: * — различие между группами значимо, $p < 0,05$			

В следующей серии экспериментов изучали влияние никотинамида на чувствительность ГАМК-бензодиазепиновых рецепторов к меченому лиганду. Установлено, что при облучении крыс в дозе 150 Гр через 5 мин происходило угнетение ГАМК-ергических рецепторов: 3Н-ГАМК – на 90 % и 3Н-дiazepam – на 82 %. Применение никотинамида в дозе 100 мг/кг препятствовало снижению активности ферментов: 3Н-ГАМК – в 6 раз, 3Н-дiazepam – 1,7 раза (табл. 3).

Через 1 ч после облучения происходило частичное восстановление функционального состояния ГАМК-рецепторного аппарата, что проявилось в увеличении сродства лиганда к рецепторам. Введение никотинамида приводило к увеличению активности ферментов у крыс до значений, зарегистрированных у интактных животных (таблица 3).

Таблица 3.

Влияние никотинамида на связывание ^3H -ГАМК и ^3H -дiazепама синапсосомальными мембранами головного мозга крыс, облученных в дозе 150 Гр ($M \pm m$)

Показатель	Группы опытов	Активность фермента, моль/мг белка (n = 12)		
			время после облучения <5 мин	время после облучения 5-10 мин
3Н-ГАМК	облучение	118,7±15,4	10,0±3*	58,4±8* [^]
	никотинамид		62,4±8* [#]	94,4±10,2 ^{#^}
3Н-дiazепам	облучение	40,4±5	18,2±2*	24,4±4*
	никотинамид		30,4±2 [#]	38,4±6
Примечание: * — различие достоверно по сравнению с фоном, p < 0,05; [#] — различие достоверно по сравнению с группой 5 мин, p < 0,05; [^] — различие достоверно по сравнению с группой «Облучение», p < 0,05.				

В целом представленные данные свидетельствуют, что облучение в сверхвысоких дозах вызывает снижение чувствительности ГАМК- и бензодиазепиновых рецепторов. Применение никотинамида способствует снижению выраженности нарушений, вызываемых действием ионизирующего излучения, активность ГАМК-бензодиазепиновых рецепторов в синапсосомальных мембранах головного мозга под влиянием препарата восстанавливается к первому часу исследования до исходных значений.

Заключение. Представленные в настоящей работе данные свидетельствуют о снижении чувствительности ГАМК-бензодиазепиновой рецепции при облучении головного мозга в сверхвысоких дозах. Указанные изменения являются одной из причин возникновения ранних пострadiационных нарушений характерных для ЦЛС. Применение никотинамида препятствует развитию нарушений чувствительности ГАМК- и бензодиазепиновых рецепторов и предупреждает развитие неврологической симптоматики.

Список литературы

1. Ашмарин И.П., Стукалов П.В. Нейрохимия. М.: Изд-во: Институт Биомедицинской Химии РАМН, 1996:216.
2. Семьянов А.В. ГАМК-ергическое торможение в ЦНС: типы ГАМК-рецепторов и механизмы тонического ГАМК-опосредованного тормозного действия. Нейрофизиология. 2002; 34(1):82–92.
3. Тюренок И.Н., Перфилова В.Н. ГАМК-рецепторы: структура и функции. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2010; 73(10):43–48.
4. Ивницкий Ю.Ю., Носов А.В., Малаховский В.Н. Механизмы церебрального лучевого синдрома. Радиационная биология. Радиоэкология. 2001;41(1):48–55.
5. Крыжановский Г.Н. Общая патофизиология нервной системы. М.: Медицина, 1997:352.
6. Meyn R. E., Munshi A., Haymach J. V. [et al.] Receptor signaling as a regulatory mechanism of DNA repair. Radiotherapy and Oncology. 2009; 92(3):316–322.
7. Hienz R. D., Brady J. V., Gooden V. L., [et al.] Neurobehavioral effects of head-only gamma-radiation exposure in rats. Radiation Research. 2008; 170(3):292–298.
8. Головкин А.И. Софронов Г.А. Современные взгляды на молекулярную структуру бензодиазепиновых рецепторов. Вестник Российской Академии медицинских наук. 1999;7:20–24.
9. Розанов В.А., Карпович Г.А. Ранние изменения уровня ГАМК, глутамата и аминотрансферазной активности в отделах головного мозга крыс после общего гамма-облучения в абсолютно летальной дозе. Радиобиология. 1985; 25(3):384–388.
10. Ильин Л.А. Мартиросов К.С., Зорин В.В. Фармакологические средства профилактики церебральной формы острой лучевой болезни. VI Съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность): тезисы докладов. Том I (секция I-VII). Москва, 25-28 октября 2010 г. М.: РУДН, 2010:193.
11. Красильников И.И. Перспективы разработки новых лекарственных средств на основе ингибиторов АДФ-рибозилирования. Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2005; 64(4):147–151.
12. Семин Ю.А., Шевчук А.С., Дубовик Б.В. Состояние адренергических и ГАМК-ергических рецепторов мозга крыс после воздействия высоких доз ионизирующей радиации. Радиобиология. 1984; 24(4):476–480.