

УДК 612.014

**Цитогенетическая оценка радиозащитных свойств
Cu и Mn хелатов Шиффовых оснований
Никотинил-L-аминокислот**

А.Г. Карапетян, А.М. Даллакян, В.Д. Тоноян

*Научный центр радиационной медицины и ожогов МЗ РА
0054, Ереван, Давидашен, п/я 25*

Ключевые слова: ионизирующая радиация, радиопротекторные соединения, выживаемость, продолжительность жизни, цитогенетические показатели

В XXI веке источники ионизирующих излучений широко представлены во всех сферах человеческой деятельности, что резко повышает вероятность поражения людей факторами радиационной природы. В связи с этим одной из многих задач, стоящих перед радиационной медициной и радиационной безопасностью, является поиск высокоэффективных и нетоксичных радиопротекторов, удобных для применения.

Целью данной работы является изучение и оценка потенциально новых радиопротекторных и радиовосстанавливающих агентов, основными компонентами которых являются Шиффовы основания – Никотинил-L-Тирозинат и Никотинил- L-Триптофанат и их Cu(II) и Mn(II) металлохелаты. Эти соединения низкотоксичны и обладают пролонгированным действием.

Шиффовы основания, производные ароматических аминокислот и ароматических альдегидов, являются важным классом лигандов, металлокомплексы которых используются в получении биологически активных веществ [5,7-9], обладающих противолучевым, антимикробным, противовоспалительным и др. свойствами. Ряд исследований указывает на то, что Шиффовы основания становятся биологически более активными при комплексообразовании с металлоэлементами, в частности при образовании хелатных комплексов [6].

Установлено, что под влиянием различных факторов внешней среды (химических, физических, стрессорных) возникают структурные изменения хромосомного аппарата. Повреждение генетического аппарата клетки является индикатором воздействия на организм и ионизирующей радиации (ИР) до того, как разовьются другие патологические процессы: физиологические, биохимические, иммунологические, морфологические.

Изучение структурных изменений в хромосомном аппарате культивированных лимфоцитов крови человека на основе анализа частоты aberrаций хромосом нестабильного типа является общепринятым методом биомониторинга и оценки цитогенетической активности новых соединений. Основными преимуществами данного метода являются высокая чувствительность и низкий спонтанный уровень aberrаций хромосом, позволяющие изучать закономерности лучевых повреждений и цитогенетические эффекты новосинтезированных соединений [10,11].

Материал и методы

С целью изучения мутагенной и радиопротекторной активности новосинтезированных металлокомплексов $\text{Cu(II)(Никотинил-L-Тирозината)}_2$, $\text{Cu(II)(Никотинил-L-Триптофаната)}_2$, $\text{Mn(II)(Никотинил-L-Триптофаната)}_2$ и $\text{Mn(II)(Никотинил-L-Тирозината)}_2$ и соответствующих им Шиффовых оснований – Никотинил-L-Тирозината и Никотинил-L-Триптофаната, проведены исследования в условиях *in vivo* (клетки костного мозга белых крыс) как при чистом введении в организм, так и за 24 часа до облучения в дозе 4,8Гр.

Лимфоциты периферической крови в наших исследованиях являются тест-объектом при радиационно-индуцированных повреждениях кариотипа. Эти повреждения бывают либо в виде нарушения непрерывности, т.е. фрагментации хромосом, либо в виде перекомбинаций их участков (обменов). Все разнообразие хромосомных aberrаций сводится к нарушению их морфологии, что и исследуется в культуре соматических клеток – лимфоцитов периферической крови (рекомендация МАГАТЭ) [3,4], с некоторыми модификациями, принятыми в нашей лаборатории. Учитывались такие цитогенетические параметры, как частота хромосомных aberrаций (ХрА), пролиферативная активность (ПА) лимфоцитов и ploидность клетки (4n).

Радиопротекторную и радиовосстанавливающую активность изучаемых металлокомплексов исследовали *in vivo* в опытах на животных, определяя показатели выживаемости и средней продолжительности жизни (СПЖ) белых беспородных крыс массой 180-200 г в течение 30 дней после облучения рентгеновскими лучами в дозе 4,8Гр на аппарате РУМ-17, осуществленного на фоне предварительного подкожного введения в организм растворов металлохелатов в дозе 10, 20 и 40 мг/кг массы тела. Эти исследования проведены с использованием различных временных схем лечения за 24, 6, 3 и 1 час до облучения (контролем служили животные, облученные в дозе 4,8 Гр).

Статистическая обработка цифрового материала проведена с помощью ряда компьютерных программ, с использованием электронной

таблицы Microsoft Excel и специализированных статистических пакетов StatSoft, SPSS и StatGraphics Plus [1,2].

Результаты и обсуждение

Токсичность металлокомплексов определяли на основе цитогенетического скрининга.

В табл. 1 приведены цитогенетические показатели животных через 24 часа после введения в организм 10 мг/кг Cu(II) и Mn(II) хелатов. Из приведенной таблицы видно, что при введении в организм животных Cu(II)(Никотинил-L-Тирозината)₂ через 24 часа имело место двукратное повышение частоты хромосомных aberrаций (ХА) и увеличение числа полиплоидных клеток (ПК), что может свидетельствовать о наличии некоторых мутагенных свойств у данного металлокомплекса.

В отличие от Cu(II)(Никотинил-L-Тирозината)₂, через 24 часа после введения в организм животных другого хелата меди – Cu(II)(Никотинил-L-Триптофаната)₂, существенных изменений в цитогенетических показателях не наблюдалось.

На фоне введения животным Mn(II)(Никотинил-L-Триптофаната)₂ было зарегистрировано 2,8-кратное уменьшение пролиферативной активности ККМ и почти 3-кратное повышение уровня хромосомных aberrаций, что указывает на наличие определенных мутагенных свойств у этого Mn(II) комплекса.

Таблица 1

Цитогенетические показатели интактных животных (норма) и животных через 24 часа после введения в организм 10 мг/кг Cu(II)(Никотинил-L-Тирозината)₂; 10 мг/кг Cu(II)(Никотинил-L-Триптофаната)₂, 10 мг/кг Mn(II)(Никотинил-L-Триптофаната)₂, 10 мг/кг Mn(II) (Никотинил-L-Тирозината)

Группы исследования	Показатели		
	ПА	4n	ХрА
Норма	558,00	0,15	5,74
Cu(II)(Никотинил-L-Тирозинат) ₂	452,33	1,03	12,36
Cu(II)(Никотинил-L-Триптофанат) ₂	618,00	0,16	6,00
Mn(II)(Никотинил-L-Триптофанат) ₂	202,0	0,24	15,00
Mn(II)(Никотинил-L-Тирозинат)	219,0	1,12	3,00

Согласно данным табл. 1, в условиях введения животным $Mn(II)$ (Никотинил-L-Тирозината)₂ в дозе 10 мг/кг наблюдалось существенное снижение ПА КKM крыс, однако при этом уровень ХрА не повышался.

На рисунке представлены кривые динамики гибели животных в течение 30 дней после воздействия ИР на организм в дозе 4,8 Гр, получивших перед облучением 20 мг/кг $Cu(II)$ (Никотинил-L-Тирозинат)₂ или 20 мг/кг $Cu(II)$ (Никотинил-L-Триптофанат)₂.

На рисунке представлены также логарифмические регрессионные кривые, описывающие выживаемость животных, подвергшихся облучению на фоне подкожного (sc) введения в организм $Cu(II)$ (Никотинил-L-Тирозината)₂ за 1 и 3 часа (а) и $Cu(II)$ (Никотинил-L-Триптофаната)₂ за 1,3 и 6 часов (б) до облучения в дозе 4,8 Гр в сравнении с контрольно облученными животными. Согласно кривым, при введении за 3 часа до облучения металлокомплекса $Cu(II)$ (Никотинил-L-Тирозината)₂ наблюдается наилучший результат (все животные были живы до конца эксперимента). В случае введения $Cu(II)$ (Никотинил-L-Триптофаната)₂, максимальное количество выживших животных было зафиксировано при введении за 6 часов до облучения.

Приведенные на рисунке кривые динамики гибели облученных животных четко показывают эффективность $Cu(II)$ (Никотинил-L-Тирозината)₂ и $Cu(II)$ (Никотинил-L-Триптофаната)₂ как радиопротекторов при условии предварительного введения в организм перед облучением в дозе 4,8 Гр.

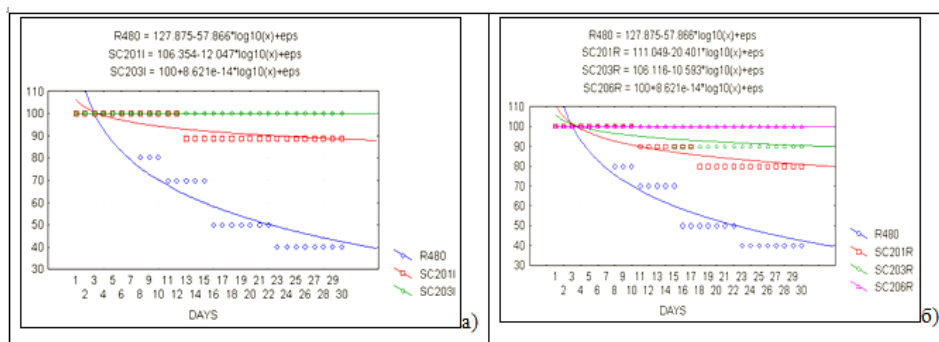


Рисунок. Логарифмические регрессионные кривые, описывающие выживаемость животных, подвергшихся облучению на фоне подкожного (sc) введения в организм $Cu(II)$ (Никотинил-L-Тирозината)₂ за 1 и 3 часа до облучения в дозе 4,8 Гр (сравнение с контрольно облученными животными).

В табл. 2 приведены цитогенетические показатели животных через 24 часа после облучения в дозе 4,8 Гр, осуществленного на фоне профилактического введения в организм 10 мг/кг $Cu(II)$ (Никотинил-L-Тирозината)₂ и $Cu(II)$ (Никотинил-L-Триптофаната)₂.

Таблица 2

Цитогенетические показатели животных через 24 часа после облучения в дозе 4,8 Гр, осуществленного на фоне профилактического введения в организм 10 мг/кг Cu(II)(Никотинил-L-Тирозината)₂ и Cu(II)(Никотинил-L-Триптофаната)₂.

Группы исследования	Эффект веществ на фоне облучения. Контроль — облученные в дозе 4,8 Гр животные без лечения		
	ПА	4п	ХрА
Контроль	59.0	1.24	43.5
Cu(II)(Никотинил-L-Тирозинат) ₂	88.00	2.72	34.0
Cu(II)(Никотинил-L-Триптофанат) ₂	253.0	0.59	23.1

Согласно полученным данным, через 24 часа после облучения на фоне введения в организм Cu(II)(Никотинил-L-Тирозината)₂ увеличивается число полиплоидных клеток, что может свидетельствовать о мутагенной активности и об отсутствии хроматинзащитного действия указанного металлокомплекса.

В отличие от Cu(II)(Никотинил-L-Тирозината)₂, другой хелат меди – Cu(II)(Никотинил-L-Триптофанат)₂ в дозе 10 мг/кг в условиях лучевого воздействия оказывает хроматинзащитный эффект. В последнем случае зарегистрировано 4-кратное увеличение пролиферативной активности клеток костного мозга и 2-кратное снижение частоты хромосомных аберраций по сравнению с показателями контрольно облученных животных.

Таким образом, при определении токсичности металлокомплексов на основе цитогенетического скрининга было обнаружено, что при введении животным Cu(II)(Никотинил-L-Тирозината)₂, Mn(II)(Никотинил-L-Тирозината)₂ и Mn(II)(Никотинил-L-Триптофаната)₂ в дозе 10мг/кг через 24 часа после введения в организм наблюдаются изменение частоты ХА, пролиферативной активности, что может свидетельствовать о наличии некоторых мутагенных свойств. Только введение Cu(II)(Никотинил-L-Триптофаната)₂ не привело к существенным изменениям цитогенетических показателей.

Полученные нами кривые динамики выживаемости облученных животных четко показывают эффективность Cu(II)(Никотинил-L-Тирозината)₂ (при введении за 3 часа до облучения в дозе 20мг/кг) и Cu(II)(Никотинил-L-Триптофаната)₂ (при введении за 6 часов до облучения в дозе 20мг/кг), как радиопротекторов при условии предварительного введения в организм перед облучением в дозе 4,8 Гр.

Согласно полученным данным, через 24 часа после облучения на фоне введения в организм хелата меди – $\text{Cu(II)(Никотинил-L-Триптофана)}_2$ в дозе 10 мг/кг в условиях лучевого воздействия в 4,8Гр проявляется хроматинзащитный эффект, что является свидетельством радио-защитного свойства. Исследования будут продолжены.

Поступила 10.07.19

Նիկոտինիլ-L-ամինաթթուների Շիֆային հիմքերի Cu և Mn խելատների ճառագայթապաշտպանիչ հատկությունների բջջազենետիկական գնահատումը

Ա.Գ. Կարապետյան, Ա.Մ. Դավաթյան, Վ.Զ. Տոնոյան

Այս աշխատանքի նպատակն է ուսումնասիրել և գնահատել պո-տենցիալ նոր ռադիոպաշտպանիչ նյութեր, որոնց հիմնական բաղադ-րիչներն են Nicotinyл-L-Tyrosinate; Nicotinyл-L-Tryptophanate Շիֆային հիմքերը և նրանց Cu(II) և Mn(II) մետաղական խելատները: Այս միա-ցություններն օժտված են ցածր թունաբանական հատկություններով և երկարատև ազդեցության հնարավորությամբ:

Թունաբանական հատկությունները ըստ բջջազենետիկական ցուցանիշների որոշելիս պարզեցինք, որ $\text{Cu(II)(Nicotinyл-L-Tyrosinate)}_2$, $\text{Mn(II) (Nicotinyл-L-Tyrosinate)}_2$ և $\text{Mn(II)(Nicotinyл-L-Tryptophanate)}_2$ 10 մգ/կգ դոզայով ներարկելուց հետո՝ 24 ժամ անց, առկա է քրոմոսոմային արերացիաների հաճախականության փոփոխություն, որը կարող է որոշ թունաբանական հատկությունների ցուցանիշ հանդիսանալ: Միայն $\text{Cu(II)(Nicotinyл-L-Tryptophanate)}_2$ -ի ներարկումը չի հանգեցրել բջջազենետիկական ցուցանիշների զգալի փոփոխությունների:

Ապրելունակության կորերի շնորհիվ ստացանք, որ $\text{Cu(II) (Nico- tinyл-L-Tyrosinate)}_2$ (20 մգ/կգ դոզայով, 3 ժամ ներարկումից առաջ) և $\text{Cu (II) (Nicotinyл-L-Tryptophanate)}_2$ (20 մգ/կգ դոզայով, 6 ժամ ներարկումից առաջ) ցուցաբերում են ճառագայթապաշտպանիչ հատկություններ նախապես օրգանիզմ ներարկման դեպքում 4,8Գր ճառագայթումից առաջ:

Ստացված տվյալների համաձայն՝ 4,8 Գր-ի ճառագայթահարման և 10 մգ/կգ դոզայով պղնձի խելատի $\text{Cu(II)(Nicotinyл-L-Tryptophanate)}_2$ ներարկման պայմաններում 24 ժամ հետո հայտնաբերվել է քրոմա-տին-պաշտպանողական ազդեցությունը, ինչը վկայում է ռադիոակ-տիվ հատկությունների առկայության մասին: Հետազոտությունները կշարունակվեն:

Cytogenetic Evaluation of the Radioprotective Properties of Cu and Mn Schiff's Bases Chelates of Nicotiny-L-Amino Acids

A.G. Karapetyan, A.M. Dallakyan, V.J. Tonoyan

The purpose of this work is to study and evaluate potential new radioprotective and radiovusting agents, the main components of which are the Nicotiny-L-Tyrosinate and Schiff bases and Nicotiny-L-Tryptophanate and their Cu(II) and Mn(II) metal chelates. These compounds are low toxic and have a prolonged action.

When determining the toxicity of metal complexes on the basis of cytogenetic screening, it was found that when Cu(II)(Nicotiny-L-Tyrosinate)₂, Mn(II)(Nicotiny-L-Tyrosinate)₂ and Mn(II) were introduced into animals (Nicotiny-L-Tryptophanate)₂ at a dose of 10mg/kg 24 hours after the introduction into the body, there is a change in the frequency of CA, proliferative activity, which may indicate the presence of some mutagenic properties. Only the introduction of Cu(II)(Nicotiny-L-Tryptophanate)₂ did not lead to significant changes in cytogenetic parameters.

The survival curves obtained by us for irradiated animals clearly show the effectiveness of Cu(II)(Nicotiny-L-Tyrosinate)₂ (when administered 3 hours before irradiation at a dose of 20 mg/kg) and Cu(II)(Nicotiny-L-Tryptophanate)₂ (when administered 6 hours before irradiation at a dose of 20 mg/kg) as radioprotectors provided that it was first introduced into the body before irradiation at a dose of 4.8 Gy.

According to the data obtained, 24 hours after irradiation with the introduction of copper chelate - Cu(II)(Nicotiny-L-Tryptophanate)₂ into the body at a dose of 10 mg/kg under radiation conditions of 4.8 Gy, the chromatin-protective effect is manifested, which is evidence of radioprotective properties. Research will be continued.

Литература

1. Буреева Н.Н. Многомерный статистический анализ с использованием ППП STATISTICA, Нижний Новгород, 2007.
2. Вукотов Э.А. Основы статистического анализа. Практикум по статистическим методам и исследованию операций с использованием пакетов STATISTICA и EXCEL, М., 2008.
3. Захаров А.Ф. и др. Хромосомы человека, М., 1982.
4. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment: Amanual. Vienna, 2001, Tech. Report Ser, N405, p.126.
5. Cimerman Z., Miljanic S., Galic N. CROATICA Chemica Acta., 73: 81, 2000.
6. Rajavel R., Senthil M. Vandivu, Anitha. C. E. Journal of Chemistry, 2008, v.5, No.3, p.620-626.
7. Sari N., Arslan S., Logoglu E., Sakiyan L. Journal of Science, 2003, 16(2): p.283-288.
8. Shalin Kumar, Durga Nath Dhar, Saxena P.N. Journal of Scientific & Industrial Research. 2009, v.68, p.181-187.
9. Spinu C., Kriza A. Acta Chim Slov., 2000, 47: 179.
10. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, 1988.
11. WHO, International Atomic Energy Agency, 2001.