

МОДИФИКАЦИЯ
РАДИАЦИОННЫХ ЭФФЕКТОВ

УДК 616-03:615: 599.323.4: 57.084.1:539.1.047

ПРОТИВОЛУЧЕВЫЕ ЭФФЕКТЫ Т1082 – ФОСФАТА
1-ИЗОБУТАНОИЛ-2-ИЗОПРОПИЛИЗОТИОМОЧЕВИНЫ,
В СРАВНЕНИИ С ЕГО АНАЛОГОМ Т1023

© 2021 г. М. В. Филимонова^{1,*}, Л. И. Шевченко¹, В. М. Макаrchук¹, А. С. Сабурова¹,
О. В. Солдатова¹, А. А. Шитова¹, А. О. Косаченко¹, В. А. Рыбачук¹,
В. О. Сабуров¹, А. С. Филимонов¹

¹ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал
Национального медицинского исследовательского центра радиологии
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск, Россия

*E-mail: mari_fil@mail.ru

Поступила в редакцию 22.06.2021 г.

После доработки 02.08.2021 г.

Принята к публикации 01.09.2021 г.

Целью исследования было сравнительное изучение токсических свойств и противолучевой активности нового ингибитора NOS Т1082 – 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевин фосфата, в сравнении с его близким химическим аналогом, известным Т1023 – 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевин гидробромидом. Изучение токсических свойств проведено по тесту острой токсичности для аутбредных мышей CD-1 при однократном внутрибрюшинном (в/б) и внутрижелудочном (в/ж) введении. Сравнительное изучение радиозащитной активности соединений Т1082 и Т1023 при в/б введении в дозах 1/18–1/2 ЛД₁₀ проведено на самцах мышей-гибридов F₁ (СВА × С57BL6j) по тесту селезеночных эндокolonий и 30-суточной выживаемости. Изучение эффектов Т1082 и Т1023 при в/ж введении в дозах 50–150 мг/кг проведено по тесту 30-суточной выживаемости. Результаты этого исследования показали, что замещение солеобразующей кислоты с НВг на Н₃РO₄ значительно не изменяет токсических свойств, но значительно модифицирует противолучевую активность солей 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевин. Фосфатная соль (Т1082) приобретает способность к эффективному радиозащитному действию при в/б введении в низких дозах (1/12–1/8 ЛД₁₀), в которых соль гидробромид (Т1023) низкоэффективна или уже не действует. Следствия таких особенностей Т1082 являются значительными. Наблюдается 2-кратное расширение диапазона эффективных доз – от 1/5–1/3 ЛД₁₀ (60–90 мг/кг) у Т1023 до 1/12–1/3 ЛД₁₀ (27–90 мг/кг) у Т1082. Такая возможность применения в 2–3 раза меньших доз без потери противолучевой эффективности дает соединению Т1082 существенные преимущества, в первую очередь, в безопасности. При в/ж введении Т1082 в дозах 50–150 мг/кг реализует радиозащитное действие, выраженность которого имеет дозово-зависимый характер, при этом эффекты Т1082 статистически значимо превышают действие равных доз Т1023. Причем при пероральном введении уровень безопасности действия Т1082 еще более возрастает – терапевтический индекс (ЛД₅₀/ED₅₀) достигает 30, а оптимальные радиозащитные дозы Т1082 (ED_{84–98} – 141–224 мг/кг) более, чем на порядок ниже максимально переносимых доз (1/16–1/10 ЛД₁₀). Полученные данные доказывают наличие у фосфата 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевин выраженных преимуществ над прототипом (Т1023), которые позволяют отнести соединение Т1082 к числу наиболее безопасных потенциальных противолучевых средств, и свидетельствуют о его высокой перспективности в качестве основы нового радиопротектора или средства профилактики осложнений лучевой терапии.

Ключевые слова: радиозащитная эффективность, облучение, выживаемость, фармакологическая безопасность, острая токсичность, соединение Т1023, ингибиторы NOS

DOI: 10.31857/S0869803121060059

Ионизирующие излучения, являясь неотъемлемой частью современной цивилизации, способны представлять прямую угрозу здоровью и жизни человека. В последние десятилетия такая угроза обусловлена как возрастанием рисков радиационных техногенных аварий или террори-

стических атак, так и широким применением радиологических методов терапии и диагностики. Поэтому для обеспечения безопасности как отдельного индивидуума, так и глобальных перспектив всего человечества значительно возрастает необходимость наличия безопасных и эффективных

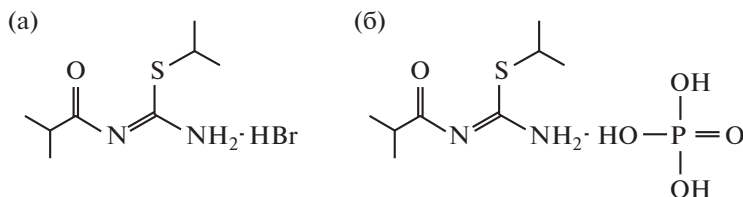


Рис. 1. Изучаемые соединения: а – 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины гидробромид (T1023); б – 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины фосфат (T1082).

Fig. 1. Studied compounds: a – 1-isobutanoyl-2-isopropylisothioureahydrobromide (T1023); b – 1-isobutanoyl-2-isopropylisothioureaphosphate (T1082).

лекарственных средств (ЛС), способных к профилактике и лечению лучевых патологий [1–3].

Однако анализ степени разработки имеющихся противолучевых средств свидетельствует, что перечень таких ЛС, допущенных к применению для противодействия лучевым поражениям человека, остается чрезвычайно ограниченным [4–7]. Особенно это касается радиопротекторов и средств профилактики осложнений лучевой терапии. Так, за 70 лет развития радиационной фармакологии ни один радиопротектор не был одобрен FDA USA к применению непосредственно для ОЛБ человека, а арсенал средств, способных противодействовать токсическим эффектам радиотерапии, представлен лишь двумя препаратами (амифостин и палифермин), клиническое применение которых имеет существенные ограничения и самостоятельные риски [4, 8, 9]. Сложившаяся ситуация обусловлена как сложностями прохождения этапов доклинических и клинических исследований средств лечения радиационных патологий, так и неудовлетворительным уровнем безопасности для человека многих известных средств, способных эффективно противодействовать лучевым поражениям [3–6, 10, 11].

В этой связи проблема разработки противолучевых средств в последние годы вышла за пределы радиобиологии и радиационной фармакологии и привлекла внимание специалистов многих областей биологии и медицины. Объектом таких исследований в настоящее время является широкий круг синтетических и биотехнологических соединений, биохимическая и физиологическая активность которых позволяет ограничивать первичную лучевую альтерацию, модулировать процессы клеточной гибели, активность постлучевой репарации, течение иммунновоспалительных процессов и фиброгенеза [5, 6, 12, 13]. При этом ряд перспективных для радиационной фармакологии классов соединений пополнили и модификаторы NO-зависимых сигнальных путей, поскольку было показано, что такие эффекторы способны выражено влиять на многие процессы, в том числе определяющие радиочувствительность биологи-

ческих объектов и развитие лучевых поражений [14–17].

В частности, в своих исследованиях ранее мы показали, что некоторые тиоамидиновые ингибиторы NOS (линейные и циклические N,S-замещенные изотиомочевины), блокируя в эндотелии сосудов NOS/sGC/cGMP-путь, способны индуцировать транзиторную тканевую гипоксию и повышать резистентность биологических тканей к действию ионизирующих излучений [18–21]. Скрининг в этой химической области позволил нам обосновать перспективность 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины гидробромид (соединение T1023; рис. 1, а) в качестве основы нового противолучевого средства с NOS-ингибирующим механизмом действия. Было установлено, что превентивное парентеральное введение T1023 в относительно безопасных дозах (1/5–1/4 ЛД₁₀; 60–75 мг/кг) обеспечивает выраженную профилактику костномозговой и кишечной ОЛБ у мелких лабораторных животных (ФИД – 1.6–1.9), не уступая либо превосходя в эффективности действию известных радиопротекторов [22–24]. Кроме того, было показано, что соединение T1023 является эффективным и в профилактике осложнений лучевой терапии. В радиозащитных дозах T1023 выражено (ФИД – 1.4–1.7) ограничивает частоту и тяжесть как острых лучевых повреждений (лучевой ожог кожи и оральная мукозит у мышей и крыс), так и отдаленных лучевых повреждений нормальных тканей (лучевой пневмофиброз у крыс). Причем при лучевой терапии солидных опухолей T1023 реализует избирательную защиту нормальных тканей, без ослабления противоопухолевых эффектов и общей эффективности лучевой терапии неоплазий [25–28].

Вместе с тем в этих исследованиях обозначились и особенности соединения T1023, способные негативно влиять на его эффективность и безопасность: близость эффективных доз к токсическому порогу (1/4 ЛД₁₀; 75 мг/кг) и недостаточная, на наш взгляд, радиозащитная ширина (1/5–1/3 ЛД₁₀; 60–90 мг/кг) – уже при дозах 1/8 ЛД₁₀ (40 мг/кг) действие T1023, как правило, слабое

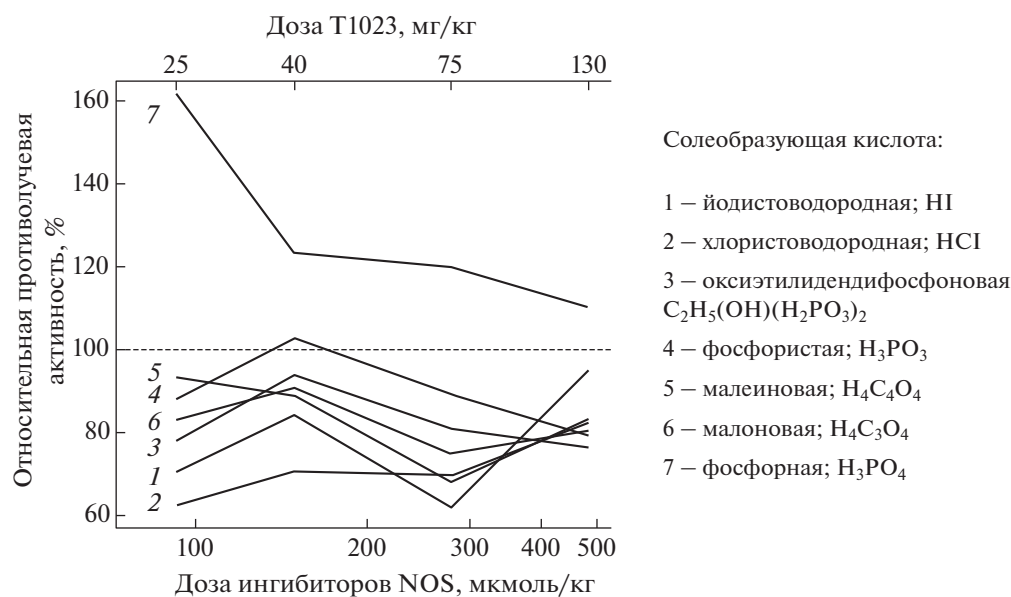


Рис. 2. Влияние вида солеобразующих кислот на противолучевую активность солей 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины (обобщение данных работы [30]). Относительная противолучевая активность (%) – отношение среднего числа КОЕ у мышей, получавших тестируемую соль, к среднему числу КОЕ у мышей, получавших эквимоллярную дозу соли гидробромида (Т1023).

Fig. 2. Influence of the type of salt-forming acids on the radioprotective activity of 1-isobutanoil-2-isopropylisothiourea salts (generalization of the data from [30]). Relative radioprotective activity (%) – the ratio of the average CFU number in mice treated with the test salt to the average CFU number in mice treated with an equimolar dose of hydrobromide salt (T1023).

[22, 24]. Такие особенности, по нашему мнению, сохраняют значимыми риски, как развития нежелательных эффектов, так и низкоэффективного действия Т1023, вследствие влияния неконтролируемых факторов, например, метаболических особенностей или патологий, искажающих фармакокинетику действующего вещества [29].

В этой связи перед началом практической разработки соединения Т1023 мы сочли целесообразным проведение дополнительного поиска более приемлемой “транспортной” формы действующего вещества среди ближайших аналогов Т1023 – в ряду солей 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины с различными неорганическими и органическими кислотами [30]. Результаты этих исследований показали, что изменение солеобразующей кислоты с гидробромида на гидроидрид, гидрохлорид, оксиэтилидендифосфонат, фосфонат, малеинат и малонат негативно сказывалось на противолучевой активности солей 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины (рис. 2). Такие соединения, исследованные в широком диапазоне доз (25–130 мг/кг) в различной степени выражено (на 10–40%) уступали радиозащитному действию соли гидробромида (Т1023) в эквимоллярных дозах. В то же время в ряду исследованных солей существенно выделялся 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины фосфат (соединение Т1082; рис. 1, б). В отличие от других

соединений, эта соль во всем диапазоне доз реализовала более высокую (на 15–60%) противолучевую активность, чем Т1023 в эквимоллярных дозах. Причем наиболее выраженное радиозащитное преимущество соединения Т1082 проявляло при низких дозах (1/12–1/8 ЛД₅₀; 25–40 мг/кг), в которых Т1023 малоэффективно или не действует. Эти данные свидетельствовали о возможно более широком диапазоне эффективных доз у соединения Т1082, что, очевидно, могло существенно скорректировать отмеченные выше недостатки Т1023.

В этой связи для подтверждения характера и масштаба особенностей радиозащитного действия Т1082, а также оценки значимости возможных радиобиологических и фармакологических преимуществ фосфатной соли 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины, как действующего вещества радиозащитного средства, было проведено достаточно детальное исследование токсических свойств и противолучевой активности этого соединения, результаты которого мы приводим в данной работе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Лабораторные животные. Исследование выполнено на 96 самцах аутбредных мышей CD-1 (возраст – 2–2.5 мес.; масса тела – 21–24 г) и на

850 самцах мышей-гибридов F_1 (СВА × С57BL6j) (возраст — 2–3 мес.; масса тела — 19–23 г). Животные были получены из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА. Мышей содержали в помещениях вивария МРНЦ им. А.Ф. Цыба в клетках Т-3 в условиях естественного освещения, при температуре 18–20°C и относительной влажности воздуха 40–70%, на подстилке из простерилизованных древесных стружек со свободным доступом к питьевой воде и корму для грызунов ПК-120-1 (Лабораторснаб, РФ). Все работы с животными были одобрены Этическим комитетом и выполнены на основе СОП, принятых в МРНЦ, которые соответствуют правилам Европейской конвенции ETS 123. Плановую эвтаназию проводили путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом.

Используемые соединения. В работе изучались и сопоставлялись свойства и эффекты двух солей 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевинны — соли, образованной бромистоводородной кислотой (соединение T1023; рис. 1, а), и соли, образованной ортофосфорной кислотой (соединение T1082; рис. 1, б). Для проведения исследований соединения T1023 и T1082 нарабатывались в лаборатории радиационной фармакологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба. Способ получения T1023 детально описан нами в работе [24]. Способ получения T1082 состоял в выделении из соединения T1023 свободного основания — 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевинны, которое далее подвергали взаимодействию с ортофосфорной кислотой [30, 31]. Методы синтеза, выделения и очистки обеспечивали стабильное качество субстанций T1023 и T1082 с содержанием действующего вещества более 95%. В экспериментах T1023 и T1082 вводили подкожным животным однократно внутривенно (в/в) или внутривенно (в/ж) в виде водных растворов, которые готовили *ex tempore* на основе воды для инъекций (Фармсинтез, РФ). Контрольным животным в те же сроки и тем же способом однократно вводили асептический 0.9%-ный раствор натрия хлорида (Дальхимфарм, РФ) в эквивалентном объеме.

Токсикологические исследования соединения T1082 проведены на аутбредных мышах по тесту острой токсичности при однократном в/в и в/ж введении. Предварительно для каждого способа введения на ограниченном числе животных (пять групп по 2 особи) оценивали ориентировочное значение $LD_{50/15}$ по методу Дейхмана–Лебланка, с учетом которого далее проводили детальные оценки параметров токсичности методом пробит-анализа по Литчфилду и Уилкоксона [32]. Для каждого способа введения формировали по пять групп животных (7–8 мышей в каждой). При парентеральном способе введения животным этих групп вводили T1082 в дозах 300–470 мг/кг (0.2 мл 1.5–2.35% раствора на 10 г массы тела),

при пероральном способе введения — в дозах 2300–3250 мг/кг (0.2 мл 11.5–16.25% раствора на 10 г массы тела). Наблюдение за животными осуществляли в течение 15 сут.

Лучевые воздействия на животных во всех экспериментах осуществляли на установке “Луч-1” (РФ) с источником ^{60}Co со средней энергией 1.25 МэВ. Воздействие γ -излучением на мышей, фиксированных в ячейках пластикового контейнера, проводили в дорзально-вентральной геометрии в группах по 8–12 особей в поле облучения 220×220 мм с фокусным расстоянием 450 мм при мощности дозы 4.95 мГр/с.

Схемы радиобиологических экспериментов, оценка эффектов. Сравнительное изучение противолучевой активности соединений T1023 и T1082 проведено в трех сериях экспериментов.

В первой серии экспериментов по методу Гилла и МакКаллока [33] проведено сравнительное исследование влияния соединений T1023 и T1082 при парентеральном введении в эквимолярных дозах, соответствующих уровням 1/18, 1/12, 1/8, 1/4 и 1/3 LD_{10} , на численность эндогенных селезеночных гемопоэтических колоний (КОЕ) у самцов мышей F_1 (СВА × С57BL6j) при воздействии γ -излучения в дозе 5 Гр. Выполнено два независимых опыта по единой схеме, в которой использовано по 11 групп мышей ($n = 16–17$ в каждой) — группа контроля облучения и 10 опытных групп. За 30 мин до облучения животным опытных групп однократно в/в вводили T1023 или T1082 в дозах 63, 93, 149, 278 и 480 мкмоль/кг (17/18, 25/27, 40/43, 75/80 и 130/138 мг/кг — 0.1 мл 0.17–1.38% раствора на 10 г массы тела), а контрольным мышам — эквивалентный объем 0.9%-ного раствора натрия хлорида. Через 8 сут после облучения всех животных выводили из опыта. Извлеченные селезенки фиксировали 24 ч в жидкости Буэна и проводили подсчет на их поверхности числа эндогенных КОЕ. Для обобщенного анализа этих экспериментов данные каждого опыта нормировали на среднее число КОЕ у контрольных мышей (переводили в отн. ед., в которых число КОЕ в контроле каждого опыта составляет $1 \pm SD$). О выраженности и различиях противолучевой активности T1023 и T1082 в этих опытах судили по межгрупповым статистическим различиям числа КОЕ в обобщенных данных.

Во второй серии экспериментов проведено сравнительное исследование влияния соединений T1023 и T1082 при парентеральном введении в эквимолярных дозах, соответствующих уровням 1/12, 1/8 и 1/4 LD_{10} , на 30-суточную выживаемость самцов мышей F_1 (СВА × С57BL6j) при воздействии γ -излучения в дозе 9.5 Гр. За 30 мин до облучения животным опытных групп ($n = 15–31$) однократно в/в вводили T1023 или T1082 в дозах 93, 149 и 278 мкмоль/кг (25.0/26.5, 40.0/42.5 и

Таблица 1. Показатели “острой” токсичности соединений Т1082 и Т1023 для аутбредных мышей при однократном внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении**Table 1.** “Acute” toxicity indicators of T1082 and T1023 for outbred mice after a single intraperitoneal and intragastric administration

Соединение, способ введения	ЛД _{10/15}		ЛД _{16/15}		ЛД _{50/15}		ЛД _{84/15}	
	мг/кг	ммоль/л	мг/кг	ммоль/л	мг/кг	ммоль/л	мг/кг	ммоль/л
Т1082, в/б	321	1.12	338	1.18	403	1.41	481	1.68
Т1023, в/б *	317	1.18	333	1.24	410	1.52	488	1.81
Т1082, в/ж	2290	8.01	2364	8.26	2638	9.22	2944	10.29

Примечание: * показатели для соединения Т1023, полученные ранее [22, 24].

75.0/79.7 мг/кг – 0.1 мл 0.25–0.8% раствора на 10 г массы тела), а контрольным мышам ($n = 30$) – эквивалентный объем 0.9%-ного раствора натрия хлорида. В течение 30 сут после облучения при 2-кратном ежедневном осмотре оценивали состояние животных и регистрировали время их гибели. Далее по методу Каплана–Майера строили диаграммы выживаемости мышей экспериментальных групп, по статистическим различиям которых судили о выраженности и различиях противолучевой активности Т1023 и Т1082 в этих экспериментах.

В третьей серии экспериментов проведено сравнительное исследование влияния соединений Т1023 и Т1082 при пероральном введении на 30-суточную выживаемость самцов мышей F₁ (СВА × С57ВL6j) при воздействии γ -излучения в дозе 9 Гр. За 30 мин до облучения животным опытных групп ($n = 20$ –34) однократно в/ж вводили соединение Т1082 в дозах 50, 75, 100, 125 и 150 мг/кг (0.1 мл 0.5–1.5% раствора на 10 г массы тела) или соединение Т1023 в дозах 125 и 150 мг/кг (0.1 мл 1.25–1.5% раствора на 10 г массы тела), а контрольным мышам ($n = 34$) – эквивалентный объем 0.9%-ного раствора натрия хлорида. Регистрацию и анализ данных проводили тем же путем, как и при парентеральном введении. Расчет эффективных радиозащитных доз Т1082 при пероральном введении проведен методом пробит-анализа.

Статистическая обработка. Значимость межгрупповых различий числа КОЕ оценивали по ANOVA-тесту Краскела–Уоллиса с апостериорным анализом по U -критерию Манна–Уитни в процедуре множественного сравнения Холма–Бонферрони [34]. Значимость межгрупповых различий диаграмм выживаемости при множественном сравнении оценивали по χ^2 -критерию с апостериорным анализом по F -критерию Кокса в процедуре множественного сравнения Холма–

Бонферрони, при парном сравнении – по F -критерию Кокса. Во всех случаях различия полагались статистически значимыми на 5%-ном уровне. Расчеты выполнены с применением программного пакета Statistica 10 (StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В токсикологических исследованиях соединения Т1082 при однократном в/б введении в дозах 300–470 мг/кг вызывало у мышей интоксикацию, динамика и проявления которой воспроизводили токсические эффекты Т1023 при таких же дозах и способе применения [24]. У мышей быстро развивалась адинамия, при дозах 350 мг/кг и выше – нарастала дыхательная аритмия, тремор и клонические судороги, на пике которых наступали остановка дыхания и гибель. Летальное действие Т1082 развивалось в первые 20–60 мин после в/б введения. Проявления интоксикации у выживших мышей ослабевали через 1.5–2 ч и в последующие 15 дней наблюдения эти животные по внешнему виду, двигательной и пищевой активности не отличались от интактных мышей. Макроскопических изменений внутренних органов у погибших и выживших мышей не выявлялось.

По результатам токсикометрии оценки максимально переносимой дозы (ЛД₁₀) и средней летальной дозы (ЛД₅₀) соединения Т1082 при в/б введении составили 321 и 403 мг/кг. Сопоставление параметров токсичности соединений Т1082 и Т1023 при таком способе введения не выявило существенных отличий – по всем показателям различия не превышали статистических погрешностей оценок и находились в пределах 5–8% (табл. 1).

При в/ж введении Т1082 чувствительность мышей к токсическому действию этого соединения снижалась в 6.5–7.0 раз – оценки ЛД₁₀ и ЛД₅₀ составили 2290 и 2638 мг/кг соответственно. Интоксикация у мышей в этом случае носила такой

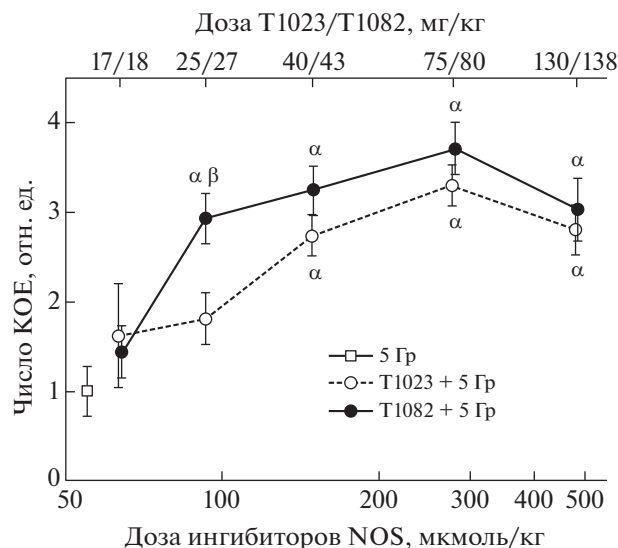


Рис. 3. Влияние соединений T1023 и T1084 при парентеральном введении (однократно, в/б, за 30 мин до облучения) в эквимоларных дозах 63, 93, 149, 278 и 480 мкмоль/кг (17/18, 25/27, 40/43, 75/80 и 130/138 мг/кг соответственно) на число селезеночных эндокolonий (КОЕ) у самцов мышей F₁ (СВА × С57BL6j) через 8 сут после воздействия γ -излучения в дозе 5 Гр. Объединенные результаты двух экспериментов ($n = 32-34$ на точку) — данные по каждому опыту нормированы на среднее число КОЕ в облученном контроле. Отклонения в точках соответствуют SD. α , β — статистически значимые межгрупповые различия по U -тесту Манна—Уитни с поправками Холма—Бонферрони: α — с облученным контролем (для T1023: $p = 0.007341$, $p = 0.000124$, $p = 0.004873$; для T1082: $p = 0.002630$, $p = 0.000279$, $p = 0.000036$, $p = 0.001798$ соответственно); β — между группами, получавшими T1023 и T1082 в эквимоларных дозах ($p = 0.003857$).

Fig. 3. The effect of compounds T1023 and T1084 after parenteral administration (single dose, i.p., 30 min before irradiation) at equimolar doses of 63, 93, 149, 278 and 480 $\mu\text{mol/kg}$ (17/18, 25/27, 40/43, 75/80 and 130/138 mg/kg, respectively) on the number of splenic endocolonies (CFU) in male F₁ mice (CBA × C57BL6j) 8 days after exposure to γ -radiation at a dose of 5 Gy. The combined results of two experiments ($n = 32-34$ per point) — the data for each experiment are normalized to the average number of CFU in the irradiated control. Point deviations correspond to SD. α , β — significant intergroup differences according to the Mann—Whitney U -test with Holm—Bonferroni corrections: α — with irradiated control (for T1023: $p = 0.007341$, $p = 0.000124$, $p = 0.004873$; for T1082: $p = 0.002630$, $p = 0.000279$, $p = 0.000036$, $p = 0.001798$, respectively); β — between groups receiving T1023 and T1082 at equimolar doses ($p = 0.003857$).

же характер, но развивалась менее стремительно, а летальное действие T1082 было более отсроченным — на 2–4-м часу после в/ж введения.

В целом данные, полученные в токсикологических исследованиях, свидетельствовали, что изменение солеобразующей кислоты с гидробромида на фосфат не оказало существенного влия-

ния на токсичность солей 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевин — оба соединения являются “умеренно токсичными” [35] с близкими количественными характеристиками.

Вместе с тем такое молекулярно-структурное изменение оказало значительное влияние на противолучевую активность фосфатной соли этой изотиомочевин.

В первой серии радиобиологических экспериментов в двух независимых опытах было проведено сравнительное исследование влияния T1023 и T1082 при парентеральном (в/б) введении в эквимоларных дозах, соответствующих уровням 1/18, 1/12, 1/8, 1/4 и 1/3 ЛД₁₀, на численность эндогенных селезеночных колоний у самцов мышей F₁ (СВА × С57BL6j) при воздействии γ -излучения в дозе 5 Гр.

В этих опытах T1023 стабильно реализовало характерную для этого соединения дозовую зависимость противолучевой активности [22, 24] (рис. 3) — в области 1/18–1/12 ЛД₁₀ (17–25 мг/кг) радиозащитное действие отсутствовало, значимый эффект проявлялся при 1/8 ЛД₁₀ (40 мг/кг) и достигал максимума в области 1/4 ЛД₁₀ (75 мг/кг). Однако дозовая зависимость противолучевой активности соединения T1082 в обоих опытах была существенно иной — радиозащитное действие отсутствовало только в области 1/18 ЛД₁₀ (18 мг/кг), а в диапазоне доз 1/12–1/4 ЛД₁₀ (27–80 мг/кг) эффект был статистически значимым и равным по эффективности ($p = 0.49-0.85$). Значимость наблюдаемых в этих опытах отличий противолучевой активности соединения T1082 подтверждало статистическое сравнение эффектов эквимоларных доз T1023 и T1082: в области 1/8 ЛД₁₀ — на уровне статистической тенденции ($p = 0.052549$), в области 1/12 ЛД₁₀ — на значимом статистическом уровне ($p = 0.003857$).

Способность соединения T1082 к эффективно радиозащитному действию при применении в низких дозах (1/12–1/8 ЛД₁₀) более контрастно проявилась при сравнительном исследовании влияния T1023 и T1082 при парентеральном (в/б) введении в эквимоларных дозах, соответствующих уровням 1/12, 1/8 и 1/4 ЛД₁₀, на 30-суточную выживаемость самцов мышей F₁ (СВА × С57BL6j) при воздействии γ -излучения в дозе 9.5 Гр.

В этом исследовании соединение T1023 также реализовало характерную для этого теста дозовую зависимость противолучевой активности [22, 24] (рис. 4) — высокоэффективное действие (выживаемость — 63%) в оптимальной дозе 1/4 ЛД₁₀ (75 мг/кг), минимальное значимое действие (выживаемость — 36%) в дозе 1/8 ЛД₁₀ (40 мг/кг), и отсутствие значимого действия (выживаемость — 27%) в дозе 1/12 ЛД₁₀ (25 мг/кг). В то же время действие T1082 обеспечивало выраженный про-

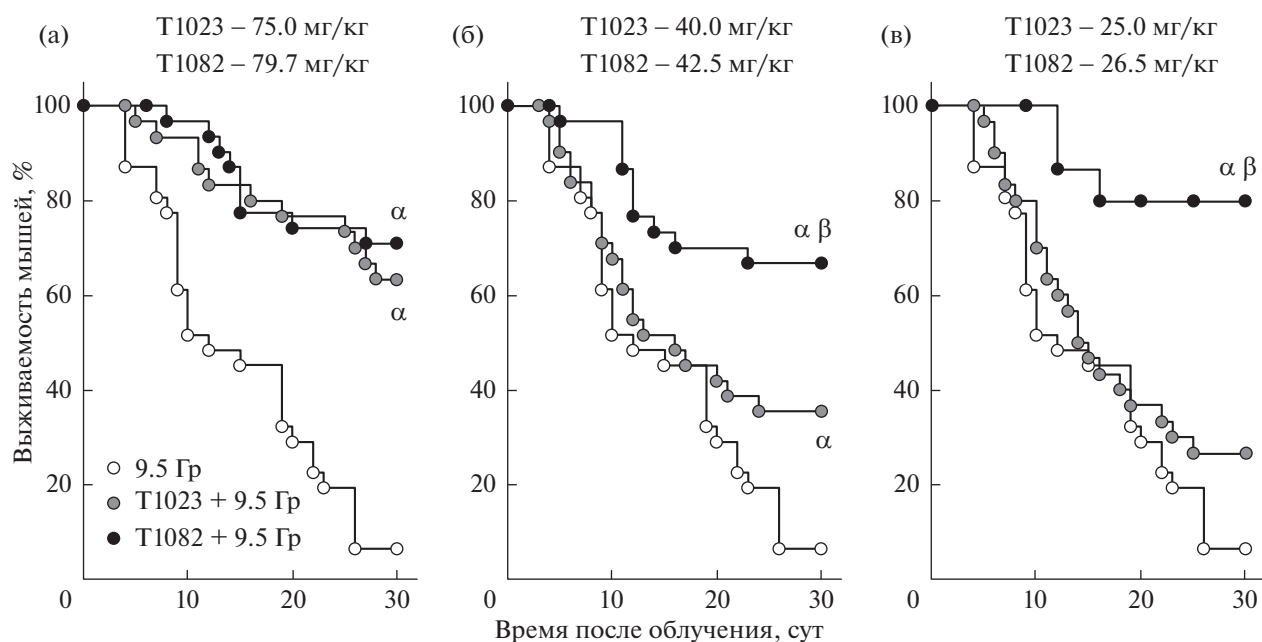


Рис. 4. Влияние соединений Т1023 и Т1084 при парентеральном введении (однократно, в/б, за 30 мин до облучения) в эквимоларных дозах, уровня 1/4 ЛД₁₀ (а), 1/8 ЛД₁₀ (б) и 1/12 ЛД₁₀ (в), на 30-суточную выживаемость самцов мышей F₁ (СВА × С57ВL6j) при воздействии γ -излучения в дозе 9.5 Гр. Объединенные результаты двух экспериментов ($n = 15-31$ в группе). Диаграммы выживаемости построены по методу Каплана–Майера. α , β – статистически значимые межгрупповые различия по F -тесту Кокса с поправками Холма–Бонферрони: α – с облученным контролем (для Т1023: $p = 0.000084$, $p = 0.031577$; для Т1082: $p = 0.000062$, $p = 0.000217$, $p = 0.000036$), β – с группой, получавшей Т1023 (б: $p = 0.008075$; в: $p = 0.000493$).

Fig. 4. Influence of compounds T1023 and T1084 after parenteral administration (once, i.p., 30 min before irradiation) in equimolar doses, corresponding to 1/4 LD₁₀ (a), 1/8 LD₁₀ (b) and 1/12 LD₁₀ (c), on 30-day survival of F₁ (CBA × C57BL6j) male mice exposed to radiation at a dose of 9.5 Gy. The combined results of two experiments ($n = 15-31$ per group). Survival diagrams were constructed using the Kaplan–Meier method. α , β – statistically significant intergroup differences according to the Cox F -test with Holm–Bonferroni corrections: α – with irradiated control (for T1023: $p = 0.000084$, $p = 0.031577$; for T1082: $p = 0.000062$, $p = 0.000217$, $p = 0.000036$), β – with group receiving T1023 (б: $p = 0.008075$; в: $p = 0.000493$).

тиволучевой эффект (выживаемость – 67–80%) во всем диапазоне доз 1/12–1/4 ЛД₁₀ (27–80 мг/кг). Радиозащитное действие Т1082 при всех уровнях доз с высокой вероятностью ($p = 0.53-0.76$) было равным по эффективности, и при дозах 1/12 и 1/8 ЛД₁₀ статистически значимо ($p = 0.000493$, $p = 0.008075$) превышало эффекты Т1023 в соответствующих дозах.

Таким образом, результаты двух независимых серий экспериментов по тесту селезеночных эндокolonий и тесту 30-суточной выживаемости убедительно подтвердили данные предварительного скрининга (рис. 2) о том, что изменение солеобразующей кислоты с НВг на Н₃Р₀4 позитивно модифицирует противолучевую активность солей 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевин. При этом масштаб такой модификации с позиций фармакологии является значительным. Наблюдается 2-кратное увеличение диапазона эффективных радиозащитных доз (радиозащитной широты) – от 60–90 мг/кг у соли гидробромида до 27–90 мг/кг у фосфатной соли. Причем

увеличение этого диапазона реализуется за счет расширения в область низких, более безопасных доз – 1/12–1/8 ЛД₁₀. И в этом случае увеличение в 2–3 раза дистанции от токсического порога позволяет соединению Т1082 существенно ограничить риски развития негативных эффектов без потери противолучевой эффективности.

Вместе с тем способность Т1082 к эффективному противолучевому действию в низких дозах (концентрациях) может дать значительные преимущества этому соединению не только в безопасности, но и в применимости. В частности, такая особенность Т1082 может повысить приемлемость такого действующего вещества для перорального способа применения. В этой связи для более полной оценки перспективности соединения Т1082 на завершающем этапе этой работы было проведено сравнительное исследование влияния Т1023 и Т1082 при пероральном введении на 30-суточную выживаемость самцов мышей F₁ (СВА × С57ВL6j) при воздействии γ -излучения в дозе 9 Гр. В этих экспериментах было установлено, что Т1082 при

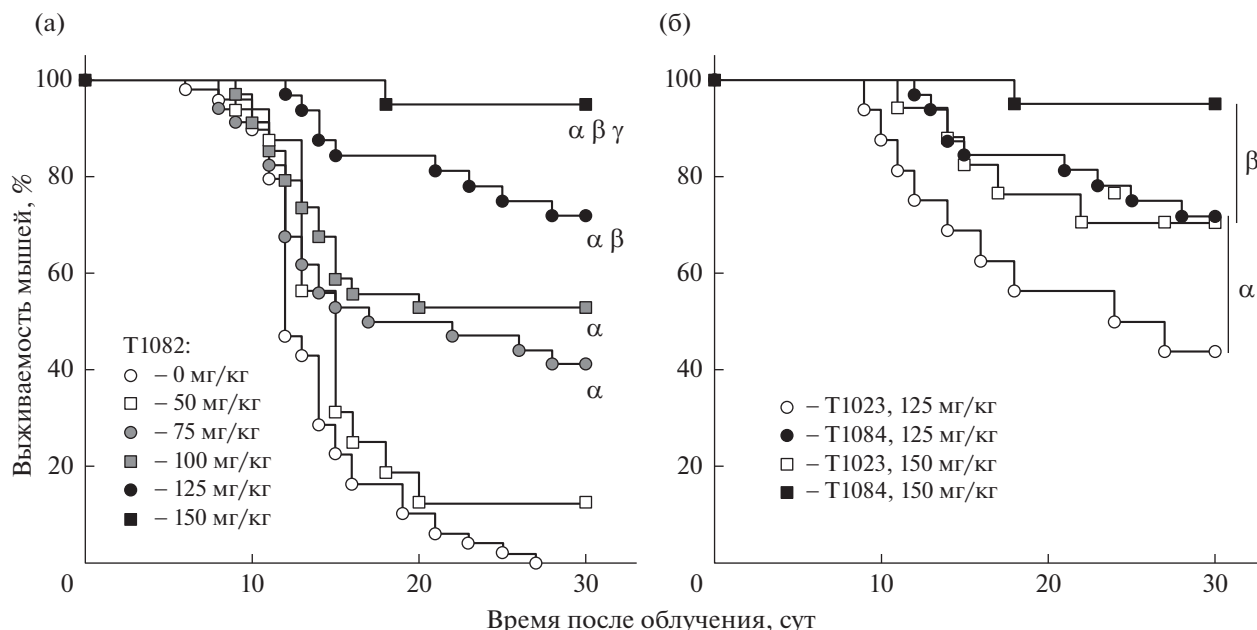


Рис. 5. Влияние соединений T1023 и T1084 при пероральном введении (однократно, в/ж, за 30 мин до облучения) на 30-суточную выживаемость самцов мышей F₁ (CBA × C57BL6j) при воздействии γ-излучения в дозе 9 Гр. а – эффекты T1082 при дозах 50–150 мг/кг. Объединенные результаты двух экспериментов (n = 20–34 в группе). α, β, γ – статистически значимые межгрупповые различия по F-тесту Кокса с поправками Холма–Бонферрони: α – с облученным контролем (p = 0.012219, p = 0.009427, p = 0.000073, p < 0.000001); β – с группой, получавшей 75 мг/кг (p = 0.013702, p = 0.000306); γ – с группой, получавшей 125 мг/кг (p = 0.005431). б – эффекты T1023 и T1082 в дозах 125 и 150 мг/кг. Объединенные результаты двух экспериментов (n = 15–34 в группе). α – различие эффектов T1023 и T1082 при дозе 125 мг/кг (p = 0.016827); β – различие эффектов T1023 и T1082 при дозе 150 мг/кг (p = 0.026849) по F-критерию Кокса.

Fig. 5. The effect of compounds T1023 and T1084 after oral administration (once, i/g, 30 min before irradiation) on the 30-day survival of male mice F₁(CBA × C57BL6j) exposed to γ-radiation at a dose of 9 Gy. а – effects of T1082 at doses of 50–150 mg/kg. Combined results from two experiments (n = 20–34 in group). α, β, γ – statistically significant intergroup differences according to the Cox F-test with Holm–Bonferroni corrections: α – with irradiated control (p = 0.012219, p = 0.009427, p = 0.000073, p < 0.000001); β – with the group receiving 75 mg/kg (p = 0.013702, p = 0.000306); γ – with the group receiving 125 mg/kg (p = 0.005431). б – effects of T1023 and T1082 at doses of 125 and 150 mg/kg. Combined results from two experiments (n = 15–34 in group). α – difference in the effects of T1023 and T1082 at a dose of 125 mg/kg (p = 0.016827); β – difference between the effects of T1023 and T1082 at a dose of 150 mg/kg (p = 0.026849) according to the Cox F-test.

однократном в/ж введении в дозах 50–150 мг/кг проявляет радиозащитную активность, выраженность которой носит отчетливую дозовую зависимость (рис. 5, а) – уровень эффекта нарастал от незначимого (выживаемость – 17%) при 50 мг/кг до высокоэффективного (выживаемость – 73%) при 125 мг/кг и абсолютно эффективного (выживаемость – 95%) при 150 мг/кг. Соединение T1023 при в/ж введении в дозах 125 и 150 мг/кг в этих опытах также оказывало противолучевое действие (рис. 5, б). Тем не менее при обеих дозах эффект T1082 статистически значимо превосходил (p = 0.016827, p = 0.026849) эффект соединения T1023. А равное радиозащитное действие соединения T1082 при пероральном введении реализовало при существенно меньших дозах (на 25–50 мг/кг; на 20–40%), чем соединение T1023 – противолучевой эффект T1023 в дозе 125 мг/кг был равноэффективен (p = 0.61–0.79) действию

T1082 в дозах 75–100 мг/кг, а противолучевой эффект T1023 в дозе 150 мг/кг был равноэффективен (p = 0.84) действию T1082 в дозе 125 мг/кг.

Полученные в этих опытах данные позволили нам также статистически надежно (p = 0.00621) охарактеризовать дозовую зависимость противолучевого действия T1082 при пероральном введении (рис. 6). Согласно результатам пробит-анализа, для мышей при таком способе введения минимальная радиозащитная доза T1082 (ED₁₆) составляет 54.4 мг/кг, средняя эффективная доза (ED₅₀) составляет 87.6 мг/кг, а диапазон оптимальных радиозащитных доз (ED_{84–98} – пробит в интервале 6.0–7.0) находится в пределах 141.2–224.1 мг/кг.

В полученных данных обращало на себя внимание различие влияния способа введения T1082 на чувствительность мышей к острому токсическому и радиозащитному действию этого соеди-

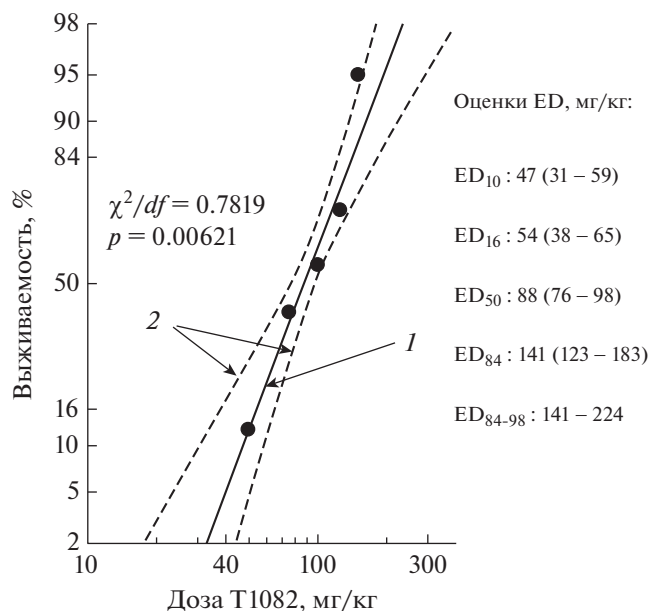


Рис. 6. Пробит-анализ дозовой зависимости радиозащитного эффекта T1082 при пероральном введении для мышей F₁ (CBA × C57BL6j) по критерию 30-суточной выживаемости. Темные символы — экспериментальные наблюдения (из рис. 5, а), 1 — средние ожидаемые эффективные дозы T1082, 2 — 95%-ный доверительный интервал ожидаемых эффективных доз T1082, p — уровень значимости пробит-логарифмической регрессии. Справа — оценки ED T1082 различной противолучевой эффективности.

Fig. 6. Probit analysis of the dose dependence of T1082 radioprotective effect after oral administration in F₁ (CBA × C57BL6j) mice according to 30-day survival criterion. Dark symbols — experimental observations (from Fig. 5, a), 1 — average expected effective doses of T1082, 2 — 95% confidence interval of T1082 expected effective doses, p — the significance level of probit-logarithmic regression. Right — estimates of T1082 ED of various radiation efficacy.

нения. Действительно, если острая токсичность T1082 при пероральном применении снижалась в 6.5–7.0 раз в сравнении с в/б введением (ЛД₁₀ и ЛД₅₀ возросли от 321 и 403 мг/кг до 2290 и 2638 мг/кг), то чувствительность к радиозащитному действию T1082 при этом снижалась заметно слабее — в 2.5–5.0 раз (ED_{opt} возросли от 27–90 мг/кг до 141–224 мг/кг). И в этом случае при пероральном применении T1082 существенно (не

менее чем на 40%) возрастала дистанция радиозащитных доз от токсического порога. Расчеты показали (табл. 2), что терапевтический индекс (ЛД₅₀/ED₅₀) T1082 при пероральном применении равен 30, при этом его оптимальные радиозащитные дозы более чем на порядок ниже максимальных переносимых доз — 1/16–1/10 ЛД₁₀. Следовательно, по соотношениям эффективности и безопасности соединения T1082 при пероральном способе введения превосходит характеристики для данного вида животных многих известных противолучевых средств [36].

Такая картина свидетельствует в пользу того, что пероральный способ применения T1082 является не только приемлемым, но и, вероятно, наиболее предпочтительным, в том числе и с позиций безопасности. Причем экстраполяция радиозащитных доз соединения T1082 для человека показывает, что пероральный способ применения этого средства вполне приемлем для фармацевтической разработки (табл. 3) — для людей с массой тела 60–80 кг эффективное радиозащитное действие будет обеспечиваться при пероральном приеме 750–1250 мг соединения T1082. В этом случае фармацевтическая разработка такого ЛС в виде твердой лекарственной формы, содержащей 250 мг (3–5 единиц на прием) или 400 мг (2–3 единицы на прием) действующего вещества, будет вполне приемлемой для однократного или кратного применения как в качестве радиопротектора, так и средства профилактики осложнений лучевой терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты этого исследования показали, что замещение солеобразующей кислоты с гидробромида на фосфат не изменяет токсических характеристик, но позитивно модифицирует противолучевую активность солей 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевин. Фосфатная соль (соединение T1082) приобретает способность к эффективному радиозащитному действию при парентеральном введении в относительно низких дозах (1/12–1/8 ЛД₁₀), в которых соль гидробромида (соединение T1023) низкоэффективна или уже не действует. Масштаб такой модификации с позиций фармакологии является значительным. Наблюдается 2-кратное расширение

Таблица 2. Фармакологические показатели безопасности радиозащитного действия соединений T1082 для мышей
Table 2. Pharmacological safety parameters of the radioprotective action of T1082 compounds for mice

Соединение, способ введения	ЛД ₁₀ / ED ₁₆	ЛД ₅₀ / ED ₅₀	ЛД ₁₀ / ED ₅₀	ЛД ₁₀ / ED _{opt}
T1082, в/ж	42.1	30.1	26.1	10.2–16.2

Таблица 3. Расчеты первично рекомендуемых радиозащитных доз T1082 для человека при пероральном введении
Table 3. Calculations of the primary recommended radioprotective doses of T1082 for humans after oral administration

Мышь	Человек *			
	масса тела 60 кг		масса тела 80 кг	
ED ₈₄₋₉₈ , мг/кг	ED ₈₄₋₉₈ , мг/кг	на прием, мг	ED ₈₄₋₉₈ , мг/кг	на прием, мг
141.2–224.1	12.6–17.4	755–1046	11.4–15.7	909–1258

* Значения ED рассчитаны по действующим коэффициентам межвидовой экстраполяции доз [32].

диапазона эффективных доз – от 1/5–1/3 ЛД₁₀ (60–90 мг/кг) у T1023 до 1/12–1/3 ЛД₁₀ (27–90 мг/кг) у T1082. Такая возможность применения в 2–3 раза меньших доз без потери противолучевой эффективности дает соединению T1082 существенные преимущества над исходным T1023, в первую очередь, в безопасности.

При пероральном введении T1082 в дозах 50–150 мг/кг наблюдается радиозащитное действие, имеющее отчетливый дозово-зависимый характер, при этом эффекты T1082 статистически значимо превышают действие равных доз T1023. Причем при пероральном способе введения уровень безопасности радиозащитного действия T1082 еще более возрастает – терапевтический индекс (ЛД₅₀/ED₅₀) достигает 30, а оптимальные радиозащитные дозы T1082 (ED₈₄₋₉₈ – 141–224 мг/кг) при этом более чем на порядок ниже максимально переносимых доз (1/16–1/10 ЛД₁₀).

Совокупность этих данных доказывает наличие у химического аналога T1023 – 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевинины фосфата, выраженных радиобиологических и фармакологических преимуществ над прототипом, что позволяет отнести T1082 к числу наиболее безопасных потенциальных противолучевых средств и свидетельствует о высокой перспективности этого соединения в качестве основы нового радиопротектора или средства профилактики осложнений лучевой терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pellmar T.C., Rockwell S. Priority list of research areas for radiological nuclear threat countermeasures // *Radiat. Res.* 2005. V. 163. № 1. P. 115–123. <https://doi.org/10.1667/rr3283>
2. Singh V.K., Romaine P.L., Seed T.M. Medical countermeasures for radiation exposure and related injuries: characterization of medicines, FDA-approval status and inclusion into the strategic national stockpile // *Health Phys.* 2015. V. 108. № 6. P. 607–630. <https://doi.org/10.1097/HP.0000000000000279>
3. Рожественский Л.М. Актуальные вопросы поиска и исследования противолучевых средств // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2013. Т. 53. № 5. С. 513–520. [*Rozhdestvensky L.M. Actual problems of searching and studying radiation countermeasures // Radiatsionnaya biologiya. Radioecologia = Radiation Biology. Radioecology.* 2013. V. 53. № 5. P. 513–520. (in Russian)] <https://doi.org/10.7868/S0869803113050135>
4. 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. № 9. P. 851–869. <https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1332438>
5. Singh V.K., Garcia M., Seed T.M. A review of radiation countermeasures focusing on injury-specific medicinals and regulatory approval status: part II. Countermeasures for limited indications, internalized radionuclides, emesis, late effects, and agents demonstrating efficacy in large animals with or without FDA IND status // *Int. J. Radiat. Biol.* 2017. V. 93. № 9. P. 870–884. <https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1338782>
6. Grebenyuk A.N., Gladkikh V.D. Modern condition and prospects for the development of medicines towards prevention and early treatment of radiation damage // *Biol. Bull.* 2019. V. 46 № 11. P. 1540–1555. <https://doi.org/10.1134/S1062359019110141>
7. Rozhdestvensky L.M. Challenges in the design of Russian radiation protection means in the crisis period: The search for key directions of development // *Biol. Bull.* 2020. V. 47. № 12. P. 1659–1668. <https://doi.org/10.1134/S1062359020120080>
8. King M., Joseph S., Albert A. et al. Use of amifostine for cytoprotection during radiation therapy: a review // *Oncology.* 2020. V. 98. № 2. P. 61–80. <https://doi.org/10.1159/000502979>
9. Le Q.T., Kim H.E., Schneider C.J. et al. Palifermin reduced severe mucositis in definitive chemoradiotherapy of locally advanced head and neck cancer: a randomized, placebo-controlled study // *J. Clin. Oncol.* 2011. V. 29. № 20. P. 2808–2814. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.4095>
10. Филимонова М.В., Филимонов А.С. Современные проблемы и перспективы разработки и внедрения отечественных противолучевых лекарственных

- средств // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т. 59. № 2. С. 127–131. [Filimonova M.V., Filimonov A.S. Contemporary problems and perspectives of development and implementation of domestic radioprotective drugs // Radiatsionnaya biologiya. radioecologia = Radiation Biology. Radioecology. 2019. V. 59. № 2. P. 127–131. (in Russian)]
<https://doi.org/10.1134/S0869803119020061>
11. Васин М.В. Средства профилактики и лечения лучевых поражений. М., 2006. 340 с. [Vasin M.V. Medicines of prophylaxis and treatment of radiation injuries. Moscow, 2006. 340 p. (in Russian)]
 12. 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. V. 93. № 9. P. 885–906.
<https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1332440>
 13. Legeza V.I., Drachev I.S., Grebenyuk A.N. Radiomitigators: classification, pharmacological properties, and application prospects // Biol. Bull. 2019. V. 46. № 12. P. 1625–1632.
<https://doi.org/10.1134/S1062359019120045>
 14. Forstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function // Eur. Heart J. 2012. V. 33. № 7. P. 829–837.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
 15. Liebmann J., DeLuca A.M., Coffin D., Keefer L.K., Venzon D., Wink D.A., et al. In vivo radiation protection by nitric oxide modulation // Cancer Res. 1994. V. 54. № 13. P. 3365–3368. PMID: 7516820
 16. Gorbunov N.V., Pogue-Geile K.L. et al. Activation of nitric oxide synthase 2 pathway in the response of bone marrow stromal cells to high doses of ionizing radiation // Radiat. Res. 2000. V. 134. № 1. P. 73–86.
[https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2000\)134\[0073:aotnos\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2000)134[0073:aotnos]2.0.co;2)
 17. Barthlen W., Klemens C., Rogenhofer S. et al. Critical role of nitric oxide for proliferation and apoptosis of bone-marrow cells under septic conditions // Ann. Hematol. 2000. V. 79. № 5. P. 249–254.
<https://doi.org/10.1007/s002770050588>
 18. Proskuryakov S.Ya., Kucherenko N.G., Trishkina A.I. et al. NO-inhibiting and vasotropic activity of some compounds with thioamidine group // Bull. Experim. Biol. Med. 2002. V. 134. № 4. P. 338–341.
<https://doi.org/10.1023/A:1021943811672>
 19. Филимонова М.В., Проскуряков С.Я., Шевченко Л.И. и др. Радиозащитные свойства производных изотиомочевин с NO-ингибирующим механизмом действия // Радиационная биология. Радиоэкология. 2012. Т. 52. № 6. С. 593–601. [Filimonova M.V., Proskuryakov S.Y., Shevchenko L.I. et al. Radioprotective properties of isothiourea derivatives with NO-inhibitory mechanism of action // Radiatsionnaya biologiya. radioecologia = Radiation Biology. Radioecology. 2012. V. 52. № 6. P. 593–601. (in Russian)]
 20. Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Трофимова Т.П. и др. К вопросу о механизме радиозащитного действия ингибиторов NO-синтаз // Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54. № 5. С. 500–506. [Filimonova M.V., Shevchenko L.I., Trofimova T.P. et al. On the mechanism of radioprotective effect of NO-synthase inhibitors // Radiatsionnaya biologiya. Radioecologia = Radiation Biology. Radioecology. 2014. V. 54. № 5. P. 500–506. (in Russian)]
<https://doi.org/10.7868/S086980311405004X>
 21. Макаrchук В.М., Филимонова М.В., Филимонов А.С. и др. Лактатемия как возможный фармакологический маркер радиорезистентности при действии ингибитора NOS T1023 // Радиация и риск. 2020. Т. 29. № 1. С. 45–56. [Makarchuk V.M., Filimonova M.V., Filimonov A.S. et al. Lactatemia as a possible pharmacological marker of NOS-inhibitor T1023 induced radioresistance // Radiation and Risk. 2020. V. 29. № 1. P. 45–56. (in Russian)]
<https://doi.org/10.21870/0131-3878-2020-29-1-45-56>
 22. Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Макаrchук В.М. и др. Радиозащитные свойства ингибитора NO-синтаз T1023: I. Показатели противолучевой активности и взаимодействие с другими радиопротекторами // Радиационная биология. Радиоэкология. 2015. Т. 55. № 3. С. 250–259. [Filimonova M.V., Shevchenko L.I., Makarchuk V.M. et al. Radioprotective properties of NO-synthase inhibitor T1023: I. Indicators of radioprotective activity and interaction with other radioprotectors // Radiatsionnaya biologiya. Radioecologia = Radiation Biology. Radioecology. 2015. V. 55. № 3. P. 250–259. (in Russian)]
<https://doi.org/10.7868/S0869803115030042>
 23. Макаrchук В.М., Филимонова М.В., Измestьева О.С. и др. Радиозащитные свойства ингибитора NO-синтаз T1023: III. Механизмы противолучевого действия in vivo // Радиационная биология. Радиоэкология. 2016. Т. 56. № 6. С. 590–597. [Makarchuk V.M., Filimonova M.V., Izmestieva O.S. et al. Radioprotective properties of NO-synthase Inhibitor T1023: III. Mechanisms of radioprotective action in vivo // Radiatsionnaya biologiya. Radioecologia = Radiation Biology. Radioecology. 2016. V. 56. № 6. P. 590–597. (in Russian)]
<https://doi.org/10.7868/S0869803116060060>
 24. Filimonova M.V., Makarchuk V.M., Shevchenko L.I. et al. Radioprotective activity of nitric oxide synthase inhibitor T1023. Toxicological and biochemical properties, cardiovascular and radioprotective effects // Radiat. Res. 2020. V. 194. № 5. P. 532–543.
<https://doi.org/10.1667/RADE-20-00046.1>
 25. Филимонова М.В., Ульяненко С.Е., Шевченко Л.И. и др. Радиозащитные свойства ингибитора NO-синтаз T1023: II. Способность к селективной защите нормальных тканей при лучевой терапии новообразований // Радиационная биология. Радиоэкология. 2015. Т. 55. № 3. С. 260–266. [Filimonova M.V., Ulyanenko S.E., Shevchenko L.I. et al. Radioprotective properties of NO-synthase Inhibitor T1023: II. The ability for selective protection of normal tissues during radiotherapy of tumor // Radiatsionnaya biologiya. Radioecologia = Radiation Biology. Radioecology. 2015. V. 55. № 3. P. 260–266. (in Russian)]
<https://doi.org/10.7868/S0869803115030054>

26. Филимонова М.В., Самсонова А.С., Корнеева Т.С. и др. Исследование способности нового ингибитора синтаза оксида азота INOS1 селективно защищать нормальные ткани на модели лучевой терапии карциномы Эрлиха // Радиация и риск. 2018. Т. 27. № 2. С. 37–45. [Filimonova M.V., Samsonova A.S., Korneeva T.S. et al. Study of the ability of a new nitric oxide synthase inhibitor INOS1 to selectively protect the normal tissue in the Ehrlich carcinoma radiotherapy model // Radiation and Risk. 2018. V. 27. № 2. P. 37–45. (in Russian)]
<https://doi.org/10.21870/0131-3878-2018-27-2-37-45>
27. Филимонова М.В., Самсонова А.С., Корнеева Т.С. и др. Противолучевые эффекты ингибитора синтаза оксида азота T1023 в нормальных и малигнизированных тканях // Радиация и риск. 2018. Т. 27. № 4. С. 155–169. [Filimonova M.V., Samsonova A.S., Korneeva T.S. et al. The radioprotective effects of nitric oxide synthase inhibitor T1023 on normal and malignant tissues // Radiation and Risk. 2018. V. 27. № 4. P. 155–169. (in Russian)]
<https://doi.org/10.21870/0131-3878-2018-27-4-155-169>
28. Сабурова А.С., Филимонова М.В., Южаков В.В. и др. Влияние ингибитора синтаза оксида азота T1023 на развитие лучевого пневмофиброза у крыс // Радиационная гигиена. 2020. Т. 13. № 1. С. 60–67. [Saburova A.S., Filimonova M.V., Yuzhakov V.V. et al. The influence of nitric oxide synthase inhibitor T1023 on the development of radiation pneumofibrosis in rats // Radiatsionnaya Gygiena = Radiation Hygiene. 2020. V. 13. № 1. P. 60–67. (in Russian)]
<https://doi.org/10.21514/1998-426X-2020-13-1-60-67>
29. Curry S.H., Whelpton R. Drug disposition and pharmacokinetics: From principles to applications, 2nd Ed. John Wiley & Sons Ltd., 2011. 388 p.
<https://doi.org/10.1002/9780470665190.ch11>
30. Филимонова М.В., Сабурова А.А., Шевченко Л.И. и др. Влияние вида солеобразующих кислот на противолучевую активность аналогов T1023 – солей N-изобутанол-S-изопропилизотиомочевин // Радиационная гигиена. 2021. Т. 14. № 1. С. 68–74. [Filimonova M.V., Saburova A.S., Shevchenko L.I. et al. Influence of the of salt-forming acids on the antiradiation activity of T1023 analogs – salts of N-isobutanoyl-S-isopropylisothiurea // Radiatsionnaya Gygiena // Radiation Hygiene. 2021. V. 14. № 1. P. 68–74. (in Russian)]
<https://doi.org/10.21514/1998-426X-2021-14-1-68-74>
31. Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Филимонов А.С. и др. Радиозащитное фармакологическое средство: Патент на изобретение Российской Федерации RU 2733883, 07.10.2020. [Filimonova M.V., Shevchenko L.I., Filimonov A.S. et al. Radioprotective pharmacological agent: Russian Federation patent RU 2733883, 07.10.2020 (in Russian)]
32. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1-я / Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с. [Guidelines on conduction of pre-clinical trials. Part one / Ed. A.N. Mironov. Moscow: Grif and Co, 2012. 944 p. (in Russian)]
33. McCulloch E.A., Till J.E. The sensitivity of cells from normal mouse bone marrow to gamma radiation in vitro and in vivo // Radiat. Res. 1962. V. 16. P. 822–832. PMID: 16722000
34. Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure // Scand. J. Stat. 1979. V. 6. № 2. P. 65–70. JSTOR 4615733.
35. Berezovskaya I.V. Classification of substances with respect to acute toxicity for parenteral administration // Pharmaceut. Chem. J. 2003. V. 37. № 3. P. 139–141.
<https://doi.org/10.1023/A:1024586630954>
36. Vasin M.V., Ushakov I.B. Comparative efficacy and the window of radioprotection for adrenergic and serotonergic agents and aminothiols in experiments with small and large animals // J. Radiat. Res. 2015. V. 56. № 1. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1093/jrr/rru087>

Radioprotective Effects of T1082 – Phosphate 1-isobutanoyl-2-isopropylisothiurea in Comparisson with its Analogue T1023

M. V. Filimonova^{a, #}, L. I. Shevchenko^a, V. M. Makarchuk^a, A. S. Saburova^a, O. V. Soldatova^a, A. A. Shitova^a, A. O. Kosachenko^a, V. A. Rybachuk^a, V. O. Saburov^a, and A. S. Filimonov^a

^a A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia

[#] E-mail: mari_fil@mail.ru

The aim of the research was a comparative study of the toxic properties and radioprotective activity of a new NOS inhibitor T1082, 1-isobutanoyl-2-isopropylisothiurea phosphate, in comparison with its close chemical analogue, known as T1023 – 1-isobutanoyl-2-isopropylisothiurea hydrobromide. The study of toxic properties was carried out according to the acute toxicity test for outbred CD-1 mice with a single intraperitoneal (i/p) and intragastric (i/g) administration. A comparative study of T1082 and T1023 radioprotective activity after i/p administration at doses of 1/18–1/2 LD₁₀ was carried out on male F₁ hybrid mice (CBA × C57BL/6j) according to the tests of splenic endocolonies and 30-day survival. The study of T1082 and T1023 effects after i/g administration at doses of 50–150 mg/kg was carried out according to the 30-day survival test. The results of this study showed that the replacement of the salt-forming acid from HBr to H₃PO₄ does not

significantly change the toxic properties, but significantly modifies the radioprotective activity of 1-isobutanoyl-2-isopropyl isothioureia salts. Phosphate salt (T1082) acquires the ability to have an effective radioprotective effect when administered i/p in low doses ($1/12$ – $1/8$ LD₁₀), at which the hydrobromide salt (T1023) is ineffective or no longer works. The consequences of such features of the T1082 are significant. There is a 2-fold expansion of the range of effective doses – from $1/5$ – $1/3$ LD₁₀ (60–90 mg/kg) for T1023 to $1/12$ – $1/3$ LD₁₀ (27–90 mg/kg) for T1082. This possibility of using 2–3 times lower doses without loss of radioprotective efficiency gives the T1082 compound significant advantages, first of all, in safety. After i/g administration, T1082 at doses of 50–150 mg/kg implements dose-dependent radioprotective effect, which statistically significantly exceed the effect of equal doses of T1023. Moreover, after i/g administration, the level of T1082 safety increases even more – the therapeutic index (LD₅₀/ED₅₀) reaches 30, and the optimal radioprotective doses of T1082 (ED_{84–98} – 224 mg/kg) are more than an order of magnitude lower than the maximum tolerated doses ($1/16$ – $1/10$ LD₁₀). The data obtained prove that 1-isobutanoyl-2-isopropylisothioureia phosphate has pronounced advantages over the prototype (T1023), which make it possible to classify the T1082 compound as one of the safest potential radioprotective agents, and indicate its high prospects as a basis for a new radioprotector or a mean of preventing radiation therapy complications.

Keywords: Radioprotective efficacy, irradiation, survival, pharmacological safety, acute toxicity, compound T1023, NOS inhibitor