

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.164.171+615.279.614.876.

**РЕГУЛЯЦИЯ МИТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
В РОГОВИЦЕ КРЫС ПРИ ЗАЩИТНОМ И ЛЕЧЕБНОМ ДЕЙСТВИИ
ПАРААМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ В ОПЫТАХ
С РЕНТГЕНОВСКИМ ОБЛУЧЕНИЕМ**

© 1999 г. О. Г. Строева, И. Г. Панова

Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН, 117808 Москва, ул. Вавилова, 26.

Поступила в редакцию 10.04.99 г.

На роговице крыс в опыте с рентгеновским облучением (5 Гр) исследовали защитное и лечебное действие парааминобензойной кислоты (ПАБК) в дозах, эффективных в индукции интерферона (Акберова и др., 1999). В дозе 10 мг/кг ПАБК сохраняет пострадиационную митотическую активность на уровне облученного контроля, а в дозах 1.4 и 100 мг/кг повышает над контрольным уровнем. Во всех опытах все три дозы в равной пропорции от общего числа митозов снижают долю патологических митозов.

Ранее нами было показано на модельном объекте – роговице крыс, облученных рентгеновскими лучами, что парааминобензойная кислота (ПАБК) при местном и системном введении в организм обладает радиозащитным и лечебным действием, значительно снижая число поврежденных интерфазных ядер и патологических митозов в базальном слое переднего роговичного эпителия (Строева и др., 1997; Панова и др., 1997). Со времени выхода этих работ было открыто, что ПАБК обладает свойствами антиоксиданта (Акберова и др., 1998а, б) и индуктора интерферона (Акберова и др., 1999). Продолжая рекогносцировочные опыты с целью уточнения механизма радиозащитного действия ПАБК *in vivo* и учитывая роль интерферона (ИФН) в снижении числа хромосомных aberrаций, сестринских хроматидных обменов и стимуляции репаративного синтеза ДНК в культуре лимфоцитов человека (Васильева и др., 1986), мы исследовали защитное и лечебное действие ПАБК в дозах, эффективных в индукции интерферона (Акберова и др., 1999). Результаты представлены ниже.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на крысах Вистар, самцах в возрасте 1.5–2 мес. весом 80–120 г. Тотальное облучение животных проводили на установке РУМ-17 в дозе 5 Гр (мощность дозы 0.886 Гр/мин, фокусное расстояние 47 см, фильтры Cu 0.5 + 1.0 Al, 210 kV, 15 mA, 5' 36"). Раствор ПАБК, приготовленный на 0.9%-ном NaCl, вводили подкожно. В первой серии изучали защитное действие ПАБК в двух типах опытов – ПАБК вводили до облучения: 1) однократно в дозе 1.4, 10 и 100 мг/кг за 20 ч

и 2) пятикратно – в течение 5 сут ежедневно в дозе 10 мг/кг; животных забивали через 5 сут после облучения. Во второй серии опытов изучали лечебное действие ПАБК, вводимой в дозе 10 мг/кг сразу после облучения и далее ежедневно однократно в течение последующих дней, всего 7 инъекций; животных забивали через 26 сут после облучения. Контролем к обеим сериям опытов служили: 1) интактные животные, 2) интактные животные с введением ПАБК в дозе 10 мг/кг (ежедневно однократно в течение 5 сут, с фиксацией через 5 сут после последней инъекции) и 3) облученные животные с фиксацией одновременно с подопытными животными в каждой серии. Гистологическую обработку материала проводили так же, как и в предыдущих исследованиях (Строева и др., 1997, Панова и др., 1997). На светооптическом уровне на серийных фронтальных срезах роговицы, толщиной 5 мкм, в базальном слое переднего роговичного эпителия просчитывали число нормальных и патологически измененных митозов на каждом третьем срезе в центральной зоне роговицы (8 срезов на роговицу). Объединяя данные по двум глазам каждого животного, за *n* принимали число животных. Учитывались следующие категории патологически измененных митозов: задержка митозов в профазе, асимметричные митозы и звездчатые метафазы с фрагментами, двугрупповые, трехплюсные и веерообразные метафазы с фрагментами, атипичные анафазы и телофазы с мостами и фрагментами, набухание и слипание хромосом. Статистическую обработку данных проводили по Стьюденту.

Таблица 1. Общее число митозов и доля патологически измененных митозов в базальном слое переднего роговичного эпителия у крыс при разных дозах ПАБК, введенной до рентгеновского облучения

Группы опытов	Число экспериментальных животных	Суммарное число митозов	Среднее число митозов на 1 животное	Патологические митозы, %
Интактный контроль	5	486	97.2 ± 12.5	5.5 ± 2.3
Контроль с ПАБК	4	470	117.5 ± 31.0	1.3 ± 0.6
Облученный контроль	10	265	26.5 ± 8.4	80.6 ± 4.2
ПАБК 10 мг/кг в течение 5 сут до облучения	6	56	9.3 ± 2.9	46.2 ± 8.7
ПАБК 10 мг/кг за 20 ч до облучения	3	46	15.3 ± 6.2	31.1 ± 15.9
ПАБК 1.4 мг/кг за 20 ч до облучения	3	165	55.0 ± 16.3	66.3 ± 10.2
ПАБК 100 мг/кг за 20 ч до облучения	3	173	57.7 ± 12.6	50.7 ± 11.6

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии опытов в интактном контроле и контроле с ПАБК число митозов на клеточную популяцию было сходным и составляло соответственно 97.2 ± 12.5 и 117.5 ± 31.0 , а доля патологических митозов среди них не превышала $5.5 \pm 2.3\%$, т.е. ПАБК не оказывала влияния на митотическую активность интактного глаза. В облученном контроле на 5-е сут после облучения число митозов было снижено до 26.5 ± 8.4 на клеточную популяцию и доля патологически измененных митозов среди них достигала $80.6 \pm 4.2\%$ (табл. 1, рис. 1).

При одно- и пятикратном введении ПАБК в дозе 10 мг/кг общее число митозов в роговичном эпителии на 5 сут после облучения было снижено, достигая 15.3 ± 6.2 и 9.3 ± 2.9 соответственно и статистически не отличаясь друг от друга и облученного контроля (рис 1), при достоверном снижении доли патологически измененных митозов по сравнению с облученным контролем – $31.1 \pm 5.9\%$ при

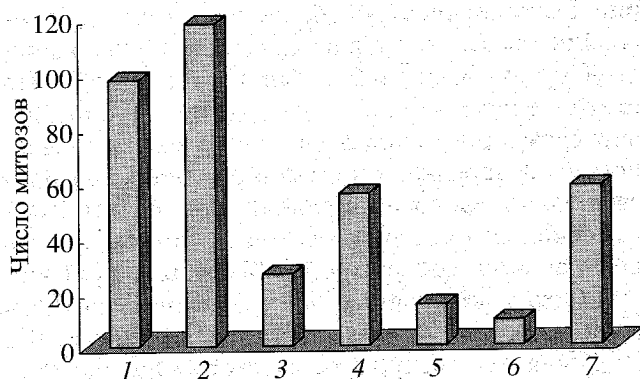


Рис. 1. Общее число митозов в базальном слое переднего эпителия роговицы в опытах с введением ПАБК до облучения: 1 – интактный контроль; 2 – контроль с ПАБК; 3 – облученный контроль; 4 – ПАБК в дозе 1.4 мг/кг, однократно за 20 ч до облучения; 5 – ПАБК в дозе 10 мг/кг, однократно за 20 ч до облучения; 6 – ПАБК в дозе 10 мг/кг пятикратно в течение 5 сут до облучения; 7 – ПАБК в дозе 100 мг/кг однократно за 20 ч облучения.

однократном и $46.2 \pm 8.7\%$ при пятикратном введении ПАБК (табл. 1). Эти результаты показывают, что однократное введение ПАБК за 20 ч до облучения достаточно и дает максимальный эффект, характерный для данной дозы.

При однократном введении ПАБК в дозах 1.4 и 100 мг/кг число митозов на клеточную популяцию было одинаково повышено по сравнению с облученным контролем и опытами с введением ПАБК в дозе 10 мг/кг, достигая 55.0 ± 16.3 и 57.7 ± 12.6 соответственно, а доля патологически измененных митозов от общего числа митозов была ниже, чем в облученном контроле (66.3 ± 10.2 и $50.7 \pm 11.6\%$ соответственно), статистически не отличаясь от таковой в опытах с введением ПАБК в дозе 10 мг/кг (табл. 1, рис. 1).

Вторая серия опытов с применением ПАБК в дозе 10 мг/кг в течение 7 сут после облучения показала, что в облученном контроле, в опыте с ПАБК и в интактном контроле к 26 сут после облучения значения общего числа митозов на клеточную популяцию статистически уравнивались – 84.0 ± 14.5 , 166.0 ± 50.0 и 121.7 ± 36.6 соответственно, что указывает на компенсаторную пролиферацию в роговице облученных животных. Доля же патологически измененных митозов была значительно ниже в опыте с ПАБК – $32.8 \pm 8.9\%$, чем в облученном контроле – $72.2 \pm 3.2\%$, превышая, естественно, уровень патологических митозов в интактном контроле (рис 2), что подтверждает лечебный эффект ПАБК при облучении (Строева и др., 1997; Панова и др., 1997).

Сравнение доз ПАБК, эффективных в индукции интерферона (Акберова и др., 1999) и в радиозащитном действии в настоящей работе, показало, что введенная до облучения ПАБК затрагивает два процесса – охрану генома и регуляцию уровня пострадиационной клеточной пролиферации. Все три дозы ПАБК – 1.4, 10 и 100 мг/кг, эффективные в индукции высокого титра раннего интерферона у мышей (табл. 2), в равной пропорции снижают долю патологически измененных митозов по отношению к общему числу митозов

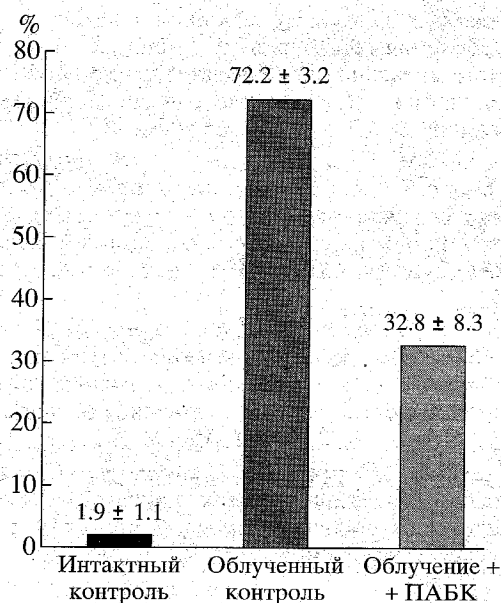


Рис. 2. Процент патологически измененных митозов в базальном слое переднего эпителия роговицы крыс в опыте с введением ПАБК в течение 7 сут после рентгеновского облучения и с регистрацией результатов через 26 сут после облучения.

в роговичном эпителии во всех опытах (табл. 1). Однако на уровень митотической активности в роговичном эпителии разные дозы ПАБК влияют по-разному: дозы 1.4 и 100 мг/кг повышают общее число митозов на клеточную популяцию по сравнению с облученным контролем, а доза 10 мг/кг сохраняет ее на уровне последнего (рис. 1). У мышей при введении ПАБК в дозах 1 и 100 мг/кг через 24 ч после введения титр ИФН в крови снижается, а при дозе 10 мг/кг остается на достаточно высоком уровне (табл. 2). Это наблюдение позволяет сделать вывод о том, что ПАБК в дозе 10 мг/кг, пролонгируя сохранение повышенного титра интерферона в крови животных,

Таблица 2. Определение интерферон-индуцирующей активности ПАБК на инбредных белых мышках (Акберова и др., 1999)

Название препарата	Доза, мг/кг	Титр интерферона после введения индуктора через:	
		5 ч	24 ч
ПАБК	1	160–320	40–80
	10	320–640	160
	100	320–640	40–80
Неовир	400	640–1280	80
Амиксин	200	40–80	320
ИФН-α	1000МЕ	320	320
ИФН-β	1000МЕ	640	640

блокирует пострадиационный подъем митотической активности в роговичном эпителии.

В чем биологический смысл ингибции пострадиационного подъема пролиферации при действии радиопротекторов? Согласно современным представлениям, радиопротекторы в облученных обновляющихся тканях млекопитающих, не уменьшая объема первичных лучевых повреждений, тормозят физиологические процессы, в частности, размножение клеток, ведущие к реализации потенциальных летальных повреждений, и тем самым удлиняют время, необходимое для репарации биологических структур (Вартанян и др., 1998). Аналогично на *Escherichia coli* было показано, что ПАБК ингибирует репликацию ДНК, увеличивая временной интервал для репарации однонитчатых разрывов ДНК с помощью ДНК-полимеразы I, и одновременно взаимодействует с этим ферментом, увеличивая его активность (Васильева, 1989). Выравнивание общего числа митозов к 26 сут после облучения в контроле, опыте с лечебным действием ПАБК и у интактных животных (табл. 1) показывает, что собственные физиологические репаративные процессы в базальном слое переднего роговичного эпителия действительно имеют место. Если допустима экстраполяция выводов, полученных в одном опыте, на другой, то можно предположить, что блок пострадиационной пролиферации, возникающий при защитном действии ПАБК в дозе 10 мг/кг, через какое то время может быть снят, и компенсаторная пролиферация восстановит объем пролиферирующих клеток в роговице, но с меньшим числом поврежденных митозов, чем при дозах 1.4 и 100 мг/кг. Можно также предположить, что в лечебном действии ПАБК, как и в защитном, достаточно однократной инъекции ПАБК, а остальные введения этого вещества избыточны. Но так как время после облучения, в течение которого возможен лечебный эффект ПАБК, неизвестно, мы не знаем, которая из 7 инъекций оказалась значимой. Оба предположения могут быть проверены экспериментально.

Доза ПАБК, равная 10 мкг/кг, при ее однократном введении в организм животных за 24 ч до или через 1 ч после облучения или гипоксического шока является также эффективной и в ее антиоксидантной активности (Акберова и др., 1998а, б). Это позволяет заключить, что обе активности ПАБК, антиоксидантная и ИФН-индуцирующая, в механизме ее защитного и лечебного действия при облучении у млекопитающих могут быть задействованы одновременно.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 96-04-50696).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Акберова С.И., Мусаев П.И., Магомедов Н.М., Бабаев Х.Ф., Гахраманов Х.М., Строева О.Г. Парааминобензойная кислота как антиоксидант // Докл. РАН. 1998а. Т. 361. № 3. С. 419–421.
- Акберова С.И., Мусаев-Галбинур П.И., Магомедов Н.М., Бабаев Х.Ф., Гахраманов Х.М., Строева О.Г. Сравнительная оценка антиоксидантной активности парааминобензойной кислоты и эмоксилина в сетчатке // Вестник офтальмологии. 1998б. Т. 114. № 6. С. 39–44.
- Акберова С.И., Тузулахова Э.Б., Мусаев-Галбинур П.И., Леонтьева Н.А., Строева О.Г. Парааминобензойная кислота – индуктор интерферона // Антибиотики и химиотерапия. 1999 (в печати).
- Вартанян Л.П., Пустовалов Ю.И., Горнаева Г.Ф. О теоретических основах химической радиозащиты // Материалы Всероссийской конференции “Проблемы противолучевой защиты”. 1998. С. 5–6.
- Васильева С.В. ПАБК – важнейший элемент системы обеспечения генетической стабильности // Химические мутагены и парааминобензойная кислота в повышении урожайности сельскохозяйственных растений. М.: Наука, 1989. С. 230–240.
- Васильева И.М., Синельщикова Т.А., Шония Н.Н., Засухина Г.Д. Способность интерферона (лейкоцитарного и рекомбинантного (2) защищать ДНК и стимулировать процессы репарации в клетках человека // Докл. АН СССР. 1986. Т. 287. № 4. С. 995–997.
- Панова И.Г., Мельникова И.И., Строева О.Г. Лечебное действие парааминобензойной кислоты после рентгеновского облучения при разных способах введения в организм (исследование роговицы крысы) // Докл. РАН. 1997. Т. 356. № 3. С. 415–417.
- Строева О.Г., Панова И.Г., Мельникова И.И. Исследование защитных свойств парааминобензойной кислоты на роговице взрослых крыс при рентгеновском облучении // Докл. РАН. 1997. Т. 355. № 4. С. 564–566.

Regulation of Mitotic Activity in the Rat Cornea upon Protective and Therapeutic Action of *p*-Aminobenzoic Acid in Experiments with X-Irradiation

O. G. Stroeва and I. G. Panova

Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 117808 Russia

The protective and therapeutic action of *p*-aminobenzoic acid (PABA), at doses effective in interferon induction (Akberova *et al.*, 1999), was studied on the rat cornea in the experiments with X-irradiation (5 Gy). PABA at 10 mg/kg preserved the postradiation mitotic activity at the level of irradiated control, while at 1.4 and 100 mg/kg it increased the mitotic activity above the control level. In all experiments, PABA at all three doses decreased the rate of pathological mitoses in equal proportions to the total number of mitoses.