

Для цитирования: Плотников Е.В., Белоусов М.В., Бразовский К.С., Ларькина М.С., Артамонов А.А., Стучебров С.Г., Чернов В.И. Экспериментальное исследование радиопротекторных свойств пирувата лития *in vitro*. Сибирский онкологический журнал. 2024; 23(4): 66–76. – doi: 10.21294/1814-4861-2024-23-4-66-76
For citation: Plotnikov E.V., Belousov M.V., Brazovsky K.S., Larkina M.S., Artamonov A.A., Stuchebrov S.G., Chernov V.I. Experimental study of radioprotective properties of lithium pyruvate *in vitro*. Siberian Journal of Oncology. 2024; 23(4): 66–76. – doi: 10.21294/1814-4861-2024-23-4-66-76

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАДИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ПИРУВАТА ЛИТИЯ *IN VITRO*

Е.В. Плотников^{1,2,3}, М.В. Белоусов^{1,2}, К.С. Бразовский¹, М.С. Ларькина^{1,2},
А.А. Артамонов⁴, С.Г. Стучебров¹, В.И. Чернов^{1,5}

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

³Научно-исследовательский институт психического здоровья, Томский национальный
исследовательский медицинский центр Российской академии наук
Россия, 634021, г. Томск, ул. Алеутская, 4

⁴Институт медико-биологических проблем РАН
Россия, 123007, г. Москва, Хорошевское ш., 76А

⁵Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный
исследовательский медицинский центр Российской академии наук
Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

Аннотация

Радиотоксичность является серьезной проблемой для пациентов, проходящих лучевую терапию, поэтому поиск новых препаратов-радиопротекторов для ослабления ее последствий крайне актуален. Радиопротекторы должны обладать рядом свойств, в том числе прямым антиоксидантным действием, снижать окислительный стресс, индуцировать репарацию ДНК или ингибировать апоптоз и при этом не вызывать собственных побочных эффектов. По совокупности свойств перспективными выглядят антиоксиданты на основе солей лития. **Целью исследования** явилось изучение радиопротекторных свойств пирувата лития *in vitro*. **Материал и методы.** В качестве биомоделей для оценки воздействия рентгеновского излучения использовали относительно радиочувствительные мононуклеарные клетки крови и относительно радиоустойчивые фибробласты линии 3Т3L1. Клетки инкубировали и облучали в 96-луночных планшетах. Пируват лития применяли в финальной концентрации 1,2 мМ. Облучение проводили с интенсивностью 15 мГр/с в диапазоне поглощенных доз 0–5 Гр на рентгеновской установке (анодное напряжение 160 кВ, средний ток 3,5 мА). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста и резазуринового теста. Оценку вариантов клеточной гибели и уровень окислительного стресса определяли цитофлуориметрическим методом. **Результаты.** Установлено цитопротекторное действие пирувата лития, проявляющееся в повышении выживаемости клеток и снижении уровня окислительного стресса после облучения в широком диапазоне поглощенных доз. Относительно большая эффективность показана в отношении мононуклеарных клеток крови с повышением жизнеспособной фракции клеток на 5–7 % и снижением уровня окислительного стресса при облучении в диапазоне 1,0–3,0 Гр. Установлено, что апоптоз является основным механизмом гибели клеток после облучения. Пируват лития снижает уровень индукции апоптоза в популяции клеток при облучении и при химически индуцированном окислительном стрессе. **Заключение.** Показано радиопротекторное действие пирувата лития при рентгеновском облучении *in vitro*. Выявлено снижение окислительного стресса при действии пирувата лития, что создает патогенетическую основу для потенциального применения данного соединения в качестве радиопротектора, что требует дальнейших исследований на моделях *in vivo*.

Ключевые слова: пируват лития, радиопротекция, фибробласты линии 3Т3L1, мононуклеарные клетки крови, рентгеновское излучение, окислительный стресс, апоптоз.

EXPERIMENTAL STUDY OF RADIOPROTECTIVE PROPERTIES OF LITHIUM PYRUVATE *IN VITRO*

E.V. Plotnikov^{1,2,3}, M.V. Belousov^{1,2}, K.S. Brazovsky¹, M.S. Larkina^{1,2},
A.A. Artamonov⁴, S.G. Stuchebrov¹, V.I. Chernov^{1,5}

¹National Research Tomsk Polytechnic University

30, Lenin Ave., Tomsk, 634050, Russia

²Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia

2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634050, Russia

³Mental Health Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center
of the Russian Academy of Sciences

4, Aleutskaya St., Tomsk, 634021, Russia

⁴Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences

76A, Khoroshevskoe sh., Moscow, 123007, Russia

⁵Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences

5, Kooperativny St., Tomsk, 634009, Russia

Abstract

Radiotoxicity is a serious problem for patients undergoing radiotherapy, so the search for new radioprotective drugs to mitigate its effects is highly relevant. Radioprotectors should have a number of properties, including direct antioxidant action, reduction of oxidative stress, ability to induce DNA repair or inhibit apoptosis, and at the same time not cause their own side effects. Antioxidants based on lithium salts look promising in terms of their properties. **The aim of study** was to study the radioprotective properties of lithium pyruvate *in vitro*. **Material and Methods.** Relatively radiosensitive blood mononuclear cells and relatively radioresistant fibroblasts of 3T3L1 line were used as biomodels for X-ray exposure. Cells were incubated and irradiated in 96-well plates. Lithium pyruvate was used at a final concentration of 1.2 mM. Cells were irradiated at a dose rate of 15 mGy/s in the absorbed-dose range from 0 to 5 Gy using an X-ray unit (anode voltage: 160 kV, average current: 3.5 mA). Cell viability was assessed by MTT test and resazurin test. The evaluation of cell death variants and the level of oxidative stress were determined by cytofluorimetric method. **Results.** The cytoprotective effect of lithium pyruvate was established. Cytoprotection was manifested in the increased cell survival and decreased oxidative stress level under lithium pyruvate after X-ray in a wide range of absorbed doses. Relatively high efficiency was shown in relation to blood mononuclear cells with an increase in the viable fraction by 5–7 % and a decrease in oxidative stress level during irradiation in the range of 1.0–3.0 Gy. Apoptosis was found to be the main mechanism of cell death after irradiation. Lithium pyruvate reduced the level of apoptosis in cell population under irradiation and chemically induced oxidative stress. **Conclusion.** Radioprotective effect of lithium pyruvate under X-ray irradiation *in vitro* has been shown. Reduction of oxidative stress under the action of pyruvate provides a pathogenetic basis for the potential use of this compound as a radioprotector, which requires further studies on *in vivo* models.

Key words: lithium pyruvate, radioprotection, fibroblast line 3T3L1, blood mononuclear cells, X-ray radiation, oxidative stress, apoptosis.

Введение

Лучевая терапия является одним из наиболее распространенных методов лечения злокачественных новообразований, до 50 % больных на определенном этапе подвергаются лучевой терапии в терапевтических или в паллиативных целях [1]. Для достижения оптимальных результатов необходимо обеспечить разумное равновесие между суммарной лучевой нагрузкой на опухоль и пороговым значением для прилегающих здоровых тканей. Очевидно, что ионизирующее излучение повреждает как нормальные, так и раковые клетки. Отметим, что эффективность лучевой терапии основана на биологическом принципе, согласно которому здоровые клетки обладают большей способностью восстанавливаться и возвращаться

к нормальному функциональному состоянию по сравнению с клетками злокачественных опухолей, где репарация и метаболизм в целом проходят неоптимальным путем. Раковые клетки в целом менее эффективно восстанавливают повреждения, вызванные лучевой терапией, что приводит к их преимущественному уничтожению [2]. Для повышения эффективности терапии за счет увеличения дозы необходимо защитить нормальные ткани от радиационного воздействия [3].

С этой целью применяется большое количество физических подходов, включая улучшение оборудования для радиотерапии и проведение рационального фракционирования и зонирования облучения. Перспективным механизмом снижения радиотоксичности нормальных тканей является

использование радиопротекторов – специальных соединений, которые защищают неопухолевые клетки от воздействия радиации [4]. Идеальный радиопротектор должен обладать рядом свойств, включая защиту нормальных тканей без значимого воздействия на опухолевую ткань, оптимальной фармакокинетикой и минимальной токсичностью [5]. Как правило, радиопротекторы являются сульфгидрильными соединениями и антиоксидантами, которые действуют путем нейтрализации свободных радикалов, защищая клетки от повреждений, вызванных облучением [6]. Однако для большинства исследованных соединений не удалось показать заметного эффекта в клинической практике. Несмотря на значительную работу в этой области за последние десятилетия, лишь несколько радиопротекторных средств одобрены для клинического применения, причем их широкое применение ограничено существенными побочными эффектами. Например, палифермин и амифостин, одобренные FDA для применения в онкологии [7, 8], имеют широкий список эффектов, осложняющих их применение, включая тошноту и аллергические реакции. Отмечается низкая селективность амифостина, а его способность защищать от облучения и опухолевые ткани требует дальнейшей верификации и изучения [9]. Продолжается поиск новых соединений, в том числе природных веществ, которые демонстрируют радиопротекторную активность [10]. С целью радиопротекции применяются различные витамины-антиоксиданты, в первую очередь жирорастворимые [11].

В данном контексте весьма перспективными соединениями выглядят соли лития с антиоксидантной активностью на основе естественных внутриклеточных метаболитов, в частности пирувата. Пируват обладает антиоксидантными свойствами и проявляет цитопротекторную и антиапоптотическую активность [12–14]. Литий, в свою очередь, широко применяется в медицине в качестве психотропного препарата, с хорошо изученным терапевтическим (нормотимическим) действием и в некоторых случаях проявляющий цитопротекторную активность при окислительном стрессе [15–17]. К настоящему времени накоплено много данных, подтверждающих широкий спектр биологических эффектов лития, включая нейро-, кардио- и нефропротекторные свойства, регуляцию воспаления и иммунитета [18–23]. Выявлено стимулирующее действие лития на гемопоэз, что имеет важное значение при восстановлении нормального функционирования организма после лучевого воздействия, в т.ч. лучевой терапии в онкологической практике [22]. В целом, лучевая терапия создает заметную токсическую нагрузку на организм вследствие массивной гибели клеток не только в опухоли, но и в сопредельных здоровых тканях. Совокупность описанных свойств исходных компонентов позволяет сделать предпо-

ложение о наличии радиопротекторных свойств у синтезированной соли пирувата лития.

Биологические эффекты ионизирующего излучения связаны с окислительным стрессом, вызванным радиолизом воды и образованием активных форм кислорода, что приводит к повреждению макромолекул, в первую очередь ДНК [24]. Радиационно-индуцированные повреждения ДНК включают однонитевые и двунитевые разрывы, повреждения нуклеотидных оснований, гликозильные повреждения и сшивки ДНК [25]. Наиболее фатальными повреждениями являются двойные разрывы ДНК. В целом повреждение ДНК активирует ряд клеточных регуляторных путей и межклеточных сигналов, которые определяют дальнейшую судьбу клеток, включая активацию репарации ДНК, остановку клеточного цикла или апоптоз. В случае выживания клетки может оставаться серьезное бремя накопленных радиационных повреждений, приводящих к хромосомным aberrациям и нестабильности генома [26]. Интенсивное радиационное и последующее окислительное повреждение нормальных клеток за короткий период приводит к перегрузке систем репарации и индукции апоптоза. Комплексное антиоксидантное и цитопротекторное действие пирувата лития потенциально может обеспечить радиопротекторное действие при ионизирующем излучении.

Целью исследования стало изучение радиопротекторных свойств пирувата лития *in vitro*.

Материал и методы

Пируват лития (рис. 1) получали *ex tempore* в реакции стехиометрического количества карбоната лития (Sigma-Aldrich, Германия) и пировиноградной кислоты (Sigma-Aldrich, Германия) 1:2 в бидистиллированной воде при умеренном нагревании до 40 °С. Для выделения продуктов реакции в кристаллическом состоянии использовали метод выделения из водного раствора протолитическими растворителями (этанолом). После перекристаллизации субстраты промывали, сушили, подтверждали состав соединений (элементный анализ, ИК-спектроскопия) и использовали для экспериментов.

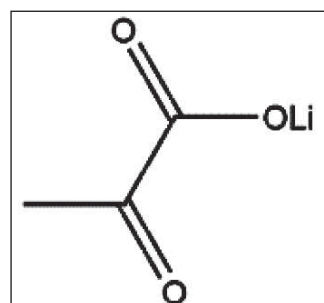


Рис. 1. Структурная формула пирувата лития.

Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 1. Structural formula of lithium pyruvate.

Note: created by the authors

Раствор гидропероксида трет-бутила 70 мас. % в H_2O (Sigma-Aldrich, Германия) использовали в качестве индуктора окисления для модуляции окислительного стресса. МТТ реагент – Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (НПП «ПанЭко», РФ) использовался для определения метаболической активности и жизнеспособности адгезивных клеточных культур. Натриевая соль резазурина (Sigma-Aldrich, Германия) использовалась для стандартного резазуринового теста в виде водного раствора.

Для экспериментов использовались мононуклеарные клетки периферической крови человека и эмбриональные мышечные фибробласты стандартизированной линии 3T3L1 (ATCC CL-173). Мононуклеарные клетки получены из крови центрифугированием на градиенте фикола плотностью $\rho=1,077 \text{ г/см}^3$ (Sigma-Aldrich, USA). Выделенные клетки отмывали, ресуспендировали в среде RPMI 1640 и использовали в экспериментах. Мононуклеарные клетки периферической крови и фибробласты линии 3T3L1 культивировали в питательной среде RPMI-1640 (ПанЭко, РФ). Питательные среды обогащались добавками GlutaMAX (Gibco, США), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (One Shot™, Thermo Fisher Scientific, Бразилия) и антибиотиками (смесь пенициллина и стрептомицина ПанЭко, Россия). Для проведения экспериментов фибробласты предварительно засевали в лунки 96-луночного планшета в концентрации 3 тыс. клеток/лунка в 100 мкл и инкубировали 24 ч при 37 °C, 5 % CO_2 , далее использовали в эксперименте. Мононуклеарные клетки засевали непосредственно перед экспериментом в 96-луночный планшет в концентрации 30 тыс. клеток/лунку в 100 мкл. В лунки с клетками вносили пируват лития (из 48 мМ рабочего раствора) для получения диапазона рабочих концентраций 0,6–1,2 мМ в 12 повторях. В контрольные лунки вносили соответствующий объем физраствора. После внесения тестируемого соединения клетки инкубировали в течение 60 мин в обычных условиях (5 % CO_2 , 37 °C, 100 % влажность), после чего проводили облучение с интенсивностью 15 мГр/с с дистанции 30 см в диапазоне поглощенных доз 0,5–5,0 Гр на рентгеновской установке со следующими параметрами: анодное напряжение – 160 кВ, средний ток – 3,5 мА. Контрольный планшет с клетками подвергался аналогичным манипуляциям, но без облучения.

Для химической индукции окислительного стресса использовали гидроперекись трет-бутила (ГПТБ) в виде 70 % водного раствора (Sigma-Aldrich, Германия). Клетки готовили аналогично вышеописанному способу в 96-луночном планшете. Вносили пируват лития в концентрации 1,2 мМ, инкубировали в течение 60 мин. Далее вносили ГПТБ для достижения финальной концентрации 40 мкМ/л. После этого клетки инкубировали в стандартных условиях 37 °C в 5 % CO_2 . Оценку

уровня ГПТБ-индуцированного окислительного стресса проводили на трех временных точках (24, 48 и 72 ч).

Оценку жизнеспособности суспензионных клеток проводили через 72 ч после рентгеновского облучения с помощью стандартного резазуринового теста. Для этого использовали 96-луночные планшеты с клетками. В лунки с клетками добавляли раствор резазурина, получая 0,02 мг/мл. Образцы встряхивали на шейкере в течение 2 мин. Далее планшеты культивировали в течение 4 ч (5 % CO_2 , 37 °C) и измеряли оптическую плотность образцов при 570 нм на спектрофотометре Multiscan FS (ThermoFisher). Жизнеспособность клеток рассчитывали как процентное отношение значения оптической плотности образца к оптической плотности необлученного контроля без воздействия соединения (с вычетом значений пустых лунок).

Жизнеспособность адгезивных культур изучали с помощью МТТ-теста через 72 ч после облучения. В каждую лунку 96-луночного планшета добавляли раствор МТТ 0,45 мг/мл, инкубировали при температуре 37 °C в атмосфере 5 % CO_2 в течение 4 ч до образования кристаллов формазана. После чего среду аспирировали и лунки наполняли 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) для растворения формазана. В течение 2 мин планшеты перемешивали на шейкере и измеряли оптическую плотность образцов при 570 нм на спектрофотометре Multiscan FS (ThermoFisher). Полученные значения оптической плотности в нескольких повторях усредняли и рассчитывали жизнеспособность в процентах от контроля без воздействия.

Облученные клетки после 72-часовой инкубации в 5 % CO_2 при 37 °C собирали из планшета, центрифугировали 5 мин при 200 g, промывали в фосфатном буфере и ресуспендировали в буфере для флуоресцентного окрашивания из набора детекции апоптоза Annexin V-FITC (Abcam, #14085), содержащем смесь Annexin V-FITC и йодистого пропидия. Далее клетки инкубировали 15 мин при комнатной температуре в темном месте и проводили цитофлуориметрическое исследование. Результаты обрабатывали и подсчитывали жизнеспособность и варианты апоптоза с помощью программного обеспечения цитофлуориметра CytoFlex (Beckman Coulter, США). Стратегия гейтирования включала разделение популяции на четыре группы: живые клетки (неокрашенные), ранние апоптотические клетки (окрашенные только Annexin V-FITC), поздние апоптотические клетки (окрашенные обоими красителями) и некротические клетки (окрашенные йодистым пропидием).

Подготовка клеток к оценке уровня окислительного стресса после облучения выполнена аналогично тесту оценки вариантов клеточной гибели. Клетки собирали, отмывали и ресуспендировали в соответствующем буфере из тестового набора детекции окислительного стресса Cellular ROS

Assay Kit (Abcam, #186029). После этого клетки окрашивали, инкубировали 30 мин в инкубаторе при 37 °C и проводили цитофлуориметрическое измерение параметров. Концентрацию активных форм кислорода в клетках оценивали с помощью программного обеспечения цитофлуориметра CytoFlex (Beckman Coulter, США).

Результаты статистически обрабатывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, CA, USA). Данные показаны в виде «среднее значение $\pm$ стандартное отклонение». Различия между группами выявляли с помощью дисперсионного анализ (ANOVA). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Оценка выживаемости фибробластов через 72 ч после лучевого воздействия и сочетанного применения пирувата лития показана на рис. 2. Выявлен относительно высокий уровень радиорезистентности данных клеток, заметное снижение жизнеспособности показано только в поглощенной дозе 3 Гр и выше.

Относительно большей радиочувствительностью обладают нормальные мононуклеарные клетки периферической крови человека (рис. 3). Через 72 ч после воздействия показано достоверное снижение жизнеспособных клеток, облученных в дозе 1,0 Гр и выше, при этом отмечено защитное действие пирувата лития.

Распределение вариантов клеточной смерти после воздействия ионизирующего излучения и радиопротектора показано на рис. 4. Отмечено увеличение доли апоптотических клеток при повышении поглощенной дозы, при этом наблюдаются снижение фракции апоптоза и увеличение фракции живых клеток при использовании пирувата лития в концентрации 1,2 мМ.

Уровень радиационно-индуцированного окислительного стресса в популяции (фракция АФК-позитивных клеток) через 72 ч после воздействия ионизирующего излучения и защитное действие пирувата лития представлены на рис. 5. Отмечается нарастание уровня окислительного стресса при повышении поглощенной дозы до 3 Гр.

Защитное действие пирувата лития на клетки крови при химически-индуцированном окислительном стрессе (40 мкМ гидроперекиси трет-бутила) показано на рис. 6. Отмечено выраженное повышение жизнеспособности клеток на всех временных точках при сочетанном использовании пирувата лития с индуктором окислительного стресса.

Обсуждение

Рентгеновское излучение достаточно широко используется в радиотерапии. Воздействие ионизирующего излучения на биологические ткани характеризуется интенсивностью процесса

ионизации среды и как следствие повреждением биологических макромолекул, приводящим к летальным нарушениям в клетках-мишенях [27]. Защита нормальных клеток является крайне важной в рамках лучевой терапии и требует создания новых радиопротекторов, поэтому в данной работе изучили потенциальное цитопротекторное действие пирувата лития при действии рентгеновского излучения на клеточные культуры крови (мононуклеары) и соединительной ткани (фибробласты) с различной радиоустойчивостью. В эксперименте клетки соединительной ткани проявили относительно высокую устойчивость к действию облучения (рис. 2). Несмотря на то, что использовалась активно пролиферирующая линия эмбриональных фибробластов, статистически значимое снижение жизнеспособности отмечено только при облучении в поглощенной дозе выше 3 Гр. Воздействие рентгеновского излучения в дозе 0,5–1,5 Гр не приводит к достоверным изменениям в популяции. При этом воздействие пирувата лития приводит к достоверному повышению жизнеспособности по сравнению с облученной контрольной группой только в дозах 3 и 5 Гр (рис. 2). Отмечается дозозависимость этого феномена с более выраженным эффектом при концентрации пирувата 1,2 мМ, тогда как при 0,6 мМ значимых отличий не выявлено. Аналогичное лучевое воздействие на мононуклеарные клетки крови выявило большую радиочувствительность клеток, отмечено снижение жизнеспособности до 76 ± 3 % уже при поглощенной дозе в 1,5 Гр и до 23 ± 4 % при 5,0 Гр. Пируват лития показал

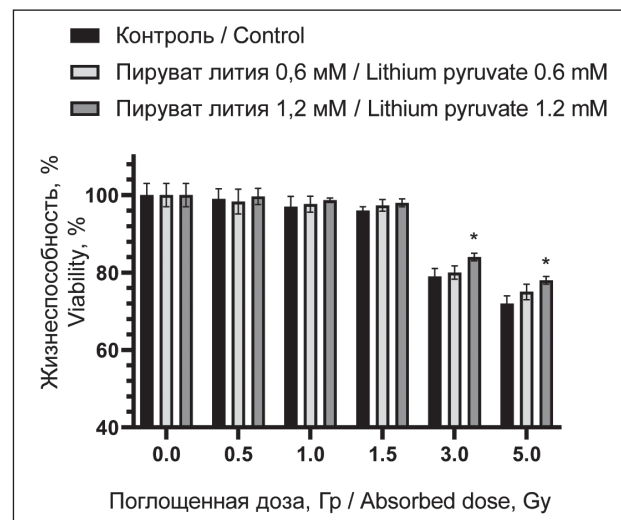


Рис. 2. Жизнеспособность нормальных эмбриональных фибробластов мыши линии 3T3L1 при рентгеновском облучении (0–5 Гр) и воздействии пирувата лития в концентрации 0,6 и 1,2 мМ. Примечания: * – различия значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$); диаграмма выполнена авторами

Fig. 2. Viability of normal mice embryonic fibroblasts 3T3L1 line under X-ray irradiation (0–5 Gy) and lithium pyruvate exposure at 0.6 and 1.2 mM.

Notes: * – significant differences vs control ($p < 0.05$); created by the authors

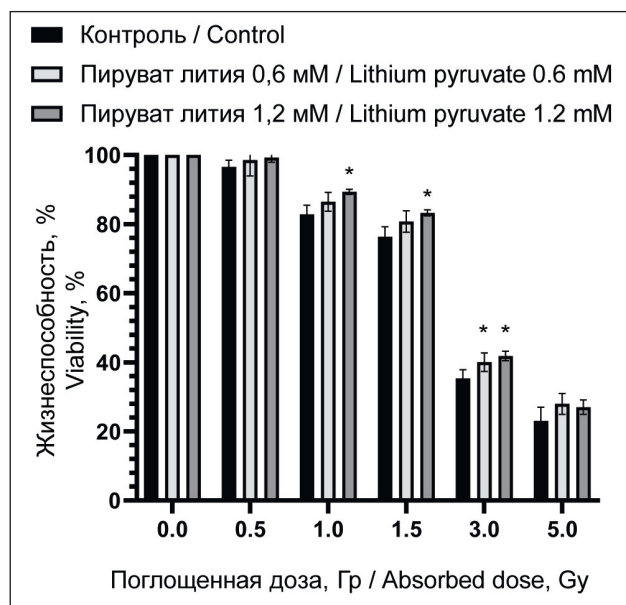


Рис. 3. Жизнеспособность мононуклеарных клеток периферической крови человека при рентгеновском облучении и воздействии пирувата лития в концентрации 0,6 и 1,2 мМ. Примечания: * – различия значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$); диаграмма выполнена авторами
Fig. 3. Viability of human peripheral blood mononuclear cells under X-ray irradiation and lithium pyruvate exposure at 0.6 and 1.2 mM.

Notes: * – significant differences vs control ($p < 0.05$); created by the authors

радиопротекторное действие в отношении мононуклеаров, что проявилось в повышении жизнеспособной фракции клеток в популяции на 5–7 % при облучении в диапазоне 1–3 Гр по сравнению с облученной контрольной группой без воздействия препарата (рис. 3). При этом в больших дозах облучения не выявлено статистически значимого отличия от контрольной группы. Важно отметить, что терапевтическая эффективность лучевой терапии, помимо физических факторов (поглощенная доза, тип излучения, фракционирование и т.п.), зависит от биологических факторов, в первую очередь радиоустойчивости здоровых тканей и радиочувствительности опухолей [1]. Это требует поиска оптимального баланса между максимизацией дозы облучения для уничтожения раковых клеток и минимизацией дозы облучения здоровых клеток. Обычно нормальные клетки более устойчивы к действию облучения, чем активно делящиеся клетки опухоли. Радиочувствительность клеточной популяции определяется рядом параметров, в первую очередь уровнем репарации (способность восстанавливать повреждения ДНК, вызванные облучением), скоростью репопуляции (степень пролиферации клеток в основных субпопуляциях), перераспределением клеток по фазам клеточного цикла (наименее устойчивые к облучению клетки в митозе, в то время как клетки S-фазы более устойчивы), оксигенацией (чувствительность клеток к облучению повышается в оксигенированной

среде) и индивидуальной радиочувствительностью ввиду определенных генетических свойств и мутаций [28, 29]. В этом контексте важно провести оценку основных механизмов клеточной гибели. На примере мононуклеарных клеток крови установлено распределение вариантов гибели клеток при различных поглощенных дозах в сочетании с пируватом лития (рис. 4). Выявлено значительное снижение доли клеток в апоптозе при воздействии пирувата лития, причем наблюдается уменьшение этой фракции во всем диапазоне поглощенных доз по сравнению с контролем. Наблюдается резкое нарастание уровня общей фракции апоптоза на 2–3-и сут после облучения до 29, 63 и 71 % для поглощенных доз 1,5, 3,0 и 5,0 Гр соответственно. При сочетанном применении пирувата лития уровень апоптотических клеток был меньше на 4–8 % для аналогичного диапазона поглощенных доз. Активация апоптоза при облучении напрямую связана с окислительным повреждением ДНК как основной биологической мишенью ввиду критических последствий для клетки, причем одноцепочечные и двухцепочечные разрывы влияют на жизнеспособность клеток по-разному [30]. При значительном накоплении двухцепочечных разрывов не могут быть восстановлены, и это приводит к гибели клеток. Одноцепочечные разрывы могут быть восстановлены клетками при наличии второй нетронутой нити ДНК. Активная репарация ДНК позволяет клетке нивелировать полученные радиационные повреждения, не уходя в апоптоз. Превышение репарационных возможностей клетки, как правило, запускает механизм апоптоза. Выраженный окислительный стресс вследствие интенсивного облучения может приводить к первичной некротической гибели клетки. В данном эксперименте уровень некротической гибели клеток не превышал 9 % даже в максимальных поглощенных дозах, а основным выявленным путем гибели клеток являлся апоптоз. На основании полученных данных предложена концепция радиопротекторного действия пирувата лития, в основе которой лежит цитопротекторное действие пирувата при окислительном стрессе. Снижение уровня продукции АФК при действии пирувата может обеспечивать снижение критических повреждений и дополнительное время для репарации повреждений в клетке без запуска апоптоза, что подтверждается снижением уровня апоптоза и повышением доли жизнеспособных клеток в облученной популяции при действии пирувата лития в концентрации 1,2 мМ (рис. 4). Для подтверждения механизма действия через снижение продукции АФК была выполнена серия тестов по оценке уровня окислительного стресса в клеточной популяции после облучения и применения ГПТБ (химического индуктора окислительного стресса). Экспериментально показано резкое нарастание АФК-позитивных клеток (повышенная продук-

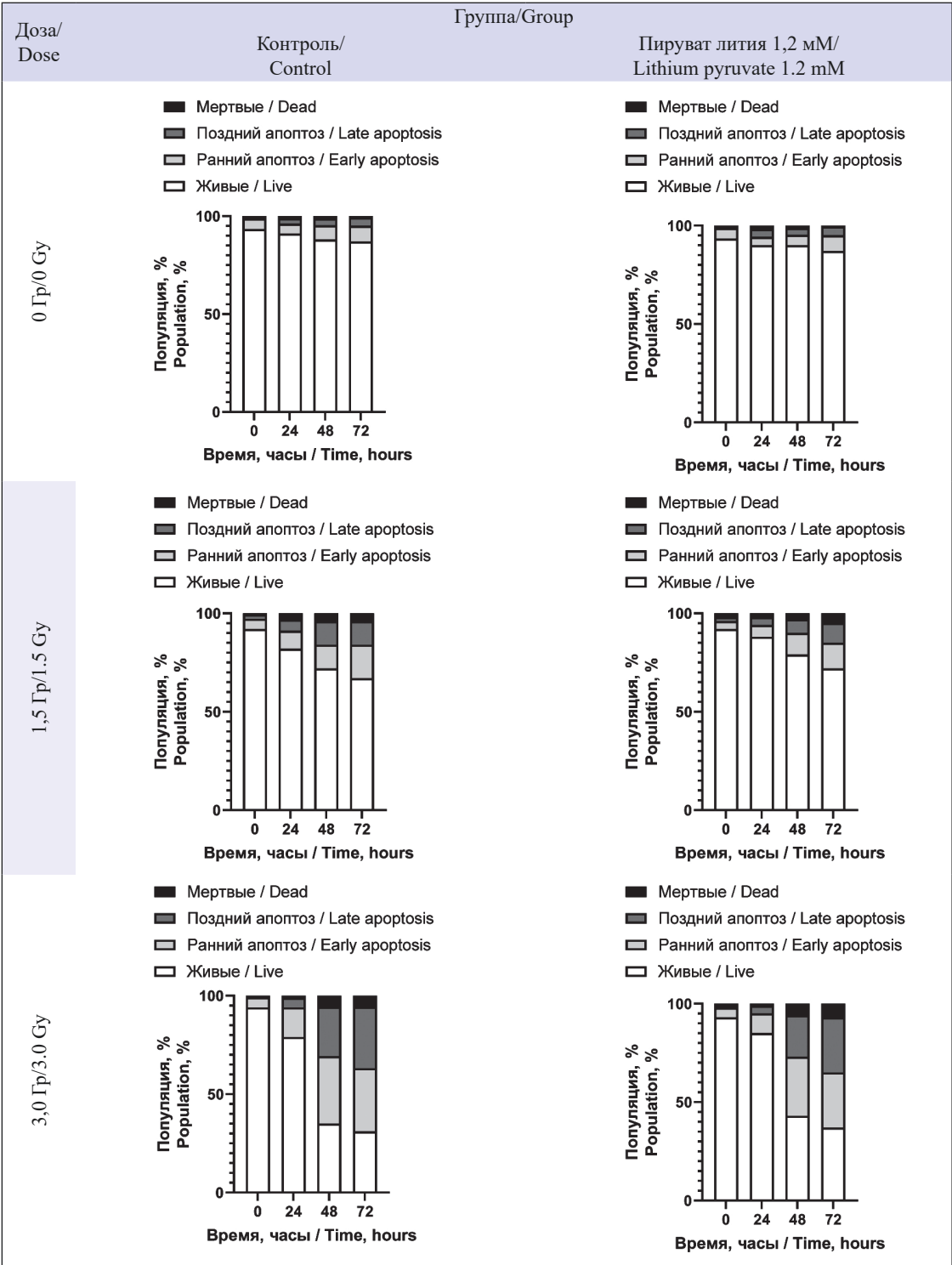


Рис. 4. Распределение вариантов клеточной гибели мононуклеарных клеток периферической крови через 72 ч после рентгеновского облучения 0–3 Гр и воздействия пирувата лития 1,2 мМ. Примечание: диаграммы выполнены авторами
Fig. 4. Distribution of cell death variants of peripheral blood mononuclear cells 72 hours after exposure 0–3 Gy X-ray irradiation and 1.2 mM lithium pyruvate. Note: created by the authors

ция активных форм кислорода), т. е. нарастание окислительного стресса при повышении дозы облучения (рис. 5). Предварительная инкубация клеток с пируватом лития (1,2 мМ) снижает уровень окислительного стресса, но уже при концентрации пирувата лития менее 0,6 мМ можно отметить только некоторый тренд на снижение окисли-

тельного стресса в популяции, без достоверных отличий (рис. 5). Наиболее выраженное цитопротекторное действие пирувата лития установлено при химически-индуцированном окислительном стрессе (рис. 6). Воздействие ГПТВ в концентрации 40 мкМ приводило к гибели до 80 % клеток в 1-е сут. Действие пирувата лития (1,2 мМ) в первые

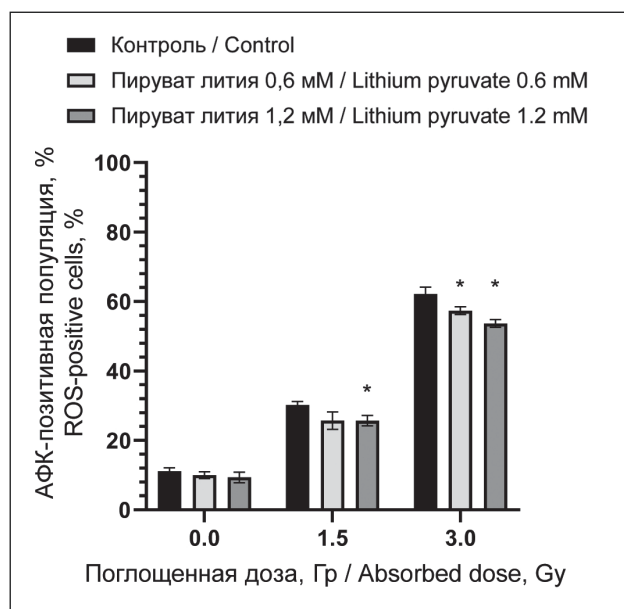


Рис. 5. Окислительный стресс (уровень АФК-позитивных клеток) в популяции мононуклеарных клеток периферической крови через 72 ч после рентгеновского облучения и воздействия пирувата лития. Примечания: * – различия значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0.05$); диаграмма выполнена авторами

Fig. 5. Oxidative stress (level of ROS-positive cells) in the population of peripheral blood mononuclear cells 72 hours after X-ray irradiation and lithium pyruvate exposure. Notes: * – significant differences vs control ($p < 0.05$); created by the authors

24 ч повышало выживаемость клеток более чем вдвое. Аналогичное достоверное снижение уровня окислительного стресса в клетках наблюдалась на всех временных точках во всем диапазоне концентраций пирувата лития (рис. 6). Таким образом, максимально эффективная реализация действия цитопротектора может достигаться снижением уровня окислительного стресса (антиоксидантное действие и прямое снижение повреждений), ингибированием апоптоза клеток (и потенциально увеличением времени репарации до критического момента инициации гибели клетки). Эти процессы являются ключевыми в защите клеток при лучевом воздействии. Полученные результаты выявили, что использование пирувата лития приводит к

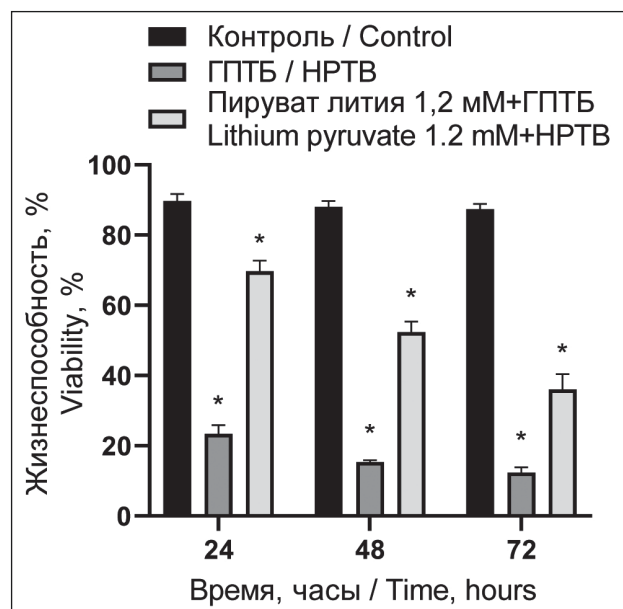


Рис. 6. Цитопротекторное действие пирувата лития в отношении мононуклеарных клеток при индуцированном окислительном стрессе (40 мкМ ГПТБ-гидроперекись трет-бутила). Примечания: * – различия значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0.05$); диаграмма выполнена авторами

Fig. 6. Cytoprotective effect of lithium pyruvate for mononuclear cells against induced oxidative stress (40 μ M HPTB-tret-butyl hydroperoxide).

Notes: * – significant differences vs control ($p < 0.05$); created by the authors

снижению уровня апоптоза в популяции и повышению жизнеспособности клеток. Очевидно, что результаты *in vitro* не отражают всего многообразия биологических процессов в живом организме при облучении, поэтому дальнейшее изучение радиопротекторных свойств и механизмов предполагает использование биомоделей *in vivo*.

Заключение

Полученные результаты выявили защитное действие пирувата лития при рентгеновском облучении нормальных клеточных культур, что создает патогенетическую основу для потенциального применения данного соединения в качестве радиопротектора.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Baskar R., Lee K.A., Yeo R., Yeoh K.W. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci.* 2012; 9(3): 193–9. doi: 10.7150/ijms.3635.
2. Begg A.C., Stewart F.A., Vens C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11(4): 239–53. doi: 10.1038/nrc3007.
3. Kamran M.Z., Ranjan A., Kaur N., Sur S., Tandon V. Radioprotective Agents: Strategies and Translational Advances. *Med Res Rev.* 2016; 36(3): 461–93. doi: 10.1002/med.21386.
4. Obrador E., Salvador R., Villaescusa J.I., Soriano J.M., Estrela J.M., Montoro A. Radioprotection and Radiomitigation: From the Bench to Clinical Practice. *Biomedicines.* 2020; 8(11): 461. doi: 10.3390/biomedicines8110461.
5. Mishra K., Alsbeih G. Appraisal of biochemical classes of radioprotectors: evidence, current status and guidelines for future development. *3 Biotech.* 2017; 7(5): 292. doi: 10.1007/s13205-017-0925-0.
6. Szejka M., Kołodziejczyk-Czepas J., Żbikowska H.M. Radioprotectors in radiotherapy – advances in the potential application of phytochemicals. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2016; 70(0): 722–34. doi: 10.5604/17322693.1208039.
7. Singh V.K., Seed T.M. The efficacy and safety of amifostine for the acute radiation syndrome. *Expert Opin Drug Saf.* 2019; 18(11): 1077–90. doi: 10.1080/14740338.2019.1666104.
8. Zivkovic Radojevic M., Milosavljevic N., Miladinovic T.B., Janković S., Folc M. Review of compounds that exhibit radioprotective and/or mitigatory effects after application of diagnostic or therapeutic ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 2023; 99(4): 594–603. doi: 10.1080/09553002.2022.2110308.
9. Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Zois C.E., Kalamida D., Pouliliou S., Karagounis I.V., Yeh T.L., Abboud M.I., Claridge T.D., Schofield C.J., Sivridis E., Simopoulos C., Tokmakidis S.P., Harris A.L. Normal tissue radioprotection by amifostine via Warburg-type effects. *Sci Rep.* 2016; 6: 30986. doi: 10.1038/srep30986.
10. Citrin D., Cotrim A.P., Hyodo F., Baum B.J., Krishna M.C., Mitchell J.B. Radioprotectors and mitigators of radiation-induced normal tissue injury. *Oncologist.* 2010; 15(4): 360–71. doi: 10.1634/theoncologist.2009-S104.

11. Lledó I., Ibáñez B., Melero A., Montoro A., Merino-Torres J.F., San Onofre N., Soriano J.M. Vitamins and Radioprotective Effect: A Review. *Antioxidants* (Basel). 2023; 12(3): 611. doi: 10.3390/antiox12030611.

12. Епимахова Е.В., Лосенков И.С., Рощина О.В., Плотников Е.В. Оценка цитопротекторного и антиоксидантного действия пирувата лития на мононуклеары периферической крови больных алкоголизмом. *Вопросы наркологии*. 2018; 12(171): 36–47. [Epimakhova E.V., Losenkov I.S., Roshchina O.V., Plotnikov E.V. Evaluation of the cytoprotective and antioxidant effects of lithium pyruvate on peripheral blood mononuclear cells of alcoholism patients. *Voprosy Narcologii*. 2018; 12(171): 36–47. (in Russian)].

13. Epimakhova E.V., Plotnikov E.V., Boiko A., Losenkov I. Influence of lithium pyruvate on expression of AKT/mTOR-signaling pathway proteins in mononuclear cells of patients with bipolar disorder. *Eur Neuropsychopharmacology*. 2020; 40(5): 200–201. doi: 10.1016/j.euroneuro.2020.09.262.

14. Plotnikov E., Losenkov I., Epimakhova E., Bohan N. Protective Effects of Pyruvic Acid Salt Against Lithium Toxicity and Oxidative Damage in Human Blood Mononuclear Cells. *Adv Pharm Bull*. 2019; 9(2): 302–6. doi: 10.15171/apb.2019.035.

15. Chiu C.T., Wang Z., Hunsberger J.G., Chuang D.M. Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder. *Pharmacol Rev*. 2013; 65(1): 105–42. doi: 10.1124/pr.111.005512.

16. Wang W., Lu D., Shi Y., Wang Y. Exploring the Neuroprotective Effects of Lithium in Ischemic Stroke: A literature review. *Int J Med Sci*. 2024; 21(2): 284–98. doi: 10.7150/ijms.88195.

17. Plotnikov E., Korotkova E., Voronova O. Lithium Salts of Krebs Cycle Substrates as Potential Normothymic Antioxidant Agents. *J Pharm Bioallied Sci*. 2018; 10(4): 240–5. doi: 10.4103/JPBS.JPBS_140_18.

18. Haupt M., Bähr M., Doeppner T.R. Lithium beyond psychiatric indications: the reincarnation of a new old drug. *Neural Regen Res*. 2021; 16(12): 2383–7. doi: 10.4103/1673-5374.313015.

19. Ветлугина Т.П., Епимахова Е.В., Савочкина Д.Н., Плотников Е.В., Прокопьева В.Д., Лосенков И.С. Действие солей лития на лимфоциты пациентов с аддиктивными и депрессивными расстройствами в опытах *in vitro*. *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. 2019; 4(105): 5–11. [Vetlugina T.P., Epimakhova E.V., Savochkina D.N., Plotnikov E.V., Prokopyeva V.D., Losenkov I.S. The effect of lithium salts on the lymphocytes of patients with addictive and depressive disorders in experiments *in vitro*. *Siberian Herald of Psychiatry and Addiction Psychiatry*. 2019; 4(105): 5–11. (in Russian)]. doi: 10.26617/1810-3111-2019-4(105)-5-11.

20. Плотников Е.В., Литвак М.М. Применение аскорбата лития в качестве церебропротекторного средства на модели ишемического

инсульта. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуск «Инсульт»*. 2020; 3(2): 29–32. [Plotnikov E.V., Litvak M.M. The use of lithium ascorbate as a cerebroprotective agent in a model of ischemic stroke. *Journal of Neurology and Psychiatry*. S.S. Korsakov. Special issue “Stroke”. 2020; 3(2): 29–32. (in Russian)]. doi: 10.17116/jnevro202012003229.

21. Forlenza O.V., De-Paula V.J., Diniz B.S. Neuroprotective effects of lithium: implications for the treatment of Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders. *ACS Chem Neurosci*. 2014; 5(6): 443–50. doi: 10.1021/cn5000309.

22. Greenberg D.B., Younger J., Kaufman S.D. Management of lithium in patients with cancer. *Psychosomatics*. 1993; 34(5): 388–94. doi: 10.1016/s0033-3182(93)71841-1.

23. Ferensztajn-Rochowiak E., Rybakowski J.K. The effect of lithium on hematopoietic, mesenchymal and neural stem cells. *Pharmacol Rep*. 2016; 68(2): 224–30. doi: 10.1016/j.pharep.2015.09.005.

24. Liu J., Bi K., Yang R., Li H., Nikitaki Z., Chang L. Role of DNA damage and repair in radiation cancer therapy: a current update and a look to the future. *Int J Radiat Biol*. 2020; 96(11): 1329–38. doi: 10.1080/09553002.2020.1807641.

25. Zhao L., Bao C., Shang Y., He X., Ma C., Lei X., Mi D., Sun Y. The Determinant of DNA Repair Pathway Choices in Ionising Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks. *Biomed Res Int*. 2020. doi: 10.1155/2020/4834965.

26. Liu L., Liang Z., Ma S., Li L., Liu X. Radioprotective countermeasures for radiation injury (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2023; 27(3): 66. doi: 10.3892/mmr.2023.12953.

27. Schae D., McBride W.H. Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015; 12(9): 527–40. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.120.

28. Thoms J., Bristow R.G. DNA repair targeting and radiotherapy: a focus on the therapeutic ratio. *Semin Radiat Oncol*. 2010; 20(4): 217–22. doi: 10.1016/j.semradonc.2010.06.003.

29. Daguene E., Khalifa J., Tolédano A., Borchellini D., Pointreau Y., Rodriguez-Lafrasse C., Chargari C., Magné N. To exploit the 5 ‘R’ of radiobiology and unleash the 3 ‘E’ of immunoeediting: ‘RE’-inventing the radiotherapy-immunotherapy combination. *Ther Adv Med Oncol*. 2020; 12. doi: 10.1177/1758835920913445.

30. Kargiotis O., Geka A., Rao J.S., Kyritsis A.P. Effects of irradiation on tumor cell survival, invasion and angiogenesis. *J Neurooncol*. 2010; 100(3): 323–38. doi: 10.1007/s11060-010-0199-4.

Поступила/Received 26.04.2024

Одобрена после рецензирования/Revised 07.05.2024

Принята к публикации/Accepted 02.08.2024

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Плотников Евгений Владимирович, кандидат химических наук, доцент, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»; научный сотрудник лаборатории химико-фармацевтических исследований, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; старший научный сотрудник отделения эндогенных расстройств, Научно-исследовательский институт психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 1904-2653. Researcher ID (WOS): F-8333-2017. Author ID (Scopus): 56432612900. ORCID: 0000-0002-4374-6422.

Белоусов Михаил Валерьевич, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтического анализа, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; профессор, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (г. Томск, Россия). SPIN-код: 8185-8117. Researcher ID (WOS): Q-3827-2016. Author ID (Scopus): 55808990700. ORCID: 0000-0002-2153-7945.

Бразовский Константин Станиславович, доктор технических наук, профессор, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (г. Томск, Россия). SPIN-код: 2868-1921. Researcher ID (WOS): O-4043-2016. Author ID (Scopus): 56582319400. ORCID: 0000-0002-4779-9820.

Ларькина Мария Сергеевна, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтического анализа, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; профессор, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (г. Томск, Россия). SPIN-код: 2812-7907. Author ID (Scopus): 57194542755. ORCID: 0000-0003-1176-2441.

Артамонов Антон Анатольевич, PhD, старший научный сотрудник, Институт медико-биологических проблем РАН (г. Москва, Россия). Author ID (Scopus): 57089921800. ORCID: 0000-0002-7543-9611.

Стучебров Сергей Геннадьевич, доцент, Исследовательская школа физики высокоэнергетических процессов, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (г. Томск, Россия). SPIN-код: 2117-0033. Researcher ID (WOS): C-7029-2015. Author ID (Scopus): 55247303500. ORCID: 0000-0003-3493-2319.

Чернов Владимир Иванович, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе и инновационной деятельности, заведующий отделением радионуклидной терапии и диагностики, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук; ведущий инженер, лаборатория № 31 ядерного реактора, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (г. Томск, Россия). SPIN-код: 6301-3612. Researcher ID (WOS): B-6789-2016. Author ID (Scopus): 7201429550. ORCID: 0000-0002-5524-9546.

ВКЛАД АВТОРОВ

Плотников Евгений Владимирович: разработка концепции проекта, выполнение исследований, написание статьи.

Белоусов Михаил Валерьевич: анализ результатов с внесением ценного интеллектуального содержания, написание статьи.

Бразовский Константин Станиславович: выполнение исследований, написание статьи.

Ларькина Мария Сергеевна: анализ научной литературы и полученных данных, написание статьи.

Артамонов Антон Анатольевич: статистическая обработка результатов, графическое оформление, написание статьи.

Стучебров Сергей Геннадьевич: техническое сопровождение, написание статьи.

Чернов Владимир Иванович: анализ данных с внесением ценного интеллектуального содержания, написание статьи.

Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой части работы.

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Конфликт интересов

Автор Чернов В.И. (доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН) является заместителем редактора «Сибирского онкологического журнала». Авторам неизвестно о каком-либо другом потенциальном конфликте интересов, связанном с данной статьей.

Соответствие принципам этики

Проведенное исследование соответствует стандартам Хельсинкской декларации. Образцы клеток получены из крови авторов статьи в добровольном порядке.

Информированное согласие

Все доноры подписали письменное согласие на использование образцов крови в научных целях и публикацию результатов в медицинском журнале, включая его электронную версию.

ABOUT THE AUTHORS

Evgeny V. Plotnikov, PhD, Associate Professor, Research School of Chemical and Biomedical Technologies, National Research Tomsk Polytechnic University; Researcher, Laboratory of Chemical and Pharmaceutical Research, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia; Senior Researcher, Department of Endogenous Disorders, Mental Health Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): F-8333-2017. Author ID (Scopus): 56432612900. ORCID: 0000-0002-4374-6422.

Mikhail V. Belousov, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical Analysis, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia; Professor, Research School of Chemical and Biomedical Technologies, National Research Tomsk Polytechnic University (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): Q-3827-2016. Author ID (Scopus): 55808990700. ORCID: 0000-0002-2153-7945.

Konstantin S. Brazovsky, Professor, Research School of Chemical and Biomedical Technologies, National Research Tomsk Polytechnic University (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): O-4043-2016. Author ID (Scopus): 56582319400. ORCID: 0000-0002-4779-9820.

Maria S. Larkina, Professor, Department of Pharmaceutical Analysis, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia; Professor, Research School of Chemical and Biomedical Technologies, National Research Tomsk Polytechnic University (Tomsk, Russia). Author ID (Scopus): 57194542755. ORCID: 0000-0003-1176-2441.

Anton A. Artamonov, PhD, Senior Researcher, Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia). Author ID (Scopus): 57089921800. ORCID: 0000-0002-7543-9611.

Sergey G. Stuchebrov, Associate Professor, Research School of High-Energy Physics, National Research Tomsk Polytechnic University (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): C-7029-2015. Author ID (Scopus): 55247303500. ORCID: 0000-0003-3493-2319.

Vladimir I. Chernov, MD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Deputy Director for Research and Innovation, Head of the Nuclear Medicine Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Lead Engineer, Nuclear Reactor Laboratory No. 31, National Research Tomsk Polytechnic University (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): B-6789-2016. Author ID (Scopus): 7201429550. ORCID: 0000-0002-5524-9546.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Evgeny V. Plotnikov: project conceptualization, research, writing of the manuscript.

Mikhail V. Belousov: analysis of the results, data interpretation, writing of the manuscript.

Konstantin S. Brazovsky: conducting research, writing of the manuscript.

Maria S. Larkina: literature review and analysis of obtained data, writing of the manuscript.

Anton A. Artamonov: statistical processing of results, graphic design, writing of the manuscript.

Sergey G. Stuchebrov: technical support, writing of the manuscript.

Vladimir I. Chernov: analysis of the results, data interpretation, writing of the manuscript.

All authors approved the final version of the manuscript prior to publication and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work were appropriately investigated and resolved.

Funding

This study required no funding.

Conflict of interests

Prof. Chernov V.I. is the Deputy Editor-in-Chief of Siberian Journal of Oncology. The authors are not aware of any other potential conflicts of interest related to this manuscript.

Compliance with Ethical Standards

The research complies with the standards of the Declaration of Helsinki. Cell samples were voluntarily obtained from the blood of donors-authors of the article.

Voluntary informed consent

All donors gave their consent to use the blood samples for scientific purposes and to publish the results in medical journal.