

615.7/—001.28—084/616—092—9

NEGATIVNÍ POKUS O OVĚŘENÍ RADIOPROTEKTIVNÍHO ÚČINKU 2-MERKAPTOPROPIONYLGLYCINU A JEHO DISULFIDU U MYŠÍ

Pplk. doc. MUDr. Pavel KUNA, CSc., prof. Ing. Jiří JARÝ, DrSc.
Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav JEP, Hradec Králové
(náčelník: genmjr. prof. MUDr. Jaroslav Vaňásek, CSc.)
Laboratoř monosacharidů VŠCHT, Praha
(vedoucí: prof. Ing. Jiří Jarý, DrSc.)

Úvod

Zprávy o výrazné radioprotektivní účinnosti nových chemických radioprotektivních látek vzbuzují zaslouženou pozornost radiobiologů a radioterapeutů. Obzvláště, když je ochranné účinnosti dosaženo aplikací malého množství chemické substance bez nežádoucích vedlejších toxických účinků. Toxické účinky současných chemických radioprotektivních látek jsou hlavní překážkou jejich klinického využití (Kamarád a Dostál, 1977; Kuna, 1969, 1975). Takovou látkou je podle Sugahary a Srivastavy (1976) 2-merkaptopropionylglycin, zkráceně označovaný jako MPG. Jeho radioprotektivní dávka byla stanovena u myši na 20 mg.kg^{-1} , což je skutečně velmi nízká dávka ve srovnání s akutní středně letální dávkou, která pro intraperitoneální podání činí 2100 mg.kg^{-1} .

Maďarští autoři Sántha aj. (1974) nepotvrdili u myši ochranný účinek MPG (1 mM nebo 2 mM na 1 kg), podaného do peritoneální dutiny 30 minut před letálním gama ozářením dávkou 9 Gy , způsobující uhynutí všech kontrolních myši do 30. dne po expozici. Zvýšené přežití pozorovali jen při profylaxi nižší dávkou MPG (1 mM.kg^{-1} , tj. 16.32 mg.kg^{-1}) u myši ozářených přibližně středně letální dávkou 7 Gy ,

která v jejich pokusu vedla k úhynu 6 nechráněných myši z 12členné skupiny do 30. dne po ozáření.

Uvedené nejednotné výsledky a skutečnost, že disulfid MPG (Ixeprin) podaný za 0,5—3 hodiny po skončeném ozařování zvyšuje procento přežívajících myši (Bodó aj., 1976) byly důvodem k prověření radioprotektivní účinnosti MPG a originálně syntetizovaného disulfidu 2-merkaptopropionylglycinu ve vlastních pokusech na myších.

Materiál a metodika

K pokusům jsme použili bílé myši samice kmene H bez patogenních mikrobů, průměrné váhy 25 g , dodané farmou Velaz Praha. Byly chované v propylénových klecích po deseti s volným přístupem k pitné vodě a peletované stravě VELAZ.

Myši jsme ozařovali dorzoventrálně jednorázově a celotělově radiokobaltovým (^{60}Co) zdrojem gama záření Chisotron, n. p., Chirana, při dávkovém příkonu $0,509 \text{ Gy.min}^{-1}$ ze vzdálenosti 100 cm od předpokládaného středu těla. Dávky záření jsou vyjadřovány jako tkáňová kerma v gray (Gy) při měření ve volném prostoru.

K posouzení radioprotektivní účinnosti MPG a jeho disulfidu jsme použili 5%, 50% a 95%

letální hodnoty dávek gama záření pro úhyn zvířat do 30. dne po expozici. K tomuto účelu byly v testované skupině ozářeny podskupiny myši stoupajícími dávkami záření v rozmezí 6 až 9 Gy. Jednotlivé pokusné soubory jsou shrnuty v 1. tabulce. Střední letální dávky jsme stanovili probit-logaritmickou metodou podle programu pro počítač Hewlett-Packard 9830A (USA) našeho ústavu.

Tab. 1

Pokusné skupiny myši

Skupina čis.	Experimentální postup
1	Intaktní, jen ozářené myši
2	MPG + 15 min + ozáření
3	Disulfid MPG + 15 min + ozáření
4	Ozáření + 30 min + MPG
5	Ozáření + 30 min + disulfid MPG

Námi použitý 2-merkaptopropionylglycin byl japonské výroby s firemním označením Thiola z produkce Santen Pharmaceutical Co., Ltd. Disulfid MPG byl syntetizován v laboratoři monosacharidů VŠCHT v Praze pod vedením jednoho z autorů. DMP i jeho disulfid byly rozpuštěny v roztoku, který obsahoval 25 mg MPG nebo jeho disulfid a 13 mg NaHCO_3 doplněné do 5 ml redestilovanou vodou. Hodnota $\text{pH} = 6,5$ až 7,0. Oba preparáty jsme podávali intraperitoneálně v dávce $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ v objemovém množství $0,05 \text{ ml} \cdot 10 \text{ g}^{-1}$.

Výsledky

Získané hodnoty LD 5, LD 50 a LD 95 pro jednotlivé pokusné skupiny jsou shrnuty v tabulce 2.

Z uvedeného přehledu získaných letálních hodnot jednoznačně vyplývá, že v použité dávce $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ neměl 2-merkaptopropionylglycin ani jeho disulfid prokazatelný radioprotektivní či léčebný účinek. Lehce zvýšené hodnoty středně letálních dávek celotělového gama záření u pokusných skupin myši v rozmezí od 0,004 do 0,034 Gy nepředstavují prakticky významné zvýšení radiorezistence vůči smrtícím účinkům radiace.

Diskuse

Naše výsledky nepotvrdily radioprotektivní účinek MPG hodnocený přežitím do 30. dne a srovnáním středních letálních dávek gama záření v té míře, jak ho dříve popsali Sugahara a Srivastava (1976). Při podání MPG 15 minut před ozářením myši v dávce $20\text{--}25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ získali LD 50/30 rovnou 8,8 Gy, u nechráněných myši byla tato hodnota 6,2 Gy a redukční faktor dávky (DRF) dosáhl hodnoty 1,4. Dvojnásobné zvýšení dávky MPG nezvýšilo hodnotu DRF, ale naopak ji snížilo na 1,22.

Vliv 2-merkaptopropionylglycinu a jeho disulfidu na přežití celotělově ozářených myši

Tab. 2

Skupina čis.	Dávka záření (Gy)	Úhyn do 30. dne	LD hodnoty v Gy
1	6	0/10	LD 5: 6,03 (4,93— 6,46)
	7	5/10	LD 50: 6,97 (6,54— 7,42)
	8	10/10	LD 95: 8,05 (7,52— 9,86)
2	7	4/20	LD 5: 5,83 (2,63— 6,63)
	8	8/10	LD 50: 7,22 (5,81— 7,74)
	9	10/10	LD 95: 8,93 (8,20—14,12)
3	7	5/10	LD 5: 5,44 (0,49— 6,45)
	8	8/10	LD 50: 7,01 (3,60— 7,61)
	9	10/10	LD 95: 9,03 (8,17—29,28)
4	7	3/10	LD 5: 6,15 (4,26— 6,77)
	8	9/10	LD 50: 7,31 (6,49— 7,77)
	9	10/10	LD 95: 8,68 (8,10—10,88)
5	7	3/10	LD 5: 6,15 (4,26— 6,77)
	8	9/10	LD 50: 7,31 (6,49— 7,77)
	9	10/10	LD 95: 8,68 (8,10—10,88)

V jiné studii Kawasaki (1973) profylaktickým podáním vysoké dávky MPG $200\text{--}250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (5 mg na myš o hmotnosti 20—25 g) zvýšil přežití myši na 9 z 12 (75 %) proti nechráněným myším, které po dávce 5 Gy přežívaly jen ve 25 procentech (3 z 12).

Na modelu mitotické postradiační inhibice buněk Ehrlichova ascitického tumoru prokázal Kawasaki (1973a) ochranný účinek MPG v malé dávce $20\text{--}25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Nástup opětivního mitotického dělení je sice ve stejném časovém odstupu od záření, v pozdějších intervalech je u chráněných skupin myši mitotický index podstatně vyšší.

Na stejných buňkách Ehrlichova ascitického tumoru in vitro dokázali Konstantinova a Révész (1977), že zvýšení radiorezistence těchto buněk pomocí cystaminu a 2-merkaptopropionylglycinu koreluje se zvýšením endogenního redukovaného glutathionu a ne s přítomností samotného protektoru ve vyšetřovaných buňkách.

Vedle uvedených pracovišť se radioprotektivními účinky MPG systematicky zabývá radiobiologická laboratoř Rajasthaniovy univerzity v Indii (1, 2, 3, 13, 14, 15). Pracují v různých dávkových oblastech celotělového gama ozáření a na rozličných tkáňových systémech malých laboratorních zvířat — albinotických švýcarských myši — průměrné hmotnosti 25 g. MPG aplikují zpravidla v dávce $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 15 až 30 minut před zahájením gama ozařování dávkou s dávkovým příkonem $0,25 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$.

Při analýze toxických účinků MPG podávaného myším ve stoupajících dávkách 20, 50, 100,

200 a 500 mg.kg⁻¹ i. p., stanovili Saharan aj. (1977), že dávky 100 mg.kg⁻¹ a vyšší vyvolávají v játrech významné histopatologické změny: degranulizaci a vakuolizaci cytoplazmy, pyknózu jádra, hyperémii, infiltraci lymfocyty atd. Změny byly ireverzibilní po jednorázové dávce 500 mg MPG na 1 kg. Dávka 20 mg.kg⁻¹, kterou považují za ochranně účinnou, žádné histopatologické změny nezpůsobila.

Po subletální expozici gama záření 5 Gy měla aplikace MPG v dávce 20 mg.kg⁻¹ 30 minut před zahájením ozařování podle Devi a Saini (1977) ochranný vliv na tymus myši. U chráněných myši dochází k časně regeneraci radiačního poškození brzlíku. Přítomnost dělicích se buněk prokazovali již za 27 hodin po ozaření, normální struktura byla obnovena do konce druhého týdne, zatímco u nechráněné jen ozařené skupiny nebyla reparace poškození kompletní ani ke konci čtvrtého týdne po expozici.

MPG zabránil vymizení germinativních buněk varlete a urychlil regeneraci semenotvorného epitelu po ozaření myši 5 Gy (Saharan a Devi 1977).

Celotělové ozaření 10 Gy vyvolává hynutí myši v prvním týdnu po expozici v důsledku rozhoďujícího poškození gastrointestinálního traktu. Chráněné myši, které neuhynuly, byly histopatologicky vyšetřeny v různých časových intervalech do konce čtvrtého týdne po ozaření. Ochranná účinnost 2-merkaptopropionylglycinu se projevila v menším radiačním poškození intestinálního epitelu a urychlenou úpravou radiačního poškození tenkého střeva (Devi aj., 1978, Saharan aj., 1978) i jaterní tkáně myši (Saini aj., 1977). Mándi aj. (1976) prokázala u myši, že disulfid MPG, nazvaný Ixepirin, redukoval časně radiační poškození erythropoézy a urychloval rychlost její reparace. Profylaktické intravenózní podání Ixepirinu krysám 10 minut před ozařením vede k časnější obnově syntézy DNA a RNA v regenerujících játrech ve srovnání s nechráněnými krysami (Gueth aj., 1976).

Přes uvedené průkazy ochranné účinnosti MPG a jeho disulfidu na odlišných orgánových soustavách po subletálním i letálním gama ozaření naše ověření ochranné účinnosti MPG i jeho disulfidu, provedené taktéž na myších ozařených stoupajícími dávkami gama záření, bylo zcela negativní. Podobně jsme neprokázali (Kuna aj., 1978) žádný radioaktivní účinek netoxického perorálně podávaného glutathionu (600 mg.kg⁻¹) hodnoceného stanovením definovaných letálních dávek gama záření. Nepodařilo se nám prokázat ani léčebný účinek disulfidu MPG popsáný Bodó aj. (1976) a Sánthou aj. (1976) u ozařených myši.

Souhrn

2-merkaptopropionylglycin (MPG) a jeho disulfid jsme podávali albinotickým myším SPF intraperitoneálně v dávce 25 mg.kg⁻¹ 15 minut před jednorázovým celotělovým gama ozařením (0,509 Gy.min⁻¹) nebo 30 minut po skončeném

ozaření. Aplikace MPG ani jeho disulfidu před nebo po expozici nevedla ke zvýšení radiorezistence myši hodnocené střední letální dávkou gama záření při sledování hynutí do 30. dne po ozaření. V našich pokusech jsme tak nepotvrdili dříve popisované radioprotektivní a terapeutické účinky netoxické dávky MPG a jeho disulfidu u myši.

Literatura

1. Bodó, K. S. - Benkő, Gy. - Sántha, A.: Issledovanie sovmestnogo dejstva gormonov anaboličeskogo dejstva i radiozaščitnyh sojedinenij u oblučennych eksperimentalnyh životnyh. [Maďarsky.] Honvéderos, 28, 1976, č. 4, s. 311—318.
2. Devi, U. P. - Saini, M. R.: Protection of Mouse Thy-mus Against Cobalt - 60 Radiation by 2-Mercaptopropionylglycine (MPG). J. Radiat. Res., 18, 1977, č. 3, s. 211—224.
3. Devi, U. P. - Saini, M. R. - Verma, A. - Saharan, B. R.: Radioprotective Effect of 2-Mercaptopropionylglycine on the Small Intestine of Swiss Albino Mice. Indian J. Exp. Biol., 16, 1978, č. 1, s. 86—88.
4. Gueth, L. - Szabó, L. D. - Sántha, A.: Effect of a New Radioprotector (Ixepirin) on the Biosynthesis of Nu-cleic Acids in Regenerating Rat Liver. In: Abstract II of 8th Congr. Soc. Hung. Radiol. and 12th Ann. Meet. of ESRB, 1976, s. 49.
5. Kamarád, V. - Dostál, M.: A Quantitative Morphome-tric Proof of the Radioprotective Effect of Cystami-ne and Mexamine in the Region of the Testicles in Rats Exposed to Total Body Gamma Irradiation. Olo-mouc, Acta Univ. Palackianae, 81, 1977, s. 229—238.
6. Kawasaki, S.: Radioprotective Action of SH Com-pounds. I. Studies Based on Survival Rate Curve. Bull. Yamaguchi Med. School, 20, 1973, č. 1—2, s. 17 až 31.
7. Kawasaki, S.: Radioprotective Action of SH Com-pounds III. Effects of Aminoethylisothiuronium Br. HBr, Cysteamine and 2-Mercaptopropionylglycine Against Mitotic Delay Induced by X-Rays. Bull. Ya-maguchi Med. School, 20, 1973a, č. 1—2, s. 45—51.
8. Konstantinova, M. M. - Révész, L.: Comparative Study of the Radioprotective Activity and Mechanism of Action of 2-MPG and MEA. Radiobiologija, 17, 1977, č. 6, s. 839—843.
9. Kuna, P.: Farmakologické účinky radioprotektivních látek cysteaminu, cystaminu a aminoethylisothiouro-nia. Čas. Lék. čes., 108, 1969, č. 13—14.
10. Kuna, P.: Pokusy o snížení toxické a zvýšení ochran-né účinnosti chemických radioprotektivních látek. Voj. zdrav. Listy, 64, 1975, č. 2, s. 71—77.
11. Kuna, P. - Petýrek, P. - Dostál, M.: Modification of To-xic and Radioprotective Effects of Cystamine by Glu-thathione in Mice. Radiobiol. Radiother., 19, 1978, č. 5, s. 599—605.
12. Mándi, E. - Sántha, A. - Benkő, G.: The Effect of a New Radioprotector, bis - (alpha-propionylglycine) - disul-phide on the Erythropoiesis of Irradiated Mice. In: Abstract II of 8th Congr. Soc. Hung. Radiol. and 12th Ann. Meet. of ESRB 1976, s. 90.
13. Saharan, B. R. - Devi, U. P.: Radiation Protection of Mouse Testes with 2-Mercaptopropionylglycine. J. Ra-diat. Res., 18, 1977, č. 4, s. 306—316.
14. Saharan, B. R. - Saini, M. R. - Devi, U. P.: MPG Pro-tection and Goblet Cell Kinetics in Mouse Jejunum. Strahlentherapie, 154, 1978, č. 1, s. 60—62.
15. Saharan, B. R. - Singh, R. P. - Verma, A.: Toxicity of 2-Mercaptopropionylglycine (MPG) on Mouse Liver. J. Radiat. Res., 18, 1977, č. 4, s. 302—307.
16. Saini, M. R. - Saharan, B. R. - Bhartiya, H. C. - Devi, U. P.: Radiation Protection of Mouse Liver by 2-Mer-captopropionylglycine. J. Radial. Res., 18, 1977, č. 3, s. 206—210.

17. Sántha, A. - Mándi, E. - Benkő, Gy.: Issledovanie me-
prina — radiozaščitnogo sojediněnja novogo tipa.
[Maďarsky.] Honvédorvos, 26, 1974, s. 145—149.
18. Sántha, A. - Mándi, E. - Benkő, Gy.: Toxicity and Ra-
dioprotective Effectiveness of a New Radioprotector
Drug, the Bis-(Alpha-Propionylglycil)-Disulphide (Ixe-
prin) Tested on Animals. In: Abstract II of 8th Congr.
Soc. Hung. Radiol. and 12th Ann. Meet. of ESRB,
1976, s. 126.
19. Sugahara, T. - Srivastava, P. N.: MPG [2-Mercaptopro-
pionylglycine]. A rewiew on Its Protective Action
Against Ionizing Radiations. In: Modification of Ra-
diosensitivity of Biological Systems. Vienna, Int. Atom.
Energy Agency, publ. No. 446, 1976, s. 77—87.