

Radioprotective Effect of Isopentenyladenosine in Mice

Materials such as cysteamine^{1,2}, phytohemagglutinin³, and other chemicals⁴ have been used as radioprotective agents in mammals. The mechanism of action of these agents is not fully established, but a number of theories have been proposed to explain the observed radioprotection. In this communication we report a preliminary observation of the radioprotective effect of N⁶-(Δ^2 -isopentenyl) adenosine (iPA) (Figure 1) which has been found in the tRNA from a variety of microorganisms, plants and mammalian tissues⁵⁻⁹. This chemical is of unusual interest because of its properties as a potent plant hormone (Cytokinin), stimulating cell division and differentiation in plant systems⁸; as a component of yeast^{6,10} and mammalian¹¹ tRNA; and as an antitumor agent in animals¹².

Materials and methods. 10–12-week-old Balb/c mice, weighing approximately 25 g were used for these experiments. In each experimental group, equal numbers of male and female mice were used. The iPA (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) was dissolved in phosphate buffered saline (PBS), filtered (sterilized millipore filter) and injected immediately. Each animal of each experimental group received 0.5 ml of diluted iPA (0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 $\mu\text{g/g}$ of body weight) or PBS (control) by i.p. injection. Before the radioprotective experiments were conducted, the toxicity of the compound was determined¹³ and the levels employed were non-toxic. One half after the iPA or PBS injection, the mice were exposed to 830 rads of ⁶⁰Co γ -radiation at a dose-rate of 34.5 rads/min.

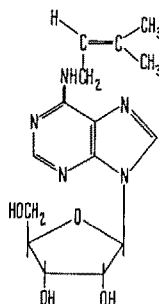


Fig. 1. Structure of N⁶-(Δ^2 -isopentenyl) adenosine.

Results and Discussion. The data shown in the Table reports the survival of the mice following 830 rads whole body radiation as a function of the iPA dose. Mean survival time was increased by nearly a factor of two at intermediate doses of iPA. Neither a low dose of iPA (0.005 $\mu\text{g/g}$) nor a high dose (0.1 $\mu\text{g/g}$) provided significant radioprotection. A measureable radioprotective effect of

iPA was seen in the dose range of 0.01 to 0.05 $\mu\text{g/g}$. This radioprotection as demonstrated by the extended survival time is shown graphically in Figure 2.

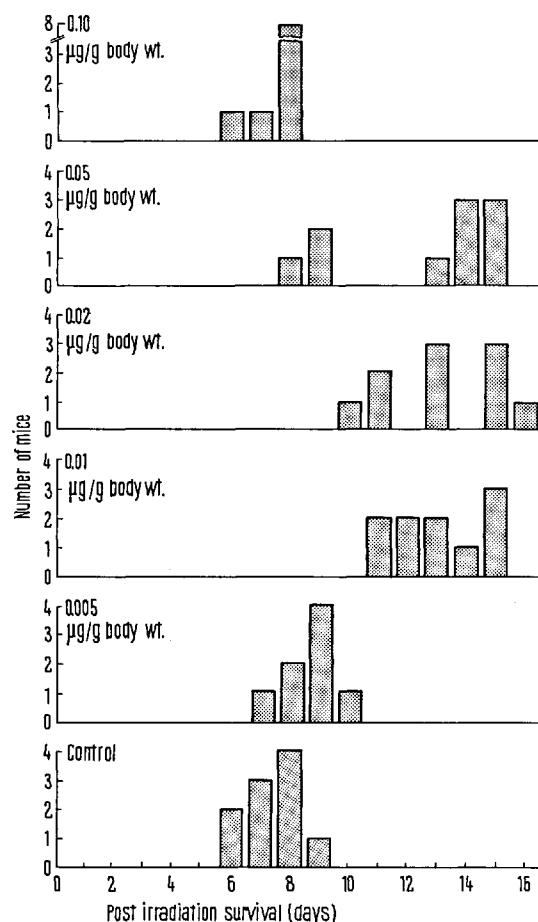


Fig. 2. A histogram showing the time of death for mice treated with N⁶-(Δ^2 -isopentenyl) adenosine and following 830 rads whole-body irradiation.

Survival time of mice treated with N⁶-(Δ^2 -isopentenyl) adenosine following 830 rads whole-body irradiation

Dose of iPA ($\mu\text{g/g}$ body wt)	No. of mice	Mean survival time (days)
Control (phosphate buffered saline)	10	7
0.005	8	9
0.01	10	13
0.02	10	13
0.05	10	13
0.1	10	8

- M. G. OMEROD and P. ALEXANDER, *Radiat. Res.* **18**, 495 (1963).
- O. VOS, G. A. GRANT and L. BUDKE, *Int. J. Radiat. Biol.* **18**, 111 (1970).
- S. STEFANI, *Experientia* **26**, 80 (1970).
- Z. M. BACQ, *Chemical Protection Against Ionizing Radiation* (C. C. Thomas, Springfield 1965).
- F. FITTLER and R. H. HALL, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **25**, 441 (1966).
- R. H. HALL, M. J. ROBBINS, L. STASIUK and R. THEDFORD, *J. Am. chem. Soc.* **88**, 2614 (1966).
- M. J. ROBBINS, R. H. HALL and R. THEDFORD, *Biochemistry* **6**, 1837 (1967).
- F. SKOOG and D. J. ARMSTRONG, *A. Rev. Plant Physiol.* **21**, 359 (1970).
- H. G. ZACHAU, D. DUTTING and H. FELDMAN, *Angew. Chem.* **78**, 392 (1966).
- R. H. HALL, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Eds J. N. DAVIDSON and W. E. COHN, Academic Press, New York 1970), vol 10, p. 57.
- M. STAEHELIN, H. ROGG, B. C. BAGULEY, T. GINSBERG and W. WEHRLI, *Nature, Lond.* **219**, 1363 (1968).
- D. SUK, C. L. SIMPSON and E. MIHICH, *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* **8**, 23 (1968).
- N. PRASAD and S. C. BUSHONG, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, in preparation.

This preliminary result indicates that iPA exhibits a protective effect on mice exposed to lethal doses of whole-body radiation. The mechanism of radioprotection of this compound is not known at this time. It is noteworthy that iPA can either stimulate or inhibit DNA synthesis, transformation, and mitosis in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes, depending on the time of treatment and the concentration used^{14, 15}. Our results show that intermediate concentrations of iPA (0.01 to 0.05 $\mu\text{g/g}$ body wt.) produce a radioprotective effect in lethally irradiated mice. It is suggested that this effect in mice by iPA occurs through the stimulation of their lymphocytes. Additional experiments are underway with iPA to further characterize the radioprotective mechanism of this compounds¹⁶.

Zusammenfassung. (iPA) bewirkt bei Mäusen, die mit einer letalen Ganzkörperdosis bestrahlt wurden, einen Schutzeffekt. Diese Verlängerung der mittleren Über-

lebenszeit wird mit einer Dosierung von 0,01 bis 0,05 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht erreicht.

N. PRASAD, S. C. BUSHONG
and H. L. BARTON

*Department of Radiology, Baylor College of Medicine,
and Veterans Administration Hospital,
Houston (Texas 77025, USA), 23 March 1971.*

¹⁴ R. C. GALLO, J. WHANG-PENG and S. PERRY, *Science* **165**, 400 (1969).

¹⁵ B. HACKER and T. L. FELDBUSH, *Biochem. Pharmac.* **18**, 847 (1969).

¹⁶ This investigation was partially supported by the American Cancer Society Institutional Research Grant No. ACS-IN-27L/P-20. The authors wish to thank BETTY H. CHEATHAM and SHARON A. BRINEY for their technical assistance.

Evolution du métabolisme des lécithines dans la membrane érythrocytaire au cours de la conservation du sang

Les différents constituants du sang subissent des modifications au cours de la conservation et il est important de déterminer l'état métabolique d'un sang après un certain temps de stockage. Plusieurs critères peuvent être utilisés pour caractériser ces possibilités métaboliques parmi lesquels l'activité de la biosynthèse des phospholipides érythrocytaires. Cette biosynthèse qui est assez faible *in vivo* a été étudiée *in vitro* sur le sang frais par incorporation de ³²P soit dans le sang total¹ soit dans les hématies^{2, 3}. Après incorporation de ³²P dans les hématies, PAYSANT-DIAMENT et POLONOVSKI³ constatent que les acides phosphatidiques sont très fortement radioactifs. SCHMIDT et al.³ trouvent de plus une radioactivité importante dans les lysophosphatidyléthanolamines, les lécithines et les sphingomyélines. La biogenèse des phospholipides a été également étudiée avec les membranes érythrocytaires: OLIVEIRA et VAUGHAN⁴, LANDS et al.^{5, 6} ont montré qu'une activité d'acyltransférase pouvait être mise en évidence dans les membranes cellulaires des érythrocytes humains, l'acide linoléique étant préférentiellement fixé sur le carbone 2 d'une 1-acyl-glycérol phosphorylcholine.

Pour évaluer l'état métabolique de la membrane globulaire au cours de la conservation du sang, nous avons étudié l'incorporation de l'acide linoléique par les membranes érythrocytaires.

Méthodes. Nous avons utilisé le sang de douze donneurs, 6 hommes et 6 femmes, prélevé sur une solution citrate-glucose ayant la composition suivante: acide citrique, H₂O 0,67 g, citrate trisodique, 2 H₂O 2,63 g, glucose anhydre 2 g, H₂O distillée q.s.p. 100 ml.

450 ml de sang sont recueillis sur 75 ml de cette solution, le mélange est ensuite divisé en 5 échantillons conservés à 4°C. Les membranes érythrocytaires de chaque échantillon sont étudiées au temps initial et au bout de 8 jours, 15 jours, 29 jours et 43 jours. La préparation des membranes est effectuée par la méthode de DODGE, MITCHELL et HANAHAN⁷, toutes les opérations sont réalisées à 4°C. Le sang est centrifugé pendant 20 min à 1000 g, les érythrocytes obtenus sont lavés 3 fois par un tampon phosphate 0,109 M de pH 7,4, puis hémolysés en tampon phosphate 0,0054 M de pH 7,4 pendant 30 min. Après centrifugation à 5000 g pendant 40 min, on obtient un culot de stromas qui est lavé 3 fois par un tampon phosphate 0,0054 M. Le culot final est placé dans 3 ml de tampon

0,0054 M de pH 7,4. On obtient une suspension de membranes blanche ou légèrement rosée, homogène au microscope optique et donnant des images satisfaisantes en microscopie électronique⁸. Les protéines de la suspension membranaire sont dosées par la méthode du biuret rapide⁹ et l'hémoglobine par la méthode de STORCK et ARDY¹⁰, la quantité d'hémoglobine présente dans les stromas est toujours très faible.

Un volume de 0,5 ml à 1 ml de la suspension de stromas correspondant à 3 mg de protéines est mis en incubation pendant 90 minutes à 37°C avec 6,25 nmoles de linoléate de potassium ¹⁴C, 125 μmoles de phosphate pH 7,4, 3 μmoles de MgCl₂, 2 μmoles d'ATP et 0,1 μmole de coenzyme A dans un volume total de 3 ml. Après incubation, les lipides sont extraits du milieu réactionnel par la méthode de FOLCH¹¹ et fractionnés par chromatographie sur colonne d'acide silicique, l'élution est effectuée successivement par éther-benzène 1:1, éther-éthanol 1:1 et méthanol⁸. La fraction élue par le méthanol est étudiée par chromatographie sur couches minces de gel de silice G avec le solvant chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (65:25:8:4) et révélation par l'iode ou le réactif de Dittmer modifié¹². La position des taches radioactives est indiquée par autoradiographie et la radioactivité est me-

¹ C. E. ROWE, *Biochem. J.* **73**, 438 (1959).

² M. PAYSANT-DIAMENT et J. POLONOVSKI, *Bull. Soc. Chim. biol.* **42**, 4 (1960).

³ P. M. SCHMIDT, M. BOULARD et Y. NAJEAN, *Schweiz. med. Wschr.* **46**, 100 (1970).

⁴ M. M. OLIVEIRA et M. VAUGHAN, *J. Lipid Res.* **5**, 156 (1964).

⁵ A. F. ROBERTSON et W. E. M. LANDS, *J. Lipid Res.* **5**, 88 (1964).

⁶ K. WAKU et W. E. M. LANDS, *J. Lipid Res.* **9**, 12 (1968).

⁷ J. T. DODGE, C. MITCHELL et D. J. HANAHAN, *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 119 (1963).

⁸ Les clichés de microscopie électronique ont été effectués par le Dr P. BRYON, Service de Microscopie électronique, Hôpital Edouard Herriot, Lyon.

⁹ T. A. WEISCHSELBAUM, *Analyt. Biochem.* **2**, 335 (1961).

¹⁰ J. STOCK et R. ARDRY, *Ann. Biol.* **1957**, 197.

¹¹ J. FOLCH, M. LEES et G. H. SLOANE-STANLEY, *J. biol. Chem.* **226**, 497 (1957).

¹² V. E. VASKOVSKY et Y. KOSTETSKY, *J. Lipid Res.* **9**, 396 (1968).