

ЛЪЧЕПРОТЕКТИВНИ АГЕНТИ - СЪВРЕМЕННИ ТЕНДЕНЦИИ В РАЗВИТИЕТО

¹Камелия Соколова, ²Веселин Иванов, ¹Стефан Радев, ¹Живка Цокева, ²Бончо Григоров, ³Магдалена Облакова

¹*Катедра физиология, патофизиология и фармакология,*

²*Катедра по химия и биохимия, Медицински факултет, Тракийски университет, Армейска 11, Стара Загора*

³*Секция «Развъждане и технологии в птицевъдството», Земеделски Институт, Стара Загора*

e-mail: camel56@abv.bg

RADIOPROTECTIVE AGENTS – TRENDS IN THE DEVELOPMENT

¹Kameliya Sokolova ²Veselin Ivanov, ¹Stefan Radev, ¹Zhivka Tsokeva, ²Boncho Grigorov, ³Magdalena Oblakova

¹*Dept. of physiology, pathophysiology and pharmacology,*

²*Dept. of Chemistry and Biochemistry, Medical Faculty, Trakia University, 11 Armeiska str., Stara Zagora*

⁽³⁾ *Department "Poultry Breeding and technology», Agricultural Institute, Stara Zagora*

e-mail: camel56@abv.bg

ABSTRACT:

This publication presents some aspects of the problems associated with the past, present and future strategies relating to the development of radioprotectors. The advantages and disadvantages in the application of these agents are discussed. The criteria of effectiveness of radioprotectors as their mechanisms of action are specified. Based on the relatively new studies connected with the development of radioprotective agents, the authors focus on the implementation of substances with moderate efficacy, low toxicity and easy way of introduction.

Keywords: ionizing radiation radioprotectors, antigenotoxicity, mutagenicity

Въведение

Йонизиращите лъчения са мощен мутагенен фактор в околната среда, който действа постоянно на всички живи организми, включително и на човека [1,2,3,4]. Основното свойство на тези лъчения е йонизацията, която предизвикват в атомите и молекулите на веществата в живата материя. Биологичните ефекти на йонизиращите лъчения могат да се дължат на директното и на индиректното им действие или на двете. При директното действие дадена молекула се уврежда (напр. ДНК веригата се разкъсва) от непосредствено преминаване през нея на йонизиращото лъчение. При индиректното действие съответната молекула се променя чрез друга молекула. Най-често образуваните от радиолизата на водата свободни радикали взаимодействат с молекулите на клетката като ги увреждат [5].

Прилагането на йонизиращата радиация в медицинската практика (например лъчетерапия и нуклеарна медицина), както и потенциалното радиационно въздействие в аварийна и спешна ситуация (например аварии в ядрената индустрия, военни действия) са причина за посочените вредни въздействия върху организмите и човека. Ето защо от изключително голямо значение за радиозащитата на населението и медицината е разработването и прилагането на ефективни лъче-модифициращи средства [6]. Лъчезащитните агенти са синтетични съединения или естествени продукти, които се прилагат непосредствено преди облъчването с цел намаляването на степента на увреждания, причинявани от йонизиращата радиация. През последните 60 години, в резултат на

огромната нужда в клиничната медицина от ефективни лъчезащитни агенти, са разработени и тествани много такива, за да се получат по-ефикасни и по-малко токсични медикаменти и средства. Тези агенти са с висока степен на ефективност що се отнася до намаляването на леталитета, предизвикван от облъчването. От този клас съединения, амифостинът е единственият лъчепротектор, който е с доказан клиничен ефект и одобрен за прилагане от Администрацията по Храни и Лекарствени Средства (FDA) [7]. Този медикамент осигурява добра лъчезащита, но е относително токсичен (гаденето, повръщането и понижаването на кръвното налягане са едни от най-често предизвикваните от него странични ефекти) [8]. Имайки предвид това, търсенията за по-малко токсични и по-ефикасни лъчепротектори, които по възможност да бъдат самоприлагани от самия пациент, продължават.

Основни терапевтични стратегии при проучването и разработването на лъчепротектори

През последните години се извършват проучвания върху лъчепротективни агенти със съвсем нов начин на действие. В частност, съединенията, които могат да окажат влияние върху регенерацията на хемопоеичните стволови клетки са обект на особено голям интерес. Целта на тази терапевтична стратегия е да се повиши степента на преживяемост посредством стимулирането на функцията и регенерирането на популацията от стволови клетки, която по принцип намалява по своята численост в резултат на предизвикваните от облъчването увреждания [9, 10]. Имуномодулаторите и цитокините представляват болшинството агенти в тази категория. Естествено срещашите се в природата фитохимични съставки, които действат като антиоксиданти и имуностимулатори представляват друга насока в стратегията за разработването на лъчепротективни агенти с ниска степен на токсичност [11,12,13,14]. Друга стратегия за намаляване на страничните ефекти, предизвиквани от йонизиращата радиация, е използването на терапевтични агенти, които могат да бъдат прилагани след облъчването. Цитокините и имуномодулаторите, поради индуцираното от тях възстановяване на костния мозък и регенериране на други видове тъкани, биха могли да представляват такъв клас агенти.

Критерии за ефективно действие на лъчепротекторите

Идеалният лъчепротективен агент трябва да покрива няколко критерия [15]:

- Да подсигурира значителна защита срещу ефектите на облъчването;
- Да оказва общ протективен ефект върху по-голямата част от органите;
- Да е със сравнително лесен начин на въвеждане (по възможност през устата, а ако това е невъзможно - интрамускулно).
- Да е с относително стабилен профил (както на основния активен продукт в него, така и на синтезираното съединение и на вехикулума);
- Да притежава добра съвместимост с голям набор други медикаменти, които се дават паралелно на пациента;
- Да проявява своето протективно действие чрез различни механизми на лъчезащита.

За съжаление, до момента не е открит такъв лъчепротектор, който едновременно да отговаря на всички тези критерии. Въпреки че, първоначалните разработки на лъчепротективни агенти довеждат до откриването на ефикасните синтетични тиолови съединения, както вече споменахме по-горе, характеристиката на страничните ефекти на тези средства налага търсенето и разработването на медикаменти от второ поколение, които да са по-ефикасни, по-малко токсични и с по-приемливи качества що се отнася до начина и честотата на прилагането им.

Основни групи лъчепротектори и механизми на действие

Тиоли и синтетични лъчепротектори

Тиолите са молекули, съдържащи в своята структура свободни или потенциални сулфхидрилни (SH) групи. Те представляват първата генерация лъчепротективни агенти [15]. Предполагат се няколко механизма на действие на тази група съединения, като например улавяне на свободните радикали, пренос на водородни йони, включително и хипоксия, както и стабилизиране на ДНК молекулата посредством прякото им свързване с нея [16]. Един от най-ефикасните разработени тиолови лъчепротектори е WR-2721 или т. нар. амифостин, който представлява про-медикамент. При него тиоестерната връзка се разцепва от мембранно-свързаната алкална фосфатаза, като по този начин се формира свободен активен тиол. Амифостинът е прилаган при клинични проучвания, където е доказано, че той протектира здравите тъкани от острите и хронични ефекти на облъчването. Одобрен е от FDA в качеството си на лъчепротектор. Макар че, амифостинът се прилага понастоящем в клиничната практика, до момента той не е получил одобрение за използване в ситуации на ядрено/лъчево нападение или въздействие.

Нитроксиди

Разработена е цяла серия от свободни и стабилни нитроксиди с цел тестването им като лъчепротектори. Смята се, че основният им механизъм на действие е улавяне на свободните радикали и притежаване на супероксид дисмутаза-подобна активност. Темполът е основното и представително съединение в тази група. Нитроксидите проявяват диференцирана протекция по отношение на здравите тъкани (костен мозък), но не и към туморната тъкан [17]. Темполът проявява значителен ефект по отношение на понижаване на кръвното налягане и ускоряване на сърдечната честота в дози, които подsigуряват лъчепротективност. Освен това, той е с доста кратък „прозорец” на действие и ефективност [17]. Тези нежелани качества на нитроксидите определено ограничават тяхната приложимост в клиничната практика.

Семейството на bis-бензимидазола

Bis-бензимидазола притежава по две бензимидазолови групи и една фенолна група, като това му дава възможност да се свързва с малките бразди в ДНК молекулата. Тези съединения дават силна флуоресценция при свързването си с ДНК и се продават на пазара от Hoechst като реагенти за *in vitro* оценка на концентрацията на ДНК. Най-добре изученото и познато съединение от тази група е Hoechst 33342. То се свързва стабилно и селективно с двойноверижната ДНК [18]. Механизмът на лъчезащитна протекция на Hoechst 33342 се състои в отдаването на един електрон от лиганда на увредената ДНК [18]. Интравенозното прилагане на Hoechst 33342 (70 mg/kg) 30 мин. преди облъчването довежда до постигането на значителен лъчезащитен ефект със стойност на доза редуциращия фактор (DMF) от 1.2 в миши модел с облъчване на белия дроб [19].

Метилпроаминният аналог на Hoechst 33342 проявява лъчепротективни качества в *in vitro* условия и е до 100 пъти с по-мощно действие от WR-1065 в клетки от линията V79 [18]. Свързаната с ДНК метилпроаминна лиганда действа като редуциращ агент посредством механизъм на пренос на електрони, като по този начин репарира преходните лъчеиндуцирани окислени групи в ДНК молекулата. Martin et al. правят предположение, че метилпроаминът притежава потенциална възможност като локално средство за прилагане при радиопротекция [18].

Ензими от групата на супероксид дисмутаза и комплексни съединения на метали

Ензимите от групата на супероксид дисмутаза (SOD) са естествено срещащи се вътреклетъчни ензими, които улавят супероксидния радикал (O_2^-) посредством катализирането на неговото превръщане във водороден прекис и кислород. Известно е, че тези ензими осигуряват най-съществената защита срещу супероксидния радикал. Мед-, цинк- и манган-съдържащите форми на SOD са най-честите типове от този ензим [20]. Пероралното прилагане на манган супероксид дисмутаза-плазмид/липозома (Mn SOD-PL) 24 часа преди еднократно облъчване с доза 30 Gy предотвратява развитието на мукозит в устната кухина при мишки. Необходимо е провеждането на още проучвания, за да се изясни ефикасността и токсичността на SOD-PL при системното му прилагане в модели с животни. Лимитиращите моменти при прилагането на тези средства са техният кратък полуживот, голямата им молекулна маса и потенциална имуногенност [21, 22].

Цитокини

Йонизиращата радиация уврежда хемопоетичната тъкан и намалява броя на неутрофилите и тромбоцитите. Намаляването на броя на тези циркулиращи в кръвотока клетки може да доведе до сепсис, кръвоизливи, анемия и смърт на организма. Една от стратегиите в разработването на нови класове лъчепротективни агенти е стимулирането, поддържането на нивото и пролиферацията на стволовите клетки в костния мозък. Цитокините могат да стимулират хемопоетичните стволови клетки. Комбинираното прилагане на фактора на стволовите клетки (SCF) и тромбопоетин (TPO) синергистично протектира $CD34^+$ CFU-мегакариоцитите срещу смърт, предизвикана от R_0 лъчене [23]. Възстановяването на хемопоетичната тъкан и функциите ѝ зависи от процента на останалите след лъчевото въздействие витални хемопоетични стволови клетки. Ето защо прилагането на хемопоетични растежни фактори трябва да се ограничи само в границите на средните дози облъчване. Третирането на мононуклеарни клетки от периферна кръв на човек с IL-3 и SCF предотвратява апоптозата, предизвикана от гама-облъчване в ин-витро условия [24]. За съжаление, някои цитокини притежават недостатъци, като проинфламаторна активност или имуногенност, които силно ограничават прилагането им в клиничната практика.

Имуномодулатори

Имуномодулаторите (ИМ) са вещества с различен произход и структура, способни да модулират покоя, пролиферацията и ефекторните функции на имунните клетки и хемопоетичните стволови клетки. Отделянето на цитокини вследствие на ефекта на имуномодулатори може да стимулира растежа, диференциацията и пролиферацията на хемопоетичните прогениторни и стволови клетки. По този начин агентите от този клас могат да оказват лъчепротективен и репарационен ефект посредством ускорена продукция на костномозъчни клетки, както и циркулиращи в кръвотока гранулоцити, лимфоцити и тромбоцити [16].

Естествени антиоксиданти

Натуралните съставки в храната подsigуряват достъпа в организма на функционално активни антиоксиданти, каквито са витамините, минералите и ензимите. Редукцията на оксидативната увреда от такива естествени антиоксиданти осигурява известно ниво на защита срещу пагубните въздействия на йонизиращата радиация.

Витамин Е (алфа токоферолът) и аналозите му са нутрицевтични вещества, които имат способност за улавяне на синглетния кислород и супероксид-анионните радикали. Съобщава се, че при мишки, на които е приложен с.с. витамин Е в доза 400 IU/kg преди облъчване, имат

повишаване на преживяемостта до 79% спрямо 4% в контролната група, третирана само с вехикулум [25].

Мелатонинът (*N*-ацетил-5-метокси триптамин) е един хормон, произвеждан от епифизата (*glandula pineale*), който има качества да улавя хидроксилни и пероксилни радикали, както и пероксинитритни аниони. Прилагането на еднократна доза мелатонин (300 mg) перорално при здрави доброволци намалява честотата на хромозомните аберации и микроядрата, предизвикани от облъчването на лимфоцити в клетъчна култура [26].

Флавоноидите (като например ориентин, виценин, нарингин, кверцетин и рутин) са една група полифенолни съединения, които се намират в плодовете и проявяват силно изразена антиоксидантна активност. Изследвани са лъчепротективните свойства на някои флавоноиди, най-вече посредством теста за микроядра, за да се установят техните антикластогенни ефекти, както и свойството им да активират клетъчната пролиферация [27]. Констатирано е, че тези флавоноиди оказват значителен протективен ефект върху клетките на костния мозък на мишки, особено когато се приложат в ниски дози преди радиационното въздействие.

Генистеинът е естествен изофлавоон, съдържащ се в соевите зърна, който може да намери своето евентуално приложение при намаляване на симптоматиката на острата лъчева увреда при инжектирането му *s.c.* 24 часа преди облъчване в дози от 100 до 400 mg/kg. Генистеинът не предизвиква никакви доловими нежелани ефекти, понася се добре и е лесен за въвеждане [10]. Подобрената преживяемост след въвеждането му е свързана със засилената регенерация на хемопоетичните стволови клетки и ускореното възстановяване на неутрофилите и тромбоцитите [10].

Растения и билки

През последните 15 години вниманието и интересът на изследователите са насочени към оценката на растителните продукти в качеството им на лъчепротектори, тъй като те притежават добра ефикасност на действие и ниска токсичност [5, 28, 29, 30]. Предполагаемата лъчепротективна активност на растителните екстракти е в резултат на съдържащите се в тях много на брой активни съставки, като например антиоксиданти, имуностимулатори и вещества с противомикробно действие. Повечето проучвания за ефикасността на растителните препарати са провеждани с използването на тотални екстракти, като е правена оценка на тяхната способност да оказват защитен ефект срещу лъчепредизвикани хромозомни аберации и формиране на микроядра. Тази способност е оценявана с прилагането на тестове за генотоксичност, като например анализ на микроядра и хромозомни абрации в метафазни пластинки и кометен анализ [5, 6, 12, 13, 31, 32].

Необходимо е провеждането на по-нататъшни проучвания за установяване на биоактивните компоненти, на които се базира лъчепротективния ефект на растителните препарати, както и за удължаване на техния „прозорец“ на действие във времето (напр. 24 часа преди облъчване). Макар че до момента е направен анализ на голям брой растения по отношение на способността им да облекчават симптоматиката на лъчеиндуцираната болест при животните, все още понастоящем няма достатъчно данни, които да са в подкрепа на тяхното прилагане при пациенти по време на лъчетерапия.

Заключение

Разработването на лъчепротективни агенти е важен момент в стратегията за протектиране на пациентите от страничните ефекти на лъчетерапията, както и на обществото като цяло от евентуална радиационна опасност. Независимо от обширната изследователска дейност, проведена до момента, с цел разработване на лъчепротективни агенти, все още няма одобрено за клинично прилагане средство, което да предотвратява острия радиационен синдром.

От направения обзор на лъчепротекторните агенти стигаме до заключението, че в днешно време съществуват две основни стратегии за намирането и евентуалното одобряване от регулаторните органи на лъчепротективен агент:

Първата стратегия е свързана с разработката на лъчепротектор на базата на имуномодулатори от естествени билкови препарати. Въпреки че цитокините въздействат директно върху продукцията и пролиферацията в хемопоеичната система, тяхното прилагане има известни ограничения, като например, предизвикване на възпалителни реакции и неподходящи способности за въвеждане.

Втората стратегия е свързана с идентифицирането на естествени продукти, които да действат като уловители на свободните радикали и които да имат способност да предизвикват възстановяване на костния мозък.

Библиография

1. Little, M.P. Risks associated with ionizing radiation. *British Medical Bulletin*; 68, 259–275, 2003.
2. Танчев, С., Георгиева, С., Георгиев, П., Попов, Б. Генетични ефекти в соматични и полови клетки на зайци след външно гама облъчване. Хромозомни аберации в периферни лимфоцитни клетки. *Trakia Journal of Science*, vol 3, № 1, 2005.
3. Tanchev, S., Georgieva, S., Zhelyazkov, E., Popov, B. Comparative study of karyotype mutability in inbred and outbred rabbits after gamma irradiation. *Trakia Journal of Science*, vol 4, № 1, 2006.
4. Popov, B., Petkova, V., Georgieva, S. Comparative analysis of chromosome damage in two groups of workers handling either radioisotopes or anti-tumour drugs in an oncology clinic of Stara Zagora, Bulgaria. *Trakia Journal of Science*, vol. 5, 2007.
5. Попов, Б. Антимутагенен потенциал на тотален екстракт от *Haberlea rhodopensis*. Дисертация за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”, Стара Загора, 2012.
6. Popov, B., Georgieva, S., Petrov, V. Radioprotective, anticlastogenic and antioxidant effects of total extract of *Haberlea Rhodo-pensis* on rabbit blood samples exposed to gamma radiation in vitro. *Revue Méd. Vét.*, 162, , 1, 34-39, 2011.
7. Cassatt, D.R. et al. Preclinical modeling of improved amifostine (ethyol) use in radiation therapy. *Semin. Radiat. Oncol.* 12, 97–102, 2002.
8. Landauer, M.R. et al. Genistein treatment protects mice from ionizing radiation injury. *J. Appl. Toxicol.* 23, 379–385, 2003.
9. Георгиева, С., Попов, Б. Лъчепротективен потенциал на растителни извлеци срещу ефектите на йонизиращата радиация. *Обзор. Животновъдни науки*, XLIX, 69-84, 2/2012.
10. Popov, B., Georgieva, S., Lalchev, S. Radioprotection from genetic damages by resurrection plant *Haberlea rhodopensis* – in vivo/in vitro study with rabbits. *Trakia Journal of Science*, Vol. 10, No 3, pp 41-47, 2012.
11. Popov, B., Radev, R., Georgieva, S. In vitro incidence of chromosome aberrations in gamma-irradiated rabbit lymphocytes, treated with *Haberlea rhodopensis* extract and vitamin C”. *Bulg. J. Vet. Med.*, 13, No 3, pp.148-153, 2010.
12. Popov, B., Dobreva, Zl., Georgieva, Sv., Stanilova, S. Enhancement of anti-klh igg antibody production in rabbits after treatment with *haberlea rhodopensis* extract. *Trakia Journal of Sciences*, Vol.8, S.2, pp 92-97, 2010.
13. Brown, D.Q. et al. Early results of the screening program for radioprotectors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 8, 565–570, 1982.
14. Maisin, J.R. and Alexander. Lecture chemical radiopro-tection: past, present and future prospects. *Int. J. Radiat. Biol.* 73, 443–450, 1998.
15. Hahn, S.M. et al. Evaluation of the hydroxylamine tempol-H as an in vivo radioprotector. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 953–958, 2000.

16. Jagetia C. Ganesh. Radioprotective Potential of Plants and Herbs against the Effects of Ionizing Radiation. *J Clin Biochem Nutr.* March; 40 (2), 74–81, 2007.
17. Sharma, A. Modulation of mutagenesis by plant products. Platinum Jubilee Lecture (Cochin). Indian Science Congress Association, Calcutta, 1990.
18. Martin, R.F. et al. In vitro studies with methylproamine: a potent new radioprotector. *Cancer Res.* 64, 1067–1070, 2004.
19. Martin, R.F. et al. Radioprotection by DNA ligands. *Br. J. Cancer* 74, 99–101, 1996.
20. Epperly, M.W. et al. Intratracheal injection of manganese superoxide dismutase (MnSOD) plasmid/liposomes protects normal lung but not orthopedic tumors from irradiation. *Gene Ther.* 7, 1011–1018, 2000.
21. Somack, R. et al. Preparation of long-acting superoxide dismutase using high molecular weight poly-ethylene glycol (41,000–72,000 Daltons). *Free Radic. Res. Commun.* 12–13, 553–562, 1991.
22. Vajragupta, O. et al. Manganese-based complexes of radical scavengers as neuroprotective agents. *Bioorg. Med. Chem.* 11, 2329–2337, 2003.
23. Kashiwakura, I. et al. Protective effects of thrombopoietin and stem cell factor on x-irradiated CD34+ megakaryocytic progenitor cells from human placental and umbilical cord blood. *Radiat. Res.* 160, 210–216, 2003.
24. Kim, J.Y. et al. Radioprotective effects of various cytokines in peripheral blood mononuclear cells and C3H mice. *Oncol. Rep.* 13, 1177–1183, 2005.
25. Kumar, S. et al. Nutritional approaches to radiation protection. *Mil. Med.* 167, 57–59, 2002.
26. Vijayalaxmi et al. Melatonin and radioprotection from genetic Damage: in vivo/in vitro studies with human volunteers. *Mutat. Res.* 371, 221–228, 1996.
27. Jagetia, G.C. et al. The grapefruit flavonone naringin protects against the radiation-induced genomic instability in the mice bone marrow: a micro-nucleus study. *Mutat. Res.* 519, 37–48, 2002.
28. Popov, B., Georgieva, S., Lalchev, S. *Haberlea rhodopensis* extract protects against gamma-irradiation induced clastogenicity. 8th European Cytogenetics Conference, Porto, Portugal, 02-05 July, 2011. *Chromosome Research*, Vol. 19 Supplement 1. S122, 2011.
29. Popov, B., Georgieva, S., Lalchev, S., Miloshev, G., Radev, R. Cellular DNA damage and lipid peroxidation after whole body gamma irradiation and treatment of total extract of *haberlea rhodopensis*. 9th Balkan Congress of Medical Genetics, Timisoara, Romania, 15-17 September, 2011. *Balkan Journal of Medical Genetics*, Vol. 14 Supplement, 40, 2011.
30. Popov, B., Georgieva, S. Antimutagenic effect of *haberlea rhodopensis* on rabbit lymphocytes (in vivo /in vitro study). XXXIXth Annual meeting of the european society for new methods in agricultural research, 25th – 29th august Brno, Czech Republic. Book of Abstracts, p. 26, 2009.
31. Georgieva, S. Popov, B., Bonev, G. Radioprotective effect of *Haberlea rhodopensis* (Friv.) leaf extract on γ -radiation-induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant levels in rabbit blood.. *Indian Journal of Experimental Biology*, Vol. 50, 2012.
32. Georgieva, S., Popov, B. Miloshev G, Bonev, G. Cellular DNA Damage and Lipid Peroxidation After Whole Body Gamma Irradiation And Treatment with *Haberlea Rhodopensis* extract in rabbits. *Revue Méd. Vét.*, 163, 12, p. 572-576, 2012.