

Лекция 4

Кислородный эффект в радиобиологии

Определение явления кислородного эффекта

Существует несколько определений кислородного эффекта в радиобиологии.

1. Кислородный эффект в радиобиологии – это явление усиления повреждающего действия ионизирующего излучения при наличии в среде кислорода во время облучения.

2. Кислородным эффектом в радиобиологии называют радиозащитное действие гипоксии (т.е. пониженного содержания кислорода).

3. Кислородным эффектом в радиобиологии называют радиосенсибилизирующее действие кислорода.

Кислородный эффект является универсальным явлением и наблюдается при облучении различных объектов – целых организмов, клеток и простых модельных систем.

Первые наблюдения кислородного эффекта

Первые наблюдения кислородного эффекта:

1. В 1912 г. в Германии Н. Swartz обратил внимание на то, что реакция кожи на облучение уменьшается, если тубус рентгеновской трубки или радиевый аппликатор плотно прижаты к коже. Позднее выяснилось, что это уменьшение лучевой реакции кожи обусловлено прекращением кровотока и, следовательно, пониженным содержанием кислорода в этих участках кожи.
2. В 1921 г. Н. Holthusen обнаружил, что яйца аскарид (паразитические круглые черви) более устойчивы к облучению в отсутствии кислорода.
3. В 1921-1923 гг. Е. Petry показал что семена растений и их проростки в бескислородной среде более устойчивы к облучению, чем в присутствии кислорода.

Коэффициент кислородного усиления

Для количественной оценки любого радиомодифицирующего эффекта используют т.н. «фактор изменения дозы» (ФИД; Dose Reduction Factor – DRF), который рассчитывают как отношение равноэффективных доз облучения в присутствии и отсутствии радиомодифицирующего агента.

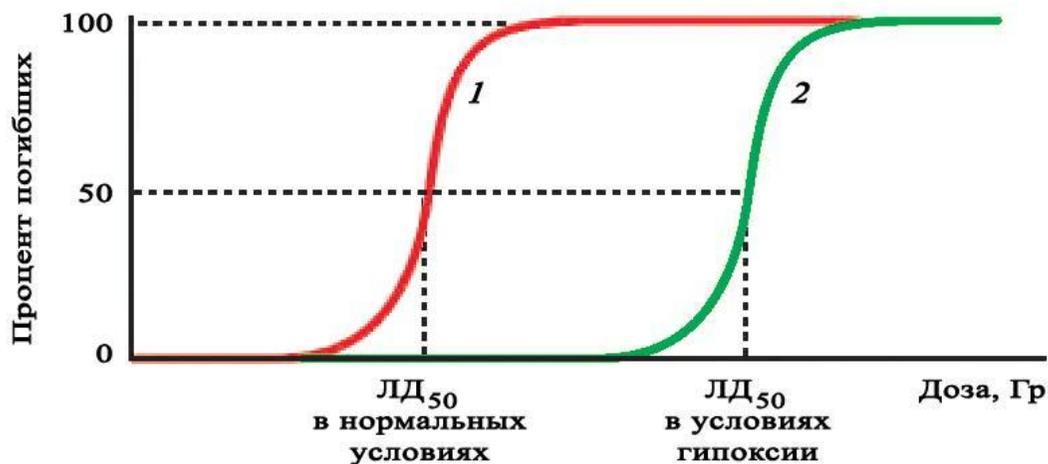
При этом независимо от направления модифицирующего воздействия (т.е. усиления или ослабления лучевого эффекта) обычно берется отношение большей дозы к меньшей.

В случае кислородного эффекта величину ФИД часто называют «коэффициентом кислородного усиления» (ККУ; Oxygen Enhancement Ratio – OER).

Расчет ККУ при облучении животных

ККУ при облучении животных рассчитывается как отношение LD_{50} в условиях гипоксии к LD_{50} в нормальных условиях (т.е. на воздухе):

$$ККУ = \frac{LD_{50} \text{ в условиях гипоксии}}{LD_{50} \text{ в нормальных условиях}}$$



Кривые гибели животных при внешнем облучении рентгеновским или γ -излучением в нормальных условиях (1) и при гипоксии (2)

Кривая гибели животных после облучения в условиях гипоксии сдвигается в область более высоких доз.

Значения ККУ при облучении животных

При облучении животных заметное снижение радиочувствительности, по сравнению с нормальным атмосферным воздухом, наблюдается начиная с 10%-ного содержания кислорода в дыхательной смеси и ниже.

Для мышей и крыс минимальным переносимым содержанием кислорода в дыхательной смеси, ниже которой они гибнут, является 5%.

Максимальное значение ККУ при гипоксии для этих животных не превышает 2-2,5.

Длительность кислородного эффекта у животных невелика, т.е. защитное действие гипоксии снижается при длительном нахождении в гипоксических условиях.

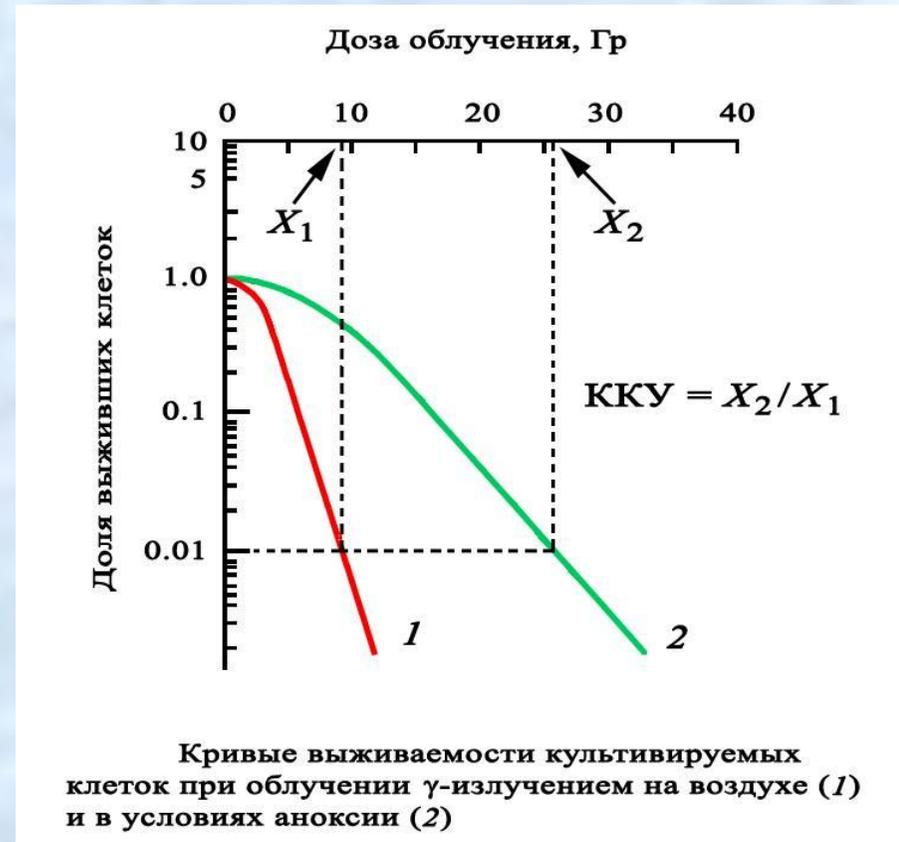
Расчет ККУ при облучении культивируемых клеток (1)

В экспериментах на культивируемых клетках и микроорганизмах значения ККУ рассчитывают 2-мя разными способами, дающими несколько различающиеся значения ККУ.

Способ 1. ККУ рассчитывается как отношение равноэффективных доз облучения, т.е. доз приводящих к одинаковой выживаемости при аноксии (или гипоксии) и в нормальных условиях (т.е. на воздухе).

Обычно ККУ рассчитывают при уровне выживаемости (т.е. доли выживших) 0,01. Иногда расчет проводят и при других уровнях выживаемости.

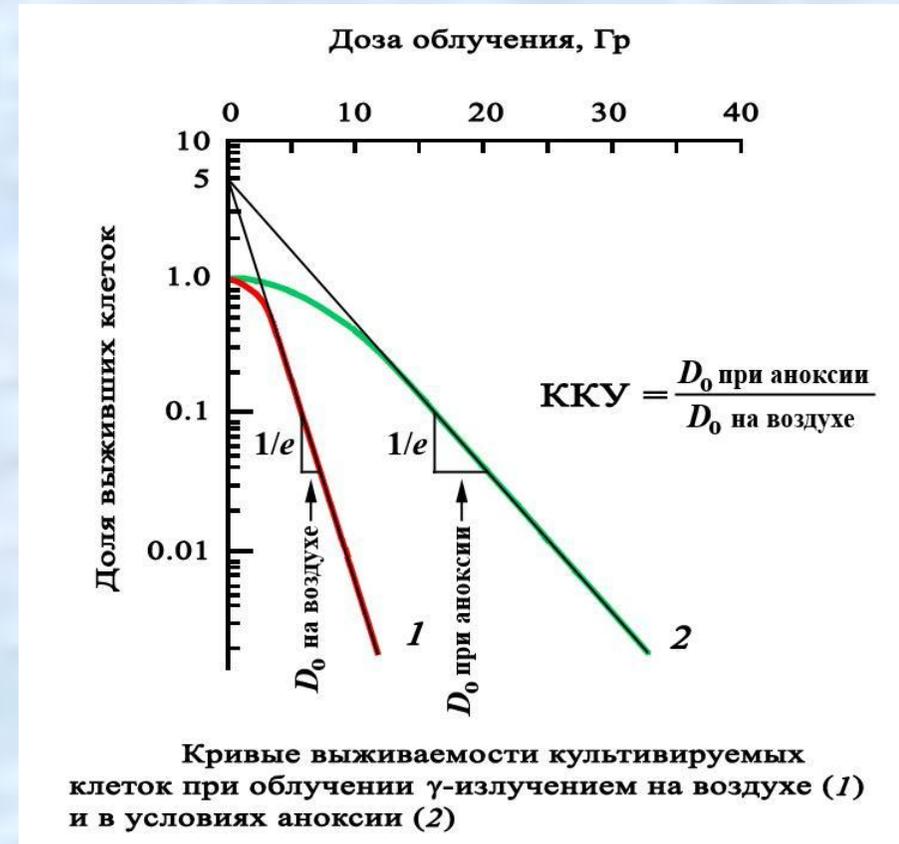
На приведенном рисунке ККУ равен X_2/X_1 , т.е. кислород повысил радиочувствительность клеток в X_2/X_1 раз.



Расчет ККУ при облучении культивируемых клеток (2)

Способ 2. ККУ рассчитывается как отношение доз D_0 при аноксии (или гипоксии) и в нормальных условиях (т. е. на воздухе):

$$\text{ККУ} = \frac{D_0 \text{ в условиях аноксии (или гипоксии)}}{D_0 \text{ в нормальных условиях}}$$



Значения ККУ при облучении культивируемых клеток

Обычно ККУ в экспериментах на культивируемых клетках и микроорганизмах достигает значений 3-3,5.

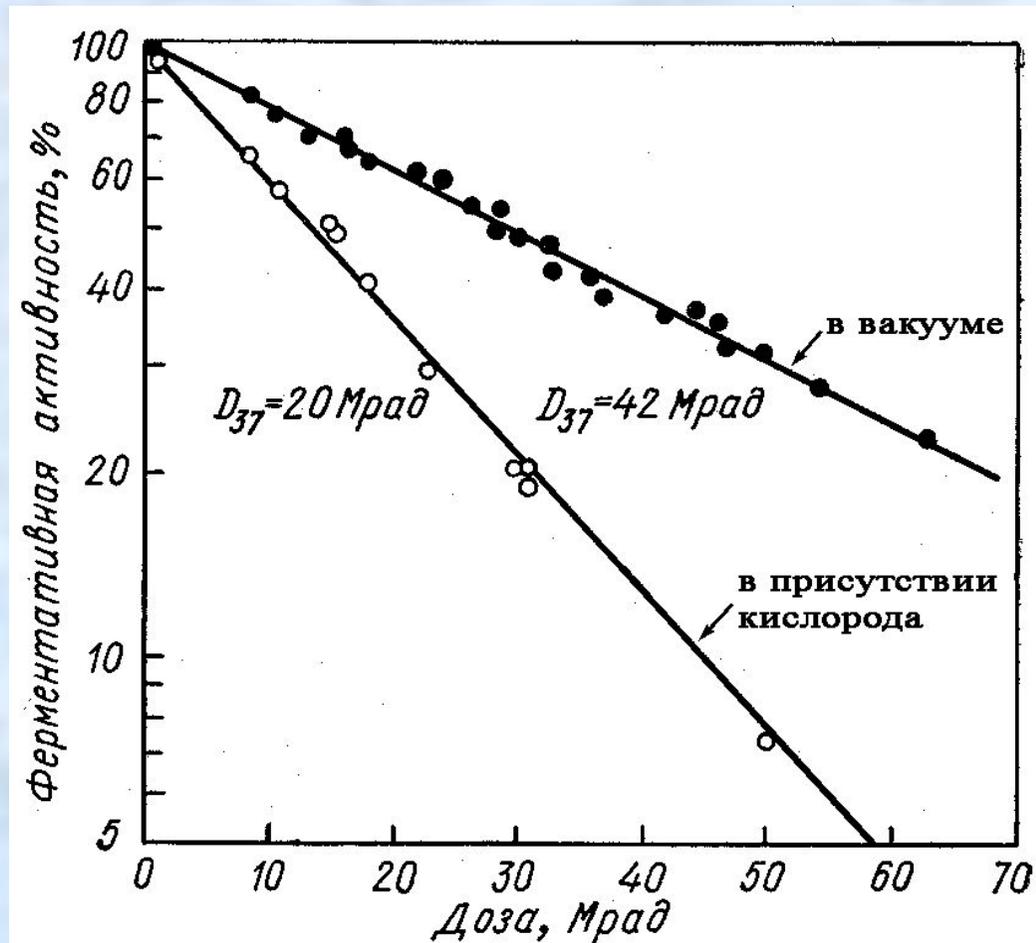
В радиобиологии подобные радиомодифицирующие эффекты считаются очень сильными, т.е. кислород является весьма эффективным радиосенсибилизатором.

Кислородный эффект при облучении макромолекул в сухом состоянии

Кислородный эффект обнаружен не только на клеточном и организменном уровне, но и в экспериментах с облучением биологических макромолекул в сухом состоянии.

Основные результаты получены, главным образом, с ферментами и нуклеиновыми кислотами, причём наиболее важные и однозначные данные были получены по инаktivации ферментов.

Кислородный эффект почти всегда наблюдается при облучении сухих макромолекул.

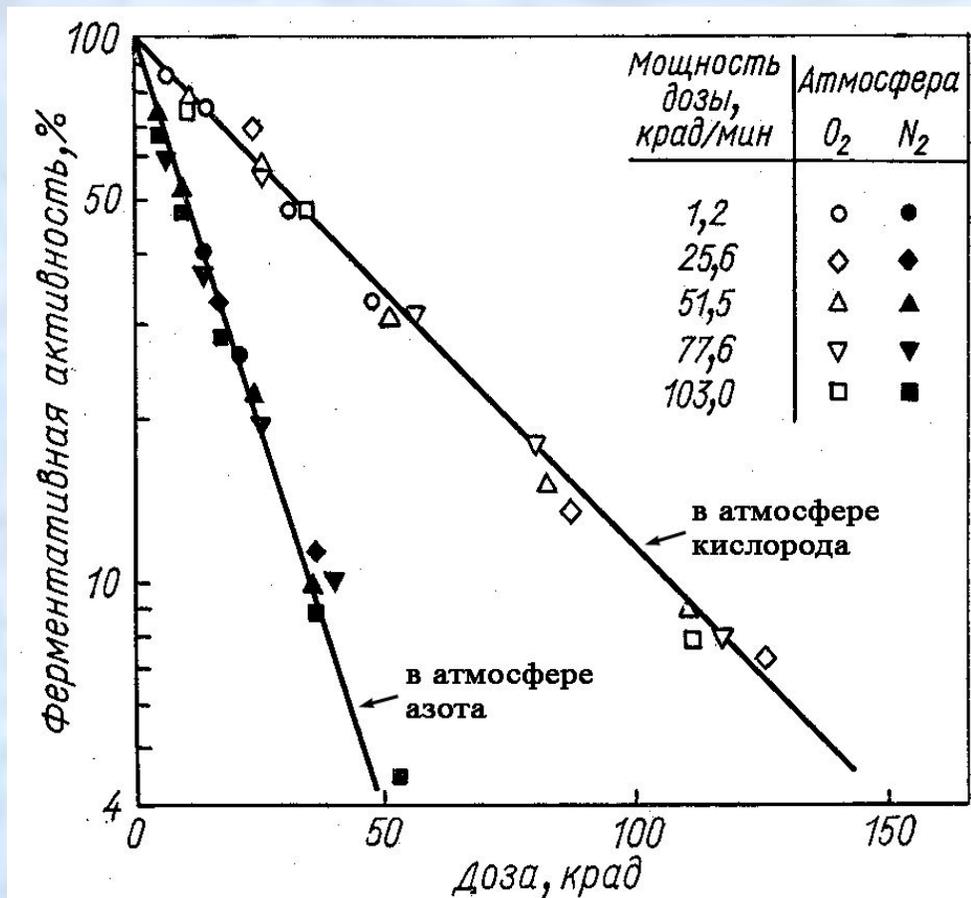


Инаktivация сухой РНК-азы γ -излучением Co^{60} в вакууме и в присутствии кислорода

Обратный кислородный эффект при облучении разбавленных водных растворов макромолекул

Однако, при облучении макромолекул в разбавленных водных растворах (т.е. в условиях, когда преобладает не прямое действие) кислородный эффект может быть очень слабым или полностью отсутствовать.

Более того, возможен даже защитный эффект кислорода (т.н. обратный кислородный эффект), что было продемонстрировано, например, при облучении растворов трипсина: его радиочувствительность в атмосфере кислорода оказалась в 3 раза ниже, чем в атмосфере азота.

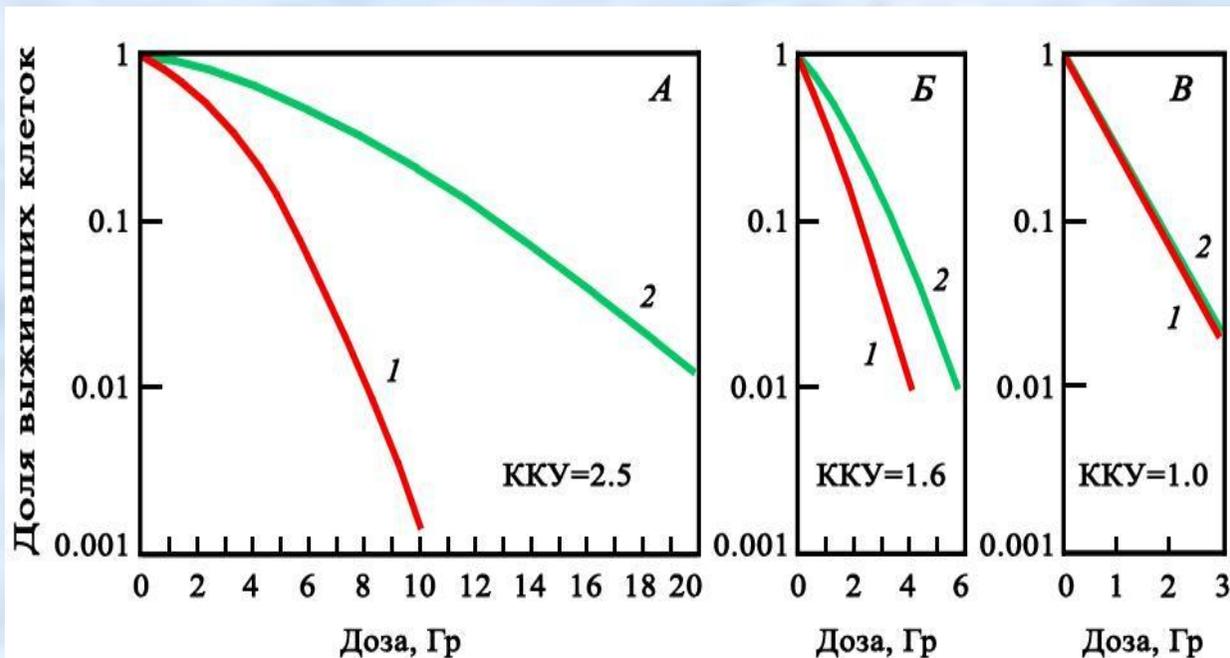


Инактивация трипсина в аэробных и анаэробных водных растворах (0,1 мг/мл) рентгеновским излучением 45 кВ при различной мощности дозы

Кислородный эффект на культивируемых клетках при действии разных видов ионизирующих излучений

Наиболее четко кислородный эффект на культивируемых клетках наблюдается при облучении редкоионизирующими излучениями (γ - и рентгеновским). При облучении плотноионизирующими излучениями кислородный эффект гораздо менее выражен (в случае нейтронного излучения) или полностью отсутствует (в случае α -излучения).

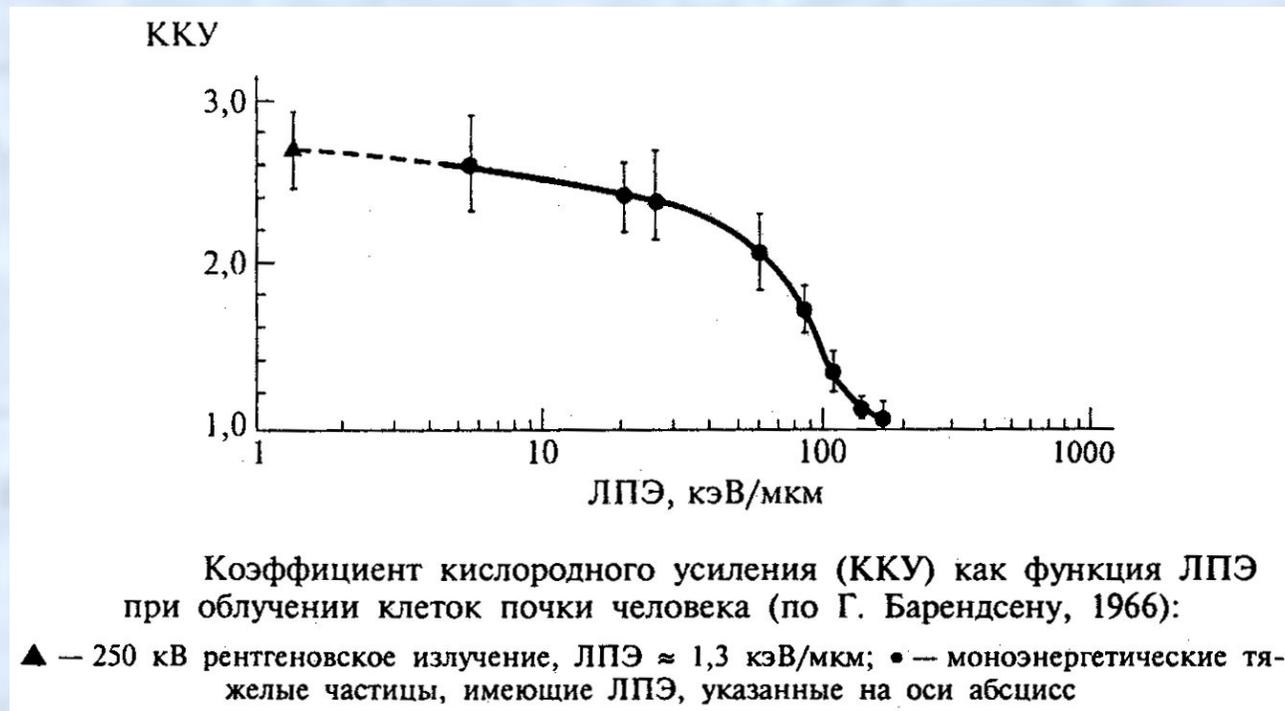
На рисунке представлены различные варианты проявления кислородного эффекта в зависимости от применяемого вида ионизирующего излучения – рентгеновского, нейтронного (15 МэВ) и α -излучения (2,5 МэВ). Как видно из рисунка, самое высокое значение ККУ на культивируемых клетках человека наблюдается при действии рентгеновского излучения.



Зависимость ККУ от вида ионизирующего излучения:
А - рентгеновское, Б - нейтронное (15 МэВ), В - α -излучение (2,5 МэВ); 1 - на воздухе, 2 - при аноксии

Зависимость ККУ от ЛПЭ ионизирующего излучения

Более подробно зависимость ККУ от ЛПЭ ионизирующего облучения при облучении культивируемых клеток почки человека представлена на нижеприведенном рисунке.



Видно, что при увеличении ЛПЭ с 1,3 кэВ/мкм до примерно 60 кэВ/мкм ККУ медленно снижается с 2,7 до 2,1. При дальнейшем повышении ЛПЭ ККУ снижается более резко и достигает 1 при ЛПЭ=160 кэВ/мкм (соответствует ЛПЭ α -излучения с энергией 2,5 МэВ).

Возможные причины снижения кислородного эффекта при повышении ЛПЭ излучения (1)

Существует несколько объяснений снижения кислородного эффекта при действии плотноионизирующего излучения на клетки.

1-е объяснение. При действии плотноионизирующего излучения количество одномоментно происходящих попаданий в мишень так велико, что поражение мишени достигает максимального уровня и становится необратимым даже в бескислородных условиях (т.е. усиливать радиационный эффект уже некуда, он и так максимальный).

Возможные причины снижения кислородного эффекта при повышении ЛПЭ излучения (2)

2-е объяснение. При действии плотноионизирующего излучения в результате дополнительных реакций вторичных продуктов радиолиза воды образуется кислород. Это приводит к тому, что реальных аноксических условий при облучении плотноионизирующим излучением создать невозможно.

Дополнительные реакции с участием вторичных продуктов радиолиза воды становятся возможны, поскольку плотность радикалов, возникающих при действии плотноионизирующего излучения гораздо выше, чем при действии редкоионизирующего излучения. Так, в частности, повышается вероятность осуществления реакции рекомбинации 2-х гидроксильных радикалов и реакции гидроксильного радикала с перекисью водорода с образованием перекисного радикала:



При действии редкоионизирующих излучений вероятность осуществления последней реакции очень незначительна (т.к. для ее осуществления фактически необходимо образование при радиолизе воды 3-х близко расположенных друг к другу гидроксильных радикалов, что очень маловероятно для РЕДКОионизирующего излучения).

Образовавшийся перекисный радикал может привести к образованию кислорода по следующим реакциям:

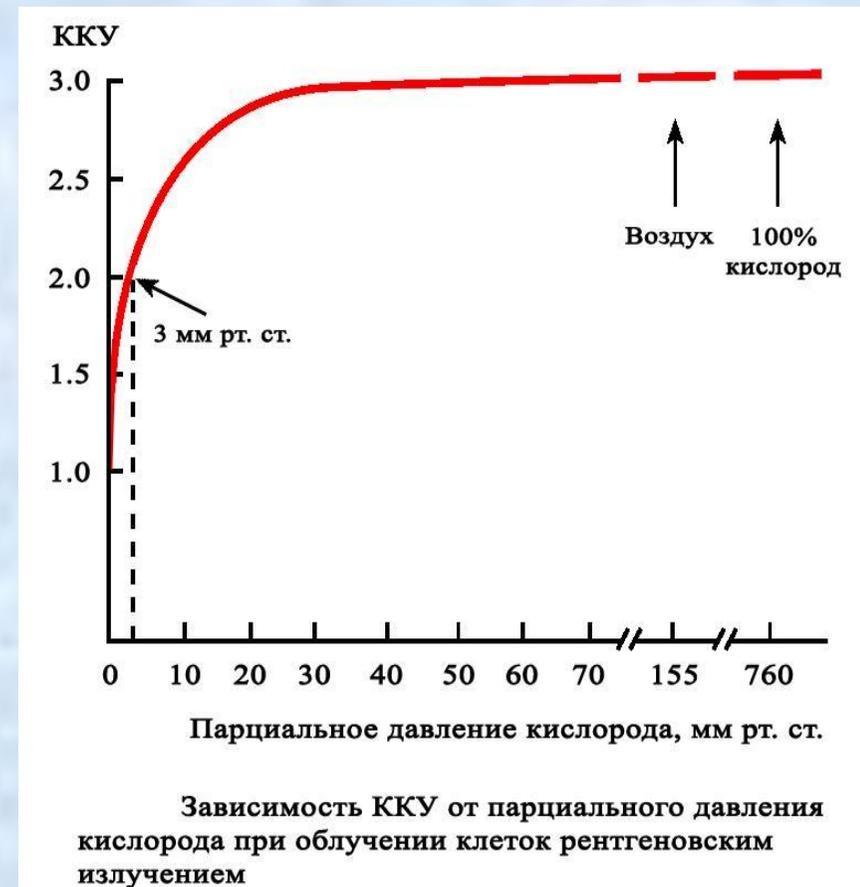


Зависимость ККУ от содержания кислорода при облучении клеток

На клеточном уровне зависимость кислородного эффекта от содержания кислорода подробно была исследована в 50-е годы прошлого столетия Л. Греем с сотрудниками (эксперименты проводились на дрожжах, бактериях и клетках млекопитающих в культуре).

Графическое изображение этой зависимости (т.н. кривой Грея) представлено на рисунке. На воздухе ККУ равен примерно 3 (т.е. радиочувствительность уже максимальна) и не возрастает при повышении концентрации кислорода.

При снижении концентрации кислорода со 159 мм рт. ст. (воздух) до 30 мм рт. ст. ККУ снижается очень незначительно. А вот в диапазоне от 20 мм рт. ст. до 0 мм рт. ст. ККУ снижается очень резко. При парциальном давлении кислорода 3 мм рт. ст. (что соответствует 0,4%-ному содержанию кислорода) ККУ равен примерно 2.



Первоначальные представления о физико-химическом механизме кислородного эффекта

Первоначально высказывались предположения, что кислородный эффект на физико-химическом уровне обусловлен появлением более активных продуктов радиолиза воды в присутствии кислорода, а именно супероксиданионрадикала $O_2^{\cdot-}$ и перекисного радикала HO_2^{\cdot} . Однако, позже было показано, что реакционная способность этих радикалов не превышает реакционной способности других основных продуктов радиолиза воды, возникающих в отсутствие кислорода.

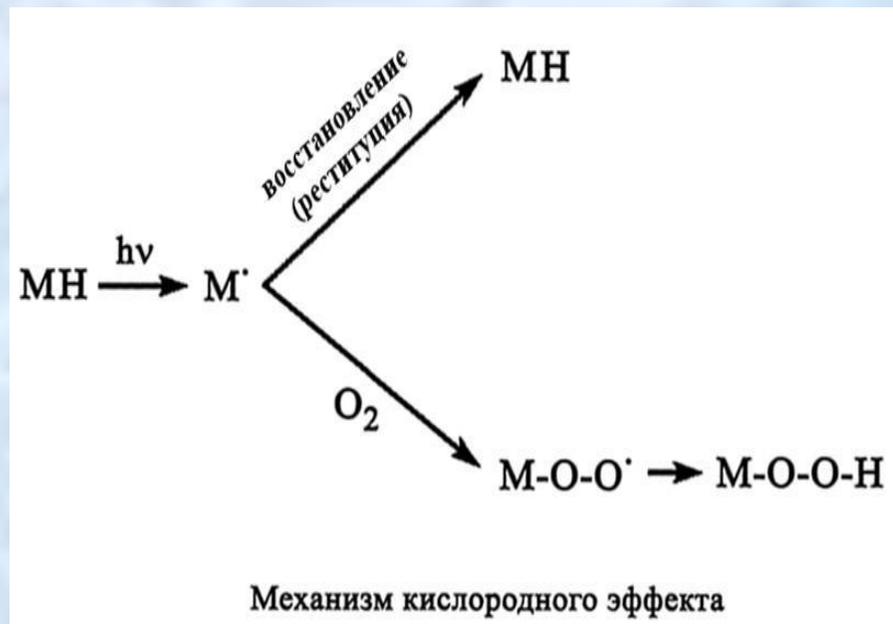
Гипотеза кислородной фиксации

В 1956 г. Т. Альпер и П. Говард-Фландерс высказали гипотезу о механизме кислородного эффекта, основанную на следующих положениях:

- а) в результате облучения мишени образуется ее активированное состояние;
- б) это активированное состояние мишени существует в течение очень короткого времени (несколько миллисекунд, не более 20 мс), а затем мишень возвращается в стабильное состояние (т.е. восстанавливается);
- в) в активированном состоянии мишень является очень реакционноспособной по отношению к кислороду;
- г) если во время облучения в среде присутствует кислород, то мишень в активированном состоянии взаимодействует с ним с образованием перекиси (гидроперекиси), т.е. происходит пероксидация мишени;

д) пероксидация мишени приводит к потере ее функциональных свойств (например, ферментативной активности и т.д.) и затрудняет ее репарацию (например, у молекулы ДНК) или вовсе делает ее невозможной. Повреждение становится нерепарируемым. Иными словами, кислород закрепляет («фиксирует») повреждение мишени.

Описанную гипотезу о механизме кислородного эффекта часто называют «гипотезой кислородной фиксации» или «гипотезой пероксидации мишени».



Значение кислородного эффекта при радиотерапии опухолей

Исследование кислородного эффекта имеет не только теоретическое, но и большое практическое значение.

В частности, это явление необходимо учитывать при радиотерапии злокачественных новообразований.

Понятно, что цель радиотерапии – убить опухолевые клетки и как можно меньше повредить нормальные ткани, окружающие опухоль.

Однако, применению облучения для удаления опухоли препятствует тот факт, что существенная часть популяции клеток опухоли является гораздо более устойчивой к действию облучения.

Это связано с тем, что в опухолях имеются гипоксические зоны, возникающие в результате гораздо худшего снабжения опухоли кровью по сравнению с нормальными тканями, что происходит по следующим причинам:

- 1) рост капиллярной сети не поспевает за быстрым ростом опухоли;
- 2) быстрое деление клеток опухоли приводит к периодическому сдавливанию имеющихся там капилляров и прекращению кровотока.

Парциальное напряжение кислорода (pO_2) в гипоксической зоне опухоли может составлять 1-10 мм рт. ст., тогда как в нормальных тканях – от 20 до 100 мм рт. ст.

Методы преодоления резистентности гипоксических клеток при радиотерапии опухолей

Для преодоления резистентности гипоксических клеток опухоли предложены различные методы:

- 1. Метод гипербарической оксигенации (метод оксибарорадиотерапии).**
- 2. Метод фракционированного облучения с учетом реоксигенации опухоли.**
- 3. Использование радиосенсибилизаторов гипоксических клеток.**
- 4. Применение ионизирующих излучений с высокой ЛПЭ (т. е. излучений, при действии которых отсутствует кислородный эффект).**

Помимо перечисленных имеются и другие методы сближения радиочувствительности клеток нормальных тканей и гипоксических клеток опухоли.

Метод оксигенорадиотерапии

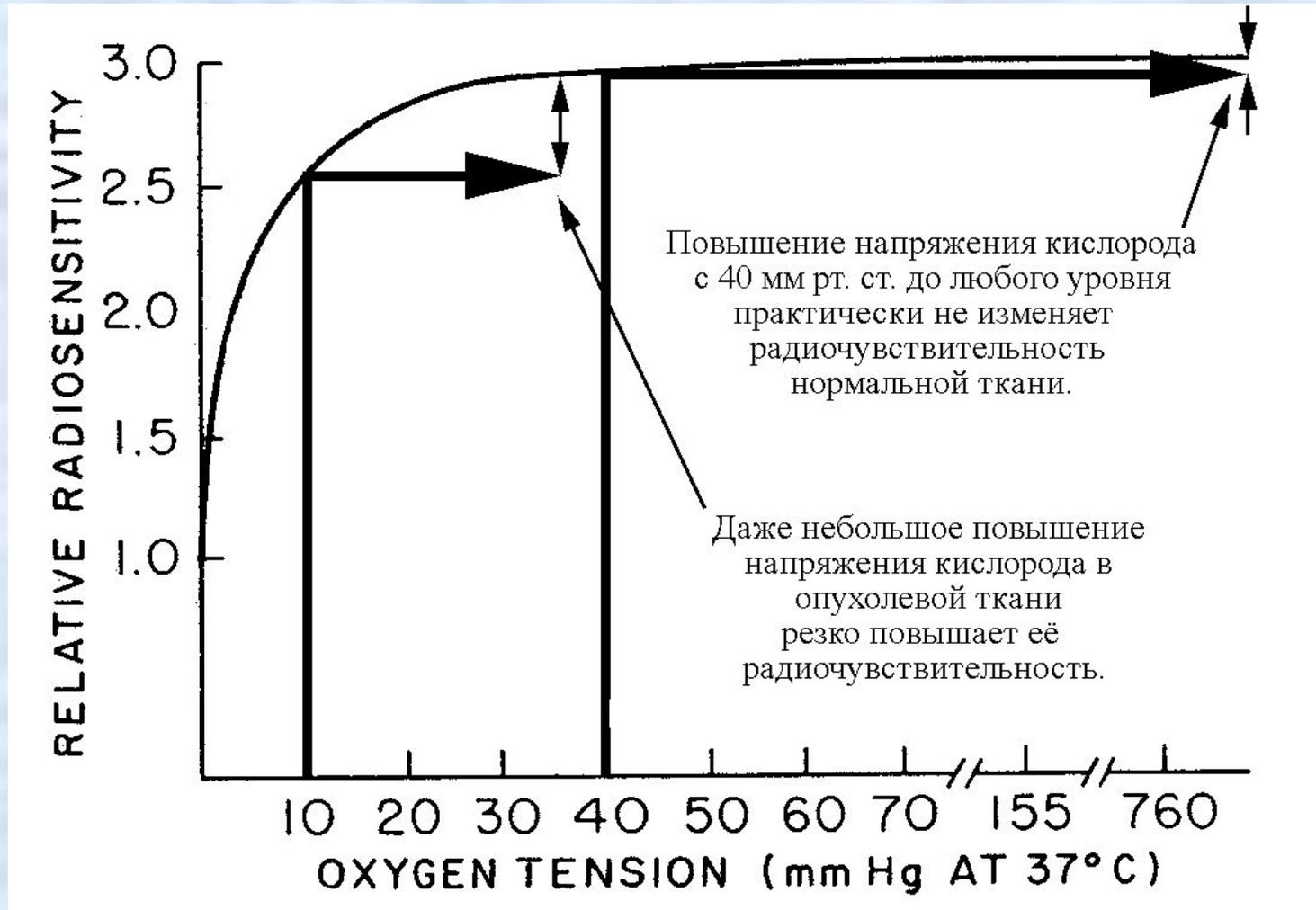
В 50-е годы прошлого века Л. Грей для повышения содержания кислорода в гипоксических опухолевых клетках предложил применять гипербарическую оксигенацию во время сеанса радиотерапии (помещение пациента в барокамеру и вдыхание чистого кислорода под давлением 2-3 атм.).

Основываясь на характере исследованной им зависимости ККУ от парциального напряжения кислорода (см. следующий слайд) он сделал вывод, что такое дополнительное повышенное оксигенирование практически не изменит радиочувствительность нормальных тканей, но существенно повысит радиочувствительность гипоксических опухолевых клеток (даже если прирост содержания кислорода в гипоксических зонах опухоли будет небольшим).

Применение оксигенорадиотерапии, действительно, повысило эффективность лечения некоторых видов опухолей (особенно опухолей головы и шеи).

Однако, в дальнейшем оказалось, что гипербарическая оксигенация приводит к увеличению содержания кислорода далеко не во всех опухолях.

Теоретическая основа метода оксибарорадиотерапии



Реоксигенация опухоли при фракционированном облучении

Другим подходом практического применения кислородного эффекта в радиотерапии опухолей является использование явления реоксигенации опухолевых клеток.

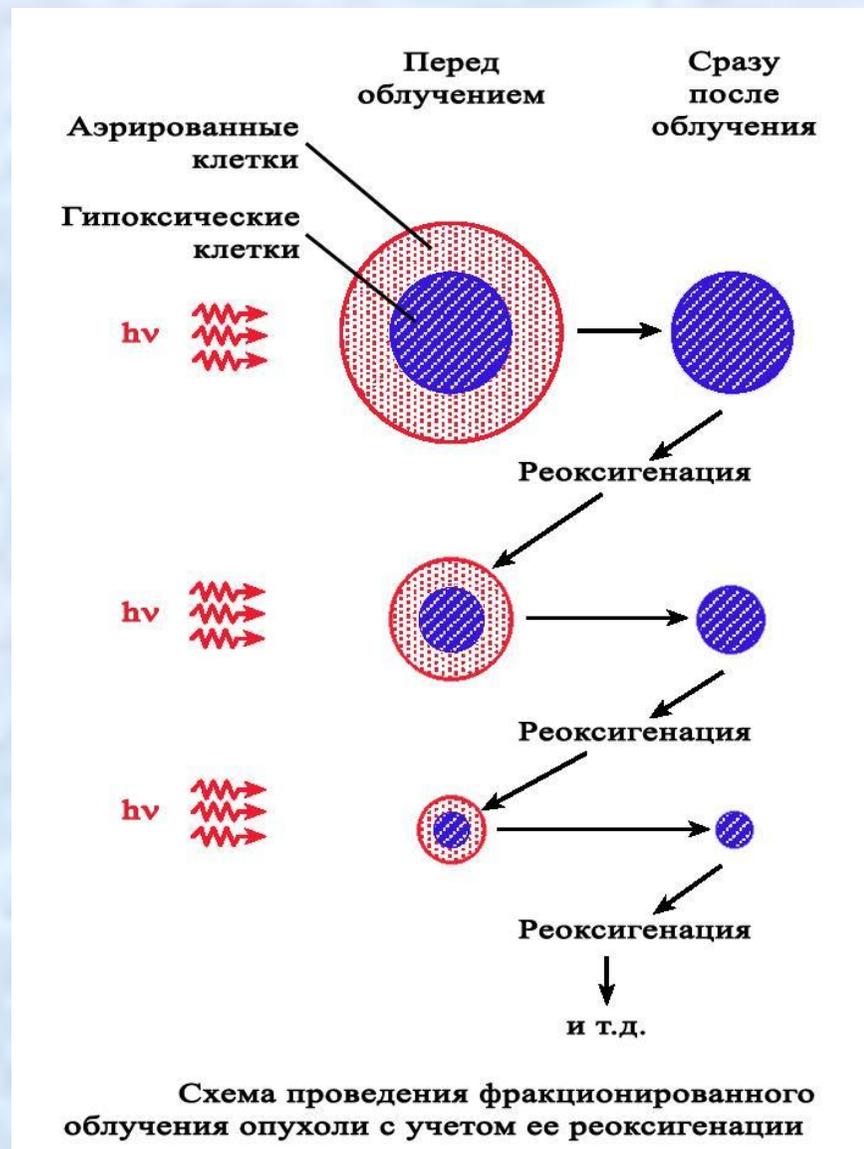
У экспериментальных животных в опухолях разных типов доля гипоксических клеток может варьировать от 0 до 50% (в среднем порядка 15%). У человека опухоли содержат по ориентировочным оценкам 10-15% гипоксических клеток. При действии облучения на опухоль гибнут, главным образом, аэрированные клетки опухоли, т.к. они более радиочувствительны.

Однако, через некоторый интервал времени популяция опухолевых клеток, состоящая сразу после облучения практически только из гипоксических клеток, восстанавливает соотношение гипоксических и аэрированных клеток на первоначальном уровне.

Это происходит в результате реоксигенации большей части выживших гипоксических клеток. Т.о., в опухоли вновь появляется фракция радиочувствительных аэрированных клеток, что позволяет опять применить облучение для их эффективного уничтожения. И так несколько десятков раз до полного уничтожения опухоли (см. схему на следующем слайде).

Схема проведения фракционированного облучения опухоли с учетом ее реоксигенации

На рисунке представлена схема проведения фракционированного облучения опухоли с учетом процесса реоксигенации.



Временной интервал для осуществления реоксигенации

Определяющим фактором для успешного применения ионизирующего излучения против опухолевых клеток является выявление того временного интервала, который необходим для их реоксигенации, т.е. выбор оптимального промежутка времени между фракциями облучения.

Оказалось, что время полной реоксигенации для различных видов опухолей может существенно различаться: для одних клеток оно может быть около 6 часов и даже менее, а для других – 1-3 суток и более.

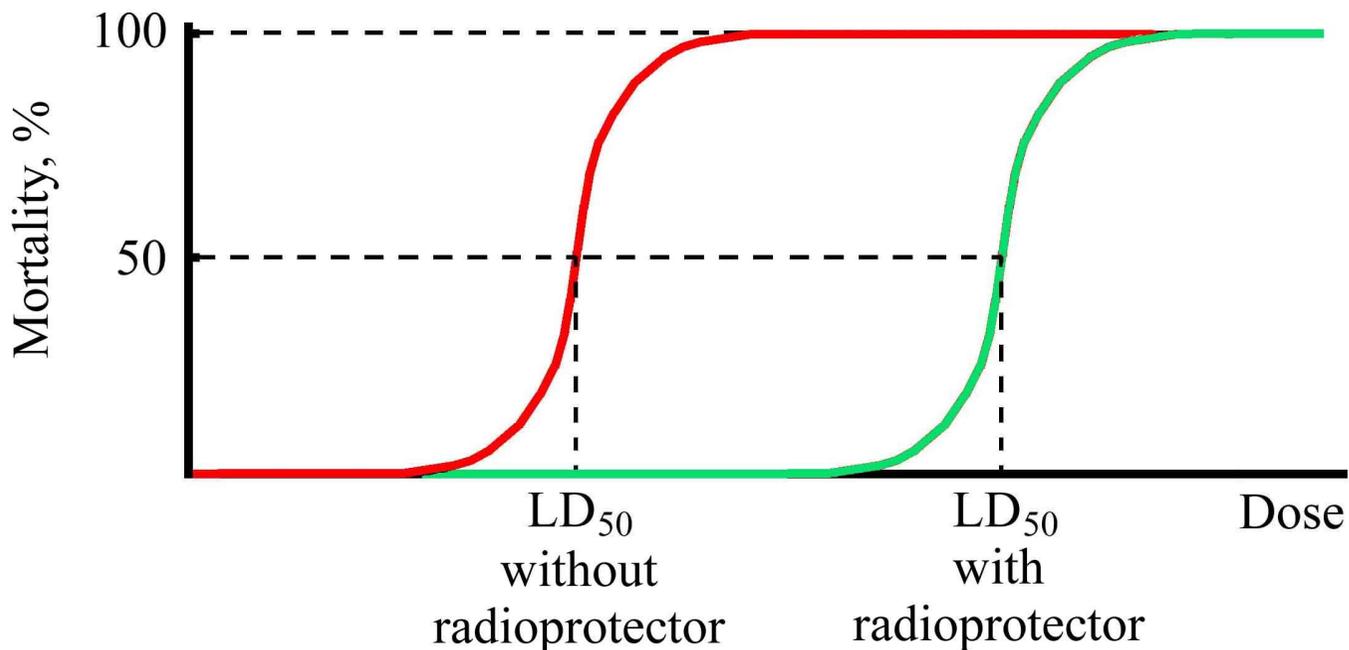
Клиническими исследованиями показано, что у большинства опухолей процесс реоксигенации длится 1-2 суток, что и определяет график проведения фракционированного облучения.

Установлено также, что радиотерапия неэффективна в отношении тех опухолей, в которых процесс реоксигенации не наблюдается.

Химическая противолучевая защита

Открытие радиопротекторов

В 1949 г. было сделано открытие, положившее начало новому и очень важному (в теоретическом и практическом плане) направлению в радиобиологии. Две группы исследователей независимого друг от друга обнаружили, что некоторые химические соединения при введении непосредственно перед облучением могут повышать радиоустойчивость животных. Такие химические соединения получили название «радиопротекторы» (или химические радиопротекторы).



Радиопротекторы вызывают сдвиг кривой гибели животных в область более высоких доз облучения.

Некоторые вопросы терминологии

Строго говоря, термин «радиопротекторы» можно применять только в отношении тех химических соединений, которые проявляют эффективность только при введении ДО ОБЛУЧЕНИЯ. Именно поэтому их также часто называют химическими радиопрофилактическими средствами (химическими радиозащитными средствами, профилактическими противолучевыми химическими средствами).

Наибольшую эффективность радиопротекторы проявляют при введении за 10-30 минут до облучения. При введении после облучения эти вещества обычно не вызывают увеличение устойчивости к облучению.

Вещества, которые снижают радиационное поражение при введении ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ, иногда называют радиотерапевтическими средствами. Однако, это название в отношении веществ, снижающих радиационное поражение при введении после облучения, не получило широкого распространения, т.к. данный термин уже использовался для обозначения лекарственных средств, в состав которых входят радионуклиды и действие которых основано на лечебном действии ионизирующего излучения, исходящего от этих радионуклидов. Поэтому правильнее использовать термин «терапевтические противолучевые средства».

Иногда все противолучевые химические средства, независимо от того, когда их вводят в организм – до или после облучения – называют радиопротекторами (что, строго говоря, неверно).

ФИД – основной показатель эффективности радиопротекторов

В качестве основного показателя эффективности действия радиопротекторов используют т.н. "фактор изменения дозы" (ФИД; *англ.* Dose Modification Factor, DMF), равный отношению полуметальных доз при введении радиопротектора и без радиопротектора:

$$\text{ФИД} = \frac{\text{ЛД}_{50} \text{ при введении радиопротектора}}{\text{ЛД}_{50} \text{ без радиопротектора}}$$

Ранее данный показатель назывался ФУД – фактор уменьшения дозы (*англ.* Dose Reduction Factor, DRF).

В большинстве случаев при расчете эффективности радиопротекторов используются значения $\text{ЛД}_{50/30}$, т.е. значения полуметальной дозы рассчитывают по 30-дневной выживаемости. Это означает, что оценивается эффективность радиопротекторов против кроветворного синдрома.

Когда хотят оценить эффективность радиопротекторов против кишечного синдрома, рассчитывают $\text{ЛД}_{50/7}$, $\text{ЛД}_{50/8}$ или $\text{ЛД}_{50/10}$.

Классификация радиопротекторов по эффективности

В зависимости от значения ФИД радиопротекторы подразделяют на:

- слабые радиопротекторы – $\text{ФИД} < 1.2$;
- умеренные радиопротекторы – $1.2 < \text{ФИД} < 1.5$;
- сильные радиопротекторы – $\text{ФИД} > 1.5$.

Наиболее эффективные радиопротекторы имеют значения ФИД от 2.0 до 2.7 в отношении кроветворного синдрома (при облучении мышей рентгеновским или γ -излучением).

Эффективность радиопротекторов снижается с увеличением линейной передачи энергии (ЛПЭ) излучения. Радиопротекторы против α -излучения не существуют.

Значения ФИД для противолучевых средств, эффективных при введении после облучения, почти никогда не превышают 1.3.

Терапевтический индекс – вторая по важности характеристика радиопротекторов

Еще одной очень важной характеристикой радиопротекторов (а точнее – показателем безопасности применения), как и для других лекарственных препаратов, является т.н. «терапевтический индекс».

Терапевтический индекс (ТИ, англ. TI) рассчитывается как соотношение токсической дозы препарата (обычно $СД_{50}$, т.е. доза препарата, вызывающая гибель 50% животных) к эффективной дозе препарата (т.е. радиозащитной дозе препарата – в случае радиопротекторов).

Таким образом, ТИ радиопротектора показывает во сколько раз его эффективная (радиозащитная) доза ниже его токсической дозы. Иными словами, ТИ является показателем широты безопасного действия препарата (в данном случае – радиопротектора).

Чем шире ТИ, тем безопаснее использование лекарственного препарата (в данном случае – радиопротектора). Чем уже ТИ, тем опаснее использование препарата и тем выше вероятность появления побочных неблагоприятных эффектов от его применения.

К сожалению, многие радиопротекторы (а точнее – большинство) проявляют максимальную эффективность при их введении в дозах, близких к токсическим, т.е. ИМЕЮТ НИЗКИЕ ЗНАЧЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ИНДЕКСА.

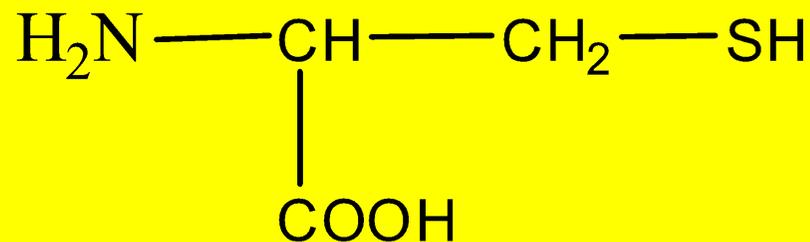
Первые обнаруженные радиопротекторы

Первыми химическими препаратами, обладавшими радиозащитной эффективностью, были следующие соединения:

- цианистый натрий (1949 г., бельгийские исследователи А. Нерве & З. Васц)



- сульфгидрильная аминокислота цистеин (1949 г., американские исследователи Н. Патт et al.)



После этого в радиобиологии начался длившийся более 20 лет исследовательский бум в области поиска и направленного синтеза химических соединений, обладающих радиозащитными свойствами. Разработка эффективных противолучевых химических средств стала одной из основных целей радиобиологии.

Массированный поиск радиопротекторов

За последующие 20-30 лет после открытия первых радиопротекторов в разных странах мира было исследовано несколько сот тысяч химических соединений на радиозащитную эффективность.

Среди них было обнаружено около 50 тысяч химических соединений, обладавших в той или иной степени радиозащитными свойствами.

Но, к сожалению, только несколько из них могли быть использованы в отношении человека (и то лишь в специфических контролируемых условиях).

Наиболее интенсивные исследования радиопротекторов проводились в годы холодной войны (1950-1970 гг.) в США и СССР.

В США основные исследования с 1959 по 1973 гг. проводились в Исследовательском армейском институте имени Уолтера Рида (Walter Reed Army Institute of Research), где было синтезировано и протестировано на радиозащитную эффективность примерно 4400 химических соединений.

В СССР основные исследования радиопротекторов проводились в Институте биофизики Министерства здравоохранения.

Области возможного применения радиопротекторов

- 1. Использование радиопротекторов для защиты военного персонала от воздействия ионизирующего излучения при применении ядерного оружия.**
- 2. Использование радиопротекторов как инструмента при исследовании механизмов биологического действия ионизирующего излучения.**
- 3. Использование радиопротекторов для защиты нормальных тканей от ионизирующего излучения при радиотерапии злокачественных опухолей.**
- 4. Использование радиопротекторов для защиты космонавтов от ионизирующего излучения при космических полетах.**
- 5. Использование радиопротекторов для защиты работников и населения от ионизирующего излучения при техногенных авариях.**

Основные предполагаемые механизмы действия радиопротекторов

Среди основных предполагаемых механизмов действия радиопротекторов следует отметить следующие:

- 1) перехват свободных радикалов и активных форм кислорода (АФК)**
- 2) индукция гипоксии в организме,**
- 3) обратимое ингибирование синтеза ДНК,**
- 4) образование смешанных дисульфидов (защита сульфгидрильных групп жизненно важных биомолекул),**
- 5) ускорение реституции (восстановления) ДНК благодаря способности радиопротекторов легко отдавать (донировать) атом водорода,**
- 6) ускорение регенерации системы кроветворения,**
- 7) ингибирование апоптоза.**

Существовало и существует довольно много гипотез и о других возможных механизмах действия радиопротекторов.

Основные принципы классификации радиопротекторов

Классификацию радиопротекторов обычно проводят по следующим принципам:

- по эффективности (по величине ФИД),
- по механизмам действия,
- по химической структуре или наличию определенных химических групп,
- по длительности действия,
- по происхождению (искусственно синтезированные или природного происхождения),
-

Основные химические классы радиопротекторов

Вещества, обладающие радиозащитными свойствами, обнаружены среди очень многих классов химических соединений.

Однако, большинство наиболее эффективных радиопротекторов принадлежит к 2-м классам химических соединений:

- амиотиолам (меркаптоалкиламинам) и другим серосодержащим соединениям и
- индолилалкиламинам.

Аминотиолы и другие серосодержащие радиопротекторы

Простейшим эффективным радиопротектором из класса аминотиолов является 2-меркаптоэтиламин (другие названия – МЭА, цистеамин, меркамин):



МЭА является продуктом декарбоксилирования аминокислоты цистеина и более эффективным радиопротектором (ФИД = 1,7) чем цистеин.

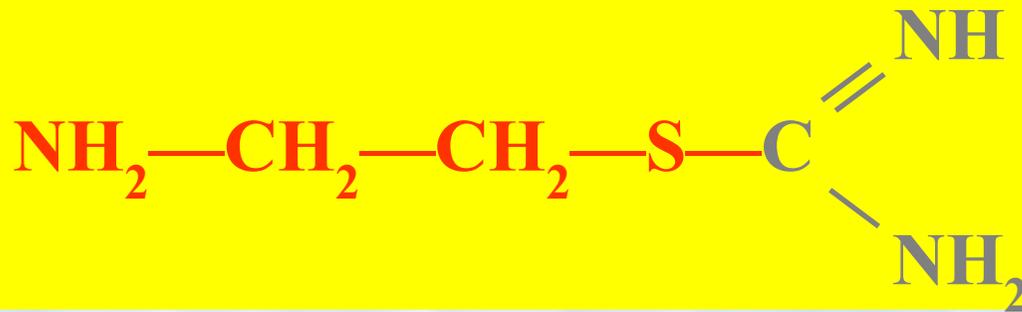
О радиозащитной эффективности МЭА впервые сообщил З. Бак в 1952 г. Обнаружение радиозащитных свойств МЭА стимулировало огромный интерес к поиску эффективных радиопротекторов среди серосодержащих химических соединений, особенно среди аналогов МЭА, в которых варьировало число атомов углерода между атомами серы и азота, а также подвешивались различные химические группировки к аминной и тиольной группе:



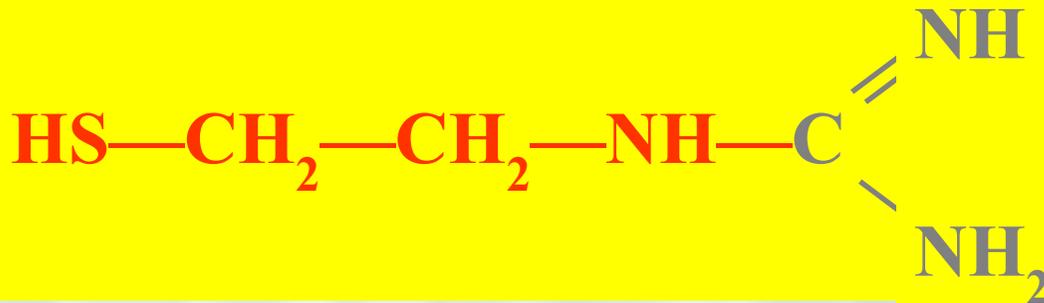
Оказалось, что наиболее эффективными радиопротекторами были соединения с 2 или 3 углеродными атомами между N и S.

АЭТ и МЭГ

Среди этих аналогов МЭА было найдено много эффективных радиопротекторов, например:



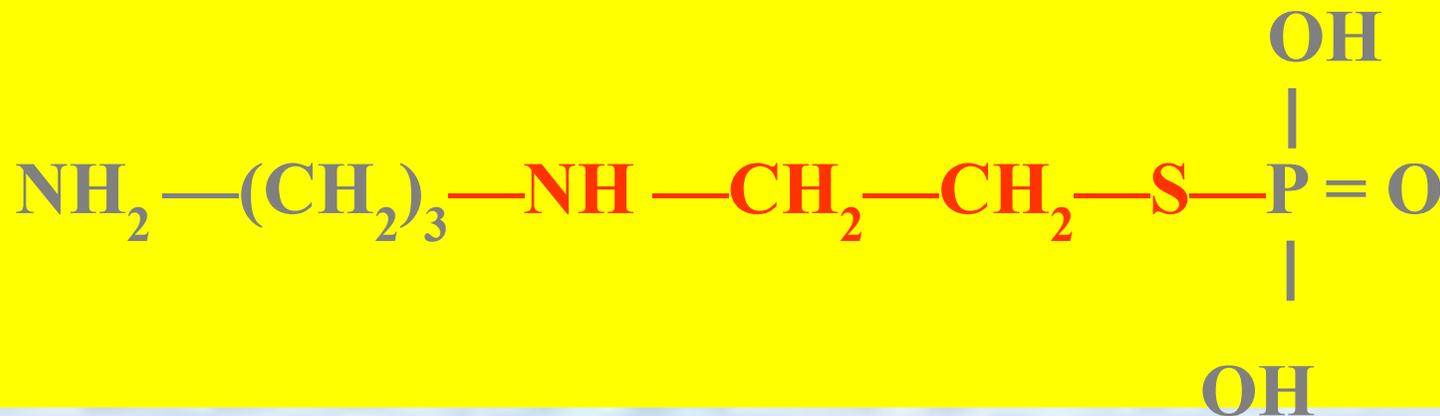
Аминоэтилизотиуроний
(АЭТ). ФИД = 1.7.



Меркаптоэтилгуанидин
(МЭГ). ФИД = 1.7.

Гаммафос (1)

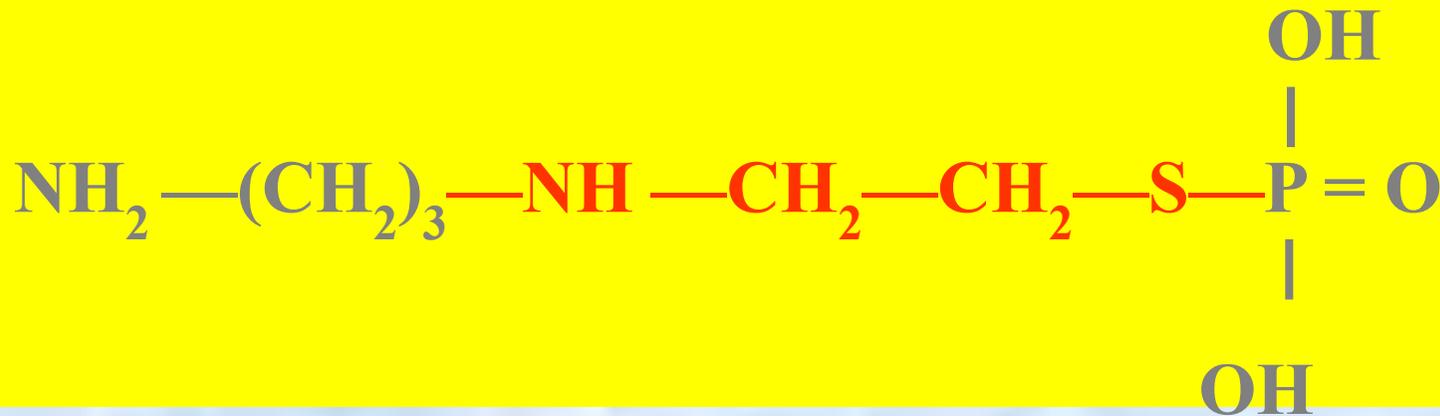
Наиболее известным эффективным радиопротектором среди меркаптоалкиламинов является гаммафос (известный также под названиями WR-2721, амифостин, этиофос):



Этот радиопротектор был синтезирован в 1969 г. в США в Исследовательском армейском институте имени У.Рида (Walter Reed Army Institute of Research) и получил известность как номерной препарат WR-2721 (буквы WR означают Walter Reed – врач, герой Гражданской войны в США, именем которого назван этот институт).

Гаммафос (2)

В этом радиопротекторе тиольная группировка прикрыта фосфатной группой, что повышает стабильность препарата (защищает SH-группу от окисления до поступления препарата внутрь клетки), увеличивает его поступление в клетки и понижает токсичность. Однако, все же токсичность этого препарата довольно высока (TI = 1,4).



До настоящего времени этот препарат остается одним из самых эффективных из известных радиопротекторов: при внутрибрюшинном введении мышам за 30 минут до γ -облучения ФИД = 2,7 для 30-дневной выживаемости (т.е. в отношении гибели в результате кроветворного синдрома) и ФИД = 1,8 для 7-дневной выживаемости (т.е. в отношении гибели в результате кишечного синдрома).

Гаммафос (3)

У человека основными неблагоприятными побочными эффектами гаммафоса являются:

- 1) тошнота и рвота,**
- 2) понижение кровяного давления.**

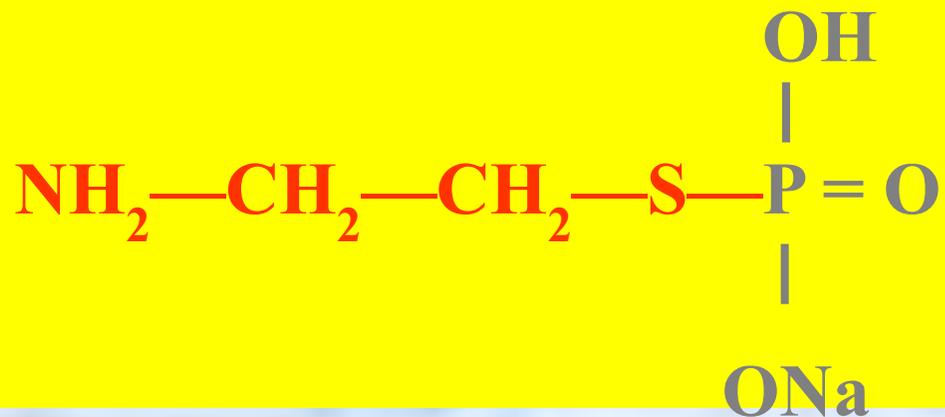
Вследствие этого использование гаммафоса возможно лишь под непосредственным медицинским контролем.

Поэтому использование гаммафоса в полевых условиях для защиты военного персонала при воздействии ядерного оружия невозможно.

Тем не менее, данный препарат известен тем, что находился в аптечке американских астронавтов при их полетах на Луну и его использование предполагалось в случае сильного повышения солнечной радиации.

Цистафос (WR-638)

Среди других известных радиопротекторов из класса меркаптоалкиламинов можно выделить также WR-638 (цистафос):



Этот радиопротектор имеет ФИД = 2.1 для 30-дневной выживаемости и ФИД = 1.6 для 7-дневной выживаемости.

Механизмы радиозащитного действия аминотиолов и других меркаптоалкиламинов

Предполагают, что основными механизмами радиозащитного действия аминотиолов и других меркаптоалкиламинов являются следующие:

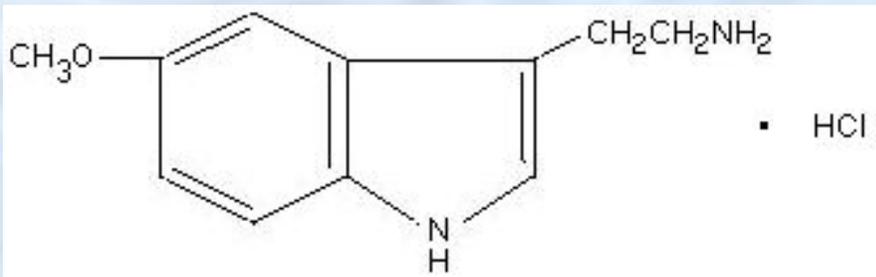
- перехват свободных радикалов,
- реституция поврежденных молекул ДНК путем донирования атома водорода.

Оптимальные условия для проявления радиозащитной эффективности на мелких лабораторных животных:

- введение внутривенно или внутрибрюшинно,
- интервал времени между введением и облучением – 15-30 минут.

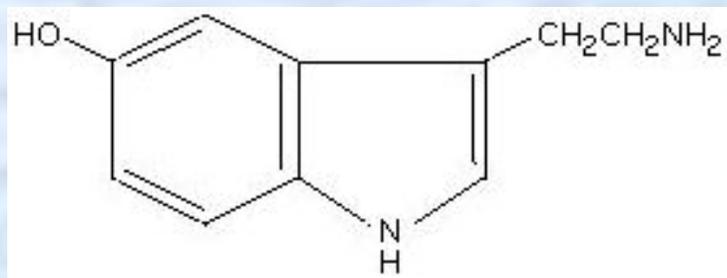
Радиопротекторы из класса индолилалкиламинов

Среди препаратов из класса индолилалкиламинов в качестве наиболее эффективных радиопротекторов можно выделить производные триптамина:



Мексамин (хлорид 5-метокситриптамина).

ФИД = 1.7 для 30-дневной выживаемости у мышей.



Серотонин (5-гидрокситриптамина).

ФИД = 1.7 для 30-дневной выживаемости у мышей.

Сам триптамин проявлял слабую радиозащитную эффективность.

Радиозащитное действие индолилалкиламинов связывают, в основном, с индукцией гипоксии в организме вследствие их вазоконстрикторного (сосудосуживающего) действия и, возможно, с перехватом свободных радикалов.

Взрыв энтузиазма в разработке радиопротекторов в 1950-1960-е гг.

В течение 20 лет после открытия первых радиопротекторов (т.е. в 1950-1960-е гг.) поиск новых эффективных радиопротекторов стал одной из основных целей радиобиологии.

В этот период времени многие радиобиологи работали с огромным энтузиазмом и верой в скорый успех в надежде разработать новые эффективные и нетоксичные радиопротекторы с широкими возможностями использования.

Именно в это время возникло понятие «идеального радиопротектора», как цели, на которую следует ориентироваться при поиске и разработке новых эффективных радиопротекторов.

Понятие «идеального радиопротектора»

Идеальный радиопротектор (для случая общего облучения) должен:

- 1) проявлять высокую радиозащитную эффективность (ФИД = 2-3);
- 2) быть эффективным не только против острого, но и против хронического облучения;
- 3) быть эффективным при пероральном приеме (или по крайней мере при внутримышечном введении) и быстро распределяться по органам и тканям;
- 4) проявлять высокую эффективность уже через несколько минут после введения и сохранять ее в течение длительного времени после введения;
- 5) быть эффективным против различных видов ионизирующего излучения;
- 6) не проявлять неблагоприятных побочных эффектов, т.е. должен быть нетоксичным;
- 7) быть недорогим;
- 8) быть химически стабильным (долго храниться в обычных условиях) и удобным для применения.

Спад в исследованиях радиопротекторов в 1980-е годы

Однако, к началу 1980-х гг. количество исследований в направлении поиска и разработки новых синтезированных химических радиопротекторов стало резко снижаться, т.к. стало ясно, что возможность эффективного применения радиопротекторов в военных целях весьма иллюзорна.

Поэтому в начале 1980-х гг. финансирование (которое осуществлялось, в основном, через военные ведомства) исследовательских проектов в области разработки новых средств химической противолучевой защиты резко сократилось и период интенсивного поиска эффективных радиопротекторов, длившийся примерно 30 лет, завершился.

Новые основные направления разработки фармакохимических противолучевых средств

С 1980-х гг. в радиобиологии произошел сдвиг исследовательских интересов от химических радиопротекторов к различным биологически активным препаратам природного происхождения, обладающим профилактической или терапевтической противолучевой эффективностью.

Главными преимуществами противолучевых средств природного происхождения считают:

- 1) меньшую токсичность и**
- 2) более длительный временной интервал проявления противолучевой активности.**

Основной недостаток – относительно низкая противолучевая эффективность.

Основные группы противолучевых средств природного происхождения

Препараты природного происхождения, обладающие противолучевыми свойствами, обнаружены во многих группах биологически активных веществ, включая:

- Антиоксиданты (α -токоферол, β -каротин, супероксиддисмутаза и др.).
- Полисахариды (из дрожжей, морской водоросли ламинарии, корня женьшеня и др.).
- Цитокины (низкомолекулярные регуляторные белки IL-1, TNF- α и др.).
- Эйкозаноиды (простагландины, их синтетические производные и др.).
- Гормоны (и их синтетические производные).
- Различные экстракты и гидролизаты растительного и животного происхождения.

Биологические эффекты малых доз облучения

Понятие малых доз облучения

Понятие «малых доз» исторически менялось неоднократно.

Даже в настоящее время нет единого общепринятого определения понятия «малых доз» (для человека и других млекопитающих).

В зависимости от подходов (микродозиметрического, радиобиологического, медицинского), которые применяются для определения этого понятия разными исследователями, верхняя граница «малых доз» может различаться в 1000 раз.

До недавнего времени верхней границей малых доз (при медицинском, или как его еще называют – эпидемиологическом подходе) считали 200 мЗв.

В настоящее время (ориентировочно последние 10 лет) верхней границей малых доз все чаще стали называть 100 мЗв. Главный критерий довольно размыт – «безопасное применение радиации».

Эффекты малых доз

Под действием малых доз ионизирующего излучения могут наблюдаться такие радиобиологические эффекты как:

- 1) радиоиндуцированный адаптивный ответ,
- 2) радиоиндуцированная геномная нестабильность,
- 3) эффект свидетеля (bystander effect).

Исследование этих эффектов в последние 10-20 лет стало одним из важнейших направлений в радиобиологии.

Радиоиндуцированный адаптивный ответ

Радиоиндуцированный адаптивный ответ – это радиобиологический феномен, заключающийся в увеличении радиоустойчивости биологических объектов к большим, повреждающим дозам ионизирующего излучения после предварительного воздействия малыми дозами.

Предварительную малую дозу облучения называют адаптирующей, или предварительной, а большую повреждающую дозу – разрешающей, или повреждающей. Радиоадаптивный ответ наблюдается у бактерий, дрожжевых клеток, у клеток различных растений и животных. Особенности радиоадаптивного ответа являются:

- а) многократные различия в величинах адаптирующей и повреждающей доз облучения,
- б) наличие определенного фиксированного интервала времени между двумя облучениями, за пределами которого эффект не наблюдается,
- в) зависимость эффекта от мощности адаптирующей дозы облучения.

Открытие радиоадаптивного эффекта

В 1984 г. итальянский исследователь Оливери с сотрудниками обнаружили, что предварительное облучение культуры клеток лимфоцитов в малых дозах 1-20 сГр увеличивает их радиорезистентность к большим повреждающим дозам рентгеновского облучения.

При этом при увеличении адаптивной дозы до 50 сГр данный эффект не наблюдался.

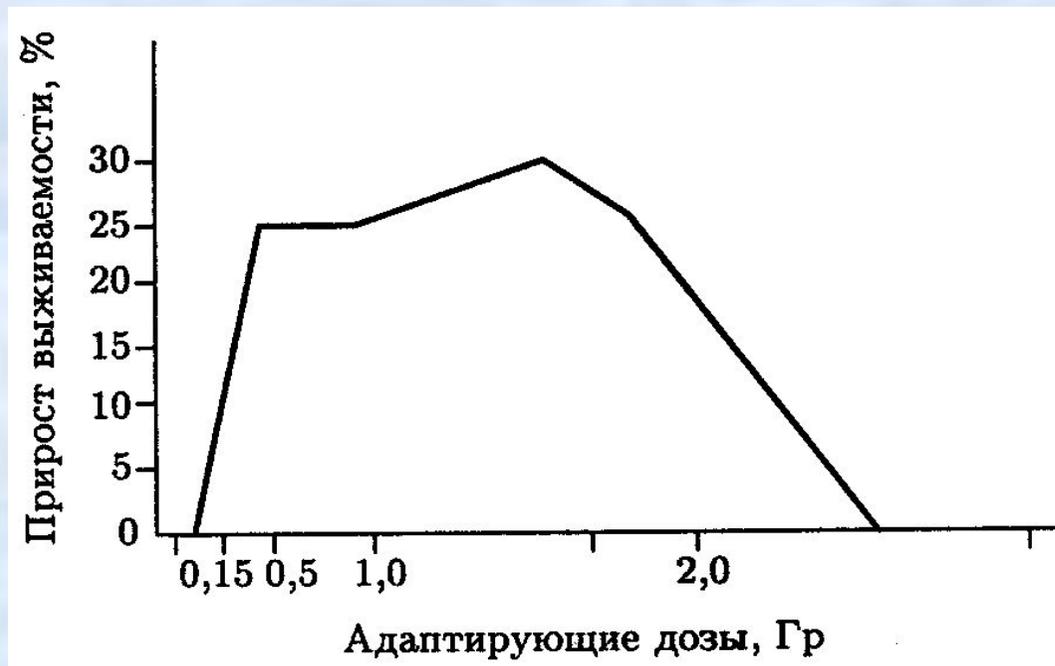
Подобные результаты на различных клетках были получены во многих лабораториях.

Радиоадаптивный ответ на животных

На рисунке представлен пример радиоадаптивного ответа, полученного на мышах при их облучении повреждающей дозой 6 Гр после предварительного воздействия различных адаптирующих доз (от 0.1 до 2.5 Гр).

Как видно, резкий подъём радиорезистентности мышей (увеличение выживаемости до 25-30%) наблюдался при адаптирующих дозах до 0.5 Гр, в то время как после 2 Гр эффект резко снижался.

Таким образом, для реализации радиоадаптивного ответа важное значение имеет величина предварительной дозы облучения, которая подвержена колебаниям в зависимости от объекта исследований.



Механизм радиоадаптивного эффекта

Адаптивный ответ проявляется не сразу после воздействия предварительной дозы: необходимо время для его формирования.

Для большинства исследованных объектов максимальный эффект достигался спустя 6 ч после применения адаптирующей дозы облучения.

Состояние повышенной устойчивости культивируемых клеток сохраняется не менее 24 ч, а у лимфоцитов человека – около 72 ч.

При облучении животных адаптивный ответ наблюдался в течение нескольких недель и месяцев.

Механизмом радиоадаптивного эффекта считают индукцию защитных систем клетки (т.е. антиоксидантных и ДНК-репарационных систем) под действием адаптирующей дозы.

Воздействие повреждающей дозы осуществляется при этом на фоне повышенной мобилизации защитных ресурсов клетки.

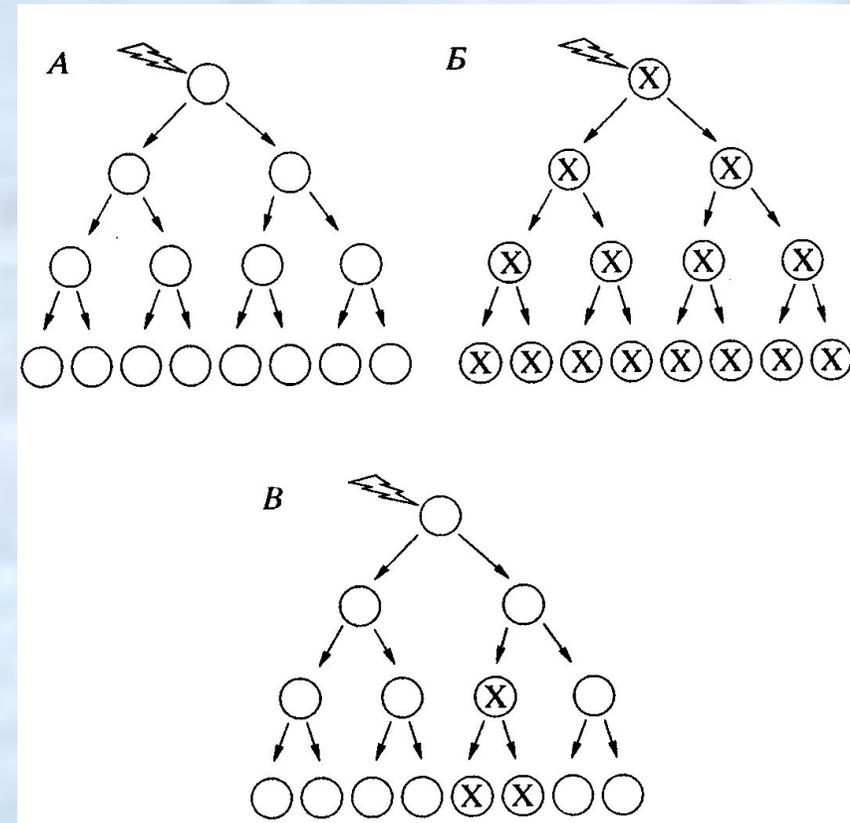
Радиоиндуцированная нестабильность генома

Данный феномен характеризуется тем, что часть клеток, выживших после облучения, может давать функционально измененное потомство, в котором с высокой частотой на протяжении многих поколений возникают aberrации хромосом и генные мутации.

Согласно традиционной модели возникновения мутаций в облученных клетках большинство клеток не испытывает мутаций (А) и лишь в редких клетках возникает мутация, которая передаётся затем всему потомству (Б).

В случае геномной нестабильности радиация не вызывает мутацию в облучённой клетке, но увеличивает частоту, возникновения мутаций в отдаленном потомстве облученной клетки (В).

Хотя на схеме это происходит рано, в действительности такие мутации возникают через 10-30 циклов деления клетки после облучения.



«Эффект свидетеля» («bystander effect»)

В 1992 г. Нагасава и Литтл впервые обнаружили, что облучение α -частицами культивируемых клеток яичника китайского хомячка (СНО) в дозах, при которых только 1-2% клеток пересекаются α -частицами и получают непосредственное радиационное воздействие, повышенная частота генетических изменений (сестринского хроматидный обмен) наблюдалась примерно у 30% клеток .

Клетки, на которые излучение непосредственно не действовало, но в которых возникли те или иные эффекты, свойственные для облученных клеток, были названы «клетками-свидетелями», а сам эффект получил название «эффект свидетеля» («bystander effect»), или «коммунальный эффект».

Механизм возникновения эффекта свидетеля

Таким образом, эффект свидетеля заключается в поражении необлучённых клеток (клеток-свидетелей) посредством секреции из облучённых клеток (клеток-мишеней) каких-то токсических и сигнальных факторов.

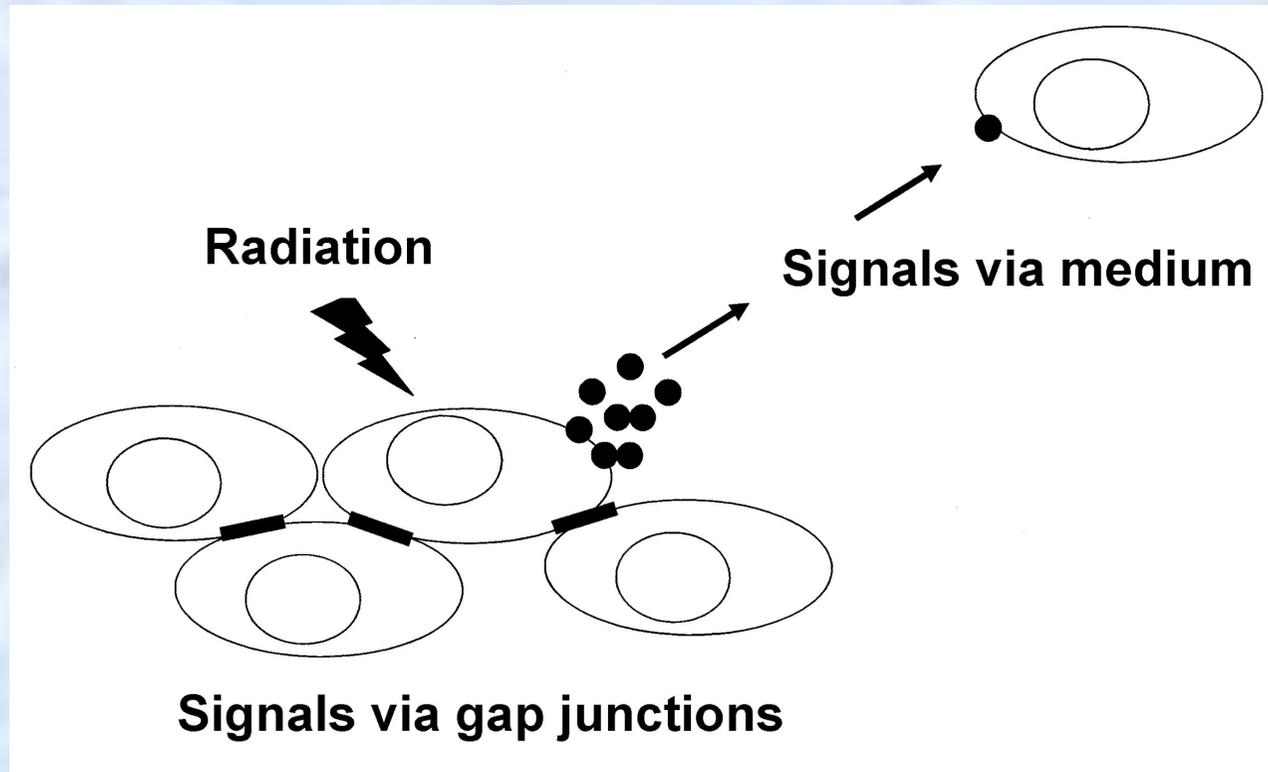
Обнаружено, что в состав этих секретлируемых веществ могут входить активные формы кислорода (АФК), в том числе и азотсодержащие, цитокины (интерлейкины IL1 и IL6, TNF- α , TGF- β), продукты окисления арахидоновой кислоты и другие биологически активные соединения.

Выделившиеся активные продукты проникают в необлучённые клетки и, накапливаясь в достаточных концентрациях, вызывают квазилучевые ответные реакции, т.е. цитогенетические и морфологические изменения, сходные с наблюдаемыми в самих облучённых клетках.

Пути межклеточного взаимодействия

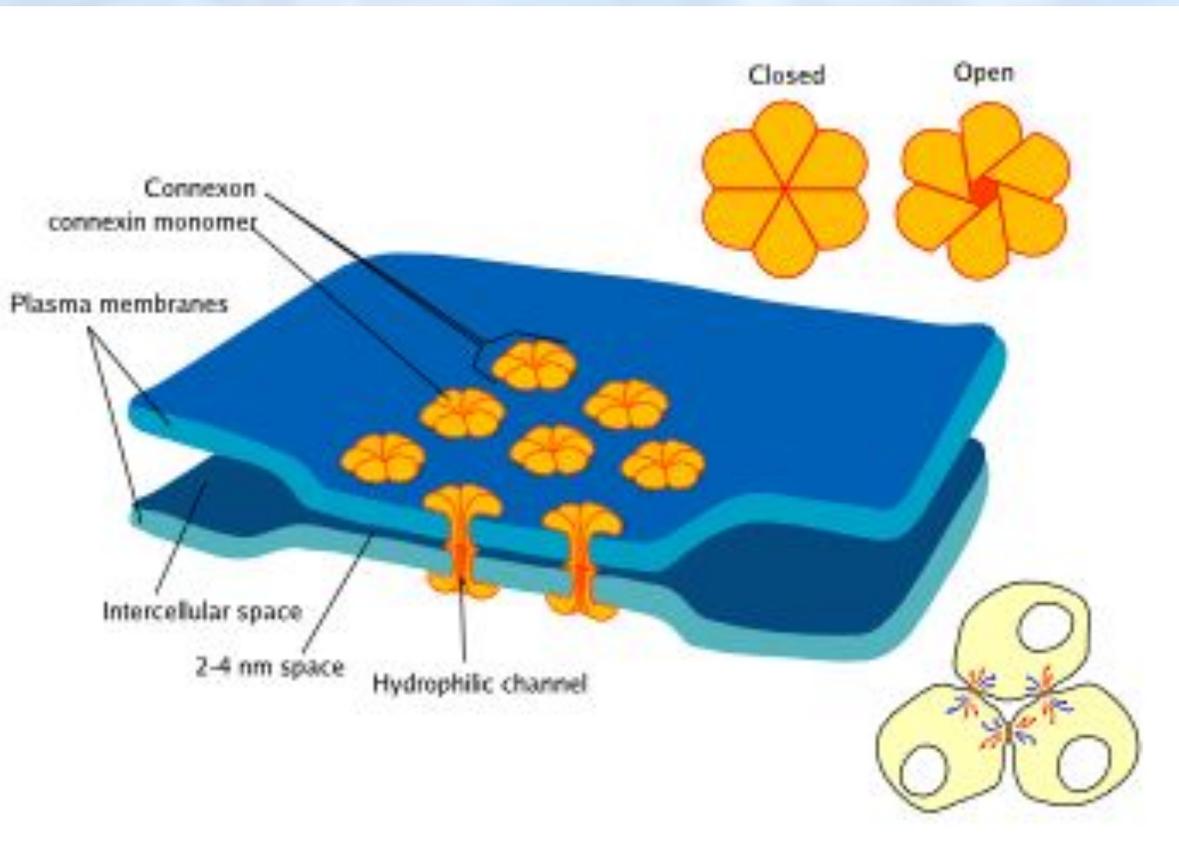
Предполагается, что межклеточное взаимодействие может быть осуществлено:

- 1) путем непосредственного контакта,
- 2) опосредованно через среду, в которой находятся облучённые клетки-мишени и необлучённые клетки-свидетели.



Роль межклеточного контакта

В работах Литтл с сотрудниками было обнаружено, что проведение сигналов повреждения от необлучённых к необлучённым клеткам в плотных культурах клеток (непосредственный контакт) происходит с помощью «щелевидного контакта» (gap-junction intercellular communication), который осуществляется с участием мембранного белка коннексина 43.



Гексамерные единицы этого белка образуют в мембране клетки т.н. коннексон, который может соединиться с коннексоном соседней клетки и образовать между клетками щелевидный канал через который происходит диффузия ионов и небольших молекул из клетки в клетку.

В мутантных клетках, у которых отсутствовал ген коннексина 43, эффект свидетеля не наблюдался.

Обнаружение эффектов малых доз – важная веха в развитии радиобиологии

Существование радиоиндуцированного адаптивного ответа, радиоиндуцированной нестабильности генома и эффекта свидетеля указывает на важную роль биологически активных соединений, секретлируемых облученными клетками, в формировании общей реакции организма на облучение.

Обнаружение радиоиндуцированного адаптивного ответа, радиоиндуцированной нестабильности генома и эффекта свидетеля является важной вехой в развитии представлений о биологическом действии ионизирующих излучений.