

РАДИОПРОТЕКТИВЕН ЕФЕКТ НА ПОЛИФЕНОЛИТЕ ОТ КРЪВЕН ЗДРАВЕЦ /GERANIUM SANGUINEUM - L/

Георги Велев, Ст. Иванчева ¹, Р. Лазаров ²

Ботанически институт при БАН, Клиника по радиология при НОЦ.

Antiradiation effect of poliphenols from Geranium sanguineum – L.

G. Velev, St. Ivancheva ¹, R. Lazarov ².

Botanical Institute Bulgarien Academy of Sciences, Department of radiology of NOC.

РЕЗЮМЕ. Разработването на стандартизирани препарати от натурални продукти, имащи радиопротекторен ефект, подобават все по-голямо значение в профилактирането на контингенти, получаващи по-високи дози йонизиращо облъчване или евентуална възможност да получат такива.

В първата група визираме:

1. Онкоболните, на които се провежда лъчетерапия.
2. Групите, които извършват зареждането на реакторите в АЕЦ с гориво.
3. Военни формирования, намиращи се на “горещи” точки на планетата, където се използват някакъв вид ядрени боеприпаси.

Втората група са:

1. Медицинският персонал, работещ в отделенията и клиниките по образна диагностика, рентгенология и радиология.
2. Хората, работещи в центрове с гама – облъчватели.
3. Работещите в АЕЦ и живеещите в близост.

Идеята на това проучване е да се получи стандартен препарат с радиозащитен ефект, с ниска или практически отсъстваща токсичност, който може да се приема продължително време. Използваните у нас и в чужбина синтетични радиопротектори / WR – 2721, ОК – 78 /, са високо токсични и това не позволява продължителното им прилагане. Стандартният продукт, получен след постепенна екстракция с етилов алкохол и последващо сублимационно сушене, наречен “Герисан” /GS/, изследвахме основно при профилактична схема на приложение на мишки, облъчени с 10 Gy гама-лъчи. Проследихме преживяемост ендогенни далачни колони и фагоцитарна активност. Профилактично – терапевтична схема приложихме при плъхове, облъчени с 4 Gy гама лъчи, на които изследвахме кръвни показатели.

GS приложихме и при онкоболни, на които се провежда лъчетерапия.

GS, прилаган превантивно, увеличава пострадиационната преживяемост при мишки, подпомага пострадиационното възстановяване на хемопоезата при плъхове и влияе върху бързото възстановяване на Т-лимфоцитите при онкоболни, на които се прилага лъчетерапия.

Ключови думи: йонизираща радиация, радиопротекция, Geranium Sanguineum, хемопоеза, фагоцитарна активност.

2

Използването на биологично активни вещества от натурални продукти дава нови възможности на съвременната фармакология. А именно, да създава алтернатива на синтетичните препарати, които обикновено са много токсични. Известни са синтетични радиопротектори като WR – 2721, ОК-78 /5/. Не случайно в аптеките в САЩ над 70% от предлаганите препарати са с природен произход. Защитата на човешкия и животинските организми от йонизиращите лъчения интересува учените още с откриването им. Радиомодифициращият ефект на редица природни продукти е предмет на изследване на много автори./1,2,3,4/. Тези препарати влизат в съображение за масова профилактика на хора, работещи в среда с йонизирани лъчения.

GS е лиофилен субстрат на извлек от коренищата на Кръвен здравец /*Geranium Sanguineum* - L/. Той представлява комплекс от полифенолни съединения със следното процентно съотношение между компонентите: танини /20-30%/, флавоноиди /0.03-0.08%/, катехини и пронтоцианидини /0.15-0.25%/, полифенолни киселини /0.01-0.02%/ и баластни вещества /7/. Получаването на извлека става, след като корените се изсушават добре до 12 % влажност, смилат се ситно до големина на частицата 0.5 мм и се провежда екстракция с етилов алкохол. Поради факта, че биологично активните съставки са термолабилни, изсушаването става чрез лиофилизация при температура 35-40°C. Получената субстанция е прахообразна с кафяво-червеникав цвят и се разтваря добре във вода и алкохол.

Задача на настоящото изследване е оценка радиопротекторните възможности на полифенолите, съдържащи се в стандартния препарат GS, получен от корените на кръвен здравец. За постигане на целта е използвана стандартна радиобиологична методика за преживяемост на гризачи, изследване на левкоцити, гранулоцити лимфоцити и тромбоцити в периферна кръв на плъхове, фагоцитарна активност на неутрофили, изследване на основни клетъчни популации при онкологично болни, на които се провежда лъчетерапия.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Опитни животни .

Опитите за преживяемост, ендогенни далачни колонии / Е – КОЕ g / и фагоциторна активност на неутрофили бяха проведени с бели безпородни мишки от мъжки пол с телесна маса 20-25 g. Изследването по отношение на периферни кръвни показатели бе извършено с плъхове порода "Вистар", от мъжки пол, с телесна маса 150 –170 g.

Клинично изпитание на GS се проведе в НОЦ при онкоболни, на които се провежда лъчетерапия. Групата се състоеше от 12 души, а контролата от 11.

2. Прилагане на препарата.

На опитните мишки се въвеждаше воден разтвор на лиофилизата чрез метална сонда в дози 30 mg/kg телесна маса 5 поредни дни преди облъчването. На плъховете беше прилаган също чрез метална сонда, но в дози 5 mg/kg телесна маса. Онкоболните пациенти го приемаха per os под формата на капсули на гладно по 150 mg на ден /~2.5 mg/kg/, започвайки 10 дни преди началото на облъчванията и продължавайки през целия курс на лечение.

Облъчване. Мишките бяха облъчени с 10 Gy в гама – облъчвател “Лъч – 1300” с четири източника, ^{60}Co и мощност 1.3 и/мин. Плъховете “Вистар” бяха облъчени с 4 Gy в същия гама - облъчвател.

При онкопациентите бе проведен курс на лечение с йонизиращи лъчения в конвенционални дози и обем.

ЕКСПЕРИМЕНТИ И ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ГРУПИ

В проследяването на преживяемост на мишки, облъчени остро с 10 Gy гама – лъчи използвахме четири групи по 20 експериментални животни.

Първа група поихме с разтвор от GS в доза 30mg /kg с помощта на метална сонда пет поредни дни преди облъчването. Профилактична схема на приложение.

Втора група приемаше същата доза пет поредни дни, но след облъчването. Терапевтична схема на приложение.

Двете контролни групи поихме с дестилирана вода – едната преди, другата след облъчването- паралелно с опитните групи /фиг.1/.

Проследяване на кръвни показатели в динамика извършихме при две групи плъхове порода “Вистар”, като едната поихме с разтвор от лиофилизата GS пет поредни дни преди облъчването с 4 Gy гама лъчи с дози 5 mg/kg телесна маса, а контролата - с дестилирана вода. Проследихме левкоцити, гранулоцити и лимфоцити /фиг.3/. Проследихме в динамика и тромбоцити /фиг.4/.

Онкоболните, при които проследихме основните левкоцитни популации, прилагайки им лъчетерапия и приемайки като радиопротектор GS бяха 12. Средната им възраст бе 47.3 год. – 6 мъже и 6 жени. По нозологични единици бяха разпределени както следва: четирима пациента провеждаха лечение по повод болест на Ходжкин, четирима - по повод тумори на матката, един – на ректума, един - на белия дроб, един – на назофаринкса, един – на мозъка. В контролната група четирима от пациентите бяха с болест на Ходжкин, двама – с неходжкинови лимфоми, двама - с тумор на езика, един – на назофаринкса, един – с тумор на матката, един – с тумор на гърдата. Или общо контролната група бе единадесет пациента, подложени само на лъчетерапия.

МЕТОДИ

- Преживяемост

Проследихме преживяемост при мишки на 3^{-ти}, 7^{-ми}, 16^{-ти}, 23^{-ти}, 30^{-ти} ден след облъчването с 10 Gy гама – лъчи, при профилактична и терапевтична схема на приложение на GS /фиг. 1/.

- Ендогенни далачни колонии /Е - КОЕ g / определяхме по метода на J.Till, E. Mc. Kulloch, L. Siminovitch. Използвахме пет групи мишки, във всяка от която имаше по 20 животни. Прилагахме превантивно 5 поредни дни GS в дози както следва: I група – 30 mg/kg телесна маса, II група – 20 mg/kg, III група – 10 mg/kg, IV група – 5 mg/kg и V – контролна, която поихме с дестилирана вода. На петия ден облъчихме с 10 Gy гама – лъчи, а на осмия ден след облъчването извадихме далаците, на които броехме ендогенни далачни колонии /фиг. 2/.

- Проследяване на хематологични показатели от периферна кръв: левкоцити, гранулоцити, лимфоцити, тромбоцити при плъхове порода “Вистар” от мъжки пол с телесна маса 150-170 g. GS бе даван пет поредни дни профилактично в

доза 5 mg/kg телесна маса, след което облъчихме с 4 Gy работната и контролната група. Проследихме хематологични показатели в динамика /фиг.3 и фиг.4/.

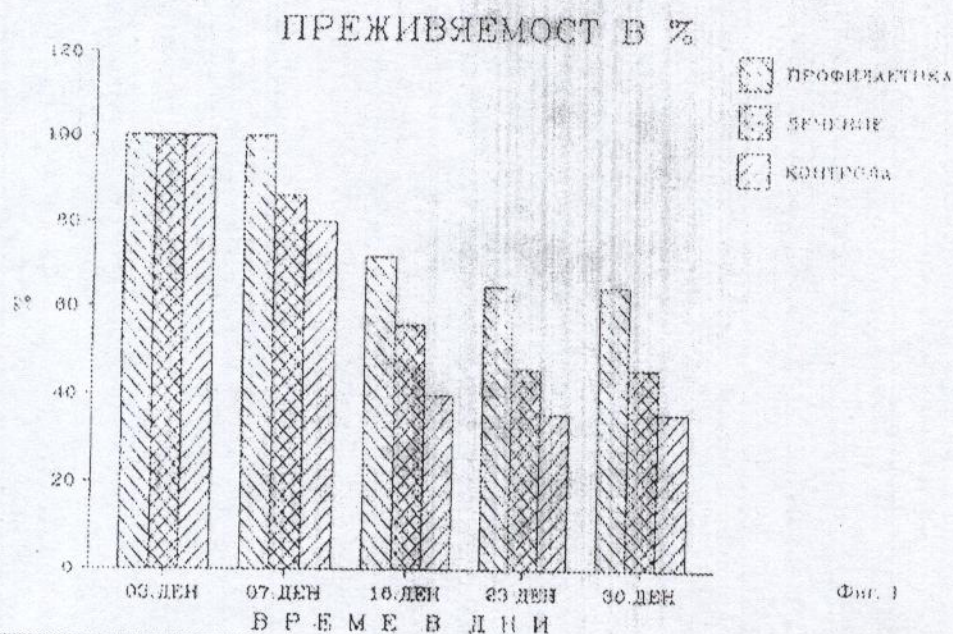
- Фгоцитарната активност е определена в маркирана по ^{14}C 20-часова култура от *Escherichia coli* и култивирана в монослой /8/ ^{14}C *Escherichia coli* беше получена след инкубиране на бактериална култура в хранителна среда на Тимаков, съдържаща като радиоактивни маркери ^{14}C тимин и ^{14}C аценин. Прави се изолиране на неутрофилите чрез NH_4Cl – изотопичен разтвор, следва трикратно градиентно центрофугиране и измиване на клетъчната суспензия с разтвор на Henk's. Получените неутрофили са със съхранен виталитет. Инкубацията се извършва за 1 час при 37°C в съотношение неутрофили / *Escherichia coli* 1: 10, след което невключената в монослой активност се отстранява чрез четирикратно изплакване с физиологичен разтвор. Лизисът на клетките се извършва 0.15 % на натриев лаурил сулфат, прибавя се сцинталационен коктейл и се измерва β -активността на течно сцинталационен брояч. Фагоцитозата се изчислява в проценти от изходната активност за 1.10^6 клетки /фиг.5/.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Работната и контролна групи от по 20 опитни животни. Работната група поихме с GS 30 mg/kg телесна маса пет поредни дни преди и след облъчване с 3 Gy, а контролата поихме с дестилирана вода.

I. Ефект на GS върху преживяемост на мишки след остро облъчване.

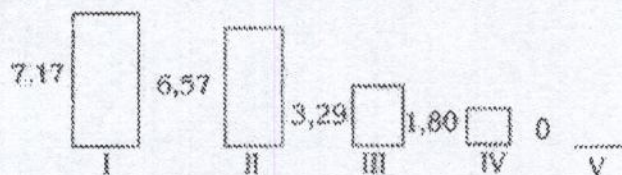
Резултатите от проследяването на преживяемост на мишки показват статистически достоверна разлика при профилактично третираната група на 16^{-ти}, 23^{-ти} и 30^{-ти} ден след облъчването. Това най-вероятно се дължи на три фактора: стимулация на хемопоезата /всички клетъчни редове/, наличието на мощни антиоксиданти като флавоноиди, антоциани, полифенолни киселини и др. и повишената фагоцитарна активност на неутрофилите /30^{-ти} ден преживелите профилактично третирани животни са $63\% \pm 5.1\%$, а контролата $33\% \pm 4.5\%$ /фиг.1/



При терапевтично третираната група статистически достоверна разлика получихме на 16^{-тия} ден. Преживелите са $55\% \pm 5.3\%$ за опитната група и $38\% \pm 4.6\%$ за контролата.

II. Проследяване на ендогенни далачни колонии /Е-КОЕд/ /фиг.2/

При I^{ва} група, на която прилагаме GS в дози 40 mg/kg телесна маса получихме среден брой Е-КОЕд 7.17 ± 1.34 , II^{-ра} група 30 mg/kg - 6.57 ± 0.83 , III^{-та} група 20 mg/kg - 3.29 ± 0.41 , IV^{-та} група 10 mg/kg - 1.80 ± 0.33 . При контролната група не открихме далачни колонии. Препаратът вероятно или спомага за по-голямото съхранение на стволовите клетки след облъчване или ускорява тяхната пролиферация или модифицира и двата процеса, което води до по-бързо възстановяване на кръвотворенето след облъчване./1/



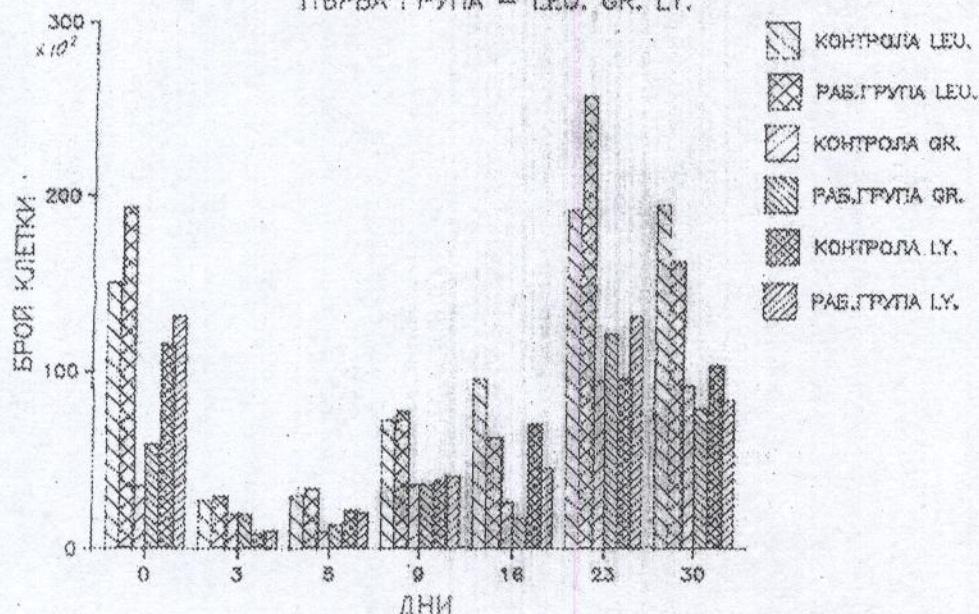
Фиг.2 Среден брой на далачни колонии

III. Ефект на GS върху хемопоезата на плъхове порода "Вистар".

Проследихме в динамика кръвни показатели, а именно левкоцити, гранулоцити, лимфоцити и тромбоцити /фиг. 3 и 4/. Поихме опитната група животни с 5 mg/kg телесна маса с GS, след което облъчихме в гама-облъчвател с 4 източника ^{60}Co в дози 4 Gy /екстраполационният коефициент плъхове/ мишки е 0.157 / В първите 10 дни след облъчването левкоцитите на работната група са по-високи от тези на контролата, а на 23^{-тия} ден разликата е статистически достоверна. Тромбоцитите при третираната група са с по-високи стойности от тези на контролата, с изключение на 5^{-тия} ден. Тук не откриваме статистически достоверна разлика.

ИЗСЛЕДВАНЕ НА "КРЪВЕН ЗДРАВЕЦ"

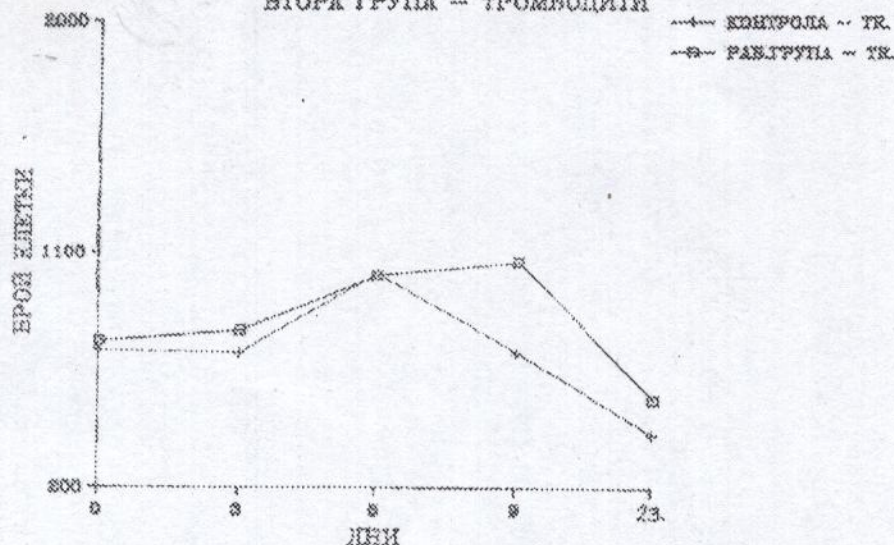
ПЪРВА ГРУПА - LEU, GR, LY.



Фиг.3

ИЗСЛЕДВАНЕ НА "КРЪВЕН ЗДРАВЕЦ"

ВТОРА ГРУПА -- ТРОМБОЦИТИ



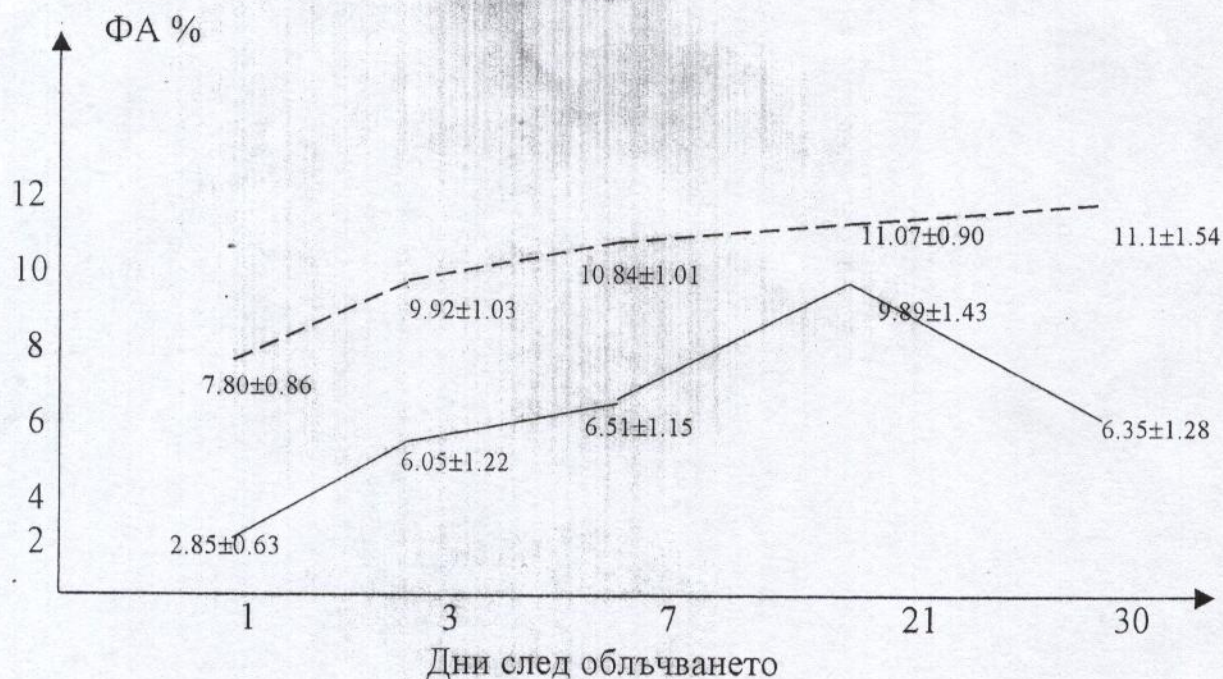
Фиг.4

IV. Ефект на GS върху фагоцитарната активност на неутрофили.

Неутрофилните гранулоцити са едни от най-чувствителните на йонизиращо облъчване кръвни клетки. Приложеният радиоизотопен метод ни дава интегрална оценка за функционалното състояние на фагоцитиращите неутрофили.

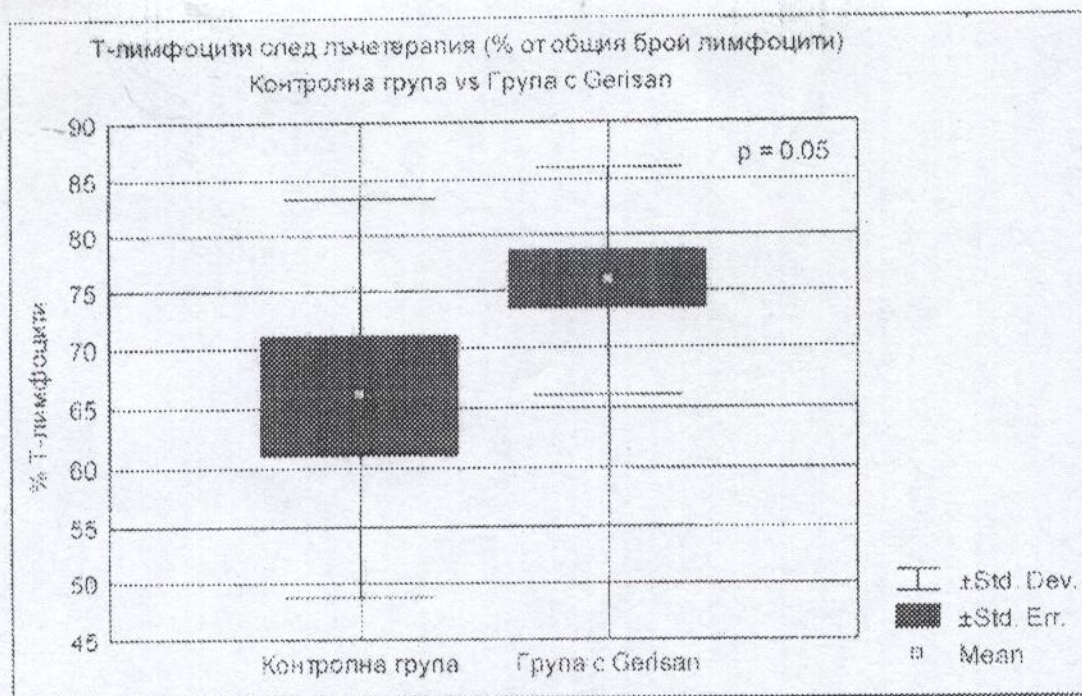
GS показва, прилаган в профилактично-терапевтична схема, статистически достоверна разлика /фиг.5/. Данните за контролата са $7.21\% \pm 1.53\%$, работната група, третирана с GS $10.67\% \pm 1.61\%$.

Фиг.5



Получените резултати ни дават основание да смятаме, че GS има категорично стимулиращо действие върху фагоцитиращите неутрофили.

V. Ефект на GS по отношение на Т-лимфоцитите при онкоболни, подложени на лъчетерапия /фиг.6/.



Фиг. 6

Прилагането на GS стимулира селективно Т-лимфоцитната популация, изразена в статистически достоверни граници при сравнение с контролната група /фиг.6/. Наблюдаваните промени в процентния дял на общите лимфоцити не показваха корелация с динамика в определена Т-лимфоцитна субпопулация. Съотношението между Т-хелпери/индусери и Т-цитотоксични/супресори останаха постоянни. Анализът и на останалите лимфоцитни субпопулации – общи: В-лимфоцити, НК-клетки не показваха статистически значими различия. На този етап от проучването ефектът от приложението на GS се отчита като положителен. Запазването на Т-лимфоцитната популация, която е отговорна за клетъчния имунен отговор при онкологичните болни, е от особено значение.

ИЗВОДИ

1. GR повишава значително преживяемостта при мишки облъчени с летални дози;
2. GR повлиява положително хемопоезата при плъхове, спомага за по-бързото възстановяване на показателите в периферната кръв;
3. GR повлиява значимо количеството на ендогенните далачни колонии /Е-КОЕд/;
4. GR повлиява положително функцията на неутрофилната популация. ФА на третираната група с GS е статистически достоверно по-висока в сравнение с контролната група.
5. Приложението на GS при онкологично болни, подложени на лъчетерапия показва запазване на Т-лимфоцитната популация, което определя ползата от съпътстващото му приложение в този случай. Тези резултати определят и възможността GS да бъде прилаган профилактично при контингенти, работещи в среда с йонизиращи лъчения.