

RADIOBIOLOGIA W SŁUŻBIE MEDYCYNY

IWONA GRĄDZKA, IRENA SZUMIEL

ARTYKUŁY

WSTĘP

Zadeklarowany przez rząd powrót do energetyki jądrowej w Polsce spowodował wzrost zainteresowania badaniami radiacyjnymi, m.in. radiobiologią. Ze względów praktycznych jest to podyktowane potrzebą zapewnienia ochrony radiologicznej przyszłym pracownikom elektrowni jądrowej. Potencjalne korzyści wynikające z zainteresowania radiobiologią są jednak szersze, ponieważ problematyka radiobiologiczna wchodzi w zakres wielu dziedzin biologii i medycyny. Promieniowanie jonizujące może być przyczyną choroby nowotworowej, ale także może ją uleczyć. Diagnostykę medyczną trudno sobie wyobrazić bez aparatów rentgenowskich. Zastosowania praktyczne – nie tylko w energetyce – wymagają zapewnienia bezpieczeństwa, zaś do wypracowania skutecznych środków ochrony, a także do zastosowań terapeutycznych potrzebne jest dogłębne zrozumienie mechanizmów działania promieniowania na organizmy żywe i ich odpowiedzi na uszkodzenia popromienne. Zwłaszcza aspekty radiobiologiczne radioterapii nowotworów są przedmiotem rosnącej liczby badań, ze względu na wzrastającą częstość zachorowań na choroby nowotworowe – nie tylko w naszym kraju – i wobec zastosowania promieniowania jonizującego w leczeniu wielu typów nowotworów u prawie 60% pacjentów.

Poniższy krótki przegląd dotyczy najważniejszych aspektów zastosowania wyników badań radiobiologicznych w medycynie. Ponieważ piśmiennictwo z tego zakresu jest bardzo obszerne, cytowane są tylko przykłady prac, głównie wykonanych w ICHTJ. Przytoczono też publikacje przeglądowe zamieszczone w *Postęпах Techniki Jądrowej*

w ostatnich kilku latach, jako źródło informacji na ten temat w języku polskim.

RADIOBIOLOGIA W TERAPII NOWOTWORÓW

Opracowanie skutecznych metod radioterapii nowotworów wymaga wiedzy z zakresu matematyki, fizyki, onkologii i radiobiologii. Kolejność tego wyliczenia nie wskazuje na wagę wkładu, jaki każda z dyscyplin wnosi do radioterapii – wszystkie są niezbędne do osiągnięcia celu, jakim jest ulepszenie procedur medycznych.

Radiobiolodzy badają zagadnienia, takie jak:

- wpływ dawki promieniowania jonizującego na przeżywalność komórek (wyznaczane są tzw. krzywe przeżywalności),
- komórkowe mechanizmy obronne,
- mechanizmy śmierci komórkowej,
- odpowiedź adaptacyjna,
- efekt widza.

Krzywe przeżywalności pozwalają na ocenę ilościową skutków promieniowania w populacji komórkowej, a więc określają promieniowrażliwość komórek. Z drugiej strony, pozwalają na scharakteryzowanie skuteczności biologicznej danego rodzaju promieniowania.

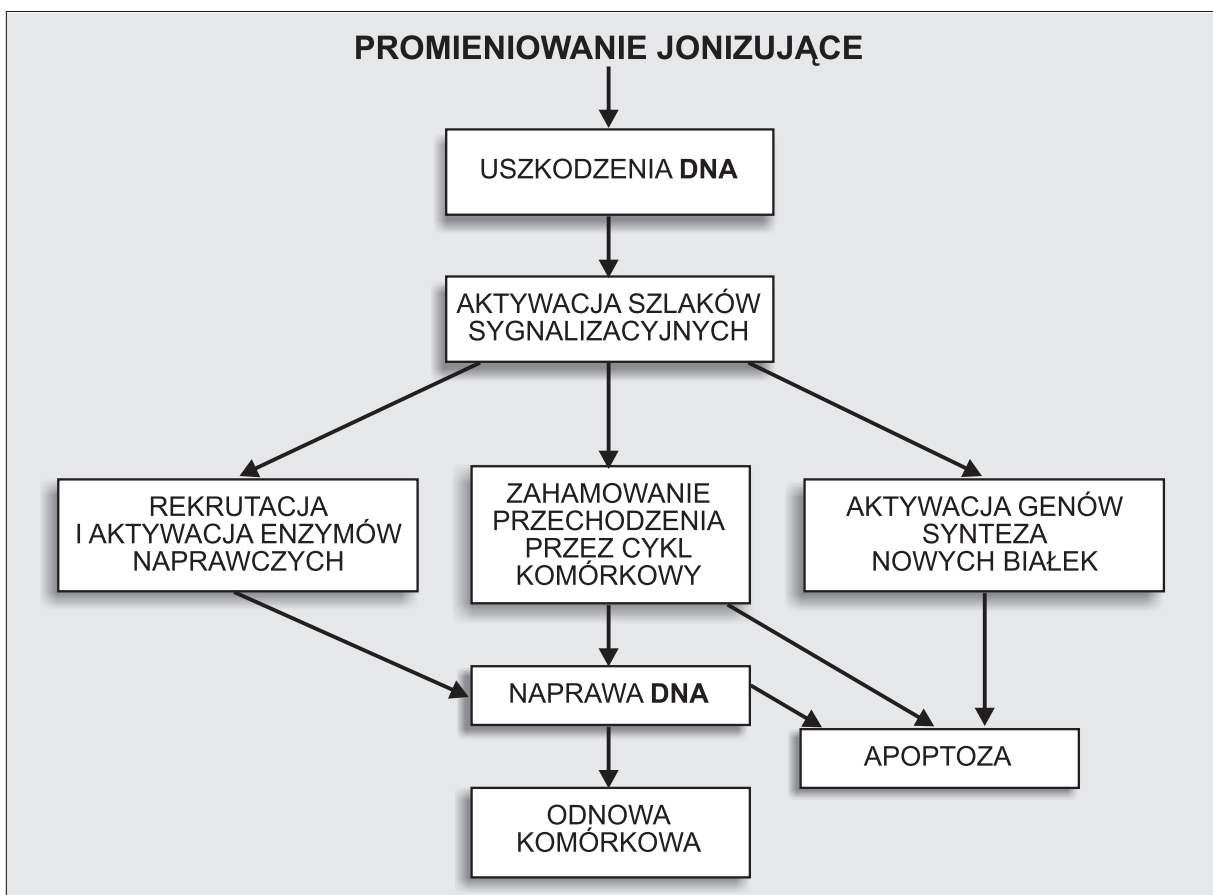
Podstawą tworzenia racjonalnych podstaw radioterapii jest znajomość komórkowych mechanizmów obronnych [1, 2], takich jak:

- naprawa DNA
- liczne szlaki sygnalizacji komórkowej, które powodują:
 - przejściowe zatrzymanie w cyklu komórkowym,

- w przypadku nieskutecznej naprawy – uruchomienie „programu śmierci” (apoptozy), co eliminuje z organizmu komórki – nośniki potencjalnie szkodliwych mutacji,
- reorganizację struktury chromatyny w miejscu uszkodzenia,
- aktywację enzymów naprawy DNA,
- aktywację transkrypcji genów, których produkty białkowe sprzyjają procesom odnowy komórkowej.

Naprawa obejmuje usunięcie uszkodzeń DNA, a także degradację innych uszkodzonych makrocząsteczek i zastąpienie ich zsyntetyzowanymi *de novo*.

Redystrybucja oznacza zmianę rozmieszczenia komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Ponieważ komórki, w zależności od położenia w cyklu podziałowym, różnią się promieniowrażliwością – po napromienieniu giną te najbardziej wrażliwe (zależnie od typu komórek, ale głównie z faz G1 i M). Jednocześnie, na skutek zahamowa-



Rys. 1. Schemat zdarzeń zachodzących w komórce po uszkodzeniu DNA przez promieniowanie jonizujące

Schemat zdarzeń zachodzących w komórce pod wpływem indukowanych przez promieniowanie uszkodzeń DNA przedstawia rys. 1.

Badanie naprawy DNA obejmuje nie tylko charakterystykę mechanizmów cząsteczkowych i komórkowych, ale także opracowanie nowych metod pomiaru uszkodzeń i zwiększanie ich czułości. Przykłady takich prac, doskonalących metodę elektroforezy DNA lub metodę kometową, są w spisie odsyłaczy ([3-5]).

Na podstawie prac z zakresu radiobiologii, biologii komórki i fizjologii wypracowano podstawowe koncepcje w radioterapii. Są to słynne cztery R: naprawa (ang. *Repair*), redystrybucja (ang. *Redistribution*), reoksygenacja (ang. *Reoxygenation*) i repopulacja (ang. *Repopulation*) (por. [6]).

nia przechodzenia przez cykl następuje przejściowe nagromadzenie komórek w fazie G2.

Reoksygenacja zachodzi w wyniku śmierci części komórek niedotlenowanego guza; komórki przeżyjące uzyskują lepsze utlenowanie dzięki mniejszej odległości od naczyń krwionośnych i mniejszej liczbie komórek konkurujących o tlen.

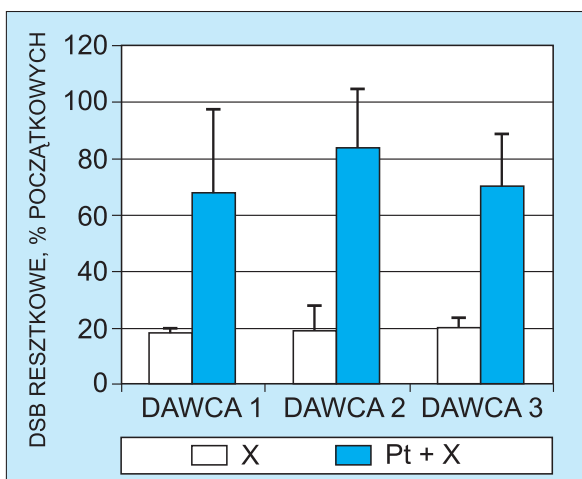
Repopulacja polega na odroście guza w wyniku przyspieszonych podziałów mitotycznych komórek, które przeżyły. Dla leczonego pacjenta jest to oczywiście zjawisko niekorzystne.

Znajomość przebiegu tych czterech procesów ułatwia dobór dawek całkowitych i frakcyjnych oraz odstępów czasowych pomiędzy dawkami frakcyjnymi, służy też do oceny następstw przerw w napromienianiu dla skuteczności terapii.

RADIOTERAPIA ŁĄCZONA Z CHEMIOTERAPIĄ

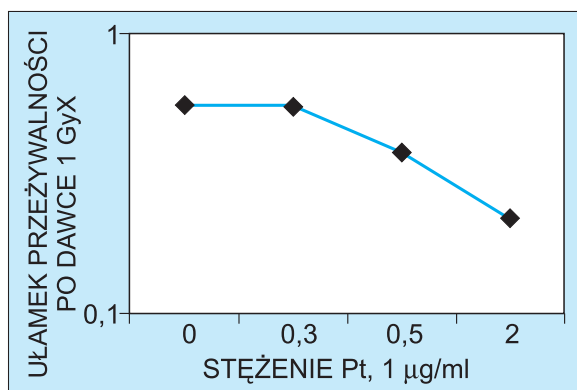
Duży postęp w leczeniu chorób nowotworowych uzyskano dzięki zastosowaniu terapii łączonej – napromieniania z jednoczesnym podawaniem leku promieniuczulającego (najnowszy przegląd w poz. [7]). Idealny lek promieniuczulający powinien mieć znikome działanie cytotoksyczne, dzięki czemu tkanka prawidłowa nie jest uszkodzana, podczas gdy eksponowany na promieniowanie obszar guza ulega zniszczeniu. Wprowadzenie leku do praktyki medycznej jest zawsze poprzedzone badaniami na hodowlach komórkowych, a następnie na zwierzętach doświadczalnych, aby określić skuteczność jego działania. Na obu tych etapach do badań włączają się radiobiolodzy.

Leki starszej generacji uszkodzają DNA w inny sposób niż promieniowanie, w wyniku czego zachodzi interakcja między uszkodzeniami obu typów. Przykładem mogą być kompleksy platyny, tworzące addukty z DNA. Ich naprawa zachodzi z wycięciem zasady, co wprowadza pęknięcie pojedynczoniowe. Jeżeli wskutek napromienienia, na przeciwną



Rys. 2. Resztkowe pęknięcia podwójniciowe (DSB), po 3-godzinym okresie naprawy, w limfocytach ludzkich izolowanych z krwi obwodowej (od 3 dawców). W 20 godzin po stymulacji fitohemaglutyniną, limfocyty traktowano (lub nie) przez 1 godzinę kompleksem platyny, Pt 1 (etylenodiamino (L-jabłczano) platyną (II)), w stężeniu 25 μM . Następnie napromieniano je dawką 10 Gy promieniowania X w temperaturze 0°C i na okres naprawy przenoszono do inkubatora CO₂, do temperatury 37°C. Oznaczenia poziomów DSB wykonano metodą elektroforezy pulsowej DNA. Według [8], zmodyfikowane

nici DNA, w bliskim sąsiedztwie pojawi się drugie pęknięcie pojedynczoniowe – powstaje pęknięcie podwójniciowe, najważniejsze uszkodzenie letalne DNA. Na poziomie komórkowym daje to efekt spowolnienia naprawy pęknięć podwójniciowych DNA i obniżenie przeżywalności komórek [8] (por. rys. 2 i 3). O ile w układzie doświadczalnym daje to obiecujące wyniki, to w praktyce działa w sposób

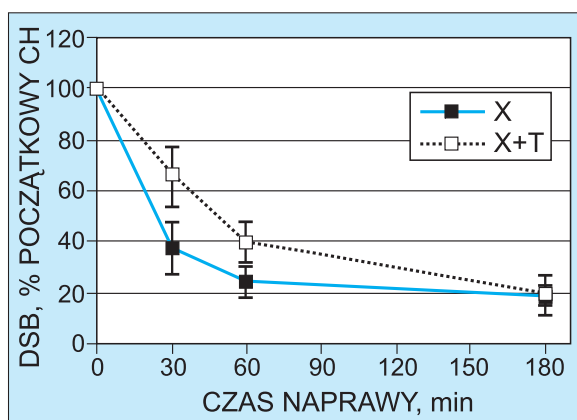


Rys. 3. Przeżywalność komórek z raka jajnika chomika chińskiego, CHO, traktowanych różnymi stężeniami kompleksu platyny, Pt 1 (por. rys. 2) przez 1 godzinę, a następnie napromienionych dawką 1 Gy promieniowania X. Według [8], zmodyfikowane

mało wybiórczy i skutkuje niekorzystnym działaniem na tkanki prawidłowe.

Dla leków nowszej generacji tarczą są wybrane szlaki sygnalizacji komórkowej, których działanie wyliczono powyżej (por. też rys. 1). Stosuje się zatem leki hamujące naprawę DNA, aktywujące apoptozę lub sprzyjające przechodzeniu komórek do faz cyklu komórkowego o podwyższonej promieniowrażliwości. Ich działania uboczne są słabsze.

Przykładem mogą być inhibitory receptora epidermalnego czynnika wzrostu, EGFR (ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*). Receptor ten jest zlokalizowany w błonie plazmatycznej i ma aktywność kinazy białkowej. Pod wpływem promieniowania następuje jego specyficzna aktywacja, dzięki której wędruje on do jądra komórkowego, przynosząc ze sobą podjednostki najważniejszego enzymu naprawy pęknięć podwójniciowych, kinazy białkowej zależnej od DNA, DNA-PK (ang. *DNA-dependent protein kinase*). Powoduje to wzrost aktywności DNA-PK i skutkuje wzmożoną naprawą pęknięć i wyższą przeżywalnością [2, 9, 10]. W radio-



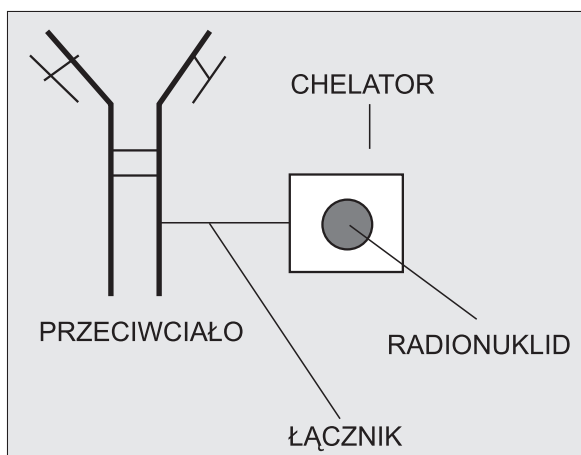
Rys. 4. Naprawa pęknięć podwójniciowych DNA (DSB) w komórkach ludzkiego glejaka M059 K traktowanych (lub nie) tyrfostyną AG 1478, T (1,5 μM) przez 1 godzinę, a następnie napromienionych dawką 10 Gy promieniowania X. Według [11], zmodyfikowane

terapii potrzebny jest skutek przeciwny i cel ten osiąga się stosując inhibitor aktywności kinazowej EGFR. Zapobiega on wędrówce cząsteczek EGFR do jądra komórkowego i wszystkim tego następstwom korzystnym dla przeżycia komórki nowotworowej, a zatem niekorzystnym dla pacjenta. Jednym z badanych inhibitorów jest tyrfostyna AG1478. Jej działanie na naprawę DNA napromienionych promieniowaniem X komórek glejaka M059K [11] ilustruje rys. 4. Inhibitor spowalnia naprawę pęknięć podwójnoniciowych DNA. Leki działające na podobnej zasadzie przeszły już próby kliniczne.

RADIOFARMACEUTYKI I EFEKT WIDZA

Przez kilkadziesiąt lat uważano, że aby promieniowanie jonizujące zabiło komórkę, musi przez jądro komórkowe przejść cząstka lub foton, który uszkodzi DNA. Pod koniec ubiegłego wieku zaobserwowano, że śmiertelnie uszkodzone mogą być nie tylko bezpośrednio „trafione”, ale i sąsiadujące z nimi komórki – „widzowie”. Efekt ten nazwano efektem widza (ang. *bystander effect*). Już znacznie wcześniej radioterapeuci stykali się z tzw. efektem abskopalnym (ang. *abscopal effect*), to jest zmianami w tkankach pozostających poza polem napromienienia. Odkrycie efektu widza (opisane w PTJ [12]) nasunęło pytanie z zakresu ochrony radiologicznej: w jakim stopniu zjawisko to wpływa na ryzyko narażenia na bardzo niskie dawki promieniowania jonizującego? Nawet pojedyncza cząstka, przechodząca przez pojedynczą komórkę może być źródłem efektu widza w populacji komórkowej [13]. Z jednej strony, może to potęgować skutki letalne, z drugiej zaś działać ochronnie, na przykład przez indukowanie procesów naprawy DNA.

Efekt widza zachodzi także *in vivo* (por. [14]) i stanowi przykład zjawiska opisanego w radiobiologii na modelach komórkowych, a mogącego wpływać na skuteczność i swoistość radiofarmaceutyków stosowanych w leczeniu nowotworów. Radiofarmaceutyki są związkami złożonymi z atomu promieniotwórczego izotopu odpowiednio dobranej pierwiastka oraz nośnika (ligandu), który w sposób wybiórczy lokuje całą cząsteczkę w odpowiednim miejscu organizmu – jeżeli celem jest obrazowanie, lub doprowadza do komórek nowotworowych – jeżeli celem jest terapia (rys. 5). Ocena skuteczności radiofarmaceutyków w terapii odbywa się najpierw na etapie badawczym z użyciem metod radiobiologicznych. Charakteryzuje się wtedy powinowactwo ligandu do danego typu komórek nowotworowych, miejsca uszkodzeń w komórce, zakres uszkodzeń i możliwość ich naprawy, efekty letalne uszkodzeń i mechanizmy odpowiedzi komórkowej.



Rys. 5. Schemat budowy radiofarmaceutyku (z zastosowaniem przeciwnowotworowym), zawierającego przeciwciało swoiste dla niszczonego nowotworu, co zapewnia wybiórczość działania. Przeciwciało sprzęgnięte jest z chelatorem wiążącym radionuklid, emiter β^- , na przykład ^{90}Y , lub emiter α , na przykład ^{211}At uszkadzający komórki nowotworowe. Do obrazowania nowotworu stosuje się najczęściej krótkożyjące radionuklidy emitujące β^+ (np. ^{18}F)

PROMIENIOWRAŻLIWOŚĆ OSOBNICZA I JEJ DIAGNOSTYKA

Ludzie różnią się wrażliwością na różne czynniki uszkadzające DNA, w tym na promieniowanie jonizujące. Podłoże tych różnic to: odmienna szybkość i dokładność naprawy uszkodzeń, zróżnicowana tolerancja uszkodzeń, a także zdolność usuwania uszkodzonych komórek w procesie śmierci kontrolowanym genetycznie („śmierci programowanej”, apoptozy).

Różnice w promieniowrażliwości osobniczej są na ogół niewielkie i nie powodują zagrożeń przy ekspozycji na bardzo niskie dawki stosowane w diagnostyce rtg (zdjęcie rentgenowskie klatki piersiowej to dawka ekspozycyjna ok. 0,05 mSv, podczas gdy przeciętna roczna dawka promieniowania ze źródeł naturalnych to ok. 2,6 mSv). Jednak rzadko występująca, uwarunkowana genetycznie nadwrażliwość na promieniowanie jonizujące może być w niektórych okolicznościach niebezpieczna. Jest to m.in. przypadek ludzi z defektem białka nazwanego kinazą ATM, gdzie ATM jest skrótem od łacińskiej nazwy choroby – *ataxia telangiectasia* i słowa „mutated” (ang. *zmutowane*). Choroba objawia się zaburzeniami równowagi (ataksją mózdzkową), rozszczepieniem drobnych naczyń krwionośnych, niestabilnością chromosomów, nadwrażliwością na promieniowanie jonizujące, zaburzeniami odporności oraz podwyższoną częstością występowania chorób nowotworowych.

Białko ATM ma kluczową rolę w odpowiedzi komórkowej na napromienienie, bowiem uruchamia procesy obronne: naprawę uszkodzeń DNA oraz zatrzymanie przechodzenia komórek przez cykl podziałowy do czasu zakończenia naprawy. Defekt

w budowie tego białka jest – jak wynika z listy objawów – istotny dla wielu funkcji organizmu, zaś ekspozycja na radioterapeutyczne lub pochodzące z wypadku radiacyjnego dawki promieniowania jest wysoce niebezpieczna dla chorego. Osoby, które odziedziczyły jedną kopię genu *atm* mają także podwyższoną promieniowrażliwość. Dlatego osoby stykające się zawodowo z wysokimi dawkami promieniowania powinny być sprawdzone pod kątem ich osobniczej promieniowrażliwości.

Radiobiolodzy poszukują łatwych do oznaczenia markerów promieniowrażliwości (np. [15, 16]). Dotychczas opracowano szereg odpowiednich do takiej oceny metod, w których materiałem do badań jest niewielka ilość krwi. Krwinki białe można zbadać pod względem ilości indukowanych przez standardową dawkę promieniowania uszkodzeń DNA, ocenić szybkość ich naprawy lub określić stopień uszkodzenia metodami cytogenetycznymi. Wspomniany defekt kinazy ATM można łatwo wykryć opracowaną w 2008 roku [17] metodą cytometrii przepływowej z zastosowaniem odpowiedniego przeciwciała, sprawdzając, czy traktowanie nadtlenkiem wodoru lub promieniowaniem X indukuje fosforylację cząsteczki.

UWAGI KOŃCOWE

Wiek XXI ma być wiekiem biologii. Istotnie, rozwój tej dyscypliny nauki jest niebywale szybki. Radiobiologia korzysta zwłaszcza z postępów biologii molekularnej i komórkowej. Odkrycia ostatnich lat, takie jak: szczegółowy opis molekularny procesów naprawy DNA, charakterystyka szlaków sygnalizacji komórkowej uczestniczących w odpowiedzi komórki na napromienienie, efekt widza, stwarzają nowe perspektywy poznawcze i praktyczne. Dopóki radioterapia pozostanie jedną z głównych metod walki z chorobami nowotworowymi, aspekty medyczne radiobiologii będą miały charakter priorytetowy. Z biegiem czasu aktualne staną się zapewne problemy ochrony radiologicznej kosmonautów. Ważne jest, aby krajowa radiobiologia mogła włączyć się w proces integracji nauki europejskiej i skorzystać z perspektyw rozwojowych stwarzanych przez Unię Europejską. Do tego jednak konieczne jest wsparcie finansowe, także ze źródeł krajowych.

dr Iwona Grądzka, prof. Irena Szumiel
INSTYTUT CHEMII I TECHNIKI JĄDROWEJ,
CENTRUM RADIOBIOLOGII I DOZYMETRII BIOLOGICZNEJ,
WARSZAWA

LITERATURA

- [1] I. Szumiel, Intrinsic radiation sensitivity: cellular signaling is the key. *Radiat Res* 169: 249-58, 2008.
- [2] I. Grądzka, B. Sochanowicz, I. Szumiel, Samoobrona komórkowa: receptor czynnika wzrostowego pobudza naprawę DNA uszkodzonego przez promieniowanie X. *Post. Techn. Jądr.* 50: 2-8, 2007.
- [3] A. R. Collins, A. Azquata Oscoc, G. Brunborg, I. Gaivão, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C. Smith, R. Štětina, The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23: 143-151, 2008.
- [4] M. Wojewódzka, I. Buraczewska, M. Kruszewski. A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. *Mutat. Res.* 518: 9-20, 2002.
- [5] I. Grądzka, T. Iwaneńko, A non-radioactive, PFGE-based assay for low levels of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *DNA Repair* 4: 1129-1139, 2005.
- [6] E.J. Hall, Radiobiology for the Radiologists, 5 wydanie, Lippincot, Williams & Wilkins, Philadelphia 2000.
- [7] J. Bernier, Current state-of-the-art for concurrent chemoradiation. *Semin. Radiat. Oncol.* 19: 3-10, 2009.
- [8] I. Grądzka, I. Buraczewska, J. Kuduk-Jaworska, A. Domanińska, I. Szumiel, Radiosensitizing properties of novel hydroxycarboxylatoplatinum(II) complexes with high or low reactivity with thiols: two modes of action. *Chem. Biol. Interact.* 146: 165-177, 2003.
- [9] K. Dittmann, C. Mayer, B. Fehrenbacher, M. Schaller, U. Raju, L. Milas, D. J.Chen, R. Kehlbach, H. P. Rodemann, Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 280: 31182-31189, 2005.
- [10] I. Szumiel, Epidermal growth factor receptor and DNA double strand break repair: the cell's self-defence. *Cell Signal* 18: 1537-1548, 2006.
- [11] I. Grądzka, I. Buraczewska, I. Szumiel, Relationships between EGFR-initiated signalling. DNA double-strand break rejoining and survival in X-irradiated human glioma M059 cells. *Nukleonika* 53: 37-44, 2008
- [12] I. Szumiel, Efekt widza. *Post. Techn. Jądr.* 47: 17-21, 2004.
- [13] H. Zhou, M. Suzuki, G. Randers-Pehrson, D. Vannais, G. Chen, J. E. Trosko, C. A. Waldren, T. K. Hei, Radiation risk to low fluences of alpha particles may be greater than we thought. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 98: 14410-14415, 2001.
- [14] L. Y. Xue, N. J. Butler, G. M. Makrigiorgos, S. J. Adelstein, A. I. Kassis, Bystander effect produced by radiolabeled tumor cells in vivo. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 99: 13765-13770, 2002.
- [15] A. Jaworska, I. Szumiel I, P. De Angelis, G. Olsen, J. Reitan, Evaluation of ionizing radiation sensitivity markers in a panel of lymphoid cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* 77: 269-280, 2001.
- [16] A. Jaworska, M. Wojewodzka, P. De Angelis, Radiation sensitivity and the status of some radiation sensitivity markers in relatively sensitive lymphoid cells. *Radiat. Biol. Radioecol.* 42: 595-599, 2002.
- [17] M. Honda, M. Takagi, L. Chessa, T. Morio, S. Mizutani, Rapid diagnosis of ataxia-telangiectasia by flow cytometric monitoring of DNA damage-dependent ATM phosphorylation. *Leukemia* 23: 409-414, 2009.