

Biofyzikální ústav
Lékařské fakulty
Masarykovy university, Brno

Radiosensitivita a radioresistence

IZMB-8

Radiosensitivita a radioresistence

- Veškeré látky a faktory, o nichž je známo, že modifikují účinky ionizujícího záření, **působí v rámci chemické fáze** interakce, tj. nemohou významně ovlivnit primární fyzikální interakci – přímé zásahy vedoucí ke zlomům atd.
- Zvláštní postavení mezi látkami modifikujícími účinky záření má **voda**, která je v živé hmotě téměř všudypřítomná. Určitý praktický význam mají úvahy o radiosensitivizujícím účinku vody v případě působení na biologicky významné molekuly v suchém stavu.
- Veškeré radiační **poškození** biologických molekul nebo i buněk **v dehydrovaném stavu** je nutno přisoudit přímému účinku, tj. zejména **zásahům DNA, a to vysokoenergetickými elektrony**.

Volně souvisí:

- Hypotéza panspermie? Život v celém vesmíru?

Vliv teploty

- Poškození molekuly, které pochází z **přímé ionizace** citlivého místa a vede k nevratné destrukci biologických vlastností molekuly, je relativně málo citlivé na teplotu. Předávaná množství energie jsou totiž podstatně vyšší než aktivační energie potřebné pro rozbití vazeb.
- V případě, že poškození pochází spíše z **excitace**, byl navržen tento vztah pro inaktivační koeficient, např. nějakého ozářeného enzymu:

$$C = \frac{1}{D_{37}} = C_0 e^{-\varepsilon/RT} + C_1 e^{-\varepsilon_1/RT} + C_2 e^{-\varepsilon_2/RT}$$

Vliv teploty

$1/D_{37}$ je inaktivačním koeficientem z jednozásahového inaktivačního modelu, tj. převrácená hodnota dávky nutné pro *inaktivaci* 63% (aktivitu si zachovává přibližně 37% = $1/e$, $e = 2,718281828459045235360287471352\dots$) molekul a rovná se výrazu $1/D_0$, pokud je inaktivace funkcí dávky prvního řádu.

Pro určení aktivačních energií se používá ve fyzikální chemii obvyklé metody *Arrheniova grafu*. $\log C$ (viz předchozí rovnice, vlastně logaritmus výtěžku reakce) se vynáší jako funkce převrácené hodnoty absolutní teploty v kelvinech. V našem případě **D_{37} je úměrná převrácené hodnotě výtěžku** (čím je D_{37} větší, tím je menší výtěžek na jednotkovou dávku). Pro jednoduché reakce je Arrheniův graf přímkou, jehož směrnice je ε/R .

Náš vztah vyjadřuje výtěžek *několika* současně probíhajících reakcí.

Vliv teploty

Data získaná pro v suchém stavu ozařovaný enzym - lysozym - vedla k tomuto konkrétnímu tvaru rovnice:

$$C = \frac{1}{D_{37}} = 0.005 + 0.02e^{-620/RT} + 0.7e^{-2540/RT}$$

První člen je zjevně na teplotě nezávislý, nepřísluší mu tedy žádná aktivační energie, druhý a třetí člen jsou závislé na teplotě.

Vysvětlení této závislosti spočívá v tepelném usnadnění přenosu náboje z místa ionizace do jiného kritického místa, jehož destrukce vede k inaktivaci.

Excitační energie může vést v některých místech molekuly ke vzniku poškození při synergickém působení tepelné energie. Dle podílu těchto mechanismů lze vymezit tři oblasti:

Vliv teploty

1. $T < 100 \text{ K}$ – inaktivace je nezávislá na teplotě a je k ní nutno extrémně vysokých dávek. Téměř chybí migrace energie.
2. $100 \text{ K} < T < 170 \text{ K}$ – dochází k migraci excitonů – rotačních a vibračních stavů a může dojít k lokalizaci energie v kritickém místě, kde pak nízká aktivační energie vede ke vzniku změny.
3. $170 \text{ K} < T < 420 \text{ K}$ – může docházet k interakci mezi migrujícím nábojem a mobilizovanými vodíky z vodíkových vazeb, což může vést až k narušení disulfidických vazeb těmito vodíky. (záření vyvolává denaturaci bílkovin!!!)

Vliv teploty

Účinek teploty lze vysvětlit i tak, že inaktivace nezávislá na teplotě je dána ionizačními událostmi, zatímco excitační události jsou na teplotě závislé.

S ohledem na nízké aktivační energie produktů radiolýzy vody je závislost účinků na teplotě za přítomnosti vody jen slabá.

Zesílení radioterapeutických účinků při hypertermii má tedy vysvětlení spíše na úrovni ovlivnění fyziologie buňky.

Kyslíkový efekt

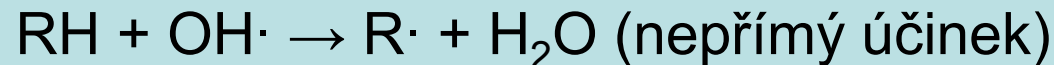
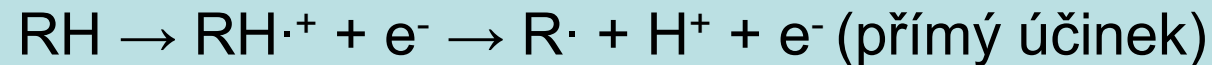
Již v počátcích radiační biologie bylo zjištěno, že přítomnost kyslíku **velmi silně** ovlivňuje schopnost záření vyvolat poškození živé hmoty nebo biologických materiálů (Schwarz 1909). Zvýšená pozornost je však těmto efektům věnována až od 50. let minulého století, kdy si radiační biologové uvědomili význam kyslíkového efektu pro odpověď nádoru na ozáření.

Princip: **anoxické podmínky pomáhají přežít části nádorových buněk**. Studium vlivu kyslíku nelze oddělit od studia vlivu některých jiných endogenních i exogenních látek.

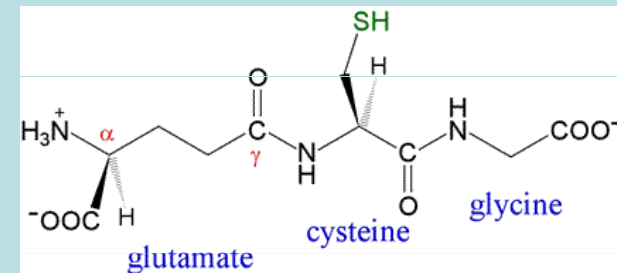
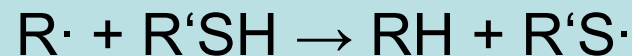
Tzv. **konkurenční model** interakce senzibilizátorů a ochranných látek, navržený již ve druhé polovině 50. let, zahrnuje několik kroků:

Kyslíkový efekt

1. Primárními událostmi jsou tvorba radikálů organických molekul jako výsledek přímého nebo nepřímého účinku:



2. Chemická oprava sulhydrylovými sloučeninami, zejména v buňce hojně se vyskytujícím glutathionem: (chemická oprava)

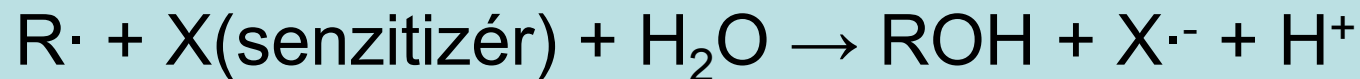


3. **Konkurenční reakce s kyslíkem**, která fixuje radikál na biomolekule a pravděpodobně vede k biochemicky neopravitelnému poškození. Tato reakce je rozhodující z hlediska **senzitivujícího účinku kyslíku**:



Kyslíkový efekt

4. Řada elektronegativních látek může **imitovat** svými reakcemi přítomnost kyslíku (reakční produkt ovšem nemusí být stejný jako při reakci s kyslíkem). Tyto senzitizery mají praktický význam a bude o nich podrobněji pojednáno dále. Příklad reakce tohoto druhu:



5. Předchozím reakcím konkuruje vychytávání „vodních“ volných radikálů sloučeninami s –SH skupinami. **Volný kyslík ovšem také reaguje s těmito thioly a tím snižuje jejich hladiny a ochranné účinky.**

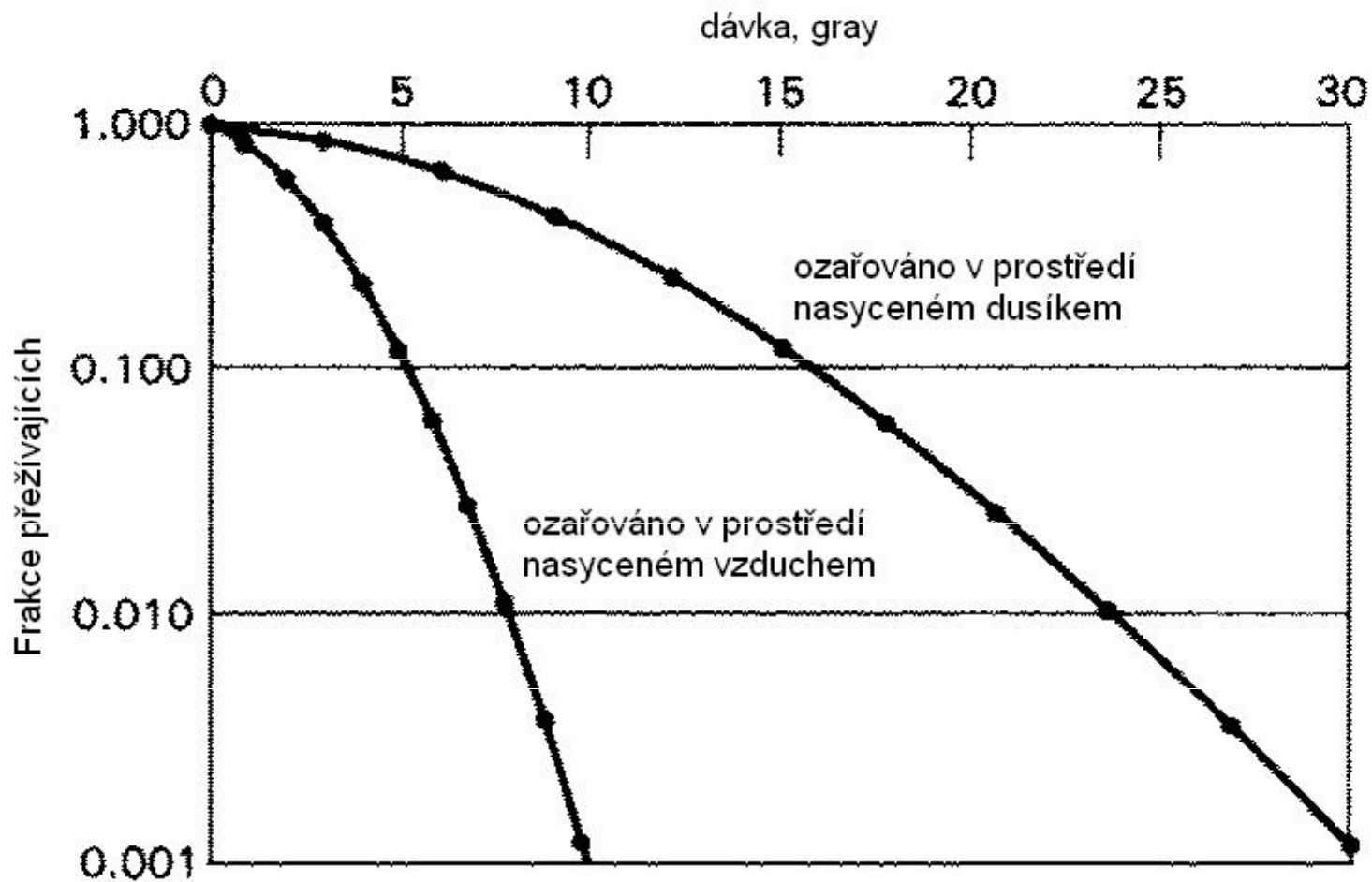
Komplexní působení kyslíku jakožto senzitizeru nebylo dosud zcela jednoznačně vysvětleno.

Kyslíkový efekt – *oxygen enhancement ratio*

Účinek kyslíku lze v zásadě popsat jako *účinek modifikující dávku* – poměr podílů přeživších buněk za přítomnosti a nepřítomnosti kyslíku pro určitou dávku ale zůstává stejný i při odlišných dávkách!

Stejně tak je **konstantní poměr absorbovaných dávek za přítomnosti a nepřítomnosti kyslíku, které vedou ke stejnému stupni přežití S**. Tento druhý poměr je označován právě jako *oxygen enhancement ratio* – OER:

$$OER = \frac{\text{dávka nutná v } N_2 \text{ pro daný } S}{\text{dávka nutná v } O_2 \text{ pro daný } S}$$



Přežití za oxických a anoxických podmínek pro hypotetickou savčí buněčnou linii, jejíž OER má hodnotu 3,0.

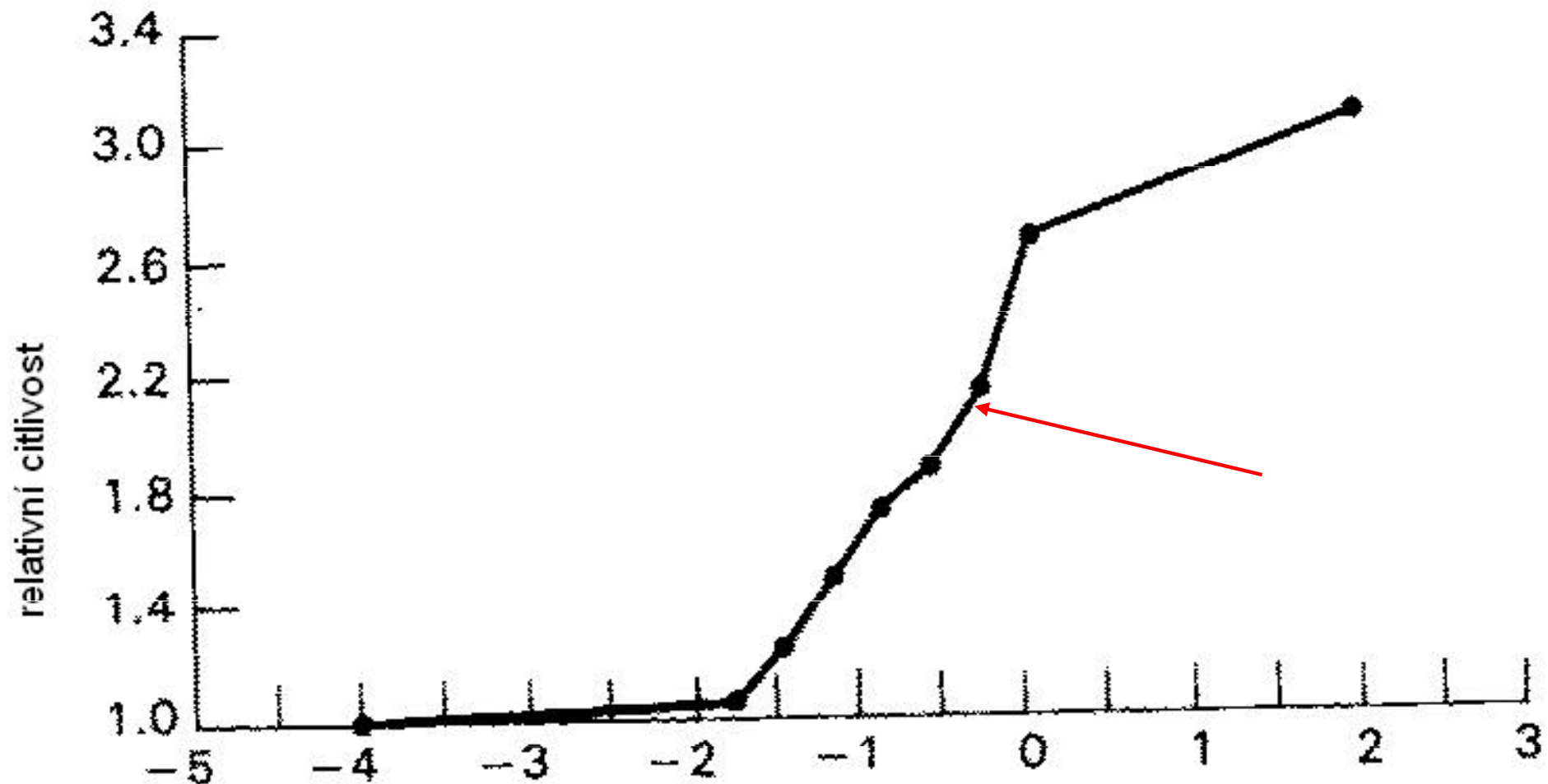
$$OER = \frac{\text{dávka v } N_2 \text{ pro daný } S}{\text{dávka v } O_2 \text{ pro daný } S}$$

Kyslíkový efekt – závislost na koncentraci kyslíku

Kyslíkový efekt je všudypřítomný a uplatňuje se téměř všeobecně (viz např. Frickeův dozimetr). Tvar křivky přežití se účinkem kyslíku většinou nemění, mění se jen její strmost.

Kyslíkový efekt je slabý u záření o vysokém LET.

Ze studia **závislosti přežití buněk na parciálním tlaku kyslíku** vyplynulo, že kyslíkový efekt je **prahový jev**, při velmi nízkých koncentracích kyslíku (setiny %) se neprojevuje, maximální zcitlivění nastává již při koncentracích 2 – 3 %.



Relativní citlivost bakterie *Shigella flexneri* Y6R na rtg-záření v závislosti na logaritmu parciálního tlaku kyslíku vyjádřeného původně v procentech.

Relativní citlivost = S/S_N , v tomto případě poměr počtu přeživších za přítomnosti kyslíku o určité koncentraci ku počtu přeživších v čistém dusíku

K ose x: -2 = 0,01% 0 = 1% 2 = 100%

Kyslíkový efekt – závislost na koncentraci kyslíku

Závislost sensitizace na koncentraci kyslíku je přinejmenším u bakterií dobře popsána tímto vztahem:

$$\frac{S}{S_N} = \frac{m[O_2] + K}{[O_2] + K}$$

S/S_N je v tomto případě poměr počtu přeživších za přítomnosti kyslíku o určité koncentraci ku počtu přeživších v čistém dusíku. Při nulové koncentraci kyslíku je S/S_N zjevně 1. Konstanta m je bezrozměrná a konstanta K má rozměr jako koncentrace kyslíku (např. $\mu\text{M/l}$). Pokud je koncentrace kyslíku mnohem větší než K , pak:

$$\frac{S}{S_N} = \frac{m[O_2]}{[O_2]} = m$$

Kyslíkový efekt – závislost na koncentraci kyslíku

Posledně uvedený vztah odpovídá situaci, kdy poměr S/S_N dosahuje maximálních hodnot. Pokud ovšem K bude rovno koncentraci kyslíku $[O_2]$, pak platí:

$$\frac{S_K}{S_N} = \frac{mK + K}{K + K} = \frac{K(m + 1)}{2K} = \frac{m + 1}{2}$$

m a následně K se určují z konkrétních grafů závislostí S/S_N na koncentraci kyslíku. (k procvičení lze použít předchozí graf, $m = 3,1$, $S_K/S_N = 2,05$, pak $K = [O_2] = 0,355\% = 4 \mu\text{M.l}^{-1}$) (průsečík zhruba označuje v grafu červená šipka)

Význam: Lze uvažovat o dvou typech poškození způsobeného primární radiční událostí. Typem 1 je potenciálně letální léze, která se stává letální pouze za přítomnosti kyslíku. Typem 2 je léze vždy letální. Léze typu 1 mohou být chemicky restituovány, což je konkurenční proces pro fixaci poškození kyslíkem.

Kyslíkový efekt – závislost na koncentraci kyslíku

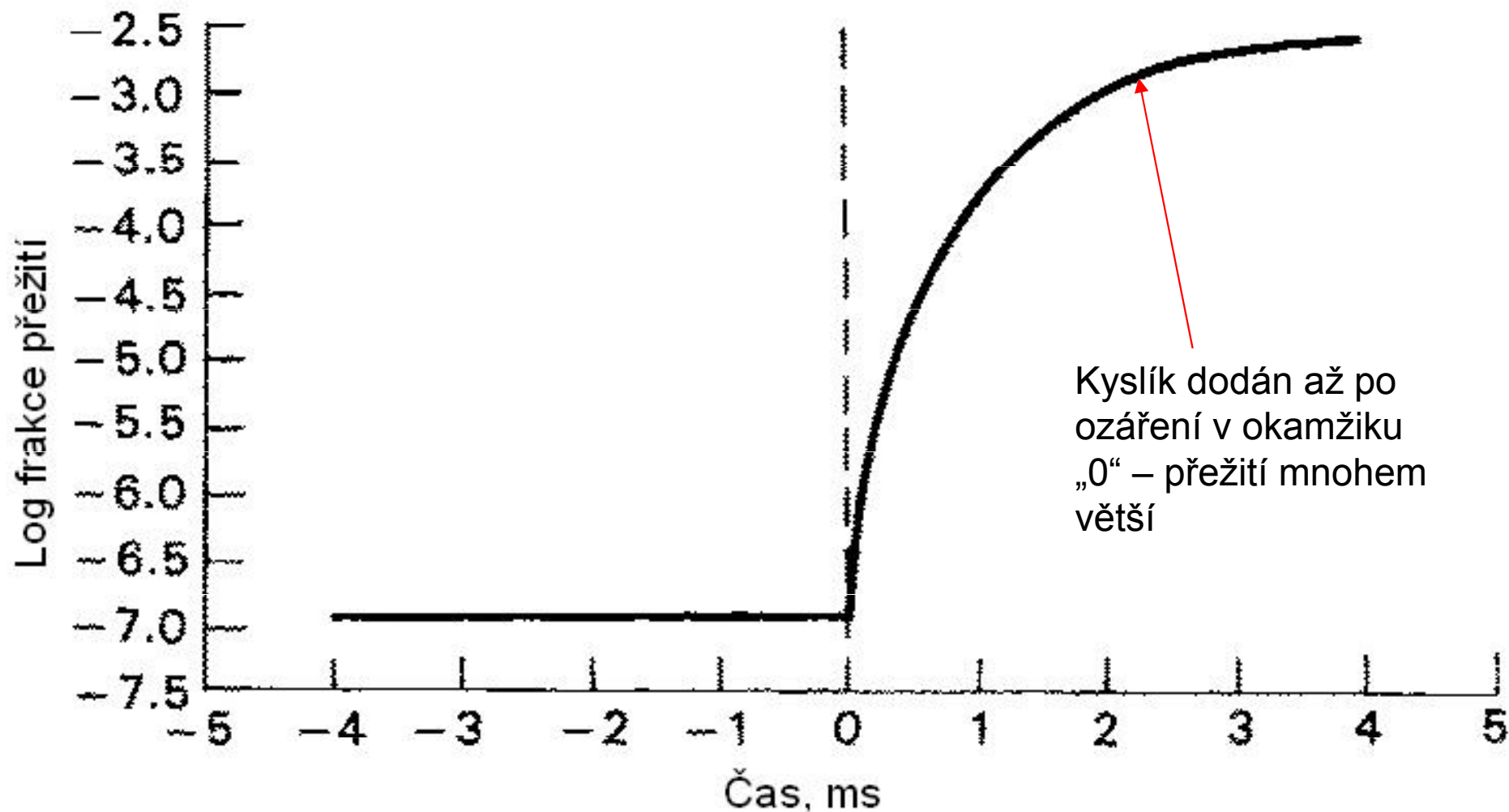
m má v tomto modelu význam konstanty, která je spojena s počty lézí typu 1 a 2 tímto vztahem:

$$n_1/n_2 = m - 1$$

K je poměr rychlostních konstant chemické restituce a kyslíkové fixace poškození:

$$K = k_{\text{rep}}/k_{\text{fix}}$$

V pokusech s mikroorganismy vystavenými náhle přítomnosti kyslíku (viz následující graf) bylo prokázáno, že vliv nepřítomnosti kyslíku se na přežití buněk projeví „až“ pokud mezi ozářením a aplikací kyslíku nastane doba delší než cca 2 ms – je tedy dán interakcí (několika různými interakcemi) kyslíku s volnými radikály se srovnatelnou dobou života. Přesný mechanismus však není znám. Jistý je význam kyslíku pro tvorbu peroxidového radikálu, u kterého však není jasný jeho význam pro vznik radiačního poškození.



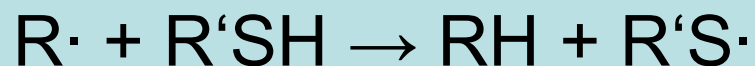
Relativní citlivost bakterie *Serratia marcescens* k 280 Gy impulzu elektronového záření. Kyslík je k dispozici buď již před ozářením (záporné časy) nebo až po ozáření. Impulz je aplikovaný v okamžiku "0".

Kyslíkový efekt – význam

Za příčinu radioresistence rychle rostoucích nádorů bylo vždy považováno jejich nedostatečné cévní zásobení a z toho plynoucí ochrana nedostatkem kyslíku. Pokusy ke zvýšení účinnosti terapie zvýšením saturace nádoru kyslíkem však nevedly k valným terapeutickým úspěchům.

Radioprotektivní účinek thiolů

Endogenní nebo exogenní thioly slouží jako lapače volných radikálů a mohou odstranit radiační poškození:



Thiolové radikály pak mohou reagovat vzájemně:



Původní thioly ovšem též reagují s (jsou odstraňovány) kyslíkem nezávisle na přítomnosti radiolytických produktů.

Roli aktivních thiolů nemohou hrát –SH skupiny bílkovin, musí se jednat o malé molekuly (tripeptid glutathion – glutamová kys.-glycin-cystein - v redukované formě – tedy **GSH**, a též cystein, cysteamin). Vzhledem k nízkým nitrobuněčným koncentracím zejména druhých dvou thiolů a velké reakční rychlosti kyslíků s volnými radikály biologicky významných látek, je však význam **endogenních thiolů** pro opravu radiačního poškození nejistý. Potvrdily to pokusy – viz dále:

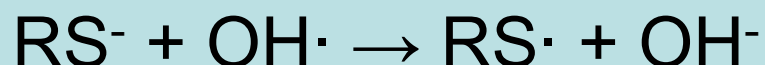
Radioprotektivní účinek thiolů

- Existují významné látky ovlivňující hladinu **GSH**: DL-buthion-S,R-sulfoxim (BSO) a diamid, tj. bis(N,N'-dimethylamid kyseliny diazen dikarboxylové. BSO ruší biosyntézu GSH a diamid oxiduje GSH na disulfid GSSG.
- Významnější je skutečnost, že existují GSH deficientní kmeny (GSH⁻) lidských buněčných linií. Tyto kmeny poskytovaly na přítomnosti kyslíku nezávislý (OER = 1) výtěžek jednovláknových zlomů. GSH⁺ kmeny vykazovaly typické hodnoty OER. Takto měl být prokázán význam intracelulárních thiolů, byť z hlediska ochrany před zářením velmi malý. (V Černobylu údajně zjištěny zvýšené hladiny glutathionu u tam žijícího ptactva.)
- Podstatně větší a zcela prokazatelný význam mají **exogenní thioly**.

Radioprotektivní účinek thiolů

Dostatečně navýšené intracelulární koncentrace jinak přirozeně se v buňkách vyskytujících thiolů, jako je cystein a cysteamin, mají prokazatelný ochranný účinek – až 2x zvyšují letální dávku, zřejmě působením *proti* kyslíkovému efektu – reparací poškození a jako lapače volných radikálů. Druhý z procesů je patrně významnější.

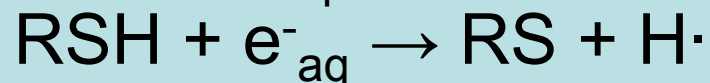
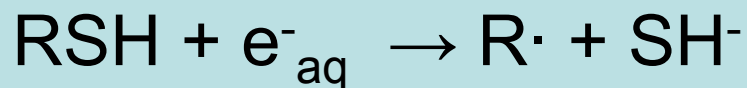
a) S hydroxylovým radikálem reagují:



b) S vodíkovým radikálem reagují:



c) Se solvatovaným elektronem reagují:



Radioprotektivní účinek thiolů

Radioprotekce pomocí thiolů je v praxi omezena jednak jejich toxicitou a také potřebou jejich podání minimálně minuty až desítky minut před ozářením. Toto může mít určitý význam v radioterapii a snad ve vojenství.

Faktor snížení dávky dosahuje u některých syntetických thiolů až hodnot kolem 3.

Nejúspěšnější je látka označovaná jako WR2721, tj. S-(2-(3-amino propylamino))ethyl-fosforothiolová kyselina, produkt vojenského výzkumu U.S. Army. Její nevýhodou je nerovnoměrná distribuce ve tkáních, zejména nízká koncentrace a tím i ochrana v mozku. Nicméně pod názvem Amifostin se používá při radioterapii např. nádorů hlavy a krku jako radioprotektivum zdravých buněk.

Sensitizéry na bázi aromatických nitrosloučenin

Vývoj těchto látek byl motivován snahou o zvýšení účinnosti radioterapie. Vesměs se jedná o elektrofilní činidla, která mohou v anoxických nádorech nahradit chybějící kyslík v jeho funkci činitele fixujícího radiační poškození nebo likvidujícího thioly, i když musí mít k témuž efektu podstatně vyšší koncentraci. V kyslíkem dobře zásobených tkáních se jako sensitizéry neprojevují. Problémem těchto látek je obecně jejich toxicita.

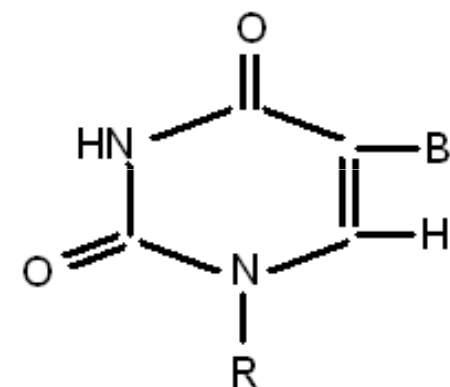
Jako první vzbudil pozornost 2-methyl-5-nitroimidazol-1-ethanol (metronidazol, Flagyl), následoval 5-nitro-2-furalaldehyd semicarbazon (nitrofurazon).

5-halogen substituované pyrimidiny

Jde o skupinu senzitizerů, které fungují zcela odlišně a nezávisle na kyslíkovém efektu.

Základním pyrimidinem je uracil. Uracil substituovaný halogenem v poloze 5 je inkorporován do DNA místo thymidinu, musí tedy být k dispozici v době replikace buněk.

Senzitizující účinek **5-bromouracilu**, resp. 5-bromodeoxyuridinu je vysvětlován citlivostí atomu bromu k radiolytickému štěpení – bromový radikál se odštěpí a v původní pozici bromu vzniká také volný radikál. K podobnému výsledku vede i reakce 5-bromouracilu se solvatovaným elektronem a nelze vyloučit ani další nepřímé mechanismy.



Autor: Vojtěch Mornstein

Poslední revize: březen 2016