

2.6.1 Biologické účinky ionizujícího záření

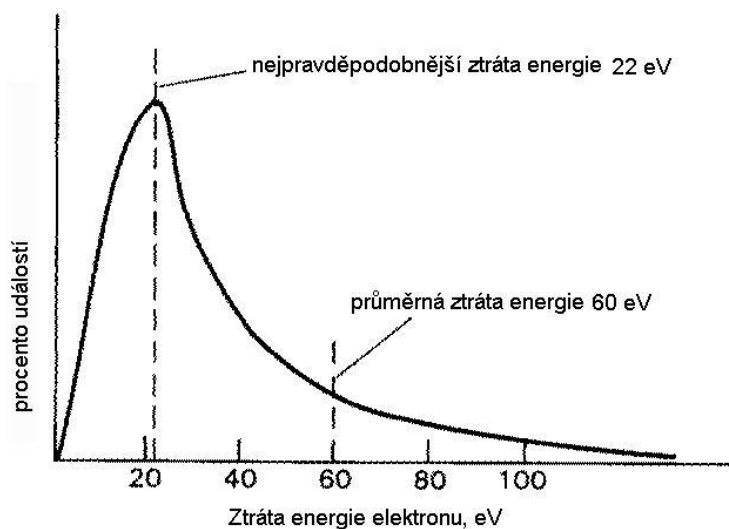
Biologické účinky ionizujícího záření jsou důležitým rizikovým faktorem diagnostických metod pracujících s tímto zářením a základem pro vysvětlení a pochopení radioterapie. Zdravotnický pracovník by měl být schopen též vyhodnotit rizika, která souvisí s přirozenou i umělou radioaktivitou v našem životním prostředí. Musí být teoreticky připraven i na možnost jakéhokoliv zneužití jaderných technologií či velké jaderné havárie.

Biologické působení ionizujícího záření se odvíjí od účinků tohoto záření na molekulární úrovni. Jeho působení na biologicky významné molekuly, zejména DNA, je esencí prakticky všech biologických efektů tohoto záření. Čtenář této kapitoly by si měl uvědomit, že jde o problematiku neobyčejně složitou, která může být experimentálně zkoumána jen na modelech dosti vzdálených našemu organismu. Klinické experimenty na lidech jsou prakticky vyloučeny, musíme se spolehnout na náhodná pozorování, studium vedlejších účinků radioterapie nebo epidemiologické studie, které se snaží vyhodnotit účinky malých dávek ionizujícího záření na velkých populačních vzorcích.

Plný rozsah této kapitoly je k studentům (radiologickým asistentům a dalším zájemcům) k dispozici v elektronické podobě.

2.6.1.1 Vybrané poznatky radiochemie

Již z řady jevů popsaných v učebnici v kap. 1.1.4. je jasné, že většina energie primárního i rozptýleného, tj. sekundárního záření je nesena elektrony, které předávají svou energii prostředí. Platí to i pro záření rentgenové a gama, s nímž se setkáváme nejčastěji. Vysokoenergetické elektrony totiž vznikají např. při fotoelektrickém jevu nebo při Comptonově rozptylu. Interakce těchto elektronů s molekulami prostředí vede k jejich chemickým změnám. Pro nás podstatným prostředím je **voda**. První ionizační potenciál vody je 12,6 eV. Toto množství energie postačuje pro „utržení“ elektronu z molekuly vody. Pro srovnání, elektrony o energii 20 000 eV ztrácejí při interakci s vodou s největší pravděpodobností kvantum energie 22 eV (průměrná velikost ztráty je ovšem 60 eV - viz obr. 2.6.1.1a). Některé tyto elektrony však přicházejí o svou energii postupně, vyražením dalších, tj. terciárních elektronů, které mají energii od jednotek do tisíců eV. Teprve tyto elektrony skutečně ve velké míře ionizují molekuly vody.



Obr 2.6.1.1a. Ztráty energie elektronů (20 keV) při ionizačních událostech.

Výsledkem předání energie elektronu molekule vody může být **ionizace**, nebo **jen excitace**. V obou těchto případech je důsledkem **nestabilita** molekul vody, která může vést ke **změnám jejich struktury** (tvorba iontů, radikálů) a následným **mezimolekulovým interakcím**.

Jednotlivé nejmenší skupiny ionizačních událostí vyvolané terciárními elektrony ve vodě, jsou od sebe vzdáleny průměrně 400 nm při vlastní velikosti ionizované skupiny molekul kolem 1 nm. Vodíkový radikál je schopen ve vodě difundovat do vzdálenosti průměrně 180 nm, dokud nezanikne. Proto je interakce (rekombinace) volných radikálů vytvářených v *různých* místech ionizačními událostmi prakticky nemožná.

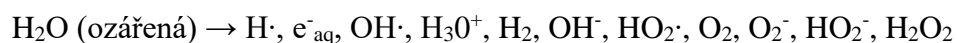
Primární produkty radiolýzy vody objevující se po interakci s částicí záření v čase od 10^{-16} do 10^{-12} s:

- Excitovaná molekula vody H_2O^*
- Radikály $\text{H}\cdot$ a $\text{OH}\cdot$ (důsledek disociace excitované molekuly)
- H_2O^+ a e^- (důsledek přímé ionizace nárazem)

Okamžitě navazují tyto chemické reakce:

- $\text{H}_2\text{O}^+ \rightarrow \text{H}^+ + \text{OH}\cdot$
- $\text{e}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}^-$
- $\text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}\cdot$
- $\text{e}^- + n\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{e}_{\text{aq}}^-$ (solvatovaný či hydratovaný elektron, doba života asi 0,2 ms)
- $\text{H}_2\text{O}^- \rightarrow \text{H}\cdot + \text{OH}^-$

Produkty radiolýzy vody tedy jsou: $\text{H}\cdot$, $\text{OH}\cdot$, e_{aq}^- , H^+ , OH^- . Ionty H^+ a OH^- však nemají z hlediska působení na živou hmotu valný význam, protože jsou ve vodě všudypřítomné. Část volných radikálů i iontů rekombinuje (vznikají původní molekuly), ale následují i další chemické reakce, takže souhrnná rovnice radiolýzy vody vypadá takto:



Všechny takto vznikající chemické entity mají určitý **chemický výtěžek** G , který je definovaný jako počet molekul vytvořených nebo rozpadlých v důsledku předání 100 eV energie sekundárního elektronu. Pro lepší představu uvádíme vybrané hodnoty G zjištěné ve vodě pro běžné rentgenové záření při neutrálním pH: $\text{H}\cdot - 0,6$, $\text{e}_{\text{aq}}^- - 2,6$, $\text{OH}\cdot - 2,6$, $\text{H}_2 - 0,45$, $\text{H}_2\text{O}_2 - 0,75$.

Jsou-li místo molekul vody zasahovány přímo biologicky významné molekuly, zejména DNA, hovoříme o **přímém účinku**.

Na základě úvah o pravděpodobnosti zásahů terčovými molekulami, je počet nepoškozených molekul E po působení dávky D dán výrazem:

$$E = E_0 \cdot e^{-kD},$$

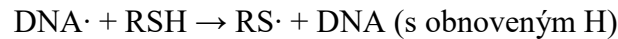
kde E_0 je původní počet molekul a k je tzv. **inaktivační konstanta** s jednotkou Gy^{-1} , jejíž převrácená hodnota udává dávku ($D = 1/k$), která sníží počet nepoškozených molekul faktorem $1/e$, tj. na 37% původní hodnoty (zdůvodnění: jestliže je $D = 1/k$, pak musí platit, že $E = E_0 \cdot e^{-1}$ čili $E = E_0/e$). Tato dávka se označuje též D_0 nebo D_{37} . Tyto úvahy platí, pokud biomolekulu inaktivuje již jediný zásah.

Nepřímý účinek je poškození terčové biomolekuly zprostředkované radikálovými produkty radiolýzy vody. Rychlost tohoto procesu je dána difuzí radikálů k biomolekulám. Bylo prokázáno, že největší význam má pro poškození biomolekul **radikál $\text{OH}\cdot$** .

To, že nastala interakce s biomolekulou (mechanismem přímého či nepřímého účinku), ještě neznamená, že muselo dojít k jejímu poškození – existují tři způsoby obnovy stavu molekul před ozářením: rekombinace, restituce a (enzymatická) oprava.

Rekombinace může nastat vlastně jen velmi krátce po interakční události – s ohledem na rychlost difuze je tento čas kratší než 10^{-11} s. Rekombinace je prostým znovuspojením iontového nebo radikálového páru.

Restituce je chemická (neenzymová) obnova původní molekuly. Dochází k ní v časech kratších než 1 ms. Příkladem takového procesu je reakce radikálu neseného molekulou DNA s molekulou obsahující sulfanylovou (sulhydroylovou či thiolovou) skupinu:

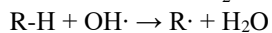
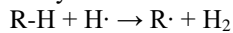


Opravy jsou enzymatické a vyžadují podstatně delší čas.

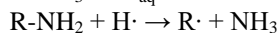
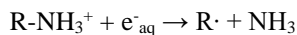
Hlavní terčovou biomolekulou je DNA, ať se jedná o účinek přímý nebo nepřímý. Ostatní biogenní makromolekuly (bílkoviny, RNA) mohou být poměrně snadno nahrazeny. Důkazem je korelace existence dvouvláknových zlomů DNA (viz dále) se ztrátou biologické aktivity. Buňky neschopné oprav DNA nebo se zablokovanými opravami DNA jsou mnohem citlivější na působení ionizujícího záření.

Není jisté, které z následujících radikálových reakcí jsou nejdůležitější pro nepřímé poškození DNA, kterou zde zastupuje písmeno R, ale uplatňují se zřejmě všechny.

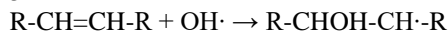
1. Vytržení vodíkového atomu



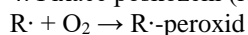
2. Disociační reakce



3. Adiční reakce



4. Fixace poškození (radikálu biomolekuly) vazbou kyslíku



Peroxidový radikál je dosti stabilní, nepodléhá restituci, ale není to ještě finální chemický produkt.

Konkrétně u DNA nastávají interakce s $\text{OH}\cdot$, $\text{H}\cdot$ a e^-_{aq} , přičemž nejdůležitější je interakce s **hydroxylem**: Funkční skupiny na bázích a cukrech mohou být změněny a chybný nukleotid se pak může špatně párovat. Poškození bází může být tak silné, že dochází k jejich ztrátám, vznikají místa bez purinů nebo pirimidinů. Přesun radikálu (přesněji nesdíleného elektronu) z báze na cukr-fosfátovou páteř může vést ke ztrátě báze. Vznikají i jednovláknové a dvouvláknové zlomy. V experimentech s viry se zjistilo, že hydroxylový radikál nejčastěji napadá vodík deoxyribózy v poloze 4. Odnímá jej cukrovému zbytku za vzniku vody.

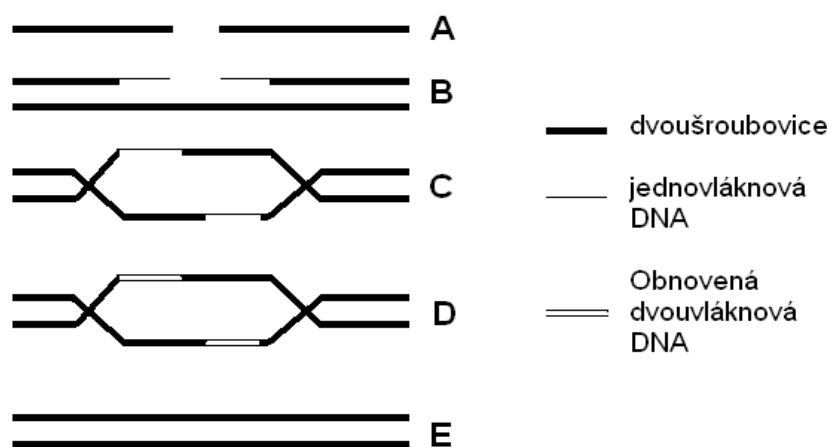
Látky se sulfanylovými skupinami vznik radikálů na DNA tlumí (mechanismem restituce), přítomnost kyslíku je naopak stabilizuje.

Zlomy dvoušroubovic DNA, jsou jednovláknové a dvouvláknové. **Jednovláknový zlom** – *single-strand break (SSB)* – je snadno reparovatelný, v radiačním poškození buněk hraje proto jen malou roli. **Dvouvláknový zlom** – *double-strand break (DSB)* – má reparaci obtížnou, protože pro ni chybí templát (předloha). Časté jsou chyby projevující se mutacemi. Tento typ zlomu vzniká třemi mechanismy, které mají různou pravděpodobnost, ovlivňovanou i druhem působícího záření:

- Jeden zásah DNA vede k **přímému** vzniku DSB v komplementárních místech řetězce.
- Jeden zásah DNA může vést k tzv. **kooperativnímu** vzniku DSB v blízkých místech obou řetězců.
- Dva **nezávislé zásahy** komplementárních řetězců v místech vzdálených od sebe max. 10 bází. Při větší vzdálenosti udrží dvoušroubovici vcelku vodíkové i jiné vazby. Jednovláknové i dvouvláknové zlomy mohou vzniknout i v důsledku nepřímého účinku, tj. působení volných radikálů. Odhaduje se, že počet DSB v jedné buňce je 15-60 při ozáření dávkou 1 Gy, zatímco počet SSB je více než 1000 na 1 Gy. Poškození DNA však působením SSB vzniká jen v minimální míře.

Poškození DNA ionizujícím zářením tedy vede ke vzniku DSB a SSB v dvoušroubovici, chemickým změnám bází i cukrových zbytků. Mohou vzniknout spojky (*cross-links*) mezi bílkovinnou matrix a DNA nebo mezi různými molekulami DNA. Tato poškození jsou opravována několika různými způsoby, jejichž detailní popis je předmětem zájmu molekulární biologie. Stačí vědět, že **excizní oprava** je typická pro jednovláknové zlomy v nereplikujících se molekulách DNA. Templát (předloha) komplementárního vlákna musí být k dispozici. Dochází k odbourání dalších bází z okolí zlomu a pak se od 3'-hydroxylového konce přerušeného vlákna doplňuje chybějící sekvence (působením enzymu DNA-polymerázy I). Podobně se opravují poškozené báze nebo cukrové zbytky.

Opravy dvouvláknových zlomů patří mezi opravy náchylné k chybám. Klíčovou rolí u nich hraje bílkovina recA (mutace genu pro recA podstatně zvyšuje citlivost k radiačnímu poškození). Prokázáno to bylo u bakterií a podobný mechanismus se projevuje i u savčích buněk. Pro částečnou rekonstrukci místa s DSB je využito homologního duplexu párového chromosomu (u diploidní buňky). Rekombinační oprava začíná odbouráním jednoho vlákna duplexu exonukleázou na obou fragmentech. Bílkovina recA se váže k obnaženým „jednovláknům“ a iniciuje výměnu vláken s homologním duplexem, čímž vznikají dvě blízká rekombinační místa. Další postup procesu vidíme na Obr. 2.6.1.1b.



Obr. 2.6.1.1b Rekombinační oprava DSB. A – dvouvláknový zlom, B – částečné odbourání jednoho z vláken v okolí zlomu a asociace s homologní dvoušroubovicí, C – vlivem recA nastává rekombinace poškozených a nepoškozených úseků, D – syntéza komplementárních řetězců (vláken) DNA polymerázou, E – opravené dvoušroubovice

Excizní opravy SSB jsou považovány za téměř bezchybné. Pravděpodobnost chyb je vyjadřována poměrem 1 : 10^7 až 1 : 10^{11} . Pravděpodobnost bezchybného spojení DSB je odhadována na jen asi 75% a dochází k němu zejména během prvních dvou hodin po poškození.

2.6.1.2 Základy buněčné radiobiologie

2.6.1.2.1 Křivky přežití

Klíčovým pojmem buněčné radiobiologie je **přežití buněk**. Teorie a modely přežití buněk vycházejí především z rozboru závislosti přežití buněk na dávce záření, tj. tzv. **křivek přežití**. Experimenty byly prováděny s buňkami *in vitro*, zpočátku mikroorganismy, a teprve od padesátých let 20. století i s buňkami tkáňových kultur, které mohou být i buňkami nádorovými nebo z nádorů odvozenými. Teorie a modely přežití buněk mají velký význam zejména pro pochopení radioterapeutických zásad a postupů, včetně pochopení nežádoucích pozdních následků ozáření.

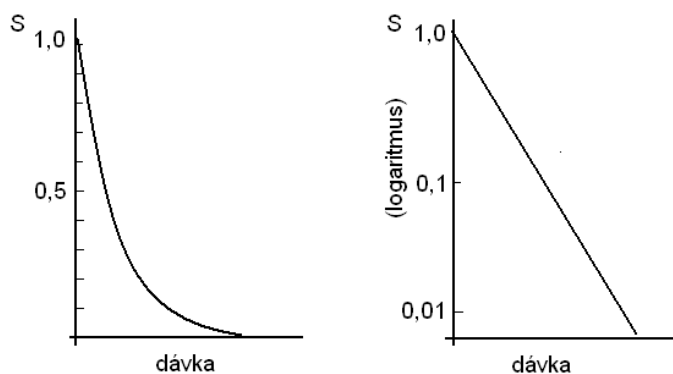
Klonogenní (též reprodukční) **přežití buňky** je stav, kdy je buňka schopna dalšího rozmnožování, například vytvoření kolonie na Petriho misce. Nejde tedy jen o přežití jednotlivé buňky, nýbrž o zachování schopnosti reprodukce (za rozhodující kritérium je považována schopnost buňky vytvořit 50 potomků). V opačném případě hovoříme o **reprodukční smrti**. K

usmrčení buňky ve smyslu jejího rychlého zániku by bylo nutno aplikovat dávky o *několik řádů* vyšší, než postačuje k její reprodukční smrti.

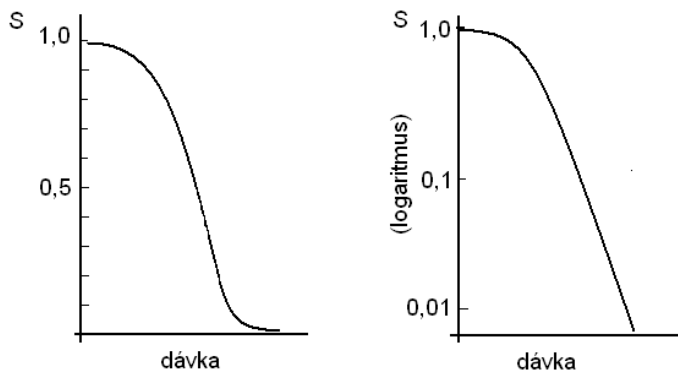
Klonogenní přežití je však obtížně definovatelné u buněk diferencovaných tkání, které mají jen malou mitotickou aktivitu a nemohou se dělit neomezeně. U těchto tkání musely být vyvinuty jiné metody hodnocení radiosenzitivity.

Již v polovině 20. století byly navrženy teoretické modely vysvětlující více či méně úspěšně tvar křivek přežití – obr. 2.6.1.2.1a a 2.6.1.2.1b. Teorie vycházela z toho, že uvnitř buňky existuje určitý malý fyzikálně popsatelný prostor představující **terč** pro účinek ionizujícího záření. Brzy byl tento terč ztotožněn s DNA. Předpokládáme, že v jedné buňce může existovat více (předem neznámý počet) terčů a inaktivace n z nich vede ke ztrátě reprodukční schopnosti. Veškeré zásahy terčů jsou náhodným (stochastickým) procesem, takže pravděpodobnost zásahu jednoho místa neovlivňuje pravděpodobnost zásahu jiného místa. (Hovoříme o nezávislých pravděpodobnostech zásahů).

Rozlišujeme jednoduché exponenciální křivky bez raménka a s raménkem.



Obr. 2.6.1.2.1a. Křivky **bez raménka** jsou typické pro haploidní buňky a prokaryota. Tento tvar napovídá, že za biologický efekt odpovídají jednotlivé jednoduché události. **Přežití S** je podíl počtu buněk přeživších určitou dávkou a počtu buněk přeživších dávkou nulovou.



Obr. 2.6.1.2.1b. Křivky **s raménkem** jsou typické pro diploidní buňky. Jejich tvar napovídá, že pro pokles reprodukční schopnosti je nutná **akumulace** poškození. Existuje (teoreticky) určitá minimální dávka, která musí být překročena, aby takovýto pokles nastal. S je definováno stejně jako v předchozím obrázku.

Přiblížíme si nejjednodušší přístup k vysvětlení křivek na obrázcích. Předpokládáme, že populace buněk je vystavena záření o nízkém LET, takže se ionizační události vzájemně neovlivňují, jejich *pravděpodobnost je malá v malém terčovém objemu*. Předpokládáme též, že buňka obsahuje terčový objem nebo objemy o velikosti v . Jako **aktivní** označíme takovou událost, která *může, ale nemusí* vést k biologickému poškození. Tím vyloučíme události završené např. rekombinací iontů nebo radikálů a chemickou restitucí (poškození biologické funkce pak *nemůže* nastat). Aktivní události registrované v objemu v se nazývají **zásahy**. Jako

V označíme **celkový buněčný objem** ozářené populace. Bude to součin průměrného objemu buňky a jejich počtu. Jako D označíme **hustotu** aktivních událostí – počet událostí (zásahů) v jednotkovém objemu. D je úměrné *dávce* a jako dávku budeme tuto veličinu, hustotu událostí, zatím označovat.

Je nutno si uvědomit, že i při velmi malých dávkách je počet aktivních událostí (v podstatě jednotlivých excitací a ionizací) velký. Odpovídá-li aktivní události např. 60 eV přenesených ze sekundárního elektronu, pak pro dávku 10 mGy vychází 4000 událostí v buňce o průměru 20 μm .

Pravděpodobnost toho, že bude zaznamenána aktivní událost kdekoli v ozářené populaci, je dána poměrem terčového a celkového objemu v/V . Vyplývá to z toho, že z celkového počtu událostí $\mathbf{D} = \mathbf{V} \cdot \mathbf{D}$ (tj. hustoty událostí – zásahů - násobené celkovým objemem) $\mathbf{v} \cdot \mathbf{D}$ událostí je zaznamenáno v citlivém objemu. Poměr těchto výrazů je roven v/V . Tento poměr je číslem, které nazveme **pravděpodobností zásahu** r . Jde zpravidla o malé číslo.

Na základě teorie pravděpodobnosti lze formulovat tzv. všeobecnou rovnici přežití. Nelze zacházet do matematických podrobností, proto tvar této rovnice uvedeme pouze pro tzv. **jednozásahový inaktivační model**, který vede ke křivce přežití bez raménka. Buňka nepřežije ani jediný zásah terče. Výše definované přežití buňky S je pak dáno výrazem:

$$S = e^{-D/D_0} \quad (= e^{-kD})$$

D_0 je převrácená hodnota inaktivačního koeficientu ($D_0 = 1/k$) a dosazením do rovnice se lze přesvědčit, že je to letální dávka potřebná pro zredukování frakce přeživších buněk na hodnotu $1/e$, tj. 37% z hodnoty původní. Při této dávce ($D = D_0$) je průměrný počet terčů zasažených v buňce roven 1. Všimněme si, že po zlogaritmování posledně uvedeného výrazu dostaneme:

$$\ln S = -kD,$$

což je samozřejmě analytické vyjádření přímky, tedy křivky bez raménka!

Matematicky mnohem složitější vyjádření mají modely, které počítají s nutností více než jednoho inaktivačního zásahu buňky. Při jistých omezeních však všechny tyto matematické přístupy vedou k vyjádření přežití buněk ve tvaru:

$$S = e^{-p(\alpha D + \beta D^2)}, \quad \text{tj. po zlogaritmování} \quad \ln S = -p(\alpha D + \beta D^2),$$

kde p , α a β jsou specifické konstanty. Protože dávka záření vystupuje v posledním vztahu v první i druhé mocnině, bývá tento výsledek označován jako **lineárně kvadratický model** závislosti biologického účinku záření na dávce. Má širší význam, než je pouhé vysvětlení tvaru křivky přežití, jak ještě ukážeme. Konstanta p bývá někdy zahrnována do koeficientů α a β . Posledně uvedená rovnice bývá někdy zapisována i v tzv. linearizované formě, kdy vyjadřujeme výraz $\ln S/D$ v závislosti na dávce (parametry α a β lze nyní snadno graficky určit z experimentálně zjištěné závislosti):

$$\frac{\ln S}{D} = -p(\alpha + \beta D)$$

Lineárně kvadratický model (LQ model) plně vyhovuje pro popis experimentálních výsledků pokud je frakce přeživších buněk větší než jedna tisícina. LQ model se plně osvědčil např. i jako východisko pro plánování frakcionované terapie.

2.6.1.2.2 Radiosensitivita a radioresistence

Veškeré látky a faktory, o nichž je známo, že modifikují účinky ionizujícího záření, **působí v rámci chemické fáze** interakce, tj. nemohou ovlivnit primární fyzikální interakci – přímé zásahy DNA vedoucí ke zlomům atd. Nepřítomnost vody a snížená teplota zvyšují radioresistenci.

Zvláštní postavení mezi látkami, které modifikují účinky záření, má **voda**, protože je v živé hmotě téměř všudypřítomná. Určitý praktický význam mají úvahy o radiosensitivujícím účinku vody v případě působení na biologicky významné molekuly v suchém stavu. Jedině za přítomnosti vody mohou vznikat nebezpečné produkty radiolýzy vody. Veškeré radiační poškození biologických molekul nebo i buněk v dehydrovaném stavu je nutno přisoudit přímému účinku, tj. zejména zásahům DNA, a to vysokoenergetickými elektrony.

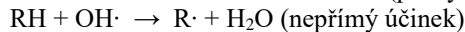
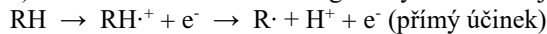
Zabývat se musíme i vlivem **teploty**. Poškození molekuly, které pochází z **přímé ionizace** citlivého místa a vede k nevratné destrukci biologických vlastností molekuly, je relativně málo citlivé na teplotu. Předávaná množství energie jsou totiž podstatně vyšší než aktivační energie potřebné pro rozbití vazeb. V případě, že poškození pochází spíše z **excitace**, je vliv teploty výraznější. S ohledem na nízké aktivační energie produktů radiolýzy vody je však závislost účinků na teplotě za přítomnosti vody jen slabá.

Zdaleka nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím citlivost buněk a tkání k ionizujícímu záření je koncentrace kyslíku. Hovoříme o **kyslíkovém efektu**.

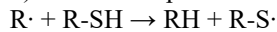
Již v počátcích radiační biologie bylo zjištěno, že přítomnost kyslíku silně ovlivňuje schopnost záření vyvolat poškození živé hmoty. Zvýšená pozornost je však těmto efektům věnována až od 50. let 20. století, kdy si radiační biologové uvědomili význam kyslíkového efektu pro odpověď nádoru na ozáření. V principu jde o to, že nedostatek kyslíku, tzv. **anoxické podmínky**, pomáhá přežít části nádorových buněk po ozáření.

Studium vlivu kyslíku nelze oddělit od studia vlivu některých jiných endogenních i exogenních látek. Tzv. konkurenční model interakce senzibilizátorů a ochranných látek zahrnuje:

a) Primární tvorbu radikálů organických molekul jako výsledek přímého nebo nepřímého účinku:



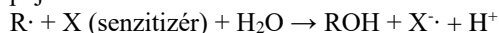
b) Chemická oprava thiolů:



c) Konkurenční reakce s kyslíkem, která **fixuje radikál** na biomolekule a pravděpodobně vede k biochemicky neopravitelnému poškození. Je klíčová z hlediska senzitivujícího účinku kyslíku:



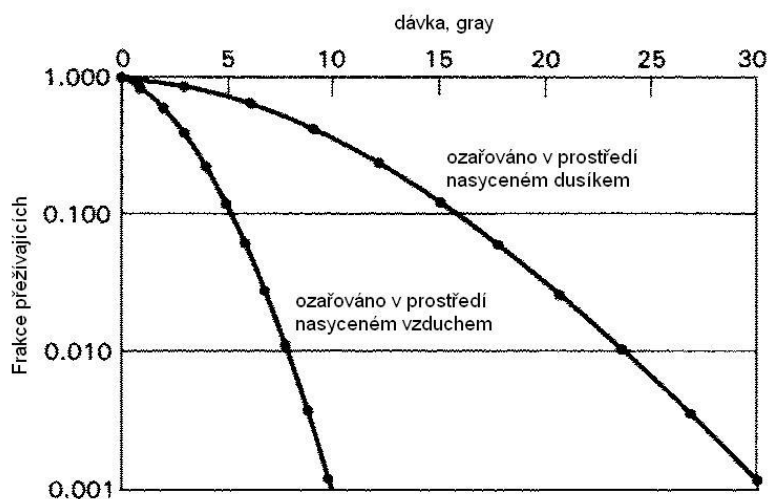
d) Řada elektronegativních látek může imitovat svými reakcemi přítomnost kyslíku (reakční produkt ovšem nemusí být stejný jako při reakci s kyslíkem). Tyto **senzitivizéry** mají praktický význam a bude o nich podrobněji pojednáno dále. Příklad reakce tohoto druhu:



e) Předchozím reakcím konkuruje vychytávání „vodních“ volných radikálů sloučeninami s –SH skupinami. Volný kyslík ovšem reaguje s těmito thiolů a tím snižuje jejich hladiny a ochranné účinky.

Účinek kyslíku lze popsat jako *účinek modifikující dávku* – poměr podílů přeživších buněk za přítomnosti a nepřítomnosti kyslíku pro určitou dávku 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. Konstantní hodnoty obou poměrů jsou zřejmé z obrázku 2.6.1.2.2a. Druhý z uvedených poměrů je označován jako **oxygen enhancement ratio** – OER:

$$OER = \frac{\text{dávka } N_2 \text{ prodaný } S}{\text{dávka } O_2 \text{ prodaný } S}$$



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

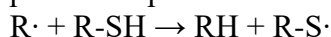
Obr. 2.6.1.2.2a

Kyslíkový efekt je všudypřítomný a uplatňuje se téměř všeobecně. Tvar křivky přežití se účinkem kyslíku většinou nemění, mění se jen její strmost. Slaběji se projevuje u záření o vysokém LET. Ze závislosti přežití buněk na parciálním tlaku kyslíku vyplynulo, že kyslíkový efekt je prahový jev. Při velmi nízkých koncentracích kyslíku (setiny %) se ještě neprojevuje, ale maximální zcitlivění nastává již při koncentracích 2 – 3 %. Další zvyšování koncentrace kyslíku má jen malý význam.

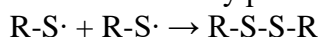
Klinický význam: Za příčinu radioresistance rychle rostoucích nádorů bylo vždy považováno jejich nedostatečné cévní zásobení a z toho plynoucí ochrana nedostatkem kyslíku. Pokusy se zvýšením účinnosti terapie lepší saturací nádoru kyslíkem však tuto tezi nepotvrdily jako univerzálně platnou.

2.6.1.2.3 Radioprotektivní účinek thiolů

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



Thiolové radikály pak mohou reagovat vzájemně:



Thioly přítomné v buňce ovšem též reagují s kyslíkem (čili jsou inaktivovány) nezávisle na přítomnosti radiolytických produktů. Roli aktivních thiolů nemohou hrát –SH skupiny bílkovin, musí se jednat o malé molekuly. Významný je tripeptid glutathion, tvořený sekvencí glutamová kyselina-glycin-cystein. Jeho redukovanou (aktivní) formu označíme jako GSH. Podobně se uplatňují též cystein a cysteamin. Vzhledem k dosti nízkým nitrobuněčným koncentracím těchto thiolů a též velké reakční rychlosti kyslíku s volnými radikály biologicky významných látek, je význam *endogenních* thiolů pro opravu radiačního poškození omezený.

Prokazatelný význam mají *exogenní* thioly dodávané organismu v nadbytku. Zvýšená intracelulární koncentrace thiolů jinak přirozeně se v buňkách vyskytujících má prokazatelný ochranný účinek – až 2x zvyšuje letální dávku, zřejmě působením *proti* kyslíkovému efektu. Thioly reparují poškození a působí jako lapače volných radikálů. Druhý mechanismus je patrně významnější. Reagují

a) s hydroxylovým radikálem:



b) s vodíkovým radikálem:



c) se solvatovaným elektronem:



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 účinku dosahuje u některých syntetických thiolů až hodnot kolem 3. Takovým thiolem je např. látka označovaná jako WR2721. Její nevýhodou je nerovnoměrná distribuce ve tkáních, zejména nízká koncentrace a tím i ochrana v mozku (což je pozitivní z hlediska ozařování mozkových nádorů!).

2.6.1.2.4 Sensitizéry na bázi aromatických nitrosloúčenin a substituovaných pirimidinů

Vývoj sensitizérů na bázi aromatických nitrosloúčenin byl motivován snahou o zvýšení účinnosti radioterapie. Vesměs se jedná o elektrofilní činidla, která mohou v anoxických nádorech nahradit chybějící kyslík při fixaci radiačního poškození nebo likvidaci thiolů, i když musí mít k těmto efektu podstatně vyšší koncentraci než kyslík. 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, má význačné účinky proti některým infekcím), následoval 5-nitro-2-furalsemikarbazon (nitrofurazon, baktericidní látka používaná na rány).

5-halogen substituované pyrimidiny jsou skupinou látek, které senzitivují 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. Senzitivující 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.

2.6.1.2.5 Genetické efekty ionizujícího záření

Rozlišujeme genetické a somatické mutace. V obou případech jde o stochastické (náhodné) poškození buňky, takže buňky si zachovávají **schopnost dělit se**. Vznik rakoviny je jednou z významných tříd somatických mutací.

Téměř vždy platí, že závažnost změny fenotypu *nezávisí* na dávce záření.

Můžeme rozlišit dva hlavní typy **genetických změn**: (1) Změny struktury a počtu chromozomů pozorovatelné v metafázi (mutace chromozómové a genomové). (2) Genetické změny, které se neprojevují na struktuře chromozomů (genové, bodové mutace).

Nejprve se budeme zabývat prvním typem, především **chromozómovými zlomy**. Rozlišujeme zlomy:

- Subchromatidové – obtížně zjistitelné, vznikají v profázi.
- Chromatidové – vznikají jako důsledek ozáření v G₂, tj. po replikaci. V následující metafázi jsou pozorovatelné.
- Chromozómové vznikající jako důsledek ozáření v G₁, tj. před replikací.

Mějme níže uvedený chromozóm s genovou strukturou určenou velkými písmeny, přičemž © označuje polohu centromery a ‡ označuje místo, kde došlo ke zlomu:

A-B-C-©-D-E-F‡-G-H-I

Výsledkem je

A-B-C-©-D-E-F **G-H-I**

Tato léze je většinou opravena správně, avšak fragmenty se mohou spojit i chybně:

A-B-C-©-D-E-F-**I-H-G**

nebo **I-H-G**-A-B-C-©-D-E-F

nebo **G-H-I**-A-B-C-©-D-E-F

Může se vytvořit i např. kruhová struktura z fragmentu, který má centromeru, a fragment bez centromery zůstane oddělen. Buňka se dělí, ale fragment bez centromery (**acentrický**) se nemůže účastnit normálním způsobem mitózy.

Jindy se na nezreplikované chromatidě chromosomu se objeví dva zlomy:

A-B-C-©-D‡-E-F‡-G-H-I, vzniká tedy:

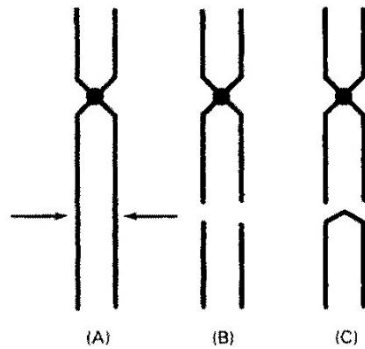
A-B-C-©-D E-F G-H-I

Rekombinační oprava může být správná, avšak může vzniknout i mnoho chybných spojení. Produkt:

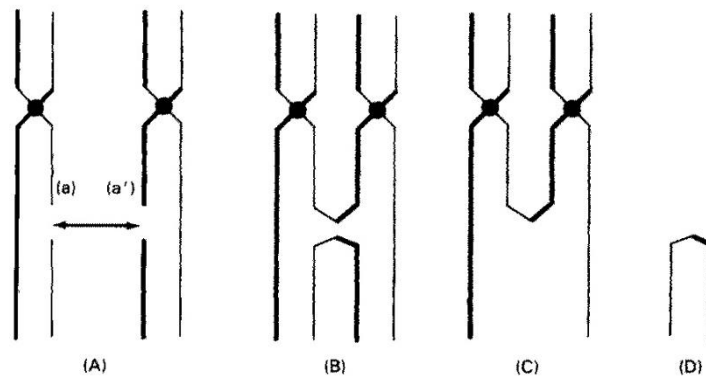
A-B-C-©-D-G-H-I

Má například **intersticiální delecí** a malý acentrický fragment E-F se bez centromery nemůže replikovat.

d) Chromozómové zlomy vzniklé po replikaci, tj. ve fázi G₂. Některé typy a jejich následky vidíme na následujících obrázcích Obr. 2.6.1.2.5a a Obr. 2.6.1.2.5b.



Obr. 2.6.1.2.5a Důsledky současných dvouvláknových zlomů (A, B) na obou chromatidách. V důsledku chybné opravy se může vytvořit velký acentrický fragment (C).



Obr. 2.6.1.2.5b. Chybná oprava dvou poškození na různých chromosomech (A,B). Chybným spojením se vytváří dicentrický chromosom (C) a acentrický zbytek (D).

Nejmenší a nejjednodušší genovou mutací je změna jediné báze nukleotidové sekvence v DNA – tzv. **bodová mutace**. Může vzniknout v důsledku chemického poškození báze nebo jejího chybného vložení při reparaci poškození či při replikaci.

Jiným typem genové mutace je tzv. posun čtení v důsledku delece nebo inzerce. Představme si sekvenci genů přepisujících se do kodonů nesených RNA:

CAT-CAT-CAT-CAT-CAT-CAT-CAT-CAT....

Tučně zvýrazněné místo označuje deleci. Nové čtení bude:

CAT-CAT-CAT-CAT-TCA-TCA-TCA.....

Díky tomu nastane chybné vložení aminokyselin.

Většina mutací, včetně těch, které vyvolalo ionizující záření, má **recesivní charakter**, čili může se projevit jen u homozygotů. Proto je poměrně obtížné mutace identifikovat, pokud nepoužijeme jako model bakteriální nebo buněčnou kulturu. U mikroorganismů se mutace identifikují pomocí tzv. **deficientních kmenů**, které potřebují nějaký specifický metabolit pro svůj růst v důsledku aktivity nějakého genu (který blokuje syntézu příslušného metabolitu). Mutantní jsou pak ty kmeny, které mohou růst i v médiu, které neobsahuje daný metabolit. Buňky deficientního kmene jsou ozářeny a po určité době jsou vysety do živného media bez příslušného metabolitu. Jejich počet je znám. Malý počet mutantů umožní vznik kolonií na Petriho miskách. Podíl přeživších buněk a jejich původního počtu ve výsevu určuje **frekvenci mutací**. Typická frekvence bodových mutací savčích buněčných linií leží v rozmezí od 1 do $3 \cdot 10^{-7}$ cGy⁻¹. Závislost na dávce má často podobu lineárně kvadratickou.

Mutagenní účinky ionizujícího záření popsal ve svých slavných experimentech u vyšších organismů poprvé Müller (1927), a to u drozofil. Šlo o mutace na chromozómu X, které se mohly letálně projevit jen u samečků. Výsledky této a navazujících studií lze shrnout takto:

1. V rozsahu od 0,25 do 40 Gy roste frekvence mutací lineárně s dávkou.
2. Přinejmenším u drozofil jde o bezprahový efekt.
3. Dávkový příkon a frakcionace nehrají v podstatě žádnou roli.
4. Citlivost samčích i samičích gamety je velmi závislá na vývojovém stadiu.
5. Frekvence mutací je $1,5 - 8 \cdot 10^{-8}$ na lokus a cGy

Protože vznikly pochybnosti o přenositelnosti výsledků získaných na drozofilách na člověka, byly od 60. let prováděny experimenty na myších, což je nejdostupnější savčí model. Bylo překvapující, že u myši byla frekvence

mutací $2,2 \cdot 10^{-7}$ na lokus a cGy, tj. i desetkrát vyšší než u drozofil. U myši bylo dále zjištěno, že pro *tutéž celkovou dávku* při nízkých dávkových příkonech (např. $0,1 \text{ mGy} \cdot \text{min}^{-1}$) je frekvence mutací citelně nižší než při vysokých dávkových příkonech (např. $1 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$). Vysvětlením je zřejmě dostatek času pro reparaci.

2.6.1.3 Účinky ionizujícího záření na normální tkáně i nádory

Nyní budeme aplikovat radiochemické poznatky a poznatky o růstových modelech a sensitizaci buněk na tkáně a orgány (systémy tkání). Z hlediska odpovědi na ozáření je u tkání rozhodující jejich reprodukční-klonogenní aktivita, jež může být u různých tkání značně rozdílná: od téměř úplné ztráty této schopnosti u mozkové tkáně až po ohromnou proliferační aktivitu krvetvorné tkáně.

Zatím jsme za smrt buňky považovali její klonogenní smrt, tj. ztrátu rozmnožovací schopnosti. Ve tkáních však musíme uvažovat vedle toho i normální stárnutí buněk a dochází i k odstraňování buněk, které jsou „ve špatný čas na špatném místě“.

Rozlišujeme dva druhy buněčné smrti: (1) **Nekróza** – akutní patologická smrt buňky v důsledku nedostatku kyslíku, zranění apod. Buňky napuchnou a lyzují, buněčný obsah se vylévá a v důsledku toho vzniká zánětlivá reakce okolní tkáně. U nádorů je nekróza častá, když rychle rostou, a proto mají nedostatečné cévní zásobení, málo kyslíku a živin. V tomto případě se však zánětlivá odpověď neobjevuje. (2) Buněčná smrt způsobená stárnutím nebo řízená metabolicky se označuje jako **apoptóza**. Projevuje se zmenšováním jádra a cytoplasmy, následuje fragmentace a fagocytóza fragmentů sousedními buňkami nebo makrofágy, obsah buněčný se nevytváří, nevzniká zánět.

Apoptóza má v souvislosti s nádorovými onemocněními klíčový význam, což se ukázalo po objevu tumor-supresorových genů a onkogenů. Patrně nejvýznamnějším tumor supresorovým genem je p53, který je transkripčním aktivátorem genů, které ovlivňují stabilitu genomu, buněčný cyklus a reakci na poškození DNA. Je známo, že produkt tohoto genu vede k apoptóze, i když není jedinou podmínkou pro její vznik. Mutace genu p53 je často provázána neschopností zahájit apoptózu. Z hlediska patologie je důležité, že již mírné poškození DNA ve fázi G1 aktivuje prostřednictvím p53 apoptózu. Jiným důležitým genem řídícím apoptózu je bcl-2. Jím kódovaný protein blokuje apoptózu (např. u neuronů, myeloidních buněk a lymfocytů), čímž brání buněčné smrti.

Z hlediska předpokládané radiobiologické odpovědi na ozáření lze tkáně různě klasifikovat. Jedním ze způsobů je členění zdravých tkání na:

- a) **Hierarchický typ H**, charakterizovaný vysokou aktivitou kmenových buněk. Jde o velmi radiosenzitivní tkáně, které reagují na ozáření akutními změnami – důsledkem je časná radiační morbidita. Křivky přežití buněk těchto tkání mají jen malá raménka.
- b) **Flexibilní typ F**, charakterizovaný nízkou aktivitou kmenových buněk, jde o radiorezistentní tkáně, jejich poškození je příčinou pozdní radiační morbidity. Křivky přežití mají význačné raménko.
- c) Existuje i smíšený typ, u kterého není časná a pozdní morbidita nezávislá – podle síly akutní odpovědi lze usoudit na odpověď pozdní.

Pro pochopení radiačního poškození tkání je důležitá existence tzv. **růstového podílu buněk**. Ne všechny buňky v populaci jsou zapojeny do procesů proliferace, tj. některé setrvávají ve fázi označované jako G0. Růstový podíl je definován jako podíl klonogenně aktivních buněk v populaci. Pro odlišení tohoto podílu od ostatních buněk bylo použito ^3H -značeného (triciovaného, tritium je zářič beta) tymidinu, který musí být k dispozici v S-fázi buněčného cyklu. Procento buněk, které inkorporovaly značený tymidin do svého genomu, pak představuje růstový podíl. Obecně platí, že neaktivní (necyklující) buňky mají vyšší radioresistenci, což lze vysvětlit např. tím, že mají více času na opravu poškození před zahájením svého dělení.

Důležitý je poznatek, že necyklující buňky se po změně vnějších podmínek mohou stát opět klonogenně aktivními (cyklujícími).

U rychle rostoucích nádorů se mohou objevit rozdíly v zásobení kyslíkem a glukózou v jejich různých částech. Je-li vzdálenost od nejbližší cévy větší než asi 100 μm , nastává nekrotizace. Růstový podíl je soustředěn do nejbližšího okolí cév. Ve zbývajícím kompartmentu nádorové tkáně jsou necyklující buňky „podvyživené“ a anoxické.

Dosud diskutované modely přežití se týkaly buněk pěstovaných *in vitro*. Prvními **tkáňovými modely**, v nichž se studovalo přežití buněk, byly *nádory*. Nádor byl ozářen v jednom živočichovi a pak transplantován do neozářeného živočicha téhož druhu. Zvláštní zájem byl o necyklující buňky a o kyslíkový efekt v souvislosti s radioterapií. Zmíníme se stručně o několika konkrétních experimentálních postupech.

Hewittův zředovací test. Prováděn pomocí nádorových linií pěstovaných v peritoneu myši. Zjišťuje se, kolik neozářených nebo různě ozářených nádorových buněk je schopno usmrtit příjemce. Pro několik různých dávek záření se určí podíl takto aktivních buněk a zjistí se jeho závislost na dávce. Tento test umožnil ověřit např. kyslíkový efekt u savčích nádorů.

Postupovat lze i tak, že z ozářeného solidního nádoru se získají buňky, které jsou podány neozářeným myším téhož kmene. Po 15-20 dnech jsou příjemci usmrceni a v jejich plicích jsou spočteny kolonie nádorových buněk. Mezi počtem injikovaných buněk a počtem kolonií je vztah přímé úměry.

Jiným způsobem hodnocení odpovědi nádoru na ozáření je sledování závislosti objemu nádoru na době od jeho inokulace do hostitelské myši. Problém je nepřesnost měření objemu nádoru *in situ* s ohledem na jeho nepravidelný tvar. Zatímco objem neozářených nádorů roste s časem alespoň zpočátku lineárně, objem ozářeného nádoru se může nejdříve zmenšit a teprve pak může po čase opět růst. Tato doba charakterizuje odpověď na ozáření a nazývá se **zpoždění růstu**.

Modifikační metody je měření doby potřebné k dosažení předem definovaného objemu nádoru nebo dávky záření potřebné k vyléčení 50% nádorů.

V rostoucích nádorech lze očekávat různě silné hypoxické podmínky. Situace se mění během „životních cyklů“ ozařovaného nádoru – vliv velikosti, vaskularizace a selektivního ničení buněk dobře zásobených kyslíkem. Reoxygenace anoxických buněk nádoru je tak rychlá, že se může projevit ještě před skončením ozařování.

Již v první dekádě dvacátého století byl formulován tzv. **zákon Bergonié a Tribondeau**, který praví, že k záření jsou nejcitlivější buňky rychle se dělící a málo diferencované.

Testování radiosenzitivity *normálních* tkání (a jejího ovlivnění) *in vivo* se zaměřuje na ty tkáně, které jsou velmi radiosenzitivní a jejichž poškození představuje pro člověka největší riziko. Jsou to zpravidla tkáně, v nichž se buňky rychle obměňují: krvetvorná tkáň (kostní dřev), kůže, epitel gastrointestinálního traktu a gonády (tvorba spermií). Pro každou z uvedených tkání byly vyvinuty testy radiosenzitivity.

Zde uvádíme některé příklady, jak se k tomuto testování přistupuje. Metoda bývá označována CFU – *colony forming units*, což znamená jednotky vytvářející kolonii buněk, např. ve slezině příjemce ozářených buněk. **Buňky krvetvorné tkáně** mají totiž schopnost vytvářet počítatelné kolonie buněk ve slezině příjemce, jehož kostní dřev byla zničena ozářením. CFU mohou pocházet z femuru ozářených myši nebo je jejich suspenze ozařována *in vitro*, což nemá zásadní vliv na jejich radiosenzitivitu. Pro buňky krvetvorné tkáně je charakteristické, že jejich křivky přežití jsou téměř bez raménka a D_0 je přibližně 1 Gy. Tyto buňky jsou vedle spermatogonií (vývojové stadium spermie) nejcitlivějšími množícími se buňkami v savčím těle a přitom do značné míry určují přežití jednotlivců.

Působení na **epitel GIT** je dáno ovlivněním klonogenie kmenových buněk střevní sliznice, jež se nacházejí v Lieberkühnových kryptách mezi střevními klky. U báze klků dochází k nejčastějšímu dělení buněk. Plně vyzrálé buňky se nacházejí až v distální třetině klku. Proces zrání buněk trvá asi 4 dny. Poškození střevní sliznice zářením se systémově jeví jako velká ztráta tekutin a elektrolytů. Z histologického hlediska přitom dochází až k úplné likvidaci klků. Dávka záření může být nastavena tak, aby v jedné kryptě zůstávala v průměru jediná klonogenní kmenová buňka. Na základě repopulace krypt kmenovými buňkami lze získat křivky přežití. Pro kmenové buňky Lieberkühnových krypt je charakteristické velké raménko na křivce přežití, což asi souvisí s jejich velkou schopností rychle reparovat poškození. Proto je poškození těchto buněk silně závislé na dávkové rychlosti. Nicméně lze odhadnout, že letální poškození GIT nastává u myši již po překročení dávky kolem 9 Gy.

Spermatogeneze. Vývoj spermie z kmenové buňky trvá u člověka zhruba 60 dnů, u myši asi 40 dnů. Jednotlivá vývojová stadia se značně liší svou citlivostí, nejvyšší citlivost mají u myši intermediální spermatogonie ($LD_{50} = 0,2$ Gy!), nejnižší již zralé spermie ($LD_{50} = 500$ Gy!). Měřítkem účinku záření na spermatogenezi je úbytek hmotnosti varlete. Metoda vychází z představy, že závislost úbytku hmotnosti na dávce je dvousložková. Je to způsobeno tím, že se varle skládá z tzv. senzitivního a nesenzitivního podílu tkání. Nesenzitivními, tj.

radiorezistentními buňkami varlete jsou Sertolliho buňky a buňky vazivové tkáně obklopující tubuly. Senzitivní buňky jsou **spermatogonie** a další předchůdci spermií, ztráta hmotnosti varlete po ozáření je v tomto případě dána přerušením spermatogeneze. Křivka „přežití“ nemá žádné raménko, což svědčí o nedostatku reparace poškození. Dávkový příkon a frakcionace proto nemají žádný vliv na rozvoj poškození. U člověka bylo zjištěno, že sterilita trvající několik let je navozena dávkou cca 2,5 Gy. K trvalé sterilizaci dochází po dávce 6 Gy.

2.6.1.4 Systémové účinky ionizujícího záření

V této kapitole se budeme věnovat jednak tzv. nemoci z ozáření čili akutní odpovědi na ozáření a následně i pozdním účinkům, které mají převážně degenerativní a kancerogenní charakter. Tyto účinky jsou výslednicí změn vyvolaných vlastním ozářením nebo sekundárně, nepřímými mechanismy. S touto problematikou se seznámíme jen v hrubých rysech.

2.6.1.4.1 Akutní letální odpověď na ozáření u savců

Akutní letální radiační odpověď – nemoc z ozáření – je do značné míry předpověditelná na základě různé citlivosti tkání a jejich zastoupení v životně důležitých orgánech. Smrt jedince nastává v tomto případě v rozmezí desítek minut až několika měsíců. Jde o důsledek působení na hojně se dělící buňky tkání, které jsou výše označovány jako tkáně typu H. Obecně vysvětlujeme akutní účinky především působením na kmenové buňky proliferujících tkání.

Z hlediska akutní letální odpovědi *nemá* při celotělovém ozáření pronikavým zářením příliš velký význam epidermis a vlasové váčky, i když jde o buňky hojně se dělící. Podobně můžeme pominout i poškození gametogeneze.

Prvním nastupujícím syndromem je **poškození krevtvorby**. Kmenové buňky kostní dřeně jsou velmi citlivé na ozáření, na rozdíl od diferencovaných buněk krevních (krvinek, destiček), jež jsou citlivé jen minimálně. Poškození krevtvorby se tedy stává patrným až po odumření zralých krevních buněk. Efekt se objevuje po dávce několika Gy.

Životní cyklus lidské červené krvinky trvá asi 100 dnů, avšak granulocyt (bílá krvinka se zásadní důležitostí pro boj s infekcí) přežívá v krvi jen pár hodin, což je po ozáření jen částečně kompenzováno prekurzory těchto buněk. Krevní destičky významně klesají asi po osmi dnech, což souvisí s vyčerpáním zásoby jejich prekurzorů – megakaryocytů. Počet erytrocytů klesá pomalu, ale po silném ozáření může klesat i v důsledku zvýšené krvácivosti.

K plnému rozvoji tzv. **gastrointestinálního syndromu** dochází po ozáření dávkami od zhruba 10 Gy během 4 – 6 dnů, což je doba, během které odumřou buňky epitelů klků, které nejsou obnovovány mitózami v Lieberkühnových kryptách. Výsledkem narušení absorpce vody a elektrolytů ze střevního obsahu jsou vážné průjmy. V případě méně závažného radiačního poškození střevní sliznice dochází k plné obnově poměrně rychle – do 10 dnů.

Ozářením je závažně postižen i **lymfatický systém**, který zahrnuje mízní uzliny, slezinu a brzlík, obsahuje tkáň typu H, koncovou buňkou je lymfocyt. Systém se z hlediska radiosenzitivity ničím podstatným neliší od předchozích, s jedinou zvláštností – lymfocyty jsou k ozáření velmi citlivé, i když se nedělí: během několika hodin po ozáření dávkami několika desetin Gy odmírají. Vysvětlení spočívá v mimořádné citlivosti lymfocytů k apoptóze, gen p53 je v nich aktivován již velmi malými poškozeními DNA.

Centrální nervový systém odpovídá na ozáření na dvou úrovních. Již při poměrně malých dávkách do 1 Gy se často objevuje neklid a zvracení, což může být důsledkem účinku záření přímo na centrum zvracení v mozku. Při velmi vysokých dávkách nad 100 Gy se objevuje téměř okamžitě dezorientace následovaná do několika hodin smrtí v důsledku selhání CNS a kardiovaskulárního systému. Mechanismus tohoto efektu je rovněž nejasný (nejde o usmrcování buněk).

Akutní odpověď na ozáření člověka – nemoc z ozáření – můžeme souhrnně popsat takto:

1. Při dávkách mezi 1 a 2 Gy jsou až do 3 – 4. týdne klinické projevy slabé - objevují se příznaky jako ztráta ochlupení, bledost, všeobecný neklid, průjmy a záněty sliznic. K úmrtím nedochází, vyléčení může být spontánní, léčba podpurná a symptomatická.

2. Dávka 5 Gy je pro člověka LD₅₀, pokud ozáření zasáhne rovnoměrně celé tělo. Odpověď organismu je prakticky okamžitá a bez lékařského zásahu se projevuje neklidem, nevolností a zvracením. Téměř okamžitě následuje druhá vlna těchto potíží. Ve třetím týdnu se naplno projevují průjmy a rozvíjí se syndrom kostní dřeně – bledost, krvácivost, záněty a infekce sliznic. Během 4. – 6. týdne nastává u poloviny neléčených ozářených smrt v důsledku vyhubnutí, infekcí a zánětů. Léčba si žádá sterilní podmínky a transfuze trombocytů i leukocytů, umělou výživu a antibiotika. Při intenzivní terapii lze přežít ve většině případů celotělovou dávkou 6 – 7 Gy.

3. 100% smrtelnou dávkou je i přes veškerou terapii 10 Gy. Ozáření se projevuje zvracením, následují průjmy. Po týdnu se k tomuto přidávají rozsáhlé záněty, infekce a krvácení. Vystupňování těchto příznaků vede k vyčerpání a smrti ve 3. týdnu. Tento klinický obraz vzniká kombinováním tří klinických syndromů:

- neurologického, který rychle usmrcuje při dávkách nad 20 Gy
- gastrointestinálního, který usmrcuje již při dávkách nad 10 Gy
- kostní dřeně (hematologického), který bez léčby usmrcuje člověka od dávky přibližně 5 Gy narušením krvetvorby a obranyschopnosti.

Rozložení v krátkém čase aplikované letální dávky na delší období (týdny) se projevuje omezením projevů GIT syndromu, protože buňky v Lieberkühnových kryptách reparují poškození během několika hodin a mohou obnovit klky. Toto však neplatí pro hematologický syndrom, protože klonogenní prekursorů buněk kostní dřeně reparují velmi pomalu.

Odděleně musíme pojednat o **účincích na embryo a plod**. Obecně lze předpokládat, že dělicí se buňky lidského embrya budou citlivé vůči ozáření. Embryo však nemá povahu neustále se obnovující populace (jako epitel) a možnosti reparace nahrazením poškozených buněk jsou malé. Problém je, jak dlouho zůstávají embryonální buňky „totipotentní“. Jasný je rozdíl mezi mutacemi způsobenými zářením již na úrovni gamet (jsou dědičné) a usmrcením (poškozením) buněk plodu např. v základu nějakého tělesného orgánu, jehož výsledkem je vrozená anomálie. Pro vážné poškození budoucího orgánu stačí zničení několika buněk. Vrozené anomálie se však přirozeně vyskytují u několika procent novorozenců a na tomto pozadí se teprve objevují anomálie vyvolané ionizujícím zářením.

Připomeňme si, že rozlišujeme tři stadia nitroděložního vývoje:

- a) Předimplantační – před zahrnutí oplodněného vajíčka v děložní sliznici.
- b) Embryogeneze – organogeneze – zahrnuje období diferenciace orgánů.
- c) Fetální růst a vývoj – zahrnuje i pozdní organogenezi.

Odpověď na ozáření je v každém z těchto stadií trochu jiná. Během **preimplantačního období** sestupuje oplodněné vajíčko vejcovody do dělohy. Za současné tvorby placenty se před uhnížděním vajíčko ještě několikrát rozdělí. V tomto stadiu může vést ztráta několika buněk (ne jedné či dvou) ke ztrátě celého embrya. U myši lze případné ztráty embryí prokázat histologickými studiemi (pokud došlo k uhníždění), u člověka toto nepřipadá v úvahu.

Přežití myších zygot se řídí v podstatě jednozásahovou kinetikou (v závislosti log S na D není raménko), převrácená hodnota inaktivační konstanty 1/k se blíží 1 Gy). Odolnost dvoubuněčného embrya je podstatně vyšší. Dávka 2 Gy vede u myši ke ztrátě 80% embryí v preimplantačním stadiu. Vrozené abnormality jsou vzácné, embryo přežívá nebo umírá.

Organogeneze: V tomto období vede k největšímu poškození zničení byť jen několika buněk v základu nějakého orgánu (např. oka, mozku, hypofýzy atp.) – již nejsou k dispozici totipotentní buňky, které by mohly ztracené buňky nahradit. Nejdříve se vyvíjející citlivé základy orgánů jsou základy CNS, nejpозději se zakládají kosti, případně se dokončuje vývoj jiných struktur, který byl zahájen již dříve (oko, zuby, zevní utváření těla). Již v 50. letech 20. století bylo zjištěno, že dávka 1 Gy vyvolává abnormality v podstatě u všech embryí ozařovaných v době organogeneze, významné množství abnormalit však vzniká již po dávkách 0,15 – 0,2 Gy. Lze odhadnout, že u člověka je embryo nejcitlivější během 4. nebo 5. týdne těhotenství (kdy si žena ještě nemusí být těhotenství vědoma). Jsou-li během organogeneze aplikovány dávky 1 – 2 Gy, vedou abnormality plodu často k jeho ztrátě.

Fetální růst: V tomto období vede aplikování dávek nad 2 Gy k úmrtí plodu a abnormality jsou málo výrazné. Spíše se projevuje opoždění vývoje a malá porodní váha. U lidí je v tomto období po ozáření dávkou i pod 1 Gy pozorována mikrocefalie.

Bylo zjištěno, že u člověka se nevyskytují orgánové malformace (abnormality) po ozáření v takové míře jako u malých laboratorních živočichů. Na základě rozboru poškození plodů po výbuších atomových pum byly u člověka identifikovány jako hlavní následky nitroděložního ozáření mentální retardace a mikrocefalie. Je obtížné rozlišit, co dáno účinkem přímo na plod a co je zprostředkováno poškozením těla matky.

2.6.1.4.2 Nestochastické pozdní účinky ozáření

Jako **pozdní účinky** jsou obecně označovány patologické změny tkání, které se objevují měsíce až roky po ozáření. Pro pozdní **nestochastické** (nověji **deterministické**) účinky existuje prahová dávka a velikost účinku závisí na dávce. Typicky se s těmito účinky setkáváme jako s důsledkem frakcionované terapie. Frakcionace chrání spíše před účinky akutními než pozdními. Existují v zásadě dvě teorie vysvětlující pozdní nestochastické účinky:

- a) Deplece (vyčerpání) klonogenních buněk ve tkáni před delší dobou ozáření.
- b) Porucha vaskularizace tkáně, která se projevuje fibrotizací a nedostatečným cévním zásobením.

Cévní endotel jako terčová tkáň. Vzhledem k tomu, že pozdní účinky se objevují i ve tkáních s nízkou mitotickou aktivitou, musíme hledat účinný mechanismus, který nezávisí na mitotické aktivitě buněk tkáně. Předpokládá se, že poškození vzniká v důsledku změn mikrovaskulatury. Cévní endotel je tkání s obnovujícími se buňkami, která proto může být citlivá k ozáření. Možný je i nepřímý mechanismus poškození v důsledku neprůchodnosti cév, která může být způsobena proliferací buněk nebo trombotizací. Navržený mechanismus začíná zvýšenou propustností stěn cév, po které následují zánětlivé procesy a poškození endotelu, fibrotizace a zesílení cévních stěn, opět snížení krevního zásobení, zhoršená difuze látek, navození dalších zánětů a fibrotizace – **cyklický proces** vedoucí k degeneraci a ztrátě funkce.

Pojivové tkáně a parenchym jako terčová tkáň. Poškození pojivové tkáně a parenchymů je alternativním vysvětlením pozdní odpovědi na ozáření. Tyto systémy jsou totiž, byť zvolna, též obnovovány, mají tedy jistý klonogenní potenciál. Délka tohoto cyklu se značně liší v jednotlivých orgánech a tkáních, což by mohlo vysvětlovat, proč se pozdní účinky projevují u různých tkání/orgánů po různé době (pokud by vše záleželo jen na poškození endotelu cév, vznikalo by pozdní poškození všude zhruba po stejné době). Ani toto vysvětlení však není zcela vyhovující, protože nástup pozdního poškození mnohdy nekoresponduje s rychlostí obnovy buněk příslušné tkáně. Je tedy pravděpodobné, že poškození endotelu, pojiv a parenchymu se projevuje současně.

Funkční podjednotky. Tento přístup ke vzniku pozdních účinků vychází z představy, že osud orgánu závisí na osudu jednotlivé tzv. funkční podjednotky. Bylo zjištěno, že rozsah dávek, které vedou k významnému funkčnímu deficitu, je dosti široký a že jedno z možných vysvětlení spočívá v uspořádání kmenových buněk ve **funkčních podjednotkách**. Vezměme si nefron tvořený glomerulem, Bowmanovým pouzdem a tubuly. Když jsou zničeny všechny epitelální buňky tubulu, nefron je ztracen navždy. V tomto případě je dávka potřebná ke zničení funkce ledvin určena spíše počtem buněk nefronu než celkovým počtem terčových buněk v orgánu. Funkční podjednotkou ledvin je nefron, v plicích to je alveolus, u míchy je skupina oligodendrocytů schopná zajistit myelinizaci příslušné skupiny neuronů atp. Širší definice funkčních podjednotek říká, že jde o objem (někdy plochu – kůže) tkáně, který může být regenerován z jediné přeživší buňky bez ztráty funkční integrity. Podle organizace funkčních podjednotek rozlišujeme orgány „sériové“ a „paralelní“. V **sériových** orgánech je organizace taková, že zničení jedné funkční podjednotky vede k vážnému poškození funkce celého orgánu (mícha, mozkový kmen, optické nervy). V **paralelních** orgánech nevede ani úplné zničení funkční podjednotky ke zničení funkce orgánu jako celku (plíce, hypofýza, dutina ústní, slinné žlázy, játra, ledviny, močový měchýř). Za „**smíšené**“ jsou považovány orgány jako jícen, hltan, hrtan, tenké střevo, rektum, mozek.

Jak se projevují pozdní deterministické účinky u jednotlivých orgánů?

Začneme s GIT. **Jícen** (příčně pruhované svalstvo, roztažná pojivová tkáň a mnohvrstevný dlaždicový epitel). Pozdním účinkem je striktura – zúžení jícnu až do úplného zneprůchodnění pro potravu – v důsledku patrně poškození cév svalů a pojiva. **Žaludek** – kmenové buňky epitelu se chovají podobně jako buňky Lieberkühnových krypt. Pozdní účinky na žaludek jsou popisovány jako fibrotická atrofie sliznice, ztráta motility, roztažnosti a schopnosti trávit. **Tenké a tlusté střevo** – tenké střevo má na vnitřním povrchu klky, tlusté střevo má hladký povrch, typické jsou pohárkové buňky produkující mukus. Pozdní účinky jsou podobné jako u žaludku a jícnu.

Rektum – fibrotické změny, ztenčení, perforace.

Významné pozdní účinky sledujeme i na **kůži**. Vnější vrstva kůže je tvořena rychle se obnovujícími keratinizovanými buňkami. Na rozdíl od pod ní ležící pojivové dermis je velmi radiosenzitivní. Akutním účinkem je suché a později i vlhké odlupování kůže, vznik mokvavých ploch. Jako pozdní následek se objevují **telangiektazie** (viditelně rozšířené kapiláry). Akutní ztráta vlasů, chlupů a funkce potních žláz může být nevratná. Objevují se fibrotické změny a zjizvení v ozařovaném poli. Podobně reagují na ozáření všechny vnitřní povrchy orgánů, protože mají podobnou histologickou skladbu.

Pozdní účinky na játra, ledviny a plíce: ozáření vede ke snížení regenerační schopnosti a později k závažným fibrotickým změnám. **Ledviny** – vedle fibrotických změn, které jsou opět spojovány s poškozením cévního endotelu, byly u zvířat popsány změny resorpční schopnosti tubulů pro vodu a glukózu. **Plíce** – po odeznění zápalu plic se objevuje též fibrotizace, sklerotizace, ztráta elasticity.

CNS: **Mozek** – akutní odpovědí je edém (častý při radioterapii mozkových tumorů), který je připisován narušení tzv. hematoencefalické bariéry. Pozdní reakcí je zhoršení různých mozkových funkcí připisované přechodnému zastavení syntézy myelinu u oligodendrocytech. **Mícha** je považována za velmi citlivou a musí být chráněna při ozařovacích procedurách. Poškození se projevuje ochrnutím – paralýzou. I v míše se objevují demyelinace a nekrózy. Příčinou je radiaci poškození klonogenních buněk (oligodendrocytů, glie) i cévního endotelu.

Pozdní účinky na **oko** se projevují vznikem **katarakty** (zákalu čočky). Jsou známy již z první poloviny 20. století u ozařovaných pacientů i lékařů. Nejde o problém způsobený poškozením vaskularizace (čočka není vaskularizovaná), nýbrž o poškození klonogenních **epiteliálních buněk**, jejichž dceřiné buňky migrují do čočky a vytvářejí v ní průhledná strukturální vlákna. Při jednorázovém ozáření se prahová dávka pohybuje od 2 do 6 Gy, při frakcionaci dávek 11 Gy. Doba latence může být u nižších dávek až 10 let. Vznik katarakty je velmi silně závislý na LET. Pro neutronové záření se udává prahová dávka kolem 1 cGy!

2.6.1.4.3 Stochastické pozdní účinky – kancerogeneze:

Kauzální vztah mezi kancerogenezí a expozicí rentgenovému záření byl rozpoznán někdy kolem roku 1911, avšak skutečnost, že jde o bezprahový efekt, začíná být zřejmá až po druhé světové válce. I když dnes považujeme vznik nádorů po ozáření za bezprahový stochastický efekt, některá pozorování tento názor relativizují: zdá se, že pro některé nádory existuje prahová dávka, a je známo, že invazivita (agresivita) některých nádorů závisí na dávce. Naše znalosti pocházejí ze studií na zvířatech, z vyvolání **nádorové transformace** u buněk pěstovaných in vitro a z pozorování lidí ozářených náhodně nebo při jaderných explozích.

Již ve 30. letech byl u myši prokázán vznik leukémie po ozáření. Při hodnocení studií tohoto druhu je však třeba mít na paměti přinejmenším to, že nádory mají nenulový výskyt i u živočichů neozařovaných a že maximální incidence nedosahuje při žádné dávce 100%. Výsledky získané na zvířatech vysvětlují působení na člověka jen kvalitativně a navíc se zpravidla týkají dávek (desetina až jednotky Gy), které nejsou z hlediska ochrany populace příliš relevantní (zde by byl zajímavý rozsah 1 – 10 mGy, typický např. pro vyšetření CT).

Výsledky studií na zvířatech lze shrnout takto: (1) Ozářováním lze u citlivého živočicha vyvolat vznik téměř jakéhokoliv nádoru. (2) Existují nádory, jejichž frekvenci ozářením ovlivnit nelze. (3) Mechanismy působení záření se liší podle druhu nádoru a expozičních podmínek. (4) Nádor může být vyvolán přímo nebo i zprostředkovaně (v důsledku působení na jiné buňky). (5) Záření o vysokém LET je z hlediska kancerogeneze obecně účinnější. (6) Kancerogeneze může být ovlivněna mnoha jinými faktory, takže se při nízkých či středních dávkách nemusí vůbec objevit. Při vysokých dávkách je snížena neschopností poškozených buněk dělit se.

K nástupu nádorového onemocnění dochází u člověka až po různé dosti dlouhé době po ozáření - **latenci**: po 2 – 20 letech od ozáření se rozvíjí leukémie, některé solidní nádory až po 35 – 40 letech. Již v r. 1941 bylo navrženo, že se proces kancerogeneze skládá ze dvou kroků, mezi nimiž může být značný časový odstup (latence).

1. Iniclace – změna genomu somatické buňky, která je nevratná. Může jít i o aktivaci onkogenního viru nebo onkogenu.
2. Druhý krok může být označen jako povzbuzení či podpora – ze změněné buňky se začíná vyvíjet nádor. Spuštění nádorového růstu je způsobeno změnou nějakých vnějších podmínek (z hlediska transformované buňky).

Obvykle platí, že s klesajícím dávkovým příkonem se snižuje (při stejné dávce) i pravděpodobnost indukce nádorového bujení, což má nepochybně souvislost s účinnější reparací DNA. Při dlouhých časech ozařování může dojít i k repulaci tkáně. Na druhé straně

má silnější kancerogenní účinek záření o vyšším LET. Při velmi malých dávkách je dávková rychlost bezvýznamná.

Transformace buněk in vitro. Nádorová transformace buněk po ozáření může být pozorována i na euploidních buňkách savčích (lidských) tkáňových kultur. Kolonie buněk nádorově transformovaných se vzhledově liší od kolonií buněk normálních, což umožňuje statistické vyhodnocení transformace. Je nutno provádět korekce na ztrátu klonogenní aktivity (reprodukční smrt) buněk. Mj. bylo zjištěno, že buněčné linie odvozené od hlodavců odpovídají na ozáření mnohem více v závislosti na dávkovém příkonu než buňky odvozené z lidských tkání. U hlodavčích buněk je výraznější i efekt frakcionace. Z toho lze usoudit, že u lidí se o něco více uplatňuje přímý účinek záření než účinek nepřímý. Tyto výsledky též naznačují, že je velmi obtížná extrapolace na člověka u závěrů získaných v experimentech na hlodavčích buňkách.

Zatímco u záření s nízkým LET vede frakcionace ke snížení kancerogenních účinků, u záření s vysokým LET byl pozorován spíše opačný efekt.

Transformace normálních buněk na buňky nádorové je za podmínek *in vivo* ovlivňována celou řadou vnitřních faktorů (např. hormony, imunitní reakce, stáří organismu aj.), které lze v pokusech *in vitro* modelovat jen velmi svízelně nebo vůbec ne.

2.6.1.4.4 Radiační kancerogeneze v lidské populaci.

Nejdříve uvedeme, jaké vzorky populace byly dosud z hlediska radiační kancerogeneze zkoumány:

a) Profesní expozice: Radiologové exponovaní při své práci, horníci vystavení radonu (zejména v uranových dolech), dělnice dřívě malující svítící ciferníky hodin uranovou barvou.

b) Medicínské expozice: Pacienti s ankylozní spondylitidou (Bechtěrev, chronické zánětlivé onemocnění páteře) léčení rtg zářením, ženy ozařované pro nezhoubná onemocnění v oblasti prsou a pánve, lidé opakovaně snímkování v tuberkulózních sanatoriích, děti ozařované při nezhoubných diagnózách jako zvětšený brzlík nebo trichofycie, děti ozařované *in utero* pro diagnostické účely v průběhu těhotenství matky.

c) Následky jaderných výbuchů a havárií: Lidé, kteří přežili jaderné výbuchy v Hirošimě a Nagasaki dle podrobné evidence pozdních efektů padesát let vedené americkými institucemi *The Atomic Bomb Casualty Commission* a následně *The Radiation Effects Research Foundation*. Dále obyvatelstvo části Marshallových ostrovů v Tichém oceáně vystavené jadernému spadu v 50. letech, pracovníci a vojáci exponovaní při pokusných jaderných výbuších (Tichý oceán, Nevadská poušť...), obyvatelstvo v okolí Nevadské pouště vystavené jadernému spadu, obyvatelstvo Ukrajiny i jiných zemí vystavené jadernému spadu po Černobylské havárii (neúplná data, jedině, co je jisté, je zvýšený výskyt nádorových onemocnění štítné žlázy).

Studované příčiny radiační kancerogeneze v populaci se značně liší svým charakterem – druh záření, dávkový příkon, homogenita ozáření apod. – proto jsou srovnání velmi obtížná.

Populační riziko vzniku zhoubných nádorů může být vyjadřováno jako relativní nebo absolutní, a to za pomoci rizikových koeficientů. **Absolutní riziko:** o kolik se zvýší riziko rakoviny, tj. její výskyt – incidence - např. na 1 milión obyvatel, po expozici jednotkové dávce oproti přirozenému výskytu, bez ohledu na to, jak je velký. **Relativní riziko:** kolikrát vyšší bude riziko rakoviny po expozici jednotkové dávce ve srovnání s přirozeným výskytem.

Vyjádření rizika radiační kancerogeneze. Můžeme vycházet z lineární závislosti:

$$I_D = I_n + \alpha_1 D$$

nebo lineárně kvadratické závislosti:

$$I_D = I_n + \alpha_1 D + \alpha_2 D^2,$$

kde D je dávka, α_1 lineární koeficient rizika (význačný spíše pro záření s vysokým LET), α_2 je kvadratický koeficient rizika (význačný spíše pro záření s nízkým LET), I_D incidence rakoviny pro dávku D , I_n normální incidence onemocnění. Zatím nelze rozhodnout, zda pro člověka ozářeného fotonovým zářením lépe vyhovuje model lineární, kvadratický či lineárně kvadratický.

Model **absolutního rizika** je založený na domněnce, že riziko spojené s určitou dávkou záření je určeno číslem, které je zcela nezávislé na riziku spontánního výskytu téže nemoci. Rizika spontánního a radiační podmíněného

výskytu se sčítají. Model **relativního rizika** je založený na domněnce, že pravděpodobnost radiogenní rakoviny je přímo úměrná přirozenému výskytu onemocnění. Jinými slovy – v tomto modelu je riziko násobkem přirozeného rizika.

Absolutní riziko tedy zapíšeme:

$$b = \lambda_1 - \lambda_0,$$

kde b je riziko spojené jen s ozářením, λ_1 – incidence v ozářené populaci, λ_0 – incidence v neozářené populaci.

Relativní riziko zapíšeme:

$$r = \lambda_1/\lambda_0,$$

kde r je rizikový faktor/relativní riziko. Absolutní i relativní riziko může být v lidské populaci smysluplně definováno pouze pro *určitou vrstvu* společnosti (danou zejména věkem a pohlavím). Odhad faktorů b i r je velmi nepřesný s ohledem na malé datové soubory a silnou závislost na vybrané společenské vrstvě.

Orgánová specifická radiogenní rakovina: Zatímco dříve se soudilo, že z hlediska kancerogeneze je nejcitlivějším orgánem kostní dřeň, dnešní data, opřená mj. o upřesněné výsledky získané v Hirošimě a Nagasaki, tvrdí, že nejrizikovější jsou plíce a prsy.

(autor: Vojtěch Mornstein)