

VEDLEJŠÍ ÚČINKY IONIZUJÍCÍHO ZÁŘENÍ I: DEFINICE, METODY STUDIA A AKCE OZÁŘENÝCH BUNĚK

¹Jan ÖSTERREICHER, ²Jürgen VOGT, ²Tilman BUTZ, ³Leoš NAVRÁTIL, ¹Aleš MACELA

¹Ústav radiobiologie a molekulární patologie, Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

²Abteilung für Nukleare Festkörperphysik, Fakultät für Physik und Geowissenschaften, Universität Leipzig, SRN

³Katedra radiologie Zdravotně sociální fakulty, Jihočeská univerzita, České Budějovice

Souhrn

Práce stručně definuje pojem vedlejších účinků ionizujícího záření, pojednává o citlivosti metod použitelných pro studium tohoto fenoménu. Dále představuje mikroozářovací techniky, které jsou relativně novou radiobiologickou technologií schopnou ozářovat přesně definovaným počtem částic jednotlivé subcelulární struktury. V neposlední řadě jsou uvedena využití mikroozářovacích technik i v jiných oblastech výzkumu.

Klíčová slova: Ionizující záření; Vedlejší účinky; Metody.

The Side-Effect of Ionizing Radiation I: the Definition, Methods and Action of Irradiated Cells

Summary

This study defines the term the side-effect of ionizing radiation and discusses the usefulness of various scientific methods used for side-effect evaluation. It also briefly introduces a relatively new technology, a microbeam facility from the radiobiological and other branch point of view. The microbeam facility is able to irradiate the defined subcellular compartments with the exact number of particles with the energy requested.

Key words: Ionizing radiation; Side-Effects, Methods.

Definice

Vedlejší účinky ionizujícího záření lze považovat za znovu objevenou kapitolu obecné radiobiologie. Rozvoj poznatků nejen v této oblasti, ale v celém oboru radiobiologie, je dán především překotným rozvojem molekulárně-biologických metod poznání, které svojí citlivostí umožňují pozorovat fenomén vedlejších účinků ionizujícího záření. Dalším faktorem rychlého rozvoje studia vedlejších účinků ionizujícího záření jsou pak metody a přístroje umožňující ozáření jediné buňky.

Vedlejší účinky lze definovat jako souhrnné označení jakýchkoliv změn v neozářeném biologickém systému, ke kterým dochází v důsledku reakce ozářené části systému. Vedlejšími účinky se míní poškození genetického materiálu neozářené buňky, významné porušení schopnosti interakce s okolním prostředím a vznik onkogenní transformace neozářených buněk.

Vedlejší účinky ionizujícího záření lze pozorovat v sousedních neozářených tkáních po ozáření libovolnými dávkami. Vzhledem k tomu, že indukce vedlejších účinků vzniká s nižší intenzitou než postradiační poškození samotné, pak největšího významu

dosahují po ozáření nízkými a velmi nízkými dávkami ionizujícího záření. Z jazykového hlediska termín „vedlejší účinky“ zcela nevystihuje anglický originál. Původní název „bystander effects“ v doslovném překladu zní jako „vedle stojící účinky“, eventuálně jako „sousední účinky“. Navíc, v mechanismech rozvoje vedlejších účinků existuje vztah k již popsaným abскопálním účinkům ionizujícího záření. Jelikož tento vztah není prokázán s jistotou, budou tyto účinky dále zmiňovány jako „vedlejší“.

Studium vedlejších účinků ionizujícího záření je staronovou oblastí radiobiologického výzkumu, kdy jsou pozorovány postradiační změny v buňkách a ve tkáních sousedících s ozářenými okruhy.

Metody studia vedlejších účinků

Výzkumné směry studia vedlejších účinků

Po roce 1992 se studium vedlejších účinků rozdělilo na dva výzkumné směry. Prvním bylo sledování vlivu radikálů, zejména kyslíkových (3), na rozvoj vedlejších účinků. Druhý směr se zaměřil na sledování mezibuněčného přenosu látek indukujících vedlejší účinky. Tomuto směru dominuje přede-

vším sledování mezibuněčných spojení gap junction a inhibice této cesty přenosu.

Možnosti detekce vedlejších účinků

Rejstřík metod pro určení a kvantifikaci vedlejších účinků ionizujícího záření se neliší od metodického spektra sloužících k rozvoji poznání v obecné biologii.

Jednotlivé metody se však liší stupněm citlivosti. Nejméně citlivými jsou klasické metody používané v cytologii, resp. radiobiologii. Jde o detekci mikrojader a apoptózy na buněčných liniích a test klonogenní aktivity. Tyto metodické postupy jsou vhodnými nástroji při určení postradiačního poškození u dávek nad cca. 0,5 Gy. Avšak pro sledování vedlejších účinků ionizujícího záření se jeví jako nevhodné.

Metody proteinové detekce lze označit za metody se střední úrovní citlivosti. Patří sem především ELISA, imunocytochemie, imunohistochemie a elektroforetické techniky. Takové metody jsou vhodné pro sledování postradiačních změn v řádu desetin Gy a vedlejších účinků u sousedních populací po ozáření dávkami 1 Gy a vyšší.

Protože pravděpodobně v nejbližší době nebudou uspokojivě popsány buněčné mechanismy na proteinové úrovni, jsou tyto metody významné z hlediska popisu rozvoje vedlejších účinků.

Nejcitlivější metody poznání vedlejších účinků dokáží detekovat poškození genetické informace. Jde o nejrůznější varianty polymerázové řetězové reakce a testy onkogenních transformací. Ve vhodně postaveném experimentu by bylo možné takovými postupy detekovat postradiační změny až na úrovni desetin mGy a vedlejší účinky řádově v jednotkách mGy. S pomocí metod odhalujících genetické poškození lze jak zjistit chování sousedních tkání na genové úrovni, tak jsou tyto metody vhodné pro posuzování přípravků používaných k zabránění vzniku vedlejších účinků ionizujícího záření.

Ozařovací postupy sloužící ke studiu vedlejších účinků

Do začátku 90. let byl radiobiologický výzkum orientován především na objasnění postradiačních změn v ozářených biologických systémech na všech úrovních, tj. od genové úrovně, přes pozorování změn proteinu, buněčných a tkáňových odpovědí, až po poškození na úrovni organismu a populační studie.

Rozvoj problematiky vedlejších účinků ionizujícího záření je úzce spjat s pokrokem na poli mikroozařovacích technik. Mikroozařovač (v anglickém originálu microbeam facility) je technologickým celkem schopným ozařovat zvolenou strukturu jednotlivými částicemi (4, 5). Typický mikroozařovač je složen z akcelérátoru, nanosondy (v originálu nanoprobe), mikroskopu s automatickým pozičním

systémem a počítačové analýzy obrazu.

Jako akcelérátor je nejčastěji používán Van der Graaffuv model, který umožňuje v elektromagnetickém poli generovat alfa částice, protony, elektrony a $^3\text{He}^{2+}$ ionty. Principem je naplnění akcelérátoru héliem, které je vysokofrekvenčními vlnami přeměněno na plazmu. Z této plazmy je možné v elektrickém poli vybrat požadovaný typ částic, které jsou akcelerovány v elektrickém poli s vysokým potenciálem. V takovém poli se kladně nabitá částice pohybují k místu s nulovým potenciálem, tedy k výstupnímu oknu se vzorky. Detailní popis s přesnými hodnotami a odůvodněním je předmětem specializovaných učebnic fyziky.

Nanosonda je označením pro soustavu trubic a elektromagnetických čoček kolimujících, resp. zaostřujících svazek částic do velmi úzkého paprsku. Protože je každý svazek elektricky nabitých částic ve vakuu zaostřován soustavou elektromagnetických čoček, proto je dosud nemožné sestavit nanosondu pro neutrální částice jako jsou neutrony. Dílčím úspěchem je sestavení mikroozařovače emitujícího gama záření, který však paprsky nezaostřuje. Je složen ze soustavy clon a z důvodu relativně velkého průměru paprsku není dosud možné s takovým přístrojem pracovat na buněčné populaci, kde jsou buňky v kontaktu.

Mikroskop s automatickým polohovacím systémem je důležitou součástí mikroozařovače, uvědomíme-li si, že je nutné přesně identifikovat buněčnou kolonii vzniklou z jedné ozářené buňky i po 6 generačních časech dané buněčné linie. Proto je nutné pracovat s adherentními buněčnými liniemi, které jsou obarveny Hoechstovým barvivem. Automatický poziční systém nejdříve naskenuje několik zorných polí a tak vytvoří doslova buněčnou mapu celé zájmové oblasti. Poté je možné přes nanosondu orientovat částici nebo částice na vybranou buňku nebo buňky (eventuálně podle velikosti průměru svazku i jen některé orgány) a po uplynutí zvoleného času je možné podle původní buněčné mapy identifikovat jednotlivé buněčné kolonie.

Důležitými vlastnostmi mikroozařovače, podle kterých je posuzována jeho kvalita jsou typ produkovaných částic, jejich energie a velikost svazku částic. Jelikož ionty helia včetně alfa částic byly prvním typem pozorovaných částic u prvních mikroozařovačů, převládá v současnosti tendence sestavit mikroozařovač produkující protony, elektrony a těžké ionty. Energie částic je neméně důležitým ukazatelem kvality každého ozařovače. Jelikož žádný živý biologický systém nemůže existovat v prostředí vakua, musí každá částice před interakcí s biologickým materiálem vstoupit do běžné atmosféry, kde je výrazně zpomalována. Je dobře známou skutečností, že několik milimetrů vzduchu dokáže

zastavit alfa částici. Tento fakt je do jisté míry ovlivněn typem misek používaných při experimentech v mikroozařovačích. Cílové okno je tvořeno cca 0,5 mikrometry tenké folie mylaru. Takový systém, kdy buňky rostou na mylarové folii, která je přiložena k výstupnímu oknu každého mikroozařovače. Navíc, většina v praxi používaných mikroozařovačů má klasickou sadu objektivů, kde místo jednoho objektivu je vloženo výstupní okno mikroozařovače, takže je možné zabránit velké ztrátě energie částice vzduchem.

Energie produkovaných alfa částic a iontu hélia se pohybuje od 0,5 MeV do 5,3 MeV. Spodní hranice je dána ztrátou energie při průletu vzduchem, mylarem a médiem. Tato ztráta se pohybuje okolo 0,3 MeV. Horní hranice 5,3 MeV je dána nejen konstrukcí každého akceleratoru, ale také praktickou použitelností, kdy alfa částice zejména rozpadové řady radonu nepřesahují 6 MeV.

Velikost cílového terčíku kam dopadají nanosondou zaostřené ionty, je poslední z hlavních ukazatelů každého mikroozařovače. Minimálním požadavkem velikosti terčíku je jeho praktická aplikace, tj. nesmí být větší, než je velikost buňky dané buněčné linie, eventuálně velikost buňky odebraného a pozorovaného tkáňového štěpu. V praxi se doporučuje mini-

mální velikost terčíku do cca 10 mikrometrů v průměru. Čím je velikost terčíku menší, tím je možné ozařovat více subcelulárních struktur. Současný světový primát drží sestrojovaný mikroozařovač v Lipské univerzitě, kde byl naměřen průměr terčíku 41 nanometrů. Minimalizace terčíku slouží nejen k přesné kvantifikaci buněčné odpovědi v závislosti na dávce záření, ale k sofistikovanějším experimentům v oblasti sledování vedlejších efektů ionizujícího záření.

V současnosti jsou na světě sestrojeny 4 mikroozařovače. První byl zhotoven v Institutu prof. Graye v Londýně (5), druhý v Centru pro radiobiologický výzkum na Kolumbijské univerzitě v USA (14), třetí na katedře jaderného inženýrství v texaské A and M univerzitě (16) a čtvrtý je situován v japonském centru pro výzkum atomové energie (15).

V současnosti je na katedře jaderné fyziky pevných látek lipské univerzity sestrojován pátý mikroozařovač v pořadí, který by měl zaručit dostupnost této technologie po celé střední Evropě od podzimu 2002 (4).

Pro českou radiobiologii, vojenskou část nevyjímaje, je zajímavá informace o aktivitách katedry jaderné spektrometrie v polském Krakově, kde je sestrojován mikroozařovač pod vedením D. Lekkiho.



Obr. 1: Na fotografii mikroozařovací laboratoře univerzity v Lipsku je zachycena kolimační soustava nanosondy (vlevo a nahoře) vycházející z válcovitého akceleratoru (nahore uprostřed), který je z větší části překryt ovládacím systémem. V dolním levém kvadrantu se nachází ozařovací komora s automatickým pozičním systémem. Celá konstrukce mikroozařovače je upevněna na desetimetrovém betonovém podloží. Místnost je klimatizována a vstup je povolen za podobných kautel jako vstup na chirurgickou ambulanci.

Využití mikroozářovačů v ostatních oborech výzkumu

Mikroozářovače však nemají uplatnění jen v radiobiologii samotné. Pomocí přesného měření ztráty energie částice při průletu materiálem je možné určit procentuální zastoupení anorganických látek v materiálu. Takové vedlejší aplikace mají uplatnění při měření ^{14}C v archeologických vzorcích k určení stáří vzorku, měření obsahu kovu v biologických tkáních při pozorování například penetrace zkoumané látky jednotlivými vrstvami epidermis (4). Další možností využití mikroozářovače je tzv. protonová mikroskopie (4). Princip je podobný jako u mikroskopu elektronického, jen s tím rozdílem, že vzorek je nebarvený a buňky jsou při skenování živé. Avšak účinek pronikajících protonů usmrtí veškerý živý materiál. Maximum rozlišení každého obrázku je dáno velikostí terčíku podobně jako rozlišení rastrového obrázku je dáno velikostí každého pixelu. Významnou perspektivou vedlejšího využití mikroozářovačů v přírodních vědách, která by mohla v brzké budoucnosti soutěžit s proteinovou detekcí v elektronové mikroskopii je právě proteinová detekce živých buněk, kdy protilátky mohou být značeny některým těžkým kovem. Pro praktické využití připadá v úvahu již zavedený systém protilátek značených částicemi zlata, jelikož molekuly těžkých kovů způsobují vyšší úbytek energie prolétající částice než ostatní buněčné struktury.

Mechanismy vzniku a rozvoje vedlejších účinků

Prvním literárně doloženým popisem vedlejších účinků byla kazuistika Pahrsona et al. (13) u pacienta po ozáření sleziny, kde byla pozorována jinak nevysvětlitelná reakce kostní dřene prsní kosti. Tato práce byla publikována v roce 1954 a byla následována několika podobnými studiemi vycházejících z preklinického i klinického pozorování. V Čechách se mimo jiné i touto kapitolou zabýval tým profesora Kuny (6) z VLA JEP. Od začátku 60. let pak v této problematice nastává publikační útlum a vědomostní stagnace daná tehdejšími stupněm poznání.

Novou etapou studia vedlejších účinků zahájili Nagasawa a Little (11) v roce 1992. Po ozáření buněčné linie buněk získaných z ovarii čínských křečků, kde bylo alfa částicemi ozářeno jen 1 % celkové buněčné populace velmi malými dávkami ionizujícího záření v rozmezí 3–25 mGy, bylo zjištěno poškození DNA až u 30 % všech buněk. Sledováním ukazatelem poškození DNA byla četnost výměny sesterských chromatid (v originálu sister chromatid exchange) (11). Tento do jisté míry překvapivý výsledek byl impulsem pro další studium vedlejších účinků.

Pro lepší výklad vedlejších účinků je vhodné si tento fenomén rozdělit na dvě části. První částí bude akce ozářených buněk a druhou pak reakce okolních buněk.

Akce ozářených buněk a tkání

Aktivované postradiační mechanismy jsou tématem samostatné učebnice radiobiologie. V tomto textu budou nezbytné postradiační mechanismy popsány tam, kde porozumění mechanismům vedlejších účinků vyžaduje znalost postradiační odpovědi.

Cesty přenosu

Ozářené buňky uvolňují látky schopné vyvolat vedlejší účinky ionizujícího záření u okolních buněk buď do mezibuněčného prostoru, nebo přes mezibuněčná spojení.

Mezibuněčný prostor v organismu je charakterizován extracelulární matrix, v *in vitro* experimentech je tímto vehikulem samotné medium.

Protože ve studiu vedlejších účinků převažují experimenty s adherentními buněčnými liniemi a dostupnost mikroozářovačů je relativně nízká, je nejčastěji používaným typem navození vedlejších účinků prostý přenos media z ozářené do jinak neovlivněné buněčné populace (7, 10). Pro takový typ pokusu se omejdeme i bez mikroozářovače a celková manipulace se vzorky je mnohem jednodušší. Pro přenos media je důležité používat sterilní filtr, který zabráni přenosu mrtvých buněk a jejich částí, které se v každé populaci vyskytují.

Častou cestou přenosu molekul indukujících vedlejší účinky formou mezibuněčných spojení je gap junction (1, 2). Toto spojení je mezibuněčným kanálem o průměru 1,5 až 2 nanometry. Takovým kanálem mohou procházet molekuly do hmotnosti až 2 kDa. Nevýhodou sledování této cesty přenosu je četnost spojení gap junction v různých typech tkání a buněčných linií (3).

Molekuly indukující vedlejší účinky

Vzhledem ke krátkému trvání novodobé éry studia této problematiky, a také z důvodu nízké molekulární koncentrace, nebyly dosud zjištěny podstatnější informace o látkách schopných vyvolat vedlejší účinky ionizujícího záření. Důležitým zdrojem informací o látkách indukujících vedlejší účinky mohou být pokusy s podáváním látek vázajících či blokujících účinek jednotlivých tříd molekul. Z těchto pokusů vyplývá (9, 10), že mezi látky indukující vedlejší účinky můžeme zařadit kyslíkové radikály a radikály dusíku.

Další informací může být dosud nepotvrzené podezření, že mezi tyto látky patří peroxidy lipidů (17).

V neposlední řadě existuje interpretace vyplývající z prací Matsumota et al. (9) a Nguena et al. (12). Matsumoto et al. (9) prokázali vznik oxidu dusíku v buňkách sousedících s ozářenými a Nguen et al. (12) popsali mutagenní vliv oxidu dusíku a jejich metabolitů.

Účinek látek indukujících vedlejší účinky je mnohostranný a složení takových látek je závislé na typu

ozářené tkáň, která je uvolňuje, absorbované dávce ionizujícího záření a složení těchto látek se také liší v jednotlivých časových intervalech po ozáření.

Literatura

1. AZZAM, EI. – DE TOLEDO, SM. – GOODING, T., et al. Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiat. Res.*, 1998, vol. 150, 497–504.
2. AZZAM, EI. – DE TOLEDO, SM. – LITTLE, JB. Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha-particle irradiated to non-irradiated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001, vol. 98, p. 473–478.
3. BISHAYEE, A. – HILL, HZ. – STEIN, D., et al. Free radical-initiated and gap junction-mediated bystander effect due to nonuniform distribution of incorporated radioactivity in a three-dimensional tissue culture model. *Radiat. Res.*, 2001, 155, p. 335–344.
4. BUTZ, T. – FLAGMEYER, R. – H., HEITMANN, J., et al. The Leipzig high-energy ion nanoprobe: A report on first results. *Nucl. Instr. Meth.*, 2000, 161–163: 323.
5. FOLKARD, M. – VOJNOVIC, B. – PRISE, KM., et al. A charged-particle microbeam: I. Development of experimental system for targeting cells individually with counted particles. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1997, vol. 72, p. 375–385.
6. KUNA, P. Modifikace abskopálních účinků gama ozáření hlavy myši cystaminem. *Čs. Radiol.*, 1986, vol. 40, p. 345–352.
7. LEHNERT, BE. – GOODWIN, EH. Extracellular factor(s) following exposure to alpha-particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells. *Cancer Res.*, 1997, vol. 57, p. 2164–2171.
8. MARPLES, B. – JOINER, MC. The response of Chinese hamster V79 cells to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population. *Radiat. Res.*, 1993, vol. 133, p. 41–51.
9. MATSUMOTO, H. – HAYASHI, S. – HATASHITA, M., et al. Induction of radioresistance by a nitric oxide-mediated bystander effect. *Radiat. Res.*, 2001, vol. 155, p. 387–396.
10. MOTHERSILL, C. – SEYMOUR, C. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1997, vol. 71, p. 421–427.
11. NAGASAWA, H. – LITTLE, JB. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha particles. *Cancer Res.*, 1992, vol. 52, p. 6394–6396.
12. NGUYEN, T. – BRUNSON, CL. – CRESPI, B., et al.: DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1992, vol. 89, p. 3030–3034.
13. PARSONS, WB. – WATKINS, GL. – PEASE, GL., et al. Changes in sternal bone marrow following roentgen-ray therapy to the spleen in chronic granulocytic leukaemia. *Cancer*, 1954, vol. 7, p. 179–189.
14. RANDERS-PEHRSON, G. – GEARD, CR. – JOHNSON, G., et al. The Columbia University single-ion microbeam. *Radiat. Res.*, 2001, vol. 156, p. 210–214.
15. SAKAI, T. – NAITOH, Y. – KAMIYA, T., et al. An external ion microbeam for studies of biological samples. *Biol. Trace Elem. Res.*, 1999, vol. 71/72, p. 77–82.
16. SAWANT, SG. – RANDERS-PEHRSON, G. – GEARD, CR., et al. The bystander effect in radiation oncogenesis I: Transformation in C3H 10T1/2 cells in vitro can be initiated in the unirradiated neighbours of irradiated cells. *Radiat. Res.*, 2001, vol. 155, p. 397–401.
17. WU, LJ. – RANDERS-PEHRSON, G. – XU, A., et al. Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, vol. 96, p. 4959–4964.

Korespondence: Kpt. doc. MUDr. Jan Österreicher, Ph.D.
Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: osterreicher@pmfhk.cz

Do redakce 17. 6. 2002