

VEDLEJŠÍ ÚČINKY IONIZUJÍCÍHO ZÁŘENÍ III: REAKCE BUNĚK V OKOLÍ OZÁŘENÉ OBLASTI NA BUNĚČNÉ ÚROVNI A MOŽNOSTI JEJICH INHIBICE

¹Jan ÖSTERREICHER, ²Jürgen VOGT, ²Tilman BUTZ, ¹Šárka PRŮCHOVÁ, ¹Aleš MACELA

¹Ústav radiobiologie a imunologie Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

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

Souhrn

Práce pojednává o jednotlivých následcích akce látek indukujících vedlejší účinky ionizujícího záření na buněčné úrovni, jako jsou vstup buněk do apoptózy, vznik mikrojader, maligní transformace a jiné. Dále se věnuje rozvoji vedlejších účinků v závislosti na dávce záření v ozářených oblastech a čase po ozáření. Jsou uvedeny dosud známé možnosti inhibice vedlejších účinků.

Klíčová slova: Ionizující záření; Vedlejší účinky; Mechanismus; Inhibice.

The Bystander Effects of Ionizing Radiation III: the Definition, Methods and Action of Irradiated Cells

Summary

This study defines the term "bystander effect of ionizing radiation", discusses the usefulness of various scientific methods for bystander effect evaluation. Next, it briefly introduces a relatively new technology, the microbeam facility, from the radiobiologic and other branch points of view. The microbeam facility is able to irradiate defined subcellular compartments with the exact number of particles and with the requested energy.

Key words: Ionizing radiation; Bystander effects; Methods.

Úroveň buněčná

Vedlejší účinky ionizujícího záření manifestované na buněčné úrovni jsou následkem poruch molekulárních mechanismů včetně poškození DNA. Na úrovni buněčné můžeme z vedlejších účinků pozorovat vyšší četnost apoptózy (2, 11), mikrojader (2, 11) a maligní transformace buňky (3, 12), poruchy diferenciace (1) a nižší schopnost proliferace s menší schopností sledovaných buněčných linií vytvářet kolonie (6, 11).

Apoptóza

O postradiačních mechanismech vedoucích ke vstupu buňky do apoptózy bylo již v tomto časopise pojednáno v roce 2000 (8).

U neozářených buněk, které se nacházejí v okolí ozářených buněk a tkání, byl naměřen vyšší počet apoptotických buněk, nicméně není zatím potvrzeno, jakými mechanismy je apoptóza u těchto buněk vyvolána a jakého je typu.

V našem experimentu na modelu přenosu média jsme nezjistili žádné významné rozdíly mezi ozářenými skupinami a populacemi ovlivněnými médiem z ozářených vzorků. Tento výsledek byl pravděpodobně způsoben nízkou citlivostí použité metody vyhodnocení. Nicméně, apoptóza jako jeden z vedlejších účinků ionizujícího záření byla již prokázána v pracích Belyakova a spol. (2) a Prieho a spol. (11).

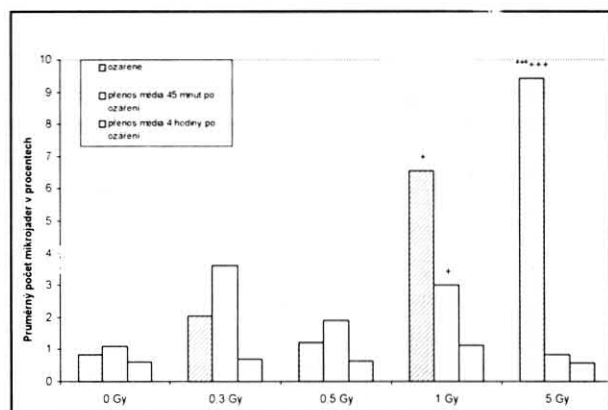
Mikrojádra

Mikrojádra jsou následkem těžkého poškození DNA. Výskyt mikrojader je závislý na dávce záření. Při výskytu dvojího zlomu dvoušroubovice DNA se často nepodaří tyto zlomy opravit. Pokud dojde k oddělení většího fragmentu DNA od původní dvoušroubovice, můžeme takový fragment lehce identifikovat po další mitóze buňky, kdy fragment zůstává v cytoplazmě jedné z dceřinných buněk. Mikrojádra pak můžeme detekovat jakýmkoli chromatinovým barvením.

Nejčastěji jsou k tomuto účelu používány 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI), Giemsovo barvení a barvení akridinovou oranží. Pro vyšší frekvenci záchytu je občas užívána kultivace buněk s cytochalasinem B, který blokuje cytoskeletární struktury při dělení buňky tak, že obě dceřinná jádra zaujímají místo v jediné buňce a mikrojádru nebo mikrojádra se zpravidla nacházejí mezi dceřinnými jádry. Pro diagnózu mikrojader používáme následující kritéria:

1. Velikost mikrojádru se pohybuje od 1/20 do 1/5 velikosti jádra buňky. Při menších velikostech jde často o artefakty, u větších objektů může jít o druhé dceřinné jádro, které se nachází ve stejné buňce při již zmíněné blokádě cytoskeletu.
2. Vždy je rozeznatelný pás cytoplazmy mezi mikrojádrem a buněčným jádrem samotným. Pokud nejsme schopni rozeznat pás cytoplazmy mezi suspektním mikrojádrem a jádrem buňky, pak může jít např. o výchlípek jaderné membrány obsahující původní chromatin jádra.
3. Barvitelnost mikrojádru je podobná intenzitě barvení chromatinu dceřinného jádra. Při odlišné barvitelnosti podezřelého objektu může dojít k záměně mikrojádru za fagosom (4).

Četnost výskytu mikrojader v ozářených buněčných liniích se liší v závislosti na radiosenzitivitě buněčné linie. Obecně však platí, že u dávek v rozmezí 1–10 Gy byl popsán výskyt mikrojader od cca 0,5–10 % (4). Z experimentálních výsledků vyplývá, že výskyt mikrojader u neozařené populace ovlivněné látkami indukujícími vedlejší účinky je obdobný jako u ozářené populace, jen hodnoty jsou nižší v závislosti na typu experimentu a buněčné linie (2, 11).



Graf 1: Procentuální výskyt mikrojader 24 hodin po ozáření nebo přenosu média. Časný přenos média byl proveden 45 minut po ozáření a pozdější 4 hodiny po ozáření. Statistické významnosti jsou vztaheny k 0 Gy pro každou skupinu.

Výskyt mikrojader u takto ovlivněných populací může být častější, s nižším procentuálním výskytem a zpravidla rychleji odeznívá.

Maligní transformace buňky

Maligní transformace buňky po ozáření řadíme mezi stochastické (nedeterministické) účinky, jejichž výskyt se řídí pravděpodobnostním rozdělením. Vznik radiačně indukovaného nádoru je podmíněn významným poškozením DNA a poškozením mechanismů na proteinové úrovni (4, 12). Přesné mechanismy nejsou dosud známy.

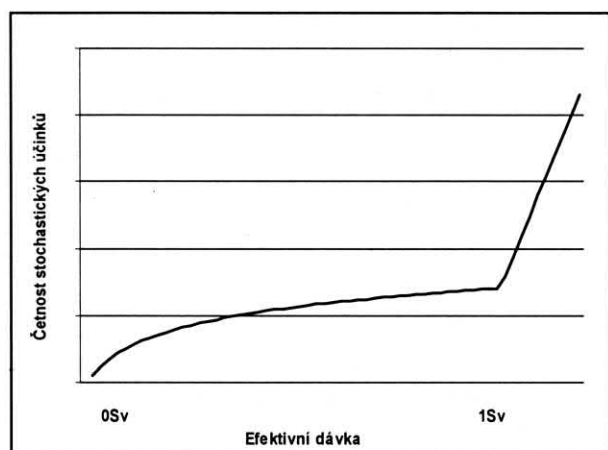
Pro účely hodnocení stochastických účinků nepoužíváme veličinu absorbované dávky s jednotkou Gy (gray), nýbrž veličinu efektivní dávky s jednotkou Sv (sievert), která zohledňuje typ záření, jeho energii, homogenitu ozáření a citlivost jednotlivých tkání na vznik radiačně indukovaného rakovinného bujení (4).

Pravděpodobnostní rozdělení závislosti výskytu maligních transformací na efektivní dávce má lineárně-kvadratický charakter. V dávkách nižších než asi 1 Sv má křivka tvar přímé úměrnosti četnosti malignit na efektivní dávce. V dávkovém rozmezí nad cca 1 Sv je výskyt radiačně indukovaných malignit přímo úměrný čtverci efektivní dávky, tj. má kvadratický charakter (4). Tato závislost bývá označována jako lineárně-kvadratický model. Pochybnosti o platnosti lineárně-kvadratického modelu vznesli poprvé v roce 1992 Nagasawa a Little (7).

Nejvíce relevantními pracemi na téma maligní transformace a vedlejší účinky ionizujícího záření jsou publikace Sawanta a spol. (12) a Brennera a spol. (3) z Kolumbijské univerzity. Ve svých pracích popisovali frekvenci maligní transformace na T-lymfocytární buněčné linii (označené jako C3H 10 T1/2) ozařované alfa částicemi o energii 5,3 MeV, tj. o stejné energii, jakou mají alfa částice při rozpadu radonu. Autoři (12) nenalezli statisticky rozdílné hodnoty mezi skupinami s 10 % a 100 % ozářených buněk dvěma a více alfa částicemi. Je otázkou, zda nezjištění rozdílu zapříčinila citlivost metody, nebo vliv látek indukujících vedlejší účinky. V následném pokusu autoři (3) měřili četnost nádorových transformací u skupiny s jednou buňkou ozářenou alfa částicí o stejné energii (5,3 MeV) a u skupiny buněčných populací s ozáření všech buněk jednou alfa částicí. A výsledek byl překvapující. U skupiny buněčných populací s jednou ozářenou buňkou byl vyšší výskyt nádorových transformací než u skupiny

ny vzorků se všemi ozářenými buňkami. Z toho lze usuzovat, že ve skupině vzorků s jednou ozářenou buňkou došlo k tvorbě a uvolnění látek indukujících jeden z vedlejších účinků, nádorovou transformací, u okolních neozářených buněk. Navíc, nižší četnost nádorových transformací u skupiny vzorků se všemi ozářenými buňkami nás vede k domněnce, že ozáření jednou alfa částicí způsobilo výrazně nižší citlivost těchto buněk na látky se signální aktivitou (a indukující vedlejší účinky) vysílané z okolních ozářených buněk.

Jsou opravdu ozářené buňky méně citlivé na signály z okolí? A jsou při vysokých dávkách ionizujícího záření mechanismy buněčné komunikace poškozeny? To jsou významné otázky, které bude moci zodpovědět jen další experimentální práce v oblasti studia vedlejších účinků ionizujícího záření.



Graf 2: Schéma lineárně-kvadratického modelu v semilogaritmickém tvaru

Poruchy diferenciacce

Jen málo badatelů zkoumalo vlastnosti vedlejších účinků na vyvíjející se buněčné populaci, která vyžívá. Jedním z nich je Oleg Belyakov a jeho spolupracovníci (1). Na vzorcích lidského urotelu pozoroval změny způsobené vedlejšími účinky záření, kdy ozářena byla jedna buňka ozářeného stepu urotelu 10 částicemi $^3\text{He}^{2+}$ o energii 5,3 MeV. Urotel byl orientován tak, aby ozářena byla plně funkční buňka na vrcholku sliznice, tj. v organismu orientována lumenálně. S každým ozářeným stepem byl kultivován jeden neozářený step urotelu. Belyakov a jeho spolupracovníci (1) naměřili 10% nárůst předčasně diferencovaných buněk, než tomu bylo u

vedlejšími účinky neovlivněných kontrolních vzorků. Sami autoři se domnívají, že takto vyvolané předčasné vyžívání buněk je pravděpodobně výsledkem kaskádového mechanismu podmíněného mezibuněčnou komunikací (1).

Můžeme si sestavit scénář pravděpodobného mechanismu předčasné diferenciacce způsobené látkami indukující vedlejší účinky:

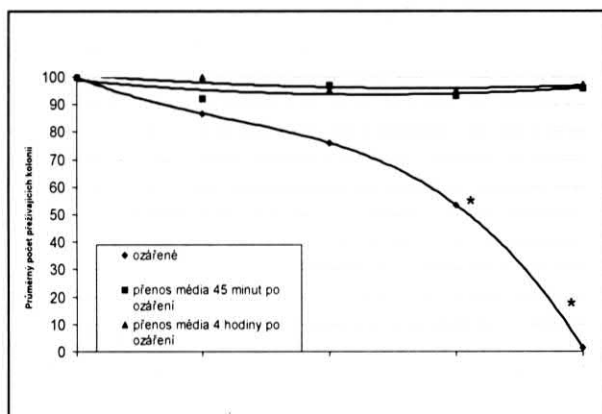
V každém epitelu se nachází vrstva nediferencovaných, středně diferencovaných a zcela funkčních buněk. Při poškození a odloučení funkčních buněk dojde k vyžívání jedné středně diferencované buňky, která pak plní funkce původní funkční buňky. Po ozáření, kdy dochází k významné poruše DNA neumožňující plnohodnotnou funkci, patrně dochází k uvolnění látek (způsobující vedlejší účinek, v tomto případě předčasnou diferenciaci), jejichž výsledkem je předčasné dozrání středně diferencovaných buněk i v neozářené části epitelu. Tímto mechanismem je možné kompenzovat depleci funkčních buněk.

Schopnost přežívání buněčných kolonií

Schopnost buněk v buněčných liniích tvořit buněčné kolonie (minimálně 50 buněk v šesti generacích) je ukazatelem, který je závislý na dávce záření a má, stejně jako četnost výskytu radiačně-indukovaných maligních transformací, lineárně-kvadratický charakter (4). Respektive, do nedávné doby neexistovaly významné pochyby o lineárně-kvadratické závislosti tzv. přežívání buněk na absorbované dávce záření.

Od roku 1993 panují odůvodněné obavy, že tento lineárně-kvadratický model zcela nevystihuje realitu. Důvodem jsou výsledky prací Marplese a Joinera (5), kteří sledovali přežívání ovariální linie získané z čínských křečků v dávkovém rozmezí od 0,05 do 10 Gy. Nejdříve z hodnot získaných po ozáření dávkami 1–10 Gy vypočetli lineárně-kvadratickou křivku pro celé rozmezí, tedy dopočetli křivku pro hodnoty 0,05–0,95 Gy. Poté porovnali skutečné experimentální výsledky s předpokládanými údaji vypočtené podle lineárně-kvadratického modelu. Hodnoty naměřené v experimentu byly 2–4krát vyšší než hodnoty matematicky odvozené!!! Největšího rozdílu dosahovaly hodnoty mezi 0,5 a 1 Gy. Autoři se domnívají, že dávky blízké se 1 Gy mají „vyšší efekt na jednotku absorbované dávky“ než dávky přesahující 1 Gy (5).

Z dosud publikovaných prací vyplývá (6, 11), že



Graf 3: Křivka přežití buněčných populací hybridní endotelialní linie (10) po ozáření a po ovlivnění vedlejšími účinky. Statisticky významné rozdíly byly zjištěny jen mezi ozářenými populacemi dávkou 1 a 5 Gy a neozářenou kontrolní skupinou. Křivky označené $\blacktriangle$ náleží hodnotám ozářené populace buněk, $\blacksquare$ hodnotám skupiny s přenosem média 45 minut po ozáření a $\bullet$ náleží údajům skupiny s přenosem média 4 hodiny po ozáření.

snížení schopnosti tvořit buněčné kolonie jako vedlejší účinek ionizujícího záření dosahuje maximálně 10 %, tj. největší omezení bylo spočítáno na hodnoty kolem 90 % původního stavu zjištěného u neozářených buněčných populací.

Dávková závislost vedlejších účinků

Vedlejší účinky jsou pozorovatelné po libovolné dávce ionizujícího záření a jsou závislé na dávce záření. Jejich identifikace je závislá pouze na citlivosti použité metody. Nejčastěji prováděné experimenty s buněčnými liniemi používají dávky mezi 1 a 5 Gy, kdy jsou vedlejší účinky nejvíce intenzivní a v ozářené populaci přežívá dostatek buněk k tvorbě látek indukujících vedlejší účinky (6, 10).

Obecně platí, že četnost jednotlivých ukazatelů poškození způsobené vedlejšími účinky s nižší intenzitou kopírují četnost takových ukazatelů poškození v ozářené populaci.

Platí zde následující omezení:

1. Při sledování proteinové exprese beta 1 integrinu a interleukinu 1 alfa byly u buněk kultivovaných s médiem z ozářené populace pozorovány nižší hladiny po ozáření dávkou 5 Gy než po ozáření dávkou 1 Gy (10). Z prací sledujících proteinovou expresi, např. TP 53, v závislosti na dávce záření nepotvrdily dávkovou závislost tohoto proteinu u dávek nad 1 Gy (13) a může-

me usuzovat, že v ozářených buňkách je postradiační odpověď na proteinové úrovni po dávkách nad 1 Gy vystupňována s maximální intenzitou, kterou už není možné zvýšit. Navíc, koncentrace látek indukujících vedlejší účinky je závislá na počtu přežívajících ozářených buněk, které tyto látky tvoří a uvolňují do okolí. U radiosenzitivní buněčné populace bude pak po ozáření velkými dávkami četnost vedlejších účinků nižší v důsledku značného úbytku buněk v ozářené buněčné populaci.

2. U velmi nízkých dávek záření, tj. do 0,2 Gy, byla na modelu maligní transformace T-lymfocytární linie zjištěna srovnatelná četnost vedlejších účinků u neozářených buněk s četností maligních transformací u ozářených populací (3, 12).

Dynamika rozvoje vedlejších účinků

Důležitou oblastí studia vedlejších účinků je znalost časového rozvoje vedlejších účinků. Ke zjištění této vlastnosti vedlejších účinků jsou nejvhodnější experimenty, kde jsou vedlejší účinky vyvolány přenosem média z ozářené populace do neozářené populace buněk. Vzhledem k dynamice postradiační odpovědi ozářených buněk se můžeme domnívat, že i složení látek indukujících vedlejší účinky je výrazně proměnlivé a tedy okolní neozářená tkáň získávající signály z ozářených oblastí bude na tyto signály odpovídat podobně.

V literatuře však nejsou popsány doby přenosu média v delších časových intervalech než několik hodin po ozáření. Dosavadní studie zjistily, že nejsilnější signál vyvolávající vedlejší účinky je uvolňován z ozářených buněk v první hodině po ozáření (2, 6, 10, 11).

Kromě studie našeho týmu (10) není v literatuře popsáno sledování vedlejších účinků v závislosti na době přenosu média z ozářené populace. Dostatečný obraz o časové závislosti na četnost vedlejších účinků si můžeme udělat z grafů prezentujících výsledky beta 1 integrinové exprese hodinu po ozáření či transportu média publikovaných ve druhé části cyklu o vedlejších účincích (9). Jelikož nejvyšší exprese beta 1 integrinu byla u ozářené populace zaznamenána hodinu po ozáření (v nejčasněji pozorovaném intervalu po ozáření), je možné sledovat výrazně nižší hodnoty pozitivních buněk u skupin vzorků s médiem transportovaným ze vzorku 4 hodiny po ozáření. U jiných ukazatelů lze očekávat nejvyšší vedlejší

účinek právě v čase, kdy maximální hodnoty takového ukazatele budou dosaženy v ozářených buňkách.

Možnosti inhibice vedlejších účinků

Z hlediska genového poškození a jeho inhibice je důležitá práce Wua a spol. (14), kteří pracovali s buněčnou linií získanou z ovarií čínských křečků. Tato linie byla obohacena o jednu kopii CD 59, jejíž poškození (a následné neúspěšné obarvení metodou *in situ* hybridizace pro normální gen CD 59) byla ukazatelem poškození DNA. Autoři (14) ozařovali cytoplazmy všech buněk 8 alfa částicemi předávající buňkám energii 90 keV/μm. Je nutné dodat, že ozářená místa byla přesně 8 mikrometrů vzdálena od jaderné membrány. Mutagenní efekt ionizujícího záření byl úspěšně utlumen podáním dimetylsulfoxidu (DMSO), který patří mezi látky vázající kyslíkové radikály, především pak hydroxylové radikály (OH[•]). Pro potvrzení daného účinku DMSO byl použit thiolový blokátor, buthionin-S-R-sulphoximin (BSO) rušící účinky DMSO. Ačkoli také zde byl přítomen efekt rušení DMSO prostřednictvím nárůstu počtu mutací CD 59, výsledky měření nebyly docela uspokojivé. Účinek DMSO snížil počet mutací CD 59 čtyřikrát, zatímco podání BSO mělo za následek sedmkrát vyšší počet mutací CD 59 ve srovnání s prostými ozářenými vzorky. Navíc, hydroxylové radikály mají velmi krátký biologický poločas dovolující jejich difuzi do vzdálenosti jen 4 mikrometrů od místa vzniku. Tato diskrepance byla autory (14) vysvětlována možným vznikem a následným účinkem peroxidu lipidů. Můžeme tedy shrnout, že DMSO účinně zamezuje vzniku vedlejších účinků ionizujícího záření.

Významnějšího pokroku při inhibici vedlejších účinků dosáhli Zhou a spol. (15), kteří sledovali vliv kyslíkových radikálů a mezibuněčných spojení typu gap junction při podání DMSO (k vyvázání kyslíkových radikálů) a lindanu (gama izomer hexachlorocyklohexanu, obecně používaného insekticidu blokujícího mezibuněčný transport skrz gap junction). Autoři (15) nezjistili významné snížení počtu mutací DNA vlivem DMSO, nýbrž po podání lindanu. Z těchto výsledků usoudili, že mezibuněčný transport má větší důležitost při vzniku vedlejších účinků a že kyslíkové radikály jsou jen jednou ze skupin celého spektra látek indukujících vedlejší účinky.

Další cestou inhibice vedlejších účinků je tlu-

mení cílových účinků. Zde jsou experimentální práce nejdále v možnostech inhibice apoptózy a byly v tomto časopise publikovány také již v roce 2000 (8).

Literatura

1. BELYAKOV, OV. – FOLKARD, M. – MOTHERSILL, C., et al. A proliferation-dependent bystander effect in primary porcine and human urothelial explants in response to targeted irradiation. *Br. J. Cancer*, 2003, vol. 88, no. 5, p. 767–774.
2. BELYAKOV, OV. – MALCOLMSON, AM. – FOLKARD, M., et al. Direct evidence for bystander effect of ionising radiation in primary human fibroblasts. *Br. J. Cancer*, 2001, vol. 84, p. 674–679.
3. BRENNER, DJ. – LITTLE, JB. – SACHS, RK. The bystander effect in radiation oncogenesis II. A quantitative model. *Radiat. Res.*, 2001, vol. 155, p. 402–408.
4. HALL, EJ. *Radiobiology for the radiologist*. 2nd ed. Hagerstown, Harper and Row publishers, 1978. 460 p.
5. 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.
6. 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, 421–427.
7. NAGASAWA, H. – LITTLE, JB. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha particles. *Cancer Res.*, 1992, vol. 52, p. 6394–6396.
8. ŠTERREICHER, J., aj. Mechanismy rozvoje apoptózy a možnosti jejího využití v klinické praxi. *Voj. zdrav. Listy*, 2000, vol. 69, č. 5, s. 193–198.
9. ŠTERREICHER, J. – VOGT, J. – BUTZ, T., et al. Vedlejší účinky ionizujícího záření II: reakce neozařených buněk v okolí ozářených oblastí na genové a proteinové úrovni. *Voj. zdrav. Listy*, 2002, vol. 72, č. 5, s. 239–243.
10. ŠTERREICHER, J. – JAHNS, J. – HILDEBRANDT, G., et al. The Beta 1 Integrin and Interleukin 1 alpha Expression on the Bystander Effect Model via Medium Transport. *Radiation Oncol.*, 2002, in press.
11. PRISE, KM. – BELYAKOV, OV. – FOLKARD, M., et al. Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1998, vol. 74, p. 793–798.
12. 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.
13. SZKANDEROVÁ, S. – VÁVROVA, J. – MAREKOVÁ, M., et al. p53 phosphorylation at serine-392 and activation of apoptosis-promoting proteins by irradiation of MOLT-4 cells by gamma rays. *Proceedings of the European Radiation Research 1–5. 9. 2001. Dresden*. 52 p.

14. WU, L.J. – 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.
15. ZHOU, H. – RANDERS-PEHRSON, G. – WALDREN, CH., et al. Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, vol. 97, p. 2099–2104.

Korespondence: Mjr. 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 došlo 12. 7. 2002
