

RADIOBIOLOGIJA U ZAŠTITI OD ZRAČENJA

G. Joksić

Institut za nuklearne nauke “Vinča”,
Laboratorija za molekularnu biologiju i endokrinologiju

Sadržaj

U radu je prikazan doprinos radiobiologije zaštiti od zračenja u poslednje tri decenije. Najvažnija otkrića prikazana su hronološki, kometerisana su aktuelna dostignuća iz ove oblasti i njihov mogući uticaj na zaštitu od zračenja.

Uvod

Efekte dejstva jonizujućeg zračenja na ljudski organizam zapazili su pioniri u primeni jonizujućeg zračenja, krajem prošlog veka, svega šest meseci nakon Röntgenovog otkrića [1]. Više od jednog veka istraživanja u ovoj oblasti nije dalo odgovor na neka osnovna pitanja; postavljeno je mnogo novih. Iskusni radiobiolozi često napominju da su fenomeni u radiobiologiji uočeni pre 30 godina još uvek u žiži interesovanja nauke, ne skrivajući pri tome čežnju za vremenom kada je u nauci sve bilo jednostavnije, a u radiobiologiji postojalo par pravolinijskih hipoteza koje su trebale u potpunosti da objasne biološke efekte zračenja.

Rane teorije radiosetljivosti

Jedna od prvih teorija je pretpostavljala da zračenje ubija ćelije zagrevajući ih. Kada je bilo moguće meriti energiju u ćelijama, ustanovljeno je da se vrlo malo toplotne energije oslobodi čak i kod letalnih doza; npr. doza od 4 Gy poveća temperaturu u ćeliji tek za 0.001°C. Imajući na umu letalne efekte zračenja, biolozi nisu odustajali; tvrdili su da je ipak na mestu primarnog događaja, lokalno, energija veoma visoka, da se na samom mestu delovanja jonizujućeg zračenja odvijaju važne hemijske reakcije koje za posledicu imaju ćelijsku smrt. Tako je nastala teorija mete. Gotovo istovremeno razvija se hipoteza “otpuštanja enzima” postulirajući da je na delovanje jonizujućeg zračenja najosetljivija ćelijska membrana, posebno membrana lizozoma, koja, kada je oštećena, ispušta proteolitičke enzime u ćelijski matriks, degradira skeletne i funkcionalne proteine usled čega ćelija ugine [2]. Deceniju kasnije ustanovljeno je da većina membranskih funkcija, posebno transport Na i K, rezistentan na zračenje sa donjim pragom osetljivosti od nekoliko Gy. Tek je nedavno sagledana uloga signala koji se emituju sa membrana ozračenih ćelija (plazma, nukleolarne i mitohondrijalne) u aktiviranju čitavih ćelijskih programa [3]. Danas se zna da je jonizujuće zračenje snažan oroz koji pokreće niz bioloških programa istovremeno, od kojih se mnogi međusobno preklapaju, nadovezuju ili su čak u suprotnosti jedan sa drugim. Aktiviranje tih programa čini odgovor na zračenje kompleksnim i često nepredvidivim.

Još su prvi *in vitro* radiobiološki eksperimenti [4] pokazali su složenost i višestepenost ćelijskog odgovora na ozračivanje: akutnim ozračivanjem kulture ćelija

terapijskom dozom (2Gy gama zračenja) jedan broj ćelija ugrine odmah, dok se druge naizgled normalno razvijaju, uspešno prodju 5 deoba, kada počinju da se manifestuju anomalije, dostižući maksimum nakon 6-7 deoba. Deset godina kasnije dokazano je da umiranje ćelija ćerki ozračene ćelije može da traje i 20 ćelijskih ciklusa [5,6].

Ćelijski ciklus

Proučavanje ćelijskog ciklusa pružilo je dodatne informacije radiobiolozima: kada se jednom ćelija podeli, njena DNK se ne replicira kontinuirano u pripremi za sledeću ćelijsku deobu, već se sinteza odvija deo po deo u sintetskoj fazi ćelijskog ciklusa, kojoj prethodi G₁ faza a sledi je G₂ faza mirovanja, nakon čega se dvostruki komplement DNK raspoređuje u dve ćelije. U ispitivanju ponašanja ozračenih ćelija vrlo rano je zapažen zadržavanje ćelija u G₂ fazi. Kasnije je zapaženo da ozračivanje malim dozama zračenja može da zadrži ćelijski ciklus u oba "check-point"-a (G₁ ili G₂), čak i sama sinteza DNK može biti usporena. Npr. ozračivanje dozom 0.1 Gy zadržava ćelije u G₁ fazi nekoliko sati, dok doze od 3 do 10 Gy zaustavljaju ćelije nekoliko dana. Danas se zna da je zadržavanje u G₁ fazi posledica ekspresije p53 tumor supresor gena popularno nazvanog "guardian of the genome". p53 je regulator transkripcije reparativnih gena zbog čega je najčešće i potrebno zadržavanje u G₁ ili G₂ fazi ćelijskog ciklusa. Regulacija transkripcije ostvaruje se vezivanjem p53 proteina za promotorska mesta gena čija aktivnost je potrebna što aktivira njihovo očitavanje [7]. Produkti aktiviranih gena (WAF1, CDK PCNA) međusobno grade komplekse koji zadržavaju ćelije u G₁ fazi. Reper genetičkog materijala ozračenih ćelija traje dok postoje kompleksi; degradacijom kompleksa ćelije nastavljaju ulazak u S-fazu. Zadržavanje u G₁ fazi omogućava dvojaku selekciju ćelija: aktiviranjem repera genom određenog broja ćelija biće popravljen pre nego što počne udvajanje DNK, dok jedan broj ćelija biva eliminisan iz ćelijske populacije (interfazna ćelijska smrt) iz čega se može zaključiti da p53 ima ključnu ulogu u radioosetljivosti i proliferaciji [8,9]. Ukoliko postoje mutacije u p53 vezujućoj oblasti target gena onemogućeno je vezivanje p53 proteina za te gene i njegova uloga se ne ostvaruje. Ispitivanje funkcionalnosti p53 proteina kod mnogih sindroma, poput Li-Fraumeni, pokazalo je heterozigotnost lokusa za p53 što za posledicu ima oslabljenu funkciju p53 proteina. Ukoliko se Li-Fraumeni ćelije ozrače nema zadržavanja u G₁ fazi, ozlede DNK se popravljaju pogrešno, proliferacija teče bez kontrole i ćelije brzo dobijaju odlike malignih.

Oporavak i popravka DNK lezija

Paralelno sa ispitivanjem ćelijskog ciklusa, ispitivani su procesi ćelijskog oporavka. Istraživanja su započeli Elkind i saradnici [10] šezdesetih godina a i danas na tome radi veliki broj naučnika. Prvo je uočen ekscizionni reper pirimidinskih dimera indukovanih UV zračenjem [11,12]. Ubrzo nakon otkrića ekscizionnog repera u bakterijskim sistemima, otkriveni su slični reparativni mehanizmi i u sisarskim ćelijama. Smatralo se da biološki efekti predstavljaju posledicu zaostalih nerepariranih lezija, te se gotovo celokupna naučna javnost krajem sedamdesetih godina, usredsredila na otkrivanje prirode DNK lezija i mehanizma njihovog oporavka. Sećanje na to vreme često je praćeno je uzdahom "life was looking pretty simple". Dolaskom osamdesetih godina stvari su počele da se komplikuju. Sve je više bilo eksperimentalnih dokaza da direktni efekti zračenja nisu jedini, da mnoge anomalije u

ćelijskoj funkciji ne nastaju kao direktna posledica DNK oštećenja. Eksperimenti u kojima se transformacija mišjih fibroblasta u kulturi u malignu formu sprovodila ozračivanjem pokazali su da će se u organizmu domaćina razviti fibrosarkom bez obzira na broj injeciranih ćelija. Izračunato je da je verovatnoća transformacije samo jedne ozračen ćelije veoma visoka (do 80%). Postalo je jasno da jonizujuće zračenje indukuje specifičnu vrstu genetičke nestabilnosti, usled čega će određeni broj potomaka ozračen ćelije postati transformisan nakon mnogo ćelijskih replikacija. Taj ključni događaj se odvija u jednoj od milion ćelija. Istraživanja kinetike transformacije pokazala su da “transforming event” ima sve odlike mutacije i nastaje sa jednakom verovatnoćom po ćelijskoj generaciji u toku ćelijskog rasta.

Mehanizmi nastajanja ovih kasnih efekata jonizujućeg zračenja dugo su bili predmet naučne rasprave; postojale su dve hipoteze: po klasičnom direktnom mehanizmu delovanja, DNK oštećenje u target genu še u većini ozračenih ćelija biti popravljeno ali će u pojedinačnim ćelijama (jednoj od milion) pogešnom popravkom nastati mutacija. Po drugoj hipotezi jonizujuće zračenje generalno indukuje određeni tip genetičke nestabilnosti koji se prenosi iz ćelijske generacije u generaciju. U svakoj narednoj generaciji raste verovatnoća da će jedna ili više ćelija ćerki postati mutant. Eksperimentalno su testirane obe hipoteze, potvrđena je druga (mutanti su se javili posle mnogo generacija replikacije i tip mutacija je identičan u svim ćelijskim kolonijama) [13]. Genetička nestabilnost manifestuje se oslabljenim “mismatch” reperom usled čega nastaju tačkaste mutacije na više lokusa istovremeno [14]. Slični rezultati dobijeni su proučavanjem klonova hematopoetskih ćelija mnogo generacija nakon ozračivanja matične ćelije hematopoeze [15].

Pored direktnog dejstva jonizujućeg zračenja, dugo proučavanog analizom hromozomskih aberacija u metafaznim i interfaznim jedrima, najrazličitijim citogenetskim tehnikama, sve je više eksperimentalnih dokaza o citološki vidljivom indirektnom dejstvu zračenja. Savremene metode omogućile su ozračivanje samo 1 odabrane ćelije u monolejeru. U jednom takvom eksperimentu korišćene su doze 0.03 i 0.25 mGy alfa zračenja. Zapaženo je da iako je ozračen samo jedna ćelija 50% ćelija u okruženju reaguje povećanom aktivnošću postreplikativnog repera merljivog učestalošću izmena sestrinskih hromatida [16]. Posredan, genotoksični efekat zračenja posledica je prenosa signala sa membrane ozračen ćelije na one u okruženju. Toksični efekti zračenja na ćelije u okruženju zajednički su nazvani “by stander effects”, i predmet su proučavanja u mnogim svetskim laboratorijama.

Šta se sve ne zna?

Tri decenije intenzivnog istraživanja u radiobiologiji i zaštiti od zračenja nije donelo odgovor na osnovno pitanje, a to je relacija doza-efekat na malim dozama zračenja, odnosno udeo malih doza u indukciji radiogenenih karcinoma. Ne zna se na koji način genomska i fenotipska konstitucija individue može da izmeni radiobiološki odgovor. Ne zna se ni koliko mutiranih tumorogenih ćelija je neophodno da bi se razvio karcinom *in vivo*. Nije sasvim jasno zašto u jednom istom organizmu pojedina tkiva se višestruko razlikuju u osetljivosti na zračenje. Ne zna ni koji korekcionni faktor bi adekvatno opisao ulogu reparativnih ćelijskih mehanizama u proceni radiogenog

rizika bilo koje vrste. Takodje je potpuno nepoznato da li i kako adaptivni odgovor, zapažen u pojedinačnim ćelijama utiče na radijacioni rizik. Iako je poznato da se pojedine vrste jonizujućeg zračenja (gama, alfa, beta, neutroni) značajno razlikuju u indukovanju bioloških efekata, mehanizmi koji to omogućavaju nisu sasvim poznati. Istraživači širom sveta su jedinstveni u stanovištu da je kancerogeneza višestepeni proces, da počinje mutacionim događajem na kritičnom genskom lokusu, razvija se u zavisnosti od funkcije imunog sistema, hormonskog statusa, starosnog doba i sl., ali uticaj zračenja na pojedine faze kancerogeneze je potpuno nepoznat.

Šta se sigurno zna?

Za sada sigurno se zna da je jonizujuće zračenje u opsegu doza od interesa za radiološku zaštitu slab kancerogen, da se ozračivanjem dozama većim od 500 mSv klinički manifestuju deterministički efekti; eritem, katarakta, infertilnost. Zna se da se radiogeni karcinomi mogu indukovati akutnim ozračivanjem terapijskim dozama zračenja. Nisu zapaženi nikakvi pozitivni efekti kod ljudi akutno ozračenih bilo kojom dozom jonizujućeg zračenja. Zna se da jedno isto tkivo zdravih odraslih ljudi pokazuje veliku varijabilnost u osetljivosti na zračenje. Dobro je poznata i razlika u osetljivosti na zračenje u zavisnosti od starosnog doba (najosetljiviji je fetalni i period ranog detinjstva). Pored konstitutivnih faktora (starosno doba, pol, genetska predispozicija), proteklo vreme od momenta ozračivanja, faktori životne sredine (posebno virusne infekcije), navike u ishrani značajno modifikuju rizik oboljevanja od radiogenog karcinoma. Često se ćelijskim reparativnim mehanizmima pripisuje gotovo čarobna moć popravke; pri tom se zaboravlja da postoje rezidualna DNK oštećenja čije su fenotipske posledice nepredvidive. Zna se da učestalost mogih primarnih molekularnih i ćelijskih događaja pokazuje linearnu zavisnost u funkciji apsorbovane energije, ali veliku nedoumicu unosi činjenica da su biološki procesi po svojoj prirodi višestepeni, te ne daju linearnu matematičku zavisnost u funkciji apsorbovane doze. Epidemiološke studije nisu dokazale ali ni opovrgle postojanje rizika od radiogenog karcinoma pri izlaganju malim dozama zračenja. Za sada ne postoje metode kojima bi se ustanovio uzrok nastajanja karcinoma. Zato se za svaku procenu rizika u obzir moraju uzeti svi raspoloživi podaci i preduzeti sve preventivne mere kako bi se kompenzovao mogući rizik koji je procenjen na osnovu epidemioloških studija.

Specifični biomarkeri

Nekoliko decenija eksperti zaštite od zračenja pokušavaju da odrede da li se poreklo pojedinih tipova solidnih tumora ili leukemija može identifikovati kao radiogeno. Aktuelna ispitivanja u svetu u osnovi su na molekularno-epidemiološka. Trenutna znanja su

da biomarkeri koji bi bili sigurni pokazatelj da je solidni tumor ili leukemija radiogenog porekla još uvek nisu prepoznatljivi ali većina tumora koji nastaju "spontano", izuzev hronične limfatične leukemije, mogu biti radiogenog porekla. Još uvek nisu identifikovani biološki dozimetri koji su verodostojni pokazatelj izloženosti na malim dozama jonizujućeg zračenja i pri malim brzinama doza, koje su od najvećeg interesa za zaštitu od zračenja. Hromozomske aberacije jesu pouzdani biomarker radiogenog efekta, reflektuju izloženost zračenju, ali se na osnovu njih ne

moгу sa sigurnošću proceniti posledice po zdravlje. U proceni posledica po zdravlje interakcija jonizujućeg zračenja i drugih agenasa, fizičkih, hemijskih i bioloških predstavlja poseban problem jer svi navedeni agensi u znatnoj meri mogu da modifikuju tok biološkog odgovora indukovanog zračenjem. Izloženost različitim agensima u sebi krije opasnost da svaki od njih pojedinačno aktivira bar po jedan složeni proces u ćeliji i učini da oni budu aktivni istovremeno, za šta u normalnim uslovima postoji jako mala verovatnoća. Najkritičnija je interakcija dva "multi-step" procesa, kada udruženo delovanje može da postigne snažno sinergetsko dejstvo. Osim toga predispozicija prema jednom agensu, npr. izmenjena senzitivnost može izmeniti konačni efekat od aditivnosti, preko sinergizma do antagonizma. Fundamentalna istraživanja u ovoj oblasti su veoma složena, ali neophodna jer će dati nezamenljiv doprinos proceni radiogenog efekta.

Umesto zaključka

Iako dosadašnja istraživanja nisu dala odgovor na mnoga pitanja, sagledana je izuzetna složenost interakcije organizma i jonizujućeg zračenja. Od bioloških indikatora, koji su sada na raspolaganju medicinskoj praksi najuspešniji su genetički. Razvoj ćelijske radiobiologije pružiće nove metode identifikacije izloženosti jonizujućem zračenju. Molekularna epidemiologija je budućnost, a zadatku biologa u zaštiti od zračenja je da kvantifikuju već poznate fenomene, precizno definišu relacije doza-biološki odgovor, i sagledaju radijacioni rizik uvažavanjem genetske predispozicije i individualne osetljivosti.

LITERATURA

1. Fush, W. (1896) Simple recommendations on how to avoid radiation harm. German Medical Weekly, No 6.
2. Bacq, Z.M., Alexander, P (1961) Fundamentals of Radiobiology, Chapter 10, pp263-279, Pergamon Press, New York.
3. Gadbois, D.M. Crissman, H.A. Tobey, R.A., Bradbury, E.M. (1992) Multiple kinase arrest points in the G₂ phase of nontransformed mammalian cells are absent in transformed cells. Proc Natl Acad Sci USA 89:8626-8630.
4. Puck, T.T., Marcus, P.I (1956) Action of X-rays on mammalian cells. J Exp Med, 103; 273-284.
5. Seymour, C.B., Mothersill, C., Alper, T. (1986) High yields of lethal mutations in somatic mammalian cells that survive ionizing radiation. Int J Radiat Biol 50, 167-179.
6. Chang, W.P., Little, J.B. (1991) Delayed reproductive death in X-irradiated Chinese hamster ovary cells. Int J Radiat Biol 60: 483-496.
7. Kuerbitz, S.J., Plunkett, B.S., Walsh, W.V., Kastan, M.B. (1992) Wild type p53 in a cell cycle checkpoint determining following irradiation. Proc Natl Acad Sci USA 89, 7491-7495.
8. Kastan, M.B., Oneykwe, O., Sidransky, D. Vogelstein, B., Craig, R.W. (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res 51:6304-6311.

9. Su, L.N., Little, J.B. (1992) Transformation and radiosensitivity of human diploid skin fibroblast transfected with activated RAS oncogene and SV40 T-antigen. *Int J Radiat Biol* 62, 201-210.
10. Elkind, M.M., Sutton, H.(1959) X-ray damage and recovery in mammalian cells in culture. *Nature* 184:1293-1295.
11. Setlow, R.B., Carrier, W.L.(1964) The disappearance of thymidine dimers from DNA: An error correcting mechanism. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 51:226-231.
12. Boyce, R.P., Howard-Flanders, P.(1964) The release of UV-induced thymine dimers from DNA in *E.coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 51: 293-300.
13. Little, J.B (1994) Changing views of Cellular Radiosensitivity. *Radiat Res* 140:299-311.
14. Bronner, C.E., Barker, S.M., Morrison, P.T., Warren, G., Smith, L.G.(1994) Mutations in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 368:258-261.
15. Kadhim, M.A., MacDonald, D.A., Goodhead, D.T., Lorimore, S.A, Marsden, S.J., Wright, E.G. (1992) Transmission of chromosomal instability after plutonium alpha particles. *Nature* 355:738-740.
16. Nagasawa, H., Little, J.B.(1992) Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha particles. *Cancer Res* 52:6394-6396.

RADIATION BIOLOGY IN RADIATION PROTECTION

G.Joksić

Institute of Nuclear Sciences "Vinča", Laboratory of molecular biology and endocrinology

The paper presented the contribution of radiation biology to radiation protection in last three decades. The most important biological discoveries are presented chronologically, current status of knowledge and their impact on radiation protection are discussed.