

Wczoraj, dziś i jutro radiobiologii klinicznej

Anna Gasińska

Radiobiologia jako dyscyplina naukowa powstała na początku XX wieku, a jej rozwój jest ściśle związany z rozwojem radioterapii (RT). Radiobiologia kliniczna zajmuje się badaniami translacyjnymi, tj. wdrażaniem osiągnięć naukowych z zakresu badań podstawowych do praktyki klinicznej w celu optymalizacji leczenia przeciwnowotworowego u indywidualnego chorego. W pracy omówiono w zarysie historię radiobiologii podzielonej arbitralnie na 4 okresy: radiobiologię komórkową (lata 1950–1970), eksperymentalną (lata 1970–1990), kliniczną (lata 1990–2000) i molekularną (od 2001–obecnie). Przedstawiono najważniejsze osiągnięcia dokonane w tych okresach, mające istotny wpływ na rozwój RT. Omówiono również ewolucję radiobiologicznych testów prognostycznych i predykcyjnych stosowanych w RT w celu personalizacji leczenia przeciwnowotworowego oraz perspektywy ich rozwoju w najbliższej przyszłości.

Past, present and future of applied radiobiology

Radiobiology as a scientific discipline was created at the beginning of the 20th century and its development was connected with progress of radiotherapy (RT). The main aim of radiation biology is to translate the findings from basic research into clinical practice and aim to personalize anticancer treatment. In the paper the historical outline of radiobiology is presented, divided arbitrarily into four periods: cellular radiobiology (1950), experimental radiobiology (1970–1990), applied radiobiology (1990–2000) and molecular radiobiology (2001–present). The most significant achievements which have had an influence on the development of radiation oncology in these periods are presented. Also the evolution of radiobiological prognostic and predictive tests applied in radiation oncology with the aim to individualize anticancer treatment are described, with a perspective on their development in the nearest future.

NOWOTWORY Journal of Oncology 2012; 62, 6: 455–463

Słowa kluczowe: historia radiobiologii, radiobiologia molekularna, testy prognostyczne

Key words: history of radiobiology, molecular radiobiology, prognostic tests

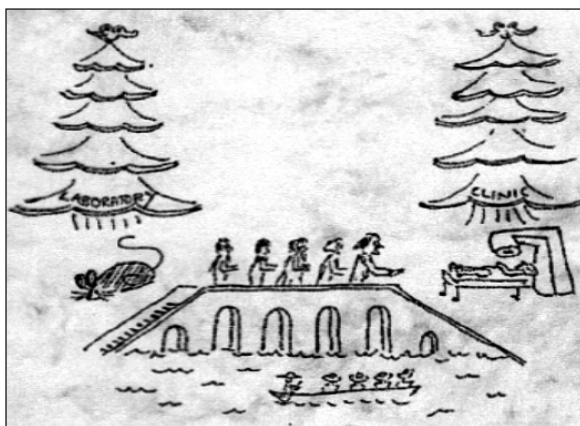
Radiobiologia jest nauką zajmującą się badaniem wpływu promieniowania na komórki, tkanki i organizmy. Jako dyscyplina naukowa powstała na początku XX w., a jej rozwój jest ściśle związany z rozwojem radioterapii (RT). Radiobiologia kliniczna, zajmująca się wdrażaniem osiągnięć naukowych do praktyki klinicznej, stanowi naukowe zaplecze RT. Ten kierunek badań nazywamy badaniami translacyjnymi, symbolizuje go rysunek (ryc. 1) wykonany przez wybitnego radiobiologa Jacka Fowlera przedstawiający pracowników laboratorium Graya i lekarzy ze Szpitala Mount Vernon w Londynie, gdzie po raz pierwszy zastosowano schemat

przyspieszonej RT — CHART (*continuous hyperfractionated radiation therapy*) na podstawie badań radiobiologicznych [1]. Rysunek ten symbolizujący współpracę radiobiologów z lekarzami i nowe kierunki badań, przyjęty został jako logo Europejskiego Towarzystwa Badań Translacyjnych.

Historię radiobiologii można podzielić arbitralnie na 4 okresy (tab. I) obejmujące rozwój radiobiologii komórkowej, eksperymentalnej, klinicznej i molekularnej. W pierwszym okresie badań, zapoczątkowanych odkryciem promieni Roentgena, do oceny wpływu promieniowania na komórki wykorzystywano głównie mikroorganizmy, muszki

¹Zakład Radiobiologii Klinicznej, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie

²Katedra Kosmetologii, Górnośląska Wyższa Szkoła Handlowa



Rycina 1. Rysunek wykonany przez Prof. Jacka Fowlera, obrazujący współpracę lekarzy z naukowcami, a ilustrujący badania translacyjne (wykorzystany za zgodą Autora)

owocowe, komórki roślinne, linie komórkowe. W drugim okresie, nazwanym radiobiologią eksperymentalną, zaczęto intensywnie wykorzystywać w badaniach zwierzęta laboratoryjne: myszy, szczury, świnki, chomiki i małpy. W trzecim etapie (radiobiologia kliniczna), obejmującym lata 90. do końca XX wieku, koncentrowano się na określaniu *in vitro* lub *in vivo* parametrów biologicznych nowotworów. Wpływ na to miały wyniki badań klinicznych, wykazujące różną odpowiedź na napromienianie chorych z tym samym typem histologicznym nowotworu i leczonych według takiego samego schematu RT. Przyjęto do dziś obowiązujące założenie, że parametry biologiczne nowotworu wpływają na odpowiedź popromienną guza i powodują różnice odpowiedzi na leczenie. Na tej podstawie powstała strategia terapeutyczna polegająca na próbie indywidualizowania leczenia zarówno napromienianiem, jak i chemioterapią w oparciu o parametry biologiczne nowotworu (ekspresję białek/genów odpowiedzialnych za ważne funkcje komórki), która powinna prowadzić do poprawy wyleczalności chorych. W tym okresie dokonał się pewien postęp, jednak, niestety, badania te nie przyniosły w pełni spodziewanych efektów. Z początkiem XXI wieku dzięki rozwojowi technik molekularnych notuje się rozkwit radiobiologii molekularnej, która

zajmuje się oddziaływaniem promieniowania jonizującego na żywe organizmy na poziomie molekularnym. Rozpędu nabiera strategia indywidualnego leczenia przeciwnowotworowego, a za datę przełomową uznaje się rok 2001, kiedy to wykazano, że badania molekularne wykonane z pomocą mikromacierzy DNA mogą wyróżnić grupy chorych na różne podtypy raka piersi różniące się przeżyciem [2].

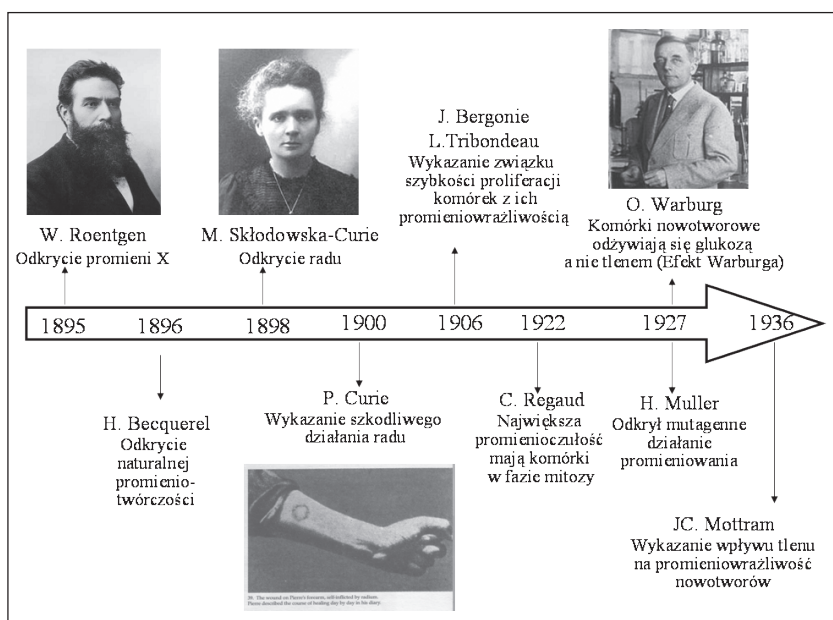
Bardziej szczegółowy opis wymienionych okresów w historii radiobiologii należy zacząć od daty odkrycia promieni X przez Wilhelma Roentgena w 1895 roku (ryc. 2). Bez tego wydarzenia, nagrodzonego Nagrodą Nobla w 1901 roku, nie byłoby nie tylko rozwoju radiobiologii, ale również fizyki i radioterapii. Henri Becquerel, powtarzając eksperymenty przeprowadzone przez W. Roentgena z rudą uranu, w 1896 roku odkrywa zjawisko naturalnej promieniotwórczości (naturalnego rozpadu promieniotwórczego pierwiastków). Następnie Maria Skłodowska-Curie wraz z mężem Piotrem Curie w 1898 roku odkrywają dwa nowe pierwiastki — polon i rad, z których tylko ten ostatni odegra rolę w radioterapii. Rad stał się głównym źródłem promieniowania gamma, wykorzystywanym do leczenia nowotworów przez następnych 20 lat. Za odkrycie zjawiska naturalnej promieniotwórczości pierwiastków chemicznych Maria i Piotr Curie wspólnie z Becquerelem w roku 1903 otrzymali Nagrodę Nobla.

Zdrowotne konsekwencje mody na pierwiastki promieniotwórcze, jaka zapanowała w tym czasie na świecie (stosowane w wodzie pitnej, kosmetykach, ubraniach) wkrótce dały o sobie znać. Jako pierwszy na szkodliwy wpływ promieniowania zwrócił w 1900 r. uwagę **Piotr Curie**, który zaobserwował zmiany skórne na przedramieniu wywołane działaniem radu. Eksperyment ten można uznać za pierwszy w dziedzinie radiobiologii. Obserwowane przez Piotra Curie uszkodzenie tkanek substancjami radioaktywnymi zostało wykorzystane w niszczeniu komórek nowotworowych. Skuteczność działania promieniowania jonizującego badano w różnych układach biologicznych (komórki, tkanki, organy).

W roku **1906** J. Bergonie i L. Tribondeau formułują prawo, które z pewnymi wyjątkami obowiązuje do dziś: promieniowrażliwość komórki jest wprost proporcjonalna do zdolności podziałowej i odwrotnie proporcjonalna do stopnia

Tabela I. Etapy rozwoju radiobiologii klinicznej

lata 1950–1970	lata 1970–1990	lata 1990–2000	2001 >
Radiobiologia komórkowa	Radiobiologia eksperymentalna	Radiobiologia kliniczna	Radiobiologia molekularna
Krzywe przeżycia	Wykazanie różnicy w reakcji popromiennej tkanek prawidłowych	Określanie parametrów biologicznych nowotworów	Genetyczne mierniki biologii nowotworów
Zwrócenie uwagi na możliwość modyfikacji hipoksji i zwiększenia promieniowrażliwości nowotworu	Kinetyka wzrostu guza nowotworowego		
	Wartość dawki frakcyjnej i częstość jej powtarzania decyduje o różnicy w odpowiedzi guza nowotworowego i tkanek prawidłowych na promieniowanie		



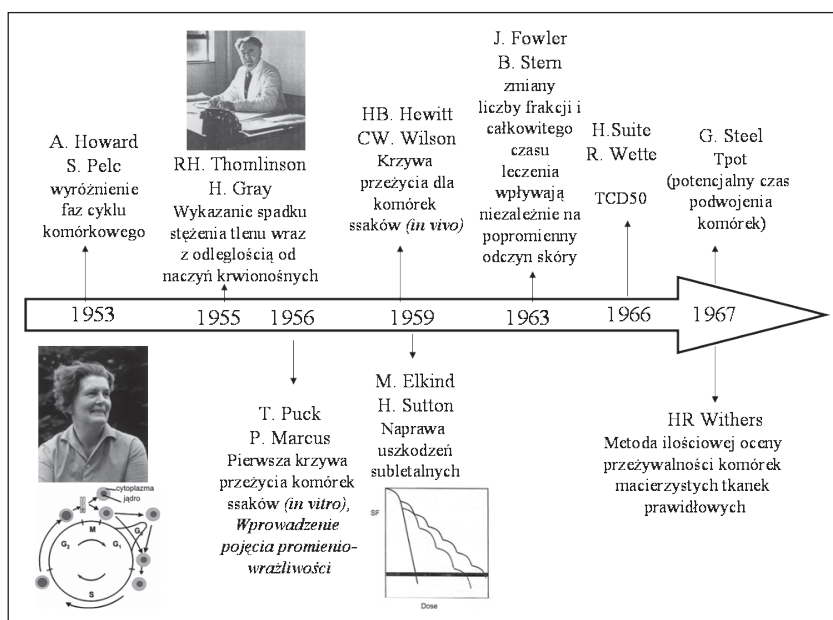
Rycina 2. Historia radiobiologii klinicznej obejmująca okres do lat 30. ubiegłego wieku

jej zróżnicowania [3]. W roku **1922** Claude Regaud, dyrektor pawilonu biologiczno-chemicznego Instytutu Radowego w Paryżu, na podstawie doświadczeń z napromienianiem jąder barana doszedł do wniosku, że największą promienioczułość mają komórki w fazie mitozy, a w 1927 roku wykazał, że barana nie można wysterylizować jednorazową dawką promieniowania bez wywołania rozległej martwicy skóry [4]. Również w **1927** roku Amerykański zoolog Hermann J. Muller, badając muszkę owocową *Drosophila melanogaster*, wykazał jako pierwszy, że promieniowanie X wywołuje mutacje w genach, za co w 1946 roku otrzymał Nagrodę Nobla. W tym samym roku biochemik niemiecki Otto Warburg zwrócił uwagę na różnice w metabolizmie pomiędzy tkanką prawidłową, a nowotworem. Wykazał on, że komórki nowotworowe preferują oddychanie beztlenowe (glikolizę), nawet w obecności tlenu [5], co — jak sugerował — jest efektem uszkodzenia mitochondriów w komórkach nowotworowych. Odkrycie to zostało zapomniane na dziesiątki lat, jednak obecnie, dzięki postępowi biologii molekularnej, przeżywa renesans i jest przedmiotem intensywnych badań.

Na początku lat 40. ubiegłego wieku Londyn z powodzeniem zaczyna konkurować z Paryżem o pierwszeństwo w badaniach radiobiologiczno-medycznych. W **1936 roku** J.C. Mottram w Londynie, napromieniał fragmenty nowotworu w obecności tlenu lub bez niego i wykazał wpływ tego pierwiastka na promieniowrażliwość nowotworu [6]. W **1953 roku** Alma Howard i Stephen Pelc w Hammersmith Hospital w Londynie, analizując cykl życiowy komórek stożka wzrostu fasoli przy użyciu izotopu fosforu, opisali fazy cyklu komórkowego (G1, S, G2, M) (ryc. 3) i wykazali, że komórki syntetyzują DNA tylko w fazie S [7]. Odkrycie to miało ogromny wpływ na rozwój wszystkich kierunków biologii.

Z początkiem lat 60. ubiegłego wieku i później panowało przekonanie, że za większość niepowodzeń radioterapii dużą odpowiedzialność ponosi efekt tlenowy. Przekonanie to było wynikiem badań pracowników Hammersmith Hospital w Londynie, fizyka Hala Graya (wprowadził termin „efekt tlenowy”) i patologa Hugh’a Thomlinsona, którzy w **1955 roku** na podstawie mikroskopowej analizy utkania raka płuca wykazali, że duża odległość między naczyniami zaopatrującymi guz nowotworowy powoduje spadek parcjalnego ciśnienia tlenu i prowadzi do hipoksji dużych fragmentów guza, a w konsekwencji do zmniejszenia ich promieniowrażliwości [8]. Udowodnili tym samym istnienie hipoksji w nowotworach i wprowadzili termin „hipoksja chroniczna”. Wykazali, że komórki w anoksji (niedotlenowane) są 2,5–3 razy bardziej odporne na promieniowanie niż komórki zawierające prawidłową ilość tlenu (normoksja).

Do połowy lat 50. w badaniach przeżycia komórek jako funkcji dawki promieniowania stosowano jedynie mikroorganizmy. W **1956 roku** T. Puck i P. Marcus wykazali, że komórki ssaków (zastosowane w tych badaniach po raz pierwszy) w wyniku popromiennych uszkodzeń tracą zdolność do namnażania się. Przedstawili pierwszą krzywą przeżycia dla komórek ssaków [9]. Termin „przeżycie komórki” (*cell survival*) zostało zdefiniowane jako zachowanie zdolności do nieograniczonego rozplemu w przypadku komórek proliferujących (macierzystych i klonogennych) lub zachowanie swoistych czynności życiowych w przypadku komórek nie proliferujących (np. komórek nerwowych, mięśniowych) po ekspozycji na promieniowanie. Pojęcie promieniowrażliwości wprowadzone przez Pucka i Marcusa do radiobiologii komórek ssaków jest najpowszechniej używane przez radiobiologów w rozważaniach nad oddziaływaniem promieniowania na



Rycina 3. Historia radiobiologii klinicznej — lata 1950–1970

komórki. Według tej koncepcji miarą promieniowrażliwości komórek jest stopień utraty ich zdolności do wytwarzania dużej liczby komórek potomnych drogą proliferacji. Jedynie komórki zachowujące tę funkcję po napromienianiu są zdolne do utrzymania przy życiu tkanki prawidłowej lub do odrostu nowotworu. W radiobiologii bada się zdolność indywidualnych komórek do wytwarzania komórek potomnych w warunkach laboratoryjnych, używając hodowli komórkowych (*in vitro*, lub zwierząt (*in vivo*). Wyniki oceny przeżywalności komórek są przedstawiane w postaci **krzywych przeżycia**, tj. graficznego przedstawienia zależności skutków działania promieniowania (śmierci lub przeżycia komórki) od dawki promieniowania.

Pierwszą krzywą przeżycia w warunkach *in vivo* dla komórek samoistnej białaczki limfatycznej myszy przedstawili w **1959 roku** H.B. Hewitt i C.W. Wilson [10]. Oceniali oni zdolność napromienianych komórek nowotworowych do indukcji białaczki u myszy.

W tym samym roku Mortimer Elkind i H. Sutton wykazali, że jeśli jednorazowa dawka promieniowania zostaje podzielona na dwie równe frakcje i komórkom pozostawi się czas (5–24 godz.) na naprawę uszkodzeń popromiennych, to przeżycie komórek jest wyższe, ponieważ w czasie przerwy międzyfrakcyjnej komórki mogą naprawić do 2/3 uszkodzeń popromiennych [11]. To odkrycie miało bardzo duży wpływ na rozwój radioterapii.

W latach 60. ubiegłego wieku przeprowadzono szereg badań na zwierzętach w celu opracowania bezpiecznego sposobu frakcjonowania dawki terapeutycznej. Autorami jednego z nich, wykonanego na myszach w **1963 roku**, są J. Fowler i B. Stern. Wykazali oni, że zmiany liczby frakcji i całkowitego czasu leczenia wpływają niezależnie na popromienny odczyn skóry [12]. Były to prace fundamentalne dla radiobiologii klinicznej.

mienny odczyn skóry [12]. Były to prace fundamentalne dla radiobiologii klinicznej.

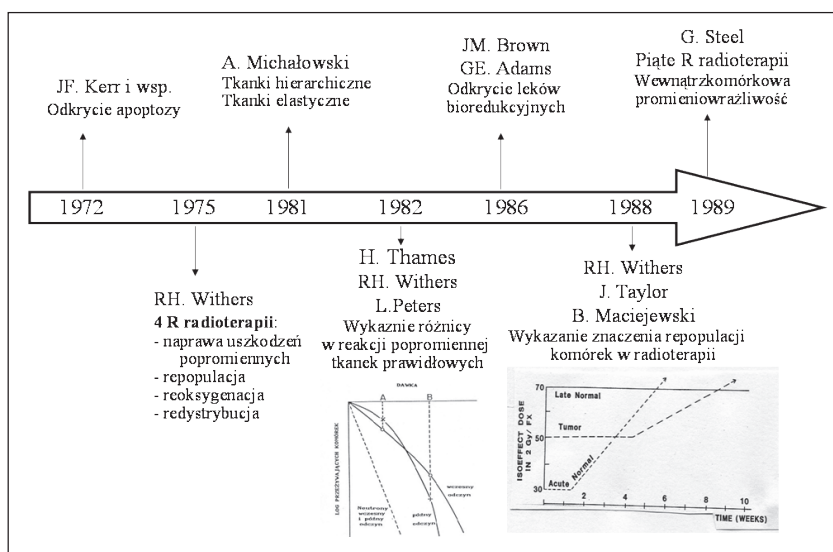
W **1966 roku** Herman Suit z MD Anderson Hospital w Houston i R. Wette napromieniali różnymi dawkami guzy mysie o podobnej wielkości i obserwowali częstość wznów i wyleczeń miejscowych nowotworu. Wprowadzili pojęcie dawki, która powoduje wyleczenie miejscowe 50% nowotworów i nazwali ją TCD50, co umożliwiło porównywanie efektów napromieniania w wielu ośrodkach.

Rok później, w **1967 roku**, Rodney Withers z Houston wprowadził po raz pierwszy metodę ilościowej oceny przeżywalności napromienianych komórek macierzystych *in situ* w skórze myszy [13]. Napromieniał on mały obszar (1 cm) skóry myszy, który oddzielał od reszty skóry pierścień napromieniony wysoką dawką, co uniemożliwiało migrację komórek z nienapromienianego terenu. Następnie zliczał kolonie powstałe z przeżywających komórek macierzystych skóry. Metoda ta umożliwiła w przyszłości badanie przeżywalności komórek macierzystych również innych tkanek.

Angielski patolog John Kerr [14] wprowadził w 1972 r. pojęcie apoptozy. Później wykazano, że większość napromienianych komórek ginie śmiercią apoptotyczną (ryc. 4).

W **1975 roku** Rodney Withers sformułował cztery procesy biologiczne, zwane 4 R radioterapii, które są odpowiedzialne za reakcję popromienną guza nowotworowego [15]. Są to: naprawa uszkodzeń subletalnych i potencjalnie letalnych (*repair*), redystrybucja komórek w cyklu (*redistribution*), repopulacja (*repopulation*) i reoksygenacja (*reoxygenation*). Od tego czasu rozpoczęto określanie cech biologicznych nowotworu odpowiedzialnych za wymienione procesy.

W **1981 roku** Adam Michałowski, patolog z Centrum Onkologii w Warszawie odegrał dużą rolę w tworzeniu



Rycina 4. Historia radiobiologii klinicznej — lata 1970–1990

koncepcji dotyczącej reakcji popromiennej różnych tkanek prawidłowych oraz mechanizmów prowadzących do łagodzenia nasilenia późnych uszkodzeń popromiennych. Był on pierwszym popularyzatorem wiedzy radiobiologicznej w Polsce. Podzielił tkanki na dwie kategorie: hierarchiczne (*hierarchical*, H) i elastyczne (*F-flexible*; nie zawierające odrębnej subpopulacji komórek macierzystych), lecz w jednakowym stopniu zdolnych do rozplemu. Sugerował, że taki podział determinuje różną reakcję tkanek na napromienianie: wczesny i późny odczyn popromienny.

Koncepcja Michałowskiego została potwierdzona w **1982 roku**, kiedy to Howard Thames i wsp. [17] wykazali, że tkanki późno reagujące są bardziej wrażliwe (nawet na niewielkie zmiany dawki frakcyjnej) od tkanek wcześnie reagujących i większości guzów nowotworowych. Zmniejszenie dawki frakcyjnej odpowiada za efekt ochronny w późno reagujących tkankach, ponieważ zwiększa się ich tolerancja i obniża ryzyko późnych powikłań.

Duże znaczenie dla rozwoju terapii przeciwnowotworowej miało odkrycie w 1986 r. przez grupę J.M. Browna [18] i G. Adamsa [19] leków bioredukcyjnych. Leki te ulegają bioredukcji do związków toksycznych głównie w komórkach hipoksycznych, dlatego mogą być dodatkowym czynnikiem cytobójczym w terapii nowotworowej.

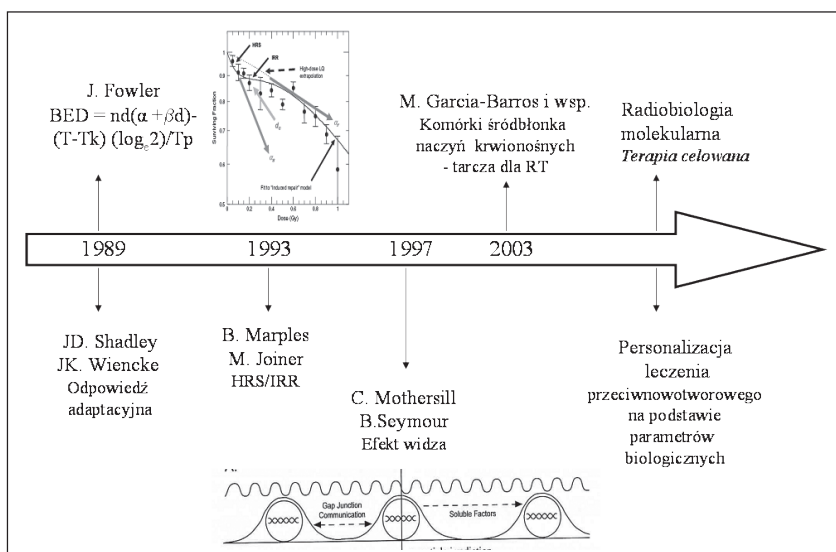
W **1988 roku** Rodney Withers, Taylor i Maciejewski przeanalizowali dane kliniczne z 59 ośrodków terapeutycznych dotyczące leczenia napromienianiem chorych na raka nosowej części gardła i wykazali, że repopulacja komórek nowotworowych przeżywających napromienianie rozpoczyna się około 4 tygodnia od rozpoczęcia RT. Wobec tego w celu uzyskania takiego samego efektu podczas napromieniania frakcjonowanego w dłuższym czasie należy podać wyższą dawkę promieniowania. Ilustruje to krzywa (ryc. 4) nazwana kolokwialnie *dog leg curve*. W celu zniwelowania efektu

repopulacji raka płaskonabłonkowego należy podać dawkę wyższą o 0,6 Gy na każdy dzień przedłużonego leczenia [20]. Badania te wykazały, że repopulacja komórek klonogennych guza po napromienianiu w zasadniczy sposób wpływa na odpowiedź popromienną. W związku z tym całkowity czas leczenia ma istotne znaczenie dla wyników radioterapii. Konsekwencją tego stwierdzenia są ważne teoretyczne i praktyczne wnioski dotyczące sposobów frakcjonowania dawki i stosowania wzorów dawek równoważnych w radioterapii.

W **1985 roku** Gordon Steel zwrócił dodatkowo uwagę na wewnątrzkomórkową promieniowrażliwość, czyli promieniowrażliwość właściwą, zależną od genów. Określona ona została jako 5 R radioterapii (*intrinsic radiosensitivity*) [21].

W **1989 roku** Jack Fowler zaproponował wzór do obliczania dawki efektywności biologicznej, uwzględniający parametry biologiczne takie jak wewnątrzkomórkowa promieniowrażliwość, tempo proliferacji czy czas naprawy uszkodzeń popromiennych. Umożliwił on porównywanie efektów działania różnych schematów napromieniania. Współczynnik α/β stał się parametrem zastępującym rodzaj tkanki w wyniku dopisania w indeksie dolnym informacji, czy dotyczy ona wczesnych (Gy10), czy późnych odczynów (Gy3). W ten sposób odróżniono dawkę fizyczną promieniowania od koncepcyjnej dawki efektywnej biologicznie [22, 23].

Lata 90. ubiegłego wieku to okres odkrycia zjawisk występujących po działaniu bardzo małych dawek promieniowania, które obaliły podstawowe dogmaty radiobiologii (ryc. 5). Do zjawisk występujących na poziomie małych dawek promieniowania zaliczamy: odpowiedź adaptacyjną, nadwrażliwość komórek na poziomie małych dawek — *hyper-radiosensitivity* (HRS) i *increased radiation resistance* (IRR), niestabilność genetyczną oraz efekt widza [24].



Rycina 5. Historia radiobiologii klinicznej — lata 90. XX wieku i współcześnie

Opisanie wymienionych zjawisk ma poważne konsekwencje, ponieważ zaprzeczają rekomendowanemu przez międzynarodową komisję ochrony radiologicznej (ICRP) liniowemu, bezprogowemu modelowi zależności efektu od dawki (obowiązującemu od 1960 roku) i wskazuje na istnienie progu dla efektu biologicznego.

Odkrycie w 1989 r. odpowiedzi adaptacyjnej wykazało, że małe dawki promieniowania jonizującego (0,5–20 cGy) mogą indukować w komórkach naprawę uszkodzeń DNA, co sprawia, że podanie drugiej wyższej dawki wywołuje mniejszy efekt od oczekiwanego. Dowiodło to, że efekt działania dawki fizycznej jest różny po powtórnej ekspozycji, co przeczyło obowiązującym wówczas założeniom o takim samym efekcie działania każdej dawki promieniowania. Nierówny efekt działania promieniowania wykazuje również zjawisko niestabilności genetycznej, które polega na występowaniu podwyższonej liczebności mutacji (genowych i chromosomowych) przez wiele generacji komórek po napromienieniu.

W 1994 roku Brian Marple i Michael Joiner [25] opisali zjawisko nadwrażliwości na małe dawki promieniowania (*hyperradiosensitivity*, HRS) i wzrostu promieniooporności po wyższych dawkach (*increased resistance*, IRR). Badając linię komórkową V79 chomika chińskiego udowodnili, że po bardzo małych dawkach promieniowania (< 30–60 cGy) przeżycie komórek jest niższe niż przewidywane na podstawie modelu LQ. Hipoteza ta jest nadal sprawdzana w warunkach *in vivo*.

Przez dziesięciolecia uważano, że aby promieniowanie jonizujące zabiło komórkę, przez jądro komórkowe musi przejść cząstka lub foton, który uszkodza DNA. Pod koniec ubiegłego wieku ten dogmat radiobiologii został podważony — okazało się, że śmiertelnie uszkodzona może być nie tylko bezpośrednio trafiona komórka, ale i sąsiadująca z nią komórka „widz”. Efekt ten, nazwany efektem widza (*bystan-*

der effect, BE), opisany został po raz pierwszy w komórkach nabłonkowych i nowotworowych w **1997 roku** przez Carmel Mothersill i Colina Seymoura [26].

Jest to zjawisko polegające na występowaniu zmian w nienapromienianych komórkach znajdujących się w sąsiedztwie napromienianych. W BE może dochodzić do mutacji lub transformacji komórek w wyniku działania wielu czynników, takich jak: reaktywne formy tlenu (RFT), tlenek azotu, transformujący czynnik wzrostu (TGF-β) wydzielane do pożywki przez trafione bezpośrednio cząstkami lub fotonami komórki. Mogą one przechodzić do sąsiednich, nietrafiionych komórek przez złącza szczelinowe. Są to liczne kanaliki w błonach plazmatycznych, przez które komórki wymieniają się cząsteczkami białek i związków niskocząsteczkowych.

W 2003 roku badania M. Garcia-Barros i wsp. [27] wykazały, że odpowiedź popromienna zależy nie tylko od fenotypu nowotworu, ale również od jego mikrośrodowiska — apoptozy komórek śródbłonna naczyń krwionośnych. Jeżeli komórki śródbłonna naczyń nie ulegały apoptozie po napromienianiu, to wzrost nowotworu był 2–4 razy szybszy. A więc komórki śródbłonna można opisywać jako rodzaj tarczy dla RT. W związku z tym celem leczenia napromienianiem stały się również białka receptorowe znajdujące się na powierzchni komórek. Poznanie tych zjawisk przyczyniło się do rozwoju terapii celowanej i radiobiologii molekularnej. Po około 20-letnim okresie poszukiwań odpowiednich markerów i metod ich wyróżnienia rozpoczął się okres indywidualizacji (personalizacji) leczenia przeciwnowotworowego na podstawie markerów molekularnych.

Od dziesięcioleci stosowania radioterapii istniała potrzeba określenia czynników prognostycznych wskazujących na to, kto wymaga leczenia, i predykcyjnych — wskazujących na to, jakie leczenie jest najwłaściwsze dla indywidualnego

chorego. Znajomość czynników predykcyjnych jest szczególnie cenna, gdyż pomaga określić dawkę promieniowania, jaką należy zastosować w konkretnej sytuacji klinicznej.

Z początkiem lat 80. zaczęto publikować wyniki licznych badań klinicznych, które wykazały, że u chorych na te same nowotwory, leczonych taką samą dawką promieniowania i z zastosowaniem tego samego sposobu frakcjonacji, z różną częstością dochodzi do miejscowych wyleczeń nowotworu, inny jest także stopień nasilenia wczesnych i późnych odczynów popromiennych. Zdano sobie wówczas sprawę z tego, że za te różnice mogą być odpowiedzialne biologiczne cechy nowotworu. Nie były one jednak i często nadal nie są brane pod uwagę w planowaniu leczenia, także i z tego powodu, że nie zostały jeszcze w pełni poznane.

Jako czynniki prognostyczne uwzględniane są głównie parametry kliniczne, takie jak: histologiczne utkanie, umiejscowienie i zaawansowanie kliniczne nowotworu, wiek, płeć i stan sprawności ustroju chorego oraz ewentualne współistnienie innych chorób. Na podstawie tych parametrów można w przybliżeniu przewidzieć wynik leczenia. Znajomość tych czynników może także służyć do wytypowania chorych, którzy wymagają uzupełniającego leczenia, jednak nie mają one większego znaczenia jako czynniki predykcyjne, to jest takie, które pozwalają na wybór optymalnego sposobu leczenia indywidualnego chorego. Do tego celu służyć może określenie nie uwzględnianych dotychczas rutynowo w praktyce klinicznej cech biologicznych nowotworu. Określenie tych parametrów jest ważne, ponieważ każdy nowotwór, nawet tego samego typu histologicznego, może się różnić cechami biologicznymi, gdyż różne czynniki genetyczne i środowiskowe mogą wpływać na jego powstawanie.

Z początkiem lat 80. ubiegłego wieku radiobiology zaczęli określać przed leczeniem szybkość wzrostu nowotworu i promieniowrażliwość komórek nowotworowych, a także zwracać uwagę na odsetek komórek niedotlenowanych (komórki hipoksyczne są 3-krotnie bardziej promieniooporne niż komórki dobrze utlenowane) oraz na liczbę komórek ulegających śmierci apoptotycznej (większa śmiertelność mogłaby wskazywać na lepszą reakcję nowotworu na leczenie). Zaczęto określać ekspresję/nadekspresję onkogenów (erb-B, Ki-ras, Nras, c-myc, Bcl-2) odpowiedzialnych za wzrost nowotworu. Oceniano aktywność genów supresorowych, a właściwie ich białkowych odpowiedników (p53, RB, BRCA1,2) odpowiedzialnych za hamowanie wzrostu nowotworu.

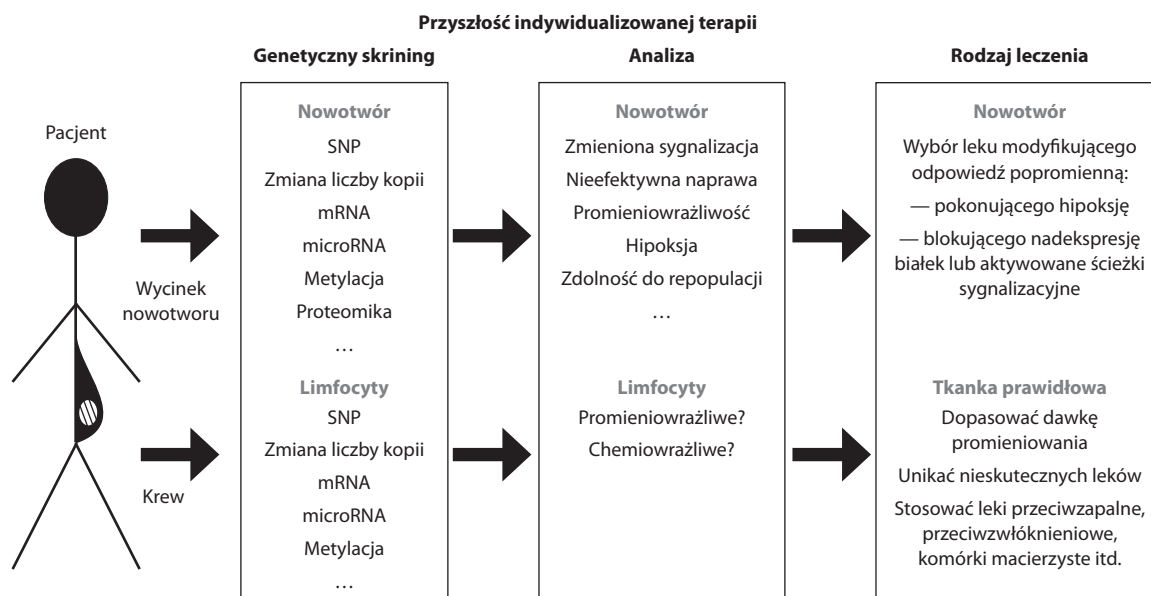
Okazało się jednak, że wszystkie wymienione parametry biologiczne w różnym stopniu wpływają na wyniki leczenia i różna może być ich rola u indywidualnego chorego. Niestety, pomimo prowadzonych przez ponad 20 lat badań nie został opracowany panel testów dla żadnego typu nowotworu, niezbędny do indywidualizacji leczenia. Można wyróżnić szereg przyczyn tego stanu rzeczy. Po pierwsze, nie zdawano sobie sprawy z heterogenności nowotworu pod

względem każdej z badanych cech. Po drugie, nie opracowano standardowych, obiektywnych metod do oceny cech biologicznych nowotworów. Po trzecie, publikowano prace, w których formułowano wnioski na podstawie analizy małych liczebnych grup chorych, ze zbyt krótkim czasem obserwacji, co doprowadzało do publikowania pomiędzy ośrodkami sprzecznych wyników.

W pierwszym etapie badań nad biologicznymi czynnikami prognostycznymi stosowano testy oparte na analizie jednego markera. Zwracano szczególnie uwagę na 3 podstawowe parametry biologiczne: proliferację, promieniowrażliwość komórek i hipoksję w nowotworze jako czynniki odpowiedzialne za wynik radioterapii. Okazało się jednak, że metody diagnostyczne oparte na jednym markerze mają szereg ograniczeń, np. mniejszą czułość i swoistość w przypadku zastosowania do diagnozowania licznej i heterogennej grupy. Każdy nowotwór, nawet tego samego typu histologicznego, może się różnić cechami biologicznymi, gdyż różne czynniki genetyczne i środowiskowe mogą wpływać na jego powstanie, rozwój i przebieg. Guz zawiera heterogenną populację komórek zarówno pod względem proliferacji, jak i zróżnicowania. Dlatego w następnym etapie badań, w celu przewidzenia odpowiedzi nowotworu na leczenie, koncentrowano się na trzech wymienionych powyżej parametrach biologicznych, wykorzystując podwójne lub potrójne barwienia immunohistochemiczne, które pozwalały na ocenę ekspresji różnych białek. Wykazano jednak, że nowotwory o podobnej promieniowrażliwości właściwej mogą się różnić pod względem proliferacji i hipoksji, podobnie jak nowotwory o podobnej proliferacji mogą wykazywać różną promieniowrażliwość właściwą i hipoksję. Dlatego obecnie preferuje się analizę setek lub tysięcy genów lub białek, na podstawie których można uzyskać wzór genetyczny i białkowy dla tkanki, narządu, różnych nowotworów u osób chorych lub zdrowych. Obecnie i w najbliższej przyszłości do oceny trzech wymienionych parametrów odgrywających największą rolę w radioterapii oprócz metod z zakresu biologii molekularnej będzie można wykorzystywać nowe narzędzia diagnostyki obrazowej, takie jak pozytonowa tomografia emisyjna (PET). Podając izotopowe znaczniki, takie jak fluorodeoksyglukoza, można ocenić metabolizm nowotworu, za pomocą fluorotymidyny — jego proliferację, z użyciem zaś fluoromisonidazolu albo fluoropochodnej etanizolu — hipoksję.

Metody molekularne w najbliższej przyszłości będą służyć do wyboru odpowiedniej sekwencji leczenia przeciwnowotworowego, zwanej obecnie onkologią teragnostyczną (zintegrowaną terapią skojarzoną), w której odpowiednia sekwencja leczenia chirurgicznego, RT czy CHT będzie oparta o sygnatury molekularne nowotworu i ocenę chemio- czy promieniowrażliwości komórek [28].

Obecnie trwają intensywne prace nad opracowaniem testów molekularnych, które mogłyby zostać wykorzystane



Rycina 6. Schemat przedstawiający wykorzystanie w najbliższej przyszłości testów molekularnych służących do indywidualizacji leczenia przeciwnowotworowego

w terapii nowotworów. Można je przeprowadzić na trzech poziomach: DNA, RNA i białek [29]. Wykorzystywane są osiągnięcia trzech następujących nauk: genomiki, transkryptomiki i proteomiki. **Genomika** jest to dziedzina biologii molekularnej zajmująca się analizą genomu ludzkiego. Głównym celem jest poznanie sekwencji materiału genetycznego oraz określenie zależności i interakcji wewnątrz organizmu. W badaniach genomicznych można określać polimorfizmy pojedynczych nukleotydów, **SNP** (*single nucleotide polymorphism*). Zjawisko to określa zmienność sekwencji DNA, która polega na występowaniu innych pojedynczych nukleotydów (A, T, C, G) u różnych osobników, co może być przyczyną ich różnej reakcji na napromienianie. Inna technika genomiczna — porównawcza hybrydyzacja genomowa, **CGH** (*comparative genomic hybridization*) jest metodą cytogenetyczną pozwalającą na detekcję liczby kopii w kontrolnym (prawidłowym) i badanym (nowotworowym) DNA. Coraz częściej w badaniach molekularnych wykorzystuje się mikromacierze DNA. Są to płytki, na których można badać jednocześnie ekspresję wielu tysięcy genów. Naukowcy używają czujników DNA do dwóch podstawowych celów: informacji o różnych genach zawartych w badanych fragmentach DNA oraz sprawdzenia ekspresji poszczególnych genów (tworzą profil ekspresji genów). Dzięki chipom DNA można badać różnice pomiędzy genami w zdrowych i nowotworowych komórkach, a także wykazać różnice w ekspresji genów i potencjalnej reakcji nowotworu na leczenie.

Transkryptomika jest dziedziną, za pomocą której można określić miejsce i czas aktywności genów. Celem jest określenie transkryptomu, czyli ogółu cząsteczek mRNA wyprodukowanych przez komórki. Do rozpoznania sekwencji mRNA wykorzystuje się najczęściej jego zdolność do hybry-

dyzacji z cDNA. Hybrydyzacja kwasów nukleinowych to zjawisko spontanicznego łączenia się komplementarnych nici kwasów nukleinowych. Do innych metod można zaliczyć określenie **microRNA (miRNA)** — małych niekodujących fragmentów RNA (19–24 nukleotydów), które hamują ekspresję genów poprzez blokowanie translacji (przepisywanie informacji z DNA na RNA).

Proteomika zaś jest nauką zajmującą się badaniem organizacji składu oraz budowy ogółu białek organizmu (czyli proteomu). Przedmiotem proteomiki nie jest identyfikacja pojedynczych białek (jak w klasycznych technikach biochemicznych), ale jednoczesna analiza nawet tysięcy białek w celu wykazania różnic między chorymi a zdrowymi osobami.

W tym celu wprowadzona została technologia mikromacierzy białkowych (*protein microarray technology*). W wyniku identyfikacji miejsc fosforyzacji białek na poszczególnych etapach progresji choroby lub przed leczeniem i po jego zakończeniu można będzie mapować szlaki sygnałowe białek. Wymaga to zastosowania zaawansowanych technik bioinformatycznych oraz analiz statystycznych. Do celów proteomiki można zaliczyć wyodrębnienie białek wytwarzanych przez poszczególne komórki i narządy, zbadanie ich wzajemnych zależności i poznanie ich struktur trójwymiarowych w celu identyfikacji miejsc (tarczy) najbardziej wrażliwych na działanie leków, które po przyłączeniu będą mogły zmieniać aktywność białka. Dlatego badacze starają się ustalić skład białek wytwarzanych przez komórki nowotworowe pobrane od pacjentów i na ich podstawie szukać markerów związanych z najbardziej złośliwymi postaciami raka. Dlatego technologie proteomiczne mogą pomóc w monitorowaniu leczenia przeciwnowotworowego oraz w indywidualizowaniu terapii.

Jak wygląda przyszłość personalizowanej terapii? Na podstawie niewielkiego wycinka nowotworu lub kropli krwi, wydzieliny czy popłuczyn będzie można określić przeciwciała, olinukleotydy, sekwencje jednoniciowego DNA oraz polimorfizmy pojedynczych nukleotydów i na podstawie profilu molekularnego wybrać odpowiednie leczenie (ryc. 6) [29]. Obecnie dostępne techniki są w stanie je wyróżnić, jednak istnieje problem z ich interpretacją. Sekwencja genów oraz obecność lub brak odpowiadającego im RNA w komórkach nowotworowych może być podstawą dla biologicznych i klinicznych spekulacji, natomiast nie można jeszcze na ich podstawie podejmować ostatecznych decyzji klinicznych. Do rekomendacji testu w klinice wymagane jest przedstawienie korelacji pomiędzy wynikami testu a przeżyciem tysięcy chorych. Ponieważ te badania prowadzone są intensywnie na całym świecie, można mieć nadzieję, że wkrótce odpowiednie rekomendacje zostaną opracowane dla każdego typu nowotworu i będą służyć do indywidualizacji leczenia, na co lekarze, radiobiolodzy i przede wszystkim pacjenci czekają od dziesiątków lat.

Podziękowania

Serdecznie dziękuję Panu Prof. dr. hab. Janowi Skołyńskiemu za cenne uwagi do maszynopisu pracy.

Prof. dr hab. n. med. Anna Gasińska

Zakład Radiobiologii Klinicznej
Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
ul. Garncarska 11, 31–115 Kraków
e-mail: z5gasins@cyf-kr.edu.pl

Otrzymało: 28 maja 2012 r.

Przyjęto do druku: 31 maja 2012 r.

Piśmiennictwo

- Dische S, Saunders MI. Continuous, hyperfractionated, accelerated radiotherapy (CHART). *Brit J Cancer* 1989; 59: 325–326.
- Sorlie T, Perou Ch M, Tibshirani R i wsp. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS* 2001; 98: 10869–10874.
- Bergonie J, Tribondeau L. L'interpretation de quelques resultants de la radiotherapie et essai de fixation d'une technique rationnelle. *CR Seances Acad Sci* 1906; 143: 983–985.
- Regaud C, Ferroux R. Discordance des effets de rayons X, d'une part dans le testicule, par le peau, d'autre parts dans le fractionnement de la dose. *Compt Rend Soc Biol* 1927; 97: 431–434.
- Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* 1927; 8: 519–530.
- Mottram JC. Factor of importance in radiosensitivity of tumours. *Brit J Radiol* 1936; 9: 606–614.
- Howard A, Pelc S R. Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* 1953; 6: 261–273.
- Thomlinson RH, Gray LH. The histologic structure of some human lung cancers and the possible implication for radiotherapy. *Br J Cancer* 1955; 9: 539–549.
- Puck TT, Marcus PI. Action of X — rays on mammalian cells. *J Exp Med* 1956; 103: 653.
- Hewitt HB, Wilson CW. A survival curve for mammalian leukaemia cells irradiated in vivo. *Br J Cancer* 1959; 13: 69–75.
- Elkind MM, Sutton H. X-ray damage and recovery in mammalian cells in culture. *Nature* 1959; 184: 1293–1295.
- Fowler JF, Stern BE. II Dose-time relationships in radiotherapy and the validity of cell survival curve models. *Brit J Radiol* 1963; 36: 163.
- Withers HR. The dose-survival relationship for irradiation of epithelial cells of mouse skin. *Br J Radiol* 1967; 40: 187–194.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239–257.
- Withers HR. The 4 R's of radiotherapy. *Adv Radiat Biol* 1975; 5: 241–271.
- Michałowski A. Effects of radiation on normal tissues: hypothetical mechanisms and limitations of in situ assays of clonogenicity. *Radiat Environ Biophys* 1981; 19: 157–172.
- Thames HD, Withers HR, Peters LJ i wsp. Changes in early and late radiation responses with altered dose fractionation: implications for dose-survival relationships. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982; 8: 219–226.
- Zeman EM, Brown JM, Lemmon MJ i wsp. SR-4233: a new bioreductive agent with high selective toxicity for hypoxic mammalian cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12: 1239–1242.
- Stratford IJ i wsp. RSU-1069, a nitroimidazole containing an aziridine group. Bioreduction greatly increases cytotoxicity under hypoxic conditions. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 105–109.
- Withers H R, Taylor JMG, Maciejewski B. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncol* 1988; 27: 131–146.
- Steel GG, McMillan TJ, Peacock JH. The 5 R's of radiobiology. *Int J Radiat Biol* 1989; 56: 1045–1048.
- Fowler JF. The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy: a review. *Br J Radiol* 1989; 62: 679–694.
- Fowler JF. Development of radiobiology for oncology — a personal view. *Phys Med Biol* 2006; 51: R263–R286.
- Tubiana M. The linear no-threshold relationship is inconsistent with radiation biologic and experimental data. *Radiol* 2009; 251: 13–22.
- 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; 133: 41–51.
- Mothersill C, Seymour CB. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int J Radiat Biol* 1997; 71: 421–427.
- Garcia-Barros M. Tumour response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 2003; 300: 1155–1159.
- B. Maciejewski i wsp. Onkologia teragnostyczna — integracja chirurgii, radioterapii i chemioterapii. *Nowotwory Journal of Oncology* 2010; 60: 509–516.
- Begg AC. Molecular targeting and patient individualization. W: Joiner MC & van der Kogel A (red.) *Basic clinical radiobiology*. Wyd.4. London: Hodder Arnold; 2009, s. 316–331.