

# BIOFIZYKA RADIACYJNA

## wykład #9

Krzysztof Wojciech Fornalski

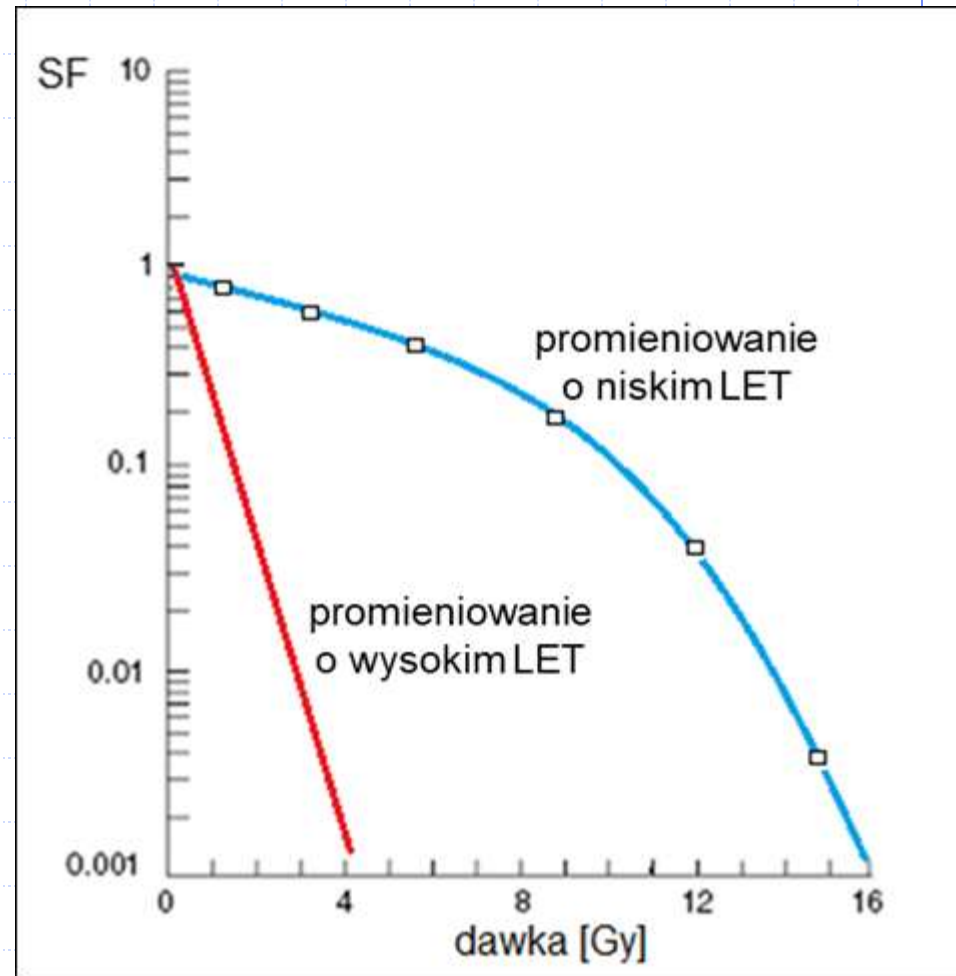
Narodowe Centrum Badań Jądrowych  
Wydział Fizyki, Politechnika Warszawska



# **PRZYPOMNIENIE Z POPZEDNIEGO WYKŁADU**

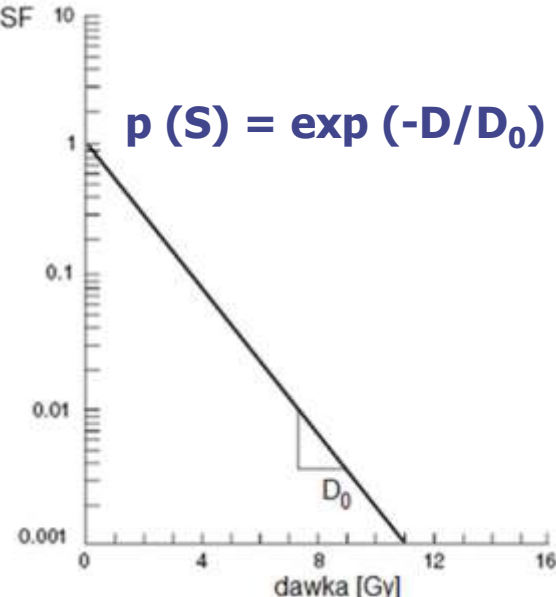
# Krzywe przeżywalności

Krzywa przeżywalności komórek opisuje zależność pomiędzy dawką promieniowania jonizującego a liczbą komórek, które przeżyły. Pojęcie przeżycia (ang. *survival*, *S*, lub *survival fraction*, *SF*) i śmierci komórek może mieć różne definicje w zależności od kontekstu (np. utrata funkcji do proliferacji = namnażania)

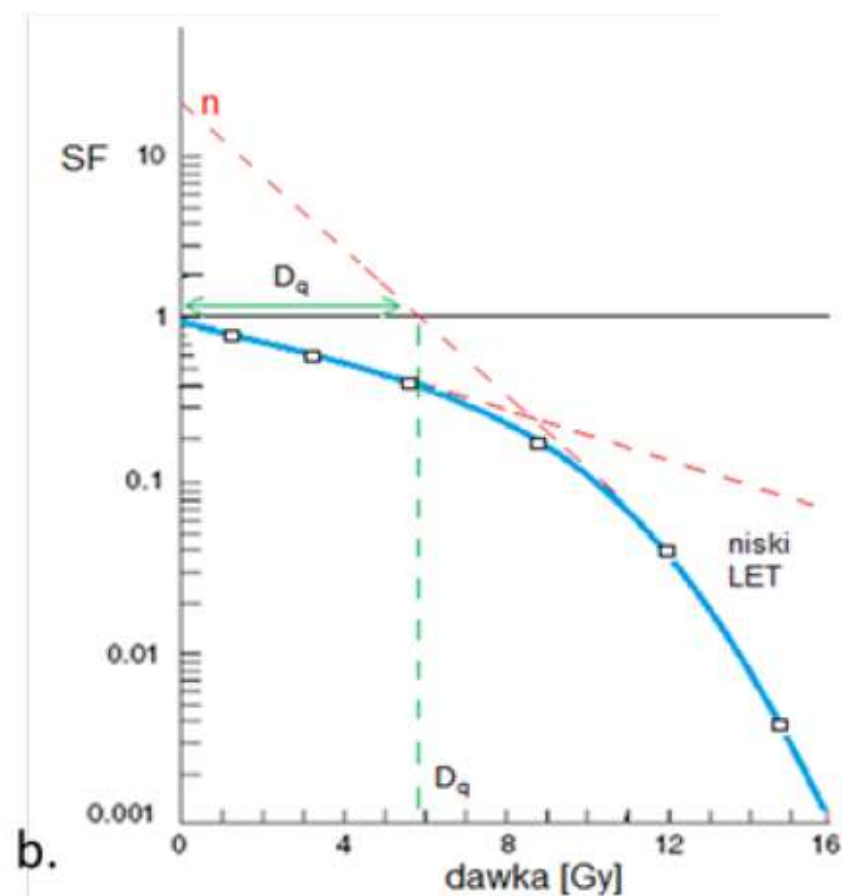
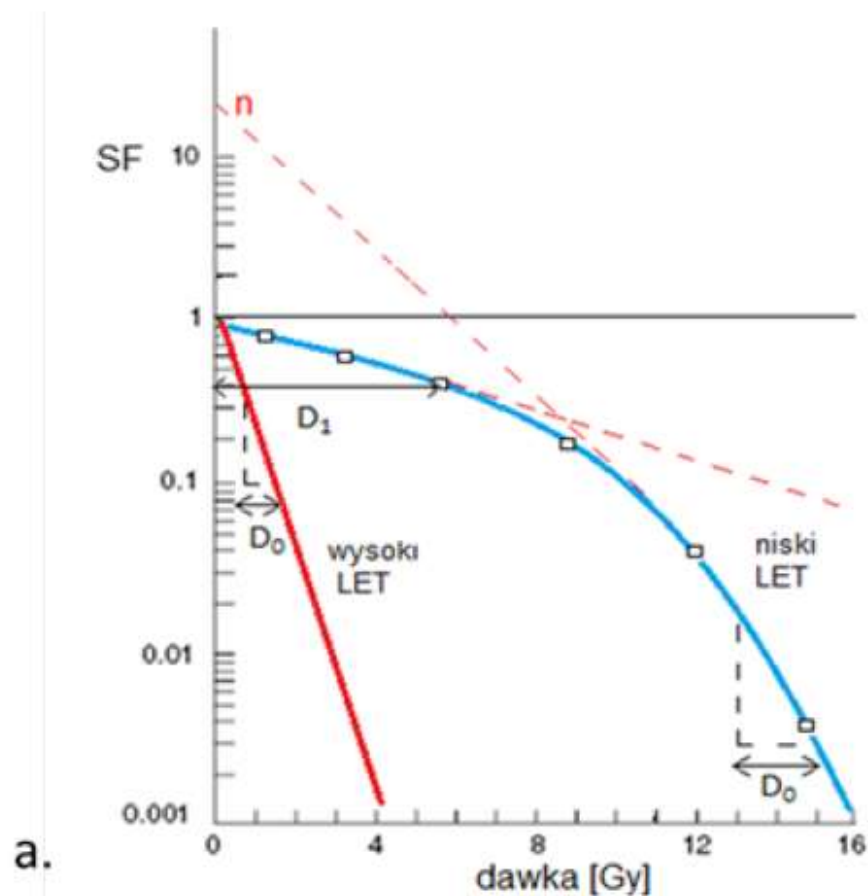


# Model jednotarczowy

- ◆ W DNA występują sekwencje, które odpowiadają za utrzymanie zdolności reprodukcyjnych komórek („tarcza”)
- ◆ **Teoria tarczy** opiera się na tym, że uszkodzenie promieniowaniem jonizującym tych specyficznych rejonów powoduje inaktywację komórki, czyli utratę klonogenności
- ◆ Zakłada się, że jedno trafienie w „tarczę” za pomocą promieniowania jonizującego prowadzi do śmierci komórki
- ◆ Zjawisko to opisano biofizycznie za pomocą modelu jednotarczowego (ang. *single-target single-hit model*), a krzywa ma kształt krzywej eksponencjalnej (patrz rys. ↑)



# Model wielotarczowy

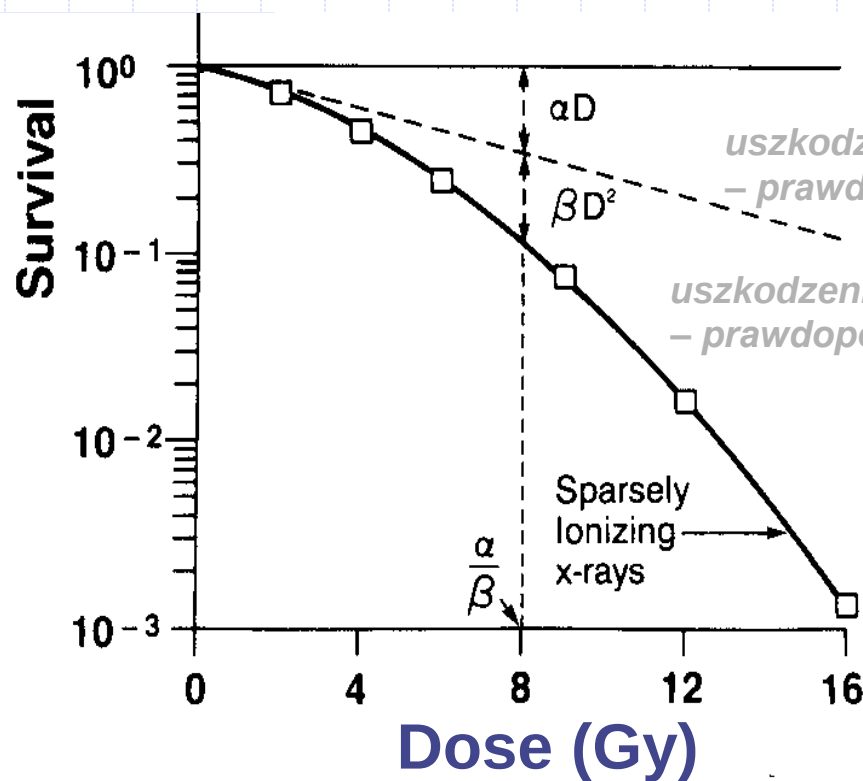


Parametry opisujące model wielotarczowy są zależne od siebie zgodnie z wyrażeniem:

$$\log_e n = D_q / D_0$$

$$S(q, n, D) = 1 - (1 - e^{-qD})^n.$$

# Model liniowo-kwadratowy



→  $P(S) = e^{(-\alpha D - \beta D^2)}$

uszkodzenia typu one-hit

– prawdopodobieństwo wystąpienia zależy od  $D$

uszkodzenia typu two-hit

– prawdopodobieństwo wystąpienia zależy od  $D^2$

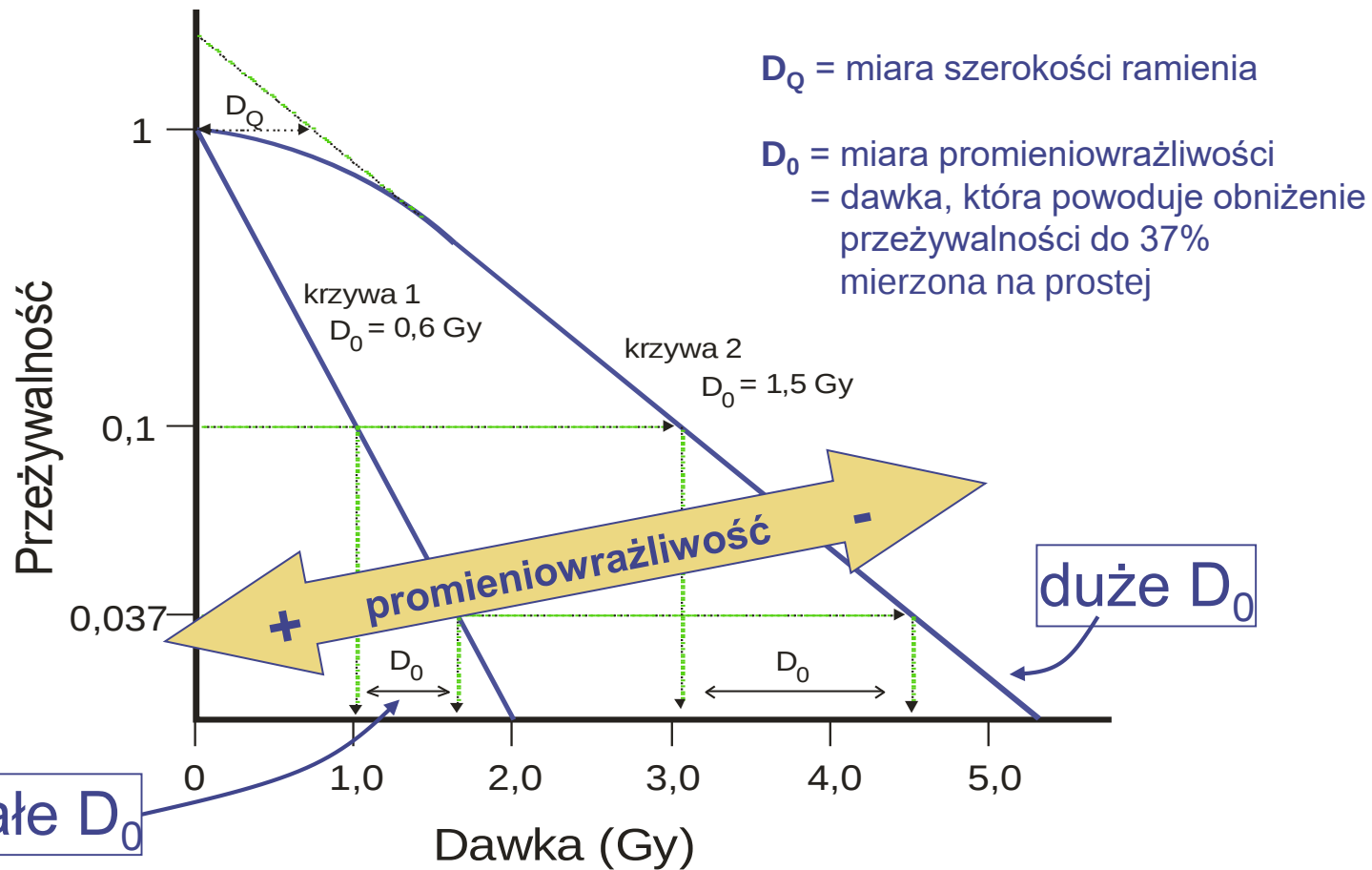
Parametry alfa i beta są wyznaczone eksperymentalnie

$\frac{\alpha}{\beta}$  = określa (w Gy) równy stosunek części liniowej i kwadratowej krzywej

duża wartość  $\frac{\alpha}{\beta}$  : dominuje składnik liniowy – niska zdolność regeneracyjna – **małe**  $D_Q$

mała wartość  $\frac{\alpha}{\beta}$  : dominuje składnik kwadratowy – wysoka zdolność regeneracyjna – **duże**  $D_Q$

# Krzywe przeżywalności a promieniowrażliwość



# **EFEKTY NIELINIOWE I NIECELOWANE (NON- TARGETED) W NAPROMIENIOWANYCH KOMÓRKACH**

- PROMIENIOWRAŻLIWOŚĆ**
- NIESTABILNOŚĆ GENOMOWA**
- EFEKT SĄSIEDZTWA**
- ODPOWIEDŹ ADAPTACYJNA**



**PROMIENIOWRAŻLIWOŚĆ,  
PROMIENIOPODATNOŚĆ,  
PROMIENIOOPORNOŚĆ**

**(RADIOOWRAŻLIWOŚĆ,  
RADIOOPORNOŚĆ)**

# Definicje #1

- ◆ **Promieniowrażliwość** (radiowrażliwość, ang. radiosensitivity) - jest to ogólnie rzecz ujmując nadwrażliwość na działanie promieniowania jonizującego dla danego rodzaju komórek / tkanek / organizmów, w odniesieniu do **skutków deterministycznych** (tj. krótkoterminowych, związanych ze **śmiercią / uszkodzeniem komórek**)
- ◆ Komórka / tkanka / organizm bardziej promieniowrażliwy odpowiada bardziej negatywnie na promieniowanie – stromsza krzywa przeżywalności
- ◆ Odwrotnością jest **promieniooporność** (radiooporność)
- ◆ **Hiper-promieniowrażliwość** – będzie omówiona później

# Definicje #2

- ◆ **Promieniopodatność** (radiopodatność, ang. radiosusceptibility) – to samo co promieniowrażliwość, ale w odniesieniu do skutków **stochastycznych**, tj. długoterminowych, przede wszystkim z punktu widzenia **indukcji nowotworu**
- ◆ Za promieniowrażliwość odpowiadają inne mechanizmy niż za promieniopodatność
- ◆ Jednakże w literaturze radiobiologicznej bardzo często nie rozróżnia się obu tych terminów i określa się je łącznie po prostu jako promieniowrażliwość w odniesieniu do wszelkich skutków
- ◆ Sporadycznie pojawia się trzeci termin: radiodegeneracja (nienowotworowe upośledzenie organu/tkanki)

# Radiowrażliwość, radiopodatność, radiodegeneracja

## RADIOSENSITIVITY    RADIOSUSCEPTIBILITY    RADIODEGENERATION



Źródło: Berthel, Foray,  
Ferlazzo: Cancers  
2019, 11(7), 905

|                                | Cellular death                   | Cellular transformation                             | Accelerated aging                                                          |
|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b>Major origin</b>            |                                  |                                                     |                                                                            |
| <b>Major clinical features</b> | Burns<br>Dermatitis<br>Proctitis | RI cancers<br>Leukemia<br>Sarcoma<br>Thyroid cancer | Cataracts<br>Non-cancer effects of<br>Cardiovascular system<br>Bone system |
| <b>Threshold doses</b>         | 200-500 mSv                      | 100–200 mSv                                         | 200 mSv ?                                                                  |
| <b>Dose-effect model</b>       | LQ model                         | LNT/NLT models                                      | ?                                                                          |
| <b>Degree of elucidation</b>   | +++                              | ++                                                  | +                                                                          |
| <b>Prediction endpoints:</b>   |                                  |                                                     |                                                                            |
| <b>at the molecular model</b>  | H2AX or pATM foci                | G2 or HPRT assays                                   | Telomere assays ?                                                          |
| <b>at the cellular model</b>   | Clonogenic survival              | ?                                                   | ?                                                                          |
| <b>at the clinical model</b>   | CTCAE/RTOG grades                | ERR of cancer                                       | ?                                                                          |

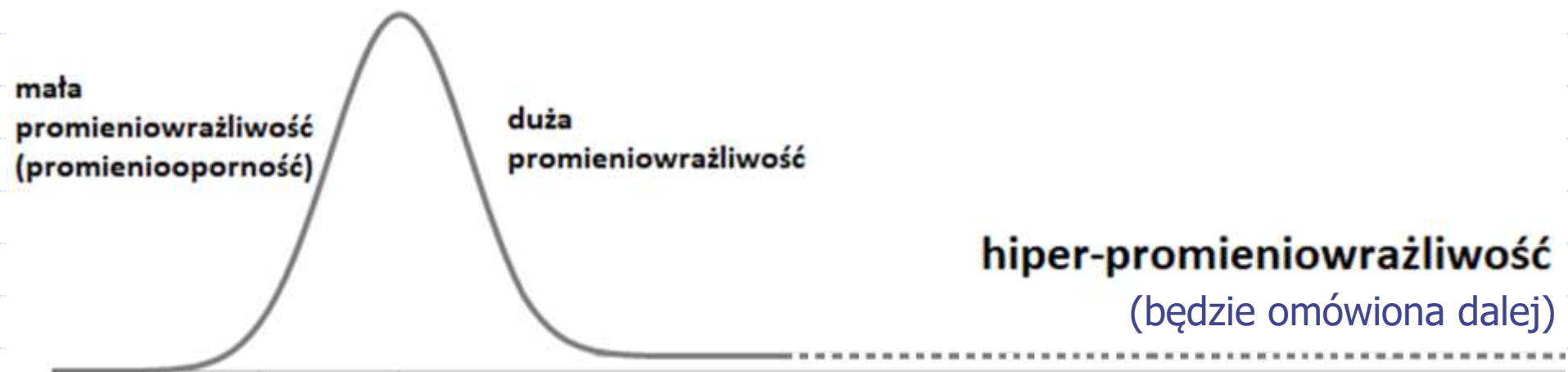
# Promieniowrażliwość i promieniopodatność

- ◆ sprzyjają jej pewne wrodzone (płeć, rasa) i nabyte (sprawność fizyczna, metabolizm) cechy fizyczne
- ◆ Ponadto pewne obciążenia genetyczne oraz cechy takie jak wiek, płeć, stan zdrowotny organizmu, na który wpływa dieta, aktywność fizyczna, używki, zanieczyszczenia środowiska, inne choroby
- ◆ W ocenie efektów działania promieniowania powyższe czynniki można traktować dwojako – jako dodatkowe parametry przy ocenie zależności dawka-efekt dla całej populacji, lub jako tzw. czynniki zakłócające (w przypadku badań epidemiologicznych)
- ◆ Poza wrażliwością osobniczą należy zwrócić uwagę na różną wrażliwość samych tkanek, komórek czy komórek w różnych fazach cyklu komórkowego
- ◆ Jak dotąd nie ustalono jaki procent ogólnej populacji mógłby wykazywać nadwrażliwość na małe dawki promieniowania jonizującego.

# Promieniowrażliwość

- ◆ Promieniowrażliwość jest więc cechą osobniczą, czyli opisaną rozkładem Gaussa
- ◆ Hiper-promieniowrażliwość – cecha rzadka, powoduje asymetryczność rozkładu (długi ogon)

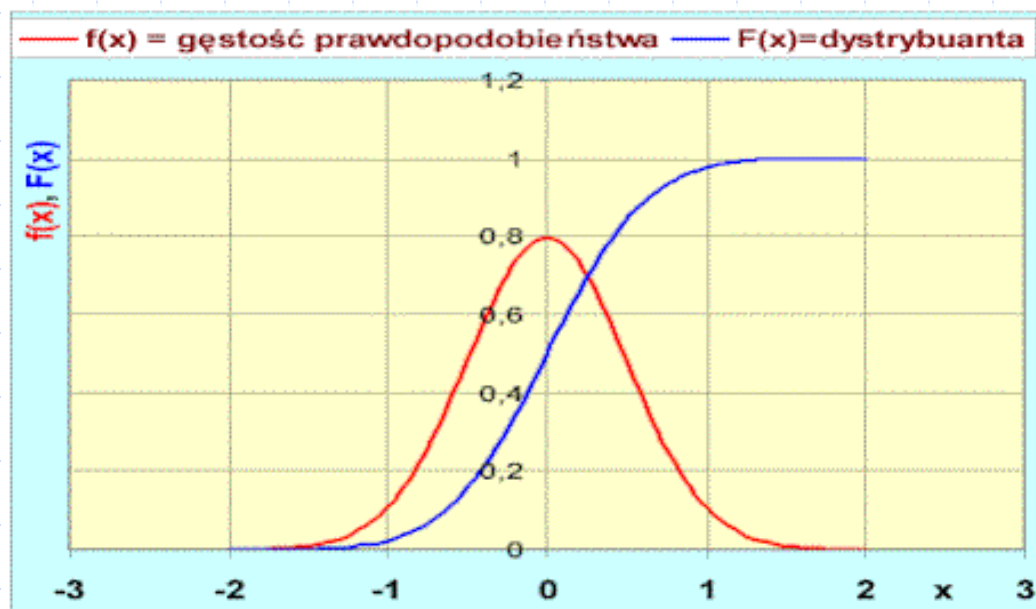
## Promieniowrażliwość



# Promieniowrażliwość

- ◆ Jak powiedziano, promieniowrażliwość odnosi się do skutków **deterministycznych**, czyli skutków wczesnych związanych z uszkodzeniami całych tkanek
- ◆ Najpoważniejszym skutkiem deterministycznym jest **śmierć** organizmu
- ◆ W związku z tym rozkład prawdopodobieństwa śmierci od napromienienia jedną dużą dawką (impulsem dawki) można również zapisać **krzywą gaussowską**, zaś p-two skumulowane (dystrybuanta) **krzywą sigmoidalną**
- ◆ Punkt przegięcia takiej sigmoidy (czyli maksimum rozkładu Gaussa) określa średnie p-two śmierci (równe  $\frac{1}{2}$ ), co określa się jako **dawka letalna LD<sub>50/30</sub>**

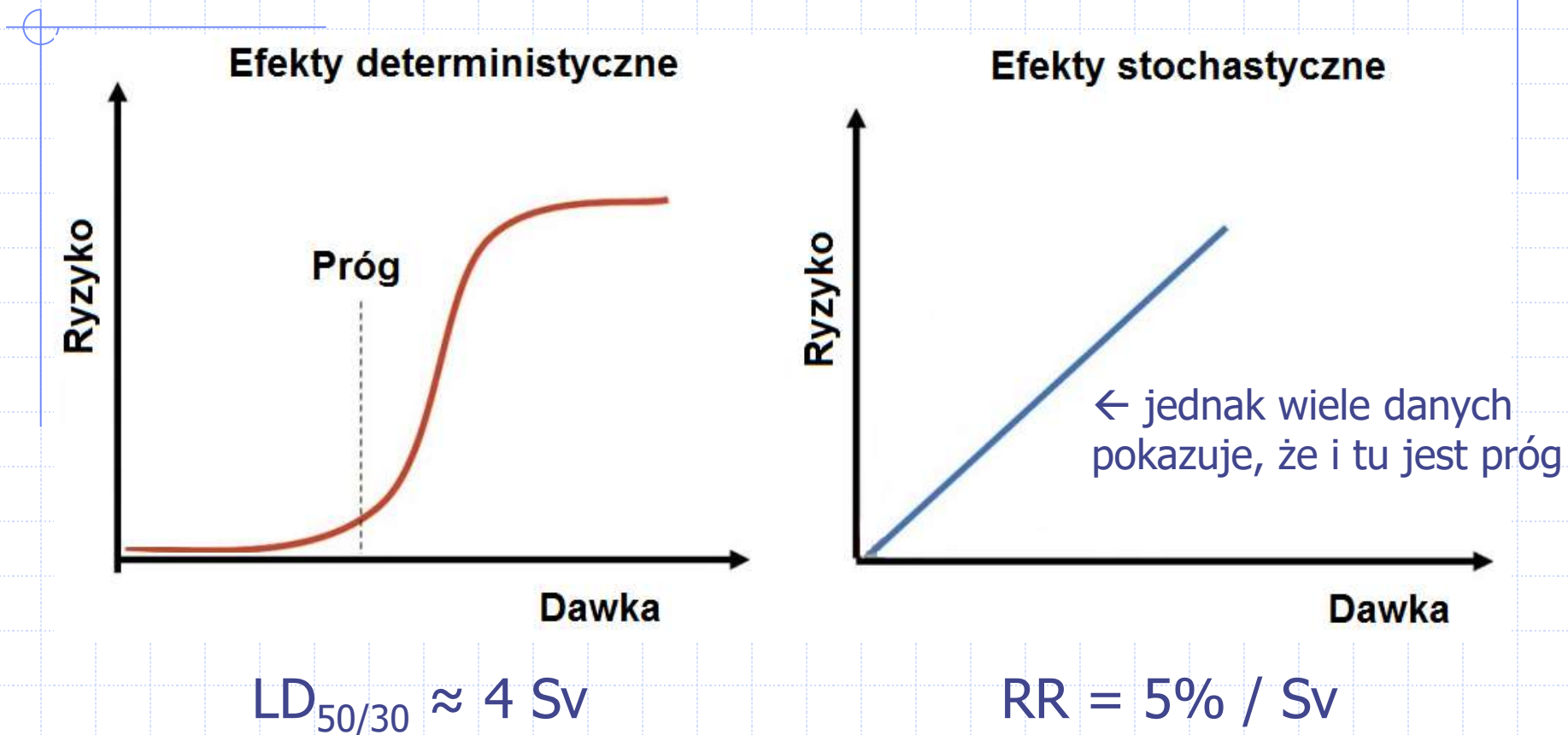
Przykładowy rozkład Gaussa wraz z jego dystrybuantą (p-twem zakumulowanym)



# Współczynnik $LD_{50/30}$

- ◆ **Dawka letalna  $LD_{50/30}$**  (*lethal dose*) określa jednorazową dawkę, przy której 50% osobników danego gatunku (populacji) umiera z przyczyn deterministycznych po 30 dniach od napromienienia, bez podjęcia leczenia
- ◆ Innymi słowy:  **$LD_{50}$  określa dawkę letalną (nie to samo co śmiertelna)**
- ◆ Dla człowieka współczynnik ten wynosi od **2,5 do 6 Sv** [siwertów], ale średnio **3,5 - 4 Sv**

# Postulaty ochrony radiologicznej



czyli dla 4 Sv mamy 50% ryzyko śmierci po 30 dniach  
oraz 20% wzrost ryzyka wystąpienia nowotworu za 10 lat

# LD<sub>50/x</sub> dla innych gatunków

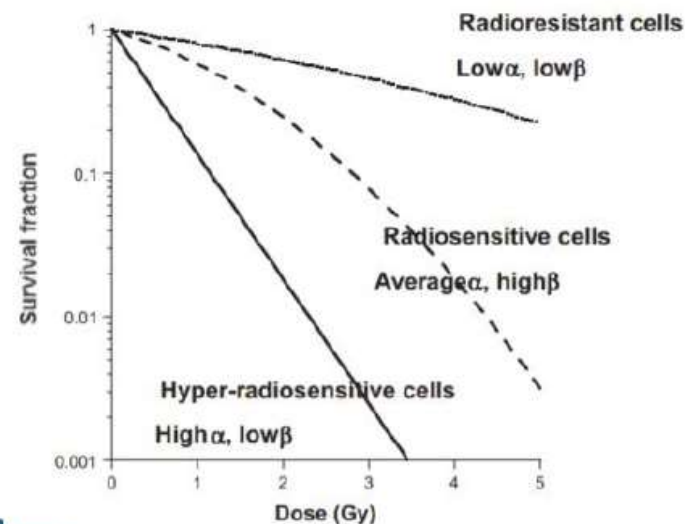
|                      |              |
|----------------------|--------------|
| Pantofelek           | ok. 3000 Gy  |
| Osa                  | ok. 3000 Gy  |
| Muszka owocowa       | ok. 1000 Gy  |
| Karaluch             | 100 Gy       |
| Łosoś                | 15 Gy        |
| Szczur laboratoryjny | 6 – 8 Gy     |
| Świnia               | 2,7 – 4,0 Gy |

Uwaga 1: zazwyczaj im organizm prostszy, tym ma wyższe LD<sub>50</sub>

Uwaga 2: jednostka Sv (siwert) odnosi się tylko dla człowieka

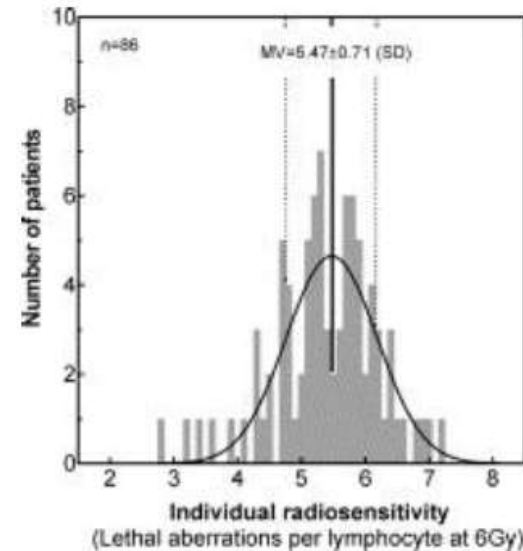
# Radiowrażliwość osobnicza

- ▶ Badania na komórkach wykazały dużą zmienność między pacjentami pod względem wrażliwości na promieniowanie.
- ▶ Opisywana przez rozkład normalny
- ▶ Podział populacji na 3:



L. Bodgi et al. / Journal of Theoretical Biology 394 (2016) 93–101

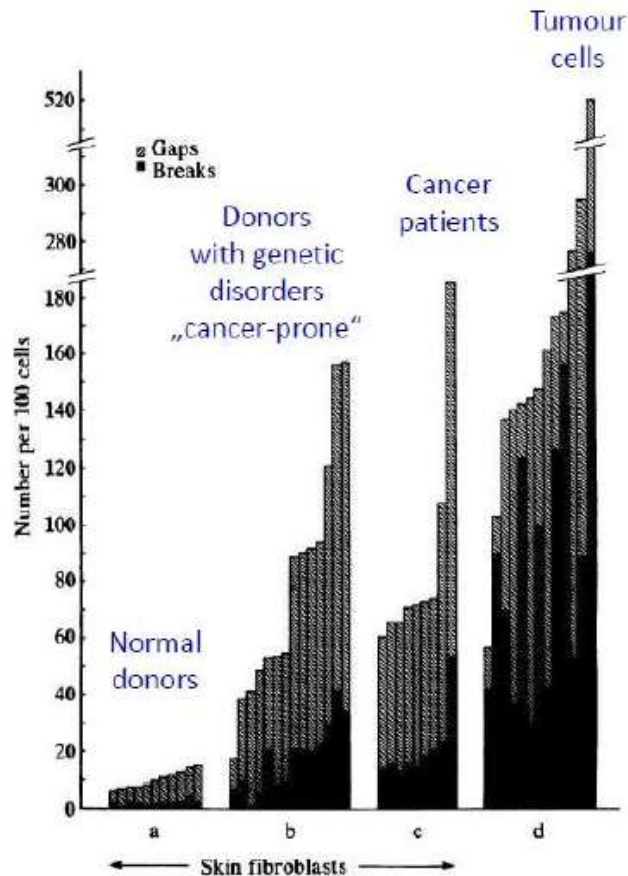
- wysoka wrażliwość
- średnia reakcja
- wysoka oporność



Ulrike Hoeller, Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer, Radiotherapy and Oncology, 2003.00

wiek, płeć, środowisko, dieta, aktywność fizyczna, czynniki genetyczne

# Indywidualna radiowrażliwość



Chromosomal radiosensitivity during the  $G_2$  cell-cycle period of skin fibroblasts from individuals with familial cancer

(chromatid gaps and breaks/cell-cycle-related radiosensitivity)

RAM PARSHAD\*, KATHERINE K. SANFORD†‡, AND GARY M. JONES\*

Różnice w ilości uszkodzeń chromosomów w populacji:

1. zdrowej

2. obciążonej predyspozycjami genetycznymi

3. pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową

– zdrowych komórek

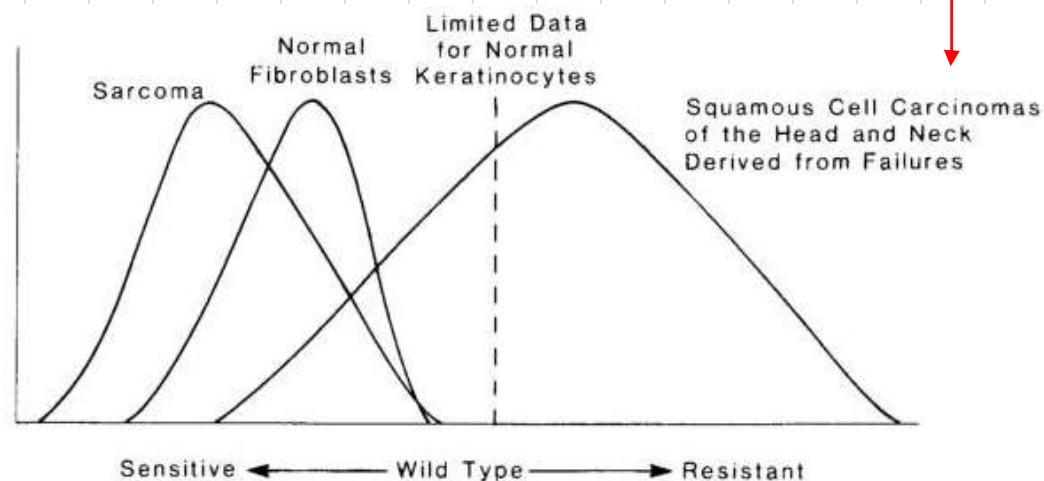
– komórek nowotworowych

# Promieniowrażliwość

## ◆ Oznacza to, że:

- Komórki nowotworowe są zazwyczaj dużo bardziej promieniowrażliwe niż komórki zdrowe (fakt wykorzystywany w radioterapii) – ale są wyjątki!
- Osoby chore (onkologicznie) lub genetycznie obciążeni (np. mutacje BRCA) są bardziej promieniowrażliwi – upośledzone mechanizmy naprawy DNA
- Promieniowrażliwość może się zmienić wraz z czasem

- Różne typy komórek i tkanek posiadają różną promieniowrażliwość i promieniopodatność!



# Radiowrażliwość tkanek

Ośłonięcie lub napromienienie narządów krytycznych ma zasadnicze znaczenie dla zwiększenia lub zmniejszenia szansy przeżycia napromieniowanego osobnika.

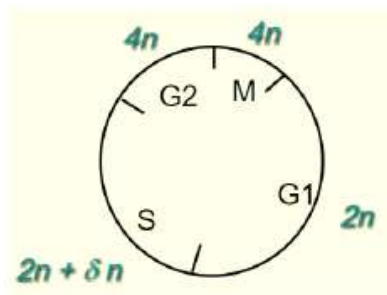
pojęcie narządu krytycznego:

to taki narząd, **który jest istotny dla funkcjonowania organizmu i jest najbardziej uszkodzany przez dany rodzaj promieniowania w danych warunkach napromieniowania.**

Np. dla promieniowania X i gamma narządami krytycznymi są szpik, gonady i soczewka oka, dla izotopu jodu – tarczycza, a dla przyjętych doustnie izotopów alfa-promieniotwórczych – śluzówka jelit.

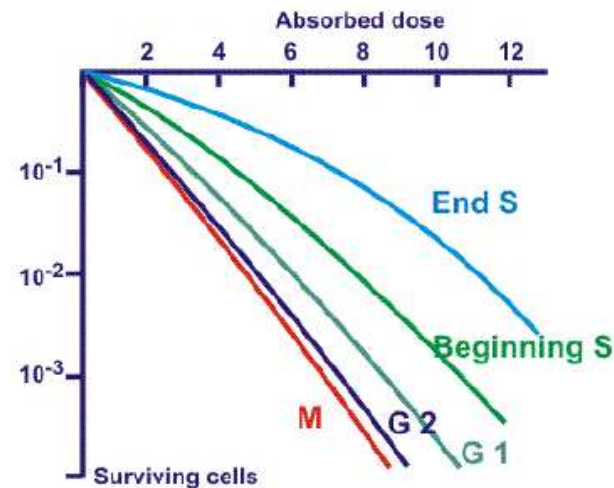
# Radiowrażliwość komórkowa

## 1. Cykl komórkowy



## 2. Typ komórki

*„Tkanki wydają się bardziej wrażliwe na promieniowanie, jeżeli ich komórki są mniej zróżnicowane, mają większy potencjał proliferacyjny i szybciej się dzielą”*



## 3. Kinetyka procesów naprawczych DNA

# Zasada Bergonié-Tribondeau (1903)

◆ **Najbardziej wrażliwe na promieniowanie są komórki szybko dzielące się (proliferujące) oraz nisko zróżnicowane (niewyspecjalizowane)**

◆ Przykłady: szpik kostny, gonady, komórki nabłonkowe, komórki macierzyste

# Komórki bardzo promieniowrażliwe

- ◆ Komórki różnicujące się (prekursorowe, aktywnie proliferujące):
  - Spermatocyty
  - Komórki prekursorowe erytrocytów, limfocytów, granulocytów
  - Komórki warstw pośrednich nabłonka i naskórka

# Komórki promieniowrażliwe

## ◆ Komórki macierzyste:

- Spermatogonie
- Komórki macierzyste szpiku kostnego
- Komórki krypt jelitowych
- Komórki warstwy podstawnej naskórka

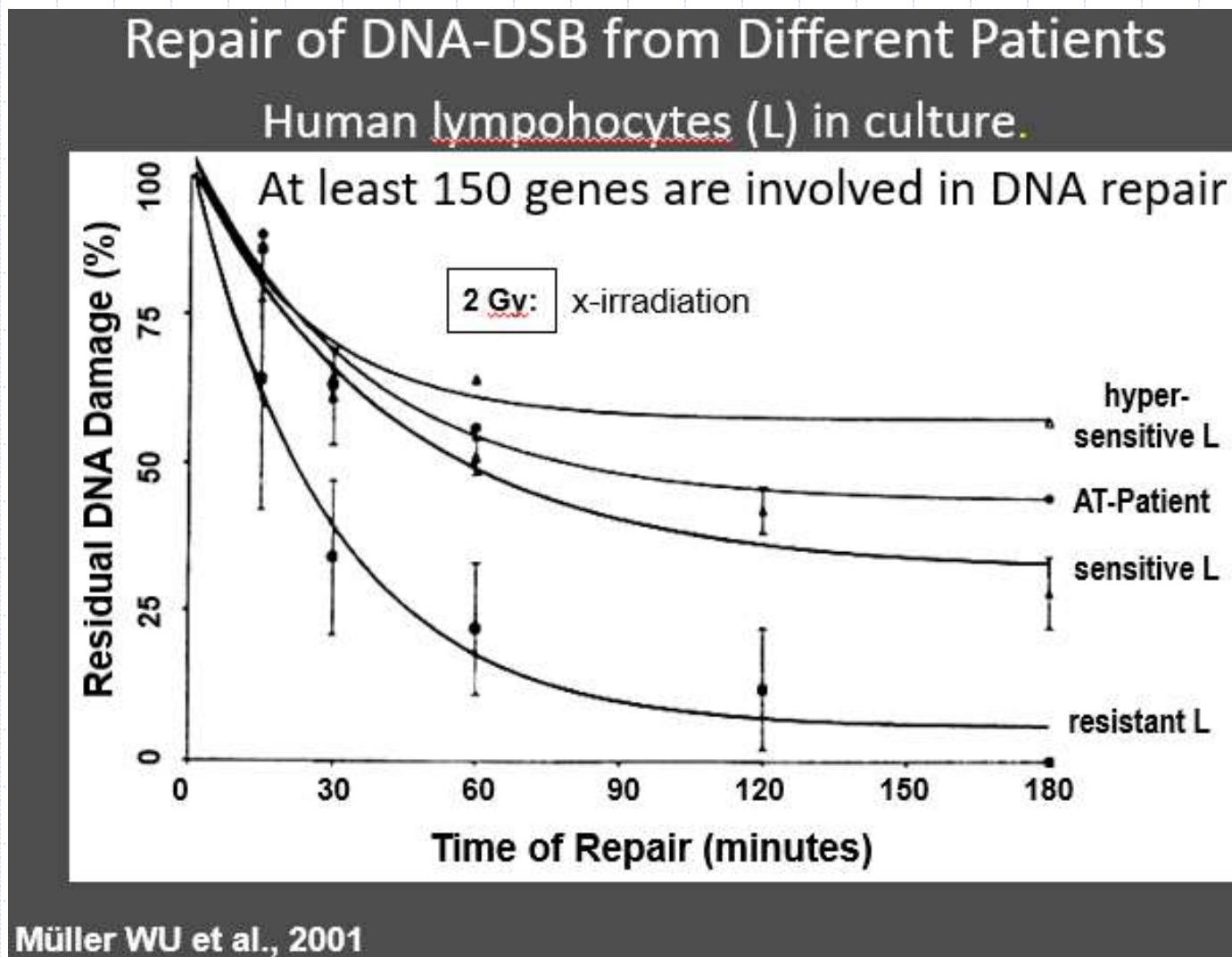
# Komórki średniopromieniowrażliwe

- ◆ Naczynia krwionośne
- ◆ Narządy mięszowe (nerki, wątroba, etc.)
- ◆ Tkanki łączne
- ◆ Mięśnie
- ◆ Płuca

# Komórki słabo promieniowrażliwe

- ◆ Komórki nerwowe
- ◆ Krew obwodowa
- ◆ Komórki powierzchni nabłonka i naskórka
- ◆ Kości

Do jakiego poziomu można naprawić uszkodzenia popromienne dla różnych poziomów promieniowrażliwości?

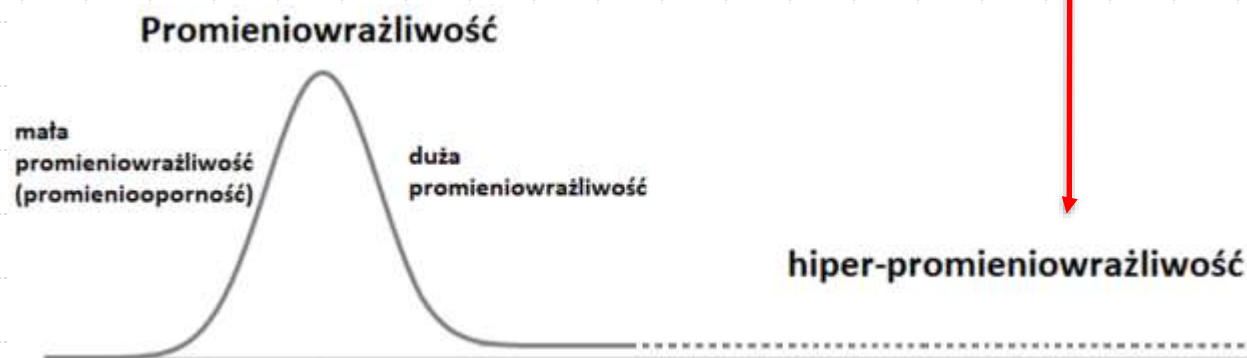


↑  
Radiosensitivity

Są to tzw.  
funkcje  
Bodgi'ego

# Promieniowrażliwość a zdolność do naprawy DNA

- ◆ Komórki promieniowrażliwe wykazują więc mniejsze prawdopodobieństwo skutecznej naprawy DNA, co skutkuje albo śmiercią komórki (skutek deterministyczny) albo zwiększeniem częstości mutacji → nowotworzenie (skutek stochastyczny)
- ◆ Kluczowe jest więc określenie osób (pacjentów) bardzo promieniowrażliwych, co do których istnieje przeciwwskazanie do np. radioterapii → hiper-promieniowrażliwość

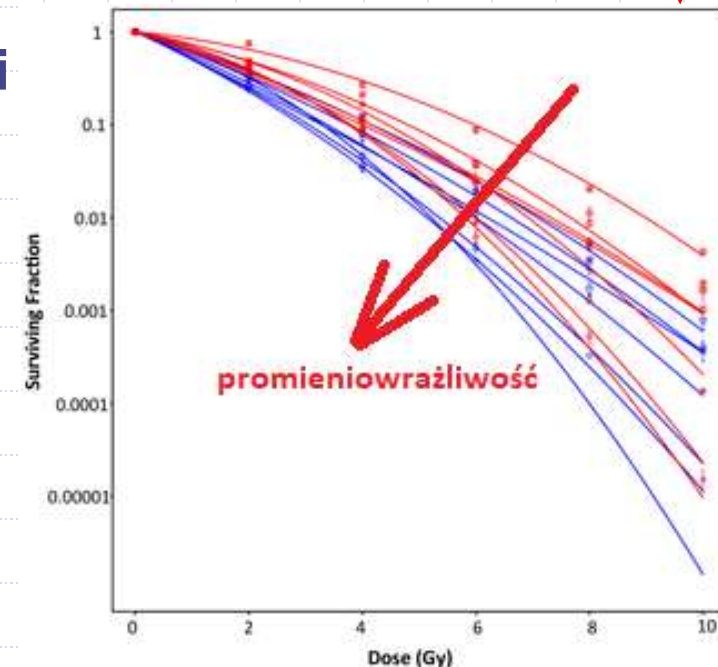
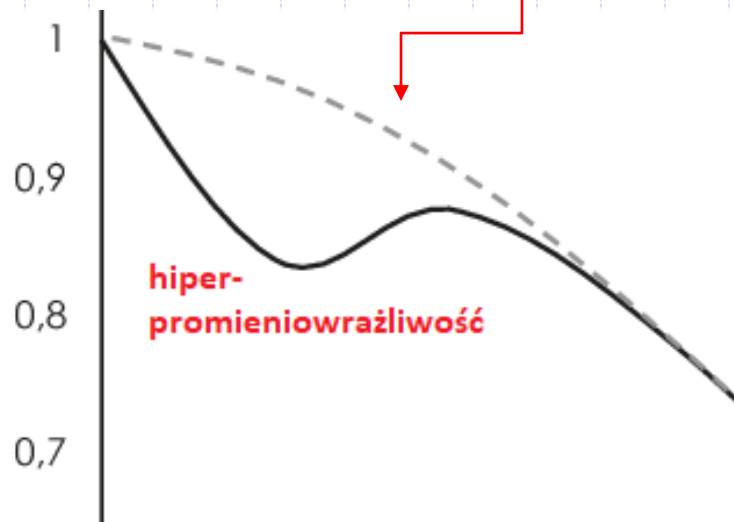




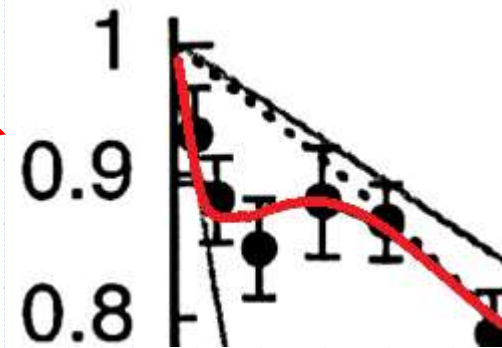
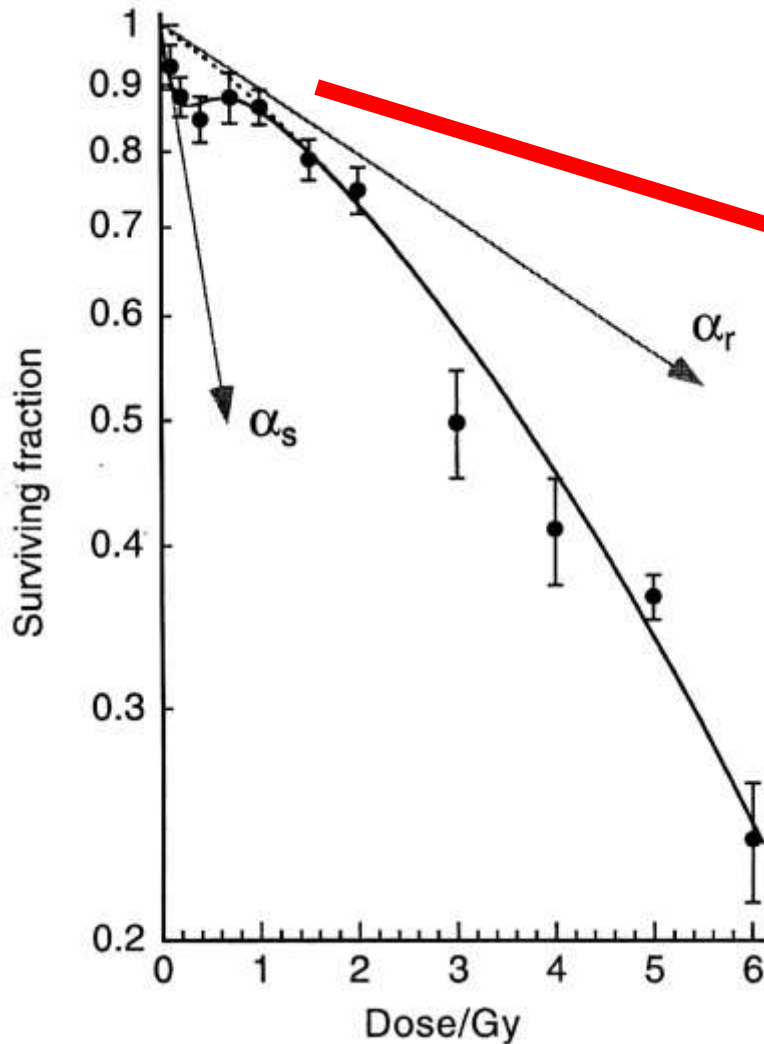
# **HIPER- PROMIENIOWRAŻLIWOŚĆ (HYPER-RADIOSENSITIVITY)**

# Hiper-promieniowrażliwość

- ◆ standardowa promieniowrażliwość jest opisywana krzywą Gaussa a krzywe przeżywalności zmieniają swoje nachylenie, zasadniczo dla całego przedziału dawek, ale im dawka większa, tym efekt silniejszy
- ◆ Jednakże w pewnych sytuacjach, dla wąskiego przedziału dawek (głównie dla dawek niskich) może pojawić się tzw. hiper-promieniowrażliwość, co objawia się **złamaniem krzywej przeżywalności**

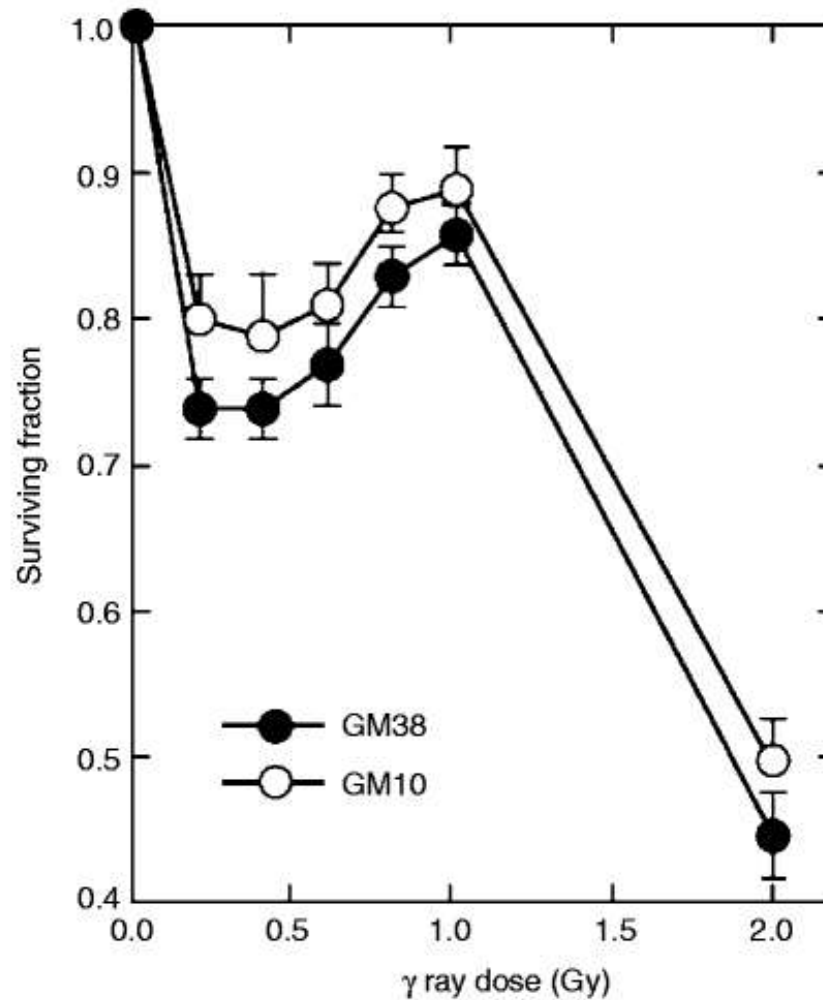


# Hiper-promieniowrażliwość



modyfikacja  
krzywej  
przeżywalności  
komórkowej

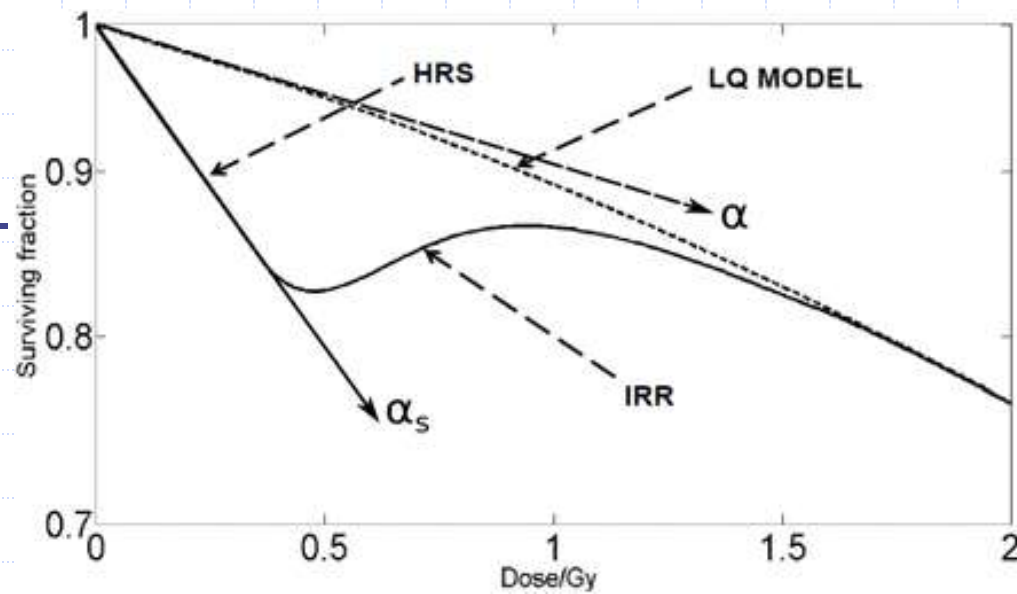
# Lokalne maksimum



# Hiper-promieniowrażliwość (hyper-radiosensitivity, HRS)

- ◆ Okazuje się, że u niektórych osób obserwuje się mieszany efekt bardzo dużej nadwrażliwości na małe dawki promieniowania jonizującego (HRS, ang. *Low-Dose Hyper-Radiosensitivity*) z efektem zwiększonej oporności (IRR, ang. *Increased Radioresistance*) na dawki nieznacznie większe, powyżej 300 mGy.

Odpowiedź ta obserwowana jest zazwyczaj u pacjentów leczonych na choroby nowotworowe, których system immunologiczny jest modulowany przez różne czynniki



# HRS – Definicja

HRS/IRR – wzrost wrażliwości (śmiertelności) komórek napromienianych małymi dawkami promieniowania poprzedzający efekt zwiększonej oporności na promieniowanie (radiooporności).

**Efekt występuje po jednorazowym napromienianiu – w przedziałach dawek:**

**HRS: 0–300 mGy**

**IRR: 300–600 mGy**

SSB



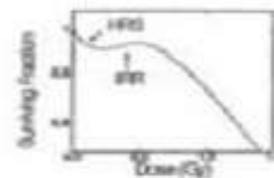
DSB



zatrzymanie cyklu  
komórkowego



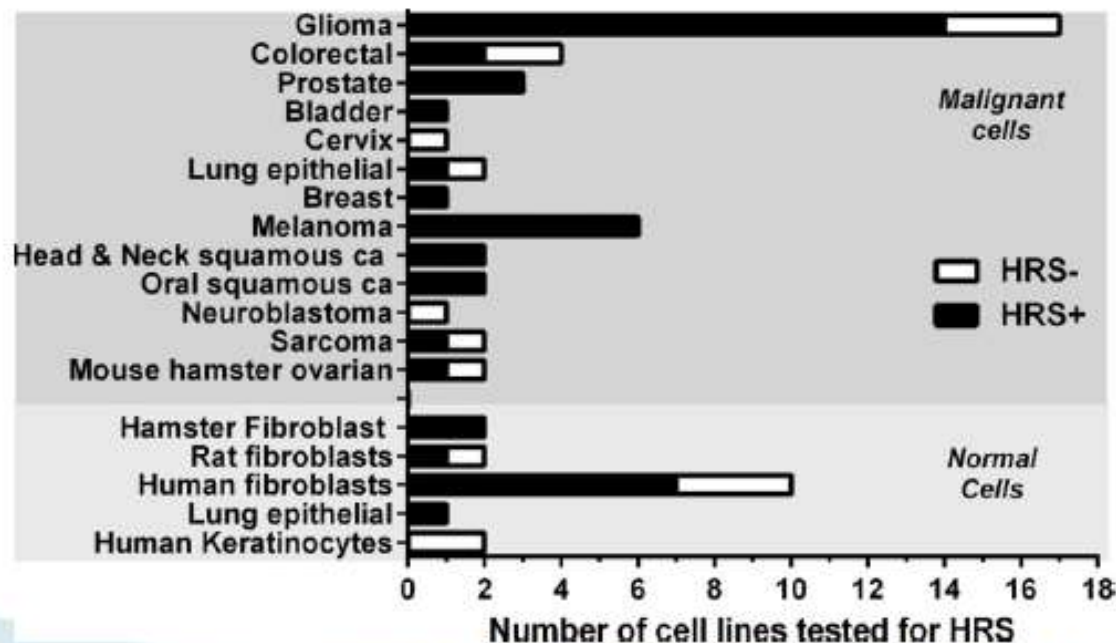
HRS



Wyjaśnienie efektu jest oparte o próg dawki na aktywację procesów naprawczych.

# HRS – obecny stan wiedzy

- ▶ Istnieje szereg publikacji sugerujących występowanie HRS( Joiner 2001, Marples 2008, Krueger 2010, Słonina 2016).
- ▶ W badaniach in vitro HRS wykazano na około 75% z 50 linii komórkowych (głównie komórek nowotworowych)
- ▶ U zdrowych dawców efekt występuje głównie w komórkach skóry (Martin 2014).



*Martin et al. Cancer Letters (2014) 349, 98–106*

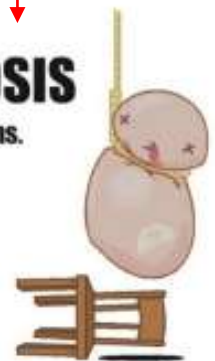
# HRS – zależność od fazy cyklu komórkowego



- ▶ Punkty kontrolne cyklu komórkowego są mechanizmami nadzoru.
- ▶ Zatrzymanie zostaje zwolnione dopiero po zakończeniu naprawy.
- ▶ Jeżeli naprawa nie jest możliwa, uszkodzone komórki są usuwane przez zaprogramowaną śmierć komórki.

- wczesny punkt kontrolny G2/M zatrzymuje progresję komórek napromieniowanych G2, późny G2/M – które były napromieniane we wcześniejszych fazach cyklu komórkowego
- niepowodzenie aktywacji wczesnego punktu kontrolnego G2/M koreluje z nadwrażliwością na promieniowanie o niskiej dawce.

**APOPTOSIS**  
Know the signs.



# Krzywe przeżywalności dla HRS - Model Joiner'a

- ◆ Występowanie hiper-radiowrażliwości (HRS) oznacza znaczną modyfikację krzywej przeżywalności komórkowej – powoduje to, że większość istniejących modeli nie sprawdza się
- ◆ W związku z tym modyfikuje się istniejący model liniowo-kwadratowy (LQ) wprowadzając dodatkowe parametry
- ◆ Jednym z modeli jest model Guirado'a, gdzie wartość  $D_q$  jest dobierana z pewnego rozkładu
- ◆ Dużo częściej stosuje się jednak **model Joiner'a, zwany Modelem Indukowanej Naprawy (Induced Repair)**

# Model Joiner'a

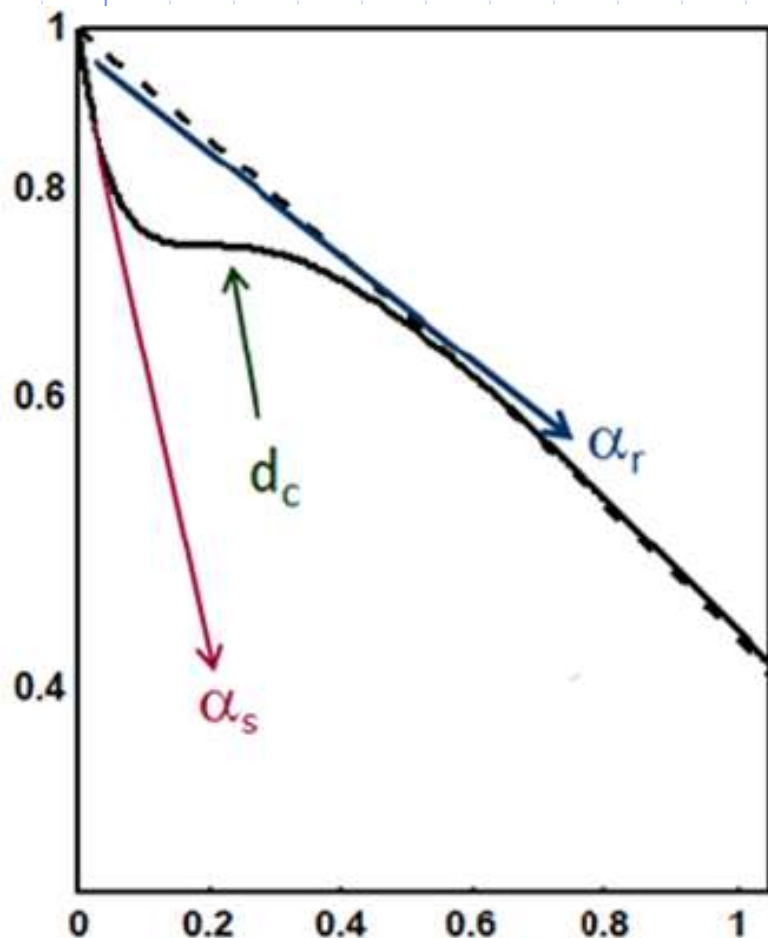
- ◆ Złamaną krzywą przeżywalności dla HRS nazywa się czasami krzywą Joinera
- ◆ Wychodzimy od wykładnika dla modelu LQ:

$$Y = \alpha d + \beta d^2$$

- ◆ W modelu Joiner'a wykładnik musi uwzględniać różne współczynniki nachylenia alfa w zależności od dawki oraz dawkę progową  $d_c$ :

$$Y = \alpha_r \left[ 1 + (\alpha_s / \alpha_r - 1) e^{-\frac{d}{d_c}} \right] d + \beta d^2$$

# Model Joiner'a



$\alpha_r$  - nachylenie - duże dawki

$\alpha_s$  - nachylenie - małe dawki

$d$  - dawka

$d_c$  - próg dla efektu

Parametry modelu

- $\alpha_s/\alpha_r > 1$

- $d_c > 0$

modyfikacja w modelu liniowo-kwadratowym parametru alfa:

$$\alpha(D, D_c) = \alpha_r + (\alpha_s - \alpha_r) \exp\left(-\frac{D}{D_c}\right)$$

$$S(D) = e^{-\alpha_r D - (\alpha_s - \alpha_r) e^{\frac{-D}{D_c}} \times D - \beta D^2}$$

Frację przeżywalności można przedstawić jako:

$$SF = e^{-(\alpha_s - \alpha_r)de^{-d/d_c}} e^{-\alpha_r d - \beta d^2} \quad (4.5)$$

Biorąc pod uwagę, że typowy kształt krzywej Gompertza ma postać:

$$f(x) = e^{-a e^{-\beta x}} \quad (4.6)$$

można zauważyć, że typową modyfikacją w modelu Indukowanej Naprawy wprowadza mnożnik do przeżywalności w modelu liniowo-kwadratowym (r-nie (4.2)) w postaci funkcji Gompertza oraz dawki  $d$  (jak w przypadku wykładnika gompertzowskiego). Część gompertzowska opisuje zapewne tworzenie uszkodzeń, które jeszcze nie wywołują reakcji naprawczych organizmu, który włącza się dopiero po przekroczeniu pewnej liczby uszkodzeń komórkowych (Leblanc i in., 2019). Oznacza to, że przy małych dawkach będziemy obserwowali wzrost uszkodzeń, a następnie ich stopniowe zmniejszanie po przekroczeniu pewnej dawki. Wartość funkcji Gompertza  $f(d)$  jest mniejsza od jedności, dawka w wykładniku związana jest z wygaszaniem efektu w momencie, gdy funkcja Joinera osiąga wartości bliskie  $d_c$ . Wykładnik  $d$  wskazuje na gaszenie ciągłego wzrostu uszkodzeń przez odpowiedź adaptacyjną. To gaszenie jest przy bardzo małych dawkach niewielkie, a w pobliżu  $d_c$  staje się istotne.

# Wyjaśnienie HRS

Istnieje kilka hipotez, które wyjaśniają oba zjawiska (HRS, IRR) i ich wzajemną relację (Marples 2004, 2008, Martin 2014). Najczęściej pojawiający się w literaturze opis mechanizmu HRS dotyczy braku aktywacji wczesnego punktu kontrolnego fazy  $G_2$  cyklu komórkowego (Słonina i in. 2017), zależnego od koncentracji kinazy białkowej ATM (ang. *Ataxia Teleangiectasia Mutated*). W normalnych warunkach procesy aktywne w czasie bloku cyklu komórkowego, we wczesnym punkcie kontrolnym, zapobiegają przejściu uszkodzonych komórek w fazę podziału. W komórkach HRS-pozytywnych zakłada się, że istnieje pewien próg dawki na aktywację tego punktu kontrolnego (Kruger 2007, Przybyszewski 2008, Fernet 2010, Słonina 2017), a wartość dawki progowej – aktywacji punktu naprawy  $G_2/M$  – zależy od ilości indukowanych podwójnych uszkodzeń nici DNA (DSB), których liczba szacowana jest na 10 – 20 (Lobrich i in., 2007, Piotrowski i in., 2017).

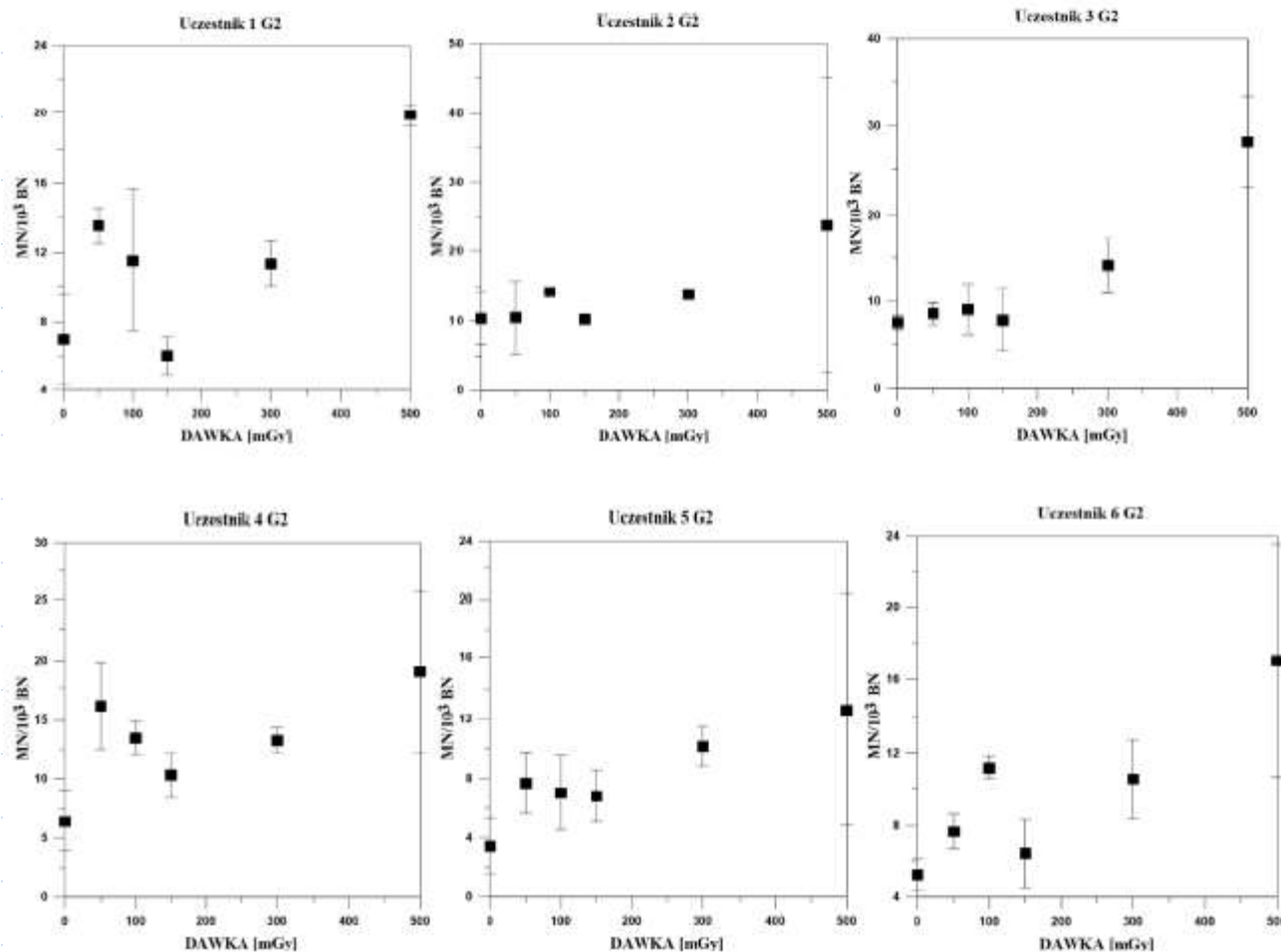
Fragment pracy  
doktorskiej dr  
J. Reszczyńskiej

Efekt nadwrażliwości obserwowany jest dla komórek napromienianych jedynie w fazie  $G_2$  cyklu komórkowego, dla różnych typów komórek (keratynocyty, fibroblasty, limfocyty) oraz różnych typów promieniowania (promieniowanie X, gamma, neutrony). Zjawisko HRS/IRR obserwowane jest głównie w komórkach linii nowotworowych lub wyselekcjonowanych, zdrowych tkanek pochodzących od pacjentów leczonych onkologicznie, co wynika z wiodącego zastosowania tych badań w celach poprawy jakości radioterapii (Martin i in., 2014). Od dawna wiadomo, że jednym z czynników decydujących o radiowrażliwości komórek jest cykl komórkowy (Sinclair, Morton 1965).

# Przykładowe badania HRS

W 2017 roku wykonano badania na 6-ciu zdrowych ochotnikach w NCBJ (we współpracy z IChTJ) w kontekście HRS

HRS jest powszechniejsze niż się wydaje!

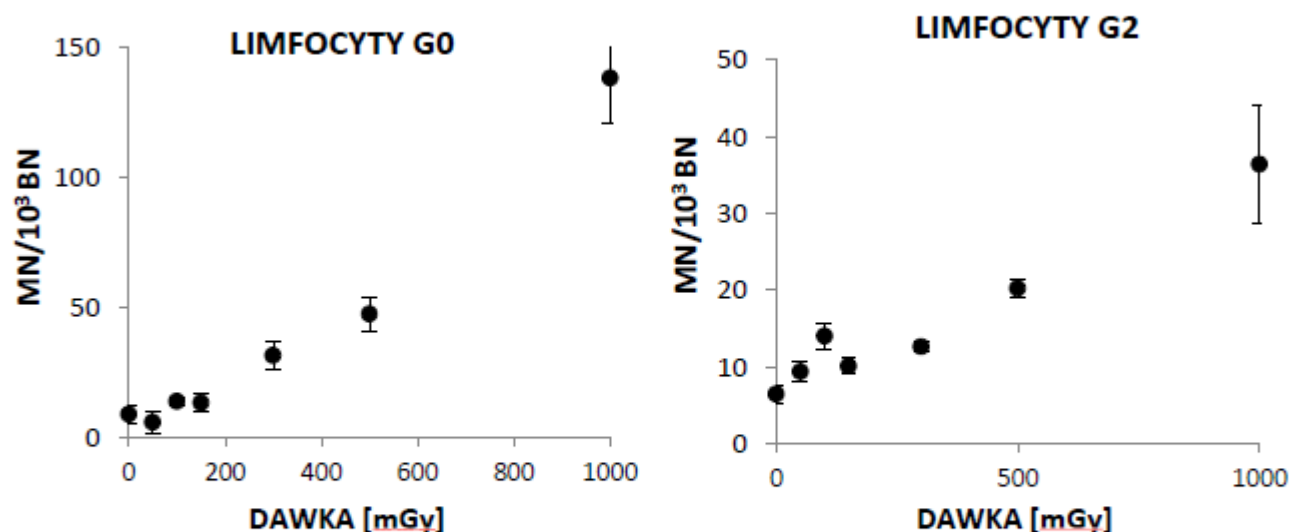


Rysunek 4.11 (wykres 1-6) Zakres wartości dawki pochłoniętej poniżej 500 mGy. Zależność częstości powstawania mikrojader w komórkach dwujądrzastych od dawki pochłoniętej dla limfocytów krwi obwodowej, w fazie G2 (dla poszczególnych uczestników badania). Na wykresie uwzględniono wartości odchylenia standardowego analizowanych preparatów.

# Przykładowe badania HRS

Jednakże efekt widoczny jedynie w fazie G<sub>2</sub> – poniżej dane zbiorcze dla fazy G<sub>0</sub> i G<sub>2</sub>

pokazuje jednoznaczny trend – w fazie G<sub>0</sub>, poniżej 100 mSv – lekki dołek hormetyczny, w fazie G<sub>2</sub> – niewielki efekt nadwrażliwości.



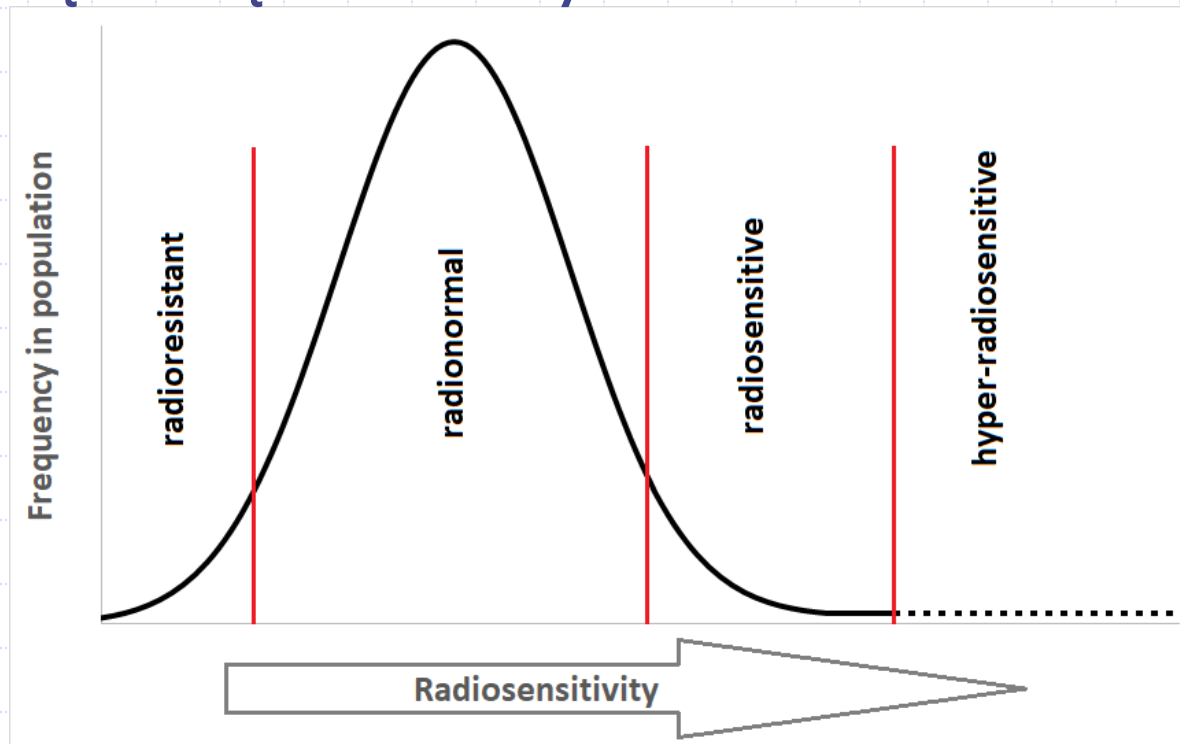
Rysunek 4.15: Zależność częstości powstawania mikrojąder w komórkach dwujądrowych od dawki pochłoniętej dla limfocytów krwi obwodowej (średnia ważona wzgl. liczby analizowanych komórek BN) dla wszystkich osób. Na wykresie uwzględniono wartości odchylenia standardowego analizowanych preparatów. Kształt zależności w obszarze dawek poniżej 1000 mGy. Faza G<sub>0</sub> (lewa strona) i Faza G<sub>2</sub> (po prawej stronie).



# **KLASYFIKACJE POZIOMÓW PROMIENIOWRAŻLIWOŚCI**

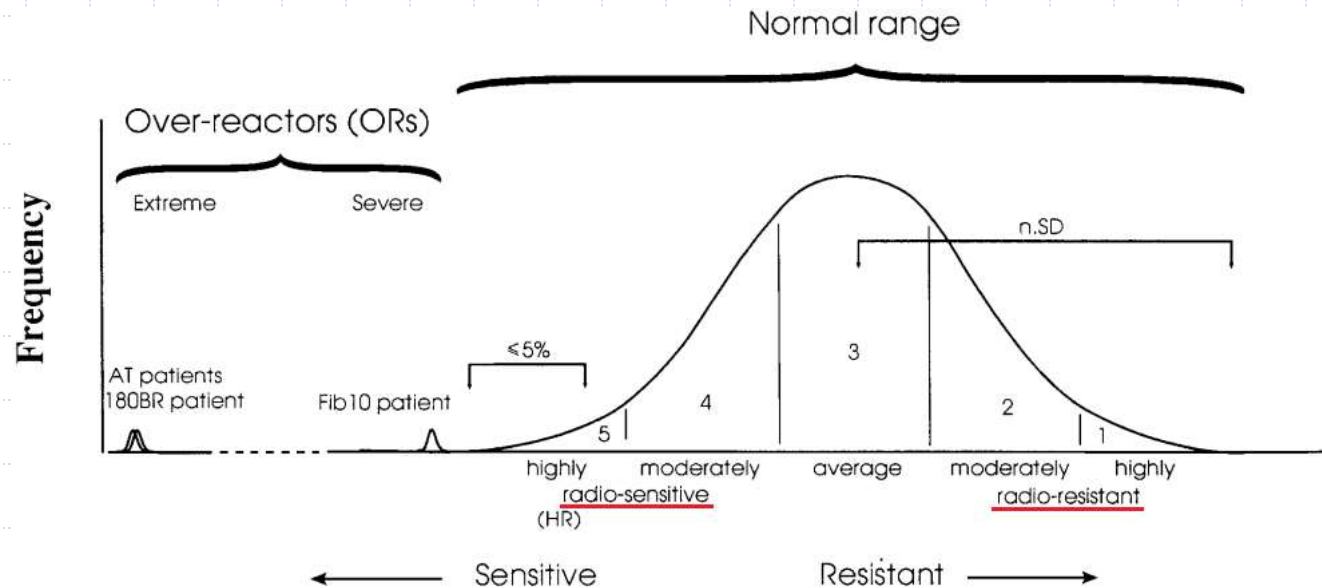
# Kto jest promieniowrażliwy?

- ◆ Kryterium promieniowrażliwości jest najczęściej umowne i wieloaspektowe (tkanki, organizm)
- ◆ Decydują wartości parametrów znacząco różniące się od reszty



# Promieniowrażliwość dla populacji ludzkiej

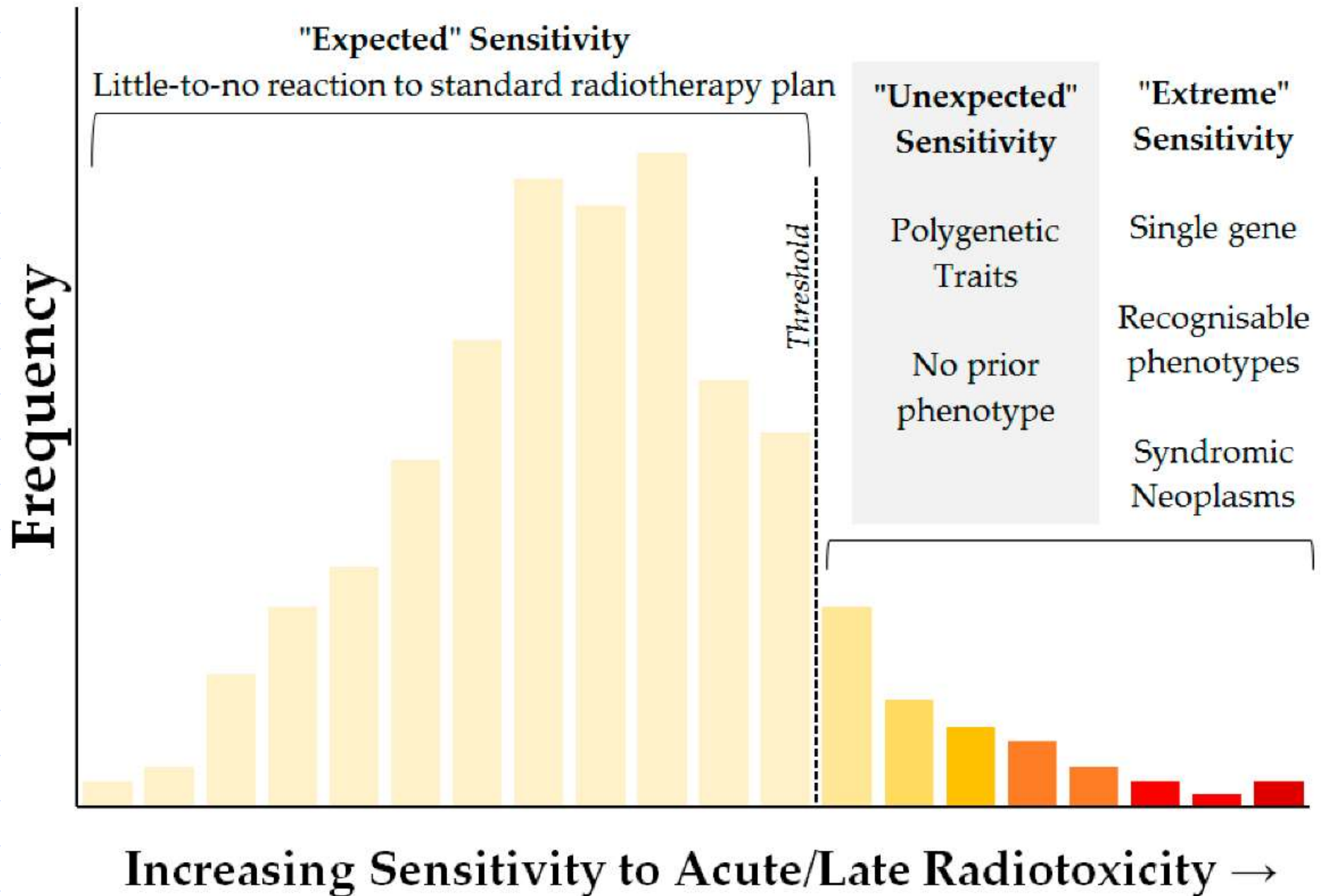
- ◆ Poziom promieniowrażliwości bada się na różne sposoby
- ◆ Najczęściej badani są pacjenci onkologiczni aby sprawdzić, czy istnieje dodatkowe ryzyko związane z radioterapią



**Idealised normal tissue response - relative scale**

**FIGURE 4** – Schematic representation of the frequency distribution of normal tissue responses amongst patients which would result from identical radiotherapeutic treatment, based on a perfect theoretical end point without threshold or saturation. The proposed nomenclature for the different categories of tissue effect is shown on an arbitrary scale. There is a range of reactions seen amongst normal patients, including some which are greater than average. On the basis that this range is the result of differences in normal tissue sensitivity, patients in category 5 could be designated “highly radiosensitive” (HR). They must be distinguished from patients with excessively sensitive normal tissues, so-called ORs, though such patients are exceedingly rare. See text for further details.

# Radiosensitivity Spectrum for Radiotherapy Dose

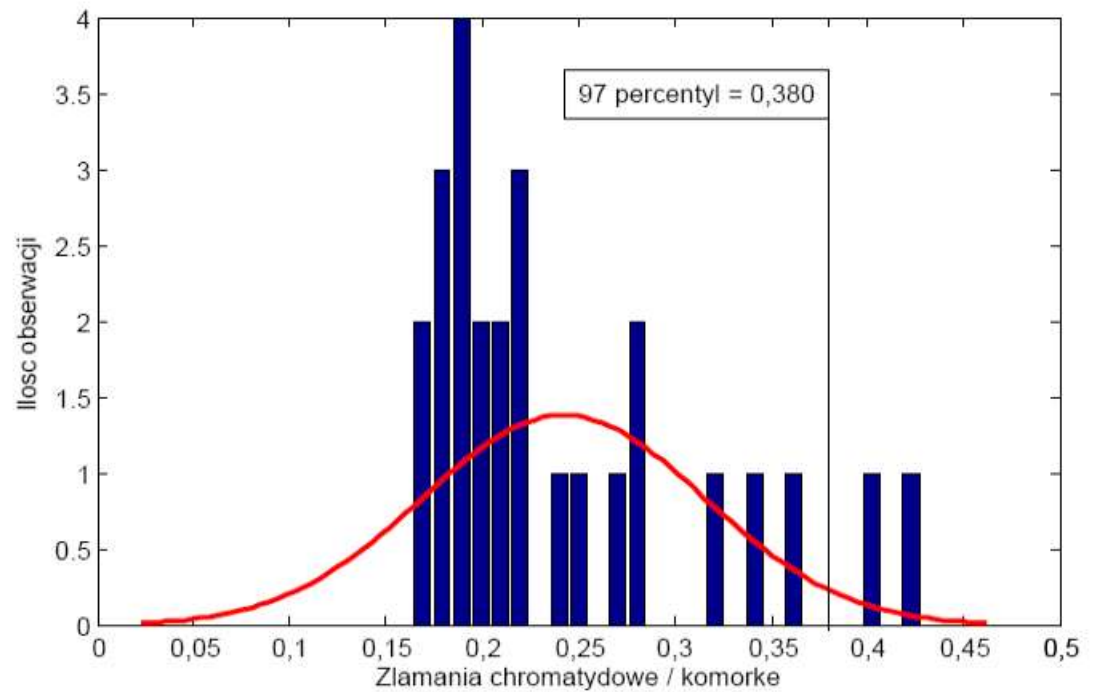


# Przykład z rodzimego podwórka: promieniowrażliwość badana w CLOR

Badanie zróżnicowania osobniczej podatności  
na indukcję radiacyjnych złamań  
chromatydowych w chromosomach limfocytów  
krwi obwodowej osób zawodowo narażonych  
na promieniowanie jonizujące

dr Maria Kowalska<sup>1</sup>, mgr Monika Szymańska<sup>2</sup>,  
mgr Kamil Szewczak<sup>3</sup>

**Rysunek 2. Aproksymacja normalnym rozkładem prawdopodobieństwa wyników  
oznaczeń częstości indukowanych złamań chromatydowych w LKO dwudziestu  
sześciu zdrowych pracowników**



# Metody wyznaczania promieniowrażliwości

- ◆ Model grecki – złamania chromatydowe przy napromienieniu limfocytów w fazie G2
- ◆ Alternatywnie: innego rodzaju aberracje

Radiotherapy and Oncology 101 (2011) 28–34



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Radiotherapy and Oncology

journal homepage: [www.thegreenjournal.com](http://www.thegreenjournal.com)



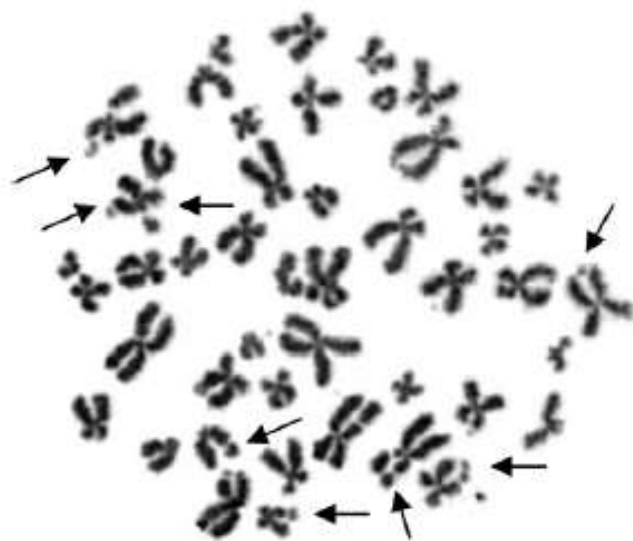
DNA damage

A standardized G2-assay for the prediction of individual radiosensitivity

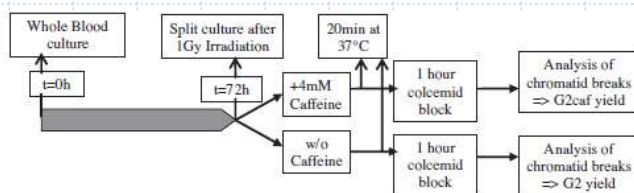
Gabriel E. Pantelias\*, Georgia I. Terzoudi

Laboratory of Radiobiology & Biodosimetry, National Center for Scientific Research "Demokritos", Athens, Greece

# Model grecki



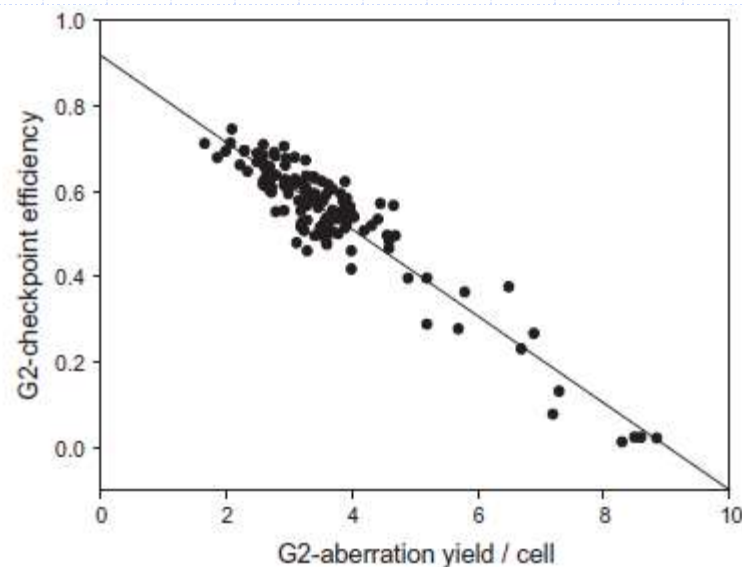
**Fig. 2.** A high yield of chromatid breaks is observed in highly condensed peripheral blood metaphase lymphocytes (pointed by arrows), despite the 4 h period allowed for repair following 1 Gy of  $\gamma$ -irradiation in G2 phase. The highly condensed appearance of chromosomes at 4 h post-irradiation time confirms that chromosomes were exposed to colcemid for long time and, therefore, such cells were not delayed by G2-checkpoint.



$$IRS = [1 - (G2caf - G2) / G2caf] \times 100\%$$

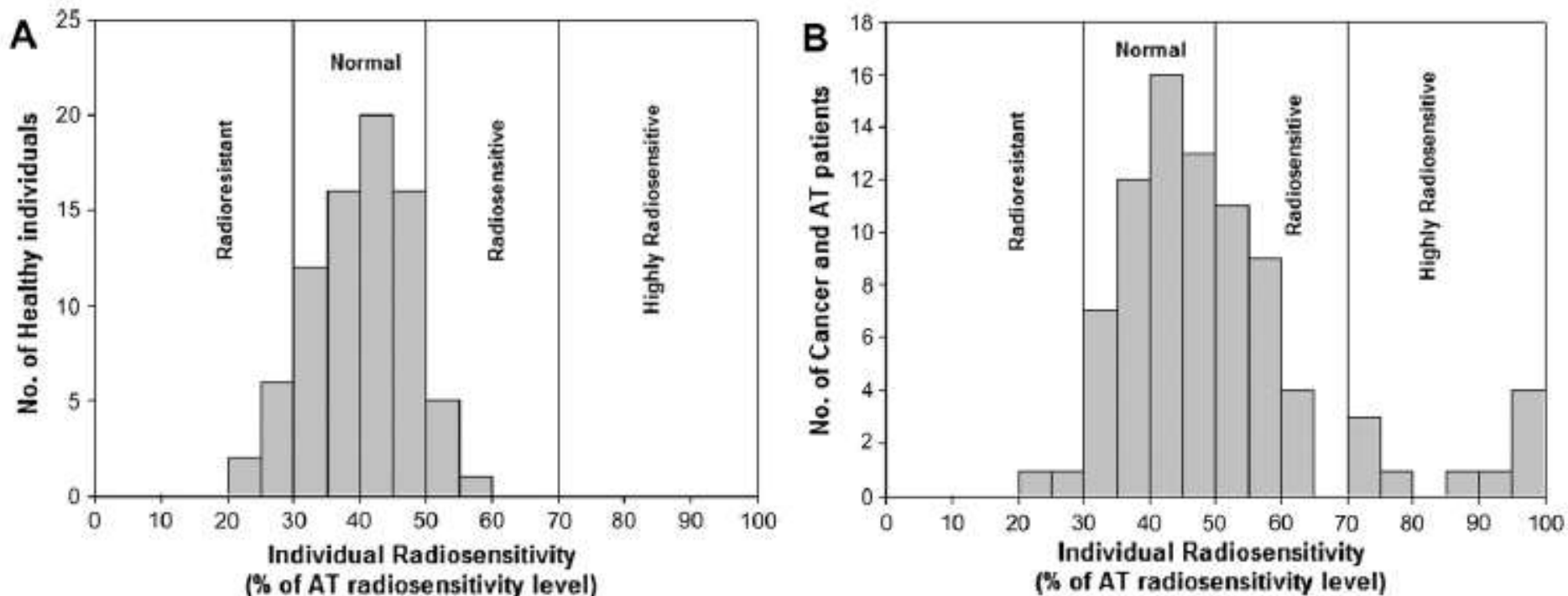
**Fig. 5.** Flow diagram of the proposed experimental methodology and detailed protocol to evaluate individual radiosensitivity (IRS) as a percentage of high radiosensitivity level of AT patients, simulated by caffeine induced G2-checkpoint abrogation.

Korelacja pomiędzy zdolnością naprawy uszkodzeń a ich wystąpieniem



**Fig. 4.** Correlation between the G2-checkpoint efficiency to prevent chromatid breakage and G2-aberration yield per cell, after 1 Gy  $\gamma$ -irradiation, for 125 blood donors with significant inter-individual radiosensitivity variation. G2-checkpoint efficiency is calculated by the ratio  $(G2caf - G2) / G2caf$ .

# Porównanie rozkładów promieniowrażliwości dla pacjentów (z prawej) oraz osób zdrowych



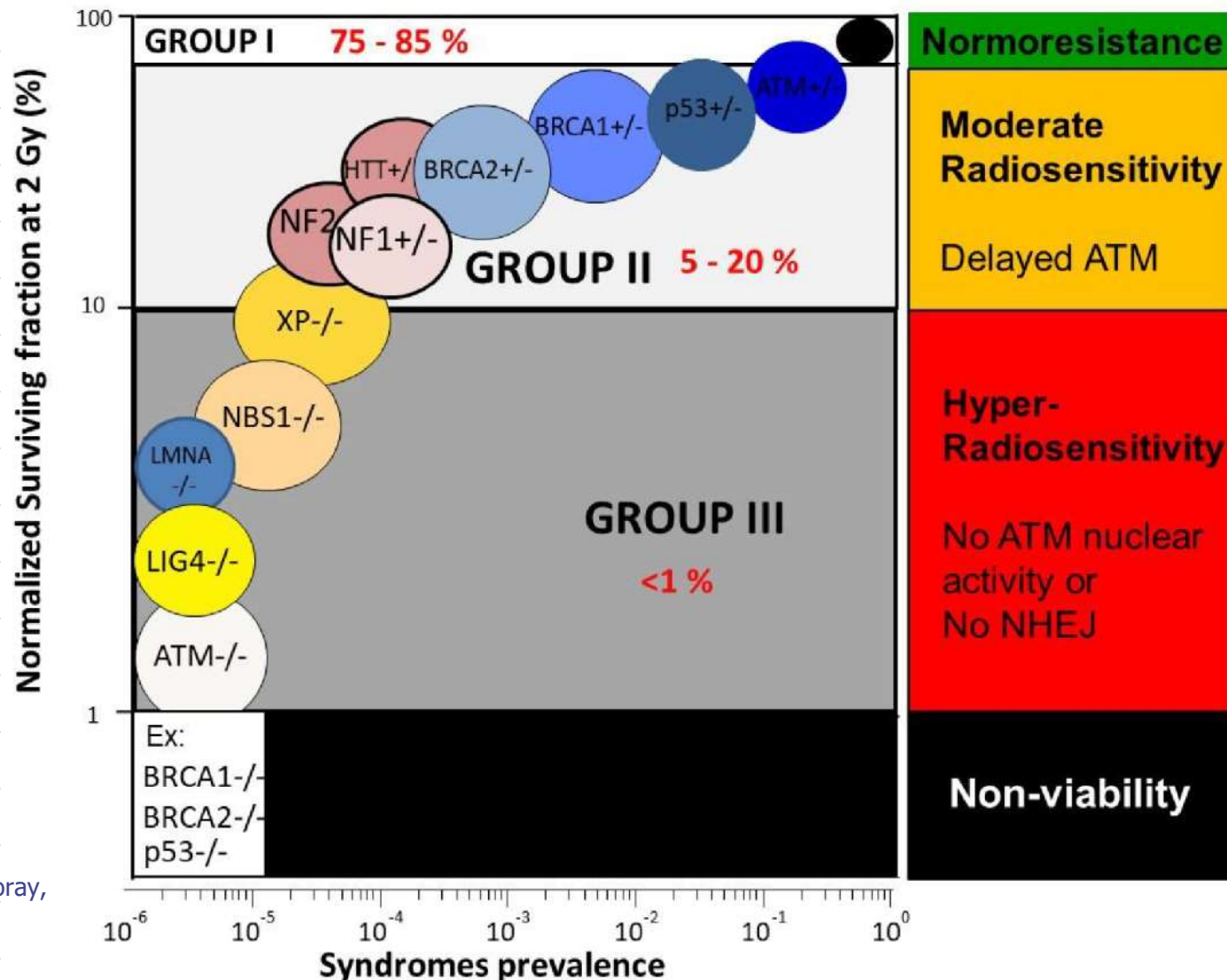
**Fig. 6.** G2-chromosomal radiosensitivity inter-individual variation analysis obtained with the standardized G2-assay. On the basis of the mean value (MV) and standard deviation ( $\pm$ SD) an individual can be classified as “radioresistant”, “radiosensitive”, or “normal” when  $IRS < MV - SD$ ,  $IRS > MV + SD$  or  $MV - SD \leq IRS \leq MV + SD$ , respectively. The IRS cut-off value, above which an individual is classified as highly radiosensitive, is set at  $IRS = MV + 3SD$ . (A) Inter-individual variation in radiosensitivity obtained for 78 healthy blood donors. (B) Inter-individual variation in radiosensitivity obtained for 78 cancer patients (72 tested before radiation therapy and 6 tested after they had experienced adverse radiation effects) and 6 AT patients. The AT patients were used as positive controls.

Ataxia Telangiectasia (AT) is a human disorder conferred by mutations in ATM [11]. The AT-cells have long been known to be defective in radiation-induced G2/M-phase checkpoint arrest [23] and, more recently, AT-cells have also been shown to display a DSB repair defect

# Aberracje a promieniowrażliwość

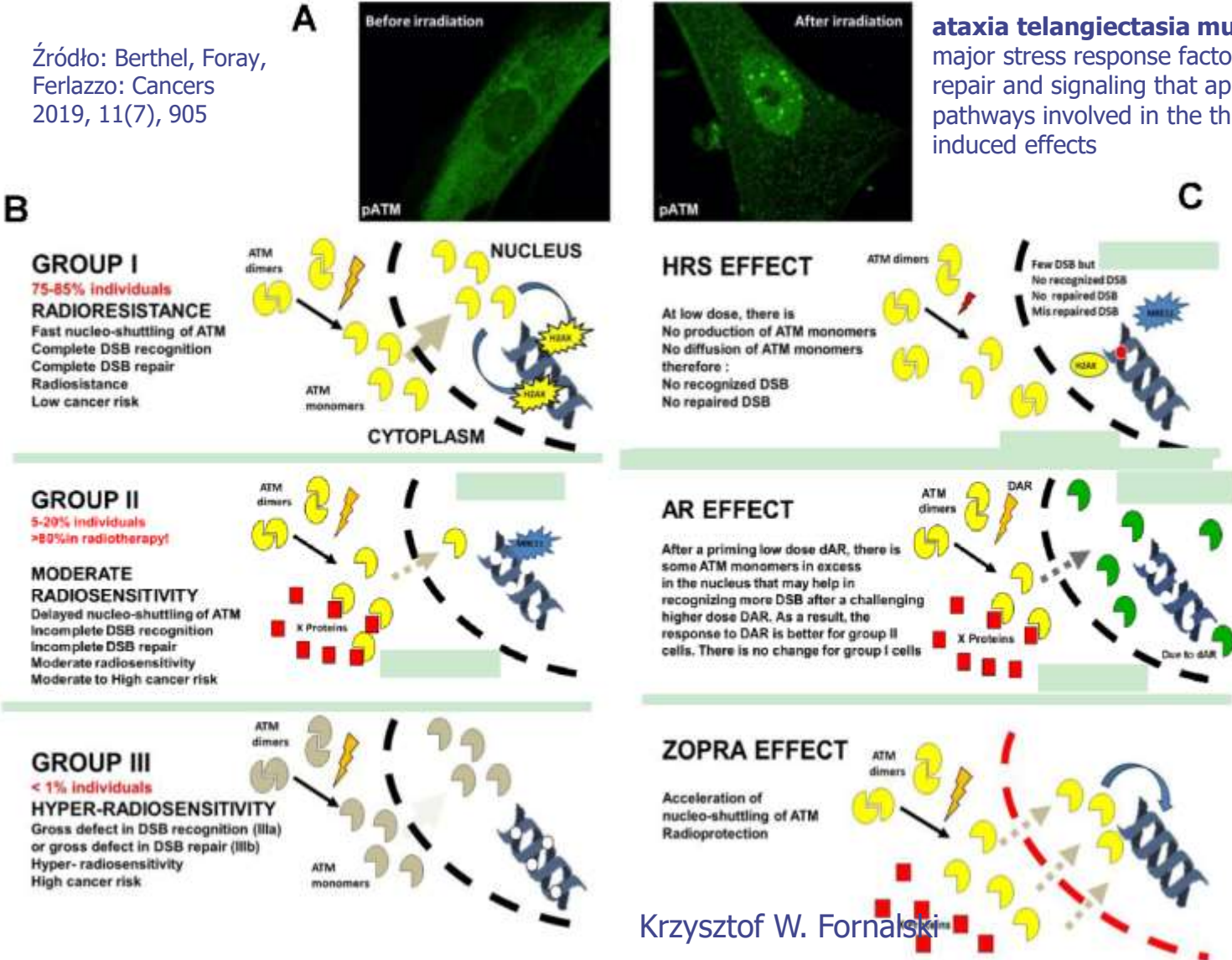
- ◆ Badania różnego rodzaju aberracji chromosomowych (w tym dicentryków, złamań chromatydowych czy mikrojąder) dla napromienionych limfocytów in-vitro to najpowszechniejsza metoda szacowania promieniowrażliwości
- ◆ Jednak takie jednoparametryczne podejście bywa zawodne, gdyż wiele czynników wpływa na promieniowrażliwość i nie można bazować jedynie na jednym kryterium → badania wielokryterialne

# Modele francuskie – zespół prof. Nicolasa Foray'a



The radiation-induced ATM nucleoshuttling (RIANS) model and its applications. **(A)** Representative image of pATM immunofluorescence before or after irradiation (2 Gy) in human normosensitive control **fibroblast** cell lines. **(B)** Schematic illustration of the three groups of radiosensitivity defined from the RIANS model. **(C)** Schematic illustration of the hyperradiosensitivity to low doses (HRS) and the adaptive response (AR) phenomena and of the effect of the combination of statins and bisphosphonates (zoledronate+pravastatin, (ZOPRA)) on the RIANS. Since the link between radiosensitivity and the nuclear membrane permeability is still unknown, membranes are represented in the same manner.

Źródło: Berthel, Foray,  
Ferland: Cancers  
2019, 11(7), 905



**ataxia telangiectasia mutated (ATM)** protein is a major stress response factor involved in the DNA repair and signaling that appears upstream most of pathways involved in the three precited radiation induced effects

DYGRESJA:  
Z Wikipedii: *Kinaza białkowa ATM (ataxia telangiectasia mutated) – kinaza białkowa serynowo-treoninowa (EC 2.7.1.11), aktywowana przez przerwanie obu nici podwójnej helisy DNA. Białko enzymu kodowane jest przez gen ATM w locus 11q22.3. Kinaza ATM fosforyluje szereg białek, odgrywających rolę w zatrzymaniu cyklu komórkowego, apoptozie i naprawie DNA. Substratami tej kinazy są m.in. p53, CHK2, BRCA1, H2AX, RAD17, RAD9 i NBS1. Gen jest przepisywany na dwa różne transkrypty, dające dwie izoformy białka.*

*Nazwa genu pochodzi od jednostki chorobowej, w której ten gen jest uszkodzony, dziedziczony w sposób autosomalny recesywny zespołu ataksja-teleangiektazja. Kinaza należy do rodziny kinaz PI3/PI4.*

# Przykładowe podejście – model francuski z 2008 r.

*Int. J. Radiat. Biol.*, Vol. 84, No. 2, February 2008, pp. 107–125

**informa**  
healthcare

**DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: At least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity?**

AURÉLIE JOUBERT<sup>1,2</sup>, KRISTIN M. ZIMMERMAN<sup>1</sup>, ZUZANA BENCOKOVA<sup>1</sup>,  
JÉRÔME GASTALDO<sup>1</sup>, NICOLE CHAVALAUDRA<sup>3</sup>, VINCENT FAVAUDON<sup>4</sup>,  
COLIN F. ARLETT<sup>5</sup>, & NICOLAS FORAY<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inserm, U647, ID17, European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France, <sup>2</sup>Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, BP17, Fontenay-aux-Roses, France, <sup>3</sup>UPRES EA-2710, Institut Gustave-Roussy, Villejuif, <sup>4</sup>Inserm, U612, Institut Curie, Centre Universitaire, Orsay, France, and <sup>5</sup>Department of Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge, Middlesex, UK

# Używane komórki: fibroblasty, a nie limfocyty

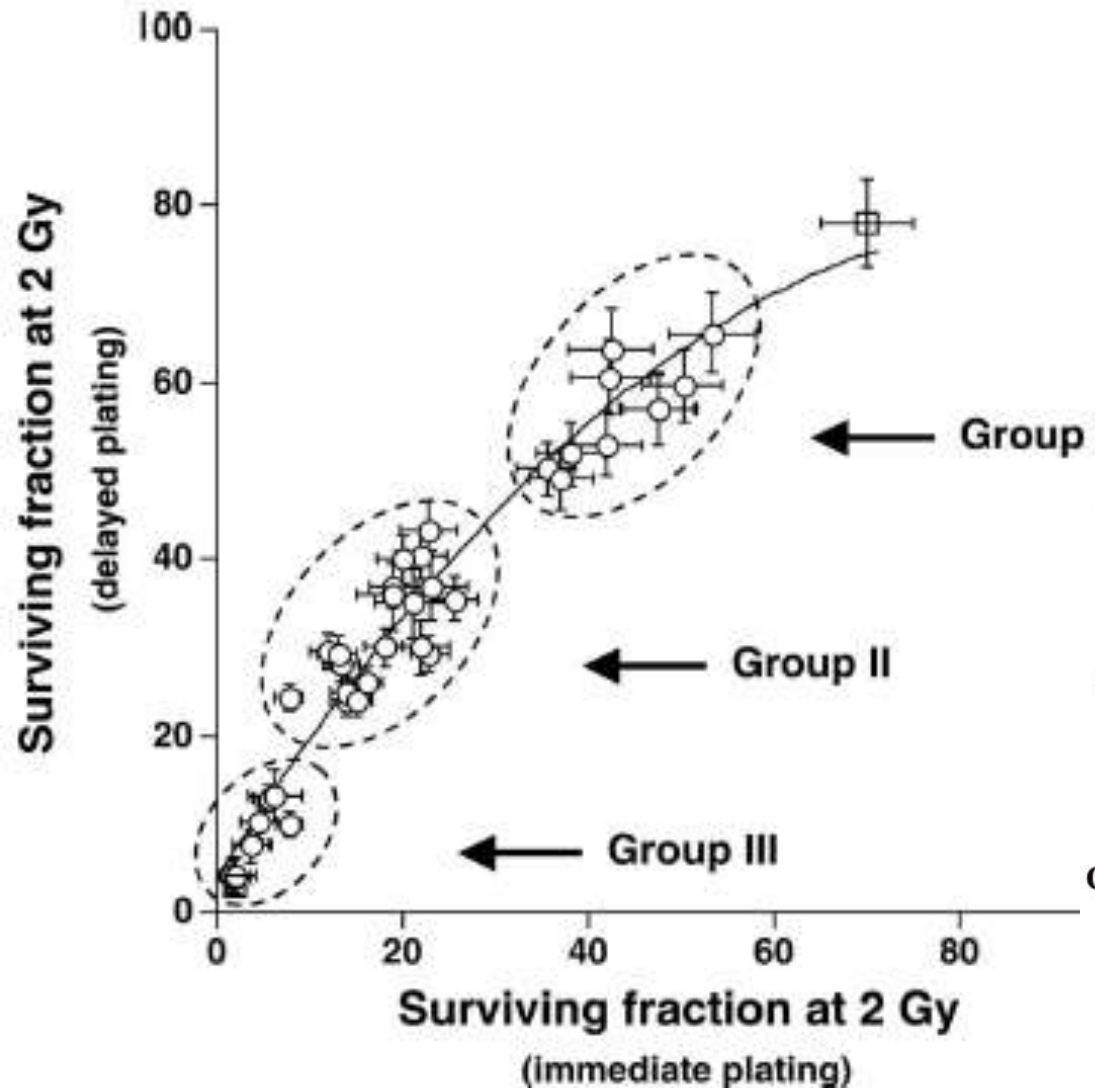
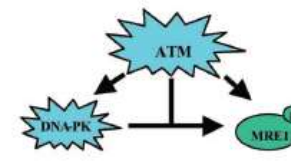
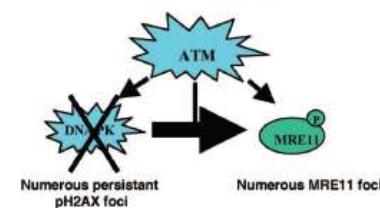


Figure 1. Surviving fractions after 2 Gy (SF2). Survival curves of each fibroblast cell line of the collection were obtained from three independent experiments at least after immediate (ip) and delayed 24 h (dp) plating. Each survival data is represented by the mean  $\pm$  standard error of at least three independent experiments. SF2dp were plotted against the corresponding SF2ip and data were fitted to a polynomial formula:  $SF2dp = 2.65 SF2ip - 0.0616 SF2ip^2$  ( $r = 0.95$ ;  $p < 0.005$ ; solid line). Three significantly distinct groups of cell lines were defined (confidence zones in dotted lines). Open squares represent the data from the radioresistant CHO and radiosensitive CHO-xrs6 rodent cell lines.

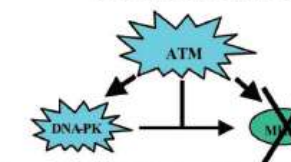
A Group I : Radioresistance



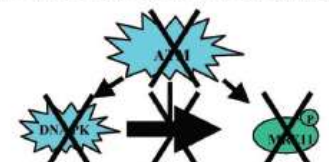
B Group IIIa : Extreme radiosensitivity and immunodeficiency



C Group II : Moderate radiosensitivity and cancer proneness



D Group IIIb : Extreme radiosensitivity Immunodeficiency and cancer proneness



## Porównanie kategorii promieniowrażliwości z punktu widzenia radioterapii (tj. możliwości naprawy zdrowych komórek między frakcjami)

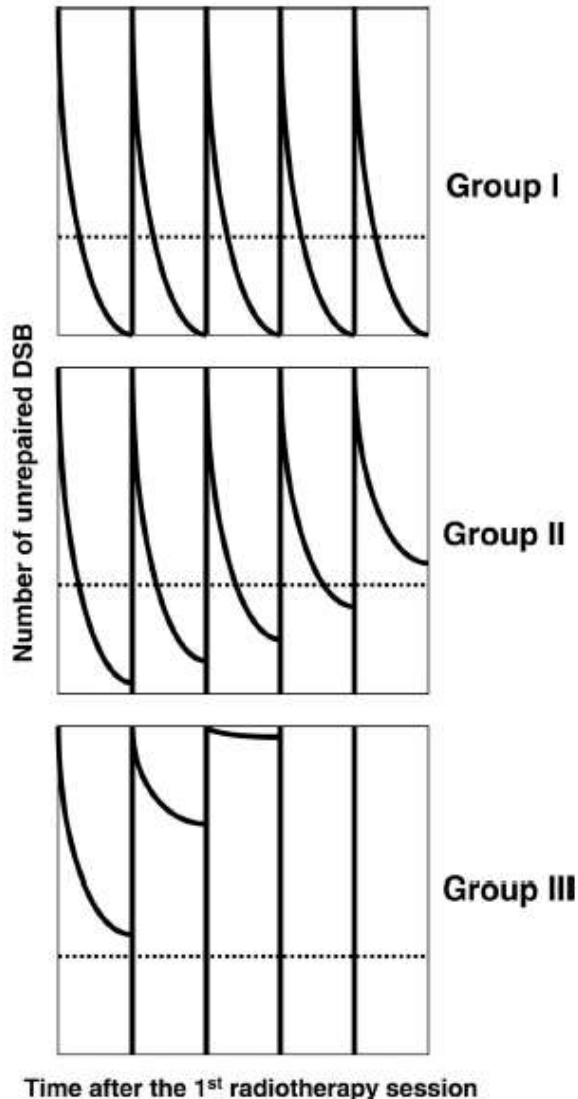


Figure 6. Potential occurrence of tissue overreactions following radiotherapy sessions according to the radiosensitivity groups defined here. The radiotherapy fractionated sessions lead to the progressive accumulation of unreparable DNA damage. By hypothesizing that tissue overreactions following radiotherapy sessions occur at a given level unreparable DNA damage per cell (dotted lines), treated group II cells may reach this level after some consecutive sessions according to their radiosensitivity whereas the group III cells may reach it at the first sessions.

# Przykładowe podejście – model francuski z 2013 r.

Journal of Theoretical Biology 333 (2013) 135–145



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Theoretical Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yjtbi](http://www.elsevier.com/locate/yjtbi)



## A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: Towards a mathematical definition of individual radiosensitivity



Larry Bodgi<sup>a,b</sup>, Adeline Granzotto<sup>a</sup>, Clément Devic<sup>a</sup>, Guillaume Vogin<sup>a</sup>, Annick Lesne<sup>c</sup>,  
Jean-François Bottollier-Depois<sup>d</sup>, Jean-Marc Victor<sup>c</sup>, Mira Maalouf<sup>b</sup>, Georges Fares<sup>b</sup>,  
Nicolas Foray<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut national de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR1052—Radiobiology Group, Cancer Research Centre of Lyon, 28 Rue Laennec, 69008, Lyon, France

<sup>b</sup> Université Saint-Joseph, Faculté des sciences, 1107-2050 Beyrouth, Liban

<sup>c</sup> Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR7600, laboratoire de physique théorique de la matière condensée, 75252 Paris, France

<sup>d</sup> Institut national de la Radioprotection et de la Sécurité Nucléaire (IRSN)—DRPH, Service de Dosimétrie Externe, 92260 Fontenay-aux-Roses, France

# Podstawy modelu: dynamika napraw uszkodzeń typu DSB

$$\frac{dN(t)}{dt} = (K_{\text{rec}} - K_{\text{rep}})N \quad (1)$$

where  $K_{\text{rec}}$  is the DNA damage recognition rate and  $K_{\text{rep}}$  is the DNA damage repair rate.

The number of DNA damage with a given repair rate  $k$ ,  $n(t, k)$ , varies with post-irradiation time  $t$ , as follows:

$$\frac{dn(t, k)}{dt} = -k n(t, k) \quad (8a)$$

$$n(t, k) = n(0, k)e^{-kt} \quad (8b)$$

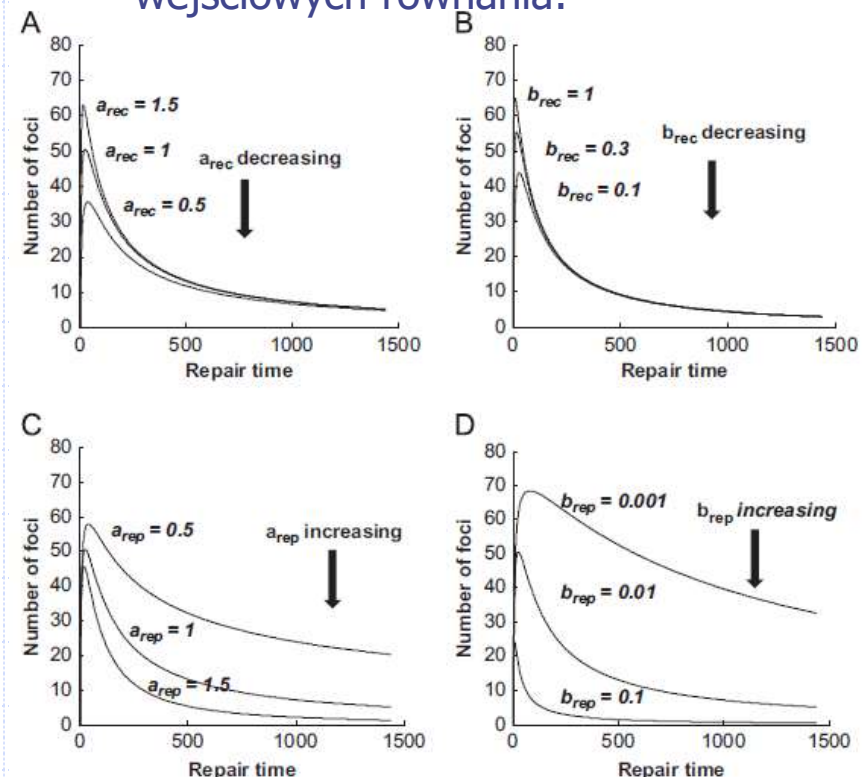
$$K_{\text{rep}}(t) = \frac{a_{\text{rep}} b_{\text{rep}}}{1 + b_{\text{rep}} t}$$

where  $a_{\text{rep}}$  and  $b_{\text{rep}}$  are adjustable parameters.

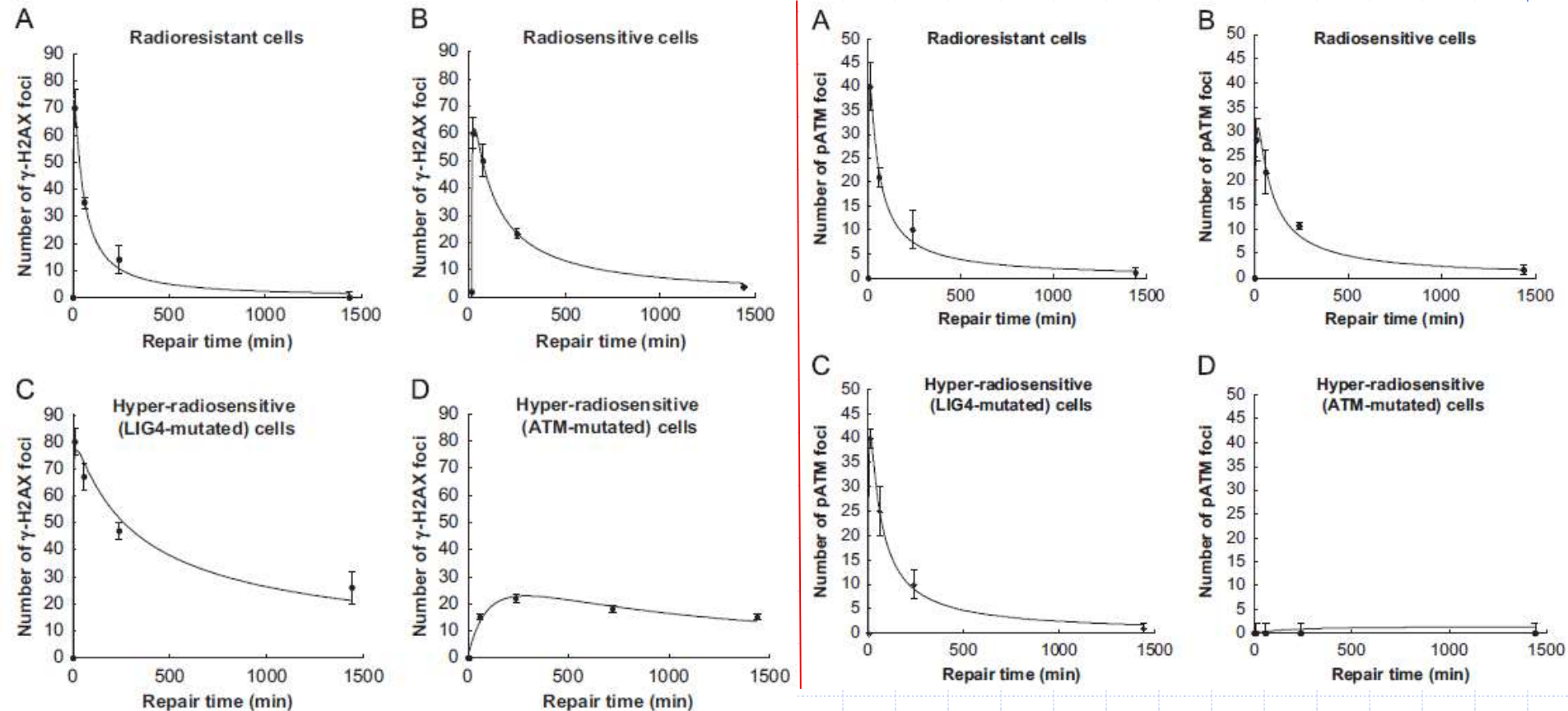
W efekcie otrzymujemy **funkcję Bodgi'ego** – jest to zależność liczby obserwowanych ognisk (punktów uszkodzeń DNA) od czasu. Równanie to uwzględnia procesy indukcji nowych ognisk oraz zaniku istniejących (naprawa)

$$N(t) = C \left( 1 - \left( \frac{1}{1 + b_{\text{rec}} t} \right)^{a_{\text{rec}}} \right) \left( \frac{1}{1 + b_{\text{rep}} (t - t_0)} \right)^{a_{\text{rep}}}$$

Przykładowe kształty funkcji Bodgi'ego dla różnych parametrów wejściowych równania:



# Zastosowanie dla dwóch rodzajów ognisk (markerów): histonu $\gamma$ -H2AX (z lewej) oraz białka pATM (z prawej)

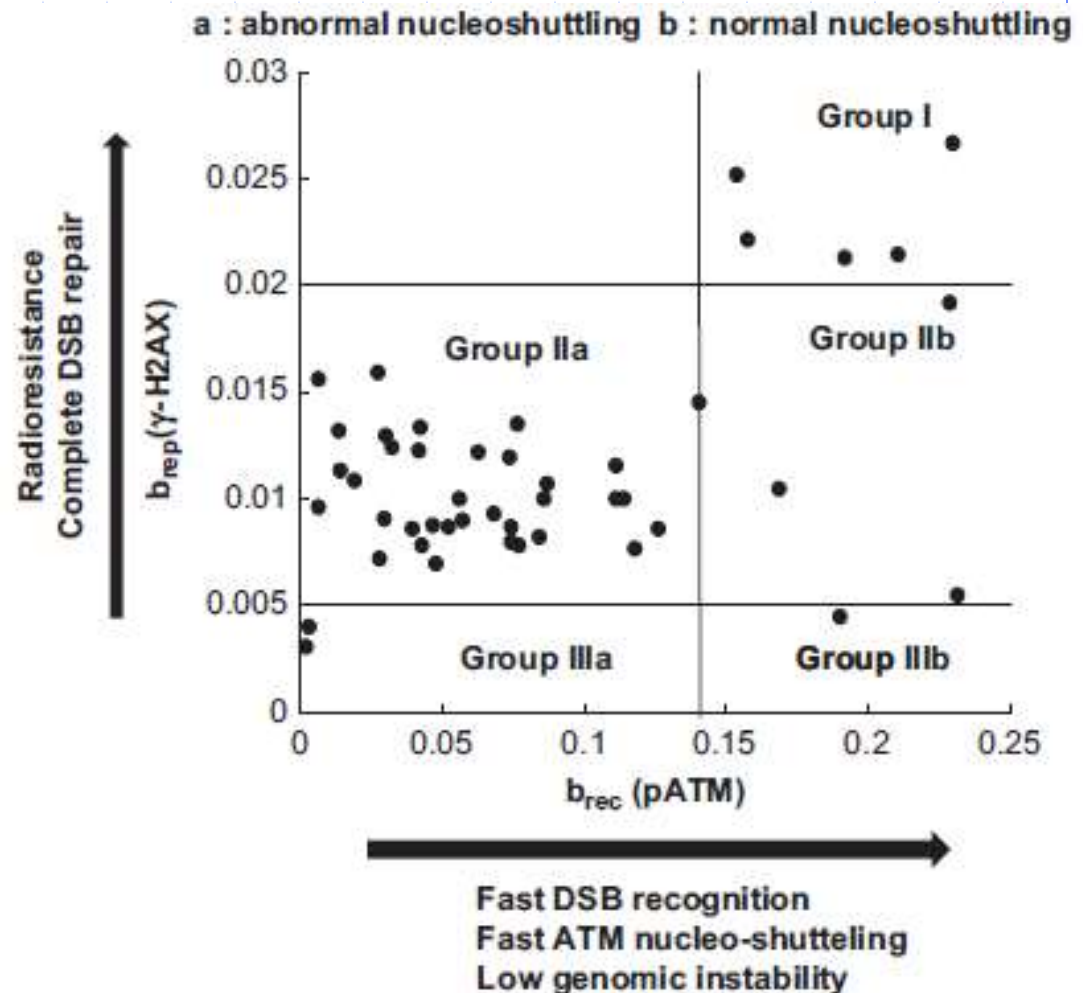


$$N(t) = C \left( 1 - \left( \frac{1}{1 + b_{\text{rec}} t} \right)^{a_{\text{rec}}} \right) \left( \frac{1}{1 + b_{\text{rep}} (t - t_0)} \right)^{a_{\text{rep}}}$$

In response to DSB inducers, the ATM protein kinase is known to auto-phosphorylate (pATM forms) and to phosphorylate H2AX ( $\gamma$ -H2AX) (Foray et al., 2003; Guo et al., 2010). The pATM forms proceed to a nucleo-shuttling from cytoplasm to nucleus and relocalize as discrete foci (Krueger et al., 2007; Yang et al., 2011). As DNA scaffold constituents, the  $\gamma$ -H2AX forms are systematically visible as nuclear foci at the DSB recognition sites.

# W efekcie można to połączyć w prosty test dwóch parametrów:

- ◆ Test histonu  $\gamma$ -H2AX oraz obecności białka pATM
- ◆ Podając wyniki w przestrzeni dwuwymiarowej można podzielić dane na kategorie dot. promieniowrażliwości



pATM - phosphorylated ATM protein –  
fosforylowana kinaza białkowa

Quantitative definition of the radiosensitivity groups from Bodgi's function parameters:  $b_{rep}(\gamma\text{H2AX})$  values from data provided by the 45 cell lines of the collection were plotted against  $b_{rec}(\text{pATM})$  values.

# Przykładowe podejście – model francuski z 2016 r.

INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION BIOLOGY, 2016  
VOL. 92, NO. 3, 117–131  
<http://dx.doi.org/10.3109/09553002.2016.1135260>



## RESEARCH ARTICLE

### The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: resolution of the linear-quadratic model\*

Larry Bodgi<sup>a,b</sup> and Nicolas Foray<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR 1052, Radiobiology Group, Cancer Research Centre of Lyon, Lyon, France;

<sup>b</sup>St-Joseph University, Faculty of Sciences, Beirut, Lebanon

- ◆ Zastosowanie krzywej przeżywalności opartej o model liniowo-kwadratowy (LQ) przy badaniu kinazy białkowej ATM

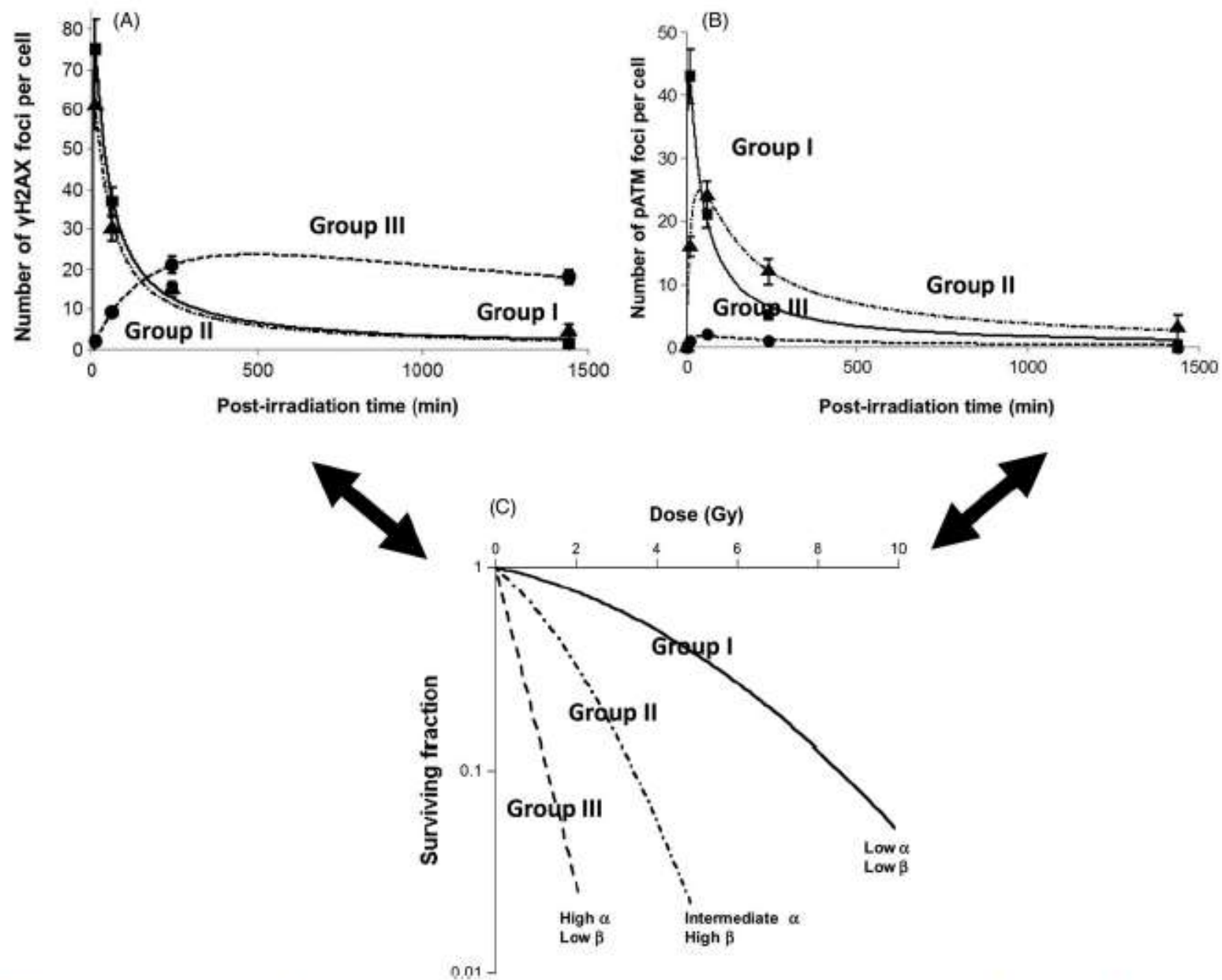
# Podstawa modelu: modyfikacje modelu LQ

- ◆ W modelu LQ istotne były parametry  $\alpha$  i  $\beta$
- ◆ Bazując na funkcji Bodgi'ego oraz dynamice kinazy białkowej ATM (jako element mierzalny) zmodyfikowano oba parametry:

From the above formulas and by defining the average, minimal and maximal values of  $\alpha$  and  $\beta$  as,  $\bar{\alpha}$ ,  $\alpha_{\min}$ ,  $\alpha_{\max}$ ,  $\bar{\beta}$ ,  $\beta_{\min}$ ,  $\beta_{\max}$ , and by considering:  $\Delta\alpha = \alpha - \bar{\alpha}$  and  $\Delta\beta = \beta_{\max} - \beta$ , it appears that, as first approximation

$$\left(\frac{\Delta\beta}{\beta}\right) = \frac{\beta_{\max}}{\beta_{\min}} \left(\frac{\Delta\alpha}{\bar{\alpha}}\right)^2 \quad \text{or} \quad \beta = \frac{\beta_{\max}}{1 + \frac{\beta_{\max}}{\beta_{\min}} \left(\frac{\alpha - \bar{\alpha}}{\bar{\alpha}}\right)^2}$$

$$\text{or} \quad \beta = \beta_{\max} \frac{\omega^2}{\omega^2 + (\alpha - \bar{\alpha})^2} \quad \text{with} \quad \omega = \bar{\alpha} \sqrt{\frac{\beta_{\min}}{\beta_{\max}}}$$



**Figure 3.** Representative example of kinetics of  $\gamma$ H2AX and pATM foci and survival curves of the 3 groups of human radiosensitivity. Immunofluorescence against  $\gamma$ H2AX (A) and pATM (B) antibodies was applied to unirradiated and irradiated (2 Gy) radioresistant HF19 (group I), radiosensitive 84BR (group II) and hyper-sensitive AT5BI (group III) fibroblast cell lines. Each plot represents the mean  $\pm$  standard error of the mean of triplicates. Survival curves are represented by the fit of the corresponding data.

Ostatecznie otrzymujemy zakresy obu parametrów związane z promieniowrażliwością

