ЛЪЧЕЛЕЧЕНИЕ И КЛЕТЪЧНА СМЪРТ. ЗНАЧЕНИЕ НА ВИДОВЕТЕ КЛЕТЪЧНА СМЪРТ ПРИ ЛЪЧЕЛЕЧЕНИЕ НА ОНКОЛОГИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

Теменужка Радева-Петкова¹, Елица Енчева¹, Иван Донеv², Явор Кашлов³

¹Клиника по лъчелечение, УМБАЛ „Света Марина“ - Варна, МУ-Варна,
Факултет по медицина, Катедра по образна диагностика и лъчелечение

²Клиника по медицинска онкология, УМБАЛ „Света Марина“ - Варна, МУ-Варна

³Клиника по вътрешни болести, УМБАЛ „Света Марина“ - Варна, МУ-Варна

RADIOTHERAPY AND CELL DEATH. SIGNIFICANCE OF CELL DEATH PATTERNS IN THE RADIOTHERAPY OF CANCER PATIENTS

Temenuzhka Radeva-Petkova¹, Elitsa Encheva¹, Ivan Donev², Yavor Kashlov³

¹Clinic of Radiotherapy, St. Marina University Hospital, Medical University of Varna

²Clinic of Medical Oncology, St. Marina University Hospital, Medical University of Varna

³Clinic of Internal Diseases, St. Marina University Hospital, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Лъчелечението е един от трите основни метода за лечение на онкологичните заболявания заедно с хирургията и химиотерапията. Прилага се при 50-60% от всички онкоболни на определен етап от тяхното комплексно лечение, като при повече от половината пациенти лъчелечението се прилага с радикална цел. Основна цел е реализиране на максимална доза в тумора и минимална доза в околните здрави тъкани. Развитието на съвременните техники на лъчелечение - 3Д конформално лъчелечение, модулирано по интензитет лъчелечение, образно ръководено лъчелечение - водят до значителен напредък в терапевтичните резултати. Въпреки това остава неизяснен въпросът защо някои тумори са чувствителни, а други са резистентни към приложеното лечение. Основна мишена на йонизиращото лъчение е ДНК. Чрез директното си и индиректно действие йонизиращите лъчения предизвикват структурни промени в ДНК и клетъчна смърт. Клетъчната смърт се приравнява на всеки процес, който води до загуба на митотична активност. Механизмът на лъчево индуцираната клетъчна смърт все още не е напълно изяснен. Съществуват много проучвания, които разкриват редица сигнални пътища и тяхната роля в индуцирането на лъчева резистентност

ABSTRACT

Radiotherapy is one of the three main treatment modalities of cancer, together with surgery and chemotherapy. It is applied to 50% - 60% of all cancer patients at a certain stage of their complex treatment, and in more than half of the patients radiotherapy is used with radical intent. The main goal is to deliver a high dose of radiation to the tumor, while maintaining an acceptable dose to adjacent tissues. The development of modern radiotherapy techniques - 3D conformal radiotherapy, intensity-modulated radiotherapy (IMRT), image-guided radiation therapy (IGRT), leads to significant advances in the therapeutic results. Nevertheless it is still not clear why some tumors are sensitive and others are resistant to irradiation. The main target of ionizing radiation is DNA. By direct and indirect action, ionizing radiation induces structural changes in DNA and cell death. Cell death is equivalent to any process that leads to loss of mitotic activity. The mechanism of radiation-induced cell death has not been fully understood yet. There are many studies that reveal a number of signaling pathways and their role in inducing radiation resistance and sensitivity, respectively. Finding the exact mechanisms of cell death will allow us to discover new target therapies, and combining them with radiotherapy will improve therapeutic results.

и съответно чувствителност. Разкриването на точните механизми на клетъчна смърт ще дадат възможност за откриването на нови таргетни терапии, а съчетаването им с лъчелечение ще подобри лечебните резултати.

Ключови думи: рак, лъчелечение, клетъчна смърт

ВЪВЕДЕНИЕ

Ракът е социално значимо заболяване, основна причина за смърт както в България, така и в световен мащаб. Представява мултигенно и мултиклетъчно заболяване, което може да възникне от всички видове клетки и органи с мултифакторна етиология (1).

Лъчелечението е един от трите основни метода за лечение на онкологичните заболявания заедно с хирургията и химиотерапията. Прилага се при 50-60% от всички онкоболни на определен етап от тяхното комплексно лечение, като при повече от половината пациенти лъчелечението се прилага с радикална цел. Основна цел е реализиране на максимална доза в тумора и минимална доза в околните здрави тъкани. Развитие на съвременните техники на лъчелечение - 3Д конформално лъчелечение, модулирано по интензитет лъчелечение, образно ръководено лъчелечение - водят до значителен напредък в терапевтичните резултати. Въпреки това остава неизяснен въпросът защо някои тумори са чувствителни, а други са резистентни към приложеното лечение.

Принципи на действие на йонизиращите лъчения при лъчелечение на онкологични заболявания

Йонизиращото лъчение предизвиква образуването на йони (електрически заредени частици), т.е. възбужда атомите и молекулите, през които преминава. Клетките и тъканите, подложени на такова лъчение, поглъщат определено количество енергия, което води до генетични промени и клетъчна смърт. Високоенергийните лъчения водят до дефекти в ДНК и блокиране възможността за делене и пролиферация (2). Основна цел на лъчелечението е да загинат максимален възможен брой туморни клетки, респ. унищожаване на тумора, с минимална увреда на околните нормални здрави тъкани. Йонизиращите лъчения предизвикват възбуждане и йонизация по директен или индиректен механизъм.

Keywords: cancer, radiotherapy, cell death

Биологичната ефективност (клетъчна смърт) на приложената терапия зависи от линейно предадената енергия, общата доза, фракционирането, лъчечувствителността на облъчената тъкан (3,4). Основна мишена на йонизиращото лъчение в клетката е ДНК (5).

Директно действие – приема, че лъчението взаимодейства директно с жизненоважна структура, наречена „мишена“, чието увреждане води до клетъчна смърт (Фиг. 1). Тази структура е ДНК. Преминаването на йонизиращата частица през хромозомите предизвиква йонизации на определени места, което причинява двойно верижно прекъсване на ДНК. Чрез голям брой едновременно действащи удари или ефект на концентриране на йонизацията се получава трайно хромозомно разкъсване. Този ефект се постига чрез повишаване на погълнатата енергия в тъканите или чрез облъчване с лъчения с висока плътност на йонизацията. В структурата на ДНК са възможни разнообразни лъчеви промени: прекъсване на една или двете полинуклеотидни вериги на ДНК; промяна или изчерпване на основите на нуклеиновата киселина; промяна в локализацията на полинуклеотидите във веригата на ДНК. Трайното ДНК увреждане се последва от невъзможност за клетъчно делене (митоза) и е причина за клетъчната смърт (6).

Индиректно действие – клетките и тъканите в човешкия организъм се състоят от 80% вода. При облъчване с йонизиращи лъчения се предизвиква разцепване на водната молекула и получаване на силно реактивоспособни радиолизни продукти на водата - водородни и хидроксилни радикали: атомен и молекулен водород, водороден пероксид и т.н. (Фиг. 1). Те отключват образуването на вторични свободни радикали, причиняващи разнообразни химични реакции. В резултат на тези химични реакции се предизвиква промяна в структурата на белтъци, полизахариди, въглехидрати и се стига до непрякото увреждане на структурата на ДНК. Всички тези процеси променят клетъчния метаболизъм и структу-

ра и предизвикват клетъчна смърт (6). Двата механизма са представени на Фиг. 1.

Фиг. 1. Директно и индиректно действие на йонизиращото лъчение, адаптирано от Rajamanickam Baskar (7)

Клетъчната смърт се приравнява на всеки процес, който води до загуба на митотична активност (8). Съществуват различни форми на клетъчна смърт: апоптоза, некроза, некроптоза и автофагия. Йонизиращите лъчения убиват раковите клетки основно чрез апоптоза или митотична катастрофа (9). Съществуват много проучвания, които разкриват редица сигнални пътища и тяхната роля в индуцирането на лъчева резистентност и съответно чувствителност.

Форми на клетъчна смърт и проучвания, касаещи лъчечувствителността

Апоптоза – програмирана форма на клетъчна смърт (Фиг. 3). Характеризира се с кондензация, фрагментиране на ДНК, формиране апоптични тела вътре в клетката. По принцип клетъчната мембрана на апоптозната клетка остава неповътната. На молекулно ниво апоптозата се потенцира от активиране на няколко ензима, наречени каспази. Апоптозата започва чрез активиране на каспази 8 или 9, които генерират сигнален път, потенциращ клетъчната смърт (10). Индуцирането на апоптозата в раковите клетки играе важна роля в ефикасността на лъчевата терапия (11). Често се наблюдават дефекти в механизма на програмирана клетъчна смърт на туморните клетки и това води до повишаване на устойчивостта им към различните конвенционални противотуморни терапии. Насочването към алтернативни пътища на клетъчна смърт е привлекателна стратегия за подобряване на антитумор-

ната терапия. Проучване разглежда как нивата на броя клетки Т-лимфоцити (от пациенти с карцином на гърдата), претърпели апоптоза в резултат на облъчване, влияят на степента на изява на късните лъчеви реакции. Ретроспективно са селектирани 20 пациенти: 10 с фиброза и/или телеангиектазии и 10 без изявени късни реакции. Проучването показва, че пациенти с изявени късни лъчеви реакции са с ниска изява на лъчево индуцирана апоптоза (12). Серемидът е ключов медиатор на апоптозата. Смята се, че дефекти в този сигнален път са причина за лъчезрезистентност при някои тумори, например при лимфом на Бъркит (13).

Митотична клетъчна смърт, митотична катастрофа – този тип клетъчна смърт се проявява по време на или след аномална митоза (клетъчно делене) и се причинява от неправилна агрегация на хромозоми, водещи до образуване на гигантски клетки с аберантна ядрена морфология, множество ядра (14,15) (Фиг. 3). След облъчване по-голяма част от клетъчната смърт се дължи на аберантни митози (16).

Автофагия – буквално значи „самоизяждане“ и описва процес, при който клетката храносмила части от нейната собствена цитоплазма с цел да генерира макромолекули и енергия (Фиг. 3). Автофагията се контролира от повече 20 гени продукта (ATG proteins), които инициират формирането на двойно мембранни структури, които растат и поглъщат цитоплазмни компоненти и формират пълни с цитоплазма компоненти, наречени автофагозоми. Форма на клетъчна смърт, която настъпва в отговор на лъчелечение (17). Съществуват проучвания, че индукцията на автофагията повишава лъчечувствителността на някои тумори, например глиобластом. Ин витро проучване доказва, че при лъчелечение на клетъчни линии от глиобластом те умират чрез автофагия (18). Установено е, че прибавянето на индуктор на автофагията (рапамицин, mTOR- inhibitor) към клетъчни линии от глиобластом в комбинация с облъчване води до по-нататъшно намаляване на клетъчната жизнеспособност, което предполага синергични ефекти на облъчването и индукция на автофагия (19). Друго проучване също потвърждава ролята автофагията при MCF-7 и MDA-MB-231 клетъчни линии от рак на гърдата. Доказва се, че прибавянето на mTOR инхибитор индуцира автофагията, подобрява лъчевата чувствителност (20). Проучване от 2015 г. установява, че автофагията, индуцирана от йонизиращи лъчения, има защитен ефект срещу клетъчната смърт и комбинацията

между лъчелечение и инхибитор на автофагията повишава апоптозата и намалява туморната пролиферация при плоскоклетъчен карцином на хранопровода (21). Индукция на автофагия след лъчелечение се наблюдава при глиобластом, карцином на гърдата, простатен карцином (22). Някои проучвания предполагат, че индуцирането на автофагия може да бъде стратегия за подобряване на терапевтичния ефект на лъчетерапията и че индуцираната автофагия провокира сенситизирване на клетките към облъчване (23).

Некроза – некрозата се разглежда като пасивна и имуногенна форма на клетъчна смърт (Фиг. 3). Тя най-често е следствие на исхемични и други вредни нокси. Клетъчният метаболизъм се преустановява, настъпва инхибиране на окислителното фосфорилиране, засилва се активността на хидролитичните ензими и клетката се автолизира. Целостта на клетъчните мембрани се нарушава и съдържанието на цитоплазмата им се излива в междуклетъчните пространства. Това е клетъчна смърт, предизвикана от условия, които са неблагоприятни и несъвместими с нормални физични процеси в организма – промени в рН, йонен дисбаланс, загуба на енергия. Характеризира се с клетъчно набъбване, мембранна деформация, повреда на клетъчните органели, освобождаване на лизозомални ензими, които атакуват клетката. Най-честа причина за некроза са исхемия, възпаление, инфекция (8). След лъчелечение некроза се наблюдава рядко (24). Това е дозозависима клетъчна смърт. Например: Клетъчна линия MG63 (от остеосарком) след облъчване с 5 Gy умира чрез апоптоза, докато облъчване с 30 Gy при същата клетъчна линия предизвиква некроза (25).

Некроптоза – нова форма на клетъчна смърт, програмирана клетъчна смърт тип III, каспаза-независима. RIPK1/3 протеинът (receptor-interacting protein kinases - рецептор взаимодействаща протеин киназа) наскоро бе открит като ключова молекула в индукцията на програмираната некроза (26), а HMGB1 е биомаркер за некротична клетъчна смърт (Фиг. 3). Експресията на RIPK3 корелира със способността на клетки да претърпят програмирана некроза. Некроптозата може да бъде активирана от суперфамилията рецептори на туморния некротичен фактор (TNF), Т-клетъчни рецептори, интерфероновни рецептори, генотоксичен или оксидативен стрес и различни противоракови лекарства (27). Най-добре проученият сигнален път, който предизвиква некроптоза, е TNF/TNFR1 (Фиг. 2). TNF се свързва с TNFR1 и води до образува-

нето на мембранен комплекс I (TRADD, TRAF2, RIPK1, cIAP1/2), в който cIAP1/2 (клетъчни инхибитори на апоптозата) промотират деубиквитинацията (отцепване на убиквитин от белтъчен субстрат) на RIPK1, което води до активиране на NF- κ B (nuclear factor- κ B-нуклеарен фактор κ B) и MAPK (mitogen-activated protein kinases) транскрипционни събития. Деубиквитинираният RIPK1 води до образуването на комплекс II, съдържащ RIPK1, FAS-асоцииран смъртоносен домейн (FADD-FAS-associated death domain protein) и каспаза-8. В комплекс II активираната каспаза-8 разцепва и инактивира RIPK1 и RIPK3 и по този начин блокира некроптозата и активира апоптозата. В някои случаи при потиснатата каспаза-8 и след серия фосфорилирания между киназите RIPK1 и RIPK3 се формира некрозома. Фосфорилиране на MLKL (mixed lineage kinase domain-like - смесена линия на киназия домейн-подобен протеин) чрез RIPK3 води до неговото преместване към плазмената мембрана и предизвиква некроптоза (28). Когато разкъсването на RIP1 и RIP3 е потиснато чрез каспаза-8 инхибитори, е възможно формирането на комплекс II и инициране на некроптозата. Резистентността към каспаза-зависимата апоптоза се явява основен терапевтичен проблем. Разкриването на терапевтични стратегии, които могат да активират алтернативни пътища на клетъчна смърт, са възможност за подобряване на терапевтичните резултати. Некроптозата се явява като такъв алтернативен път при каспаза-дефицит (28).

На Фиг. 2 е представена схема на активиране на некроптозата.

Фиг. 2. Активация на некроптоза, адаптирано от Najoua Lalaoui and Gabriela Brumatti (28)

Проучвания показват, че некроптозата е нов механизъм на лъчево индуцираната клетъчна смърт на някои типове ендокринни ракови клетки като тироидни и адренкортикални карци-

номни клетки (29). Радикалната цистектомия е стандартен подход при карцином на пикочен мехур с инвазия на мускулната стена. Това съответно води до влошаване качеството на живот на пациента. Ако съществува биомаркер, който да определи кои пациенти са чувствителни към лъчелечение, това би позволило съхраняване на органа и запазване на неговата функция. In vitro и in vivo проучване доказва, че високите нива на HMGB1 корелира с по-лош отговор към лъчелечението (30). Проучване установява, че при аблативно хипофракционирано лъчелечение $\geq 10\text{Gy}$ за фракция засилва клетъчната смърт на клетъчни линии от недребноклетъчен белодробен карцином, които имат висока експресия на RIP3. Следователно RIP3 може да служи като полезен биомаркер за предсказване на благоприятен отговор към SBRT (стереотактично телесно облъчване). RIP3 се асоциира с подобряване на локалния туморен контрол и преживяемостта без прогресия (all $P < 0,05$) (31).

На Фиг. 3 са представени основните типове клетъчна смърт, предизвикани в резултат на йонизиращите лъчения.

Фиг. 3. Форми на клетъчна смърт, адаптирано от Kristen Lauber et al. (32)

Както стана ясно, различни гени и вътреклетъчни сигнални пътища участват в регулацията на клетъчната смърт, предизвикани от йонизиращите лъчения. Всички тези пътища са взаимно свързани и от тях зависи лъчево индуцираната клетъчна смърт. Въпреки това точният механизъм (и), причиняващ клетъчна смърт на раковите клетки в резултат на йонизиращите лъчения, не е напълно изяснен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лъчелечението е незаменим метод в лечението на онкологичните заболявания. Но въпреки развитието на съвременните техники на облъчване остава отворен въпросът с клетъчната резистентност към йонизиращите лъчения.

Кои са сигналните пътища, които водят до нея? Разкриването на точните механизми на клетъчната смърт, индуцирана от йонизиращите лъчения, ще предостави възможности за развитието на нови таргетни терапии. Съчетаването им с лъчелечение ще допринесе за индивидуализирането и подобряването на комплексното лечение на раковите заболявания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hanahan D, Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70
2. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009;461:1071-1078
3. Hall EJ. Cancer caused by x-rays-a random event?. *Lancet Oncol*. 2007;8:369-370
4. Brandsma D, Stalpers L, Taal W et al. Clinical features, mechanisms, and management of pseudoprogression in malignant gliomas. *Lancet Oncol*. 2008;9:453-461
5. Emami B, Lyman J, Brown A et al. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1991;21:109-122
6. Eric J. Hall, Amato J. Giaccia, Radiobiology for the Radiologist. Lippincott Williams & Wilkins 2012
7. Rajamanickam Baskar, Kuo Ann Lee, Richard Yeo, Kheng-Wei Yeoh, Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions, *Int J Med Sci* 2012; 9(3):193-199.
8. Bradly G. Wouters, Cell death after irradiation: how, when and why cells die.
9. Ross GM, Induction of cell death by radiotherapy, *Endocr Relat Cancer*. 1999 Mar;6(1):41-4.
10. Mo Kim B, Hong Y, Lee S et al. Therapeutic Implications for Overcoming Radiation Resistance in Cancer Therapy, *Int J Mol Sci*. 2015 Nov; 16(11): 26880–26913.
11. Verheij M. Clinical biomarkers and imaging for radiotherapy-induced cell death. *Cancer Metastasis Rev*. 2008;27:471-480
12. Fuentes-Raspall MJ, Caragol I, Alonso C et al. Apoptosis for prediction of radiotherapy late toxicity: lymphocyte subset sensitivity and potential effect of TP53 Arg72Pro polymorphism. 2015 Mar;20(3):371-82.

13. Michael JM, Lavin MF, Watters DJ. Resistance to radiation-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma cells is associated with defective ceramide signaling. 1997 Aug 15;57(16):3600-5.
14. Sato N, Mizumoto K, Nakamura M. et al. A possible role for centrosome overduplication in radiation-induced cell death. *Oncogene*. 2000;19:5281-5290
15. Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ*. 2008;15:1153-1162
16. Jonathan EC, Bernhard EJ, McKenna WG. How does radiation kill cells?. *Curr Opin Chem Biol*. 1999;3:77-83
17. Tam SY, Cheung Wu VW, and Law H. Influence of autophagy on the efficacy of radiotherapy. *Radiat Oncol*. 2017; 12: 57.
18. Daido S, Yamamoto A, Fujiwara K, Sawaya R, Kondo S, Kondo Y. Inhibition of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit radiosensitizes malignant glioma cells by inducing autophagy. *Cancer Res*. 2005 May 15;65(10):4368-75
19. Palumbo S, Pirtoli L, Tini P, et al. Different involvement of autophagy in human malignant glioma cell lines undergoing irradiation and temozolomide combined treatments. *J Cell Biochem*. 2012;113(7):2308-18.
20. Albert JM, Kim KW, Cao C, Lu B. Targeting the Akt/mammalian target of rapamycin pathway for radiosensitization of breast cancer. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(5):1183-9.
21. Chen Y, Li X, Guo L et al. Combining radiation with autophagy inhibition enhances suppression of tumor growth and angiogenesis in esophageal cancer. 2015 Aug; 12(2): 1645-1652.
22. Paglin S., Hollister T., Delohery T. et al. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res*. 2001;61:439-444.
23. Zhuang W, Qin Z, Liang Z. The role of autophagy in sensitizing malignant glioma cells to radiation therapy. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2009 May; 41(5):341-51.
24. Wauters BG. Cell death after irradiation: how, when and why cell die. Chapter 3 Basic Clinical Radiobiology Fourth Edition 2009, Michael C. Joiner, Albert van der Kogel
25. Rainaldi G., Ferrante A., Indovina P.L., Santini M.T. Induction of apoptosis or necrosis by ionizing radiation is dose-dependent in MG-63 osteosarcoma multicellular spheroids. *Anticancer Res*. 2003;23:2505-2518.
26. Wen Zhou, Junying Yuan. Necroptosis in health and diseases, *Semin Cell Dev Biol*. 2014 Nov;35:14-23.
27. Lalaoui N, Lindqvist LM, Sandow JJ, Ekert PG. The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis. *Semin Cell Dev Biol* 2015; 39: 63-69.
28. Najoua Lalaoui and Gabriela Brumatti, Relevance of necroptosis in cancer, *Immunology and Cell Biology* (2017) 95, 137-145 & 2017 Australasian Society for Immunology Inc. All rights reserved 0818-9641/17.
29. Nehs MA, Lin CI, Kozono DE et al. Necroptosis is a novel mechanism of radiation-induced cell death in anaplastic thyroid and adrenocortical cancers. *Surgery*. 2011 Dec; 150(6):1032-9.
30. Shrivastava S, Mansure JJ, Almajed W et al. *Mol Cancer Ther*. The Role of HMGB1 in Radioresistance of Bladder Cancer. 2016 Mar;15(3):471-9.
31. Wang HH, Wu ZQ, Qian D et al. Ablative Hypofractionated Radiation Therapy Enhances Non-Small Cell Lung Cancer Cell Killing via Preferential Stimulation of Necroptosis In Vitro and In Vivo, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2018 May 1;101(1):49-62.
32. K. Lauber et al, Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy, *Frontiers in Oncology* 2(116):116 • September 2012

Адрес за кореспонденция:

Ас. д-р Теменужка Руменова Радева-Петкова
 Медицински университет – Варна
 Факултет по медицина, Катедра по образна
 диагностика и лъчелечение
 Варна 9000, ул. «Марин Дринов» 55
 e-mail: dr.t.radeva@gmail.com
 temenuzhka.radeva@mu-varna.bg