

Sašo Mravljak¹, Petra Hudler², Blaž Grošel³

Biološke osnove zdravljenja z ionizirajočim sevanjem

The Biological Principles of Ionizing Radiation Treatment

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: ionizirajoče sevanje, radioterapija, rak, radiosenzitivnost, DNA-popravljalni mehanizmi

Ionizirajoče sevanje se uporablja za zdravljenje raka. Temelji na glavnem učinku ionizirajočega sevanja, poškodbi molekule DNA in posledičnem odmrtnju obsevane celice. Poleg poškodb DNA povzroča tudi druge znotrajcelične poškodbe makromolekul. Glavna razlika med zdravim in rakastim tkivom je boljša sposobnost zdravih celic v popravljanju znotrajceličnih poškodb. Obsevanje se izvaja v dnevni odmerkih – frakcijah, kar omogoči zdravemu tkivu, da lahko sproti in učinkoviteje kot rakasto popravlja nastale znotrajcelične poškodbe. V prispevku bomo predstavili različne učinke ionizirajočega sevanja na celico. Predstavljeni bodo glavni biološki mehanizmi, ki jih zdrava celica uporabi, da je zdravljenje z ionizirajočim sevanjem učinkovito.

ABSTRACT

KEY WORDS: ionizing radiation, radiotherapy, cancer, radiosensitivity, DNA repair mechanisms

Ionizing radiation is a method used to treat cancer. It is based on the main effect of ionizing radiation, namely, the damage to the DNA molecule, and the resulting death of the irradiated cell. In addition to DNA damage, it also causes other intracellular damage to macromolecules. The big difference between healthy and cancerous tissue is that healthy cells are better able to repair intracellular damage. Irradiation is delivered in daily doses – fractions – so that healthy tissue can repair intracellular damage more efficiently than cancerous tissue. This article presents the various effects of ionizing radiation on the cell. The main biological mechanisms used by the cell to make ionizing radiation treatment effective are also presented.

¹ Sašo Mravljak, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; saso.mravljak@mf.uni-lj.si

² Izr. prof. dr. Petra Hudler, univ. dipl. mikr., Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; petra.hudler@mf.uni-lj.si

³ Doc. dr. Blaž Grošel, dr. med., Sektor za radioterapijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana; Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; Katedra za onkologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana; bgroselj@onko-i.si

UVOD

Ionizirajoče sevanje se že več kot stoletje uporablja za zdravljenje raka, v redkih primerih pa tudi za benigna obolenja. Slovenci so, še v Avstro-Ogrski monarhiji, bili med prvimi na svetu, ki so tovrstno sevanje uporabljali za zdravljenje. Dr. Emil Bock iz Deželne bolnišnice v Ljubljani je že leta 1902 kupil prvi radijev aplikator. Prav tako pa smo bili med prvimi na svetu, kjer se je tovrstno zdravljenje razvilo v samostojno medicinsko specializacijo – radioterapijo – onkološko vedo, ki ionizirajoče sevanje uporablja za zdravljenje pretežno malignih bolezni. Temelji predvsem na glavnem učinku ionizirajočega sevanja – poškodbah najpomembnejše molekule v celici – DNA, kar navadno vodi v odmrte obsevane celice (1, 2). Vsaka prizadeta celica po tovrstnem zdravljenju lahko odmre – tako zdrava kot tudi rakasta, kar je odvisno od sevalnega odmerka. Glavna razlika med zdravim in rakastim tkivom pa je boljša sposobnost zdravih celic v popravljanju znotrajceličnih poškodb. Tkiva, tako zdrava kot tudi rakasta, so različno občutljiva za ionizirajoče sevanje, zato govorimo o radiosenzitivnosti. Obsevanje (zdravljenje z ionizirajočim sevanjem) se izvaja po dnevni odmerkih – frakcijah. Na ta način se omogoči, da zdravo tkivo lahko sproti učinkoviteje popravlja nastale znotrajcelične poškodbe in si opomore. Zdravljenje se izvaja načeloma do sevalne meje, ko je popravilo zdravih celic še učinkovito in torej poškodba zdravega tkiva še popravljiva. Ob teh odmerkih je verjetnost, da tumorsko tkivo odmre, še vedno velika. V prispevku bomo podrobneje predstavili različne učinke, ki jih ima sevanje na celico – biološke osnove zdravljenja z ionizirajočim sevanjem.

FIZIKALNI UČINKI SEVANJA

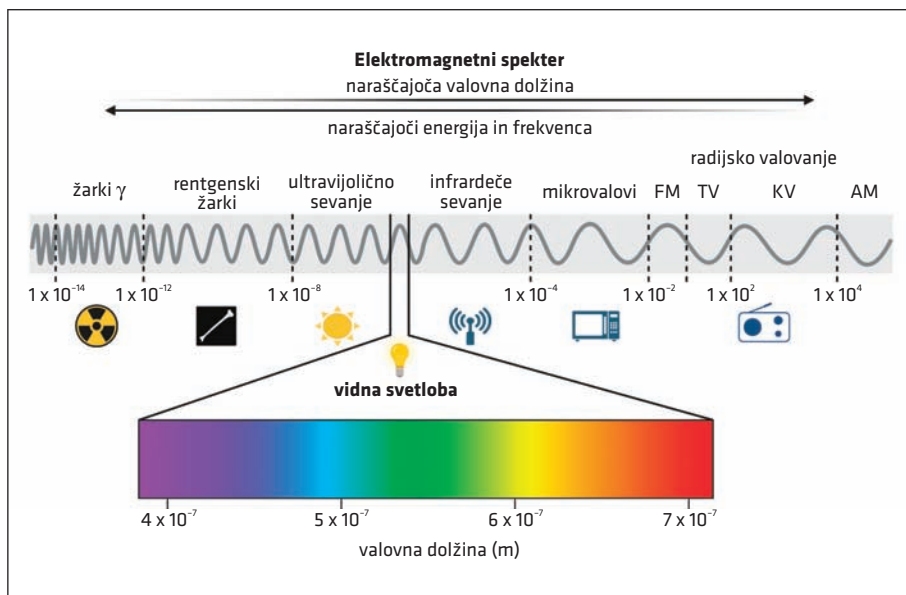
Sevanje je naravno prisotno v našem okolju že od začetka obstoja planeta. Posledično se je življenje razvilo in prilagodilo v okolju, na katerega deluje tudi sevanje. Poznamo

več vrst sevanj. Sevanja prihajajo iz vesolja (prasevanje oz. mikrovalovno sevanje ozadja) ter iz zemlje, kar imenujemo zemeljsko sevanje. Prav tako sevanje izvira tudi iz naših lastnih teles, kar opisujemo kot notranje sevanje. V sledeh je prisotno v zraku, hrani, vodi in v gradbenih materialih, ki se uporabljajo pri gradnji domov in drugih konstrukcij (3).

Sevanje je oddajanje elektromagnetnih valov ali osnovnih delcev iz izvora v prostor (4). Elektromagnetno sevanje potuje skozi prazen prostor s hitrostjo $3,0 \times 10^8$ metrov na sekundo – 300.000 kilometrov na sekundo. Elektromagnetni spekter vključuje na nizkofrekvenčnem (dolgovalovnem) koncu spektra radijske valove (pod katere spada tudi kratkovalovno sevanje (KV), katerega navidezno paradokсно poimenovanje izhaja iz prvotne razdelitve radijskih valov), nato mikrovalove, infrardeče sevanje, vidno svetlobo, ultravijolično sevanje (UV), rentgenske žarke in na skrajnem visokofrekvenčnem (kratkovalovnem) koncu še žarke gama (slika 1). Energija fotona je premo sorazmerna s frekvenco valovanja, zato imajo žarki gama najvišjo energijo (približno eno milijardo elektronvoltov (eV)), medtem ko imajo radijski valovi zelo nizko energijo (približno 1 feV) (3, 5, 6).

Ionizirajoče in neionizirajoče sevanje

Sevanje delimo na ionizirajoče in neionizirajoče – kot pove ime, na lastnost, če lahko povzroči ionizacijo snovi, s katero medsebojno delujejo. To pomeni, da ionizirajoče sevanje izbija elektrone atomom, ki pridejo v stik s sevanjem. Okoljsko sevanje je večinoma neionizirajoče vrste, vključno s pretežnim delom ultravijoličnega (UV) in velikim delom ostalega elektromagnetnega spektra. Ionizirajoče sevanje vključuje visokofrekvenčni del elektromagnetnega spektra – rentgenske žarke in žarke gama ter sevanje v obliki delcev, kot so delci alfa, beta in nevtroni. Pod ionizirajoče sevanje



Slika 1. Elektromagnetno sevanje ima lastnost elektromagnetnega valovanja in hkrati delca energije (fotona) in ga lahko ponazorimo s t. i. elektromagnetnim spektrom. Visokofrekvenčni del elektromagnetnega spektra spada pod ionizirajoče sevanje. Sposobnost ionizacije ima tudi sevanje nekaterih drugih delcev, ki niso del elektromagnetnega spektra in nimajo omenjene dvojne lastnosti. Ustvarjeno s spletnim orodjem BioRender.com (4, 6, 7).

se lahko uvršča tudi UV-sevanje z višjimi frekvencami oz. višjo energijo – del UV-C-spektra, del daljnega UV-spektra (angl. *far ultraviolet*) in skrajni UV-spekter (angl. *extreme ultraviolet*) (5–7). Sevanje, ki se uporablja v radioterapiji, je bodisi elektromagnetno (npr. rentgensko sevanje) bodisi sevanje delcev (npr. obsevanje z elektroni) in vodi v ionizacijo snovi/bioloških molekul (8).

Sevanje delcev sestavljajo delci alfa, ki so jedra helija z dvema protonoma in dvema nevtronoma. So težki in pozitivno nabiti delci. Ker energijo izgubljajo izredno hitro, ne morejo prodreti skozi kožo oz. dlje kot 0,04 mm v tkivo, zato se za zunanje obsevanje ne uporabljajo. Težava lahko nastane, če jih zaužijemo ali vdihnemo. Tovrstno tveganje poznamo npr. pri vdihovanju plina radona in lahko predstavljajo tveganje za občutljive organe, predvsem pljuča (3, 8, 9). Delci alfa imajo visok linearni prenos energije (angl. *linear energy*

transfer, LET), kar pomeni, da na svoji poti skozi snov ionizirajoči delec odda veliko energije snovi, preko katere prehaja. Tako na svoji poti oddajajo energijo, ki je od 100- do 1000-krat večja od energije, ki jo oddajajo žarki gama, in povzročijo veliko ionizacij (10). Energija, ki se absorbira v enoti mase snovi, je absorbiran odmerek (enota za merjenje je gray (Gy)). Če ta odmerek uravnovesimo glede na relativno biološko učinkovitost, dobimo ekvivalentni odmerek (enota za merjenje je sievert (Sv)). Delci alfa imajo zelo visok dejavnik relativne biološke učinkovitosti (4). Poškodbe, ki jih povzročajo alfa delci, so predvsem dvojni prelomi DNA (angl. *double-strand breaks*, DSB), ki so kot poškodbe večinoma težje popravljivi (8, 9). Terapevtsko se delce alfa uporablja pri notranjem obsevanju z npr. Ra^{223} za zdravljenje razsejanega raka prostate pri bolnikih s kostnimi zasevki (10). Brahiterapija oz. notranje obsevanje je

način zdravljenja z ionizirajočim sevanjem, pri katerem so viri sevanja v neposredni bližini ali pa v tumorju (4).

V drugo skupino sevanja delcev uvrščamo delce beta, ki so visokoenergijski elektroni. Gibljejo se hitro in imajo negativni naboj. Imajo večji doseg v zraku v primerjavi z alfa delci in lahko prodrejo skozi kožo, a jih zaustavi že tanka plast plastične ali aluminijaste folije in oblačila. Podobno kot delci alfa so nevarnejši pri zaužitju ali vdihanju (3). V medicini se delci beta uporabljajo pri zdravljenju različnih vrst raka, predvsem z brahiterapevtskimi aplikatorji stroncija (Sr^{90}) za zdravljenje tumorjev očesne veznice (11).

V tretjo skupino ionizirajočega sevanja prištevamo fotone visoke energije, kot so rentgenski žarki (oz. žarki X) in žarki gama, ki so oboji del spektra elektromagnetnega sevanja (8). Rentgenski žarki in žarki gama imajo bistveno višjo energijo, kot delci alfa ali beta, kar jim omogoča prehod večjih razdalj. Imajo izjemno prodorne lastnosti in zahtevajo robustnejšo zaščito, kot je debela svinčena obloga, da se zmanjša njihov učinek. Rentgenski žarki se uporabljajo v slikovni diagnostiki (npr. rentgensko slikanje in slikanje s CT) zaradi svoje značilnosti, da lažje prodirajo skozi kožo in druga mehka tkiva kot skozi kosti. Uporabljajo se tudi za radioterapevtsko zdravljenje praktično vseh tumorjev in v nekaterih primerih celo pri zdravljenju benignih lezij (3, 8). Viri sevanja z nizkim LET, kot so rentgenski žarki in žarki gama, povzročajo redko (sporadično) ionizacijo na poti skozi snov (12).

Na kvantni ravni neionizirajoče sevanje nima dovolj energije, da bi popolnoma izbil elektron iz atoma oz. molekule (kar se imenuje ionizacija), vendar lahko vzbudi elektrone in povzroči prehod atoma v vzbujeno stanje (13). V nasprotju z neionizirajočim je ionizirajoče sevanje veliko agresivnejše pri medsebojnem delovanju z makromolekulami, a tudi neionizirajoči

viri sevanja lahko škodujejo biološkim tkivom (7, 14, 15).

KEMIČNI UČINKI SEVANJA

Osrednja dogma radiobiologije je, da ionizirajoče sevanje poškoduje tako celične strukture kot tudi celične molekule, predvsem nukleinske kisline, kar lahko vodi v celično smrt. Poškodbe nukleinskih kislin se kažejo kot spremembe kemijske strukture nukleotidnih baz in sladkorjev, enojni prelomi DNA (angl. *single-strand breaks*, SSB) in DSB ter združevanje oz. navzkrižno povezovanje molekul DNA. V celično smrt pa poleg sevalnih poškodb molekule DNA lahko vodijo tudi poškodbe znotrajceličnih beljakovin in lipidov ter organelov, npr. mitohondrijev in endoplazemskega retikuluma (7, 16).

Izpostavljenost sevanju povzroči poškodbe dušikovih baz, kot so oksidativne spremembe dušikovih baz in prelomi DNA, ki lahko vodijo do nastanka abazičnih mest. Reakcije med dušikovimi bazami, hidrosilnimi radikali kot tudi hidriranimi elektroni potekajo s hitrostjo, ki jo omejuje difuzija. Reakcije lahko obsegajo npr. desaturacijo (uvajanje dvojnih vezi, da molekula nastane nenasičena) ter odvzem vodikovih atomov od metilnih in aaminskih skupin (7).

Glavni vzrok za nastanek prelomov DNA je sevalna poškodba deoksiriboze. Ta poškodba se pojavi naključno in pogosto neposredno zaradi t. i. hidrosilnega napada – ko hidrosilni radikal neposredno učinkuje na molekulo DNA ter na encime, vezane na nukleinsko kislino. DSB nastanejo, ko dva hidrosilna radikala koordinirano medsebojno delujeta z bližnjimi sladkornimi mesti, kar vodi do pretrganja vijačnice. Hidrosilni radikali lahko poleg deoksiriboze poškodujejo tudi dušikove baze (7). DSB, ki jih povzroča ionizirajoče sevanje, predstavljajo najbolj smrtonosno vrsto poškodb DNA, če jih popravljalni mehanizmi poškodb DNA ne uspejo popraviti. Učinkoviti popravljalni mehanizmi

tako predstavljajo ključno obrambno linijo proti tovrstnim poškodbam (1).

BIOLOŠKI UČINKI SEVANJA

Biološki učinki sevanja so odvisni od vrste sevanja, količine izpostavljenosti ter vrste tkiv, ki so izpostavljena sevanju. Različne vrste ionizirajočega sevanja povzročajo različne vzorce poškodb. Delci alfa navadno povzročijo poškodbe na površini kože, če jih vdihnemo, pa lahko povzročijo tudi poškodbe v tkivih. Delci beta običajno povzročajo lokalne poškodbe, kot so opekline, vendar lahko poškodujejo tudi globlja tkiva, če jih zaužijemo ali vdihnemo. Nevtroni, rentgensko sevanje in sevanje gama lahko povzročijo tako lokalne poškodbe kot tudi sevalno bolezen, če je prizadet velik del telesa (12).

Biološki učinki sevanja so odvisni tudi od vrste izpostavljenih tkiv. Michalowski deli tkiva na hierarhična in fleksibilna. Glede na model obstajajo tri celične vrste. Matične celice služijo namenu podvajanja, pri čemer nastanejo hčerinske celice, ki ohranjajo nabor matičnih celic ali se diferencirajo v različne vrste celic. Te celice so predvsem v bazalni plasti kože ali znotraj črevesnih kript. Funkcionalne celice predstavljajo popolnoma zrele celice, ki niso sposobne nadaljnje delitve. Zajemajo zrele epiteljske celice v črevesju in koži ter krvne celice, kot so nevtrofilci in rdeče krvničke. Tretja vrsta so dozorevajoče, delno diferencirane celice, ki se še lahko delijo, a je njihov delitveni potencial omejen zaradi odsotnosti telomeraze. Takšne celice najdemo npr. v kostnem mozgu (17, 18).

Za hierarhična tkiva (tip H) je značilna prisotnost vseh treh vrst celic. Matične celice nenehno ustvarjajo dozorevajoče celice, ki sčasoma dosežejo popolno zrelost in postanejo funkcionalne celice. Hierarhična tkiva obsegajo večino epiteljskih plasti in kostni mozeg. V splošnem se tkiva tipa H hitro odzovejo na poškodbe zaradi sevanja, saj je prizadeta občutljiva populacija

matičnih celic. To zavira proizvodnjo zrelejših celic, kar vodi do znakov, kot je stanjšanje pokožnice ali zmanjšana proizvodnja krvnih celic. Nasprotno pa fleksibilna tkiva (tip F) obsegajo funkcionalne celice, ki se načeloma redko delijo, vendar jih je mogoče k temu spodbuditi kot odgovor na poškodbo. Te celice so funkcionalne, vendar ohranijo sposobnost ponovnega vstopa v celični cikel, če je to potrebno. Primeri tkiv tipa F vključujejo jetra, ščitnico in usnjico kože. Večina tkiv je mešanica obeh tipov in se njihov odziv na sevanje temu primerno razlikuje (17, 18).

Torej, tkiva s celicami, ki imajo kratek življenjski cikel, so dozretnejša za sevanje. To sevanje sproži znotrajcelične mehanizme, ki vodijo v eno od vrst celične smrti – najpogosteje apoptozo, lahko pa tudi nekrozo. Hitro deleče se celice, npr. spermatoцитi, hematopoetski prekurzorji, krožeči limfociti in črevesne kriptne celice, spadajo med najboljčutiljiveše celične tipe (12, 19).

NEPOSREDNI IN POSREDNI UČINKI SEVANJA

Dva glavna mehanizma medsebojnega delovanja ionizirajočega sevanja z biološkimi molekulami so neposredni učinki, kjer gre za odlaganje energije v makromolekule, in posredni učinki, pri katerih energija medsebojno deluje z vodo in tvori reaktivne kisikove zvrsti (angl. *reactive oxygen species*, ROS). ROS imajo samoojačevalni učinek preko medsebojnega delovanja z lipidi, predvsem membranskimi, in s kisikom. Neposredni škodljivi učinki se navadno hitreje popravijo, medtem ko lahko škoda zaradi posrednih učinkov, posredovanih z ROS, vztraja in se krepi. Neposredni učinki so tudi redkejši, ker je verjetnost, da žarek zadene DNA, relativno majhna, saj te kritične komponente sestavljajo majhen del celice (20).

Neposredni učinki ionizirajočega sevanja vključujejo medsebojno delovanje energije s snovjo, ki vodi v ionizacijo na molekuli

DNA (20). To lahko vodi v strukturne spremembe DNA in posledično v poškodbe celic ali celo njihovo smrt. Poškodovane celice, ki preživijo, lahko kasneje povzročijo karcinogenezo ali druge nepravilnosti. Ta proces je prevladujoč pri sevanjih z visokim LET ter pri obsevanju z visokimi odmerki (21). Rakave celice lahko pridobijo tudi genetske spremembe, ki povzročajo izgubo učinkovitih mehanizmov obrambe proti poškodbam DNA, kar vodi v večjo občutljivost za ionizirajoče sevanje (radiosenzibilnost) rakavih celic (1). V vsakodnevni radioterapevtski praksi je ravno razlika v občutljivosti zdravih in rakavih celic na sevalne poškodbe ključen dejavnik za uspešno izvedeno zdravljenje. Iskanje načinov, kako oslabiti popravljalne mehanizme rakavih celic, je predmet številnih raziskav. Tako je ciljanje signalnih poti odziva na poškodbe DNA eden izmed ključnih in obetavnih pristopov za selektivno radiosenzibilizacijo rakavih celic.

Usmerjenost žarkov gama ali rentgenskih žarkov v vodo celic vodi v tvorbo ROS, kot sta hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$) in ionizirana voda (H_2O^+). Obstaja tudi vrsta drugih manj raziskanih reducentov, kot sta vodikov radikal ($\text{H}\cdot$) in hidrirani elektroni (e_{aq}^-). V zelo kratkem času se tvorijo tudi sekundarni ROS, ki so posledica primarnih ROS, npr. superoksid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) in vodikov peroksid (H_2O_2). Med radiolitičnimi produkti vode so najpogostejši hidroksilni radikali, ki lahko povzročijo pomembne poškodbe nukleinskih kislin (7). Kar 60 % celične škode ionizirajočega sevanja z rentgenskimi žarki in žarki gama povzročijo posredni učinki sevanja (1). V nekaterih primerih so poškodbe s prostimi radikali neposreden vzrok bolezenskega stanja (npr. poškodbe tkiva zaradi izpostavljenosti ionizirajočemu sevanju) (22). Nastanek ROS lahko vodi tudi v nastanek reaktivnih dušikovih zvrsti (angl. *reactive nitrogen species*, RNS), kot so peroksinitritni anion (OONO^-), dušikov dioksid ($\text{NO}_2\cdot$) in didušikov trioksid (N_2O_3). Na splošno je

tvorba ROS in RNS zaradi ionizirajočega sevanja še posebej škodljiva za celico, saj so v mnogih primerih novonastali reakcijski produkti bolj reaktivni kot njihovi predhodniki (7).

Skupni (kumulativni) učinki zgodnjih, hitrih biokemičnih procesov, ki jih povzročajo ionizirajoče sevanje, se kažejo v kasnejših fazah celične škode, vključno z upočasnjevanjem celične delitve, poškodbami signalnih beljakovin in poškodovanjem membrane. Ti celični učinki se lahko pojavijo v obdobju od nekaj minut do 10 ur (7).

Učinek očividca

Učinek očividca (angl. *bystander effect*) je opredeljen kot biološki učinek, ki se izrazi v (bližnjih) celicah, katerih jedra niso bila neposredno obsevana. V onkologiji je ta učinek znan tudi kot sevalno sprožen učinek očividca (angl. *radiation induced bystander effect*, RIBE). Učinek sta prva opisala Nagasawa in Little in vključuje različne učinke na celico in jedro, med drugimi DNA-poškodbe, kromosomsko nestabilnost, genetske spremembe in apoptozo. Vloga in razsežnost RIBE v klinični radioterapiji še ni dobro opredeljena (1, 23, 24).

Posredovanje signalov med neposredno obsevano celico in celicami v bližini se lahko doseže preko različnih mehanizmov. Možna je izmenjava molekul med sosednjimi celicami skozi presledkovne stike, sporazumevanje med oddaljenimi celicami s prenosom topnih dejavnikov, izmenjava hlapnih komponent med fizično ločenimi populacijami celic ter prenosom elektromagnetnih signalov (npr. preko UV-sevanja) od obsevanih celic do oddaljenih celic (25, 26).

Obsevane celice izločajo signalne molekule, ki vstopajo v neizpostavljene zdrave celice, kar lahko pri njih vodi v podoben odziv kot pri neposredno obsevanih celicah. Med signalnimi molekulami učinka se je izkazal za pomembnega posrednika transformirajoči rastni dejavnik beta 1 (angl. *transforming growth factor beta 1*, TGF- β 1), verjetno pa tudi

številni drugi potencialni posredniki, kot so tumorje nekrotizirajoči dejavnik alfa (angl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- α), interlevnik 6 (IL-6), IL-8 in ROS (1).

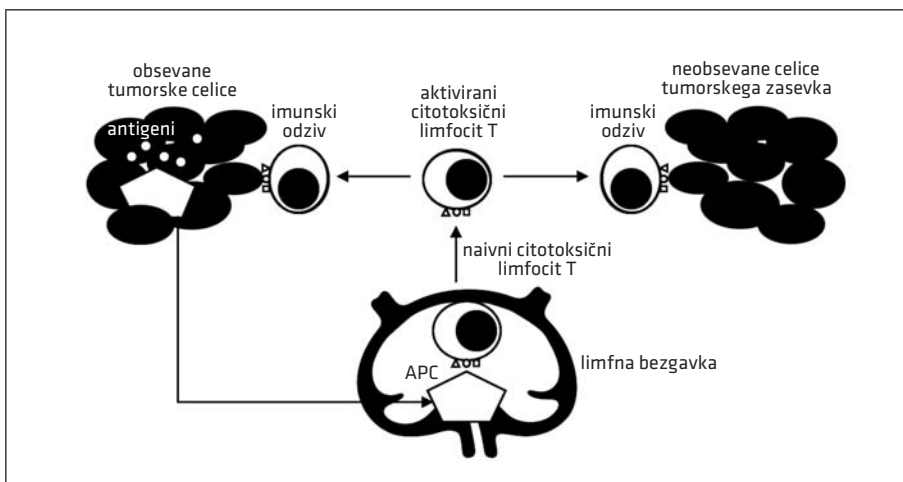
Nedavno objavljene raziskave nakazujejo, da je eden od pomembnih mehanizmov celičnega sporazumevanja, posredovanega s topnimi dejavniki, (tudi) medcelično sporazumevanje z zunajceličnimi vezikli, predvsem z eksosomi. Ti vezikli lahko vsebujejo mRNA, mikroRNA (miRNA) in beljakovine, ki so funkcionalne in se lahko prenesejo v druge celice, kar vodi v imunski odziv/karcinogenezo (27). V kontekstu RIBE, posredovanih preko eksosomov, proces verjetno spodbuja tako citotoksične/genotoksične učinke kot tudi zaščitne učinke za celico. V raziskavah so npr. odkrili, da so eksosomi, sproščeni iz obsevanih celic raka dojki, povečali raven kromosomskih aberacij in spodbudili proizvodnjo ROS. Po drugi strani pa je bilo ugotovljeno, da eksosomi, sproščeni iz obsevanih celic raka glave in vratu, spodbujajo popraviljanje DNA in s tem pri-

spevajo k povečani neobčutljivosti celic, tkiv ali organov za ionizirajoče sevanje – radiorezistenci (26, 28, 29).

Daljnotarčni učinek

Abskopalni učinek (angl. *abscopal effect*) je sposobnost lokaliziranega sevanja, da sproži protitumorski odziv na oddaljenih mestih, ki sevanju niso bila izpostavljena. V iskanju primernega slovenskega izraza ga bomo v nadaljevanju poimenovali »daljnotarčni učinek«. Vključuje imunski odziv, ki je v veliki meri posredovan s citotoksičnimi limfociti T (s prisotnim označevalcem tkivne skladnosti 8 (angl. *cluster of differentiation* 8, CD8)) in ga pretežno sprožijo učinki sevanja na tumorsko tkivo, kar povzroči sproščanje antigenov v krvni obtok. Ta proces lahko sproži imunski odgovor (slika 2). Daljnotarčni učinek je prvič opisal Mole v začetku 50. let prejšnjega stoletja (30–32).

Radioterapija običajno deluje imunosupresivno – predvsem, če so v obsevanem polju limfne bezgavke. Obstajajo pa



Slika 2. Diagram, ki prikazuje mehanizem aktivacije imunskega odziva na radioterapijo. Antigene iz poškodovanih tumorskih celic lahko privzamejo antigen predstavitvene celice (APC), ki nato potujejo v limfno bezgavko in sprožijo aktivacijo limfocitov T. Aktivirani limfociti T, usmerjeni proti tumorsko specifičnim antigenom, nato vstopijo v primarni tumor in neobsevane tumorske zasevke. Legenda receptorjev: Δ – ligand za receptor Fas, membransko beljakovino aktiviranih limfocitov T in nekaterih drugih vrst celic (angl. *first apoptosis signal ligand*, FasL), \bigcirc – T-celični receptor, \square – receptor programirane celične smrti 1 (angl. *programmed cell death receptor 1*, PD-1) (33).

raziskave, ki kažejo, da lahko povzroči tudi spremembe v imunskem sistemu, ki so blagodejne za bolnike z rakom. Obsevanje namreč povišuje izražanje kalretikulina na površini umirajočih tumorskih celic, kar dendritičnim celicam olajša prepoznavo in fagocitozo mrtvih tumorskih celic. Te umirajoče tumorske celice lahko izločajo tudi molekule, ki delujejo kot signali nevarnosti in pripomorejo k izboljšanju zorenja dendritičnih celic. Poleg neposrednega ubijanja tumorskih celic sevanje spodbuja tudi izražanje beljakovin, ki olajšajo predstavitev antigenov, kar poteka tako, da antigen predstavljena celica (APC) zajame s tumorjem povezani antigen (angl. *tumor-associated antigene*, TAA) in ga predstavi citotoksičnemu limfocitu T. To vodi v lažjo prepoznavo tumorskih celic in napad tako na primarno tumorsko mesto kot tudi na zasevke drugje v telesu. Kaže, da sevanje spodbuja izražanje kemokinov, ki lahko vpokličejo aktivirane efektorske celice T pomagalke (s prisotnim CD4) in citotoksične limfocite T na mesta, kjer je tumor. Celokupno vsi mehanizmi spodbujajo izkušene citotoksične limfocite T, da odstranijo tumorske celice (33, 34).

Klinični vidik daljnotarčnega učinka je nejasen, trenutno v obsegu poročil o posameznih primerih (35, 36). Zelo verjetno pa sinergistično združevanje radioterapije z imunoterapijo vodi v okrepljen daljnotarčni učinek, kar v prihodnosti morda omogoča uporabo radioterapije tudi za modalnost v zdravljenju razsejane bolezni (33).

DETERMINISTIČNI UČINKI SEVANJA

Deterministični oz. nestohastični učinki so spremembe v organizmu po absorpciji praznega oz. nadpraznega odmerka ionizirajočega sevanja (4). Prag odmerka, pod katerim se ne pojavijo, se razlikuje med zdravljenimi bolniki. Jakost učinka je lahko odvisna od časa in odmerka izpostavljenosti ter vrste sevanja. Vsi zgodnji učinki in

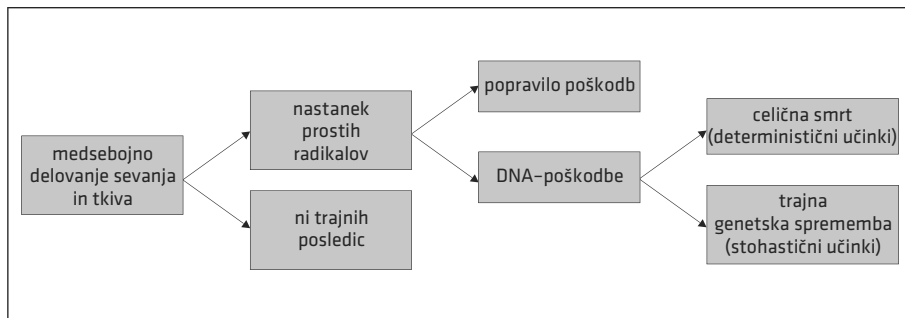
večina pozno nastalih učinkov na tkiva so deterministični učinki. Vedno vodijo v smrt celice, če je odmerek dovolj velik (slika 3). Deterministične učinke lahko delimo na akutne in kronične učinke (13).

Akutni učinki se pojavijo, ko oseba prejme velik odmerek sevanja v kratkem času, kar povzroči takojšnje zdravstvene težave, kot so slabost, bruhanje, glavobol, vročina, opekline kože in tkiva (13). Z akutnimi učinki sevanja je povezan tudi pojem akutne sevalne bolezni, ki je kontinuiteta kliničnih manifestacij in se nanaša na znake in simptome, ki so posledica absorbirane doze ionizirajočega sevanja več kot 1 Sv in se pojavijo v nekaj dneh po izpostavljenosti (4, 37, 38).

Kronični učinki se pojavijo po dolgotrajni izpostavljenosti sevanju in povzročajo dolgoročne učinke, kot so siva mrena, rak, genetske spremembe in začasna ali trajna neplodnost (13). Skupek bolezenskih znakov, ki se pojavijo po daljši izpostavljenosti ionizirajočemu sevanju v odmerku do 1 Sv, imenujemo kronična sevalna bolezen (4). Kronični učinki so nevarni in težko ozdravljivi ter lahko povzročijo celo smrt. Ti učinki niso takoj opazni in se lahko razvijejo v nekaj mesecih ali letih (13).

STOHAISTIČNI UČINKI SEVANJA

Za stohastične oz. »naključne« učinke je značilno, da se z višanjem odmerka povečuje verjetnost pojavnosti bolezni in nimajo praga, pod katerim je zagotovo, da se negativni učinek ne bo pojavil, ter se lahko pojavijo z zakasnitvijo do nekaj desetletij. Somatski stohastični učinki so omejeni na izpostavljeno osebo in povzročajo posledice, ki se lahko kažejo pri izpostavljenem posamezniku. Dedni stohastični učinki se pojavijo, ko ionizirajoče sevanje poškoduje genetski material v reproduktivnih celicah, kar pomeni, da se lahko ti učinki/genetske spremembe prenašajo iz generacije v generacijo (slika 3). Sevalno povzročene genetske spremembe v genih in posamez-



Slika 3. Diagram nastanka determinističnih oz. stohastičnih učinkov.

nikovi DNA lahko vodijo v splav oz. rojstvo otroka s prirojenimi malformacijami (teratogenost) (13, 39). Pri determinističnih učinkih opisujemo jakost učinka v odvisnosti od odmerka. Pri stohastičnih učinkih pa takšne povezave ni, saj bo oseba razvila raka ali pa ga ne bo, in prag odmerka, pri katerem je tveganje za nastanek raka ničelno, ne obstaja (13).

Posledično lahko opazujemo odvisnost med verjetnostjo nastanka določenega stanja npr. vzbuditev (indukcijo) raka v odvisnosti od odmerka. Za napovedovanje stohastičnih učinkov so bili predlagani različni modeli (13, 39). Brezpražni premo sorazmeren model predpostavlja, da se tveganje za nastanek raka premo sorazmerno povečuje, minimalna količina sevanja, pri kateri ni tveganja za nastanek raka, pa ne obstaja. Dotični model sicer ne upošteva dejstva, da se živa bitja na Zemlji prilagajamo na prasevanje že milijarde let in smo razvili mehanizme, ki škodo sevanja preprečujejo in popravljajo že nastalo škodo (39–42). Linearno-kvadratni model predlaga, da se tveganje za nastanek raka povečuje s kvadratno premo sorazmerno funkcijo. Krivulja je esasta in kaže, da imajo največji vpliv na povečevanje verjetnosti za nastanek raka relativno srednji odmerki (39, 40, 43). Model odziva na odmerek, na katerega smo prilagojeni, imenovan tudi sevalna hormeza, ki predpostavlja, da so nizki odmerki sevanja oz. odmerki, na katere smo prilagojeni,

zaščitni in znižajo verjetnost pojavnosti raka (39, 42). Luckey je leta 2008 predpostavil, da bi dvig izpostavljenosti prasevanju iz običajnih 2–3 $\mu\text{Sv}/\text{leto}$ za 3000-krat na vse do 8 Sv/leto , prinesel mnogotere blagodejne učinke (slika 3) (39, 42, 44, 45). Primer te hipoteze je sporna študija Cohena iz leta 1995, ki je pokazala, da je pri ljudeh, ki živijo v delih ZDA z visokimi ravnmi radioaktivnega plina radona, manj verjetno, da bodo umrli zaradi pljučnega raka (46, 47). Vendar pa je leta 2003 Puskin pokazal, da je to mogoče bolje razložiti z upoštevanjem različne razširjenosti kajenja v teh pokrajinah (48). Model učinka očitvidca je podrobneje opisan v poglavju *Učinek očitvidca* (glej zgoraj) (39).

DNA-POPRAVLJALNI MEHANIZMI

Neposredne in posredne poškodbe jedrne in mitohondrijske DNA zaradi sevanja in zaradi s sevanjem povzročene oksidativnega stresa, kot so DSB, abazična mesta in oksidativne poškodbe dušikovih baz in deoksiriboze, zaznajo mehanizmi odziva na poškodbe DNA (angl. *DNA damage response*, DDR) (16, 49, 50). Ti mehanizmi aktivirajo različne DNA-popravljalne mehanizme, odvisno od vrste poškodbe (slika 4) (50). Ionizirajoče sevanje v celicah sesalcev sproži nastanek približno 850 pirimidinskih lezij, 450 purinskih lezij, 1000 SSB in 20–40 DSB na celice na 1 Gy z nizkim LET. Vzorec odlaganja energije sevanja v strukturne

komponente nukleinske kisline določa prostorsko razporeditev lezij v molekuli DNA, ki so lahko razporejene v skupkih na razdalji nekaj nanometrov – zaradi poti žarkov in zaradi strukture kromatina, oz. so razporejene posamično po celotnem kromatinu (51). Slednja razporeditev je značilna predvsem po delovanju ROS. Razlika med endogeno in eksogeno poškodbo je prostorska razporeditev. Pri endogeni poškodbi gre za enakomerno razporeditev vzdolž vijačnice, pri obsevanju pa nastanejo zgoščene poškodbe, ki so za popraviljanje zahtevnejše (52). Abazična mesta, oksidativne poškodbe in SSB prepoznavajo in učinkovito popravljajo številni DNA-popravljalni mehanizmi, kot npr. popraviljanje z izrezovanjem baz (angl. *base excision repair*, BER) po kratki ali dolgi poti (53). Pri obeh poteh prepozna poškodovano bazo ena izmed DNA-glikozilaz in jo odcepi, da nastane abazično mesto. Nato pa delujejo DNA-(apurinsko/apirimidinsko mesto) endonukleaze I (APE1) oz. DNA-(apurinsko/apirimidinsko mesto) liaze (AP-liaze), da nastanejo SSB. SSB se popravijo po kratki poti, tako da nastalo vrzel zapolni DNA-polimeraza β , DNA-ligaza III pa katalizira povezovanje (ligacijo) obeh koncev verig, pri tem verjetno sodeluje tudi strukturna oz. povezovalna beljakovina XRCC1 (angl. *X-ray repair cross-complementing protein 1*). Lahko se aktivira tudi dolga pot BER, pri čemer se odcepi več nukleotidov in pri tem sodelujejo še dejavnik procesivnosti PCNA (angl. *proliferating cell nuclear antigen*), DNA-polimeraza δ/ϵ , endonukleaza FEN1 (angl. *flap structure-specific endonuclease 1*) in DNA-ligaza I. Pri obeh poteh sodeluje tudi poli-ADP-riboza polimeraza I (PARP1), ki prepozna in se veže na SSB ter aktivira BER (53, 54). Večino oksidativnih poškodb, ki jih povzroči obsevanje, torej popravi sistem BER. V hipoksičnem okolju, ki je pogosto značilno za tumorje, lahko nastajajo tudi ciklodeoksinukleozidi, ki jih popravi DNA-popravljalni mehanizem z izrezo-

vanjem nukleotidov (angl. *nucleotide excision repair*, NER). Nepopravljene poškodbe, kot so SSB in poškodovane dušikove baze, lahko ustavijo replikacijske vilice, kar povzroči nastanek DSB. DSB so lahko preprosti, pri katerih se prekineta vezi v obeh verigah DNA, lahko pa so kompleksni, pri čemer pride ob prekinitev tudi do dodatnih poškodb, kot so abazična mesta ali oksidativne poškodbe dušikovih baz (50). Ravno te poškodbe celični mehanizmi najteže pravilno popravijo in kopičenje takšnih poškodb vodi v celično smrt.

Ker različni odmerki obsevanja in različne vrednosti LET različno vplivajo na poškodbe DNA, potekajo številne raziskave, ki preučujejo, na kakšen način bi lahko spodbudili poškodbe DNA, kot so npr. DSB, ki povzročijo največ škode tumorskim celicam (16, 51).

Zaznavanje dvojnih prelomov DNA

V sesalskih celicah pri popraviljanju DSB sodelujeta dva glavna mehanizma, popraviljanje s homologno rekombinacijo (angl. *homologous recombination*, HR) in nehologno spajanje koncev DNA (angl. *non-homologous end joining*, NHEJ). DSB prepoznajo med drugim serin/treoninske kinaze družine fosfatidilinozitol-3-kinaze-sorodnih kinaz (angl. *phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases*, PIKK), kot so npr. beljakovinski kompleks MRN (sestavljeno iz MRE11, RAD50 in NBS1), ATM-kinaza (angl. *ataxia-telangiectasia mutated kinase*), ATR-kinaza (angl. *ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase*) in katalitična podenota od DNA odvisne kinaze (angl. *DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*, DNA-PKcs) (55–58). To vodi do fosforilacije številnih drugih beljakovin, ki sprožijo signalne poti, ki aktivirajo HR oz. NHEJ. Pomembno vlogo ima fosforilacija histona H2AX, ki označi prisotnost DSB in vpokliče popraviljalne beljakovine na mesto poškodbe, povzročene z obsevanjem (53). Serin/treoninska ATM- in ATR-kinaza poleg tega sodelujeta pri zaustavitvi oz.

vzdrževanju stabilnosti replikacijskih vilic, če je bila poškodba zaznana med podvajanjem DNA (59).

Nehomologo popraviljanje s spajanjem koncev DNA

NHEJ deluje tako, da zlepi poškodovana konca molekule DNA. Pri tem ni potrebna homologna matrična DNA, zato ta mehanizem lahko uvede nove napake v DNA, ki potencialno vodijo v kromosomsko nestabilnost, saj zaradi načina popraviljanja DSB brez homologne matrične DNA pogosto nastanejo majhne delecije (mikrodelecije), v nekaterih primerih pa lahko tudi kromosomske translokacije (60, 61). Kljub temu je pri sesalcih pomemben mehanizem popraviljanja DSB, ker lahko deluje v vseh fazah celičnega cikla. Prvi korak mehanizma NHEJ je vezava heterodimerne beljakovine KU70/80 na konca DSB, kar omogoči vezavo z DNA-PKcs (53). Ta kompleks sodeluje pri fosforilaciji številnih beljakovin (npr. H2AX, Artemis, DNA-ligaza IV, NHEJ1 oz. XLF (angl. *non-homologous end joining factor 1* oz. angl. *XRCC4-like factor*)) in aktivaciji popraviljanja s spajanjem koncev DNA. Ena izmed polimeraz, ki sodelujejo pri NHEJ, je DNA-polimeraza μ . Zaradi okvarjenih genov v tumorskih celicah je klasična pot NHEJ pogosto okvarjena, zato se v tem primeru aktivirajo alternativne poti. Ena izmed njih je popraviljanje DNA s spajanjem koncev na podlagi mikrohomologije (angl. *microhomology mediated end joining*, MMEJ oz. angl. *alternative end joining*, a-EJ), pri kateri se na mestu preloma odcepi od 5 do 25 nukleotidov, medtem ko se pri NHEJ običajno odcepijo le štirje nukleotidi. Za MMEJ niso potrebne beljakovine KU, pri popraviljanju pa sodelujejo druge beljakovine, kot so PARP1, XRCC1, DNA-ligaza III, kompleks MRN in DNA-polimeraza θ (62).

Dokazano je bilo, da ima NHEJ pomembno vlogo pri radiorezistenci, saj so nekatere beljakovine tega sistema pogosto čezmerno aktivirane. Hussain s sodelavci je pokazal, da

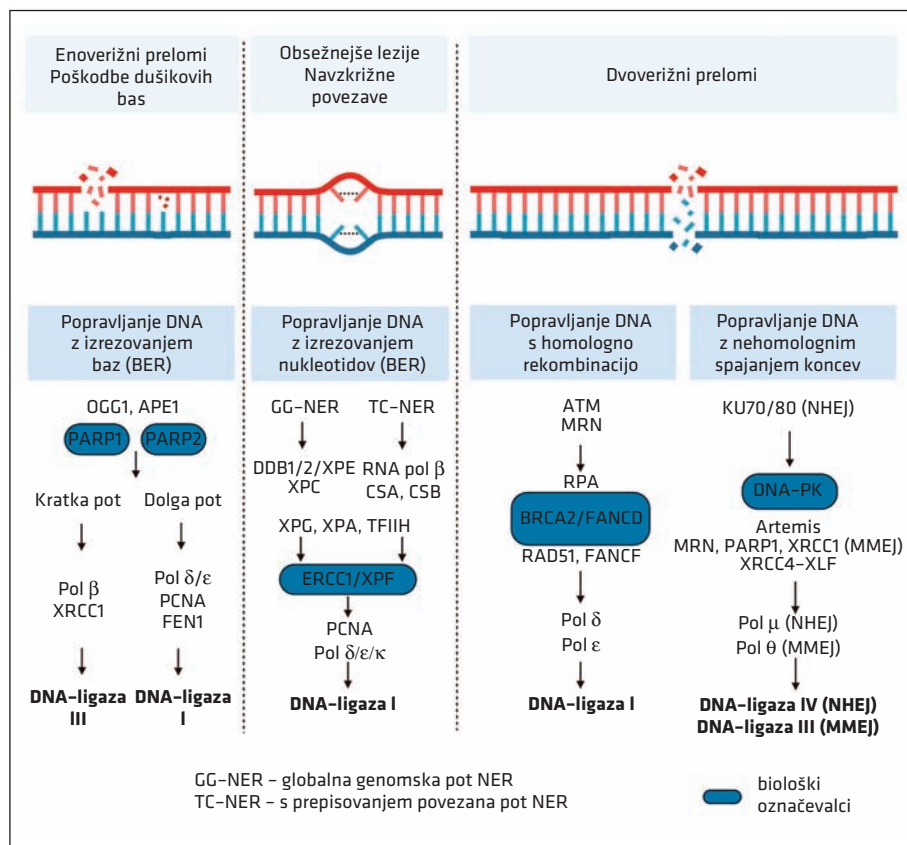
imata NHEJ in MMEJ značilen mutacijski odtis, ki ga lahko zaznamo v celičnih linijah, kar bi lahko omogočilo izbor bolnikov, ki bi jih pred obsevanjem zdravili z zaviralci NHEJ (63). Nekaj zaviralcev NHEJ, kot sta vortmanin, ki zavira delovanje od DNA odvisnih kinaz (angl. *DNA-protein kinase*, DNA-PK) in fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K), ter NU7026, ki specifično zavira DNA-PK, so že preizkušali na celičnih linijah (64–66). Ugotovili so, da je izpostavljanje celic tem zaviralcem okrepilo delovanje obsevanja in celicam povrnilo radiosenzitivnost.

Popraviljanje DNA s homologno rekombinacijo

HR deluje le v fazah G_2 in S celičnega cikla, saj se pri popraviljanju uporabi homologna sestrška kromatida kot matrična DNA (53). Ta način popraviljanja je zato zelo natančen. Za njeno pravilno delovanje sta poleg ostalih beljakovin nujno potrebni beljakovini BRCA1/2 (angl. *breast cancer 1/2*). DSB prepoznajo in vežejo beljakovine kompleksa MRN, ATM- in ATR-kinaza, eksonukleaza 1 (EXO1) ali nukleaza DNA2, helikaza BLM (angl. *bloom syndrome protein*), BRCA1 in CTIP (angl. *carboxy-terminal binding protein*), ki cepijo DNA in sodelujejo pri nastanku enoverižnih 3' koncev DNA (53, 67). Te konce prekrijejo beljakovine RPA (angl. *replication protein A*), da jih zaščitijo, nato pa jih izpodrivajo in se na njihovo mesto vežejo beljakovine RAD51, medtem ko BRCA2, PALB2 (angl. *partner and localizer of BRCA2*), RAD54 in BARD1 (angl. *BRCA1-associated RING domain protein 1*) omogočijo invazijo nukleoproteinskega filameta v homologno sestrško kromatido, da nastane D-zanka (53). DNA-polimeraze dodajajo nukleotide v vrzeli, pri čemer delujeta verigi sestrške kromatide kot matrična DNA, novo nastala konca nato zlepi DNA-ligaza. Pri tem nastanejo Hollidayeve zanke, ki jih stabilizirajo in razklenijo različne endonukleaze (GEN1 (angl. *flap endonuclease GEN homolog 1*), SLX4

(angl. *structure-specific endonuclease subunit SLX4*), beljakovinski kompleks MUS81-EME1 (angl. *crossover junction endonuclease MUS81-essential meiotic structure-specific endonuclease 1*)...) (68).

Nekatere genetske različice v genih za dovzetnost raka dojčk 1/2 (angl. *breast cancer 1, BRCA1/2*) in genu *ATM* (angl. *ataxia telangiectasia mutated*) so povezane s povečanim tveganjem za nastanek raka dojčk,



Slika 4. Shematski prikaz DNA-popravljalnih mehanizmov. Ustvarjeno s spletnim orodjem BioRender.com. BER – popravljanje DNA z izrezovanjem baz (angl. *base excision repair*), OGG1 – 8-oksogvanin DNA-glikozilaza 1, APE1 – DNA-(apurinsko/apirimidinsko mesto) endonukleaza 1, PARP1/2 – poli-ADP-riboza polimeraza 1/2, Pol – DNA-polimeraza, XRCC1 (angl. *X-ray repair cross-complementing protein 1*), PCNA (angl. *proliferating cell nuclear antigen*), FEN1 (angl. *flap structure-specific endonuclease 1*), NER – popravljanje DNA z izrezovanjem nukleotidov (angl. *nucleotide excision repair*), DDB1/2 (angl. *DNA damage-binding protein 1/2*), XPE (angl. *xeroderma pigmentosum complementation group E protein*), XPC (angl. *xeroderma pigmentosum complementation group C protein*), CSA (angl. *Cockayne syndrome group A*), CSB (angl. *Cockayne syndrome group B*), XPG (angl. *xeroderma pigmentosum complementation group G protein*), XPA (angl. *xeroderma pigmentosum complementation group A protein*), TFIIH – prepisovalni dejavnik II H (angl. *transcription factor II H*), ERCC1 (angl. *excision repair cross-complementation group 1*), XPF (angl. *xeroderma pigmentosum complementation group F protein*), ATM – ATM-kinaza (angl. *ataxia-telangiectasia mutated kinase*), MRN – beljakovinski kompleks MRN (sestavljen iz beljakovin MRE11, RAD50 in NBS1), BRCA2 (angl. *breast cancer 2*), FANCD (angl. *Fanconi anemia group D protein*), NHEJ – nehomologno spajanje koncev (angl. *non-homologous end joining*), DNA-PK – od DNA odvisna kinaza (angl. *DNA-dependent protein kinase*), MMEJ – spajanje koncev na podlagi mikrohomologije (angl. *microhomology-mediated end joining*), XRCC4-XFL (angl. *X-ray repair cross-complementing protein 4-XRCC4-like factor*).

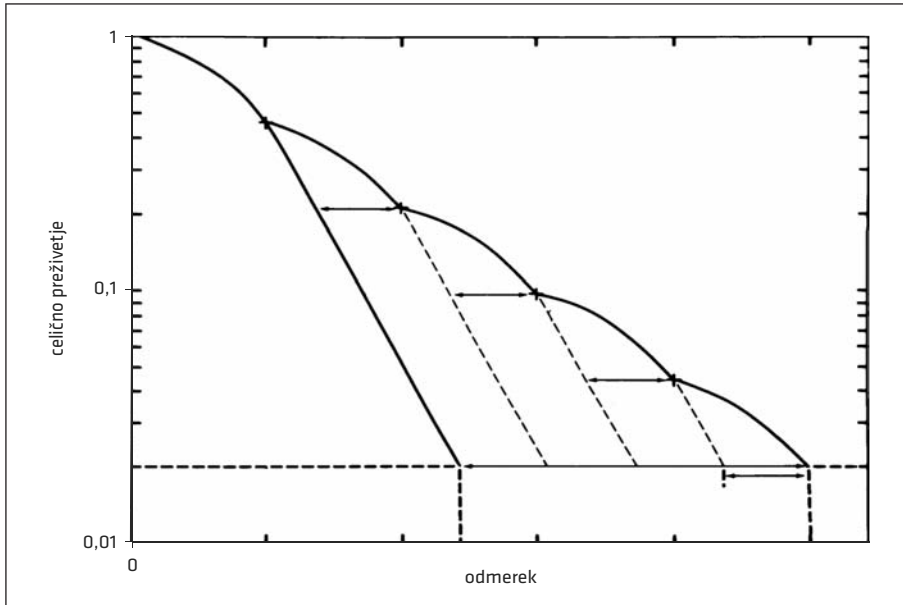
jajčnikov, črevesa, prostate, in ker so te beljakovine pomembne pri popravljanju DSB s HR, bi lahko bile tumorske celice občutljivejše za obsevanje (69). Raziskave so pokazale nasprotujoče si rezultate, saj so v eni raziskavi odkrili, da bi lahko obsevanje žensk, mlajših od 30 let, ki so nosilke mutacij v genih *BRCA1/2*, sprožilo razvoj sekundarnih rakov (70). Kasnejše raziskave na večjih kohortah bolnic so to hipotezo sicer ovrgle (71, 72). Nasprotujoče rezultate so pokazale tudi raziskave obsevanja bolnic z rakom dojk in nosilkami genetskih sprememb v genu *ATM*, saj so v nekaterih študijah odkrili, da so tumorji bolj radio-rezistentni, medtem ko so bili v drugih občutljivi in povezani z manj ponovitvami bolezni po obsevanju v primerjavi z bolnicami, ki so prejele le kemoterapijo (69).

PET R-JEV RADIOBIOLOGIJE

Leta 1975 je Withers objavil članek z naslovom »Štirje R-ji radioterapije« (angl. »*The 4 R's of Radiotherapy*«). V članku so bili prvič zajeti najpomembnejši dejavniki, ki določajo odziv biološkega tkiva na večkratne odmerke sevanja – in tako predstavljajo biološko osnovo za radioterapijo raka in omogočajo razumevanje za učinkovitost oz. neučinkovitost pri zdravljenju raka z obsevanjem. Pojem štirih R-jev zajema popravljanje (angl. *repair*), reoksigenacijo (angl. *reoxygenation*), prerazporeditev (angl. *redistribution*) in regeneracijo (angl. *regeneration*). Pojav regeneracije se je kasneje preimenoval v repopulacijo (angl. *repopulation*) (73, 74). Leta 1989 so Steel in sodelavci predlagali, da se doda še peti R – radiosenzitivnost (angl. *radiosensitivity*) (74). Posledično se v sodobni literaturi opisuje pet R-jev radioterapije: popravilo subletalnih poškodb, reoksigenacija, prerazporeditev celičnega cikla, repopulacija in radiosenzitivnost različnih celičnih tipov. Nekateri avtorji predlagajo še šesti R, ki se nanaša na reaktivacijo protitumorskega imunskega odziva (angl. *reactivation of the immune system*) (74–77).

Popravljanje subletalnih poškodb

Uničenje celic zaradi ionizirajočega sevanja temelji na nastanku nepopravljivih lezij oz. prelomov DNA. Večina poškodb DNA je sicer subletalnih in jih tumorske celice, ko je obsevanje v začetnih frakcijah in pri nižjih odmerkih, lahko popravijo z zgoraj opisanimi mehanizmi. Ko se čez čas – med zdravljenjem z obsevanjem – odmerek viša in poškodbe DNA kopičijo, pa to lahko vodi v celično smrt (78). Ionizacije, ki jih povzročata sevanje, so v obsevanem tkivu porazdeljene naključno, zato je uničenje tumorskih celic naključen proces. Ker je uničevanje celic sorazmerno, je razmerje med odmerkom in preživetjem celic običajno prikazano na logaritemski skali preživetja celic v odvisnosti od odmerka – t. i. krivulja preživetja celic (slika 5) (73). Za razliko od zdravih so tumorske celice običajno manj učinkovite pri popravljanju subletalnih poškodb, ker je zanje pogosto značilno, da imajo okvarjene gene za beljakovine, ki sodelujejo pri DNA-popravljalnih mehanizmi. Dokazano pa je, da se tumorske celice zelo razlikujejo po svoji intrinzični celični radio-rezistenci – tako so lahko nekateri tumorji tudi zelo učinkoviti pri DNA-popravljanju. Številne raziskave so pokazale, da k tumorski radiorezistenci prispeva tudi tumorsko mikrookolje (78–81). Čeprav so dobro poznani blagodejni učinki obsevanja na celice tumorskega mikrookolja, kot so reaktivacija protitumorskega imunskega odziva in drugi, pa ima obsevanje lahko tudi nasproten učinek, in sicer spodbudi infiltracijo tumorjev z imunosupresivnimi imunskimi celicami, ali da spodbudi reprogramiranje s tumorji povezanih fibroblastov (angl. *cancer-associated fibroblasts*, CAF), da izločajo signalne molekule, ki omogočajo in spodbujajo rast tumorskih celic, omogočajo in povečajo njihovo invazivnost, zagotavljajo presnovke za rast in prilagajajo imunski odziv (81, 82). Tako bo izid radioterapevtskega zdravljenja rezultat, ki je odvisen od obsega



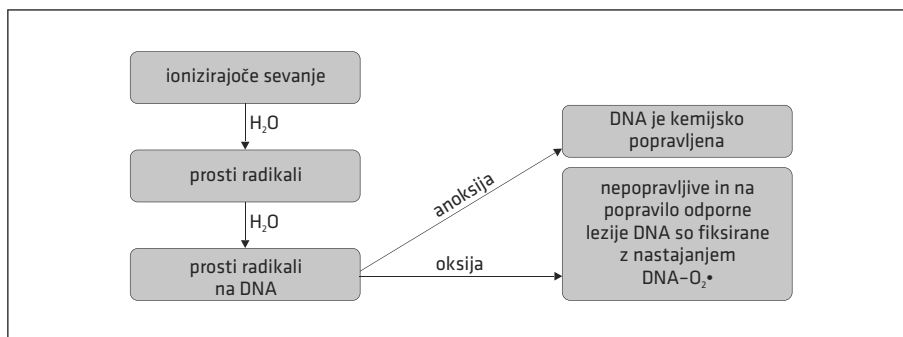
Slika 5. Teoretične krivulje preživetja. Krivulje odmerka in preživetja za celice sesalcev, izpostavljene rentgenskim žarkom ali žarkom gama, običajno kažejo na začetno položnost, čemur sledi strmejšo področje. Naraščajoča učinkovitost odmerka (vidna kot večji naklon krivulje) pomeni, da se v celicah kopičijo subletalne poškodbe, ki vodijo v njihovo smrt. Značilnost večine zdravih celic sesalcev je, da se lahko po nekaj urah po izpostavljenosti sevanju poškodbe popravijo in celice se na ponovno obsevanje odzivajo tako, kot da niso bile predhodno obsevane. To lahko opazujemo kot ponovno izravnanje krivulje preživetja naslednjega odmerka sevanja (73).

poškodb ter učinkovitosti tumorskih celic in tumorskega mikrookolja, da popravijo poškodovano DNA, zavirajo imunski odziv in podpirajo rast tumorskih celic (78).

Reoksigenacija

Kisik je nujno potreben za tvorbo prostih radikalov, ki jih povzroči sevanje. Če je oksigenacija tkiv slabša, je slabši tudi učinek obsevanja. Znano je, da hipoksične celice kažejo 2- do 3-krat večjo radiorezistenco (78). Kisik povzroča radiosenzitizacijo celic, saj lahko fiksira poškodbo, ki bi jo drugače v hipoksičnih razmerah popravili znotrajcelični antioksidanti (hipoteza o fiksaciji kisika) (slika 6), hkrati pa vodi v povečano nastajanje in prisotnost ROS (83, 84). Mikrookolje tumorja je dinamično, s stalno spreminjajočimi se gradienti kisika in vrednostmi pH. Nekateri tumorji vse-

bujejo kronično ali akutno hipoksične podpopulacije, ki potrebujejo višje sevalne odmerke za njihovo uničenje. Prehodne epizode akutne hipoksije tumorja, ki izhajajo iz prekinjenega dotoka krvi, se lahko hitro ponovno oksigenirajo, medtem ko lahko kronična hipoksija zaradi omejene difuzije kisika zahteva daljše obdobje za reoksigenacijo (83). Pomen tumorske reoksigenacije za radioterapijo je, da se s frakcioniranim obsevanjem celic, ki so bile odporne zaradi hipoksije med izpostavljenostjo prejšnjemu odmerku, do naslednjega odmerka lahko oksigenirajo (ker celice odmirajo in pride do prej hipoksične celice več kisika) in tako postanejo bolj radiosenzibilne. Reoksigenacija akutno hipoksičnih celic med dnevnimi odmerki je zato izredno pomemben vidik frakcionirane radioterapije (73, 78, 83, 85).



Slika 6. Shematski prikaz hipoteze o fiksaciji kisika. Ko so celice obsevane, nastanejo reaktivne kisikove vrste. Ti zelo reaktivni prosti radikali medsebojno delujejo z DNA, kar vodi v nastanek prostih radikalov na DNA. V odsotnosti O_2 je te visoko nestabilne radikale DNA mogoče kemično obnoviti z oksidacijo sulfhidrilnih spojin (R-SH) ali z drugimi reducirajočimi molekulami. V oksidacijskih pogojih O_2 medsebojno deluje z radikali DNA in jih kemično pretvori v nepopravljive oksidirane derivate, kot da so te lezije DNA »fiksirane« (83).

Prerazporeditev celičnega cikla

Občutljivost rakastih celic se spreminja skozi celični cikel. Celice so v mitozni (faza M) in fazi G_2 najbolj občutljive, mirujoče celice v fazi G_1 manj, v pozni fazi S pa najmanj občutljive – tudi do 2,5-krat manj kot celice v fazi G_2 ali mitozni. Napredovanje celic iz faze G_2 , M, G_1 v fazo S jim tako zagotavlja večjo stopnjo zaščite pred sevanjem. Posledično so celice, ki preživijo odmerek obsevanja v asinhronih populacijah celic, v odpornejših fazah celičnega cikla. Pri frakcionirani radioterapiji tumorjev s hitrim razmnoževanjem celic heterogenost v kinetiki celičnega cikla vodi k redistribuciji (sinhronizaciji celic v celičnem ciklu) (86). Ko je asinhrona populacija celic izpostavljena sevanju, imajo celice v občutljivih fazah celičnega cikla bistveno večjo verjetnost smrti zaradi sevanja. Z naslednjo frakcijo, ki je čez 24 ur, tumorske celice, ki se hitreje delijo kot zdrave celice, že vstopijo v občutljivejšo fazo celičnega cikla. To ponovno vodi v smrt tumorskih celic (73, 85).

Repopulacija

Repopulacija tumorskih celic je eden glavnih vzrokov za omejeno učinkovitost konvencionalnih frakcioniranih oblik radiote-

rapije. Tako normalna tkiva kot tudi tumorji imajo lahko zmožnost regeneracije kot odziv na zmanjšanje populacije celic. Hitrost regeneracije se med tkivi razlikuje. Nekatera normalna tkiva v obdobju običajnih šest tednov trajanja radioterapije ne kažejo opazne delitvene dejavnosti, kar vodi v omejeno depopulacijo in omejeno repopulacijo. Druga tkiva, ki se običajno stalno delijo, pa v obdobju terapije kažejo depopulacijo in kompenzacijsko repopulacijo. Če se regeneracija začne zgodaj in je hitra, je uspeh radioterapije manjši (73, 78).

Že desetletja se predpostavlja, da depopulacija določenih hierarhično normalnih tkiv, kot je tanko črevo, z ionizirajočim sevanjem sproži prehod matičnih celic iz asimetričnega načina delitve celic, pri katerem nastane matična celica in celica, usmerjena v diferenciacijo, v simetrični način delitve celic, ki vodi v nastanek dveh proliferativnih hčerinskih matičnih celic. Izguba celic iz proliferativnega predelka normalnih tkiv se zdi znižana, dokler ni regeneracija končana. Podoben mehanizem je bil predlagan tudi za tumorje in vodi v pospešeno repopulacijo, pri čemer hitrost repopulacije tumorja po zdravljenju s subletalnimi odmerki sevanja preseže rast nezdravljivega tumorja (78).

Radiosenzitivnost različnih celičnih tipov

Celice različnih vrst tumorjev se bistveno razlikujejo v svoji prirojeni radiosenzitivnosti, tj. v strmini krivulje preživetja celic. Celice, izolirane iz klinično manj agresivnih tumorjev, so imele pomembno bolj strmo začetno krivuljo kot celice iz agresivnejših tumorjev. Raziskave so potrdile, da bi lahko različne krivulje preživetja pojasnile klinično opažene odzive različnih tumorjev na zdravljenje. Dodatno je mogoče opaziti, da so razlike v strminah krivulj pri nižjih odmerkih znatnejše (74, 87). Izraz radiosenzitivnost lahko torej ima več pomenov. Najbolj neposreden pomen je strmina krivulje akutnega preživetja po obsevanju, klinično bistven pomen ima krivulja preživetja pri nizkih odmerkih sevanja, tretji pomen pa bi lahko bil občutljivost na začetno vzbuditev poškodb (74).

Celice lahko postanejo radiorezistentne, saj ionizirajoče sevanje vodi tudi v prilagoditvene celične spremembe v rakavih celicah. To lahko vodi v odpornost proti zdravljenju, saj se lahko aktivirajo signalne poti, ki rakavim celicam zagotavljajo proliferativno prednost. Tumorji lahko postanejo radiorezistentni zaradi od liganda neodvisne aktivacije signalnih poti, npr. tistih, ki so uravnane z membransko vezanimi receptorskimi tirozin kinazami (RTK). Pogosto so spremenjene tudi poti, v katerih so vključeni receptorji za epidermalni rastni dejavnik (angl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR), PI3K, protein kinaza B (PKB oz. Akt-kinaza), mTOR-kinaza (angl. *mammalian/mechanistic target of rapamycin kinase*), STAT (angl. *signal transducer and activator of transcription*) in z mitogenom aktivirana proteinska kinaza (angl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK). Te poti so povezane z najpomembnejšimi značilnostmi (angl. *hallmarks*) raka, vključno s celičnim ciklom, preživetjem, presnovo, invazijo, angiogenezo in genomsko nestabilnostjo (1).

KLINIČNI VIDIK RADIOTERAPIJE

Radioterapijo se uporablja v približno polovici primerov na kateri koli točki zdravljenja rakavih obolenj. Gre za lokalno zdravljenje, ki deluje na točno določen predel telesa. Obsevanje na ostale dele telesa praktično nima učinka (razen v redkih primerih, ko pride do daljnotarčnega učinka, glej zgoraj). Glede na lokacijo vira sevanja delimo radioterapijo na teleradioterapijo oz. zunanje obsevanje – ko je vir ionizirajočega sevanja izven bolnika, kar predstavlja večino radioterapevtskega zdravljenja; ter brahiterapijo, kjer vir sevanja (izotop) dostavimo neposredno v ali ob rakasto tkivo in lahko tako do določenega tkiva dostavimo zelo visoke odmerke, ne da bi prekomerno prizadeli okolno zdravo tkivo. Glede na namen ločimo več vrst obsevanja: radikalno, kjer je cilj ozdravitev; pooperativno, ki je namenjeno zmanjšanju verjetnosti ponovitve bolezni; ter paliativno obsevanje, ki je usmerjeno v lajšanje oz. zaustavitev simptomov in znakov. Najpogosteje se uporablja frakcija odmerka 2 Gy enkrat dnevno. Vsak rak ima svojo zahtevano raven odmerka, ki jo je treba doseči z radioterapijo, da se tumor uniči. Pri radikalnem zdravljenju je ta raven odmerka običajno med 60 in 76 Gy, medtem ko je pri pooperativnem obsevanju dovolj 60 Gy. Pri paliativnem obsevanju so dnevni odmerki običajno višji in celokupno prejet odmerek nižji.

ZAKLJUČKI

V članku so bile predstavljene različne plati bioloških zakonitosti, ki sodelujejo pri povzročitvi in popravilu znotrajceličnih poškodb po radioterapevtskem zdravljenju z ionizirajočim sevanjem. Uporabi se pri visokem odstotku bolnikov, ki so zboleli za rakom. Biološke osnove so čedalje bolj raziskane, kar je pomembno za prepoznavo morebitnih terapevtskih tarč. Radioterapevtsko zdravljenje se pogosto združuje z zdravili, ki šibijo popravljalne mehanizme v ciljanih celicah.

LITERATURA

1. Baskar R, Dai J, Wenlong N, et al. Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Front Mol Biosci*. 2014; 1: 24.
2. Zupanič Slavec Z. Zgodovina zdravstva in medicine na slovenskem, infektologija, nevrologija, onkologija, dermatovenerologija, zobozdravstvo, strokovnoscine in the slovene lands, infectiology, neurology, oncology, dermatovenerology, dentistry, professional health sciences, preužba; Društvo Mohorjeva družba; 2022.
3. Zakariya NI, Kahn M. Benefits and biological effects of ionizing radiation. *Scholars academic journal of biosciences*. 2014; 2 (9): 583–91.
4. Termania: Slovenski medicinski slovar [internet]. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, c2012–2023. Dosegljivo na: <https://www.termania.net/slovarji/95/slovenski-medicinski-slovar>
5. ISO I. 21348: 2007–space environment (natural and artificial)–process for determining solar irradiances. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland. 2007: 12.
6. Ball DW. The electromagnetic spectrum: A history. *Spectroscopy*. 2007; 22 (3): 14.
7. Reisz JA, Bansal N, Qian J, et al. Effects of ionizing radiation on biological molecules–mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 21 (2): 260–92.
8. Dunne-Daly CF, ed. Principles of radiotherapy and radiobiology. *Seminars in oncology nursing*; 1999: Elsevier.
9. Sgouros G. Alpha particles for targeted therapy. *Advanced drug delivery reviews*. 2008; 60 (12): 1402–6.
10. Fendler WP, Cutler C. More α than β for prostate cancer? *Journal of Nuclear Medicine*. 2017; 58 (11): 1709–10.
11. Hashempour M, Ghorbani M, Amato E, et al. Effect of beta particles spectrum on absorbed fraction in internal radiotherapy. *Asia Oceania Journal of Nuclear Medicine and Biology*. 2019; 7 (1): 71.
12. Allen JY, Dainiak N, Wingard JR, et al. Clinical manifestations, evaluation, and diagnosis of acute radiation exposure [internet]. Danz DF, Chao NJ Editorler Up To Date; c2023–2023 [citirano 2023 Jul 11]. Dosegljivo na: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-evaluation-and-diagnosis-of-acute-radiation-exposure>
13. Choudhary S. Deterministic and stochastic effects of radiation. *Cancer Therapy & Oncology International Journal*. 2018; 12 (2): 31–2.
14. Zhang M, Qureshi AA, Geller AC, et al. Use of tanning beds and incidence of skin cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2012; 30 (14): 1588.
15. Karagas MR, Stannard VA, Mott LA, et al. Use of tanning devices and risk of basal cell and squamous cell skin cancers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002; 94 (3): 224–6.
16. Kim W, Lee S, Seo D, et al. Cellular stress responses in radiotherapy. *Cells*. 2019; 8 (9): 1105.
17. Michalowski A. Effects of radiation on normal tissues: Hypothetical mechanisms and limitations of in situ assays of clonogenicity. *Radiation and environmental biophysics*. 1981; 19 (3): 157–72.
18. Wheldon T, Michalowski A, Kirk J. The effect of irradiation on function in self-renewing normal tissues with differing proliferative organisation. *The British journal of radiology*. 1982; 55 (658): 759–66.
19. Obrador E, Salvador R, Villaescusa JI, et al. Radioprotection and radiomitigation: From the bench to clinical practice. *Biomedicines*. 2020; 8 (11): 461.
20. Barcellos-Hoff MH, Park C, Wright EG. Radiation and the microenvironment–tumorigenesis and therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2005; 5 (11): 867–75.
21. Desouky O, Ding N, Zhou G. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2015; 8 (2): 247–54.
22. Lieberman M, Marks AD, Peet A. Marks' basic medical biochemistry: A clinical approach. 4th ed. Philadelphia [etc.]: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
23. Nagasawa H, Little JB. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of α -particles. *Cancer research*. 1992; 52 (22): 6394–6.
24. Marín A, Martín M, Liñán O, et al. Bystander effects and radiotherapy. *reports of Practical Oncology and radiotherapy*. 2015; 20 (1): 12–21.
25. Le M, Fernandez-Palomo C, McNeill FE, et al. Exosomes are released by bystander cells exposed to radiation-induced biophoton signals: Reconciling the mechanisms mediating the bystander effect. *PLoS one*. 2017; 12 (3): e0173685.
26. Smolarz M, Skoczylas Ł, Gawin M, et al. Radiation-induced bystander effect mediated by exosomes involves the replication stress in recipient cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23 (8): 4169.

27. Kumar Jella K, Rani S, O'driscoll L, et al. Exosomes are involved in mediating radiation induced bystander signaling in human keratinocyte cells. *Radiation research*. 2014; 181 (2): 138–45.
28. Al-Mayah AH, Irons SL, Pink RC, et al. Possible role of exosomes containing rna in mediating nontargeted effect of ionizing radiation. *Radiation research*. 2012; 177 (5): 539–45.
29. Mutschelknaus L, Peters C, Winkler K, et al. Exosomes derived from squamous head and neck cancer promote cell survival after ionizing radiation. *PloS one*. 2016; 11 (3): e0152213.
30. Craig DJ, Nanavaty NS, Devanaboyina M, et al. The abscopal effect of radiation therapy. *Future Oncology*. 2021; 17 (13): 1683–94.
31. Mole R. Whole body irradiation—radiobiology or medicine? *The British journal of radiology*. 1953; 26 (305): 234–41.
32. Nabrinsky E, Macklis J, Bitran J. A review of the abscopal effect in the era of immunotherapy. *Cureus*. 2022; 14 (9).
33. Ngwa W, Irabor OC, Schoenfeld JD, et al. Using immunotherapy to boost the abscopal effect. *Nature Reviews Cancer*. 2018; 18 (5): 313–22.
34. Khalil DN, Budhu S, Gasmil B, et al. The new era of cancer immunotherapy: Manipulating t-cell activity to overcome malignancy. *Advances in cancer research*. 2015; 128: 1–68.
35. Seiwert TY, Kiess AP. Time to debunk an urban myth? The »abscopal effect« with radiation and anti–pd-1. *Journal*. 2021; 39 (Issue): 1–3.
36. McBride S, Sherman E, Tsai CJ, et al. Randomized phase ii trial of nivolumab with stereotactic body radiotherapy versus nivolumab alone in metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2021; 39 (1): 30.
37. Smith H MA, Bell D, et al. Acute radiation syndrome. *Journal*. 2018; (Issue).
38. Donnelly EH, Nemhauser JB, Smith JM, et al. Acute radiation syndrome: Assessment and management. *Southern medical journal*. 2010; 103 (6): 541.
39. Jones J CR, Murphy A, et al. Stochastic effects [internet]. *Radiopaedia.org*, c2008–2023 [citirano 2023 Jul 9]. Dosegljivo na: <https://radiopaedia.org/articles/5099>
40. Seong KM, Seo S, Lee D, et al. Is the linear no-threshold dose-response paradigm still necessary for the assessment of health effects of low dose radiation? *Journal of Korean medical science*. 2016; 31 (Suppl 1): S10–S23.
41. Calabrese EJ, O'Connor MK. Estimating risk of low radiation doses - a critical review of the beir vii report and its use of the linear no-threshold (Int) hypothesis. *Radiat Res*. 2014; 182 (5): 463–74.
42. Lall R, Ganapathy S, Yang M, et al. Low-dose radiation exposure induces a hif-1-mediated adaptive and protective metabolic response. *Cell Death & Differentiation*. 2014; 21 (5): 836–44.
43. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, et al. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*. 2004; 73: 39–85.
44. Luckey T. Abundant health from radioactive waste. *International Journal of Low Radiation*. 2008; 5 (1): 71–82.
45. Vaiserman AM. Radiation hormesis: Historical perspective and implications for low-dose cancer risk assessment. *Dose Response*. 2010; 8 (2): 172–91.
46. Cohen BL. Test of the linear-no threshold theory of radiation carcinogenesis for inhaled radon decay products. *Health Physics*. 1995; 68 (2): 157–74.
47. Luckey T, ed. Radiation hormesis: Biopositive effect of radiations. *Signals and Images: Selected Papers from the 7th and 8th GIRI Meeting, held in Montpellier, France, November 20–21, 1993, and Jerusalem, Israel, December 10–11, 1994; 1993: Springer*.
48. Puskin J. Smoking as a confounder in ecologic correlations of cancer mortality rates with average county radon levels. *Health Physics*. 2003; 84 (4): 526–32.
49. Li L-Y, Guan Y-d, Chen X-S, et al. DNA repair pathways in cancer therapy and resistance. *Frontiers in pharmacology*. 2021; 11: 629266.
50. Huang R, Zhou P-K. DNA damage repair: Historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021; 6 (1): 254.
51. Lomax M, Folkes L, O'Neill P. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: Relevance to radiotherapy. *Clinical oncology*. 2013; 25 (10): 578–85.
52. O'Neill LMFL. P. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: Relevance to radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2013; 25 (10): 578–85.
53. Biau J, Chautard E, Verrelle P, et al. Altering DNA repair to improve radiation therapy: Specific and multiple pathway targeting. *Frontiers in Oncology*. 2019; 9: 1009.

54. Schiewer MJ, Mandigo AC, Gordon N, et al. Parp-1 regulates DNA repair factor availability. *EMBO molecular medicine*. 2018; 10 (12): e8816.
55. Angira D, Shaik A, Thiruvankatam V. Structural and strategic landscape of pikk protein family and their inhibitors: An overview. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2020; 25 (8): 1538–67.
56. Cortez D, Glick G, Elledge SJ. Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the atm and atr checkpoint kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004; 101 (27): 10078–83.
57. Shibata A, Jeggo PA. Atm's role in the repair of DNA double-strand breaks. *Genes*. 2021; 12 (9): 1370.
58. Van Der Burg M, Ijspeert H, Verkaik NS, et al. A DNA-pkcs mutation in a radiosensitive t-b-scid patient inhibits artemis activation and nonhomologous end-joining. *The Journal of clinical investigation*. 2009; 119 (1): 91–8.
59. Couch FB, Bansbach CE, Driscoll R, et al. Atr phosphorylates smarca1 to prevent replication fork collapse. *Genes & development*. 2013; 27 (14): 1610–23.
60. Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells au-mao, zhiyong. *Cell Cycle*. 2008; 7: 2902–6.
61. Jan H. HJ genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001; 411 (6835): 366–74.
62. Haince J-F, McDonald D, Rodrigue A, et al. Parp1-dependent kinetics of recruitment of mre11 and nbs1 proteins to multiple DNA damage sites. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283 (2): 1197–208.
63. Hussain SS, Majumdar R, Moore GM, et al. Measuring nonhomologous end-joining, homologous recombination and alternative end-joining simultaneously at an endogenous locus in any transfectable human cell. *Nucleic Acids Research*. 2021; 49 (13): e74–e.
64. Kostyushev D, Kostyusheva A, Brezgin S, et al. Suppressing the nhej pathway by DNA-pkcs inhibitor nu7026 prevents degradation of hbv cccdna cleaved by crispr/cas9. *Scientific reports*. 2019; 9 (1): 1847.
65. Manjunath M, Choudhary B, Raghavan SC. Scr7, a potent cancer therapeutic agent and a biochemical inhibitor of nonhomologous DNA end-joining. *Cancer Reports*. 2021; 4 (3): e1341.
66. Niazi M, Mok G, Heravi M, et al. Effects of dna-line n87. *Current Oncology*. 2014; 21 (2): 91–6.
67. Toh M, Ngeow J. Homologous recombination deficiency: Cancer predispositions and treatment implications. *The oncologist*. 2021; 26 (9): e1526–e37.
68. Lilley DM. Holliday junction-resolving enzymes—structures and mechanisms. *FEBS letters*. 2017; 591 (8): 1073–82.
69. Lazzari G, Buono G, Zannino B, et al. Breast cancer adjuvant radiotherapy in brca1/2, tp53, atm genes mutations: Are there solved issues? *Breast Cancer: Targets and Therapy*. 2021: 299–310.
70. Pijpe A, Andrieu N, Easton DF, et al. Exposure to diagnostic radiation and risk of breast cancer among carriers of brca1/2 mutations: Retrospective cohort study (gene-rad-risk). *Bmj*. 2012; 345.
71. Chapman BV, Liu D, Shen Y, et al. Outcomes after breast radiation therapy in a diverse patient cohort with a germline brca1/2 mutation. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2022; 112 (2): 426–36.
72. Schlosser S, Rabinovitch R, Shatz Z, et al. Radiation-associated secondary malignancies in brca mutation carriers treated for breast cancer. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2020; 107 (2): 353–9.
73. Withers HR. The four r's of radiotherapy. *Advances in radiation biology*. 5: Elsevier; 1975. p. 241–71.
74. Steel GG, McMillan TJ, Peacock J. The 5r's of radiobiology. *International journal of radiation biology*. 1989; 56 (6): 1045–8.
75. Montero A, Alvarez B. The 5r's dilemma of radiotherapy for non-malignant diseases: 5r's to darken or 5r's to shine. *reports of Practical Oncology and radiotherapy*. 2023; 28 (1): 74–8.
76. Boustani J, Grapin M, Laurent PA, et al. The 6th r of radiobiology: Reactivation of anti-tumor immune response. *Cancers (Basel)*. 2019; 11 (6).
77. Marcu LG. Contemporary issues in head and neck cancer management. *InTech*; 2015. Dosegljivo na: <http://dx.doi.org/10.5772/58653>
78. Pajonk F, Vlashi E, McBride WH. Radiation resistance of cancer stem cells: The 4 r's of radiobiology revisited. *Stem cells*. 2010; 28 (4): 639–48.
79. Chargini C, Clemenson C, Martins I, et al. Understanding the functions of tumor stroma in resistance to ionizing radiation: Emerging targets for pharmacological modulation. *Drug Resistance Updates*. 2013; 16 (1-2): 10–21.
80. Kamochi N, Nakashima M, Aoki S, et al. Irradiated fibroblast-induced bystander effects on invasive growth of squamous cell carcinoma under cancer–stromal cell interaction. *Cancer science*. 2008; 99 (12): 2417–27.
81. Krisnawan VE, Stanley JA, Schwarz JK, et al. Tumor microenvironment as a regulator of radiation therapy: New insights into stromal-mediated radioresistance. *Cancers*. 2020; 12 (10): 2916.

82. Weichselbaum RR, Liang H, Deng L, et al. Radiotherapy and immunotherapy: A beneficial liaison? *Nature reviews Clinical oncology*. 2017; 14 (6): 365–79.
83. Liu C, Lin Q, Yun Z. Cellular and molecular mechanisms underlying oxygen-dependent radiosensitivity. *Radiation research*. 2015; 183 (5): 487–96.
84. Grimes DR, Partridge M. A mechanistic investigation of the oxygen fixation hypothesis and oxygen enhancement ratio. *Biomedical physics & engineering express*. 2015; 1 (4): 045209.
85. Herskind C, Ma L, Liu Q, et al. Biology of high single doses of iort: Rbe, 5 r's, and other biological aspects. *Radiation Oncology*. 2017; 12: 1–14.
86. Lonati L, Barbieri S, Guardamagna I, et al. Radiation induced cell cycle perturbations: A computational tool validated with flow cytometry data. *Scientific reports*. 2021; 11 (1): 925.
87. Todorović V, Prcv A, Nikšić Žakelj M, et al. Induction of radioresistance and cisplatin resistance in hnscc cell line after ionizing radiation. *Journal of cancer metastasis and treatment*. 2016; 2 (1): 18–9.

Prispelo 19. 7. 2023