

[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#01]

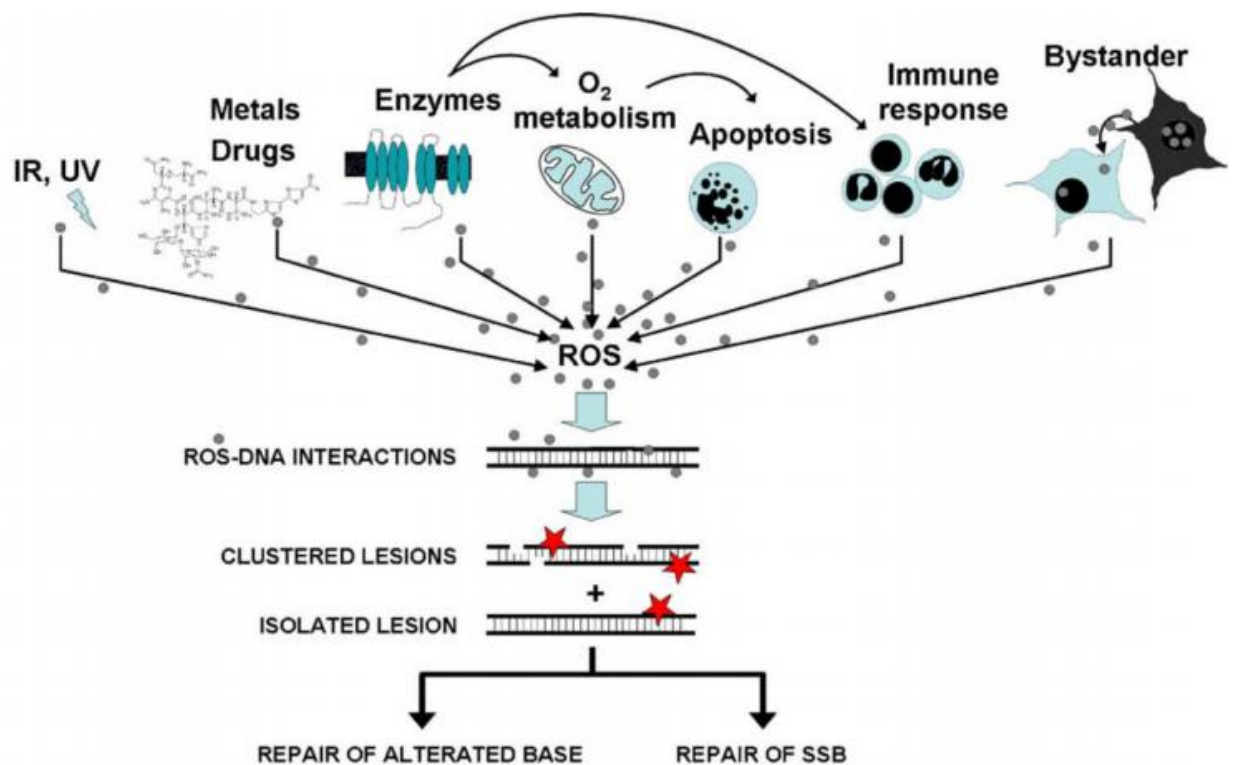
### Кисневий ефект

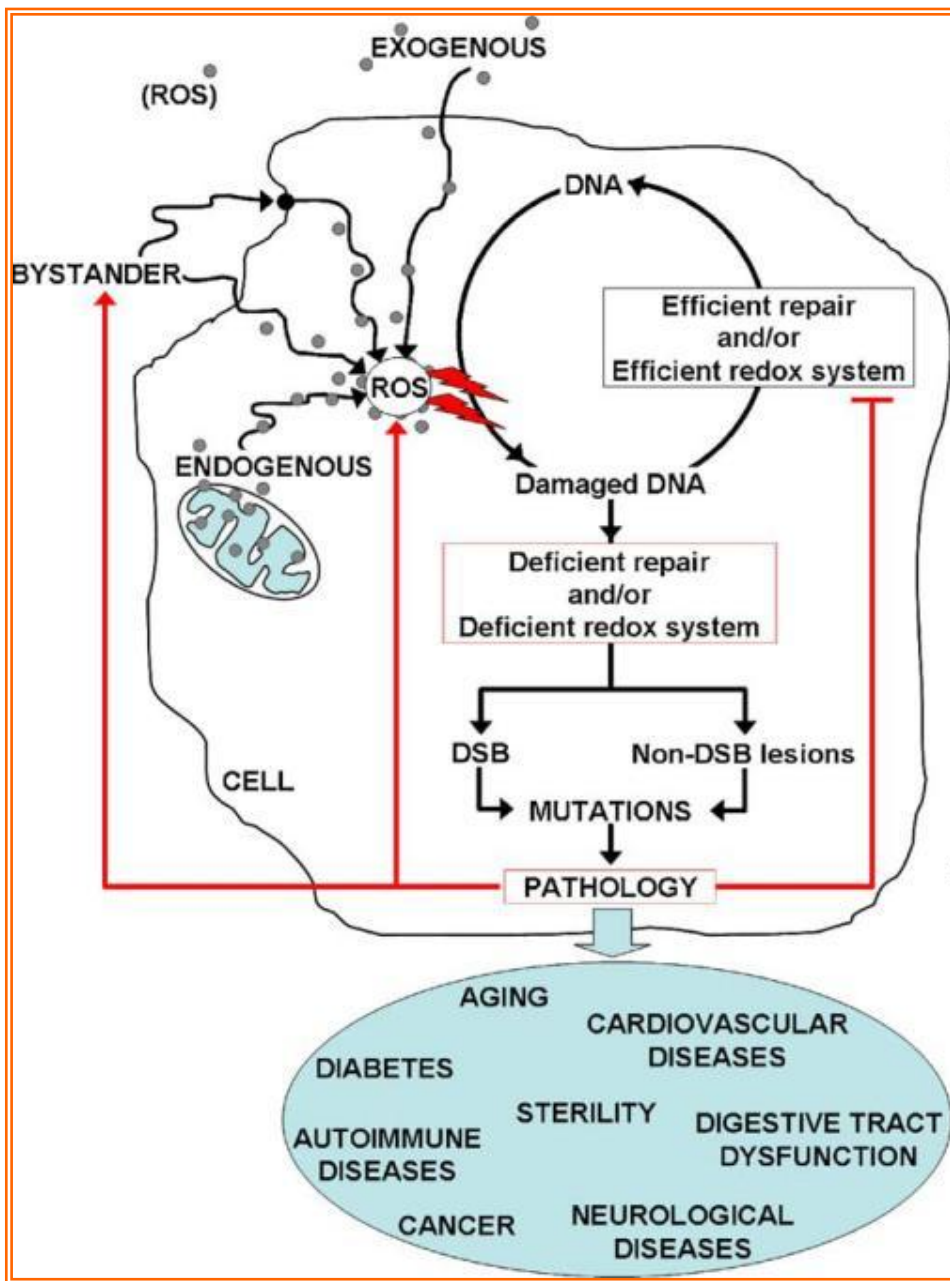
1. Поширеність кисневого ефекту.
2. Кисневий ефект у радіаційно-хімічних реакціях.
3. Коефіцієнт кисневого посилення.
4. Залежність кисневого ефекту від концентрації кисню.

[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#02]

**Кисневий ефект** – це посилення променевого враження при підвищенні концентрації кисню порівняно з враженням в анаеробних умовах.

Принцип дії – перетворення потенційно летальних пошкоджень в летальні.





[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#03]

**Залежність радіочутливості від напруження кисню (рівняння Альпера і Говарда-Фландерса)**

$$\frac{D_0}{D} = \frac{K + m[O_2]}{m(K + [O_2])}$$

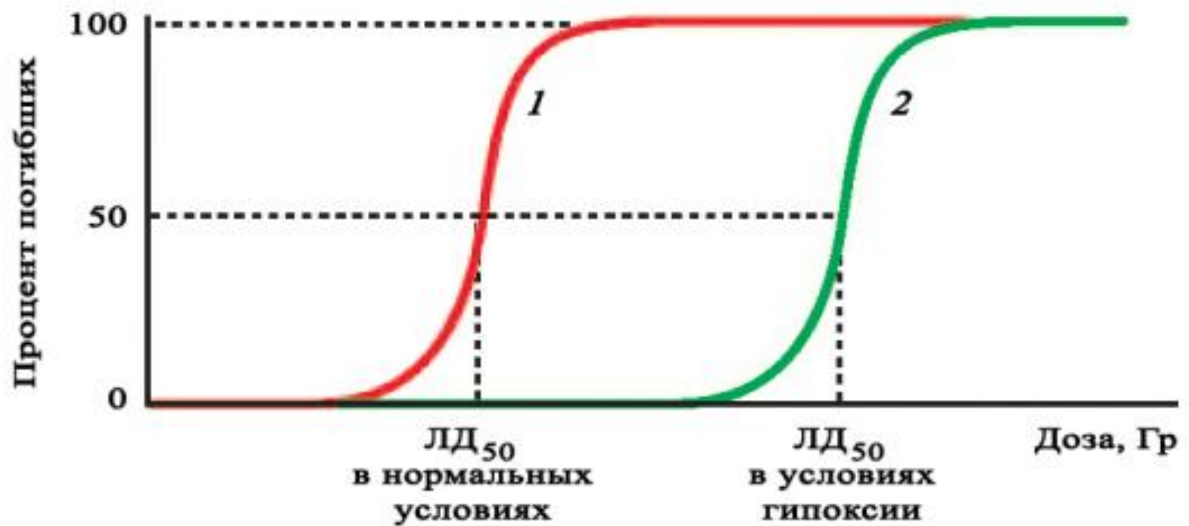
где  $D$  – доза, вызывающая данную степень поражения;

$D_0$  – доза, соответствующая этому же поражению в кислороде;

$[O_2]$  – концентрация кислорода в среде;

$K$  и  $m$  – эмпирические константы. Величина  $m$  указывает во сколько раз радиочувствительность в кислороде выше, чем при аноксии. Величина  $K$  равна той концентрации кислорода, которая соответствует радиочувствительности, вдвое превышающей аноксический уровень.

[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#04]



**Кривые гибели животных при внешнем облучении рентгеновским или  $\gamma$ -излучением в нормальных условиях (1) и при гипоксии (2)**

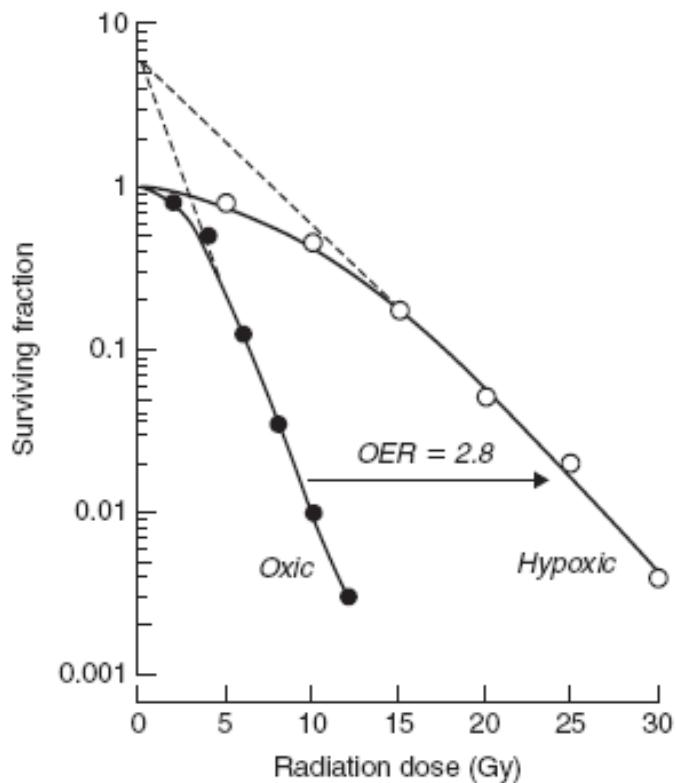
[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#05]

Важливість кисневого ефекту

- Чутливість клітин до дії іонізуючого випромінювання напряму залежить від концентрації кисню
- **Коефіцієнт кисневого посилення (oxygen enhancement ratio, OER)** – співвідношення доз опромінення в оксигенованому і гіпоксичному станах, які спричиняють однаковий біологічний ефект:

$$\begin{aligned} \text{коефіцієнт кисневого посилення} &= \\ &= \frac{LD_{50} \text{ в умовах гіпоксії}}{LD_{50} \text{ в умовах нормальної оксигенації}} \end{aligned}$$

$$\text{Oxygen enhancement ratio} = \frac{\text{Radiation dose in hypoxia}}{\text{Radiation dose in air}}$$



Survival curves for cultured mammalian cells exposed to X-rays under oxic or hypoxic conditions, illustrating the radiation dose-modifying effect of oxygen. Note that the broken lines extrapolate back to the same point on the survival axis ( $n = 6$ ). OER, oxygen enhancement ratio.

[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#06]

#### Властивості коефіцієнта кисневого посилення:

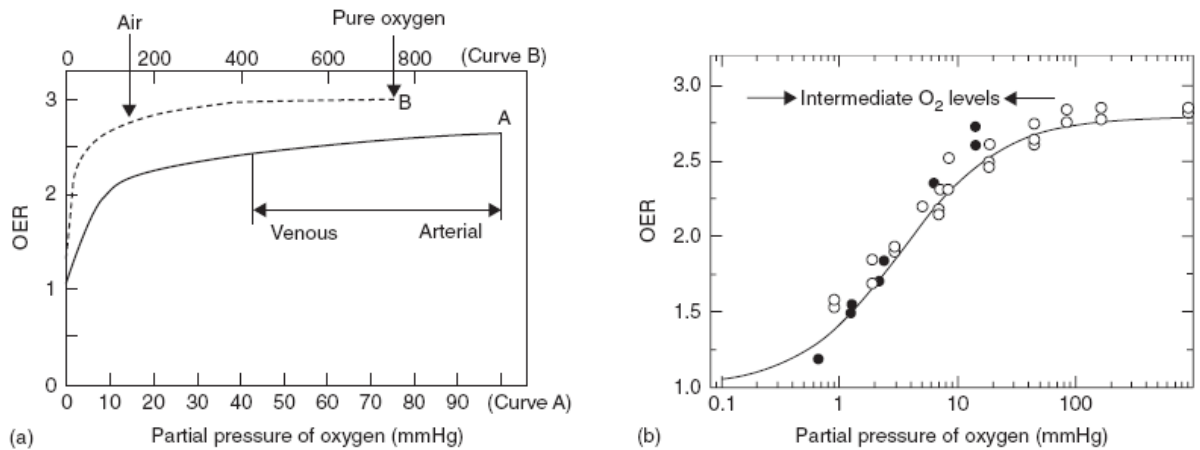
**Коефіцієнт кисневого посилення** у середньому дорівнює 3-3,5, та залежить як від напруження  $O_2$  середовищі, так і від дози опромінення (у випадку  $D \leq 3$  Гр, він знижується)

Кисневий ефект проявляється, коли  $O_2$  присутній підчас опромінення, або з'являється протягом декількох мілісекунд після опромінення

[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#07]

#### Коефіцієнт кисневого посилення залежність від $pO_2$ :

- За відсутності  $O_2$  (аноксія), коефіцієнт КП дорівнює 1,
- При  $pO_2$  до 0.15 мм.рт.ст (до 0.02%) маємо міні радіочутливість,
- Найбільшу швидкість зростання ККП маємо при  $pO_2$  0,5 - 20 мм.рт.ст.



Variation of oxygen enhancement ratio (OER) with oxygen partial pressure scaled linearly in (a) and logarithmically in (b). In (a), the horizontal arrows indicate the range of physiological blood oxygen tensions on the lower scale (to convert mmHg to kPa, multiply by 0.133). (b) Published OER values at different oxygen partial pressures adapted from Koch *et al.* (1984) (closed circles) and Whillans and Hunt (1982) (open circles).

[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#08]

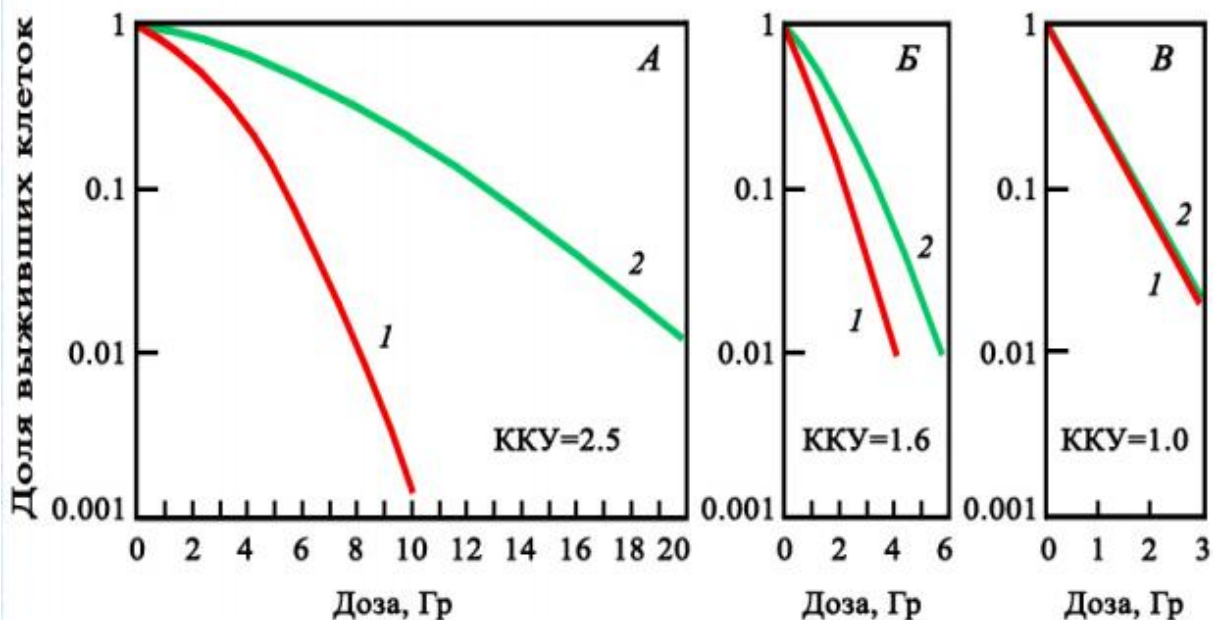
#### Властивості коефіцієнта кисневого посилення (організм):

- Мінімальна концентрація  $O_2$  в повітрі (лабораторні тварин), при якій може існувати організм = 5%,
- Помітне зниження радіочутливості організму настає при зниженні рівня  $O_2$  до **10%**. За цих умов максимальне значення ККП = 2-2,5.
- Але захисний ефект гіпоксії знижується при тривалому перебуванні організму в гіпоксичних умовах.

[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#09]

#### Залежність кисневого ефекту від виду випромінювання

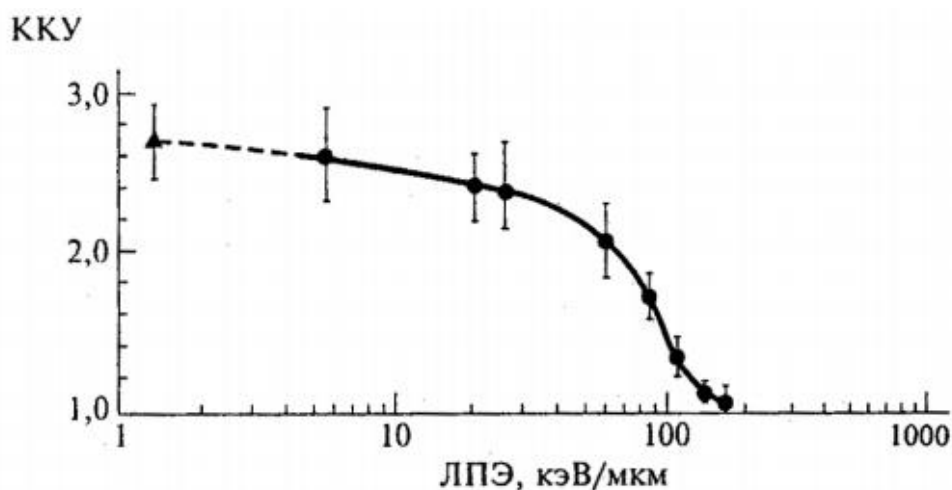
- **Найбільш виражений** – у випадку ІВ з низькою густиною іонізації ( $\gamma$ -випромінювання, рентгенівські промені),
- **Відсутній** у випадку  $\alpha$ -випромінювання
- Ця відмінність корелює зі значенням густини іонізації (та лінійної передачі енергії) випромінювань



**Зависимость ККУ от вида ионизирующего излучения:**  
*A* - рентгеновское, *B* - нейтронное (15 МэВ), *B* -  $\alpha$ -излучение (2,5 МэВ); *1* - на воздухе, *2* - при аноксии

[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#10]

**Залежність кисневого ефекту від значення лінійної передачі енергії**



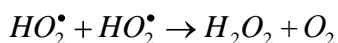
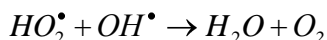
**Коэффициент кислородного усиления (ККУ) как функция ЛПЭ при облучении клеток почки человека (по Г. Барендсену, 1966):**

▲ — 250 кВ рентгеновское излучение, ЛПЭ  $\approx$  1,3 кэВ/мкм; • — моноэнергетические тяжелые частицы, имеющие ЛПЭ, указанные на оси абсцисс

[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#11]

## Гіпотези зв'язку між кисневим ефектом і значенням лінійної передачі енергії

1. У випадку ІВ з високою густиною іонізації враження мішені є численними, таким чином посилення вже не має сенсу
2. У випадку ІВ з високою густиною іонізації вторинні продукти радіолізу води утворюють кисень, таким чином не можна вважати ці умови гіпоксичними:

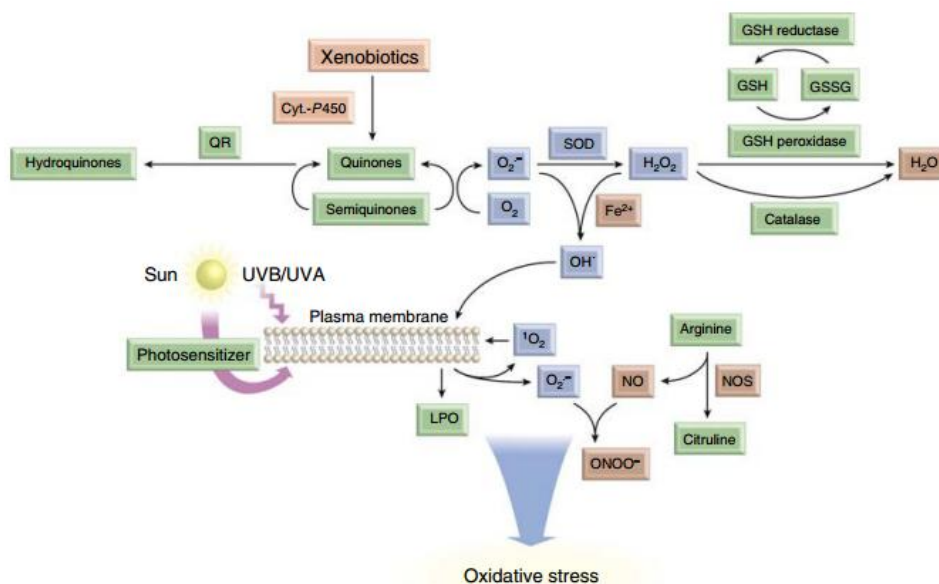


[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#12]

## Фізико-хімічний механізм розвитку кисневого ефекту

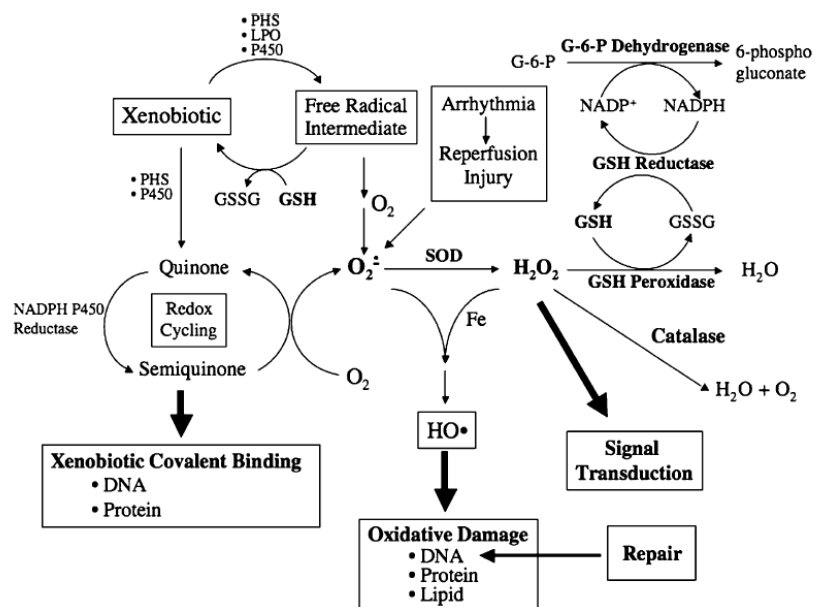
### Активні форми кисню:

- перекисний радикал  $HO_2^{\bullet}$ ,
  - перекис водню  $H_2O_2$ ,
  - супроксиданіон радикал  $HO_2^{\bullet}$
- володіють високою реакційною здатністю



**Generation of ROS and antioxidant defense in skin cells.** Normal skin cells generate ROS such as superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) and  $H_2O_2$  as a result of normal metabolism in minute concentrations. Both  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$  may be converted to the highly reactive hydroxyl radical ( $OH^{\bullet}$ ) by iron ( $Fe^{2+}$ )-catalyzed Haber-Weiss and Fenton reactions. Similarly, reactive nitrogen species (RNS) are generated as a result of sequential reactions that begin with nitric oxide synthase (NOS)-mediated conversion of arginine to citrulline. In this reaction, NO is generated, which reacts with  $O_2^{\bullet-}$  to produce peroxynitrite ( $ONOO^{\bullet}$ ). Similarly, ROS and RNS can be formed as a result of exposure to environmental agents including chemicals (xenobiotics) and solar UVA and UVB. Many xenobiotics are converted to toxic quinones by the family of functionally related enzymes known as cytochrome P450 (CYP). These quinones are redox-sensitive agents and are reversibly reduced to semihydroquinones/hydroquinones, which generate  $O_2^{\bullet-}$ . Both UVA and UVB produce similar free radicals and/or singlet oxygen ( $^1O_2$ ) either directly following interaction with cellular components or in the presence of chemical agents known as photosensitizers. These photoactive chemicals while in their lowest energy or ground state absorb incident radiation (including UVA/UVB), within their absorption spectrum. The energy of the absorbed photon creates an excited state molecule, which is highly unstable under ambient conditions. In returning to the ground state, excited species transfer energy to adjacent intracellular chemical moieties particularly molecular oxygen ( $O_2$ ) and thereby convert it into ROS. These ROS interact with lipid-rich plasma membranes and initiate a reaction known as lipid peroxidation. Numerous intracellular enzymes serve to degrade these reactive species. Some of these enzymes are specific such as SODs, which dismutate  $O_2^{\bullet-}$  to  $H_2O_2$ , whereas others have overlapping substrate affinities such as catalase and glutathione peroxidases, both of which can degrade  $H_2O_2$  to water and  $O_2$  but glutathione peroxidases also degrade organic peroxides to relatively non-toxic alcoholic species. These enzymes also require GSH during the course of peroxide degradation and convert GSH into its oxidized form, which is recycled by the enzyme glutathione reductase. Similarly, toxic quinones are converted to relatively less toxic hydroquinones by quinone reductases (QR).

[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#13]



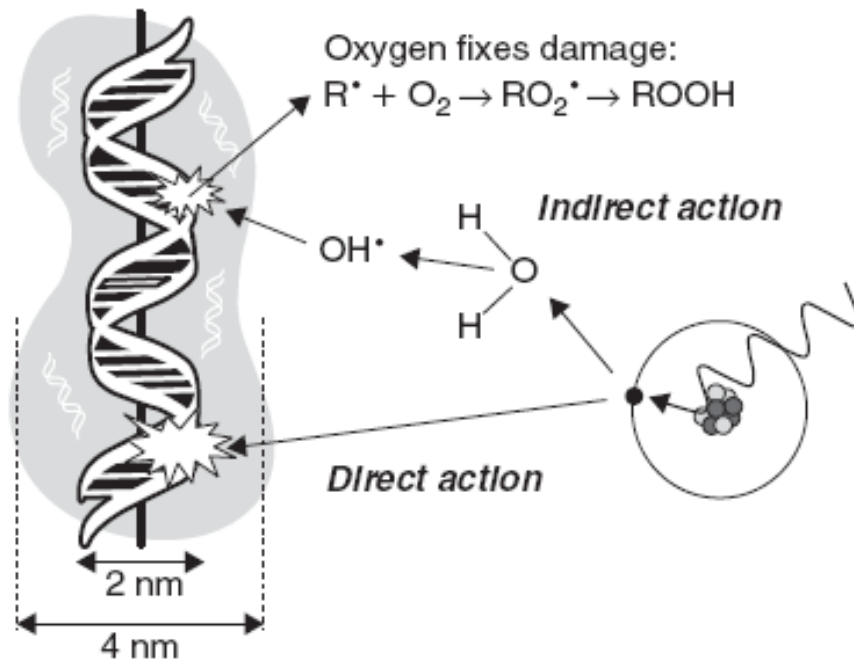
Biochemical pathways for the formation, detoxification and cellular effects of xenobiotic free radical intermediates and ROS. Abbreviations: Fe, iron; GSSG, glutathione disulfide;  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hydrogen peroxide;  $\text{HO}\cdot$ , hydroxyl radical;  $\text{NADP}^+$ , nicotinamide adenine dinucleotide phosphate;  $\text{O}_2\cdot^-$ , superoxide; P450, cytochromes P450 (modified from: Wells *et al.*, *Mutat. Res.* 396, 65–78, 1997).

[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#14]

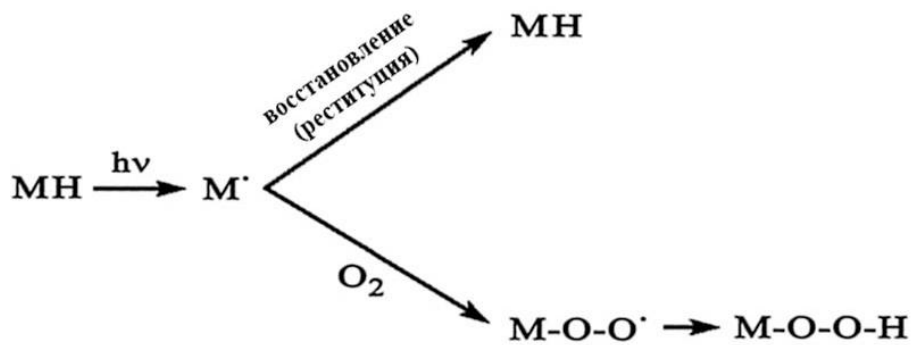
#### Гіпотеза кисневої фіксації :

- Під дією іонізуючого випромінювання формуються **вільні радикали**, які руйнують хімічні зв'язки в біомолекулах. Формуються радикали ( $\text{R}\cdot$ ), які легко реагують з  $\text{O}_2$ , утворюючи  $\text{RO}_2\cdot$ , що перетворюється в **ROOH**.
- ROOH – стабільна молекула, отже порушення в біомолекулі як би “фіксується” киснем.
- В умовах гіпоксії час існування радикала  $\text{R}\cdot$  більший, і значно більше шансів відновитись до нормальної молекули, приєднавши  $\text{H}^+$ .





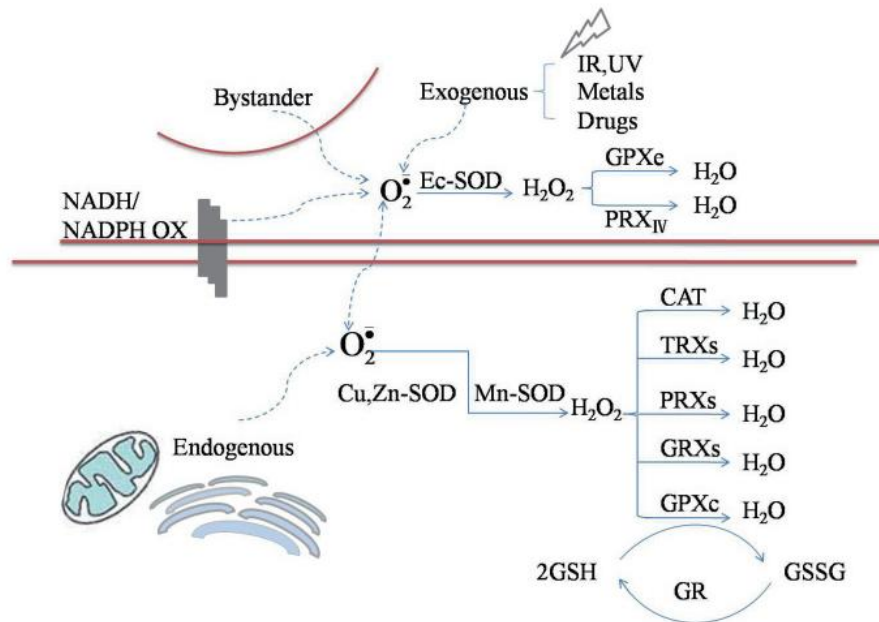
The oxygen fixation hypothesis. Free radicals produced in DNA by either a direct or indirect action of radiation can be repaired under hypoxia but fixed in the presence of oxygen.



Механизм кислородного эффекта

[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#15]

Антиоксидантний захист клітини



**The antioxidant enzymatic defense mechanism naturally occurring in organism.** CAT: catalase; GPXc: classic (intracellular) glutathione peroxidase; GPXe: extracellular glutathione peroxidase; GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione; GR: glutathione reductase; GRXs: glutaredoxins; PRXs: peroxiredoxins (thioredoxin peroxidase); PRX<sub>IV</sub>: peroxiredoxin IV; TRXs: thioredoxins; NADH/NADPH OX: nicotinamide adenine dinucleotide reduced/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced oxidases; IR: ionizing radiation; UV: ultraviolet.

### Summary of diverse sources of ROS

Endogenous sources	Exogenous sources
NAD(P)H oxidase	Radiations
Xanthine oxidase	Pathogens
P-450 monooxygenases	Metals: Fe, Cu, Zn
Lipoxygenases	Xenobiotics, etc.
Cyclooxygenases, etc.	

[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#16]

### Зворотній кисневий ефект

- У розведених водних розчинах переважно спостерігається непряма дія випромінювання, а біомолекули переважно пошкоджуються продуктами радіолізу води:
- У водних розчинах  $O_2$  переважно взаємодіє не з біомолекулами, а з радикалами водню  $H^{\bullet}$  та з гідратованими електронами  $e^-_{aq}$ .
- Є 2 варіанти розвитку подій:
  - 1) коли молекули переважно пошкоджуються  $H^{\bullet}$  та  $e^-_{aq}$ , кисень  $O_2$  матиме **захисний (зворотній) ефект** за рахунок їх перехоплення,
  - 2) коли молекули переважно пошкоджуються  $OH^{\bullet}$ , то кисень  $O_2$ , перехоплюючи  $H^{\bullet}$ , зменшуватиме ймовірність їх рекомбінації у воду, тому сприятиме **посилленню радіаційного пошкодження** біомолекул

[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#17]

### **Використання кисневого ефекту в радіотерапії пухлин**

Радіотерапію (променевою терапією) використовують у випадку лікування 60-70% випадків пухлин. При коректно підібраному лікуванні майже половина з них виліковується.

Насьогоді переважно використовують:

- для дистантного опромінення рентгенівські і  $\gamma$ -апарати (енергія 60-100 кеВ) електронне випромінювання,
- для контактного опромінювання (закриті і відкриті джерела контактного опромінення) – електронне випромінювання (енергія 10-30 МеВ)

В обох випадках у якості джерела випромінювання переважно використовують радіоактивний ізотоп кобальту ( $^{60}\text{Co}$ )

[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#18]

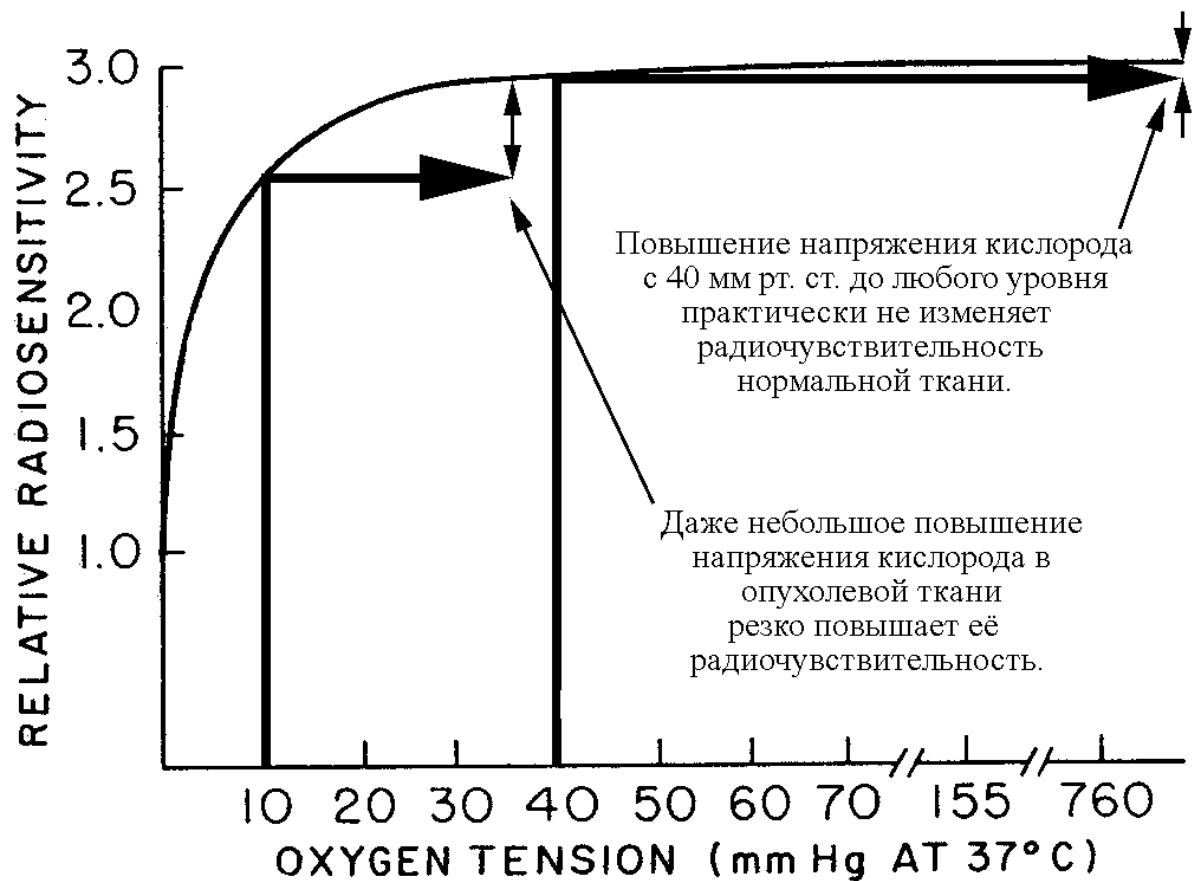
**Врахування** **кисневого** **ефекту**  
**при терапії пухлин :**

- Тканини пухлин зазвичай гіпоксичні:  $p\text{O}_2 = 1-10$  мм рт.ст. (в нормі 20-100 мм рт.ст.)
- Радіорезистентність пухлин обходять декількома шляхами:
- 1) метод гіпербаричної оксигенації (оксибарорадіотерапії),
- 2) метод фракційного опромінення з врахуванням реоксигенації пухлини,
- 3) використання радіосенсибілізаторів гіпоксичних клітин,
- 4) використання випромінювань з високою ЛПЕ (з відсутнім кисневим ефектом)

[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#19]

### **метод гіпербаричної оксигенації (оксибарорадіотерапії)**

- Пацієнт під час сеансу радіотерапії знаходиться в барокамері та дихає чистим киснем (тиск кисню 2-3 атм.)
- Цей метод є ефективним для терапії пухлин голови і шиї



[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#20]

#### Реоксигенація при фракціонованому опроміненні пухлин

Також при радіотерапії пухлин викликають кисневий ефект шляхом **реоксигенації пухлин**.

Відомо, що в пухлині близько 10-15% клітин знаходяться в гіпоксичному стані.

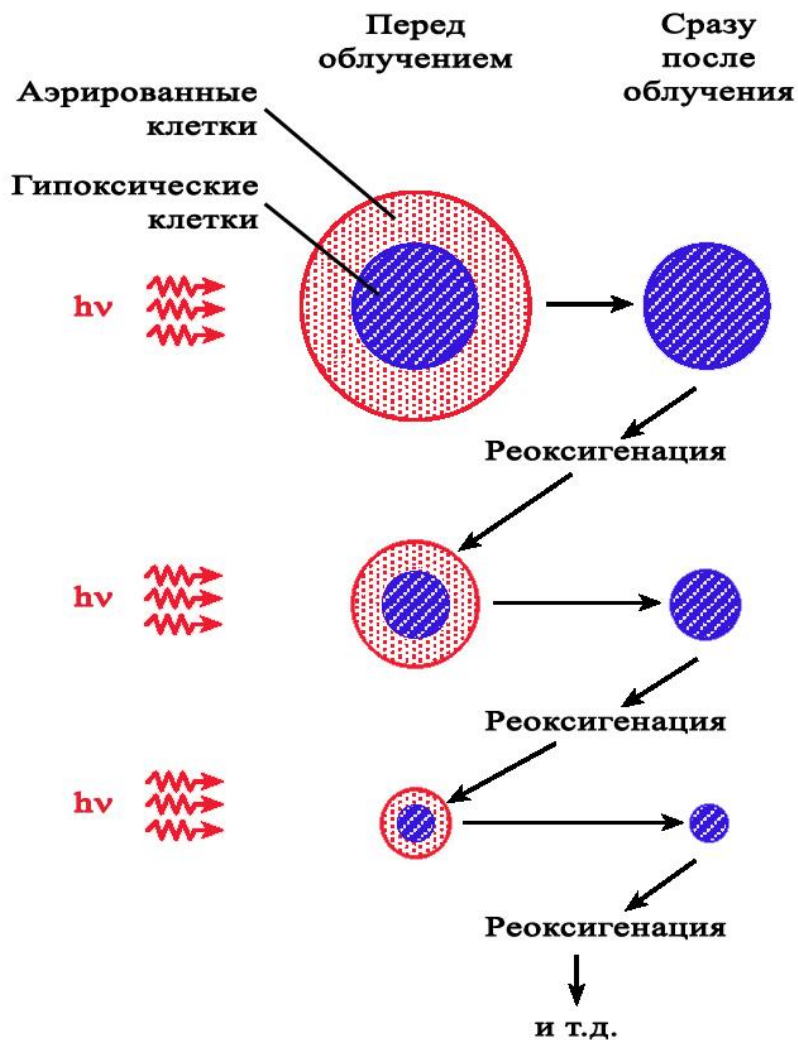
При опроміненні гинуть переважно оксигеновані клітини, але після радіотерапії з часом співвідношення оксигеновані/гіпоксичні клітини в пухлині відновлюється (за рахунок реоксигенації популяції гіпоксичних клітин).

**Таким чином, якщо опромінення (з певними часовими проміжками) повторити декілька десятків разів, можна знищити пухлину цілком.**

[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#21]

#### Схема проведення фракціонованого опромінення пухлин із урахуванням реоксигенації

Стандартні величини фракцій (тобто разових доз) складають від 1,8 до 2 Гр 5 раз в тиждень до досягнення суммарної дози (від 25 до 70-100 Гр). Крім **звичайного** режиму застосовують **мультифракціювання** (денне дроблення дози на декілька фракцій, які підводять з інтервалом 4-8-12 годин).



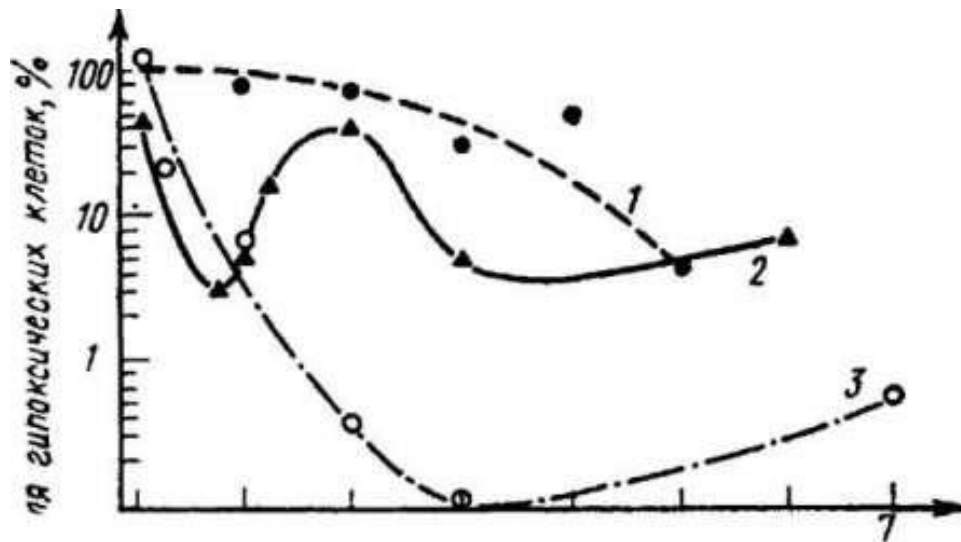
**Схема проведения фракционированного облучения опухоли с учетом ее реоксигенации**

[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#22]

#### **Час реоксигенації**

Головне - вибір оптимального часу між опроміненнями,  
у середньому це 1-2 доби

Найчастіше призначають  
щоденне опромінення  
пухлини в дозі 1.8-2.5 Гр  
5 разів на тиждень



Динамика реоксигенации экспериментальных опухолей (по Р. Томплинсону, 1970):

1-остеогенная саркома мышей,

2- фибросаркома крыс,

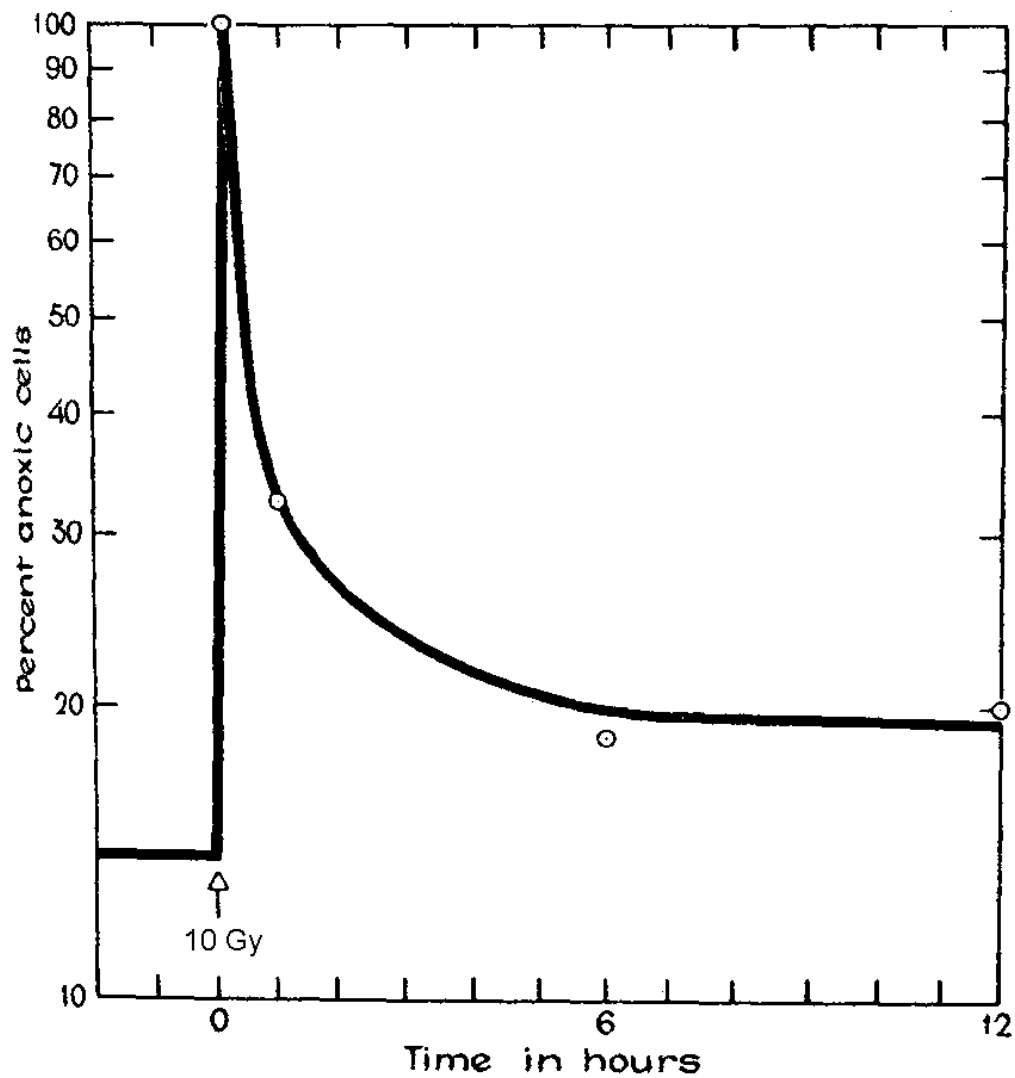
3 – карцинома молочной железы мышей;

фракция гипоксических клеток в каждой опухоли сразу после облучения принята за 100%

[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#23]

### Динаміка реоксигенації

Динаміка реоксигенації клітин саркоми миші при опроміненні рентгенівськими променями (10 Гр)



[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#24]

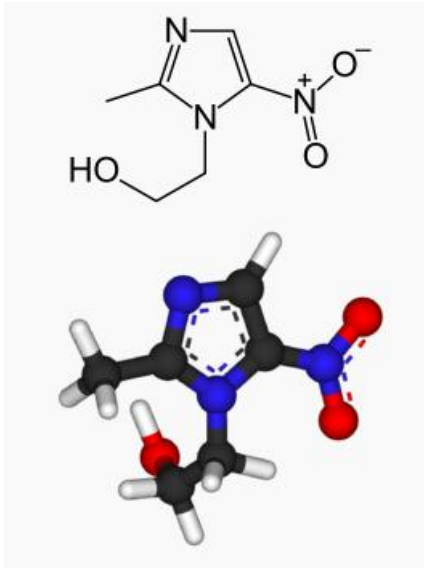
**Радіосенсибілізатори гіпоксичних клітин:**

Радіосенсибілізатори гіпоксичних клітин – це речовини, які здатні вибірково підвищувати радіочутливість гіпоксичних клітин, не впливаючи на радіочутливість нормально оксигінованих клітин.

**Метронізадол і його похідні**

(нітроїмідазольні сполуки)

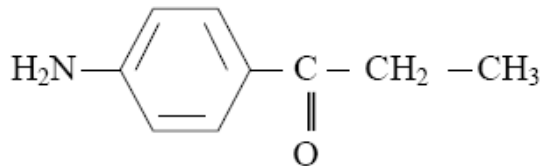
- Недолік – висока токсичність цих речовин



[sheva\_medu\_mag01\_CHUMBALYK\_L\_6RB#25]

#### Фактори, які модулюють кисневий ефект

- Гіпоксія (за рахунок зниження напруження  $O_2$  у повітрі),
- Зменшення здатності гемоглобіну зв'язувати кисень за рахунок переведення іона  $Fe^{2+}$  в окислену форму  $Fe^{3+}$  (чадний газ CO, амінопропіофенон)



- Зменшення кровопостачання тканин судинозвужуючими гормонами (адреналін, серотонін, гістамін)

