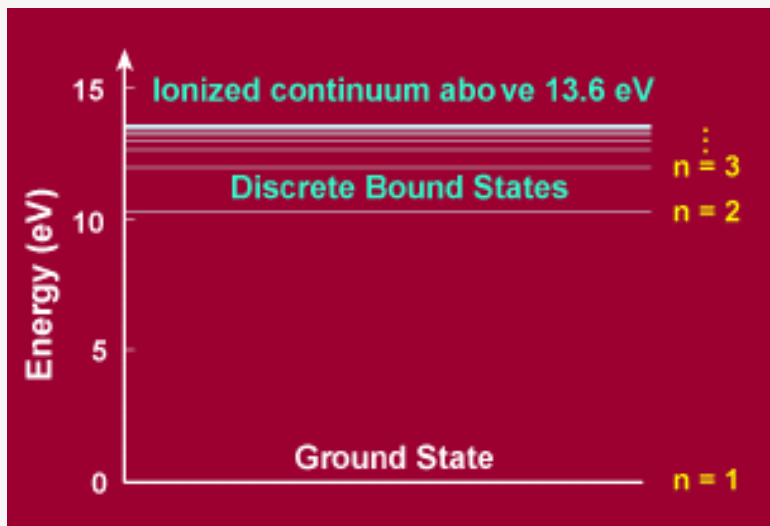


Ionizace a excitace

Ionizace = oddělení nábojů, zejména vyslání jednoho či více orbitálních elektronů z atomu či molekuly

Excitace = přesun některého orbitálního elektronu na vyšší hladinu v atomu či v molekule



Energetické hladiny v atomu vodíku. Povšimněte si, že ionizační energie závisí na složení látky.

Ionizující a neionizující záření: definice, druhy

Ionizující záření: záření, které má dostatečnou energii pro uskutečnění ionizace

Energie rozptýlená ve tkáni na jeden ionizační děj je zhruba 33 eV (tj. energie fotonu při vlnové délce zhruba 40 nm)

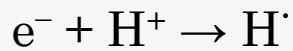
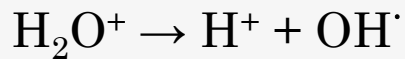
Příklady: RTG záření, záření γ , záření α a β , protony, neutrony, urychlené ionty

Neionizující záření: záření, které nemá dostatečnou energii pro uskutečnění ionizace, způsobující pouze excitaci elektronů

Příklady: ultrafialové záření, viditelné světlo (včetně laseru), infračervené záření, mikrovlny, radiovlny

Radiolýza vody: přehled

Klíčové procesy:

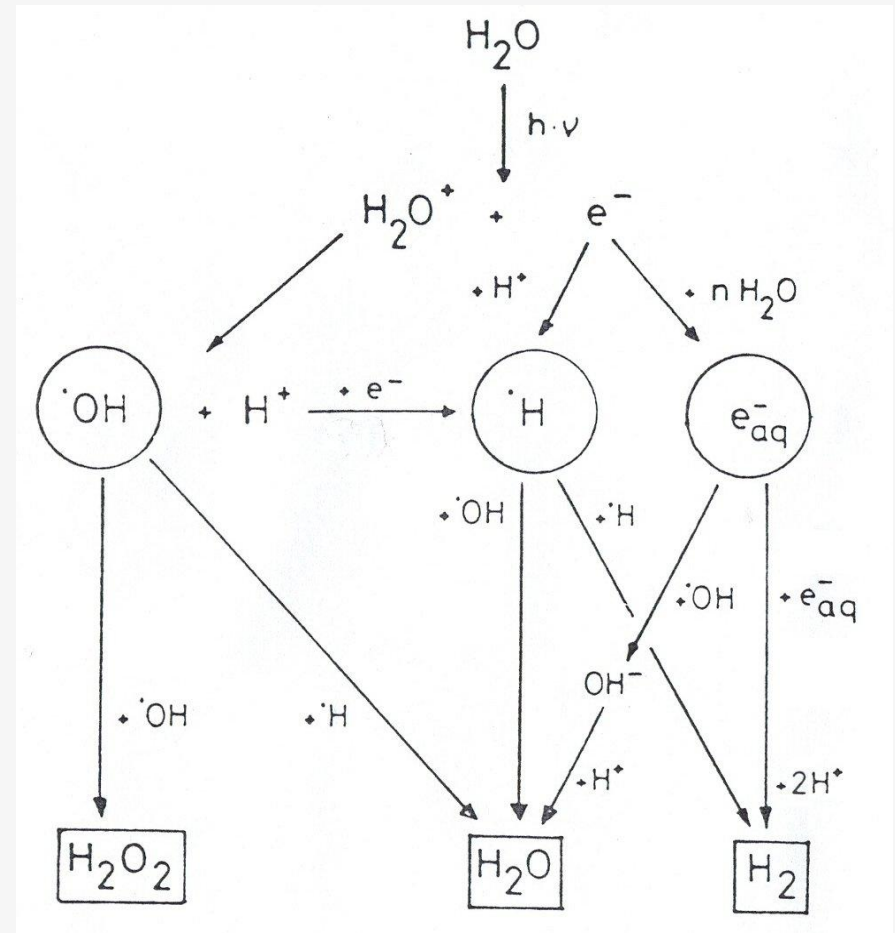


Klíčové složky:

Radikál OH^\cdot

Radikál H^\cdot

Hydratovaný elektron e^-_{aq}



Radiolýza vody: hodnoty G

Hodnota G je počet radikálů dané složky generovaných na 100 eV absorbované energie

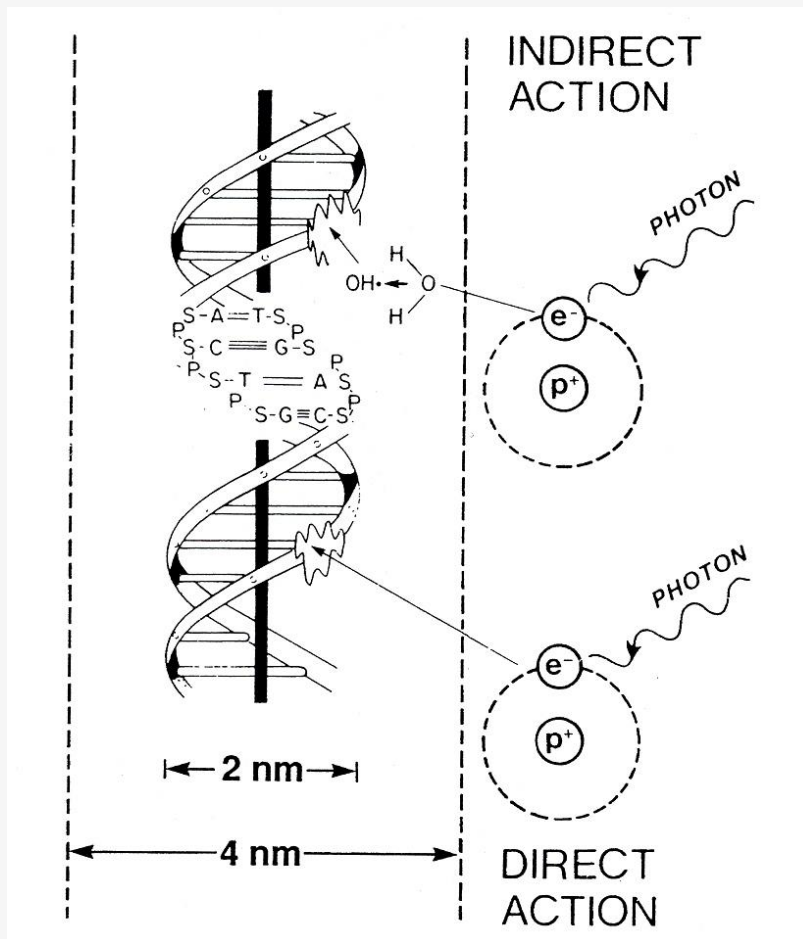
Ve vodném roztoku jsou tyto hodnoty obvykle

2.3 pro radikály OH^\cdot

0.6 pro radikály H^\cdot

2.3 pro hydratované elektrony e^-_{aqu}

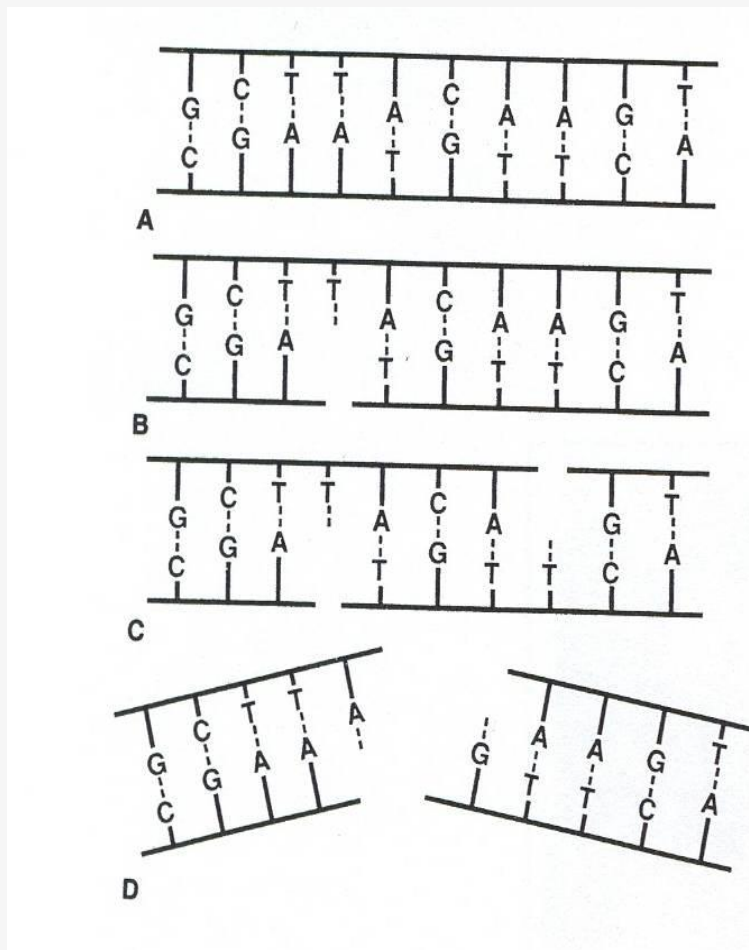
Přímý a nepřímý účinek



Při přímém účinku působí elektron uvolněný po absorpci fotonu na DNA s vyvoláním účinku.

Při nepřímém účinku působí sekundární elektron na molekulu vody s vytvořením radikálu, který dále způsobuje poškození DNA.

Jednořetězcové a dvojřetězcové zlomy: přehled



A: Dvojrozměrné znázornění normálního helixu DNA

B: Zlom jednoho řetězce má malý význam, protože se rychle opraví s použitím druhého řetězce jako templátu.

C: Zlomy v obou řetězcích, pokud jsou vzdálené, se opraví jako nezávislé zlomy.

D: Pokud zlomy nastanou v obou řetězcích a jsou přímo proti sobě nebo odděleny pouze malým počtem bází, může nastat dvojřetězcový zlom.

Jednořetězcové a dvojřetězcové zlomy: frekvence

Zlomy řetězců jsou nejběžnějším typem poškození DNA při působení ionizujícího záření. Jsou často, i když ne vždy, doprovázeny poškozením báze (zničením nebo ztrátou báze), ke kterému ovšem též dochází nezávisle.

Při dávce 1 Gy bude obvykle v jedné buňce

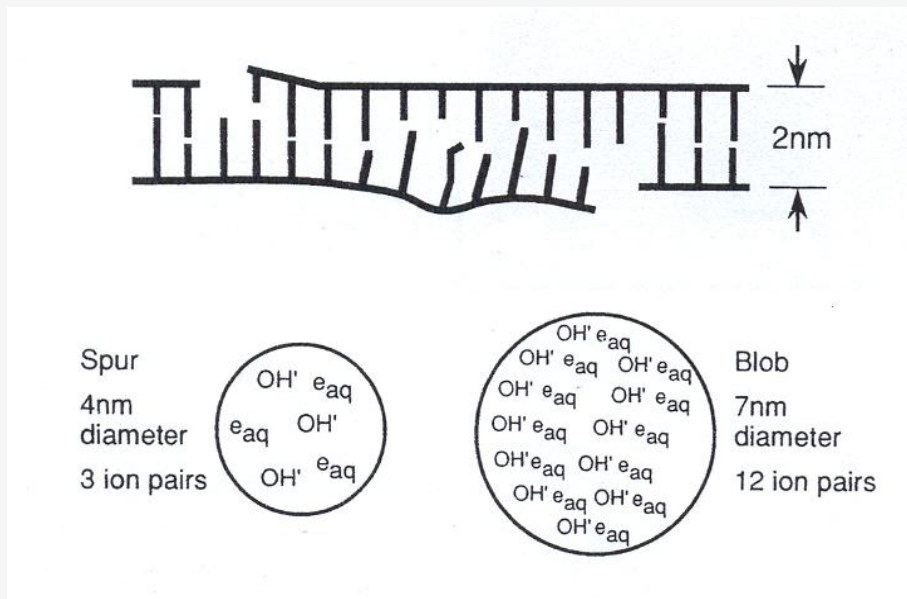
> 1000 míst poškození báze,

~ 1000 jednořetězcových zlomů,

~ 40 dvojřetězcových zlomů

Tyto hodnoty jsou do značné míry nezávislé na kvalitě záření, tj. jsou podobné pro fotony, elektrony, těžké nabitě částice a neutrony.

Lokálně vícečetně poškozená místa

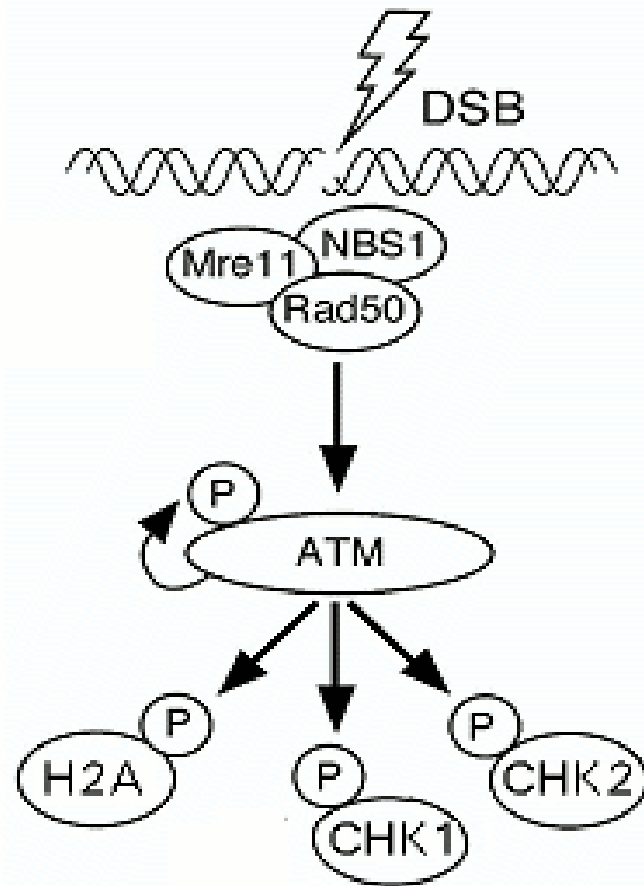


Energie fotonu se neabsorbuje jednotně. Radiční chemici mluví o "spurs a blobs" (útvary tvaru ostnu a kousky), které obsahují několik iontových párů a mají velikost srovnatelnou s dvojitým helixem DNA. Dvojřetězcový zlom je pravděpodobně doprovázen rozsáhlým poškozením bází.

Poškození signální cesty

Místo poškození se rozpoznává třemi proteiny Mre11, Rad50 a NBS1, které vytvářejí tzv. komplex MRN.

To vede k mobilizaci proteinu ATM, který fosforyluje a tím aktivuje značný počet dalších proteinů (viz též další obrázek).



Cíle fosforylace ATM



Kindly reviewed by Dr. Domenico Delia, Istituto Tumori, Milano, Italy

Regulace buněčného cyklu signální cestou p53-Rb

- Přejchod G_1 -S je normálně regulován čtyřmi kooperujícími proteiny [p16 - cyklin D1 - cdk4 - Rb]. Většina karcinomů má tyto čtyři proteiny pozměněné.
- Nejdůležitější z těchto čtyř je p53, který hraje klíčovou roli v poškození signální cesty:

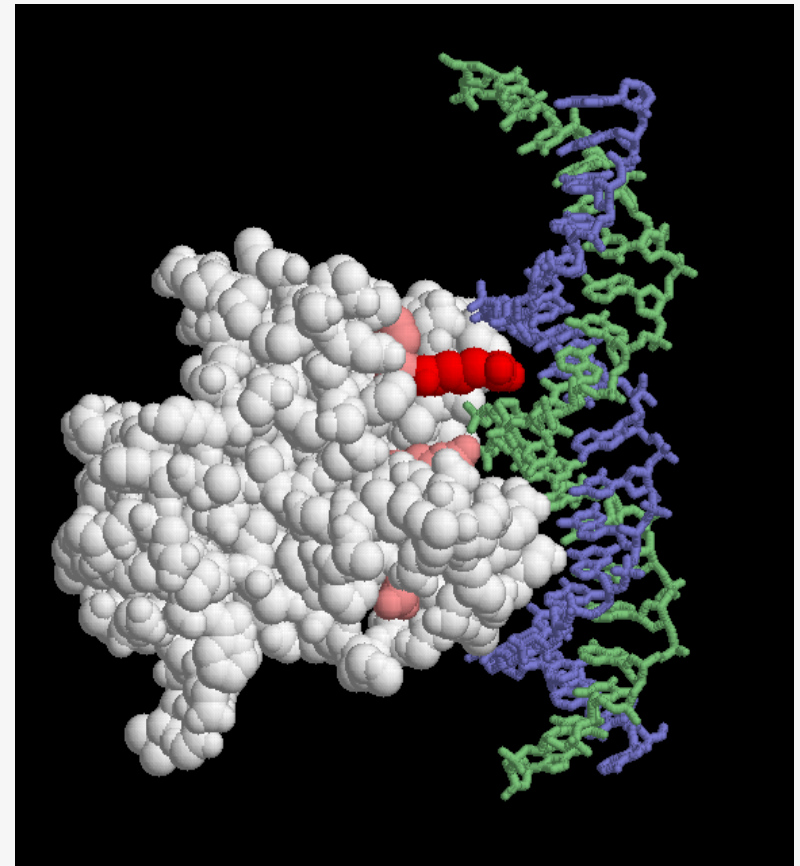
Poškození DNA

- ➔ aktivace p53 přímo proteinem ATM nebo nepřímo aktivací CHK1 proteinem ATM
- ➔ aktivace p21
- ➔ inhibice cdk4 (nebo jiných cdk)
- ➔ snížená inhibice, tj. aktivace Rb
- ➔ inhibice E2F
- ➔ pozastavení G_1 fáze

Mutace p53

Nejběžnější mutace genu p53
pozměňuje arginin 248
(červeně), který se normálně
váže v malé drážce DNA - silná
stabilizační interakce

Další klíčová místa mutace jsou
ukázána růžově včetně
argininových zbytků 175, 249,
273 a 282 a glycinu 245. Některé
z nich kontaktují DNA přímo
a další se účastní na umístění
dalších aminokyselin, které se
vážou na DNA.



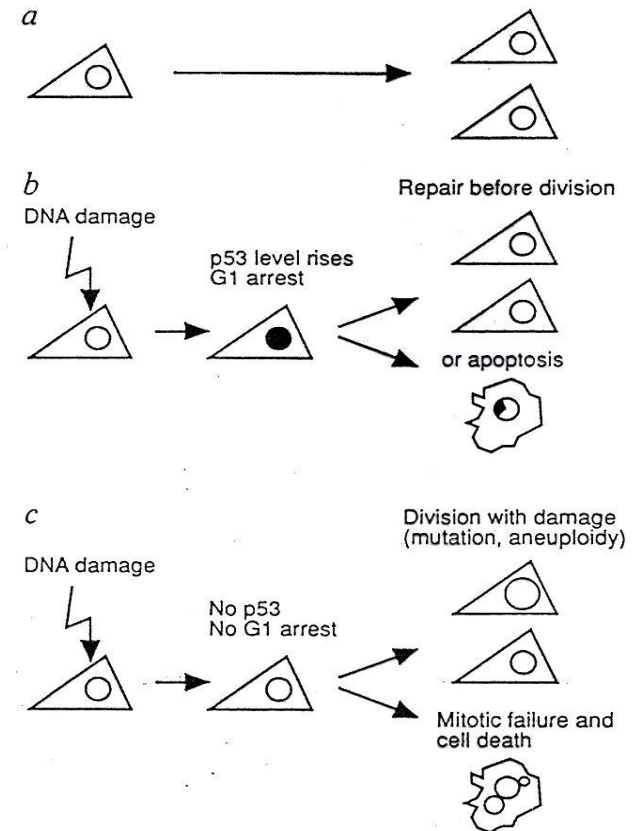
p53

Model funkce p53:

- Normální buněčné dělení, pro které není p53 nutný.
- Jako odpověď normální buňky na poškození DNA se vyvolává funkce strážce genomu p53.
- Buňky, ve kterých je cesta p53 inaktivována, replikují poškozenou DNA, což vede k mutaci, aneuploidii, mitotickému selhání a zániku buňky.

p53, guardian of the genome

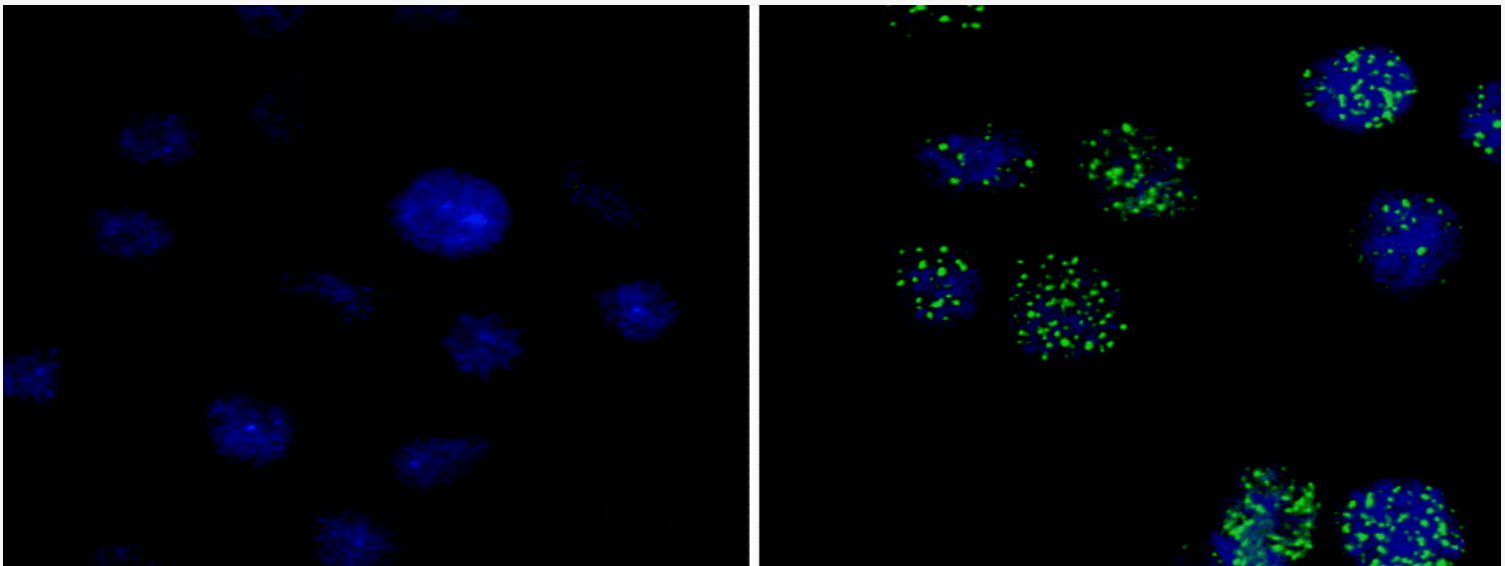
D. P. Lane



A model for the function of p53. *a*, Normal cell division, for which p53 is not required. *b*, In the response of a normal cell to DNA damage, the genome-guarding function of p53 is induced. *c*, Cells in which the p53 pathway is inactivated by mutation of p53, or by host (MDM2) or viral oncoproteins, replicate damaged DNA, resulting in mutation, aneuploidy, mitotic failure and cell death. Malignant clones arise from the survivors of this genetic scrambling.

Tvorba reparačních enzymových komplexů (γ H2AX)

Komplex MRN se váže na protein ATM, který se tím aktivuje a zahajuje fosforylaci, mezi jiným histonu H2AX. Fosforylovaný H2AX se nazývá γ H2AX a může se vizualizovat pomocí protilátek. Pod mikroskopem lze vidět jasná malá "ohniska" 5 až 30 minut po expozici v počtu zhruba ekvivalentním počtu dvojřetězcových zlomů.

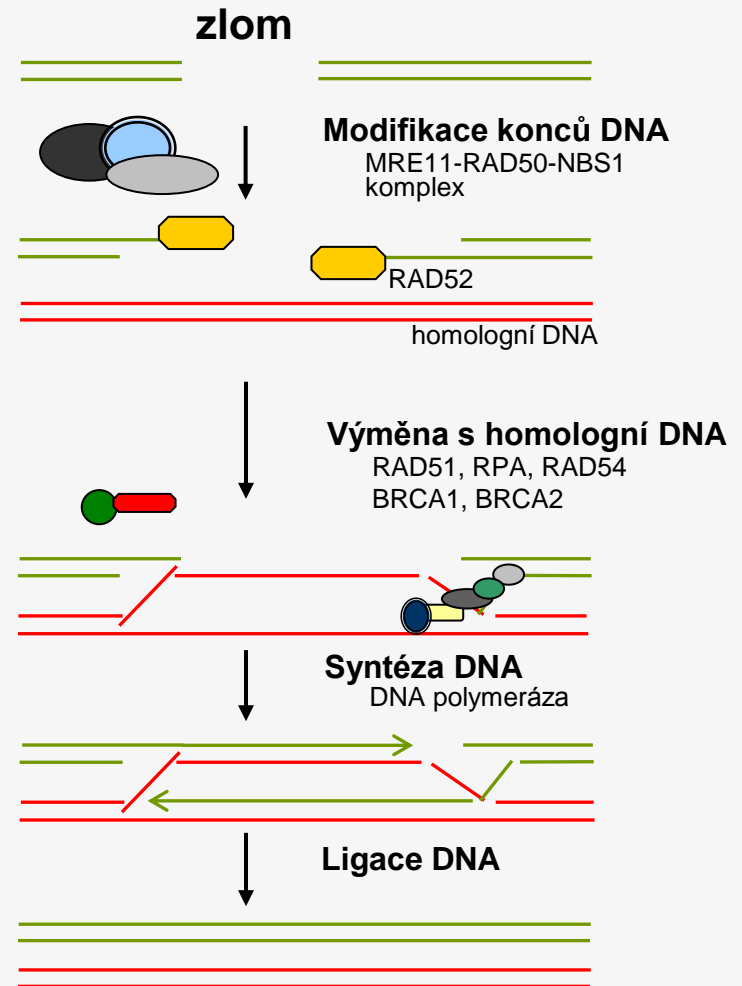


Oprava dvojřetězcového zlomu homologní rekombinací

Tento typ opravy nastává buď po replikaci, když nejsou k dispozici dvě chromatidy nebo mezi paternálními a maternálními chromozomy.

Jednotlivý řetězec homologní DNA napadá poškozený dvojitý řetězec, takže může být použit jako templát pro vyplnění mezery.

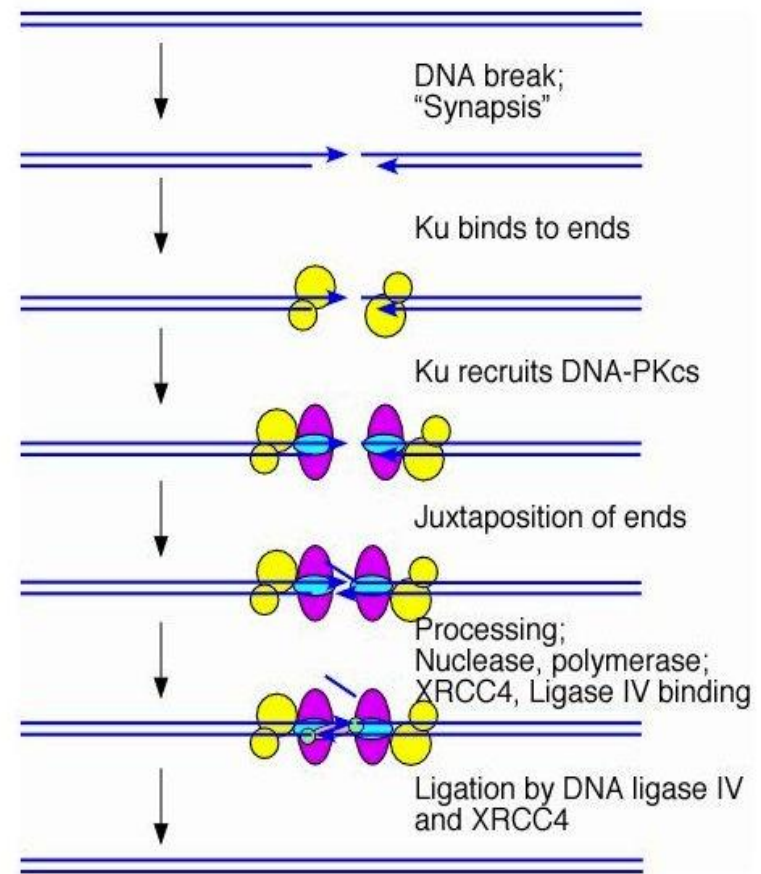
Tento proces je bezchybný, avšak v případě paternální-maternální rekombinace se ztrácí heterozygotnost.



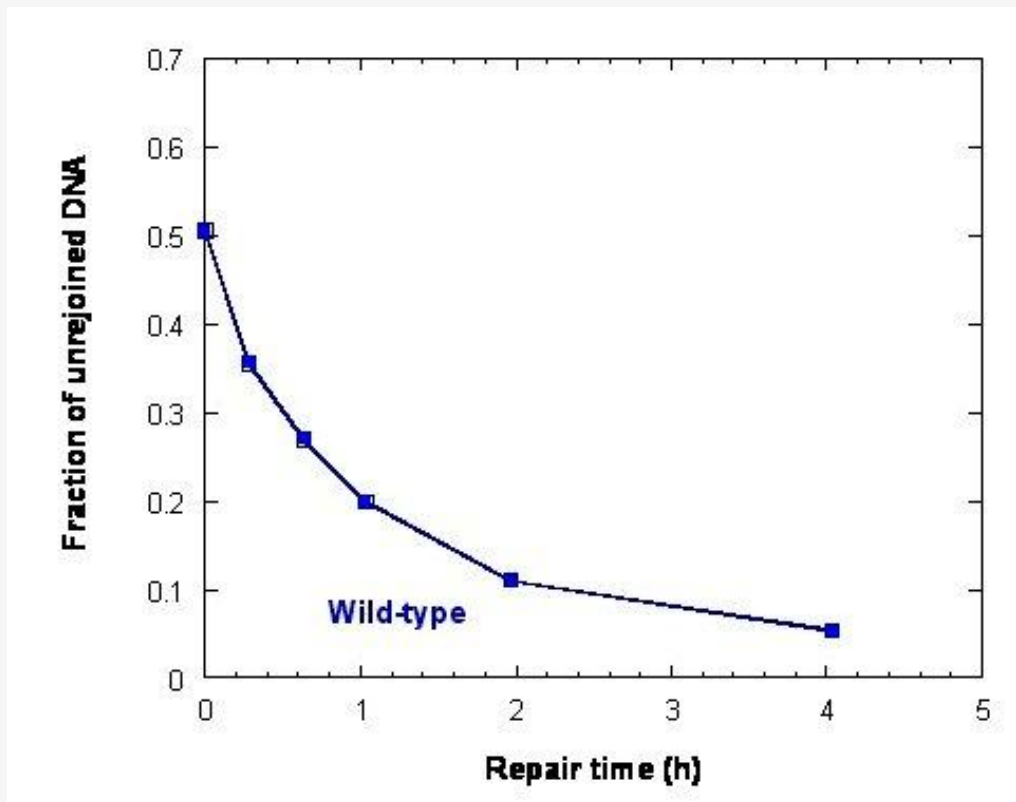
Oprava dvojřetězcového zlomu nehomologní spojování konců

Alternativou homologní rekombinace je spojování konců dvojřetězcového zlomu jako takových.

Tento postup je náchylný k chybě, tj. z DNA se může ztratit informace. Tento typ opravy se proto někdy nazývá "nelegitimní rekombinace".



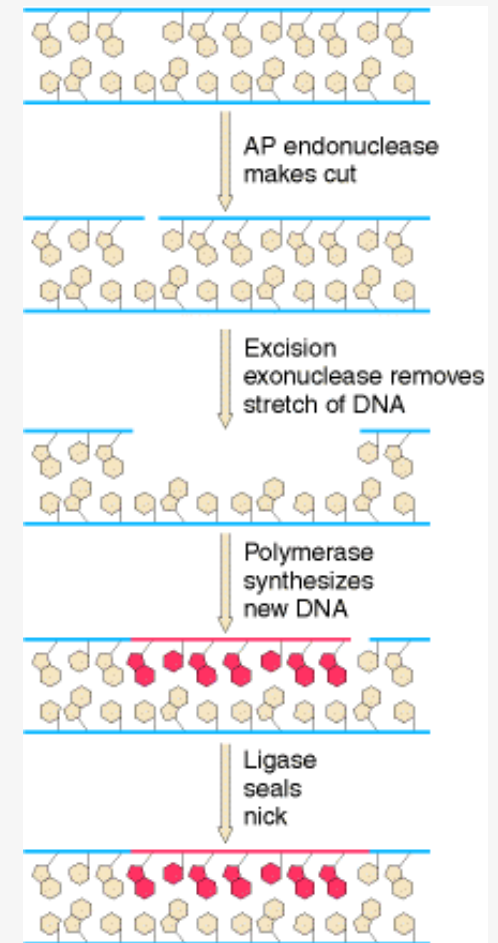
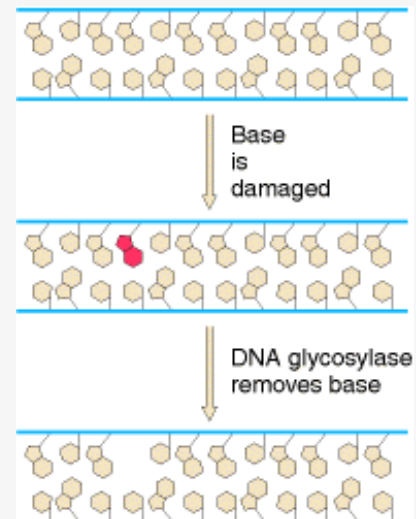
Časový průběh opravy dvojřetězcového zlomu



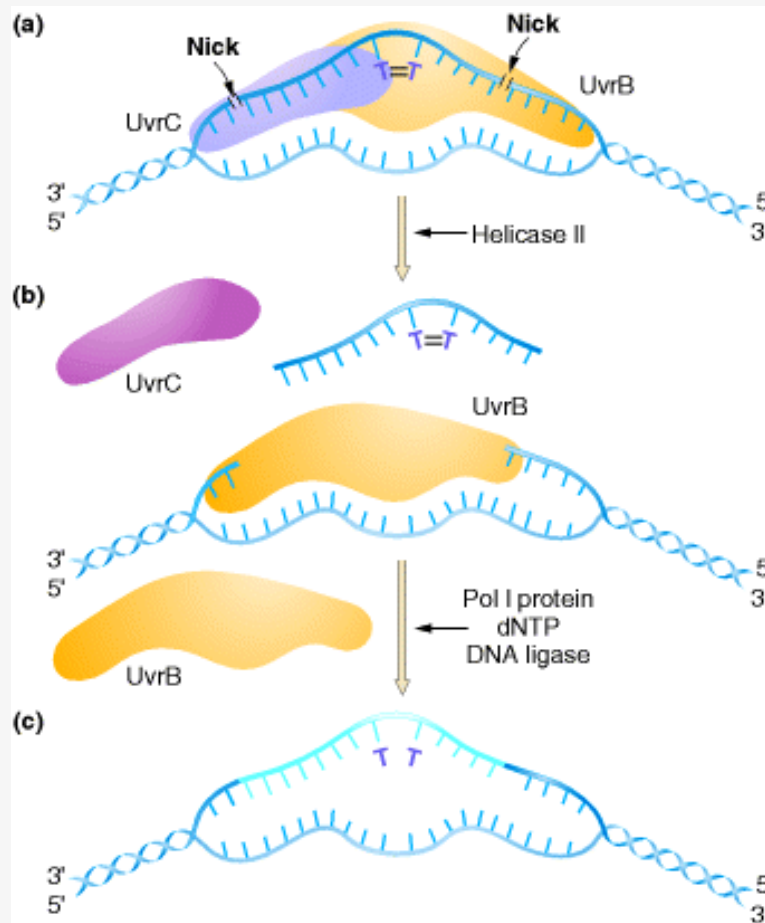
Typický poločas dvojřetězcových zlomů v lidských buňkách: 1 hodina.

Oprava excizí báze / Oprava míst AP

Jednotlivé poškozené báze se mohou z řetězce DNA vyříznout enzymem glykosylázou. Zbývající místa AP (apyrimidinová nebo apurinová místa) se potom odstraní postupem podobným opravě excizí nukleotidu.



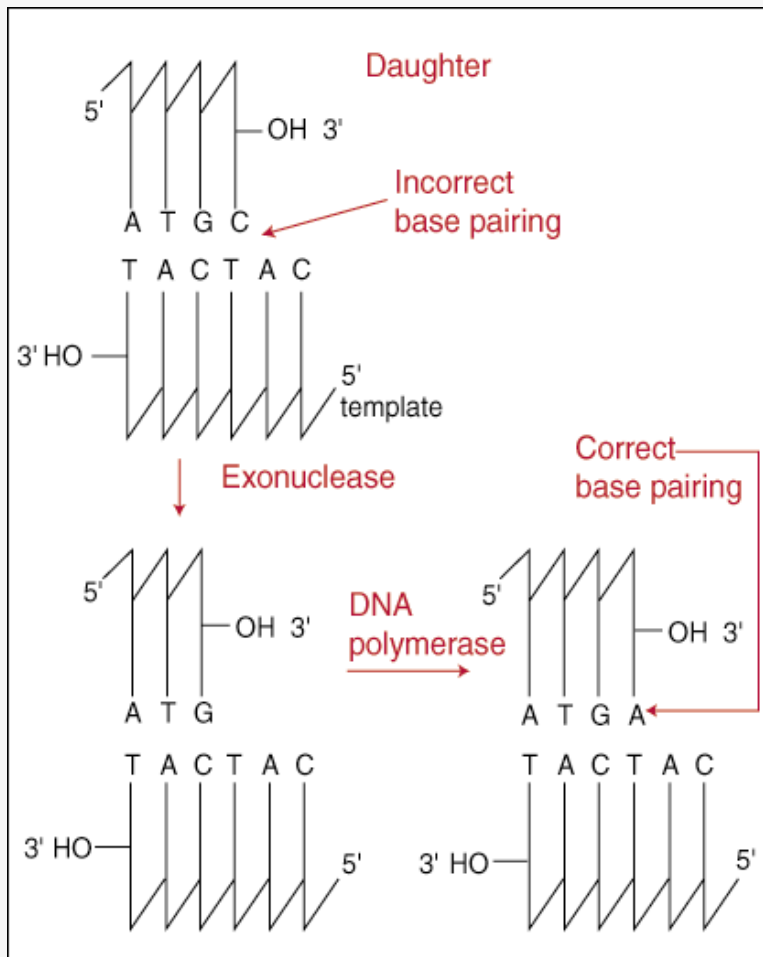
Oprava excizí nukleotidu



Pyrimidinové dimery (forma poškození vyvolaná ultrafialovým světlem) se mohou opravit následujícím způsobem:

- 1) incize (zavedení zářezů) vlevo a vpravo od poškozeného místa
- 2) excize jednořetězcového úseku DNA obsahujícího poškození
- 3) resyntéza chybějícího jednotlivého řetězce (s použitím druhého řetězce jako templátu)
- 4) ligace nového úseku DNA s původním úsekem

Exonukleázová funkce: „proof-reading“

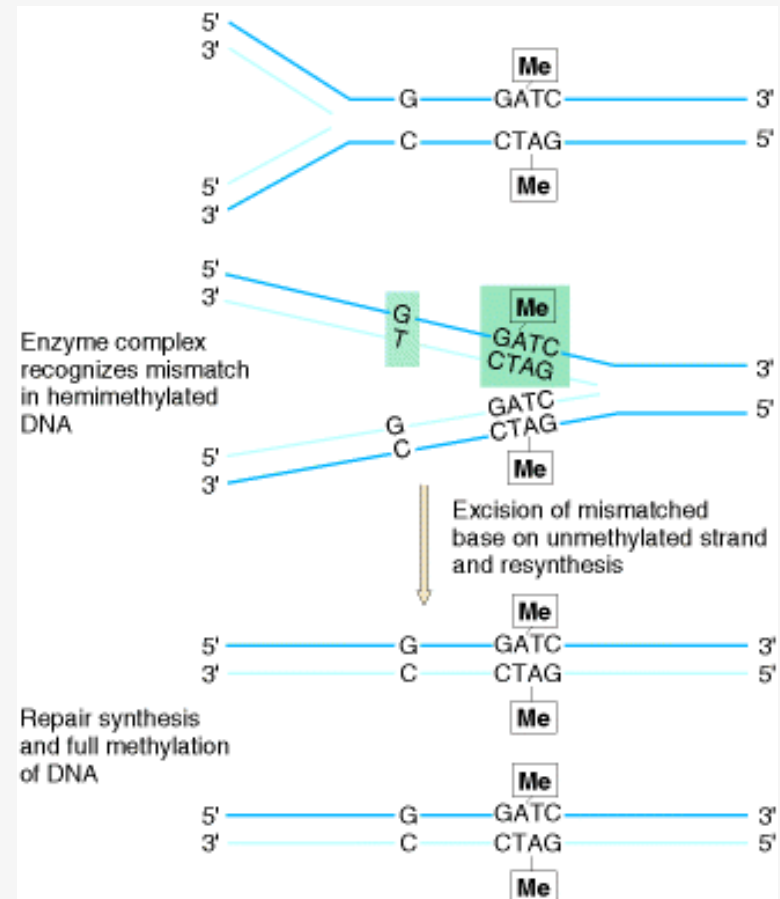


Pokud se DNA replikuje či opravuje, syntetizuje se nový řetězec rychlostí několika set nukleotidů za sekundu.

Bez funkce 3'-5' exonukleázy „proof-reading“ (která ihned odstraňuje nesprávnou bázi po jejím vložení) je výskyt chyby zhruba 1×10^5 a funkce „proof-reading“ snižuje tento výskyt chyby na zhruba 1 in 1×10^{10} .

Oprava nesprávné inkorporace báží)

Pokud se během replikace nebo opravy vloží nesprávná báze a není ihned odstraněna 3'-5' exonukleázou, lze toto napravit. Aby se tento proces uskutečnil, musí být buňka schopná rozlišit rozdíl mezi starým a novým řetězcem, což je možné, protože nový řetězec je dočasně hypometylovaný.



Chromatinová struktura

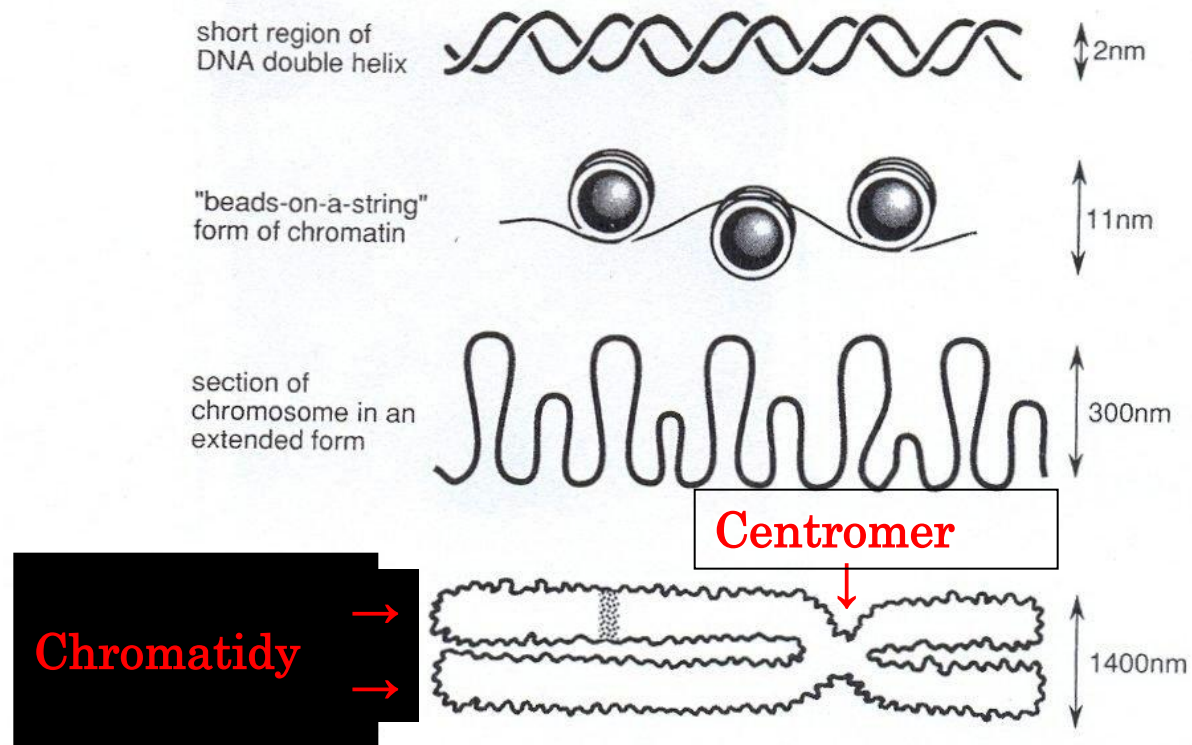
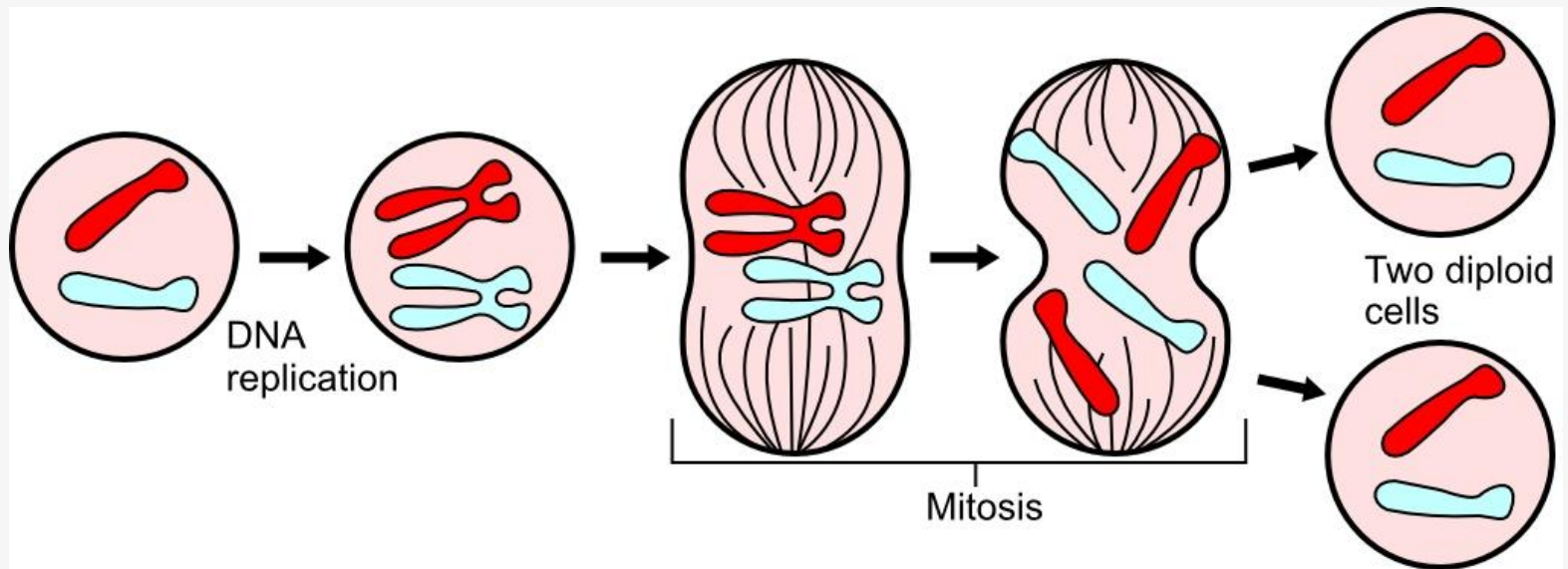
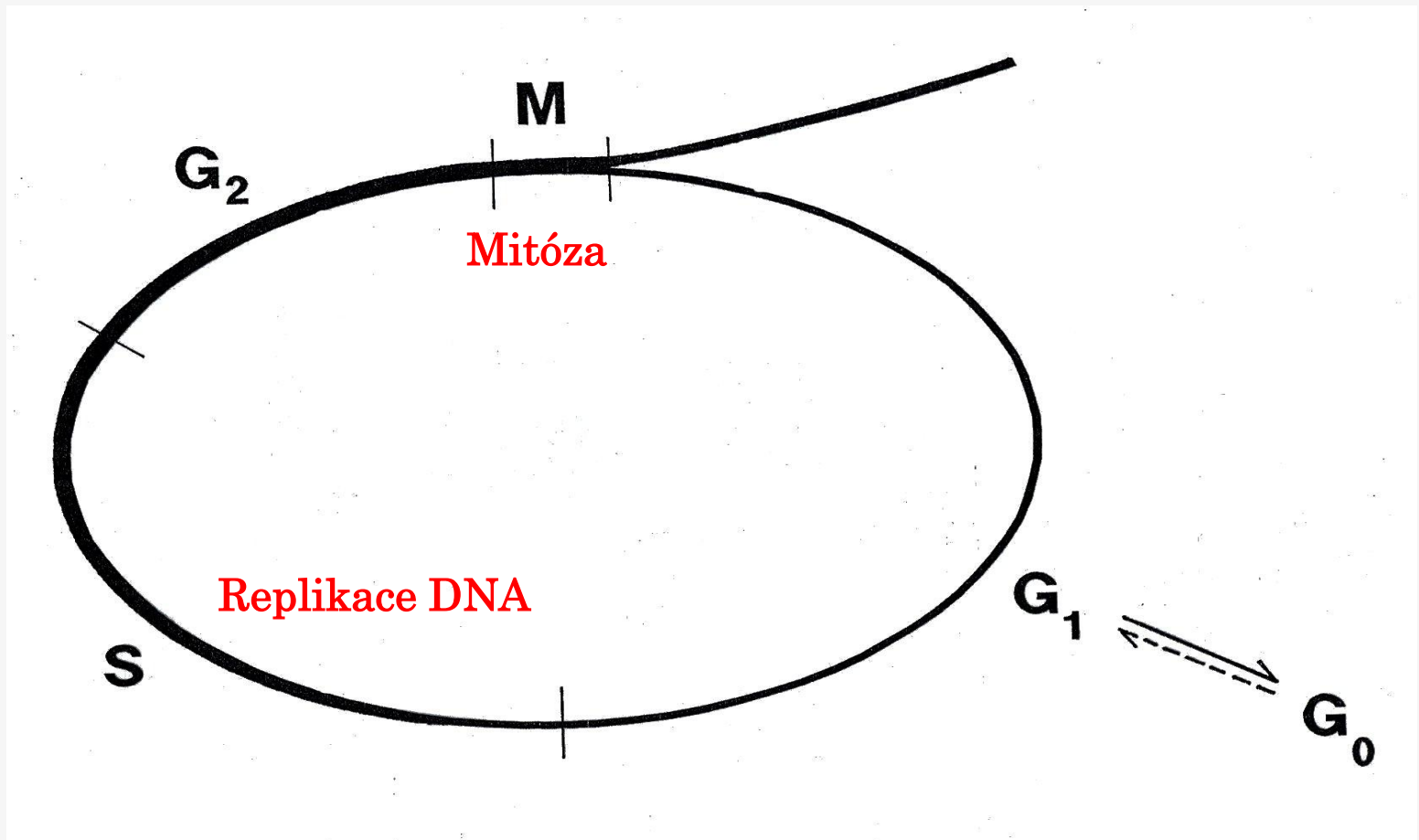


Figure 2.5. Illustration of the relative sizes of the DNA helix, the various stages of folding and packing of the DNA, and an entire chromosome condensed at metaphase.

Mitóza



Buněčný cyklus



Typy aberací

Chromosomová aberace

- výsledek, pokud se buňka ozáří časně v interfázi (G_1), před replikací chromosomového materiálu
- během fáze syntézy DNA, která následuje, klade tento chromatinový řetězec vedle sebe identický řetězec.

Chromatidová aberace

- výsledek, pokud je buňka ozářena později v interfázi po zdvojení DNA (G_2) a chromosom vytváří dva řetězce chromatinu
- zlom, který nastává v jednom rameni chromatidy, ponechává opačné rameno téhož chromosomu nepoškozené.

Letální aberace chromosomů či chromatid (1)

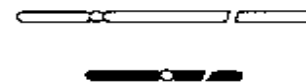
Postihuje dva oddělené chromosomy

Zlomy musí nastat časně v interfázi a musí být "opraveny" připojením dvou chromosomových částí obsahujících centromery.

Výsledná struktura se replikuje a může se identifikovat jako zkreslený chromosom se 2 (nebo 3) centromerami a jedním centrickým fragmentem.



2 different pre-replication chromosomes

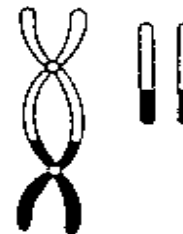


1 break in each chromosome



Illegitimate union

Replication (S)



Dicentric chromosome plus acentric fragment

A

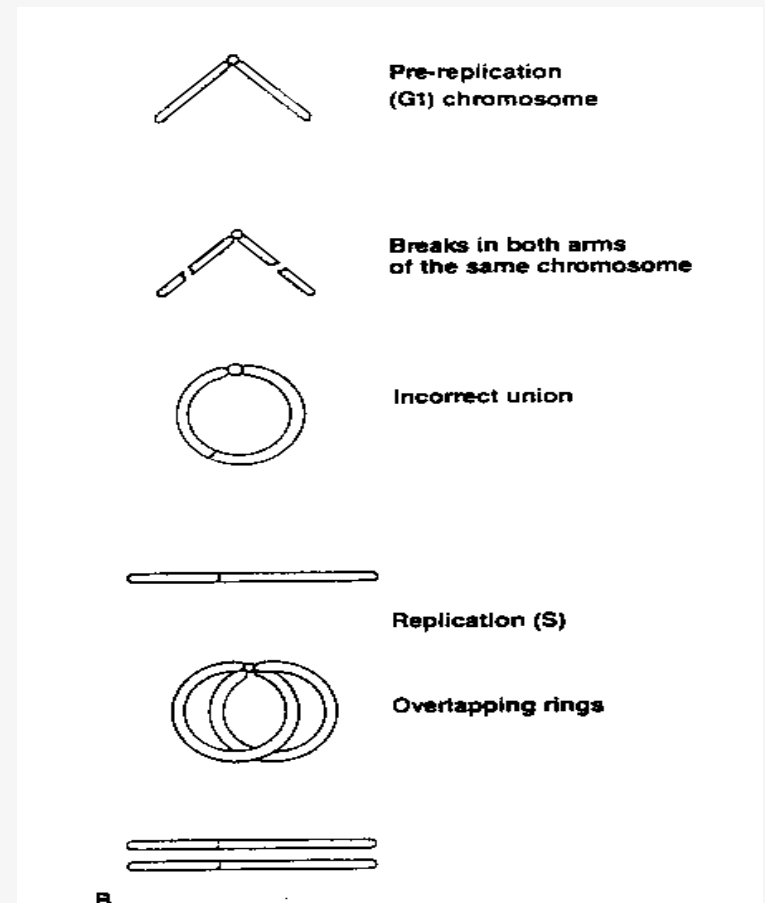
Letální aberace chromosomů či chromatid (2)

Centrický kroužek

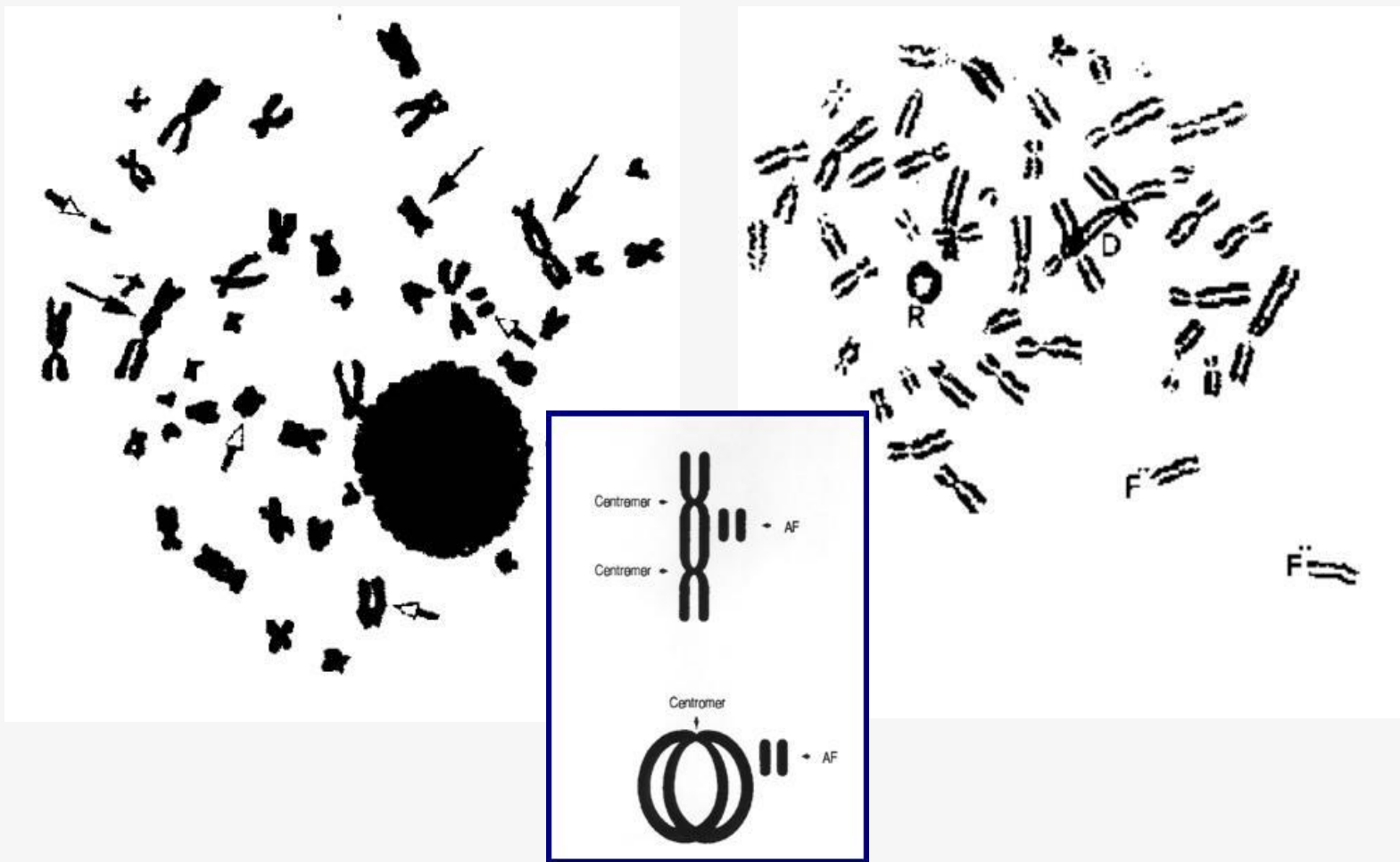
Zahrnuje dvě větve téhož chromosomu.

Zlomy musí nastat časně v interfázi a musí být "opraveny" vytvořením kroužku s jednou centromerou a jedním centrickým fragmentem.

Později se chromosom replikuje a může se identifikovat jako dvojitý kroužek.



Chromosomové aberace v metafázi lymfocytů



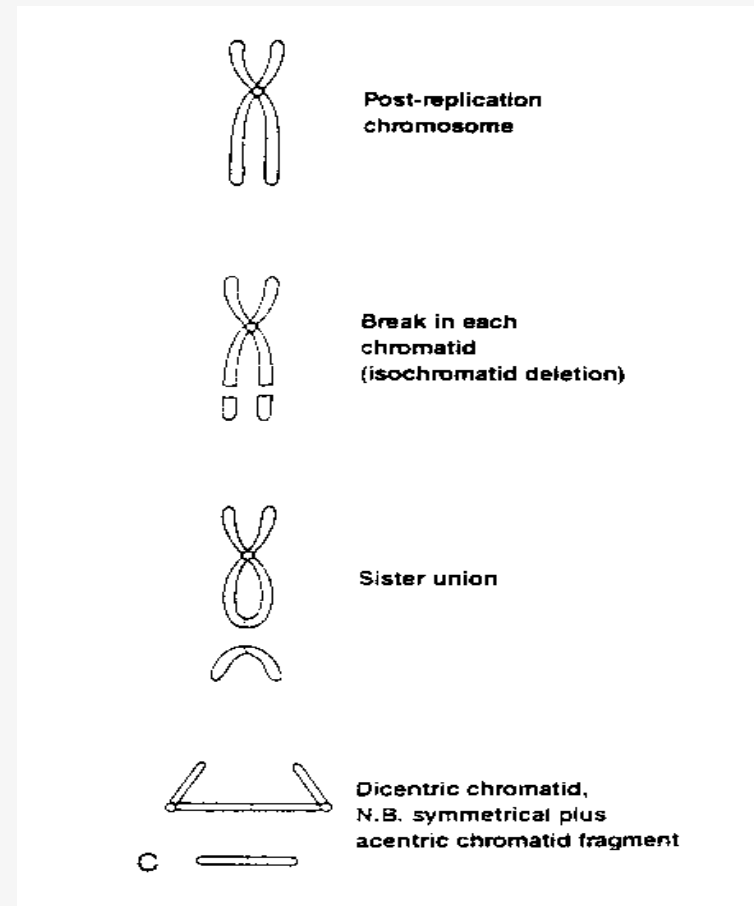
Letální aberace chromosomů či chromatid (3)

Anafázový můstek

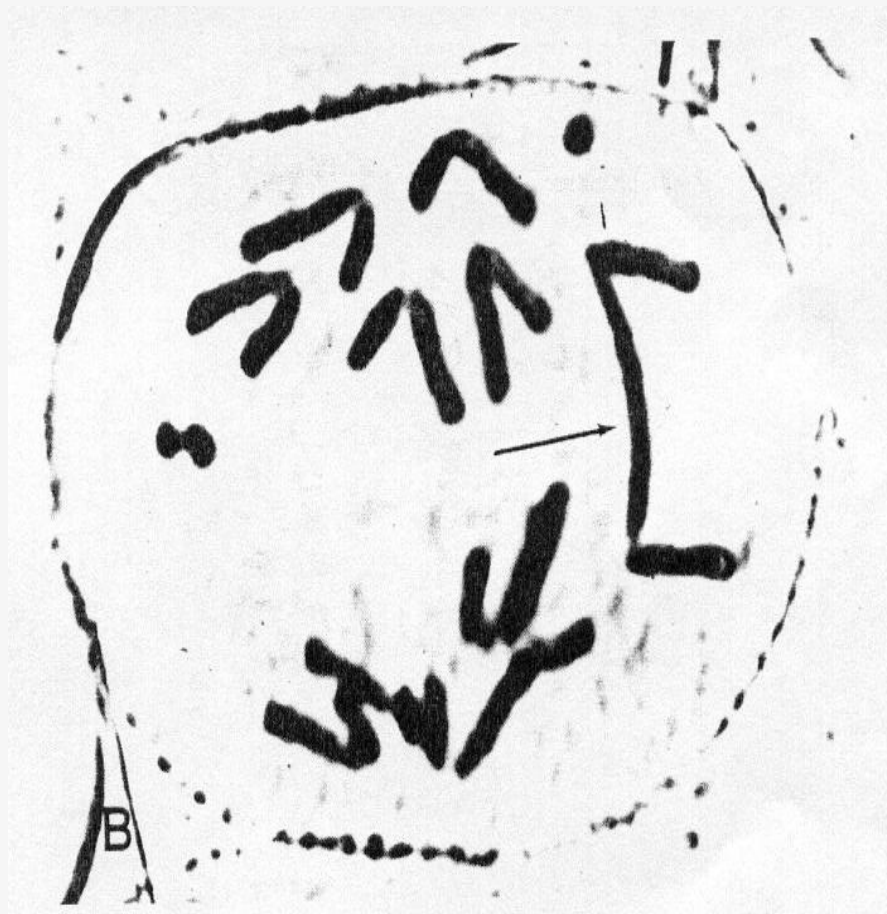
Postihuje dvě chromatidy téhož chromosomu.

Zlomy musí nastat později v interfázi, po replikaci a musí být "opraveny" spojením nesprávných konců

V anafázi, když se chromatidy pohybují k opačným pólům, se chromatinová sekce mezi centromerami protáhne a vytvoří můstek.



Anafázový můstek



Typy aberací

Jsou možné mnohé typy aberací a přeskupení.

3 typy jsou pro buňku letální:

- dicentrické chromosomy (chromosomový typ)
- centrický kroužek (chromosomový typ)
- anafázový můstek (chromatidový typ)

Několik dalších typů je neletálních:

- malá delece (terminální nebo intersticiální)
- translokace

Neletální přeskupení (1)

1) Terminální delece:

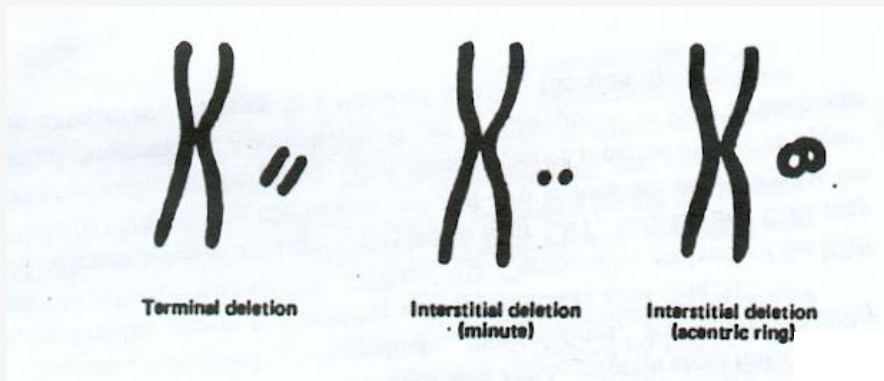
Ztráta genetického materiálu z konce chromatidy.

2) Intersticiální delece

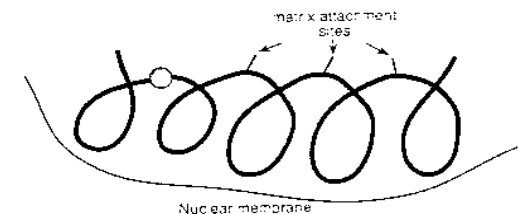
- drobné: velmi malé vypuštění; jako malé spárované tečky
- acentrický kroužek: větší intersticiální delece; jako centrické kroužky

Delece může souviset se vznikem karcinomu, pokud ztráta materiálu zahrnuje některý supresorový gen.

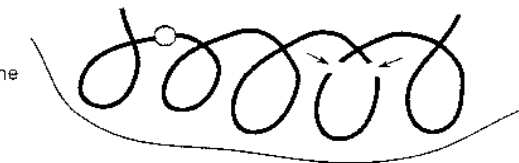
Možný mechanismus vzniku malých delecí



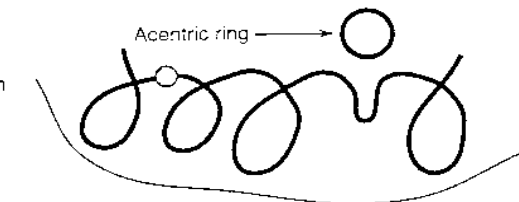
Pre-replication interphase chromosome



Two radiation induced breaks occur in the same arm of a chromosome



A deletion occurs as an acentric ring; lost as mitosis



Neletální přeskupení (3)

Symetrická translokace

Zahrnuje zlomy ve 2 prereplikačních chromosomech s výměnou přerušovaných konců mezi těmito dvěma chromosomy.

Obtížně viditelná na konvenčním preparátu, ale snadno pozorovatelná při fluorescenční hybridizaci in situ (FISH).

2 different pre-replication chromosomes



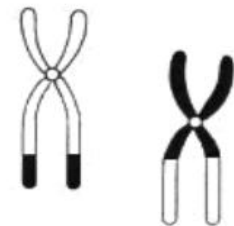
1 break in each chromosome



Illegitimate union

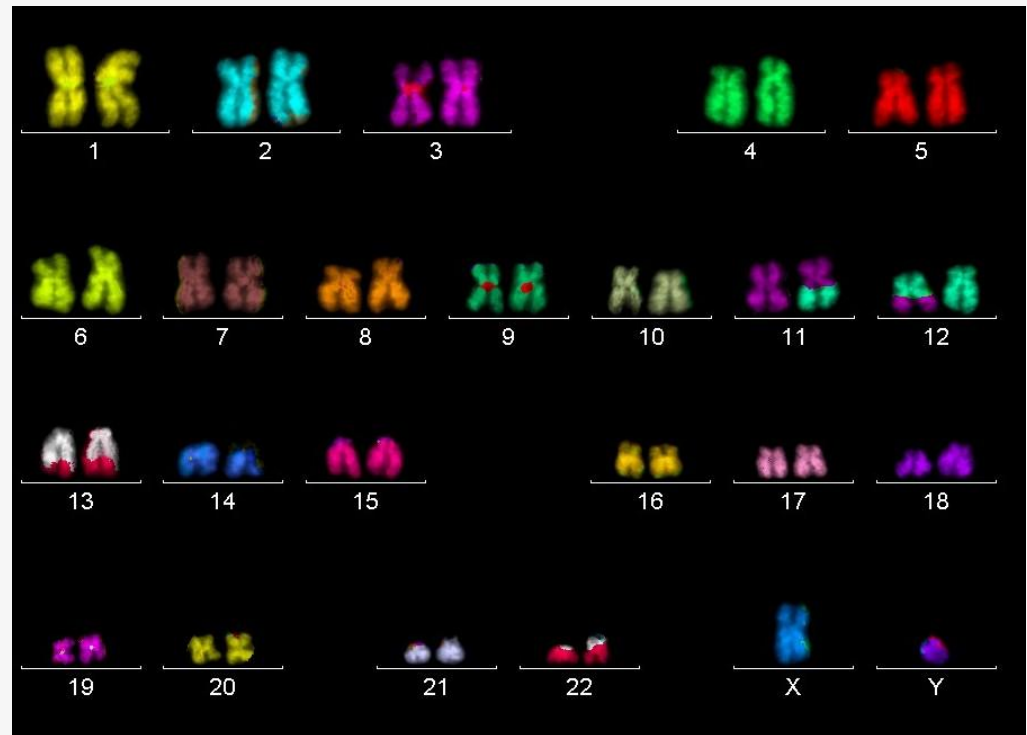
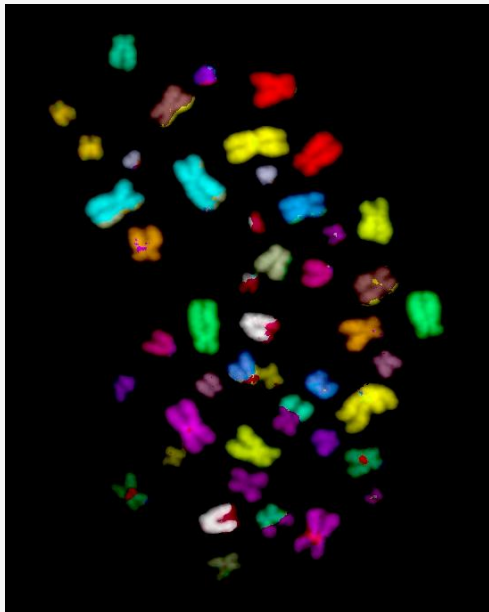


Replication (S)



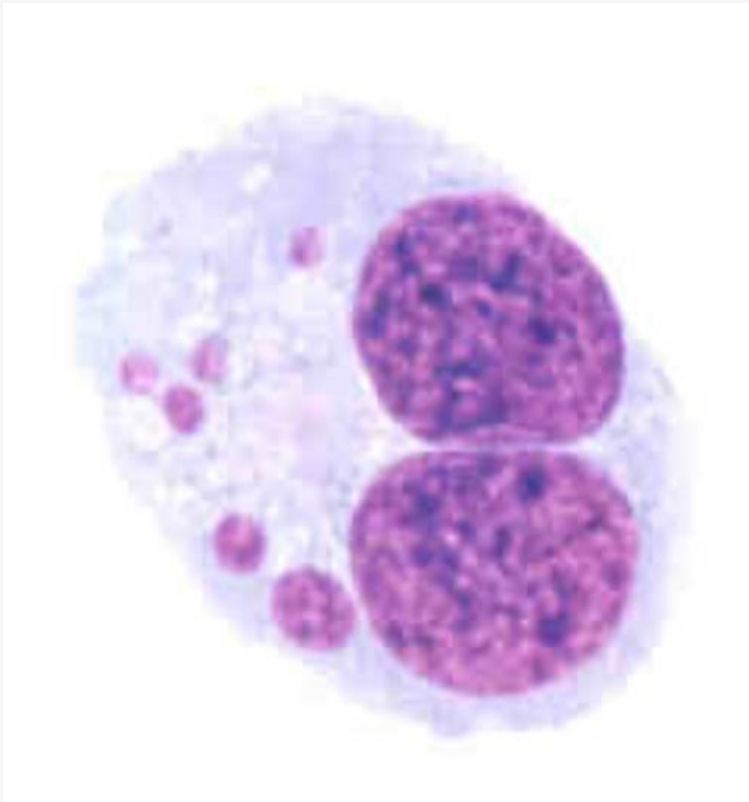
Translocation

Analýza stabilních chromosomových aberací metodou FISH

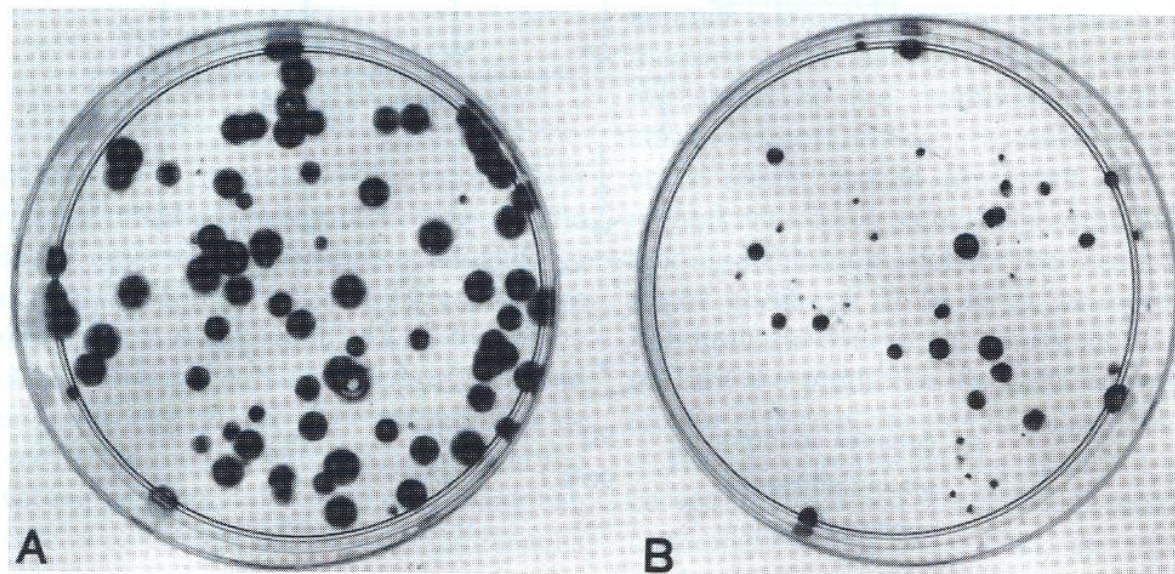


FISH = fluorescence in situ hybridization (“Chromosome Painting“)

Mikronukleární a nukleoplazmatické můstky po dělení jádra



Analýza tvorby kolonií (1)



A: Na této neozářené kontrolní misce bylo naočkováno 100 buněk a byla poskytnuta doba 7 dnů růstu před obarvením. Je zde 90 kolonií.

B: 2000 buněk bylo naočkováno a poté exponováno dávkou 8 Gy RTG záření. Je zde 30 kolonií.

Analýza tvorby kolonií (2)

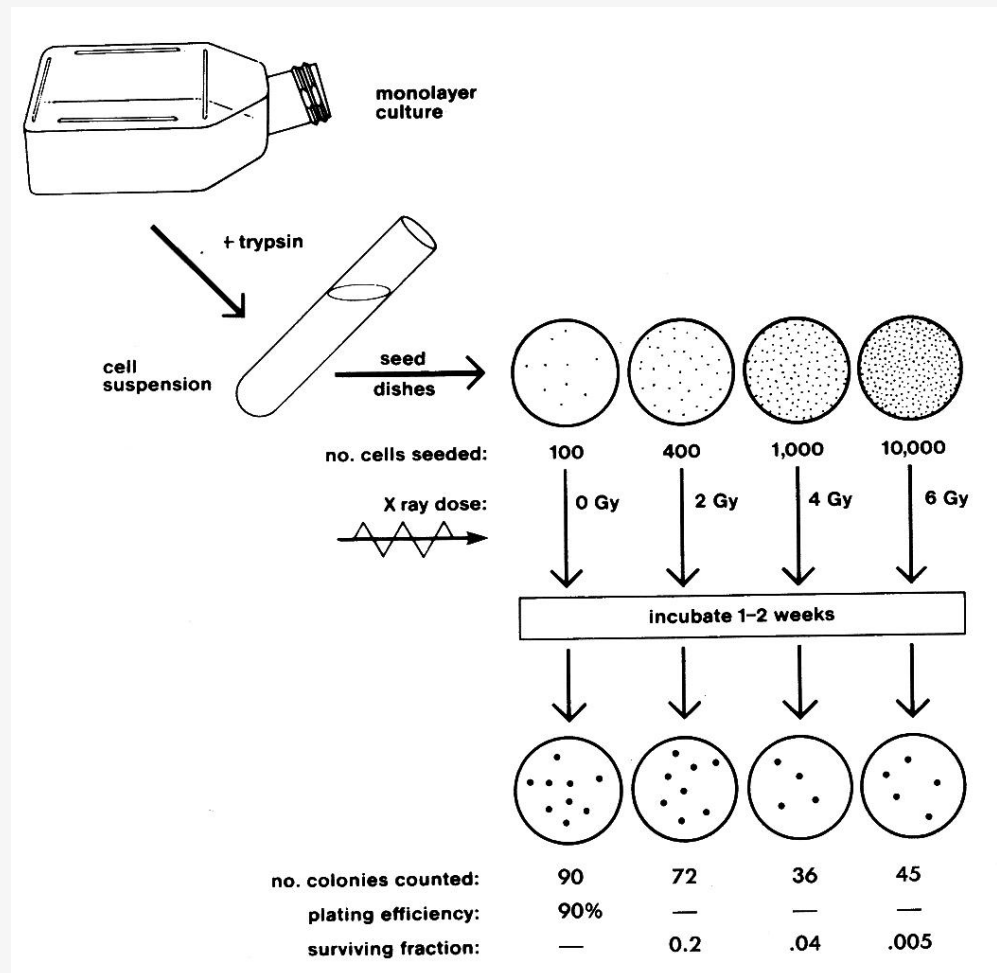
Plating efficiency
(Účinnost nanesení) =

$$\frac{\text{Počet kolonií}}{\text{Počet naočkovaných buněk}} \times 100 \text{ (bez ozáření)}$$

Surviving fraction
(Přežívající frakce) =

$$\frac{\text{Počet kolonií}}{\text{Počet naočkovaných buněk}}$$

/ PE x 100



Tvar křivky přežívání

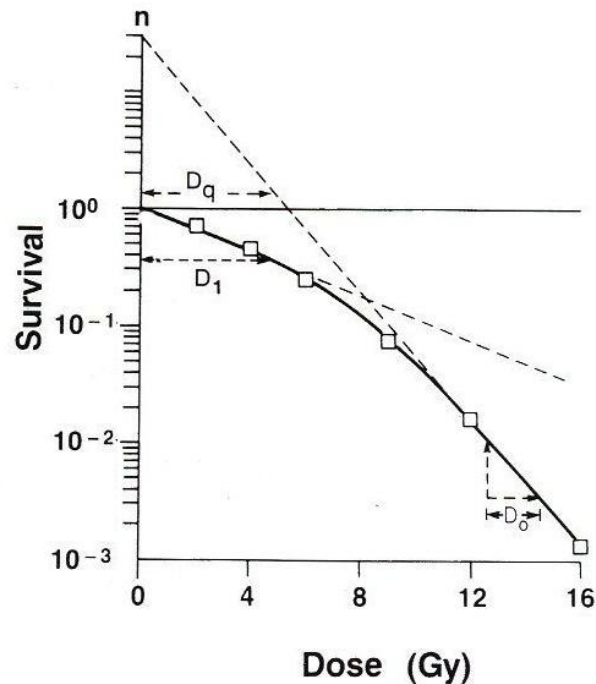


Figure 3.3. Shape of survival curve for mammalian cells exposed to radiation. The fraction of cells surviving is plotted on a logarithmic scale against dose on a linear scale.

A: The curve is described by the initial slope (D_1), the final slope (D_0), and a parameter that represents the width of the shoulder, either n or D_q .

Letální zásahy (1)

Počet přežívajících (jednotek tvořících kolonie) se vztahuje k počtu (letálních) zásahů podle Poissonova rozdělení:

Předpokládejme, že průměrný počet zásahů na buňku při dávce D je hD .

Potom pravděpodobnost buňky, která utrpěla přesně n zásahů je

$$P(n) = hD * \exp(-hD) / n!$$

Pravděpodobnost, že buňka obdrží 0 zásahů, tj. přežití, je

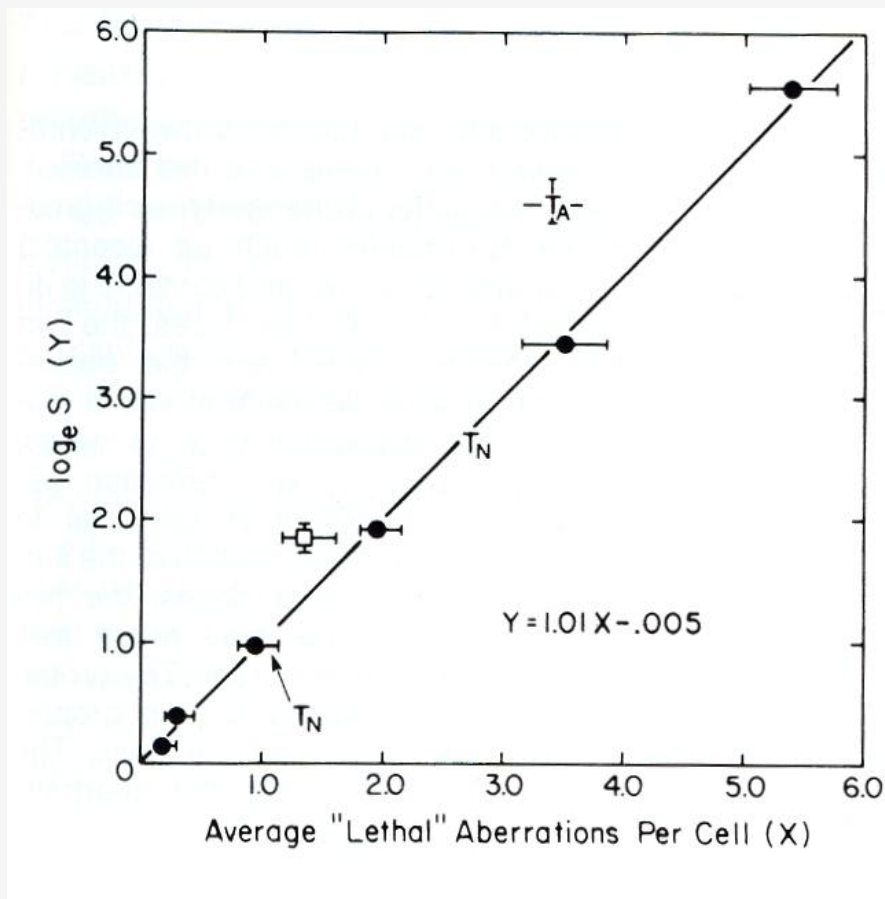
$$P(0) = hD * \exp(-hD)$$

Je-li průměrný počet zásahů na buňku právě 1, potom $hD_1 = 1$, a

$$P(0) = 1 * \exp(-1) = 1/e \text{ neboli } 37\%$$

Proto D_1 je dávka, která snižuje přežití na 37 %.

Letální zásahy (2)

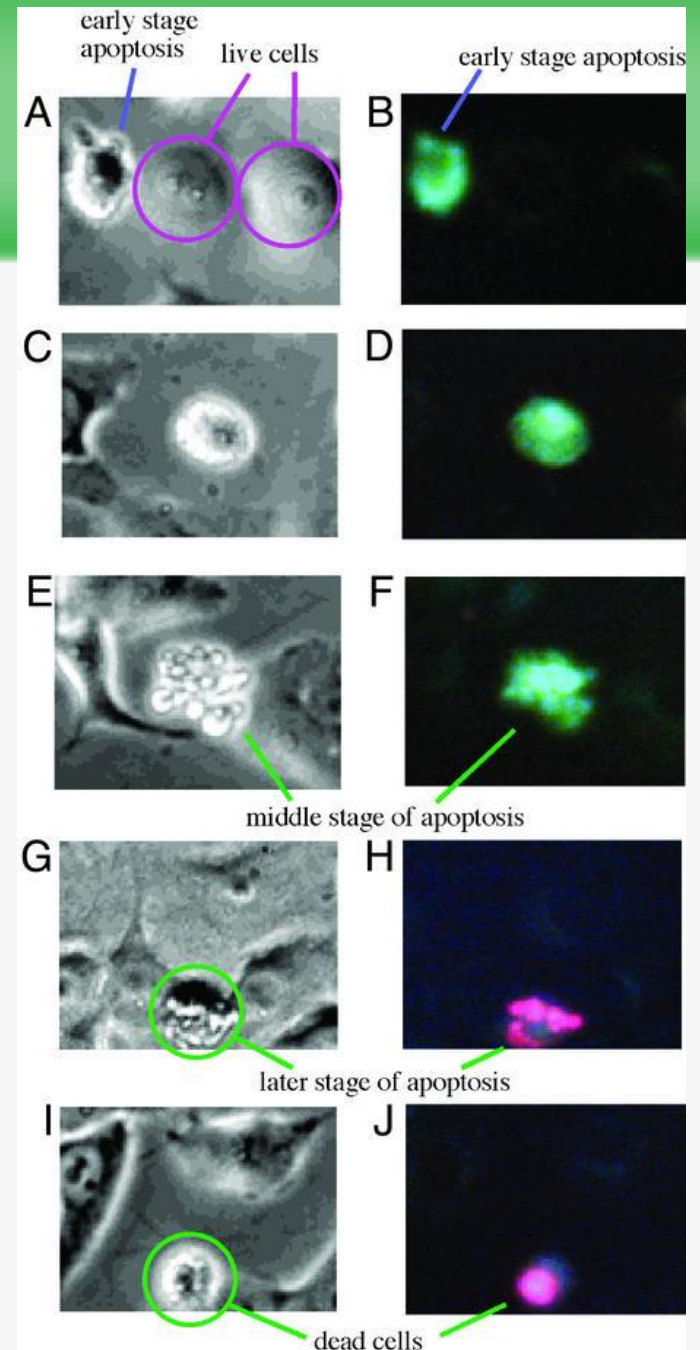


Vztah mezi průměrným počtem "letálních" zásahů a počtem chromosomových aberací na buňku pro jeden typ lidských fibroblastů. Existuje virtuální vztah jedna ku jedné s 1 "letálním" zásahem (37 % přežití) při 1 chromosomové aberaci.

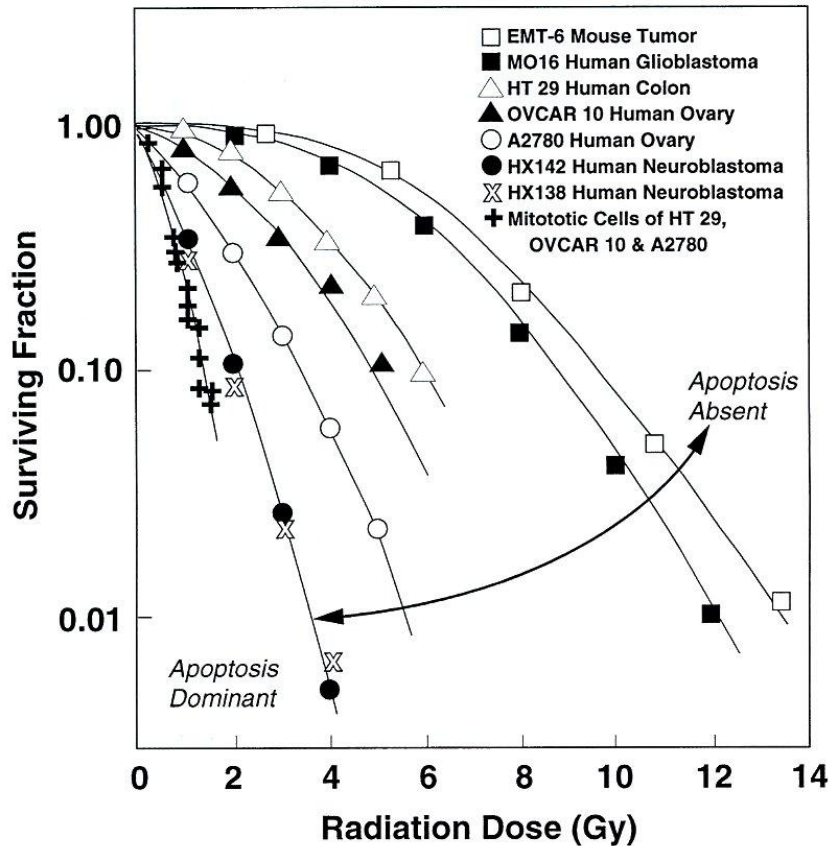
Apoptóza

“Programovaný zánik buňky” nebo “sebevražda buňky”.

Morfologické změny zahrnují tvorbu bublinek na buněčné membráně (“blebbing”), kondenzaci chromatinu (“pyknózu”), rozpuštění DNA na malé fragmenty pravidelné velikosti (“DNA laddering”) a tvorbu malých fragmentů buňky uzavřených membránou („apoptotických tělísek”).



Relativní příspěvek apoptózy k inaktivaci buněk



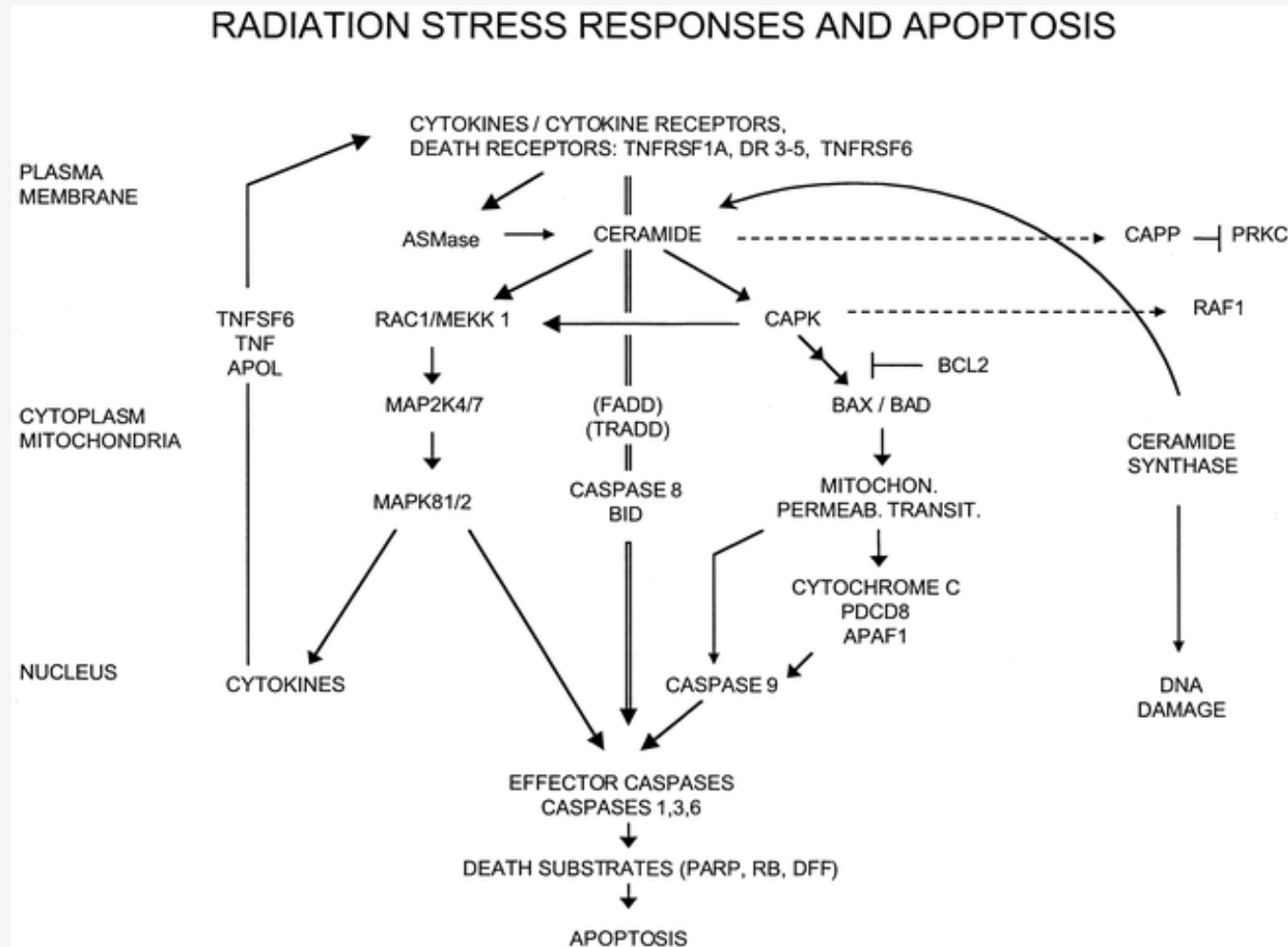
Vynesení křivek přežívání pro několik buněčných linií od lidí a hlodavců.

Povšimněte si širokého rozmezí radiosenzitivit (nejlépe vidět na rozměru ramena) mezi nejrezistnějšími, které nevykazují apoptózu a nejcitlivějšími, které ji vykazují.

Regulace apoptózy prostřednictvím p53

- Poškození DNA v p53+/+ buňkách → apoptóza
- Poškození DNA v p53-/- buňkách → bez apoptózy
- p53 vyvolává bax a tím protiútok proti bcl2 obvykle potlačující apoptózu
- avšak tento mechanismus není zdaleka vysvětlen
- apoptóza vyvolaná zářením není vždy (u všech buněčných linií) závislá na funkčním p53

Cesty indukce apoptózy



Zotavení z potenciálně letálního poškození (1)

Křivky přežívání ozáření RTG paprsky u nerostoucích buněk. Přežívání buněk je horší u buněk vložených do růstového média bezprostředně po ozáření a je lepší, pokud jsou ponechány za podmínek bez růstu po několik hodin, čímž se jim poskytne čas potřebný pro opravu poškození DNA.

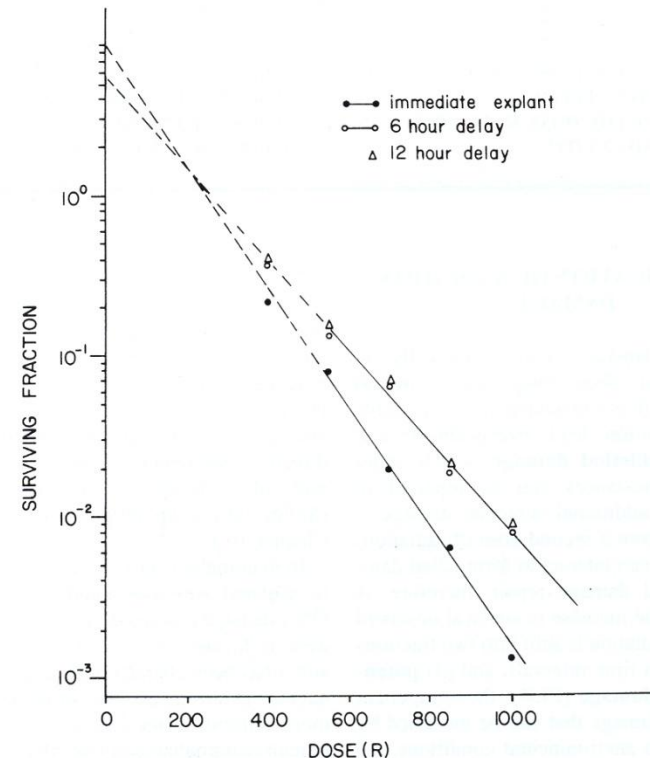
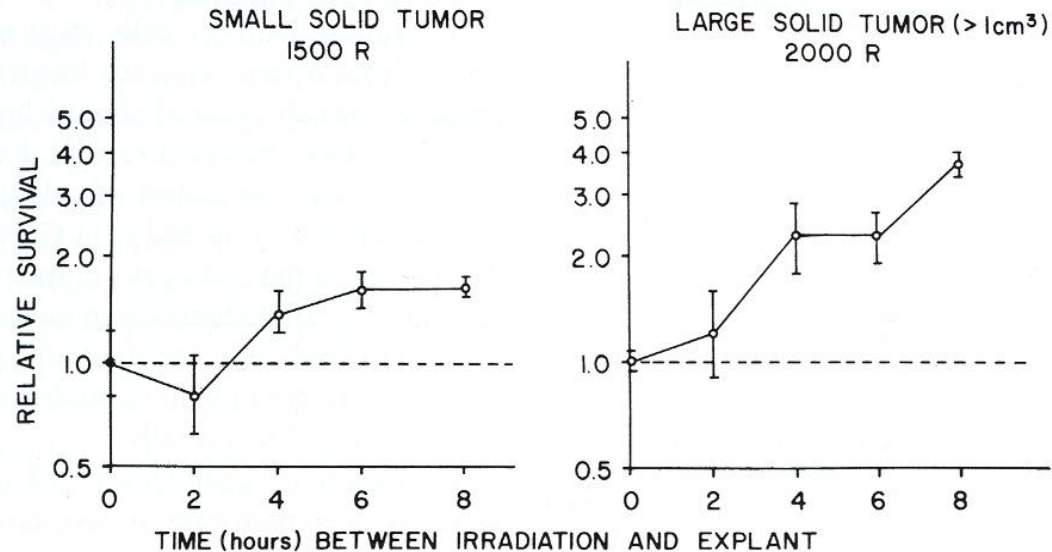


Figure 5.1. X-ray survival curves for density-inhibited stationary-phase cells, subcultured (trypsinized and plated) either immediately or 6 to 12 hours after irradiation. Cell survival is enhanced if cells are left in the stationary phase after irradiation, allowing time for the repair of potentially lethal damage. (From Little JB, Hahn GM, Frindel E, Tubiana M: Repair of potentially lethal radiation damage in vitro and in vivo. *Radiology* 106:689–694, 1973, with permission.)

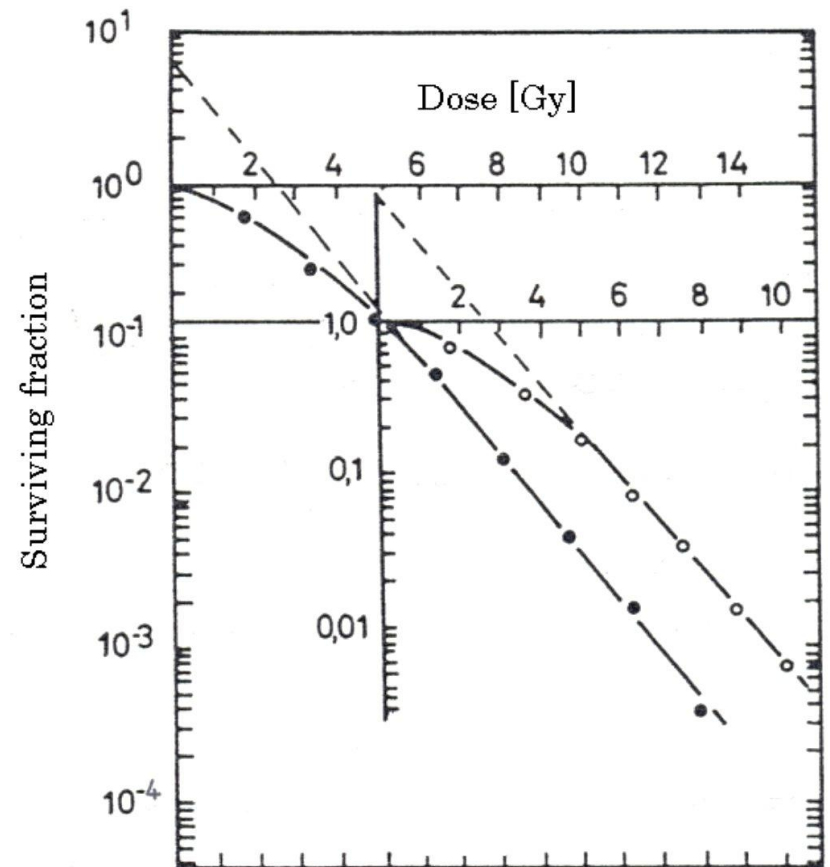
Zotavení z potenciálně letálního poškození (2)



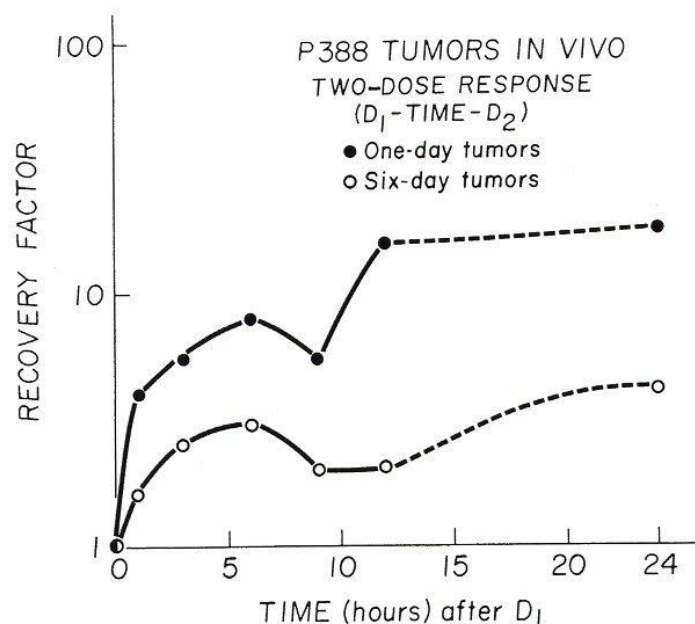
Časový průběh zotavení z potenciálně letálního poškození. V těchto pokusech byly ozářeny tumory a byly připraveny suspenze jednotlivých buněk pro rozbor tvorby kolonií in vitro. Povšimněte si, že čas optimálního zotavení je řádu 6 hodin.

Zotavení ze subletálního poškození (1)

Pokud jsou buňky ozářeny první dávkou okolo 5 Gy a poté inkubovány po dobu 24 hodin, reagují na druhou dávku (použitou po inkubaci), jako kdyby nebyly předtím nikdy exponovány zářením. "Rameno" křivky přežívání je stejné pro "pouze první dávku" jako pro "pouze druhou dávku".



Zotavení ze subletálního poškození (2)



Podobně, jako je tomu s časovým průběhem zotavení z potenciálně letálního poškození, vyžaduje zotavení ze subletálního poškození alespoň 6, někdy 12 hodin k plnému rozvoji. "Faktor zotavení", který je zde vyneseno je poměr frakce přežití následkem frakcionace do dvou dávek k frakci přežití následkem jedné ekvivalentní dávky.

Účinek frakcionace dávek

Dokonce i po opakované frakcionaci lze pozorovat rameno křivky přežívání při každé nové dávce podané po skončení období zotavení ze subletálního poškození.

Tímto způsobem se vytváří "efektivní" křivka přežívání, která je zřetelně plošší než křivka přežívání pro jednotlivé dávky.

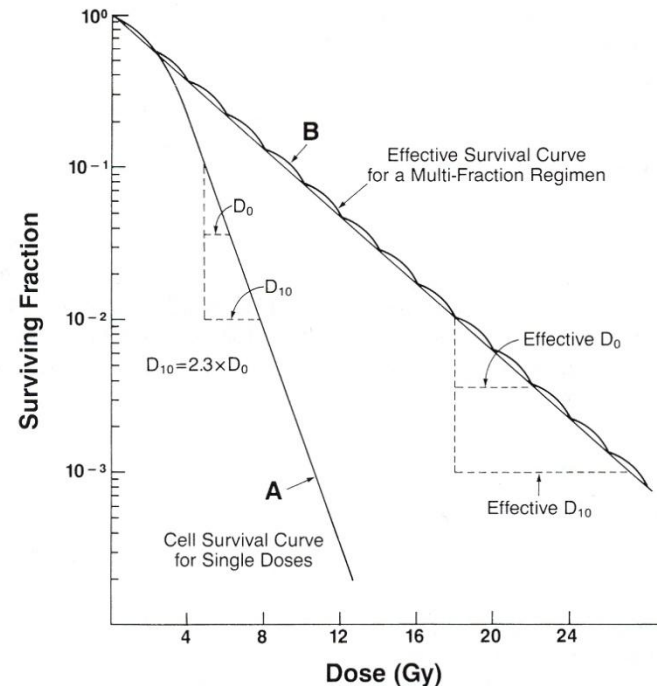


Figure 3.10. The concept of an “effective” survival curve for a multifraction regimen is illustrated. If the radiation dose is delivered in a series of equal fractions separated by time intervals sufficiently long for the repair of sublethal damage to be complete between fractions, the shoulder of the survival curve is repeated many times. The effective dose–survival curve is an exponential function of dose, that is, a straight line from the origin through a point on the single-dose survival curve corresponding to the daily dose fraction (e.g., 2 Gy). The dose resulting in one decade of cell killing (D_{10}) is related to the D_0 by the expression $D_{10} = 2.3 D_0$.

Vliv snížení dávkového příkonu

Křivky dávka-odpověď pro záření γ při různých příkonech dávky. Při vysokých dávkách je zřetelný účinek dávkového příkonu dokonce při 1,07, 0,3, a 0,16 Gy/min, avšak při ještě nižších dávkových příkonech lze pozorovat rozšíření ramena křivky, takže je možno tento účinek pozorovat dokonce i při nižších dávkách.

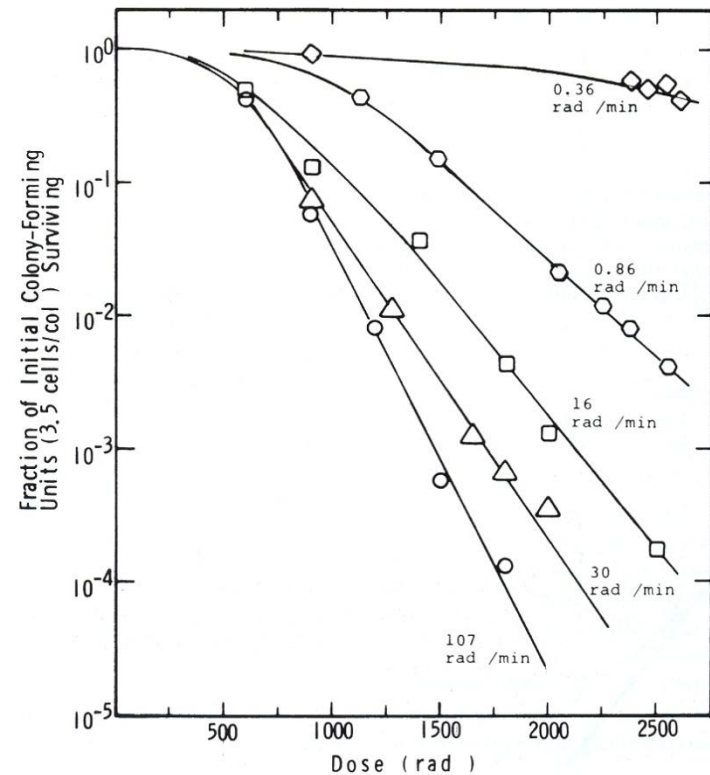
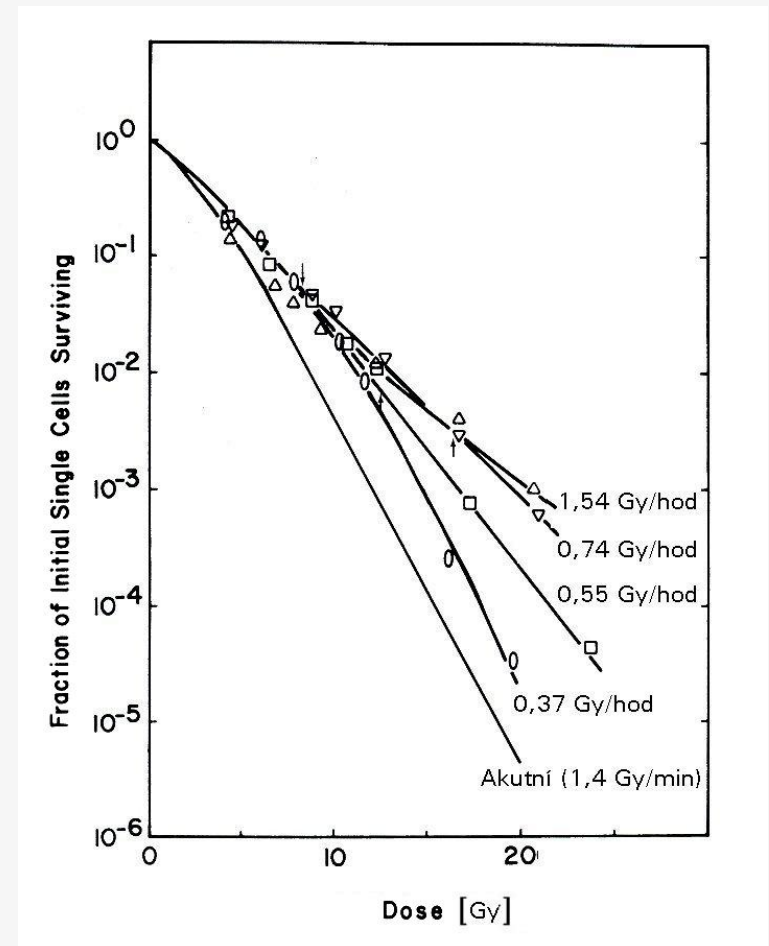


Figure 5.10. Dose-response curves for Chinese hamster cells (CHL-F line) grown *in vitro* and exposed to cobalt-60 γ -rays at various dose rates. At high doses a substantial dose-rate effect is evident even among 1.07, 0.3, and 0.16 Gy/min (107, 30, and 16 rad/min). The decrease in cell killing becomes even more dramatic as the dose rate is reduced further. (From Bedford JS, Mitchell JB: Dose rate effects in synchronous mammalian cells in culture. *Radiat Res* 54:316-327, 1973, with permission.)

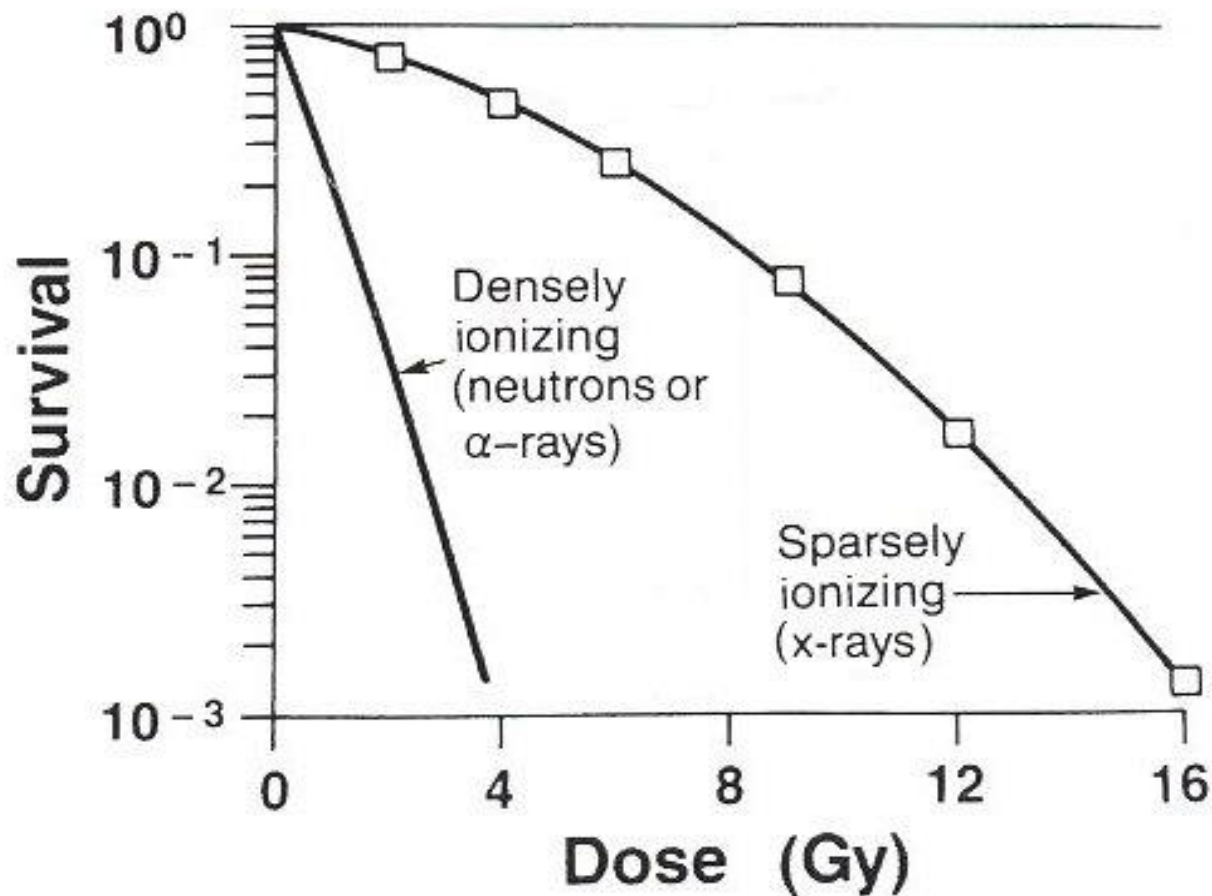
Inverzní účinek dávka-příkon

V některých případech snížení přílivu dávky vede do určité míry ke sníženému účinku (zde: menší inaktivace buněk), avšak další snížení způsobuje opět vyšší účinek (zde: více usmrcených buněk).

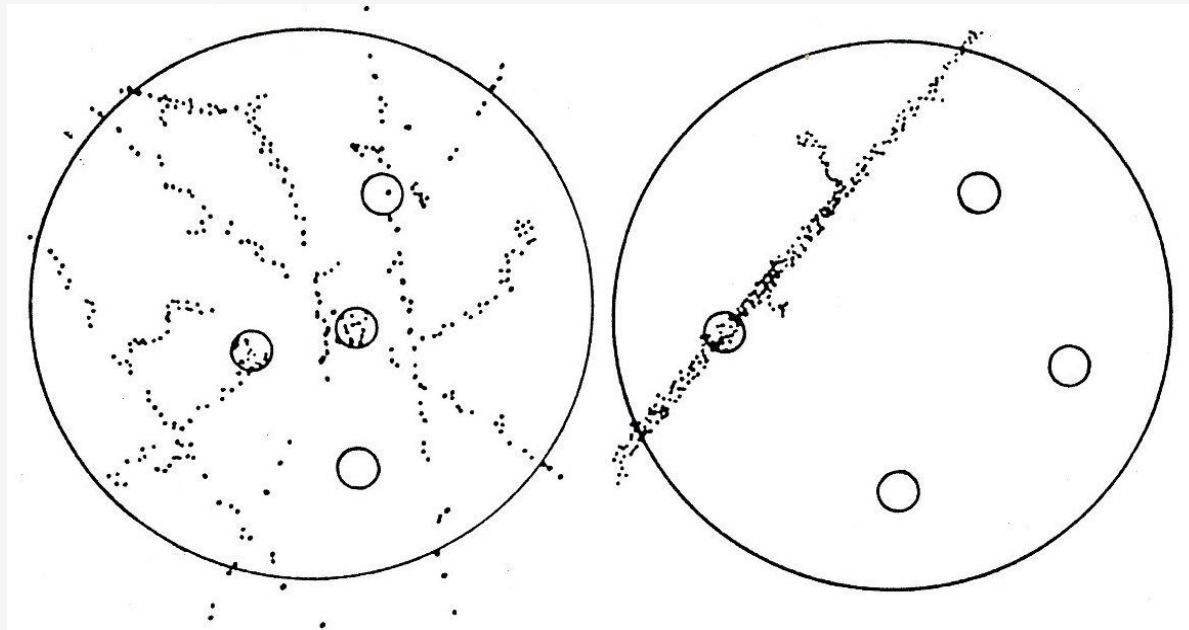
Jeden z důvodů takového účinku je "zmrazení" buněk v G_2 fázi, čímž se tyto buňky stanou citlivějšími..



Srovnání řídce a hustě ionizujícího záření (1)

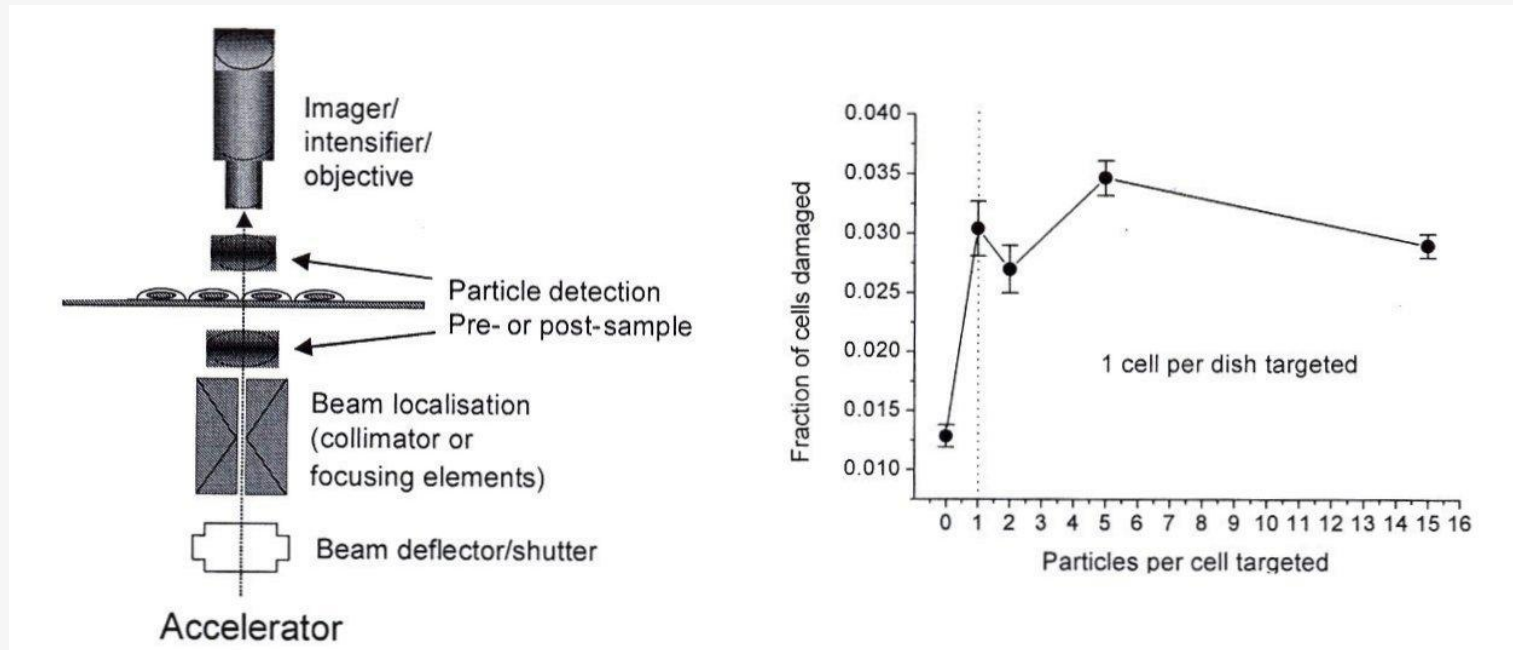


Srovnání řídce a hustě ionizujícího záření (2)



Ionizace a poškození způsobené řídce ionizujícím zářením (RTG paprsky, paprsky γ) jsou víceméně rovnoměrně distribuovány v buňce, zatímco ionizace a poškození způsobené hustě ionizujícím zářením (částice α , neutrony) jsou koncentrovány okolo dráhy částice procházející buňkou.

“Bystander” efekt



Ozáření jednotlivých buněk pomocí mikrosvazku způsobuje rovněž poškození v sousedních buňkách, které nebyly zasaženy. Proto je počet postižených buněk do značné míry nezávislý na počtu částic vyslaných na cílovou buňku.

Pravidlo Bergonié a Tribondeau

Tkáně jsou více radiosenzitivní, pokud jsou jejich buňky méně diferencovány a pokud se rychleji dělí.

typ buňky	vlastnosti	příklady
vegetativní intermitotické buňky	pravidelné dělení, bez diferenciac	erytroblasty (kostní dřeň) buňky intestinální krypty zárodečné buňky epidermis
diferencující intermitotické buňky	pravidelné dělení, určitá diferenciac mezi děleními	myelocyty (kostní dřeň)
revertující postmitotické buňky	nedělí se pravidelně, proměnlivě diferenciované	játra
fixované postmitotické buňky	nikdy se nedělí, vysoce diferenciované	nervy, svaly