



# Radiologická fyzika a radiobiologie

## Základy radiochemie (radiobiologie I)

Tato přednáška se opírá převážně o monografii E. L. Alpen: Radiation Biophysics (1998), novější radiobiologickou literaturu a internetové materiály.

# Ionizační a excitační procesy

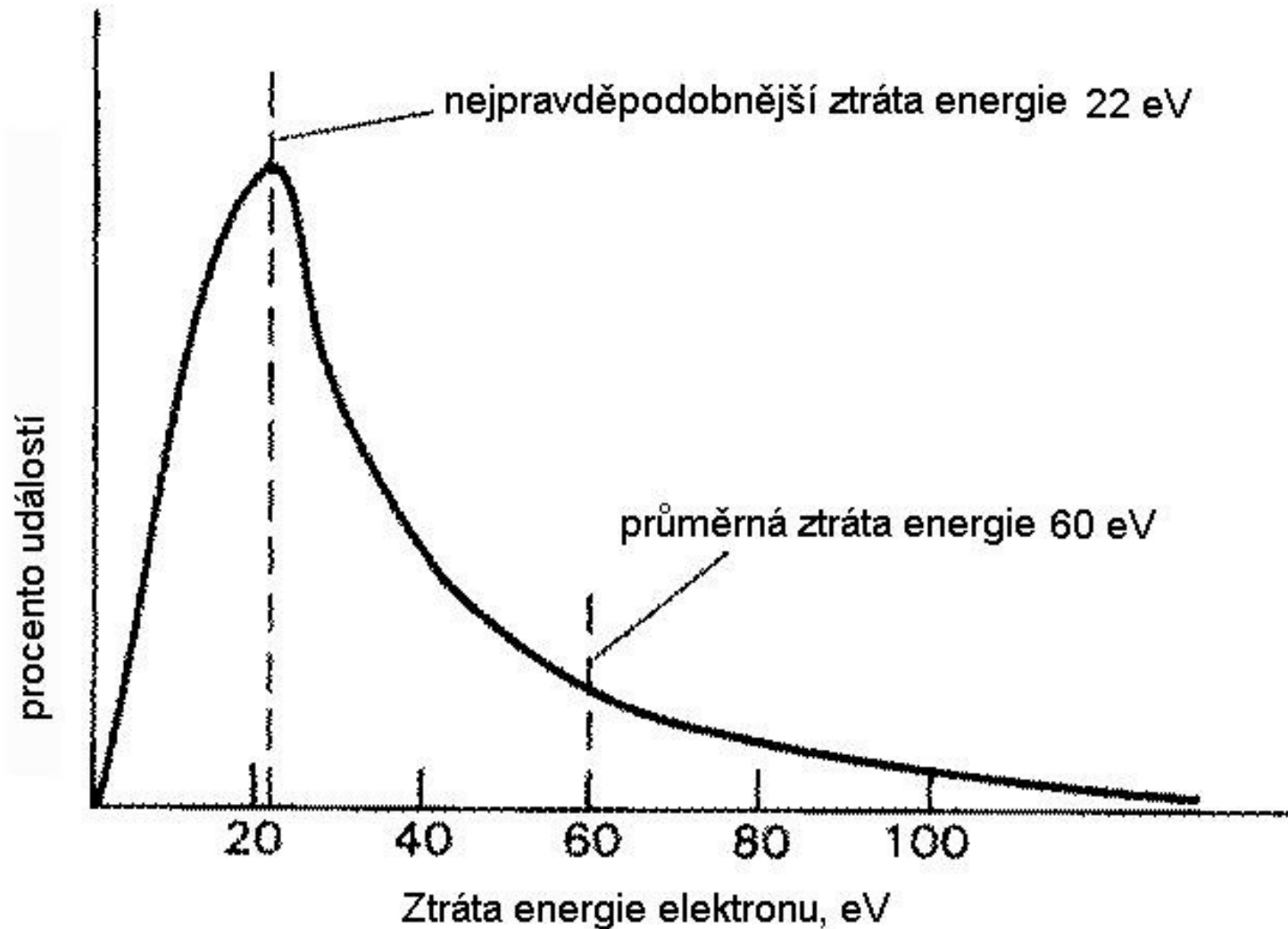


Většina energie rozptýleného (sekundárního) záření je nesena elektrony, které ionizují prostředí. Tyto **vysokoenergetické elektrony** vznikly (v radiologických souvislostech) **fotoelektrickým jevem a Comptonovým rozptylem záření rentgenového i gama.**

Pro nás podstatným prostředím je **voda**, která tvoří u dospělých kolem 60% váhy těla.

Tzv. první ionizační potenciál vody je 12,6 eV. Pro srovnání, elektrony o energii 20 keV ztrácejí při interakci s vodou s největší pravděpodobností kvantum energie 22 eV (průměrná velikost ztráty je 60 eV (viz obr.)). Ztráty energie mají v každém případě diskrétní hodnoty.

# Histogram ztrát energie elektronu při jeho interakcích s látkou (elektrony o relativně nízké energii 20 keV ve vodě)



*Dost podobně tomu je s průměrným a nejpravděpodobnějším platem!!!!*

# Ionizační a excitační procesy



Patrně podle vzhledu ionizačních stop získaných pomocí bublinkových komor a množství „předané = ztracené“ energie se tyto události dělí na

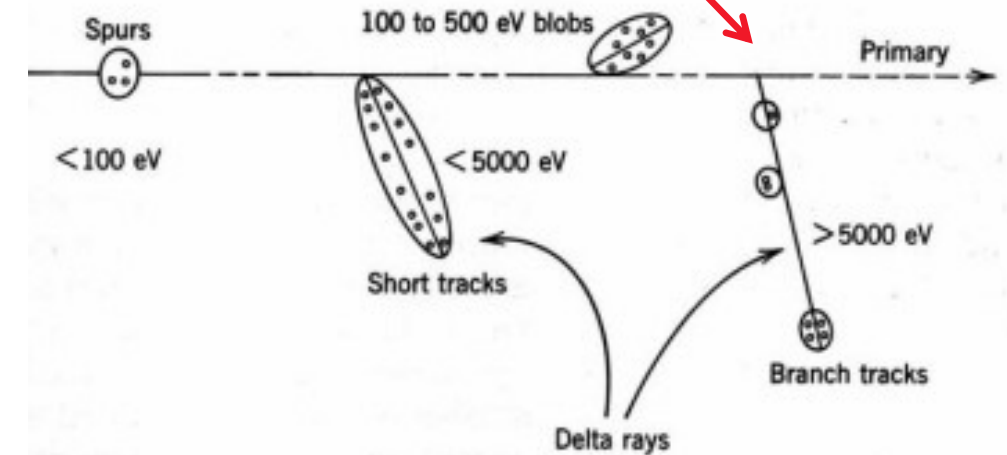
Ostruhy (*Spurs*) – 6 – 100 eV – jen několik iontů

Kuličky, bloby (*Blobs*) – 100 – 500 eV – desítky iontů

Krátké stopy (*Short tracks*) – 500 – 5000 eV – stovky iontů

Elektron o energii 1 MeV, předává asi 65% energie v „ostruhách“, 15% v „blobech“ a 20% v „krátkých stopách“ (což jsou vlastně ionizační stopy terciárních elektronů).

Větvení stopy



<http://www.photobiology.com/educational/len/part2.htm>

# Ionizační a excitační procesy



Výsledek předání energie:

**ionizace** – 1 nebo více elektronů vyraženo z molekuly

**excitace**

**superexcitace** (přijatá energie je vyšší než ionizační, avšak elektron zůstává vázán k původnímu jádru)

Ve všech těchto případech je důsledkem **nestabilita**, která může vést ke **změnám struktury** molekuly nebo **mezimolekulovým interakcím**.

Jednotlivé „ostruhy“, tj, nejmenší skupiny ionizačních událostí, jsou od sebe **vzdáleny** v průměru 400 nm při vlastní velikosti cca 1 nm, vodíkový radikál je schopen difundovat do vzdálenosti v průměru 180 nm, dokud nezanikne.

**Důsledek: interakce (např. rekombinace) volných radikálů vytvářených v různých blosech, ostruhách a krátkých stopách prakticky není možná (pravděpodobná).**

# Radiochemie vody



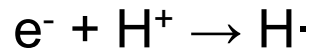
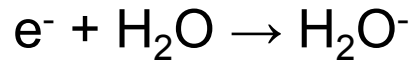
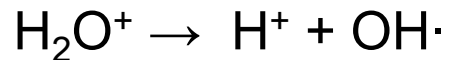
**Primární produkty radiolýzy vody**, objevující se v čase od  $10^{-16}$  do  $10^{-12}$  s:

**Excitovaná molekula vody  $H_2O^*$**

**Radikály  $H\cdot$  a  $OH\cdot$**  (důsledek disociace excitované molekuly)

**$H_2O^+$  a  $e^-$**  (důsledek přímé ionizace nárazem)

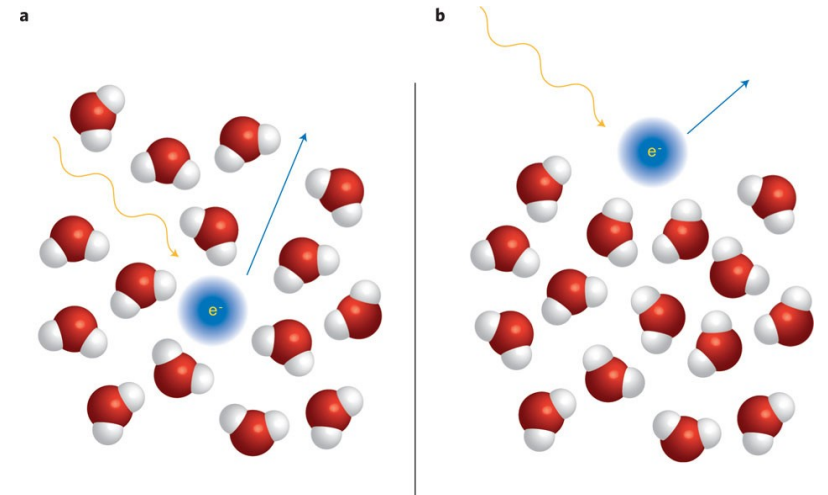
Navazující procesy:



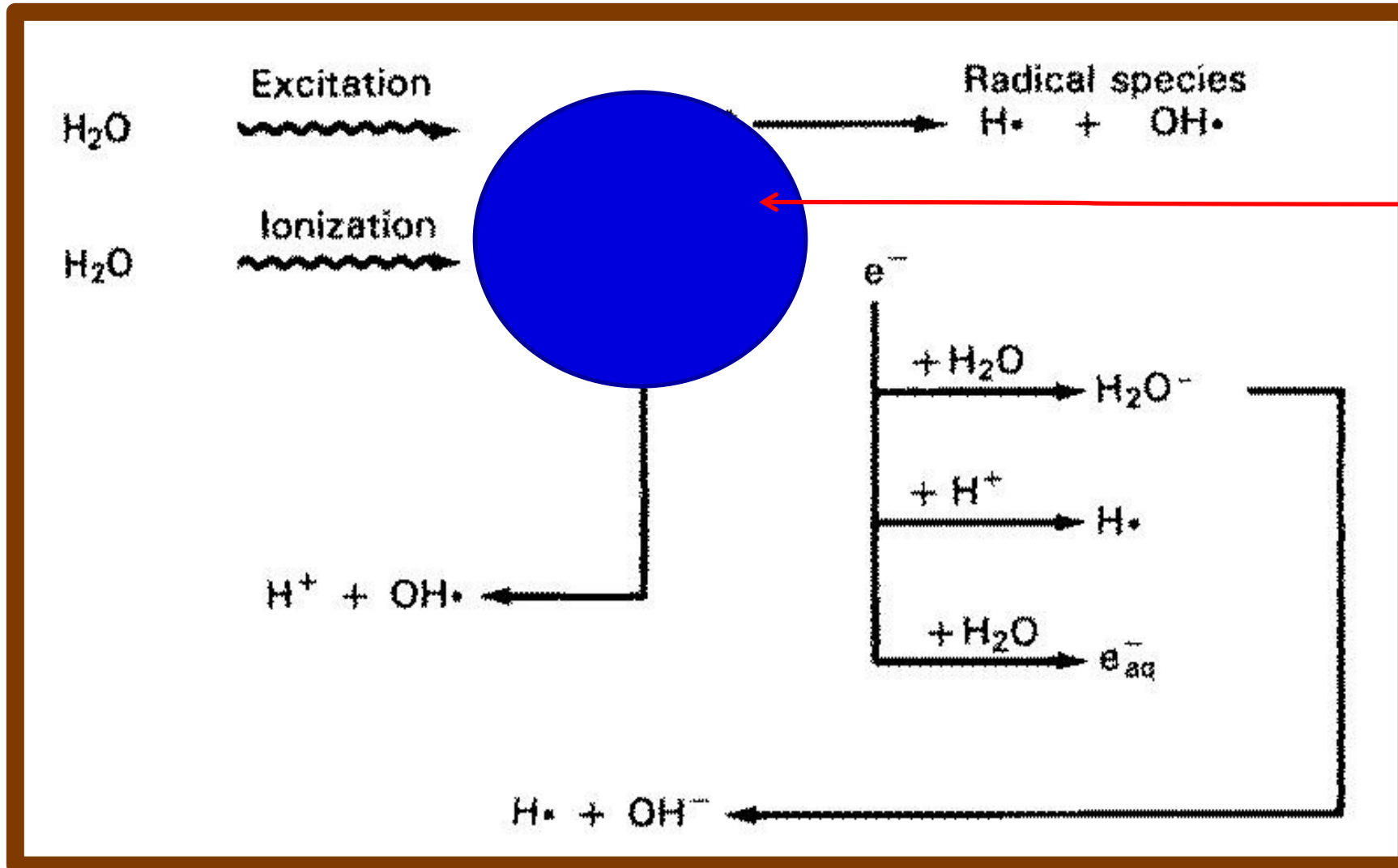
a také



Vazba solvatovaného elektronu obklopeného šesti molekulami vody má 3,3 eV, na povrchu vody jen 1,6 eV – měřeno na základě energie elektronů, vyražených z vody světelnými fotony!!



# Schéma radiolýzy vody



Pozor, pravděpodobnost excitace a ionizace není stejná – závisí na energii elektronů a dalších faktorech!

# Radiochemie vody



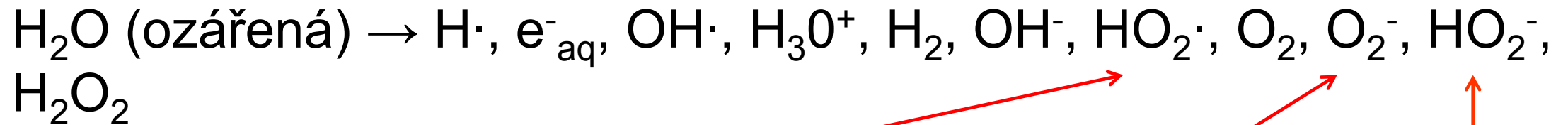
Produkty radiolýzy vody tedy jsou:



Ionty  $\text{H}^+$  a  $\text{OH}^-$  však nemají z hlediska působení na živou hmotu valný význam, protože jsou ve vodě a vodných roztocích všudypřítomné.

Část volných radikálů i iontů rychle rekombinuje (spojuje se do původních celků).

Následuje chemická fáze, popsateľná souhrnnou rovnicí:



"hydroperoxyl" nebo  
"perhydroxy radikál"

Superoxidový anion

Superoxid vodíku



# Hodnota G



Hodnota G – měřítko chemického výtěžku.

**G je počet molekul vytvořených nebo rozpadlých v důsledku předání 100 eV energie sekundárního elektronu.**

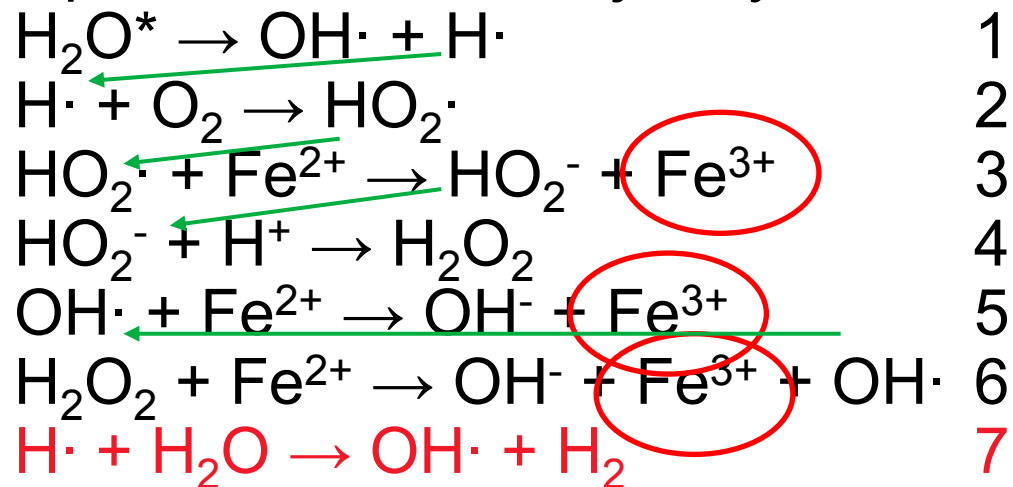
Vybrané hodnoty G při *neutrálním* pH:

H·	0,6
<u>e<sup>-</sup><sub>aq</sub></u>	<u>2,6</u>
<u>OH·</u>	<u>2,6</u>
H <sub>2</sub>	0,45
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,75

# Frickeův dozimetr jako model radiochemické reakce



Oxidace iontů železnatých ( $\text{Fe}^{2+}$ ) na železité ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Využití pro dosimetrické účely je omezené (což platí i pro jiné chemické dozimetry), protože hodnota G silně závisí na LET. Jde však o cenný model interakce volných radikálů s jejich lapači. Jde o následující systém reakcí:



# Frickeův dozimetr jako model radiochemické reakce



Reakce (7) nastává jen za absence kyslíku.

Prostudování těchto reakcí vede k závěru, že za *přítomnosti kyslíku* a v *kyselém prostředí* každý vodíkový radikál způsobí oxidaci **tří železnatých iontů na ionty železité**.

V reakci (2) vzniká superoxidový radikál  $\text{HO}_2\cdot$ , který následně oxiduje **první** železnatý iont. Ze superoxidového aniontu a vodíkového iontu vzniká peroxid vodíku, který pak oxiduje **druhý** iont  $\text{Fe}^{2+}$ .

V této reakci (6) vzniklý hydroxylový radikál pak oxiduje **třetí** iont  $\text{Fe}^{2+}$  (5).

Je dále zjevné, že jiným způsobem (*radiolyticky*) vzniklý  $\text{H}_2\text{O}_2$  sám poskytuje **2 ionty**  $\text{Fe}^{3+}$  (reakce 5 a 6). *Radiolyticky* vzniklý radikál  $\text{OH}\cdot$  (reakce 1) stvoří v reakci (5) **další iont**  $\text{Fe}^{3+}$ .

# Frickeův dozimetr jako model radiochemické reakce



Pro celkový výtěžek  $\text{Fe}^{3+}$  pak můžeme napsat:

$$G(\text{Fe}^{3+}) = 2G(\text{H}_2\text{O}_2) + 3G(\text{H}\cdot) + G(\text{OH}\cdot)$$

Za nepřístupu kyslíku analogicky

$$G(\text{Fe}^{3+}) = 2G(\text{H}_2\text{O}_2) + G(\text{H}\cdot) + G(\text{OH}\cdot)$$

# Frickeův dozimetr jako model radiochemické reakce



Pro  $\gamma$ -záření Co-60 o nízkém LET jsou platné hodnoty:

$$G(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,75$$

$$G(\text{H}) = 3,65$$

$$G(\text{OH}) = 3,15$$

Takže s ohledem na

$$G(\text{Fe}^{3+}) = 2G(\text{H}_2\text{O}_2) + 3G(\text{H}\cdot) + G(\text{OH}\cdot),$$

je  $G(\text{Fe}^{3+})$  rovno 15,6

a za nepřítomnosti kyslíku analogicky 8,30. Tyto hodnoty jsou ovšem nižší než jejich teoretický odhad, protože část energie záření nevyvolá změny lapače radikálů (železnatých iontů nebo jiných redukujících molekul).

Za předpokladu spotřeby 17 eV na vytvoření jednoho páru  $\text{H}\cdot$  a  $\text{OH}\cdot$  by hodnota  $G$  měla vyjít pro  $\text{Fe}^{3+}$  23,53.

# Přímý a nepřímý účinek



**Přímý účinek:** místo molekul vody jsou zasahovány přímo biologicky významné molekuly, zejména DNA. Počet **nepoškozených molekul  $N$**  po působení dávky  $D$  je dán původním počtem nepoškozených molekul  $N_0$ :

Kde  $k$  je tzv. **inaktivační konstanta** s jednotkou  $\text{Gy}^{-1}$ , jejíž převrácená hodnota udává dávku ( $D = 1/k$ ), která sníží počet nepoškozených molekul faktorem  $1/e$ , tj. na 37% původní hodnoty (uvažme  $N = N_0 \cdot e^{-1}$ , tj.  $N = N_0/e$ ). Tato dávka se označuje též  $D_0$  nebo  $D_{37}$ .

Úvahy platí, pokud **jediný** zásah inaktivuje biomolekulu.

# Přímý a nepřímý účinek



Zejména v souvislosti s tzv. zásahovou teorií má velký význam pojem **terče**. Tímto terčem myslíme zpravidla nějakou molekulu. Existuje vztah mezi molekulovou hmotností a velikostí terče (**v.t.**).

**Molekulovou hmotnost lze dokonce považovat přímo za velikost terče** (při inaktivaci jediným zásahem).

$D_{37}$  považujeme za inaktivační dávku. Je-li experimentálně zjištěná hodnota průměrného množství energie předané při jedné interakční události 75 eV, platí:

$$v.t.(g) = \frac{75 \times 1,602 \cdot 10^{-19} [J]}{D_{37} [J \cdot g^{-1}]} = \frac{75 [eV]}{D_{37} \cdot 6,2 \cdot 10^{15} [eV \cdot g^{-1}]} = k \times \frac{75 [eV]}{6,2 \cdot 10^{15} [eV \cdot g^{-1}]}$$

Pro lepší pochopení rovnic: „energie potřebná pro inaktivaci terče dělená inaktivační energií na gram poskytuje počet gramů připadajících na jeden terč“. Numerický výraz ve druhém či třetím jmenovateli je přepočítací faktor z Gy, tj.  $J \cdot kg^{-1}$ , na  $eV \cdot g^{-1}$ .  $k$  je vysvětleno na předchozím snímku.

# Přímý a nepřímý účinek (příklad úvahy, pochopit ale nebiflovat)

*Molekulová hmotnost* terče je dána součinem Avogadrovy konstanty a velikostí terče *v.t.* vyjádřenou jako *hmotnost* v gramech. Po výpočtu s využitím výrazu z předchozího snímku dostáváme:

$D_{37}$  je dosazena za převrácenou hodnotou  $k$  a je ji nutno vyjadřovat v  $\text{eV}\cdot\text{g}^{-1}$ . Mezi *mol. hmotností určenou z radiochemického experimentu* a *mol. hmotností určenou nezávisle na ozáření* je značná shoda, což naznačuje platnost jednozásahové inaktivační hypotézy. **Teorie platí v plném rozsahu pro molekuly v suchém stavu, ve vodném prostředí se více uplatňuje nepřímý účinek.**



# Přímý a nepřímý účinek



Nepřímý účinek: poškození terčové biomolekuly je **zprostředkováno** radikálovými produkty radiolýzy vody. Proces je řízen difuzí.

Pokusy se specifickými lapači radikálů ukázaly, že rozhodující význam má pro poškození biomolekul **radikál OH·**.



# Rekombinace, restituce, oprava

## 3 způsoby obnovy stavu molekul před ozářením:

**Rekombinace** může nastat prakticky jen velmi krátce po interakční události – s ohledem na rychlost difuze je tento čas kratší než  $10^{-11}$  s. Rekombinace je prostým znovuspojením iontového nebo radikálového páru.

**Restituce** je chemická (neenzymová) obnova původní molekuly. Dochází k ní v časech kratších než je jedna ms. Příkladem takového procesu je reakce radikálu DNA s molekulou obsahující sulfhydrylovou skupinu -SH:



**Opravy** jsou enzymatické a vyžadují podstatně delší čas.

# Makromolekulární terč v buňce



Dnes je jasné, že hlavním terčem je **DNA**, ať se jedná o účinek přímý nebo nepřímý.

Ostatní makromolekuly (bílkoviny i RNA) mohou být poměrně snadno nahrazeny resyntézou.

Důkazy:

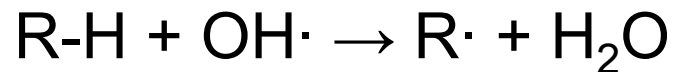
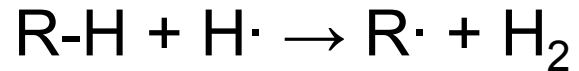
- A) korelace existence dvouvláknových zlomů DNA se ztrátou biologické aktivity.
- B) Buňky neschopné oprav DNA nebo s chemicky zablokovanými opravami DNA jsou mnohem citlivější na působení ionizujícího záření.

# Chemické reakce vyvolané produkty radiolýzy vody

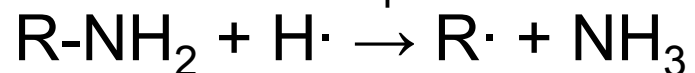
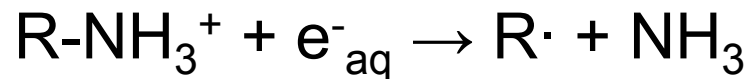


Není jisté, které z následujících radikálových reakcí jsou nejdůležitější pro nepřímé poškození DNA, ale uplatňují se zřejmě všechny.

## 1. Vytržení vodíkového atomu



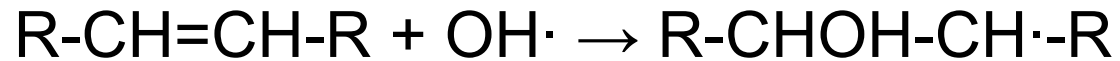
## 2. Disociativní reakce



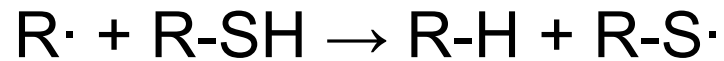
# Chemické reakce vyvolané produkty radiolýzy vody



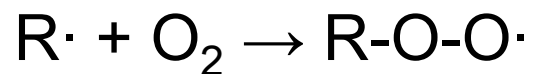
## 3. Adiční reakce



## 4. Restituce



**5. Fixace poškození** (radikálu biomolekuly) vazbou kyslíku – vzniká peroxid



Peroxidový radikál je dosti stabilní, nepodléhá restituci, ale není to finální produkt.

# Reakce s DNA



Jedná se o interakce s  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{H}\cdot$  a  $\text{e}^-_{\text{aq}}$ , přičemž nejdůležitější jsou interakce s **hydroxylem**:

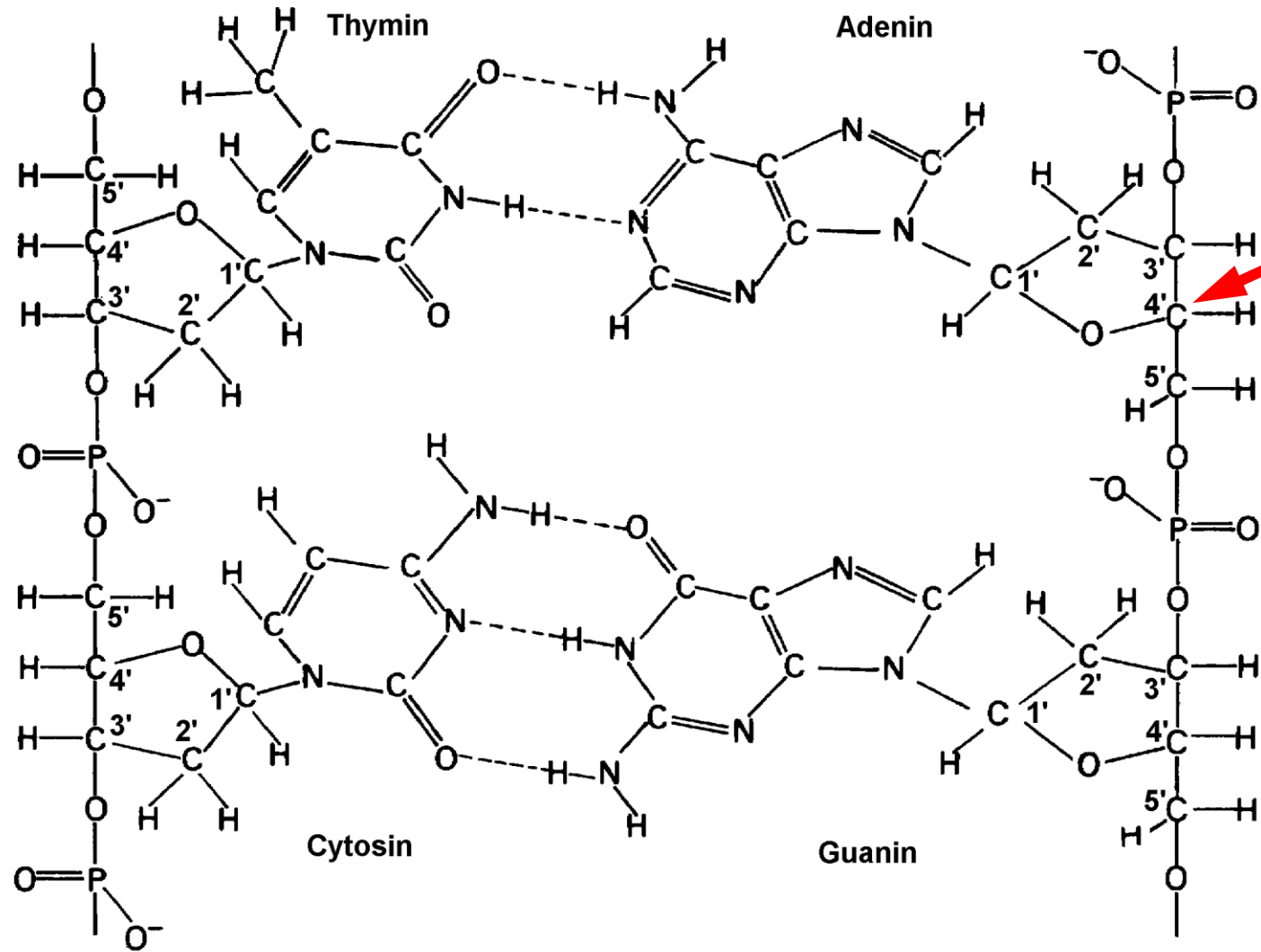
Funkční skupiny na bázích a cukrech mohou být změněny – chybný nukleotid  
Poškození bází může být tak silné, že dochází k jejich ztrátám, vznikají místa bez purinů nebo pirimidinů v DNA.

Přesun radikálu z báze na cukr-fosfátovou páteř může vést ke ztrátě báze.

Vznikají jednovláknové a dvouvláknové **zlomy**. Blízké (max. 10 bází vzdálené) zlomy na obou řetězcích se označují jako dvouvláknové – vedou k přerušení dvoušroubovice.

V experimentech s viry se zjistilo, že hydroxylový radikál nejčastěji napadá vodík deoxyribózy v poloze 4 (obr.), odnímá jej cukrovému zbytku za vzniku vody.

Látky se sulfhydrylovými skupinami (thioly) vznik radikálů na DNA tlumí (mechanismem restituce), přítomnost kyslíku je naopak stabilizuje.



Místo, které nejčastěji napadá hydroxylový radikál.

# Přerušeni řetězce DNA



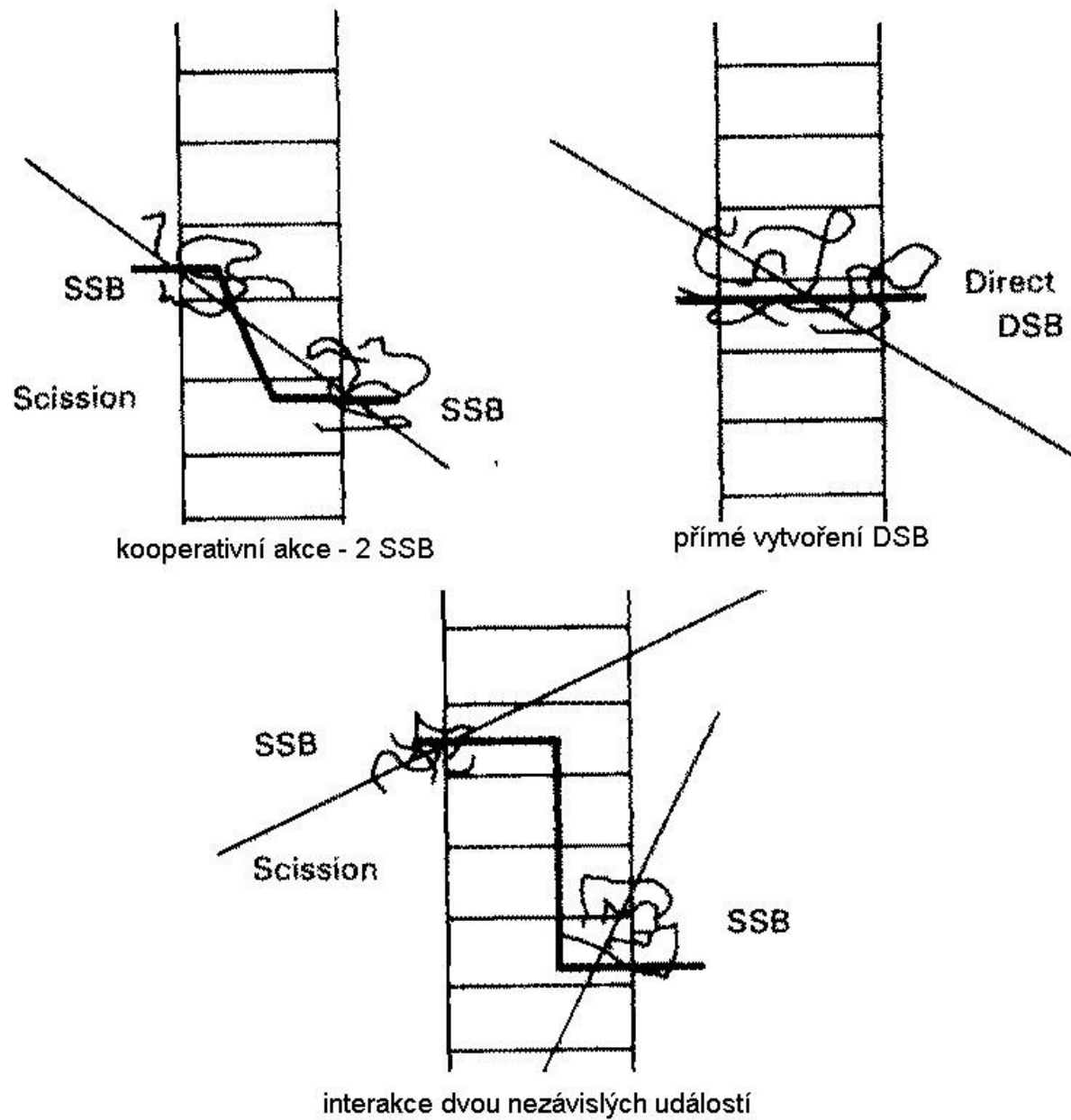
**Jednovláknový zlom** – *single-strand break* (SSB): Poměrně snadná reparace, v radiačním poškození buněk hraje jen malou roli.

**Dvouvláknový zlom** – *double-strand break* (DSB): Reparace obtížná, protože pro ni chybí přesný templát (předloha), časté chyby projevující se mutacemi. Různé mechanismy vzniku:

- a) Jeden zásah DNA vede k **přímému** vzniku DSB v komplementárních místech řetězce.
- b) Jeden zásah DNA může vést k tzv. **kooperativnímu** vzniku DSB v blízkých místech obou řetězců.
- c) Dva **nezávislé zásahy** komplementárních řetězců v místech vzdálených od sebe max. 10 bází. Při větší vzdálenosti udrží dvoušroubovici vcelku vodíkové i jiné vazby.

JEDNOVLÁKNOVÉ I DVOUVLÁKNOVÉ ZLOMY MOHOU VZNIKOUT TAKÉ JAKO DŮSLEDEK NEPŘÍMÉHO ÚČINKU - PŮSOBENÍ VOLNÝCH RADIKÁLŮ.





Obr. Dvouvláknové zlomy. Popis na předchozím snímku.

# Vliv konfigurace DNA na její radiální poškození



V živých buňkách se DNA nachází ve vysoce kondenzovaném stavu (*supercoil*, *superhelix*, *nadšroubovice*, *supervinutí* – viz např. biofyzika, přednáška o struktuře živé hmoty) a v pevné vazbě s histony – hovoříme o chromatinu. Tato vazba je ovlivňována ionizujícím zářením již při dávkách řádově jednotek Gy. Relaxace „supervinutí“ (tj. rozvinutí onoho supervinutí) v důsledku dvouvláknových zlomů zřejmě znemožňuje reparační procesy.

# Reparace DNA



Odhaduje se, že počet DSB v jedné buňce je 15-60 na 1 Gy, zatímco počet SSB je více než 1000 na 1 Gy. Poškození DNA však působením SSB vzniká jen minimálně.

Poškození DNA v důsledku působení ionizujícího záření:

- a) **DSB a SSB v dvoušroubovici**
- b) **Chemické změny bazí**
- c) **Chemické změny cukrových zbytků**
- d) **Vznik spojek (cross-links) mezi bílkovinnou matrix a DNA nebo v DNA samotné.**

Tato poškození jsou opravována několika různými způsoby, jejichž detailní popis je předmětem zájmu molekulární biologie.



# Reparace DNA – Excizní oprava

**Excizní oprava** – typická pro jednovláknové zlomy v nereplikujících se molekulách DNA.

**Templát** (předloha) komplementárního vlákna musí být k dispozici! Nejdříve dochází k **odbourání dalších bází** z okolí zlomu, a pak se od 3'-hydroxylového konce vlákna **doplňuje** chybějící sekvence (působením enzymu DNA-polymerázy I).

Podobně se opravují poškozené báze nebo cukrové zbytky.

# Rekombinační oprava DSB

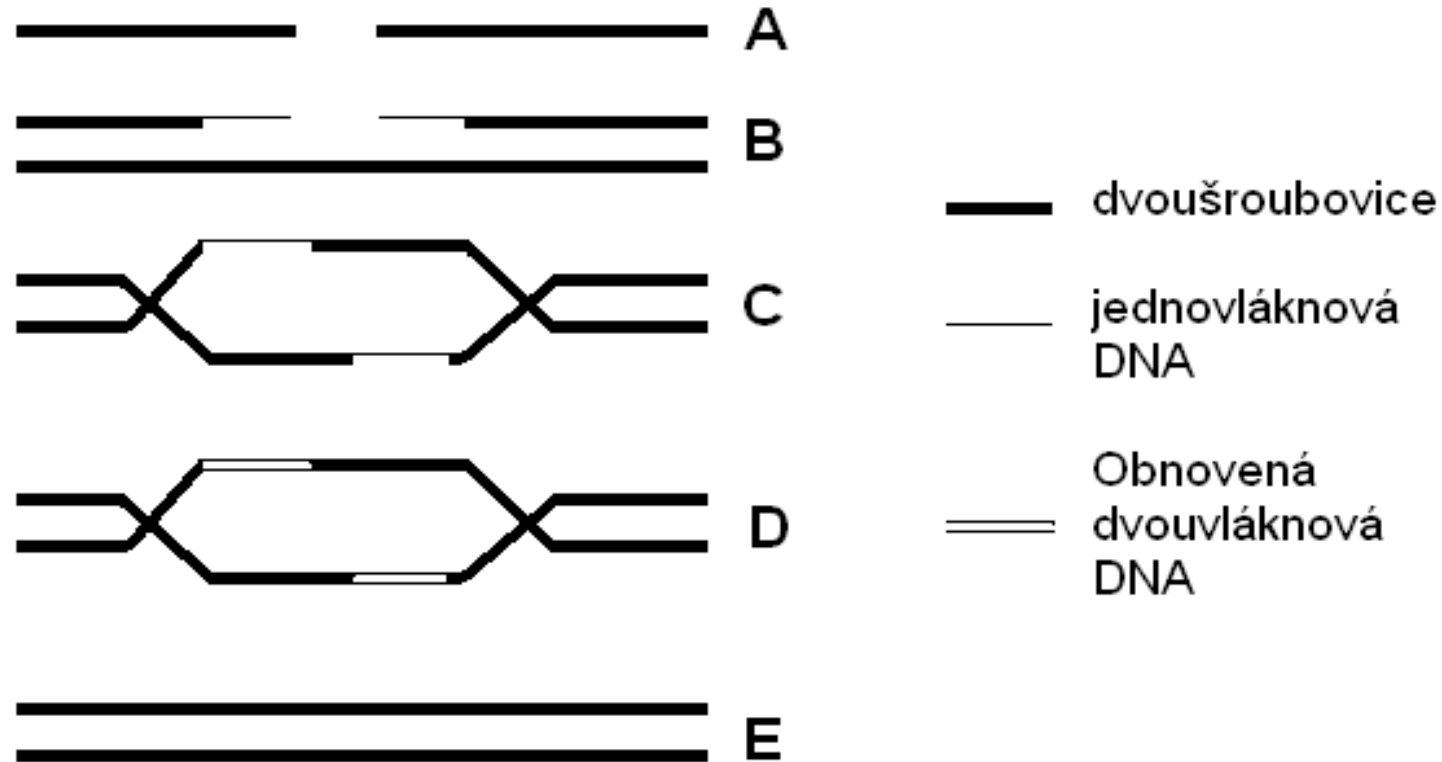


Opravy DSB patří mezi tzv. *error-prone* (k chybám náchylné) opravy. Klíčovou roli v těchto opravách hraje bílkovina **recA** (mutace genu pro recA podstatně zvyšuje citlivost k radiačnímu poškození). Prokázáno u bakterií a něco podobného se projevuje i u savčích buněk.

Pro částečnou rekonstrukci místa s DSB je využito **homologního duplexu = chromosomu** (u diploidní buňky).

Rekombinační oprava začíná odbouráním jednoho vlákna duplexu exonukleázou na obou fragmentech. Bílkovina recA se váže k obnaženým „jednovláknům“ a iniciuje výměnu vláken s homologním duplexem, čímž vznikají dvě blízká rekombinační místa. Další postup viz obr.

# Rekombinační oprava DSB



A – dvouvláknový zlom, B – částečné odbourání jednoho z vláken v okolí zlomu a asociace s homologní dvoušroubovicí (duplexem), C – pod vlivem recA nastává rekombinace poškozených a nepoškozených úseků, D – syntéza komplementárních řetězců (vláken) DNA polymerázou, E – opravené dvoušroubovice

# Věrnost oprav (*repair fidelity*)



Excizní opravy SSB jsou všeobecně považovány za téměř bezchybné. Pravděpodobnost chyb je vyjadřována poměrem  $1 : 10^7$  až  $1 : 10^{11}$ .

Pravděpodobnost bezchybného spojení DSB je odhadována na jen asi 75% a dochází k němu zejména během prvních dvou hodin po poškození.

Autor: Vojtěch Mornstein

Poslední revize a ozvučení: březen 2021