

Biofyzikální ústav
Lékařské fakulty
Masarykovy university, Brno

Základy radiochemie (radiobiologie I) – IZMB-6

Prof. RNDr. V. Mornstein, CSc.

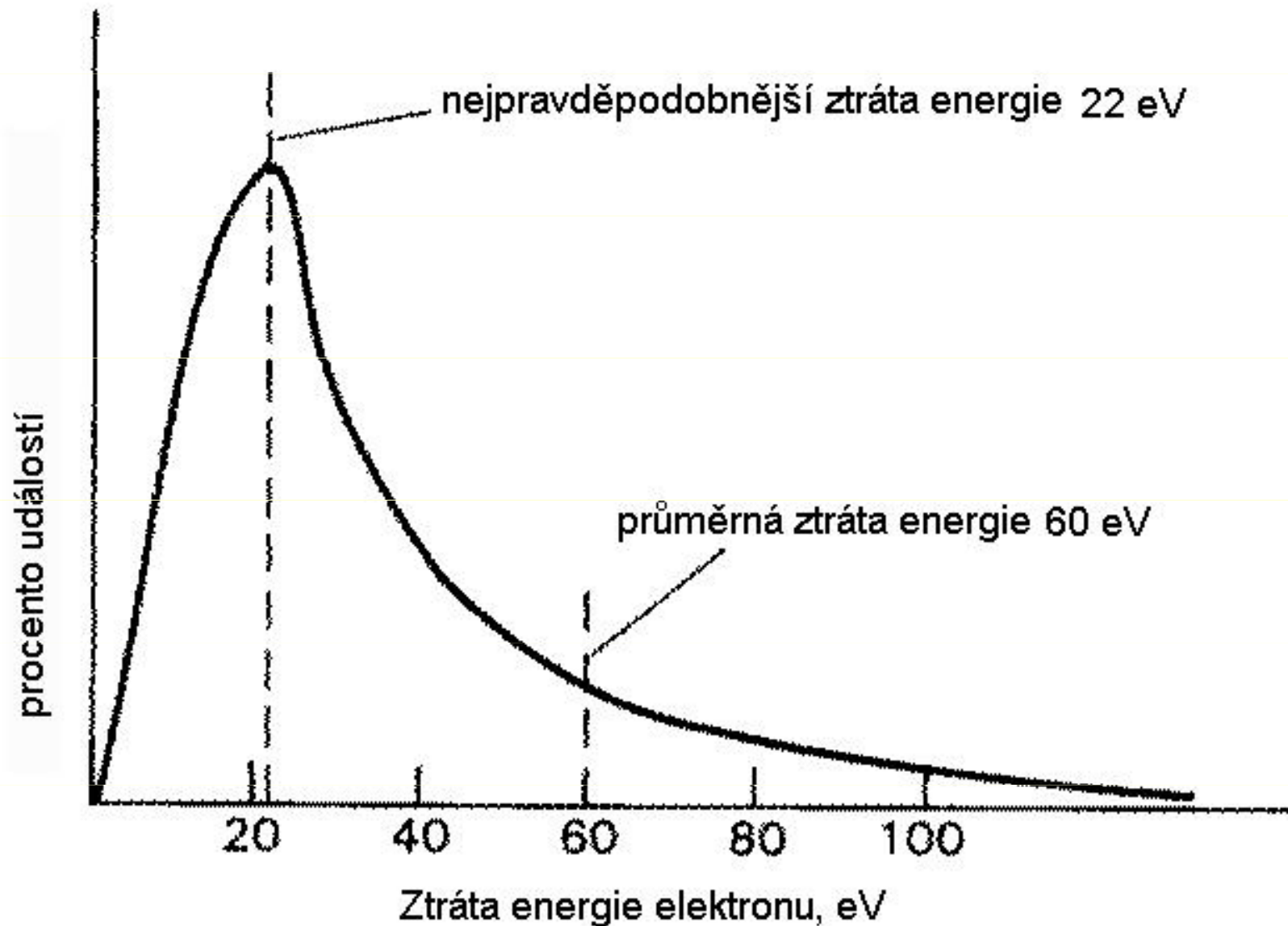
**Tato přednáška se opírá převážně o monografii E. L. Alpen:
Radiation Biophysics (1998) a internetové materiály**

Ionizační a excitační procesy

- Většina energie rozptýleného (sekundárního) záření je nesená 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

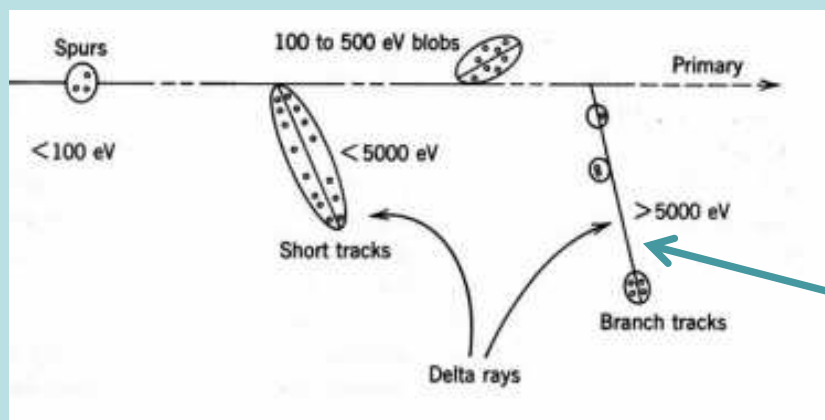
(elektrony o relativně nízké energii ve vodě)



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

Ionizační a excitační procesy

- Podle vzhledu ionizačních stop získaných pomocí bublinových 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)



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

Větvení stopy

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 1nm, vodíkový radikál je schopen difundovat do vzdálenosti v průměru 180 nm, dokud nezanikne.
- **Důsledek: interakce (rekombinace) volných radikálů vytvářených v různých blosech, ostruhách a krátkých stopách prakticky není možná (pravděpodobná).**

Radiochemie vody

Primární produkty radiolýzy vody, které se objevují 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:

- $H_2O^+ \rightarrow H^+ + OH\cdot$
- $e^- + H_2O \rightarrow H_2O^-$
- $e^- + H^+ \rightarrow H\cdot$
- $e^- + H_2O \rightarrow e^-_{aq}$ (solvatovaný, vodný, **hydratovaný elektron**, doba života přibližně 0,2 ms)

a také



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

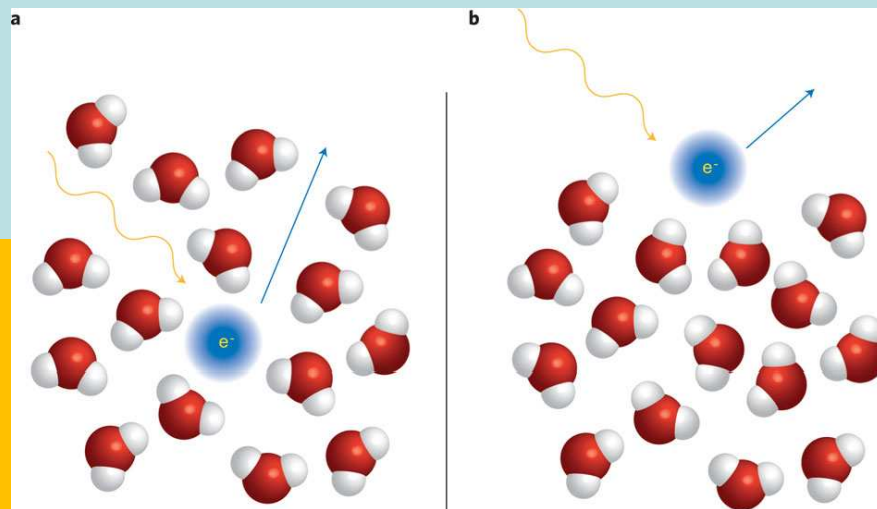
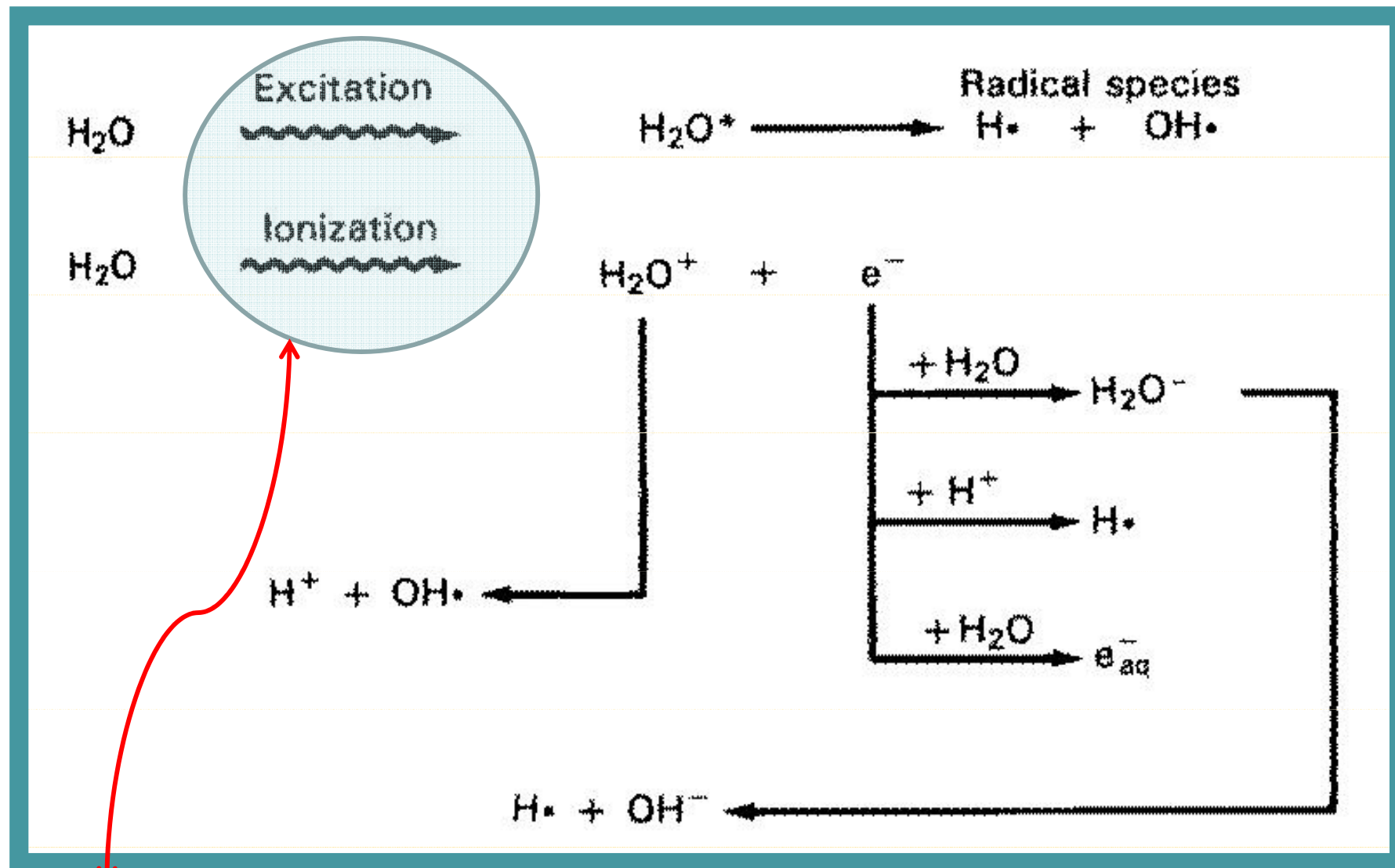


Schéma radiolýzy vody



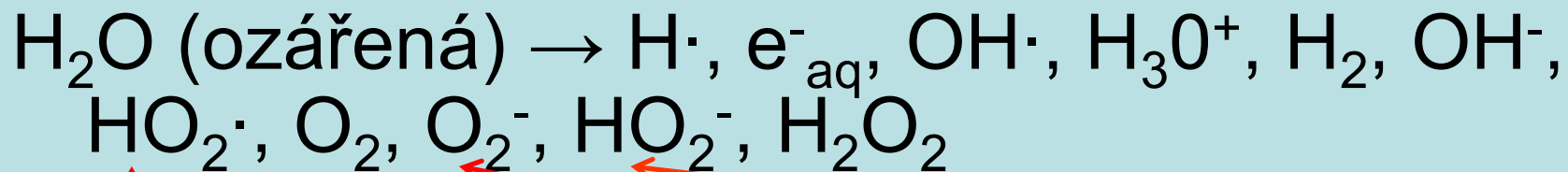
Pozor, pravděpodobnost obou procesů není stejná – závisí na energii elektronů a dalších faktorech

Radiochemie vody

- Produkty radiolýzy vody tedy jsou:



- Ionty H^+ a OH^- však nemají z hlediska působení na živou hmotu valný význam, protože jsou ve vodě a vodných roztocích všudypřítomné.
- Část volných radikálů i iontů rekombinuje (spojuje se do původních celků).
- Následuje chemická fáze, popsateľná souhrnnou rovnicí:



"hydroperoxyl" nebo "perhydroxy radikál"

Superoxid vodíku

Superoxidový anion

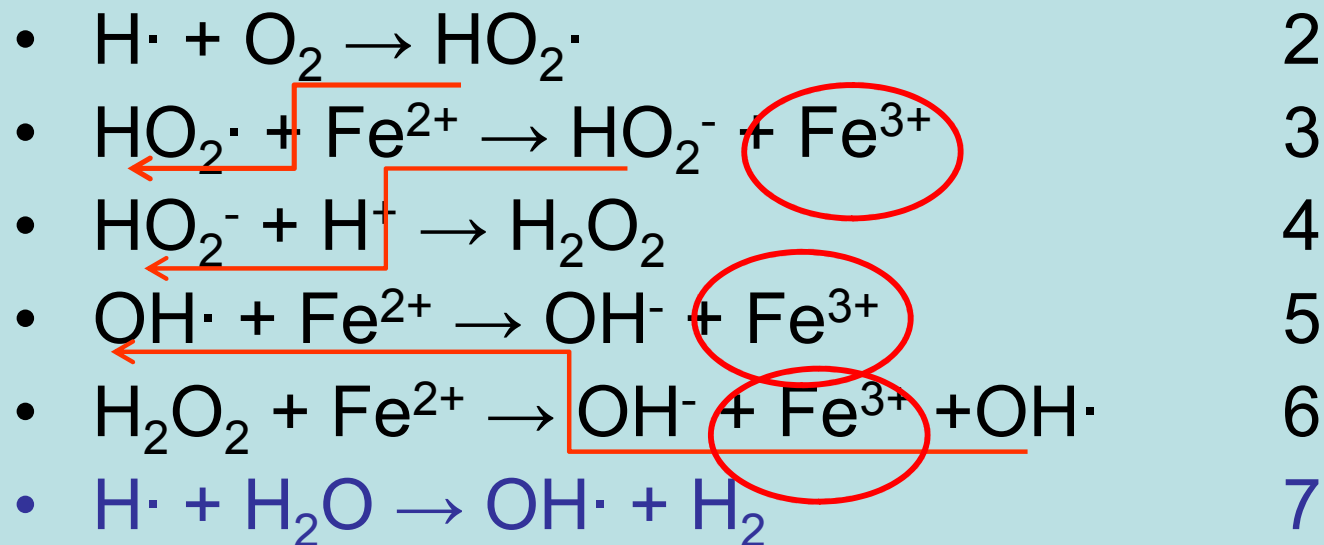
Hodnota G

- 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⁻_{aq}</u>	<u>2,6</u>
<u>OH·</u>	<u>2,6</u>
H ₂	0,45
H ₂ O ₂	0,75

Frickeův dozimetr jako model radiochemické reakce

- Oxidace iontů železnatých (Fe^{2+}) na železité (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:

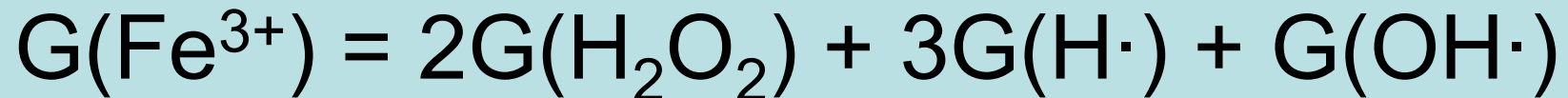


Frickeův dozimetr jako model radiochemické reakce

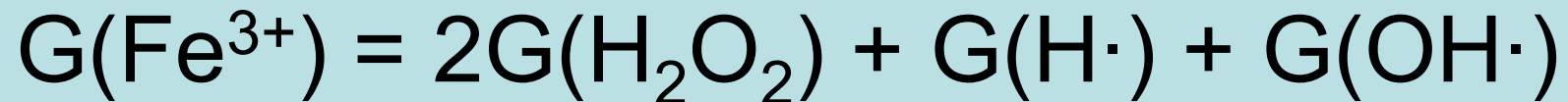
- Reakce (7) nastává jen za absence kyslíku
- Prostudování těchto reakcí vede k závěru, že za přítomnosti kyslíku a v *kyselém prostředí* každý vodíkový radikál způsobí oxidaci **tří železnatých iontů**.
 - V reakci (2) vzniká superoxidový radikál $\text{HO}_2\cdot$, který následně oxiduje **první** železnatý iont.
 - Ze superoxidového aniontu a vodíkového iontu vzniká peroxid vodíku, který pak oxiduje **druhý** iont Fe^{2+} .
 - V této reakci (6) vzniklý hydroxylový radikál pak oxiduje **třetí** iont Fe^{2+} (5).
- Je dále zjevné, že jiným způsobem (*radiolyticky*) vzniklý H_2O_2 sám poskytuje **2 ionty** Fe^{3+} (reakce 5,6). *Radiolyticky* vzniklý radikál $\text{OH}\cdot$ (reakce (1), která není v předchozím přehledu reakcí uvedena) stvoří v reakci (5) **další iont** Fe^{3+} .

Frickeův dozimetr jako model radiochemické reakce

- Pro celkový výtěžek Fe^{3+} pak můžeme napsat:



- Za nepřístupu kyslíku analogicky



Frickeův dozimetr jako model radiochemické reakce

- Pro γ -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 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 :

$$N = N_0 \cdot e^{-kD}$$

Kde k je tzv. **inaktivační konstanta** s jednotkou Gy^{-1} , jejíž převrácená hodnota udává dávku ($D = 1/k$), která sníží počet nepoškozených molekul faktorem $1/e$, tj. na 37% původní hodnoty ($N = N_0 \cdot e^{-1}$). 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.*) - **lze považovat molekulovou hmotnost 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:

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

Pro 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 $eV \cdot g^{-1}$.

Přímý a nepřímý účinek

- Molekulová hmotnost terče je dána součinem Avogadrovy konstanty a velikosti terče vyjádřené jako hmotnost v gramech. Po výpočtu s využitím výrazu z předchozího obrázku dostáváme:

$$\text{mol.hmotnost terče} = \frac{7,28 \times 10^{11}}{D_{37}}$$

D_{37} je dosazena za převrácenou hodnotou k a je ji nutno vyjadřovat v eV.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:
 - Příklad:
 - $\text{DNA}\cdot + \text{RSH} \rightarrow \text{RS}\cdot + \text{DNA}$ (s obnoveným H)
- **Opravy** jsou enzymatické a vyžadují podstatně delší čas.

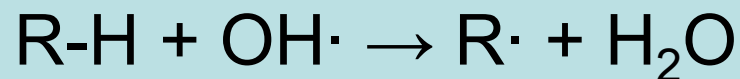
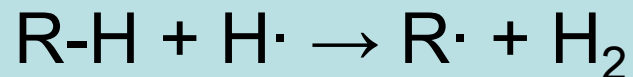
Makromolekulární terč v buňce

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

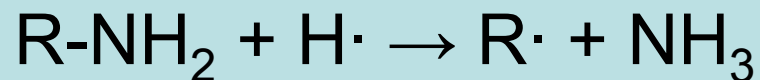
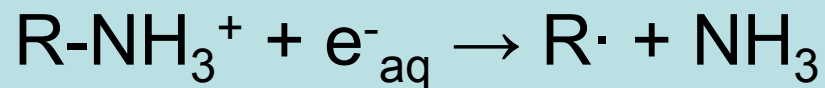
Chemické reakce vyvolané produkty radiolýzy vody

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

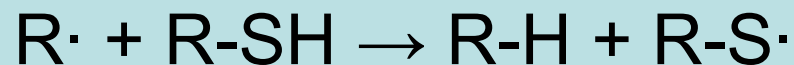


Chemické reakce vyvolané produkty radiolýzy vody

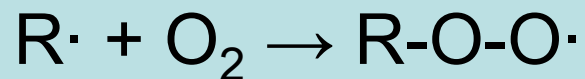
3. Adiční reakce



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 e^-_{aq} , přičemž nejdůležitější jsou interakce s **hydroxylem**:

Funkční skupiny na bázích a cukrech mohou být změněny – chybný nukleotid

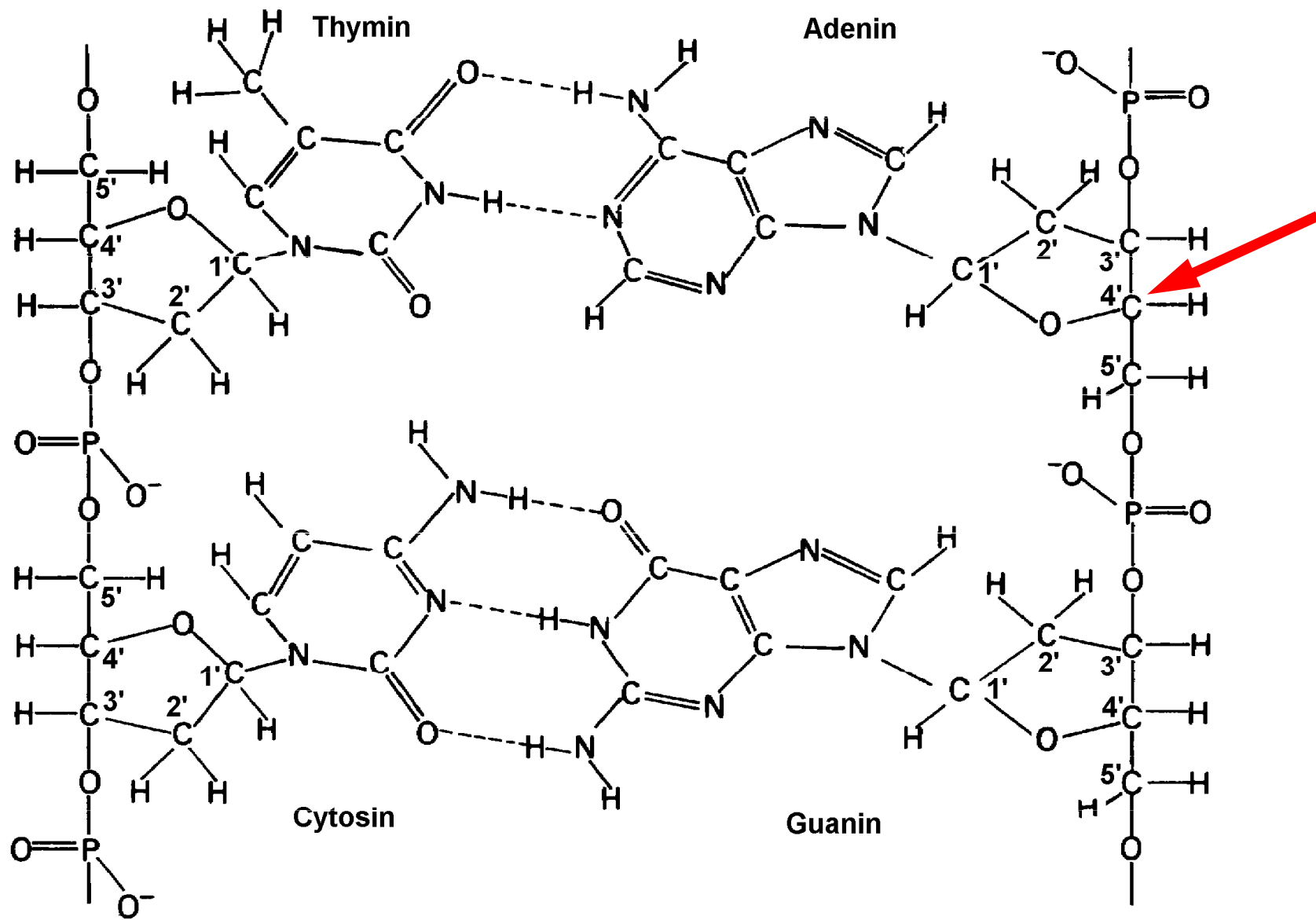
Poškození bází může být tak silné, že dochází k jejich ztrátám, vznikají místa bez purinů nebo pirimidinů v DNA.

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.

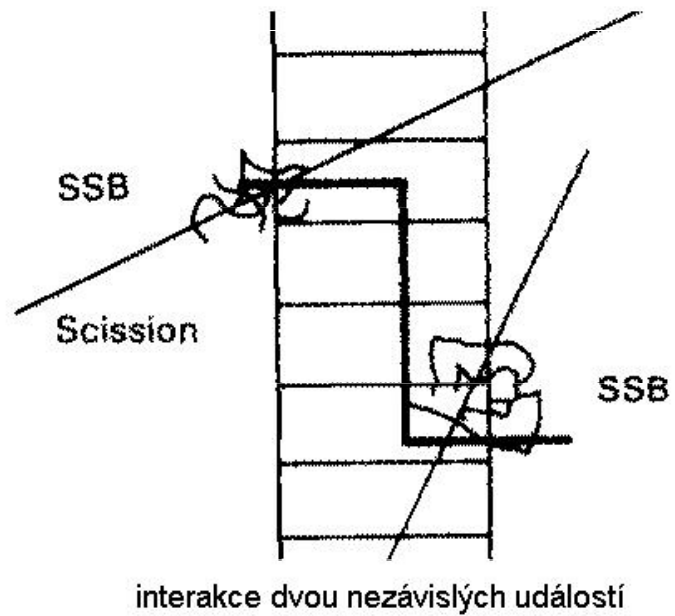
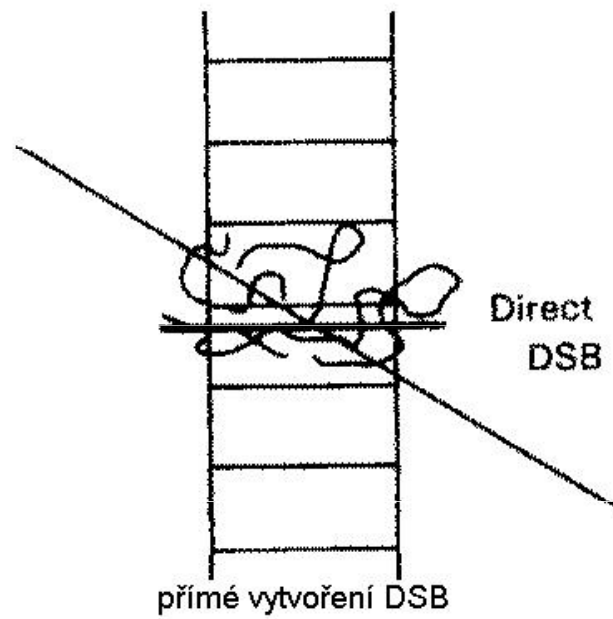
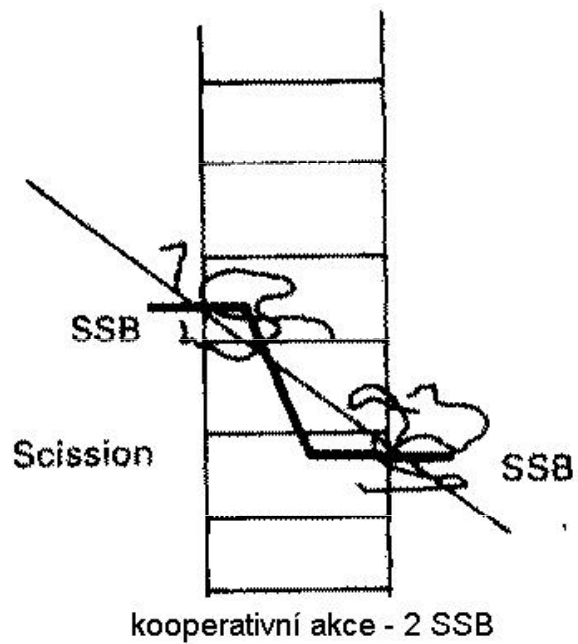
Látky se sulfhydrylovými skupinami vznik radikálů na DNA tlumí (mechanismem restituce), přítomnost kyslíku je naopak stabilizuje.



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 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.



Vliv konfigurace DNA na její radiační poškození

- V živých buňkách se DNA nachází ve vysoce kondenzovaném stavu (*supercoil*, *nadšroubovice*, *supervinutí* – viz biofyzika, přednáška o struktuře živé hmoty) a v pevné vazbě s histony. 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 bází**
 - 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.

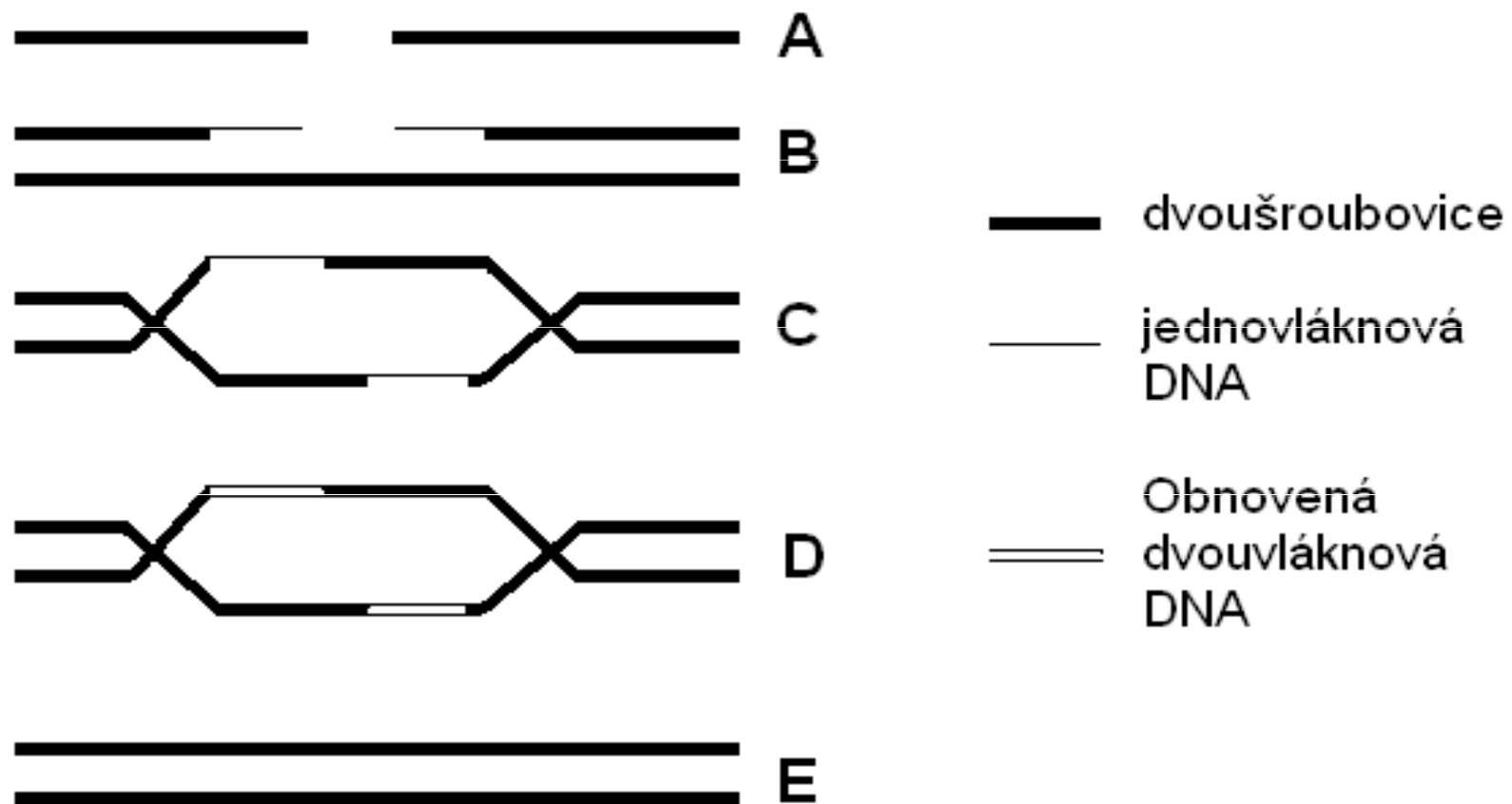
Reparace DNA – Excizní oprava

- **Excizní oprava** – typická pro jednovláknové zlomy v nereplikujících se molekulách DNA.
- **Templát** (předloha) komplementárního vlákna musí být k dispozici!
- Dochází k **odbourání** dalších bází z okolí zlomu a pak se od 3'-hydroxylového konce vlákna **doplňuje** chybějící sekvence (působením 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: březen 2015