

I. Vývoj představ o povaze hmoty

1.1 Vývoj představ o povaze světla

1.1.1 Newtonovy představy

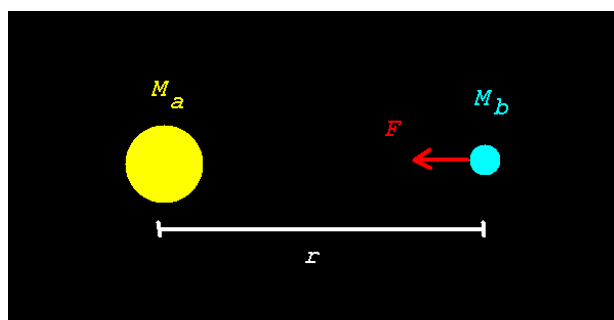
Isaac Newton (obr. 1) objevil zákon gravitace. Podle tohoto zákona jsou tělesa přitahována silou, která je úměrná hmotnostem těles a nepřímo úměrná čtverci vzdálenosti (obr.2). Dále jsou známy Newtonovy zákony o síle: Podle prvního zákona (zákon o setrvačnosti) těleso setrvává v klidu nebo v rovnoměrném



Isaac Newton

Obr. 1. Isaac Newton

přímocarem
pohybu dokud není
tento stav nuceno
změnit působením
vnější síly. Podle
druhého (zákon o
síle) je zrychlení
jež uvádí těleso do
pohybu úměrné
působící síle a
nepřímo úměrné



$$F = G \frac{M_a M_b}{r^2}$$

Obr. 2. Zákon gravitace

hmotnosti tělesa. Podle třetího (zákon akce a reakce) je každá akce (působení síly) provázena reakcí, která má stejnou velikost ale opačný směr. Tyto zákony jsou předmětem klasické mechaniky a nebudeme je tedy rozebírat.

Méně je známo, že Newton se také zabýval studiem světla. Používal k tomu různé hranoly a již ve svých 23 letech zjistil, že světlo se dá rozložit na barevné spektrum (obr. 3). Dále zjistil, že světelné spektrum se dá zase spojit použitím druhého hranolu. Vymezením se dá získat světlo určité barvy. Newton si představoval světlo jako proud částic různé velikosti. Jestliže narážejí v hranolu na částice stejné hmotnosti, pak nejméně se budou odrážet částice s největší hmotností.



Obr. 3. Isaac Newton se zabýval také studiem světla

1.1.2 Světlo jako vlnění

Vlnové vlastnosti světla studoval

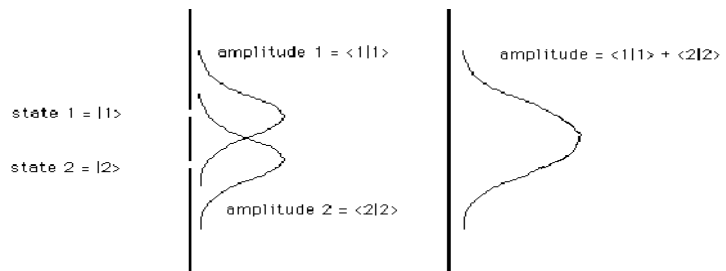


Obr. 4. Thomas Young

Thomas Young na
začátku 19. století
(obr. 4). Popíšeme

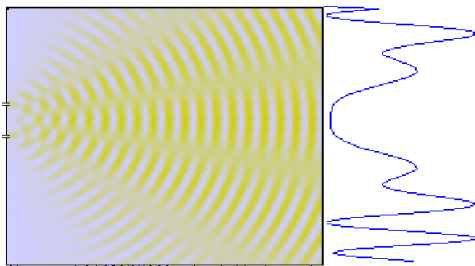
jeho klasický experiment, v němž světlo prochází dvěma štěrbinami (obr. 5). Průchod světla dvěma štěrbinami by měl dát na stínítku součet osvětlení od jednotlivých štěrbin (vpravo); místo toho se však pozoruje interferenční obrazec (obr. 6). Tento obrazec lze vysvětlit za předpokladu, že se světlo šíří ve formě vlnoploch (jako vlny na hladině rybníka), tj. v každém bodě kde světlo vnikne dochází ke vzniku nové vlnoplochy.

Amplituda vlny v prostoru a čase se pak dá popsat goniometrickou funkcí (stejně jako šíření vln po hladině v určitém směru), kdy amplitudu označíme A , její maximální hodnotu A_0 , ω označíme úhlovou frekvencí, která je 6.28 x větší než kmitočet, t je čas:



Obr. 5. Průchod světla dvěma štěrbinami by měl dát na stínítku součet osvětlení od jednotlivých štěrbin (vpravo)

$$A = A_0 \sin(\omega \cdot t + \Delta x),$$



Obr. 6 Interference světla ze dvou štěrbin

Δx je fázový posun, který souvisí s počátkem měření a může být nenulový. Pro dvě štěrbinu se dá výsledná amplituda v určitém bodě stínítka spočítat jako součet takových funkcí pro jednu i druhou štěrbinu (fázový posun vyjadřuje zpoždění vln z jedné štěrbinu oproti druhé):

$$A = A_0 \cdot (\sin(\omega \cdot t) + \sin(\omega \cdot t + \Delta \alpha)) = 2 \cdot A_0 \sin(\omega \cdot t + \Delta \alpha / 2) \cdot \cos(\Delta \alpha / 2)$$

Tento výraz bude nulový pro $\Delta \alpha = (2 \cdot n + 1) \cdot \pi$. Zde $\Delta \alpha = 2 \cdot \pi \cdot \Delta x / \lambda$, kde λ je vlnová délka a Δx je délkový posun. Jestliže je tedy délkový posun roven polovině vlnové délky (nebo lichým násobkům), dojde k vyrušení amplitudy. Pozorovaná intenzita bude také nulová. Průběh intenzity bude tedy záviset na vzdálenosti stínítka od štěrbin a nulová intenzita může být pozorována i ve středu – mezi oběma štěrbinami, kde by dle prvního obrázku (obr.5) mělo být maximum.

1.1.3 Maxwellovy rovnice

Ve druhé polovině 19. století je už známá řada zákonů, jež se týkají elektřiny a magnetismu. Je to např. Coulombův zákon:

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q \cdot Q}{r^2},$$

vyjadřující sílu F , působící na nabitou částici s nábojem q , nacházející se ve vzdálenosti r od jiné částice s nábojem Q .

Biot-Savartův zákon udává intenzitu magnetického pole vodiče, kterým protéká proud (obr.7) a Faradayův zákon magnetické indukce udává závislost elektromotorické síly indukované ve vodivé smyčce na časové změně magnetické indukce (obr. 8).

$$d\vec{B} = \frac{\mu_0}{4\pi} \left(\frac{I d\vec{s} \times \hat{r}}{r^2} \right)$$

Obr. 7. Biot-Savartův zákon - I je intenzita proudu, ds je element vodiče ve směru proudu, r je průvodič (vektor od elementu ds k bodu, v němž intenzitu magnetického pole B určujeme)

$$\oint \mathbf{E} \cdot d\vec{l} = \frac{d}{dt} \int \mathbf{B} \cdot \mathbf{n} dA$$

Obr. 8 Faradayův zákon – elektromotorická síla vytvořená podél smyčky se rovná časové změně magnetické indukce

Tyto zákony se Maxwellovi podařilo brilantně zobecnit a dospěl k soustavě rovnic, které popisovaly elektromagnetické jevy (obr. 9). Předpověděl, že nejen elektrický náboj může při pohybu indukovat magnetické pole, ale také naopak že změna magnetického pole může indukovat pole elektrické. Z uvedených rovnic vyšla jako řešení funkce popisující elektromagnetickou vlnu (střídání elektrického a magnetického pole) a její časová závislost. Z této funkce bylo možné spočítat rychlost šíření této vlny jako:

$$\begin{aligned} \nabla \times \vec{E} &= -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \\ \nabla \cdot \vec{D} &= \rho \\ \nabla \times \vec{H} &= \vec{J} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \\ \nabla \cdot \vec{B} &= 0 \\ \vec{D} &= \epsilon \vec{E} \\ \vec{B} &= \mu \vec{H} \end{aligned}$$

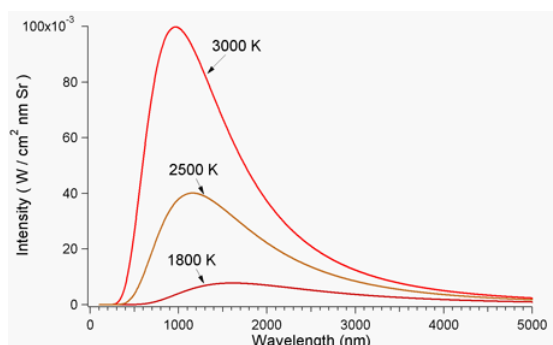
$$\frac{1}{\sqrt{\epsilon_0 \mu_0}} = c$$

Rychlost šíření vyšla velmi přesně rovna rychlosti světla ve vakuu. Z toho Maxwell vyvodil, že světlo je elektromagnetické vlnění (obr. 9). V současné době víme, že existuje celá řada druhů elektromagnetického vlnění (obr.10).

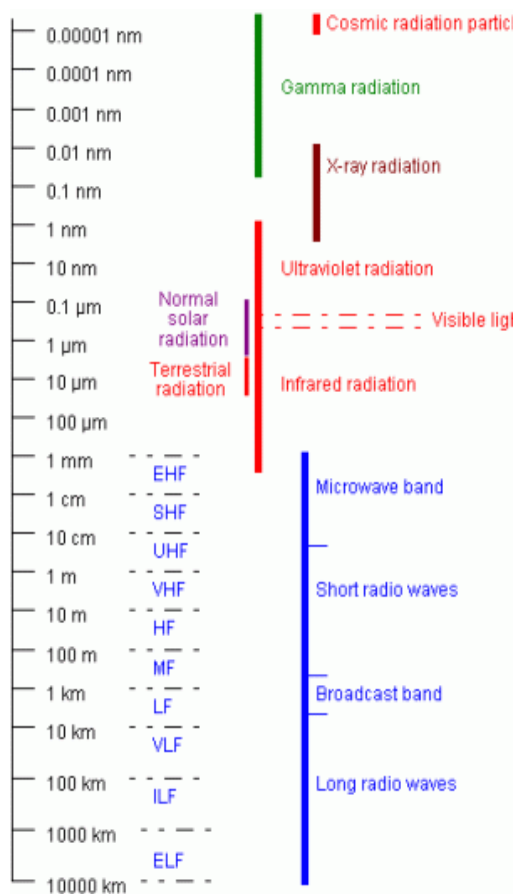
Obr. 9 Soustava Maxwellových rovnic - $\nabla \times$ znamená operátor rotace a $\nabla \cdot$ znamená operátor divergence

1.1.4 Záření absolutně černého tělesa

Koncem 19. století bylo známo, že zahřáté těleso vyzařuje elektromagnetické záření. Aby bylo možné změřit emitované záření přesněji, bylo použito uzavřené nádoby s úzkým hrdlem takovým, aby nepropouštělo vnější záření dovnitř. Takové těleso bylo označeno jako černé, tj. neodrážející. Byly stanoveny spektra pro různé teploty (obr. 11) a bylo zjištěno, že



Obr. 11 Spektra záření černého tělesa pro 3 různé teploty



Obr. 10 Druhy elektromagnetického vlnění, vlevo je uvedena vlnová délka

maximum intenzity závisí na teplotě a to nepřímo úměrně – tento posouvací zákon byl objeven Wienem. Existovaly také empirické formule pro popis spekter při malých vlnových délkách (exponenciální formule) a velkých vlnových délkách (lineární závislost). Planck si s těmito rovnicemi pohrával a našel jejich zobecnění.

$$E_{b\lambda T} = \frac{2\pi hc^2}{\lambda^5 [\exp(hc/\lambda kT) - 1]}$$

$E_{b\lambda T}$ is black body radiation in $W m^{-2}$

k = Boltzmann's constant ($1.37 \times 10^{-23} JK^{-1}$)

h = Planck's constant ($6.625 \times 10^{-34} Js$)

c = speed of light ($3 \times 10^8 m s^{-1}$)

T = temperature in Kelvin

Exponenciální člen ve jmenovateli lze skutečně pro velké a malé vlnové délky upravit na exponenciální a lineární závislosti.

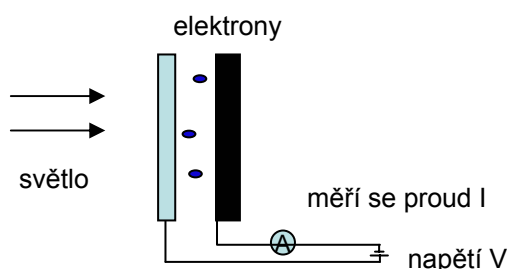
Dalším krokem bylo hledání vhodné interpretace takové rovnice. To bylo obtížné, neboť podle klasických představ měly být uprostřed tělesa malé oscilátory, které měly se zvyšující se teplotou kmitat více a více. Planckovu rovnici však bylo možné odvodit pouze za předpokladu, že tyto oscilátory nemohou mít libovolnou energii nýbrž, že ji mění po skocích. Změna energie se děje po kvantech daných určitou konstantou (Plancková konstanta h):

$$\Delta E = h \cdot \nu$$

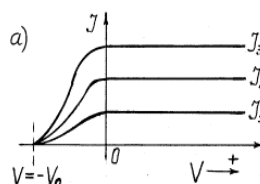
Tímto Planck vlastně zavedl kvantovou teorii. Planck prezentoval svoji teorii Berlínské fyzikální společnosti v prosinci 1900. Ačkoliv měl oscilátory kvantované aby odvodil svoji rovnici, emitované světlo už považoval za elektromagnetickou vlnu. Jak byl blízko pojmu kvanta světla! Pojem foton však jím zaveden nebyl – to se stalo o něco později v teorii fotoefektu.

1.1.5 Einsteinová teorie fotoefektu

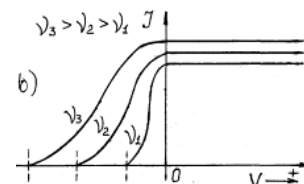
Světlo dopadající na kovovou folii vyráží z této folie elektrony (obr.12). Umístíme-li do blízkosti folie druhou elektrodu, bude obvodem na obr. 12 proudit elektrický proud. Experimentálně bylo zjištěno, že velikost proudu závisí na intenzitě světla (obr. 13) a nezávisí na napětí; pouze v závěrném směru lze proud



Obr.12. Fotoefekt – modře elektrony nad folií, na kterou dopadá světlo. Měří se proud mezi folií a druhou elektrodou při určitém napětí.



Obr. 13. Závislost proudu fotoefektu na napětí pro různé intenzity světla



Obr. 14 Závislost proudu fotoefektu na napětí pro různé vlnové délky světla

blokovat při $V = -V_0$. Jestliže měníme vlnovou délku (barvu světla), mění se velikost závěrného napětí, ale proud zůstává při dané intenzitě přibližně stejný (obr. 14).

Tyto jevy neodpovídaly klasickým představám, neboť si vědci představovali elektrony ve folii jako oscilátory, které je nutno rozkmitat aby se utrhyly a oddělily se od povrchu. Pak by k tomuto rozkmitání měla pomoci větší intenzita světla, tj. energie by měla být tím větší, čím je větší intenzita. Elektrony by měly být emitovány s určitým zpožděním – až po rozkmitání – a proud by měl narůstat s časem. Elektrony by měly být emitovány pro libovolnou vlnovou délku. To se ovšem nepozorovalo. Souvislost energie elektronů s frekvencí světla vysvětlil Einstein kvantovou povahou světla a zavedl pojem **foton**. Foton má energii hc/λ , která se spotřebovává na výstupní práci elektronů (ϕ) a jejich kinetickou energii:

$$E_k = hc/\lambda - \phi$$

Tím se vysvětluje závislost energie elektronů na barvě světla a také existence prahu pro malé frekvence; neexistuje žádné časové zpoždění mezi osvitom a objevením se elektronů. Za vysvětlení fotoefektu obdržel Einstein v roce 1921 Nobelovu cenu.

1.6 De Broglieova teorie

Podobně jako se fotonu přisuzují korpuskulární vlastnosti a určité vlnové délce se přisuzuje energie $E=h.c/\lambda$ a impuls $p=h/\lambda$ lze částici s energií E a hybností p přisoudit určitou vlnovou délku podle vzorce: $\lambda=h/mv$. Této vlnové délce se říká de Broglieová vlnová délka.

1.2 Teorie relativity

Začátkem 20. století se vedly diskuse o šíření světla, o kterém se vědělo jakou má rychlost z Maxwellových rovnic. Předpokládalo se, že podobně jako vlny na vodě nebo zvuk ve vzduchu se světlo šíří v tzv. éteru, který je v klidu vůči určité jedné soustavě souřadnic. To by znamenalo, že lze určit absolutní klid a také např. absolutní rychlost Země vůči této soustavě klidu. Byly činěny pokusy o určení rychlosti světla ve vakuu ve směru pohybu Země a proti směru tohoto pohybu (Michelsonův interferometrický pokus). Výsledek byl ovšem negativní – neexistuje éter ani absolutně klidná soustava. Světlo má vůči všem soustavám rychlost danou Maxwellovými rovnicemi. Einstein ukázal, že rovnocennost všech inerciálních soustav (těch, které se vůči sobě pohybují rovnoměrně) a stálost rychlosti světla vede k Lorenzově transformaci pro souřadnice a čas, tj. že čas se transformuje v závislosti na souřadnicích a naopak souřadnice v závislosti na čase. Platí vzorec pro tzv. dilataci času:

$$t = t_o \frac{1}{\sqrt{1 - \frac{v^2}{c^2}}},$$

kde t je čas v soustavě pohybující se vůči vztažné soustavě rychlostí v . Pro rychlost tělesa, jež se pohybuje v pohybuující se soustavě platí vzorec pro skládání rychlostí:

$$v_A = \frac{v + v_B}{1 + \frac{v \cdot v_B}{c^2}},$$

kde v je rychlost soustav vůči sobě, v_B je rychlost tělesa vůči soustavě B a v_A je rychlost tělesa vůči soustavě A. Tento vzorec lze použít pro výpočet hybnosti v dynamice těles při pružných nebo nepružných srážkách. Uvažováním pružné srážky dvou stejných těles dospějeme k závěru, že hmotnost tělesa nemůže být konstantní, ale že závisí na rychlosti:

$$m = \frac{m_o}{\sqrt{1 - \frac{v^2}{c^2}}},$$

kde m_0 je klidová hmotnost tělesa. Tento vzorec je široce používán v radiční fyzice i technice. Z této rovnice pro celkovou hmotnost tělesa lze dospět k obecně známé rovnici mezi energií a hmotností částice:

$$E = m \cdot c^2,$$

kde ovšem m je celková hmotnost částice. Klidová hmotnost je m_0 a „klidová energie“ je tedy rovná:

$$E_0 = m_0 \cdot c^2.$$

1.3. Atom

1.3.1 Primitivní představy o atomu

Pojem atom zavedl Demokritos, představitel jedné řecké filosofické školy, zhruba 400 let př.n.l. Existenci atomu měl zdůvodněnou tím, že není možné neustále dělit látku do nekonečna na menší a menší částčky. Proto musí existovat nějaká nejmenší částice. Atomy různých látek se podle Demokrita liší tvarem a velikostí.

Teprve počátkem 19. stol. se tuto primitivní představu podařilo lépe zdůvodnit. Dalton kombinoval poměry chemických látek při vzájemných chemických reakcích a zjistil, že aby látky zreagovaly, musí být v určitém poměru. Dalton vysvětluje svá pozorování existencí atomů a dospívá k závěru, že:

- 1) Všechny látky jsou tvořeny atomy
- 2) Atomy nevznikají ani nezanikají chem. reakcí
- 3) Atomy se vážou v poměru celých čísel
- 4) Různé atomy mají různé hmotnosti

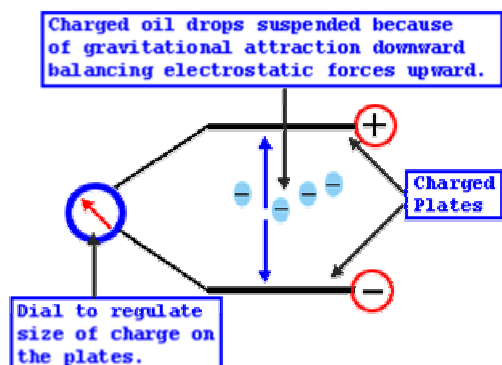
Při formulaci těchto pravidel mu bezpochyby pomohl zákon zachování hmoty formulovaný již v roce 1785 Antoinem Lavoisierem.

1.3.2 Thomsonův model atomu.

Představa atomu jako chemicky dále nedělitelné entity tím byla vlastně zformulována a platí doposud. Koncem 19. století došlo k řadě důležitých objevů. Bylo objeveno roentgenovo záření (Röntgen, 1885), byla objevena přírodní radioaktivita (Becquerel, 1886), byly objeveny další prvky – radium a polonium. Intenzivně pokračovalo studium elektromagnetických jevů. V roce 1897 studoval Thomson katodové záření v plynech. Toto záření bylo možné ovlivnit jak elektrickým, tak magnetickým polem a bylo možné pro nositele tohoto záření vypočítat poměrně přesně poměr náboje a hmotnosti (e/m). Thomson ze svých experimentů usoudil, že se jedná o nový druh částic, nazval je elektrony a vyjádřil hypotézu, že elektrony vznikají z atomů – tedy že jsou původně jejich součástí. Představoval si, že atomy jsou tvořené kladně nabitým jádrem a záporným oblakem elektronů. Odhadl rozměr atomů na 10^{-11} m.

Náboj elektronu určil o několik let později Millikan v experimentech, v nichž sledoval pod mikroskopem pohyb nabitých olejových kapek v elektrickém poli kondenzátoru. Napětí mohl měnit a tím se měnila rychlost a směr pohybu kapek (obr. 15). Náboj kapek měnil tím, že je ozařoval. Zjistil, že pohyb kapek se mění nespojitě – vždy o určitou hodnotu, která

odpovídal změně náboje o $1.6 \cdot 10^{-19}$ C. Tento náboj označil jako elementární – dále nedělitelný.

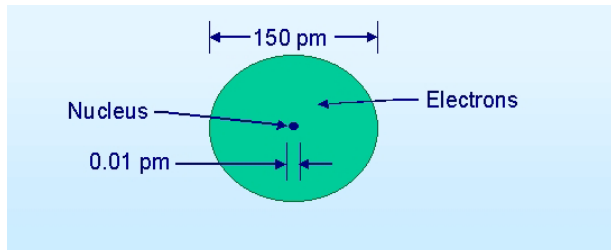


Obr. 15 Millikanův experiment

1.3.3. Rutherfordův model atomu.

V roce 1911 zkoumal Rutherford průlet částic α tenkou zlatou folií. O těchto částicích již věděl jakou mají hmotnost i náboj a dokázal si spočítat na základě Coulombova zákona, jak by měly tyto částice interagovat s jádry atomů, o kterých se domníval, že tvoří vnitřní část atomů (dle

Thomsonova modelu). Částice by se měly vychýlovat ze své dráhy. Frakce vychýlených částic by měla odpovídat geometrickému průřezu jádra jehož poloměr odhadoval na 10^{-11} m. Závěry jeho pokusů však byly ohromující – téměř žádné částice se nevychylovaly, avšak ty, které se vychýlily, byly rozptýleny na velké úhly – jako by narážely na něco malého ale těžkého. Rutherford z tohoto pozorování učinil závěr, že atomy obsahují malé (10^{-15} m) jádro, které obsahuje prakticky všechnu hmotu atomu. Vznikl „planetární model atomu“, v němž je ve středu kladně nabitě jádro a kolem obíhají elektrony. V jádře je koncentrována téměř veškerá hmotu atomu (obr.16).



Obr.16 Rutherfordův model atomu

Tento model ovšem odporoval tehdy již známé skutečnosti, že totiž elektron pohybující se po zakřivené dráze vyzařuje a ztrácí energii. Představa planetárního atomu byla proto neudržitelná.

1.3.4. Bohrov model atomu.

Bohr využívá kvantového přístupu, který už dříve zavedli Planck a Einstein a vnáší do teorie atomu předpoklad, že elektron se

nemůže pohybovat po libovolné dráze kolem jádra (jako planety) a mít libovolnou energii, ale že může mít jen určité hodnoty energie. Existují stacionární stavy elektronu, kdy energii neztrácí ani nepřijímá a při přechodu mezi těmito stavy (s energií E_1 a E_2) může energii přijmout nebo ztratit. Tato energie se vyzáří (nebo absorbuje) ve formě elektromagnetického záření.

$$h\nu = E_1 - E_2$$

kde h je Planckova konstanta a ν je frekvence vyzářeného světla. V Bohrově modelu atomu se předpokládá, že moment hybnosti elektronu (L) může nabývat pouze celočíselných násobků Planckovy konstanty:

$$L = \frac{nh}{2\pi}$$

Tento předpoklad je v souladu s de Brogliovou teorií, v níž se přisuzuje elektronu také vlnová délka, jež se rovná h/mv . Pak jsou celočíselné násobky L vlastně dány požadavkem, aby byl obvod dráhy elektronu celočíselným násobkem jeho vlnové délky:

$$mvr = \frac{nh}{2\pi}$$

Z rovnosti odstředivé síly a přitažlivé síly plyne:

$$r = \frac{kZe^2}{mv^2}$$

a tudíž:

$$r = \frac{n^2 h^2}{4\pi^2 kZe^2 m}$$

kde

$$r = 0,529 \times 10^{-10} n^2 / Zm$$

a pro rychlost platí:

$$v = \frac{2\pi kZe^2}{nh} = 2,19 \times 10^6 \frac{Z}{n} \text{ms}^{-1}$$

Kinetická energie se rovná:

$$\text{KE} = \frac{1}{2}mv^2 = \frac{2\pi^2 k^2 Z^2 e^4 m}{n^2 h^2}$$

neboli

$$E_n = -\frac{2\pi^2 k^2 Z^2 e^4 m}{n^2 h^2}$$

$$E_n = 2,18 \times 10^{-18} Z^2 / n^2 J,$$

$$= -13,6 Z^2 / n^2 eV$$

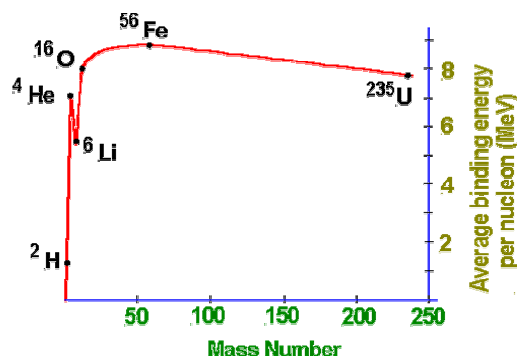
Energetické hladiny jsou závislé na hlavním kvantovém čísle n a atomovém čísle Z . První hladina v atomu vodíku má tedy úroveň -13.6 eV.

1.4. Jádro atomu

Existenci jádra atomu postuloval už Thomson a jeho velikost ukázal Rutherford (1911). Kromě protonů jsou v jádře přítomny též neutrony, které byly objeveny Chadwickem v roce 1932 (objev popsán v další kapitole). Jádro atomu je soustava částic protonů a neutronů, která je popisována vhodnými modely. Isotop je charakterizován určitým atomovým číslem Z (počtem protonů v jádře nebo též protonovým číslem) a hmotnostním číslem A (počtem nukleonů v jádře, též někdy nukleonovým číslem nebo relativní atomovou hmotností). Prvek je charakterizován pouze hodnotou Z . Jádra se stejným Z ale různým hmotnostním číslem A se nazývají izotopy; při stejném $N=A-Z$ jsou to izotony; při stejném A , ale různém Z jsou to izochory.

1.4.1 Kapkový model jádra.

Když si představíme jádro jak kapku tekutiny, můžeme z této představy odvodit poměrně přesnou formuli pro hmotnost (a tedy i hmotnostní defekt) jádra. Hmotnostní defekt je rozdíl mezi očekávanou hmotností jádra ($1.67 \cdot 10^{-27} A$, kde A je atomové číslo) a skutečnou hmotností. Hmotnostní defekt bude zřejmě záviset na počtu částic, tj. bude obsahovat člen úměrný A , dále na povrchu kapky je nutno počítat s povrchovým napětím a nutno proto korigovat výsledek o člen úměrný $A^{2/3}$ (je-li poloměr úměrný $A^{1/3}$). Dále bude v jádře působit Coulombická repulse, kdy interakce bude existovat mezi všemi dvojicemi protonů (tj. Coulombický člen bude úměrný Z^2), vzdálenost mezi nimi odhadneme dle poloměru jádra na $A^{1/3}$. Coulombický člen bude dán potenciální energií jednoho protonu v poli (potenciálu) druhého protonu a bude tudíž úměrný $1/A^{1/3}$. Celkově pro Coulombický člen platí, že je úměrný $Z^2/A^{1/3}$. Poslední člen, který se uvažuje je tzv. Pauliho člen, který představuje korekci na rozdílný počet protonů a neutronů. V úvahu se zde bere skutečnost, že nejstabilnější jsou jádra se stejným počtem obou. Tento člen je tedy úměrný $(A-2Z)$ a vzhledem ke zvětšující se disproporcii mezi počtem protonů a neutronů pro rostoucí A , se poslední člen předpokládá nepřímo úměrný A . Takto jsme dospěli k semiempirické Weizsaeckerově formuli:



Obr. 17. Vazebná energie jádra (odpovídá hmotnostnímu defektu)

$$E_b^{even-odd} \approx \underbrace{(15.75 \text{ MeV})A}_{\text{Volume term}} - \underbrace{(17.8 \text{ MeV})A^{2/3}}_{\text{Surface term}} - \underbrace{\frac{(0.711 \text{ MeV})Z^2}{A^{1/3}}}_{\text{Coulomb term}} - \underbrace{\frac{(23.7 \text{ MeV})(A-2Z)^2}{A}}_{\text{Pauli term}}$$

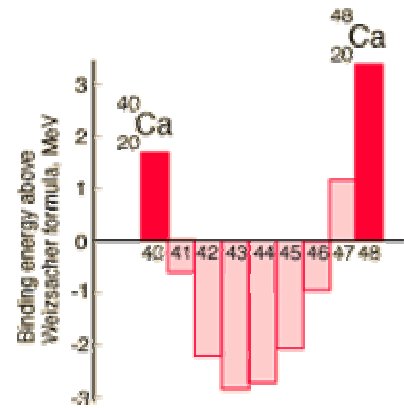
V této rovnici jsou uvedeny číselné hodnoty pro jednotlivé členy. Vzhledem k tomu, že se energie dále liší pro lichá a sudá jádra, předpovídá tato rovnice spíše průměrnou hodnotu pro sudé a sousední liché jádro.

Z průběhu vazebné energie (viz. obr. 17) je vidět, že největší hodnoty nabývá vazebná energie uprostřed periodické soustavy. Je tedy možný rozpad jader těžších za zisku energie (např. ^{235}U), ale také syntéza jader lehčích (např. $d+t$).

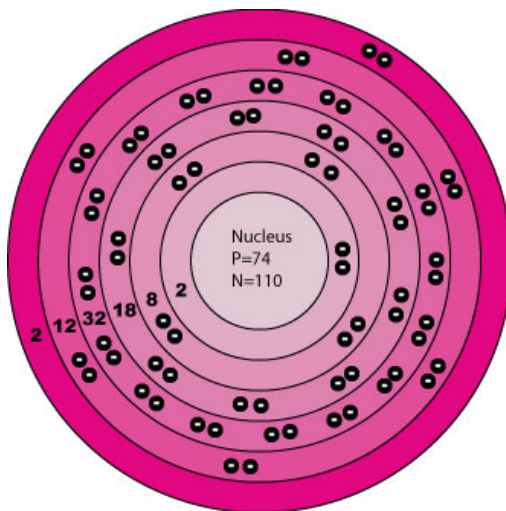
1.4.2 Slupkový model jádra.

Tento model vychází ze skutečnosti, že některá jádra jsou mimořádně stabilní (mají velkou vazebnou energii). Tak např. velmi stabilní je jádro helia při $Z=2$ a $A=2$, jádro kyslíku při $Z=8$ a $A=16$, vápníku při $Z=20$ a $A=20$. Tzv. magickými čísly jsou tato: 2, 8, 20, 28, 50, 82. Stabilitu je vidět např. u vápníku, kdy při přechodu od $Z=20$, $A=20$ přidáváním neutronů vidíme, že vazebná energie nejprve klesá a posléze vzroste při $N=28$, kde se jádro stává opět stabilní (obr. 18).

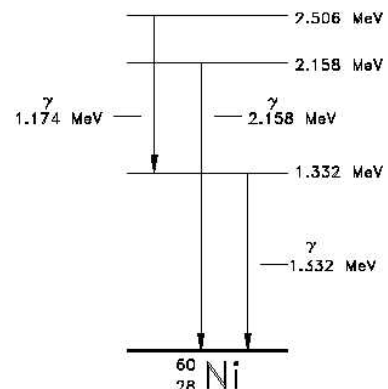
Výpočtem lze získat jednotlivé stavy jádra pro daný počet částic (obr. 19). Jádro v základním stavu může být stabilní a při přechodu mezi energetickými stavy pak vyzařuje patřičnou energii. Na obrázku (obr. 20) vidíme systém stavů v jádře niklu, které vznikne rozpadem ^{60}Co .



Obr. 18. Závislost vazebné energie na hmotnostním čísle pro jádro vápníku.

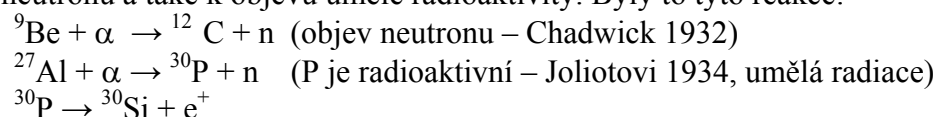


Obr. 19. Slupkový model jádra při 74 protonech a 110 neutronech (Wolfram).



Obr. 20. Systém vzbuzených stavů v jádře niklu po rozpadu ^{60}Co .

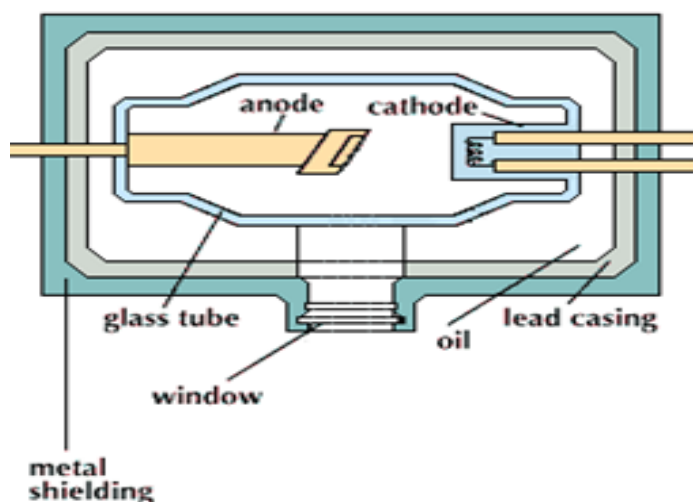
Jádra se mohou přeměňovat při tzv. *jaderných reakcích*, které mohou být vyvolány buď přírodními zdroji záření nebo umělými svazky částic. První takovou reakci uskutečnil Rutherford (1919) když zkoumal dolet částic α v různých plynech. Nedovedl si vysvětlit, proč v dusíku je dolet 4x větší. Nakonec to vysvětlil vznikem jiných částic – protonů, které jsou 4x lehčí. Reakci lze zapsat takto: $^{14}\text{N} + \alpha \rightarrow ^{17}\text{O} + p$. Částice α umožnily objev dalších reakcí, které vedly k objevu neutronu a také k objevu umělé radioaktivity. Byly to tyto reakce:



Působení záření γ může rovněž docházet k jaderným reakcím. Tak např. pro energii vyšší než 2.2 MeV dochází k fotodesintegraci: $^2\text{H} + \gamma \rightarrow ^1\text{H} + n$

II. Přírodní zdroje ionizujícího záření

V této kapitole se budeme zabývat zdroji a vlastnostmi záření. Předpokládá se znalost základních vlastností hmoty jako je stavba atomů, atomového jádra a molekul. Tyto základní informace lze nalézt ve skriptech (Hrazdira a Mornstein, 1999). Pro doplnění poznatků lze doporučit knihu Klener V., 2000.



Obr. 21. Roentgenovo záření vzniká v rentgence při dopadu elektronů na anodu nebo antikatu. Většinou anoda slouží pro vytvoření elektrického pole a do lampy se vkládá další elektroda – antikata pro dopad elektronů, kde se tvoří záření. Dole je anoda, nahoře katoda, uprostřed antikata odkud vychází záření. Schéma lampy je zobrazeno na horním obrázku, dole je reálná Roentgenova lampa (historický exemplář).

nemohl své krystalky osvětlit a po zabalení do černého papíru očekával pouze slabý obraz. Jaké však bylo jeho překvapení, když obrazy krystalků byly jasné. To znamenalo, že uran emituje záření bez vnějšího zdroje energie. Becquerel takto objevil přirozenou radioaktivitu. Přirozenou radioaktivitu začali intenzívně studovat Pierre a Marie Curie (obr. 23). Po chemické extrakci uranu z uranové rudy, Marie zjistila, že zbytek rudy je více radioaktivní než samotný uran. Dospěla

2. 1. Objev radioaktivního záření

V listopadu 1895, na Universitě ve Würzburgu, zkoumal Wilhelm Roentgen světélkující fluorescenční stínítko. Fluorescence v něm byla indukovaná katodovými paprsky, jež vznikaly po dopadu elektronů na antikatu ve vakuové trubici (obr. 21). Zjistil, že fluorescence nemizí ani při zaclonění trubice černým papírem a usoudil, že se jedná o neviditelné záření nazvané později paprsky X (Roentgenovy paprsky). Když vložil Roentgen mezi lampu a stínítko ruku, uviděl ke svému velkému překvapení kosti prstů. Během dvou měsíců publikoval pečlivý popis výsledků svého výzkumu. Roentgen obdržel za svůj objev v roce 1901 Nobelovu cenu. Katodové trubice byly vlastně prvními jednoduchými urychlovači elektronů (viz urychlovače částic v kap. 1.3.1.).

Přirozenou radioaktivitu objevil v roce 1896 francouzský fyzik Antoine Henri Becquerel. Becquerel znal práce Roentgena, což vedlo k tomu, že v prosinci 1895 “vyfotil” ruku své ženy tak, že ji umístil do svazku paprsků X. Na fotografické desce se objevil nezapomenutelný obraz kostí s prstýnkem (obr.22). Becquerel se zabýval zkoumáním solí uranu, které nejprve exponoval na slunci, poté zabalil do černého papíru a na fotografických deskách pak obdržel obraz krystalků uranu. Domníval se, že sluneční paprsky indukují v uranu záření. Koncem února 1896 bylo nad Paříží zataženo, Becquerel



Obr. 22.

tak k závěru, že ruda obsahuje další prvek - také radioaktivní. To vedlo k objevům prvků polonia a radia. Manželé Curie obdrželi v roce 1903 Nobelovu cenu za jejich práce o radioaktivitě. Na počest Marie Curiovi byl název “curie” zvolen za jednotku aktivity. Marie Curie získala jako první na světě další Nobelovu cenu v roce 1911. Zbytek života věnovala studiu radia a jeho použití při léčbě rakoviny.



Obr. 23.
Marie Curie

Záření vždy bylo a je součástí životního prostředí člověka. Existuje celá řada zdrojů radioaktivního záření a lze je dělit z různých hledisek. Nejčastěji se používá dělení na přírodní a antropogenní zdroje. Mezi přírodní zdroje patří zejména terestriální záření, které vzniká většinou z rozpadových řad a kosmické záření. Člověk vytvořil mnoho zdrojů záření: od Roentgenovy lampy, přes reaktory a urychlovače až po terapeutické ozařovače. V praxi se záření používá v řadě oblastí lidské činnosti jako např. v energetice, výzkumu, medicíně, apod. Popíšeme stručně nejčastější zdroje ionizujícího záření.

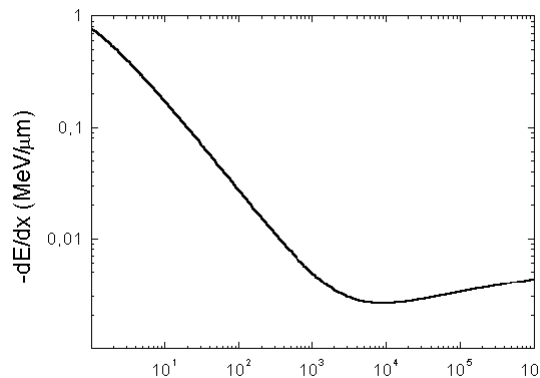
V přírodě se setkáváme se 3 druhy radioaktivního rozpadu: rozpadem alfa, beta a gama. Rozpadem se rozumí přeměna prvků na jiné prvky a s ní spojená emise záření. Budeme hovořit o α -, β - a γ -záření. Na přírodní radioaktivitě pocházející ze zemských hornin se nejvíce podílejí isotopy rozpadových řad - uranové a thoriové. Atomová hmotnost isotopu v řadě se dá vyjádřit vztahem $4n+2$, kde n je kladné číslo. Podobně pro thoriovou řadu platí, že atomová hmotnost je dána jako $4n$; pro aktiniovou $4n+3$. Atomovou hmotnost $4n+1$ mají isotopy v umělé neptuniové řadě.

K přírodnímu pozadí dále podstatně přispívá kosmické záření, které se dále dělí na galaktické a sluneční. Oba tyto typy záření mají pro člověka význam, proto se o nich zmíníme. Existují také radionuklidy, které jsou součástí lidského těla a ozařují organismus zevnitř. Patří mezi ně např. draslík ^{40}K a ^{14}C . Jejich příspěvek k celkovému ozáření člověka je však malý (<10%).

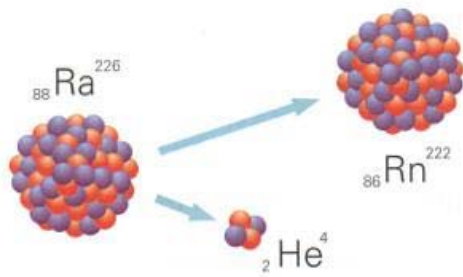
2.2. α -záření

α -záření je svazek rychle letících jader helia, tj. částic, které obsahují 4 nukleony (2 protony a 2 neutrony). Jádro emitující α -částici sníží tedy své atomové číslo o 2 a nukleonové číslo o 4 jednotky. Hmotnost jedné částice je $4 \times 1.67 \times 10^{-27}$ kg. Energie částic α -záření nabývá pouze určitých diskrétních hodnot, jež jsou pro různé α -zářiče v rozmezí 4-7 MeV (mluvíme o tzv. čárovém spektru). Čárové spektrum je dáno kvantovým charakterem přechodů jader.

α -záření je málo pronikavé a k jeho odstínění stačí list papíru. Ve tkáni má doběh několik desítek mikrometrů. Ztráty energie α -částice při průchodu hmotou lze popsat v závislosti na energii pomocí Bethe-Blochovy formule (obr. 24). Částice α ztrácejí energii v prostředí ionizacemi a excitacemi. Dolet částic je dobře definován a závisí na jejich počáteční energii a materiálu. U tohoto druhu záření není nebezpečné externí ozáření, ale spíše možnost vnitřní kontaminace, kdy se radioaktivní izotop může zabudovat do organismu a ozařovat jej po celý život. Poločas rozpadu souvisí s energií - čím je větší energie α -částic, tím je kratší poločas. Tak např. pro ^{239}Pu je energie 5.1 MeV a poločas 24 tis. let, pro ^{241}Am je energie 5.5 MeV a poločas rozpadu je 433 let.



Obr. 24. Ionizační ztráty energie částice v závislosti na její energii (vypočteno dle Bethe-Blochovy formule)



Obr. 25. Rozpad radia na radon a částici alfa.

Důležitým isotopem emitujícím α -záření je radon (${}^{226}\text{Ra}$). Tento prvek vzniká při rozpadu radia v rámci tzv. uran-radiové rozpadové řady a sám dále emituje α -záření, stejně jako jeho dceřiné produkty (viz obr. 25). Radon je za normálních podmínek v plynném stavu a často se s ním setkáváme v uranových dolech, nevhodně postavených domcích, jeskyních a také ve vodě, která protéká uranovými rudami. Záření radonu působí při vdechování na plicní buňky a způsobuje s určitou pravděpodobností rakovinu. Vznik rakoviny plic byl prokázán jak u horníků pracujících v uranových dolech, tak u osob žijících v domcích se zvýšenou koncentrací radonu. Příspěvek radonu k celkovému radiačnímu

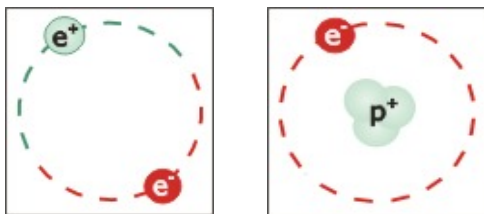
pozadí závisí silně na lokalitě. V průměru se uvádí hodnota přibližně 2mSv/rok.

2.3. β -záření

β -záření je tvořeno rychlými elektrony (β^-) nebo pozitrony (β^+). Hmotnost elektronů nebo pozitronů je asi 2000x menší ve srovnání s hmotností nukleonu. Energetické spektrum β -záření je spojité vzhledem k tomu, že při β -rozpadu vznikají 3 částice (např. neutron se rozpadá β -rozpadem na proton, elektron a antineutrino). Přestože je celková uvolněná energie přesně určená energetickými hladinami v jádře, rozdělí se neutron na 3 částice a každá z nich pak může odnést libovolnou energii. Maximální energie elektronů se může pohybovat v rozsahu od desítek keV (např. ${}^3\text{H}$ má energii elektronů 19 keV) až po MeV (např. ${}^{32}\text{P}$ má energii 1.7 MeV).

β -záření je pronikavější než α -částice. K jeho odstínění je zapotřebí tlustší vrstva např. z plexiskla (8-10 mm). β -záření ztrácí energii v prostředí rovněž prostřednictvím ionizací a excitací atomů a molekul a pro výpočet ionizačních ztrát lze přibližně rovněž použít Bethe-Blochovu rovnici. Elektrony jsou však značně lehčí v porovnání s α -částicem a ztrácejí tak méně energie na jednotku dráhy. Proto mají také podstatně větší dolet. Při průchodu elektronů hmotným prostředím dochází často k rozptylu elektronů a jejich dráha je proto značně klikatá. Elektrony mohou ztrácet svou energii také emisí tzv. brzdného záření, jehož výtěžek závisí na energii elektronu a na atomovém čísle prostředí. Pro přírodní zdroje β -záření činí ztráty brzdným zářením pouze malou část celkových ztrát. Kladně nabitě pozitrony jsou antičástice k elektronům a po zabrzdění v látkovém prostředí dochází proto k anihilaci pozitronu s elektronem.

Vzniklé záření se nazývá anihilační a má energii 511 keV (rovnou klidové hmotnosti elektronu).

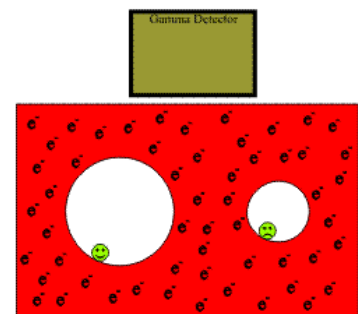


Obr. 26. Positronium ve srovnání s atomem vodíku (proton a elektron)

Positronium formuje v přítomnosti elektronu exotický atom zvaný positronium (obr. 26). Atom positronia je podobný atomu vodíku, ale má 1000x menší hmotnost. Jeho zvláštností je, že s určitou

pravděpodobností dochází k jeho anihilaci, kdy se celá klidová hmotnost obou částic mění na energii fotonů. Doba života je v oblasti nanosekund, 1 gram uvolní energii rovnou 25 kilotunám TNT.

Positronium lze využít ke studiu materiálů, kdy se využívá tzv. předčasné anihilace pozitronu, který je součástí positronia při kolisi s elektronem (obr.27). Je-li positronium uvězněno v určitém materiálu, pravd. předčasné anihilace závisí na velikosti póru (pro větší je menší).

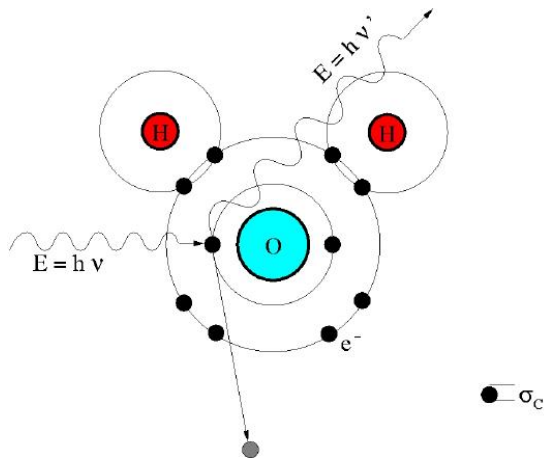


Obr. 27. Studium materiálů pomocí positronia. Dopadem positronia na povrch dutiny může dojít k předčasné anihilaci.

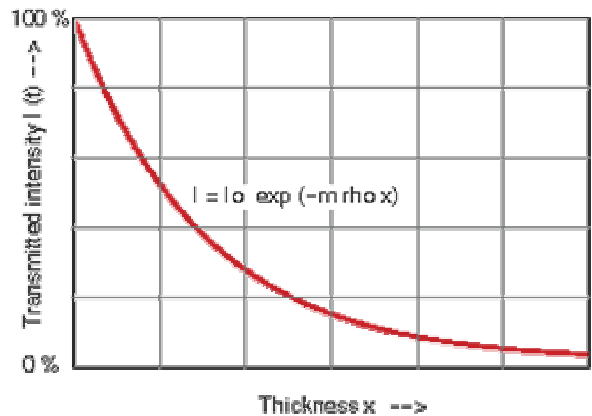
2.4. γ -záření

γ -záření je vlastně elektromagnetické záření o velmi krátké vlnové délce. Vzniká v důsledku přechodu vzbuzeného stavu jádra na nižší energetickou hladinu. Vzbuzeňé jádro může vzniknout po některém jiném rozpadu. Tak např. ^{60}Co se rozpadá na ^{60}Ni β -rozpadem, přičemž uvolněná energie činí 0.3 MeV. Jádro niklu však zůstane ve vzbuzeňém stavu a vyzářuje dva kvanta γ s energiemi 1.17 a 1.33 MeV. Jak vidíme, spektrum γ -záření je čárové, jeho energie se pohybuje od zlomku keV do několika MeV.

Pohlcování γ -záření hmotou se děje prostřednictvím třech hlavních jevů: fotoefektu, Comptonova jevu a materializace fotonů. Při fotoefektu je předána veškerá energie fotonu na



Obr. 28. Comptonův jev na molekule vody. Energie počátečního fotonu E se spočte jako součin Planckovy konstanty a frekvence daného záření: $E=h.v$.



Obr. 29. Exponenciální zákon absorpce pro gamma-záření (na rozdíl od určitého doletu pro těžké částice).

elektron, který je nejenom uvolněn z atomu či molekuly, ale má také určitou kinetickou energii. Comptonův jev je vlastně rozptyl, při kterém se sníží energie fotonu a rozdíl energií počátečního a výsledného kvanta se předá elektronu (obr. 28). Při materializaci dochází ke vzniku elektron-pozitronového páru. Při tomto procesu musí být energie fotonu dostatečně velká (>1 MeV) a dochází k němu pouze v blízkosti jádra atomu, neboť to vyžadují zákony zachování energie a hybnosti. Absorpci fotonů hmotou lze popsat pomocí exponenciálního zákona, tj. na jednotku délky je pravděpodobnost absorpce konstantní a závisí na energii fotonů a na vlastnostech látky. Platí tedy, že

$$I/I_0 = \exp(-x/L),$$

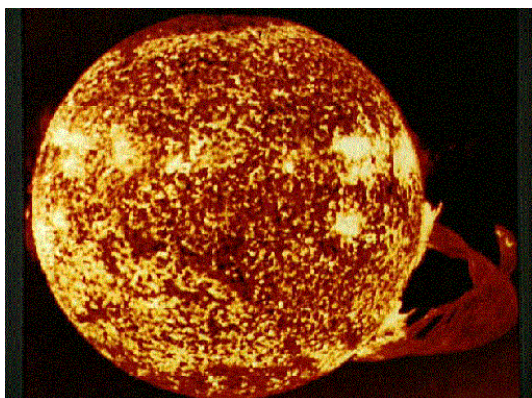
kde I a I_0 jsou konečná a počáteční intenzita γ -záření, x je tloušťka látky a L je polovrstva absorpce (obr. 29). Vidíme, že γ -záření vlastně nelze zcela odstínit. V rámci radiační ochrany je však důležité snížit intenzitu pod úroveň přírodního pozadí. Při energiích do 1 MeV je vhodným absorpčním materiálem olovo nebo uran. Je tomu tak proto, že absorpce γ -záření fotoefektem je silnější pro větší Z prostředí. Vzhledem k vysoké pronikavosti γ -záření je u γ -zářičů velké nebezpečí vnějšího ozáření. Přírodní pozadí od terestriálního γ -záření závisí na přítomnosti radioaktivních hornin a činí přibližně 0.3-1 mSv/rok.

Energie emise i absorpce je kvantována – stejný prvek by měl γ -záření také pohlcovat tak jak to je u atomů. To nebylo pozorováno vzhledem k posunu čar způsobenému odrazem jádra. V krystalové mřížce při nízké teplotě se však možné kmity kvantují a energie se pak může předat celé mřížce – posun je pak zanedbatelný. Rozladění zdroje a detektoru lze pozorovat při různých jevech – např. Dopplerův jev (posun čar v důsledku pohybu zdroje) lze detekovat už při cm/s. Lze detekovat gravitační posun čar způsobený rozdílem potenciálů pro rozdíl výšek 21 m.

2.5. Kosmické záření

Existují dva podstatně odlišné druhy kosmického záření a sice sluneční a galaktické.

2.5.1 Sluneční záření má směrový charakter a je tvořeno elektromagnetickým zářením a protony. Jeho intenzita je závislá na sluneční aktivitě a může prudce a nečekaně narůstat v okamžiku



Obr. 30. Jedna z největších slunečních erupcí zachycená Skylabem v roce 1973.

slunečních erupcí (obr. 30). Slunce prochází určitými cykly s periodou 11 let, v jejichž průběhu se mění řada parametrů. Při tzv. “solárním maximu” je na slunečním povrchu pozorováno nejvíce skvrn, množství erupcí a výronů hmoty do prostoru. Sluneční erupce vedou k emisi rychlých protonů, které zesilují tzv. sluneční vítr a způsobují záři na severní polokouli. Tato záře se ze Země jeví jako závěs na nebi jenž světelkuje červeně a zeleně. (obr. 31). Částice slunečního záření mohou přerušit komunikaci prostřednictvím rádia, mohou vést k ozáření posádky letadla dávkou srovnatelnou s

lékařským vyšetřením a mohou způsobit smrtelné ozáření posádky kosmické lodi. Země je chráněná před tímto zářením atmosférou. Pro předpověď slunečních erupcí existují modely, které však nejsou zcela spolehlivé. Aktivita Slunce je monitorována družicemi.

2.5.2 Galaktické záření

Z hlubin vesmíru k nám přichází **galaktické záření** a to ze všech stran. Obsahuje částice celého spektra periodické soustavy prvků, přičemž existují maxima výskytu pro některé prvky. Částice dosahují velmi vysokých energií (až 10^{17} eV), které doposud nebyly dosaženy v pozemských urychlovačích. Při dopadu do zemské atmosféry interagují částice galaktického záření s atomy a vzniká velký počet sekundárních částic. Galaktické záření má také své maximum a minimum, které souvisí se slunečním cyklem. To proto, poněvadž sluneční záření vyvolává magnetické pole ve Sluneční soustavě, které potom ovlivňuje galaktické záření. Toto pole má maximální účinnost ve slunečním maximu, kdy je tedy nejslabší příspěvek od galaktického záření. Galaktické záření přispívá k radiační zátěži cestujících a zejména pak posádek v letadlech. Tak např. ve výšce 10,000 m je dávková rychlost přibližně 50 mSv/rok; na povrchu Země činí pouze 1-3 mSv/rok. Sluneční záření neohrožuje cestující v letadlech, protože má malou energii. Pouze při velkých erupcích může být jeho příspěvek na vysokých letových hladinách v řádu 0.1 mSv/hod.



Obr. 31. Polární záře nad Severní Dakotou 21. listopadu 2002

Kosmické záření produkuje při dopadu do zemské atmosféry sekundární částice, z nichž některé doletí až na povrch Země. Jak primární, tak sekundární záření je pohlcováno atmosférou, a proto má jeho intenzita maximum v určité výšce (zhruba 20 km), která však závisí na zeměpisné šířce. Na zemském povrchu činí příspěvek tzv. tvrdé složky sekundárního kosmického záření k radiačnímu pozadí zhruba 0.5 mSv/rok. Je tvořena převážně miony, které mají poločas rozpadu $2 \cdot 10^{-6}$ s a mohou tak při své rychlosti urazit v atmosféře dráhu i několika desítek kilometrů. Miony dosahují rychlosti blízké rychlosti světla a doba letu se pro ně prodlužuje v důsledku dilatace času. Rozpadem mionů vznikají záporné i kladné elektrony, které tvoří tzv. měkkou složku kosmického záření. Lze ji odstínit vrstvou olova o tloušťce 10 cm. Tvrdá složka kosmického záření může proniknout i metrovou vrstvou olova a lze ji pozorovat i pod zemí a pod hladinou moře.

III. Zdroje záření vytvořené člověkem

Člověk vytvořil mohutné zdroje záření, které mohou být použity pro účely radiobiologického výzkumu. Z druhé strany je však třeba se před těmito zdroji chránit. Ve výzkumu se používají urychlovače - největší přístroje, které kdy člověk stvořil; v průmyslu se zdroje záření používají pro řadu účelů, např. pro defektoskopii; v energetice zaujímají významné místo jaderné elektrárny; v medicíně se zářením provádí diagnostika a léčí se zhoubné nádory. Podáme jenom stručný přehled těchto zdrojů záření a jejich základních vlastností důležitých z radiobiologického hlediska.

3.1. Urychlovače

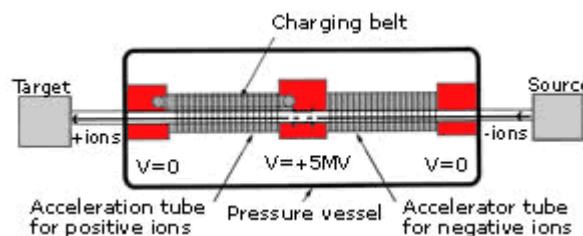
Urychlovače jsou zařízení, která udělují vysokou rychlost subatomovým částicím jako jsou protony, elektrony a další elementární částice nebo také ionty, tj. jádra různých atomů. Tyto částice získají urychlením vysokou energii a jsou vyvedeny na terčik, kde kolidují s jádry atomů, jež jsou v terčiku obsaženy. Z interakcí vznikají další částice, které jsou zachyceny v detektorech. Z informace poskytnuté detektory fyzikové vyvozují vlastnosti hmoty. Čím je větší energie částic, tím detailnější informace o hmotě lze získat. Proto je snaha stále zvyšovat energii urychlovačů a stavět větší a větší zařízení. Urychlovače se používají také v průmyslu např. pro implantaci iontů (povrchovou úpravu materiálů), ve výzkumu jiném než fyzikálním (např. radiobiologickém nebo biologickém), pro radioterapii a produkci isotopů vhodných pro diagnostiku.

Urychlovače se dělí na dvě velké kategorie: lineární a kruhové. U lineárních urychlovačů vzrůstá energie částic na výstupu s jejich délkou. V kruhových urychlovačích se částice pohybují po kruhové dráze a mnohokrát oběhnou urychlovač než získají potřebnou energii a dopadnou na terčik.

3.1.1. Lineární urychlovače

Tyto urychlovače jsou tvořeny dlouhou trubicí s dostatečně vysokým vakuem, v nichž je na jedné straně zdroj částic a na straně druhé se nachází terčik. Nedílnou součástí urychlovače je zdroj vysokého napětí (např. Van de Graaffův generátor). Napětí je přivedeno na elektrody urychlovače. Částice procházejí potenciálovým rozdílem mezi elektrodami a nabývají na rychlosti a energii. Nejjednoduššími a nejrozšířenějšími urychlovacími zařízeními jsou vlastně obrazovky televizních přijímačů, monitory počítačů nebo elektronové mikroskopy. Jsou to katodové trubice, v nichž se urychlují elektrony. Zdrojem elektronů je žhavené vlákno. Přivedením vysokého napětí dochází k urychlení na energii několika desítek keV. Elektrony jsou vychýleny a rozprostřeny po celé obrazovce kde po dopadu budí světlo.

První lineární urychlovače s vysokým napětím byly konstruovány ve dvacátých letech minulého století. Sestávaly ze dvou elektrod umístěných do vakuové trubice, mezi kterými byl potenciálový rozdíl 100 kV. Tyto urychlovače byly nazvány podle svých autorů **Cockcroft-Waltonovy generátory**. V současné době se nejčastěji setkáváme s van de Graaffovým lineárním urychlovačem. V tomto urychlovači se náboj nanáší pomocí výboje na izolační pás, kterým je přenášen na terminál s vysokým napětím. Potenciál na terminálu se zvyšuje dokud se proud přenášený pásem nevyrovná se zpětným proudem z terminálu. Kvůli úniku náboje se obvykle terminál i trubice vkládají do nádrže s izolujícím plynem. Napětí se do urychlovací trubice přivádí po částech, na několik elektrod. Jako zdroj iontů se



Obr. 32. Princip tandemového urychlovače. Záporně nabití ionty z uzemněného iontového zdroje jsou urychlovány směrem ke středu, kde se nachází terminál s vysokým napětím. Tam se změní náboj iontů průchodem přes tenkou folii. Elektrický náboj se přenáší na páse. Vysoké napětí (5 MV) je izolováno od země izolujícím plynem, který je navíc pod tlakem.

používá vhodný plyn umístěný do elektrického výboje. Velikost proudu ve van de Graaffově generátoru může činit několik mikroamper.

Moderní *van de Graaffův generátor* je znázorněn na obr. 32, kde je napětí přiváděno doprostřed generátoru, zatímco oba konce jsou uzemněny. Záporně nabitě ionty jsou urychlovány od zdroje směrem ke středu trubice. Tam je tenká folie nebo tenká vrstva plynu v níž se ionty zbaví několika elektronů a jejich náboj se změní ze záporného na kladný. To umožní další urychlení iontu v druhé polovině trubice. Tento tzv. tandemový urychlovač může udělit iontům dvojnásobnou energii ve srovnání s jednostupňovým zařízením. Van de Graaffovy urychlovače jsou v současné době dostupné komerční přístroje, u nichž se napětí pohybuje v rozmezí 1-25 MV. Používají se při analýze materiálu, hmotové spektrometrii apod. Jeden z největších van de Graaffových generátorů se používá již mnoho let v Daresbury (Velká Británie). Jeho urychlovací trubice je dlouhá 42 m a jeho terminál ve středu trubice udrží potenciál až 20 MV (obr. 33).

Lineární urychlovače s opakovaným urychlením.

Urychlení v lineárním urychlovači se může uskutečnit v jednom kroku nebo opakovaně tak, že se v trubici nachází více cylindrických elektrod, na které je přiváděno vhodné časově závislé napětí. Tento urychlovač zkonstruoval norský fyzik Rolf Wideröe. Jestliže použijeme vysokofrekvenční zdroj napětí o stálé frekvenci a přivedeme toto napětí na sérii elektrod umístěných podél lineárního urychlovače, můžeme dosáhnout opakovaného urychlení ve štěrbinách mezi elektrodami.

Elektrody se však musí postupně prodlužovat, protože částice letí čím dál, tím rychleji (mluvíme o lineárním vysokofrekvenčním urychlovači). Poněkud odlišnou konstrukci použil později Luis Walter Alvarez, který vytvořil uvnitř cylindrických dutin stojatou vlnu nesoucí urychlované částice. Vývoj radarových systémů v průběhu druhé světové války vedl ke zdokonalení konstrukce



Obr. 33. Tandemový urychlovač v Daresbury (Velká Británie).



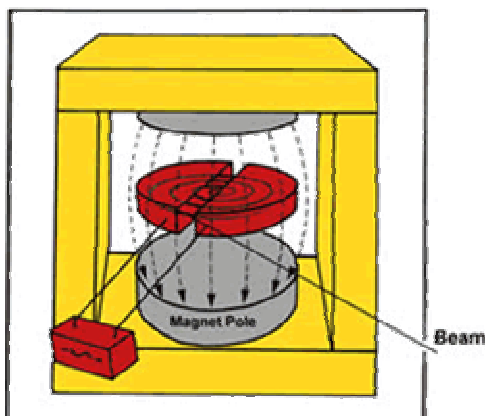
Obr. 34. Lineární urychlovač ve Stanfordu byl zkonstruován Burtonem Richterem a je 3 km dlouhý. Energie elektronů zde dosáhla v roce 1976 20 GeV.

vlnovodičů, které byly použity pro konstrukci urychlovačů. V těchto urychlovačích se elektromagnetické vlny šíří rychlostí světla, což umožňuje urychlování elektronů, jež se také pohybují takto rychle. Elektrony jsou nesené elektromagnetickou vlnou jako surfař na vlně v moři. V současné době existuje pro vědecké účely zhruba 130 lineárních urychlovačů pro elektrony a pozitrony a 50 pro ionty včetně protonů. Největší energie dosahují elektrony ve SLACu (Stanford Linear Accelerator Centre) (obr. 34). V Los Alamos je protonový lineární urychlovač na jehož výstupu mají protony energii 800 MeV. Tento 800 m dlouhý urychlovač je jádrem LAMPFu (Los Alamos Meson Physics Facility). Lineární urychlovače se často používají jako injektory pro kruhové urychlovače. Tisíce lineárních urychlovačů se používá v nemocnicích pro radioterapii nádorů.

3.1.2. Kruhové urychlovače

Kruhové urychlovače využívají magnetické pole pro zakřivení dráhy částice. První kruhový urychlovač sestrojil r. 1931 Lawrence a nazval jej cyklotronem. V Evropě byl první cyklotron

sestrojen v Paříži v roce 1938. **Cyklotron** má poměrně jednoduchou konstrukci. Je tvořen vakuovou komorou cylindrického tvaru, v jejímž středu se nachází iontový zdroj, z něhož jsou emitovány částice pro urychlení. Schéma je znázorněno na obr. 35. Částice se pohybují po spirálovité dráze



Obr. 35. Schéma cyklotronu. Uvnitř cylindrické komory (není znázorněna) se nachází iontový zdroj, který produkuje částice, a půlkruhové elektrody - duanty (červeně), na které je přivedeno vysokofrekvenční urychlovací napětí (červená krabice).

(černá čára uvnitř červených duant) a jejich rychlost se zvyšuje průletem mezi duantami (červeně), což jsou elektrody s vysokofrekvenčním napětím (červená krabice), které je ovšem uvnitř duantu odstíněno a nepůsobí nijak na částice. Používá se konstantní magnetické pole o indukci \mathbf{B} , jež směřuje kolmo na dráhu částice (nástavce magnetu jsou znázorněny šedě). Po dosažení okraje urychlovací komory je rychlost částice největší a její dráha je odkloněna tzv. deflektorem do výstupního kanálu, který vede k terčičku. Pro cyklotron lze napsat jednoduché rovnice, které vysvětlí jeho funkci. Částice jsou přitahovány střídavě k jedné a druhé elektrodě, na níž se pravidelně mění napětí. Aby stále docházelo k urychlování, musí částice se Z elementárními náboji obíhat se stejnou úhlovou rychlostí ve všech fázích urychlovacího procesu. Síla (\mathbf{F}), která na částici působí je rovna

$$\mathbf{F} = e \cdot (\mathbf{v} \times \mathbf{B}), \quad (1)$$

kde \mathbf{v} je vektor rychlosti částice, \mathbf{B} je vektor magnetické indukce a e je elementární náboj. Tato síla se musí rovnat odstředivé síle

$$\mathbf{F} = m \cdot \mathbf{a}, \quad (2)$$

kde m je hmotnost částice a \mathbf{a} je vektor zrychlení a lze je

napsat jako součin poloměru r , čtverce úhlové rychlosti ω^2 a jednotkového vektoru v radiálním směru. V cyklotronech je magnetické pole kolmé na pohyb částice a lze tedy psát: $m \cdot v \cdot \omega = e \cdot v \cdot B$, protože $v = r \cdot \omega$. Po zkrácení v dostaneme:

$$\omega = eB/m. \quad (3)$$

Vidíme, že úhlová rychlost je tedy konstantní a nezávisí na poloměru nebo na rychlosti částice. Pro maximální rychlost dostaneme při poloměru urychlovače R :

$$v_{\max} = R \cdot e \cdot B / m. \quad (4)$$

Výstupní rychlost a tedy i energie roste s poloměrem urychlovače a s intenzitou magnetického pole.



Obr. 36. Cyklotron v Upsale (Švédsko) byl postaven po válce (1950) a urychluje protony na energii 185 MeV. Vakuová komora je vidět pod magnetem (žlutý) vážícím 600 tun. Výstupní kanály směřují dopředu. Urychlovač byl v roce 1986 přestavěn na cyklotron se sektorovou fokusací.

3.1.2.1. Synchrociklotron

Funkce cyklotronu má své omezení zejména v tom, že hmotnost částice závisí na její rychlosti dle relativistického vztahu $m = m_0 \sqrt{1/(1-\beta^2)}$, kde $\beta = v/c$ a c je rychlost světla ve vakuu. Pro $v \rightarrow c$ dostaneme $m \rightarrow \infty$. Proto rovnice (3) platí pouze pro nižší rychlosti. Tento problém lze řešit snížením frekvence elektrického pole přiváděného na duanty v průběhu každého urychlovacího cyklu (V.I. Veksler a E.M.McMillan, 1944). Takovému urychlovači se pak říká *synchrociklotron*. Pro ilustraci je na obr. 36 uveden synchrociklotron v Upsale (Švédsko). Je zřejmé, že takový přístroj nemůže pracovat spojitě, neboť snižováním frekvence lze vyhovět podmínce (3) jen pro ionty, které vstoupily do komory současně. Proto dostáváme na výstupu synchrociklotronu shluky iontů s maximální energií. Přitom nezáleží příliš na tom, jak rychle se frekvence mění. Platí zde totiž princip fázové stability,

kteřý vede k tomu, že opožděné ionty dohánějí urychlovaný shluk a ionty s předstihem se urychlují

méně. Největší synchrocyclotron se nachází v Gatčíně nedaleko Petrohradu a urychluje protony na 1 GeV. Železné póly magnetu mají v průměru 6 m, celý urychlovač váží 10 000 tun. Používá se pro experimenty v oblasti jaderné fyziky a pro medicínské aplikace.

3.1.2.2. Isochronní cyklotron

Druhá možnost jak kompenzovat přírůstek hmotnosti při rostoucí rychlosti je zesílení intenzity magnetického pole pro větší poloměr dráhy. To však vede k rozostření (defokusaci) svazku v horizontálním směru. V roce 1960 se objevil nový princip fokusace částic, který spočívá v modulaci magnetického pole v úhlovém směru vložení železných sektorů do mezery v nastavcích magnetu. Tento druh cyklotronu se nazývá *isochronní cyklotron*, protože frekvence urychlovacího pole je zde konstantní. V současné době je v provozu řada těchto zařízení, která nahradila synchrocyclotrony a mohou urychlovat prakticky libovolný typ iontů (např. cyklotron v Bloomingtonu, Indiana; v Faure, Jižní Afrika; v Osace, Japonsko; ve Vancouveru, Kanada). Cyklotrony se používají pro výzkum v oblasti jaderné fyziky, pro výrobu radionuklidů v medicíně i průmyslu. Jedním způsobem využití izotopů je pozitronová emisní tomografie (PET).

3.1.2.3. Mikrotron a betatron

Cyklotron může v principu urychlovat také elektrony, avšak relativistický nárůst jejich hmotnosti vede k tomu, že podmínka (3) přestává být splněná už pro malé energie. Variantou cyklotronu určenou pro elektrony je *mikrotron*, v němž je urychlovací štěrbinou umístěná na okraj dráhy elektronů. Urychlení elektronů při jednom průchodu štěrbinou se volí tak, aby se doba oběhu v kolmém magnetickém poli prodloužila o celý násobek urychlovací frekvence.

Pro dosažení energie elektronů v řádu desítek až stovek MeV se používá *betatron*. V betatronu jsou elektrony urychlovány změnou toku magnetické indukce podle Faradayova zákona. Elektrony obíhají ve vakuové kruhové trubici a jejich dráha se zakřivuje stejným magnetickým polem, kterým jsou i urychlovány. Pro dosažení stability je nutné, aby magnetická indukce uvnitř dráhy byla silnější než na jejím obvodu. V betatronech lze dosáhnout energie elektronů až stovek MeV. Při vyšších energiích dochází ke ztrátám způsobeným brzdícím zářením.

3.1.2.4. Synchrotrony se slabou fokusací

V principu neexistuje limit pro maximální energii isochronního cyklotronu. Konstrukce velkého magnetu je však velmi nákladná. Proto se pro nejvyšší energie používá trubice s rovnými úseky, které jsou sestaveny do kruhu a v jejichž spojích se svazek ohýbá ze směru jednoho úseku do směru dalšího úseku pomocí elektromagnetu v němž se v průběhu urychlovacího cyklu zvětšuje intenzita magnetického pole. Problémem kruhových urychlovačů jsou značné příčné kmity částic. Proto je nutné potlačit tyto kmity. První *synchrotrony* řešily tento problém tzv. *slabou fokusací*, tj. vytvořením gradientu pole směrem od středu k okraji. Takovým přístrojem byl Cosmotron v Brookhavenu postavený v roce 1952 (urychloval protony na 3 GeV), Bevatron v Lawrence Berkeley Laboratory, USA (6 GeV), synchrofazotron v Dubně, Rusko (10 GeV). V těchto urychlovačích se pole mění z 0.02 T (tesla) až do 1.5 T pro maximální energii. Doba cyklu činí méně než sekundu a počet částic v pulsu je 10^{11} . Synchrotrony se slabou fokusací musely mít dostatečně velkou trubici s ohledem na kmity částic. Synchrotron v Dubně je poslední ještě fungující s poloměrem 28 m a váhou magnetu 36 tis. tun.

3.1.2.5. Synchrotrony se silnou fokusací

V roce 1952 E.D.Courant, M.S.Livingston a H.S.Snyder navrhli princip *silné fokusace*. V magnetech, které ohýbají svazek se střídá orientace radiálního gradientu, což vede při vhodné konstrukci k zaostření svazku do další trubice. Díky silné fokusaci lze použít při stejných výstupních energiích a intenzitách podstatně menší trubice i magnety. První synchrotron se silnou fokusací byl postaven v roce 1954 na Cornelově universitě, Ithaca, USA. Pro počáteční urychlení

byl použit van de Graaffův urychlovač na 2 MeV. Po vstříknutí částic do synchrotronu byla síla pole 0.002 T, urychlení probíhalo za 0.01 sekundy a výsledná intenzita pole byla 1.35 T. V roce 1958 byl v Bonnu uveden do provozu první elektronový synchrotron na energii 500 MeV. Další elektronové synchrotrony byly postaveny v Hamburgu (6 GeV), Cambridge (6 GeV) a v Tokiu (1.3 GeV). Doposud se používají protonové synchrotrony v Ženevě (CERN - evropská organizace pro jaderný výzkum, 28 GeV) a v Brookhavenu (33 GeV), které byly postaveny záhy po objevení principu silné fokuse.



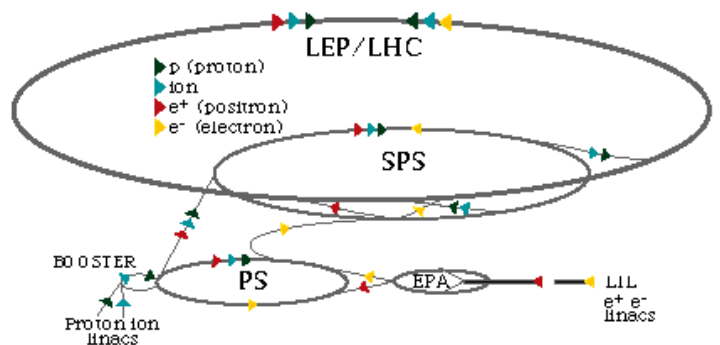
Obr. 37. Protonový synchrotron v CERNu urychluje částice na 450 GeV. Ohýbající magnety jsou červené, fokusující modré.

V dalším vývoji došlo k *oddělení magnetů ohýbajících svazek a magnetů (kvadrupolových čoček) určených pro fokusaci svazku* obr. 37. Tyto čočky "zaostří" svazek částic do středu urychlovací trubice neohledě na energii částic (obr. 38). Jeden z největších urychlovacích komplexů na světě se nachází ve Švýcarsku, blízko Ženevy (obr. 39), kde má laboratoř CERN. Tato laboratoř je příkladem mezinárodní spolupráce, na které se účastní 20 členských zemí. Zkoumá se zde stavba hmoty a její silové působení.



Obr. 38 Kvadrupolové čočky slouží k udržení svazku uvnitř urychlovací trubice (žlutě).

Zvýšení intenzity magnetického pole lze dosáhnout použitím *supravodivé technologie*. Supravodivé



Obr. 39 Schéma urychlovacího komplexu v CERNu (Ženeva). Prvním urychlovačem byl synchrocyclotron postavený v roce 1954, paralelně s protonovým synchrotronem (PS). Tento urychlovač v současné době zásobuje ostatní zařízení částicemi.

magnety byly použity v několika malých "kompaktních" cyklotronech (East Lansing, USA). Pole těchto urychlovačů činí 5 T a poloměr magnetů 1.5-2 m. Maximální energie iontů činí 160 MeV. Pro velké urychlovače byly supravodivé magnety použity poprvé ve Fermiho laboratoři (Fermilab) u Chicaga. Tevatron - jak se urychlovač nazývá - urychluje protony na 1 TeV. Supravodivé magnety produkují pole až 5 T (obr. 40).



Obr. 40. Tevatron ve Fermilabu. Injektor je vpředu (3.2 km obvod) a produkuje částice s energií 150 GeV. Tyto částice jsou injikovány do Tevatronu - supravodivého protonového synchrotronu, který je schopen urychlovat protony a v opačném směru antiprotony (tzv. collider).

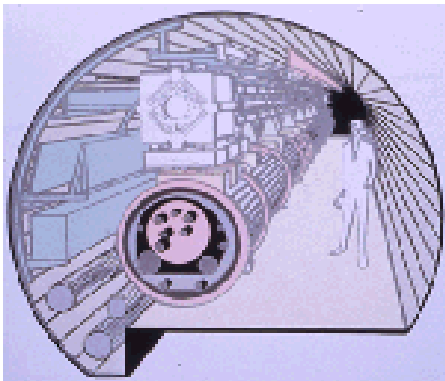


Obr. 41. V roce 1970 byla započata konstrukce protonového supersynchrotronu s poloměrem 6 km. Za výsledky získané na tomto urychlovači byla udělena Nobelova cena.

Komplex urychlovačů v CERNu zahrnuje tzv. protonový supersynchrotron, který je kruhovým zařízením o průměru 6 km a je umístěn pod zemí (obr. 41). Toto zařízení urychluje protony a v poslední době také antiprotony v opačném směru. Slouží tak jako proton-antiproton „collider“. Na tomto urychlovači byly objeveny částice W a Z, které jsou nositeli slabé interakce. Lze zde rovněž urychlovat ionty olova na energii 170 GeV/nukleon. To je největší energie dosažená ve světě. Pro urychlování elektronů slouží LEP s tunelem dlouhým 27 km. Vnitřek tunelu je na obr. 42. Tento urychlovač



Obr. 42 Největším urychlovačem je LEP (large electron-positron collider), jenž má obvod 27 km a jeho komora je umístěna 100 m pod zemí. Na obrázku je vnitřek komory.



Obr. 43 LHC (large hadron collider) – umožní sledovat kolise proton-proton při energiích 7 TeV. Pole supravodivých magnetů bude mít intenzitu 8.3 T při teplotě 1.9 K. Chlazení bude zajištěno supratekutým héliem pro 30 tis tun materiálu na vzdálenost 27 km. Provoz má být zahájen v roce 2006.

však bude nahrazen novým zařízením vyvinutým na bázi supravodivých magnetů pro zakřivení dráhy částic (obr. 43) a nazvaným LHC (large hadron collider).

3.2. Jaderná energie

3.2.1. Jaderné zbraně

Koncem 30-tých let minulého století si mnozí vědci uvědomovali možnost řetězové jaderné reakce, při které se uvolní obrovská energie. V této době byl v Německu u moci Hitler a vědělo se, že němečtí vědci provádějí experimenty s cílem vyrobit *jadernou bombu*. Na popud maďarského fyzika E. Tellera napsal proto A. Einstein dopis F.D. Roosveltovi, americkému prezidentovi, v němž ho upozorňuje na možnost vývoje mimořádně silné zbraně. Rozhodnutí o projektu „Manhattan“ bylo přijato v prosinci 1941, kdy pod vedením R. Oppenheimera začal v Los Alamos vývoj atomové bomby. Za účelem konstrukce bomby byly postaveny továrny na výrobu uranu ^{235}U (Oak Ridge) a uvedeny do provozu v září 1944. Cílem projektu Manhattan bylo vyrobit atomovou bombu dříve než Němci. Že byl tento projekt úspěšný bylo prodemonstrováno 16. července 1945 v poušti Nového Mexika s názvem Trinity, jihovýchodně od Los Alamos (obr. 44). President Truman se právě účastnil konference v Postupimi. Večer druhého dne konference mu byla telegraficky zaslána zpráva o úspěšném testu. Atomová bomba byla ke konci 2. světové války použita dvakrát, v Hirošimě (6.8.1945) a v Nagasaki (9.8.1945).



Obr. 44 Pozemní atomový výbuch je provázen vznikem typického hříbu.



Obr. 45. Při podzemním výbuchu vzniká hlouben kráter o průměru 622 m a hloubce 322 m.

3.2.2. Termojaderné zbraně

Po válce došlo k rozpoutání „studené války“, tj. závodů ve zbrojení. Rusové vyzkoušeli atomovou bombu již v roce 1949. Informace pro její konstrukci získali od špiona K. Fuchse. To vedlo vládu USA k pevnému rozhodnutí vyvinout silnější vodíkovou bombu, tzv. H-bombu. Ta byla poprvé vyzkoušena v říjnu 1952 na Marshalových ostrovech.

Po válce začal také výzkum možností mírového využití atomové energie. Mluví se o dolování, přetváření Země, budování přístavů, „kopání“ kanálů nebo tunelů, atd. V Nevadě byl proveden test s podzemním výbuchem v hloubce kolem 200 m. Bomba měla sílu 100 ktun, byla odpálena 6. července 1962 a v důsledku jejího výbuchu vznikl kráter průměrem 400 m a hluboký 100 m (obr. 45). V té době vznikaly plány na rozšíření Panamského průplavu. S časem se však ukázalo, že problémy s kontaminací jsou nepřekonatelné.

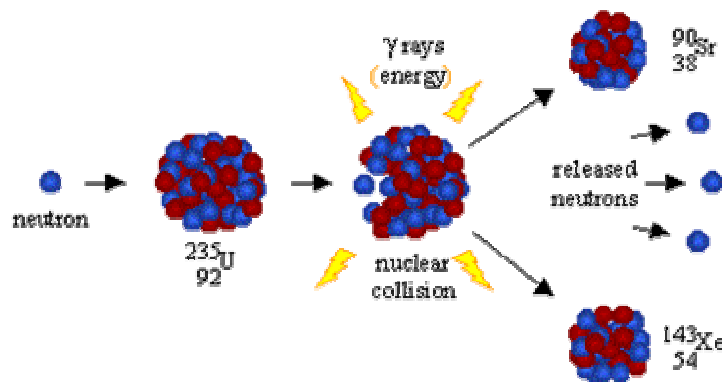
3.2.3. Jaderné reaktory a jaderné elektrárny

Využití atomové energie pro výrobu elektřiny začalo také hned po válce. Už v roce 1951 byl v Idahu sestaven *experimentální reaktor*, který zásoboval elektřinou 4 žárovky o výkonu

150 W. První reaktor, který produkoval dostatek energie pro celé město (BORAX III) byl vyvinut v Aragonské národní laboratoři v Chicagu a spuštěn do provozu v roce 1955.

3.2.3.1. Palivový cyklus

Palivový cyklus je obecně známý pojem pro kroky potřebné k tomu, aby se přeměnila syrová uranová ruda na jaderné palivo. Uran je poměrně hojný prvek v zemské kůře. Existuje několik typů uranové rudy: uranit, gummit, carnotit, uranofan (USA, ČR, Zaire). Obsah uranu se liší dosti podstatně od 0.05% až do 12%. V těchto rudách tedy uran není koncentrován, a proto je potřeba těžít dosti velký objem horniny. Ten činil v roce 1997 celkově 35 tis. tun, z toho nejvíce v Kanadě (12 tis. tun). Uran se těží několika způsoby podle uložení (povrchová těžba, doly). Po vytěžení se uranová ruda mele, přidá se louh, který rozpustí uran. Výsledná kapalina se dále zpracovává tak, aby se uran koncentroval a extrahoval. Přírodní uran sestává z 99.28% ^{238}U a pouze 0.71% ^{235}U . Vzhledem k tomu, že se ^{238}U jednoduše neštěpí, je nutné přírodní uran obohatit o ^{235}U . Obohacení lze provést např. tak, že se nechá plyn UF_6 difundovat přes membrány s malými otvory, kde těžší isotop uranu difunduje trochu pomaleji. Obohacený uran se konvertuje na UO_2 , který se vkládá do zirkoniových trubic.

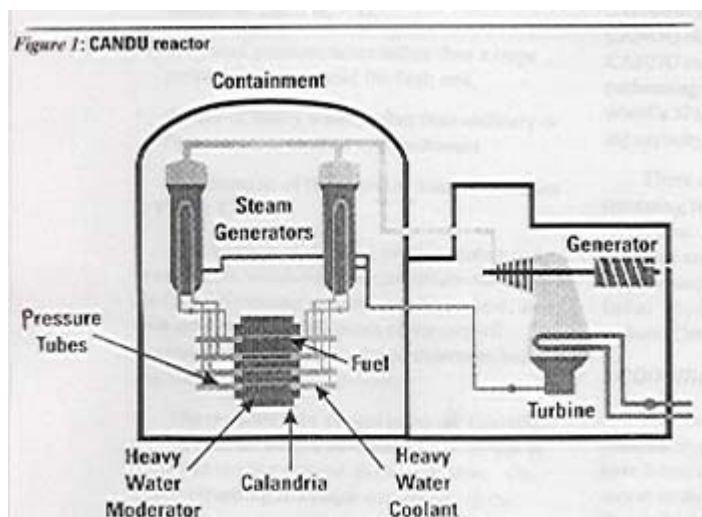


Obr. 46 Štěpení jádra uranu na dva fragmenty a několik dalších neutronů.

3.2.3.2. Štěpná reakce

Je to jaderná reakce, při které je neutron absorbován jádrem ^{235}U , ^{233}U nebo ^{239}Pu načež dojde spontánně k rozštěpení vzniklého jádra na dva fragmenty a uvolní se několik dalších neutronů (obr. 46). U uvedených isotopů je vazebná energie jádra tak malá, že po zachycení neutronu jádro není stabilní a rozpadá se. Štěpení zde probíhá nezávisle na kinetické energii neutronu a má velkou pravděpodobnost ve srovnání

s absorpcí. U isotopu ^{238}U schází pro rozštěpení energie zhruba 1 MeV, a proto lze štěpení dosáhnout při energii neutronu nad 1 MeV. Štěpení je statistický proces, při kterém jak atomové číslo, tak hmotnost nabývají různých hodnot kolem střední hodnoty, která činí zhruba 95 pro lehčí fragment a 135 pro těžší. Také počet neutronů se může lišit od nuly do 6 i více a jejich kinetická energie se pohybuje od 0.5 MeV do více než 4 MeV (nejpravděpodobnější je energie 0.75 MeV, průměr činí 2 MeV). Uvolněná energie činí zhruba 180 MeV a dělí se mezi fragmenty (165 MeV), γ -záření (7 MeV), energii neutronů (5 MeV) a dále

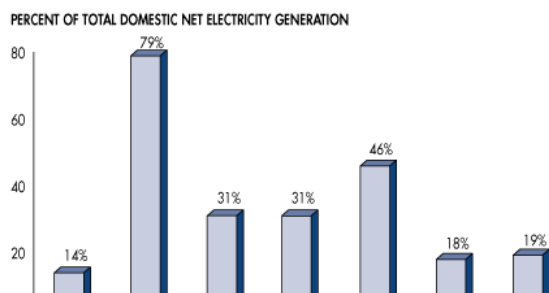
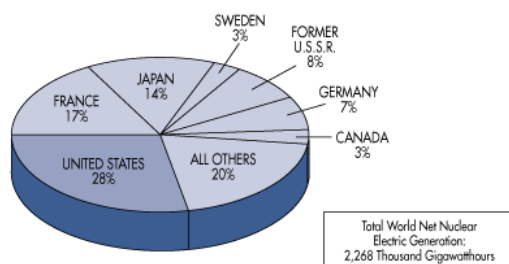


Obr. 47. Principiální schéma jaderné elektrárny. „Kontejnment“ je nádoba, v níž se nachází reaktor s parními generátory. V reaktoru se nachází palivo, moderátor a regulační tyče. Teplo vznikající při štěpení paliva ohřívá vodu, která pohání turbíny.

α -částice, neutrino atd. Neutrony vzniklé po štěpení je potřeba zpomalit, aby se zvýšil účinný průřez pro další štěpení. Pro vyvolání řetězové reakce musí z uvolněných neutronů více než jeden způsobit další štěpení. Toho lze dosáhnout při dostatečně hmotnosti (kritické hmotnosti) štěpného materiálu. Ta činí 16 kg pro ^{233}U , 52 kg pro ^{235}U a 10 kg pro ^{239}Pu .

3.2.3.3. Jaderný reaktor

Jaderný reaktor sestává z reaktorové nádoby, v níž jsou umístěny palivové tyče s uranem obohaceným o ^{235}U tak, aby vytvářely nadkritickou soustavu (obr. 47). Mezi nimi je umístěn moderátor, který zpomaluje neutrony a regulační tyče, které nedovolují rozběhnutí řetězové reakce. Regulační tyče obsahují materiál, který dobře absorbuje neutrony jako je kadmium nebo bór. Materiálem vhodným pro zpomalování neutronů může být grafit, lehká nebo těžká voda. Voda může zároveň sloužit pro chlazení reaktoru. Povytažením tyčí dojde ke spuštění reakce a voda se začne ohřívat. Nádoba je většinou pod tlakem a přehřátá kapalina je vedena k turbínám, kde se tepelná energie mění na elektrickou. To je ve zkratce princip jaderné elektrárny. Existují jaderné elektrárny různých typů. Nejčastěji se setkáváme s tzv. lehkovodním reaktorem, tj. reaktorem chlazeným vodou a to buď vodou zahřátou na bod varu (tzv. BWR neboli boiling water reactor čili varný reaktor) nebo párou pod vysokým tlakem (PWR neboli pressurized water reactor čili tlakovodní reaktor). Voda slouží zároveň jako moderátor neutronů. První druh reaktoru je levnější, neboť je často jednookruhový, tj. voda přímo žene turbíny, ale nákladnější za provozu, protože voda na turbínách je kontaminovaná. Druhý systém vyžaduje tlakové potrubí, jehož problémem je těsnost a to za poměrně



Obr. 48. Podíl některých zemí na celosvětové produkci jaderné energie. Je zřejmé, že nejvíce jaderné energie vyprodukuje USA, pak Francie a na třetím místě je Japonsko. V histogramu dole je vidět jaké procento celkové produkce energie činí v dané zemi jaderná energie.

okruhu, parogenerátory, systémy chlazení a čištění, systémy transportu a manipulace s jaderným palivem. Patří zde všechna zařízení, ve kterých se mohou vyskytovat radioaktivní látky a kde poškození těsnosti by mohlo vést k úniku těchto látek do okolí. Většina těchto zařízení je umístěna uvnitř hermetické obálky (kontejmentu), který je vyroben z předpjatého betonu s vnitřní ocelovou výstelkou, která má tloušťku 8 mm a má dvě základní funkce:

nepříznivých podmínek. Časem mohou vznikat praskliny potrubí na čemž má podíl silná radiace. Dále existují tzv. rychlé reaktory, ve kterých jsou neutrony produkované při jaderné reakci využity pro vytváření dalšího paliva a to zejména reakcí s ^{238}U , kdy transmutací vzniká ^{239}Pu . U těchto reaktorů je jádro tvořeno ^{235}U a kolem tohoto jádra je rozmístěn ^{238}U ; nepoužívá se moderátor.

Jaderná energie se v současné době ve světě široce využívá. Celkový podíl na světové produkci energie je znázorněn v grafu (obr. 48). Nejvíce jaderné energie je vyrobeno v USA. Největší podíl má jaderná energie na celkové energetické produkci ve Francii (obr. 48).

3.2.3.4. Jaderná energetika v České republice

V České republice existují dvě jaderné elektrárny: Dukovany nedaleko Brna a Temelín. Uspořádání jaderné elektrárny v Temelíně (JETE) je následující. Jaderná elektrárna je rozdělena do tří oddělených okruhů. Primárního, to je jaderný reaktor, hlavní cirkulační čerpadla, potrubí primárního

chránit okolí elektrárny před následky případné provozní havárie a naopak zase chránit vnitřní zařízení před vnějšími vlivy (pád letadla). Těto úloze odpovídá mohutná železobetonová konstrukce kontejmentu, vysoká 56 m o vnitřním průměru 45 m. Shora vše uzavírá kulový vrchlík. Stěny jsou silné 1,2 m a jsou vyplněny potrubím z umělé hmoty, kterým jsou protažena ocelová lana, předeprnutá na 1000 tun. Sekundární okruh tvoří systémy parního potrubí přivádějící páru z parogenerátoru o teplotě 278,5 °C a tlaku 6,3 MPa, systémy úpravy napájecí vody, turbosoustrojí a systémy přepouštěcích stanic. Třetím okruhem se chladí kondenzátory turbín. Z tohoto systému jsou nejviditelnější, a tím i nejkontroverznější, 155 m vysoké chladicí věže, které, ať chceme, či ne, tvoří dominantu elektrárny a z estetického hlediska nejsou zrovna přínosem pro vzhled krajiny. Pro upřesnění: k jednomu výrobnímu bloku (reaktorovna + strojovna s turbínou) přináležejí dvě věže. Každá má patní průměr 130,7 m (fotbalové hřiště má asi 120 m), průměr v koruně 82,6 m, tloušťka stěny je 18 - 90 cm.

3.2.3.5. *Problematika vyhořelého paliva*

Jaderné elektrárny nemají za normálního provozu podstatný vliv na životní prostředí v jejich okolí a produkují velmi čistou energii. Negativní stránkou těchto elektráren je možnost nehody, a také problém s ukládáním vyhořelého paliva. Zhruba každých 18 měsíců je nutno obnovit 1/3 jaderného paliva, které se již částečně vyčerpalo a jaderná reakce se udrží pouze při hodně zvednutých regulačních tyčích. Palivové články se v jaderném reaktoru stanou horké a silně radioaktivní. Pobyť po dobu 10 s ve vzdálenosti 1 m od článku by byl smrtelný. Každá výměna paliva rektoru s výkonem 1000 MW vede k odpadu, jehož váha zhruba činí 30 tun a aktivita 5 mil Ci. Kromě toho, tento odpad produkuje 1.5 MW tepla. Vyhořelé palivo je ukládáno do bazénů, kde zůstává několik měsíců až desítky let. Pak se pravděpodobně bude ukládat do hlubinných úložišť. Množství tohoto odpadu je v současné době jenom v USA 42 tis. tun a doba potřebná na to, aby se jeho aktivita dostala na úroveň původní uranové rudy (tj. přírodního pozadí) bude činit 3 mil. let.

V ČR se řeší problematika jaderného paliva následujícím způsobem. Vláda schválila dne 15. 5. 2002 dokument nazvaný Koncepce nakládání s radioaktivními odpady a vyhořelým jaderným palivem v ČR. Koncepce navrhuje dlouhodobou strategii státu v uvedené oblasti. Koncepce doporučuje pokračovat v dosavadní praxi ukládání nízko a středně aktivních odpadů do stávajících přípovrchových úložišť (Richard u Litoměřic, Bratrství u Jáchymova a Dukovany) provozovaných SÚRAO. Pro vysoceaktivní odpady a vyhořelé jaderné palivo bude podle tohoto vládního dokumentu připravováno hlubinné úložiště, jehož zprovoznění se předpokládá kolem roku 2065. Až do té doby bude vyhořelé palivo z jaderných elektráren skladováno v transportně-skladovacích kontejnerech umístěných v samostatných skladech vybudovaných přímo v areálech obou jaderných elektráren. Koncepce dále říká, že bude dále sledován a podporován rozvoj nových technologií, které by v budoucnosti mohly umožnit využití vyhořelého jaderného paliva například v novém typu jaderných reaktorů. Koncepce připomíná, že veškeré náklady na vyřazování jaderných zařízení a ukládání radioaktivních odpadů nesou provozovatelé těchto zařízení a původci radioaktivních odpadů. Stát prostřednictvím SÚRAO kontroluje a řídí tvorbu zdrojů vytvářených na speciálních vázaných účtech u bank či na jaderném účtu tak, aby byl zajištěn dostatek finančních prostředků na výše uvedené činnosti.

IV. Rozdělení energie deponované zářením na mikroskopické úrovni

4.1. Mikrodosimetrie

4.1.1 Vydělování energie jako diskrétní a nahodilý proces

Elektron s počáteční energií 20 keV ztrácí v první srážce nejčastěji 22 eV, střední ztráta energie je 60 eV. Na obrázku je rozdělení energie při jednom aktu předání energie hmotě (při průchodu tenkou folií).

Depozice energie se může uskutečňovat ve formě jednotlivých ionizací a excitací, které jsou však často korelovány – vznikají shluky neboli klastry ionizací a excitací (anglicky spurs nebo blobs).

Při ozáření buněčné kultury dávkou D nejsou všechny buňky postiženy stejně, neboť dochází ke fluktuacím absorbované energie. Tyto fluktuace vyplývají z kvantové povahy depozice energie. Uvažujme tedy malý objemový element a průchod částic tímto elementem (obr. 49). Necht' n je střední počet částic prošedších tímto elementem. Pak pravděpodobnost, že jím projde právě m částic bude:

$$P(m) = n^m \exp(-n) / m!$$

dle Poissonova rozdělení. Hodnota m bude tedy náhodná veličina.

Pro jednu částici bude počet událostí předání energie rovněž náhodnou veličinou. Při určité hodnotě LPE bude střední počet událostí

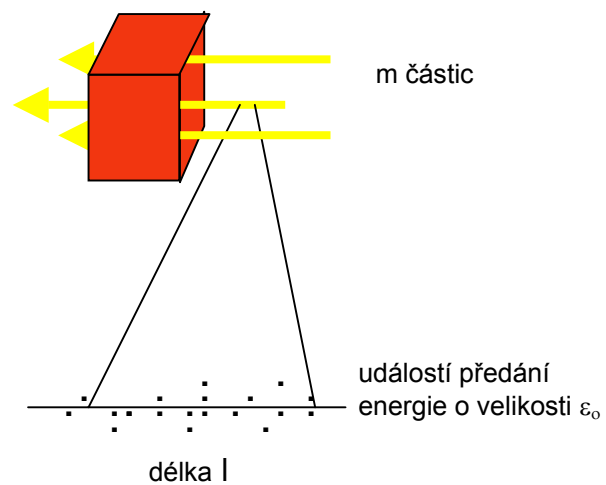
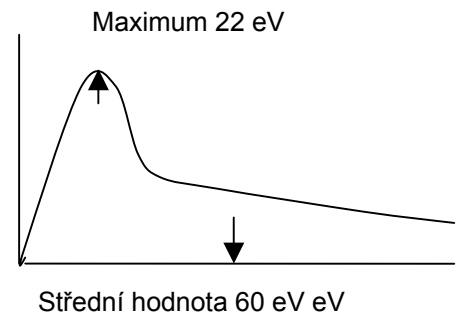
$$v = LPE * l / \epsilon_0$$

avšak přesný počet bude opět fluktuovat kolem střední hodnoty.

4.1.2 Sdělená energie

Při ozáření určitého objemového elementu lze definovat řadu fyzikálních veličin. Probereme nejdůležitější. Sdělená energie: $\epsilon = \sum \epsilon_{in} - \sum \epsilon_{ex} + \sum Q$, kde první člen je součet energií všech částic na vstupu, druhý člen je součet energií částic na výstupu a poslední člen je rozdíl součtů všech energií uvolněných a všech energií spotřebovaných v přeměnách jader (podle Einsteinovy formule).

Jednotlivé lokální události předání energie se označují jako „energy deposition events“, česky budeme říkat *události (akty) předání energie*. Každá taková událost však může sestávat z více interakcí, tj z více ionizací nebo excitací. Ionizace a excitace jsou v aktech předání energie korelovány, tj vznikají blízko sebe v klastrech. Po ozáření pracujeme tedy v mikroobjemech s počáteční distribucí ionizací a excitací – u každé máme souřadnice a velikost předané energie. Pro jednu částici se tato distribuce označuje stopa částice (angl. „track“).



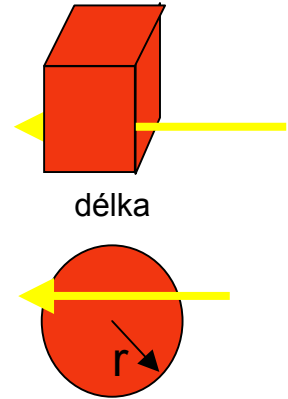
Obr. 49. Elementární objem, přes který prochází částice, v expandované části je znázorněna struktura stopy částice.

4.1.3 Lineární energie

Je definována jako $y = \varepsilon/l_{AV}$, kde ε je energie sdělená v jednom průchodu částice mikroobjemu ΔV , l_{AV} je střední délka tohoto mikroobjemu. Tato veličina je mikroskopickým analogem LPE – je to energie na jednotku délky. Pokud je LPE konstantní podél mikroobjemu, pak bude platit, že

$$\varepsilon = LPE \cdot l$$

bude pro všechny události stejná. Pokud ovšem bude mít mikroobjem nepravidelný tvar, pak dostaneme distribuci hodnot ε , která bude odpovídat distribuci délek tzv. *chord*. Pro sféru dostaneme tuto distribuci ve tvaru: $f(l) = 1/(2 \cdot r^2)$.



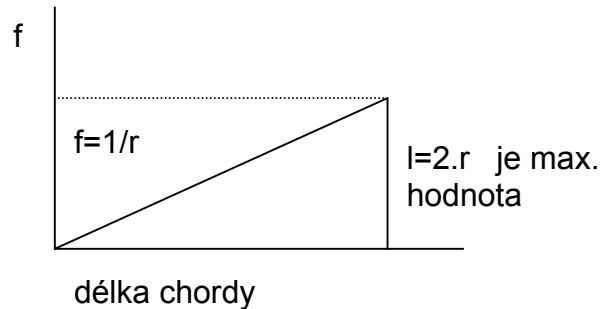
4.1.4 Distribuce lineární energie v kouli pro hustě ionizující částice

Distribuce chord pro kouli je tedy popsána trojúhelníkem: Distribuce délek je: $f(l) = 1/(2 \cdot r^2)$, kde platí že $y = \varepsilon/l_{AV} = LPE \cdot l/l_{AV}$. Dosazením dostaneme: $f(l) \cdot dl = y/LPE \cdot l_{AV}/(2r^2) \cdot dl = f(y) \cdot dy$, kde pro kouli platí $l_{AV} = 4/3 \cdot r$ a $dy = LPE \cdot dl/l_{AV}$. Z toho plyne:

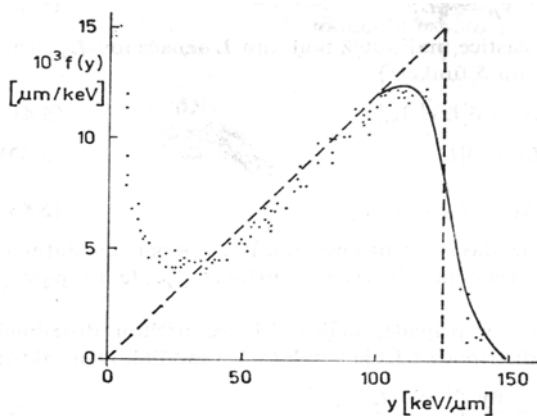
$$f(y) = 8/9 \cdot y/LPE^2$$

Toto je frekvenční distribuce y ; dávková distribuce udávající rozdělení dávky na frakce s lineární energií y bude:

$$d(y) = y \cdot f(y) / y_F$$

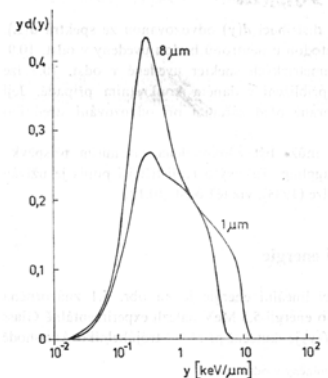


Na obr.50 a 51 jsou zobrazeny distribuce lineární energie v kouli pro těžké částice (α -záření) a pro řídké ionizující záření (γ -záření).



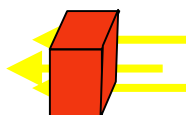
Obr. 50. Experimentální distribuce lineární energie v kouli pro hustě ionizující částice. Tato distribuce byla změřena pro částice alfa s energií 5,3 MeV. Čárkovaně je znázorněna teoretická trojúhelníková distribuce. Experimentální body jsou vyznačeny tečkami. Plná čára znázorňuje vliv stragglingu.

Obr. 51. Dávková distribuce lineární energie v kouli pro γ záření. Distribuce $d(y)$ pro záření γ - ^{60}Co pro sféru s průměrem 1 μm , resp. 8 μm (vyšší křivka).



4.1.5 Specifická energie

Definice: $z = \epsilon/m$, kde ϵ je sdělená energie a m je hmotnost mikroobjemu. Jednotkou je J/kg, název Gray. Pro specifickou energii platí, že (1) z je definována pouze pro konečné oblasti (mikroobjemy), hodnoty se mění nespojitě v čase a prostoru, nelze ji tedy připsat rychlost změny, (2) z nelze předpovědět, pravděpodobnost určité hodnoty však určit lze. Zatímco lineární energie se vztahuje k jednomu průchodu částice, specifická energie se vztahuje k dávce D . Pro některé účely je však vhodné zavést také specifickou energii pro jeden průchod částice. Pak bude platit:



X"qdlgo wxgrknquk"X"
c'j o qppquk'o "h' g"
ucpqxkv"gpgti kk' "

$$z = l_{av} \cdot y/m$$

Pro kouli dostaneme: $z = a \cdot y / (2r)^2$, kde $a = 0.2$ pro keV, μm a Gy.

4.1.5.1. Frekvenční a dávková distribuce specifické energie při jednom průchodu částice mikroobjemem

Uvažujme nejprve jeden průchod částice mikroobjemem V . Pak rozdělení spec. energie z budeme označovat $f_1(z)$. Pro kouli platí, že $f_1(z) = 2 \cdot z / a^2$, kde a je maximální z pro průchod částice středem koule, tj. $a = LPE \cdot 2r$. Známe-li funkci $f_1(z)$, můžeme spočítat střední hodnotu z jako:

$$z_F = \int z \cdot f_1(z) \cdot dz$$

Pro distribuci frakce dávky $d_1(z)$ s jednorůchodovou spec. energií z platí:

$$d_1(z) = z \cdot f_1(z) / z_F$$

a střední hodnota:

$$z_D = \int z \cdot d_1(z) \cdot dz = 1/z_F \cdot \int z^2 f_1(z) \cdot dz$$

Střední hodnoty jsou pro některé druhy záření uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Střední hodnoty spekter specifické (měrné) energie pro jeden průchod částice a pro různé sféry a různé druhy záření

Záření	d μm	\bar{z}_F mGy	\bar{z}_D čili ζ mGy	V_z
gama (^{60}Co)	1	83,30	353	3,24
	2	17,20	60	2,49
	3	7,69	21	1,73
	4	4,35	10	1,30
	5	2,78	7	1,52
neutrony (0,43 MeV)	1	12 500	14 500	0,16
	2	2 560	2 630	0,03
	3	909	1 000	0,10
	4	426	476	0,12
	5	238	305	0,28
neutrony (14,7 MeV)	1	2 630	21 000	6,98
	2	625	4 760	6,62
	3	270	1 900	6,04
	4	143	1 080	6,55
	5	91	690	6,58

4.1.5.2. Distribuce specifické energie $f(z,D)$

Funcke $f(z,D)$ popisuje fluktuace energie v mikroobjemech při dávce D . Tyto fluktuace budou tím větší, čím:

- a) bude menší dávka - pro malé dávky bude $f(z,D)$ blízká $f_1(z)$; s rostoucí dávkou nabývají distribuce $f(z,D)$ Gaussova rozdělení se střední hodnotou blízkou dávce D
- b) pro velké LPE jsou fluktuace větší a naopak
- c) s rostoucím průměrem mikroobjemu se $f(z,D)$ přibližuje normálnímu rozdělení se střední hodnotou D

Vztah mezi $f_1(z)$ a $f(z,D)$

Nechť $f_n(z)$ je rozdělení spec. energie z při n -aktech (průchodech částice) přes mikroobjem. Pak lze psát:

$$f(z,D) = \sum h(n) \cdot f_n(z),$$

kde $h(n)$ je Poissonovo rozdělení (vzhledem k nezávislosti částic na sobě).

Poissonovo rozdělení při střední hodnotě počtu částic $m = \sigma \cdot F$, (průřez krát fluence) lze psát ve tvaru:

$$h(n) = \exp(-m) \frac{m^n}{n!}.$$

Funkce $f_n(z)$ lze vypočítat z funkce $f_1(z)$ pomocí konvolučních integrálů:

$$f_n(z) = \int f_1(w) \cdot f_{n-1}(z-w) \cdot dw$$

Zapíše se také: $f_n(z) = f_1(z) * f_{n-1}(z)$.

Pro velmi malou dávku bude:

$$\begin{aligned} f(z,D) &= \exp(-m) \cdot (f_0(z) + m/1! \cdot f_1(z) + m^2/2! \cdot f_2(z) + \dots) \\ &= (1-m) \cdot f_0(z) + m \cdot f_1(z) \end{aligned}$$

Z tohoto vztahu je zřejmé, co nutno dosadit za funkci:

$$f_0(z) = \delta(z),$$

je Diraková delta funkce: $\delta=0$ pro $z \neq 0$ a integrál $\int \delta(z) \cdot dz = 1$.

Pro výpočet $f_m(z)$ se použije Laplaceovy transformace. Nalezneme nejprve obraz funkce $f_1(z)$:

$$H_3^* \cdot r^+ \cdot ? \cdot H_3^* \cdot | + 0/r^0 \cdot | \cdot \Gamma |$$

Tato funkce se dá pro sféru napsat jako:

$$H_3^* \cdot r^+ \cdot ? \cdot H_3^* \cdot | + 0/r^0 \cdot | \cdot \Gamma | \cdot ? \cdot 4 \cdot k^4 \cdot 0/c \cdot r^0 \cdot g/r^c \cdot - \cdot 3 \cdot r^4 \cdot 0^3/g/r^c \cdot + \cdot "$$

kde $p = x + i \cdot y$ je komplexní proměnná. Podle Laplaceovy teorie se m -násobná konvoluce dá zapsat jako m -tá mocnina Laplaceova obrazu, tj.:

$$H_0^* \cdot r^+ \cdot ? \cdot H_3^* \cdot r^+ \cdot 0 "$$

Abychom našli funkci $f_m(z)$, musíme tedy spočítat zpětnou transformaci m-té mocniny funkce $F_1(p)$:

$$h_0^{-1} \int_0^w \int_0^x f(r) r^{m-1} dr dx$$

Tento integrál lze upravit na:

$$h_0^{-1} \int_0^w \int_0^x f(r) r^{m-1} dr dx$$

kde w a x lze vybrat tak, aby byl výpočet dostatečně přesný: $w=20/(m-1)$, $x=1/m$.

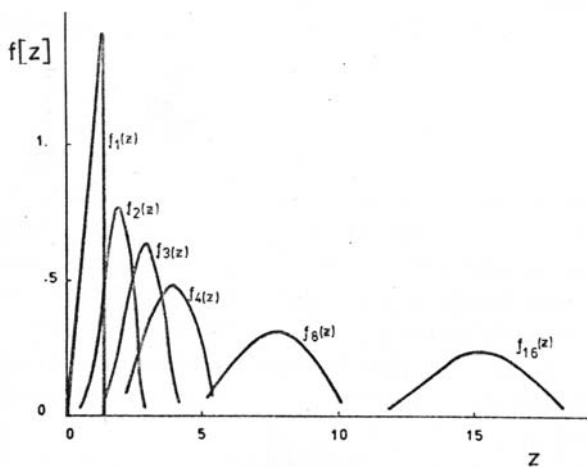
Lze ukázat, že funkce $f(z,D)$ má důležitou vlastnost:

$$f(z,D) = 1 \text{ s přesností } 1\%$$

kteřá umožňuje tabelovat funkce $f_m(z)$ pro $a=\sqrt{2}$. V paměti počítače lze např. uchovat hodnoty $f_m(z)$ pro $z_i=z_1, z_2, \dots, z_{30}$ při $m=2, 3, \dots, 500$ v rozmezí hodnot z_{\min} až z_{\max} , kde $z_{\min}=(0.57-0.74/m).m. \sqrt{2}$, $z_{\max}=(0.75+0.5/\sqrt{2}).m. \sqrt{2}$ (empiricky zjištěné hodnoty). Takto spočtená funkce $f(z,D)$ dává:

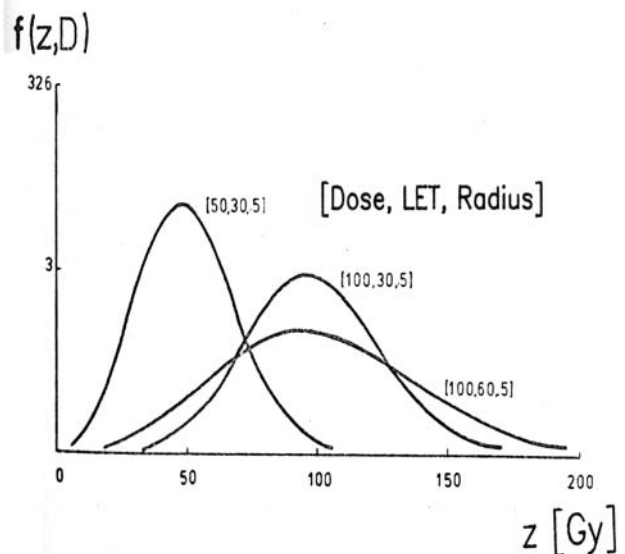
$$f(z,D) = 1 \text{ s přesností } 1\%$$

Příklady výpočtu $f(z,D)$ následují na obr. 52-53.



Obr. 53. Závislost tvaru $f(z,D)$ na hodnotách dávky, $LPE=LET$ a poloměru koule (čísla v závorkách). Pro větší dávku se rozdělení rozšiřuje a posouvá k vyšším z (šířka se však zvětší méně, tj. rozdělení se blíží Dirakově delta funkci pro vysoké hodnoty dávky. Pro větší LET se rozdělení rozšíří, tj. fluktuace energie narostou.

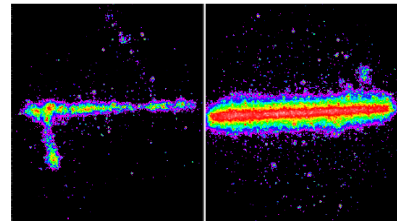
Obr. 52. Funkce $f_m(z)$ pro $m=1, 2, 3, 4, 8, 16$ při střední hodnotě absorbované energie $a=\sqrt{2}$. Pro výpočet funkcí pro konkrétní částice lze použít výše zmíněné transformační rovnice. Je vidět, že pro $m=1$ je funkce trojúhelníková, pro vyšší hodnoty m se rozdělení rozšiřuje a posouvá doprava.



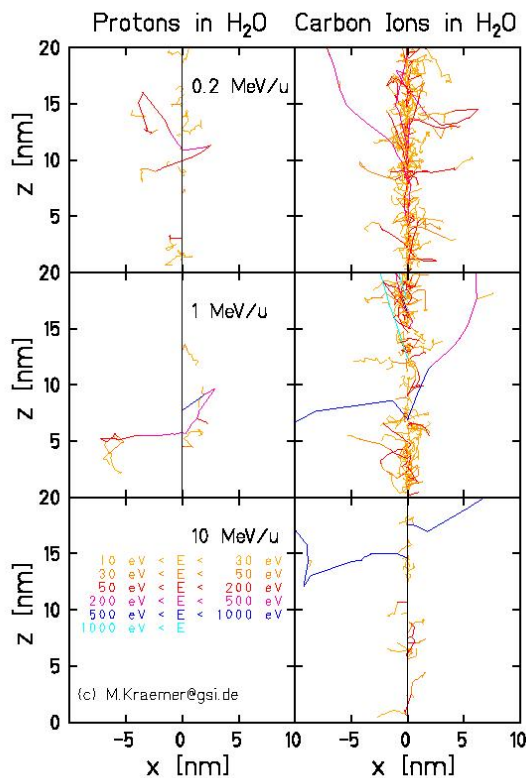
4.2. Struktura stopy částice

4.2.1. Vizualizace stopy částice.

Výpočty podle funkce $f(z,D)$ předpokládají, že stopa částice je nekonečně tenká a LPE se předává rovnoměrně podél ní. Ve skutečnosti má stopa určitou strukturu. Na obr. 54 je vidět stopy částic uhlíku s energiemi 400 a 0.7 MeV/u. Je vidět, že pomalejší částice má mnohem tlustší



Obr. 54. Ion uhlíku ve speciálním plynu, který umožňuje vizualizaci. Energie 400 MeV/n vlevo, 0.7 MeV/n vpravo

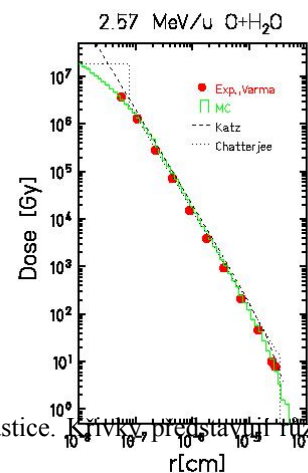


Obr. 55. Vypočtené stopy protonů a iontů uhlíku s energiemi 0.2, 1 a 10 MeV/u ve vodě. Energie sekundárních částic je odlišena barevně – od 10 do 1000 eV.

4.2.2. Distribuce lokální dávky ve stopě částice

Pokud budeme uvažovat malý objem v určité vzdálenosti od osy stopy částice, můžeme v tomto objemu změřit průměrnou dávku. V praxi to musíme provést integraci přes řadu částic, jímž vymežíme dráhu v malém válcovém prostoru a kolem tohoto válce „roztáhneme prostor“ snížením tlaku tkáň-ekvivalentního plynu, ve kterém umístíme měřící komůrku (ta bude představovat mikroobjem).

Obr. 56. Závislost střední lokální dávky na příčné vzdálenosti od osy stopy částice. Křivky představují různé modely, které závislost popisují (Katz, Chatterjee), a také výsledek MC výpočtu.



stopu.

Jednotlivé akty předání energie lze pozorovat a to například

v bublinové nebo mlžné komoře – ve formě malých bublinek, které se hromadí podél stopy. V bublinové komoře, která je plněná tekutým vodíkem, vznikají bubliny tam, kde se iont nebo elektron-iontový pár stane kondenzačním centrem přehřáté kapaliny. Bublínky lemují dráhy částic, které jsou takto vizualizovány. Podobně lze stopy částic pozorovat v jaderných emulzích, kde průchod částice způsobuje zčernání zrněk emulze. I zde můžeme pozorovat rozdíly mezi tenkými a tlustými stopami částic.

Kromě toho lze stopy částic modelovat MC výpočty, při nichž se všechny procesy jako pružné a nepružné rozptyly, interakce částic modelují tak, že je jim přiřazena určitá pravděpodobnost. Počítá se distribuce bodů v prostoru v nichž vznikají sekundární částice, přiřazují se jim směr a rychlost (energie).

Závislost dávky na vzdálenosti od osy stopy částice lze popsat více modely (obr. 56). Popis zde dále uvedený má výhodu v tom, že lokální dávku lze integrovat přes průřez stopy a jako výsledek dostaneme hodnotu LPE částice. Střední lokální dávku popíšeme odlišnými funkcemi pro jádro stopy (oblast několika nanometrů) a polostín (penumbra) tvořený δ -elektrony (obr. 57):

$$D(x) = 8.2 \times 10^4 \cdot (1-k) \cdot \text{LPE} \quad \text{pro } x < r_{\min}$$

$$D(x) = 5.0 \times 10^6 \cdot (1/E) \cdot (Z_e/x)^2 \quad \text{pro } x > r_{\min}$$

kde $D(x)$ je v cGy, x je vzdálenost od středu stopy částice v nm, k je frakce LPE předávané δ -elektrony (pro $r_{\min}=1$ nm to činí 0.45), E je energie na nukleon částice v MeV/nukleon, Z_e je efektivní náboj částice:

$$Z_e = Z_0(1 - \exp(-125 \cdot \beta \cdot Z_0^{2/3}))$$

(korigovaný na záchyt elektronů při letu částice), Z_0 je náboj částice, r_{\min} je rozměr jádra stopy částice: $r_{\min} \approx 1$ nm, r_{\max} je maximální dolet δ -elektronů (rozměr stopy částice) v nm:

$$r_{\max} = 40 \cdot E^{1.75}$$

Integrál této funkce přes průřez stopy musí dát LPE:

$$\int D(x) \cdot \rho \cdot 2\pi x \cdot dx = \text{LPE}$$

Jádro stopy se výrazně liší od δ -elektronů hustotou ionizace a tím i biologickým účinkem. Rozlišujeme proto energii vydělenou stopou částice z_1 a energii vydělenou δ -elektrony – z_2 . Platí, že

$$z_1 = (1-k) \cdot z,$$

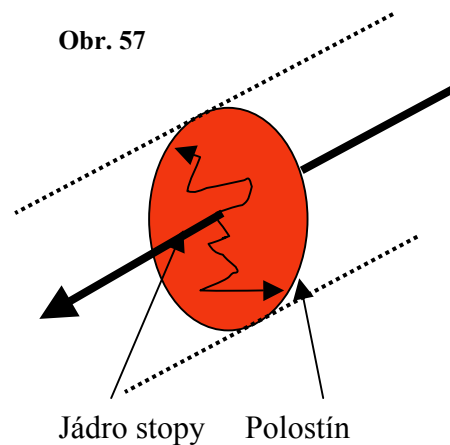
$$z_2 = k \cdot z$$

Část z této energie se předává ve srážkách, kterých se neúčastní jádro stopy. Označme tuto část předávané energie F_g a zkusme ji určit (viz obr. 58).

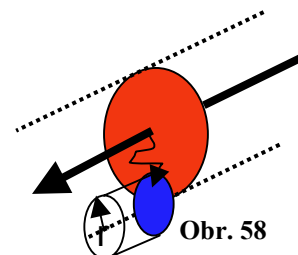
Frakce energie (nebo dávky) δ -elektronů, která se přenesou cylindrickému objemu velikosti r z celkové energie (dávky) těmito elektrony přenášené bude zhruba rovna (obr. 59) :

$$\frac{\int_{r_{\min}}^r \frac{1}{x^2} \cdot 2\pi x \cdot dx}{\int_{r_{\min}}^{r_{\max}} \frac{1}{x^2} \cdot 2\pi x \cdot dx} = \frac{\ln(r/r_{\min})}{\ln(r_{\max}/r_{\min})}$$

a frakce komplementární bude $\ln(r_{\max}/r) / \ln(r_{\max}/r_{\min})$.



Obr. 57



Obr. 58

Přesnější výpočet dává hodnotu zhruba poloviční; zároveň kvůli asymptotickým vlastnostem je vhodnější přičíst r do čitatele prvního zlomku (pak bude pro velké objemy $F_g=0$):

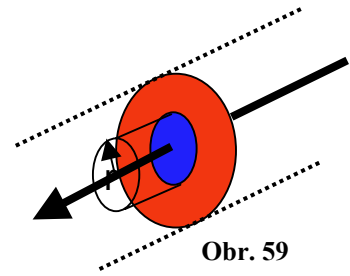
$$F_g = 0.5 \ln((r_{\max}+r)/r) / \ln(r_{\max}/r_{\min})$$

Část dávky předávaná stopou čistě ve formě jen δ -elektronů bude

$$z_g = z_2 \cdot F_g$$

a komplementární část dávky bude:

$$z_d = z_1 + z_2 \cdot (1 - F_g).$$



Tato frakce dávky bude fluktuovat zhruba stejně jako jádro stopy (viz obr.59), zatímco první části dávky bude velmi podobná co do vlastností γ -záření.

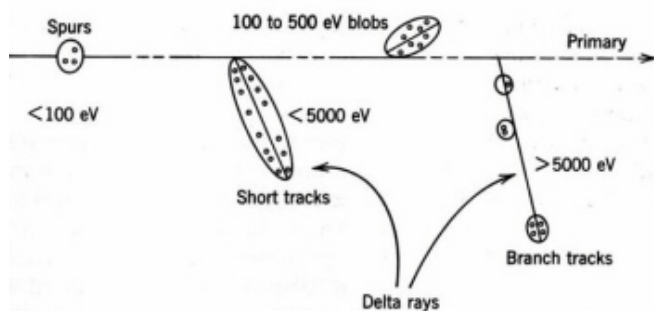
Funkce $f(z,D)$ pak bude mít první člen sestávající z pravděpodobnosti, že přes objem neprojde ani jedna částice ($\exp(-n)$) a Dirakovy delta funkce:

$$f(z,D) = e^{-n} \cdot \delta(z-z_g) + \sum_{m=1}^{\infty} P(m) \cdot f_m(z_d)$$

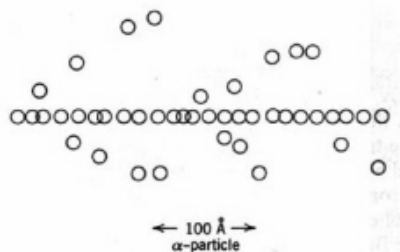
Dosazením za $P(m)$ a f_m z dříve uvedených rovnic dostaneme algoritmus pro výpočet $f(z, D)$ funkce. Tento algoritmus lze uplatnit v řadě případů při výpočtech radiobiologických účinků.

V. Radiační chemie

Energie vydělená částicemi hmotě se většinou mění na kinetickou energii elektronů, které vytvářejí klastry ionizací a excitací (obr. 60, 61). Energie na jeden akt je nejčastěji 22 eV, v průměru pak 60 eV. To je tzv. fyzikální stadium účinku záření. Po předání energie se začínají odvíjet fyzikálně-chemické procesy spočívající v interakcích radikálů a jejich další přeměně. Vzhledem k tomu, že buňky a tkáně, kterými se budeme zabývat, obsahují z velké části vodu, budeme se věnovat radiální chemii vody a dále se zastavíme u působení radikálů na organické molekuly, zejména DNA, které představuje hlavní terč pro účinek záření v buňce.



Obr. 60. Řídce ionizující záření vytváří různě velké shluky ionizací a excitací (spurs, blobs), krátké stopy.



Obr. 61. Hustě ionizující záření vytváří stopy ionizací a excitací s postranními stopami pocházejícími od d-elektronů.

5.1. Radiolýza vody

Radiolýza vody vede ke vzniku radikálů, které jsou dále reaktivní a produkují další silně reaktivní produkty schopné vyvolávat oxidační poškození.

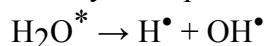
Radiolýza vody byla studována už velmi dávno – od objevu radioaktivity. Výzkumníci, kteří se první zabývali účinkem záření na vodu (včetně Becquerela) zjistili, že radiová emence (radon) rozkládá vodu na vodík a kyslík. To bylo vysvětlováno disociací molekul vody na jednotlivé atomy.

Další studie s vodou bez kyslíku vedly ke stanovení produkce H_2 a H_2O_2 , který byl přisuzován reakci primárních radikálů H^\bullet a OH^\bullet . Rozklad peroxidu pak vysvětluje vznik kyslíku. Účinek záření na biologické molekuly umístěné ve vodním prostředí je obvykle podstatně vyšší v přítomnosti kyslíku než v anaerobních podmínkách. To bylo přisuzováno vzniku hydroperoxyradikálů HO_2^\bullet , jež vznikají v reakci atomů vodíku s molekulárním kyslíkem.

5.1.1. První představy o radiolýze vody

Na základě výše uvedeného máme tedy následující rovnice pro radiolýzu:

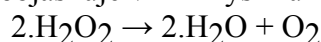
- 1) Excitovaná molekula vody se štěpí na vodíkový a hydroxylový radikál



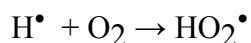
- 2) Interakce radikálů vedou ke vzniku peroxidu vodíku a vodíku



- 3) Rozklad peroxidu objasňuje vznik kyslíku



- 4) Interakce vodíkového radikálu s molekulárním kyslíkem objasňuje vyšší účinek v přítomnosti kyslíku, protože hydroperoxyradikál je velmi reaktivní

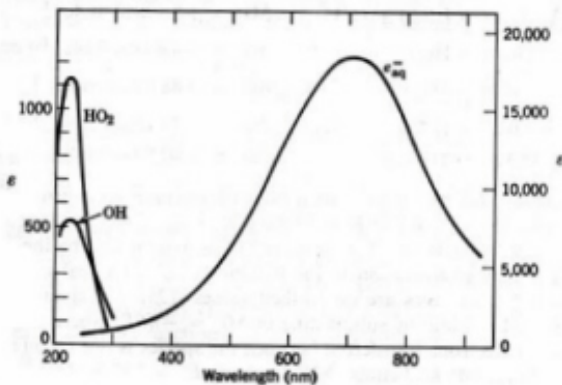


Tato přímočará teorie radiolýzy vody setrvala pak až do počátku 60-tých let 20. století, kdy se objevily nové zdroje záření (LINAC) a při vysokých dávkových rychlostech bylo možné měřit konstanty produkce radikálů. Bylo zjištěno, že tyto konstanty neodpovídají uvedeným rovnicím.

5.1.2. Objev hydratovaného elektronu

V roce 1962 Hart a Boag objevili při pulsní radiolýze vody hydratovaný elektron (e^-_{aq}). Ozařování čisté vody krátkými pulsy elektronů z LINACu generovalo velmi silný a široký absorpční pás s maximem na 720 nm, který byl přisouzen (e^-_{aq}) (obr. 62).

Možnost vzniku stabilizovaného elektronu ve vodě postuloval v roce 1950 Platzmann na základě teoretických studií. Poprvé byl experimentálně pozorován při studiu radiolýzy halogenových iontů UV světlem. Volný elektron (tzv. suchý) existuje ve vodě pouze velmi krátkou dobu (ps)



Obr. 62. Absorpční spektra produktů radiolýzy vody – vlevo jsou to radikály HO₂• a OH•, vpravo je to hydratovaný elektron (e^-_{aq}).

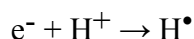
5.1.3. Vlastnosti hydratovaného elektronu

Interakce hydratovaného elektronu: Existenci hydratovaného elektronu lze prokázat jeho reakcemi. Tak např. zánik hydratovaných elektronů je urychlován přítomností produktů jež reagují s elektrony jako je H⁺, O₂, N₂O. Reakce s N₂O je důkazem přítomnosti elektronů, neboť jiné produkty s N₂O tak intenzivně nereagují (hydratované elektrony se dají kvantitativně stanovit podle N₂):

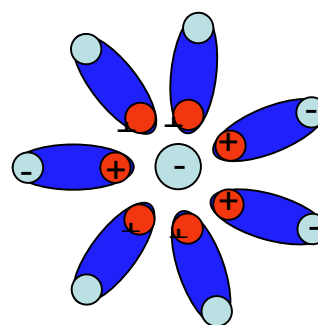


Podle soudobých představ rychle sekundární elektrony ztrácejí energii sérií interakcí dokud se nestanou termálními elektrony, tj. jejich energie je srovnatelná s tepelným pohybem. To nastane za zhruba 10⁻¹¹ s. Tyto tepelné elektrony interagují se sousedními molekulami vody dielektricky. Hydratovaný elektron si představujeme jako elektron uprostřed malé dutinky ve vodě obklopen vrstvou orientovaných vodních molekul (dipólů) s kladným nábojem uvnitř (obr. 63). Tato struktura má vzbuze stavy; není přesně definovaná – má široké maximum absorpce.

Z chemického pohledu je hydratovaný elektron aniontem k H atomu:



e^-_{aq} je nejsilnější redukční činidlo s redukčním potenciálem - 2.9 V při pH 7.0, e^-_{aq} je konvertován na O₂⁻ za přítomnosti O₂



Obr. 63. Hydratovaný elektron

Struktura vytvořená kolem hydratovaného elektronu vytváří kladný elektrický potenciál v místě elektronu. To znamená (z hlediska kvantové mechaniky), že elektron může v tomto potenciálu nabývat pouze určitých energetických stavů – podobně jako v atomu vodíku. Může být také excitován a může pohlcovat světlo. To je pozorováno při pulsní radiolýze. Výsledné spektrum je dosti široké což lze vysvětlit rychle se měnícím okolím elektronu – molekuly vody se rychle v hydratačním obalu zaměňují. Vlastnosti hydratovaného elektronu jsou shrnuty v následující tabulce:

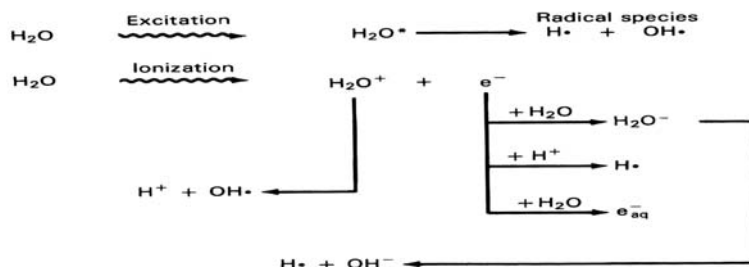
Absorpční maximum:	715 nm
Extinkční koeficient při 715 nm:	$18\,500\text{ mol}^{-1}\text{ dm}^3\text{ cm}^{-1}$
Difúzní konstanta:	$4.9\,10^{-9}\text{ m}^2\text{ s}^{-1}$
Redukční potenciál:	-2.9 V
Poločas života v čisté neutrální vodě:	$2.1\,10^{-4}\text{ s}$
G-hodnota:	2.7

5.1.4. Soudobé představy o radiolýze vody

Primární interakce záření s vodou vedou ke vzniku ionizované vody (H_2O^+), excitovaných molekul vody (H_2O^*) a rychlých elektronů :

- 1) H_2O (excitace) $\rightarrow \text{H}_2\text{O}^*$
- 2) H_2O (ionizace) $\rightarrow \text{H}_2\text{O}^+ + e^-$
- 3) Zpomalující se elektrony

Další osud těchto produktů během přibližně 10^{-11} s je následující:



Obr. 64. Schéma radiolýzy vody

Elektrony

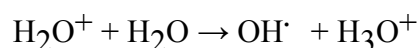
Elektrony jsou zpomalovány a mohou následně interagovat:

- 1) interakce s vodou: $e^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}^- \rightarrow \text{H}\cdot + \text{OH}^-$
- 2) interakce s vodou za vzniku hydratovaného elektronu
- 3) interakce s H^+ za vzniku H

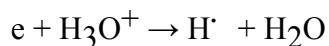
Hydratovaný elektron je relativně stabilní a jeho interakce s vodou je málo pravděpodobná (střední doba života je 2.10^{-4} s)

H_2O^+ iont

je nestabilní a rozpadá se za 10^{-13} s na $\text{OH}\cdot$ a proton H^+ , který interaguje s molekulou okolní vody a vzniká $\text{OH}\cdot$ radikál a H_3O^+

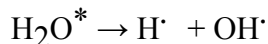


Následná sekundární reakce je



*Excitovaná molekula H_2O^**

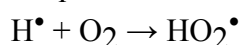
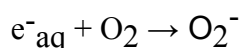
se rozpadá a vzniká nevelké množství radikálů H^\bullet



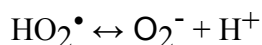
kromě toho může H_2O^* disociovat za vzniku p , e^-_{aq} a OH^\bullet

5.1.5. Radiolýza vody v přítomnosti kyslíku

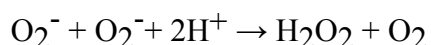
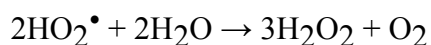
Za přítomnosti kyslíku musíme přidat tyto reakce:



Kyslík nereaguje s OH^\bullet radikály. Výše uvedené rovnice jsou vázané, neboť dochází k disociaci

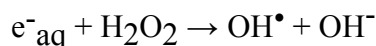


Vzniklé primární produkty jsou nestabilní a mění se na molekuly:



V roztocích obsahujících kyslík je zvýšená produkce peroxidu vodíku a kyslík se částečně regeneruje.

Peroxid vodíku může reakcí s hydratovaným elektronem zvyšovat produkci reaktivních OH^\bullet radikálů:

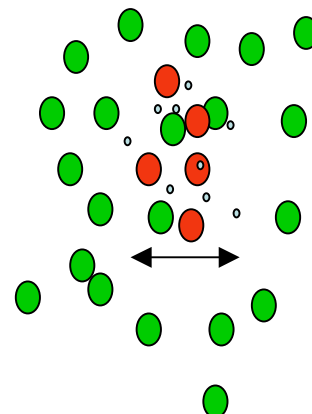
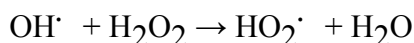


Tabulka 2 Nejdůležitější sekundární reakce při radiolýze vody (i s kyslíkem) s reakčními konstantami.

Reaction	k $dm^3 M^{-1} s^{-1}$	Reaction	k $dm^3 M^{-1} s^{-1}$
$OH^\bullet + OH^\bullet \rightarrow H_2O_2$	$2k = 1.1 \cdot 10^{10}$	$H^\bullet + OH^- \rightarrow e^-_{aq}$	$2.2 \cdot 10^7$
$OH^\bullet + O_2^- \rightarrow HO_2^-$	$2.0 \cdot 10^{10}$	$H^\bullet + H_2O_2 \rightarrow OH^\bullet + H_2O$	$9.0 \cdot 10^7$
$OH^\bullet + H_2 \rightarrow H^\bullet + H_2O$	$4.2 \cdot 10^7$	$H^\bullet + O_2 \rightarrow HO_2^\bullet$	$2.1 \cdot 10^{10}$
$OH^\bullet + OH^- \rightarrow O_2^- + H_2O$	$1.3 \cdot 10^{10}$	$H^\bullet + HO_2^\bullet \rightarrow H_2O_2$	$\sim 10^{10}$
$OH^\bullet + H_2O_2 \rightarrow H_2O + HO_2^\bullet$		$e^-_{aq} + H_2O \rightarrow H^\bullet + OH^-$	$1.9 \cdot 10^1$
$\quad \quad \quad \leftrightarrow O_2^- + H_3O^+$	$2.7 \cdot 10^7$	$e^-_{aq} + e^-_{aq} \rightarrow H_2 + 2OH^-$	$2k = 1.1 \cdot 10^{10}$
$OH^\bullet + HO_2^- \rightarrow OH^- + HO_2^\bullet$		$e^-_{aq} + H^\bullet \rightarrow H_2 + OH^-$	$2.5 \cdot 10^{10}$
$\quad \quad \quad \leftrightarrow O_2^- + H_3O^+$	$7.5 \cdot 10^9$	$e^-_{aq} + OH^\bullet \rightarrow OH^-$	$3.0 \cdot 10^{10}$
$OH^\bullet + H_2O_2^+ \rightarrow H_3O^+ + O_2$	$1.2 \cdot 10^{10}$	$e^-_{aq} + O_2^- \rightarrow 2OH^-$	$2.2 \cdot 10^{10}$
$OH^\bullet + HO_2^\bullet \rightarrow H_2O + O_2$	$6.0 \cdot 10^9$	$e^-_{aq} + H_3O^+ \rightarrow H^\bullet$	$2.3 \cdot 10^{10}$
$OH^\bullet + O_2^- \rightarrow OH^- + O_2$	$8.0 \cdot 10^9$	$e^-_{aq} + H_2O_2 \rightarrow OH^\bullet + OH^-$	$1.1 \cdot 10^{10}$
$H^\bullet + H_2O \rightarrow H_2 + OH^\bullet$	$1.0 \cdot 10^1$	$e^-_{aq} + HO_2^- \rightarrow OH^\bullet + 2OH^-$	$3.5 \cdot 10^{10}$
$H^\bullet + H^\bullet \rightarrow H_2$	$2k = 1.55 \cdot 10^{10}$	$e^-_{aq} + O_2 \rightarrow O_2^-$	$1.9 \cdot 10^{10}$
$H^\bullet + OH^\bullet \rightarrow H_2O$	$7.0 \cdot 10^9$	$e^-_{aq} + O_2^- \rightarrow O_2^{2-}$	$1.3 \cdot 10^{10}$

5.1.6. Rekombinace v klastrech a stopách

Vznik sekundárních produktů se kvantitativně daří vysvětlit za předpokladu rychlých reakcí, které probíhají v klastrech nebo stopách, kde je dostatečně vysoká koncentrace primárních produktů. V klastru je zhruba 2-5 ionizovaných nebo excitovaných vodních molekul a jeho rozměr je několik nm. Během 10^{-11} - 10^{-10} s aktivní produkty reagují tak jak bylo popsáno, ztratí svou energii a difundují do okolí. Uvnitř klastru nebo stopy částice dochází k rekombinaci:



Obr. 65.

Na obr. 65 jsou zeleně molekuly prostředí, červeně a modře jsou znázorněny různé typy radikálů. Shluk může dosahovat 1-5 nm.

5.1.7. Pravděpodobnost vzniku produktů radiolýzy ihned po ozáření: G [počet/100 eV]

Pravděpodobnosti vzniku jednotlivých produktů radiolýzy vody před reakcemi v klastrech. Typické hodnoty jsou uvedeny v tabulce 3a. Kromě těchto produktů vzniká ještě H^+ a OH^- , což však nemá velký význam, neboť tyto ionty jsou ve vodě přítomny ve velkém množství. Hodnoty G po proběhnutí reakcí v klastrech jsou uvedeny v tabulce 3b.

Tabulka 3a Produkce prvotních radikálů (G hodnoty)

Radiation	$G(\text{H}_2+\text{H}_2\text{O}_2)$	$G_{(e-aq)}$	$G(\text{H})$	$G(\text{OH})$
x-rays, electrons 0.1-20 MeV	0	4.78	0.62	5.6

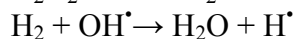
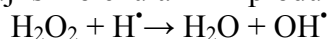
Tabulka 3b Hodnoty G po proběhnutí reakcí v klastrech

Radiation	$G(-\text{H}_2\text{O})$	$G(\text{H}_2+\text{H}_2\text{O}_2)$	$G_{(e-aq)}$	$G(\text{H})$	$G(\text{OH})$
x-rays, electrons 0.1-20 MeV	4.08 pH 3-13	1.13	2.63	0.55	2.72
12 MeV alpha	2.84 pH 7	2.19	0.42	0.27	0.54
Polonium alpha, 3 MeV	3.62 pH 0.46	3.02	0	0.60	0.50

Jak je z tabulky vidět, pravděpodobnosti vzniku jednotlivých produktů radiolýzy vody závisí na pH a na LET záření.

5.1.8. Výsledek radiolýzy vody

V čisté vodě ozáření řídce ionizujícím zářením prakticky nenastává dekompozice, neboť radikály reagují s molekulárními produkty za vzniku vody:



V přítomnosti kyslíku vzniká určité množství peroxidu.

Pro vysoké LET – je více molekulárních produktů a termální dekompozice peroxidu dává kyslík. Proto může např. v reaktorech, kde vzniká velká hustota toku neutronů a tím i odražených protonů a těžších fragmentů, docházet k produkci směsi vodík + kyslík, což je nebezpečné. Aby se předešlo nebezpečí, je vodík katalyticky vázán.

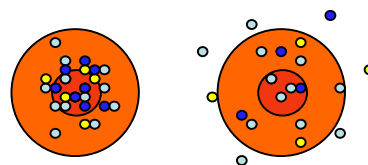
5.1.9. Teorie reakcí ve sférických shlucích radikálů

Prvotní ionizace a excitace vznikají v klastrech (řídce ionizující záření) nebo ve stopách (těžké částice). Vzhledem ke krátké době vzniku prvotních radikálů 10^{-11} s budou také tyto radikály na počátku v klastrech a stopách.

Základní vlastnosti těchto klastrů lze získat řešením klasické časově závislé difúzní rovnice pro izolovaný klaster s předpokladem kompetice mezi 3 reakcemi:

- 1) bimolekulární reakce primárních radikálů vzniklých radiolýzou
- 2) reakce radikálů s vychytávači
- 3) difúze primárních radikálů do vnějšího media, kde mohou rekombinovat a reagovat s různými dalšími molekulami

Předpokládá se dále gaussovské (zvonkovité) rozdělení radikálů v radiálním směru (v difúzní teorii se tato geometrie nazývá „bodovým zdrojem“). Určitá frakce radikálů reaguje mezi sebou v klastru a vytvoří se tak molekuly; ostatní uniknou do okolního prostředí, kde už probíhají homogenní reakce.



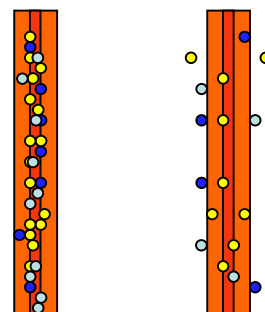
Obr. 66. Klaster radikálů

Na obr. 66 jsou různou barvou zobrazeny různé typy radikálů

ve shluku (klastru). S časem radikály vzájemně reagují a mizí a také se rozplývají do okolí.

5.1.10. Ve stopách po částicích vznikají cylindrické shluky radikálů

Hustě ionizující záření se modeluje jako „cylindrický klaster“ (obr. 67). Tato geometrie odpovídá cylindrickému zdroji radikálů. Analýza vede k závěru, že produkce molekul rekombinací radikálů bude vyšší než pro řídce ionizující záření. To souvisí s hustotou prvotních radikálů ve stopě, které mají malou šanci ze stopy difundovat bez interakce s jiným radikálem. Ve stopách částic je vyšší také produkce peroxidu vodíku, který se uvolňuje kyslík. Reálná situace je komplikovanější vzhledem k překryvu klastrů a stop vzhledem k různým interakčním konstantám primárních reakcí. Proto jsou používány počítače pro realistickou simulaci celého procesu.



Obr. 67. Cylindr s radikály
S časem se radikály rozplývají do okolí (vpravo).

5.1.11. Reakce vodních radikálů s dalšími látkami

Po termalizaci počátečních produktů vytvořených v prvotních reakcích za přibližně 10^{-11} s začíná další – chemické stádium účinku záření. Chemické reakce probíhají v blízkosti klastrů nebo stop částic a jsou tedy nehomogenní, tj. koncentrace nejsou uniformní. Podle přítomnosti další látek ve vodním roztoku nastává velký počet reakcí, z nichž většina nemá velký význam.

1. Hydratovaný elektron reaguje s: ionty kovů (Cd^{2+} , Cu^+ , Fe^{2+}), nenasycenými alifatickými sloučeninami (acetylén, acetaldehyd, tetranitrometan), halogenovanými uhlovodíky (chloroform), aromatickými sloučeninami (benzofenon, nitrobenzen), sloučeninami jež obsahují síru (cysteine, cystamine) a s bázemi nukleových kyselin (purin, thymin, uracil);
2. OH^\bullet reaguje rychle s oxidovatelnými ionty (Br^- , CNS^- , I^- , $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$) a organickými sloučeninami s různou strukturou (alkoholy, akrylamide, formiát, etylacetát, nitrometan,

pyridin, benzen, anilin, fenol), sloučeninami obsahujícími síru (cystin, cysteamin), aromatickými aminokyselinami (fenylalanin, tyrosin, tryptofan) a různými dalšími biologickými molekulami (ribósa, thymin, uracil, glukóza).

3. Reakce H^\bullet a HO_2^\bullet jsou podobné jako u OH^\bullet ale obvykle pomalejší.

5.1.12. Frickeho dosimetrie

Radiolytická oxidace iontů Fe^{2+} na Fe^{3+} se používala od roku 1930 pro měření absorbované dávky (tzv. Frickeho dosimetrie). Frickeho dosimetr sestává z roztoku 1mM Fe^{2+} při pH 0.46. Konverze iontů Fe^{2+} na Fe^{3+} se měří spektrofotometricky. Konverzní faktor je $G=15.5$ pro záření s nízkým LET.

Vzhledem k závislosti G na LET záření má tento druh dosimetrie omezené použití. Je to však důležitý nástroj pro zkoumání kinetiky vychytávání radikálů (scavengers).

Konverze $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ může nastat působením radikálů HO_2^\bullet , OH^\bullet , a H_2O_2 . Lze ukázat, že v přítomnosti kyslíku každý vzniklý radikál

H^\bullet vede k přeměně 3 iontů Fe^{2+} ,

OH^\bullet radikále vede k přeměně 1 Fe^{2+} a

H_2O_2 vede k přeměně 2 iontů Fe^{2+} .

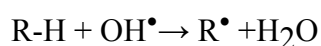
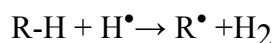
V anaerobních podmínkách se mění počet přeměněných iontů Fe^{2+} u H^\bullet radikálů ze 3 na 1.

Takto lze spočítat ze známé produkce radikálů hodnotu G Frickeho dosimetru. Pomocí oxidace iontů železa lze studovat vychytávání radikálů, tj roli tzv. nepřímého účinku záření, roli kyslíku, kompetici vychytávání apod.

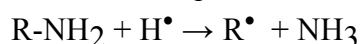
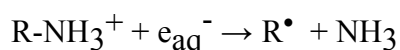
5.1.13. Reakce produktů radiolýzy vody s biologickými molekulami

Existuje řada reakcí produktů radiolýzy vody s biologicky důležitými molekulami:

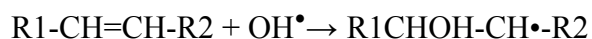
1) Oddělení vodíku:



2) Disociace:



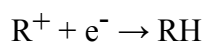
3) Sloučení radikálu s molekulou:



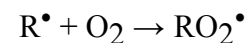
5.1.14. Osud radikálů biomolekul

Radikály biologických molekul mohou rekombinovat nebo mohou být fixovány na nevratná poškození (bude probráno podrobně později):

1) Restituční procesy (probíhají za účasti endogenních sloučenin obsahující S-H skupinu, tzv. thiolů):



2) Fixace radikálu kyslíkem:



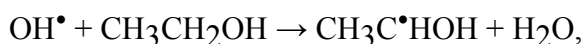
Takto fixovaný radikál se už neúčastní restituečních procesů.

3) Vznik poškození biomolekuly způsobeného radikálem (R^\bullet nebo RO_2^\bullet)

5.1.15. Reakce s vychytávací radikálů

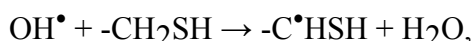
Důležité jsou reakce s vychytávací radikálů (látkami, které zmenšují účinek záření zneškodňováním radikálů). Jsou to:

1) Alkoholy:



kde vzniknuvší alkoholový radikál je daleko méně reaktivní.

2) Cystein a cysteamin: obsahují sulfidivý můstek ve skupině $-\text{CH}_2\text{SH}$, který reaguje s OH radikálem podobně jako u alkoholů:



Tyto látky jsou v radiobiologii velmi dobře známy jako protektivní činidla.

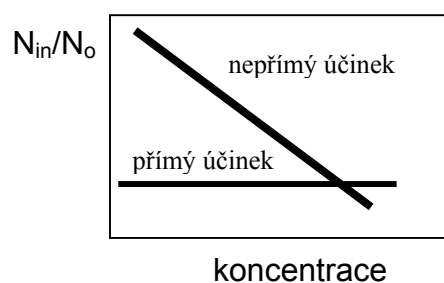
5.1.16 Přímý a nepřímý účinek záření

Produkty radiolýzy jsou velmi reaktivní radikály. Proto je zřejmé, že u látek rozpuštěných ve vodě bude působení záření dvojitě (obr. 68):

1) přímý účinek poškozením molekuly dané látky

2) nepřímý účinek působením vodního radikálu

U přímého účinku je frakce inaktivovaných molekul v roztoku dána dávkou a nezávisí na koncentraci (každá molekula má určitou pravděpodobnost zásahu). Naopak při nepřímém účinku záření se radikály vychytávají na přítomné látce a čím bude její koncentrace nižší, tím více jich připadne na jednu molekulu a účinek bude větší. Proto frakce inaktivovaných molekul látky v důsledku nepřímého účinku záření roste s klesající koncentrací látky.



Obr. 68. Přímý a nepřímý účinek v závislosti na koncentraci ozařované látky

5.2. Radiolýza biologických molekul

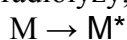
Radiolýza biologických molekul je často velmi komplexní proces. Např. ozáření vodního roztoku glycinu (nejjednodušší aminokyselina) vede ke vzniku mnoha produktů včetně NH_3 , H_2 , CO_2 , CHOCO_2H , HCHO , CH_2NH_2 . Informace o produktech nám poskytují zejména dvě metodiky:

- 1) Pulsní radiolýza při pokojové teplotě dává informaci o prvotních i sekundárních produktech
- 2) Elektronová paramagnetická resonance (EPR) ozařovaných krystalů, prášků a zmražených roztoků dává informaci o časných stádiích

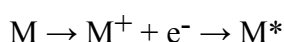
První metoda vede k optickým spektrům a kinetice, která pomáhá identifikovat přechodné produkty. Reakce OH^\bullet radikálů se zkoumá přidáním N_2O tak, aby roztok byl satureován – tím se e_{aq}^- mění na OH^\bullet . Naopak hydratované elektrony jsou preferovány přidáním t-butanolu, který konvertuje OH^\bullet na relativně nereaktivní alkoholové radikály.

5.3. Radiační efekty v plynech

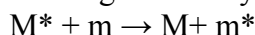
Radiolýza plynů může vést ke vzniku iontů, excitovaných molekul a volných radikálů. Existuje řada technik pro jejich měření včetně měření toku iontů, hmotnostní spektrometrie, pulsní radiolýzy, izotopové značení apod. Často pozorujeme vznik excitovaných molekul:



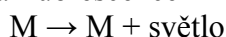
a nepřímou excitaci neutralizací iontového páru:



Excitační energie může být přenesena na jinou molekulu:

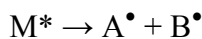


což se nazývá „kolísí druhého řádu“. Alternativně může být excitační energie emitována jako optická fluorescence



nebo může být ztracena kolísí s jinou molekulou.

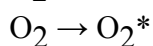
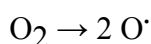
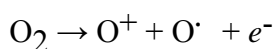
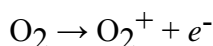
Excitované molekuly se mohou rozpadat na radikály:



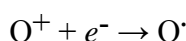
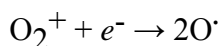
nebo na molekulární produkty: $M^* \rightarrow C + D$

5.3.1. Radiolýza kyslíku

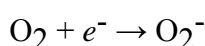
Molekulární kyslík byl vždy středem zájmu vzhledem k jeho důležitosti v radiobiologii a vzhledem k reakcím v atmosféře. Byly identifikovány následující primární reakce:



Rekombinace elektronů s ionty vede ke vzniku kyslíkových atomů



Záchyt elektronu generuje ionty O_2^- :



Reakcí

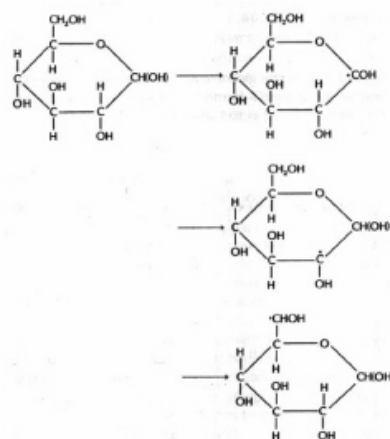


vzniká ozon. Zde M je jiná molekula kyslíku nebo stěny nádoby, která funguje jako třetí těleso, aby byla zachována energie a hybnost.

5.4. Radiolýza alkoholů a některých sacharidů

Radiolýza alifatických alkoholů vede k oddělení vodíkového atomu z hydroxylové skupiny. Např. radiolýzou glukózy vznikají produkty znázorněné na obr. 69. Odtržení vodíku může nastat pro CH(OH) a CH₂OH místa.

Řada reakcí nastává u polysacharidů. Praktickými následky jsou křehnutí papíru, celulosová vlákna a plasty ztrácejí pevnost ovoce a zelenina měknou kvůli degradaci pektinu.



Obr. 69. Radiolýza glukózy. Radikály vznikají na různých pozicích uhlíku.

5.5. Radiolýza proteinů

Proteiny obsahují mnoho reaktivních míst pro radiolýzu.

- 1) e_{aq}^- reaguje s histidinem, cystinem, asparaginem, argininem a aromatickými aminokyselinami, tryptofanem, tyrosinem a fenylalaninem.
- 2) OH^\bullet radikál reaguje se všemi aminokyselinami v místě peptidové vazby a s některými dalšími funkčními skupinami, např. indolovou skupinou tryptofanu; velmi reaktivní jsou také SH a SS skupiny v aminokyselinách obsahujících síru.

3) H^\bullet radikál reaguje s alifatickými aminokyselinami mnohem pomaleji než OH^\bullet , výjimku představují aromatické aminokyseliny a ty, které obsahují síru. Interakce záření s proteiny není z hlediska osudu ozářené buňky důležitá, neboť v buňce je velký počet molekul proteinů a mohou být v případě potřeby syntetizovány. Daleko důležitější je osud unikátních molekul – takovou molekulou je DNA.

5.6. Radiolýza DNA

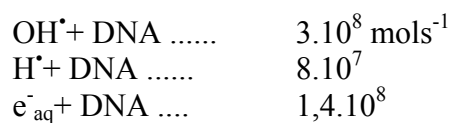
DNA je z hlediska biologického účinku záření zdaleka nejdůležitější molekula. Ionizující záření deponuje svou energii jednak v samotné molekule DNA (přímý účinek), ale také v rozpouštědle (vodě) a dalších rozpuštěných molekulách (nepřímý účinek), což velmi komplikuje situaci i v dobře definovaných roztocích. V buňce to představuje velmi těžko řešitelný problém. Reakční konstanty pro jednotlivé báze jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4. Pro jednotlivé báze jsou reakční konstanty vodních radikálů následující

k $M^{-1} s^{-1}$	OH^\bullet (oxidation)	e_{aq}^- (reduction)	H^\bullet (reduction)
Deoxyribose	$2.5 \cdot 10^9$	10^7	$2.9 \cdot 10^7$
Adenine	$6.1 \cdot 10^9$	$9 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^8$
Cytosine	$6.1 \cdot 10^9$	$1.3 \cdot 10^{10}$	$9.2 \cdot 10^7$
Guanine	$9.2 \cdot 10^9$	$1.4 \cdot 10^{10}$	-
Thymine	$6.4 \cdot 10^9$	$1.8 \cdot 10^{10}$	$5.7 \cdot 10^8$

Z tabulky je vidět, že reakční konstanty jsou poměrně velké pro OH radikály a pro hydratované elektrony.

Nepřímý účinek záření na DNA, tj působení radikálů se projevuje až do vysokých koncentrací DNA. Reaktivitu jednotlivých radikálů lze celkem snadno určit tak, že necháme vychytávat jinou látkou ostatní radikály. Bylo zjištěno, že oproti očekávání založeného na reakčních konstantách z předchozí tabulky je nejučinnější OH^\bullet radikál, následuje (e_{aq}^-) a na posledním místě je H^\bullet . Konstanty reakčních rychlostí jsou:



OH radikál se při své difúzní konstantě může pohybovat jen velmi omezeně – střední vzdálenost difúze lze odhadnout na 3,5 nm (pro porovnání má DNA příčný rozměr 2.2 nm a vzdálenost bazí je 0.34 nm).

Oproti očekávání je role hydratovaných elektronů při poškození DNA zářením podstatně menší. To lze ukázat přidáním N_2O k roztoku DNA. Molekuly N_2O kvantitativně transformují hydratované elektrony na OH^\bullet radikály a počet poškozených DNA molekul ve stejném poměru vzroste.

Ačkoli je produkce a reaktivita H^\bullet radikálů nízká, nelze ji zanedbat. To ukazuje následující experiment: Je-li anoxický roztok DNA saturován vodíkem, poškození DNA zářením se nemění (i když lze předpokládat interakci OH^\bullet radikálů s vodíkem a měly by vznikat H^\bullet radikály). Lze soudit, že účinek H^\bullet radikálů je stejný jako účinek OH^\bullet radikálů.

Je-li však použita směs vodíku a kyslíku v poměru 1:10, poškození je redukováno 10x. To lze vysvětlit tak, že H_2 reaguje s OH^\bullet radikály a vznikají H^\bullet radikály – v nepřítomnosti kyslíku zřejmě způsobují stejné poškození jako OH^\bullet . Kyslík z druhé strany chrání před H^\bullet radikály, takže poškození vzniká pouze působením OH^\bullet radikálů.

5.6.1. Radiolýza DNA – typy poškození

Rozlišujeme následující typy poškození DNA (obr. 70):

- 1) jednoduché zlomy DNA (SSB)
- 2) dvojité zlomy DNA (DSB)
- 3) poškození báze
- 4) ztráta báze
- 5) lokální denaturace
- 6) intramolekulární crosslinky
- 7) intermolekulární crosslinky

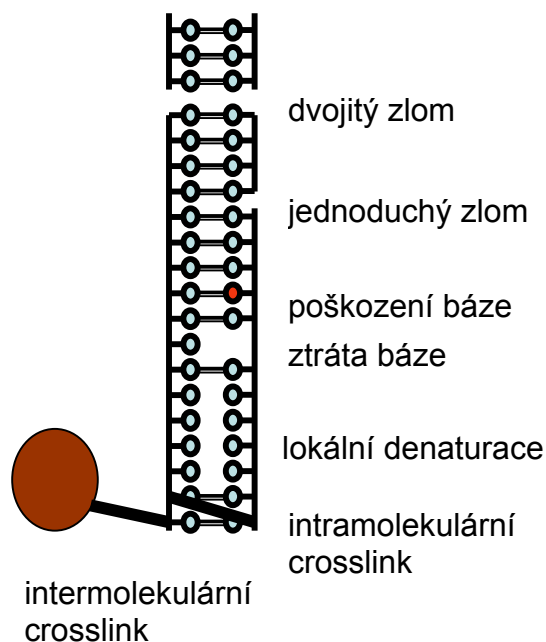
Tyto typy poškození se vzájemně nevylučují a často vznikají společně (např. zlomy mohou být doprovázeny poškozením bází, oblastmi lokální denaturace apod.). Četnost vzniku těchto poškození závisí na podmínkách experimentu; velmi zhruba vzniká v buňce 1 SSB na 100 eV (tj. $G=1$), produkce DSB je o řád nižší (1 DSB na 1000-2000 eV, $G=0.05$). Poškozených bází je více než SSB. V roztoku vše závisí na koncentraci. Dávkové závislosti mohou být často nelineární a nelze tedy hodnotu G vůbec udat. Za nejdůležitější jsou považovány zlomy DNA.

1) jednoduché zlomy DNA – jsou zlomy mezi cukrem a fosfátovou skupinou v jednom řetězci. Mechanismus vzniku SSB: zřejmě existuje více mechanismů; OH radikály interagují z 20% přímo s cukrem v DNA a z 80% s bázemi, kde rozrušují dvojně vazby a způsobují vznik radikálů bází. Tyto radikály se často přenášejí do 4-té polohy na pentoze, což uvolní fosfátovou skupinu.

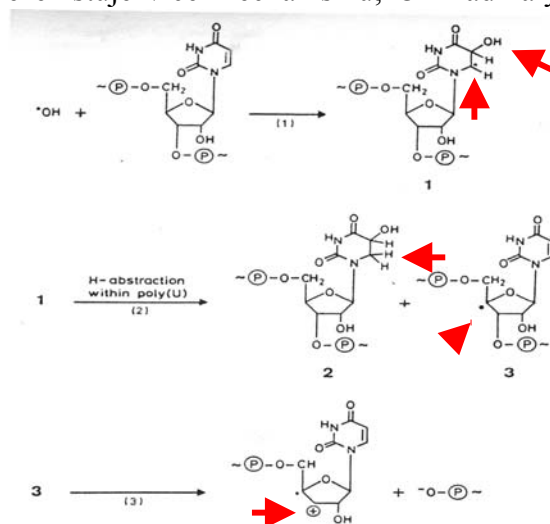
2) dvojité zlomy DNA – dva SSB proti sobě, mechanismus může být různý. V roztoku to mohou být dva náhodně vzniklé SSB proti sobě; v buňce to je spíše důsledek přímého průchodu částice v blízkosti obou řetězců DNA, kdy v okolí stopy vzniká řada radikálů, které zasáhnou oba řetězce.

5.6.2. Zlomy DNA

Zlomy DNA vznikají z radikálů pentozy. V principu může radikál vznikat na libovolném atomu uhlíku avšak radikály na prvním a druhém uhlíku vznikají málo vzhledem k tomu, že tyto pozice jsou ukryty v malém žlábků DNA. Jednoduché zlomy DNA vznikají většinou z radikálů na 4-té nebo 5-té pozici pentozy, které tam můžou vzniknout buď přímo nebo přenesením radikálu báze do 4-té pozice pentozy.



Obr. 70. Poškození DNA



Obr. 71. OH^\bullet radikál interaguje s poly(U) a dojde k jeho zachycení na uracilu, kde se zruší dvojná vazba a vznikne radikál. Ten se přeneseme na 4-tou pozici pentozy v jiném místě řetězce a vzápětí vzniká zlom

Na obr. 71 je znázorněna interakce OH^\bullet radikálu s molekulou DNA a vznik radikálu. Radikál posléze interaguje uvnitř poly(U) řetězce a přenesení se na pentózu na 4-tý uhlík. Tato pozice je nejcitlivější z hlediska vzniku zlomu DNA. Zlomy DNA jsou velmi důležité pro biologický účinek záření.

5.6.3. Měření zlomů DNA

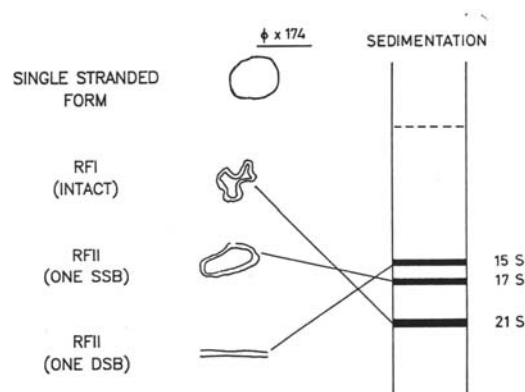
SSB a DSB se dají snadno prokázat sedimentačními technikami. Tato jednoduchá metoda není bez komplikací, neboť velká molekula DNA je velmi fragilní a zlomy lze nadělat manipulací. To vymezuje použitelnost této technologie na větší dávky záření – takové, které jsou při ozařování buňky mimo fyziologickou oblast.

Pro měření SSB se DNA denaturuje alkalickým prostředím, což ovšem způsobuje vznik dodatečných zlomů, které nejsou detekovány, jestliže se denaturuje např. teplem. Tyto dodatečné zlomy, které vznikají z některých typů poškození bází se nazývají „alkali labile sites“ (als), tj. místa nestálá v zásaditém prostředí. Počet těchto zlomů je asi 30% z celkového počtu SSB. Prakticky lze měření provést v gradientu sacharózy (5-20% gradient), kde na jeho povrch se umístí DNA značená izotopem v alkalickém prostředí. Po centrifugaci rozkapeme gradient na frakce a změříme aktivitu v jednotlivých frakcích např. v β -spektrometru. Tím dostaneme rozdělení aktivity podél gradientu. Kalibrací stanovíme pro danou molekulární hmotnost DNA polohu v gradientu. Z rozdělení pak můžeme spočítat střední molekulární hmotnost. Lze snadno prokázat, že střední molekulární hmotnost klesá s rostoucí dávkou záření jak pro roztoky tak v buňkách.

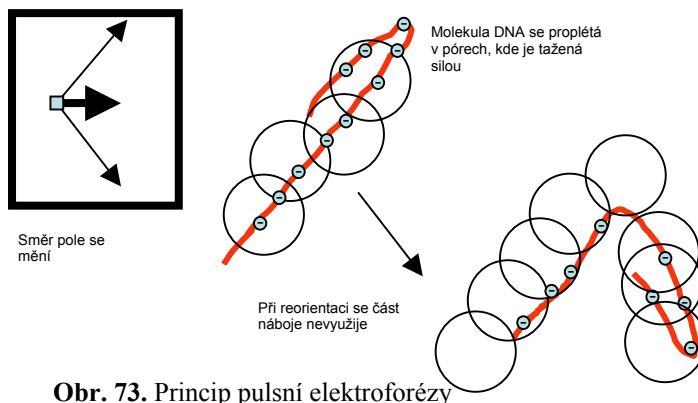
Další metodou měření SSB a DSB je elektroforéza. Jednoduché je použít kruhovou DNA, která má velkou pohyblivost v elektrickém poli. Vznikem SSB dojde k relaxaci a pohyblivost se podstatně zmenší. Vnesení DSB do kruhové molekuly vede ke vzniku molekuly lineární a k další změně pohyblivosti. Tyto tři formy DNA se dají snadno oddělit sedimentací nebo elektroforézou (viz obr. 72).

Další metodou je „unwinding technika“, která využívá řízené denaturace DNA v zásaditém prostředí, kdy při přesně stanoveném pH a změřené době dojde k oddělení určitého úseku dvoušroubovice. Čím více bude zlomů v DNA, tím rychleji dojde k úplné denaturaci všech molekul. Měří se nakonec frakce dvojřetězové DNA použitím vhodné barvičky. Tato metoda je citlivější než sedimentační technika a umožňuje pracovat s dávkami blízkými „fyziologickým“. Metoda vyžaduje pečlivou kalibraci.

Poslední metodou pro měření DSB, o které se zmíníme, je pulsní elektroforéza, do které byly vkládány velké naděje. U pulsní elektroforézy se střídá elektrické pole pod určitým tupým úhlem a lze programově řídit jak velikost pole, tak úhel a dobu pulsů napětí. Molekuly DNA se v gelu nejprve orientují a teprve poté se začnou pohybovat. Při změně orientace



Obr. 72. Tři formy původně kruhové DNA po ozáření



Obr. 73. Princip pulsí elektroforézy

napětí dochází k re-orientaci, která zabere určitý čas, jenž je větší pro větší molekuly. Rozhodující pro výsledek, tj. polohu molekuly na gelu, je proto rychlost reorientace a nikoliv pohyblivost. Tímto způsobem lze oddělit šetrně velké molekuly až několik Mbp (celý genom E. coli).

Na obr. 73 je zobrazen princip pulsní elektroforézy – měnící se elektrické pole, ve kterém dochází opakovaně k reorientaci molekul DNA. Doba reorientace je větší pro delší molekulu.

5.6.4. Výsledky měření zlomů DNA pulsní elektroforézou a jejich interpretace.

Byly měřeny např. zlomy indukované zářením u E. coli nebo B. subtilis na celých genomech, kterými jsou kruhové molekuly DNA. Výsledek elektroforézy vypadal takto – určitá linie odpovídala původní DNA (zůstala na původním místě vzhledem k ukotvení na buněčné struktuře), další maximum odpovídalo jednořetězové DNA. Třetí maximum bylo široké a odpovídalo molekulám rozbitým na drobnější kousky.

Jednoduše lze odvodit, že při náhodném vzniku DSB v molekule DNA musí mezi množstvím DNA v jednotlivých oblastech elektroforeogramu platit určité vztahy.

Pro řídké ionizující záření bude při středním počtu zlomů

$$n = a \cdot D$$

pravděpodobnost, že k žádnému nedošlo

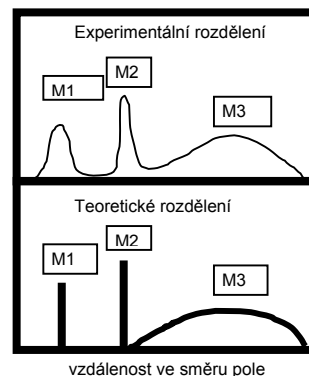
$$\exp(-n)$$

a pravděpodobnost že došlo právě k jednomu bude

$$n \exp(-n)$$

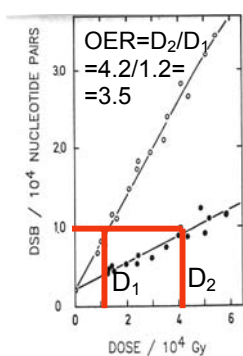
Zbytek do 1 bude připadat na spojitou část rozdělení v pravé části obr. 74.

Množství DNA pod maximy lze určit integrací a porovnat s rovnicemi. Pro hustě ionizující záření lze použít $f(z, D)$ funkci a pro dané z deponované v molekule vypočítat počet zlomů. Velikosti maxim a tvar spojitého spektra vpravo pro hustě ionizující záření by se měly lišit. Experimentální výsledky však příliš neodpovídají teoretickým předpovědím, což odráží celou řadu problému při vyhodnocování těchto experimentů.



Obr. 74. Výsledek pulsní elektroforézy ozářených bakterií

5.6.5. Radiolýza DNA – vliv kyslíku

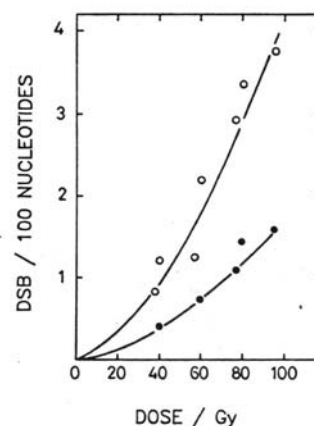


Kyslík obvykle zvětšuje účinek záření a to jak na úrovni molekulární, tak na úrovni buněk a tkání. Mluví se o tzv. kyslíkovém efektu, který je jedním z nejlépe prozkoumaných a nejuniwersálnějších radiobiologických fenoménů. Pro hodnocení účinku v přítomnosti kyslíku v porovnání s anoxickými podmínkami se zavádí se poměr dávek v kyslíku a v anoxii pro stejné poškození DNA – tzv. kyslíkový poměr (KP) anglicky oxygen enhancement ratio (OER). Hodnota OER pro SSB při γ -ozáření byla odhadnuta na 5.4, pro DSB 3.5 (viz obr.75).

Obr. 75. Definice kyslíkového poměru – červeně jsou znázorněny dávky pro určitý efekt (10 zlomů). Poměr dávek je hodnota OER.

Jak již bylo uvedeno, kyslík může zvyšovat produkci OH^\bullet radikálů avšak tento příspěvek je malý. Nejdůležitější je role kyslíku při fixaci radikálů DNA. Vzhledem k vysokému obsahu kyslíku ve vodě a vzhledem k vysoké reakční rychlosti s těmito radikály je i velmi malá koncentrace kyslíku dostatečná pro 100% účinek záření. Proto se musí experimenty, v nichž se zkoumá anoxie velmi pečlivě provádět – tak, aby byla koncentrace kyslíku skutečně nulová.

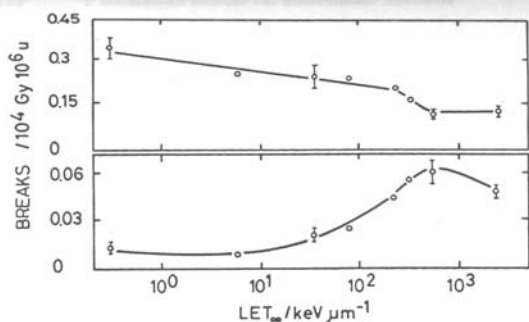
Dvojitě zlomy DNA vznikají odlišným mechanismem v roztoku a v buňkách (obr. 76). V roztoku dochází k formování DSB jako dvou SSB s odstupem 6-8 nukleotidů. To předpokládá dostatečně velkou produkci SSB, aby takový jev byl dostatečně pravděpodobný a důsledkem pak je kvadratická závislost počtu zlomů na dávce. V buňkách je vznik DSB 1000x méně pravděpodobný jednak proto, poněvadž příspěvek nepřímého účinku záření je menší, jsou zde také přítomné látky vychytávající radikály a konformace DNA v chromatinu je jiná. Dávkové závislosti počtu DSB v buňkách jsou většinou lineární.



Obr. 76. Kyslíkový poměr v roztoku. Dávkové závislosti vzniku DSB jsou kvadratické, neboť DSB vznikají ze dvou SSB. Hodnota OER je zde menší než 2.

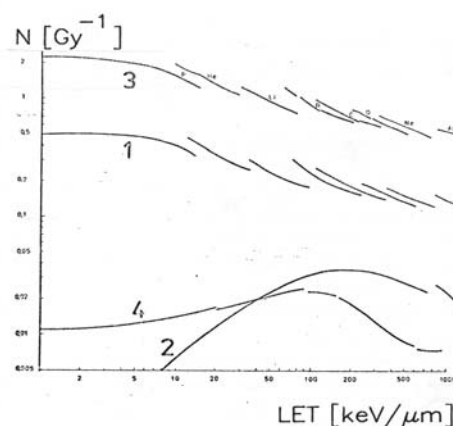
5.6.6. Radiolýza DNA – vliv LPE

Jak vidíme z obr. 77, produkce SSB, DSB a i dalších poškození DNA se mění v závislosti na tom, jaký druh záření použijeme. Proto není možné vysvětlit účinek záření na buňku pouze úvahami o energii deponované v citlivém objemu (jádře) buňky. Pro větší hodnoty LPE záření se mění distribuce specifické energie z v jádrech buněk a část buněk bude proto pociťovat větší než průměrnou hodnotu \bar{z} . Co je však důležité, že s růstem LPE produkce



Obr. 77. Experimentální závislosti produkce SSB a DSB v závislosti na LET záření

DSB nejprve roste a posléze klesá. Tyto závislosti lze objasnit jestliže zvážíme charakter vydělení energie (mikrodosimetrické aspekty a strukturu stopy částice). Pro jednoduché zlomy není třeba tolik energie jako pro dvojitě, a proto jejich produkce padá s růstem LPE. U dvojitých zlomů se pravděpodobnost vydělení dostatečné energie v rozmezí molekuly (2 nm) nejprve zvětšuje až do několika set keV/μm. Na obr. 78 jsou znázorněny teoretické křivky spočtené na základě teoretických představ o vydělení energie v molekule DNA. K jejich interpretaci se vrátíme později.



Obr. 78. Teoretické křivky:
1 – produkce SSB,
2 – produkce přímých DSB
3 – produkce poškození bází
4 – produkce tzv. komplexních poškození

5.6.7. Ostatní poškození DNA

Poškození bazí a ztráta bazí se pozoruje jako úbytek absorbance při 265nm, což je poněkud hrubá metoda. Byly popsány určité typy poškození bazí (např. u thyminu 30 druhů změn) (obr. 79); jejich biologické následky však nejsou známy a nepřičítá se jim velký význam. Poškození bazí se v buňce reparuje excizní reparací, čímž se tato poškození mění na SSB. Proto lze po určité době pozorovat nárůst počtu SSB po ozáření.

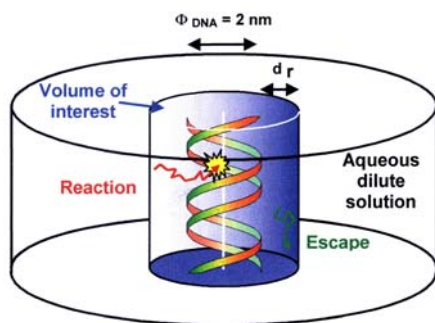
Denaturované oblasti způsobují naopak při malých dávkách určitý nárůst absorbance při 265 nm. Tyto oblasti lze prokázat na denaturačních křivkách nebo pomocí enzymů specifických pro single-strandovou DNA.

Denaturace provází většinu z uvedených typů poškození, a proto je hodnota G poměrně velká.

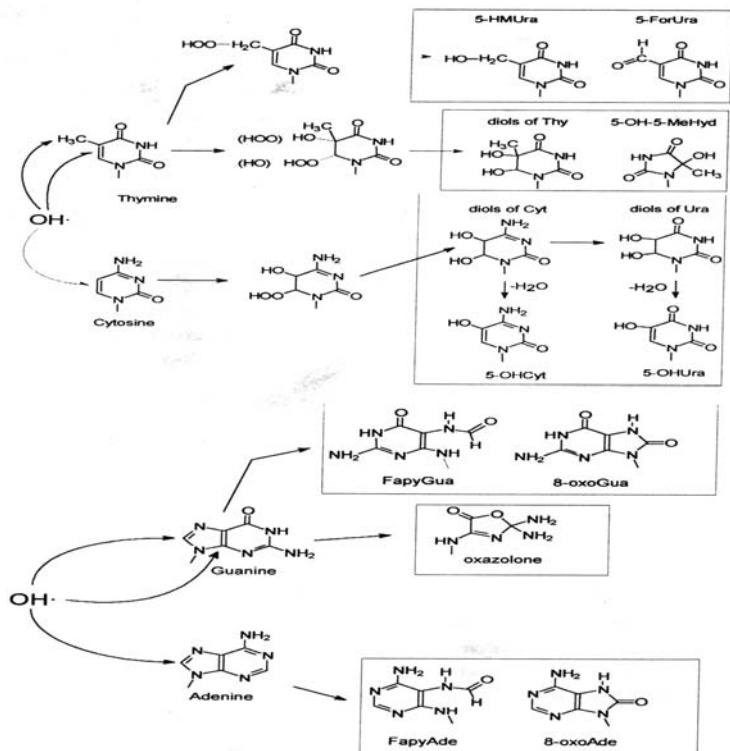
Crosslinky – nejsou dobře prozkoumány. Intramolekulární crosslinky vedou k podstatným změnám v denaturačních křivkách a zvyšují rychlost sedimentace. Crosslinky s proteiny způsobují obtížnou extrakci z buněk – toho lze využít při fixaci DNA.

5.6.8. Výpočet produkce zlomů DNA po ozáření

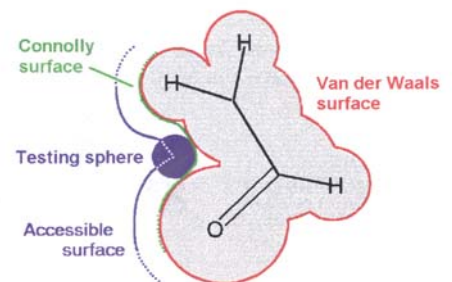
Modelování DNA – existují modely struktury DNA, které umožňují stanovit přístupná místa. Je několik přístupů – lze určit tzv. Van der Waalsův povrch a „dostupný povrch“ (nemusí být shodné) (obr. 80).



Obr. 81. Modelování působení OH radikálu na DNA. (převzato z práce M. Běgusové)



Obr. 79. Typy poškození bazí OH• radikálem. Jsou znázorněna místa citlivá k OH• radikálům a změny, které nastávají.

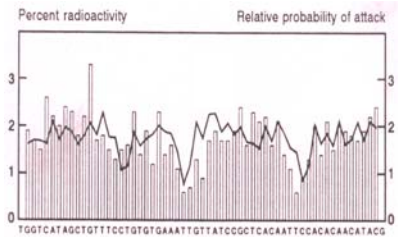


Obr. 80 Povrchy molekuly – van der Waalsův a „dostupný povrch“.

Modeluje se pohyb radikálů v 3D prostoru a jejich interakce s DNA (obr. 81).

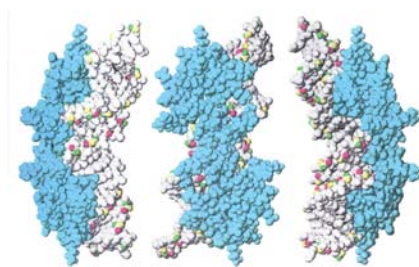
5.6.8.1. Závislost pravděpodobnosti vzniku zlomu na složení DNA

Byl ozařován fragment DNA a analyzována produkce zlomů v daném místě. Analýza byla provedena na akrylamidovém gelu podobně jako sekvenování. Podle délky řetězce DNA bylo možné přesně stanovit, ve kterém místě (na kterém nukleotidu) došlo ke vzniku zlomu. Na obr. 82 vidíme experimentální a teoretickou pravd. vzniku SSB



Obr. 82. Pravděpodobnosti vzniku zlomu závisí na složení DNA – v blízkosti TTG, TTC jsou minima. Křivka představuje teoretický výpočet. (práce M. Běgusové)

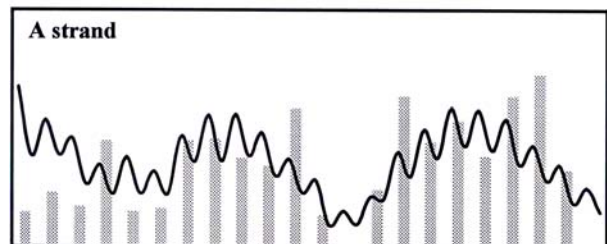
5.6.8.2. Vznik zlomů DNA v komplexu s proteinem



Obr. 83. Struktura fragmentu DNA se lacI represorem. (práce M. Běgusové)

K modelování byl použit komplex DNA s lac represorem (odpovídající vazebná sekvence). Na obr. 83 je část řetězce DNA v komplexu s lac represorem (modře), jsou zde znázorněny atomy vodíku v polohách H4 a H5 (zelenou a fialovou barvou). Je zřejmé, že pouze část atomů je přístupná pro interakci s OH radikály (obr. 84)

G A A T T G T G A G C G G A T A A C A A T T

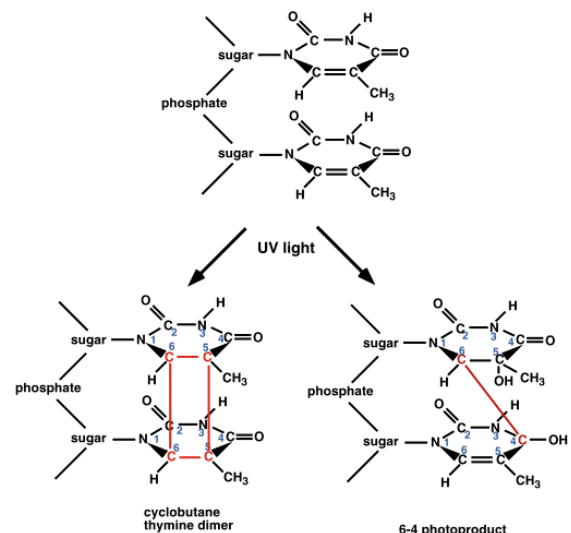


Obr. 84. Vznik zlomů DNA v komplexu s proteinem – vznik zlomů pro DNA s represorem. Je vidět, že model docela dobře popisuje experimentální výsledky. (práce M. Běgusové)

5.6.9. Poškození DNA působením UV-záření

UV záření se dělí na A, B a C. UV-A záření způsobuje vznik SSB zlomů DNA, které – jak uvidíme později se rychle reparují, a proto UV-A záření nezpůsobuje přímo závažná poškození buněk. UV-B a UV-C záření způsobují vznik dimerů a 6-4 fotoproduktů (obr. 85). Kovalentní vazba vzniká mezi sousedními pyrimidiny, nejčastěji jsou to thyminy.

Oba typy poškození mohou způsobovat špatné párování při replikaci nebo zastavení replikace. Protože na Zemi žijeme v přítomnosti UV-záření, vyvinula se řada systémů pro reparaci poškození způsobených tímto zářením.



Obr. 85. Vznik pyrimidinového dimeru a 6-4 fotoproduktu působením UV-záření.

VI. Reparace DNA po ozáření

DNA je na rozdíl od proteinů, lipidů a sacharidů unikátní molekula v buňce. Molekuly, kterých je mnoho se mohou při poškození prostě zaměnit. Udržet DNA v originálním stavu je pro buňku jedna z hlavních úloh. Proto existuje řada reparačních systémů DNA. DNA je relativně stabilní sloučenina, je však vystavena mnoha poškozujícím vlivům:

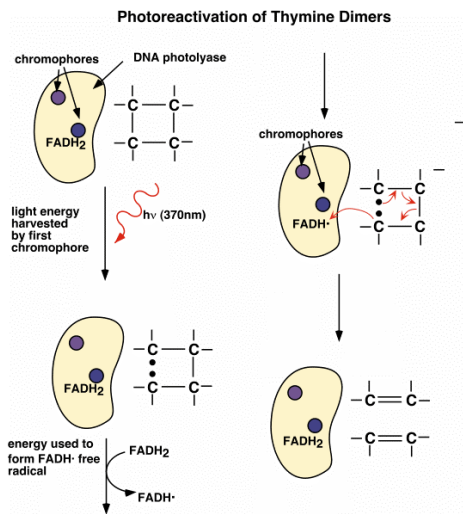
- 1) Teplota – denaturace, deaminace bazí, ztráta bazí glykosylickou hydrolyzou
- 2) UV záření – vznikají pyrimidinové dimery, 6-4 fotoprodukty
- 3) Ionizující záření – poškození bazí, jejich fragmentace, zlomy
- 4) Chemické modifikace – velký počet

Reparace byla první prozkoumána u *E. coli* s různými mutacemi při působení UV záření. Proto probereme první UV-poškození a související reparační procesy u bakterií.

6.1. Základní systémy reparace

6.1.1. Fotoreaktivace – prokaryotní i eukaryotní buňky

První systém reparace se nazývá fotoreaktivace. Uskutečňuje se působením jednoho enzymu, DNA-fotoliázy (obr. 86). Tento enzym štěpí dimery. Energie pro štěpení kovalentní vazby cyklobutanového kruhu se čerpá pohlcením světla (370 nm) chromofory. *Vlastnosti fotoliázy E. coli*: (1) phr gen, 54 kd, monomer, (2) izolován – modrá barva, absorbuje při 380 nm, (3) obsahuje chromofory FADH₂ a pterin, (4) reparuje pyrimidinové dimery rychlostí 25/min/molekulu, (5) stimuluje ABC nukleázu. Vazba PL (fotoliázy) na DNA je (1) velmi selektivní – váže se na dimery, (2) nezávislá na formě DNA (relaxovaná supercoiled, ssDNA apod), (3) rozpoznává cyklobutanový kruh (2 kovalentní vazby), jiné dimery nepozná, (4) PL asociuje s 6-7 páry bazí v okolí dimeru, zapadá do menšího žlábků DNA. *Mechanismus reparace je následující*:



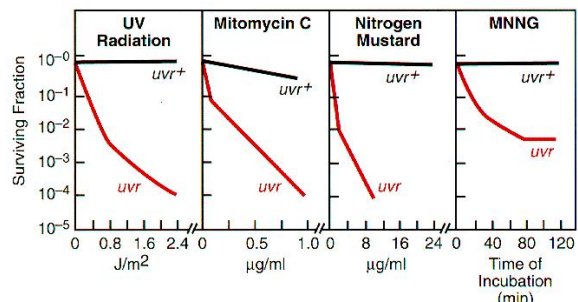
Obr. 86. Fotoreaktivace thyminových dimerů

(1) aktivuje se enzym přes pohlcení světla oběma chromofory, (2) FADH₂ (flavin) je excitován a předává elektron dimeru, čímž zruší příčnou vazbu, (3) role druhého chromoforu je pravděpodobně zaplnění místa po odevzdaném elektronu v molekule flavinu

Fotoreaktivace byla nalezena u mnoha organismů včetně ryb, plazů ale nebyla nalezena u savců. U člověka existuje gen CRY, jenž je sekvenčně podobný fotoliáze, není však schopen fotoreaktivace (uplatnění při nastavení denních rytů).

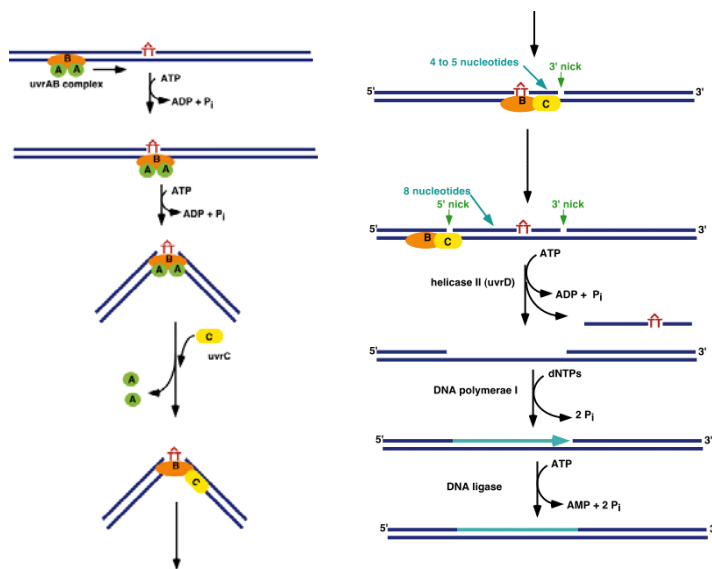
6.1.2. Nukleotidová excisní reparační (NER)

V 60. letech se podařilo vydělit mutanty *E. coli* citlivé k UV-záření. Nyní víme, že u těchto kmenů byla zablokována reparační DNA nukleotidovou excisní cestou (obr. 87). Excisní reparační dimerů se uskutečňuje působením *uvrABC* systému. Při nalezení dimeru *uvrAAB* proteinem dochází k odpojení *uvrA* proteinu a k připojení *uvrC*. Tento komplex štípně páteř DNA v blízkosti dimeru. Část řetězce je odstraněna *uvrD* proteinem – helikázou II



Obr. 87. Citlivost *uvr-* kmenů *E. coli* k UV-záření a různým mutagenům

(obr. 88). UvrA protein má 2810 bp, je to ATPáza, funguje v dimeru a disponuje vazebnou aktivitou k DNA. Poznání substrátu souvisí s deformací helikální struktury DNA. Dimer odtáčí helix o 19-20 stupňů a vytváří přehyb o velikosti 27 st., který zasahuje do velkého žlábkku do vzdálenosti přibližně 0.26 nm.



Obr. 88. Excisní reparace dimerů se uskutečňuje působením uvrABC systému. Komplex uvrAuvrB skenuje DNA a vyhledává dimery. Při jejich nalezení dochází k odpojení uvrA proteinu (ATP závislá reakce) a k připojení uvrC. Tento komplex (uvrBuvrC) štípně páteř DNA v blízkosti dimeru. Část řetězce je odstraněna uvrD proteinem – helikázou II za dodání energie z ATP. Další proces se uskuteční jako prostá syntéza polymerázou a ligázou.

aktivitou k DNA. Poznání substrátu souvisí s deformací helikální struktury DNA. Dimer odtáčí helix o 19-20 stupňů a vytváří přehyb o velikosti 27 st., který zasahuje do velkého žlábkku do vzdálenosti přibližně 0.26 nm.

Uvr B protein má 2019 bp, neváže se k DNA samostatně, pouze spolu s uvrA, nemá ATPázovou aktivitu. UvrC protein má 1764 bp, váže se k uvrB na DNA (1 i více molekul) a způsobuje excisi. Naštípnutí je současné na obou místech, nikoliv postupné. Štěpí 8-mou fosfodiesterickou vazbu ve směru 5' od poškození a 4-tou nebo 5-tou ve směru 3', což dává 12-13. mer. Gen uvrC odpovídá u člověka ERCC1 gen, u kvasinek RAD10 gen,

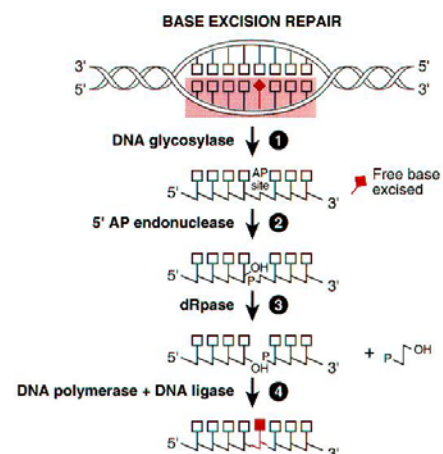
uvrD genu (helikáze) odpovídá ERCC2 u člověka a RAD3 u kvasinek. U člověka je excizní reparační systém složitější – 4 geny (XPC, DDB, XPA, RPA) se mohou vázat k DNA. Geny uvrB odpovídají dva geny XPB a XPD, které jsou oba potřebné pro vznik pre-incizního stavu. Pro incisi jsou potřebné dva geny XPG a XPF – pro každou zvláště – místo uvrC u E.coli. Celý komplex disociuje s 24-32 oligonukleotidem, mezeru zaplní pol δ nebo ϵ a ligáza LIG1

6.1.3. Excisní reparace poškozených bazí (BER)

Dochází k odstranění poškozených bazí (nikoliv nukleotidů), kdy se nejprve hydrolyzuje N-glykosylická vazba mezi deoxyribózou a cukrem a pak se odstraní báze DNA glykosylázou (obr.89). Vzniká AP místo (apurinové nebo apyrimidinové), které se opraví endonukleázou (štípně páteř DNA v blízkosti AP místa) a dRpázou (deoxyribosofosfodiesterazou). Vloží se nukleotid polymerázou a páteř se spojí ligázou.

DNA glykosylázy: (1) malé molekuly 20-30 kD, velmi specifické (např. uracil, hypoxantin, 3-metyladenin, hydroxymetyluracil apod), záření vyvolává např. 4,6-diamino-5-FAPY (formamido-pyrimidin), který odstraňuje enzym genu fpg (30 KD). Hydroxymethyluracil vzniká rovněž působením záření nebo jiných oxidačních činidel

AP endonukleázy:(1) štípnou fosfodiesterickou vazbu 3' nebo 5' od AP místa (podle toho existují 4 druhy endonukleáz a štípnou buď na 3' straně nebo 5' straně od AP a vzniká 3'OH + 5'PO₄, 3'PO₄ + 5'OH).



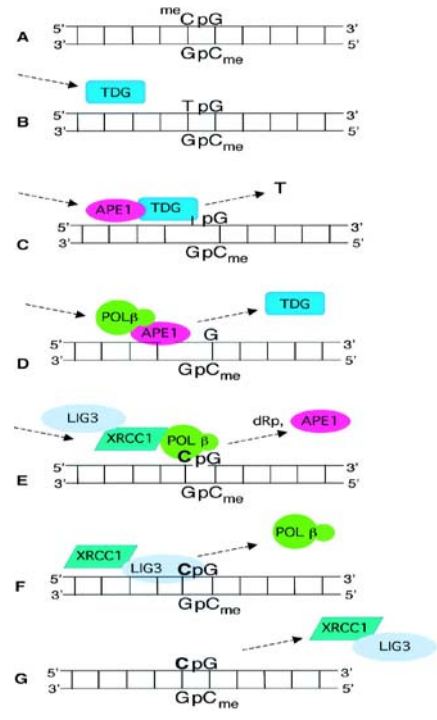
Obr. 89. Excisní reparace bazí (standardní schéma).

(2) jsou různé druhy endonukleáz, např. endo IV – mutanti citliví k alkylujícím činidlům (mitomycin C, bleomycin), endo V – degraduje DNA s uracilem, u člověka existují také AP endonukleázy

6.1.4. Excizní reparace poškozených bazí u člověka (obr.90)

U člověka existují 3 odlišné glykosylázy pro oxidativní poškození a čtvrtá pro alkylované puriny. Další 4 mohou odstranit uracil z DNA (např. UNG glykosyláza je homologická Ung enzymu E.coli, asociuje se s replikační vidlicí a odstraňuje chybně vložený uracil naproti adeninu). SMUG1 je unikátní pro vyšší eukaryoty a odstraňuje uracil vzniklý po deaminaci cytosinu v DNA). Byla nalezena pouze 1 endonukleáza pro AP místa (APE1). Delece tohoto genu způsobuje embryonální letalitu u myši. Na obr. 91 je znázorněna reparace residua po deaminaci 5-methylcytosinu– thyminu.

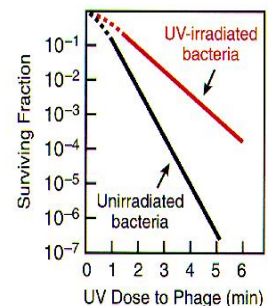
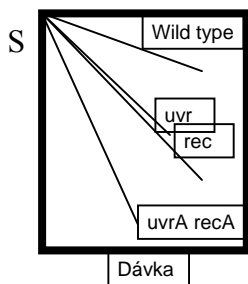
Obr. 90. Excizní reparace bazí u člověka. Nejprve se hydrolyzuje N-glykosylická vazba mezi deoxyribozou a cukrem a pak se odstraní báze DNA glykosylázou. Endonukleáza štípe páteř DNA v blízkosti AP místa. Vloží se nukleotid polymerázou a páteř se spojí ligázou.



Obr. 91. Reparace residua po deaminaci 5-methylcytosinu – thyminu. TDG glykosyláza odstraní thymin a přivolá APE1 nukleázu, ta očistí okraj a přivolá POL β, ta vsadí cytosin a přivolá LIG3-XRCC1 komplex.

6.1.5. SOS reparace

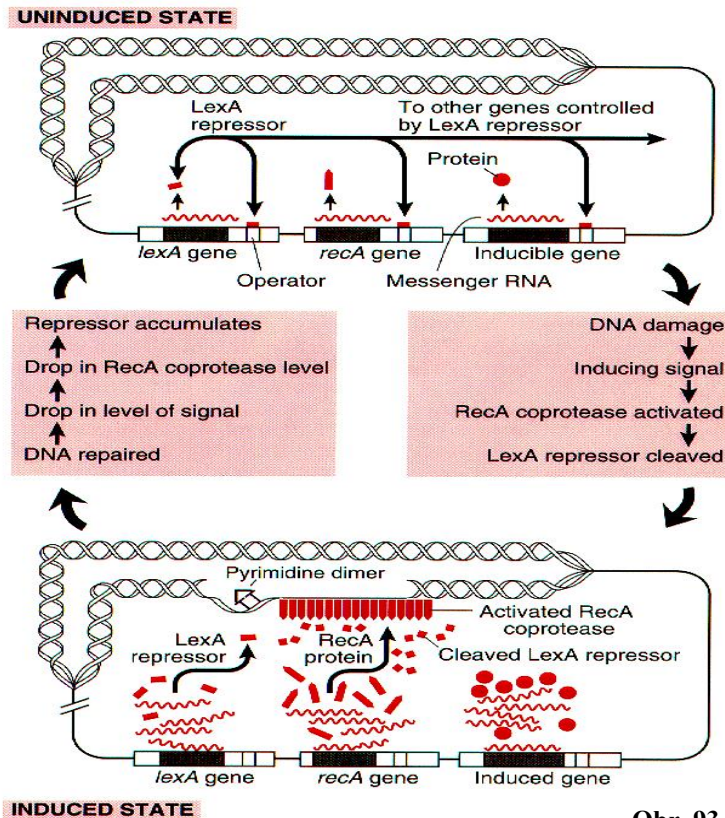
V 60-tých létech byli izolováni mutanti *E. coli* citliví k UV-světlu. Nejzajímavější byli mutanti *uvrA* a *recA*, u nich u obou byla citlivost k UV podstatně větší než u buněk standardního (divokého) kmene. Ukázalo se, že existuje dvojitý mutant *uvrA recA*, jehož citlivost je ještě daleko vyšší, u kterého existuje pouze fotoreaktivace, tj. reparace závislá na světle. Existence dvou typů mutovaných buněk se zvýšenou citlivostí k UV záření nezávislých na sobě svědčila o existenci dvou reparačních systémů. Skutečně bylo zjištěno, že existuje NER reparace, kterou jsme již probrali a SOS reparace, o které se nyní zmíníme. Oba tyto reparační systémy jsou velmi efektivní při reparaci UV poškození, ale i zlomu DNA po působení ionizujícího záření.



6.1.5.1. W-reaktivace fágových částic

Při ozáření bakteriofága dochází k jeho poškození a ztrátě funkce. Čím je větší dávka, tím méně fágových částic přežívá (je schopno infikovat bakterii). Jestliže však bakterie předtím ozáříme, přežije více fágových částic – tomu se říká W-reaktivace (Weigle) (obr. 92). Tento jev byl první, který svědčil o existenci jistého indukibilního reparačního systému u bakterií.

Obr. 92. Přežití fágových částic po ozáření nositele (baktérií)



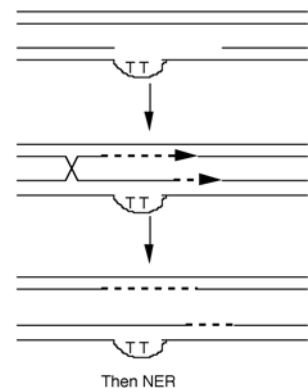
Obr. 93.

recA-proteáze), hydrolýza lexA odblokuje syntézu řady genů, včetně recA, který pak má ještě další funkce – nasedá na DNA a chrání jí v průběhu reparace, způsobuje rekombinaci (obr. 93 dole). Jakmile je poškození reparováno, klesne úroveň proteázy, lexA protein nasedne na operátorová místa a zablokuje syntézu.

6.1.5.3. SOS (postreplikativní) reparace

SOS systém umožňuje reparaci DNA v průběhu replikace – na poškození se polymeráza zastaví, disociuje od DNA a syntéza je inicializována ve vzdálenosti 1000 bp dál podél řetězce, zanechávající mezeru s poškozenou bazí (nebo dimerem) (obr. 94). RecA protein se váže k ssDNA a má schopnost přenést do této mezery řetězec ze sesterského duplexu (chromatidy), který má nepoškozený templát. Tento „crossing over“ zanechává malé gapy, které se uzavřou polymerázou a ligázou.

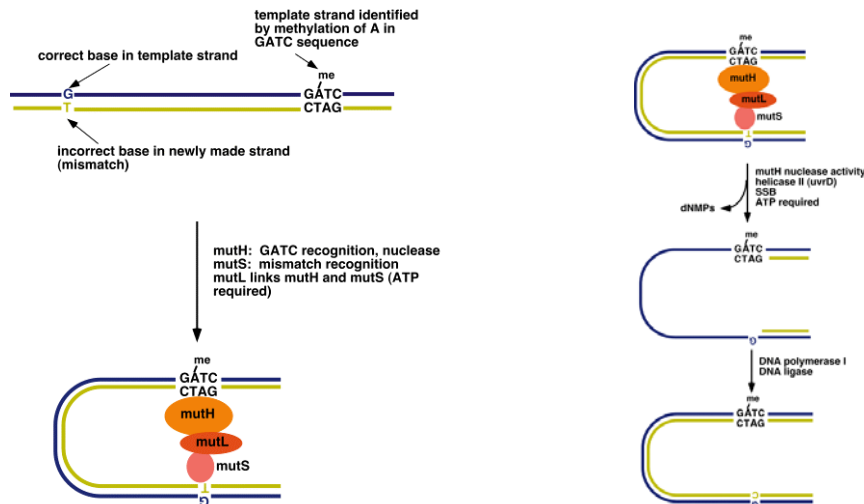
Poškození se neodstraní – pouze dochází ke zředění a poškození čeká na další reparaci (pokud je možná).



Obr. 94. Schéma post-replikativní reparace.

6.1.6. Mismatch reparace

Po replikaci se při chybně vloženém nukleotidu oprava děje tzv. „mismatch repair“ s využitím genů mutHLS (obr. 95). mutH se váže na GATC sekvenci s metylovaným A – tím se pozná starý řetězec DNA, mutS se váže na nespárované místo. MutL spojí mutH a mutS a dojde k vyštěpení řetězce za pomoci helikázy (uvrD).



Obr. 95. Mismatch reparace. V nově syntetizovaném řetězci máme nesprávnou bázi. Starý řetězec pozná mutH protein podle metylovaného adeninu v sekvenci GATC, přitáhne mutL a mutS se váže na nespárované místo. Řetězec se degraduje a resyntetizuje.

6.2. Reparace zlomů DNA

6.2.1. Stručný přehled reparačních systémů

SSB se většinou reparují velmi rychle s využitím stejných reparačních systémů jak BER nebo NER. Existují však různé typy SSB – část se reparuje ligázou, část s použitím excizní reparace a zbývající poškození těžšího kalibru indukují SOS-reparaci.

DSB se reparují pomocí rekombinace, což u E.coli při 1 genomu na buňku není možné. Replikace u bakterií však probíhá synchronně a doba zdvojení může být kratší než je doba replikace – pak je na buňku více genomů (např. 6-8 kopií). Pak je možná rekombinace.

U savčích buněk se reparují DSB prostým spojením konců. To vyžaduje enzymy, které konce rozpoznají a dotáhnou je k sobě. Reparace nevyžaduje homologii a nazývá se nehomologní spojování konců (NHEJ- nonhomologous end-joining). Pro tuto reparaci je důležitý protein Ku. Je to heterodimer podjednotek Ku70 a Ku80. Defekt této reparace vede ke vzniku translokací.

Dalším typem reparace DSB u savčích buněk je homologní rekombinační reparace. Tato reparace probíhá na sesterských chromatidách (G2 fáze cyklu) nebo s pomocí homologního chromosomu – v G1 fázi to předpokládá hledání tohoto homologa v jádře, což je málo pravděpodobné, proto se předpokládá, že v G1 probíhá pouze NHEJ. Další možnost je u chromosomů s duplikovanou sekvencí.

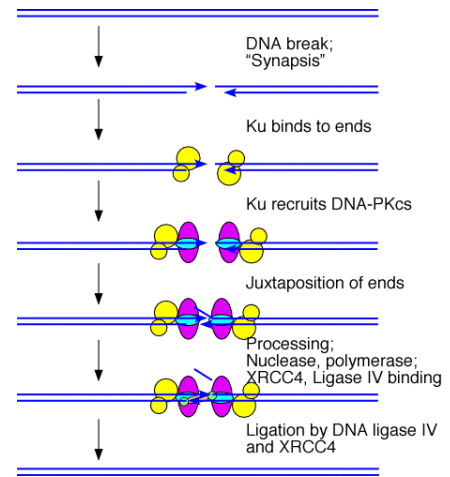
6.2.2. Nehomologní spojování konců (NHEJ reparace)

Jedná se o proces, při kterém se podrží pohromadě konce vzniklého DSB, očistí se a spojí se opět dohromady, byť se ztratí informace. Tento typ reparace nepotřebuje homologní DNA, a proto může probíhat i v G1 fázi buněčného cyklu. Dá se zdůvodnit tím, že genom u savčích buněk obsahuje obrovské množství redundantní informace a ztráta této informace v oblastech nekódující DNA nemusí být pro buňku kritickou. U diferencovaných buněk s omezenou potřebou replikace se tak může jednat o přiměřený způsob opravy DNA.

Proteiny, které se účastní: (1) DNA ligáza IV – kooperuje s XRCC4 na spojení konců po jejich patřičném opracování; (2) XRCC4 - analog LIF1 genu u kvasinek – spojení konců XRCC5 – analog HDF2 u kvasinek – označuje se nyní jako Ku80 – spolupracuje s Ku70 nasedá na konce a spojuje je; (3) XRCC6 – analog HDF1, označuje se Ku 70, je velmi hojný

tvorí heterodimer s Ku80, nasedá na konce a rozplétá je částečně; (4) XRCC7 – DNA protein kináza – aktivuje Artemis; (5) ARTEMIS – nukleáza regulovaná PKcs, připravuje konce pro ligázu.

Mechanismus reparace: Oba zlomy jsou podrženy pohromadě v tzv. synapsi následujícím způsobem (obr. 96): (1) Ku proteiny nasednou na konce zlomů a interagují mezi sebou (tj. drží konce u sebe); (2) Ku přivolají protein kinázu PKcs, která se asociuje s ARTEMIS endonukleázou a aktivuje ji, aby očistila konce (ořezala jednořetězcové zbytky); (3) Po očištění se konce spojí – účastní se DNA ligáza IV a XRCC4 protein.

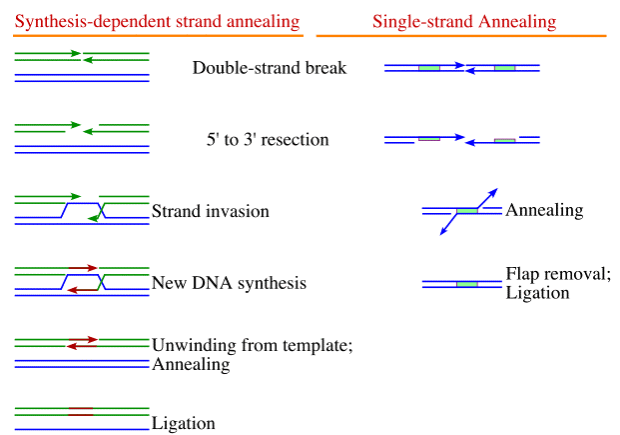


Obr. 96. Nehomologní spojování zlomů DNA (NHEJ) reparace

6.2.3. Rekombinační reparace u savčích buněk

Existují dva dobře dokumentované procesy – SDSA (synthesis dependent strand annealing) a SSA (single-strand annealing). V prvním případě (obr. 97 vlevo) dochází k invazi řetězce DNA jednoho konce zlomu do homologní oblasti druhé molekuly DNA a vytvořený D-loop (odchlípení) se naváže do oblasti zlomu. Podle tohoto úseku se potom syntetizuje úsek DNA v místě zlomu. Podobně se ve druhé molekule syntetizuje chybějící část řetězce. Poté dojde k oddělení obou molekul. Tento typ reparace probíhá teoreticky bez ztráty informace.

Druhý proces (SSA) probíhá tam, kdy zlom vznikl mezi dvěma homologními úseky DNA (obr. 97. vpravo). Zlom vede k obnažení homologních sekvencí, které se na sebe navážou a dojde ke spojení DNA, která je o úsek mezi homologiemi kratší. Rekombinační reparace může nastat tam, kde je k dispozici homologní DNA, tedy i v G1 fázi, kde se ovšem těžko hledá homolog (vzhledem k malé pohyblivosti chromatinu).

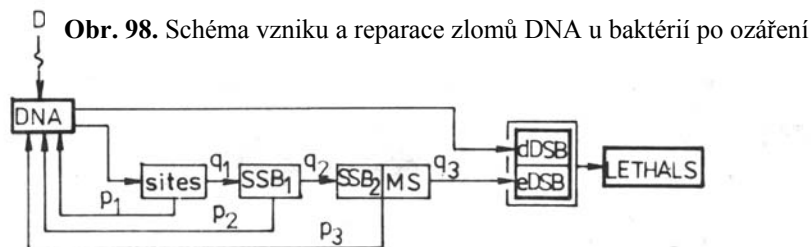


Obr. 97. Rekombinační reparace

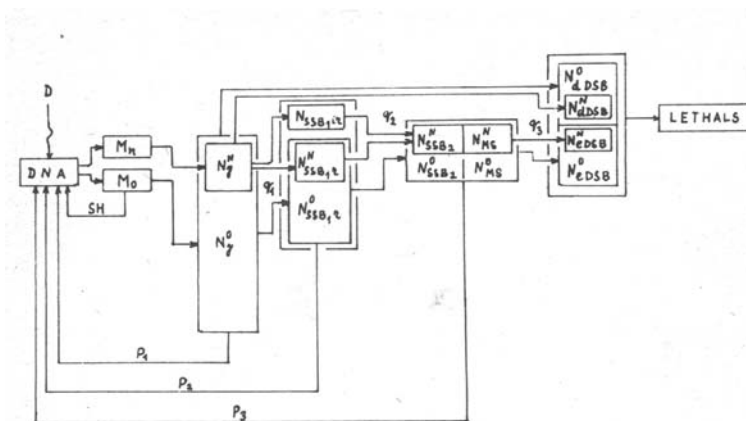
6.3. Hierarchie reparace zlomů u bakterií

6.3.1. Schéma reparace zlomů DNA

Prvotní zlomy DNA (DNA sites) se mohou zčásti reparovat velmi rychle DNA ligázou (obr. 98). Tato poškození mohou částečně představovat a částečně z nich vznikají (např. excizní reparací BER z poškozených bazí) jednoduché zlomy (SSB1). Zlomy jsou převážně reparovány enzymy excizní reparace (polA polymerázou). Část těchto zlomů se transformuje na SSB2, což jsou dlouhé mezery v DNA (gapy). K této transformaci dochází působením recBCD nukleázy kvůli poškození konců, nebo z jiných příčin, jestliže na zlom narazí replikační mechanismus. Tyto gapy pokud nejsou chráněny recA proteinem, se transformují na DSB (DSB enzymatického původu) a jsou letální u kmene *E. coli* recA. Proto je označujeme také jako metastabilní stavy (MS). DSB jsou letální u buněk standardního kmene (wild type).



V přítomnosti kyslíku se ve srovnání s anoxií podstatně liší spektrum poškození (obr. 99). Tento rozdíl je zachycen na dalším schématu. M_N a M_O jsou radikály DNA, v nepřítomnosti kyslíku se M_O prostě „reparují“ na fyzikálně-chemické úrovni pomocí endogenních molekul obsahujících SH skupinu (thiolů). Z prvotních zlomů (N_γ) se část reparuje, jak v přítomnosti

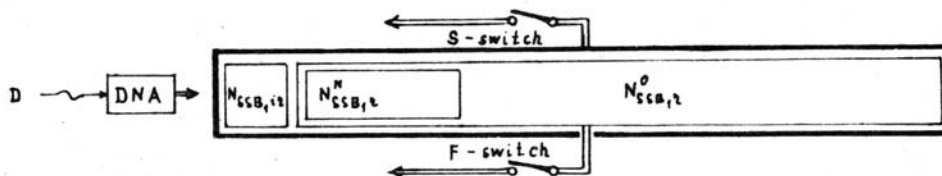


Obr. 99. Schéma reparačních procesů v anoxii a za přítomnosti kyslíku

kyslíku, tak bez něho (p_1) a vznikají zlomy, které jsou reparovány enzymy excizní reparace. Část těchto zlomů je nereparovatelná excizní reparací ($N_{SSB_{1,ir}}$) a vyžaduje indukci SOS systému. SOS systém je posledním reparačním systémem, který je indukován $SSB_{1,ir}$ a také částí $SSB_{1,r}$ – pokud se nestihly reparovat rychlým typem polA-závislé reparace.

6.3.2. Model reparace zlomů u *E.coli*

Nyní si schéma zjednodušíme a připustíme existenci dvou (hlavních) reparačních systémů – rychlé (excizní) reparace a pomalé (SOS reparace). Množství zlomů označíme $N_{SSB1,ir}$ - pro zlomy nereparabilní rychlou (F-fast) reparací, $N_{SSB1,r}$ – reparabilní zlomy v anoxických podmínkách s indexem N a za přítomnosti kyslíku s indexem O. Existence nereparabilních zlomů je zřejmá. Hypotézou modelu je nezávislost $N_{SSB1,ir}$ na přítomnosti kyslíku. Takovými poškozeními mohou být např. komplexní zlomy doprovázené poškozením báze (bází).



Obr. 100. Zjednodušené schéma reparace, S-switch a F-switch znamená přepínače, které můžeme vypínat použitím určitého reparačně defektního kmene bakterií. Typy poškození jsou popsány v textu.

Nechť redukce zlomů reparovaných rychlou reparací je F a pomalou je S. Pak dostaneme pro počet zlomů zbylých po reparaci (pomalá reparace je schopna reparovat i $N_{SSB1,ir}$).

$$N_{let} = \frac{N_{SSB1,r}}{F \cdot S} + \frac{N_{SSB1,ir}}{S}$$

Zkusíme využít experimentálních výsledků, abychom stanovili parametry modelu (předpokládáme, že 37% buněk hyne jestliže je v populaci v průměru 1 letální událost – nereparovaný zlom -na buňku):

Kmen	N_{let}	OER
rec A	0.062	1.8
Wild type	0.01	3.4
pol A	0.049	4.6

Pro kyslíkový poměr pak dostaneme:

$$OER = \frac{N^O_{SSB1,r} / F + N_{SSB1,ir}}{N^N_{SSB1,r} / F + N_{SSB1,ir}}$$

6.3.2.1. Určení parametrů modelu

Zkusíme spočítat parametry podle naměřených údajů pro reparačně defektní buňky. OER pro mutanty *E.coli* s defektem excizní reparace, tj. *polA1*- kmen, je největší ze všech mutantů (pro *polA1* kmen by mělo platit, že $F=1$):

$$OER^{pol} = 4,6 = \frac{N^O_{SSB1,r} + N_{SSB1,ir}}{N^N_{SSB1,r} + N_{SSB1,ir}}$$

Střední letální dávka, která odpovídá počtu nereparovaných DSB pro *recA* kmen je podle tohoto modelu:

$$N_{let,recA} = 0,062 = N^O_{SSB1,r} / F^{rec} + N_{SSB1,ir}$$

Kyslíkový poměr pro recA buňky je pouze 1,8 a platí tedy:

$$OER^{rec} = 1,8 = \frac{N_{SSB_{1r}}^0 / F^{rec} + N_{SSB_{1ir}}}{N_{SSB_{1r}}^N / F^{rec} + N_{SSB_{1ir}}}$$

Odtud plyne, že počet zlomů nereparovatelných rychlou reparací u buněk recA souvisí jednoznačně s objemem rychlé reparace:

$$N_{SSB_{1ir}} = 0,026 \cdot \frac{F^{rec}}{F^{rec} - 1}$$

Vzhledem k tomu, že recA buňky mají excizní reparaci v pořádku, je $F^{rec} \gg 1$. Proto bude produkce zlomu blízká $N_{SSB_{1ir}} = 0.026 \text{ Gy}^{-1} \text{ genom}^{-1}$.

Dále pak pro buňky recA platí:

$$N_{SSB_{1r}}^0 / F^{rec} = 0,033 \quad F^{rec} = 30 \cdot (N_{SSB_{1r}}^0 - 0,029)$$

Pro polA máme podobně:

$$S^{pol} = 20 \cdot (N_{SSB_{1r}}^0)$$

Jestliže dosadíme pro $N_{SSB_{1r}}^0 = 2.2 \cdot 10^{-12} \text{ cGy}^{-1} \cdot \text{D}^{-1} = 0.66 \text{ Gy}^{-1} \text{ genom}^{-1}$ (ve shodě s mnoha experimentálními výsledky) pak dostaneme pro

$$F^{rec} = 18.9 \quad \text{a} \quad S^{pol} = 13.2.$$

Pro počet letálních zlomů a OER buněk standardního (divokého) kmene platí (experimentální hodnoty jsou dosazeny) :

$$N_{let,wt} = 0,01 = \frac{N_{SSB_{1r}}^0}{F^{wt} \cdot S^{wt}} + \frac{N_{SSB_{1ir}}}{S^{wt}} \quad OER^{wt} = 3,4 = \frac{N_{SSB_{1r}}^0 / F^{wt} + N_{SSB_{1ir}}}{N_{SSB_{1r}}^N / F^{wt} + N_{SSB_{1ir}}}$$

Z těchto rovnic lze vypočítat:

$$F^{wt} = 3.6 \quad \text{a} \quad S^{wt} = 21.2$$

Výsledky výpočtů jsou tedy:

Kmen	F	S
rec A	18.9	1
wild type	3.6	21.2
pol A	1	13.2

Je vidět, že rychlá (excizní) reparace je u recA kmene efektivnější, než u standardního kmene při stejných podmínkách kultivace. Pomalá reparace u polA kmene je naopak méně efektivní ve srovnání se standardním kmenem.

6.3.2.2. Parametry modelu pro kmeny *E. coli* defektní v uvr endonukleáze.

Pro buňky uvrA, tj defektní v nukleotidové excizní reparaci budou přispívat k letálnímu efektu pyrimidinové dimery vzniknuvší po ozáření. Jejich příspěvek při ozáření γ -zářením je $0.042 \text{ Gy}^{-1} \text{ genom}^{-1}$. PD mají vlastnosti velmi podobné Nssb1,ir, protože jsou nezávislé na kyslíku. Reparovat se budou pomalou reparací, při které však bude jejich počet zředován, ale nebudou odstraněny. Bude platit:

$$N_{let,uvr} = \frac{N^0_{SSB_{1r}}}{F^{rec} S^{wt}} + \frac{N_{SSB_{1,ir}}}{S^{wt}} + \frac{N_{PD}}{Q^{uvr}} \quad OER^{wt} = \frac{N^0_{SSB_{1r}} / F^{wt} + N_{SSB_{1,ir}} + N_{PD} \cdot (S^{wt} / Q^{uvr})}{N^N_{SSB_{1r}} / F^{wt} + N_{SSB_{1,ir}} + N_{PD} \cdot (S^{wt} / Q^{uvr})}$$

Z hodnoty OER=2 dostaneme $S^{wt}/Q^{uvr}=2.1$ – tedy reparace PD je zhruba 2x méně efektivní než u ostatních zlomů na vstupu pomalé, tj. SOS reparace. Počet $N_{let,uvr}$ pak vychází 0.014, což je ve shodě s experimentem.

Podobně pro dvojitý mutant recAuvrA máme:

$$N_{let,uvr} = \frac{N^0_{SSB_{1r}}}{F^{rec}} + N_{SSB_{1,ir}} + N_{PD} \quad OER^{uvr} = \frac{N^O_{SSB_{1r}} / F^{rec} + N_{SSB_{1,ir}} + N_{PD}}{N^N_{SSB_{1r}} / F^{rec} + N_{SSB_{1,ir}} + N_{PD}}$$

Tyto hodnoty můžeme spočítat: $N_{let,uvr}=0.1 \text{ Gy}^{-1} \text{ genom}^{-1}$, $OER^{uvr}=1.35$, což je ve shodě s experimentem.

6.3.2.3. Parametry modelu v závislosti na podmínkách kultivace.

Podobně lze na základě modelu analyzovat i jiné kmeny *E. coli*. Je však třeba mít na paměti, že model je jednoduchý a odráží pouze určité aspekty reparace. Zajímavé je porovnat citlivost a kyslíkový efekt buněk standardního kmene pěstovaných v různých podmínkách (různě bohatá půda). Pro tyto různé podmínky se bude lišit poměr příspěvků obou hlavních reparačních systémů (vzhledem k tomu, že SOS reparace je závislá na energii a tedy podmínkách růstu). Předpokládejme, že hodnoty F a S pro oba reparační systémy jsou ve vztahu:

$$(F-1) \cdot (S-1) = K.$$

Toto je empirická formule, která má tu vlastnost, že pro větší rychlost SOS reparace se zmenšuje objem polA-závislé reparace a naopak. Pokud se F nebo S blíží 1, objem opačné reparace se rychle zvětšuje. Koeficienty b a K lze určit z experimentu a činí: $b=0.7$ $K=21.5$. Čím méně vydatné bude médium, tím větší bude citlivost buněk (více nereparovaných zlomů) a tím bude menší kyslíkový poměr.

VII Cytogenetická úroveň účinku záření na buňku

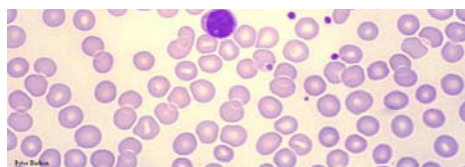
7.1. Příprava a pozorování preparátů

7.1.1. Fixace a barvení buněk

Buňky se oddělí od média pomocí centrifugy (obr.101), fixují se na mikroskopické skličko obvykle použitím metanolu a kyseliny octové (obr. 102), barví se různým způsobem (viz dále) a prohlížejí se pod mikroskopem (obr. 103).



Obr. 101. Centrifuga



Obr. 102.
Mikroskopické skličko



Obr. 103. Mikroskop

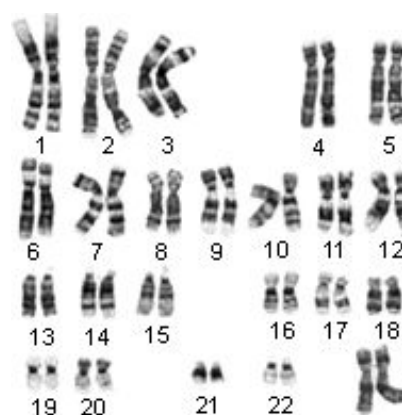
7.1.2. Klasické barvení mitotických chromosomů

Mitotické chromosomy lze snadno obarvit např. Giemsou (obr. 104). Výsledkem jsou tmavé (G-pruhy) a světlé pruhy (R-pruhy), které jsou charakteristické pro daný chromosom (lze je odlišit, poznat). Světlemjší pruhy odpovídají euchromatinu tmavé heterochromatinu. Chromosomy se dělí podle velikosti, podle polohy centromery a podle pruhů. Karyotyp člověka sestává ze 46 chromosomů (viz obr. 105).



Chromosom 11

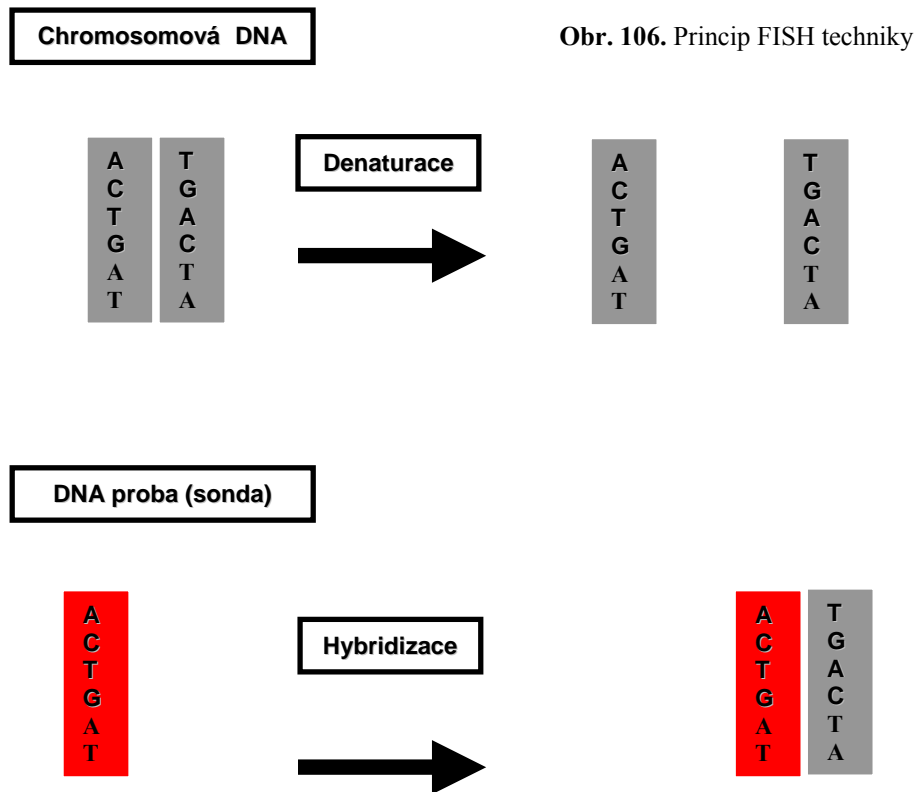
Obr. 104. Mitotický chromosom 11 s G- a R-pruhy. R-pruhy jsou světlejší a odpovídají euchromatinu na interfázních chromosomech.



Obr. 105. Světlemjší pruhy odpovídají euchromatinu tmavé heterochromatinu. Chromosomy se dělí podle velikosti, podle polohy centromery a podle pruhů.

7.1.3. Barvení chromosomů FISH technikou

V 80-tých letech 20. století byla zavedena tzv. FISH technika neboli technika fluorescenční in situ hybridizace (obr.106). Je založena na schopnosti DNA rozdělit se na dva komplementární řetězce a opět se spojit, přičemž pro toto spojení je potřebný vysoký stupeň homologie (stejný kód obou spojovaných řetězců). Pro obarvení části DNA lze použít značenou sondu (fragment

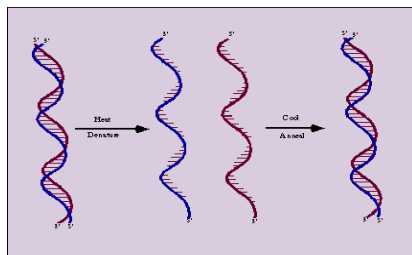


Obr. 106. Princip FISH techniky

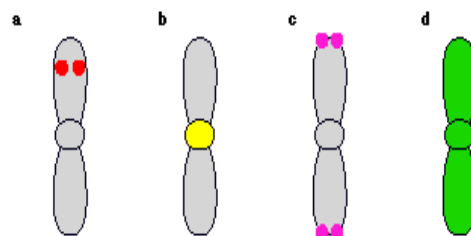
DNA konjugovaný s fluorochromem – na obrázku červeně), který necháme nasednout na genomovou DNA předem připravenou tak, aby řetězce byly odděleny od sebe. Sonda si najde své komplementární místo a nasedne na něj. Tak přinese fluorochrom právě do místa, které nás zajímá. Přítomnost fluorochromu se pak zkoumá ve fluorescenčním mikroskopu.

7.1.3.1. Denaturace DNA, druhy sond, hybridizace

Denaturace se provádí obvykle jak u chromosomové DNA na preparátu, tak u sondy, která se použije pro hybridizaci. K oddělení řetězců dochází při zvýšené teplotě obvykle ještě v přítomnosti formamidu (obr. 107). Různé typy DNA sond jsou uvedeny na obr. 108.



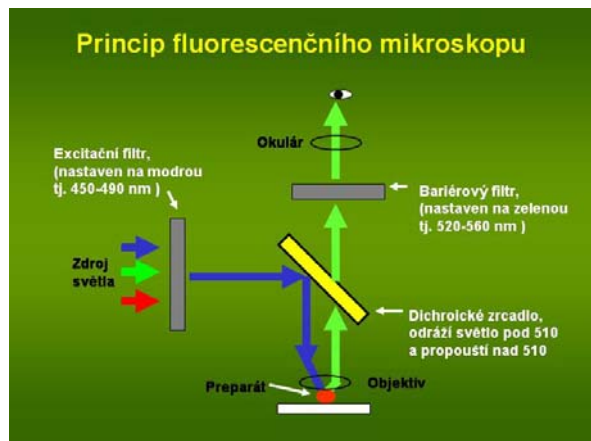
Obr. 107. Denaturace a renaturace DNA



Obr. 108. a) Sondy specifické pro určité geny (sekvence)
 b) Sondy pro repetitivní sekvence v okolí centromer
 c) Sondy specifické pro telomery
 d) "Paintingové" sondy pro celé chromosomy

7.1.3.2. Pozorování signálu pod mikroskopem

Mikroskopování je v dnešní době velmi náročnou technologií. Velmi rozšířenou je fluorescenční mikroskopie, která má velmi výhodný poměr signál/šum. Princip fluorescenční mikroskopie je znázorněn na obr. 109. Fluorochrom je excitován určitou vlnovou délkou a emituje světlo o jiné vlnové délce. Proto lze světlo zdroje zablokovat bariérovým filtrem. V nepřítomnosti signálu je tak pozadí zcela tmavé. Často se využívá několika fluorochromů, jež umožňují obarvit více struktur. Pozorování pak může být sekvenční, kdy postupně přepínáme jednotlivé filtry, nebo můžeme pozorovat více barev najednou použitím dvoj- nebo trojcestného filtru (excitačního i bariérového). Obraz většinou snímáme použitím kamery vybavené chlazením. Takto se může obraz snímat delší dobu (do 30s).



Obr. 109. Princip fluorescenčního mikroskopu. Je zobrazena cesta světla a jednotlivé filtry.

7.2. Chromosomy

Genom je v eukaryotických buňkách rozdělen na několik částí, které se nacházejí v tzv. chromosomech. Chromosom se liší stupněm kondenzace mezi interfází a mitózou, kdy jsou kondenzovanější a tvoří útvary podobající se písmenku X. V mitóze jsou chromosomy dobře viditelné i v klasickém mikroskopu, ale zejména po obarvení (viz předchozí kapitola). Chromosom obsahuje nejen určitý úsek DNA, ale také proteiny a RNA. Struktura chromosomů a její funkční aspekty jsou v současnosti předmětem intenzivního výzkumu.

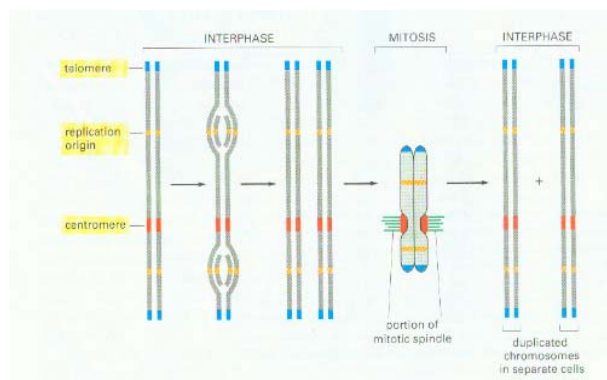
7.2.1. Významné sekvence na chromosomech

Na chromosomech rozlišujeme několik významných míst – jsou to centromery, telomery a počátky replikace (obr. 110). Centromery jsou identifikovatelné jako místa konstriktce, v nichž jsou chromatidy spojeny k sobě, jsou odpovědné za segregaci chromosomových teritorií (CT), jsou fixovány na určité místo v CT a mají určitou sekvenci. Tyto sekvence mohou být stejné nebo podobné pro více CT.

Telomery. Při replikaci nastává problém na konci lineárních molekul DNA, který se řeší speciálními sekvencemi

(tandem GGGTTA – až 10 kbp), kde se váže enzym telomeráza, tj. enzym, který funguje v komplexu s krátkým úsekem RNA, podle kterého syntetizuje (jako reverzní transkriptáza) malé úseky DNA na koncích chromosomů. Těmto koncům chromosomů se říká telomery.

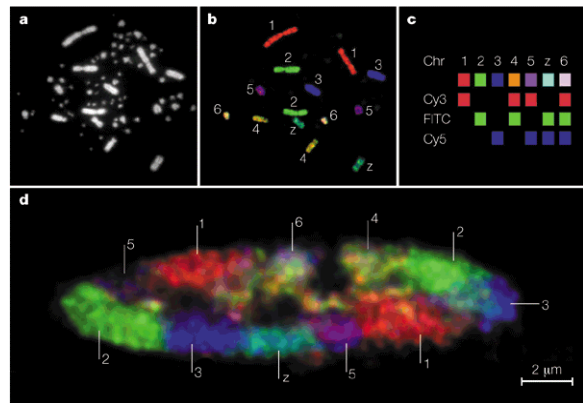
Počátky replikace obsahují specifické sekvence pro iniciaci replikace a je jich velký počet, takže doba replikace celého genomu trvá řádově několik hodin.



Obr. 110. Centromery, telomery a počátky replikace.

7.2.2. Chromosomová teritoria (CT)

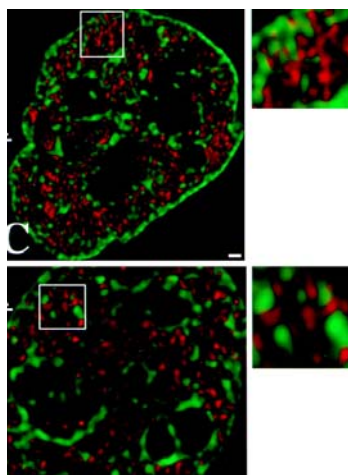
Již počátkem 20. století se někteří badatelé (Boveri, Rabl) domnívali, že chromosomy v interfázi si zachovávají svou identitu podobně jako v mitóze. První experimenty, které však vedly k závěru, že chromosomy se nacházejí v jádře v podobě ohraničených domén, byly až pokusy T. Cremera v létech 1982-1984. Zavedení FISH podstatně urychlilo poznání chromosomů jak v mitóze, tak v interfázi. Na obr. 111 vidíme chromosomy 1-6 obarvené různými barvami v tzv. multicolor FISH. Zřetelně je vidět oddělené prostorové útvary (teritoria). Chromosomová teritoria se nepromíchávají jak se původně myslelo. Velké chromosomy se nacházejí spíše na okraji jádra.



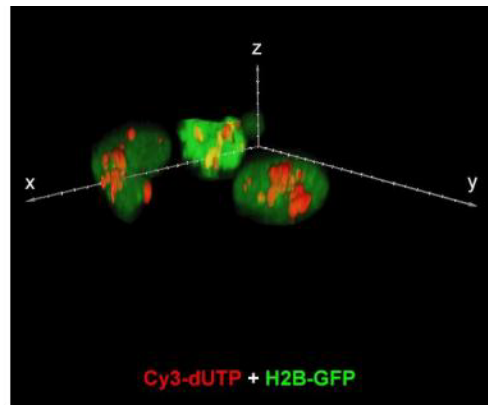
Obr. 111. Chromosomová teritoria obarvená multicolor FISH. Chromosom 1 je červený, 2 je zelený, 3 je modrý.

7.2.3. Pohyblivost chromatinu

Dlouhou dobu nebylo jasné, zda se chromatin v jádře pohybuje a jak rychle. První náznaky toho, že je chromatin v jádře poměrně stabilní byla pozorování dceřiných buněk pomocí FISH, kdy těsně po rozdělení měly tyto buňky přibližně stejnou nebo podobnou strukturu. Obarvení chromatinu in vivo pomocí GFP proteinu vyřešilo otázku pohyblivosti chromatinu. Bylo vcelku jednoznačně stanoveno, že pohyblivost genetických lokusů i celých chromosomových teritorií je malá. Při vizualizaci jednotlivých genů dospěla Bickmorová k závěru, že se tyto geny pohybují difúzním pohybem, ale jejich difúze je omezená poloměrem zhruba 0.5 µm.



Obr. 113. H2B+GFP a nascentní mRNA (BrUTP) + Cy3 ukazuje, že mRNA se nachází mezi chromatinem vizualizovaným pomocí GFP.



Obr. 112. Pohyblivost chromosomových teritorií byla zkoumána T. Cremerem pomocí „scratch techniky“ a H2b-GFP

Velikost difúzního

koeficientu se lišila podle polohy genů – u membrány nebo v blízkosti jadérka byla pohyblivost nejmenší. T. Cremer zkoumal pohyblivost teritorií obarvených tzv. „scratch technikou“, kdy se buňky mechanicky poškodí a do média se přidají prekursori syntézy DNA konjugované s Cy3 (obr. 112). Jádra buněk byla vizualizována pomocí konstruktů s expresí H2b-GFP. Pohyblivost CT byla jen malá.

7.2.4. Vnitřní struktura chromosomových teritorií

První model interfázního jádra navržený Cremerem spočíval v představě, že syntéza mRNA probíhá na povrchu chromosomových teritorií (CT) zatímco uvnitř jsou uschovány sekvence, které transkripci nepotřebují (utlumené geny a nekódující sekvence). Tato představa byla vyvrácena v experimentech Verschure, která ukázala, že i uvnitř CT dochází k transkripci (obr. 113).

7.3. Chromosomální aberace

7.3.1. Numerické aberace

Genom obsahuje 46 chromosomů, 22 párů autosomů a 1 pár pohlavních chromosomů buď XX nebo XY. Euploidní sada chromosomů jich má 23.

Polyploidie je pojem, který se vztahuje k násobku euploidního počtu. U člověka je diploidní sada 46 chromosomů, triploidní 69 atd. Polyploidie vzniká v důsledku poruch meiozy apod. Vede ke smrti jedince.

Aneuploidie je jakýkoliv počet chromosomů, který není násobkem euploidní sady. Monosomie – je přítomný pouze 1 chromosom z dvojice. Člověk s monosomií by měl 45 chromosomů.

Trisomie – jsou přítomny 3 chromosomy určitého typu, u člověka – 47 chromosomů. Všechny autosomální monosomie a trisomie s výjimkou trisomie 13, 18 a 21 vedou ke spontánním potratům. Uvedené trisomie mají za následek těžké poškození organismu (deformity končetin, nervového systému, srdce a mentální retardaci). Trisomie 13 a 18 vede ke smrti brzo po narození. Trisomie 21 je jediná autosomální trisomie, při níž se člověk dožívá dospělého věku. Pravděpodobnost trisomie silně závisí na věku matky – pro 20-letou je četnost 0.05%, pro více než 40-letou je to 3%.

Aneuploidie pohlavních chromosomů jsou čtenější, monosomie X je slučitelná s životem.

Monosomie X – Turnerův syndrom – malý vzrůst, záhyby kůže na krku, nedostatečný sexuální vývoj, vyvíjí se recesivní onemocnění vázaná na X chromosom, neboť chybí druhá kopie X chromosomu, která by maskovala účinek chybných alel přítomných v genech.

XXY – Klinefelterův syndrom – muži s nedostatečným sexuálním vývojem, sníženým intelektem. Počet X chromosomů může být i větší – nemoc je pak výraznější.

YYY syndrom – tento karyotyp byl objeven u vězňů. Výskyt je asi 0.1% v normální populaci, ale u vězňů je to 4.5 %. U tohoto onemocnění pozorujeme sklon k násilí, nižší intelekt.

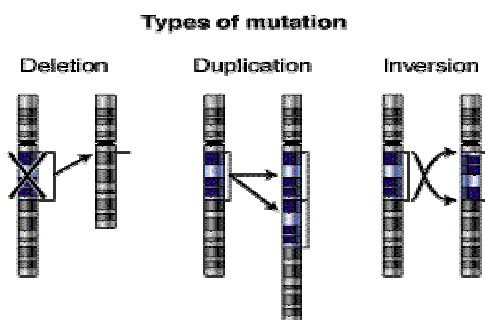
XXX syndrom – klinicky normální, vyšší četnost mentálních retardací a sterility. Více X chromosomů – výraznější manifestace onemocnění.

7.3.2. Strukturální aberace

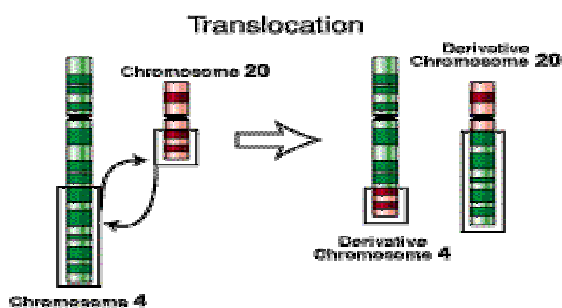
Jsou důsledkem zlomu a následného špatného spojení chromosomů nebo ztráty fragmentu (části chromosomu). Aberace může nastat spontánně při replikaci a může být indukovaná chemicky, ionizujícím zářením a UV zářením. Důsledky vzniku aberace závisí na tom, jak je rozsáhlá, kde na chromosomu a kde ve tkáni vznikne.

Inverze – rotace zlomeného chromosomového fragmentu a spojení v obrácené poloze

Duplikace – chromosomální segment je opakován



Obr. 114. Delece, duplikace a inverze



Obr. 114. Vznik translokace mezi chromosomy 4 a 20

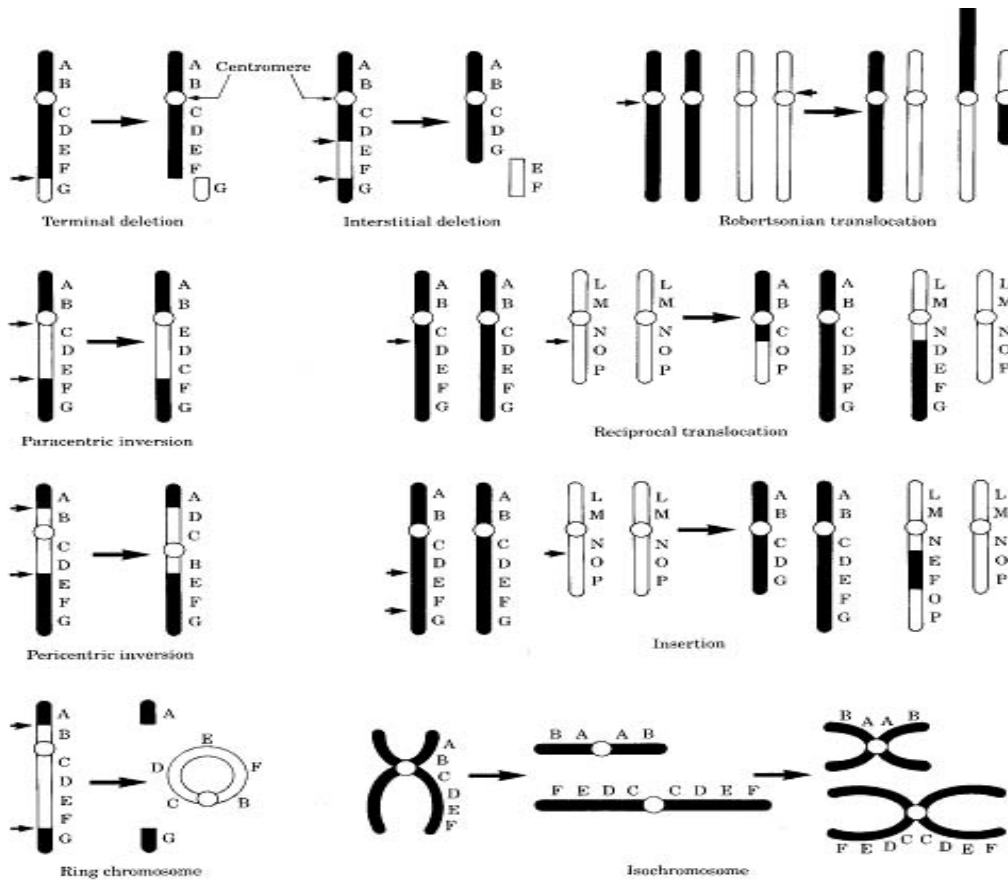
Translokace – transfer části chromosomu na nehomologní jiný chromosom.

Reciproká translokace – bez ztráty genetického materiálu (může a nemusí mít fenotypický projev), může se přenášet z generace na generaci. V meioze může dojít k duplikacím nebo delecím, což vede ke spontánním potratům.

Robertsonová translokace – zlom krátkých ramének dvou chromosomů s následným

spojením velkých ramének a ztrátou fragmentů malých. U chromosomů 14 a 21 - Downův syndrom

Delece – segment chromosomu je ztracen. Pouze malé delece jsou tolerovány (Cri-du-chat syndrom – delece malé části chromosomu 5)



Obr. 115. Různé typy chromosomálních aberací (terminální delece, intersticiální delece, Robertsonová translokace, paracentrická inverze, reciproká translokace, pericentrická inverze, inserce, kruhový chromosom a isochromosom).

7.4. Vznik aberací po ozáření

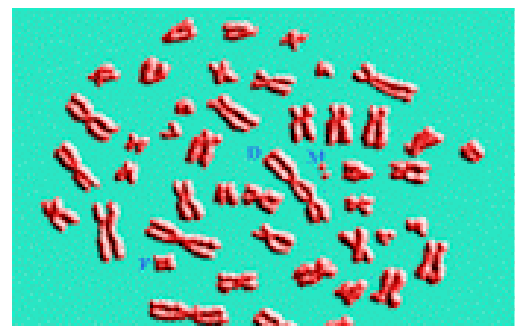
7.4.1. Detekce aberací (standardní experiment)

Standardní experiment sestává z následujících kroků:

1) izolace lymfocytů (odběr od donora, centrifugace a separace na ficolu, příprava na ozařování)
 2) resuspendování buněk do média, stimulace k dělení, kultivace 48-72 h, zastavení cyklu colcemidem, hypotonický roztok, fixace kyselinou octovou a metanolem, kapání na vymražené sklíčko, BUdR – lze odlišit první mitózu (světlá a tmavá část chromatidy)

3) barvení (Giemsa nebo FISH) pozorování pod mikroskopem, vyhledání mitóz a jejich vyhodnocení.

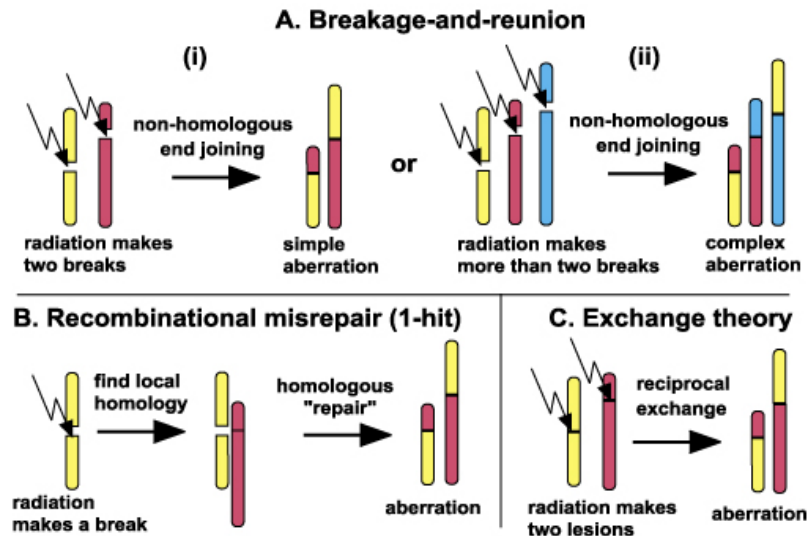
Na obr. 116 vidíme typickou aberaci indukovanou zářením – dicentrický chromosom neboli dicentrik (chromosome se dvěma centromerami).



Obr. 116. Na obrázku je příklad aberace typické pro ozáření – dicentrický chromosom neboli dicentrik (chromosome se dvěma centromerami).

7.4.2. Mechanismy vzniku výměn

Záření indukuje všechny možné typy aberací; nejčastěji sledované a také nejvýznamnější jsou výměnné aberace. Dicentriky jsou nejčastěji sledované klasickou technikou a translokace jsou snadno detekovatelné FISH technikou (obr. 117). Tyto aberace mohou zřejmě vzniknout (A) nehomologním spojením konců DSB při NHEJ reparaci (takto mohou vzniknout i složitější výměny – viz obr. 117 A vpravo), ale také při chybné rekombinační reparaci (B) a nebo může ze dvou poškození (nemusí to být DSB) vzniknout rekombinační reparací výměnná aberace (C).



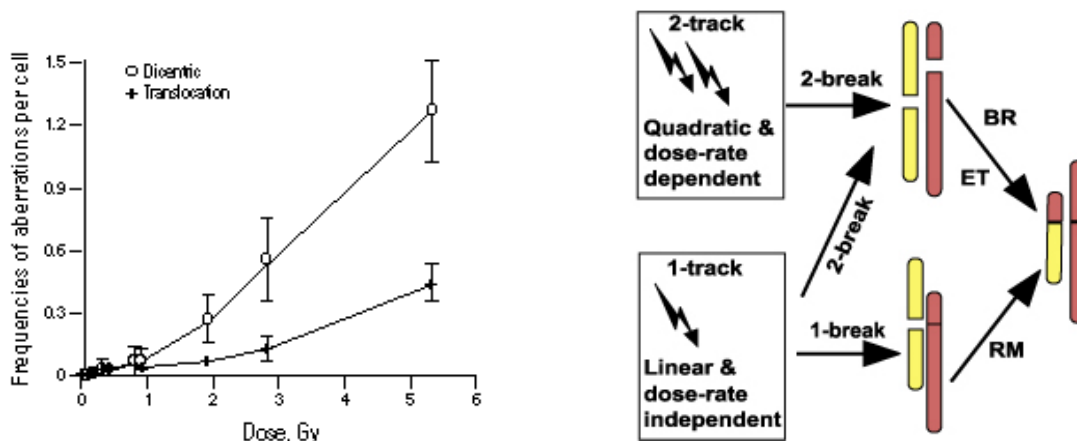
Obr.117. Mechanismy vzniku výměnných aberací u savčích buněk. NHEJ reparací (A), rekombinační reparací (B) a reciprokou výměnou ze dvou poškození (C).

7.4.3. Dávkové závislosti.

Pro mechanismy A a C dostáváme kvadratické závislosti na dávce, pro mechanismus B dostaneme lineární závislost. Dávkové závislosti se proto dají nejlépe popsat lineárně-kvadratickou funkcí

$$X = aD + bD^2$$

kde kvadratická komponenta mizí postupně pro záření s vyšším LET.

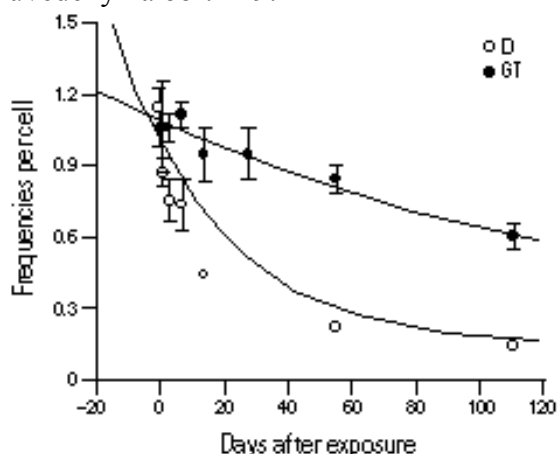


Obr.118. Lineárně-kvadratická dávková závislost frekvence aberací na buňku. Vpravo je opět schématicky znázorněn mechanismus vysvětlující lineární a kvadratickou komponentu.

7.4.4. Kinetika vzniku a časové závislosti poklesu počtu chromosomálních aberací v krvi

Aberace vznikají velmi krátce po ozáření, což lze prokázat tzv. PCC technikou. Tato technika spočívá ve fúzi mitotické buňky s G1-buňkou, v níž chromosomy předčasně z kondenzují. Aberace v lymfocytech v krvi s časem mizí. Pokles počtu dicentriků je daleko rychlejší než

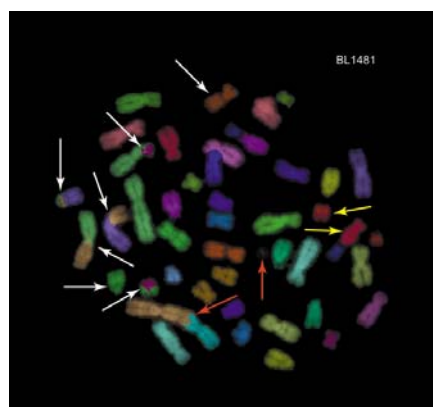
pokles počtu translokací. Časové závislosti počtu dicentriků (D) a translokací (GT) v krvi jsou uvedeny na obr. 119.



Obr. 119. Pokles počtu dicentriků je poměrně rychlý, což ztěžuje jejich detekci po delší době po ozáření. Tím je ztížena tzv. biologická dosimetrie, která využívá počítání dicentriků ke stanovení dávky v případech, kdy dojde k ozáření člověka nečekaně takže dávka není dokumentována dosimetrem. Pokles počtu translokací je menší a lze je detekovat i dlouhou dobu (roky) po ozáření. Určitou nevýhodou je zde možnost vzniku klonů dělením lymfocytů jež nesou danou aberaci. Tyto klony je třeba z analýzy vyloučit.

7.4.5. Komplexní přestavby.

Po ozáření často vznikají velmi komplexní přestavby chromosomů. Dříve je nebylo možné pozorovat, nyní se dají zachytit pomocí FISH techniky. Tyto změny nejsou slučitelné s dalším životem buňky.

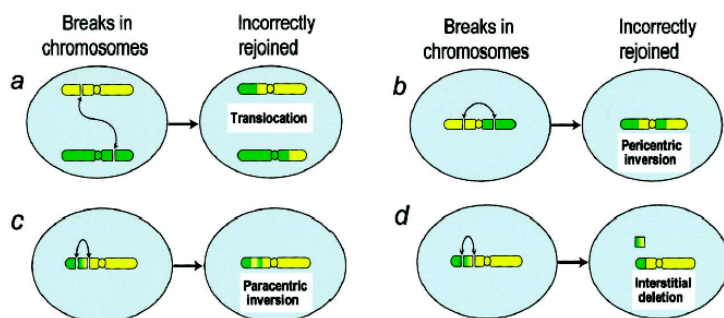


Obr. 120. Komplexní přestavba chromosomů. Šipkami jsou ukázány změny

7.4.6. Intrachromosomální aberace.

Multicolor FISH se dá použít pro bandování uvnitř chromosomů (dříve to nebylo možné). Bylo zjištěno, že radiace zanechává dlouhodobě změny v podobě stabilních intrachromosomálních aberací (mechanismy viz obr. 121).

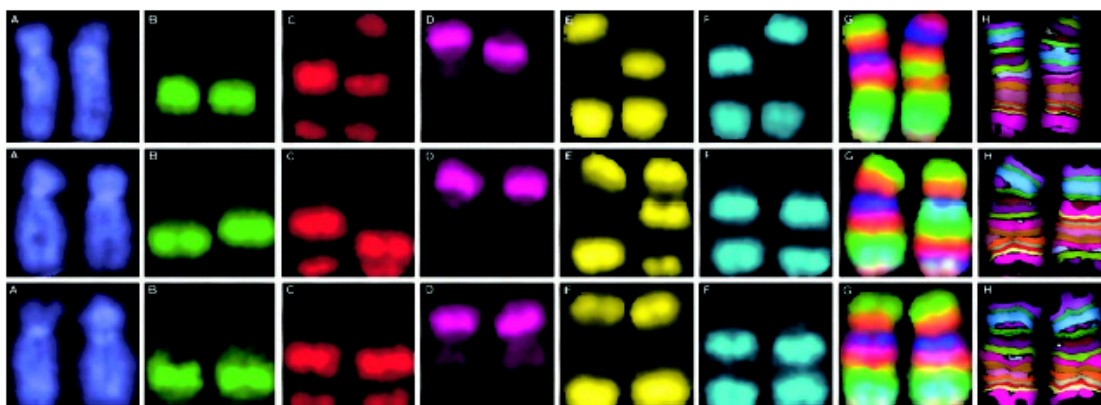
Pracovníci ozáření před mnoha lety při práci s plutoniem mají v krvi aberace v lymfocytech – více než polovina lymfocytů nese přestavby (>6 Mb). Počty těchto přestaveb korelují s dávkou na kostní dřev. Tyto aberace lze registrovat po dlouhé době, mají nízké pozadí a metoda má velkou citlivost pro hustě ionizující záření.



Obr. 121. Kromě typických translokací (a) může po ozáření docházet také k celé řadě vnitrochromosomových změn:

- pericentromerické inverse (b),
- paracentromerické inverse (c)
- intersticiální delece (d)

Na obr.122 je použito 6 fluorochromů (DAPI, FITC, Gold, Texas Red, Cy5 a Aqua). Složený obraz se dále analyzuje tak, aby jednotlivé oblasti byly lépe rozlišitelné (přiřazují se pseudobarvy).

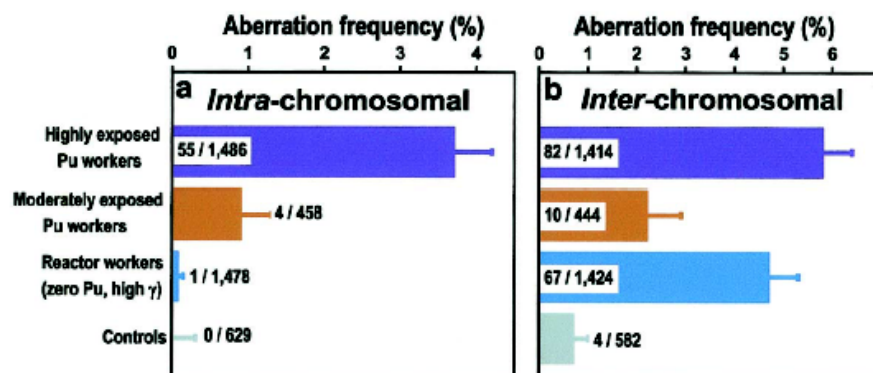


Obr. 122. Multicolor FISH pro zobrazení změn uvnitř chromosomů. Je zde použito 6 fluorochromů (zleva doprava): DAPI, FITC, Gold, Texas Red, Cy5 a Aqua. Superpozice těchto fluorochromů je zobrazena na předposledním obrázku a poslední obrázek ukazuje přiřazení pseudobarv.

7.4.7. Multicolor FISH detekuje intra- i interchromosomální přestavby

V krvi pracovníků s plutoniem (závod Maják v dřívějším SSSR) byly detekovány komplexní přestavby spočívající v inter- a současně intrachromosomálních výměnách. U řady těchto pracovníků došlo ke vzniku nádorů na plicích nebo kostí. Pro porovnání byla sledována také skupina pracovníků „na reaktoru“, u kterých bylo zjištěno značné ozáření γ -zářením.

Pracovníci s Pu (hustě ionizující záření) nesou v krvi intra-chromosomové přestavby, zatímco pracovníci na reaktoru (ozáření γ -zářením) nesou interchromosomové přestavby. Vidíme, že v kontrole prakticky nejsou detekovány intra- chromosomové přestavby.



Obr. 123. Intra- a interchromosomální přestavby v krvi pracovníků s plutoniem (nahore) a pracovníků s γ -zářením (dole). Úplně dole je kontrola

7.4.8. Biologická dosimetrie

Cytogenetická analýza lymfocytů je od počátku 70. let používána pro účely biologické dosimetrie. Je standardizována – existují kalibrační křivky počtu dicentriků na dávce pro různé doby od ozáření. Předpokládá se souvislost s nádory. Kromě záření jsou však aberace indukovány širokým spektrem jiných klastogénů.

FISH technika očividně rozšířila možnosti detekce různých druhů aberací, jednak o stabilní aberace, což umožňuje biologickou dosimetrii i po dlouhé době po ozáření a jednak o intrachromosomové aberace, které jsou typické pro hustě ionizující záření.

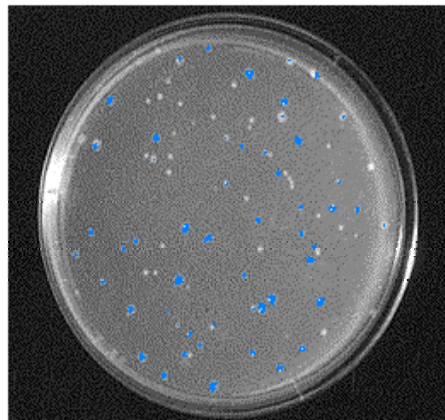
Problémy – závislost pozadí na věku, individuální citlivost k ozáření, vznik klonů, které je nutno detekovat a vyloučit.

VIII. Vznik bodových mutací po ozáření

8.1. Přímé a zpětné mutace u bakterií

8.1.1. Úvod

U přímých mutací dochází ke ztrátě funkčního proteinu v důsledku změny genetického kódu. Tyto mutace lze detekovat na vhodných půdách (obr. 124), např. mutace $lac^+ \rightarrow lac^-$ lze detekovat na půdě s tetrazoliem, mutace v $lacI$ genu (což je represor lac systému) lze detekovat na půdě s X-galem, což je substrát pro β -galaktosidázu. Defekt v $lacI$ genu vede ke vzniku konstitutivní mutace a syntéze galaktosidázy i bez přítomnosti laktózy. X-gal způsobuje modré zbarvení mutovaných buněk. Tato metoda je vhodná pro detekci malého počtu mutací, neboť modré kolonie jsou vidět na pozadí velkého počtu bílých kolonií. Při pozorování pod mikroskopem lze detekovat několik mutovaných kolonií na 10^5 normálních (bílých) kolonií.



Obr. 124. Mutace lze na vhodných půdách barevně odlišit.

U zpětných mutací se používají půdy, na kterých původní buňky nerostou (např. pro bakterie s defektem v syntéze histidinu se použije minimální půda bez histidinu. Protože pro fixaci mutací je potřeba, aby se buňky alespoň několikrát podělily, přidává se nepatrné množství aminokyseliny.

8.1.2. Detekce mutací po ozáření.

Buňky po ozáření mohou přežít nebo hynout, mohou nebo nemusí nést mutace. My umíme detekovat přežívající buňky (tj. měřit frakci přežívajících buněk) a detekovat mutace v těchto buňkách. Obvykle se stanovuje přežití

$$S(D) = N(D)/N_0$$

a současně počet mutantů v závislosti na dávce

$$M(D) = N_m(D)/N_0$$

Normováním pak dostaneme četnost mutací na přežívající buňku

$$N_m(D)/N(D) = M(D)/S(D)$$

V případě zpětných mutací (reversí) musíme od hodnoty $M(D)$ odečíst pozadí (M_0), které může být dosti velké. U přímých mutací je pozadí většinou zanedbatelné.

8.1.3. Tvar křivek $N_m/N(D)$ pro přímé mutace v $lacZ$ genu

Přežití je u bakterií velmi často dáno exponenciální křivkou přežití:

$$S(D) = \exp(-w \cdot D)$$

Jestliže bude frekvence indukovaných mutací proporcionální velikosti absorbované dávky (mutace vznikají proporcionálně počtu poškození), pak:

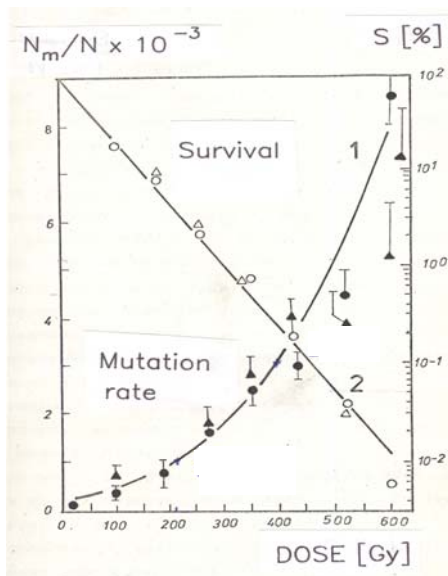
$$P_m(D) = a \cdot D$$

Frakce vzniklých mutací pak bude:

$$N_m(D)/N_0 = aD \cdot \exp(-wD)$$

Pokud pro vznik mutace musí dojít k interakci dvou poškození, bude závislost $P_m(D)$ kvadratická. V obecnějším případě bude tato závislost lineárně-kvadratická.

$$N_m(D)/N_0 = (aD+bD^2).exp(-wD)$$

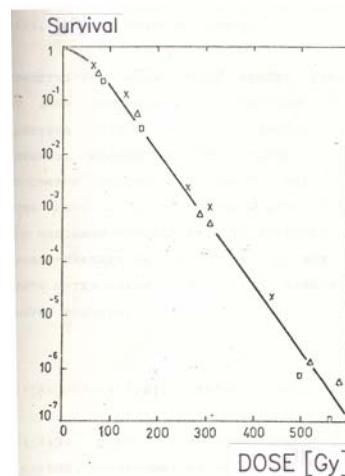


Obr.125. Kvadratická závislost četnosti vzniku přímých lac mutací u E.coli (γ -záření)

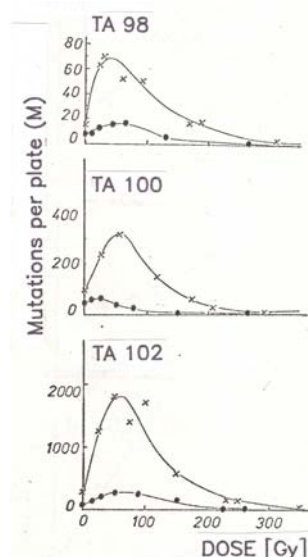
Podívejme se, jak vypadají experimentální závislosti. Na obr. 125 je křivka přežití (stupnice vpravo), která se velmi podobá exponenciální závislosti a závislost frekvence indukovaných mutací na dávce (stupnice vlevo) odpovídající spíše kvadratické funkci. Kvadratickou závislost lze interpretovat tak, že pro vznik mutace jsou potřebná dvě poškození. Předpokládejme, že při reparaci nebo replikaci dojde ke vzniku jednořetězové DNA s poškozením. Pravděpodobnost takové události bude zřejmě úměrná dávce. Přes poškozenou matici neprojde normální replikační nebo reparační mechanismus a je nutná indukce SOS systému spojeného s indukci umuC a umuD proteinů, které společně s polC tvoří komplex umožňující syntézu na poškozené matici (viz dále).

8.1.4. Vznik zpětných mutací po ozáření

Zpětné mutace lze detekovat snadno na půdě, kde původní kmen neroste. Abychom mohli spočítat frekvenci indukovaných mutací (tj. normovat počty mutací na přežívající buňku), musíme přesně změřit křivku přežití. Na obr. 126 vidíme křivku přežití pro buňky Salmonella typhimurium s defektem v syntéze histidinu (jedná se o systém tzv. Amesových kmenů, kde je známá molekulární událost, která vede k reverzi). Vidíme, že v rozsahu 7 řádů je křivka přežití blízká exponenciální funkci.



Obr. 126. Křivka přežití pro buňky Salmonella



Obr. 127. Závislosti počtu mutací na dávce záření pro reverze indukované u buněk Salmonella typhimurium

Počty reverzí na misku v závislosti na dávce sledují křivku s maximem. Na obrázku 127 vidíme, že počty revertantů závisí na typu molekulární události, která vede k reverzi:

TA 98 – frameshift

TA 100 – mutace v sekvenci GGG

TA 102 – mutace v sekvenci TAA

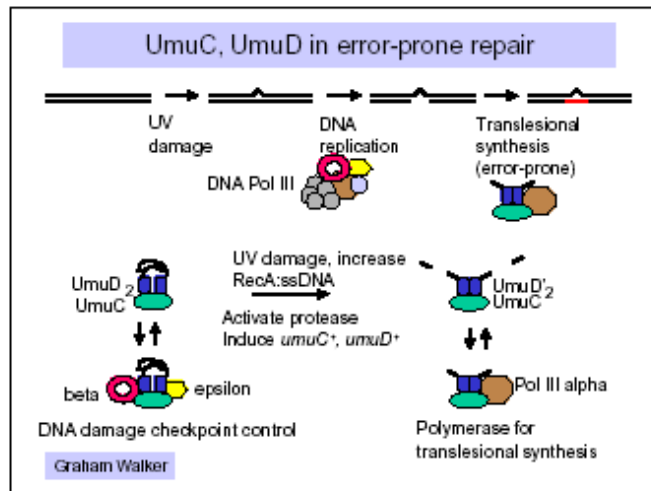
Nejvíce mutací zřejmě vzniká u buněk TA 102 a to proto, že oxidační činidla, ke kterým ionizující záření patří způsobují častěji poškození TAA.

Křivky byly naměřeny po přidání malého množství histidinu na misky (křížky) nebo na miskách bez histidinu (kolečka). Vidíme typické křivky s maximem dobře popsatelné dříve uvedenými rovnicemi. Počty indukovaných reverzí jsou nejmenší u TA98 a největší u TA102.

8.2. Mechanismy vzniku mutací u bakterií

8.2.1. SOS systém zahrnuje geny mutátory - *umuC* a *umuD*.

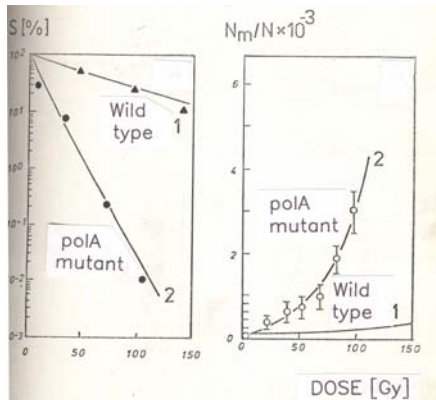
Tyto geny mají ve svém promotoru sekvenci potřebnou pro vazbu *lexA* represoru a indukují se proto společně s dalšími geny SOS systému (viz. obr. 127a). Produkty těchto genů se vážou s polymerázou pol III, čímž vzniká komplex, jenž umožňuje projít replikační vidlici přes poškození. Proto je SOS indukovaná reparace mutagenní. Na obrázku je znázorněno poškození DNA UV zářením, ale stejně funguje SOS indukce a indukce genů *umuC* a *D* i při poškození DNA ionizujícím zářením. *UmuD* vytváří dimer a váže se k jedné molekule *umuC*. Tento komplex se pak váže s polymerázou III.



Obr. 127a. Indukce genů *umuC* a *umuD* při poškození DNA

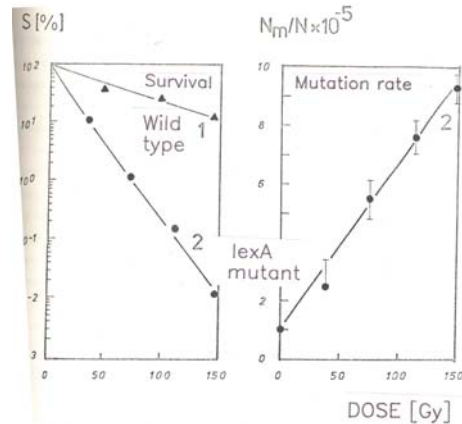
8.2.2. Vznik mutací u reparačně defektních kmenů bakterií

Bude zajímavé zjistit, jaká je radiačně indukovaná reparace u bakterií defektních v určitých typech reparace. U *polA*⁻ kmene se SSB nereparují rychlým typem reparace a velký počet těchto zlomů musí zvládat pomalá, inducibilní SOS reparace, která je mutagenní. Proto je tento kmen daleko citlivější ve srovnání s buňkami standardního kmene (obr. 128). Mutagenese je daleko vyšší než u „wild type“ buněk. To lze zřejmě vysvětlit zvýšenou pravděpodobností indukce mutagenní SOS reparace.



Obr. 128. *PolA* defektní kmen *E.coli* v porovnání s buňkami „wild type“.

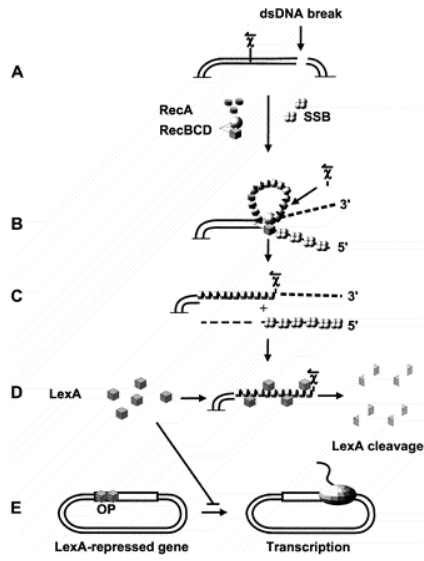
LexA⁻ buňky mají defekt v indukci SOS systému. Mutagenese je zde podstatně zeslabená. Citlivost buněk vůči záření je větší (chybí pomalý typ reparace). Frekvence indukovaných mutací pro 100 Gy dosahuje $6 \cdot 10^{-4}$ na přežívající buňku, což je 50x méně než pro stejné dávky záření u *polA* kmene ($3 \cdot 10^{-3}$). Z obrázku je vidět, že i při malých počtech mutovaných buněk lze přímé mutace snadno detekovat.



Obr. 129. *LexA* defektní kmen *E.coli* v porovnání s buňkami „wild type“.

8.2.3. Role RecBCD nuleázy při vzniku mutací

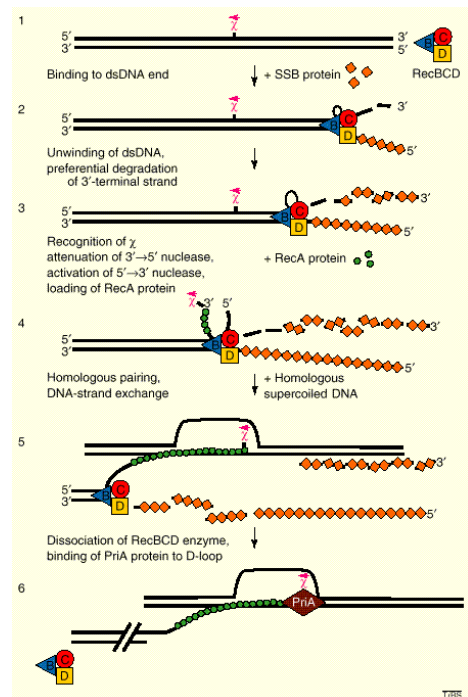
Dalším zajímavým enzymem je RecBCD helikáza a nukleáza. RecBCD degraduje DNA počínaje DSB až po tzv. χ -sekvenci. Zde se překloupí na druhý řetězec a první se začne



Obr. 130. Mechanismus působení RecBCD nukleázy po vzniku DSB

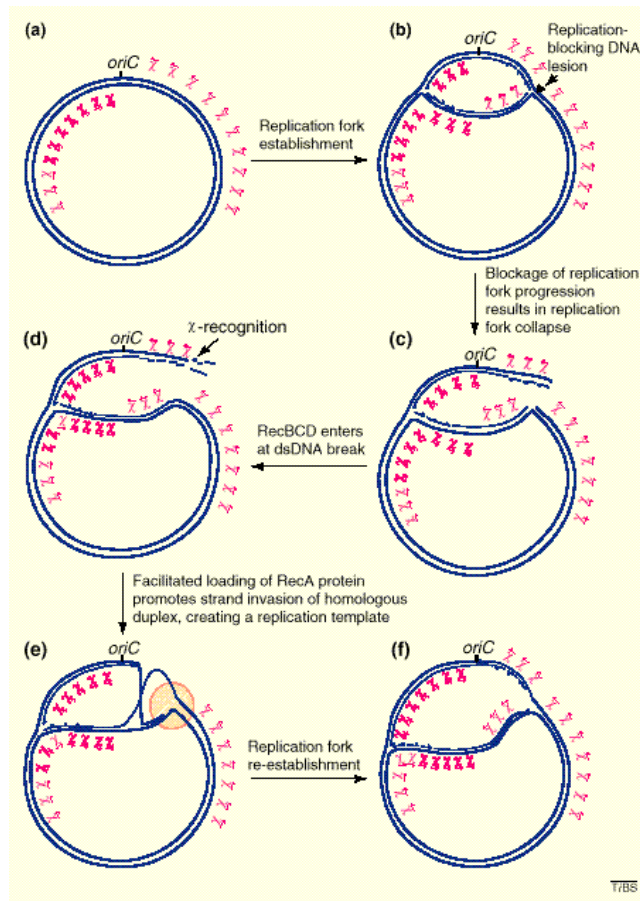
homologní DNA.

obalovat recA proteinem. Ten působí jako proteáza na lexA protein a spouští se SOS systém. Proto je role recBCD dvojí – jednak eliminuje poškození degradací té části řetězce, kde se nacházejí a zablokuje tak replikaci a jednak spouští SOS systém. RecBCD nukleáza indukuje také rekombinaci. Řetězec obalen recA proteinem se váže na



Obr. 131. Mechanismus působení RecBCD nukleázy po vzniku DSB včetně rekombinace.

8.2.4. RecBCD nukleáza při reparaci poškození DNA.

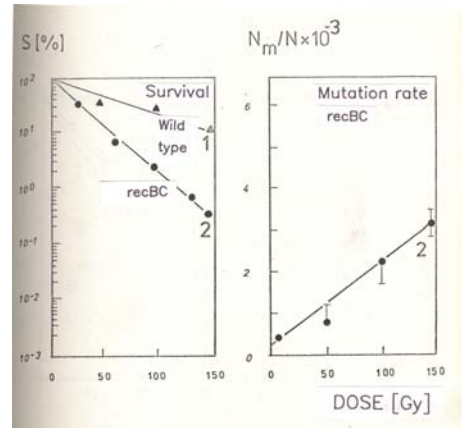


Uvažujme kruhovou DNA s řadou χ -sekvencí na obou řetězcích (obr. 132 a). Necht' nyní dojde k poškození DNA (obr. 132 b). Jestliže replikační reparace narazí na poškození DNA, dojde k jejímu rozpadu. Je-li poškození pouze na jednom řetězci DNA, druhý řetězec se může spojit a zůstane nám volný konec DNA s poškozením na konci. RecBCD degraduje poškozenou DNA až do χ -sekvence, kde vznikne recA obalené vlákno, které se přichytí na již replikovanou část DNA a replikace se obnoví. Takto se buňka efektivně zbavila poškození a replikace může pokračovat.

Obr. 132. Účast RecBCD nukleázy při reparaci DNA

8.2.5. Citlivost *recBC* mutantů k ozáření a mutagenéze indukovaná v těchto buňkách zářením.

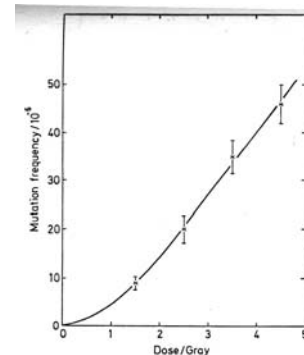
Jak jsme viděli, RecBCD nukleáza se účastní reparace poškození DNA u bakterií, přičemž tato reparace probíhá v průběhu replikace. Poškození vedou pouze ke zpomalení replikace. Bez RecBCD nukleázy se část těchto poškození může reparovat SOS indukibilní reparací, která bude při ozáření indukována i bez RecBCD enzymu, a část jich způsobí letální události jako obecně každý zlom reparovaný SOS reparací. Citlivost *recBC*⁻ kmene je podstatně vyšší než u buněk standardního kmene, ale menší ve srovnání s *lexA* nebo *recA* kmenem (obr. 133, vlevo). Mutagenéze je u *recBC*⁻ buněk podstatně vyšší (o 2 řády) než u *lexA* kmene a je srovnatelná s buňkami *polA*⁻, u nichž však byla pozorována kvadratická závislost na dávce. Lineární dávková závislost je zřejmě dána tím, že se většinou jedná o poškození jednoho řetězce DNA nereparovatelná rychlým typem reparace.



Obr.133. Přežití a mutagenéze u buněk *recBC*⁻

8.3. Detekce bodových mutací u savčích buněk

U savčích buněk lze rovněž detekovat bodové mutace. Jsou to např. mutace v genu HPRT (hypoxantin guanin fosforibosyltransferaza), který odpovídá za rezistenci k 6-thioguaninu. Mutované kolonie rostou na půdě s 6-thioguaninem, zatímco původní buňky nerostou. Dávková závislost frekvence indukovaných mutací je na obr. 134, ze kterého je vidět určitou nelinearitu v oblasti malých dávek záření (pod 1 Gy). Tato nelinearita mizí pro větší hustoty ionizace a již pro hodnoty LPE kolem 20 keV/ μ m je dávková závislost lineární. Mutace v HPRT genu byly podrobeny zverubné analýze, při které bylo zjištěno, že většina jich představuje delece (45% buněk má deletovaný jeden exon, 30% nese totální deleci celého genu). Podobně působením α -záření dochází rovněž většinou k delecím. U buněk *xrs-5* s defektem Ku proteinu je spektrum indukovaných mutací trochu jiné (43% buněk nese deletovaný exon ale jen 14% má totální deleci).



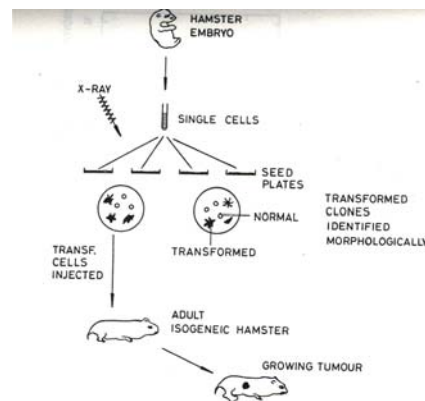
Obr. 134. Frekvence indukovaných mutací v závislosti na dávce pro HPRT gen u savčích buněk.

V současné době se často používá další test – detekce přímých mutací u buněk lymfomu (Mouse Lymphoma Forward Mutation Assay). U tohoto testu se používá toxický analog nukleosidu trifluorothymidin (TFT). Buňky bez mutace nevytvářejí kolonie na půdě obsahující TFT. Předpokládá se, že kolonie vyrůstají z mutovaných buněk – buď spontánně nebo v důsledku působení zkoumaného faktoru (záření). Tento test určuje zda mutace nebo chromosomální delece nastala v tk lokusu L5178Y tk^{+/-} buněk. Tyto buňky mají jednu funkční kopii genu pro thymidin kinazu (TK), což je enzym jehož aktivita je kritická pro syntézu DNA. Po ozáření jsou vypěstovány kolonie a je stanovena jejich velikost. U malých kolonií se předpokládá že jsou důsledkem chromosomálního poškození, zatímco velké kolonie jsou výsledkem mutagenní události v tk lokusu.

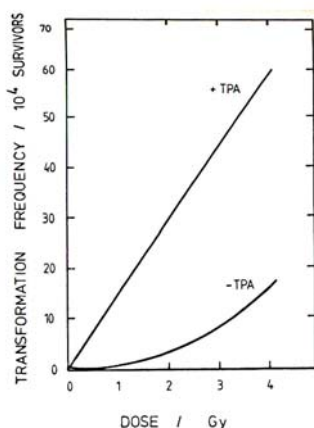
8.4. Transformace buněk po ozáření

8.4.1. Schéma experimentu

Připraví se kultura embryonálních buněk, které se rozdělí po jednotlivých buňkách naisky. Za normálních podmínek tyto buňky vytvoří po čase konfluentní populaci a dále už nerostou, protože reagují na tzv. kontaktní inhibici růstu. Po ozáření však pozorujeme vznik ohnisek větší hustoty růstu buněk. Tato ohniska lze snadno obarvit a spočítat. Z těchto ohnisek vzniká po injekci buněk do organismu isogenní myši nádor. Jsou to tedy buňky nádorové, které rostou nekontrolovaně neboť ztratily schopnost kontaktní inhibice. Vhodné buňky lze připravit i z určitých tkání – např. z kůže (epidermální fibroblasty).



Obr. 135. Schéma experimentu



Obr. 136. Dávkové závislosti transformace buněk.

8.4.2. Detekce transformantů po ozáření

Frekvence indukovaných transformantů byla měřena po ozáření za různých podmínek a pro řadu různých typů záření. Bylo zjištěno, že počet transformantů roste s dávkou. Genetická účinnost transformace buněk roste prudce pro větší hodnoty LPE záření a také v přítomnosti promotorů nádorového růstu jako je např. TPA (forbol ester). TPA jako promotor nádorové transformace potencuje vznik transformantů (obr. 136). Je třeba zdůraznit, že četnost vzniku transformantů je velmi vysoká (dosahuje $1-6 \cdot 10^{-3}$ – viz obr. 136), což lze těžko vysvětlit nějakým jednoduchým způsobem. Přímé mutace vznikají s četností v řádu $1-6 \cdot 10^{-5}$ (viz předchozí kapitola) a jsou tedy o 2 řády méně četné. Spekuluje se o poškození genů – mutátorů, ale toto vysvětlení je těžko akceptovatelné.

IX. Letální účinky záření

9.1. Přežití buněk

9.1.1. Experimentální stanovení přežití

Přežitím se v radiobiologii rozumí schopnost buňky vytvořit kolonii. Klasický radiobiologický experiment sestává z následujících kroků:

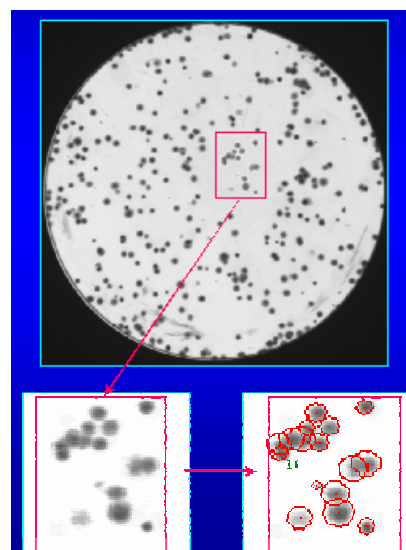
1) Pěstování buněk, jejich příprava pro radiální experiment (vybere se exponenciální nebo logaritmická fáze růstu, buňky lze synchronizovat hladověním apod). Pro sledování kyslíkového efektu se volí speciální postupy.

2) Ozáření buněk se může provést v suspenzi nebo na povrchu pevného média. Pozornost nutno věnovat správné dosimetrii. Pro tvrdé γ -záření, které je obvykle k dispozici (terapeutický ozařovač) není dávka na povrchu maximální (viz křivky hloubkových dávek obr. 138).

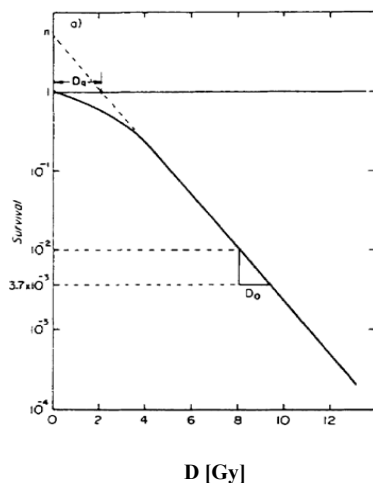
3) Vysetí buněk se provede na pevnou půdu (agar). Zde je nutno věnovat patřičnou pozornost správnému ředění suspenze tak, abychom si nekontaminovali roztoky s nižší koncentrací buněk suspenzí z vyšších koncentrací. Inkubace buněk se provede v termostatu a to do nárůstu kolonií (obr. 137)

4) Počítání kolonií a vyhodnocení experimentu. Kolonie se dříve počítaly ručně; v současné době se používá analýza obrazu, kdy se kolonie nacházejí postupným prahováním. Z obr. 137 je vidět, že si počítač poradí i s překrývajícími se koloniemi.

5) Znázornění počtu přežívajících buněk (S) v závislosti na dávce (D) v semi-logaritmickém grafu (obr. 138).



Obr. 137. Kolonie bakterií.



Obr. 138. Křivka přežití.

9.1.2. Křivka přežití

Křivka přežití se obvykle zobrazuje v semilogaritmickém měřítku, kdy na ose x je dávka (D) a na ose y je logaritmus přežití (S – survival). Křivka má obvykle exponenciální část charakterizovanou určitým sklonem; tuto část lze popsat funkcí:

$$S = m \cdot \exp(-\alpha \cdot D)$$

v níž je α sklon a platí:

$$\alpha = 1/D_0$$

kde D_0 je tzv. střední letální dávka.

Hodnota m se nazývá extrapoláční číslo. Pro $D=0$ je dle rovnice $S=m$. Oblast dávek $D < D_q = D_0 \cdot \ln(m)$ je oblast ramene křivky přežití. Na obr. 138 jsou znázorněny veličiny D_0 , D_q a m (extrapolační číslo – nahoře vlevo).

9.1.3. Interpretace exponenciálních křivek přežití – zásahový princip

Křivky přežití jsou interpretovány tzv. zásahovou teorií (Dessauer, Altenburger), která vzniká ve 20. letech 20. století. Vychází ze 3 axiomů (tzv. zásahového principu):

- (1) ionizující záření přenáší energii hmotě v diskrétních porcích,
- (2) akty vydělení energie jsou v prostoru rozloženy náhodně,

(3) reakce biologického objektu na ozáření (např. smrt) nastává zasažením citlivého terčíku.

Nechť v je velikost citlivého objemu ($v \mu\text{m}^3$) a D je dávka v J/kg . Pak počet zásahů bude $\alpha \cdot vD$, kde konstanta je spojena s přepočtem jednotek na zásahy (při 60 eV na zásah a při 1 g/cm^3 bude rovna $\alpha=100$). Pravděpodobnost, že nedojde ani k jednomu zásahu bude dle Poissonova rozdělení:

$$P = \exp(-\alpha \cdot vD)$$

Tím je vysvětlen exponenciální charakter křivek přežití.

9.2. Teorie vysvětlující křivku přežití

9.2.1. Zásahová teorie

Experimentální křivky přežití mají často tzv. rameno (shoulder), tj. v oblasti malých dávek více buněk přežívá než by odpovídalo exponentě. V rámci zásahové teorie je zde interpretace dvojitá.

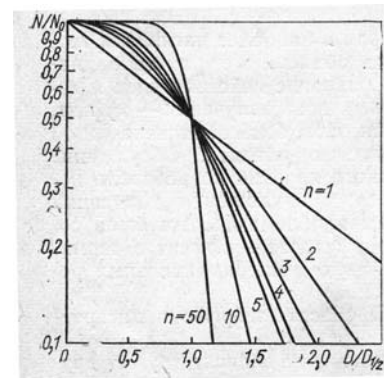
9.2.1. Vícezásahový model

Uvažujme opět terčík o velikosti v , ale necht' pro jeho zničení je zapotřebí n -zásahů. Pravděpodobnost n zásahů je dána Poissonovým rozdělením:

$$P(n) = (\alpha vD)^n e^{-\alpha vD} / n!$$

Buňky hynou při obdržení n a více zásahů, a proto frakce přežívajících buněk pak bude:

$$N/N_0 = e^{-\alpha vD} \sum_{k=0}^{n-1} (\alpha vD)^k / k!$$



Obr. 139. Křivky přežití pro n -zásahů normované tak, aby pro $D=D_{50}$ bylo přežití 0.5

Na obr. 139 jsou znázorněny odpovídající křivky pro různé hodnoty n . Pro větší n zřejmě dostaneme větší rameno na křivce přežití.

9.2.2. Víceterčový model

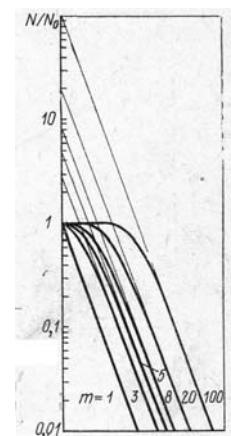
Druhý model předpokládá, že pro inaktivaci buněk je potřeba inaktivovat více terčíků (m). Protože pravděpodobnost inaktivace jednoho terčíku je $1 - \exp(-\alpha vD)$ a pravděpodobnost inaktivace m terčíků $(1 - \exp(-\alpha vD))^m$, bude pro přežití buněk s m -terčíky platit:

$$N/N_0 = 1 - (1 - e^{-\alpha vD})^m = 1 - (1 - m e^{-\alpha vD} + \dots \pm e^{-m\alpha vD}).$$

Na obrázku jsou křivky přežití pro různé počty terčíků (m). Hodnota m je dána tzv. extrapoláčním číslem. Pro velké hodnoty dávky totiž platí:

$$\ln(N/N_0) = -\alpha vD + \ln(m)$$

a exponenciální část křivky přežití můžeme tedy popsat touto rovnicí. Když extrapolujeme exponentu k nule, dostaneme v semilogaritmickém grafu hodnotu extrapoláčního čísla (viz obr. 140).



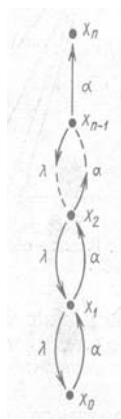
Obr. 140. Křivky přežití vypočtené podle víceterčového modelu.

9.2.3. Víceterčový vícezasahový model

Kombinace obou modelů je rovněž možná. Pro m-terčůků a n potřebných zásahů pro každý terč máme:

$$N/N_0 = 1 - (1 - e^{-\alpha v D} \sum_{k=0}^{n-1} (\alpha v D)^k / k!)^m$$

Je třeba zdůraznit, že experimentální závislosti lze proložit různými kombinacemi těchto křivek a proto toto zobecnění postrádá biofyzikální interpretaci.



Obr. 141

9.2.2. Stochastická teorie

Na proces účinku záření se lze dívat, jako na sérii stavů buňky, mezi nimiž buňky přechází působením záření. Aby nastala smrt (efekt) musí se dosáhnout určitého koncového stavu. Pro danou dávku existuje pouze určitá pravděpodobnost přechodu mezi dvěma stavy. Přechody mezi stavy znázorníme diagramem:

Na obrázku je popsán mechanismus, ve kterém je buňka charakterizována 5 stavy, přechody mají všechny stejnou pravděpodobnost α (na jednotku dávky) a existuje i pravděpodobnosti obráceného přechodu λ . Stav buňky je pak charakterizován vektorem:

$$\bar{x} = (x_0, x_1, \dots, x_n)$$

Pro uvedené schéma lze napsat systém rovnic:

$$\frac{d\bar{x}}{dD} = A\bar{x}$$

kde D je dávka záření a A je matice pravděpodobností přechodů mezi stavy na jednotku dávky.

$$A = \begin{bmatrix} -\alpha & 0 & 0 & \dots & \dots & 0 & 0 & 0 \\ \alpha & -\alpha & 0 & \dots & \dots & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \alpha & -\alpha & \dots & \dots & 0 & 0 & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & \dots & \alpha & -\alpha & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \dots & \dots & 0 & \alpha & -\alpha \end{bmatrix}$$

Tento systém rovnic lze integrovat a dostaneme:

$$\bar{x} = e^{AD\bar{x}_0}$$

kde $\exp(AD)$ je dáno Taylorovou řadou:

$$e^{AD} = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{A^k D^k}{k!}$$

Počáteční stav popíšeme vektorem:

$$\bar{x}_0 = (1, 0, \dots, 0).$$

Přežití bude dáno počtem buněk, které nedosáhly konečného stavu (jenž odpovídá smrti buňky).

$$N/N_0 = \sum_{k=0}^{n-1} x_k$$

Pro předchozí matici pak dostaneme řešení ve tvaru (vícezásahových křivek):

$$N / N_0 = e^{-\alpha D} \sum_{k=0}^{n-1} \frac{(\alpha D)^k}{k!}$$

Jestliže budou v matici A různé pravděpodobnosti přechodů, jako např.

$$A = \begin{bmatrix} -\alpha_0 & 0 & 0 & \cdot & \cdot & 0 & 0 & 0 \\ \alpha_0 & -\alpha_1 & 0 & \cdot & \cdot & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \alpha_1 & -\alpha_2 & \cdot & \cdot & 0 & 0 & 0 \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ 0 & 0 & 0 & \cdot & \cdot & \alpha_{n-3} & -\alpha_{n-2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \cdot & \cdot & 0 & \alpha_{n-2} & -\alpha_{n-1} \end{bmatrix}$$

pak křivky přežití budou mít konečné extrapolací číslo (e) – viz obr. 142. Extrapolací číslo však nelze interpretovat jako počet terčíků.

Do stochastických modelů lze zahrnout také reparační procesy jako zpětné přechody. Matice reparačních procesů při stejné pravděpodobnosti zpětných přechodů pro všechny mezistavy bude mít tvar:

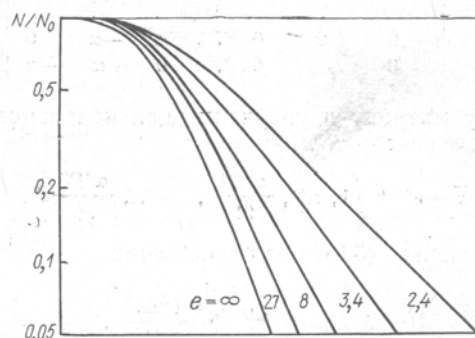
$$A(\lambda) = \begin{bmatrix} 0 & \lambda & 0 & \cdot & \cdot & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -\lambda & \lambda & \cdot & \cdot & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -\lambda & \cdot & \cdot & 0 & 0 & 0 \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ 0 & 0 & 0 & \cdot & \cdot & -\lambda & \lambda & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \cdot & \cdot & 0 & -\lambda & \lambda \\ 0 & 0 & 0 & \cdot & \cdot & 0 & 0 & -\lambda \end{bmatrix}$$

Matice A pak bude součtem $A(\alpha_j) + A(\lambda)$. Jsou-li všechny hodnoty α stejné, pak dostaneme křivky zobrazené na obr. 143. Tvar a citlivost výsledné křivky závisí na poměru α/λ . Čím je tento poměr větší, tím méně se uplatní reparační procesy a tím citlivější buňky budou; zároveň se na křivce objevuje výrazné rameno.

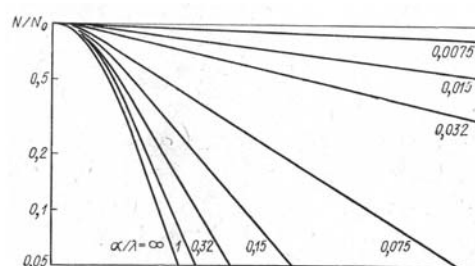
9.3. Moderní teorie vysvětlující přežití buněk po ozáření

9.3.1. Charakteristika modelů popisujících a vysvětlujících křivku přežití

Bylo vytvořeno nepřehledné množství modelů, jež se pokoušely vysvětlit rameno na křivce přežití. Tak např. byl vytvořen model interagujících radikálů, ve kterém interakce hypotetických radikálů vedla k letálním událostem, a proto byly malé dávky méně účinné. V modelu Laurie-Orra se předpokládala existence reparačního zásobníku („repair pool“),



Obr. 142. Dávkové závislosti přežití vypočtené ze stochastického modelu (e je extrapolací číslo).



Obr. 143. Dávkové závislosti přežití pro různé poměry α/λ .

který se při vzrůstající dávce vyčerpává a rameno na křivce přežití přechází v exponenciální část. Tento model také správně popisoval chování křivky přežití pro různé dávkové rychlosti.

Velmi známým se stal tzv. molekulární model Chadwicka a Leenhoutse, v němž se předpokládá interakce dvou SSB vedoucí ke vzniku DSB. Výsledný počet letálních událostí je proto lineárně-kvadratickou funkcí dávky. Předpokládá se náhodné rozdělení letálních událostí v buněčné populaci, a proto se lineárně-kvadratická funkce dávky (D) objevuje v exponentu křivky přežití (S):

$$S = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$$

kde α a β jsou konstanty. Tento model naráží na problém se vzdáleností mezi SSB. Při běžných dávkách kdy část buněk hyne (1-5 Gy) připadá na buňku řádově 10^2 - 10^3 SSB. Průměrná vzdálenost mezi nimi je proto více než 10^6 nukleotidů, což je molekulárně i prostorově velmi daleko. Proto byli oba autoři modelu nuceni připustit existenci radikálů s dlouhou dobou života a jejich interakci na velkou vzdálenost. Takový proces zatím nebyl potvrzen. Molekulární model byl detailně propracován a vydán v knižní formě.

Dalším velmi propracovaným modelem je model Rossiho a Kellerera, který je založen na mikrodosimetrických úvahách a budeme se jím zabývat podrobně v kapitole o závislosti biologického účinku na LPE záření. Křivka přežití tohoto modelu má stejný tvar jako u molekulárního modelu, avšak interpretace lineárně-kvadratického členu v exponentu je úplně jiná. Je to důsledek interakce dvou poškození, které vedou k letální události a dále důsledek nerovnoměrného vydělení energie - někdy vzniknou tato dvě poškození z jedné stopy a někdy ze dvou stop. Proto se zde objevuje lineárně-kvadratický člen. Problémem tohoto modelu je skutečnost, že lineární komponenta je daleko větší na experimentální křivce než by bylo možno vysvětlit teorií.

Řada modelů vysvětlujících závislost křivky přežití na LPE se vůbec nezabývala tvarem křivky přežití pro řídké ionizující záření. Často byly použity víceterčové formule (Katz) nebo kombinace víceterčové a jednozásahové formule (Wideroe). Někteří autoři prostě vzali jako výchozí křivku pro γ -záření jako takovou (Guenter).

V současné době je zřejmě nejuznávanější LPL model S. Curtise (Lawrence Berkeley Laboratory), který popíšeme podrobněji.

9.3.2. LPL model pro savčí buňky

9.3.2.1. Formulace modelu

LPL model je určitým speciálním případem kinetického více- stavového modelu s více poškozeními. Letální poškození v něm vznikají konverzí (přeměnou) potenciálně-letálních poškození. Curtis předběžně identifikoval tato poškození s DSB. V současné době věříme, že DSB jsou hlavním typem poškození, které je v savčích buňkách opravitelné, ale odpovědné za letální efekt záření.

V LPL modelu se uvažují 2 typy interakce: lineární a kvadratická. Kvadratická interakce odpovídá NHEJ. Spojené konce DSB jednoho chromosomu vedou k mutacím, ale nejsou letální. Kvadratická interakce odpovídá spojování konců různých chromosomů a je letální. V modelu se připouští možnost vzniku neopravitelného DSB (lineární interakce). Toto poškození bylo původně interpretováno jako vznik dvou DSB v těsné blízkosti. Nyní se spíše zdá, že se jedná o komplexní poškození, jež buňka prostě není schopna žádným způsobem opravit, a které nemůže vést ani ke kvadratické interakci. Na cytogenetické úrovni se nejspíše jedná o terminální delece části chromosomu.

Matematická formulace LPL modelu spočívá ve dvou diferenciálních rovnicích:

$$\frac{d\bar{L}_{dsb}(t)}{dt} = 2\dot{D}(t)Y \Sigma_{dsb} - \{\lambda_{dsb} + \eta_{dsb \rightarrow f} \bar{L}_{dsb}(t)\} \bar{L}_{dsb}(t)$$

$$\frac{d\bar{L}_f(t)}{dt} = 2\dot{D}(t)Y \Sigma_f + \eta_{dsb \rightarrow f} \bar{L}_{dsb}(t) \bar{L}_{dsb}(t).$$

kde L_{dsb} je střední počet DSB na buňku, Σ_{dsb} (Σ_f) je pravděpodobnost vzniku reparabilního (irreparabilního) DSB pro genom o velikosti Y a při dávkové rychlosti $\dot{D}(t)$. λ_{dsb} a η_{dsb-f} jsou pravděpodobnosti reparační a kvadratické interakce.

Interakce v binárním členu je úměrná čtverci počtu nereparovaných DSB na buňku. Očekávaný počet konců v čase t je $2 \cdot L_{dsb}(t)$. Binární interakce může vést ke vzniku různých typů intro- nebo inter-chromosomových aberací, např. dicentriků, centrických ringů a translokací. Dominantní jsou zřejmě dicentriky. Proto jsou fragmenty a dicentriky hlavními příčinami letálních událostí v LPL modelu.

9.3.2.2. Řešení modelu.

Rovnice jsou integrovány při počátečních podmínkách L_{dsb} a $L_f=0$. Přežití buněk se spočte za předpokladu náhodného rozložení fatálních poškození v buněčné populaci, tj.

$$S = \exp(-L_f),$$

kde L_f je střední počet letálních událostí na buňku pro t nekonečno.

Prakticky se bere 10-15 x větší doba, než je poločas reparační DSB, tj. $1/\lambda_{dsb}$ + doba ozařování (při malých dávkových rychlostech může být doba ozařování významná).

Na obr. 144 jsou křivky přežití publikované Stackhousem a Bedfordem pro CHO buňky

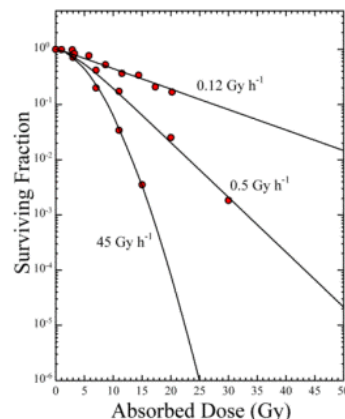
Parametry LPL modelu jsou:

$$2Y\Sigma_f = 3.35 \cdot 10^{-2} \text{ Gy}^{-1}$$

$$2Y\Sigma_{dsb} = 2.98 \text{ DSB cell}^{-1} \text{ Gy}^{-1}$$

$$\lambda_{dsb} = 0.123 \text{ h}^{-1} \text{ (5.63 h DSB poločas)}$$

$$\eta_{dsb-f} = 7.62 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$$



Obr. 144. Křivky přežití pro 3 dávkové rychlosti. Experiment je zde porovnán s výpočtem dle LPL modelu s parametry uvedenými v textu.

X. Závislost citlivosti buněk na LPE záření

10.1. Teorie terčíku

10.1.1. Exponenciální křivky přežití

Ozáření biologických objektů zářením s vysokým LPE (např. urychlené ionty, neutrony) vede často k exponenciální závislosti přežití buněk na dávce. Interpretace těchto exponenciálních křivek je následující. Předpokládá se, že:

- (1) těžké nabitě částice usmrcují buňku při průchodu určitým citlivým objemem (terčíkem) v buňce (jádrem);
- (2) pravděpodobnost zásahu je dána účinným průřezem terčíku.

Nechť σ je velikost účinného průřezu (v μm^2) a F je fluence částic v počtu částic/ μm^2 . Pak počet zásahů bude $\sigma \cdot F$. Pravděpodobnost, že nedojde ani k jednomu zásahu bude dle Poissonova rozdělení (buňka přežije):

$$S = \exp(-\sigma \cdot F)$$

Tím je vysvětlena exponenta křivek přežití pro těžké nabitě částice. Do rovnice lze dosadit dávku ze vzorce:

$$D = 0.16 \times \text{LET} \times F$$

kde jednotky jsou následující: D v Gy, LET v keV/ μm , F v $\text{č}/\mu\text{m}^2$

10.1.2. Metoda segmentů stopy částice:

Při středních a nízkých hodnotách LPE buňka nemusí vždy zahynout při průchodu částice citlivým objemem. Zahyne zřejmě pro velké LPE (předaná energie bude velká). Tak např. pro malé LPE (pro γ -záření je LET=0.3 keV/ μm) bude předaná energie malá (pro jádro bakterie s rozměrem 1 μm to bude 0.3 keV = 300 eV, tj. 5 aktů předání energie po 60 eV, tedy 5 SSB, které se reparují s velkou pravděpodobností).

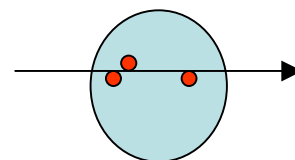
Proto se zavádí funkce $\psi(L)$, která se rovná pravděpodobnosti inaktivace buňky pro jeden průchod částice s LPE = L . Tato funkce definuje efektivní účinný průřez inaktivace buňky: $\sigma = \sigma_0 \cdot \psi(L)$ v předchozí rovnici. Nechť ϵ_0 je energie předaná při jednom aktu (obr. 145), d nechť je střední délka terčíku. Pak $k = L \cdot d / \epsilon_0$ bude střední počet aktů na jeden průchod částice a při Poissonově rozdělení bude pravděpodobnost m aktů:

$$P(m) = k^m \cdot e^{-k} / m!$$

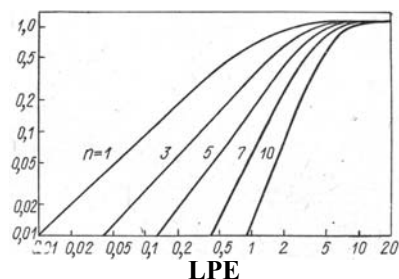
Při předpokladu, že pro usmrcení buňky je třeba alespoň n aktů dostaneme:

$$\psi(L) = 1 - e^{-L \cdot d / \epsilon_0} \sum_{k=0}^{n-1} \frac{(L \cdot d / \epsilon_0)^k}{k!}$$

Jestliže dosadíme funkce $\psi(L)$ do rovnice pro přežití buněk $S = \exp(-\sigma F)$, kde $\sigma = \sigma_0 \cdot \psi(L)$ a $F = D / 0.16 / L$, pak pro tzv. citlivost buněk, tj. hodnotu dávky potřebnou pro inaktivaci 37% buněk (neboli hodnotu koeficientu α v rovnici $S = \exp(-\alpha \cdot D)$), dostaneme: $\sigma_0 \cdot \psi(L) / 0.16 / L$. Pravděpodobnost inaktivace pro částici prošedší terčem je zobrazena v závislosti na LPE pro různý počet potřebných zásahů (n) na obr. 146.

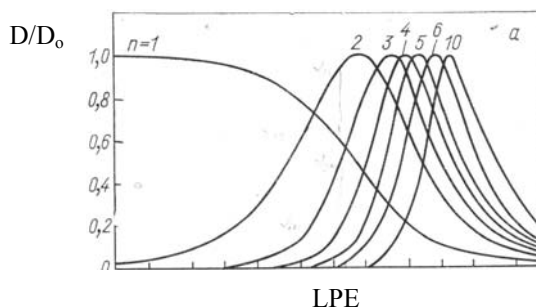


Obr. 145. Průchod částice citlivým objemem

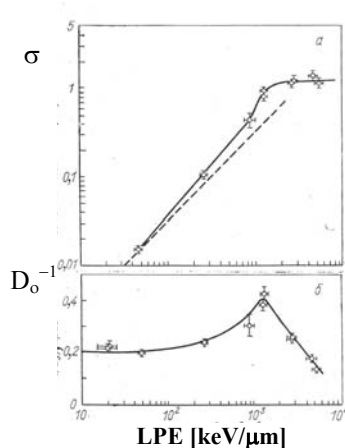


Obr. 146. Pravděpodobnost ψ v závislosti na LPE.

Jestliže dosadíme do rovnice pro citlivost buněk (tj. vlastně vydělíme L), dostaneme křivky s maximem (kromě první obr. 147). Tyto křivky závisí na počtu nutných zásahů (n) a na velikosti citlivého objemu (d), který pak odpovídá citlivosti pro γ -záření. Do rovnice dosazujeme účinný průřez pro vysoké hodnoty LPE, σ_0 . Tyto parametry pak popisují celou závislost na LPE. Na dalším obr.148 vidíme závislosti účinného

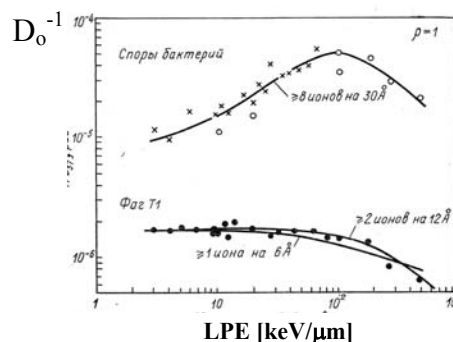


Obr. 147. Závislost citlivosti buněk na LPE záření.



Obr. 148. σ a D_0^{-1} v závislosti na LPE.

průřezu a citlivosti buněk na LPE. Uvedené křivky byly spočteny pro haploidní kvasinky a odpovídají v širokém rozmezí hodnot LPE teoretické předpovědi. Podobně lze popsat inaktivaci bakterálních spor za předpokladu, že pro inaktivaci dojde v citlivém objemu velikosti 3 nm k 8 událostem vydělení energie (obr. 149). Pro molekulu bakteriofága T1 nejlépe odpovídají křivce 2 události v rozmezí 1,2 nm (1 událost v terčiku o velikosti 0,6 nm dává



Obr. 149. Závislost citlivosti na LPE záření pro bakterie a viry

horší popis (obr. 149). Metoda segmentů stopy částice je poměrně hrubou aproximací, avšak je podstatou prakticky všech modelů popisujících citlivost buněk v závislosti na LPE záření.

10.2. Katzová teorie

10.2.1. Teorie inaktivace biologických objektů ve stopě částice

Katz ukázal, že účinný průřez může být větší, než je geometrický rozměr objektů, jestliže jsou tyto objekty citlivé k δ -elektronům. Lokální dávka uvnitř stopy částice je přibližně úměrná Z_e^2/E neboli Z_e^2/β^2 a nepřímo úměrná vzdálenosti od osy stopy, tj. x^2 (viz Struktura stopy částice str. 30). Jestliže tuto dávku použijeme ve vztahu pro přežití:

$$S(x) = \exp(-D_\delta(x)/D_0)$$

kde

$$D_\delta(x) = a \frac{Z_e^2}{\beta^2} \frac{1}{x^2}$$

a integrujeme přes stopu částice výraz $1-S(x)$, tj. pravděpodobnost, že buňka zahyne (od nuly do max. doletu δ -elektronů), dostaneme účinný průřez inaktivace pro jeden průchod částice, který pak můžeme dosadit do rovnice (viz metoda segmentů stopy částice):

$$S = \exp(-\sigma.F)$$

Katzovy konečné rovnice mají tvar

$$\sigma = 2\pi \int_0^{\infty} x dx \left(1 - e^{-D_{\delta}(x)/D_0}\right)$$

$$b = 1.36 \cdot 10^{-7}$$

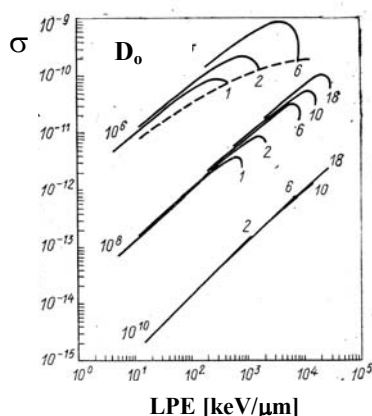
$$\sigma = 2\pi \int_0^a x dx \left\{1 - \exp\left[-\frac{bZ_e^2}{2\pi x \beta^2 D_0} \left(\frac{1}{x} - \frac{1}{a}\right)\right]\right\}$$

$$a = 1,246 \frac{m^2 c^2 \beta^2}{1 - \beta^2}$$

$$\beta = v/c$$

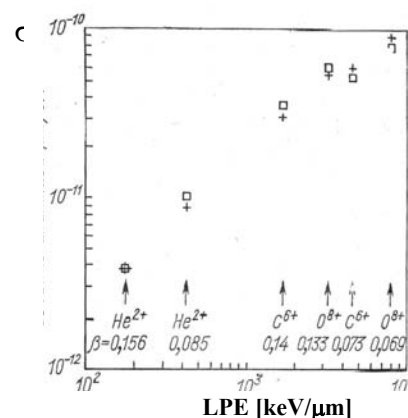
kde popis lokální dávky je trochu modifikován a integruje se do maximálního doletu δ -elektronů (a).

Účinný průřez v závislosti na LPE záření je zde vypočten pro různě citlivé objekty na obr. 150. Čísla u jednotlivých křivek znamenají Z . Čárkovaně je znázorněna křivka pro nekonečně tenkou stopu. Účinný průřez pro bakterie



Obr. 150. Závislost účinného průřezu (cm^2) na LPE záření.

E. coli (B_s kmen) pro různé částice s daným LPE a pro dané Z (typ iontu) je porovnán s teoretickými hodnotami (křížky). β je energie částice. Z obr. 151 je vidět, že i pro velmi podobné hodnoty LPE může nastat situace, že vyšší LPE nezvyšuje účinný průřez a naopak ho snižuje.



Obr. 151. Závislost účinného průřezu (cm^2) na LPE záření pro bakterie.

10.2.2. Katzová teorie pro savčí buňky

Zatím jsme se zabývali jednoduchými biologickými objekty (viry, citlivými druhy bakterií, haploidními kvasinkami), pro které je křivka přežití vesměs exponenciální, tj. nemá rameno. Existence ramene u křivek přežití savčích buněk samozřejmě komplikuje situaci.

Pro savčí buňky Katz rozlišuje tzv. „ion kill mode“ a „ γ -ray kill mode“. Pro „ion kill mode“ se předpokládá exponenciální křivka, ve které je exponent úměrný D/L (viz teorie segmentů stop částic):

$$S_i(D) = e^{-\frac{\alpha}{L^\infty} D}$$

Pro „ γ -ray kill mode“ se předpokládá platnost klasické víceterčové rovnice:

$$S_\gamma(D) = 1 - (1 - e^{-\beta D})^m$$

kde koeficienty α a β závisí na pravděpodobnosti, že inaktivace nastane jako „ion kill mode“ takto: $\alpha = P \cdot \sigma_0$, $\beta = (1-P)/D_0$. Pravděpodobnost P musí záviset na vlastnostech záření a Katz ji zavádí jako:

$$P = \left[1 - \exp\left(-\frac{Z_{eff}^2}{\chi \beta^2}\right)\right]^m$$

kde χ je nový parametr.

Pro křivku přežití pak dostaneme:

$$S(D) = e^{-\sigma_0 \frac{P}{L\infty} D} \left[1 - \left(1 - e^{-\frac{(1-P)D}{D_0}} \right)^m \right]$$

Tato rovnice byla použita pro fitování křivek přežití se 4 parametry, ale bez jasné biofyzikální interpretace. Hodnoty D_0 a m jsou vlastně odvozeny z křivky přežití pro γ -záření, hodnota σ_0 je odvozena ze sklonu křivky přežití pro velmi vysoké LPE. 4-tý parametr je potřebný pro popis přechodu mezi oběma režimy (ion vs γ -ray). Zatímco první model publikovaný v roce 1967 měl jasnou biofyzikální interpretaci a popisoval účinek záření na jednoduché biologické objekty, rozvinutý model pro savčí buňky je popisný, bez většího významu.

Oba tyto modely patří do kategorie „energy only models“, tj. uvažuje se v nich pouze o energii deponované v jádře (nukleoidu) buňky (tato energie je determinující pro inaktivaci). Tyto modely fungují pokud produkce poškození nezávisí příliš na LET, tj. pokud letálními poškozeními jsou např. SSB (u citlivých kmenů bakterií).

10.3. Teorie duálního účinku záření

Teorie vychází z experimentálního pozorování, že křivky přežití jsou pro γ -záření (X-záření) u savčích buněk převážně kvadratické, zatímco pro neutrony jsou lineární. Byl učiněn předpoklad, že γ -záření produkuje dvě nezávislá potenciálně letální poškození, které musí interagovat aby vzniklo poškození letální, zatímco neutrony produkují letální poškození přímo. Neutrony mají značnou komponentu záření s vysokým LPE, a proto Rossi navrhl odvodit interpretaci křivek přežití na základě mikrodosimetrie. Mluvíme o tzv. „duální teorii účinku“, tj. že účinek nastupuje interakcí dvou potenciálně letálních poškození. Počet poškození je úměrný specifické energii (z) absorbované v citlivé struktuře (jádro buňky) a počet interakcí tedy bude úměrný kvadrátu z^2 . Střední počet letálních poškození na buňku s absorbovanou energií \underline{z} označme $G(z)$ a frakci letálních poškození v populaci buněk označme $E(D)$. Pak platí

$$E(D) = \int_0^\infty G(z) \cdot f(z, D) dz$$

$$G(z) = kz^2$$

kde $f(z, D)$ je rozdělení specifické energie z při dávce D . Výpočet uvedeného integrálu lze provést zavedením $f_1(z)$ funkce jako Poissonovou sumaci členů:

$$\begin{aligned} \left[\overline{z^2} \right]_n &= \int_0^\infty dz z^2 f_n(z) \\ &= \int_0^\infty dz' f_{n-1}(z') \int_z^\infty dz z^2 f_1(z - z') \\ &= \int_0^\infty dz' f_{n-1}(z') \int_{z'}^\infty dz [(z - z')^2 \\ &\quad + 2(z - z')z' + z'^2] f_1(z - z') \\ &= \overline{z}_F \overline{z}_D + 2 \left[\overline{z} \right]_{n-1} \overline{z}_F + \left[\overline{z^2} \right]_{n-1} \\ &= \overline{z}_F \overline{z}_D + 2(n-1)z_F'^2 + \left[\overline{z^2} \right]_{n-1} \end{aligned}$$

což je rekurentní formule, kterou lze řešit: $\left[\overline{z^2} \right]_n = n \cdot \overline{z}_F \overline{z}_D + 2n(n-1)z_F'^2$

a sumace pak dá: $\overline{z^2} = \overline{z_D} \cdot D + D^2$

Střední počet letálních událostí na buňku se použije v exponentu rovnice pro přežití:

$$S = e^{-k(\overline{z_D} D + D^2)}$$

Rovnice pro přežití v závislosti na dávce se velmi často používá v radiobiologii jako nejjednodušší aproximace nelineární závislosti. Skutečná teorie by nutně potřebovala výpočet koeficientů a jejich porovnání s experimentem. Ukazuje se, že takové porovnání není úspěšné, protože koeficienty u lineárního členu jsou mnohonásobně větší v experimentu než by mohla dát teorie. Také závislost na LPE nebyla touto teorií nikdy popsána. Pro rozumný popis závislosti radiačních efektů na LPE je nutné popsat vznik poškození DNA v závislosti na LPE, čímž se budeme nyní zabývat.

10.4. Vznik zlomů DNA pro různé druhy záření

Produkce zlomů DNA se mění s růstem LPE záření a při stejném LPE závisí na energii záření. Produkce SSB s růstem LPE klesá; naopak produkce DSB měřených sedimentačními metodami pro vyšší LPE roste. Takové chování produkce zlomů odpovídá energetické náročnosti a můžeme je matematicky modelovat.

Při průchodu částice přes DNA vznikne zlom pouze s určitou pravděpodobností danou E a L (LPE, LET) záření. Střední počet aktů vydělení energie (60 eV) bude dán energií v DNA absorbovanou. Ta závisí na struktuře stopy a na parametru srážky (x). Musíme rozlišit dva velmi odlišné případy - DNA byla zasažena jádrem stopy nebo δ -elektrony. Obecně může energie v DNA deponovaná pocházet od obou částí stopy částice:

$$y(x) = y^\delta(x) + y_\Delta(x)$$

10.4.1. Vklad jádra stopy k energii deponované v DNA

Spočteme oba vklady energie na základě geometrických úvah (obr. 152). Mějme stopu částice (červeně jádro stopy a žlutě oblast δ -elektronů), která protíná DNA (zelený hranol) jak jádrem stopy, tak δ -obalem (předpokládejme pro začátek, že stopa je kolmá na molekulu DNA). Pak frakce energie pohlcená v hranolu pocházející od jádra stopy se dá spočítat pro různé případy vzdálenosti hranolu od osy stopy (x). Frakce energie deponovaná jádrem stopy v DNA pak bude (viz naznačený výpočet dále):

$$y_\Delta(x) = \frac{1-k}{\pi} \left[\arccos \frac{x_0}{r_{\min}} + \frac{x_0}{r_{\min}} \sqrt{1 - \left(\frac{x_0}{r_{\min}} \right)^2} \right],$$

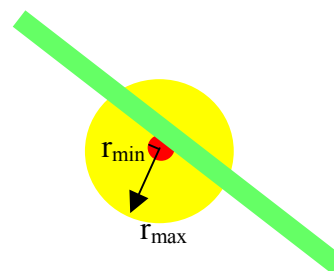
$$x_0 = x - \ell/2$$

$$\ell/2 < x < \ell/2 + r_{\min}$$

$$y_\Delta(x) = \frac{1-k}{\pi} \left[\pi - \arccos \frac{x_0}{r_{\min}} - \frac{x_0}{r_{\min}} \sqrt{1 - \left(\frac{x_0}{r_{\min}} \right)^2} \right],$$

$$x_0 = x - \ell/2$$

$$0 < x < \ell/2$$



Obr. 152. Stopa částice (žlutě) a DNA (zeleně). Červeně je zobrazeno jádro stopy.

ℓ je zde šířka DNA, r_{\min} je poloměr jádra stopy, k je frakce energie předávaná δ -elektrony (přibližně platí, že $\ell/2 \gg r_{\min}$).

10.4.1.1. Odvození rovnic pro jádro stopy

Úhel α (viz obr. 153) je dán funkcí $\arccos(x_0/r_{\min})$ a výšeč odpovídající dvojnásobnému úhlu α je normována na celkový kruh 2π ve druhé rovnici shora. Od této frakce se musí odečíst frakce energie přenášené jádrem stopy, která odpovídá trojúhelníku ABC.

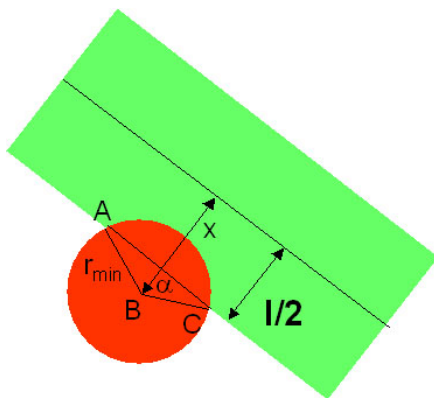
l je zde šířka DNA, r_{\min} je poloměr jádra stopy (přibližně platí, že $l/2 \gg r_{\min}$). $x_0 = x - l/2$

$$\alpha = \arccos \frac{x_0}{r_{\min}}$$

$$y_{\Delta 1} = \frac{1}{2\pi} \cdot 2 \cdot \arccos \frac{x_0}{r_{\min}}$$

$$x_0 = x - l/2$$

$$y_{\Delta 2} = \frac{1}{\pi} \frac{x_0}{r_{\min}} \sqrt{1 - \left(\frac{x_0}{r_{\min}}\right)^2},$$



Obr. 153. Jádro stopy částice jako válec (červeně) a DNA jako hranol (zeleně). Frakce energie přenášené jádrem stopy, která je deponována v DNA, se spočítá jako část červené plochy uvnitř zelené normovaná na celkovou plochu kruhu. $x_0 = x - l/2$ je výška v rovnoramenném trojúhelníku, který se pro výpočet také použije.

10.4.2. Vklad δ -elektronů k energii deponované v DNA

Kromě jádra stopy částice přispívá k energii deponované v DNA také „polostín“ (angl. „penumbra“). Rovnice pro tento vklad jsou následující:

$$y^{\delta}(x) = \frac{l \cdot k}{x} \frac{\arctg \sqrt{\left(\frac{40 \cdot E^{1.75}}{x}\right)^2} - 1}{\pi \cdot \ln \frac{40 \cdot E^{1.75}}{r_{\min}}} \quad \text{pro } x > r_{\min} + l/2$$

$$y^{\delta}(x) = \frac{l \cdot k}{x} \frac{\arctg \sqrt{\left(\frac{40 \cdot E^{1.75}}{x}\right)^2} - 1 - \arctg \sqrt{\left(\frac{r_{\min}}{x}\right)^2} - 1}{\pi \cdot \ln \frac{40 \cdot E^{1.75}}{r_{\min}}} \quad \text{pro } x < l/2 + r_{\min},$$

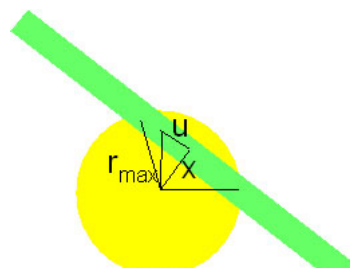
$$y_{\Delta}(x) = 0 \quad \text{pro } x > r_{\max} + l/2,$$

l je zde šířka DNA, r_{\min} je poloměr jádra stopy, k je frakce energie předávaná δ -elektrony (přibližně platí, že $l/2 \gg r_{\min}$ a $r_{\max} = 40 E^{1.75}$ nm)

10.4.2.1. Odvození rovnic pro δ -elektrony

Lokální dávka je úměrná $1/r^2$, kde $r = \sqrt{(x^2 + u^2)}$ a integraci je třeba provádět od $u_{\min}=0$ do u_{\max} .

$$u_{\max} = \sqrt{r_{\max}^2 - x^2} \quad r_{\max} = 40 \cdot E^{1.75}$$



je maximální dolet δ -elektronů. Integrací dostaneme funkci arctg

$$\int \frac{1}{x^2 + u^2} \cdot du = \frac{1}{x} \operatorname{arctg}(u/x)$$

Obr. 154. Polostín stopy částice (žlutě) a DNA (zeleně). x je parametr srážky

Meze integrace (0 až u_{\max}) nám dají polovinu celkového integrálu. Člen ve jmenovateli dostaneme normováním na celkovou energii δ -elektronů ve stopě, kde se integruje $1/x^2 \cdot 2\pi x dx$, což dá logaritmus a meze se volí od r_{\min} do r_{\max} . l je zde šířka DNA, r_{\min} je poloměr jádra stopy, k je frakce energie předávaná δ -elektrony, $r_{\max} = 40 E^{1.75}$ (nm)

10.4.2.2. Odvození rovnic pro produkci SSB a DSB zářením

Střední počet zlomů dostaneme jako:

$$\bar{n} = \frac{w \cdot l_{ef}}{\epsilon_0} \cdot \frac{y \cdot L}{2},$$

kde l_{ef} je efektivní rozměr DNA, který je větší než l vzhledem různým možným orientacím molekuly a stopy částice (zhruba $3/2 \cdot l$), $y \cdot L$ je frakce energie stopy deponované v DNA, ϵ_0 je energie na jeden akt předání a w je pravděpodobnost vzniku zlomu na jeden akt, tj. 60 eV ($w=1$). Skutečný počet SSB může být 1 nebo 2 (na obou řetězcích):

$$\bar{n}_{SSB_1} = 2 \cdot \left(1 - e^{-\frac{w \cdot l_{ef} \cdot y \cdot L}{2 \cdot \epsilon_0}} \right),$$

Podobně pro dvojité zlomy dostaneme:

$$n_{DSB} = \bar{g} \cdot \left(1 - e^{-\frac{w \cdot l_{ef} \cdot y \cdot L}{2 \cdot \epsilon_0}} \right)^2$$

kde čtverec je zde proto, že DSB vzniká jestliže na obou řetězcích vznikne SSB a tyto události jsou nezávislé. \bar{g} je geometrický faktor menší než 1, který zohledňuje pravděpodobnost zásahu druhého řetězce byl-li zasažen první ($\bar{g}=0,4$).

Předchozí veličiny jsou závislé na x a musíme je proto integrovat přes stopu částice. Pro střední počet SSB1 (SSB detekovatelné standardními metodami) a dDSB (přímé DSB) na jednotku dávky (Gy^{-1}) a na dalton dostaneme:

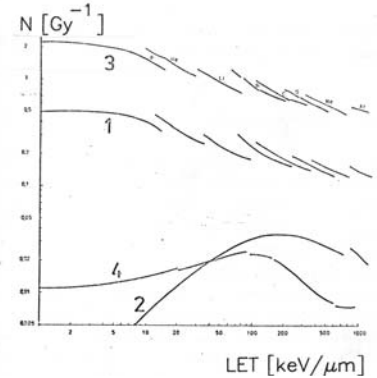
$$N_{SSB_1}(L) = 5 \cdot 10^{-9} \cdot \frac{1}{L} \int_0^{\infty} 2 \cdot \left(1 - e^{-\frac{w \cdot l_{ef} \cdot y \cdot L}{2 \cdot \epsilon_0}} \right) dx$$

$$N_{dDSB}(L) = 2.5 \cdot 10^{-9} \cdot \frac{1}{L} \int_0^{\infty} \left(1 - e^{-\frac{w \cdot l_{ef} \cdot y \cdot L}{2 \cdot \epsilon_0}} \right)^2 dx$$

Formule je odhadem pro SSB1, které se obvykle měří po ozáření a přímé dDSB, které představují hlavní příspěvek k DSB pro částice s vyšším LPE. Výpočet jiných typů poškození je možný, jestliže zvážíme jejich povahu. Tak např. poškození bází je častější, než vznik SSB, a proto w (počet poškození na 60 eV) musí být větší. Vznik zlomu a poškození báze na jednom řetězci lze spočítat, jestliže zmenšíme l_{eff} na $l/2$ (jedná se o jeden řetězec) a zvětšíme w . Komplexní poškození jednoho řetězce je hlavním adeptem na poškození nereparabilní rychlou reparací (SSB_{irr})

10.4.3. Výpočet poškození DNA v závislosti na LPE

Produkce poškození DNA v závislosti na LPE záření je spočtena podle uvedeného modelu na obr. 155. Počet SSB na jednotku dávky s růstem LPE klesá, stejně jako počet poškozených bází. Produkce DSB nejprve roste a posléze klesá. Na obr. 155 je křivka 1 – produkce SSB1, 2 – produkce přímých dDSB, 3 – produkce poškození bází (výpočet proveden jako pro SSB, pouze w větší), 4 – produkce tzv. komplexních poškození (SSB1+poškození báze, tj. dvě nezávislé události na stejném řetězci DNA, l_{eff} bude rovna $l/2$ a w bude větší).



Obr.155. Na obrázku jsou teoretické křivky produkce poškození DNA

10.5. Odvození rovnic pro přežití bakteriálních buněk

Pro přežití bude zřejmě platit (viz model reparace u bakterií):

$$S = e^{-a \cdot z}, a = N_{SSB1} \cdot \frac{q_3}{p_3 + q_3} \cdot \frac{q_2}{p_2 + q_2} + N_{dDSB},$$

kde \underline{a} je střední počet letálních události a křivka přežití je dána exponenciální křivkou s koeficientem \underline{a} . V této funkci však musí figurovat \underline{z} , tj. specifická energie, neboť to je energie, kterou buňka cítí. Jestliže $G(z)$ bude pravděpodobnost inaktivace buněk při specifické energii \underline{z} , pak sensitivitu ($1/Do$) můžeme psát jako:

$$G(z) = 1 - e^{-a(R,L,E) \cdot z}$$

$$D_0^{-1}(R, L, E) = \frac{1}{z_F} \cdot \int_0^{\infty} G(R, L, E, z) f_1(z) dz,$$

$$z_F = \int_0^{\infty} z \cdot f_1(z) dz$$

Výpočet integrálu s $f(z, D)$ funkcí je možné napsat ve formě integrálu s $f_1(z)$ funkcí.

10.5.1. Praktický výpočet přežití buněk

$$D_0^{-1} = \mu \cdot \frac{a}{F(x_1)} + (1 - \mu) \cdot a \cdot \phi(q, \omega),$$

$$\mu = 1 - 0.05 \cdot E^{-0.22} \cdot \ln(1/q),$$

$$F(x) = \frac{2}{3} \cdot x_1 / \left\{ 1 - \frac{2}{x_1^2} [1 - e^{-x_1} (1 + x_1)] \right\},$$

$$\phi(q, \omega) = 1 - \sum_{i=2}^{\infty} \frac{\omega^{i-\ell}}{(i-\ell)!} \cdot \frac{1 - q^{i-\ell}}{(\ln q)^i},$$

$$q = 194 \cdot \sigma_{in} / E^{3.42}, \omega = 16 \cdot a \cdot (1 - \mu) \frac{L}{\sigma_{in}}, x_1 = 24 \cdot a \cdot \mu \cdot \frac{L}{\sigma_{in}}$$

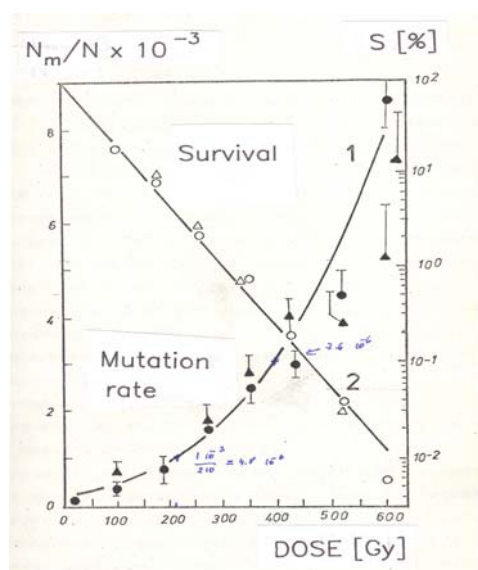
Další výpočet lze učinit podle Gubina zjednodušeným způsobem (viz rovnice). Zde koeficient \underline{a} závisí na \underline{L} a energii záření a dosazuje se z předešlého výpočtu. μ je zde frakce energie předávaná oblastí stopy kolem jádra s rozměrem citlivého objemu (závisí mírně na energii), σ_{in} je geom. průřez citlivé oblasti (pro bakterie je to přibližně $1 \mu m^2$)

XI Přežití a mutagenese při ozáření buněk hustě ionizujícím zářením

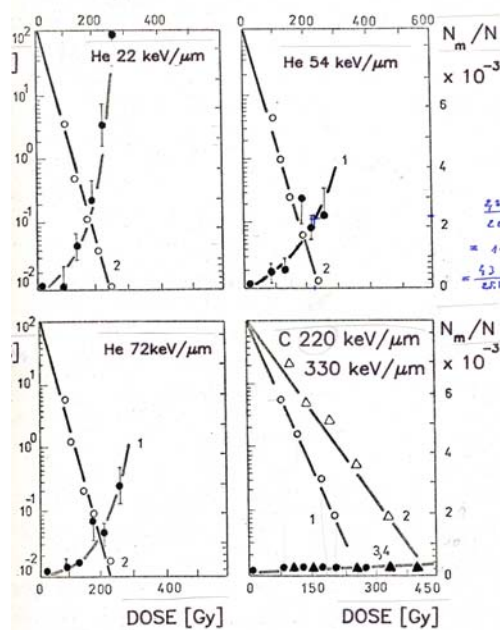
11.1. Přežití a indukce přímých mutací hustě ionizujícím zářením u bakterií

11.1.1. Vznik přímých mutací po ozáření γ -zářením a urychlenými částicemi

Křivka přežití a frekvence indukovaných mutací v lacZ lokusu E.coli v závislosti na dávce pro γ -záření ^{137}Cs je pro srovnání uvedena na obr. 145. Je zřejmé, že křivka přežití je exponenciální zatímco frekvence indukovaných mutací roste s dávkou kvadraticky. V tomto experimentu byly stanoveny mutace v lacZ genu pomocí pěstování bakterií na půdě s tetrazoliem. Na dalším obrázku (obr. 146) jsou uvedeny křivky přežití a mutagenese pro těžké ionty (helium s třemi hodnotami LPE a ionty uhlíku se dvěma hodnotami LPE). Křivky přežití zůstávají exponenciální, ale účinnost iontů helia je větší ve srovnání s γ -zářením. Je zajímavé, že také závislosti $N_m/N(D)$ zůstávají kvadratickými až do vysokých hodnot LPE (72 keV/ μm). Pro ionty uhlíku se mutagenese snižuje.



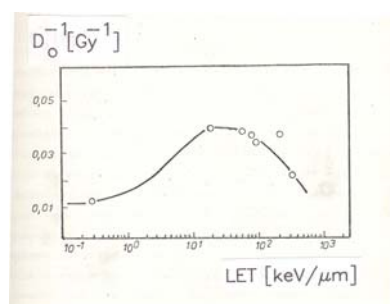
Obr. 145. Křivka přežití a četnost vzniku přímých lac mutací u E.coli (γ -záření).



Obr.146. Četnost vzniku mutací u E.coli pro hustě ionizující záření.

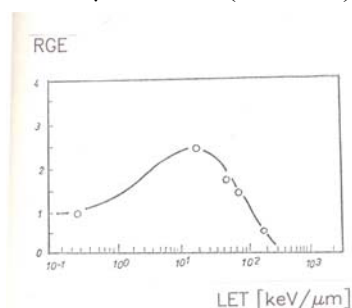
11.1.2. Relativní účinnost různých druhů záření.

Letální účinek hustě ionizujícího záření je evidentně větší ve srovnání s γ -zářením (obr. 147) a



Obr. 147. Radiosensitivita buněk ($1/D_0$) v závislosti na LPE záření.

až pro hodnoty LPE nad 100 keV/ μm se snižuje. To nelze vysvětlit fluktuacemi energie v citlivém objemu buněk, ale spíše větší produkcí zlomů DNA (DSB) účinkem hustší ionizace (viz kapitola X). U mutagenese dochází rovněž nejprve k růstu účinnosti záření při zvyšování LPE a posléze k poklesu, ale maximum se objevuje při menších



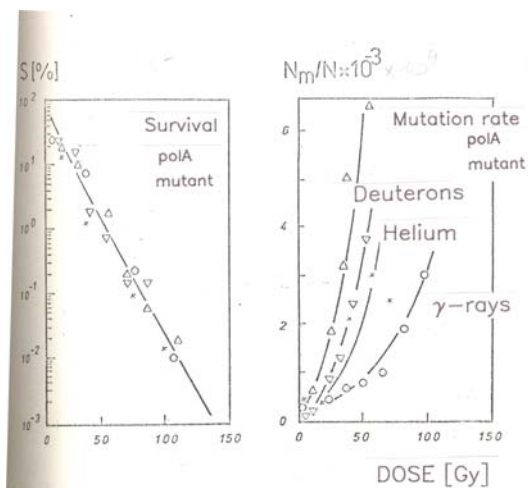
Obr. 148. Relativní genetická účinnost hustě ionizujícího záření v závislosti na LPE.

hodnotách LPE (obr. 148). Pokles lze vysvětlit tím, že pro těžké částice buňky hynou

průchodem částice přes genom buňky, tj. v přežívajících buňkách nevznikají mutace. Nárůst může souviset s charakterem poškození DNA, která vedou k mutacím. Pravděpodobně jsou to poškození komplexního typu, která vedou spíše k mutacím než k letálním událostem.

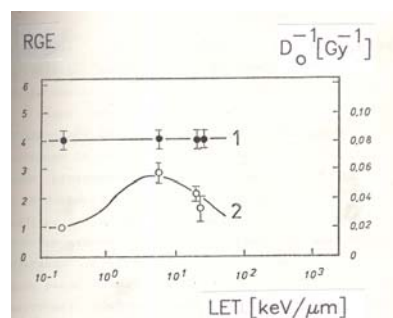
11.1.3. Závislost citlivosti buněk a mutagenese na LPE u *polA* kmene *E.coli*

Vznik mutací by mohlo objasnit chování reparačně defektních kmenů *E.coli* na které se nyní rovněž podíváme. Zajímavé jsou buňky *polA*, ve kterých se indukuje SOS reparační podobně jako u buněk „wild type“.



Obr. 149. Citlivost a mutagenese *polA* kmene *E.coli* pro hustě ionizující záření

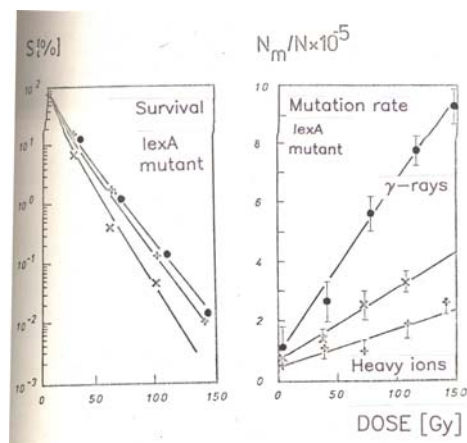
Na obr. 149 je citlivost *polA* defektního kmene k různým typům záření. Vidíme, že citlivost se prakticky nemění což lze vysvětlit velkým příspěvkem SSB k letálním událostem (chybí rychlý typ reparační). Mutagenese vzrůstá pro těžké nabitě částice a prochází přes maximum při 10 keV/μm (obr. 150). Chování je zde podobné jako u buněk standardního kmene.



Obr. 150. Závislost citlivosti buněk *polA* a relativní genetické účinnosti na LPE

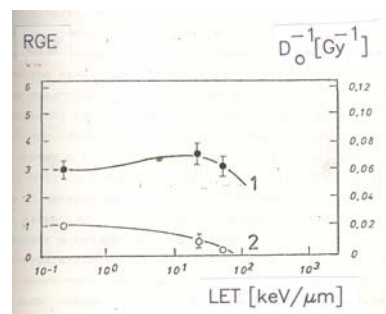
11.1.4. Závislost citlivosti buněk a mutagenese na LPE u *lexA* kmene *E.coli*

lexA- buňky mají defekt v indukci SOS systému. Mutagenese je zde podstatně zeslabená. Citlivost buněk vůči záření je větší (chybí pomalý typ reparační). Frekvence indukovaných mutací pro 100 Gy dosahuje $6 \cdot 10^{-4}$ na přežívající buňku, což je 50x méně než pro stejnou dávku u *polA* kmene ($3 \cdot 10^{-3}$). Z obr. 151 je vidět, že i při malých počtech mutovaných buněk lze přímé mutace snadno detekovat.



Obr.151. Citlivost a mutagenese *lexA* kmene *E.coli* pro hustě ionizující záření

Citlivost těchto buněk se moc nemění nebo spíše klesá s růstem LPE (podobně jako u *polA* kmene). Mutagenese výrazně

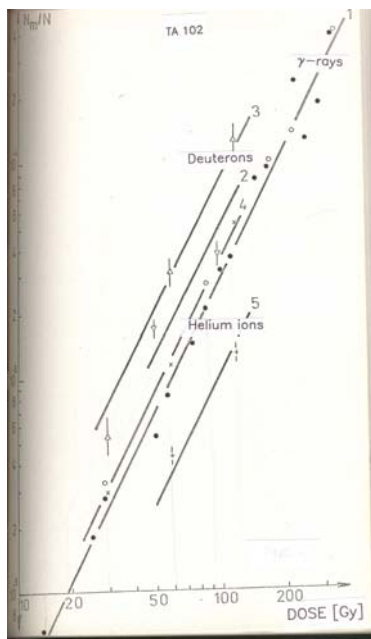


Obr. 152. Závislost citlivosti buněk *lexA* a relativní genetické účinnosti na LPE

klesá (obr. 152). U těchto buněk se SOS reparační neúčastní mutagenese, a proto je produkce mutací malá, a ani vyšší hodnoty LPE záření ji nezvyšují. To nelze vysvětlit žádným známým mechanismem. Pravděpodobně i rychlý typ reparační zlomů DNA za účasti enzymů excisní reparační jako je *polA* není zcela bezchybný a může určité typy poškození DNA interpretovat jako přítomnost jiné báze v řetězci kde je prováděná oprava.

11.2. Indukce reverzí u bakterií zářením s vysokou hustotou ionizace

Zpětné mutace lze detekovat snadno na půdě, kde původní kmen neroste. Abychom mohli spočítat frekvenci indukovaných mutací (tj. normovat počty mutací na přežívající buňku, musíme přesně změřit křivku přežití. Na obr. 126 (viz kap. 7) je uvedena křivka přežití pro buňky *Salmonella typhimurium* s defektem v syntéze histidinu (jedná se o systém tzv. Amesových kmenů, kde je známá molekulární událost, která vede k reverzi). Počty reverzí na přežívající buňku v závislosti na dávce jsou uvedeny na obr. 153. Křivky odpovídají různým druhům záření – γ -záření, deuterium (5 a 12 keV/ μm), helium (22 a 83 keV/ μm). Na obr. 154 je závislost relativní genetické účinnosti na LPE záření. Je zajímavé, že genetická účinnost dále klesá u buněk TA 98, kde je mutagenní událostí frameshift. U kmene TA 102, kde pozorujeme relativně velkou mutagenézi pro γ -záření se genetická účinnost dále zvyšuje pro těžké ionty s růstem LPE záření. Je obtížné hledat zde vysvětlení na úrovni poškození DNA.

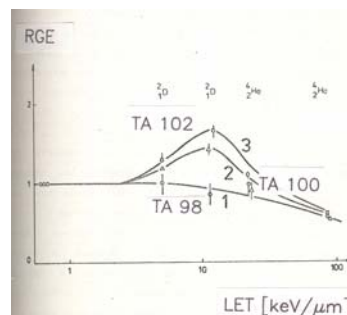


Obr. 153. Dávkové závislosti mutagenézi pro TA102 kmen ozářený různými druhy záření.

mutagenézi pro γ -záření se genetická účinnost dále

zvyšuje pro těžké ionty s růstem LPE záření. Je obtížné hledat zde vysvětlení na úrovni poškození DNA.

Každopádně se zdá, že poškození vedoucí k reverzím u TA102 a TA100 se liší svou podstatou od poškození, jež indukují reverze u TA98.



Obr. 154. Relativní mutagenéze u buněk *Salmonella typhimurium* pro těžké ionty.

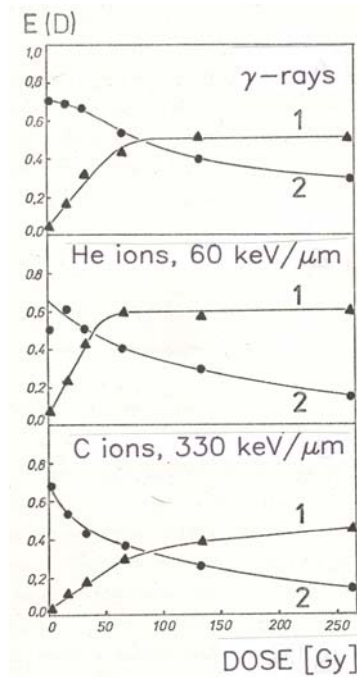
Indukci přímých mutací i reverzí u bakterií lze popsat lineárně kvadratickou závislostí do poměrně vysokých hodnot LPE a normováním lze tedy docela jednoznačně stanovit hodnoty relativní genetické účinnosti, které nejsou funkcí dávky. Těžké částice s vysokým LPE indukují mutace s větší účinností u buněk standardního kmene a *polA* mutantu, s menší účinností u *lexA* kmene s defektem indukce SOS systému. U zpětných mutací byly zjištěny rozdíly mezi účinností záření v závislosti na genetické změně – pro změnu v kodonu TAA je mutagenéze nejvyšší, pro GGG menší a pro frameshifts nejmenší. Těžké nabitě částice s vysokým LPE jsou efektivnější pro mutace v TAA kodonu a relativně méně efektivní pro frameshift mutace. Kvadratické závislosti na dávce lze vysvětlit nezbytností indukce SOS systému pro vznik mutací. Podíváme se nyní blíže na indukci SOS samotnou.

11.3. Indukce SOS systému zářením

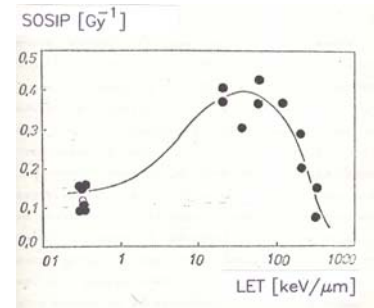
SOS systém lze zkoumat podle indukce jednotlivých genů s regulací *lexA* represorem nebo také s využitím indukce profága λ , který má vlastní represor (λ represor), jenž je součástí SOS systému. Zvláštností λ -represoru je jeho schopnost indukovat profága rychleji, než buňka zahyne, tj. při vážném ohrožení buňky (poškození DNA), dojde ještě na poslední chvíli k indukci profága, který se pomnoží a lyzuje buňku.

11.3.1. SOS chromotest

Ve speciálně upravených kmenech *E.coli* (nesoucích konstrukt s lacZ genem pod kontrolou *lexA* promotoru) lze sledovat indukci SOS systému měřením množství β -galaktosidázy pomocí vhodného substrátu (ONPG) a fotometrie. Na obr.155 vidíme indukci SOS v závislosti na dávce pro různé druhy záření. Rostoucí křivky představují koncentrace β -galaktosidázy, klesající křivky jsou kontrolní a představují koncentrace fosfatázy. Je zřejmé, že indukce je nejsilnější pro ionty helia. Počáteční sklony pro ionty helia z obr. 155 normovány na γ -záření (SOSIP je tzv. SOS induction potency) jsou zobrazeny na obr. 156 v závislosti na LPE záření. Vidíme, že indukce SOS je nejefektivnější pro LPE kolem 20-50 keV/ μ m.



Na obr. 156 v závislosti na LPE záření. Vidíme, že indukce SOS je nejefektivnější pro LPE kolem 20-50 keV/ μ m.

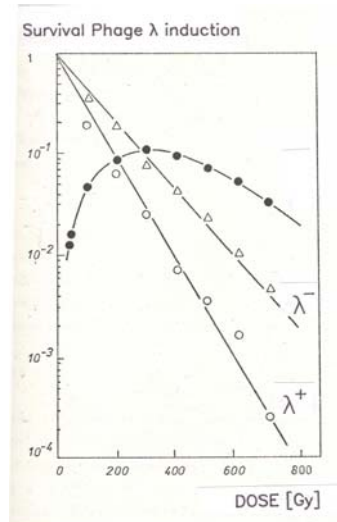


Obr. 156. Závislosti indukce SOS na LPE záření.

Obr. 155. Dávkové závislosti indukce SOS systému ionizujícím zářením (měřeno SOS chromotestem).

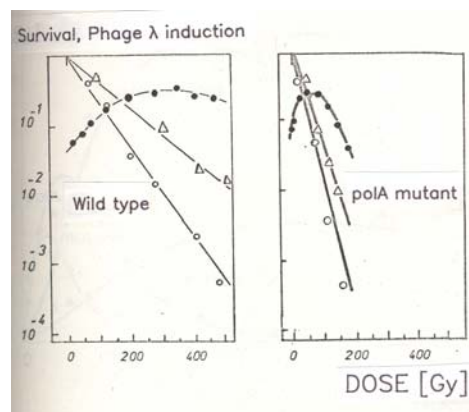
11.3.2. Indukce λ fága

SOS systém lze zkoumat také podle indukce profága λ , který je u tzv. lysogenních kmenů zabudován do genomu a nachází se pod kontrolou SOS systému. Při poškození DNA dochází k jeho indukci a pomnožení. Na obr.157 je citlivost kontrolní a lysogenní populace buněk a indukce profága zářením. Křivka prochází přes maximum, neboť počet fágových částic na misku je pro velké dávky snižován letálním účinkem záření. Jak lze očekávat, profág je indukován s daleko větší pravděpodobností u buněk s defektem *polA* enzymu. Na obr. 158 jsou stejné závislosti porovnány pro buňky standardního kmene a *polA*. Je z nich vidět, že indukce profága je větší na jednotku dávky u standardního kmene a to v přibližně stejném poměru jako je redukováno přežití.



Obr. 157. Křivky přežití normální a lysogenní kultury *E.coli* a indukce profága v závislosti na dávce.

Na obr. 158 jsou stejné závislosti porovnány pro buňky standardního kmene a *polA*. Je z nich vidět, že indukce profága je větší na jednotku dávky u standardního kmene a to v přibližně stejném poměru jako je redukováno přežití.

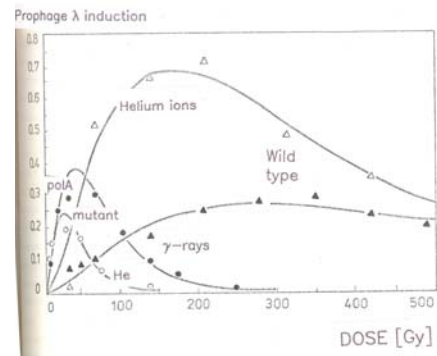


Obr. 158. Porovnání standardního kmene a isogenního kmene s defektem v *polA*.

11.3.3. Indukce profága λ hustě ionizujícím zářením

Ionty helia indukují fága efektivněji pro standardní kmen, ale stejně efektivně pro polA defektní mutovaný kmen, kde je však indukce SOS i tak velká (obr. 159). Tyto poznatky jsou ve shodě s výsledky získanými SOS chromotestem.

Indukce SOS systému zářením je potřebná pro přežití buněk, ale vede ke vzniku mutací a ke kvadratické závislosti četnosti mutagenese na dávce. Poškození, která indukují SOS jsou produkována s větší četností zářením s vyšším LPE (v oblasti 20-50 keV/ μ m), což znamená, že jsou to komplexnější typy poškození, jež vyžadují větší vydělení energie pro svůj vznik.



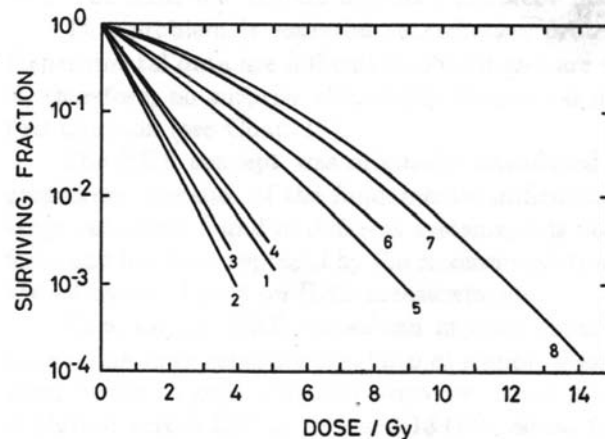
Obr. 159. Indukce profága λ hustě ionizujícím zářením.

11.4. Přežití a mutagenese savčích buněk po ozáření hustě ionizujícím zářením

11.4.1. Přežití savčích buněk v závislosti na LPE záření

Citlivost savčích buněk vůči záření narůstá pro vyšších hustoty ionizace, což je v souladu s dříve zdůvodněnou představou, že

letální události jsou u savčích buněk odvozeny od DSB. Produkce DSB pro vyšší LPE se zvyšuje, a proto roste také citlivost (obr. 160). Pro hodně velké LPE nastává opět pokles citlivosti (to je na obrázku patrné v oblasti 88-166 keV/ μ m). Pokles citlivosti buněk lze vysvětlit fluktuacemi energie – viz kap. IV). Růst citlivosti buněk vůči záření v oblasti 0,3-88 keV/ μ m není možné vysvětlit mikrodosimetrií. Je zřejmé, že dříve popsaný model inaktivace savčích buněk nazvaný jako „dual radiation action theory“ (kapitola 10.3) a rozvíjený zejména Rossim a Kellererem nemůže v principu tyto výsledky vysvětlit. Také model Katze neobsahuje popis vzniku poškození DNA v žádné formě a poměrně dobrý popis křivek přežití je proto umožněn pouze zavedením dodatečných (nemodelových) předpokladů o závislosti pravděpodobnosti režimu „ion kill mode“ na LPE záření. Tyto předpoklady ovšem činí z modelu bezcenný ryze matematický popis. Rozumný popis přežití savčích buněk v závislosti na LPE záření se objevuje v práci Gunthera a Schultze, kteří modelují vznik poškození DNA mikrodosimetrickými metodami a dále do své teorie zahrnují fluktuace energie v citlivém objemu savčích buněk. Popis tohoto modelu je však poměrně složitý a model neřeší biofyzikálním způsobem vznik poškození DNA (pravděpodobnost vzniku SSB nebo DSB je v závislosti na absorbované specifické energii popsána formální funkcí se 3 parametry). Proto tento model nedoznal velkého uplatnění a nebudeme jej podrobněji popisovat.



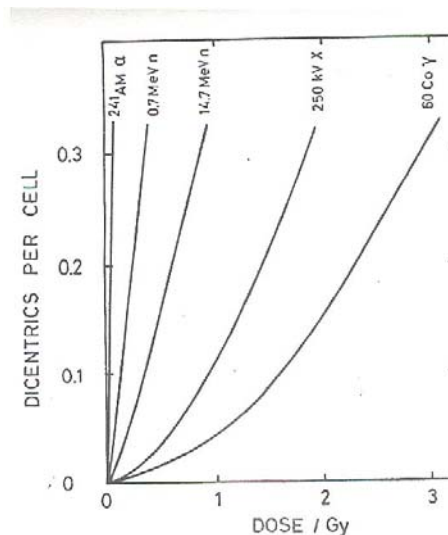
Obr. 160. Přežití T1 buněk (lidské buňky ledvin) při ozáření částicemi s různou hustotou ionizace: 1-166 keV/ μ m, 2-110 keV/ μ m, 3-88 keV/ μ m, 4-61 keV/ μ m, 5-25 keV/ μ m, 6-20 keV/ μ m, 7-5,6 keV/ μ m, 8-0,3 keV/ μ m

Závislosti přežití na LPE záření byly studovány v mnoha pracech. V některých autoři použili stejné částice, a aby dosáhli větších hodnot LPE, snižovali jejich energii, jindy naopak zvyšovali LPE výběrem vhodného iontu. V další kapitole jsou uvedené také výsledky přežití a mutagenese pro velmi těžké ionty končící uranem.

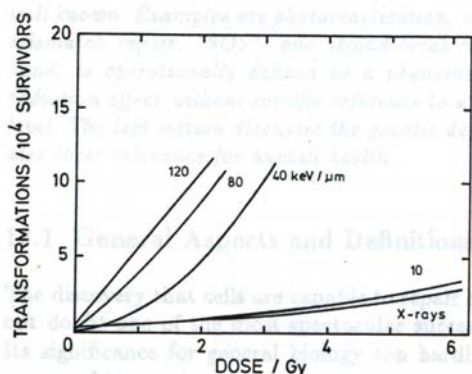
11.4.2. Vznik chromosomových aberací a bodových mutací po ozáření u savčích buněk

V kapitole VII jsme se zabývali vznikem a osudem chromosomových přestaveb. Tyto přestavby vznikají několika mechanismy, z nichž nejčastější je zřejmě chybné spojení konců chromosomů při NHEJ reparaci. Vyšší hustota ionizace vede k markantnímu zvýšení účinnosti indukce aberací (obr. 161). Na obrázku jsou uvedeny závislosti počtu dicentriků/buňku na dávce pro různé druhy záření (γ -záření, X-záření, neutrony, α -částice). Vidíme, že stejný efekt jako řídce ionizující záření (γ -záření nebo X-záření) zde působí 20-30x nižší dávky α -záření. Proto jsou neutrony a α -částice považovány ze zdravotního hlediska za velmi nebezpečné druhy záření.

U savčích buněk lze rovněž detekovat bodové mutace (např. mutace v genu HPRT), který odpovídá za rezistenci k 6-thioguaninu (kap. 7.2). Vznik těchto mutací byl detekován po ozáření těžkými



Obr. 161. Dávkové závislosti indukce dicentrických aberací pro různé hodnoty LPE záření.



Obr. 162. Četnost transformace buněk v závislosti na dávce záření pro různé LPE.

ionty s různou hodnotou LPE. Detekované závislosti jsou složité, a proto je uvedeme v další kapitole kde se zároveň pokusíme o jejich interpretaci.

11.4.3. Transformace buněk hustě ionizujícím zářením

Účinnost těžkých nabitých částic je podstatně větší ve srovnání s X-zářením, zejména v oblasti malých dávek záření (obr. 162). Lineárně-kvadratická závislost přechází na lineární.

XII. Matematické modely mutagenního účinku záření s vysokým LPE

12.1. Indukce mutací a přežití bakterií po ozáření částicemi s velmi vysokým LPE

V tabulce 5 jsou uvedena souhrnná data o indukci mutací různými druhy záření. Jsou popsány charakteristiky záření a uvedeny účinné průřezy pro indukci mutací. Tyto experimenty byly provedeny v Berkeley na Bevalacu (Fe, Ne ionty), Dubně na urychlovači U400 (D, He, C), Darmstadtu (*B. subtilis*) a některé také u nás v Řeži u Prahy na cyklotronu (*lacI* mutace na svazcích He a D)

Tab.5. Fyzikální parametry těžkých iontů, které byly použity v experimentech, experimentální účinné průřezy indukce mutací (σ_m) mutagenní účinnosti na částici (MPE), získané z poměrů σ_m a konstanty indukce mutací α_m pro X nebo γ -záření

Ion	E_n (MeV/u)	LET (keV/ μ m)	Accelerator ^a	Assay system		$\sigma_m \times 10^{-7}$ (μ m ²) ^b	MPE (μ m ² × Gy)	Reference
				Bacteria	Mutation			
Deuterium	5.0	8	1	<i>E. coli</i>	<i>lacI</i>	3.1 ± 0.3	1.08 ± 0.14	30
	5.0	8	1	<i>S. typhimurium</i>	<i>his</i>	0.45 ± 0.07	1.15 ± 0.27	30
Helium	0.9	115	—	<i>E. coli</i>	<i>lacI</i>	7 ± 5	2.4 ± 1.8	30
	1.7	72	3	<i>E. coli</i>	<i>lacZ</i>	(1.1 ± 0.1) × 10 ³	14.4 ± 2.3	10
	2.5	54	3	<i>E. coli</i>	<i>lacZ</i>	(1.0 ± 0.1) × 10 ³	13.8 ± 1.7	10
	3.4	44	1	<i>E. coli</i>	<i>lacI</i>	38 ± 6	12.3 ± 2.4	30
	3.4	44	1	<i>S. typhimurium</i>		4.2 ± 0.8	11.3 ± 3.0	30
	6.0	28	1	<i>E. coli</i>	<i>lacI</i>	35 ± 2	12.3 ± 1.1	30
	6.0	28	1	<i>S. typhimurium</i>		4.6 ± 0.5	11.8 ± 2.2	30
Carbon	8.0	22	3	<i>E. coli</i>	<i>lacZ</i>	(6.1 ± 0.3) × 10 ²	8.1 ± 0.7	10
	7.0	220	3	<i>E. coli</i>	<i>lacZ</i>	(4.2 ± 1.4) × 10 ²	5.6 ± 1.8	10
Neon	1.5	1400	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	0	0	12
	3.3	900	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	0	0	12
	5.7	650	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	0	0	12
	5.9	630	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	0.15 ± 0.01	9.0 ± 1.2	12
	10.2	430	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	0.16 ± 0.01	9.6 ± 2.7	12
	14.4	330	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	0.36 ± 0.02	21.6 ± 2.7	12
	18.6	280	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	0.32 ± 0.01	19.2 ± 1.9	12
	425	30	2	<i>S. typhimurium</i>	<i>his</i>	1.7 ± 0.4	9.5 ± 2.8	30
	600	26	2	<i>E. coli</i>	<i>lacI</i>	7.5 ± 0.6	3.0 ± 0.4	30
	600	26	2	<i>S. typhimurium</i>	<i>his</i>	0.83 ± 0.06	4.2 ± 0.5	30
Iron	400	210	2	<i>E. coli</i>	<i>lacI</i>	50 ± 3	28.6 ± 3.1	30
	400	210	2	<i>S. typhimurium</i>	<i>his</i>	8.2 ± 0.6	32.8 ± 4.3	30
Nickel	0.9	5000	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	0	0	12
	3.4	3700	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	0.68 ± 0.03	40.7 ± 4.6	12
Krypton	10.0	3930	4	<i>E. coli</i>	<i>lacI</i>	420 ± 50	145 ± 24	30
	10.0	3930	4	<i>S. typhimurium</i>	<i>his</i>	81 ± 20	207 ± 63	30
	10.8	3200	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	1.16 ± 0.07	69.5 ± 9.0	12
Xenon	17.7	2500	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	1.00 ± 0.05	59.8 ± 7.2	12
	2.1	8700	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	0.44 ± 0.05	26.3 ± 4.8	12
	2.8	8300	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	0.74 ± 0.10	44.3 ± 9.0	12
	4.2	7600	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	1.00 ± 0.06	59.9 ± 7.7	12
	6.9	6700	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	1.70 ± 0.05	101 ± 10	12
	9.5	6000	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	2.37 ± 0.06	142 ± 13	12
	11.8	5500	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	2.03 ± 0.10	121 ± 14	12
	16.8	5000	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	2.33 ± 0.40	139 ± 33	12
Uranium	2.6	15400	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	1.05 ± 0.04	62.9 ± 6.8	12
	7.7	13700	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	2.94 ± 0.27	176 ± 28	12
	10.7	12600	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	4.70 ± 0.31	281 ± 38	12
	11.9	12000	4	<i>B. subtilis</i>	<i>his</i>	4.33 ± 0.29	259 ± 35	12

Vznik mutací u bakterií po ozáření můžeme matematicky popsat na základě představ o struktuře stopy částice. Zavedeme k tomu účelu mutagenní účinnost γ -záření jako koeficient ve vztahu $m=\alpha_m D$, a mutagenní účinnost záření s daným LET jako koeficient ve vztahu $m=\sigma_m F$.

$$m_i(D) = \sigma_m F$$

$$m_\gamma(F) = \alpha_m D$$

Poměr těchto účinností označíme $MPE=\sigma_m/\alpha_m$

Veličina MPE se snadno určí z experimentu a pokusíme se tedy o její výpočet. Zavedeme ještě důležitý vztah mezi dávkou δ -elektronů D_δ a fluencí částic F . Budeme předpokládat, že frakce energie deponovaná elektrony bude f_δ . Pak platí:

$$D = 0.16 \times LET_\infty \times F$$

$$D_\delta = 0.16 \times f_\delta \times LET \times F$$

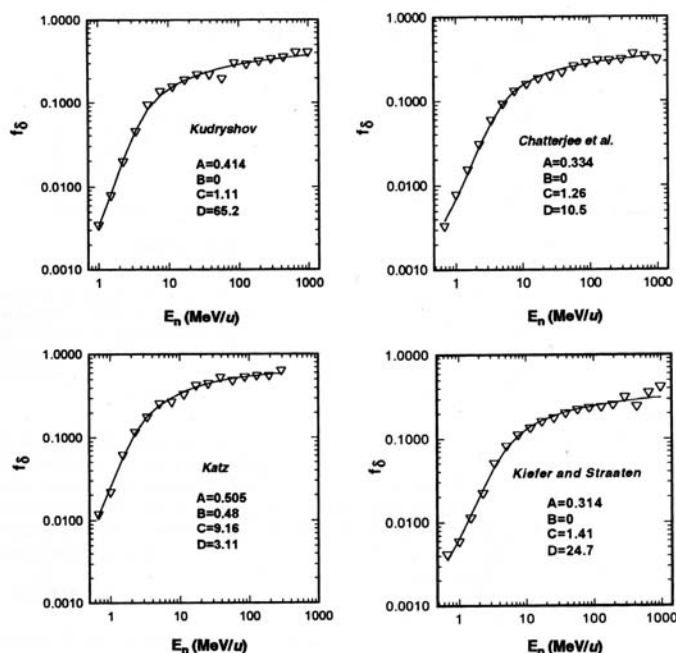
Spočteme frakci f_δ na základě modelu struktury stopy částice.

Strukturu stopy lze popsat několika modely různých autorů (Chatterjee, Kudrasov, Kiefer a Katz), přičemž se tyto modely liší jednak úbytkem energie v závislosti na vzdálenosti od osy stopy a jednak odhadem pro dolet δ -elektronů. Přesto vedou tyto modely k velmi podobným odhadům pro závislost $f_\delta(E)$. Stopa je popsána v modelu Kudryashova (resp. Kiefera a Straatena) funkcemi:

$$D_\delta \approx \frac{Z_{eff}^2}{E_n^{1.06}} \times \frac{1}{b^2}$$

$$D_\delta = 0.000125 \times \frac{Z_{eff}^2}{\beta^2} \times \frac{1}{b^2}$$

Závislosti $f_\delta(E)$ jsou uvedeny na obr. 162.

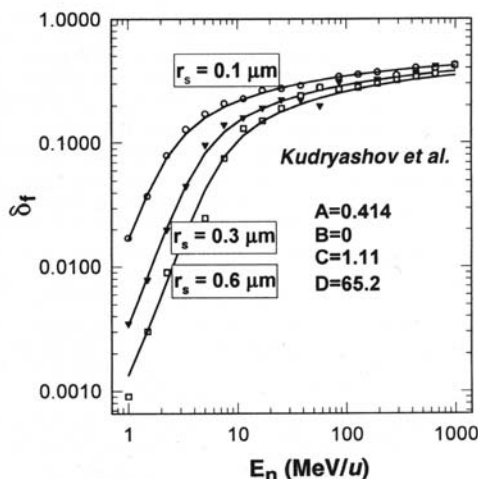


Obr. 162. Výsledky Monte Carlo výpočtů frakce energie deponované těžkými ionty v nepřímých zásazích (f_δ) ve sférických objektech ($r_s=0,3\mu\text{m}$). Funkce $f_\delta(E_n)$ je spočtena na základě modelů Kudriashova, Chetterjeeho, Katze a Kiefera.

Závislost $f_{\delta}(E)$ byla spočtena Monte Carlo ale lze ji snadno popsat empirickou funkcí:

$$f_{\delta} = A \times (1 - e^{-c/B}) \times \frac{\log(c + e^{-c/C})}{\log(D \times E_n)}$$

kde $c=r_{\delta}/r_s$ $r_{\delta}=0.0616.E^{1.7}$ je aproximace Kiefera a Straatena pro dolet elektronů ve stopě částice. Na obr. 163 je znázorněna závislost uvedené funkce na velikosti citlivého objemu r_s . Vidíme, že pro větší r_s je frakce f_{δ} menší. Křivky spočtené na základě semiempirické formule jsou proloženy experimentálními body.



Obr. 163. Závislost frakce energie deponované v nepřímých zásazích na energii částice pro různé velikosti citlivého objemu.

V tabulce 6 jsou uvedeny kromě účinných průřezů pro indukci mutací také hodnoty MPE, které mají důležitou vlastnost. Jestliže je

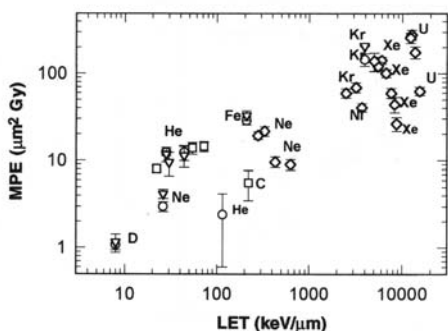
relativní biologická účinnost těžkých částic stejná jako je účinnost γ -záření, tj. $m_i=m_{\gamma}$, pak dosazením za dávku dostaneme:

$$MPE = 0.16 \cdot L,$$

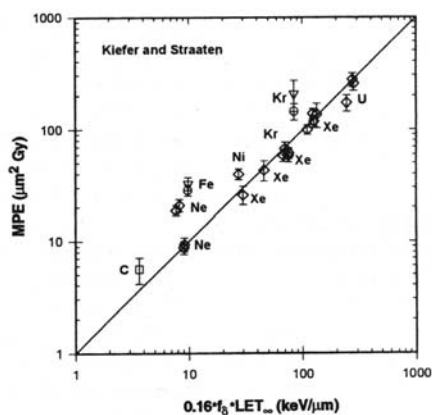
tj. MPE bude lineárně růst s LPE částic. Pro velmi těžké částice, které zabijí buňku průchodem přes její citlivou strukturu a jejichž mutagenese prostřednictvím δ -elektronu je stejná jako u γ -záření dostaneme:

$$MPE = 0.16 \cdot f_{\delta} \cdot L$$

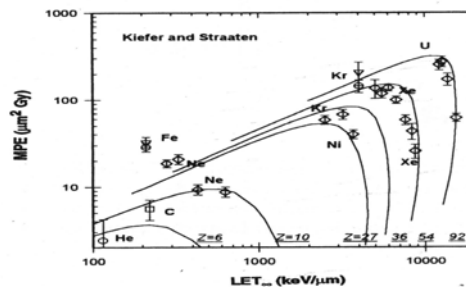
Na obr. 164 jsou uvedeny hodnoty MPE pro různé LPE. Je vidět, že MPE nesouvisí jednoznačně s LPE částic. Jestliže však vyneseme MPE v závislosti na $f_{\delta} \cdot LPE$, dostaneme zřetelnou korelaci; nejlepší pro model Kudryashova a Kiefera (obr. 165). Závislosti MPE na LET pak vytvářejí sérii křivek (obr. 166).



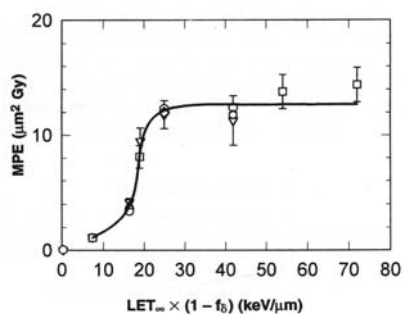
Obr. 164. Mutagenní efektivita částic jako funkce LET pro *lacI* mutace v *E. coli* (O), *lac Z* mutace v *E. coli* *HfrH* (□), jeho reverse v *S. thymimurium* TA 102 (∇) a v *B. subtilis* HA 101 spores (◇).



Obr. 165. Závislosti MPE na frakci LPE odpovídající nepřímým srážkám.



Obr. 166. Závislost MPE na LPE pro různé ionty (Z je nad křivkou)

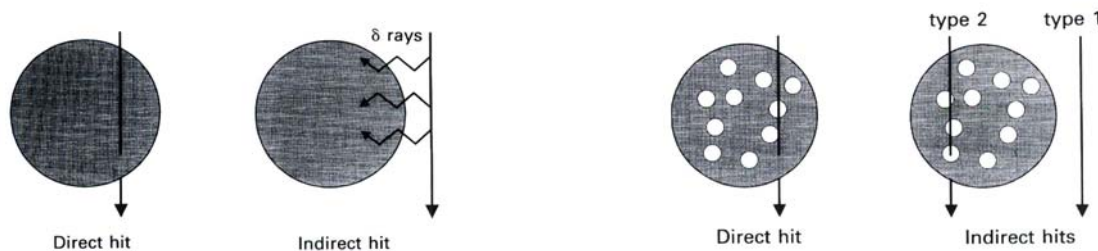


Pro oblast LPE do přibližně 100keV/μm je zřejmě lepší veličinou pro popis mutagenního účinku $L \cdot (1 - f_\delta)$ a to z toho důvodu, že částice nezabíjejí buňky, přes které projdou a naopak nejvíce mutagenních události vzniká v těchto případech. MPE lze pak popsat jako nelineární funkci veličiny $L \cdot (1 - f_\delta)$. Na obr. 167 je vidět, že tato funkce je jednoznačná.

Obr. 167. Mutagenní účinnost na částici (MPE) urychlených těžkých iontů pro $LPE < 100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ jako funkce omezeného LPE ($LET(1 - f_\delta)$).

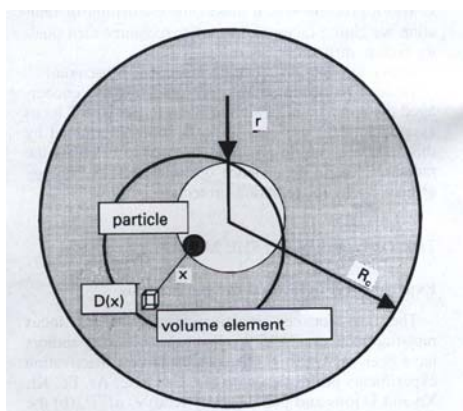
12.2. Model mutagenního účinku záření s různou hustotou ionizace pro savčí buňky

U savčích buněk je hustota chromatinu menší a nerovnoměrná, o čemž svědčí skutečnost, že některé částice mohou projít jádrem buňky a nezpůsobit žádný efekt. To budeme modelovat otvory v jádře. Průchod částice otvorem bude rovněž považován za nepřímý zásah. Pokud bude energie částice dostatečná, může být citlivý objem zasažen δ -elektrony.

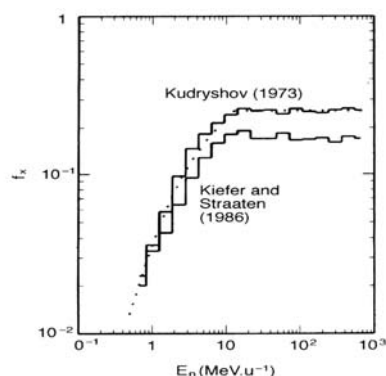


Obr. 168. Přímý a nepřímý zásah u bakteriálních buněk (vlevo) a u savčích buněk s velkými rozdíly v hustotě chromatinu (otvory modelují místa v jádře s malou hustotou genetického materiálu). Nepřímé zásahy jsou zde dvojího typu.

Znázorníme si situaci kdy částice prošla otvorem a její δ -elektrony zasáhly genetický materiál buňky (obr. 169). Frakce energie deponovaná v citlivém objemu pak bude závislá na energii částice. Na obr.170 jsou tyto závislosti pro různé modely popisující stopu částice.



Obr. 169. Modelování situace, kdy částice prošla otvorem a zasáhla citlivé struktury svými δ -elektrony.



Obr. 170. Frakce energie deponovaná v citlivém materiálu buněk při průchodu otvorem o průměru 0.1-0.3 μm f_x .

Výpočet f_x byl proveden za předpokladu existence spojitě jaderné hmoty kolem jednoho otvoru metodou Monte Carlo, užitím různých modelů popisujících strukturu stopy částice. Pro účely dalších výpočtů byla závislost $f_x(E)$ popsána funkcí:

$$f_x = a_w \ln\left(\frac{q}{r} + 1\right) \quad \text{pro } q < R_c$$

$$f_x = a_w \ln\left(\frac{R_c}{r} + 1\right) \quad \text{pro } q > R_c$$

kde $q = 0.077 \cdot E^{1.7}$

a R_c je poloměr buněčného jádra (6 μm), r je poloměr otvorů (0.1 μm), a_w je fitovaný parametr a rovná se $a_w = 0.062$. Závislost $f_x(E)$ je podobná pro různé modely stopy částice (Chatterjee, 1973; Kudryashov, 1973; Kiefer and Straaten, 1976)

12.2.1. Model letálního účinku záření pro velmi vysoké LPE

Účinný průřez pro inaktivaci bude složen ze dvou komponent, neboť částice může inaktivovat buňku buď tak, že projde citlivou oblastí (mimo otvory) nebo projde otvorem a její δ -elektrony způsobí inaktivaci. První komponenta bude pro velmi těžké částice rovná geometrickému průřezu citlivé části jádra A_{sen} . Druhá komponenta bude dána pravděpodobností, že částice projde otvorem (průřez všech otvorů na jádře je $A_g - A_{sen}$) a pravděpodobností, že buňka zahyne působením dávky D_δ .

$$\sigma_i = \sigma_{i,sen} + \sigma_{i,ins} = A_{sen} + (A_g - A_{sen})(1 - S(D_\delta))$$

Vzhledem k tomu, že pro δ -elektrony bereme křivku přežití pro ionty helia s $LPE = 20 \text{ keV}/\mu\text{m}$, která je exponenciální, můžeme psát:

$$\sigma_i = A_{sen} + (A_g - A_{sen}) \times (1 - \exp(-\alpha_\delta D_\delta))$$

V těchto rovnicích je dávka pocházející od δ -elektronů rovna: $D_\delta = \frac{0,16LET_\infty f_x}{A_g}$

Částice procházející sensitivní částí jádra buňku zabije a žádné mutace tak nevzniknou. Naopak, částice procházející přes otvor způsobí vznik mutací úměrný dávce indukované δ -elektrony. Jestliže pro záření s nízkým LPE (ionty helia) bude frekvence indukovaných mutací $m(D)$, pak pro velmi vysoké LPE bude pravděpodobnost indukce mutace v buňce ozářené δ -elektrony jedné částice:

$$p(D_\delta) = m(D_\delta) (A_{ins} - \sigma_{i,ins}) / A_{ins}$$

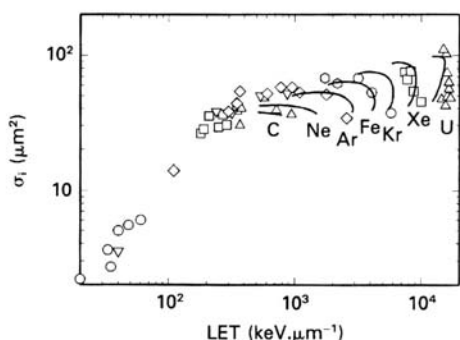
$$p(D_\delta) = \alpha_{m,\delta} D_\delta (A_{ins} - \sigma_{i,ins}) / A_{ins}$$

kde $\alpha_{m,\delta}$ je konstanta indukce mutací pro nízké LPE. Vzhledem k definici účinného průřezu pro indukci mutací: $p = \sigma / A_g$ můžeme psát:

$$\sigma_m = \alpha_{m,\delta} 0,16LET_\infty f_x \frac{A_{ins} - \sigma_{i,ins}}{A_{ins}} = \alpha_{m,\delta} 0,16LET_\infty f_x \frac{A_g - \sigma_i}{A_{ins}}$$

kde σ_i je počítáno z předešlé rovnice.

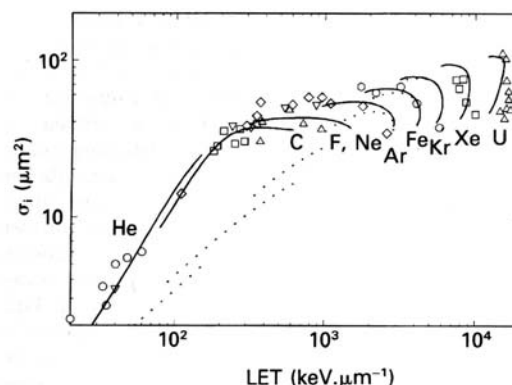
Experimentální účinný průřez inaktivace buněk v závislosti na LPE je znázorněn na obr. 171. Teoretické křivky jsou zobrazeny pro velmi vysoké LPE a jak je vidět, dobře odpovídají experimentu.



Obr. 171. Účinný průřez inaktivace pro V79 buňky ozářené různými těžkými ionty je zobrazen v závislosti na LET, (LET_{∞}). Experimentální data jsou porovnána s křivkou vypočítanou s použitím předchozích rovnic pro $LET_{\infty} > 500$ keV/ μm . (\circ = ionty He a Kr, \square = C a Xe, \diamond = Ar, Δ U, obrácený trojúhelník, Ne). Byly použity následující parametry: konstanta inaktivace pro nízké LPE ($\alpha = 0,67$ Gy $^{-1}$), plocha jádra $\sigma = 100$ μm^2 ; účinný průřez citlivých částí jádra $\sigma = 35$ μm^2 . f_x hodnoty byly vypočítány z výše uvedených rovnic.

12.2.2. Model letálního účinku záření pro střední LPE

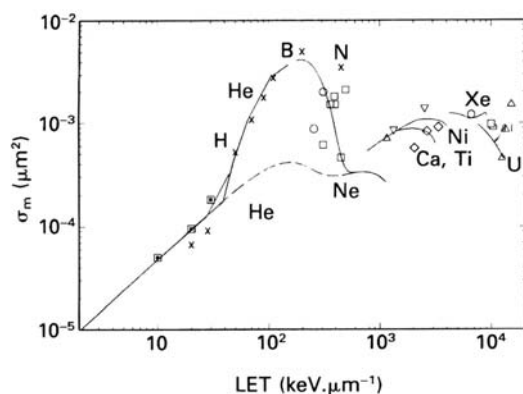
Pro střední hodnoty LPE je dříve rozpracovaná teorie neplatná. Buňky mohou přežít přímý zásah do citlivé části jádra a produkce mutací v těchto buňkách předčí mutace indukované δ -elektrony. Proto v této oblasti LPE může být popis pomocí $LET_{\Delta} = LET (1 - f_x)$ vhodnější, než použití celkového LET_{∞} . Omezíme se na popis konstant inaktivace a indukce mutací (α a α_m) lineárními závislostmi. Pak můžeme celkem snadno popsat závislosti účinného průřezu inaktivace a indukce mutací na LPE (obr. 172). Na obrázku jsou experimentální data porovnána s teoretickými křivkami vypočítanými z výše uvedených rovnic.



Obr. 172. Účinný průřez inaktivace pro V79 buňky ozářené různými těžkými ionty je zobrazen v závislosti na LET, (LET_{∞}).

12.2.3. Vznik mutací u savčích buněk po ozáření různými druhy záření – model mutagenního účinku záření

Snadno lze spočítat mutagenезi pro velmi těžké ionty, kdy částice při průchodu citlivou strukturou inaktivuje buňku a mutace vznikají pouze při průchodu otvorem. V oblasti středních hodnot LPE je nutno model doplnit podobně jako u letálních účinků záření – zde vznikají mutace také při průchodu částice citlivým objemem, protože nenastává letální efekt se 100% účinností (obr. 173).



Obr. 173. Účinný průřez mutagenезe pro buňky V79 ozářené různými těžkými ionty je zobrazen v závislosti na LET, (LET_{∞}). Jsou uvedena experimentální data odlišných laboratoří: Kranert (\circ = ionty O a Au, \square = Ne a Pb, \diamond = Ni, Δ U, obrácený trjúhelník, Ti). Byly použity následující parametry: mutagenní konstanta pro nízké LET $\alpha = 2 \times 10^{-5}$ Gy $^{-1}$; $\eta = 0,2$ mm. $L_0 = 20$ keV/ μm .

XIII. Účinek záření na tkáně

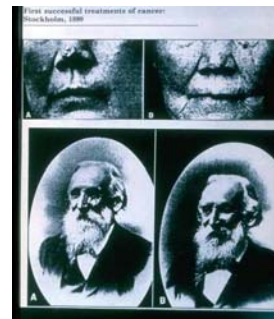
13. 1. Pokrok v radiační terapii v průběhu 20. století

13.1.1. Léčebná terapie na začátku 20. století

Prakticky od objevu radioaktivního záření je toto záření využíváno k léčbě nádorových onemocnění. První úspěšná léčba byla uskutečněna u 49-leté pacientky s basaliomem kůže na nose (obr. 174). Pacientka byla ozařována ve více než 100 frakcích, v průběhu 9 měsíců. Poté žila ještě 30 let. Vespod je pacient, u něhož byl vyléčen spinocelulární karcinom. Mnoho pacientů v té době žaslo nad blahodárným vlivem záření. Nutno zdůraznit, že bez ozařování by většina z nich beznadějně zemřela.



Obr.175. Ozařovna začátku 20. století.

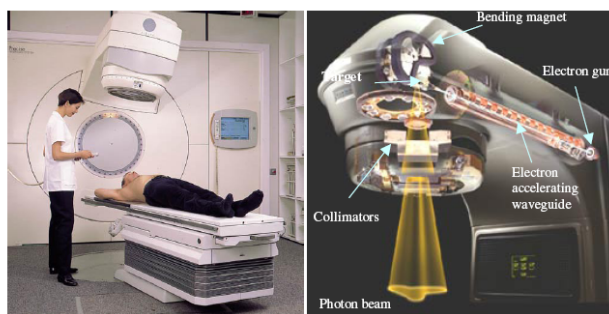


Obr. 174. První pacienti léčení ionizujícím zářením.

Na začátku 20. století byla terapie zářením prováděná velmi jednoduchým způsobem. Na obrázku 175 je Riederová terapeutická místnost v Mnichově – současně bylo ozařováno několik pacientů. Terapie byla doprovázena jiskrami, praskáním a kouřem, ale byla účinná.

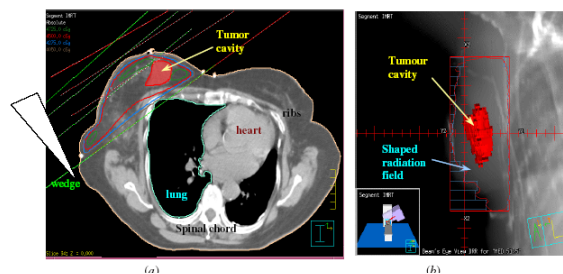
13.1.2. Léčebná terapie na začátku 21. století

V průběhu 20. století zaznamenala léčebná terapie zářením velký pokrok. Na obr. 176 je ozařovna s lineárním urychlovačem. Schéma urychlovače je vpravo, kde vidíme, že elektrony produkované v elektronovém dělu jsou urychleny elektromagnetickou vlnou, jejich dráha je zakřivena magnetem a dopadnou na terčík, kde produkují X-záření. Svazek fotonů je kolimován do ozařovaného prostoru. Celý systém může kolem pacienta rotovat a svazek se dá směřovat na tentýž bod z různých směrů. To umožňuje podstatné šetření zdravých tkání při zachování dostatečné dávky v nádoru. Na obr. 177



Obr. 176. Terapie pomocí lineárního urychlovače (vlevo) a jeho schéma (vpravo)

vidíme soudobé plánování léčby pomocí CT kdy v příčném řezu je vidět nádor (červeně) v prsu pacientky. Ozařování je voleno s využitím klínu (vlevo), který mění intenzitu napříč svazkem. Jsou použita dvě protilehlá tangenciální radiační pole (6 MV) s klínem (zobrazeno je pouze jedno), která dodají téměř homogenní dávku uvnitř prsu. Izodocy ilustrují homogenitu pole napříč tkání. Výsledkem je homogenní prozáření oblasti kolem nádoru při šetření zdravých tkání – plic, srdce a kůže na povrchu.



Obr.177. Transaxiální pohled na CT obraz, který ilustruje typický ozařovací plán pro rakovinu prsu (vlevo). Radiační pole jsou tvarována tak, aby byla minimální dávka absorbovaná v plicích a v srdci (vpravo).

Léčebná terapie zářením je příkladem úspěšné aplikace pokročilé fyziky při léčbě lidských onemocnění, jež vede ke zlepšení kvality a délky života a v mnoha případech dokonce k vyléčení pacientů jinak ohrožených na životě. Co způsobuje záření rakovinným buňkám?

Zhoubné onemocnění je charakterizováno neomezeným dělením buněk, které narušuje okolní orgány a tkáň a ohrožuje pacienta na životě. Cílem léčebné terapie zářením je proto aplikace takové dávky do cílového objemu, která sterilizuje rakovinné buňky a to při přijatelném poškození okolní zdravé tkáně.

Některé faktory napomáhají tomuto léčebnému cíli, jiné zhoršují situaci a výsledek léčby. K první skupině faktorů patří např. skutečnost, že nádor sestává z dělicích se buněk, které jsou zčásti v M-fázi buněčného cyklu a jsou tedy citlivé k záření. Normální tkáň se dělí málo a je tedy obvykle rezistentnější. Naopak u nádorů je zhoršené zásobení kyslíkem a část buněk může být v hypoxii, která snižuje účinek záření.

13.2. Kvantitativní popis účinku záření na tkáň

13.2.1. Terapeutický poměr

Studium účinku záření na tkáň je důležité z toho důvodu, že vysoké procento lidské populace onemocní v průběhu života zhoubným nádorem (asi 20-25%) a z toho zhruba 60% lidí je ozařováno masivními dávkami ionizujícího záření s cílem odstranit nádor nebo alespoň zmírnit potíže (paliativní ozařování). Na obr.178 vidíme schématicky závislosti pravděpodobnosti vyléčení nádoru na dávce a pravděpodobnosti vzniku poškození zdravé tkáně. Poměr dávek se nazývá „terapeutický poměr“ a je příznivý, jestliže se křivka pro nádor nachází vlevo od křivky pro zdravou tkáň. To však vždy nenastává.

Při terapii je nezbytné stanovit dávku záření (přesnou hodnotu) a to tak, aby tato dávka byla optimální. Proto je od počátku existence radioterapie snaha zavést kvantitativní modely účinku záření, které by umožňovaly tuto hodnotu počítat.

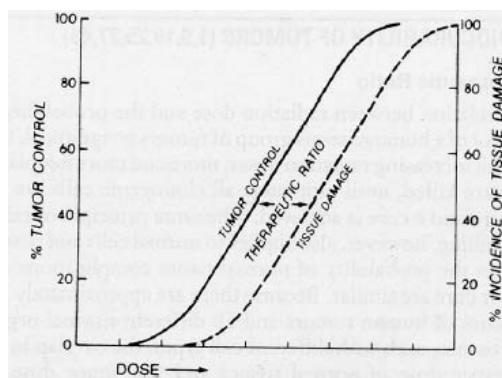
13.2.3. Strandqvistovy grafy

Ozařování se používá k léčbě nádorů už od počátku 20. století. Úspěšnost se postupně zlepšovala od zvládnutí povrchově se šířících nádorů ve 20-tých a 30-tých letech přes nádory hrtanu, úst a nosu ve 30-tých letech až po hlouběji uložené nádory, když se začaly používat kobaltové ozařovače v 50-tých a 60-tých letech. Standardní frakcionační schémata byla 5 frakcí za týden po dobu 5-7 týdnů.

Změny ve frakcionaci, o které se terapeuti pokoušeli směřovaly jednak k hyperfrakcionaci (HF) – větší počet menších frakcí a také k akcelerované frakcionaci (AF) – zkrácení celkové doby ozařování při použití větší dávky na frakci. Oba tyto režimy mohou mít význam z čistě praktického hlediska (např. je třeba urychlit ozařování kvůli špatnému zdravotnímu stavu).

Jak již bylo uvedeno, zvyšování dávky je limitováno poškozením zdravé tkáně. Z druhé strany, příliš malá dávka nezlikviduje nádor, který ve většině případů ohrožuje život pacienta.

Už ve 30-tých letech bylo zjištěno, že při frakcionované léčebné terapii odpovídá dávce 20 Gy v jedné frakci zhruba 40-45 Gy ve 12 dnech, a to je dále ekvivalentní 50 Gy ve



Obr.178. Definice „terapeutického poměru“ .

třech týdnech. V roce 1944 se objevuje Strandqvistová monografie, v níž jsou uvedeny výsledky léčby 280 pacientů s rakovinou kůže. Na základě těchto údajů autor sestavil tzv. isoefektní křivky, tj. závislosti dávky nutné pro dosažení toleranční reakce tkáně na době frakcionované léčebné terapie.

Ukázalo se, že tyto závislosti lze vystihnout v dvojitým logaritmicke měřítku přímkou, tedy rovnicí:

$$\ln(D) = \kappa \cdot \ln(T) + \eta$$

kde κ a η jsou konstanty. Strandqvist proto zobrazil své klinické údaje v grafu, v němž na svislou osu nanášel logaritmus celkové dávky a na horizontální osu logaritmus celkové doby ozařování. Tyto grafy se nazývají Strandqvistovy grafy a grafy odrážejí obecnou zákonitost růstu celkové dávky, která způsobuje určitou reakci tkáně, s růstem doby ozařování T v kvantitativním tvaru. Jelikož Strandqvist předpokládá, že linie odpovídající různým reakcím tkáně jsou paralelní, parametr η se dá pak chápat jako míru poškození tkáně.

Strandqvist dospěl k hodnotě sklonu $\kappa=0,22$ pro různé typy poškození kůže, a také pro nádor (spinocelulární karcinom kůže). Později se ukázalo, že sklon κ se liší pro kůži a pro karcinom kůže (výsledek mnoha autorů shrnul Cohen ve své disertaci): $\kappa_k=0,33$ a $\kappa_r=0,22$.

Aby bylo možné určit dávku při změně frakcionačního režimu, zavedl Ellis (1969) empirické funkční závislosti. Ellis předpokládal, že rozdíl ve sklonech pro nádor a zdravou tkáň je dán existencí homeostatických zpětnovazebních regulačních mechanismů u normálních tkání, které neexistují u nádoru. Proto se normální tkáň zotavuje rychleji než nádor a frakcionovaná terapie je výhodnější nežli jednorázové ozáření.

Druhý základní Ellisův předpoklad se týká buněčné reparace, která probíhá uvnitř buněk po každém ozáření a je ukončena během několika hodin. Podle Ellise se buňky kůže a karcinomu kůže neliší svými reparačními schopnostmi, neboť jsou stejného původu.

Vzhledem k tomu, že u nádoru nedochází k repopulaci, je nárůst dávky v grafu důsledkem zvyšování počtu frakcí, po každé z nichž proběhne buněčná reparace. Stejnou závislost na počtu frakcí lze očekávat pro normální tkáň, která se navíc zotavuje repopulací.

Pro kůži tedy můžeme psát: $\ln(D) = \kappa_k \cdot \ln(T) + \eta_k$

a pro karcinom kůže: $\ln(D) = \kappa_r \cdot \ln(T) + \eta_r$

Pro nádor je podstatný počet frakcí N a nikoli doba ozařování T . Protože platí přibližně, že N je úměrné T (5 frakcí v týdnu o stejné velikosti), můžeme v rovnici pro nádor T zaměnit za N . Pro kůži pak můžeme psát, že sklon je součtem dvou příspěvků, z nichž první je stejný jako u nádoru, tj.

$$\kappa_k = \nu + \tau$$

kde $\nu=\kappa_r$ představuje buněčnou reparaci; druhý sčítanec představuje příspěvek repopulace. Po dosazení parametrů z Cohenovy disertace $\nu = 0,24$ a $\tau = 0,11$ dospěl Ellis k výsledným rovnicím.

13.2.4. NSD koncepce

Výsledné rovnice definují tzv. nominální standardní dávku (NSD) pro zdravou tkáň jako:

$$NSD = \frac{D}{N^{0.24} \cdot T^{0.11}}$$

a tzv. nominální standardní dávku na nádor (NSTD) :

$$NSTD = \frac{D}{N^{0.24}}$$

Tyto rovnice definují dávku pro daný frakcionační režim a danou hodnotu NSD (NSTD), která odpovídá určitému stupni poškození tkáně (event. pravděpodobnosti vyléčení nádoru). Význam tohoto výsledku byl obrovský, o čemž svědčilo využívání uvedených rovnic

v praxi po dlouhou dobu po celém světě. Ellis navrhl zavést pro NSD jednotku 1 ret (roentgen equivalent therapy) a pro NSTD jednotku 1 ren (roentgen equivalent neoplasma).

Ellis značně rozšířil možnosti využití uvedených rovnic zavedením dalšího předpokladu, že totiž míra poškození kůže je dána rozsahem poškození pojivové tkáně; pojivová tkáň je pak podle Ellise kritickou tkání pro poškození zářením prakticky všech částí těla s výjimkou některých citlivých orgánů.

Hodnota NSD a NSTD závisí na lokalizaci, velikosti nádoru, technice ozařování apod. V učebnicích radioterapie se často uváděly hodnoty NSD v retech pro toleranci tkáně za určitých podmínek.

13.2.5. TDF faktor

V roce 1973 zavádějí Orton a Ellis tzv. TDF faktor pro výpočet toleranční dávky u neregulárních frakcionačních režimů.

Jestliže totiž dojde ke změně frakcionačního režimu, např. v polovině ozařování, vzniká problém, jakou dávkou lze pacienta doozařovat. Orton a Ellis zavádějí pojem tzv. parciální tolerance:

$$PT = NSD \cdot n/N,$$

kde NSD odpovídá zadané reakci, n je již aplikovaný počet frakcí a N je celkový počet frakcí odpovídající úplnému režimu. Jestliže zavedeme dávku na frakci d a dobu mezi frakcemi t , můžeme parciální toleranci psát ve tvaru (dosazením z Ellisovy rovnice):

$$PT = n \cdot (NSD)^{-0,538} \cdot d^{1,538} \cdot t^{-0,169}$$

Parciální tolerance se mohou sčítat až do celkové maximální hodnoty $PT=NSD$. Vzhledem k linearitě vztahu pro PT na počtu aplikovaných frakcí n , Orton a Ellis zavádějí tzv. TDF faktor jako:

$$TDF = n \cdot d^{1,538} \cdot t^{-0,169} \cdot 10^{-3}$$

TDF faktor lze počítat i pro neúplné frakcionační režimy a sčítat v případě aplikace dvou různých režimů. Celková dávka pak musí být taková, aby finální hodnota TDF nepřekročila určitou mez.

13.2.6. Cohenův model

Rozvoj radiobiologie vedl k pokusům zavést radiobiologické výsledky do radioterapie. Jako první s o to pokusil Cohen v roce 1968. Jeho model je založen na předpokladu, že makroskopická reakce tkání je způsobena vyhubením určité populace kmenových buněk. Čím menší je přežití kmenových buněk, tím silnější bude reakce. Předpokládá se, že reakce odpovídá minimálnímu množství kmenových buněk, které máme ve tkáni těsně po skončení terapie.

Přežití buněk po ukončení terapie je podle modelu důsledek dvou protichůdných procesů – letálního účinku záření na jednotlivé buňky a zotavení na úrovni tkáně – repopulace. Letální účinek záření je popsán křivkou přežití s ramenem, která zároveň v sobě zahrnuje buněčnou reparaci. Repopulace se uskutečňuje mezi jednotlivými frakcemi dávky podle logistické křivky. Normální tkáň se může plně zotavit pouze v tom případě, jestliže počet buněčných dělení nepřekročí kritickou mez. Po vyčerpání této vitální kapacity tkáně další zotavení už neprobíhá. Model bere do úvahy objemový faktor (tj. závislost účinku frakcionované terapie na velikosti ozářeného objemu nebo velikosti pole).

Cohen bere víceterčovou formuli pro popis přežití (později lineárně-kvadratickou). Repopulace je popsána diferenciální rovnicí:

$$\frac{dy}{dt} = a \cdot y - b \cdot y^2$$

kde y je množství buněk, a , b jsou parametry určující rychlost růstu a počet buněk v rovnovážném stavu (po dosažení maximální hustoty).

Výsledné přežití je v Cohenově modelu dáno vztahem:

$$S_N = \prod_{i=1}^{N-1} \frac{S_1 \cdot c_i}{S_i + (c_i - S_i) \cdot \exp(-a \cdot t_i)}$$

kde S_i je přežívající frakce po i -té frakci záření, tj. dávce d_i , a je rychlost růstu, t_i je interval mezi frakcemi a c_i je mez růstu po i -té frakci. Tato mez je rovna 1 při vyčerpání růstových možností nebo $e^{G \cdot S_1 \cdot S_2 \dots S_i}$ pro i -tou frakci G je maximální možný počet buněčných cyklů.

Možnosti Cohenova modelu jsou následující. Optimalizací lze určit parametry a model lze pak využít v klinické praxi. Vzhledem k tomu, že parametry jsou získány z experimentálních, či klinických dat, lze považovat předpovězenou dávku za interpolovanou nebo extrapolovanou hodnotu. Radiobiologická interpretace umožňuje zavádět korekce na různé faktory jako např. LPE záření, dávkovou rychlost, kyslíkový efekt apod.

13.2.7. NSD koncepce a přežití kmenových buněk

Experimenty na tkáních ukázaly (např. Hornseyová), že určité poškození tkáně (definované např. jako LD50 v 5 dnech) odpovídá určité hladině přežití kmenových buněk ($S=0.01$ pro tenké střevo). Hladina přežívajících buněk pro LD50 byla stejná pro několik různých režimů frakcionace a také při ozáření v anoxii. Podobná souvislost byla nalezena také pro kůži a u krvevorné tkáně.

Vzhledem k tomu, že NSD koncepce popisuje účinnost frakcionovaného ozařování a týká se především makroskopické reakce kůže, logickým důsledkem bylo hledání vztahu mezi NSD a přežitím kmenových buněk ve tkáni.

Pro kůži se tedy můžeme pokusit o nalezení vztahu mezi přežitím kmenových buněk a makroskopickou reakcí popsanou NSD. Budeme předpokládat, že určité přežití S_N po N frakcích bude korelovat s NSD a bude závislé na D , N a T . V obecném případě na dávkách v jednotlivých frakcích d_i a intervalech mezi frakcemi t_i .

Pak lze formálně psát:

$$S_N(d_i, t_i) = \prod_{i=1}^N S_i(d_i, t_i)$$

kde S_i je frakce kmenových buněk přežívající v době t_i po i -té frakci ve srovnání s přežitím před i -tou frakcí. Rovnici lze přepsat do tvaru:

$$-\ln S_N(d_i, t_i) = \sum_{i=1}^N -\ln S_i(d_i, t_i)$$

Jak jsme viděli, TDF lze rovněž psát jako součet:

$$TDF = \sum_{i=1}^N TDF_i$$

kde

$$TDF_i = d_i^\gamma \cdot t_i^{-\beta} \quad \gamma = 1.538 \text{ a } \beta = 0.169$$

Protože rovnice pro přežití i TDF jsou identické svým tvarem i obsahem (popisují poškození stejných kmenových buněk) a protože veličiny TDF_i a TDF_j jsou nezávislé pro libovolnou kombinaci i a j, lze dojít k závěru, že v té oblasti, kde platí uvedené rovnice, bude také platit:

$$-\ln S_i(d_i, t_i) = \alpha \cdot TDF_i$$

kde α je nějaký parametr. Pro libovolnou frakci záření lze pak psát:

$$S(d, t) = e^{-\alpha \cdot d^\gamma \cdot t^{-\beta}}$$

Parametry γ a β mají dříve uvedené hodnoty. Rovnice popisuje přežití kmenových buněk ozářených dávkou d v době t po tomto ozáření. Hodnota $S(d, t)$ nezávisí na indexu i , což nám dává možnost hledat vztah mezi přežitím ve tkáni a přežitím „in vitro“. Pro obecný případ, kdy koeficienty NSD formule jsou ν a τ , dostaneme pro γ a β následující vztahy:

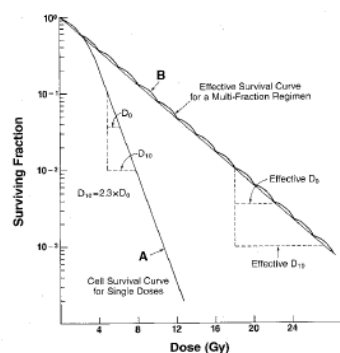
$$\gamma = \frac{1}{1-\nu-\tau} \quad \beta = \frac{\tau}{1-\nu-\tau} = \tau \cdot \gamma$$

Pro nádorovou tkáň tedy dostaneme $\gamma=1.315$ a $\beta=0$. Dostáváme tedy rovnici pro přežití buněk ve tvaru:

$$S(d) = e^{-\alpha \cdot d^\gamma}$$

který popisuje křivku přežití s ramenem a odpovídá docela dobře experimentálním výsledkům (přínejmenším stejně jako lineárně kvadratická formule). Tuto křivku navrhnul Hugget pro popis přežití buněk a ukázal, že parametry $\gamma=1.48$ a $\gamma=1.36$ odpovídají dobře okysličené a anoxické kultuře buněk.

13.2.8. Popis přežití kmenových buněk tkáně



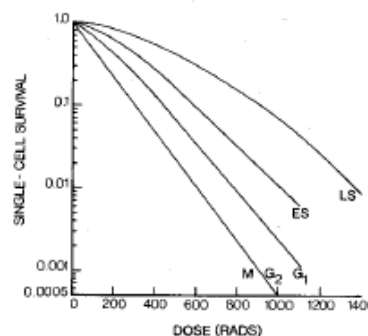
Obr.179. Křivka přežití (A) a přežití ve tkáni (B) při frakcionovaném ozařování.

pro různé typy nádorů (a reálně vzato může se měnit v průběhu ozařování).

Z uvedeného se dá soudit, že reakci nádorové tkáně na ozáření by bylo možné popsat opakovaným použitím stejné křivky přežití (viz obr.179). Výsledné přežití pak bude:

$$S_N(d) = e^{-\alpha \cdot N \cdot d^\gamma}$$

Křivka přežití však může silně záviset na podmínkách ozařování a také na fázi buněčného cyklu (viz obr. 180). Proto může být koeficient v exponentu rovnice různý



Obr. 180. Křivky přežití pro různé fáze buněčného cyklu.

Pro zdravou tkáň máme složitější rovnici s časovou závislostí, která však nepopisuje repopulaci buněk ve tkáni vhodným způsobem. Proto byly zkoušeny jiné způsoby popisu zotavení tkáně v průběhu léčby zářením. Kmenové buňky se dělí exponenciálně – jako buňky v kultuře – avšak toto dělení nastává s určitým zpožděním, které je způsobeno zpětnovazební regulací tohoto dělení.

Pro terapii trvající T dnů bude počet kmenových buněk větší v poměru daném vztahem:

$$S_T / S_D = e^{\beta(T-T_0)}$$

kde S_D by bylo přežití po aplikaci frakcionovaného ozařování bez repopulace. Jestliže použijeme rovnici pro přežití a dosadíme repopulaci, dostáváme jednoduché formule pro popis účinku záření na tkáň:

$$S_{N_T}(d) = e^{-\alpha \cdot N \cdot d^\gamma} + \beta(T - T_0)$$

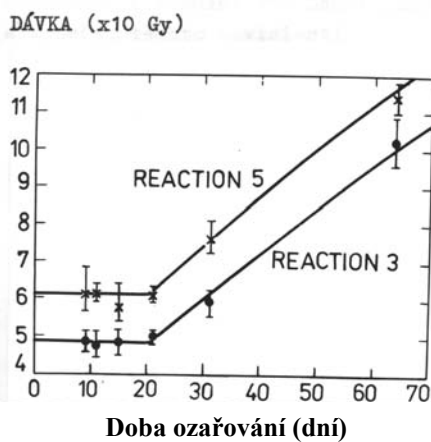
tato rovnice platí pro $T > T_0$, kde T_0 je doba zpoždění repopulace. Pro zjednodušení můžeme rovnici logaritmovat a zavést veličinu závislou na reakci tkáně (DFT):

$$DFT = N \cdot d^\gamma - \beta_0 \cdot (T - T_0)$$

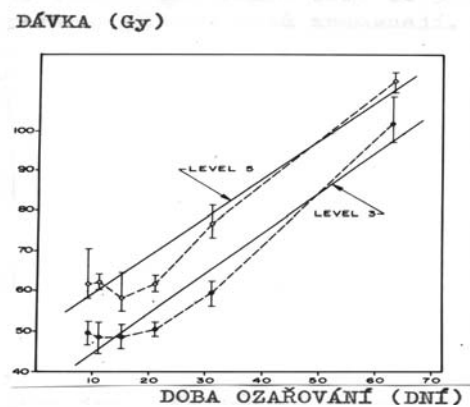
pro $T < T_0$ nebo pro tkáň bez repopulace musíme časovou závislost vynechat a máme:

$$DFT = N \cdot d^\gamma$$

Veličina DFT resp. DF byla použita pro analýzu dat u řady tkání. Na obr.181 vidíme závislost $DF = Nd^\gamma$ na čase pro dvě úrovně reakce kůže krysy na ozařování (3 a 5). Je zřejmé, že po 20 dnech začíná repopulace a projevuje se lineárním nárůstem DF. Rovnice pro DFT tedy velmi dobře popisuje tyto výsledky. Na vedlejším obrázku (obr. 182) vidíme stejná data analyzována pomocí Cohenova modelu (přímkové závislosti).



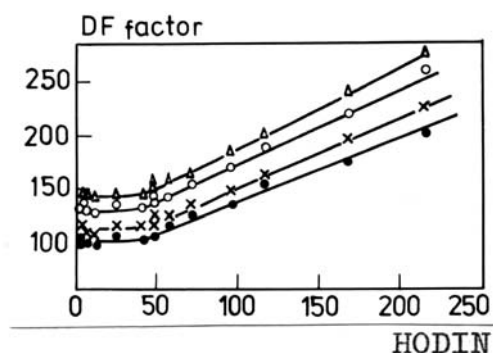
Obr. 181. Závislost DF faktoru na době ozařování pro dva stupně reakce kůže krysy na ozařování. Lineární nárůst DF s časem potvrzuje správnost výše uvedeného modelu.



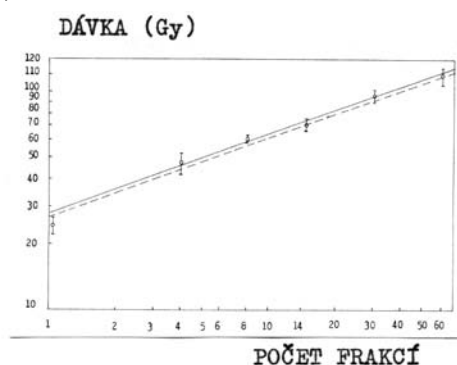
Obr. 182. Závislost dávky na době ozařování podle Cohenova modelu.

Další reakce tkání, které byly analyzovány pomocí DFT modelu, jsou různé stupně poškození střeva u myši, kde byla data publikována Withersem a myelitida rovněž u myši. Experimentální výsledky pro myelitidu byly publikovány pracovníky Grayovy laboratoře (Hornseyová). Na obr.183 vidíme závislost DF na čase pro tkáň tlustého střeva u myši. Experimentální body odpovídají různému počtu přežívajících buněk na kryptu tlustého střeva – od 10 buněk pro plné kolečka až po 100 buněk pro trojúhelníky. Na obr. 184 je

Strandqvistův graf pro myelopatii jako konečný efekt fracionovaného ozařování míchy u myši. V rovnici $DF=Nd^\gamma$ je $\gamma=1.55$ (plná čára v grafu).



Obr.183. Závislost DF faktoru na době ozařování tlustého střeva u myši. Repopulace se projeví růstem hodnoty DF.



Obr. 184. Závislost dávky na počtu frakcí pro radiční myelitidu u myši.

13.2.9. Experimentální systémy sledování poškození tkání

Tkáně používané nejčastěji jako experimentální modely:

Kostní dřev – metoda slezinných kolonií (Till a McCulloch, 1960) – injekce buněk kostní dřevě po ozáření je vstříknutá letálně ozářeným myším stejného imbredního kmene a na slezině jsou pak po 2 týdnech spočítány mikrokolonie. Byly stanoveny parametry křivky přežití: $n=2.5$, $Do=105$ Gy pro in vitro experimenty a $n=1.5$, $Do=95$ Gy pro in vivo ozáření. Rozdíl je pravděpodobně způsoben přechodem buněk z Go fáze do buněčného cyklu během doby do odebrání vzorku.

Přežití buněk ve střevních kryptách – Withers a Elkind (1970) – v kryptách dochází k dělení a diferenciaci s rychlým obratem (4 dny), po ozáření dochází k obnově těch krypt, kde alespoň jedna buňka zůstala schopná dělení. Přežití krypt má velká extrapolační čísla odpovídající počtu buněk v kryptách: $n=100-400$, $Do=1$ Gy.

Kůže – Field, Withers zavedli počítání kolonií u kůže po větších dávkách záření. Vydělí se ostrůvek kůže tak, že se ozáří velkou dávkou okolí (30 Gy). Pak lze hodnotit nodulární růst buněk v ostrůvcích. Takto byly určeny parametry $Do=1.35$ Gy, $n=12$. n bylo spočteno z Dq pro rozdělenou dávku.

Reakce dalších tkání na ozáření:

Cévy – zvýšená permeabilita, nekróza cévní stěny, pozdní změny - atrofie, teleangiektázie,.

Plice – radiční pneumonitida (po 2-6 měsících) a postiradiační fibróza (po době nad 6 měsíců), prahová dávka je u obou postižení 8 Gy.

Ledviny – nefropatie, 11 Gy lokálně, hypotrofie, insuficience funkce.

Ovaria – radiosensitivní, sterilita po 3 Gy

Varle – přechodná sterilita již po 0,15 Gy, trvalá po 3 Gy

Oko – nejcitlivější čočka – katarakta 0,2 Gy, latence 6 měsíců, na zadní stěně se začne měnit uspořádání vláken čočky, které omezí průnik světla.

13.2.10. Typy tkání

Tkáně v organismu se liší a rozlišujeme několik typů tkání:

1) Jednoduchá tranzitní populace – buňky vcházejí a se stejnou rychlostí odcházejí (spermatozoa, červené krvinky a jiné buňky krvetvorby, kožní buňky)

2) Rozpadající se populace (oocyty)

3) Statická populace (neurony – je zde však pomalý úbytek)

4) Dělicí se tranzitní populace – více buněk odchází než vchází a rozdíl odpovídá dělení (diferencující a proliferující buňky krvetvorby – promyelocyty)

5) Zárodečná populace (stem cells) – dělí se a odcházejí (mizí, diferencují) – (každá obnovující se populace musí mít prekursory tohoto typu – epiteliální tkáň)

6) Uzavřená dělicí se populace – nádorový růst

Po ozáření tkáň se nemusí poškození hned projevit. Tak např. u jaterní tkáň dochází k dělení pouze při poškození (parciální hepatektomie). Je-li tkáň předtím ozářená, může dojít k selhání obnovné funkce. Proto jsou z radiobiologického hlediska důležité tkáň, které se obnovují, tj. obsahují frakci dělicích se buněk. U těchto tkání vede ozáření k akutním reakcím. Pozdní reakce pak nastávají u pomalu se obnovujících tkání.

U obnovujících se tkání může docházet k akceleraci dělení, tj. k repopulaci po určité době, kdy kmenové buňky jsou odblokovány. Toto odblokování může být spojeno s vymizením určité tranzitní populace, která měla danou kmenovou populaci jako prekursora a regulovala její dělení. Snížení počtu dělicích se kmenových buněk zářením má za následek postupné snížení počtu ve všech následných kompartmentech v časovém intervalu odpovídajícím obratu buněk v dané tkáni. Toto zpoždění reakce je pro určitou tkáň typické.

Z hlediska radiační terapie jsou důležité pozdní následky (poškození tkání). Toto pozdní poškození závisí na způsobu frakcionace dávky a na ozařovaném objemu.

13.3. Radiační terapie

13.3.1. Komplikace po ozařování tkáň v radioterapii

V terapii se pro popis přežití v současné době nejčastěji používá buď exponenciální nebo exponenciální formule s lineárně-kvadratickým exponentem:

$$S = e^{-\alpha_0 d} \quad S = e^{-\alpha d - \beta d^2}$$

Pro přežití po N frakcích můžeme psát:

$$S_N = \exp(-\alpha_0 \cdot D) \quad S_N = \exp(-\alpha \cdot D(1 + d / (\alpha / \beta)))$$

kde D je celková dávka a d je dávka na frakci při rovnoměrném ozařování. Tyto rovnice se obvykle přepisují do tvaru (pro isoepekt lze použít libovolnou transformaci):

$$NTCP(D, v) = \exp(-N_0 \cdot v^{-k} S_N) = \exp(-N_0 \cdot v^{-k} \exp(-\alpha_0 \cdot D))$$

$$NTCP(D, v) = \exp(-N_0 \cdot v^{-k} S_N) = \exp(-N_0 \cdot v^{-k} \exp(-\alpha \cdot D(1 + d / (\alpha / \beta))))$$

který popisuje sigmoidní závislosti (obr. 178) pravděpodobnosti vzniku komplikací (NTCP) na dávce. No a k jsou parametry tkáň a $v=V/V_s$ je poměr ozařovaného objemu k nějakému standardu V_s (je to korekce na velikost ozařovaného objemu). V literatuře se uvádějí parametry této rovnice pro NTCP5% a 50%. Objemová závislost se někdy uvádí, někdy nikoli. Často se uvádí pouze parametr $\alpha_0 = \alpha \cdot G$, (vzhledem k nedostatku přesných údajů o frakcinaci) čímž se rozumí:

$$\alpha_0 = \alpha \cdot G = \alpha \cdot (1 + d / (\alpha / \beta))$$

Parametry 2G, K a N_0 jsou uvedeny v tab. 6 pro celou řadu tkání.

Tab. 6. Radioterapeutické parametry poškození tkání (rovnice pro NTCP)

Orgán	αG	k	N_0	Poškození orgánů
Ledviny	0.0177	4.6091	123.37	Klinický zánět ledvin
Mozek	0.0975	1.3390	235.36	Nekróza
Mozkový kmen	0.0956	0.8815	345.81	Nekróza
Uši	0.1464	0	241.84	Akutní zánět ucha
Uši	0.1464	0	9391.38	Chronický zánět ucha
Jícen	0.1180	0.4681	2132.37	Klinická perforace jícnu
Srdce	0.1395	2.5911	669.16	Zánět osrdečníku
Močový měchýř	0.1171	2.9239	7007.99	Symptomatický močový měchýř
Hrtan	0.1291	1.1778	19147.40	Nekróza chrupavky
Hrtan	0.0418	0	19.67	Otok hrtanu
Játra	0.1587	2.5643	349.84	Selhání jater
Plice	0.0977	3.0007	11.90	Pneumontida
Kůže	0.0886	0.5867	351.42	Nekróza kůže
Tenké střevo	0.1126	0.7617	302.92	Perforace tenkého střeva
Tlusté střevo	0.1464	1.3323	2172.96	Perforace tlustého střeva
Mícha	0.0714	0.1211	90.68	Zánět míchy
Žaludek	0.1151	0.7637	1118.77	Žaludeční vředy
Štítná žláza	0.0419	0	19.76	Zánět štítné žlázy
Cauda equine	0.0976	0	1045.23	Klinické poškození nervu
Pažní pletěň	0.0976	0.1736	1054.43	Klinické poškození nervu
Stehenní kost	0.1126	0	1045.23	Nekróza
Oční čočka	0.1824	0	18.67	Šedý zákal
Optický nerv	0.0976	0	393.94	Slepota
Překřížení zrakových	0.0976	0	393.94	Slepota
Sítnice	0.0732	0	80.68	Slepota
Konečník	0.0732	0	241.84	Těžká nekróza, stenóza
Hrudní koš	0.0975	0	393.94	Patologická fraktura
Příušní žláza	0.1046	0	85.01	Xerostomia

13.3.2. Místní vyléčení nádoru (local control)

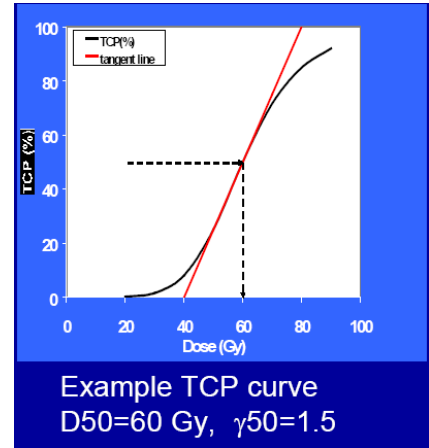
Závislost pravděpodobnosti vyléčení nádoru (TCP) na dávce má sigmoidní tvar a lze ji charakterizovat dvěma parametry (obr. 185): D50 dávkou pro 50% vyléčení a γ_{50} , což je poměr D50 a rozdílu dávek mezi 0% a 100% na extrapolované přímce (červeně). Veličina γ_{50} je tedy úměrná sklonu – čím je větší, tím je křivka strmější.

Jestliže lze reakci nádorové tkáně na ozáření popsat opakovaným použitím stejné křivky přežití, pak střední počet nádorových buněk, které zůstaly v organismu po ozářování bude:

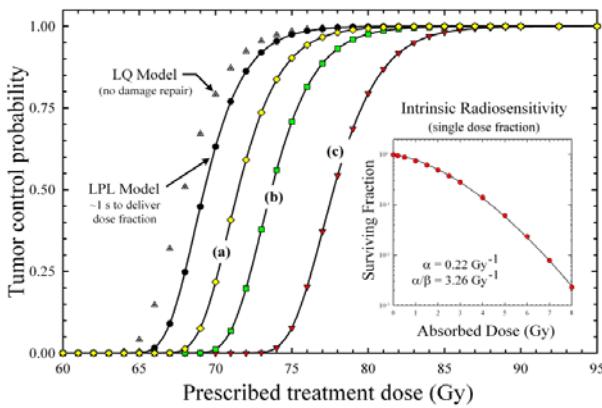
$$\bar{n} = N_o \cdot S_N = N_o \cdot S_1^N$$

Jestliže pro likvidaci nádoru nesmí v organismu zůstat ani jedna nádorová buňka, pak pravděpodobnost vyléčení bude:

$$P = \exp(-\bar{n}) = \exp(-N_o \cdot S_1^N)$$



Obr. 185. TCP v závislosti na dávce záření.



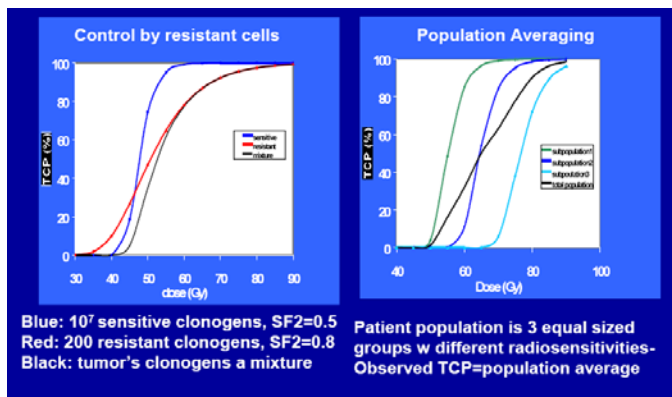
Obr. 186. Teoretická závislost pravděpodobnosti vyléčení nádoru na dávce při různé velikosti nádoru. Křivka přežití (vpravo, dole) je popsána buď LQ (lineárně-kvadratickým) modelem nebo LPL modelem.

Pro popis přežití můžeme použít různé typy rovnic; v současné době se nejčastěji používá lineárně-kvadratická rovnice; její dosazení dává:

$$P = \exp(-N_o \cdot \exp(-\alpha \cdot D(1 + d/(\alpha/\beta))))$$

kde N je celkový počet frakcí, d je dávka na frakci (předpokládá se, že dávky jsou stejné) a N_o je počáteční počet nádorových buněk. Závislosti P(D) se také často označují TCP(D). Při léčbě nádorových onemocnění zářením se zavádí pojem „local control“, tj místní vyléčení nádoru. Na obr. 186 vidíme jak pravděpodobnost vyléčení (tumor control probability, TCP) závisí na dávce.

Skutečné křivky se liší tím, že jsou širší, což může být způsobeno přítomností rezistentní frakce v nádorech nebo variabilitou populace (obr. 187).

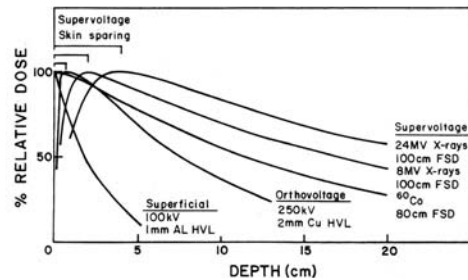


Obr.187. Závislosti TCP na dávce ilustrující možné důvody rozšíření této křivky při (a) nehomogenní populaci buněk v nádoru (vlevo) nebo (b) nehomogenní populaci pacientů. Rozšíření této závislosti je nepříznivou okolností neboť ani při hodně vysokých dávkách nedosáhneme dostatečně vysoké pravděpodobnosti vyléčení pacientů.

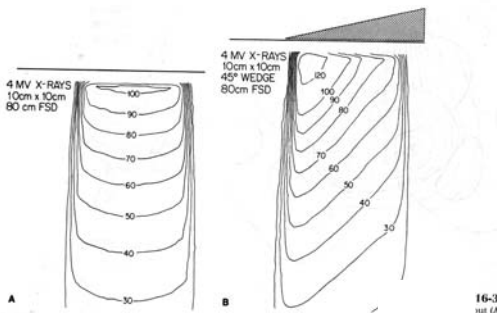
13.3.3. Výpočet dávky záření při radioterapii

Různé druhy záření jsou různě pronikavé, což je demonstrováno na obr.188. Pro roentgenovo záření závisí jeho pronikavost na energii lampy (tzv. ortovoltážní terapie jde více do hloubky než povrchová). Ještě větší pronikavost má supervoltážní terapie tvrdým X-zářením.

Dávka absorbovaná v různých hloubkách se popisuje pomocí isodoz (obr. 189). Tyto křivky popisují oblasti stejné dávky počínaje od 100% - maximální hodnoty. Výpočet se uskutečňuje pomocí počítačů a bere v úvahu pokles se

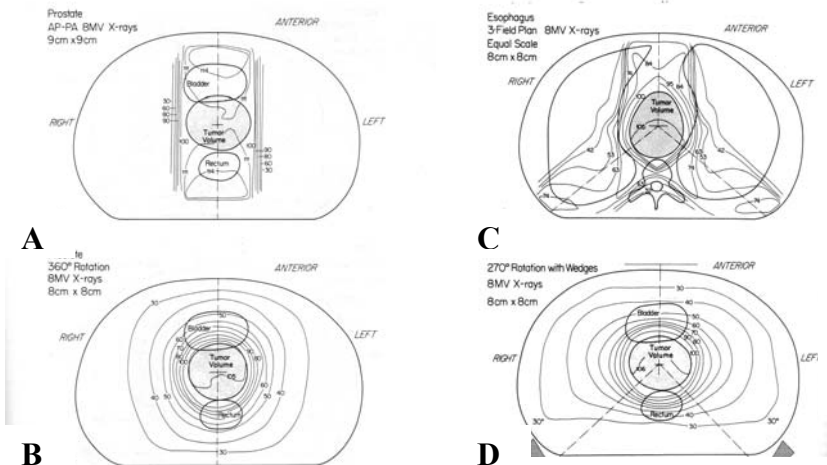


Obr.188. Průběh hloubkové dávky pro různé druhy záření.



Obr.189. Isodozy – křivky o stejné dávce. Vpravo je pole s klínem.

čtvercem vzdálenosti od zdroje, exponenciální absorpci ve tkáni a další faktory. Pacient je obvykle ozařován několika ozařovacími poli nebo tzv. rotací, kdy hlavice se zářičem rotuje kolem těla a svazek míří stále na nádor. Rotace nemusí činit celých 360°; pokud je úhel menší, mluvíme o ozařování kyvem. Ve všech těchto případech se výsledné isodozy vytvoří složením jednotlivých směrů se započtením nehomogenit v těle pacienta. Na obr. 190 vidíme porovnání isodoz pro následující techniky ozařování: ze 2 opačných polí, při rotaci, ze 3 polí, a rotací s klínem.



Obr. 190. Isodozy pro 4 různé techniky ozařování pacientů. A) dvě protilehlá pole, B) rotace o 360°, C) ze tří polí a D) kyvem s klíny. Výsledné isodozy by měly pokrývat nádor dostatečně velkou dávkou a do okolí by měl být spád dávky dostatečně rychlý. Zejména v oblasti kritických orgánů (rektum nebo močový měchýř u karcinomu prostaty) by měla být dávka co nejmenší.

13.3.4. 3D radioterapie a IMRT terapie

3D-CRT (3D-conformal radiotherapy) začíná CT tomografií, při které se snímá řada řezů tělem pacienta a provede se rekonstrukce obrazu (obr. 191). V konečném obraze se označí nádor, a také citlivé tkáně, na které musí být dávka co nejnižší. Při plánování léčby se navrhne celková léčebná strategie, tj posoudí se možnost chirurgického zákroku před nebo po radioterapii, zváží se možnosti adjuvantní chemoterapie a další léčby. Navrhne se druh záření (např. elektrony, X-záření, γ -záření), počet ozařovacích polí (event. ozařování rotací nebo kyvem), pacient se označí tak, aby jej bylo možné reprodukovatelně nastavovat do svazku záření. Počítačem se zpracují isodozy a porovnají se s polohou nádoru a citlivých struktur pacienta.

Nejpokročilejší metodou radioterapie je tzv. IMRT (intensity modulated radiation therapy). Ozařování je prováděno velkým počtem svazků namířených na nádor z různých stran s modulovanou intenzitou. Výsledkem je extrémní přesnost a vysoká dávka v nádoru při šetření zdravých tkání.

Přístup k šetření zdravých tkání prodělal při svém vývoji několik etap:

1950: používala se čtvercová/obdélníková pole

1960: používaly se olověné bloky chránící citlivé struktury

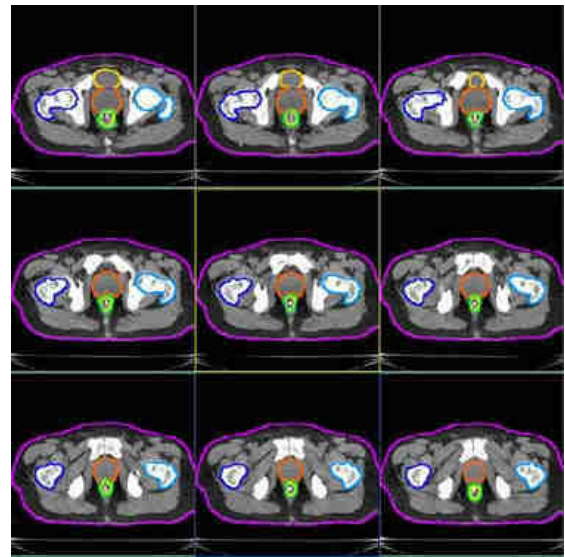
1990 – 2000: pole se tvarovalo, dané pole.

2001 – současnost: IMRT terapie – kontinuální změna tvaru a profilu intenzity při neustálém fokusování svazku na nádor

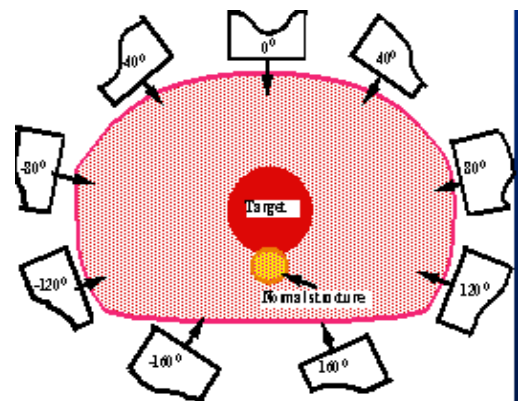
IMRT terapie - využívá se proměnného kolimátoru řízeného počítačem (obr. 192), který upravuje tvar zářivého pole v každém okamžiku tak, aby co nejlépe odpovídal tvaru nádoru.



Obr. 192. Kolimátor pro IMRT terapii s měnitelným profilem pole.

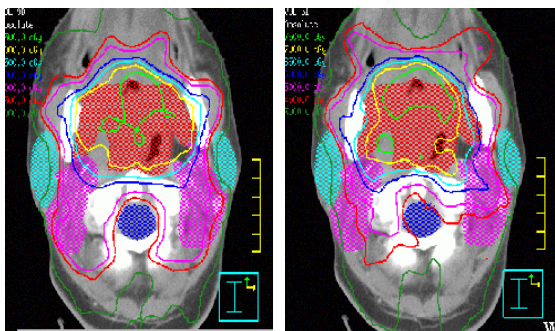


Obr. 191. Série příčných řezů pořízených pomocí CT se zakresleným nádorem a citlivými orgány .

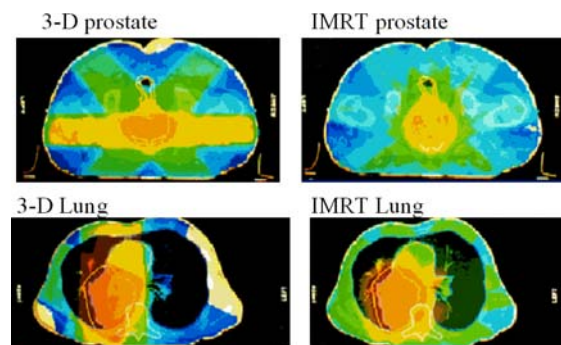


Obr. 193. Ozařování pomocí IMRT. Pro každý směr svazku máme optimální profil svazku.

Při IMRT terapii se výrazně šetří citlivé struktury, neboť jsou stíněné při libovolném nasměrování svazku (na obr. 193 žlutě). Dávkové distribuce u IMRT terapie jsou uvedeny na obr. 194, 195 – standardní terapie vede k rozsáhlejšímu ozáření zdravých tkání.



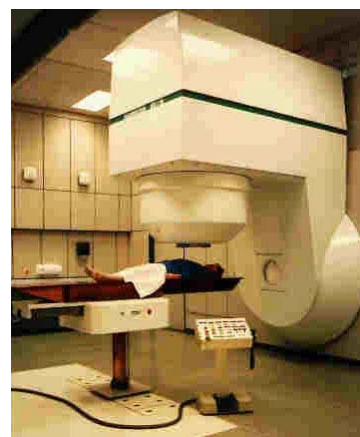
Obr. 194. IMRT terapie z 9 polí (vlevo) a z 5 polí. Více polí vede k lepší distribuci dávky



Obr. 195. Porovnání standardní 3D terapie a IMRT terapie (vpravo).

13.3.5. *Terapie neutrony*

Neutrony jsou částice bez náboje stejně těžké jako je proton. Vznikají např. v jaderném reaktoru při štěpení uranu nebo také na urychlovači při dopadu deuteronů na terčik, kdy může dojít k oddělení neutronu od protonu. Neutrony také vznikají v nejrůznějších jaderných reakcích. Při průchodu hmotou ztrácejí neutrony svou energii většinou v pružných a nepružných srážkách, přičemž největší část energie ztratí při srážce se stejně velikou částicí, tj protonem (jádem vodíkového atomu). Energie je tedy předávána hmotě nepřímo, prostřednictvím sekundárních částic (odražených protonů, jader uhlíku, kyslíku apod). Toto jsou poměrně těžké částice a hustě ionizují (mají vysoké LPE). Neutrony mají tedy ve srovnání s X-zářením větší hodnotu LPE a menší kyslíkový poměr, a proto jsou vhodnější pro rezistentní nádory (např. s anoxickou komponentou). Průběh hloubkových dávek je u neutronů podobný jako u X-záření.



Obr. 196. Neutronový generátor ve službách radioterapie.

13.3.6. *Terapie zápornými piony*

Záporné mesony π mají z hlediska radioterapie výhodné vlastnosti. Jednak je maximum absorbované dávky v určité hloubce pod povrchem (Braggův peak), podle jejich energie a jednak jsou tyto částice zachytávány atomy, postupně klesají na nižší a nižší orbity, až jsou nakonec pohlceny jádrem, které tímto získá velkou energii (135 MeV) a rozpadne se. Produkty těchto rozpadů mají dolet srovnatelný s rozměrem buňky a velmi hustě ionizují. Proto je kyslíkový poměr u pionů menší než u standardních typů záření. Klinické experimenty s piony byly prováděny na několika pracovištích ve světě (viz. tab.7). Vzhledem k vysokým nákladům a nepřiliš přesvědčivým úspěchům terapie piony ve srovnání s moderními metodami jako je IMRT, se současné době terapie piony nerozšiřuje.

Tab. 7. Laboratoře v nichž proběhly klinické experimenty na svazcích záporných mesonů π

Place	Country	Accelerator	E_p (MeV)	No. of Patients	Period
Los Alamos, NM	USA	Linac	800	230	1974-1982
Vancouver	Canada	Cyclotron	520	367	1979-1994
Villigen	Switzerland	Cyclotron	590	503	1981-1993
Dubna	Russia	Synchrocyclotron	660		
			Total:	1100	

13.3.7. *Terapie protony*

Ozařování protony má velkou výhodu v tom, že svazek lze velmi přesně vymežit a pacienta lze ozařovat z mnoha různých směrů. To umožňuje dosáhnout velké dávky v určitém malém objemu (několika cm^3) a značného gradientu dávky v okolí. Takto se dá léčit řada pacientů, kteří se nehodí pro léčbu γ -zářením:

- 1) izolované metastázy na mozku
- 2) AMD (senilní degenerace makuly) – věkem podmíněné onemocnění zraku (37% ztrát zraku, 15% u osob nad 50 let), léčba laserem způsobuje sama poškození zraku – protony jsou vysoce účinné
- 3) meningiomy (benigní nádory mozku)
- 4) nádory hltanu a hrtanu – značně přesnější rozložení dávky umožňuje více ozářit nádor a méně zdravé tkáně v okolí

5) oční nádory u dětí (šetření byt' malého kousku tkáně před ozářením je pro další vývoj dítěte nesmírně důležité)

6) nádory prostaty – šetření rekta a močového měchýře může vést k recidivám

7) inoperabilní nádory plic v časných stádiích

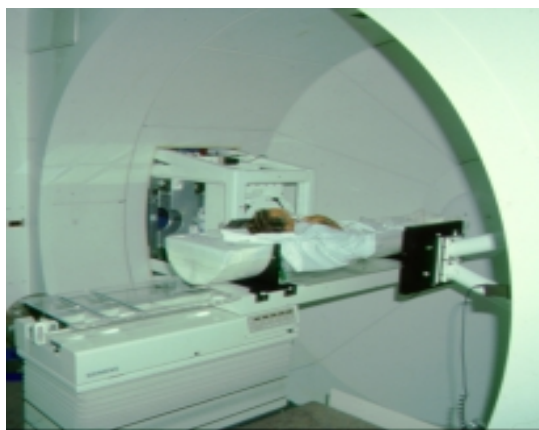
Na obr. 197 je centrum protonové terapie na Loma Linda University v Kalifornii.



Obr. 197a Plánování léčby - CT



Obr. 197b. Plánování – analýza CT



Obr. 197c. Pohyblivý svazek protonů



Obr. 197d. Boční fixní svazek

XIV. Účinek záření na organismy

14.1. Experimenty se zářením

Kromě léčebných účinků se brzo přišlo na to, že záření může člověku velmi vážně ublížit. Sama Marie Curie na svou práci se zářením doplatila. Již v roce 1920 pociťovala silnou únavnost a závratě. V roce 1930 onemocněla nevléčitelnou anémií a 4 roky poté zemřela v horském sanatoriu, kde byla léčená. Vzhledem k neviditelnosti záření však mnozí dlouho nechápali jeho škodlivost nebo ji brali na lehkou váhu.

V období studené války došlo k řadě případů zneužití záření a to jak v Rusku, tak v USA. Dokumentuje to zpráva D.O.E. „Human Radiation Experiments“. Tak např. byl v průběhu 2 let podávána 829 ženám plutoniový koktejl s komentářem typu – budete se cítit lépe. Fyzici mnohdy pracovali s nadšením bez ohledu na své zdraví i zdraví jiných. Tak např. dr. Slotin zemřel po experimentování se dvěma hemisférami plutonia, které ručně posunoval k sobě dokud neucítil atomovou reakci (obr. 198). Když mu sjel šroubovák, reakce přešla v intenzivní záři a Slotin oddělil obě hemisféry ručně od sebe. Zemřel po 9 dnech.



Obr. 198. Americký atomový fyzik Slotin experimentující s plutoniem.

14.2. Deterministické účinky záření na organismus

Rozlišujeme *deterministické účinky*, pro které existuje práh, jež se týkají velkých dávek, u nichž nastává rychlý nástup, a které mají relativně malý význam pro společnost a *stochastické účinky*, kde se předpokládá bezprahovost, které nastávají po malých dávkách, dochází k nim po dlouhé době po ozáření, a které mají velký význam pro společnost. Stochastické účinky zahrnují zejména kancerogenní působení záření a genetické účinky (vliv záření na zárodečné buňky a plod).

14.2.1. Citlivost různých organismů k záření

Účinek záření na tkáň lze vysvětlit přežitím kmenových buněk tkáně (určitě reakci tkáně odpovídá určitá hodnota přežití). Podobně účinek záření na úrovni organismu lze redukovat na poškození určité tkáně, tedy opět na přežití buněk. Záření způsobuje u organismů akutní nemoc z ozáření. U člověka rozlišujeme tři formy podle velikosti dávky a podle příznaků:

- dřevňová forma (poškození krvinek)
- gastrointestinální forma (poškození střevního epitelu)
- neurovaskulární forma (poškození cév mozku)

Citlivost jednotlivých organismů se hodnotí pomocí LD50 (Gy), tj. dávky, při které zahyne polovina jedinců:

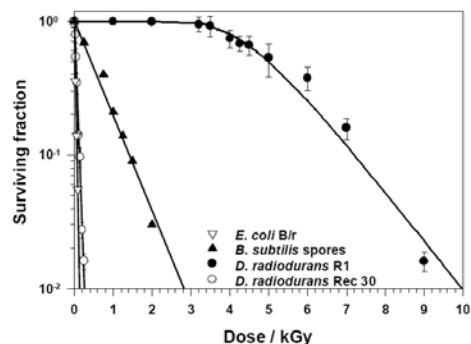
Tab. 8. Hodnoty LD50 pro různé organismy [Gy]

Člověk	4-5 Gy	Prase	3 Gy	Králík	8 Gy
Pes	2,5-3 Gy	Opice	4-5 Gy	Kůň	6 Gy
Myš	5-10 Gy	Kuřata	10 Gy	Ryby	6 Gy
Potkan	7-10 Gy	Krasy	20 Gy	Želvy	150 Gy
Hmyz	100-1000 Gy	Pšenice	50 Gy	Rajčata	120 Gy
Houba	300-500 Gy	Špenát	150 Gy	Zelí	150 Gy

Pro srovnání

uvádíme také citlivost jednotlivých buněk k záření:

Savčí buňky	1-2 Gy
Escherichia coli	100-200 Gy
Prvok	1000-3000 Gy
Micrococcus radiodurans	8000 Gy



Obr. 199. Citlivost různých bakterií k ozáření. Micrococcus je nejodolnější.

Rozdíly v citlivosti se objasňují různě: různé populace buněk jsou kritické a různě velké. Zhruba platí, že fylogeneticky vyvinutější organismy jsou citlivější. U Micrococcus je rezistence způsobena mnoha kopiemi genomu na buňku a efektivní reparací poškození DNA.

14.2.2. Nemoc z ozáření u člověka

K nemoci z ozáření dochází u člověka pro dávky větší než 0,7 Gy. Nejcitlivější jsou krevní buňky, dále střevní a nejvíce rezistentní se jeví nervové buňky, které se nemnoží.

Dřeňová forma: kostní dřeň – úbytek kmenových krvetvorných buněk, které jsou velmi citlivé. Prahová dávka je zhruba 1 Gy, prodromální fáze nastupuje za 30 min – 48 hod, dále pozorujeme latentní fázi 2 dny až 3 týdny načež přichází manifestní fáze. Dochází k útlumu krvetvorby, cytopenii, nejvíce kostní dřeň je lokalizováno v páteři, dorzálních oblastech žeber a pánve – ozáření těchto oblastí je kritické (lze v případě potřeby stínit).

Prodromální symptomy zahrnují zvracení, průjem. Při těžkém průjmu je pravděpodobná smrt. Během prvních dnů dochází k prudkému poklesu lymfocytů, který je dávkově závislý a může být použit jako indikátor dávky. Latence je dlouhá (obvykle několik týdnů), pancytopenie způsobuje těžké infekce, pokles trombocytů způsobuje hemoragie (krvácení). Symptomy tedy zahrnují vzestup infekčních komplikací, krvácení, anemii, špatné hojení ran. Maximální pokles lymfocytů nastává 3. den. Podle počtu lymfocytů lze odhadnout další vývoj nemoci z ozáření.

14.2.3. Léčba nemoci z ozáření

Léčba spočívá v:

- prevenci infekcí a jejich léčbě;
- podávání hemotologických růstových faktorů;
- transplantaci kmenových buněk.

Prevence infekcí – izolace, antibiotika (i preventivně), acyklovir (x Herpes), riziko krvácení při hluboké trombocytopenii lze redukovat transfúzí trombocytů.

Růstové faktory – podávají se u vyšších dávek, G-CSF nebo GM-CSF, co nejdříve po ozáření a dlouhodobě (10-20 dní). Stimulují krvetvorbu – redukce neutropenie. Nežádoucí účinky – bolesti kostí, hlavy, horečka.

Transplantace – nejlepší by byly autologní či syngenní kmenové buňky, ty jsou však obvykle nedostupné. Po alogenní transplantaci dochází k reakci štěpu proti hostiteli a naopak. Transplantace je vhodná pouze při dávkách 8-10 Gy v případě, že nejsou poškozeny další tkáně.

Při současném poranění člověka radiace dále zhoršuje vyhlídky na uzdravení.

14.2.4. Gastrointestinální forma nemoci z ozáření (GIS)

Je letální, dávky jsou větší než u samotné dřevňové formy (epitel je rezistentnější, (>8 Gy). Manifestace je rychlejší ve srovnání s dřevňovou formou (10min – 48 h), latentní fáze trvá 3-5 dnů a následuje manifestace onemocnění.

Podstatou této formy je úhyn kmenových buněk střevního epitelu denudace střevní sliznice, eliminace funkční bariéry bránící vstupu mikrobů do těla a ztrátám tekutin. Nejvíce je postiženo tenké střevo. Dochází ke zpomalení nebo zastavení obměny epitelu krypt.

Při lokálním ozáření dochází později ke vzniku atrofie, fibrotizace a vředů. Výsledek závisí na dávce a jejím rozložení v čase.

Klinické projevy splývají s projevy dřevňového syndromu, neexistují specifické projevy.

14.2.5. Neurovaskulární syndrom

Dochází k němu po expozici velmi vysokými dávkami – 30 Gy a více (vojenské operace, nehody v jaderných zařízeních). Při výbuchu jaderné zbraně se lidé vystavení takto vysokým dávkám nacházejí v zóně letální z hlediska tlakových a teplotních účinků.

Prodromální fáze nastupuje za několik minut, latence do 2 dnů nebo úplně chybí, manifestní fáze provázená smrtí. Mechanismy souvisí s poškozením cév a CNS. Cévní složka se manifestuje po 30Gy, CNS – po dávkách nad 100 Gy.

Typický je úbytek endoteliálních buněk – zvýšení propustnosti kapilár – únik plazmy do intersticia – pokles krevního tlaku, edém, krvácení do mozku končící smrtí.

Poškození CNS – demyelinizace a perivaskulární edém, nekróza. V průběhu manifestní fáze při dávkách nad 100 Gy se pozoruje zhoršování vědomí, následované bezvědomím a smrtí.

14.3. Stochastické účinky záření na organismy

14.3.1. Radiační karcinogeneze

Zdroji informace jsou zde experimentální zvířata, experimenty s transformací buněk a ozáření populace lidí (v uranových dolech, v domcích s radonem, po bombardování Hirošimy a Nagasaki, po Černobyli, po dalších radiačních nehodách).

Zhoubné nádory jsou charakterizovány:

- transformaci buněk, které nereagují na kontrolní mechanismy regulující růst
- schopností invazivního růstu
- tvorbou metastáz

Vznik nádorů – uznávaná je tzv. klonální teorie, kdy nádor vzniká z jediné buňky, jež změní své genetické vlastnosti tak, že má růstovou výhodu a vytvoří klon. V něm dojde k další mutaci atd. tak, až se odblokují reakce na okolní kontrolní signály a dojde k nekontrolovanému dělení.

Ve prospěch jednobuněčné teorie svědčí – podobnost nádorových buněk co se týče enzymatické a genetické výbavy, přítomnost imunoglobulinů. V průběhu progresu nádoru dochází ke vzniku dalších subklonů s odlišnou genetickou výbavou.

14.3.2. Radiační karcinogeneze u zvířat

Už v roce 1930 byla prokázána možnost indukce leukémie u myši zářením, v roce 1958 Upton publikoval dávkové závislosti indukce myeloidní a lymfoidní leukémie.

Obecnými zákonitostmi jsou: velká spontánní incidence, dávkové závislosti strmé na začátku pro malé dávky a poté se zakřivující, maximum podstatně menší než 100%. Dávkové závislosti jsou určeny pro relativně vysoké dávky ve srovnání s potřebami radiační ochrany (1-100 mSv). Nejnížší použité dávky jsou přibližně 400 mGy a výsledky nasvědčují lineární

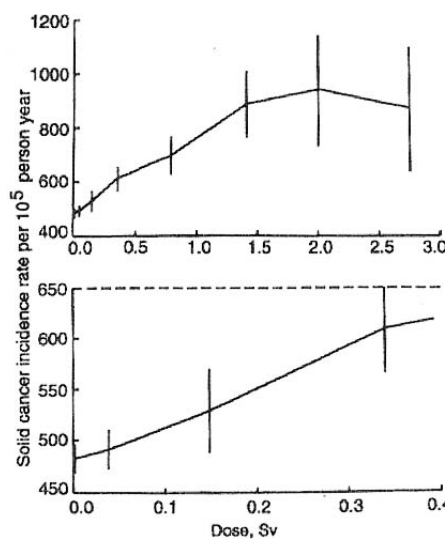
závislosti pravděpodobnosti vzniku nádorů na dávce. Doba latence je u zvířat poměrně krátká - jsou to měsíce až roky, u lidí 2-5 let pro leukémii a 35-40 let pro solidní tumory.

14.3.3. Epidemiologické studie

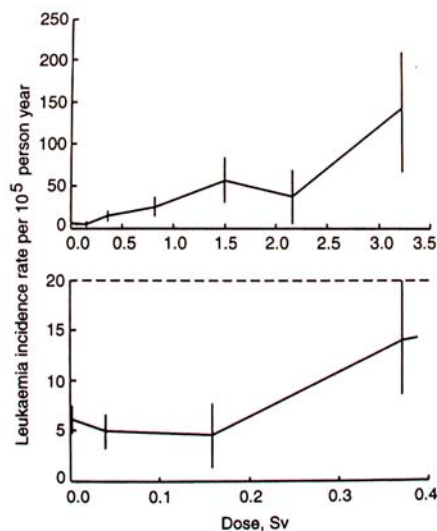
Výsledky epidemiologických studií jsou zpracovány ve zprávě UNSCEAR 2001. Závěr této zprávy je takový, že objem dat se od poslední zprávy (UNSCEAR 1994) rozšířil, zejména přibýly další případy úmrtí ve skupinách z Hirošimy a Nagasaki (odhad činí 421 dodatečných úmrtím následky ozáření, 334 na solidní nádory, 87 na leukémii). Vyšší statistická přesnost umožnila trochu upřesnit také závěry o závislostech dávka-účinek. Výsledky studií ukazují, že data jsou konzistentní s lineárními (solidní nádory) nebo lineárně-kvadratickými (leukémie) UZ(ED) závislostmi účinku záření na dávce, UZ(D) (na obr. 200,201). V poslední zprávě UNSCEAR je také učiněn závěr, že epidemiologická data sama o sobě neumožní odpovědět na otázku, zda existuje prahová dávka v UZ(D) závislosti; UZ(D) data pro leukémii jsou konzistentní s existencí prahu v oblasti malých dávek záření.

Byl potvrzen závěr dřívější zprávy o účinku vnitřního ozáření dětí radioaktivním jodem a vznikem rakoviny štítné žlázy (Černobyl). Odhad rizika je však komplikován nedostatečně určenou dávkou. Také výsledky dalších studií z území bývalého Sovětského svazu (Maják, řeka Teča) jsou nedostatečné pro upřesnění UZ(D) závislosti.

Celkové riziko vzniku solidního nádoru na 1 Sv činí 11% s chybou zhruba 2x (6-22%) a 1% pro leukémii. Při snížení dávky na 0,1 Sv bude podle lineárně-kvadratického modelu riziko vzniku leukémie 20x menší.



Obr. 200. Dávkové závislosti incidence solidních nádorů u obyvatel Hirošimy a Nagasaki. Pro malé dávky je vidět, že experimentální data jsou v souladu s lineární závislosti.



Obr. 201 Dávkové závislosti incidence leukémií u obyvatel Hirošimy a Nagasaki. Pro malé dávky je vidět, že experimentální data odpovídají spíše lineárně-kvadratické závislosti nebo závislosti s prahem do zhruba 0.2 Sv.

Epidemiologické studie jsou pro radiační ochranu velmi cenné, avšak neumožňují stanovit přesně riziko pro velmi nízké dávky záření (pod 20 cSv) vzhledem k vysoké spontánní incidenci zhoubných onemocnění a nízké statistické spolehlivosti závěrů.

14.3.4. Radiační riziko a další rizika jímž je člověk vystaven

V tabulkách jsou uvedeny rizika, kterým je člověk v životě vystaven (počty úmrtí a zkrácení života). Radiační riziko je nutno nastavit v tomto kontextu tak, aby bylo podstatně menší ve srovnání s běžnými riziky.

Tab.9. Odhad zkrácení života pro určitou profesi

Průmysl	Zkrácení života (ve dnech)
Hornictví	328
Stavebnictví	302
Zemědělství	277
Radiační dávka 5cSv/rok	250
Přeprava/Služby	164
Státní služba	55

Pro práci se zářením jsou stanoveny *limitní dávky*, které nesmějí být překročeny. Mají za cíl vyloučení deterministických účinků a omezení stochastických na nezbytné minimum. Práce musí být plánována tak, aby její prospěšnost pro lidstvo převýšila možný negativní vliv na zdraví pracovníka nebo obyvatelstvo. Při práci s ionizujícím zářením se řídíme následujícími limity.

Tab. 11. Limity pro ozáření

	V zaměstnání	Mimo zaměstnání
Celé tělo	50 mSv/rok	1 mSv/rok
Kůže Končetiny Jiné orgány	500 mSv/rok	N/A
Oční čočka	150 mSv/rok	N/A

Tab. 10. Počty úmrtí za rok na milión lidí

Kardiovaskulární choroby	4780
Rakovina	1700
Autonehody	220
Domácí úrazy	150
Zabití	100
Oheň	30
Utopení	30
Otrava	13
Radiace	9
Letecké nehody	8
Elektrina	6
Zabití bleskem	1
Kousnutí zvířetem nebo hmyzem	1

14.3.5. Výpočet dávek v radiační ochraně

Pro výpočet biologického účinku se zavádějí jednak radiační váhové faktory, které se liší pro různé druhy záření, jednak tkáňové váhové faktory, které se liší pro různé tkáně. Faktorem se násobí dávka jako fyzikálně změřená veličina a výsledná veličina se pak nazývá ekvivalentní resp. efektivní dávka (tab. 12). Tyto dva postupy lze také kombinovat.

Tab.12. Radiační a tkáňové váhové faktory

Radiační váhové faktory pro stanovení ekvivalentní dávky

α -záření	20
β -záření	1
γ a X-paprsky	1
neutrony, termální, rychlé	2.5 (10-20)
těžké ionty	>20

Tkáňové váhové faktory pro stanovení efektivní dávky

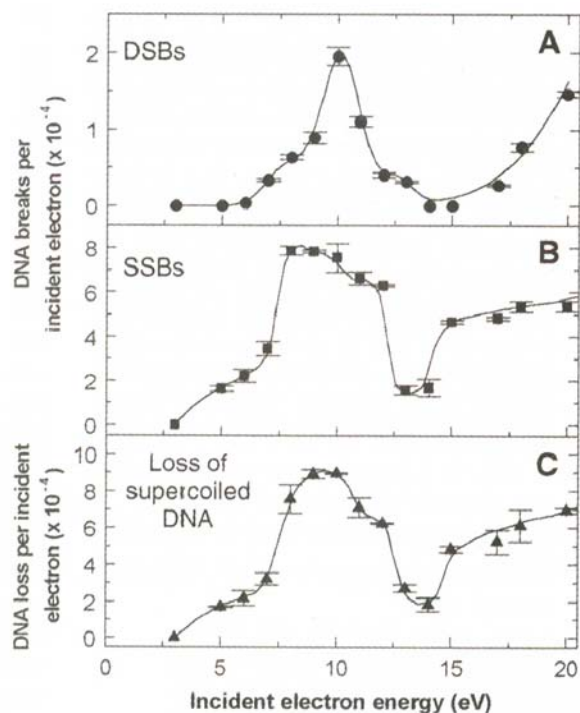
močový měchýř	0.05	pohlavní orgány	0.20
kost	0.01	játra	0.05
kostní dřeň	0.12	pľíce	0.12
prso	0.05	kůže	0.01
tlusté střevo	0.12	žaludek	0.12
jícen	0.05	všechno ostatní	0.05
štítná žláza	0.05	celé tělo	1.00

XV. Žhavá témata současnosti v oblasti radiační biofyziky

15.1. Nové, principiálně důležité výsledky

15.1.1. Resonanční charakter přenosu energie ionizujícího záření na molekuly DNA v oblasti malých energií sekundárních elektronů

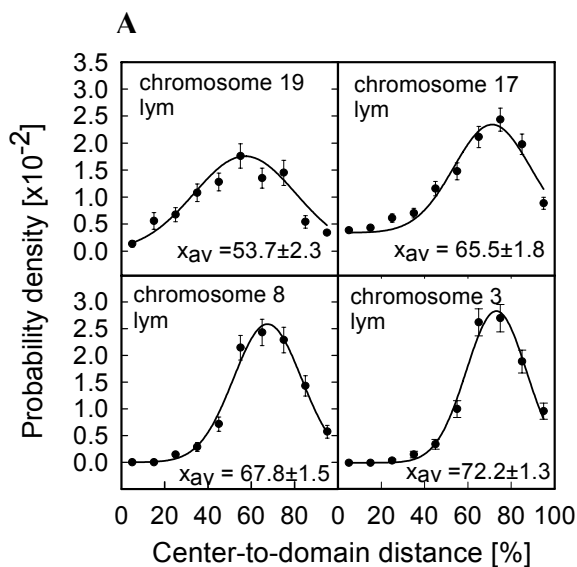
Fyzikální procesy přenosu energie ve vodě nebo vodním roztoku DNA jsou poměrně dobře prostudovány. Na základě znalosti účinných průřezů pro různé fyzikální reakce byly navrženy počítačové programy založené na Monte-Carlo metodě pro detailní výpočet vzniku ionizací a excitací molekul ve vodě, přenos energie na DNA jednak přímo a jednak prostřednictvím radikálů a nakonec pro výpočet poškození DNA (přehled v disertaci Běgusová M., 1999). Tyto modely umožnily vysvětlit závislosti vzniku zlomů DNA v závislosti na struktuře DNA (na posloupnosti nukleotidů), na její konformaci a event. na přítomnosti proteinů v DNA molekule. Ve zmíněných programech se procesy simulují do určité energetické úrovně elektronů (např. 20 eV) a předpokládá se, že pod touto úrovní už elektron nemůže s DNA interagovat tak, aby způsobil vznik zlomu (pod prahem ionizace). Tento předpoklad se však ukázal být nesprávný. V řadě prací kanadské skupiny, pod vedením L. Sanche, se dokazuje, že energie elektronu potřebná pro indukci DNA zlomu (SSB i DSB), může být podstatně menší, než se doposud předpokládalo (2-20 eV). Tento jev spočívá v rezonanční absorpci elektronu molekulou DNA (obr. 202). Absorpce vede k nestabilnímu stavu molekuly, který může s určitou pravděpodobností způsobit vznik zlomu. Autoři ukazují, že vzhledem k početnosti sekundárních elektronů s energií 1-20 eV ($5 \cdot 10^4$ na MeV), může uvedený mechanismus indukce zlomů DNA konkurovat známým procesům excitace, ionizace nebo interakce molekuly DNA s radikály. Zajímavý je rezonanční průběh závislosti indukce zlomů DNA na energii elektronů, který je spojován se zachycením elektronu k molekule DNA.



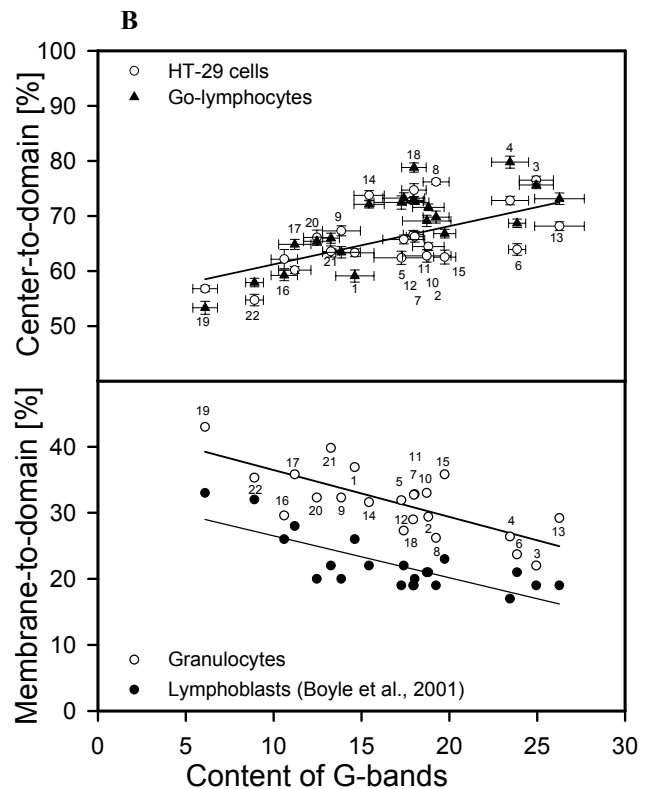
Obr. 202 Resonanční záchyt elektronů na molekule DNA a její poškození vznikem DSB (A), SSB (B) a ztrátou spiralizace (C). Nejúčinnější jsou elektrony s energií 10 eV.

15.1.2. Struktura genomu není náhodná

Význam struktury „citlivé oblasti“ nebo „terčíku“ pro účinek záření je znám už přinejmenším půl století. Je zřejmé, že ty genetické elementy, které mají k sobě blízko, mohou zřejmě interagovat daleko častěji než vzdálené elementy. Dlouhou dobu se však předpokládalo, že molekuly DNA (chromosomy) plavou v jádře buňky asi jako „nudle v polévce“ a celé jádro si lidé představovali jako „sáček“ naplněný touto „nudlovou polévkou“. Zavedení FISH techniky v 80-tých letech jasně ukázalo, že v jádře existují tzv. chromosomová teritoria, tj. že jednotlivé chromosomy zaujímají prostor, který je podstatně menší ve srovnání s jádrem buňky. Zároveň se však zjistilo, že polohy teritorií jsou velmi variabilní, a proto se nadále předpokládalo, že jednotlivé lokusy jsou v jádře umístěny více či méně náhodně. Teprve přesná měření ukázala význam geometrie jádra pro odhad účinků záření.



Obr. 203 Umístění chromosomových teritorií v jádře lidských buněk. (A) Radiální distribuce čtyř chromosomových teritorií v trojrozměrně fixovaných jádrech lidských G_0 -lymfocytů. Pro každý chromosom jsou uvedeny průměrné hodnoty a jejich standardní odchylky.



(B) Závislost trojrozměrných radiálních vzdáleností na obsahu G pruhů pro G_0 -lymfocyty (černé trojúhelníky) a HT-29 buňky (bílé kruhy). Pro porovnání jsou uvedeny výsledky na dvourozměrně fixovaných lymfoblastech (černé body) a dřívější výsledky na dvourozměrně fixovaných granulocytech (bílé kruhy).

Poloha chromosomů v jádře buňky

V několika pracích byly měřeny v jádrech buněk radiální vzdálenosti fluorescenčních středů chromosomových teritorií od středu jádra. Byly sestaveny grafy distribucí těchto

vzdáleností pro 22 chromosomů (obr. 203 A). Chromosomy 16, 19 a 22 byly nalezeny blízko u středu jádra. Nejvíce na okraji byly umístěny chromosomy 3, 4, 8 a 18 (obr. 203 B).

Na grafech (obr. 203 B) je znázorněna závislost průměrné 3D vzdálenosti středů chromosomových teritorií na obsahu G-pruhů u lidských G_0 -lymfocytů a u buněčné linie HT-29. Pro porovnání jsou zde také uvedeny grafy, které vyjadřují závislost 2D vzdáleností středů chromosomových teritorií od jaderné membrány u lidských granulocytů a lymfoblastů. Poměr mezi obsahem R a G pruhů (R/G obsah) pravděpodobně ovlivňuje umístění chromosomů. Vzdálenosti chromosomů od středu jádra v G_0 -lymfocytech, granulocytech, HT-29 buňkách a lymfoblastech byly přibližně úměrné obsahu G pruhů. Některé rozdíly v distribucích radiálních vzdáleností, které byly publikovány pro různé buněčné typy, mohou být zapříčiněny zejména způsobem měření vzdáleností v jádře nebo normováním, které se používá v různých laboratořích. Paralelní měření polohy jednotlivých chromosomů v G_0 -lymfocytech a buňkách HT-29 naznačuje, že by umístění většiny chromosomů v buněčném jádře mohlo být podobné pro oba buněčné typy (obr. 203 B). Pouze v případě umístění chromosomu 5 byl v těchto dvou buněčných typech nalezen rozdíl větší než 10 %R (R je poloměr jádra buňky). V jádrech granulocytů se chromosom 16 nacházel mnohem blíže k jaderné membráně, než tomu bylo u G_0 -lymfocytů a HT-29 buněk.

Jak vyplývá z výše popsaných zákonitostí, genetické elementy (geny, centromery, chromosomy) se nacházejí přednostně v určité vzdálenosti od středu jádra, ve sférických vrstvách, které se mohou zcela překrývat (např. pro geny ABL a BCR), nebo mohou být vzájemně velmi vzdáleny (např. gen c-MYC a BCR). Uvnitř těchto vrstev je rozložení elementů v převážné většině případů náhodné. Pro odhad pravděpodobnosti interakce po ozáření dvou elementů je proto důležité zjistit hladiny (radiální vzdálenosti), na kterých se nacházejí a prověřit, zda jsou v rámci dané hladiny jejich polohy náhodné. Pro elementy náhodně se vyskytující uvnitř určité radiální vrstvy lze použít hustotu pravděpodobnosti výskytu (viz obr. 203 A) normovanou na jednotku objemu (funkce ψ) pro výpočet pravděpodobnosti interakce mezi oběma elementy. Příklad takového výpočtu je uveden pro chromosomy 8, 9 a 22 na obr. 204. Pravděpodobnost vzájemné interakce pro chromosomy 9 a 22 se rovná $R_{9,22}=2.1$, zatímco pro chromosomy 8 a 22 je uvedená pravděpodobnost $R_{8,22}=0.5$. Tyto rozdíly jsou způsobeny pouze odlišnou polohou odpovídajících vrstev jednotlivých chromosomů.

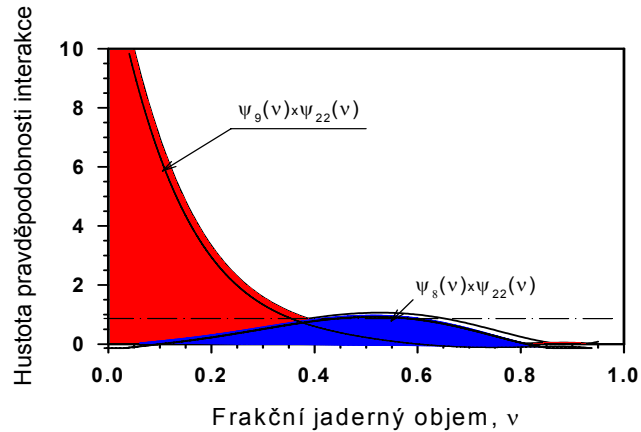
Párování heterologních genetických elementů

Mezi genetickými elementy může docházet ke vzniku vázaných stavů, které se projevují neúměrně vysokým počtem případů, kdy se heterologní genetické oblasti párují dohromady (angl. tethering) v malé prostorové vzdálenosti. Tento efekt byl studován pro ABL a BCR geny v lidských T-lymfocytech. Výsledek experimentů je uveden na obr. 204.

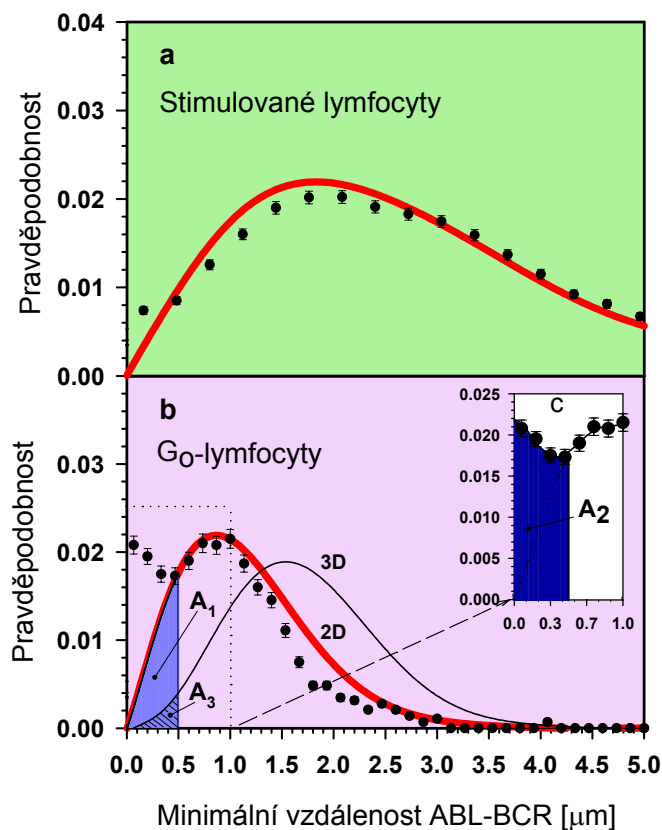
Pro G_0 -lymfocyty bylo naměřeno podstatně více případů, kdy geny ABL a BCR jsou blízko ($<0.5 \mu\text{m}$), než by se dalo čekat z teoretického výpočtu založeného na Monte Carlo simulaci (obr. 205). Pro srovnání vidíme, že u stimulovaných lymfocytů experimentální údaje dobře odpovídají teorii. Vzhledem k tomu, že měření bylo

provedeno v 2D projekci, skutečný nárůst počtu vázaných stavů oproti případu, kdy jsou geny blízko u sebe náhodně, je nutno vypočítat jako poměr ploch $(A_2 - A_1)/A_3$, což v našem případě činí 7.3 ± 1.5 . Docházíme tedy k závěru, že pravděpodobnost interakce mezi chromosomy 9 a 22 by měla být alespoň 2.1×7.3 , což je $15.3 \times$ větší v porovnání s náhodným rozdělením. Jak bude uvedeno dále, experimentálním měřením bylo zjištěno, že uvedená hodnota je $11 \times$ větší, což je v souladu s výše vypočítaným odhadem.

Otázka existence vázaných stavů je velmi důležitá, a proto byla zkoumána v dalších experimentech při použití 3D fixace. Bylo zjištěno, že v ojedinělých případech lze najít vazbu mezi genetickými elementy, která se projevuje atypickým úhlovým rozdělením (rozdělením úhlů element-střed jádra-element), jež neodpovídá funkci sinus. V těchto případech se také setkáváme s atypickým rozdělením vzájemných vzdáleností mezi genetickými elementy, kdy je upřednostněna určitá vzdálenost.



Obr. 204 Závislost hustoty pravděpodobnosti interakce mezi chromosomy 9 a 22 (8 a 22) na frakčním jaderném objemu. Celková pravděpodobnost interakce se vypočte jako integrál pod zobrazenou křivkou: červená plocha pro chromosomy 9 a 22 (modrá plocha pro chromosomy 8 a 22). Pravděpodobnost interakce je normována na případ, kdy se oba chromosomy nacházejí zcela náhodně v celém objemu jádra (plocha pod čerchovanou přímkou se rovná 1).



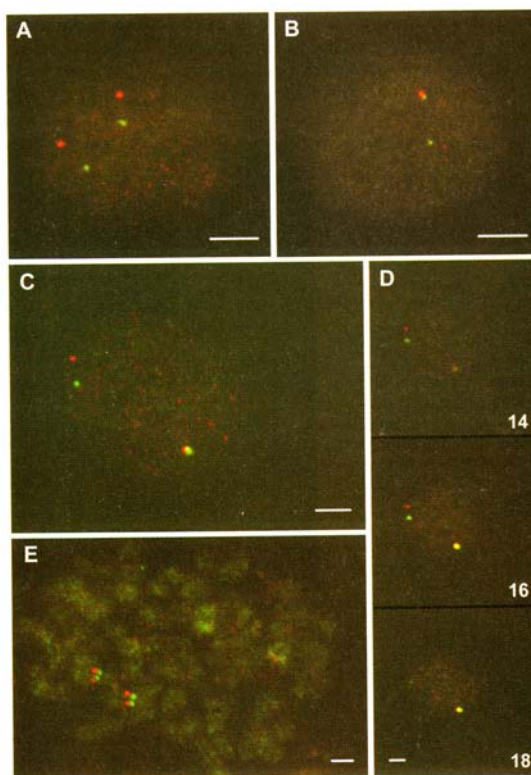
Také pro 3D vzdálenosti mezi

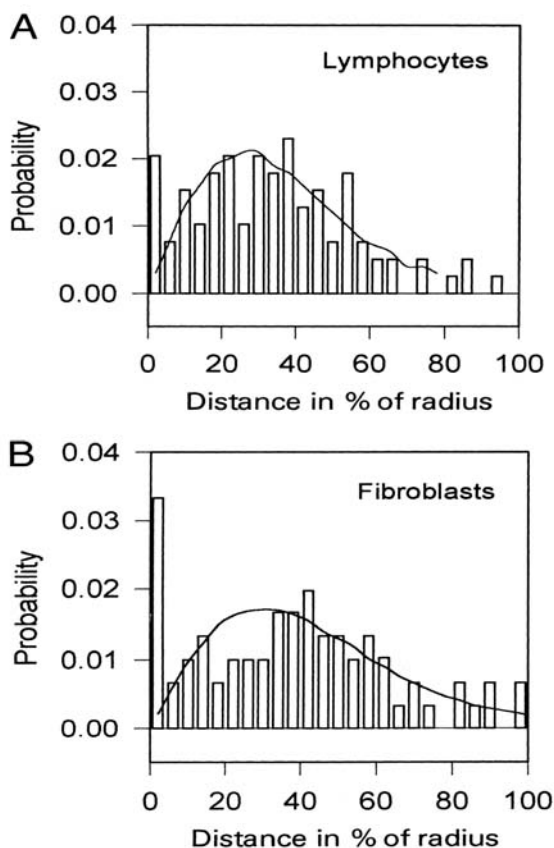
Obr. 205 Distribuce minimálních 2D vzdáleností mezi geny ABL a BCR (AB_m) ve stimulovaných (a) a nestimulovaných (b) lidských lymfocytech. Teoretická závislost pravděpodobnosti na AB_m (plná čára) byla počítána pomocí modelu jak pro 2D projekce, tak pro 3D vzdálenosti. Počáteční část distribuce do $1 \mu m$ je znázorněna na obr. 205 c, kde tmavě modrá oblast znázorňuje plochu pod experimentální distribucí AB_m pro hodnoty $AB_m < 0.5 \mu m$ (A_2). Světle modrá oblast na obr. 205 b znázorňuje plochu pod teoretickou křivkou ve 2D (A_1) a šrafovaná oblast ve 3D prostoru (A_3). Jak vidíme, počet jader G_0 -lymfocytů s $AB_m < 0.5 \mu m$ je podstatně vyšší (2x), než je teoretická předpověď.

geny ABL a BCR v G_0 -lymfocytech byl nalezen posun k menším hodnotám (obr. 205). Z hlediska vzniku CML je však důležitá distribuce těchto vzdáleností v kritické buněčné

populaci, tj. v buňkách $CD34^+$. Tyto buňky lze separovat z kostní dřeně nebo z mobilizované krve. Předběžné experimenty ukázaly, že skutečně v buňkách $CD34^+$ jsou vzdálenosti mezi ABL a BCR menší, než by odpovídalo radiálním distribucím.

Obr. 206 Vazba (tethering) mezi geny RET a H4 u buněk štítné žlázy. Geny RET a H4 jsou odděleny poměrně velkou molekulární vzdáleností a v jádře se nacházejí daleko od sebe (A). Ve 30% případů se však RET a H4 nacházejí poblíž (B-D). Na obr. E je mitóza, kde je vidět, že v kondenzovaném stavu jsou oba geny také blízko u sebe.





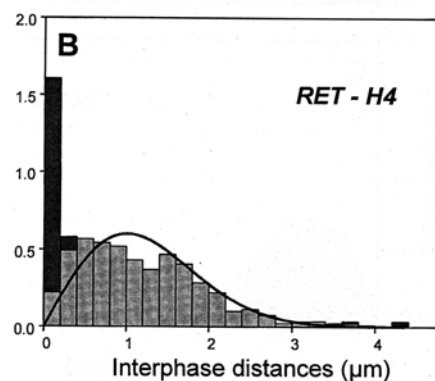
Obr. 207 Vazba mezi geny *c-MYC* a *IGH* byla prokázána pro dva typy buněk. Na obrázku jsou distribuce vzájemných vzdáleností mezi oběma geny (Kozubek S. et al., 1997).

proto, poněvadž existuje vazba mezi těmito geny (obr. 206, 208). Prostorová blízkost dvou genetických oblastí podstatně zvyšuje pravděpodobnost jejich interakce po ozáření. Výrazně se to projevuje pro hustě ionizující záření, kde výměnné aberace vznikají mezi blízko se nacházejícími chromosomy. Pro takové dvojice chromosomů (např. 9 a 22 nebo 14 a 18) nacházíme aberace také u často se vyskytujících zhoubných onemocnění krvinek. To v menší míře platí také pro gamma záření, kde formování aberací trvá delší dobu a vzájemně tak může interagovat více chromosomových dvojic.

Prostorové uspořádání chromosomů a vazba genetických elementů mohou tedy významně ovlivnit indukcii genetických poškození zářením. Pro zhodnocení tohoto vlivu je však nutný přesný výpočet.

Výměny vznikají tedy zejména tam, kde jsou dané chromosomové oblasti blízko u sebe buď v důsledku stejných radiálních distribucí, nebo v důsledku vazby (tethering). Vazba mezi určitými genetickými strukturami (tethering) již dříve (Kozubek S. et al., 1997) pro *c-MYC* a *IGH* lokusy (obr. 207). V dalších pracích byla taková vazba prokázána pro geny *ABL* a *BCR* v Go lymfocytech měřením 2D i 3D vzdáleností.

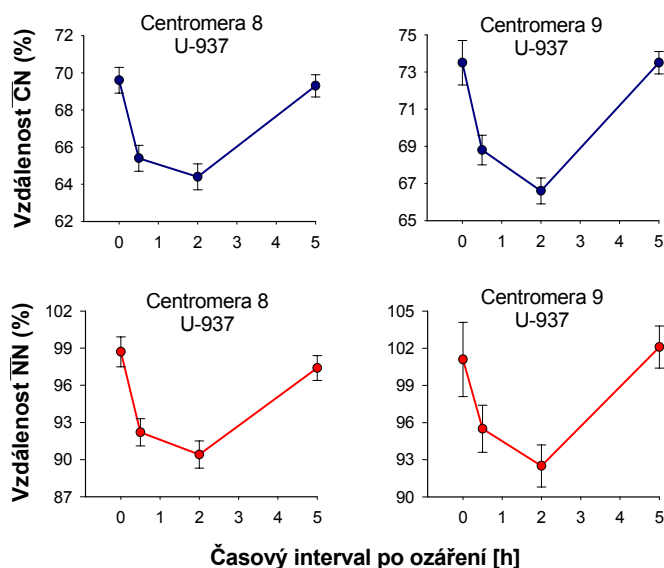
Na tyto naše výsledky navázali další autoři, kteří sledovali geny *RET* a *H4* v buňkách štítné žlázy (Nikiforova et al., 2000) a prokázali, že vznik nádorů štítné žlázy po Černobylu je právě důsledkem *RET/H4* aberace, a ta vzniká



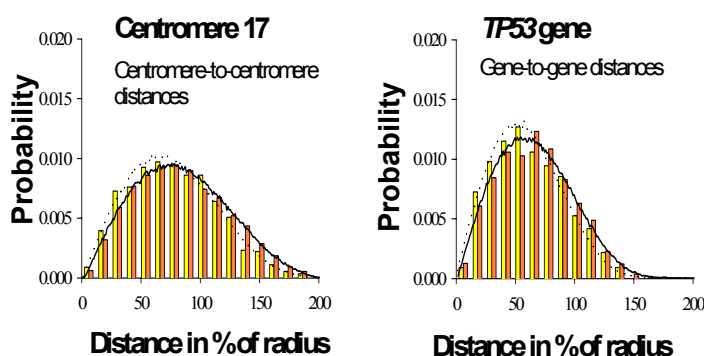
Obr. 208 Vazba mezi geny *RET* a *H4* byla prokázána na základě podobného rozdělení v práci Nikiforové

15.1.3. Geometrie genomu v jádře se mění účinkem záření

Dalším zajímavým aspektem je kinetika vzájemného prostorového uspořádání kritických genů po ozáření v jádře buňky. Vizualizace genetických struktur umožňuje zkoumat také tuto otázku experimentálně. Byl studován vliv ionizujícího záření na změny ve struktuře chromatinu vyššího řádu v interfázních jádrech buněčných linií ML-1 a U-937. 2D vzdálenosti centromer 8, 9 a 17 a genu *TP53* od těžiště jádra a vzdálenosti mezi homologními signály byly měřeny v časových intervalech 2 h a 5 h po ozáření. Dvě hodiny po ozáření bylo



Obr. 209 Zmenšení vzdáleností centromer 8 a 9 od těžiště jádra (tmavě modrá) a zmenšení vzájemných vzdáleností mezi homologními signály centromer 8 a 9 (červená) v buňkách U-937 po ozáření.



Obr. 210 Rozdělení vzdáleností mezi dvěma genetickými lokusy (centromerami 17 a geny *TP53*) v jádrech buněk ML-1 v kontrole (červeně) a po ozáření dávkou 5 Gy (žlutě). Exp. distribuce odpovídají teoretickým křivkám spočteným za předpokladu náhodného rozložení genetických oblastí ve sférické hladině.

zjištěno zmenšení vzdáleností signálů genetické oblasti od těžiště jádra a zmenšení vzdáleností mezi homologními signály. V časo-vém intervalu 5 hodin po ozáření byl sledován zpětný posun vzdáleností signálů centromer 8, 9 a 17 a genu *TP53* od těžiště jádra a vzdáleností mezi homologními signály do původní pozice před ozářením (tab.12). Posuny vzdáleností pro centromery 8 a 9 v buňkách U-937 a jejich návrat do původní pozice po ozáření jsou uvedeny na obr. 209.

Ozáření buněk tedy vede ke změnám ve struktuře jádra vyššího řádu. Homologní genetické struktury se k sobě přibližují, což bylo v literatuře interpretováno jako důsledek rekombinační reparace s využitím druhé kopie genetického materiálu jako templátu.

Ukázalo se, že pohyb homologů k sobě je důsledkem pohybu chromatinu směrem ke středu jádra (zřejmě jako následek rozvolnění chromatinu

při reparaci). Sférické hladiny pro jednotlivé struktury se tedy posouvají směrem ke středu jádra. Rozložení genetických lokusů uvnitř sférických hladin však zůstává náhodné (obr. 210), což vyvrací výše uvedený mechanismus rekombinační reparace.

Tabulka 12. Topografické parametry odlišných genetických úseků v interfázních jádrech buněčných linií ML-1 a U-937 určených po ozáření

Genetický úsek (buněčný typ)	Topografický parametr	Kontrola [%]	Ozářené buňky	
			2 h [%]	5h [%]
Centromera 8 (U-937)	$\overline{CN_8}$	69.6 ± 0.7	64.4 ± 0.7*	69.3 ± 0.6
	$\overline{N_8N_8}$	98.7 ± 1.2	90.4 ± 1.1*	97.4 ± 1.0
Centromera 9 (U-937)	$\overline{CN_9}$	73.5 ± 1.2	66.6 ± 0.7*	73.5 ± 0.6
	$\overline{N_9N_9}$	101.1 ± 3.0	92.5 ± 1.7*	102.1 ± 1.7
TP53 (ML-1)	\overline{CP}	47.5 ± 0.6	43.1 ± 1.1*	45.5 ± 0.8
	\overline{PP}	66.4 ± 0.9	63.5 ± 1.6	65.4 ± 1.2
Centromera 17 (ML-1)	$\overline{CN_{17}}$	59.3 ± 0.8	55.6 ± 1.4*	63.2 ± 1.3
	$\overline{N_{17}N_{17}}$	84.5 ± 1.1	78.2 ± 1.7*	90.5 ± 1.6

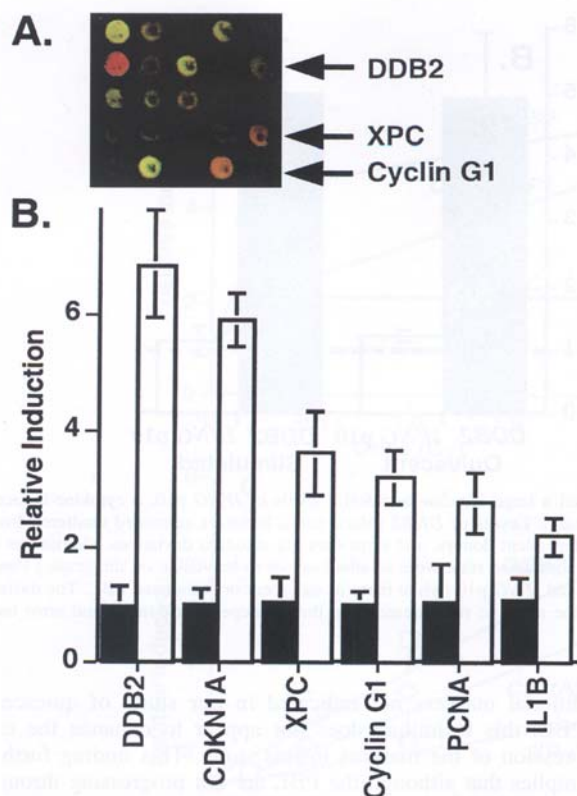
\overline{CP} - průměrná vzdálenost genu TP53 od těžiště jádra; \overline{PP} - průměrná vzdálenost mezi dvěma homologními geny TP53; $\overline{CN_8}$ - průměrná vzdálenost centromery 8 od těžiště jádra; $\overline{N_8N_8}$ - průměrná vzdálenost mezi dvěma homologními centromerami 8; $\overline{CN_9}$ - průměrná vzdálenost centromery 9 od těžiště jádra; $\overline{N_9N_9}$ - průměrná vzdálenost mezi dvěma homologními centromerami 9; $\overline{CN_{17}}$ - průměrná vzdálenost centromery 17 od těžiště jádra; $\overline{N_{17}N_{17}}$ - průměrná vzdálenost mezi dvěma homologními centromerami 17 (vzdálenosti jsou uvedeny v % lokálního poloměru, R); *statisticky významné rozdíly při $p < 0.05$.

Pohyb genetické struktury v jádře po ozáření byl očekáván v souvislosti s reparačními procesy, nebyl však znám charakter tohoto pohybu, jeho kinetika a způsob detekce. Změna geometrie genomu po ozáření znamená, že event. další záření již působí na změněnou strukturu, která může vykazovat odlišnou citlivost.

Pohyb chromatinu po ozáření – ať už je důsledkem reparačních procesů nebo jiných mechanismů – může ovlivnit pravděpodobnost vzniku aberací a tím i zhoubných onemocnění. Znamená podstatnou komplikaci při modelování účinků záření matematickými prostředky.

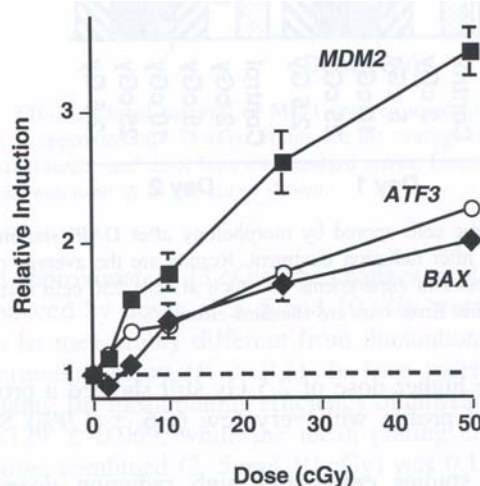
15.1.4 Genová exprese je indukována malými dávkami záření (první výsledky získané metodou DNA-čipů)

Změny exprese genů jsou známy již více než deset let a za tuto dobu se podařilo trochu nahlédnout do vzájemných vazeb mezi jednotlivými geny. Tak např. indukce TP53 způsobuje celou kaskádu indukce dalších genů, jako jsou GADD45, CDKN1A, MDM2, BAX, MCL1, BCLX. Tyto geny se uplatňují při regulaci buněčného cyklu a u zhoubných onemocnění nacházíme mutace v těchto genech. Kromě genů ovlivňujících buněčné přežití byly studovány také další geny, jako jsou FOS, JUN, MYC, HRAS apod., které nemají přímý



Obr. 211 DNA čipy (A). Na čipu je zeleně znázorněna exprese genu rovná kontrolní hodnotě a červeně jsou zobrazeny zářením indukované geny. Relativní indukce dávkou 50 cGy pro různé geny je znázorněna dole (B).

vliv na letální účinek záření. Uvedené studie však byly provedeny užitím relativně vysokých dávek záření. Použitím techniky DNA-čipů u buněk ML-1, které jsou p53 pozitivní, byla zkoumána indukce genů v oblasti dávek 2-50 cGy (Amundson). Byla prokázána indukce celé řady genů,



Obr. 212 Dávkové závislosti indukce některých genů po ozáření. Je vidět, že i dávky pod 10 cGy silně indukují expresi MDM2 a ATF3.

včetně genů CDKN1A, GADD45, MDM2, ATF3 a BAX, které byly detailněji studovány (obr. 211, 212). Indukce v oblasti nízkých dávek měla poněkud jinou kinetiku ve srovnání s vysokými dávkami záření. Dávková závislost vykazovala v některých případech linearitu, jindy konkávní závislost, někdy i s lokálním maximem v oblasti dávek kolem 0.5 Gy.

Současné pokroky v chápání molekulárních událostí, které následují po ozáření buněk a vedou k poškození DNA, reparaci, apoptóze a zpoždění buněčného cyklu, mohou znamenat nové cesty pro usměrnění účinků záření. Nabízejí se možnosti zvýšení citlivosti k ionizujícímu záření - např. inaktivací genu RAS nebo jiných genů odpovědných za

rozpoznávání poškození DNA a jejich reparaci. Jestliže se při léčbě zhoubných nemocí zářením uplatňuje apoptóza, lze uvažovat o její podpoře. Naopak, ve zdravé tkáni je nutno apoptózu potlačit. Toho lze docílit např. blokováním některých genů, jako je např. růstový faktor TGF β . Podobně, zpoždění buněčného cyklu v G2-fázi lze eliminovat a tím rovněž zvýšit citlivost buněk, zejména v liniích s mutovaným p53 proteinem, které ztratily kontrolu přechodu G1/S (tzv. G1-checkpoint).

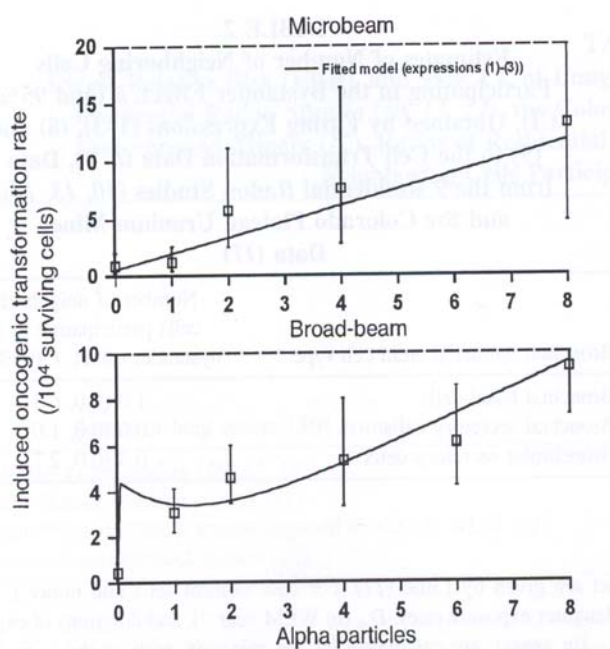
V této oblasti bylo zatím publikováno poměrně málo prací; oblast je však velmi perspektivní, zejména z hlediska pochopení mechanismů a možného ovlivnění účinků záření.

15.2. Nově objevené účinky záření

15.2.1 Záření poškozuje také přímo nezasažené buňky (bystander efekt)

Dlouhou dobu se v radiobiologii považovalo za platné tvrzení, že genetické účinky záření vyžadují, aby byla molekula DNA zasažena zářením nebo radikálem, který záření vytvořilo. V současné době se však již nahromadily experimentální výsledky v dostatečné míře na to, aby bylo možné učinit závěr, že při ozáření buněk částicemi jsou poškozeny také ty buňky, které nejsou přímo zasaženy. Tento jev se nazývá „bystander effect“ (BE) a lze jej nejlépe demonstrovat v experimentech s α -zářením, kde se ukazuje, že zářením jsou postiženy také buňky, přes které neprošla částice.

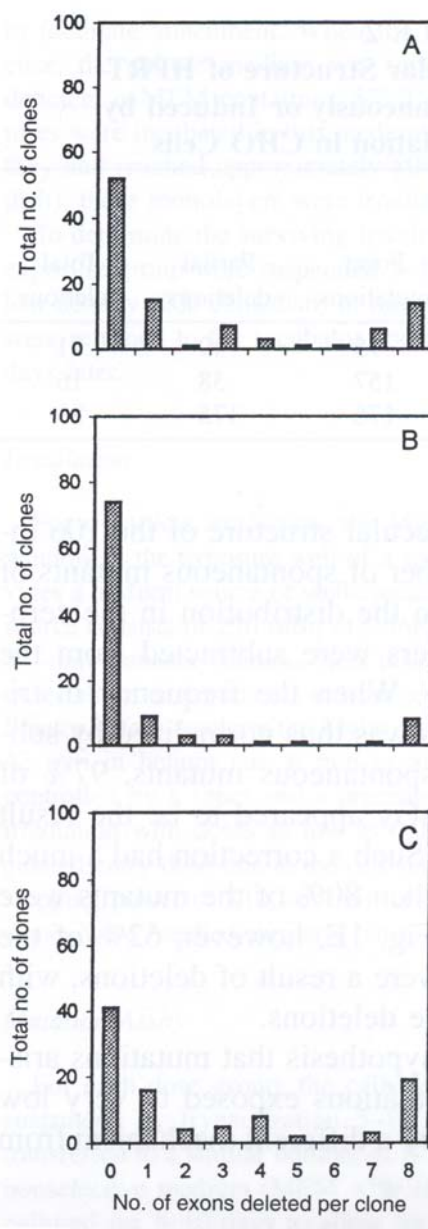
BE byl pozorován pro různé účinky záření: letální účinky, chromosomové aberace, mutace, genetickou nestabilitu a genovou expresi, a také pro transformaci buněk (Sawant et al., 2001). Pro výzkum BE byl s výhodou použit mikrosvazek záření. Při ozáření 10% buněk ionty hélia (8 částicemi) pozorovali autoři stejnou frekvenci transformovaných buněk jako při rovnoměrném ozáření celé populace stejnou průměrnou fluencí (obr. 213). Spektrum mutací pro BE buňky je jiné, nežli podobné spektrum pro přímo zasažené buňky (obr. 214). To naznačuje, že také mechanismy mohou být v obou případech odlišné.



Obr. 213 Bystander efekt. Závislost počtu transformovaných buněk na fluenci při ozáření 10% buněk mikrosvazkem nebo při rovnoměrném ozáření celé populace.

BE lze zkoumat v podstatě 3 metodami: (i) ozáření buněk nízkými dávkami záření (tak, aby velká část buněk nebyla přímo zasažena), (ii) ozáření vybraných buněk mikrosvazkem a (iii) působení na buňky médiem z ozářené kultury. Zkoumání mechanismu BE ukázalo, že pro vznik BE je důležitá komunikace mezi buňkami – při použití látek, jež rozrušují komunikační kanálky, dochází k vymizení BE. Existují tedy přinejmenším dva typy přenosu signálu pro BE – přes komunikační kanálky a přes medium. Zdá se, že bylo vyjasněno, jaký je vztah mezi BE a genetickou nestabilitou (GN). V experimentech Lynga se ukázalo, že apoptóza může být indukovaná nejenom médiem z ozářených buněk, ale také médiem z potomstva těchto ozářených buněk, ve kterých docházelo ke GN. Znamená to, že mechanismus BE je shodný s mechanismem GN a přenos signálu pro BE mezi buňkami je shodný s přenosem signálu do dalších generací jednou ozářené buňky.

BE znamená, že riziko odhadnuté na základě extrapolace z oblastí vysokých dávek směrem k velmi nízkým dávkám může být velmi podhodnoceno. Pro záření s nízkým LET, BE nejvíce přispívá k účinkům záření při velmi nízkých dávkách (pod 0.1 Gy), pro vysoké LET nelze závislost na dávce definovat, protože už průchod jediné částice vyvolává plný efekt. Byly učiněny odhady BE pro plicní buňky ozářené inhalací dceřiných produktů radonu. Autoři došli k závěru, že poměr mezi frekvencemi indukovaných zhoubných onemocnění plic pro obyvatele domů se zvýšenou koncentrací radonu (nízké dávky) a horníky z uranových dolů (vysoké dávky), který činí 2.4-4, odpovídá téměř nulovému BE, tj. minimálnímu počtu buněk v okolí každé buňky zasažené α -částicí. Skutečnost, že se BE u nádorů plic vzniklých při inhalaci radonu neuplatňuje, lze možná přičíst na vrub tomu, že při prolongovaném ozařování částicemi s vysokým LET se ionizující záření uplatňuje jako iniciační i jako promoční faktor.



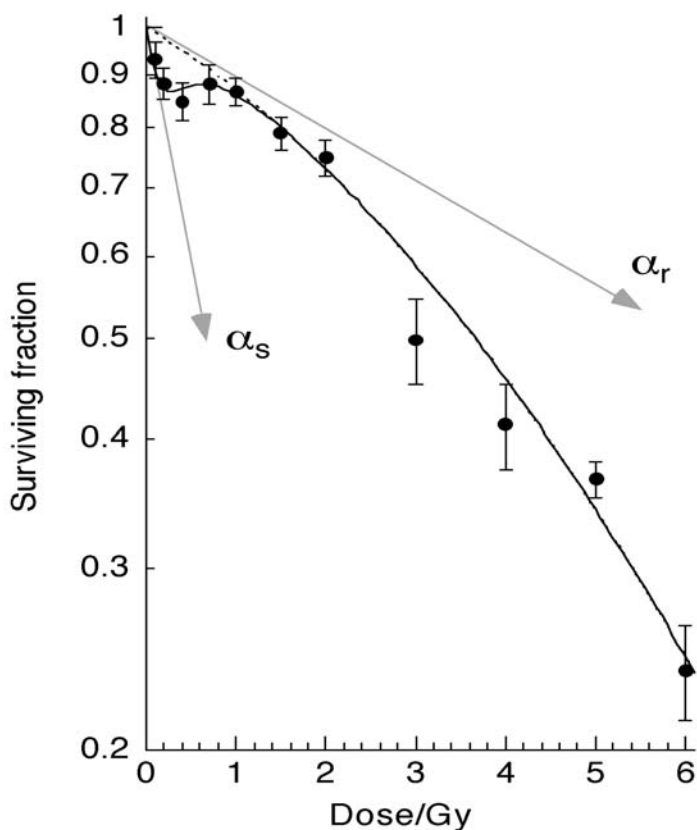
Obr. 214 Spektrum mutací v exonech HPRT genu se liší pro bystander buňky (B) a přímo zasažené buňky (C). Spektrum pro spontánní mutace je na obrázku (A) a liší se od obou předchozích spekter. To naznačuje, že také mechanismy mohou být odlišné.

„Bystander efekt“ byl potvrzen v mnoha pracích, mechanismus není znám; předpokládá se přenos reaktivních kyslíkových nebo dusíkových radikálů. BE souvisí s GN a možná má stejnou příčinu. BE má velký význam z praktického hlediska, neboť vede k nelinearitě závislosti na dávce a v důsledku BE mohou být současné odhady radiálního rizika podceněny.

15.2.2. Nelinearita křivky přežití v oblasti velmi malých dávek záření a adaptivní reakce buňky na ozáření

V posledním desetiletí byly vyvinuty přesné metody měření klonogenního přežití buněk po ozáření v oblasti velmi nízkých dávek záření. Jednotlivé buňky jsou po ozáření rozděleny do vhodných komůrek nebo do gelu a poté je sledována každá buňka zvlášť. Takto se zpracuje dostatečně velký počet buněk tak, aby bylo možné statisticky vyhodnotit jejich přežití. V poslední době se začaly používat také počítačem řízené mikroskopy, umožňující opakované snímání a porovnávání obrazu v potřebných intervalech po ozáření. Příklad křivky přežití získané těmito moderními prostředky je uveden na obr. 215.

Pro X-záření je na křivce přežití patrná oblast zvýšené citlivosti (hypersensitivity, HS) pro dávky zhruba do 0.2 Gy. HS byla naměřena pro řadu buněčných typů). Úsilí o vyjasnění mechanismu HS v oblasti malých dávek záření vedlo ke snahám modifikovat křivku přežití použitím různých druhů záření, použitím chemických modifikátorů (zejména inhibitorů reparačních enzymů) a přítomností mezibuněčných kontaktů (ozařování v mikrokolo-



Obr.215 Křivka přežití v oblasti velmi nízkých dávek záření pro X-záření. Pro dávky pod 20 cGy je patrná oblast hypersensitivity.

niích). Výsledky ukázaly, že látky, které ovlivňují reparaci (např. 3-aminobenzamid), mohou zmenšit nárůst rezistence v oblasti 0.2-1 Gy. Autoři tyto výsledky interpretují tak, že nárůst rezistence na křivce přežití (viz obr. 215) je způsoben indukci reparace (nikoli hypersensitivní subpopulací buněk). To by vysvětlovalo také dlouhou dobu známý jev adaptivní reakce buňky

na ozáření, při kterém buňky vykazovaly snížený cytogenetický účinek záření po předběžném ozáření malou dávkou. Tento jev se rovněž interpretuje jako indukce reparačního mechanismu.

Z hlediska radioterapie je zajímavé zjištění, že při frakcionovaném ozařování s intervalem 8 h, docházelo k opakování HS oblasti na křivce přežití a aplikace 3x0,4 Gy za den bylo účinnější než aplikace 1,2 Gy denně po dobu 5 dnů. Byl zkoumán také vztah HS k BE tím, že byly srovnávány buněčné linie s výrazným/nevýrazným BE a výraznou/nevýraznou HS. Bylo zjištěno, že buňky s výrazným BE nevykazovaly HS, a naopak. Možné vysvětlení je, že signál indukovaný v buňkách při velmi malých dávkách, jenž vede k letálnímu efektu (HS), zůstane uvnitř buňky, a proto je tak účinný. Jestliže jej buňka propustí ven, její citlivost se zmenší, ale poškodí se buňky v okolí.

Hypersensitivita v oblasti malých dávek záření znamená silnou nelinearitu na křivce přežití a následně může znamenat také nelinearitu jiných účinek záření, jako je transformace, mutagenese, GN apod. To se dá očekávat zejména s ohledem na předpokládaný mechanismus HS, kterým je indukce reparačních procesů.

15.2.3. Vznik chromosomových aberací po ozáření neodpovídá molekulárním hmotnostem chromosomů

Značná pozornost byla věnována vztahu mezi strukturou chromatinu vyššího řádu a vznikem aberací. Byly provedeny experimenty na lymfocytech ozářených neutrony a γ -zářením. V těchto experimentech byly sledovány výměnné aberace ve velkých skupinách chromosomů. Paralelně byly hledány strukturální charakteristiky, které by korelovaly s četností výměnných aberací.

Indukce výměnných aberací hustě ionizujícím zářením

Bylo prokázáno, že výměnné aberace v lymfocytech ozářených rychlými neutrony vznikají s velmi vysokou frekvencí jen mezi specifickými chromosomy. Detekce výměnných aberací mezi 10 vybranými chromosomy lidských lymfocytů ozařovaných třemi dávkami rychlých neutronů s průměrnou energií 7MeV byla prováděna pomocí opakované duální FISH techniky. Při každé hybridizaci byly hodnoceny rozdílné páry chromosomů. Definované pozice metafázních chromosomů byly uloženy na hard disk a automaticky nahrávány po každé ze šesti úspěšných rehybridizací. Touto cestou bylo získáno šest rozdílných obrazů stejných metafázních chromosomů. Srovnávání těchto obrazů umožnilo identifikovat výměny pro chromosomy HSA 1, 2, 3, 4, 8, 9, 12, 14, 18 a 22. Frekvence těchto výměn nevykazovala žádnou korelaci s molekulární hmotností interagujících chromosomů. Nejvýznamnější byly výměnné aberace mezi chromosomy HSA 14/18, 9/22, 14/8, 18/8, 8/3, 1/14, 1/8, 3/8, a 3/14. Tyto výsledky jasně ukazují, že výměnné aberace postihují stejné chromosomy, které podléhají translokacím u často se vyskytujících forem lymfomů a leukémií. Vysoká frekvence

výměnných aberací souvisí s prostorovou blízkostí chromosomů v jádře. To je pravděpodobně jeden z hlavních důvodů vzniku specifických translokací vedoucích k maligní transformaci buněk.

Tabulka 13. Počet výměn mezi páry chromosomů ve vybrané skupině (N_{ij}^{10}) a počet těchto výměn počítaných podle modelu lineární úměrnosti ($N_{ij}^{10,th}$) pro vybrané dvojice chromosomů

Dvojice Chromosomů	0.5 Gy			1 Gy			1.5 Gy		
	N_{ij}^{10}	$N_{ij}^{10,th}$	p	N_{ij}^{10}	$N_{ij}^{10,th}$	p	N_{ij}^{10}	$N_{ij}^{10,th}$	P
1/8	4	0.43	$<10^{-4}$	6	1.01	$<10^{-4}$	9	2.01	$<10^{-4}$
1/14	2	0.34	$<10^{-2}$	4	0.69	$<10^{-3}$	11	1.58	$<10^{-6}$
3/8	2	0.35	$<10^{-2}$	2	0.82	-	12	1.62	$<10^{-6}$
3/14	1	0.25	-	4	0.58	$<10^{-3}$	5	1.15	$<10^{-3}$
3/18	1	0.19	-	1	0.45	-	4	0.89	$<10^{-2}$
4/12	1	0.29	-	1	0.69	-	6	1.38	$<10^{-3}$
8/14	2	0.18	$<10^{-2}$	5	0.42	$<10^{-5}$	8	0.84	$<10^{-6}$
8/18	1	0.14	-	2	0.33	$<10^{-2}$	7	0.65	$<10^{-6}$
9/22	0	0.11	-	4	0.24	$<10^{-4}$	6	0.55	$<10^{-6}$
14/18	5	0.11	$<10^{-6}$	5	0.25	$<10^{-6}$	16	0.51	$<10^{-6}$

p - statistická významnost rozdílů.

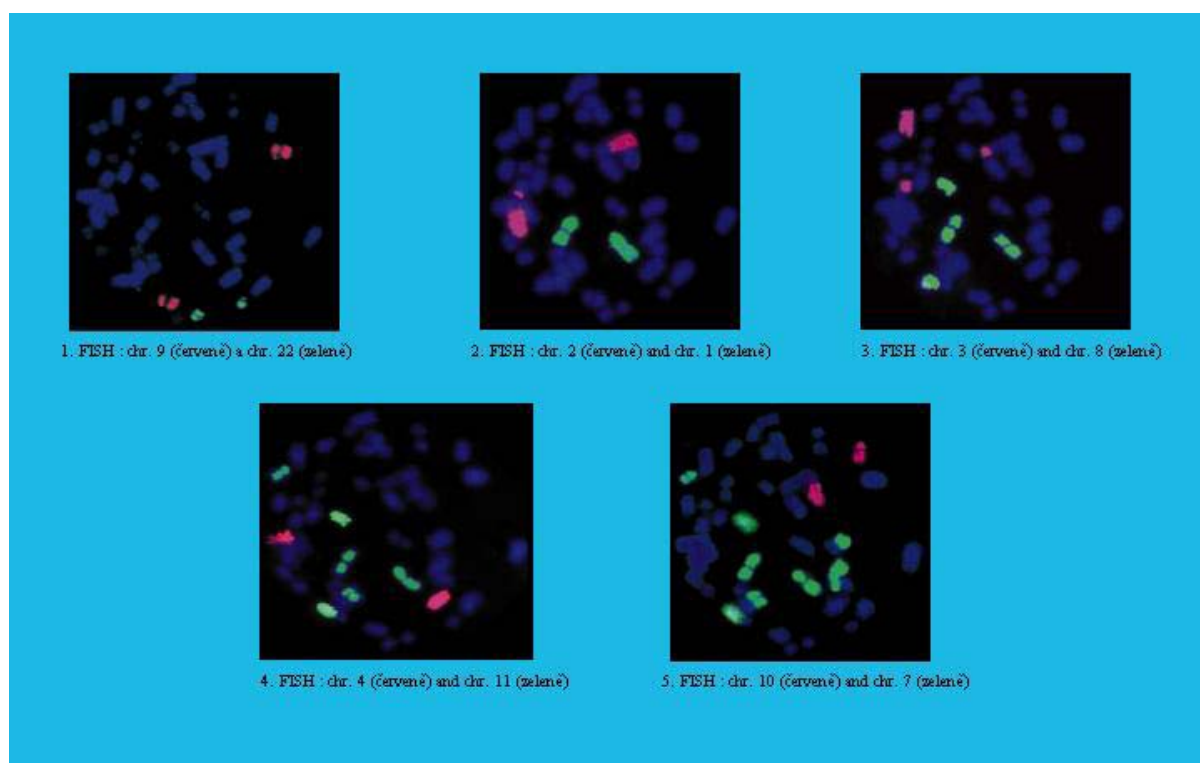
Byly porovnány frekvence indukovaných aberací zjištěné experimentálně (při opakovaných hybridizacích metafázních buněk lidských lymfocytů ozářených neutrony) s hodnotami vypočtenými podle lineárního modelu (modelu, ve kterém se předpokládá proporcionalita mezi molekulární hmotností a pravděpodobností indukce aberace). Po ozáření dávkou 1.5 Gy byl pozorován pro HSA 8, 14, 18 a 22 mnohem větší počet výměnných aberací, než je teoretická předpověď počítaná podle molekulární hmotnosti chromosomů. Také po ozáření menší dávkou neutronů byl pozorován větší počet aberací pro chromosomy HSA 14 a 22, než je teoretická předpověď. Statisticky významné nebyly rozdíly mezi teoretickou a experimentální hodnotou výměnných aberací pro chromosomy HSA 8 a 18 po ozáření menší dávkou neutronů.

Nejvýznamnější výsledky jsou shrnuty v tab. 13. Nejvyšší frekvence výměnných aberací byla pozorována pro chromosomy HSA 14 a 18 po dávce 1.5 Gy ($f_{14,18}=0.036\pm 0.009$).

Teoretická předpověď pro tyto chromosomy činí ($f_{14,18}^{\text{th}}=0.0012$). Po dávce 1.5 Gy je frekvence výměnných aberací pro další páry chromosomů, jež jsou uvedeny v tabulce 13 (1/8, 1/14, 3/8, 3/14, 3/18, 4/12, 8/14, 8/18, 9/22), rovněž významně vyšší. Vzhledem k nízkému počtu pozorovaných aberací nebylo možné prokázat statistickou významnost frekvence výměn pro dvojice chromosomů 3/8, 3/18 a 4/12. Na druhé straně jsme, v rozporu s očekáváním, nepozorovali žádné výměnné aberace mezi některými většími chromosomy (např. 3/4, 3/2, 4/2).

Indukce výměnných aberací řídce ionizujícím zářením

Výsledky, podobné jako v předchozí kapitole, byly získány pro γ -záření. Sada zkoumaných chromosomů zahrnovala 11 chromosomů (HSA 1, 2-4, 7-11, 21 a 22); opakovaná hybridizace byla prováděna podobným způsobem jako v předchozích experimentech (obr. 216). Závěry z této práce potvrdily v zásadě předchozí výsledky. Bylo zjištěno, že nejvíce výměnných aberací vzniká pro ty dvojice chromosomů, které nacházíme často translokované u zhoubných onemocnění krvinek. Tak např. zvýšený počet výměn byl nalezen u HSA 3 a 21, HSA 4 a 11, HSA 22 a 9, HSA 22 a 21. Translokace t(3;21) nacházíme u CML, t(4;11) u pre-B-ALL nebo ALL, t(22;9) u CML a ALL a t(22;21) u Ewingova sarcomu. Na rozdíl od neutronů nebyl však vliv struktury na vznik výměnných aberací u řídce ionizujícího záření tak výrazný - četnosti vzniku aberací byly mnohem blíže k očekáváním, jež jsme vypočítali podle hmotnosti jednotlivých chromosomů. Tento jev lze přičíst na vrub odlišnému prostorovému rozložení zlomů vyvolaných řídce a hustě ionizujícím zářením. Při průchodu sekundární částice odražené neutrony rozhraním mezi dvěma chromosomy mohou s poměrně velkou pravděpodobností vzniknout zlomy na obou teritoriích a vzápětí interagovat za vzniku výměnné aberace. V případě řídce ionizujícího záření jsou zlomy rozloženy v prostoru náhodně a musí čekat mnohem delší dobu na svého "partnera", aby mohlo k interakci dojít.



Obr. 216. Opakovaná hybridizace téže mitózy lidského lymfocytu ozářeného dávkou 3Gy γ -záření. Lze pozorovat dicentrickou aberaci mezi chromosomem 2 a 3 (2.a 3. hybridizace); translokaci mezi chromosomem 7 a neidentifikovaným chromosomem.

FISH technika je velmi vhodným prostředkem pro studium vzniku aberací po ozáření. Ukazuje, že některé dvojice chromosomů mohou tvořit výměnné aberace s vyšší četností, než se dá čekat z jejich molekulární hmotnosti. Jsou to právě ty dvojice, jež se často vyskytují také u zhoubných onemocnění.

15.3. Příspěvek nových výsledků k řešení starých problémů

15.3.1. Genetická nestabilita - příčina nebo průvodní jev zhoubných nádorových onemocnění?

Genetická nestabilita genomu (GN) je dlouho diskutovaným jevem, kterému mnozí autoři přikládají velký význam v onkogenezi. Proto se tímto jevem budeme blíže zabývat.

Normální buňka má k dispozici systém pro udržení stability, tj. pro zajištění přesné duplikace genetického materiálu a jeho rozdělení do dceřiných buněk. Tento systém zahrnuje několik set genů. U zhoubných onemocnění se pozorují změny v primární struktuře genomu; obvykle tím více, čím agresivnější je nádor. Často se pozoruje tzv. aneuploidie, tj. odlišný počet chromosomů. Tyto skutečnosti odpovídají "teorii somatických mutací", jež byla navržena německým embryologem Boverim již v roce 1914. GN může být způsobena defekty v celé řadě genů. Tyto defekty můžeme pozorovat např. jako chromosomové aberace.

Vznik zhoubných onemocnění lze popsat na základě GN zhruba takto: 1) Dojde k iniciaci v jedné buňce, která se částečně vymkne růstové kontrole a stane se geneticky nestabilní. 2) V expandující populaci buněk dochází ke genetickým změnám, které jsou většinou eliminovány (vzhledem k metabolickým nevýhodám, které znamená vyřazení určitých genů), avšak s určitou frekvencí mohou vzniknout mutace s dodatečnou výhodou pro růst a šíření nádorové populace. 3) Proběhne postupná, evoluční selekce klonů buněk, které jsou více a více abnormální jak geneticky, tak biologicky, až nakonec nádor svého hostitele usmrtí. GN zvyšuje přizpůsobivost buněk a vysvětluje tak celou řadu jevů, jako je invaze maligních buněk do cizí tkáně, adaptace novým podmínkám v této tkáni, vytváření si krevního zásobení v nádoru, klamání imunitního systému apod. GN vysvětluje také mnohotvárnost nádorových onemocnění a vznik rezistence k chemoterapii.

Ionizující záření indukuje genetickou nestabilitu (přehled viz Morgan 1996), a to jak záření s nízkým lineárním přenosem energie (LPE), tak s vysokým LPE (α -částice). GN se pozoruje po několika generacích od ozáření, kdy se fixuje poškození tzv. mutatorového genu. Zastánci mechanismu radiační onkogeneze, který je založený na GN, tedy předpokládají, že onkogeneze spočívá v indukci mutace (v mutatorovém genu), která vede k mutačnímu fenotypu buňky (Hall 2001). To vysvětluje také vysokou četnost indukce transformovaných buněk po ozáření, která je daleko vyšší, než by odpovídalo četnosti indukce mutace v jednom lokusu jako iniciační události.

Teorie GN, jako základní fenomén onkogeneze, má však svá slabá místa, zejména při vysvětlení iniciace zhoubného onemocnění. U řady zhoubných onemocnění je v současné době známa genetická změna, která je příčinou vzniku nádoru a může se často vyskytovat u pacienta jako jediná genetická změna - např. translokace genů ABL/BCR u chronické myeloidní leukémie (CML). To je silným argumentem ve prospěch tvrzení, že iniciační událost zde musela být specifickou genetickou změnou. Podpurná fáze (angl. promotion) pak nevyžadovala další změny genomu. U CML se také vyvíjí GN v průběhu onemocnění a vznikají sekundární aberace, ale tento proces je poměrně pomalý (několik let). Logickým vysvětlením je tedy to, že prvotní genetická změna je příčinou GN. Jestliže by byla GN prvotní, dalo by se čekat, že v maligní populaci buněk budou přítomny další genetické změny - ať už mající pozitivní efekt z hlediska proliferace nebo indiferentní. Jak se zdá, toto pozorování je v rozporu s teorií radiační onkogeneze jako důsledku GN. Kromě toho byly translokace ABL/BCR nalezeny v buňkách bezprostředně po ozáření (Ito et al., 1995).

V poslední době byla GN pozorována také v buňkách jako důsledek BE (Seymour and Mothersill, 1997, Watson et al., 2000, viz také kapitola o BE). Jako příčinu BE i GN se nejčastěji zmiňují reaktivní kyslíkové nebo dusíkové radikály (přesněji „reactive oxygen or nitrogen species“).

GN je mnoha autory považována za prvotní příčinu zhoubných onemocnění, a to jak po ozáření, tak obecně. Zdá se však, že tento závěr nemusí být - vzhledem k uniformitě maligních klonů v některých případech - pravdivý. Spíše se nabízí vysvětlení, že iniciace je událost ve specifickém lokusu, což ovšem nevylučuje celou řadu takových událostí v ozářené populaci, které se však neuplatní. In vitro vzniká zřejmě GN ve velké části populace porušením některého z genů mutatorového typu.

15.3.2. Individuální radiosensitivita

Existuje několik studií, ze kterých lze usuzovat na možnost stanovení individuální sensitivity k ozáření. To by samozřejmě mělo význam pro radiační ochranu.

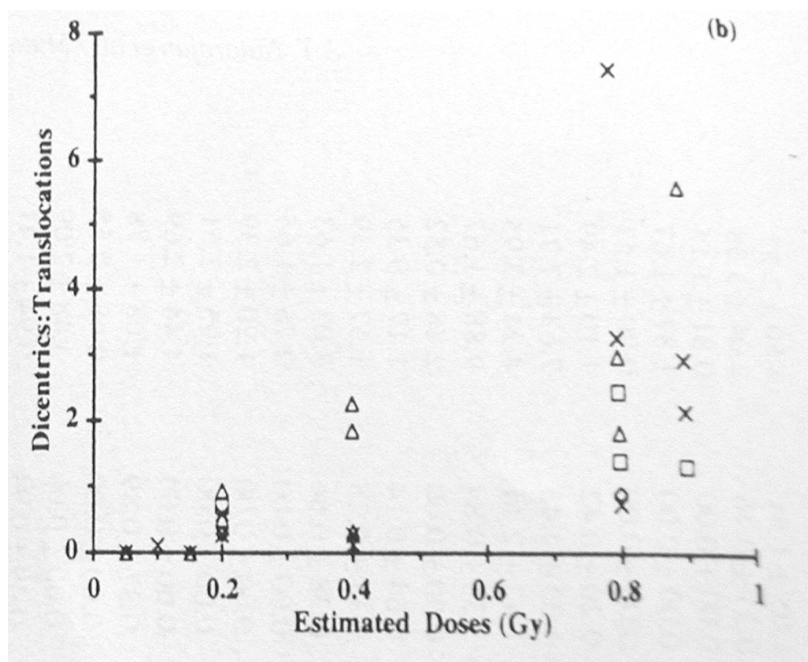
Bylo zjištěno, že citlivost chromosomů k indukci aberací je větší pro řadu případů osob, u kterých je také zvýšená pravděpodobnost onkogeneze; kromě toho mohou mít vyšší výskyt aberací v periferní krvi také pacienti se solidními nádory. Navržený mechanismus spočívá v poškození kritických genů (např. genů odpovědných za reparaci). Problémem zde zůstává otázka rozptylu měření – např. pro pacienty se zhoubným onemocněním je střední hodnota výskytu aberací podstatně vyšší než u zdravé populace, nicméně rozptyl je tak velký, že u konkrétního člověka nelze říci, ke které skupině patří. Zkoumání tohoto rozptylu pro metodu počítání mikrojader a počítání aberací v metafázi ukázalo, že intraindividuální variabilita (opakované měření u stejného člověka) je podobná jako interindividuální (měření u různých jedinců). Bylo proto doporučeno činit závěry až po opakovaném stanovení těchto veličin u téhož člověka. Individuální radiosensitivita by se mohla stát důležitým vodítkem pro výběr zaměstnanců pro práci se zářením. Je však nutné dopracovat metody detekce sensitivních jedinců.

15.3.4. Biologická dosimetrie

Za relativně nejlepší metodu pro biologickou dosimetrii je považována metoda analýzy dicentriků užitím fluorescenčního +Giemsa barvení (FPG) tak, aby se detekovaly pouze první mitózy. Mnoho pokusů bylo učiněno s FISH technikou (fluorescenční in situ hybridizace), která umožňuje detekovat translokace (viz obr.16), tj. aberace, které jsou daleko stabilnější než dicentriky, a to by FISH techniku předurčovalo k detekci ozáření v minulosti. Bohužel, výsledky epidemiologických studií ukázaly na řadu problémů, spojených s takovým měřením (např. možnost vzniku a pomnožení klonů nesoucích aberaci, které mohou vést k nesprávným odhadům, viz obr. 217).

Moderní, vysoce průchodné technologie umožňující screening exprese velkého počtu genů vedly k návrhu nového systému pro biologickou dosimetrii – cílem bylo definovat systém genů, podle jejichž exprese by se stanovila dávka (celotělová) a doba ozáření. Autoři zjistili, že nejsilnější byla odpověď genu DDB2, který kóduje p48 podjednotku XPE proteinu odpovědného za UV sensitivitu. Indukce DDB2 a CDKN1A je lineární s dávkou v rozsahu 0,2-2 Gy při měření 24 a 48 h po ozáření. Naopak pro 72 h vykazovaly dávkové závislosti silné nelinearity s lokálním maximem kolem 0.5 Gy.

Biologická dosimetrie je obohacena dalšími technikami; jejich použití však není standardizováno a má řadu úskalí. Proto je využití těchto technik v praxi zatím velmi omezeno.



Obr. 217 Poměr mezi počtem dicentriků určených standardní metodou biologické dosimetrie a počtem translokací detekovaných delší dobu po ozáření v závislosti na dávce záření pro osoby ozářené při radiční nehodě. Je zřejmé, že obě metody si příliš neodpovídají.

15.3.5. Pravděpodobný mechanismus (radiční) onkogeneze

Vznik zhoubných onemocnění (onkogeneze) je vícestupňový proces, který se uskutečňuje na buněčné úrovni a jehož základem je změna DNA kódu (genetická změna). Jednotlivý stupeň představuje: (i) změnu uvnitř jednotlivé buňky a (ii) následný vznik klonu změněných buněk, který je terčem pro další stupeň procesu. Nelze vyloučit, že některé stupně onkogeneze jsou však způsobeny změnou exprese genu(ů) bez genetické změny (tzv. epigenetický mechanismus onkogeneze). Jednotlivé stupně onkogeneze nejsou přesně známy; naše znalosti se však v poslední době enormně rozšířily a jejich objem narůstá doslova každým dnem.

Jednou z etap, která významně přispěla k pochopení onkogeneze, bylo období identifikace onkogenů a tumor-supresorových genů (viz např. Rabbitts 1994). Mechanismus působení onkogenů může být různý: mohou přispívat ke vstupu buněk do buněčného cyklu, inhibovat apoptózu (programovanou buněčnou smrt) nebo měnit povrchové vlastnosti buněk a přispívat tak ke vzniku metastáz. Tumor-supresorové geny naopak blokují cestu ke vzniku zhoubných onemocnění, např. tím, že navodí apoptózu buňky při vážném poškození genomu. Ukázalo se, že aktivace onkogenů nebo inaktivace tumor-supresorového genu může vést ke vzniku zhoubného nádoru. Tyto změny jsou následkem poškození genomu, které lze v některých případech pozorovat cytogenetickými metodami, zejména jako delece,

translokace nebo inverse. Delece je typickým příkladem genetické změny, která může vést k vyřazení tumor-supresorového genu z funkce. Naopak translokace a inverse se uplatňují při aktivaci onkogenů. Aktivace se uskutečňuje tak, že daný onkogen (nebo jeho část) se v důsledku genetické změny ocitne v blízkosti jiných genetických elementů, ať už na stejném nebo jiném chromosomu, které způsobují jeho intenzivní expresi. Existuje celá řada příkladů: aktivace c-MYC genu u Burkittova lymfomu přenesením do blízkosti IGH genu (IGH je intenzivně transkribován, neboť zabezpečuje imunitní odpověď buněk); c-ABL gen se aktivuje u CML po t(9;22) translokaci; BCL2 gen se rovněž aktivuje přenesením do blízkosti IGH atd.

Je zřejmé, že vícestupňový charakter onkogeneze souvisí právě s překonáním vícenásobných bariér, kterými se organismus jistí proti jejímu vzniku. Poškození tumor-supresorových genů nebo aktivace onkogenů jsou v tomto procesu nejdůležitější. Nepřímým potvrzením hypotézy o rozhodující roli genetických poškození při vzniku zhoubných onemocnění je korelace mezi mutageny a kancerogeny. Rozsáhlými testy bylo ověřeno, že látky, které působí mutagenně, tj. poškozují DNA buněk, jsou také účinnými kancerogeny a naopak. Onkogeneze zahrnuje kromě genetických změn také pomnožení jednotlivých buněčných populací, které v důsledku genetických změn mohou měnit své vlastnosti (rychlost dělení, povrchové vlastnosti, způsob růstu apod). Jednou z nejdůležitějších změn, které jsou pozorovány, je genetická nestabilita nádorových populací. Dochází v nich s vysokou četností k dalším genetickým změnám, které již nevyžadují působení kancerogenů. Z toho plyne, že řada vnějších faktorů může ovlivnit tyto procesy.

Klasicky se rozlišují následující fáze onkogeneze: iniciace, podpůrná fáze a progresse. Pojmy iniciace a podpůrná fáze byly zavedeny na základě výsledků experimentů, ve kterých působení jednoho agens (např. záření) bylo nedostatečné při určitých dávkách pro vyvolání nádoru, zatímco v kombinaci s dalším agens (které samostatně nádor nevyvolávalo) vedlo k měřitelné úrovni onkogeneze. Synergické působení záření jako iniciačního agens a specifického promočního činidla bylo zjištěno pro řadu různých buněčných systémů a tkání. Další výzkumy však ukázaly, že některá promoční činidla také vyvolávají poškození DNA, zejména prostřednictvím indukce volných radikálů, a také chromosomové aberace. Zdá se tedy, že procesy iniciace a podpůrná fáze nelze vždy přesně oddělit, a že celý proces onkogeneze je tím více spojen s kumulací poškození DNA. Tomu odpovídá také skutečnost, že záření a také některé chemické kancerogeny jsou účinné také v jedné dávce, jestliže je dostatečně vysoká nebo při opakované aplikaci, a mohou tedy "zastoupit" promoční činidlo. Na druhé straně, iniciace vždy nestačí na vyvolání zhoubného onemocnění, neboť existují

látky, které mohou potlačit maligní fenotyp buňky, která je geneticky již změněná (např. retinová kyselina u akutní promyelocytické leukémie).

Pod pojmem progresse se obvykle myslí nabytí agresivity (malignity) u již existujícího nádoru v důsledku genetické nestability; mezní formou progresse je konverze benigního charakteru nádoru na maligní. O záření je známo, že může přispět k progresi nádoru (urychlit jeho vývoj). Uvedené dělení vývojových stupňů onkogeneze nemá obecnou platnost a přesné vymezení. Jednotlivé fáze nelze přiřadit všem druhům zhoubných nádorů.

Málo je známo o úloze tzv epigenetických faktorů v onkogenezi. Těmito faktory se někdy mylně rozumí vlivy prostředí (dieta, životní styl, stresy apod). V odborné literatuře se pod pojmem epigenetické faktory rozumí vymezené jevy, ve kterých je exprese genů ovlivněna dědičně jinak než změnou genomu. Je to (i) metylace DNA, (ii) acetylace histonů, (iii) struktura chromatinu a (iv) lokální kontrola exprese genů. Tyto faktory spolu souvisí a víme, že metylace DNA (deacetylace histonů, kondenzace chromatinu) vede k inaktivaci genů uvnitř změněné oblasti a může vést také k vyřazení tumor-supresorového genu z činnosti a přispět tak ke vzniku zhoubného onemocnění. Charakter metylace genomu se může přenášet z buňky do jejího potomstva při dělení, což umožňuje vznik klonu. Nakupení epigenetických změn s časem se tak jeví možným mechanismem evoluce nádoru. Vzhledem k argumentaci uvedené výše je však zřejmé, že základní příčinou vzniku nádorů je (alespoň v drtivé většině případů) genetická změna, tj aktivace onkogenů nebo inaktivace tumor-supresorových genů. Epigenetické faktory mohou přispět nejspíše ve stádiu podpůrné fáze a progresse.

Období hledání jednotlivých onkogenů a postupné zkoumání mechanismů jejich působení se však stalo minulostí, lze říci minulým stoletím. Biologická revoluce postoupila nevídaným tempem kupředu.

15.4. Perspektivy dalšího výzkumu - technologie nového tisíciletí

S nástupem nového století (a také tisíciletí) bychom očekávali další důležitou etapu; ta skutečně přišla a s nečekaným rozmachem. Bylo dokončeno sekvenování lidského genomu (určení posloupnosti nukleotidů ve všech chromosomech). Byly stanoveny sekvence prakticky všech genů a už v průběhu sekvenace bylo možné dosažené výsledky využít pro hledání nových onkogenů (s překvapením bylo zjištěno, že celkový počet genů je pouze 30-40, 000).

Význam znalosti primární struktury všech genů se však vynořil teprve v okamžiku, kdy přišla na scénu robotika na mikroskopické úrovni, která otevřela cestu k výzkumu

velkého počtu molekul současně. Vznik technologie DNA-čipů nebo „DNA-microarrays“ umožňuje na malém prostoru zkoumat prakticky současně všechny lidské geny, jejich varianty, jejich poškození a funkci. V kostce řečeno, funkce genomu v konkrétní buněčné populaci se touto metodou dá přenést na jedno sklíčko. V čem spočívá metoda DNA-čipů? Populárně vysvětleno se DNA sekvence mnoha genů nanese na jedno sklíčko do matice např. 100x100 bodů, v každém bodě je nanese robotem DNA pouze jednoho genu. Taková sklíčka (DNA čipy) se pak prodávají, takže si je laboratoře mohou koupit. Z buněk se dá izolovat látka, která po nanesení na sklíčko způsobí barevnou reakci v místě každé tečky, a to tím silnější, čím více je exprimovaný (používaný) gen, jehož DNA v daném bodě je. Vyhodnocení sklíčka se provádí skenerem v automatickém režimu a výsledkem je obrovské množství údajů o buňce. Tento soubor může být v určitém smyslu vyčerpávající (úplný) a tvoří tedy profil buňky nebo tkáně ("signature"). Uvedené úspěchy společně s rozvojem proteomiky a bioinformatiky jsou velmi nadějně. Rozbíhají se nové projekty, jako je např. „Cancer Genome Anatomy Project“, které si kladou za cíl identifikovat molekulární podstatu různých zhoubných onemocnění.

Další velmi důležitou technologií jsou vizualizační techniky optické mikroskopie, které rovněž prodělávají prudký vývoj. Ještě jsme nestačili zužitkovat výhody „standardní“ konfokální mikroskopie, když se objevují nečekané cesty ke zvýšení rozlišení pod optickou mez (0.2-0.3 μm), jako je dvoufotonová mikroskopie, spektrální mikroskopie nebo mikroskopie založená na stojaté vlně. Kromě toho, zvyšování výkonu výpočetní techniky vedlo k vývoji nových digitálních přístupů v optické mikroskopii. Na rozdíl od elektronové mikroskopie má optická mikroskopie řadu výhod. Kromě relativně nízké pořizovací ceny je to zejména snadná manipulace s biologickým objektem. Bouřlivý vývoj zaznamenaly metody přípravy biologických vzorků pro pozorování. Pro ilustraci uvedeme tzv. FISH techniku, která umožňuje zviditelnit v jádře buňky jednotlivé geny a chromosomy při prostorovém zachování struktury jádra. V současnosti existují technologie umožňující pozorovat strukturální detaily in vivo - v živé buňce.

Co se dá očekávat v oblasti onkologie? Kromě identifikace poškození genů je očividně důležité vědět, jak tato poškození buňku ovlivňují, tj. které geny se v důsledku poškození „zapínají“ a které „vypínají“. Poznání těchto následných změn by nám pak mohlo umožnit identifikaci místa vhodného pro ovlivnění procesu onkogeneze – navržení léčby. První výsledky ukazují, že změny funkce genů v nádorech jsou velmi široké, tj. velký počet genů mění svou expresi. Tak např. u akutní promyelocytické leukémie vzniká v důsledku translokace PML/RAR α genů a následně působením tzv. fúzního proteinu dochází k aktivaci

genů chromosomu X (Xq28 band), 16 (16q24.1-3), a naopak utlumení genů na q-ramínku chromosomu 22, v okolí centromery chromosomu 17 a na chromosomu 19 (19p13.3-19p13.2). Seznam konkrétních genů je velmi dlouhý. DNA-čipy umožní dále sledovat kinetiku těchto změn a jejich ovlivnění léčebnými prostředky. Mechanismy interakce jednotlivých proteinů jsou předmětem proteomiky. Vizualizační techniky pak mohou přispět vyjasněním prostorových vztahů mezi interagujícími molekulami, které jsou důležité z toho důvodu, že reakce v jádře buňky silně závisí na prostorovém uspořádání.

XVI Další literatura

- Amundson S.A., Do K.T., Fornace A.J 1999, Induction of stress genes by low doses of gamma rays. *Radiat.Res.* **152**, p.225-231.
- Bauchinger M., Schmid E., and Braselman H. 2001, Time-course of translocation and dicentric frequencies in a radiation accident case. *Int. J. Radiat. Biol.* **77**, 553- 557.
- Bauchinger M., Schmid E., Zitzelsbereger H., Braselman H., and Nahrstedt U. 1993 Radiation-induced chromosome aberrations analysed by two-colour fluorescence in situ hybridization with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe. Nomenclatures. *Int. J. Radiat. Biol.* **64**, 179-184.
- Bártová E., Kozubek S., Kozubek M., *et al.* (2000a). The influence of the cell cycle, differentiation and irradiation on the nuclear location of the *abl*, *bcr* and *c-myc* genes in human leukemic cells. *Leukemia Research* **24**: 233-241.
- Bártová, E., Kozubek, S., Jirsová, P., Kozubek, M., Lukášová, E., Skalníková, M., Cafourková, A., Koutná, I., Paseková, R. (2001) Higher-order chromatin structure of human granulocytes. *Chromosoma*, **110**, 360-370.
- Běgusová M. DNA radiolysis. Experimental study and theoretical modelling of the effects of DNA structure and ligands. PhD thesis, Université d'Orléans, 1999.
- Beninson D., Lloyd D.C., Natarajan A.T., Obe G., Preston R.J., and Sasaki M.,1986, Biological Dosimetry: Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment. Technical Reports Series no. **260**, IAEA, Vienna.
- Boudaiffa B., Cloutier P., Hunting D., Huels M.A. and Sanche L. 2000 Resonant formation of DNA strand breaks by extremely low energy electrons. *Science* **287**, p.1658-1660.
- Boudaiffa B., Hunting D. Cloutier P., Huels M.A. Sanche L. Induction of single and double strand breaks in plasmid DNA by 100 to 1500 eV electrons. *Int.J.Radiat.Biol.* **76**, p.1209-1221, 2000b.
- Boveri TH. , 1914 Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren, Jena, Germany.
- Boyle S., Gilchrist S., Bridger J.M., *et al.* (2001). The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 211-219.
- Cafourková A., Lukášová E., Kozubek S., *et al.* (2001). Exchange aberrations induced with gamma-rays among 11 chromosomes of human lymphocytes. *Int.J.Radiat.Biol.*, **77**, 419-429.
- Cheng K.C., Lawrence A.L. 1993 Genomic instability and tumor progression: Mechanistic considerations. *Adv.Cancer.Research* **60**, p.121-156.
- Curtis SB., Luebeck EG, Hazelton WS, Moolgavkar SH. 2001, The role of promotion in carcinogenesis from protracted high-LET exposure. *Physica Medica* **17**, p.157-160.
- el Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer W.E., Kinzler K.W., and Vogelstein B.,1993, WAF1, a potential mediator of p53 tumour suppression. *Cell* **75**, 817-825.
- Hollander M.C., Alamo I., Jackman J., McBride O.W., and Fornace A.J. Jr., 1993, Sequence conservation and DNA damage-responsiveness of the mammalian gadd45 gene. *J. Biol. Chem.*, **268**, 24385-24393.
- Ikushima T., 1987, Chromosomal responses to ionising radiation reminiscent of an adaptive response in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Research* , **180**, 215-221.
- Ito T. 1995, Induction of BCR-ABL fusion genes by in vivo X-irradiation. *Jpn.J.Cancer Res.* **84**, p.105-110.
- Jirsová P., Bártová E., Kozubek S., Kozubek M., Lukášová E., Cafourková A., Koutná I., Skalníková M. Nuclear distribution of the centromeric heterochromatin and the p53 gene of human leukemic cell lines after irradiation. *Radiation Research*, **155**, 311-319, 2001
- Kastan M.B., Zhan Q., el-Deiry W.S., Carrier F., Jacks T., Walsh W.V., Plunkett B.S., Vogelstein B.,and Fornace A.J. Jr., 1992, A mammalian cell cycle checkpoint utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia telangiectasia. *Cell* **71**, 587-597.

- Kellerer A.M. and H. H. Rossi, A generalized formulation of dual radiation action. *Radiat. Res.* **75**, 471–488 (1978).
- Kozubek S., Lukášová E., Rýznar L., *et al.* (1997) Distribution of ABL and BCR genes in cell nuclei of normal and irradiated lymphocytes. *Blood* **89**: 4537-4545.
- Kozubek S., Lukášová E., Rýznar L., *et al.* (1999a) The topological organization of chromosomes 9 and 22 in cell nuclei has a determinative role in the induction of t(9,22) translocations and in the pathogenesis of t(9,22) leukemias. *Chromosoma* **108**: 426-435.
- Kozubek S., Lukášová E., Jirsová P., *et al.* (2002) 3D Structure of the human genome: Order in randomness. *Chromosoma* (in press).
- Lambin P., Marples B., Ferth B., Malaise E.P., Joiner M.C. 1993, Low dose radiation response of human tumour cell lines of different intrinsic radiosensitivity. In B.R. Paliwal, T.J. Kinsella and J.F. Fowler (eds), *Prediction of Response in Radiotherapy: Radiosensitivity and Repopulation* (New York: Institute of Physics), pp. 311-319.
- Little MP, Wakeford R. 2001 Dec. The bystander effect in C3H 10T cells and radon-induced lung cancer: *Radiat Res*; **156**(6):695-9.
- Lucas J.N., Awa A., Straume T., Poggensee M., Kodama Y., Nakano M., Ohtaki K., Weier D., Pinkel and Littlefield G., 1992 Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionising radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **62**, 53-63.
- Lukášová E., Kozubek S., Kozubek M., *et al.* (1999). Chromosomes participating in translocations typical of malignant haemoblastosis are also involved in exchange aberrations induced by fast neutrons. *Radiat. Res.* **151**, p.375-384.
- Lyng FM., Seymour CB. and Mothersill C Initiation of apoptosis in cells exposed to medium from the progeny of irradiated cells: A possible mechanism for bystander-induced genomic instability? *Radiat.Res.*, **157**, p.365-370, 2002
- Marples B. and Joiner M.C. 1993, The response of Chinese hamster V79 cells to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population. *Radiation Research*, **133**, 41-51.
- Marples B. and Joiner M.C. 1995, The elimination of lowdose hypersensitivity in V79-379A cells by pre-treatment with X-rays or hydrogen peroxide. *Radiation Research*, **141**, 160-169.
- Marples B., Joiner M.C. Modifiacation of survival by DNA repair modifiers: a probable explanation for the phenomenon of increased radioresistance. *Int.J.Radiat.Biol.* **76**, p.305-312, 2000
- Marples B., Lambin P., Skov K., and Joiner M.C., 1997, Low dose hyper-sensitivity and increased radioresistance in mammalian cells. *International Journal of Radiation Biology*, **71**, 721-735.
- Miyashita T., Krajewski S., Krajewska M., Wang H.G., Lin H.K., Liebermann D.A., Hoffman B., and Reed J.C., 1994, Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* **9**, 1799-1805.
- Morgan W.F. *et al.*, 1996 Genomic instagility induced by ionizing radiation. *Radiat.Res.* **146**, p.247-258.
- Mothersill C., Seymour C.B. and Joiner M.C. 2002 Relationship between radiation-induced low-dose hypersensitivity and the bystander effect. *Radiat.Res.* **157**, p.526-532.
- Muckerheide J. Low level radiation health effects: Compiling the data. Radiation, Science, and Health, Inc., http://cnts.wpi.edu/rsh/data_docs/execsum98.html.
- Natarajan A.T., Santos S.J., Darroudi F., Hadjidikova V., Vermeulen S., ChatterjeeS., Berg M.V.D., Grigorova M., Sakomoto-Hojo E.T., and Curado M.P. 1998, ¹³⁷Cs-induced chromosome aberrations analyzed by fluorescence *in situ* hybridization: eight years follow up of the Goiania radiation accident victims. *Mutat. Res.* **400**, 299-312.
- Nikiforova M.N., Stringer J.R., Blough R., *et al.* (2000). Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. *Science* **290**: 138-142.
- Nowell P.C. 1976 The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, p.23-28,

- Olivieri G., Bodycote J., and Wolff S. 1984, Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science*, **223**, 594-597.
- Parshad R., Price F.M., Bohr V.A., Cowans K.H., Zujewski J.A., and Sanford K.K. 1996, Deficient DNA repair capacity, a predisposing factor in a breast cancer. *Br. J. Cancer* **74**, 1-5.
- Pawliuk, R. Eaves C. and R. K. Humphries, Evidence of both ontogeny and transplant dose-regulated expansion of hematopoietic stem cells *in vivo*. *Blood* **88**, 2852–2858 (1996).
- Podesta, M. Piaggio, G., Frassoni, F., Pitto, A, Zikos, P., Sessarego, M. Abate, M., Teresa, V.L., Berisso G. and A. Bacigalupo, The assessment of the hematopoietic reservoir after immunosuppressive therapy or bone marrow transplantation in severe aplastic anemia. *Blood* **91**, 1959–1965 (1998).
- Prasad A.V., Mohan N., Chandrasekar B., and Meltz M.L., 1995, Induction of transcription of „immediate early genes“ by low-dose ionizing radiation. *Radiation Research*, **143**, 263-272.
- Pressl S., Romm H., Ganguly B.B., Stephan G., 2000, Experience with FISH-detected translocations as an indicator in retrospective dose reconstruction . *Radiat. Prot. Dosim.* **88**, 45-49.
- Prise K.M., Belyakov O.V., Folkard M., and Michael B.D., 1998, Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam. *Int. J.Rradiat. Biol.* **74**, 793-798.
- Radvoyevitch T. and D. G. Hoel, Biologically-based risk estimation for radiation-induced chronic myeloid leukemia. *Radiat. Environ. Biophys.* **39**, 153–159 (2000).
- Radvoyevitch T., Kozubek S., Sachs R.K., (2001). Biologically based risk estimation for radiation-induced CML. Inferences from BCR and ABL geometric distributions. *Radiat. Environ Biophys.* **40**, 1-9.
- Radvoyevitch T., Kozubek S., Sachs R.K., (2002). The Risk of Chronic Myeloid Leukemia: Can the Dose-Response Curve be U-Shaped? *Radiat. Res.* **157**: 106-109.
- Roberts, A.W., DeLuca, E., Begley, C.G., Basser, R., Grigg A.P. and D. Metcalf, Broad inter-individual variations in circulating progenitor cell numbers induced by granulocyte colony-stimulating factor therapy. *Stem Cells* **13**, 512–516 (1995).
- Roberts S.A., Spreadborough A.R., Bulman B., Barber J.B.P., Evans D.G.R. and Scott D. 1999, Heritability of cellular radiosensitivity: A marker of low-penetrance predisposition genes in a breast cancer? *Am. J.Hum. Genet.* **65**, 784-794.
- Samson L. and Schwartz L.J. 1980, Evidence for an adaptive DNA repair pathway in CHO cells and human skin fibroblasts cell lines. *Nature* (London), **287**, 861-863.
- Sawant SG, Randers-Pehrson G, Geard CR, Brenner DJ, Hall EJ. 2001 Mar. The bystander effect in radiation oncogenesis: I. Transformation in C3H 10T1/2 cells *in vitro* can be initiated in the unirradiated neighbors of irradiated cells. *Radiat Res*; **155** (3):397-401.
- Scott D., Barber J.B.P., Spreadborough A.R., Burill W., and Roberts S.A., 1999, Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: A comparison of two assays. . *Int. J. Radiat. Biol.* **75**, 1-10.
- Selleri, C., Maciejewski, J.P., De Rosa, G., Raiola, A. Risitano, A.M. Picardi, M., Pezzullo, L. Luciano, L., Ricci P. and B. Rotoli, Longlasting decrease of marrow and circulating long-term culture initiating cells after allogeneic bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant.* **23**, 1029–1037 (1999).
- Selvakumaran M., Lin H.-K., Miyashita T., Wang H.G., Krajewski S., Reed J.C., Hoffman B., and Liebermann D.A., 1994, Immediate early upregulation of bax expression by p53 but not TGFβ1: A paradigm for distinct apoptic pathways. *Oncogene*, **9**, 1791-1798.
- Seymour C.B., and Mothersil C., 2000, Relative contribution of bystander and targeted cell killing to the low-dose region of the radiation dose-response curve. *Radiat. Res.* **153**, 508-511.
- Shadley J.D. 1994, Chromosomal adaptive response in human lymphocytes . *Radiation Research*, **138**, S9-12.
- Short S.C., Kelly J., Mayes C.R., Woodcock M., and Joiner M.C., 2001, Low-dose hypersensitivity after fractionated low-dose irradiation *in vitro*. *Int. J. radiat. Biol.*, **77**, 655-664.
- Singh B., Arrand J.E., Joiner M.C. 1994, Hypersensitive response of normal human lung epithelial cells at low radiation doses. *International Journal of Radiation Biology*, **65**, 457-464.

- Terzoudi G.I., Jung T., Ham J., Vrouvas J., Margaritis K., Donta-Bakoymani C., Makropoulos V., Angelakis P.H., and Pantelias G.E. 2000, Increased G2 chromosomal radiosensitivity in cancer patients : The role of cdk1/cyclinB activity level in the mechanism involved. . *Int. J. Radiat. Biol.* **76**, 607-615.
- Thomas A., and White E., 1998, Suppression of the p300-dependent mdm2 negative-feedback loop induces the p53 apoptic function. *Genes Dev.*, **12**, 1975-1985.
- Tucker J.D., Lee D.A. and Moore D.H., 1995, Validation of chromosome painting. II A detailed analysis of aberrations following high doses of ionizing radiation *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol.* **67**, 19-28.
- Tucker J.D., Ramsey M.J., Lee A.D. and Minkler J.L. 1993, Validation of chromosome painting as a biosimulator in human peripheral lymphocytes following acute exposure to ionising radiation *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol.* **64**, 27-37.
- Ward J.F. 1995 Radiation mutagenesis: The initial DNA lesions responsible. *Radiat.Res.* **142**, p.362-368..
- Wolff S. 1992, Fails Memorial Lecture: Is radiation all bad? The search for adaptation. *Radiation Research*, **131**, 117-123.
- Wouters B.G. and Skargard L.D., 1994, The response of a human tumour cell line to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity. *Radiation Research*, **138**, S76-80.
- Wouters B.G. and Skargard L.D., 1997, Low dose radiation sensitivity and induced radioresistance to cell killing in HT-29 cells is distinct from the "adaptive response" and cannot be explained by a subpopulation of sensitive cells. *Radiation Research*, **148**, 435-442.
- Youngblom J.H., Wiencke J.K., and Wolff S. 1989, Inhibition of the adaptive response of human lymphocytes to very low doses of ionising radiation by the protein synthesis inhibitor cycloheximide. *Mutation Research*, **227**, 257-261.
- Zhan Q., Bae I., Fornace A.J. Jr., and Creig R.W., 1997, Induction of Bcl-2 family member Mcl-1 as an early response to DNA damage. *Oncogene*, **14**, 1031-1039.
- Zhan Q., Fan S., Bae I., Guillouf C., Liebermann D.A., O'Connor and Fornace A.J., 1994, Induction of BAX by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene*, **9**, 3743-3751.
- Zhou H, Randers-Pehrson G, Waldren CA, Vannais D, Hall EJ, Hei TK. 2000 Feb, Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **29**;97(5):2099-104