

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Zdravotně sociální fakulta**



**MOLEKULÁRNÍ
RADIOBIOLOGIE**

*doplňkové texty pro posluchače kombinované formy studia
studijního programu „B5345 – Specializace ve zdravotnictví“*

studijního oboru „Radiologický asistent“

doc. RNDr. Miroslav Šíp, DrSc.

ČESKÉ BUDĚJOVICE 2007

Klíčová slova:

Ionizující záření, účinky, radiace, mutace, aberace

1 Úvod do studia radiobiologie

1.1 Historické poznámky, vymezení pojmu radiobiologie, stručný přehled aplikací ionizujícího záření v biologii a v medicíně

1.1.1 Historické poznámky

Vznik radiobiologie jako vědní disciplíny je obvykle dáván do souvislosti s objevem rentgenových paprsků Konradem Roentgenem r. 1895 a objevem přirozené radioaktivity H. Becquerelem o rok později. Neviditelné paprsky pronikaly celou řadou neprůhledných látek a zanechávaly stopy na fotografickém materiálu. Tyto objevy otevřely skutečně nové obzory moderní vědě a v krátké době byly prakticky využity v celé řadě oborů lidské činnosti. Po několika letech od těchto objevů byly objeveny a izolovány radioaktivní izotopy rádia a polonia, které vyzařovaly částice alfa, beta a gama. Ukázalo se, že záření gama je elektromagnetické povahy, zrovna tak jako rentgenové záření.

Je však třeba si uvědomit, že lidé měli zkušenosti s ionizujícím zářením již dávno předtím. Od nepaměti přec svítilo na zemi slunce a lidé věděli, že není radno se jeho paprskům příliš vystavovat, protože mohou způsobit spáleniny na kůži. Všimli si též, že pokožka, která je často slunci vystavována, stárne rychleji než ta, která je před sluncem chráněna. Věděli, že toto souvisí se sluncem, avšak mechanismus jeho působení se podařilo objasnit až mnohem později, kdy se zjistilo, že za pozorované úkony je zodpovědná pouze část slunečního spektra - ultrafialové záření, které s vysokou účinností ionizuje molekuly živé tkáně.

Od počátku našeho století se nesmírně zdokonalila technologie přístrojů využívajících jak rentgenové záření tak gama záření. V posledním desetiletí byly díky rozmachu elektroniky dosaženy pokroky zejména v oblasti detekce záření a numerického zpracování signálu.

Rozvoj radiologie byl urychlen zejména objevem umělých radioizotopů. V současné době jsou k dispozici radioizotopy více než poloviny všech chemických prvků.

Význam paprsků pronikajících do nitra hmoty byl takový, že jejich praktické aplikace zejména v medicíně v radioterapii a v radiodiagnostice a v technice v defektoskopii šly v předstihu před čistě fyzikálním výzkumem rentgenových paprsků a radioaktivity.

1.1.2 **Vymezení pojmu radiobiologie a molekulární radiobiologie**

###

Radiobiologie, jak už sám název složený ze dvou částí napovídá, je disciplína, která je svým obsahem situována na pomezí biologie a fyziky, přesněji řečeno, fyziky záření a k těmto dvěma základním vědám přistupuje navíc chemie.

Z hlediska různorodosti problémů, kterými se zabývá a vzhledem k tomu, že se přímo či nepřímo dotýká prakticky všech oblastí biologie je metodologicky velmi

heterogenní. V obecném smyslu zahrnuje nejrůznější způsoby použití ionizujícího záření v biologii a ve vědách a aplikacích, pro které biologie představuje součást společného teoretického vědního základu, jako je například medicína, průmyslová a lékařská mikrobiologie, rostlinná a živočišná výroba, aplikovaná botanika apod.

Teoretickým základem radiobiologie, který je klíčem k hlubšímu pochopení jeví a umožňuje je jednotným způsobem popsat a klasifikovat, je teorie vzájemného působení záření a živé hmoty, která na mikroskopickém kvantovém základě popisuje jednak samotnou interakci, jednak pochody, k nimž dochází následovně po ozáření.

* Souvislosti mezi radiobiologií, radiofyzikou a radiochemií

Radiobiologie na rozdíl od radiofyziky a radiochemie je specializována na interakci ionizujícího záření s **živou** hmotou. Základní popis interakce platí jak pro živou, tak pro neživou hmotu, avšak *strukturní jedinečnost, schopnost samoregulace, reprodukce a citlivost živé hmoty reagovat na vnější podněty jako ucelený systém a nikoliv jako soubor jednotlivých molekul*, to jsou vlastnosti, které jsou charakteristické pro živé systémy, a proto je radiobiologie musí brát v úvahu.

V poslední době, díky objevům molekulárních systémů na pomezí živé a neživé přírody jakými jsou např. viroidy tvořené pouze molekulou nukleové kyseliny se hranice oddělující živou přírodu od neživých objektů stává méně zřetelnou. Připomeňme si proto podrobněji některé charakteristické znaky života:

Elementární složení

Živá hmota se skládá z biogenních prvků: kyslíku, dusíku, vodíku, uhlíku, fosforu, vápníku, mají-li být jmenovány ty základní. Z nich má každý svou specifickou roli, avšak zásadní význam má uhlík, který díky struktuře své elektronové obálky tvoří základní kámen stavebnice živé hmoty. Jeho čtyři chemické vazby mohou měnit svou geometrii v závislosti na typu hybridizace orbitalů. Tato vlastnost podmiňuje nevyčerpatelnou rozmanitost organických sloučenin a tvoří základ polymerní struktury bílkovin a nukleových kyselin.

Struktura

Živé systémy jsou vysoce uspořádané struktury, které jsou z termodynamického hlediska otevřenými systémy¹, komunikujícími s okolním prostředím. Díky této řízené látkové výměně může uvnitř živých systémů probíhat metabolismus, při kterém jsou živé struktury na základě především genetické informace obsažené v nukleových kyselinách vytvářeny, udržovány a reprodukovány.

Všechny doposud poznané formy života jsou založeny na molekulárních

¹ Entropie živých systémů

Míra uspořádanosti je vyjádřena termodynamickou veličinou entropií S . Když roste S , klesá uspořádanost. Entropie jakéhokoliv uzavřeného systému, tj. systému dokonale izolovaného od okolí, podle třetího termodynamického s časem vzrůstá, to znamená, že se snižuje uspořádanost daného systému. Tomuto čistě fyzikálnímu popisu zdánlivě odporovaly živé systémy, neboť se vyznačují vysokým stupněm uspořádanosti a při jejich růstu entropie zdánlivě klesá, neboť vznikají nové vysoce uspořádané struktury. Korektní teoretický popis přinesla teorie otevřených systémů rozpracovaná Bertalanffyem. Zde se živý systém chápe jako systém prostorově ohraničený avšak nikoliv izolovaný. Může, nebo má-li přežít, musí s okolím vyměňovat hmotu či energii. Pouze přísun energie zvenčí zabezpečí dynamickou rovnováhu mezi spontánní degradací spojenou s růstem entropie a vytvářením uspořádaných struktur vyznačujících se nízkou entropií. Primárním zdrojem energie je sluneční záření, které přes proces fotosyntézy a následně potravní řetězec zásobuje prakticky celou biosféru.

strukturách bílkovin a nukleových kyselin, mají společný genetický kód, tj. způsob zápisu genetické informace do těchto struktur. Na obr. 1 je zobrazena struktura nukleové kyseliny, kde posloupnost dusíkatých bazí, ze kterých se skládá, nese genetickou informaci např. o struktuře bílkoviny, která má být syntetizována.

Systémové vlastnosti včetně schopnosti reprodukce

Biologické pochody mohou probíhat pouze za předpokladu vytvoření určitých podmínek. Živé systémy jsou schopny udržovat optimální podmínky díky složitému systému vazeb, které zprostředkovávají předávání informací o vnějších i vnitřních podmínkách a upravují metabolismus podle okamžité potřeby - udržují homeostázu.

Živý systém je schopen reprodukce na základě genetické informace obsažené v molekulárních strukturách především nukleových kyselin. Předávání genetické informace z pokolení na pokolení zajišťuje zachování forem života a zároveň jejich evoluci

* Časové měřítko jevů

Oblast radiobiologie můžeme také definovat z hlediska časového na základě charakteristické doby trvání různých jevů. Sledujeme-li interakci ionizujícího záření s živou hmotou, primárním jevem je ionizace molekul. Ionizace je procesem čistě **fyzikálním** a probíhá typicky ve velmi krátkých časech srovnatelných s dobou kmitu ionizující částice, tj. pro rentgenové záření asi 10^{-16} s. Na ionizaci potom navazují přeskupení elektronových orbitalů molekul s možným vznikem či zánikem chemických vazeb. To je oblast **radiochemie**, kde časové konstanty chemických reakcí mohou dosahovat až několika hodin či dnů, avšak v průměru bývají mnohem kratší a pohybují se v mili či mikrosekundách. Chemické změny, ke kterým dochází v této fázi jsou základem změn biologických na úrovni makromolekul a následně buněk, organismů i celých populací, které popisuje **radiobiologie**.

* Spojitost mezi evolucí života a ionizujícím zářením

Doposud nepadá shoda v otázce podmínek, které panovaly na Zemi před příchodem života. Obsahovala původní atmosféra metan nebo čpavek? Jaké bylo zastoupení ostatních plynů? Většina badatelů se shoduje v tom, že v atmosféře bylo příliš málo volného kyslíku na to, aby se mohla vytvořit vrstva **ozonu**, která by jako dnes chránila Zemi před dopadem ultrafialových paprsků ze Slunce. Současně též byla Země mladší a proto byla s určitostí vyšší i úroveň přirozené radioaktivity.

V současné době se průměrná expozice člověka pohybuje kolem 360 miliremů za rok z přirozených zdrojů a přibližně 60 mrem/rok z antropogenních zdrojů. Je přitom možná překvapující, že velký přirozený zdroj záření se nachází uvnitř našeho těla. Je jím draslík, který je jinak nezbytný pro mnoho životně důležitých funkcí jako např. udržování iontové rovnováhy buněčného prostředí, šíření signálů mezi buňkami aj. Všechny přírodní zdroje draslíku obsahují určitý podíl radioaktivního draslíku K-40. Uvážíme-li, že život na Zemi existuje přibližně 4 miliardy let, tj. po dobu asi 3 poločasů rozpadu izotopu K-40, znamená to, že dávka ozáření pocházející od draslíku je dnes přibližně osmkrát nižší než před čtyřmi miliardami let. Podle publikovaných údajů [1] geologické zdroje záření (přibližně 28 mrem/rok) zahrnují především uran, thorium a draslík nacházející se v zemské kůře. Na základě studia údajů 1100 různých hornin Karam a Leslie [1] dospěli k závěru, že intenzita záření z těchto zdrojů je v současnosti poloviční ve srovnání se situací před 4 miliardami let. V této studii nebyly zahrnuty

kosmické zdroje záření (asi 27 mrem/rok) a radon (asi 200 mrem/rok).

Prvé formy života na Zemi se tedy s určitostí musely nutně vyrovnávat s přítomností intenzivního ionizujícího záření. Ionizující záření vytvářelo selekční tlak, který urychloval evoluci primitivních forem života. Není vyloučeno, že ionizující záření mohlo být oním katalyzátorem, který umožnil vznik prvních jednoduchých organických molekul.

* Molekulární radiobiologie

V souvislosti s pokroky v poznávání mikrosvěta a rozvojem molekulární biofyziky a molekulární biologie bylo možno stále více jevů, se kterými se v radiobiologii setkáváme, vysvětlit na molekulární úrovni jakožto výsledek fyzikálních, chemických a biologických dějů, kterých se molekuly živé hmoty zúčastňují. Proto v rámci radiobiologie vydělujeme oblast nazývanou **molekulární radiobiologie**, která se zabývá jevy souvisejícími s účinky ionizujícího záření na molekulární úrovni živé hmoty.

2.1.3. Použití ionizujícího záření v medicíně

Ionizující záření v medicíně může sloužit jak ke zjišťování stavu pacienta, tak k léčbě, jinak řečeno existují aplikace diagnostické i aplikace terapeutické.

Ke *klinickým* diagnostickým aplikacím ionizujícího záření patří především rentgenové snímkování, CT, vyšetřovací metody s použitím radiofarmak aj. V *laboratorní* diagnostice se pracuje zejména s krví (sérum) pacienta. Radioizotopy umožňují citlivou detekci malých množství látky např. hledání protilátek pomocí antigenů značených radioaktivními izotopy.

Terapeutické aplikace byly v minulosti velmi rozšířené. V současné době se vzhledem k nežádoucím vedlejším účinkům používá ionizující záření v terapeutických dávkách především v terapii zhoubných nádorů.

i. Karam and Leslie, Health Physics, December 1999

Kontrolní otázky k 1. kapitole

- Jak vznikl obor radiobiologie a co tvoří jeho náplň?
- Co odlišuje živou hmotu od neživé.
- Kde se můžeme setkat s ionizujícím zářením?
- Co je náplní molekulární radiobiologie?
- Vyjmenujte tři časové fáze probíhající po ozáření biologického objektu ionizujícím zářením.

2. Biofyzikální popis interakce ionizujícího záření s hmotou

Interakce ionizujícího záření s hmotou je ústředním tématem molekulární radiobiologie. Proto jí věnujeme zvláštní pozornost, přestože jednotlivé poznatky, které přináší tato kapitola zřejmě nejsou pro čtenáře nové. Předkládaný biofyzikální popis interakce ionizujícího záření s hmotou je obecně platný pro živou i neživou hmotu. Rozdíly v chování živé a neživé přírody jsou více patrné ve fázi radiochemických přeměn a samozřejmě především z hlediska pozdních účinků biologických.

Biofyzikální popis se opírá jednak o pojmy a charakteristiky vlastní ionizujícímu záření, jednak o charakteristiky a strukturu hmoty, se kterou toto záření interaguje. Proto se stručně zmiňujeme o obou těchto aspektech. Jedním ze základních principů, který podmiňuje poznání vzájemného působení záření a hmoty je vlnově-částicová povaha světla.

2.1. Vlnově-částicová povaha světla

Až do konce minulého století fyzikální popis světla ostře odlišoval mezi objekty vlnové povahy, jako je například elektromagnetické záření, jmenovitě světlo a objekty povahy částicové (korpuskulární). Avšak některá experimentální fakta nebylo možné na základě tohoto dělení vysvětlit. Patří mezi ně například fotoelektrický jev a záření absolutně černého tělesa, kde se zřetelně projevuje korpuskulární charakter světla. Světelná vlna je složena z malých částic, fotonů, z nichž každý nese určité množství - **kvantum** energie, dané výrazem

$$E = h\nu,$$

kde h je Planckova konstanta a ν je frekvence fotonu. Pojem fotonu zavedl A. Einstein v r. 1905.

Fotonu můžeme přiřadit na základě relativistického vztahu $E = mc^2$ hmotnost m a dostaneme vztah mezi vlnovou délkou fotonu λ a jeho hmotností:

$$\lambda = h/mc$$

Z výše uvedeného vyplývá, že pole světelné vlny není spojité, ale že se skládá z fotonů, které se za určitých podmínek mohou chovat jako hmotné částice. Z druhé strany moderní fyzika, jmenovitě teorie vlnové mechaniky Louise de Broglie předpověděla, že hmotné částice, které mají nenulovou klidovou hmotnost, se za určitých podmínek chovají jako vlny o vlnové délce

$$\lambda = h/mv.$$

Tento vztah bylo možno ověřit pomocí difrakce např. pro elektron o hmotnosti 9.10^{-31} kg, avšak experimentální důkaz pro makroskopická tělesa bude velmi obtížný. Pro předmět o hmotnosti 10 gramů pohybující se rychlostí 1000 m/s činí vlnová délka

$$\lambda = \frac{h}{mv} = \frac{6,5 \cdot 10^{-27}}{10 \cdot 10^{-3}} = 6,5 \cdot 10^{-24} \text{ nm}$$

tedy délka, kterou nemůžeme v současné době změřit žádným přístrojem.

Závěr o vlnově-částicové povaze světa:

Všechny hmotné objekty včetně fyzikálních polí vykazují jak korpuskulární tak vlnové vlastnosti. Vlnové vlastnosti makroskopických objektů jsou neměřitelné, projevují se však na úrovni mikrosvěta, kde podmiňují atomovou a molekulární strukturu hmoty.

2.2. Interakce záření s atomy a molekulami

Záření obecně může interagovat buď s atomovými jádry nebo s jejich elektronovým obalem. Z hlediska biologického je dominantním jevem právě interakce s elektronovým obalem a její důsledky radiochemické a radiobiologické. V důsledku absorpce nebo rozptylu záření přecházejí elektrony na hladiny o vyšší energii, jinými slovy do excitovaného stavu, což může vést ke změnám konformace molekul a jejich solvatační obálky, k ionizaci molekul, to znamená uvolnění jednoho nebo více elektronů nebo dokonce k rozpadu molekuly, za vzniku dvou nebo více molekulárních fragmentů nebo radikálů.

Z hlediska druhu záření rozdělujeme možné interakce na interakce fotonů s hmotou a na interakce

Z různých druhů ionizujícího záření mají v biologii zřejmě největší význam fotony prostřednictvím svých interakcí s biologickými molekulami. V dalším bude však pojednáno též o specifických účincích elektronů (záření β), těžkých nabitých částic (záření α , protony, ostatní těžké ionty) a o působení neutronů.

2.2.1. Účinky fotonů

V předcházejících odstavcích jsme se zabývali podrobněji elektronovou strukturou atomů a molekul z jednoho prostého důvodu: tato struktura je určující pro způsob, jakým bude docházet v látce k absorpci energie různých druhů ionizujícího záření a současně určuje, jak se daná látka bude chovat po této absorpci. Je zde několik možných variant. **Absorpce záření** může vést k přechodu molekul do

energeticky vyšších stavů, tj. k **excitaci** molekul látky. Předání určité nadprahové energie vede k odtržení elektronu z elektronového obalu atomu nebo molekuly a dochází k **ionizaci**. Molekula se též může po absorbování dostatečného množství energie rozpadnout (**disociace** za vzniku molekulárních radikálů). Při vysokých energiích dopadajících fotonů dochází ke **Comptonovu rozptylu**, k **vytváření párů** elektron - pozitron nebo dokonce k **photodezintegraci** atomových jader.

2.2.1.1. Excitace

Pro excitaci molekuly (nebo atomu) je nutné, aby ve spektru záření, které je s molekulou v interakci byly obsaženy frekvence odpovídající povoleným kvantovým přechodům v molekule. Obvykle je tento předpoklad splněn v oblasti nízkých energií (mikrovlnné a infračervené záření, tepelná excitace) a vždy pro energie odpovídající záření ultrafialovému a vyšší. Naproti tomu v oblasti viditelného záření některé organické molekuly energii neabsorbují. Je to způsobeno tím, že mezi základním stavem a excitovanými stavy molekuly je velká mezera. Absorbované kvantum musí mít tedy určitou minimální energii (nebo maximální vlnovou délku), aby mohlo být absorbováno. Tato energie se nazývá energií absorpční hrany, podle tvaru absorpčního spektra, kde absorbance u této energie obvykle prudce spadá na nulovou hodnotu, a tuto oblast spektra nazýváme **absorpční hranou**. Nejdůležitější biologické molekuly nukleové kyseliny a bílkoviny neabsorbují záření ve viditelné ani v blízké ultrafialové oblasti.

K absorpci záření o frekvenci v provázené elektronovou excitací dochází, je-li splněna rezonanční podmínka $h\nu = \Delta E$, tj. existují-li v látce dva stavy takové, že rozdíl jejich energií je roven ΔE , a dovolují-li to výběrová pravidla.

2.2.1.2. Ionizace

Koncem minulého století byl poprvé pozorován tzv. **fotoelektrický jev**: když dopadalo světlo na povrch kovu, kov ztrácel náboj za podmínky, že světlo mělo frekvenci větší než určitá minimální frekvence ν_0 , přičemž tato frekvence byla nezávislá na intenzitě záření a naopak závisela výrazně na ozařovaném materiálu. Tato fakta nebylo možné vysvětlit pomocí klasických přístupů. V roce 1905 navrhl pro popis fotoelektrického jevu hypotézu existence kvant energie, která nazval fotony. Jejich energie $E = h\nu$, kde h je Planckova konstanta. Při interakci s atomen či molekulou foton předává veškerou svoji energii a zaniká. Přitom se uvolňuje elektron, jehož kinetická energie je rovna rozdílu energie fotonu a vazebné energie elektronu. Pravděpodobnost fotoelektrické interakce elektronu klesá s třetí mocninou energie fotonu a naopak roste s třetí mocninou atomového čísla ozařovaného materiálu. V biologických materiálech je fotoelektrický jev nejvýznamější v oblasti energií fotonů **do 50 keV**.

2.2.1.3. Vznik radikálů

Za určitých podmínek není molekula schopna zbavit se dostatečně rychle přebytku energie po absorpci fotonu a dochází k její destrukci za vzniku iontů či

radikálů neboli k její radiolýze. Tento proces probíhá například i v molekulách vody, kde vznikající silně reaktivní fragmenty mohou interagovat dále s biologickými molekulami a poškozovat je.

Vznik nestabilních a reaktivních radikálů podmiňuje ve většině případů fotochemické změny živých systémů.

2.2.1.4. Comptonův rozptyl

Korpuskulární aspekt fotonu umožňuje jeho přímou interakci s kterýmkoliv z elektronů atomu. Srážkou s fotonem je elektron vytržen z atomu. Pro oblast energií fotonů 50 keV až 50 MeV je tento proces v biologických materiálech dominantním způsobem interakce s elektrony. Fyzikální popis této interakce podal A.H.Compton v roce 1923 a nazývá se Comptonovým rozptylem.

V tomto případě totiž foton nezaniká jako v případě absorpce, nýbrž pouze předává část své energie elektronu mění svůj směr, je rozptylován pod určitým úhlem.

Vzhledem k tomu, že uvedené energie fotonů jsou velké ve srovnání s vazebnou energií elektronů v biologických látkách (typicky jednotky až desítky eV), můžeme elektrony považovat za relativně Avolné. Z toho plyne, že proces je téměř nezávislý na atomovém čísle absorbujícího materiálu a všechny látky absorbují přibližně stejné množství záření na jeden elektron.

2.2.1.5. Generace párů elektron-pozitron

Má-li foton dostatečnou energii, může vytvořit elektron-pozitronový pár. Z Einsteinova vztahu a zákona zachování energie vyplývá, že minimální hodnota energie fotonu musí být rovna součtu klidových hmotností elektronu a pozitronu násobenému čtvercem rychlosti světla, tj. 1,02 MeV. Vzniklý elektron i pozitron ztrácejí kinetickou energii excitací a ionizací okolních atomů a nakonec pozitron zaniká rekombinací s elektronem. Pravděpodobnost vytváření párů roste od 1,02 MeV s energií lineárně a stává se významnou v biologických látkách při energiích fotonů větších než 20 až 30 MeV. Vzhledem k tomu, že páry vznikají interakcí fotonů s coulombickým polem jader, bude pravděpodobnost růst s intenzitou tohoto pole a tedy i s atomovým číslem a to opět přibližně lineárně.

2.2.1.6. Fotodesintegrace

Fotony mohou interagovat nejenom s elektronovou obálkou atomů, ale, mají-li energii vyšší než je vazebná energie nukleonů, mohou interagovat i s atomovým jádrem. Takto dochází k uvolňování jaderných částic jako protonů, neutronů, částic alfa a jejich různých kombinací při ozařování materiálu fotony o energiích větších než přibližně 7 MeV. Na fotodesintegraci lehkých jader je zapotřebí vyšší energie, přibližně 10 až 15 MeV. Fotodesintegrací vznikají nestabilní částice, které se rozpadají a sekundárně emitují další částice nebo fotony γ .

2.2.1.7. Kvantitativní popis interakce, absorpční koeficient

Při průchodu absorbujícím prostředím dochází k postupnému ubývání intenzity svazku záření. Čím delší je dráha svazku a čím více prostředí absorbuje, tím je úbytek větší. Ve viditelné oblasti spektra kvantitativně popisuje tento proces

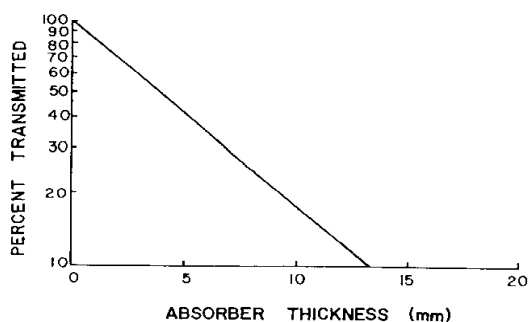
Lambert-Beerův zákon:

$$I = I_0 \cdot e^{-\epsilon Cl}$$

kde I_0 resp. I jsou intensity záření dopadajícího resp. záření po průchodu absorbujícím prostředím o tloušťce l a ϵ je **absorpční koeficient**. Absorpční koeficient je funkcí frekvence záření ν , která souvisí s energií fotonů známým vztahem $E = h\nu$. Též logicky platí, že absorpční koeficient na frekvenci odpovídající energii určitého kvantového přechodu je úměrný síle oscilátoru tohoto přechodu, nebo v případě spojitého spektra přechodů

$$\epsilon(\nu) \sim df/d\nu.$$

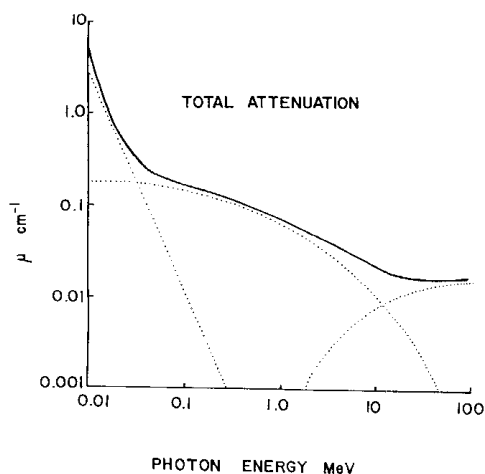
V případě ionizujícího záření je nutno uvažovat nejenom možné přechody mezi vázanými stavy, ale musíme započítat i procesy, které byly zmíněny výše. Přesto můžeme popsat průběh zeslabení intenzity fotonového svazku analogicky: Zavádí se zde celková pravděpodobnost, že foton bude absorbován nebo rozptýlen výše zmíněnými interakcemi μ nebo $\mu(E,Z)$, protože je závislá na energii a atomovém čísle.



Počet fotonů N , které proniknou do hloubky x materiálu je v nejjednodušším případě popsán vztahem

$$N = N_0 e^{-\mu x}$$

který je formálně totožný s Lambert-Beerovým zákonem a ve většině případů dává dobré přiblížení.



2.2.2. Účinky korpuskulárního záření (částice s nenulovou klidovou hmotností)

2.2.2.1. Účinky elektronů

Elektrony ztrácejí při průchodu hmotou svoji energii prostřednictvím **srážek** a přímým **vyzařováním**. Vzhledem k tomu, že mají stejnou hmotnost jako vázané elektrony, se kterými interagují, jejich dráha není přímočará a její směr se mění při každé srážce. Jsou tedy silně **rozptylovány**.

Podél této dráhy zanechává pohybující se elektron ionizované a excitované atomy či molekuly. Při ionizaci uvolněné elektrony potom samozřejmě mohou samy ionizovat další atomy.

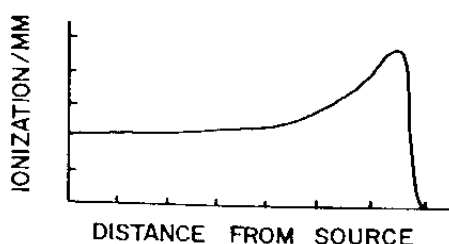
Při průletu elektronů v silném poli atomových jader zrácejí elektrony energii vyzařováním tzv. **brzdného záření**, které spadá do oblasti vlnových délek rentgenového záření. Nepřímo se na generaci rentgenového záření při průletu

elektronu podílí vyzařování ionizovaných atomů při přeskupování elektronového obalu, kde se zářivým přechodem zaplňuje mezera po chybějícím elektronu.

2.2.2.2. Účinky těžkých nabitých částic

K těžkým nabitým částicím počítáme protony, částice alfa a ostatní těžké iony. Všechny tyto částice mají hmotnost více než tisíckrát větší než elektron. Proto při stejné rychlosti nesou monohonásobně větší energii než elektron, nebo, jinými slovy, při stejné energii se budou pohybovat mnohem pomaleji. Pomalu se pohybující nabitá částice za sebou zanechává vyšší koncentraci ionizovaných atomů. Číká se, že takové **záření je hustě ionizující**.

Hustota ionizace závisí pochopitelně i na náboji, který nese ionizující částice. Zdvojnásobíme-li náboj, zvýší se hustota ionizace čtyřikrát.



Stopa těžké částice je obvykle přímočará až téměř do samotného konce. Na konci dráhy se zvyšuje hustota ionizace, která dosahuje tzv. Braggova maxima několik mm od místa, kde se částice zastaví.

2.2.2.3. Neutronové interakce

Neutrony jsou hmotností blízké protonům ($m_n \approx 1800m_e$), na rozdíl od nich však nenesou žádný náboj. Interagují přímými srážkami s jádry a mohou být buď rozptýleny pod určitým úhlem nebo absorbovány.

Atomová jádra biologických tkání jsou relativně lehká a převládá zde kvasielastický rozptyl. To znamená, že při interakci neutron změni směr a část jeho energie je přeměněna na kinetickou energii zasaženého jádra, která je tím větší, čím bude jádro lehčí. Např. ve vodě, jejíž podstatnou součástí tvoří lehké protony (vodíková jádra), získávají tyto značnou kinetickou energii a působí jako sekundární ionizující částice.

Když jsou neutrony srážkami dostatečně zpomaleny, mohou být

absorbovány jádru. Jedním z možných mechanismů absorpce je zachycení neutronu jádrem. Vzniké hmotnější jádro může být nestabilní a rozpadat se radioaktivně. Přitom mohou vznikat sekundární částice nesoucí náboj které budou hustě ionizovat okolí místa absorpce neutronu.

2.2.3. Lineární přenos energie

Předchozí odstavce ukazují, že různé druhy záření se chovají při interakci s látkou různě a vedle předávané energie jsou důležité i jiné parametry interakce jako např. hybnost, hmotnost, geometrie interakce apod.

Pokusme se zobecnit popis interakce ionizujícího záření s látkou a zavést parametry, které budou tuto interakci popisovat.

2.2.3.1. Mechanismy přenosu energie

Všimněme si mechanismu předávání energie látce nabitými částicemi (např. záření α nebo β). Může zde docházet ke dvěma typům srážek. Při tzv. **tvrdých srážkách**, které si můžeme představit jako ráz dvou koulí, předá letící částice elektronu velkou hybnost a energii, která je mnohem větší než vazebná energie elektronu. Proto v tomto případě při ionizaci mnoho nezáleží na chemickém složení látky. Rozhodující je pouze prostorová hustota elektronů. Mnohem častější než tvrdé srážky jsou tzv. **měkké srážky**. Tento pojem zahrnuje vzájemné působení na větší vzdálenost, kdy ionizující částice působí na elektron pouze prostřednictvím svého dalekodosaového elektrostatického pole. Měkké srážky jsou asi 8 - 10krát častější než srážky tvrdé (Fano, 1952). Výraz elektrostatické pole je správný pouze z hlediska souřadného systému spjatého s letící částicí. Toto pole však zdaleka není statické, pozorujeme-li jej z hlediska ionizované molekuly. Ta pocítí při přeletu rychle nabitě částice prudký impuls **elektromagnetického** pole. Hovoříme o poli elektromagnetickém, protože zde dochází ke změně vektoru E intenzity elektrického pole a tudíž ke vzniku pole magnetického. Každý impuls může být rozložen pomocí Fourierovy analýzy v součet N harmonických oscilací o kmitočtech ν_i

$$E_i = \sum k_i \cos(2\pi \nu_i t)$$

Obvyklé spektrum frekvencí takového pulsu je spojitě. Čím jsou boky impulsu strmější, tím vyšší frekvence se v jeho spektru vyskytují. Hodnoty maximálních frekvencí ν_m dosahují 10^{17} s^{-1} , což odpovídá $h\nu_m = 414 \text{ eV}$.

Platí, že počet molekul excitovaných do stavu N_s je úměrný síle oscilátoru stavu s f_s :

$$N_s = \text{konstanta} \cdot f_s \tag{1}$$

Distribuce transversální složky pole rychlého náboje (částice) je v širokém spektrálním rozsahu dána vztahem:

$$I_{tr}(v) - I(v) = \text{konst.}$$

Každý foton nese energii $h(v)$,

tedy

$$I(v) = n(v) \cdot h(v)$$

odkud

$$n(v) = I(v)/hv = \text{konst}/hv$$

Z předchozího vyplývá, že průchod nabitě částice látkou je ekvivalentní průchodu „bílého světla“ s rozdělením kmitočtů $1/hv$.

Při tomto rozdělení vztah (1) dává:

$$N_s - 1/E_s \cdot f_s \quad \text{kde } E_s = hv_s$$

Pro spojité spektrum je

$$N_s - 1/E \cdot df/dE$$

Hodnoty df/dE lze získat z absorpčního spektra látky. N_s tedy závisí na chemickém složení látky. Navíc f_s je úměrné počtu elektronů ve slupce a E_s je menší pro vnější slupky než pro vnitřní, proto dochází převážně k interakci s valenčními (vnějšími) elektrony.

2.2.3.2. Definice lineárního přenosu energie

. Účinnost záření závisí na jeho povaze. Důležitým parametrem, který udává, **kolik energie předává v průměru částice svému okolí při průletu po jednotkové dráze**, je lineární přenos energie. Tato veličina souvisí přímo s hustotou ionizace, tj. s koncentrací ionizovaných částic ve stopě, kterou po sobě zanechává při průletu částice ionizující. K řídce ionizujícím druhům záření patří především rentgenové záření a záření gama.

**TRACK AVERAGE LET VALUES
FOR VARIOUS RADIATIONS**

Radiation type	$L_{\Delta,r}$ keV/ μm
^{60}Co	0.239
22 MV X-ray	0.19
2 MeV electron	0.20
200 kVp X-ray	1.7
^3H betas	4.7
50 kV X-ray	6.3
5 MeV proton	10.
Thermal neutrons	20.
5.3 MeV alpha	43.

From International Commission on Radiation Units and Measurements, *Linear Energy Transfer*, ICRU Report 16, International Commission on Radiation Units and Measurements, Washington, D.C., 1970. With permission.

2.2.3.3. Závislost biologického účinku na dávce ozáření

K radiačnímu poškození dochází v několika fázích od primární excitace, superexcitace či ionizace přes chemické až po biologické změny, k jejichž manifestaci je někdy zapotřebí mnoha let. Proto je obecně obtížné sestavit jednoduchý model, který by vystihoval závislost biologického účinku na dávce ozáření. Při konstrukci tohoto modelu vycházíme předně ze znalosti vstupních parametrů (zde ionizujícího záření), výstupních parametrů

2.2.3.3.1. Relativní biologická účinnost

Biologické účinky ozáření budou samozřejmě závislé na fyzikální dávce záření, kterou definujeme jako energii absorbovanou na jednotku hmotnosti ozařované látky. Starou jednotkou absorbované dávky je rad = 100 erg/g, jednotkou SI je Gray = 1J/kg = 100 rad. Bylo však experimentálně potvrzeno, že různé druhy záření mají

různou biologickou účinnost. Proto byla zavedena další jednotka, která v sobě zahrnuje i tzv. relativní biologickou účinnost (RBÚ) daného druhu záření rem (roentgen-equivalent-man)

$$\text{rem} = \text{rad} \times \text{RBÚ},$$

příčemž

$$\text{RBÚ} = D_{\text{ref}}/D_{\text{test}},$$

kde D_{test} je dávka záření testovaného, která vyvolá stejný biologický účinek, jako dávka záření referenčního D_{ref} . V anglicky psané literatuře se užívá zkratky RBE relative biological effectiveness.

Typické hodnoty RBÚ rentgenového záření, záření gama a elektronů jsou rovny jedné, rychlé neutrony a protony do 10 MeV mají účinnost přibližně desetkrát větší ($\text{RBÚ} = 10$).

2.2.3.4. Rozptyl záření

V případě, že nedochází při srážkách ionizující částice s molekulou k podstatné změně kinetické energie částice a molekula nezíská srážkou podstatnou hybnost (tj. v adiabatické limitě $\Delta T \ll 0$ a $\Delta p \ll 0$), mluvíme o rozptylu záření, při kterém je částice pouze vychylována z původní dráhy. Tato situace nastává v případě, že hmotnost rozptylující molekuly je mnohem větší než hmotnost rozptylované částice ($M \gg m$), avšak v některých případech jsou výše zmíněné podmínky splněny i v případě, kdy $M \approx m$.

Efektivní čas srážky $t_{\text{sc}} \approx \rho/v$, kde ρ je tzv. srážkový parametr (impact parameter), je veličina, která nám umožňuje srážky přirozeným způsobem klasifikovat.

Srážka je nazývána **adiabatickou**, když je efektivní čas srážky mnohem větší než perioda v^{-1} charakterizující kvantový přechod, tj. když je splněna nerovnost

$$v \cdot \rho/v \gg 1$$

Je možno dále ukázat, že svého maxima dosahuje pravděpodobnost excitace v případě, že

$$v \approx a \cdot v,$$

kde a je průměr molekuly, tj. když $v \approx a \cdot v$. Tento semiklasický popis je výhodný pro vysoce excitované stavy včetně ionizovaných stavů molekuly, neboť v tomto případě v odpovídá frekvenci oběhů elektronu kolem pozitivně nabitého jádra a maximum pravděpodobnosti excitace potom odpovídá případu, kdy se rychlost

částice rovná orbitální rychlosti excitovaného elektronu.

Literatura ke 2. kapitole:

1. D. Halliday, R. Resnick, J. Walker: Fyzika, část 5, ČVUT - VUTUM, Brno 2000
2. Chemie pro gymnázia (jakákoliv učebnice chemie pro gymnázia)
3. **Beiser A. : Úvod do moderní fyziky (překlad z angličtiny). Academia, Praha 1978.**

Kontrolní otázky ke 2. kapitole

- Proč se v běžné praxi neprojevují vlnové vlastnosti makroskopických předmětů?
- Jak se liší ve svých účincích neutrony, těžké nabitě částice a fotony?
- Ve kterých oblastech energií převládá generace párů elektron-pozitron, Comptonův jev a fotoelektrický jev?
- Vysvětlíte pojem lineární přenos energie.
- Co je relativní biologická účinnost záření, navrhnete postup experimentu zaměřeného na její určení.

3. Biochemické aspekty působení ionizujícího záření.

V předcházející kapitole byly vysvětleny pochody, které probíhají v ozařované tkáni téměř *současně* s dopadem kvant ionizujícího záření. Tyto pochody můžeme z převážné části popsat fyzikálními pojmy přeměny energie, předání impulsu, ionizace apod. Působení ionizujícího záření na živé systémy však s sebou nese i celou řadu *následných* změn na molekulární úrovni, při kterých dochází ke změnám chemických vazeb, k rozpadu molekul, vzniku molekulárních fragmentů, radikálů, iontů a formování nových molekul. Tyto procesy mají chemickou povahu a proto je lze nejlépe popsat pomocí chemických rovnic. Následující kapitola se věnuje popisu chemických reakcí, které probíhají v buňkách vystavených účinkům ionizujícího záření. Radiačně chemické procesy představují podstatný zásah do struktury živé hmoty a jsou proto často první etapou procesů radiobiologických. V následujících odstavcích se soustředíme na popis radiačně indukovaných chemických změn biologicky důležitých molekul.

3.1. Radiolýza vody

Voda má klíčový význam pro živou přírodu. Voda vázaná i volná je převažující součástí živých systémů a vzhledem k tomu, že pohlcuje ionizující záření, má klíčový význam i v radiobiologii. Nehraje zde však pouze roli pasivního absorbéru. Při ozařování se štěpí na celou řadu chemicky aktivních produktů, které potom následně interagují s dalšími biomolekulami. Produkty radiolýzy vody jsou takto zodpovědné za **nepřímý účinek ionizujícího záření**.

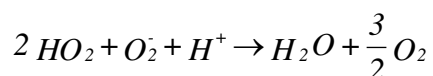
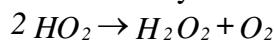
Řada produktů radiolýzy jsou nestabilní meziproducty, které se dále chemicky mění. Rozeznáváme producty základní, které vznikají přímo působením ionizujícího záření a dále dceřinné producty, které vznikají chemickými reakcemi za účasti základních productů. Ani reakce dceřinných productů nemusí však vést ke stabilním productům. Proto obecně může být několik generací dceřinných productů. Přehled nejdůležitějších reakcí je uveden v rámečku R0.

Zvláštní osud má ve vodních roztocích elektron vznikající jako základní product ionizace. Polem, které kolem sebe vytváří, zachycuje polární molekuly vody, které se orientují svými kladně nabitými částmi (vodíky) směrem k elektronu. Takto vzniká molekulární iont, tvořený záporně nabitým elektronem obklopeným čtyřmi molekulami vody, který nazýváme **hydratovaným elektronem** (e_{hydr}^-). Střední poloměr rozdělení (distribuce) záporného náboje hydratovaného elektronu je udáván na 0,25 - 0,3 nm. Hydratovaný elektron je z chemického hlediska silné redukční činidlo.

Hojně se vyskytujícím molekulárním fragmentem při radiolýze vody je **hydroxylový radikál** OH. Představuje silné oxidační činidlo. V nenasycených organických sloučeninách se váže v místě přerušeni dvojných vazeb. S nasycenými organickými sloučeninami obvykle nereaguje. V některých případech je však pozorováno odštěpování vodíků reakcí s hydroxilovými radikály i u nasycených organických sloučenin.

Atomární vodík H má slabší redukční schopnost než hydratovaný elektron. Odštěpuje vodíky z nasycených organických sloučenin a zúčastňuje se dalších reakcí.

Peroxidové radikály HO_2 a O_2^- mohou vstupovat do chemických reakcí jako činidla slabě okysličující i slabě redukující. V prvním případě dávají reakcemi peroxid vodíku a v případě redukčních reakcí se mezi producty vyskytuje kyslík. Obvykle však rychle rekombinují následujícími mechanismy:



	Nízký LPE	Vysoký LPE
e_{hydr}^-	27	4
H	5	
OH	27	6
H_2	45	17
H_2O_2	71	14

H ₃ O ⁺	27	-
HO ₂	-	35

Z hlediska významu jednotlivých produktů je důležité znát jejich výtěžky při ozařování. Tabulka R1 ukazuje, že výtěžky se podstatně liší i v závislosti na druhu použitého záření.

3.2. Radiolýza aminokyselin a bílkovin

Bílkoviny neboli **proteiny** jsou vedle nukleových kyselin nejdůležitějšími biologickými makromolekulami. Mají v živé přírodě četné funkce. Jsou základní součástí téměř všech biologických struktur. Katalyzují také celou řadu biochemických reakcí.

Bílkoviny mohou být složeny pouze z aminokyselin, v tomto případě hovoříme o **bílkovinách jednoduchých**. Pokud se na struktuře bílkovin podílejí i jiné molekuly, jako např. hem či sacharidy, mluvíme o **bílkovinách složených**.

Aminokyseliny tvořící bílkoviny jsou navzájem spojeny tzv. peptidickou vazbou do řetězců. Posloupnost aminokyselin (jejich pořadí v řetězci) určuje **primární strukturu bílkoviny**. Řetězec bílkoviny vytváří zpravidla složité prostorové struktury. Rozeznáváme tři základní typy tzv. **sekundárních struktur**: **α -šroubovice**, **β -struktura** (skládaný list) a **zpětná smyčka**. Na jednom bílkovinném vláknu zpravidla nalezneme úseky různou sekundární strukturou. Toto vlákno jako celek vytváří určitou **terciární strukturu**. Je-li bílkovina složena z více vláken, vytvářejí její subjednotky v prostoru určitou **kvartérní strukturu**, danou slabými interakcemi jednotlivých subjednotek.

V bílkovinách se vyskytuje 20 druhů aminokyselin. Tyto látky mají v molekule obvykle jednu aminoskupinu -NH₂ a jednu karboxylovou skupinu -COOH. Bazická aminoskupina se v roztocích protonizuje za vzniku NH₃⁺, zatímco karboxyl nesoucí kyselá vlastnosti proton naopak ztrácí. Podle povahy postranního řetězce dělíme

aminokyseliny na

- neutrální s nepolárním postranním řetězcem
- neutrální s polárním řetězcem
- kyselé (se záporně nabitým řetězcem)
- bazické (s kladně nabitým postranním řetězcem)

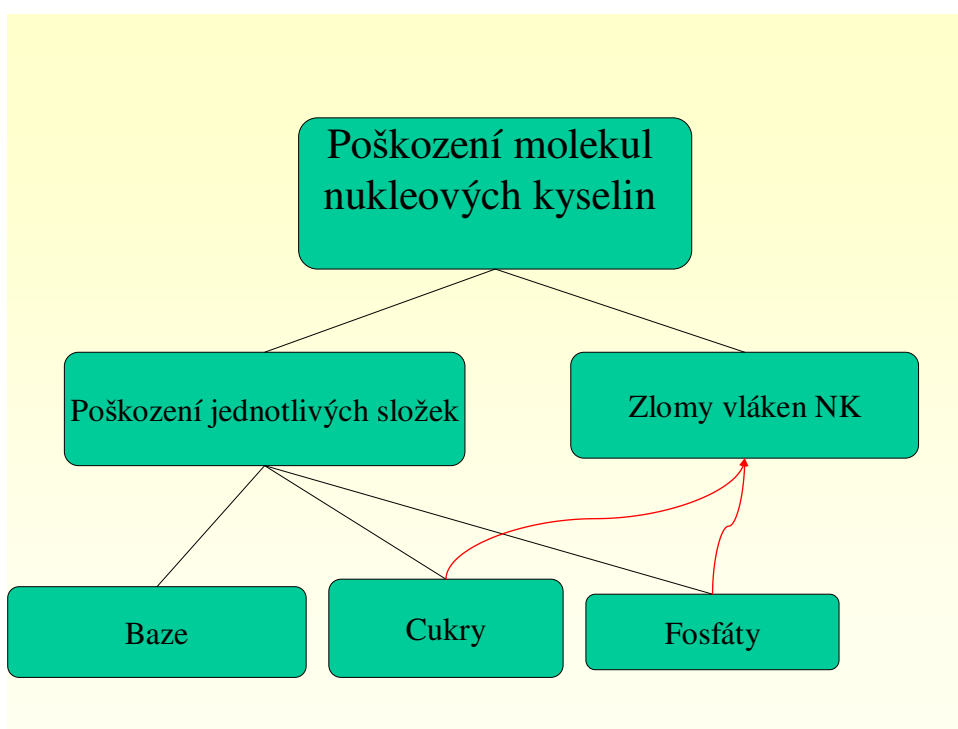
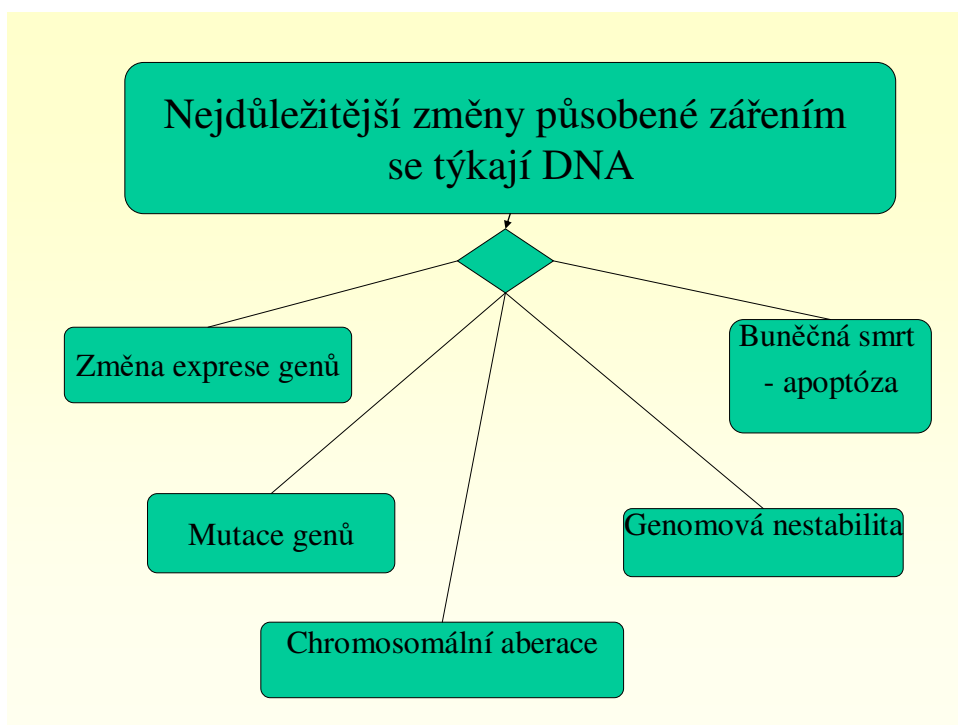
Kratší řetězce aminokyselin ($M_r \# 5 \cdot 10^3$) jsou nazývány peptidy. V poslední době je snaha toto konvenční dělení peptidů a bílkovin podle velikosti nahradit dělením funkčním, kdy se bílkovinou nazývá libovolně dlouhý řetězec aminokyselin s definovanou prostorovou strukturou, který je schopen zastávat určitou biologickou funkci.

Produkty radiolýzy bílkovin jsou opět

- volné radikály včetně atomárního vodíku, které napadají okolní struktury,
- molekulární ionty,
- elektrony,
- čpavek a další sloučeniny
- **a především v konečném stádiu bílkoviny změněné zářením, které mají změněné vlastnosti a změněnou funkci.**

3.3. Změny indukované ionizujícím zářením v nukleových kyselinách

Ionizující záření si příliš nevybírání svůj cíl v buňce. Zasažena a změněna může být jakákoliv molekula. Důsledky této změny jsou závislé na roli, kterou daná molekula v buňce zastává a bezesporu nejvýrazněji se projevují při zasažení nukleových kyselin.

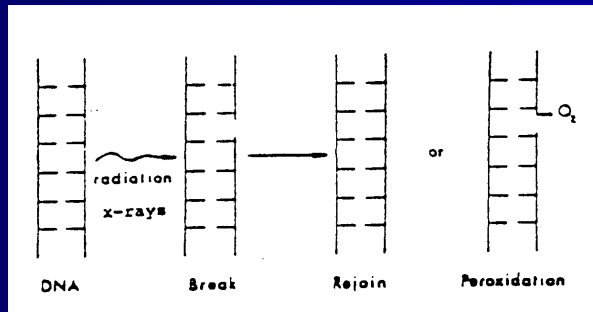


V nukleových kyselinách mohou být poškozeny všechny jejich složky tj. baze, cukry i fosfáty. Při poškození samotných bází nedochází k přetržení vláken nukleových kyselin.

Při poškození cukrů a fosfátů může dojít k přetržení jednoho nebo dvou vláken DNK, tj. k jednovláknovým a dvouvláknovým zlomům.

Poškození nukleových kyselin

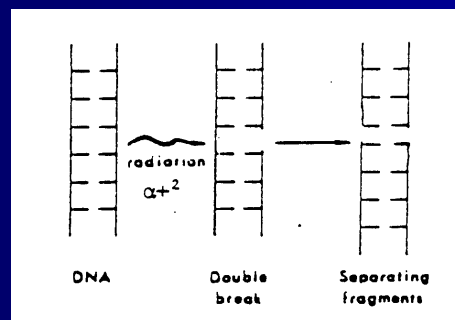
Nízký LPE – jednovláknové zlomy



Obr.: <http://www.uic.edu/com/uhrd/manual/section2/section2.html>

Při nízkém lineárním přenosu energie (záření X a gama) vznikají převážně jednovláknové zlomy, které jsou úspěšně reparovány (zacelovány).
V kyslíkatém prostředí, pokud proběhne peroxidace, není již reparace možná.

Vysoký LPE – dvouvláknové zlomy



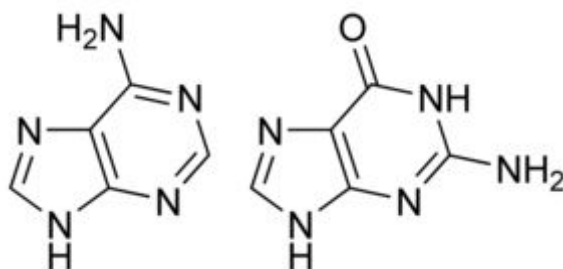
Obr.: <http://www.uic.edu/com/uhrd/manual/section2/section2.html>

Při vysokém lineárním přenosu energie dochází k dvouvláknovým zlomům, které vedou ke štěpení (fragmentaci) DNA.

Poškození bazí nukleových kyselin

Baze nukleových kyselin dělíme na deriváty purinu a pyrimidinu.

Hlavními purinovými basemi jsou [adenin](#) a [guanin](#).

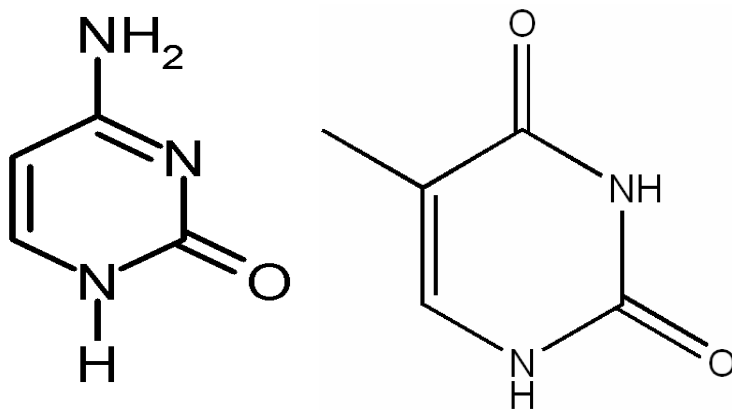


Adenin

Guanin

K chemickým reakcím v důsledku ozařování dochází na purinových bazích nejčastěji na uhlíku C10 (uhlík v pětičlenném cyklu).

Pyrimidinové base cytosin a thymin reagují nejvíce na uhlících C5 a C6, které jsou spojeny dvojnou vazbou.

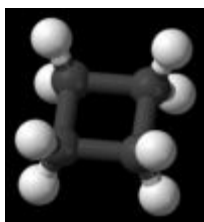
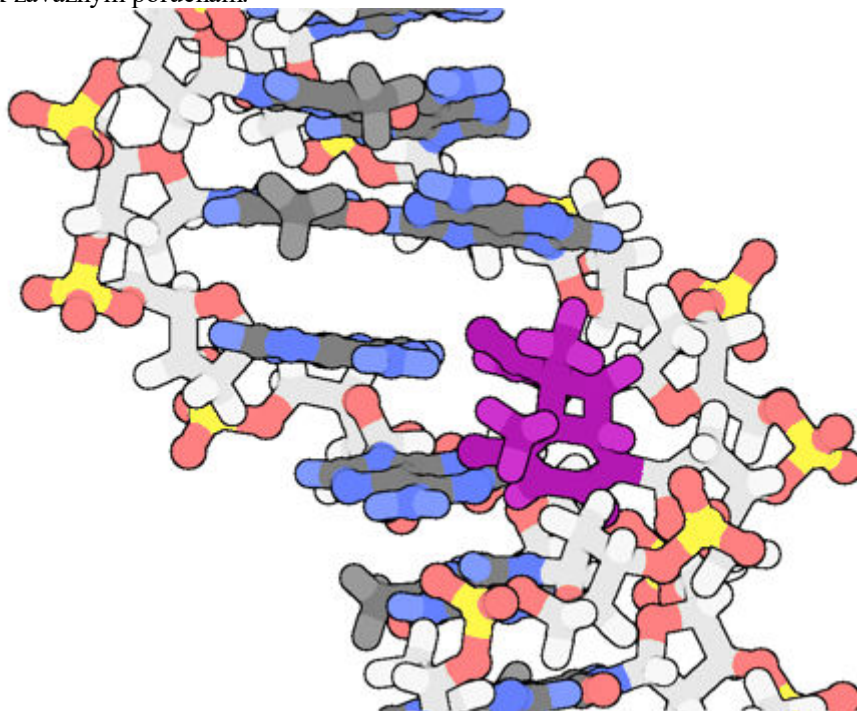


Obrázky Wikipedia

Pyrimidinové dimery:

Působením UV záření se vytvářejí vazby mezi dvěma po sobě jdoucími pyrimidiny. Jsou to vždy dvě pevné kovalentní vazby, vytvářející společně cyklobutanový cyklus (viz malý doplňující

obrázek). Pokud by nebyla tato poškození během krátké doby opravena, mohla by vést k závažným poruchám.



Literatura ke 3. kapitole:

1. Černohorský, Vondřejš: Biofyzika II, skriptum UK Praha
2. Biochemie pro lékařské fakulty

Kontrolní otázky ke 3. kapitole

- Proč je důležité v radiobiologii studium produktů radiolýzy vody?
- Které produkty radiolýzy vody znáte?
- Nakreslete chemickou strukturu bílkovin a nukleových kyselin.
- Která vazba v molekule pyrimidinů je často měněna v důsledku účinků ionizujícího záření?
- Jak vypadá thyminový dimer?.

4. Biologické účinky ionizujícího záření

4.1. Mechanismy biologického působení záření

Působení ionizujícího záření na biologické objekty je podmíněn vznikem mikroskopických změn následkem fyzikálních a chemických pochodů vyvolaných interakcí záření s živou hmotou. Tyto pochody byly detailně probrány v předcházejících kapitolách, proto zde uvedeme pouze některá dokreslující fakta.

* Teorie přímého a nepřímého působení záření

- přímé působení: dochází k absorpci zářivé energie molekulou, změny se projevují přímo v místě absorpce
- nepřímé působení: molekula předává získanou energii jiným molekulám, které se transformují.

Vlivem záření vznikají v biologickém prostředí volné radikály, z nichž nejpočetnější a také nejvýznamnější jsou primární produkty radiolýzy vody.

Udává se, že přibližně polovina absorbované energie vede k přímým změnám, polovina působí na organismus nepřímo, tento poměr je samozřejmě dán především obsahem vody v látce.

Při ozáření látek s nižším obsahem kyslíku se pozoruje omezení vlivu radiace (tzv. kyslíkový efekt).

* Teorie zásahová a terčová, Kreuzer, Herčík - modeluje závislost účinku na dávce ozáření

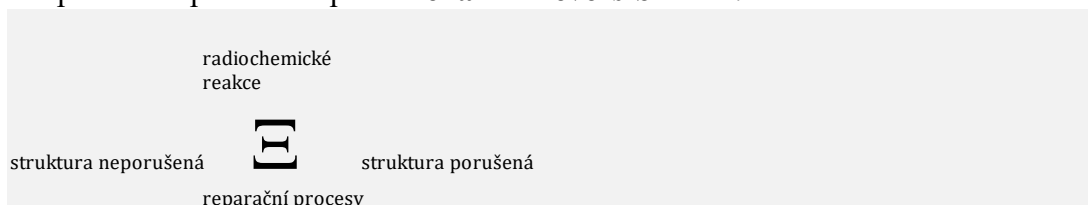
4.1.1. Účinek záření na buňku obecně, změny reversibilní a irreversibilní

Z přehledu radiochemie v předcházející kapitole vyplývá, že prakticky každá biologická molekula, každá součást živé buňky může být zasažena a poškozena

ionizujícím zářením.

Poškození buněčných struktur vede k poruše jejich funkce a může mít za následek i smrt buňky.

Naštěstí k trvalému poškození dochází v poměrně malém procentu případů. Buňky si totiž na svou ochranu vyvinuly mechanismy, které jsou schopny opravit porušené struktury, které se nazývají **reparační mechanismy**. Díky těmto mechanismům je většina poškození vratný děj a v každém organismu existuje dynamická rovnováha mezi strukturami poškozeným a strukturami nepoškozenými. Poškození, která jsou opravitelná pomocí reparačních mechanismů nazýváme **změnami reversibilními**, neopravitelná poškození pak **změnami irreversibilními**.



Reparační mechanismy musí fungovat, to znamená, že nesmí být zářením inaktivovány, aby se buňka mohla z účinků záření zotavit.

Vznik radiačně podmíněných změn můžeme zjednodušeně rozdělit do tří etap:

- primární radiofyzikální procesy (absorpce, excitace, ionizace)
- radiačně chemické změny (přímé a nepřímé působení záření na biologické molekuly)
- biologické procesy (biologické reakce na úrovni živých tkání)

Reparační pochody mají též tři základní stupně:

- rozpoznání změněných struktur
- odbourání porušených částí struktur
- syntéza nových struktur nebo jejich částí

Podle tzv. centrálního dogmatu molekulární biologie probíhá přenos a exprese genetické informace obsažené v DNK v zásadě nejprve na RNK a podle RNK jsou syntetizovány bílkoviny.

Z předchozího vyplývá, že:

-
- 1) Poškození DNK způsobí změny v syntéze RNK i v syntéze bílkovin
 - 2) Poškození RNK bude ovlivňovat syntézu bílkovin
 - 3) Poškození bílkovin se může projevit ve všech procesech, jichž se bílkoviny zúčastňují, zejména pak při syntéze DNK, RNK i při syntéze bílkovin, která se neobejde bez enzymatické funkce bílkovin samotných.

Proto nelze, pokud hovoříme o závažnosti radiačního poškození, podceňovat žádnou komponentu živé hmoty, neboť poškození jakékoliv se promítne do stavu celého systému.

Jako příklad komplexnosti pochodů, které jsou v živé buňce spuštěny ionizujícím zářením můžeme uvést mechanismus náhrady poškozené bílkoviny:

- 1) Rozpoznání, odbourání a vyloučení poškozené bílkoviny
- 2) Povel k syntéze odpovídající RNK (transkripce genu z DNK na RNK)
- 3) Syntéza bílkoviny podle tripletového kódu RNK.

Podmínkou všech těchto reakcí je dostatečná zásoba neporušených enzymů a neporušenost DNK. V případě nesplnění prvé z podmínek obvykle již dochází ke smrti buňky, porušená DNK obvykle vede k syntéze nefunkční bílkoviny. Tyto změny struktury řadíme ke **změnám ireversibilním**.

4.1.2. Závislost biologického účinku na dávce ozáření

Biologické účinky záření závisí na mnoha okolnostech, z nichž nejdůležitější jsou

1. druh použitého záření (relativní biologická účinnost záření),
2. druh ozařovaných buněk a jejich stav (okysličení, zásobení živinami, fáze buněčného cyklu,...),
3. dávka ozáření a
4. dávkový příkon vypovídající o intenzitě použitého záření.

Míru poškození buňky ionizujícím zářením a obecněji biologický účinek záření určuje do značné míry dávka ozáření. Rozbor závislosti dávka-účinek, nejčastěji tzv. křivek přežití, byl jedním z prvních nástrojů radiobiologie dávno předtím, než mohly být jednoznačně pojmenovány molekulární a buněčné struktury zodpovědné za konkrétní biologickou reakci ozářeného objektu. Matematický popis křivek přežití poskytují **teorie zásahová a terčová**, kvadratické závislosti a lineárně-kvadratické křivky jsou modelovány pomocí **teorie duální akce**.

4.1.2.1. Poškození genetického materiálu ionizujícím zářením

Udržení genetické informace materializované v podobě posloupnosti párů bazí nukleových kyselin klade velmi náročná kritéria na přesnost mechanismu replikace a na mechanismy opravy poškození. Náročnost je zřejmá uvědomíme-li si, že při buněčném dělení je zapotřebí nasyntetizovat DNA o délce řádově miliard párů bazí a že je též nutno tuto informaci ochránit před poškozením v intervalu mezi děleními. Díky vysokému stupni dokonalosti příslušných mechanismů replikace a reparace je pravděpodobnost poškození DNA a vzniku mutací relativně malá, avšak přesto nezanedbatelná.

4.1.2.1.1. Mutace

Mutace jsou změny v nukleotidových sekvencích genů, které vedou k dědičným změnám genotypu. Mutace se mohou týkat jednoho genu (genová mutace), chromozómu (chromozómová mutace) nebo celého genomu (genomová mutace). Mutace dělíme na mutace **stabilní** a **labilní**. Labilní mutace se ve vývoji neudrží, podléhají selekčnímu tlaku. Stabilní mutace jsou naproti tomu základní podmínkou evoluce.

Mutace vznikají především nukleotidovou substitucí, inzercí a delecí.

Substituce je záměna nukleotidů jinými nukleotidy, přičemž úhrnná délka vlákna zůstává zachována. V případě tzv. transice je purinový nukleotid vyměněn za purinový a pyrimidinový za pyrimidinový, zatímco při transversi je purinový nukleotid vyměněn za pyrimidinový a pyrimidinový za purinový.

Delece je vynechání jednoho nebo více nukleotidů z nukleotidové sekvence.

Inzerce je vložení jednoho nebo více nukleotidů do nukleotidové sekvence.

Delece i inzerce tedy, na rozdíl od substituce, mění délku vlákna NK.

Vzhledem k tomu, že genetický kód je třípísmenný, pouze inserce a delece, které jsou násobkem tří nukleotidů umožňují správné čtení informace v sekvenci následující za mutovanou sekvencí, v ostatních případech dochází k tzv. posunutí čtecího rámce, proto se tyto mutace označují jako **posunové**.

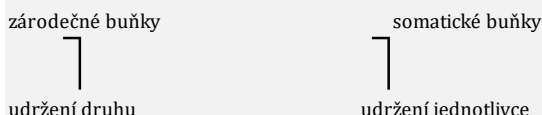
□ Rychlost mutací

Rychlost stabilních mutací vypovídá o rychlosti s níž divergují druhy. Jedním ze způsobů, jak srovnávat druhy je orovnávaní primárních sekvencí stejných proteinů. Pro měření rychlosti **všech** mutací, tedy i labilních se hodí **fibrinopeptidy** - dvacetiaminokyselinové peptidy, které vznikají z fibrinogenu při srážení krve. Zde příliš nezáleží na sekvenci, proto je selekční tlak minimální. Bylo zjištěno, že protein (středně velký) o 400 aminokyselinách změní spontánně jednu aminokyselinu za 200 000 let! Dnes se může měřit tato rychlost přímo sekvenováním DNK.

□ Mutační rychlosti dělicích se buněk

K určení rychlosti mutací se s výhodou používají velké populace např. populace myši nebo octomilek nebo též populace buněk v kultuře. Rychlosti mutací vycházejí řádově 1 mutace na 10^9 párů bazí na jednu generaci. Uvážíme-li, že jeden gen čítá průměrně 10^3 bp, vyplývá z předchozího, že jeden gen bude modifikován pouze jednou za 10^6 generací!

□ Nízké rychlosti mutací jsou důležité pro zachování života
ochrana proti mutacím



Většina mutací znamená negativní zásah do genomu a projeví se zhoršením funkce biologických struktur a systémů. Prakticky se jedná o poškození, které si nemůže příliš často žádná buňka dovolit. Ochrana proti mutacím zárodečných buněk (gamet) zabezpečuje udržení druhu, ochrana proti mutacím somatických buněk chrání život jedince.

Změna nukleotidů (sekvence) v somatických buňkách může usnadnit proces přirozeného výběru, který vede k přežití nejschopnějších buněk na úkor zbytku organismu. Extrémem je zde malignisace buněk vedoucí k zhoubnému nádorovému bujení. Naštěstí je k takovéto proměně buňky obvykle zapotřebí několika postupných mutací (u kolorektálního karcinomu jsou udávány 3 mutace) k tomu, aby se vyvinul klinický obraz zhoubného nádoru. Je-li p_1 pravděpodobnost první mutace, p_2 a p_3 mutací následujících, je pravděpodobnost p_z zhoubné přeměny buňky dána součinem

$$p_z = p_1 \cdot p_2 \cdot p_3$$

I tak je pravděpodobnost p_z stále dosti vysoká, uvážíme-li, že zhoubné nádory jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí v lidské populaci.

V následující tabulce jsou shrnuty pozorované rychlosti změn sekvencí aminokyselin v bílkovinách.

Bílkovina	Čas pro 1 přijatelnou změnu aminokyseliny na 100 aminokyselin
Fibrinopeptid	$0,7 \cdot 10^6$ let
Hemoglobin	$5 \cdot 10^6$ let
Cytochrom C	$21 \cdot 10^6$ let
Histon H4	$500 \cdot 10^6$ let

Pro experimentální určování analýzy genomů, výskytu mutací a příbuznosti bylo vyvinuto v poslední době mnoho metod. Patří k nim hybridizace nukleových kyselin se značenými sondami, sekvenování nukleových kyselin, sledování polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP) aj.

Pokud by nebyla poškozená DNK neustále opravována, sekvence DNA by se rychle měnila.

4.1.2.1.2. Reparační mechanismy

Obecné schema

Reparace probíhá v několika krocích, které jsou pro většinu reparačních procesů stejné nebo podobné:

1. krok - rozpoznání poškozené části vlákna a její odstranění speciálními enzymy - opravnými nukleázami.
2. krok - syntéza chybějícího vlákna ve směru $5' \rightarrow 3'$ podle templátu DNA polymerázou.
3. krok - spojení přerušeno vlákna DNA ligázou

Mechanismy reparace různých typů poškození se liší zejména enzymy vstupujícími do reakcí 1. kroku:

- Oprava depurinace: Depurinovaný cukr je rozpoznán enzymem AP endonukleázou. Dále je stejný 2. i 3. krok jako v obecném schématu.
- Oprava poškozených bází (včetně bází deaminovaných): Hydrolyzujícími enzymy jsou zde DNA glykosylázy. Je jich nejméně 6 různých typů, včetně enzymů specializovaných na odstranění deaminovaných cytosinů, deaminovaných adeninů, různých alkylovaných bází, bází s otevřeným cyklem a bází, kde byla dvojná vazba C=C změněna na vazbu jednoduchou.

4.1.2.1.3. Účinky ionizujícího záření

4.1.2.1.3.1. Vznik mutací a chromozomálních aberací

Ukazuje se, že typ mutací a charakter biologického poškození obecně závisí na druhu záření

Účinky záření s nízkým LPE

Rentgenové záření a záření γ mají nízký lineární přenos energie (LPE). Dostávají se k našim buňkám především Adíky@ radiologickým vyšetřením a radioterapií. Dávka 1 Gy (gray) způsobí $2 \cdot 10^5$ ionizací v jedné buňce z nichž část se týká ionizace DNA. Odhaduje se, že vznikne asi tisíc jednovláknových zlomů a asi 10 dvouvláknových zlomů. Velká část těchto poškození se opraví pomocí reparačních mechanismů, některé opravy budou však nepřesné nebo nedokonalé - vzniknou mutace a chromosomální změny. Chromozomální změny – aberace jsou přímo pozorovatelné v optickém mikroskopu. Vznikají většinou v důsledku dvouvláknových zlomů přeskupením DNA uvnitř chromozomu nebo mezi chromozomy, popřípadě úplnou ztrátou části genetického materiálu.

Dávka na jeden rentgenový snímek je asi 10^{-3} Gy, tj. dvatisíckrát méně než jediná seance radioterapie (asi 2 Gy). Na biologickém objektu se tato dávka záření s nízkým LPE projeví chromosomálními změnami, které v 50% případů způsobí smrt poškozené buňky. Zbylých padesát procent přežívajících buněk nese ve svých chromozomech odchylky stejného druhu, jako změny, které jsou pokládány za spontánní, které pozorujeme u nositelů chromosomálních aberací, nebo změny související s evolucí druhů.

Účinky záření s vysokým LPE

Záření s vysokým LPE se vyznačuje především malou hloubkou průniku, tzn. jedná se hlavně o povrchové působení, i když nelze vyloučit ani působení v hloubce, ke kterému dochází u vnitřních zářičů. Toto záření je významné zejména zásluhou radonu, který emituje záření α , které představuje přibližně 37% celkové radiační zátěže obyvatelstva.

Obecně záření s vysokým LPE je záření hustě ionizující, vytváří při průchodu tkáněmi tzv. ionizující tunel, následkem čehož je poškození koncentrováno v na ohraničené oblasti buněk a není rovnoměrně rozděleno po všech buňkách v celém objemu jako poškození způsobené zářením s nízkým LPE.

Z toho vyplývá skutečnost, že zasažené buňky mohou nést velmi složité chromosomální změny, které jsou výsledkem mnohonásobných zlomů a rekombinací zřejmě tímto způsobem vznikají i četné mutace, které nejsou pozorovatelné pod mikroskopem.

Společnou vlastností záření s nízkým a vysokým LPE je **ztráta funkčnosti zasažených genů** u větší části poškození.

Rozeberme nyní podrobněji možné důsledky poškození genů. Připomeňme si, že v eukaryotních organismech (to jsou organismy, jejichž buňky mají jádro) je většina genů zastoupena dvěma alelami. V normální situaci jsou obě tyto alely funkční. Každá z nich kóduje syntézu bílkoviny, jejíž biologická funkce určuje fenotyp.

Mutace jedné z dvojice alel může mít různé následky:

1. Mutovaná alela ztrácí funkci - není aktivní, nekóduje protein. Zůstává však druhá alela, která ji zastoupí a zajistí funkci. Takovéto mutaci se říká recesivní, na fenotypu se neprojeví.

2. Mutovaná alela kóduje mutovaný nefunkční protein, který soutěží s proteinem, který je syntetizován díky druhé nemutované alele - zde mutace snižuje nozmalní funkci. Takováto mutace je dominantní negativní.

3. Mutovaná alela kóduje funkční protein, avšak ten není rozpoznán katabolickými enzymy. V důsledku toho není odbouráván a má tedy delší dobu života, takže je přítomen ve vyšší koncentraci. Účinek mutace je dominantní.

4. Mutovaná alela kóduje protein funkční, který má nové vlastnosti oproti proteinu nemutovanému. Zde jde též o dominantní efekt.

Z uvedeného výčtu se zdá, že případy, kdy je protein dále syntetizován, avšak má pozměněnou funkci (funkčnost), jsou převládající, avšak není tomu tak ve skutečnosti. Takovéto případy jsou naopak velice vzácné. Většina zásahů vede k inaktivaci genu. To znamená, že většina poškození patří do první kategorie, která byla zmíněna.

4.1.2.1.3.2. Nestabilita genomu

Další charakteristikou poškození, vyvolaných zářeními, je nestabilita genomu. Ta byla pozorována experimentálně jak na genech, tak na chromozomech. Na obr. 21 je znázorněna jedna z možností vzniku genomové nestability. Charakteristické jsou velmi dlouhé časy, které uplynou mezi primárním poškozením (ozářením) a demaskováním mutovaného genu po ztrátě zdravého genu.

4.1.2.1.3.2.1. Geny související s nádorovým bujením

V minulosti existovaly o původu nádorového bujení nejrůznější představy. Po zdokonalení metod molekulární biologie a genetiky bylo však stále více zřejmé, že nádorové bujení je geneticky podmíněno a proto bylo vyvíjeno velké úsilí o nalezení a identifikaci genu rakoviny. Počáteční představa, že bylo nutno záhy korigovat, nebo se podařilo zjistit celou řadu genů, které jsou v nádorové buňce změněné, avšak žádný univerzální gen rakoviny se najít nepodařilo. Bylo doposud popsáno více než 250 genů, jejichž mutace mohou hrát důležitou roli v kancerogenezi. Dělí se na dvě velké skupiny: onkogeny a antionkogeny. Nádorový klon může vzniknout buďto v důsledku aktivace onkogenu nebo jako následek inaktivace antionkogenu.

Onkogeny

Onkogeny jsou lépe prozkoumány než antionkogeny, neboť jejich aktivace se lépe dokazuje než ztráta aktivity antionkogenu. Aktivují se většinou dominantními mutacemi nebo přeskupením alely, zatímco druhá alela zůstává tzv. protoonkogenem. Ve většině případů také mutace onkogenů není způsobena ionizujícím zářením s

výjimkou významného případu karcinomu štítné žlázy.

Antionkogeny

Antionkogeny se nazývají též nádorové supresory a řídí různým způsobem správnou funkci buňky. Známe jich více než sto. Zvláště důležitá je jejich schopnost řídit buněčnou proliferaci a vztah k jiným buňkám. Nejčastěji se mutace antionkogenů týkají somatických buněk. Navíc existuje asi dvacet genů, které jsou prakticky geny predispozice k nádorům a které jsou přímo schopny spustit v organismu proces nádorového bujení. Mutace těchto genů probíhají v zárodečných - pohlavních buňkách. Predisponované osoby, které jsou nositeli pouze jedné mutované alely, jsou heterozygotní. Jejich predispozice je tedy **dominantním** rysem. K vyvolání procesu nádorového bujení je však třeba, aby se změna stala homozygotní aspoň v jedné buňce a to tak, že alela, která byla normální, je deletována nebo mutována. Takto se mutace projeví jako **recesivní** v buňkách, které projdou maligní transformací.

Recesivní mutace se akumulují s věkem a riziko dvojnásobné mutace se zvětšuje. Ke vzniku nádoru vede obvykle teprve postupné poškození více genů souvisejících s nádorovým bujením, což významně snižuje pravděpodobnost výskytu nádorového klonu. Obvykle však nelze u této metageneze rozlišit mezi působením ionizujícího záření, chemických mutagenů a dalších nox.

Literatura:

1. S. Rosypal a kol., Molekulární genetika.
2. Alberts: Cell
3. Gordon: Radiobiology
4. Černohorský, Vondrejs: Biofyzika II, skriptum UK Praha
5. Přednášky

Kontrolní otázky ke 4. kapitole

- Na čem závisí obecně velikost biologického účinku záření?
- Co jsou křivky přežití?
- Jak pracuje systém excisní reparace nukleových kyselin?
- Jak vznikají chromosomální aberace?
