

Genetika II

Mutageneze

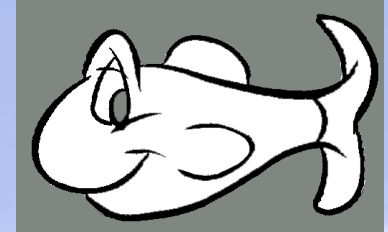
Petr Kuglík

**Oddělení genetiky a molekulární biologie
Přírodovědecká fakulta MU v Brně**

Témata přednášek

- **Biologické a genetické účinky neionizujícího a ionizujícího záření**
 - **Promutageny a chemické mutageny v životním prostředí**
 - **Genetická toxikologie a testy genotoxicity**
 - **Antimutageny aneb co nás chrání před mutacemi a rakovinou**
-

Definice mutací

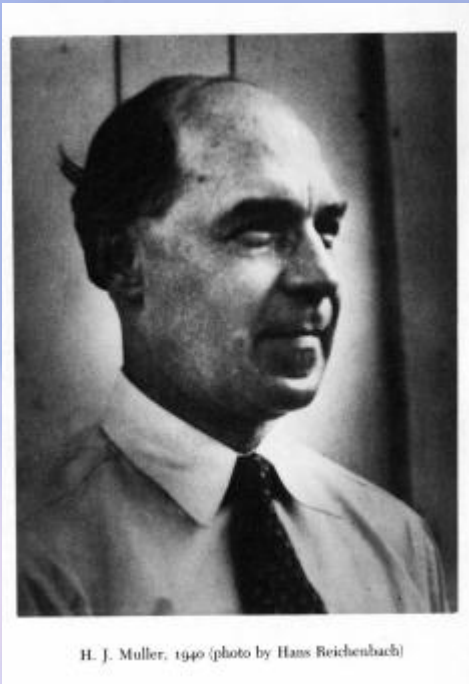


Mutace - jakákoliv dědičná změna v genetickém materiálu, jejíž příčinou není segregace nebo genetická rekombinace, a která při přenosu do dceřiných buněk a následujících generací dává vznik mutantním buňkám nebo mutantním jedincům

Mutace – změny v DNA, jejichž frekvence je **nižší než 1 % !!!**

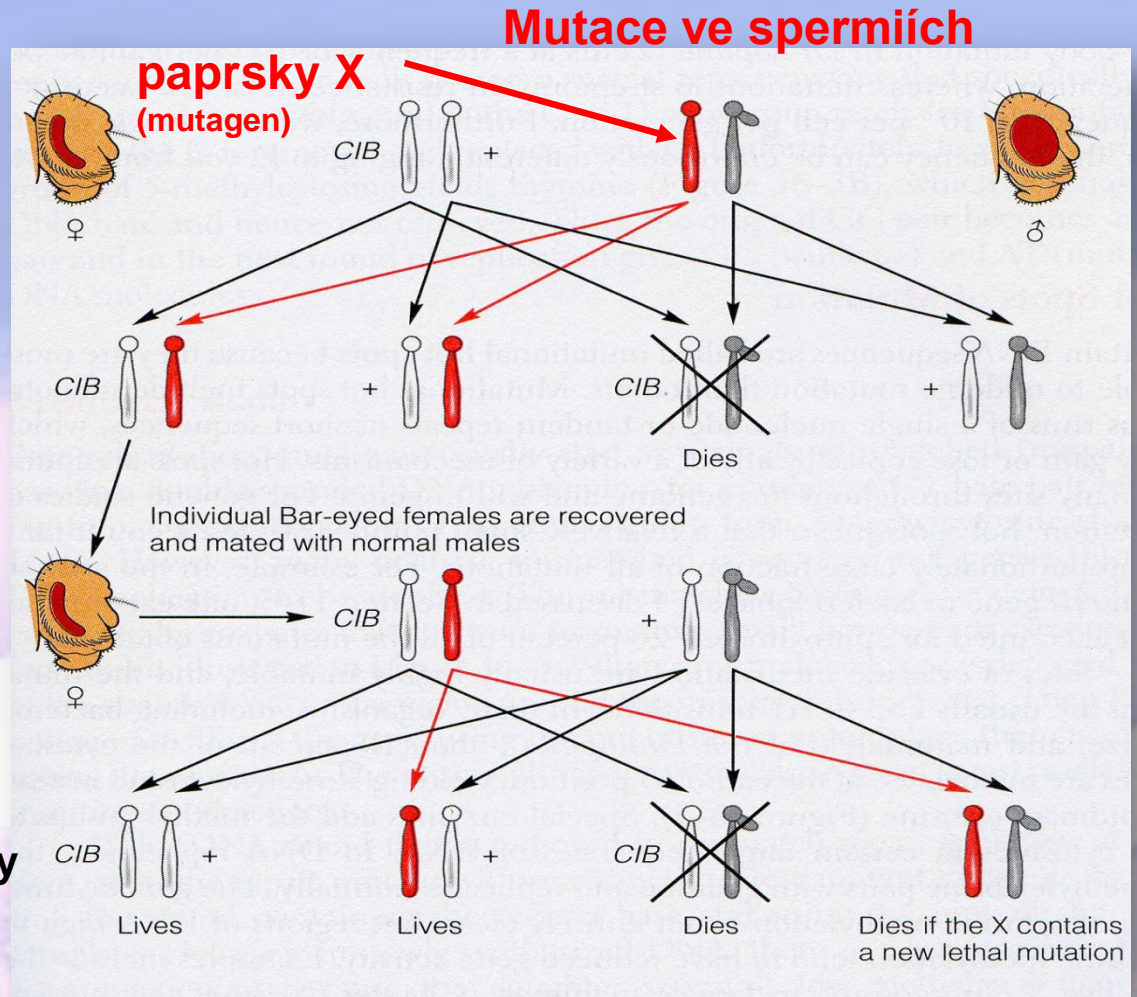
Polymorfismus - stav, kdy vedle sebe společně existuje dvě či více forem určitého druhu

Radiační mutageneze CIB test u *Drosophila melanogaster*



Hermann Muller – 1927
The Nobel Prize in Physiology
or Medicine 1946

X záření – mutagenní !!!

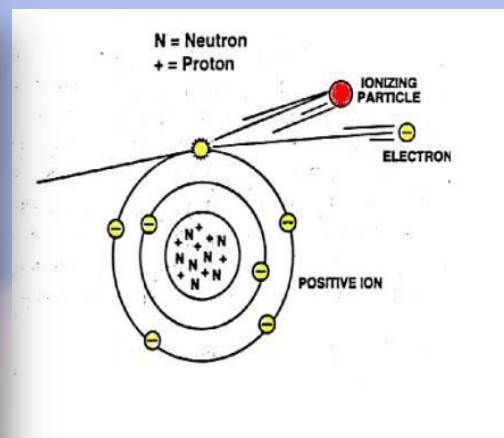
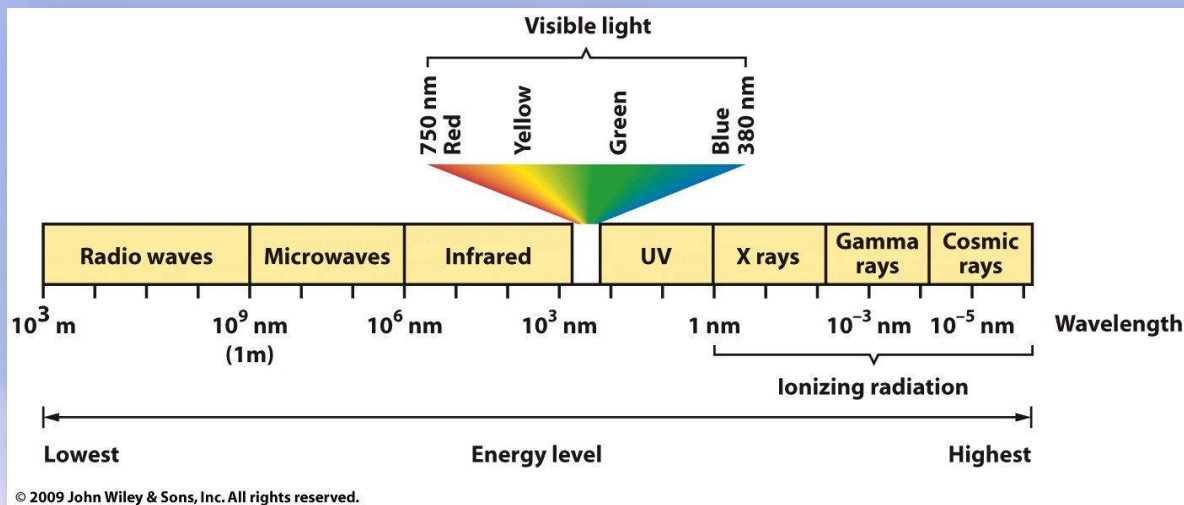


V případě vzniku letální mutace – **nebudou v generaci F2 samečci**

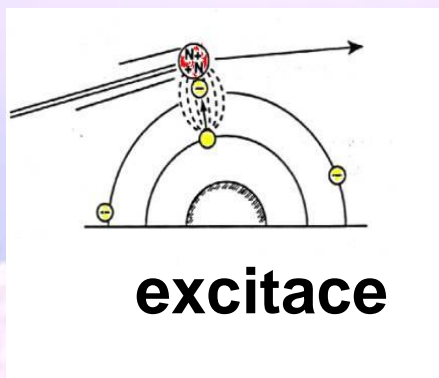
Biologické a genetické účinky ionizujícího záření

UV záření
Ionizující záření

Ionizující a neionizující záření



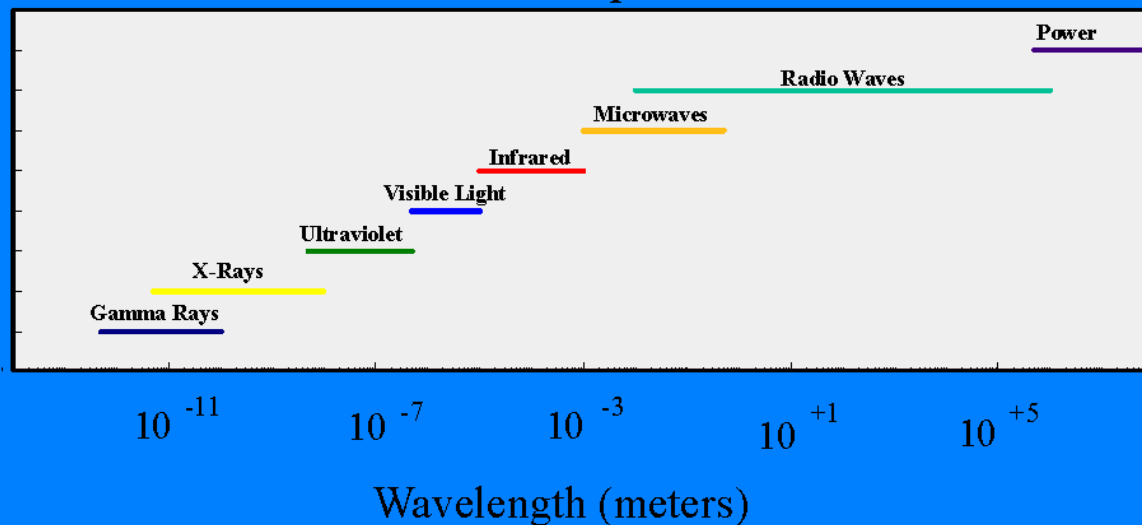
ionizace



Ionizujícím zářením nazýváme takové záření, jehož kvanta mají natolik vysokou energii, že jsou schopna vyrážet elektrony z atomového obalu a tím látku **ionizovat**

UV záření

The Solar Spectrum



UVA = 320 – 400 nm

UVB = 280 – 320 nm

UVC = 190 – 280 nm

Sluneční světlo

Infračervené
záření = 31,9 %

Viditelné světlo
= 62,7 %

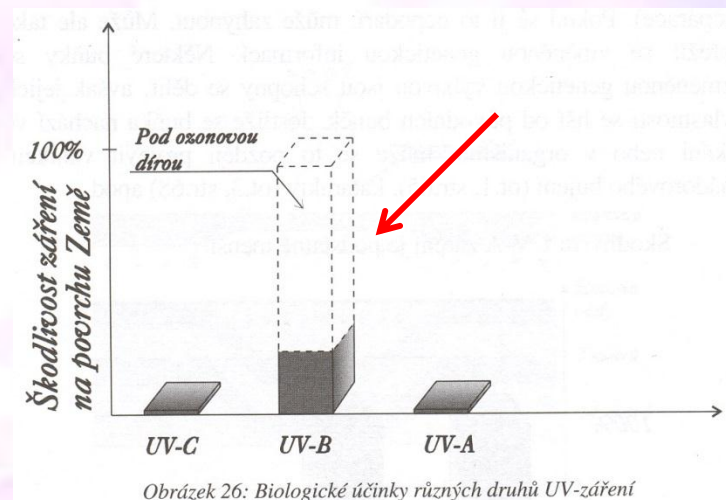
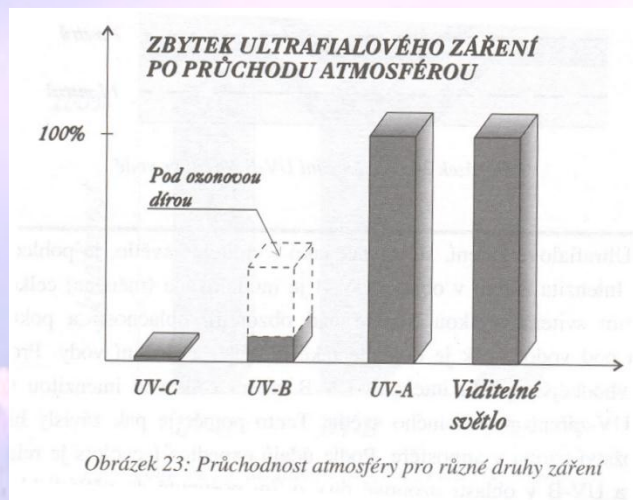
UVA = 5,1 %

UVB = 0,3 %

Průchodnost atmosféry pro různé druhy UV záření

- UV-C složka - je zcela pohlcována **atmosférou**
- UV-B složka - z 90 % pohlcována **ozonem**, vodními parami, O_2 a CO_2
- UV - A složka - dopadá na povrch Země

UV záření dopadající na povrch = UV-A + UV-B



Jednotky dávky UV záření

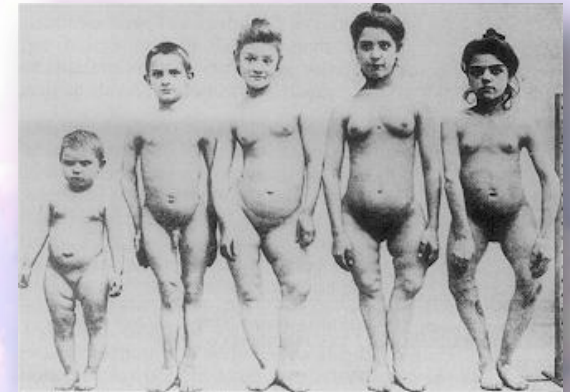
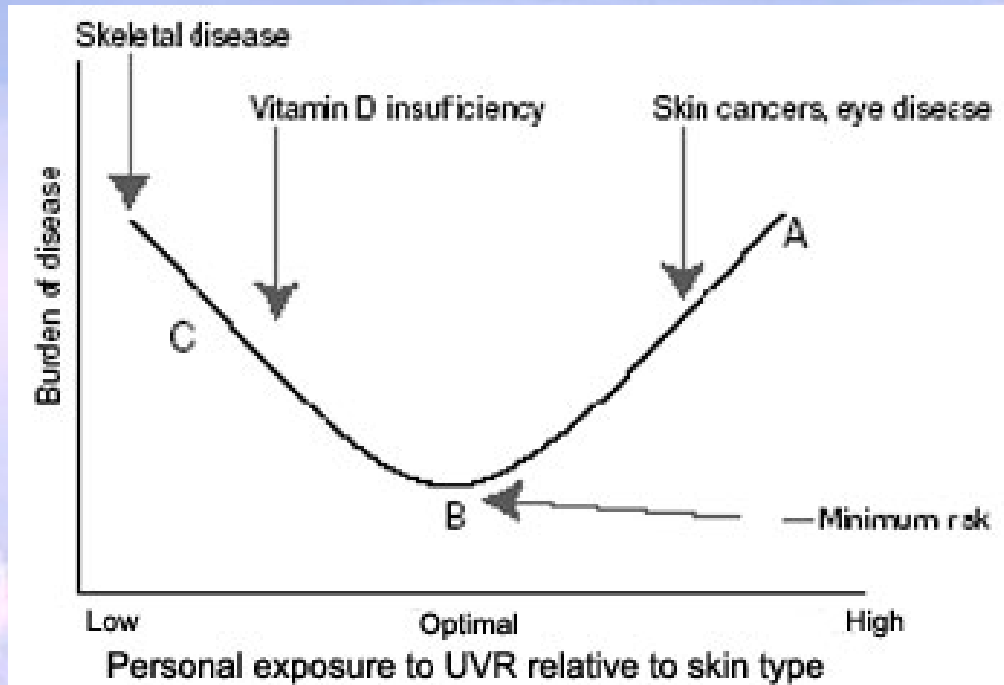
J/m²

Dávka UV záření, která snižuje počet přežívajících buněk (lidských fibroblastů) na 1/100 činí:

- **40-50 J/m² pro UV - C**
- **60-80 J/m² pro UV - B**
- **400 - 500 J/m² pro UV - A**

Biologické účinky UV záření na člověka

- **příznivé účinky UV záření – tvorba vitamínu D**, léčba některých chorob (lupénka, lupus vulgaris, některé ekzémy...)
- nedostatek vitamínu D + vápníku – **křivice** (rachitis)



Genetické důsledky UV záření

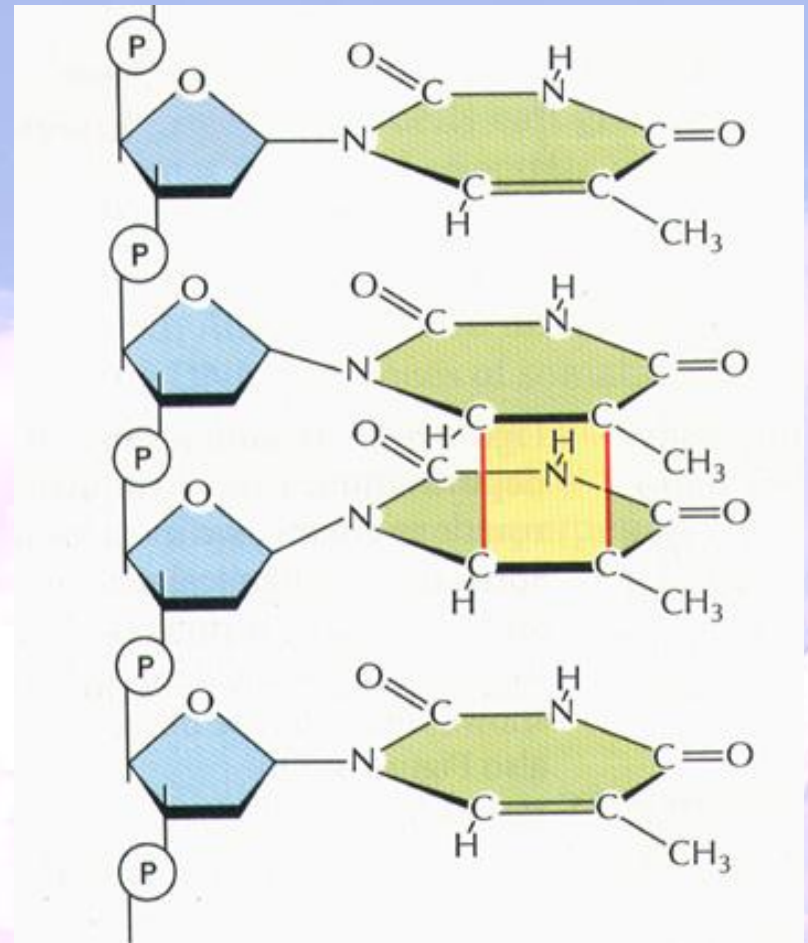
- UV záření představuje **neionizující** typ záření !!!
(molekula, která zachytila energii fotonu UV záření se dostává do **excitovaného stavu**)
 - UV záření indukuje tzv. **fotoléze**
 - existují tři hlavní mechanismy poškození DNA po účinku UV záření:
 - a) **absorbce UV záření – vznik fotolézí**
 - b) **poškození DNA zprostředkovaná působením UV záření a fotosenzitivátorů** (např. furokumariny)
 - c) **působení reaktivních kyslíkových radikálů (ROS)**
-

Typy poškození DNA po účinku UV záření

- 1. Cyklobutanové pyrimidinové diméry**
 - 2. 6' - 4' fotoprodukty**
 3. Monomerní poškození pyrimidinových bazí (cytosin hydrát, 8-hydroxydeoxyguanosin, tyminový glykol)
 4. Zlomy v DNA, křížové vazby
-

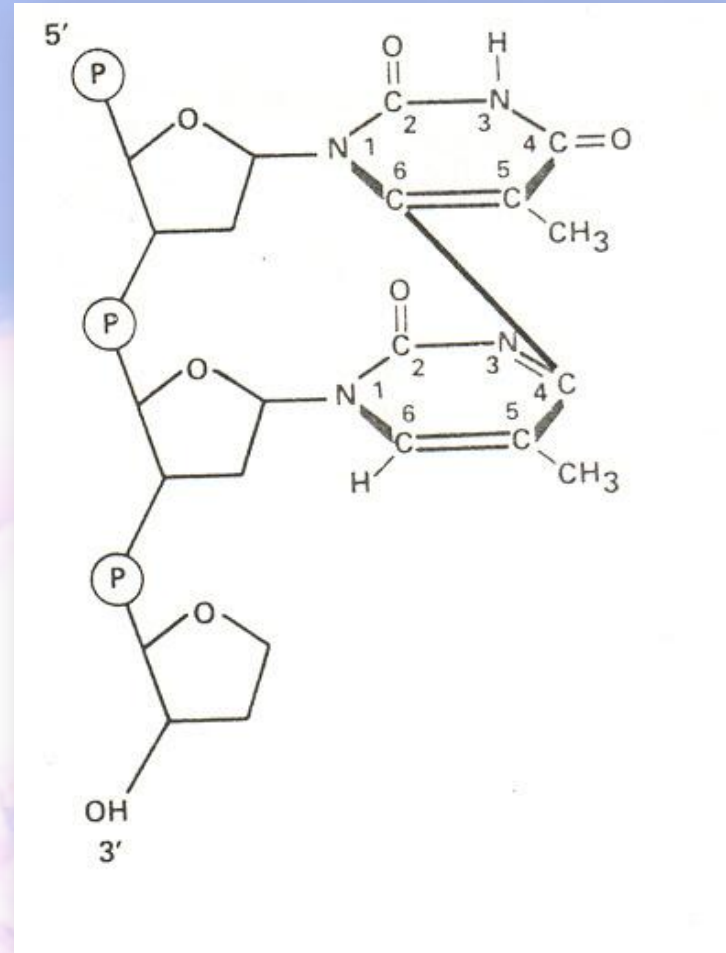
Cyklobutanové pyrimidinové diméry

- CPD vznikají v důsledku absorpce UV DNA záření vazbami mezi 5,6 C
- **nejčastěji typu TT, méně TC a CC**
- jejich přítomnost porušuje sekundární strukturu DNA a replikaci
- tvorba dimérů závisí na sekvenci okolních bazí v genomu (A-TT-A více CPD, A-TT-G méně CPD)



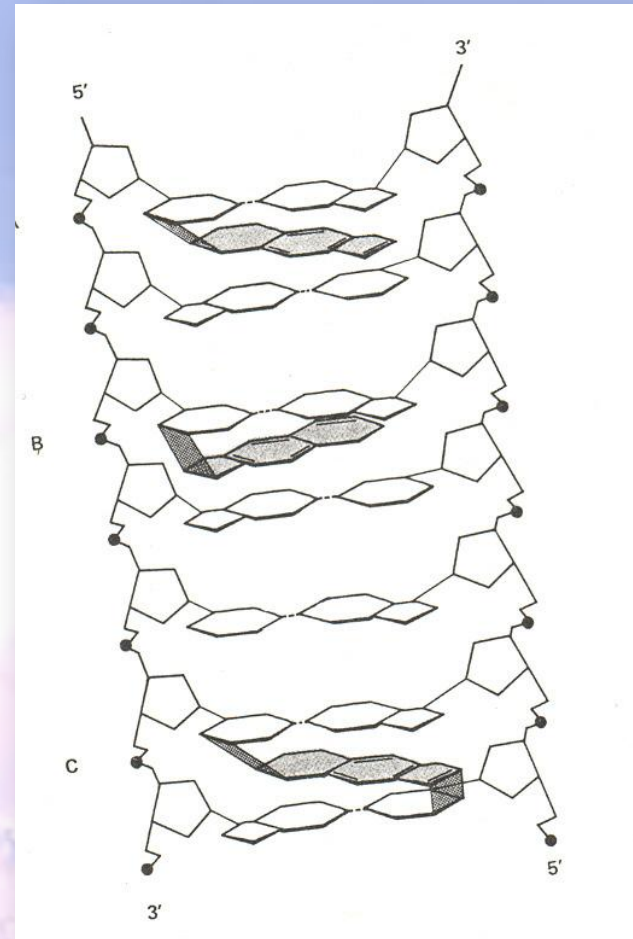
6' - 4' fotoprodukty

- druhý nejvýznamnější typ fotolézí
- výskyt 3 až 5x nižší v porovnání s CPD
- preferenčně mezi **TC**, méně častěji CC nebo TT
- více indukovány **UV-B** složkou záření



Fotoléze indukované fotosenzitivací

- **fotosenzitivátory** – po absorpci fotonu UV záření se stávají reaktivními a mohou reagovat s DNA (fotocykloadice)
- **furokumaríny** – např. psoralen vytvářejí mono- či bi- adukty s DNA (tymín)
- **tvorba křížových vazeb, porucha replikace**
- terapeutické využití – léčba lupénky
(angelicin, hematoporfyriny, promazin, metylénová modř, proflavin)



Biologické účinky UV záření na člověka

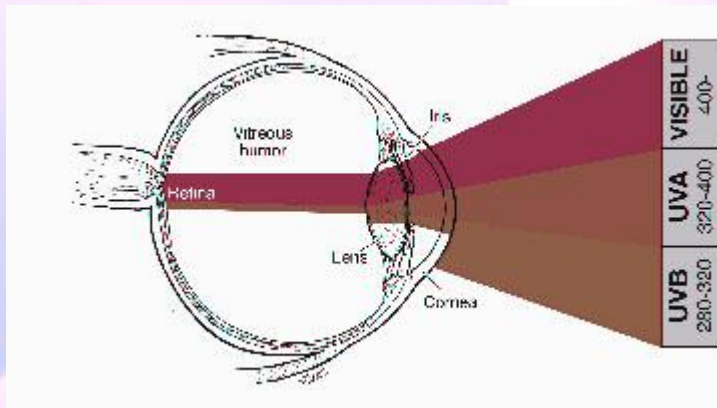
- **škodlivé účinky UV záření:**

- nádory kůže
 - předčasné stárnutí kůže
 - poškození očí
 - suprese imunitního systému
-

Škodlivý účinek UV záření na člověka – poškození očí

Poškození očí UV zářením – zánětlivé reakce:

- **fotokonjunktivitis** (zánět spojivek)
- **fotokeratitis** – zánět rohovky (extrémně „sněžná slepota“)
- pterygium (poškození víčka)
- **katarakta** – zákal oční čočky (maximum účinku záření 305 nm !!!)



Poškození kůže indukované UV zářením

Keratom, spinocelulární karcinom, bazicelulární karcinom



Copyright L. Schidler
Prof. Weber
www.curecancer.tv



Spinocelulární karcinom







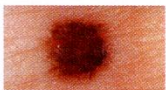
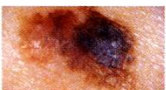

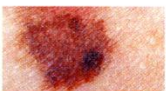

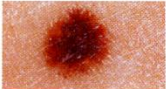
Bazicelulární karcinom

Nádory indukované UV zářením

Maligní melanom

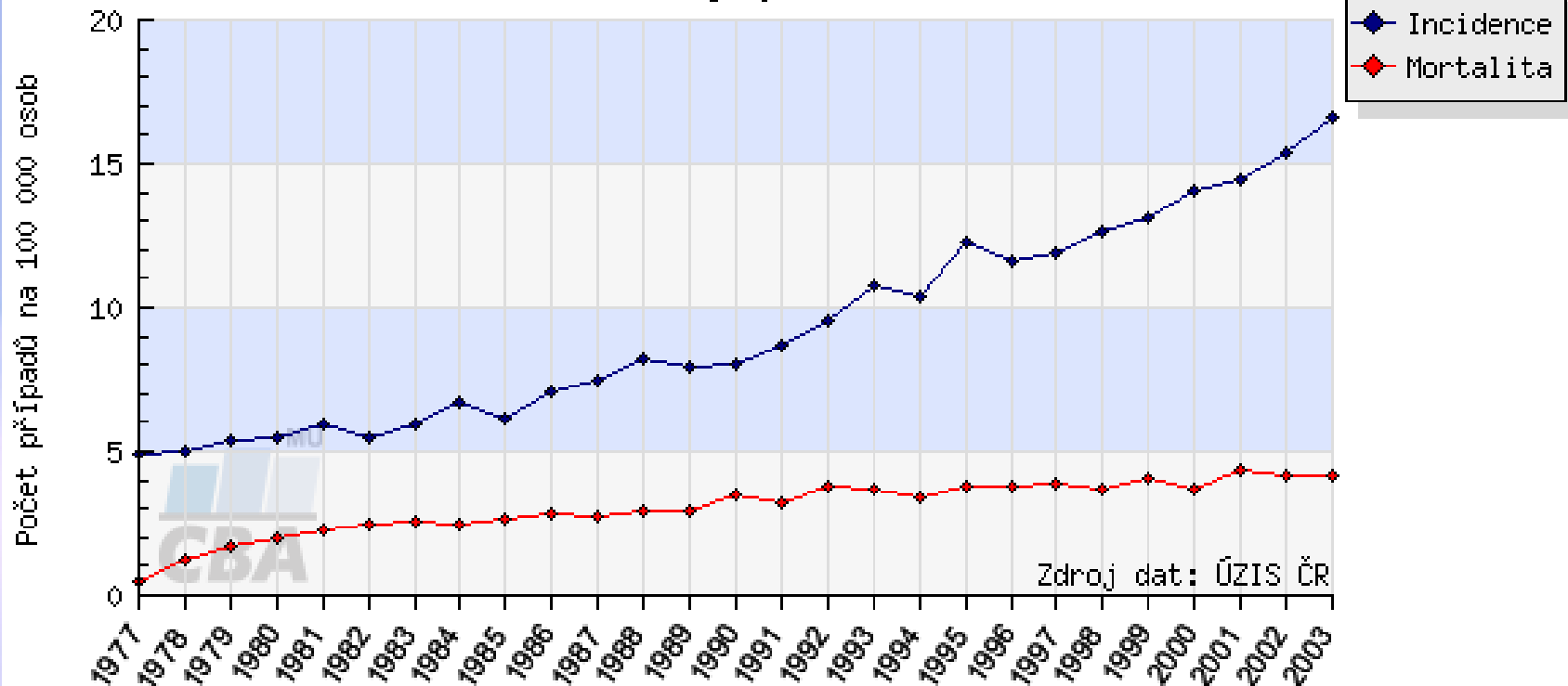


Jak rozpoznat maligní melanom

	Mateřské znaménko	Melanom
A symetrie Jaký je tvar?	 Spíše kulatý a symetrický	 Asymetrický
B orders (= okraje) Jak vypadají okraje?	 Pravidelný a geometrický	 Nepravidelný a neohraničený
C olor (= barva) Jaké je zbarvení?	 Jednobarevné	 Vícebarevné
D imension (= rozměr) Jaká je velikost?	 Malá velikost (< 5 mm)	 Velká velikost (> 5 mm)
E volution (= vývoj) Došlo v poslední době ke změnám popsaných kritérií?	 → 	

C43 - Zhoubný melanom kůže

Vývoj v čase



Analyzovaná data: N(inc)=25840, N(mor)=8474

<http://www.svod.cz>

Maligní melanom a mutace

- populační celoživotní riziko pro onemocnění zhoubným melanomem se u nás pohybuje kolem 1–1,5 %
- téměř u **50 %** všech případů melanomů nese aktivační mutaci v genu **BRAF**
- **v 80 % případů se jedná se o substituční mutace, které vedou k záměně valinu za kyselinu glutamovou (V600E). Tato mutace způsobuje zvýšení aktivity kinázy BRAF, která je příčinou konstitutivní aktivace MAPK signální dráhy**
- toto zjištění vedlo k vývoji molekulárního inhibitoru aktivovaného BRAF a v roce 2012 byl úspěšně schválen pro léčbu preparát **vemurafenib (Zelboraf)**
- **mezi dalšími geny, u nichž bývá v melanomech změna jejich aktivity nebo exprese, patří TP53, PTEN, CDKN2A, PTPRD a NRAS**

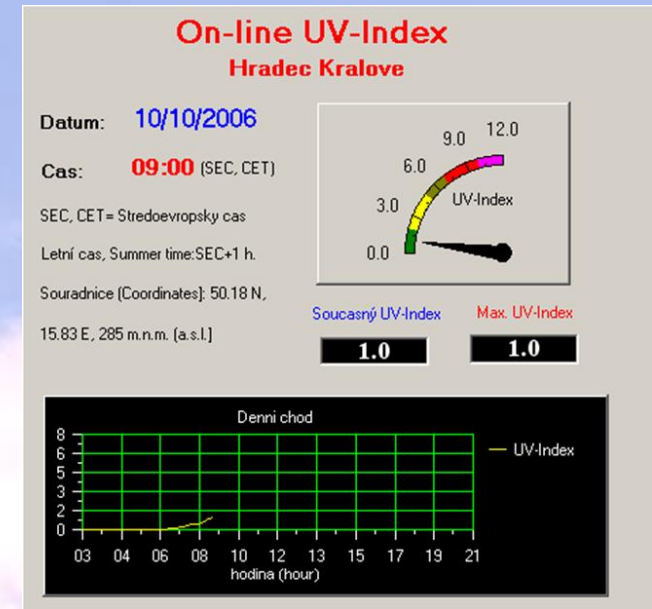


UV - index

- **UV-index** je mezinárodně standardizovaná bezrozměrná veličina charakterizující úroveň erytemového slunečního ultrafialového záření dopadající na zemský povrch, vyjadřující biologický efekt na lidské zdraví. Používá se k informovanosti obyvatelstva o možném negativním vlivu UV záření na lidský organismus. UV-index je definován na horizontální povrch. Obyvatelstvo je informováno nejen o očekávané maximální hodnotě
- **V naší geografické oblasti se UV-index pohybuje v rozmezí od 0 do 9, v tropickém pásu může dosáhnout až 15, nebo 16.**
- **Všeobecně se dá říci, že čím výše je Slunce nad obzorem (za jasného počasí), tím větší je UV-index. Čím větší UV-Index tím větší dávka UV záření.**

Hodnoty UV indexu

UV INDEX	ROZSAH
Nizký	< 2
Střední	3 - 5
Vysoký	6 - 7
Velmi vysoký	8 - 10
Extremní	11 +



UV Index	Kožní fototypy			
	I	II	III	IV
1 - 3	15	10	5	-
4 - 6	25	20	10	5
7 - 9	40	30	20	15
10 a více	50	40	30	20

Hodnoty slunečního ochranného faktoru (SPF) doporučené pro jednotlivé fototypy kůže při prvním opalování

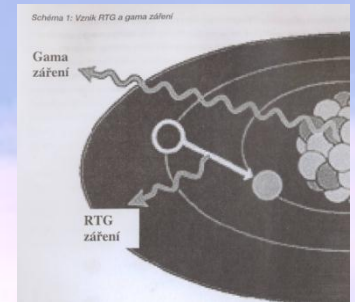
http://www.chmi.cz/meteo/ozon/UV_online.html



Ionizující záření

- pojem „záření“ – šíření **radiační energie**
- **radioaktivita** - důsledek radiačního rozpadu, při kterém se mění stav nebo složení atomových jader nuklidů:

- a) **rozpad vedoucí k dělení jádra na 2 nebo více částic**
(**U** → **Ra** → **Rn** + **α částice**)
- b) **rozpady způsobené samovolnou přeměnou jader**
(**neutron** → **proton** + **elektron**)
- c) **deexcitace jádra - přechodem jádra z vyššího do nižšího energetického stavu, přičemž se jádro zbavuje své excitační energie**



Ionizující záření – společná vlastnost ionizace hmoty – meziatomový pohyb elementárních částic, které mají dostatečnou energii na **ionizaci atomů**

Při průchodu hmotou dochází k absorpci záření → **řetěz fyzikálních, chemických a biologických změn**, které ovlivňují život buněk, tkání a organismů

Radiobiologie – věda o působení záření na biologické objekty

Radiobiologie

Prof. MUDr. RNDr. Ferdinand Herčík (1905-1966)

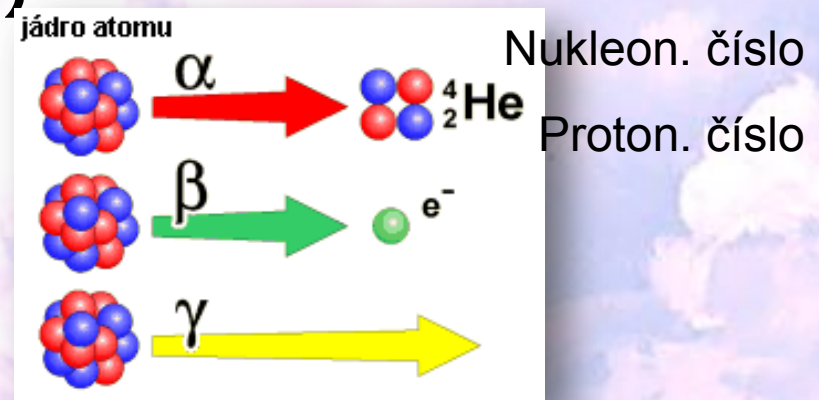
- se věnoval také výzkumu účinků záření na buňku a organismus. Jeho práce měly řadu mezinárodních vazeb, což mu přineslo i členství ve **Vědeckém výboru OSN pro zkoumání účinků záření** (včetně období ve funkci jeho předsedy) i funkci místopředsedy rady guvernérů v Mezinárodní agentuře pro atomovou energii ve Vídni.
- **1955 – založení Biofyzikálního ústavu AV ČR v Brně**

Zakladatel československého radiobiologického výzkumu



Typy ionizujícího záření – duální povaha

- **elektromagnetické** (vlnová délka 10^{-17} až 10^{-23} nm) – vzniká periodickou změnou elektrického a magnetického pole, které má původ v určitém zdroji a šíří se prostorem – **hmota ve formě energie** – částice **foton (paprsky X, γ -záření)**
- **korpuskulární** – tvoří proud rychle letících elementárních atomových částic, jader atomů, které mohou mít kladný či záporný náboj nebo mohou být neutrální (**elektrony, protony, neutrony, α -částice**)



Pojmy a jednotky k hodnocení radiační situace

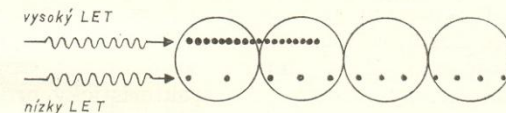
- **expozice** (tj. míra ionizace vzduchu)
 - **absorbovaná dávka** (tj. množství energie absorbované hmotou)
 - **dávkový příkon** – vyjádření absorbované dávky za jednotku času (Gy/h)
 - **dávkový ekvivalent** (tj. dávka vážená koeficienty, které charakterizují **relativní biologickou účinnost**)
 - **aktivita** - veličina používaná ke stanovení množství radionuklidů (**becquerel**) - počet radioaktivních přeměn za sekundu
-

Energie ionizujícího záření - LET

- **energie ionizujícího záření** se vyjadřuje **v elektronvoltech** (eV), (keV, MeV)
- 1 eV je energie, kterou získá elektron urychlený potenciálním spádem 1V
- **Lineární přenos energie** (Linear Energy Transfer – LET) vyjadřuje přenos energie na jednotku dráhy, vyjadřuje se v **MeV** **či keV/μm** – vztah k **hustotě ionizace** - (**hustě x řídce ionizující záření**)

Tabulka č. 1: Druhy záření ve vztahu k hustotě ionizace

Druh záření a energetická rozmezí	LET – hustota ionizace
Fotony, všechny energie	Nízká
Elektrony, všechny energie	Nízká
Neutrony, energie do 10 keV	Vysoká
Neutrony, energie 10 – 100 keV	Vysoká
Neutrony, energie 100 keV – 2 MeV	Velmi vysoká
Neutrony, energie 2 – 20 MeV	Vysoká
Neutrony, energie nad 20 MeV	Vysoká
Protony, energie 2 MeV	Vysoká
Alfa částice, štěpné fragmenty, těžká jádra	Velmi vysoká



Obr. 43. Znárodnenie relatívnej hustoty ionizácie v citlivom objeme pri vysokom a nízkom LET

Závislosť biologického účinku od hustoty ionizácie znázorňuje podľa zásahovej teórie obr. 43. Vidíme, že žiarenie nízkej ionizačnej hustoty produkuje difúznú ionizáciu v celom prostredí, kým častice s vysokým LET majú krátku dráhu a hustú ionizáciu, takže žiarenie nezasiahne niektoré zo znázornených citlivých objemov. Podľa zásahovej teórie sa môže biologický účinok dosiahnuť jednou ionizáciou v citlivom objeme, kým ostatné sú v ňom nepotrebné. Ak platí tento predpoklad — a zdá sa, že pre jednoduché chemické a biologické systémy áno —, žiarenie s níz-

Jednotky dávky ionizujícího záření

There are several units used to measure levels of ionizing radiation.

1. The Roentgen, **R** is a measure of the exposure dose to an ionizing radiation.
1 R = 2.58×10^{-4} C/kg (coulombs per kilogram) of dry air at STP (standard temperature and pressure)
Not used for particle radiation **1R = $2,083 \times 10^9$ iontových párů v 1 cm^3 vzduchu**
2. The radiation absorbed dose.
1 rad = 0.01 J/kg 100 rad = 1 Gy
Used for all types of ionizing radiation **Dávkový příkon - $\mu\text{G}/\text{hod}$**
3. The roentgen equivalent man.
rem = rad x QF (quality factor)
which adjusts the exposure to account for the biological effect of various types of radiation.
4. A convenient unit called the *dose equivalent* is the mSv (millisievert) The **sievert (Sv)** is an absorbed dose of 1J/kg (as stipulated by the International Commission on Radiological Protection)

The units of measurement are mSv (1 mSv = 100 mrem).

Jednotky dávky záření

- Jeden gray odpovídá **energii** záření jednoho **joule** absorbované jedním **kilogramem** látky.
 - $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg} = 1 \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-2}$
- Gray je **mírou fyzikálních účinků ionizujícího záření**, která nevyjadřuje jeho účinky na živé organismy. Např. ozáření celého těla člověka dávkou asi 10 až 20 Gy je smrtelné, ačkoliv odpovídá energii pouze asi 1 kJ, kterou lidský organismus získá asi ze čtvrt gramu cukru. **Naproti tomu sievert je jednotka, která má zahrnovat biologické účinky záření, v závislosti na druhu záření a jeho energii.**

EFEKTIVNÍ DÁVKA

- **Sievert** (Sv) je jednotkou dávkového ekvivalentu ionizujícího záření. Je pojmenována po **Rolfu Sievertovi**, průkopníkovi radiační ochrany.
- **1 Sv** je taková absorbovaná dávka, **která při jakémkoliv typu ionizujícího záření vyvolá** v organické látce **stejný biologický účinek**. Jednotkou je **J/kg** a vypočítá se jako **$D \times Q$** , kde **D** je dávka (Gy) a **Q** je **jakostní faktor**, různý pro různé organické látky a jednotlivé druhy ionizujícího záření. **Pro foton je $Q=1$.**

Typy záření a relativní biologický účinek (RBU)

DRUH ŽIARENIA

Použitý druh žiarenia a jeho energia rozhodujú nielen o priestorovom rozložení dávky, ale aj o biologickom účinku žiarenia. Na vyjadrenie biologickej účinnosti žiarenia sa používa pojem **RBE — relativný biologický efekt**. Faktor RBE udáva, koľkokrát je skúmané žiarenie biologicky účinnejšie ako lúče X alebo lúče γ . Vyjadruje sa pomerom dávok žiarenia (D) udanými v jednotkách rad, ktoré majú rovnaký biologický účinok:

$$RBE = \frac{D_X \text{ alebo } \gamma}{D \text{ porovnávané lúče}}$$

Predpokladajú sa pritom rovnaké ožarovacie podmienky — intenzita žiarenia, obsah kyslíka, zloženie prostredia a pod. Približné hodnoty RBE sú:

lúče X a lúče γ	1
lúče β	1
lúče α	10 — 20
pomalé a rýchle neutróny	5 — 10
protóny	10

Z týchto údajov vyplýva, že napr. rovnaká absorbovaná dávka žiarenia α je 10 — 20-násobne biologicky účinnejšia ako rovnaká dávka žiarenia γ .

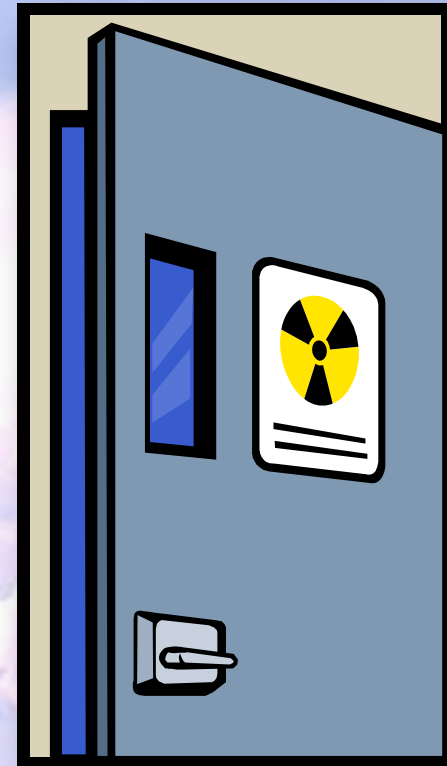
Pri každom druhu žiarenia sa faktor RBE mení pri zmene energie lúčov i pri zmene absorbujúceho biologického materiálu. Udávané hodnoty faktorov RBE sú len približné. Rozdiely sú aj pri fotónoch, ktorých základný faktor sa rovná hodnote jeden:

rtg lúče (200 kV)	1
lúče $\gamma^{60}\text{Co}$	0,8
lúče X (22 MeV)	0,7

jakostní faktor Q

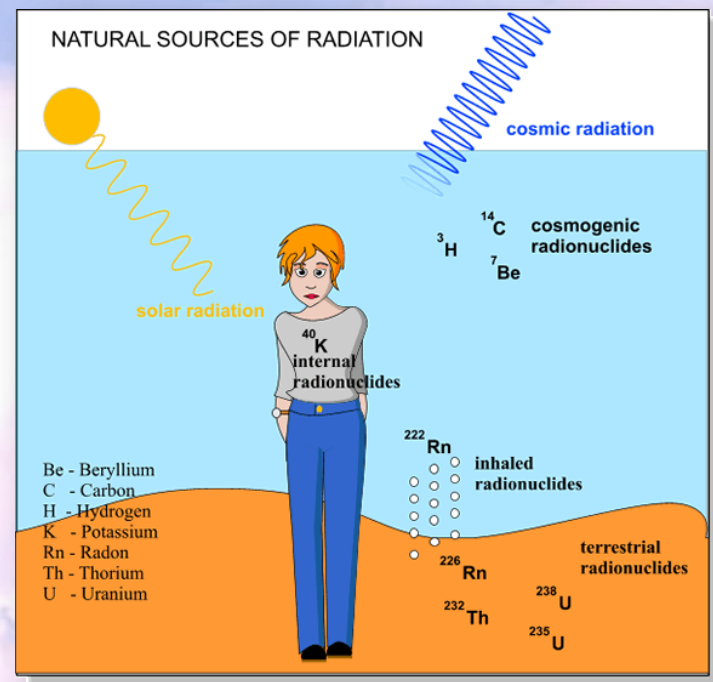
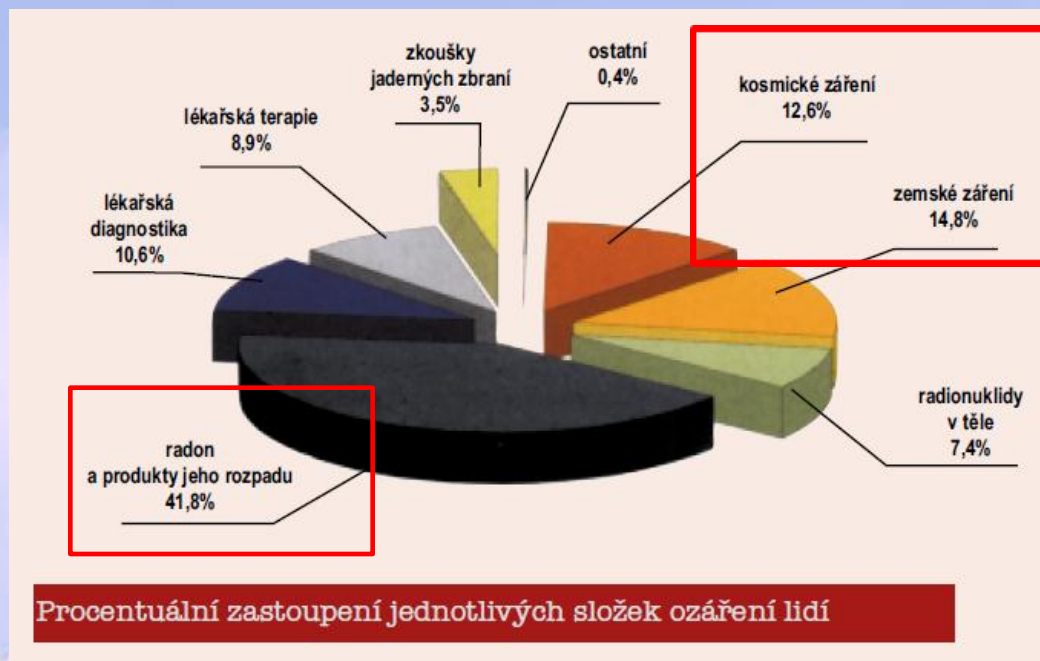
Zdroje záření

- **přírodních zdroje** - z kosmického záření a přírodních radionuklidů
- **umělé zdroje** - (lékařství)
- **vnější ozáření**
- **vnitřní ozáření**
(radionuklidy v lidském těle)



Zdroje ionizujícího záření

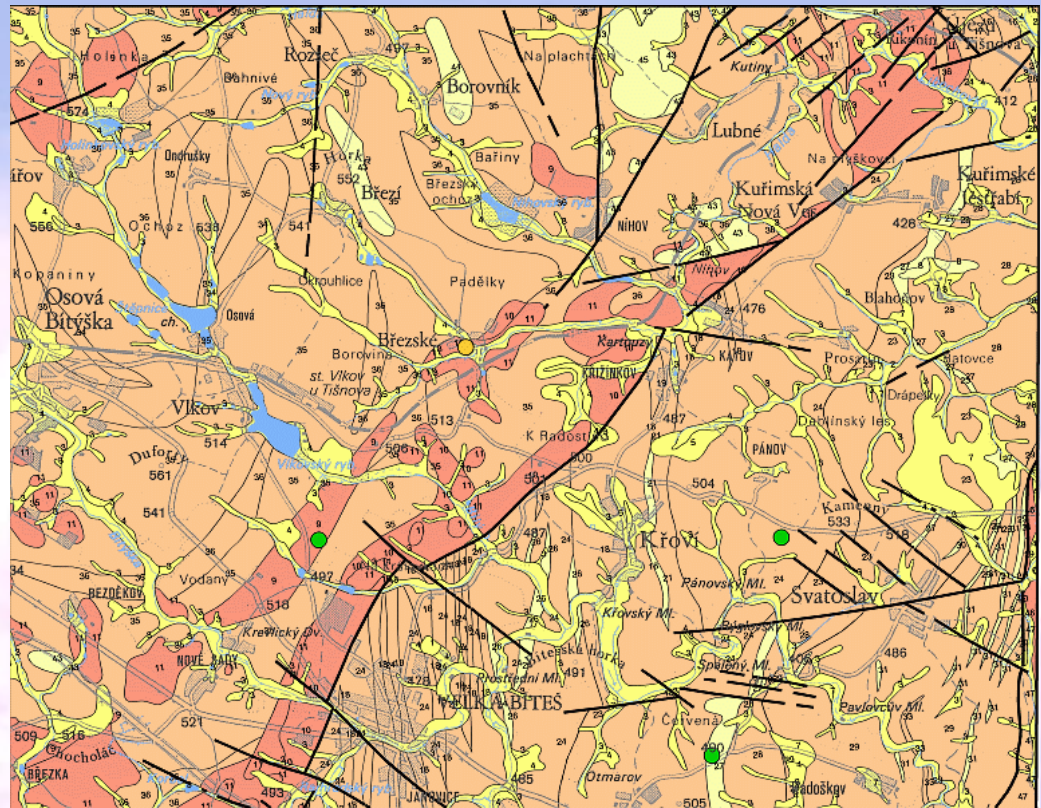
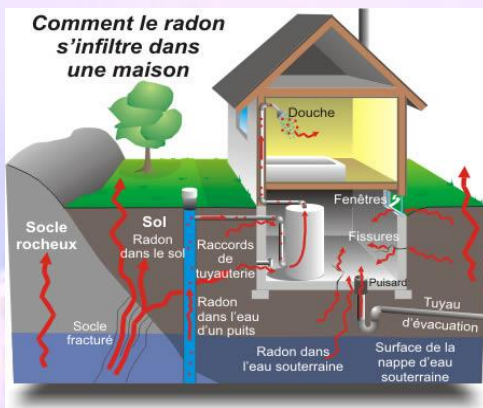
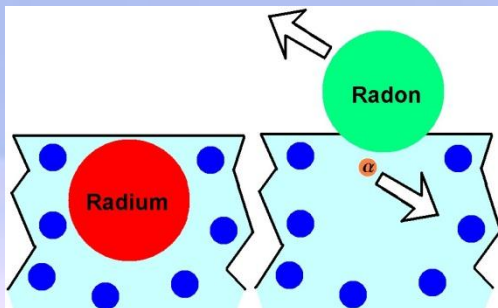
a) přirozené



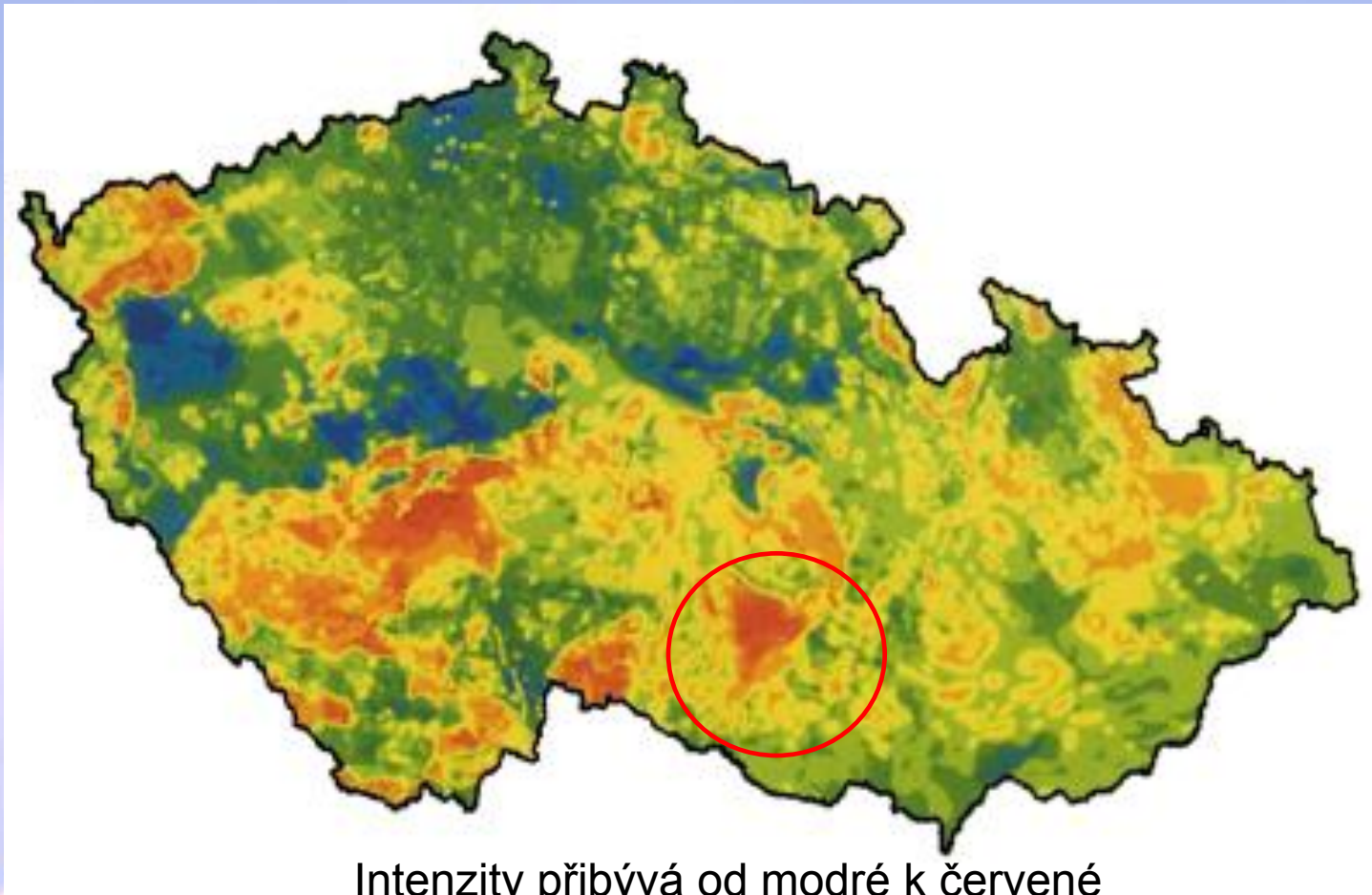
Přirozené zdroje ionizujícího záření radon Rn 222

- vyvěřelé magmatické horniny a zeminy, **stavební materiály, voda**
- **plyn rozpustný v tucích**, hromadění v kostní dřeni - leukémie

Rozpad: $U - {}^{226}\text{Ra} - {}^{222}\text{Rn} - \text{Po}$
(vyzáření α částice)



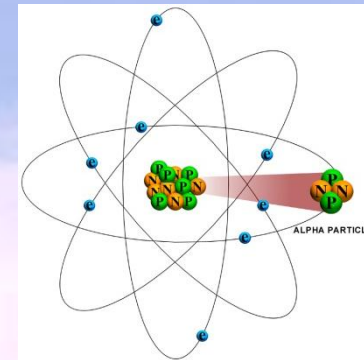
Intenzita radioaktivního záření povrchu v České republice



Intenzity přibývá od modré k červené

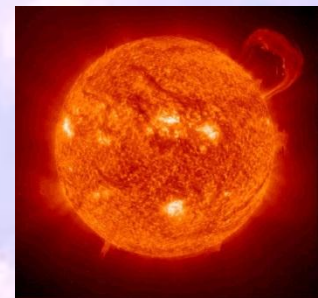
Radon a jeho účinky

- **Zdroje radonu**
(geologické podloží, stavební materiál, podzemní voda)
- **Radon a dům**
(Radon se hromadí pod základy domu a dosahuje vysokých koncentrací)
- **Vlastnosti a účinky radonu na lidský organismus**
(Radioaktivní plyn a jeho rozpadové produkty zůstávají v plicích a zhoubně působí na lidský organismus.)
- Dle dlouhodobých výzkumů a statistik se dá konstatovat, že ze sta případů onemocnění rakovinou plic přichází **84 % na vrub kouření** a zbývajících **16 % právě na choroby z ozáření radonem** a jeho rozpadovými produkty.
- **Radon a ochrana**
Existují dva základní pohledy na tuto problematiku. Při ochraně objektů se používá buď pasivní nebo aktivní ochrana. **Pasivní ochrana** spočívá v položení protiradonových izolací do podlah a základových desek. **Aktivní ochrana** spočívá v prováděném trvalém odvětrání jednotlivých obytných místností pomocí ventilace instalované v celém objektu.



Přirozené zdroje ionizujícího záření kosmické záření

- **Kosmické záření** je proud energetických částic pocházejících z kosmu, pohybujících se vysokou rychlostí a dopadajících do zemské atmosféry. Jedná se především o:
 - protony (85 až 90 %) a jádra hélia (9 až 14 %). Zbytek tvoří elektrony, jádra jiných atomů a další elementární částice.
- **Sluneční záření** – urychlené protony



Přirozené zdroje ionizujícího záření kosmické záření

Cosmic Radiation



Cosmic radiation comes from our sun, supernovas, and quasars. Earth's atmosphere is very good at shielding cosmic radiation, but some places on earth receive more radiation than others because the thickness of the atmosphere varies from place to



You may also be exposed to cosmic radiation during air travel. Jets that fly above 60,000 feet are required to have a radiation detector in the cockpit to warn crews of high radiation levels.

To estimate in flight radiation dose, click [here](#).

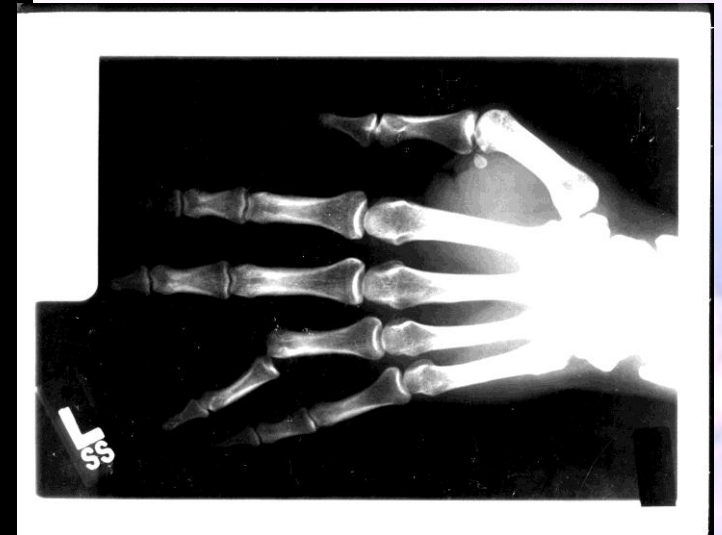
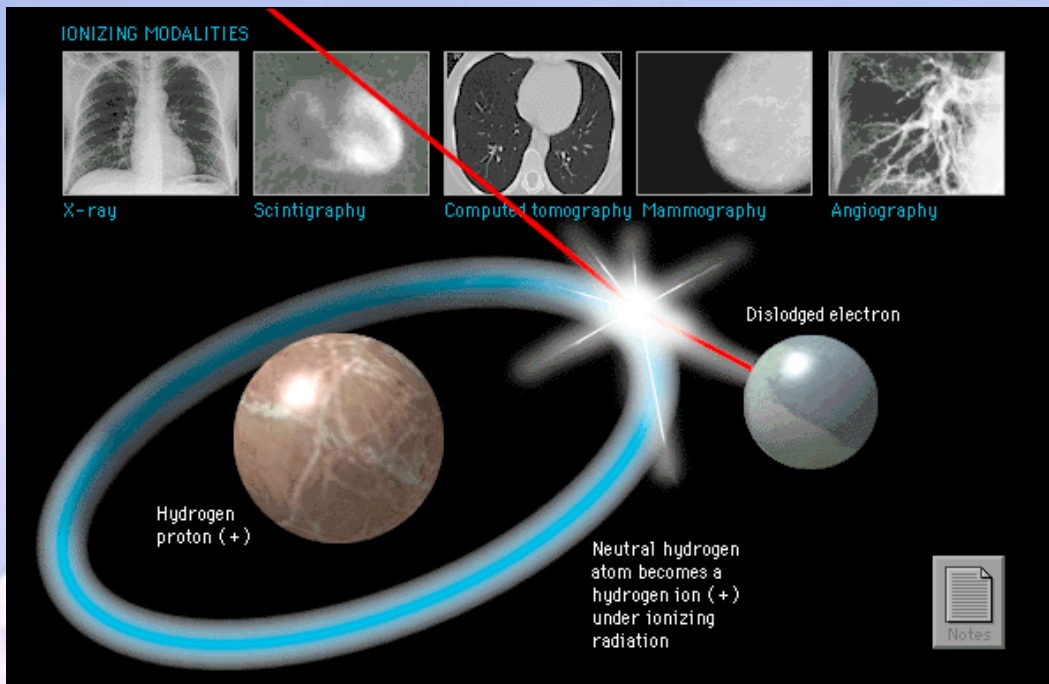


Average Radiation Doses of the Flight
Crews for the Apollo Missions

Apollo Mission	Skin Dose, rads
7	0.16
8	.16
9	.20
10	.48
11	.18
12	.58
13	.24
14	1.14
15	.30
16	.51
17	.55

Využití ionizujícího záření v lékařství

- **diagnostika**
- **terapie** - celotělové/lokalizované ozáření, využití radioizotopů – př. štítná žláza



Tab. 1 Typické hodnoty efektivních dávek pro vybraná konvenční rentgenová a CT vyšetření

Diagnostický výkon		Typické efektivní dávky (mSv)	Přibližná doba pro stejné ozáření z přírodních zdrojů
<i>Konvenční rentgenová vyšetření</i>	Končetiny a klouby	< 0,01	< 1,5 dne
	Plíce (jeden PA snímek)	0,02	3 dny
	Lebka	0,07	11 dní
	Mamografie (skreening)	0,1	15 dnů
	Kyčle	0,3	7 týdnů
	Pánev, hrudní páteř	0,7	4 měsíce
	Břicho	1,0	6 měsíců
	Bederní páteř	1,3	7 měsíců
	Polykací akt	1,5	8 měsíců
	IVU	2,5	14 měsíců
	Vyšetření žaludku, střevní pasáž	3	16 měsíců
	Irigoskopie	7	3,2 roku
<i>CT vyšetření</i>	CT hlavy	2,3	1 rok
	CT hrudníku	8	3,6 roku
	CT břicha nebo pánve	10	4,5 roku

Mamograf a záření ?

- **Obavy z ozáření v rámci mamografického screeningu nejsou na místě**

Riziko vzniku rakoviny prsu v důsledku ozáření při mamografickém vyšetření je jen nepatrné v porovnání s přínosem této metody, která každoročně zachrání mnoho životů. Vyplývá to z nové studie, která již byla publikována on-line a bude zveřejněna v lednovém čísle odborného časopisu *Radiology*.

- **Dávka 3,7 mGy, tj asi 0,15 mSv**
- Z výsledků vyplynulo, že každoroční screening u žen ve věkové skupině 40–55 let a screening ve dvouletých intervalech u žen ve věkové skupině 56–74 let, by na **100 000 žen**, z nichž každá dostala dávku záření 3,7 mGy do každého prsu, měl za následek **86 případů rakoviny prsu vyvolaných zářením**, 11 fatálních případů rakoviny prsu, a 136 ztracených let života. Zároveň však vyšlo najevo, že časná detekce by u téže kohorty zachránila **497 životů a ušetřila 10 670 let života.**

Radiační dávky

- Ionizující nebezpečné záření vyjadřujeme dávkovým ekvivalentem v sievertch. Za rok obdrží člověk přirozenou dávku **2,5 až 3,0 mSv**. K této hodnotě je potřeba připočítat individuální dávkový ekvivalent. Tak např. člověk sledující **televizi 1 hodinu denně si připočítá 0,01 mSv za rok**, člověk žijící v okolí uhelné elektrárny navíc 0,01 mSv za rok, člověk žijící v okolí jaderné elektrárny 0,002 až 0,005 mSv za rok, atd. (ozáření z mikrovlnky, počítače, mobilu, u lékaře, aj.) **Havárie v Černobylu vyzářila kolem 300 000 mSv**.
 - Přírodní pozadí se na některých místech světa **vyznačuje zvýšenou radioaktivitou** hornin. Na těchto místech žijí trvale statisíce lidí bez jakékoliv újmy způsobené zářením. Dávky ozáření a limity lze vidět z následující tabulky.
 - **limit pro pracovníka se zářením 50 mSv/rok**
 - **přírodní radiační pozadí občana ČR 2,5 až 3 mSv/rok**
 - přírodní radiační pozadí občana Kerali v Indii **17 mSv/rok**
 - přírodní radiační pozadí občana Guapari v Brazílii **175 mSv/rok**
 - přírodní radiační pozadí občana Ramsaru v Iránu **400 mSv/rok**
 - pracovník JE Dukovany obdrží 0,4 mSv/rok
 - obyvatelstvo v okolí JE Dukovany obdrží 0,005 mSv/rok
 - **3 lety nadzvukovým letadlem Praha - USA 0,38 mSv/rok**
-

Použití radioizotopů v biologii – nejčastěji beta zářiče

- **Beta zářiče** – dolet ve vzduchu i 1 m, pronikavost ve tkáni několik mm
- např. značení DNA – autoradiografie
- použití **$^3\text{HdTh}$, ^{32}P**

Metody stanovení délky buněčného cyklu.

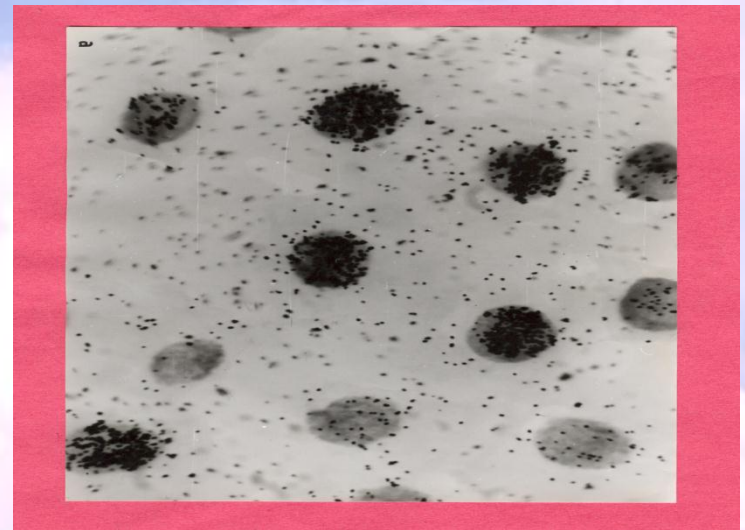
a) metody autoradiografické.

Princip autoradiografické metody stanovení délky buněčného cyklu:

- hodnocení četnosti značených mitóz v závislosti na čase

Postup:

1. Kultivace buněk v roztoku obsahujícím radioaktivní látku. (pulzní značení)
2. Odběr materiálu, fixace (usmrcení buněk).
3. Hydrolýza v 1 N HCl při 60 °C.
4. Barvení chromosomů v Schiffově reagens (Feulgenova reakce).
5. Zhotovení roztlačkových preparátů - sušení.
6. Nanášení radioaktivní emulze (dipping, stripping metoda) - Ilford, Kodak.
7. Expozice ve tmě (10 - 21 dnů).
8. Vyvolávání, ustalování, vypírání autoradiogramů.
9. Hodnocení autoradiogramů.
10. Grafické vyjádření počtu značených mitóz v závislosti na čase, odhad parametrů jednotlivých fází buněčného cyklu.



Ionizující záření a jaderná energetika

- výpustě jaderných elektráren
- radioaktivní odpad (96 % uran 235, 1% plutonium, izotopy **stroncía a cesia**)
Dukovany - 56 tun ročně !!!
- **havárie JE** – únik radioaktivních látek

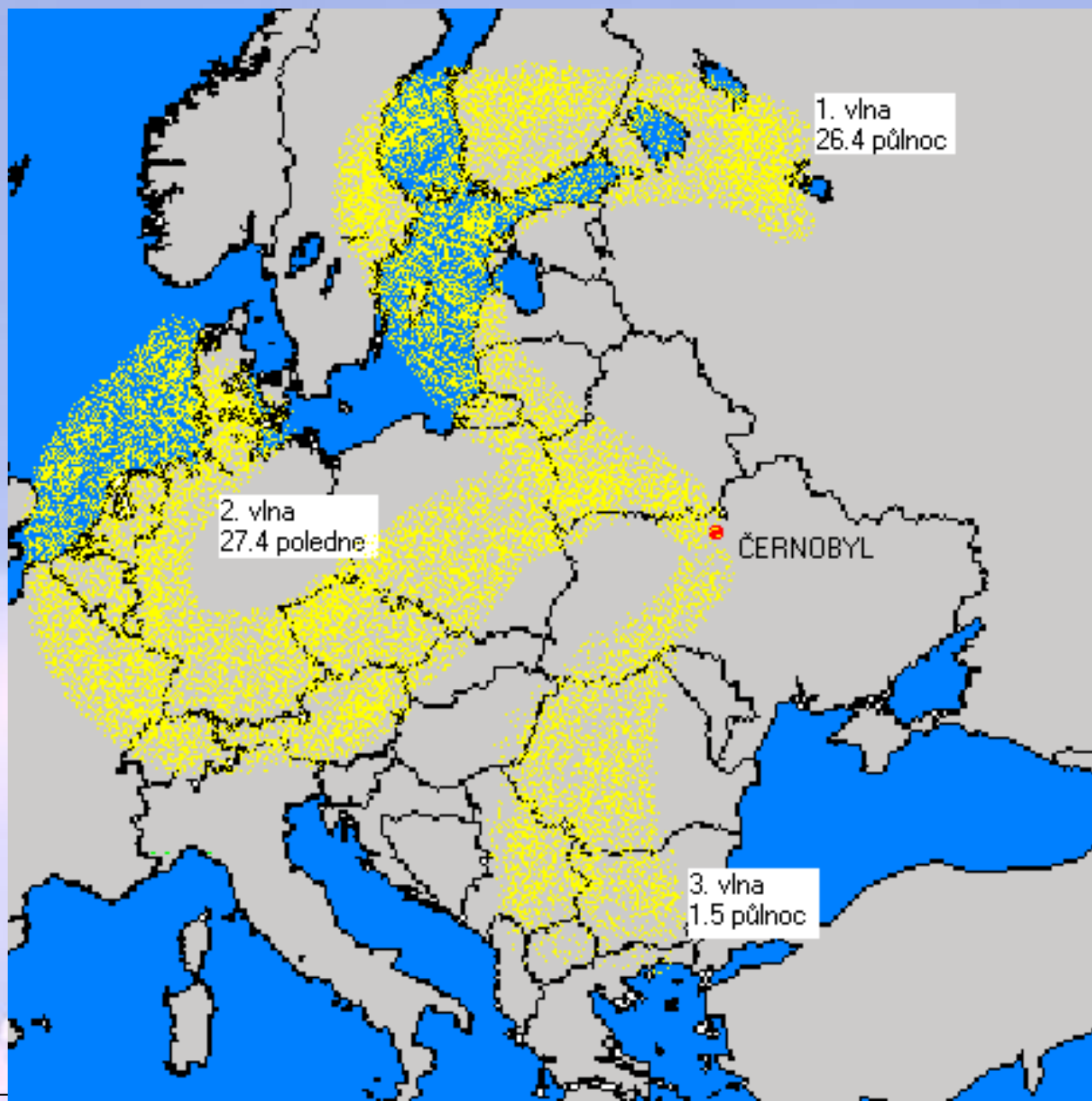


Havárie jaderné elektrárny v Černobylu



- **Černobyl** – 26. duben 1986
- únik radioaktivity $1-2 \cdot 10^{18}$ Bq
- **ekvivalent 90 atom. bomb** svržených na Hirošimu
- evakuace 135 000 obyvatel/30 km
- kolektivní dávka $1,6 \cdot 10^4$ Sv

Příčiny: odpojení automatického havarijního systému, provoz na nepřipustně nízkých hladinách výkonu, selhání obsluhy



Černobyl a ČR

- Následky jaderné havárie elektrárny Černobyl byly patrné i na území tehdejší ČSSR. Kontaminované vzdušné masy a s nimi **postupující radioaktivní zamoření se k nám dostaly z východu a později naše území zasáhly ještě jednou poté, co se vzdušná vlna odrazila od Alp a putovala zpět směrem na Polsko.**
- První znaky signalizující radioaktivní zamoření v důsledku příchodu kontaminovaných vzdušných mas, přicházejících z Černobylu, zachytili pracovníci [Jaderné elektrárny Dukovany](#), a to v průběhu noci z 29. 4. na 30. 4. 1986. Později toho dne také započala měření Krajských hygienických stanic a pracovišť Institutu hygieny a epidemiologie.
- Ze zdravotního hlediska nejdůležitějšími radioaktivními látkami způsobující radioaktivní zamoření byly **cesium a jód. Jód s poločasem rozpadu 8 dní mohl být potenciálně nebezpečný pouze v prvních dnech po havárii. Cesium s poločasem rozpadu 30 let se dostalo do potravinového řetězce. Nejvyšší** objemové aktivity jódu na našem území byly naměřeny ve dnech 30. 4. a 1. 5. 1986.
- Úřady v ČSSR vyvíjely snahu **omezit radioaktivní zamoření potravin**, když největší kontaminace radioaktivním jódem byla očekávána u **mléka a čerstvé listové zeleniny**. Dne 3. května bylo rozhodnuto o preventivních opatřeních ke snížení následků jaderné havárie, například při krmení dojnic. Podle věrohodných zpráv ale nebyla vždy správně uplatňována.

- Za jednoznačně prokázaný pozdní účinek havárie v Černobylu, jehož příčinou je radioaktivní zamoření, je považován **zvýšený výskyt rakoviny štítné žlázy u jedinců ozářených v dětském věku (tzn. do 18 let věku)**. Šlo o děti z Běloruska a v menší míře z Ruska a Ukrajiny, které byly zasaženy **radioaktivním jódem (I131)** jak vdechnutím, tak zejména v důsledku pití mléka od krav, které se pásly na kontaminované trávě.
 - Ve skupině **přímých likvidátorů jaderné havárie** (tedy zaměstnanci, hasiči, záchranáři, asanační pracovníci, atd.), kteří byli zasaženi vyšší dávkou radiace (v průměru 107 mSv), byla zaznamenána **zvýšená úmrtnost způsobená leukémií, jinými nádorovými nemocemi či nemocemi oběhového systému vyvolanými radiací** v důsledku jaderné havárie. Počet takovýchto úmrtí byl odhadován na zhruba 230.
-

Odborníci radikálně snížili počet obětí Černobylu

- **Trosky Černobylu stále ohrožují lidi žijící okolo jaderné elektrárny.**
foto: <http://www.seminaire-sherbrooke.qc.ca>
- Odborníci odhadují, že v souvislosti s výbuchem v ukrajinské jaderné elektrárně Černobyl, zahynuly asi **4 tisíce lidí**. Podstatně tak snížili předešlé statistiky, jež hovořily o desítkách tisících mrtvých.
Informaci zveřejnila OSN.
- 6.9. 2005 16:22
- **VÍDEŇ - Ozáření přímo podleho 59 lidí, z toho dva lidé zahynuli při explozi a 28 dalších ještě v roce 1986. Dalších 3940 zahynulo během následujících měsíců a let na rakovinu.**
- **"Celkově mohlo kvůli vystavení radiaci zemřít 4000 lidí,"** píše se ve zprávě, která by měla být v úterý a ve středu představena na mezinárodní konferenci jaderných expertů ve Vídni. Podle ní vysoká dávka záření zasáhla asi **600 tisíc osob**. Šlo většinou o pracovníky elektrárny, záchranáře, hasiče a obyvatelé žijící v okolí vybuchlého reaktoru.
- **"Dopady neštěstí na lidské zdraví byly strašlivé, ale celkově vzato nebyly jeho účinky na veřejné zdraví zdaleka tak vážné, jak se myslelo původně,"** uvádí ve zprávě Michael Repacholi ze Světové zdravotnické organizace (WHO). Zpráva uvádí, že míra radiace v 30 kilometrovém okruhu u Černobylu se dostává do běžných hodnot.

Fukushima 11.3.2011 - poškození 4 reaktorů



Jaderné zbraně a ionizující záření

Jaderné zbraně:

A) v užším smyslu

1. Štěpné zbraně s obsahem ^{235}U nebo ^{239}Pu – výbuch - řetězová reakce štěpného materiálu (ekvivalent desítek a stovek TNT)

2. Termonukleární zbraň (vodíková bomba) – výbuch – spuštění jaderné syntézy (ekvivalent megatun TNT)

3. Neutronové zbraně – kombinace předchozích zbraní – štěpný materiál **americium** či **californium**. Energie se uvoňuje ve formě ionizujícího záření s převahou **neutronů**

B) izotopické zbraně – jakékoliv zařízení způsobující kontaminaci prostředí radioaktivními látkami bez použití jaderné detonace (tzv. „špinavá bomba“). Poškození organismu **radionuklidy** – ^{137}Cs , ^{90}Sr a ^{131}I .

Radioaktivní stopa

Radioaktivní částice vznikající při výbuchu obsahují:

- **směs štěpných produktů, sublimované předměty, zemina, nerozštěpený materiál**

Radioaktivní spad:

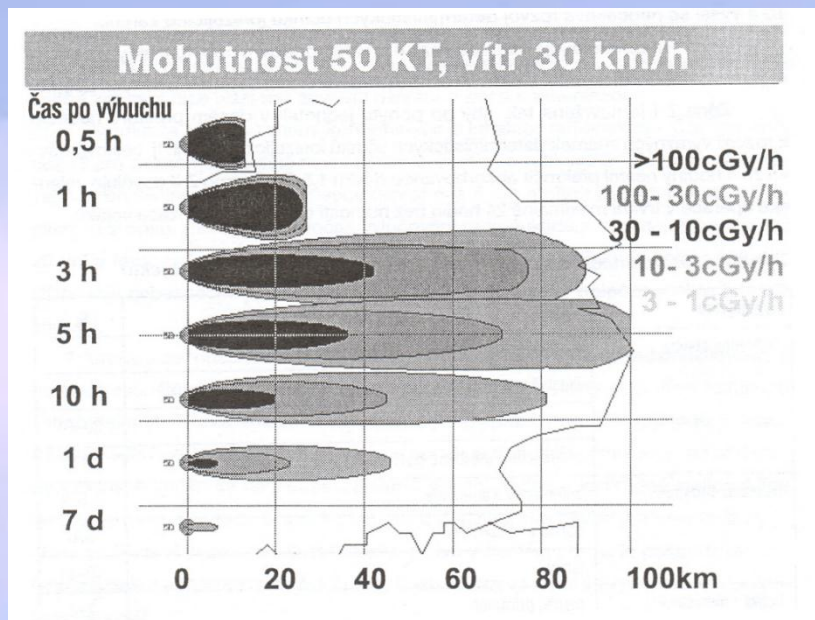
- **lokální** (obsahuje částice nad velikost 20-40 μm)
- **globální** (obsahuje částice 20 μm a menší, které rychle stoupají do stratosféry a jsou unášeny větrnými proudy)

Radionuklidy obsažené v radioaktivním mraku lze rozdělit na:

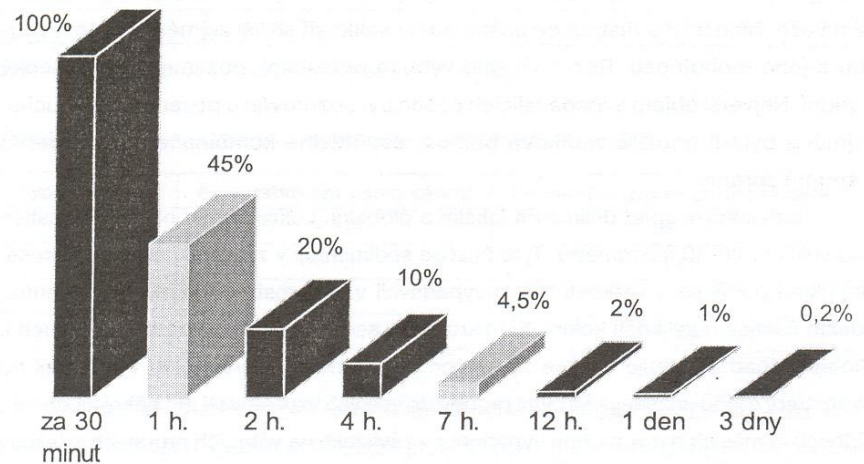
- nevstřebatelné** nebo málo vstřebatelné – těžké kovy, lanthanoidy, transurany
- středně dobře vstřebatelné** – alkalické prvky – **stroncium**, barium
- velmi dobře vstřebatelné** – **cesium a jód** – **štítná žláza** (vytěsňuje vápník z kostí)

Radioaktivní stopa – úroveň ozáření „sedmičkové pravidlo“

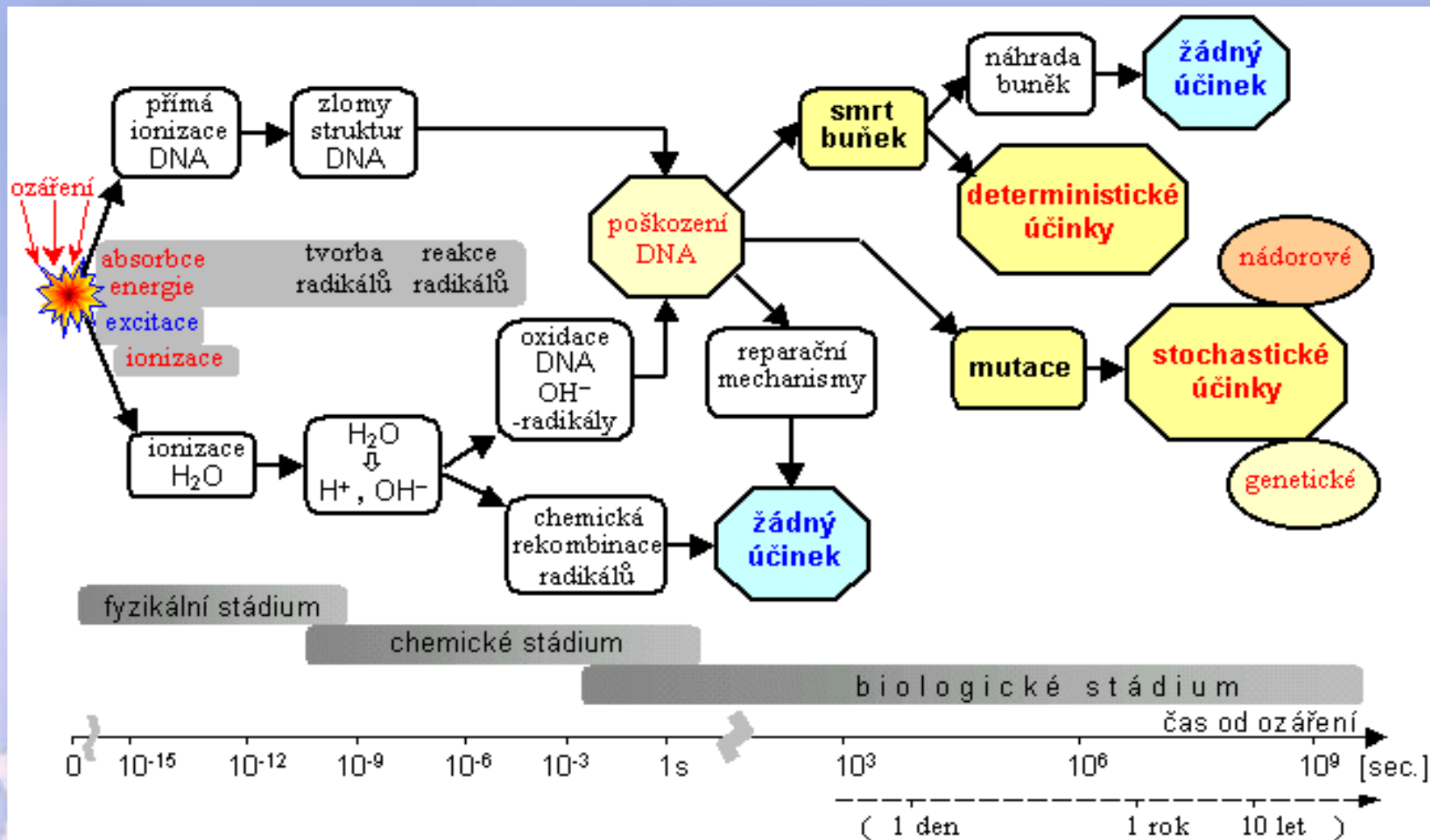
Úroveň dávkového příkonu **poklesne desetinásobně** za sedminásobný čas od výbuchu



Graf č. 2: Přibližná dynamika dávkového příkonu směsi štěpných produktů potvrzujících tzv. sedmičkové pravidlo



Účinky ionizujícího záření na molekulární a buněčné úrovni

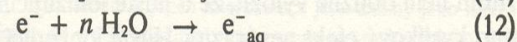
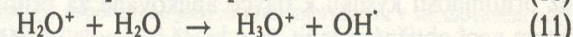
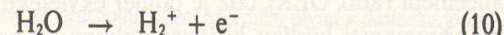


Nepřímý účinek záření (radikálová teorie)

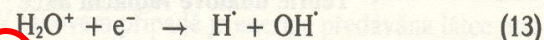
**Biologický materiál – tvořen
ze 70 % H₂O !!!**

Volné radikály jsou vysoce reaktivní částice, které mají ve své struktuře **nepárový elektron**, takže vstupují snadno do řady reakcí, např. s vodíkem nebo s nenasycenými vazbami organických molekul

Ionizující záření způsobuje ve vodě **radiolýzu**. Při ní se uplatňují zejména tyto reakce (volný radikál se značí tečkou u chemického symbolu):



V reakci 11 vzniká **hydroxylový radikál OH[·]**, který má oxidační schopnosti, v reakci 12 vzniká **hydratovaný elektron e_{aq}⁻**, který redukuje. Hydroxylový radikál, který představuje hlavní oxidační produkt radiolýzy vody, vzniká také jinými reakcemi, např.



Vodíkový radikál H[·] má zvláštní význam v tom, že může působit redukčně i oxidačně. **Na přítomnosti kyslíku vzniká z něho silně oxidačně působící hydroperoxylový radikál HO₂[·]**:

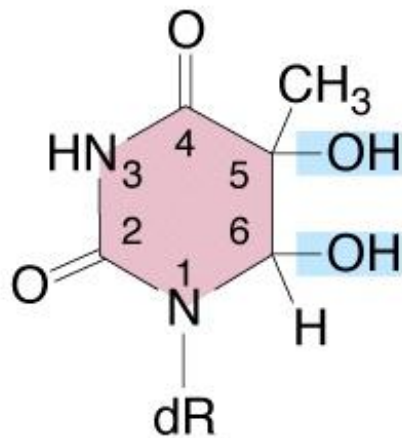


Vzniklé radikály vstupují do dvou typů reakcí, které jsou ve vzájemné kompetici. Mohou jednak reagovat s molekulami rozpuštěné látky, jednak vstupovat do vzájemných reakcí radikálů vzniklých radiolýzou vody (rekombinace radikálů). O podílu těchto dvou procesů a výsledném působení radikálů rozhodují další podmínky.

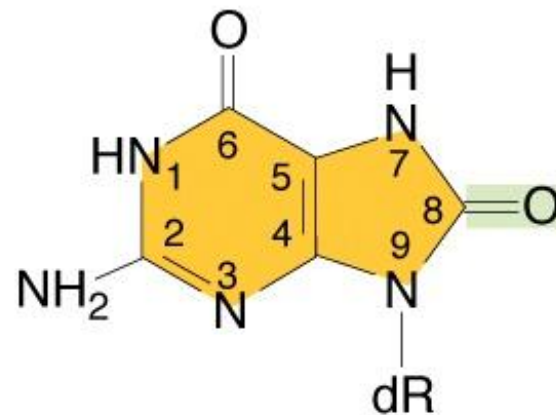
Při uvážení všech proměnných podmíňujících vznik a další kinetiku volných radikálů je zřejmé, že **v ozářené tkáni nemusí dojít k rovnocennému uplatnění redukujících a oxidujících částic. Při běžných podmínkách ozáření převládá v živých systémech účinek hydroxylových a hydroperoxylových radikálů**, které jsou v ozářené tkáni v nadbytku. Tyto radikály zprostředkují dalšími reakcemi peroxidické změny funkčně významných makromolekul v buňce. Teorie nepřímého

Příklady oxidativní poškození bází DNA

DNA



Thymidine glycol



8-Oxo-7-hydrodeoxyguanosine
(8-oxodG)

párování s C a A

Biologické účinky ionizujícího záření

- dávka 1000 rad – zvýší teplotu těla u člověka pouze o 0,002 °C, ale způsobí smrt !!!

PROČ ?

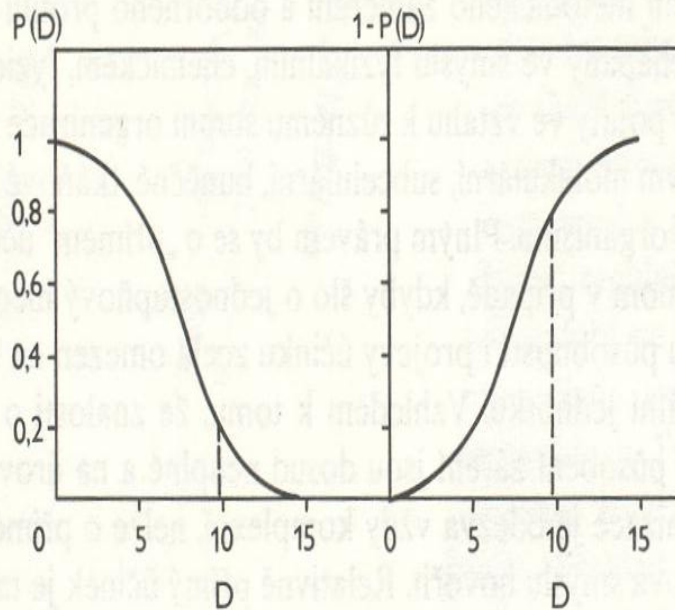
Vysvětlení:

Zásahová teorie – vytvořena na základě interpretace křivek přežití

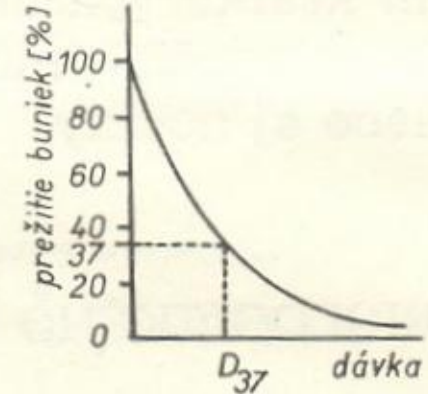
- předpoklad výskytu **citlivého terče** v buňce (jádro), jehož zásah zničí buňku – na poškození stačí **jediný zásah**
- na porovnávání radiosenzitivity rozličných buněk se používá **charakteristická dávka D_{37}** (přežívá 37 % ozářených buněk – **při průměrném 1 zásahu** citlivého terče)



Křivky přežívání



Obr. 5. Základní tvar křivky přežití $P(D)$ a poškození $1 - P(D)$ v lineárním systému souřadnic. Čárkováním je vyznačena na vodorovné ose dávka způsobující přežití 20 %, tj. zánik 80 % ozářených elementů.



Obr. 33. Krivka prežívania buniek

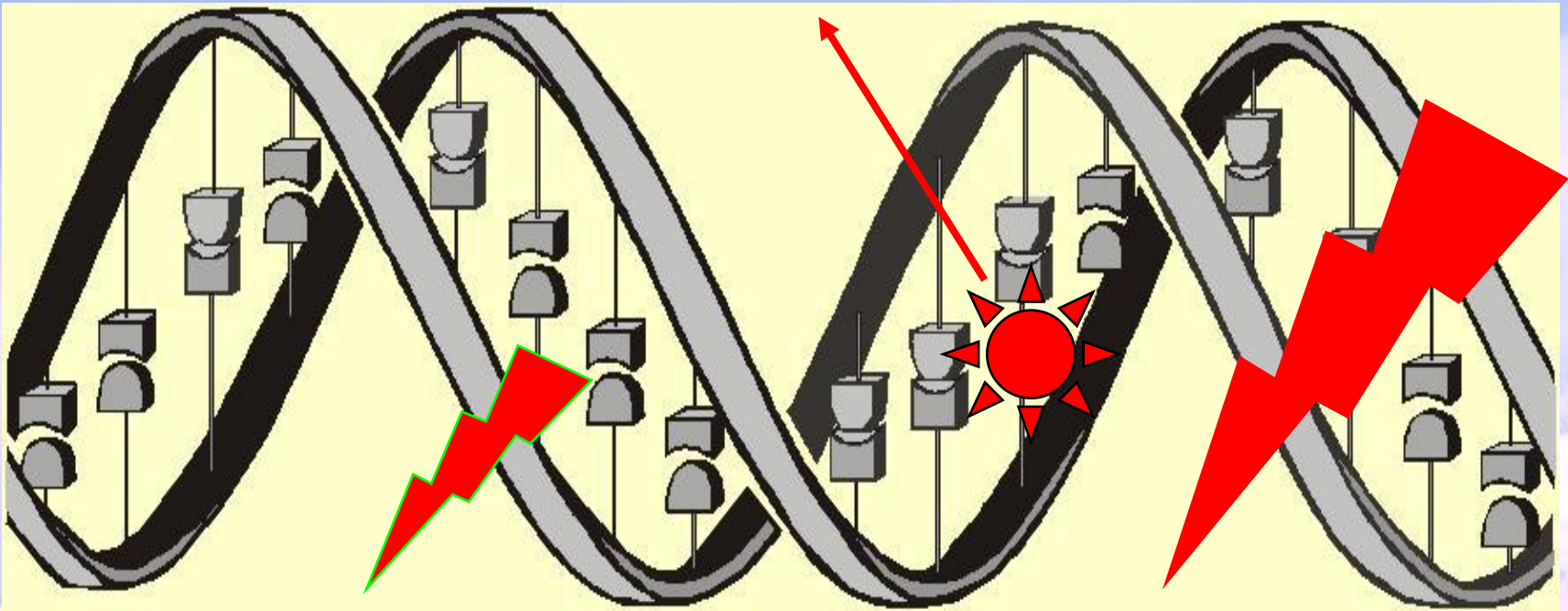
Molekulárně biologická teorie účinků ionizujícího záření (Chadwick a Leenhouts 1981)

- předpokládaným terčem v buňce je **dvojvlákno DNA**
- primární efekt záření – **dvojvláknový zlom v DNA (DSB)**
- zlom může vzniknout při průchodu **jediné** částice či v důsledku průchodu **dvou prostorově blízkých** ionizujících částic
- počet dvojitých zlomů: **$N = \alpha D + \beta D^2$**
(**D** – dávka, **α** , **β** – koeficienty závisující na buněčném prostředí)

K poškození buňky dochází při kombinaci dvou primárních dějů odehrávajících se na dvojvláknech nukleové kyseliny DNA, tvořící jádro buňky, přičemž poškození je pravděpodobnostně závislé na počtu vzniklých zlomů a na působení reparačních procesů. **Částice "řídce" ionizujícího záření, tj. beta a gama, vytvářejí při svém průchodu kritickým místem pouze po jednom primárním narušení (zlomu), takže k definitivnímu vzniku poškození je třeba průchodu dvou jednotlivých částic daným místem rychle po sobě - počet těchto poškození pak závisí převážně na druhé mocnině dávky, pro menší dávky je poškození výrazně nižší. Částice "hustě" ionizujícího záření (alfa, neutrony, protony) jsou schopny při jediném průchodu kritickým místem vyvolat dvě a více primárních poruch, což stačí ke vzniku reálného poškození, takže počet poškození, tj. radiační účinek, je zde přímo úměrný dávce záření; poškození zde vzniká snadněji, tyto druhy záření mají vyšší biologickou účinnost.**

Radiačně-indukované poškození molekuly DNA

Poškození bází: 1000-2000 per 1 Gy



Zlomy jednořetězcové
500-1000 per 1 Gy

Zlomy dvouřetězcové
40-50 per 1 Gy

Strategie eukaryotických buněk na radiačně-indukované poškození DNA

- 1) poznání poškození
- 2) odhad velikosti poškození
- 3) odpovídající odpověď – **reparace DNA** či indukce **buněčné smrti (apoptóza)**

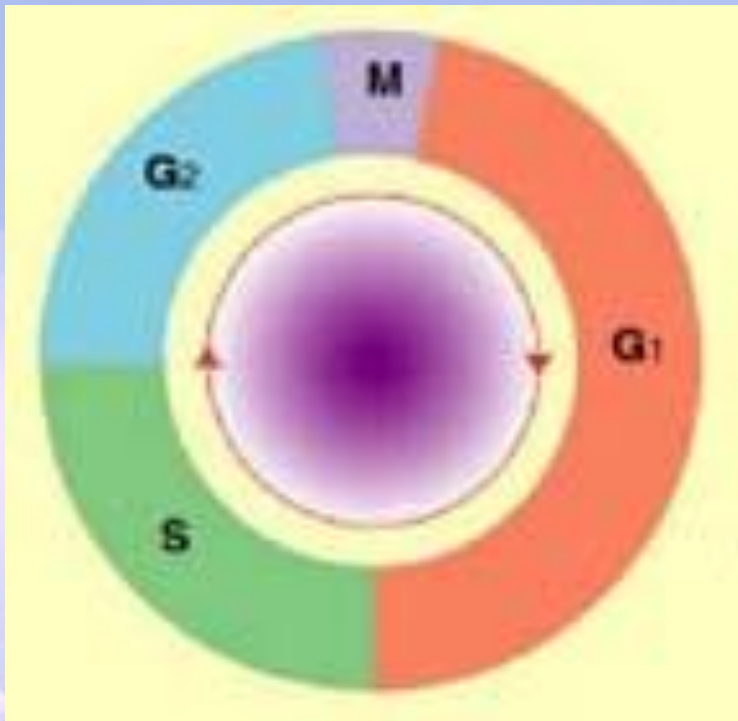
- **DSB (dvouvláknové zlomy) – rozhodující léze v DNA po účinku ionizujícího záření !!!**

Oprava:

- A) **homologní rekombinace** (G2/M fáze)
 - B) **nehomologní spojení** (G1 fáze)
-

Účinek ionizujícího záření na buňku

Hlavní typy radiačního poškození buněk



- **intermitotická smrt buňky**

(vysoké dávky záření, destrukce jaderné hmoty, porucha mitochondrií, oxidativní fosforylace, narušení iontové rovnováhy)- **nekróza, apoptóza**

- **mitotická smrt** (zástava mitózy, fragmentace chromozomů, chromozomové aberace)

- **zástava syntézy DNA, transkripce DNA**

- **poškození genetického materiálu**

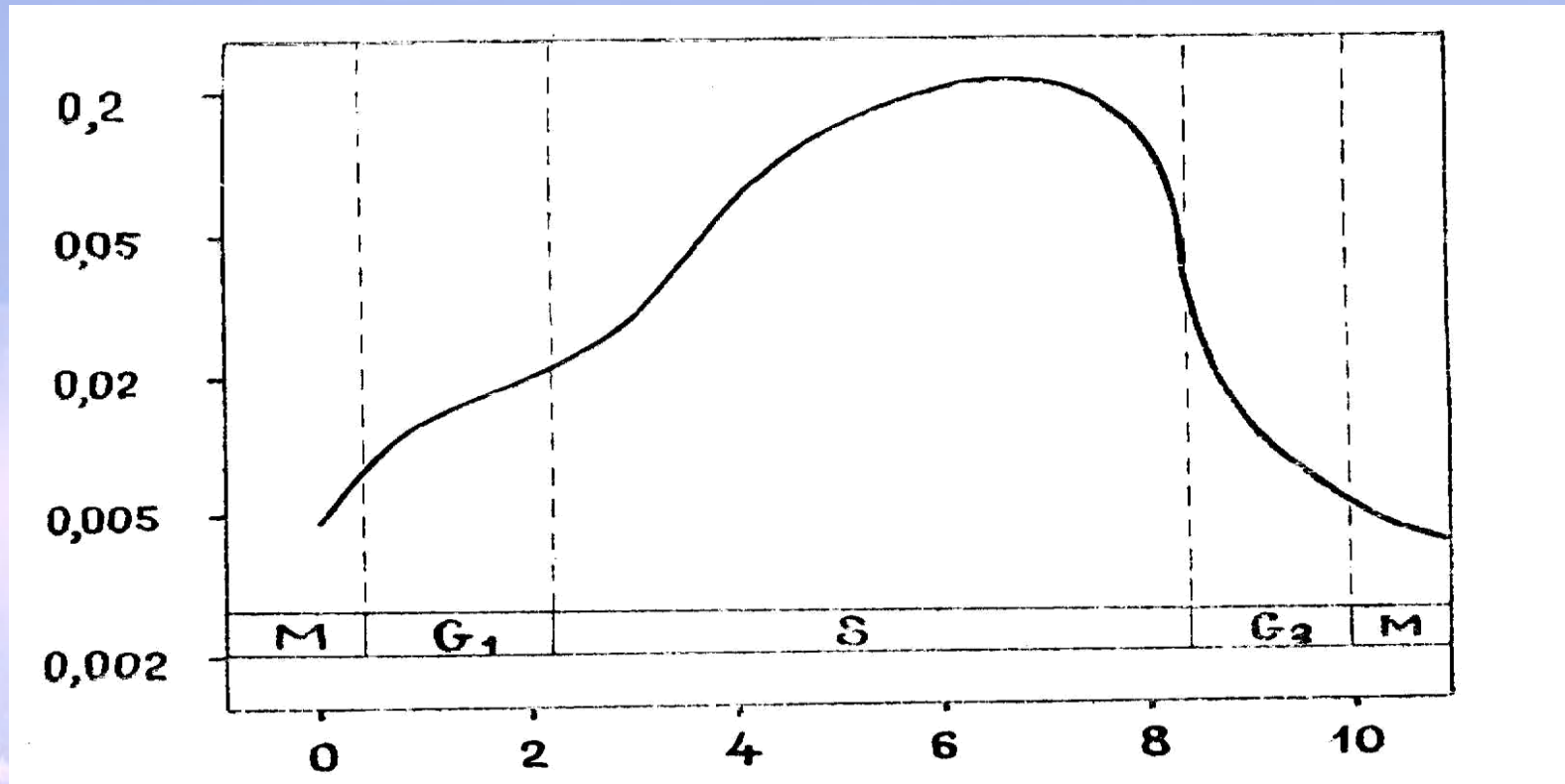
Účinek ionizujícího záření na buňky

Vnímavost buňky vůči účinkům ionizujícího záření se mění v průběhu jejího buněčného cyklu – největší je v ranných stádiích mitózy.

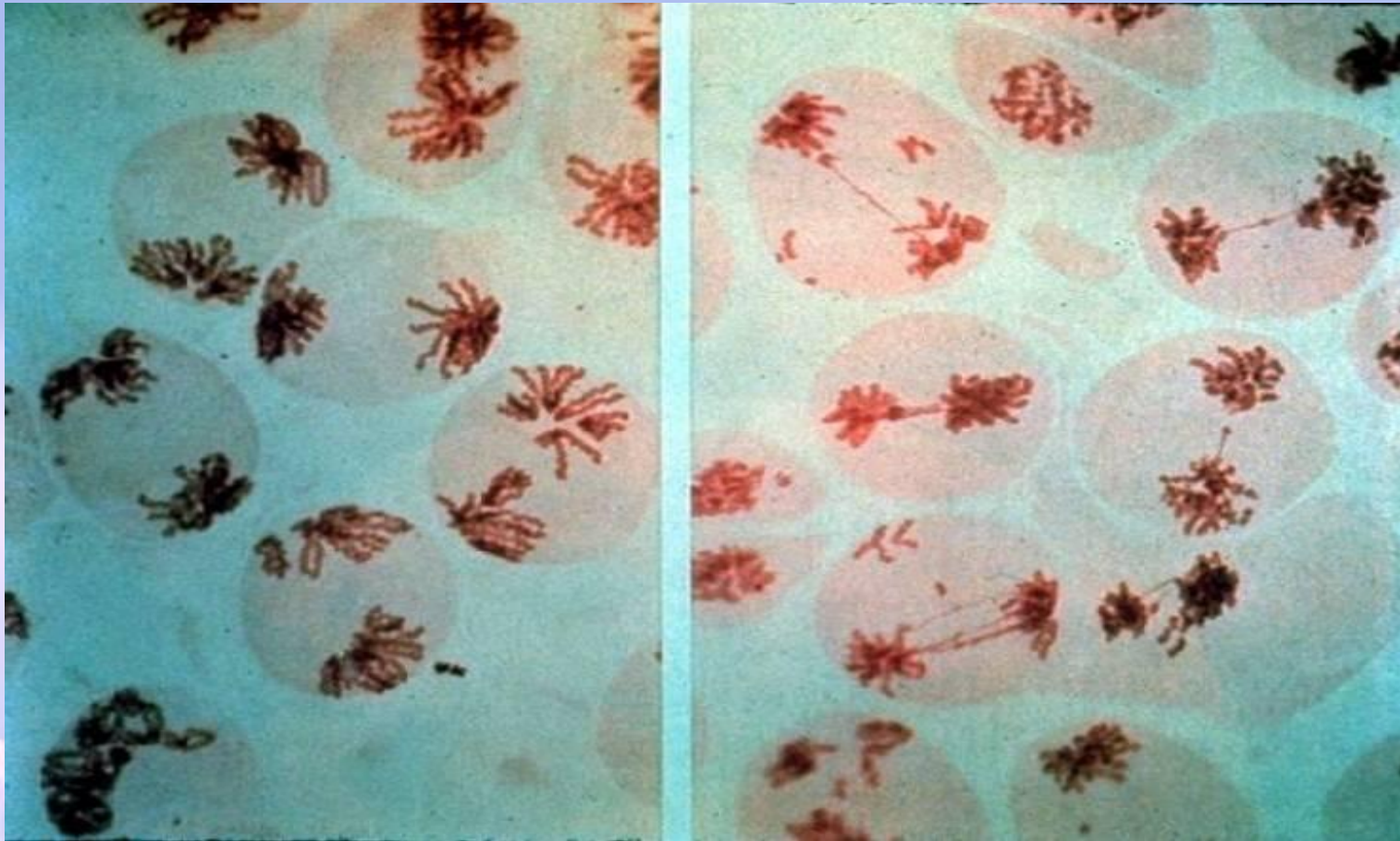
Počet mitoticky aktivních buněk ve tkáni ovlivňuje citlivost orgánů !!!

Nejcitlivější: lymfoidní buňky
 hematopoetické buňky
 zárodečný epitel
 sliznice

Radiosenzitivita buněk v průběhu buněčného cyklu



Mitotická smrt



NORMAL

IRRADIATED








Ionizující záření a poškození chromozomů

- **ionizující záření – silný klastogen !!!!**
 - **poškození chromozomů lze využít jako biologický dozimetr !!!**
 - využívají se lymfocyty periferní krve (G_0 fáze)
 - krátkodobá kultivace (24h)
 - nevýhoda – **nelze použít u dávek nad 5 Gy**
-

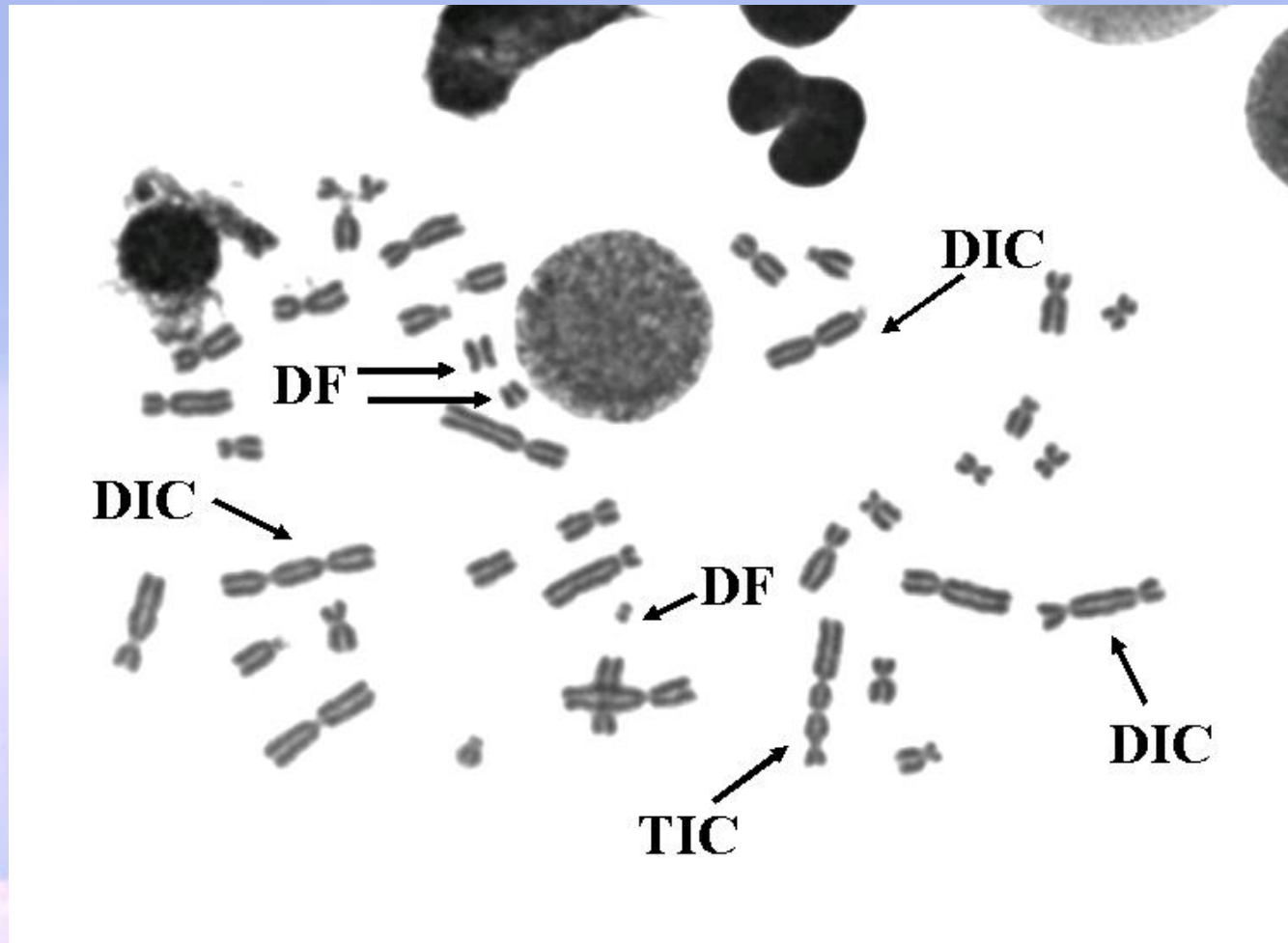
Účinek ionizujícího záření na chromozomy

Ionizující záření indukuje zejména **chromozomové typy aberací !!!**

Examples of 2-lesion *Chromosome-type* aberrations

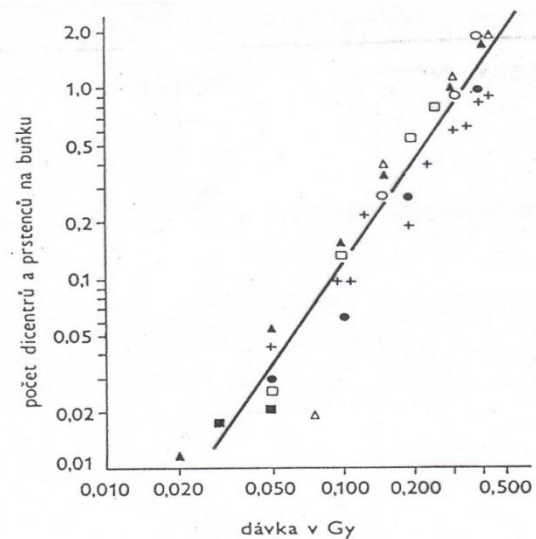
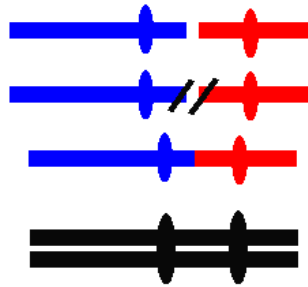
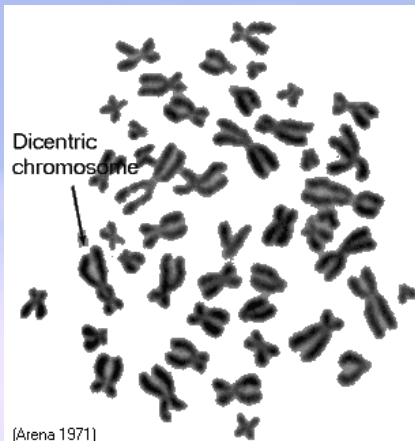
	INTERCHANGE	INTER-ARM INTRACHANGE	INTRA-ARM INTRACHANGE	"BREAK" DISCONTINUITY
A	 dicentric	 centric-ring	 interstitial deletion	
S	 reciprocal translocation	 pericentric inversion	 paracentric inversion	

Di- a tricentrický chromozom, difragment



Chromozomové aberace jako indikátor radiačního poškození – nestabilní typy

Citlivost od 0,02 Gy !!!



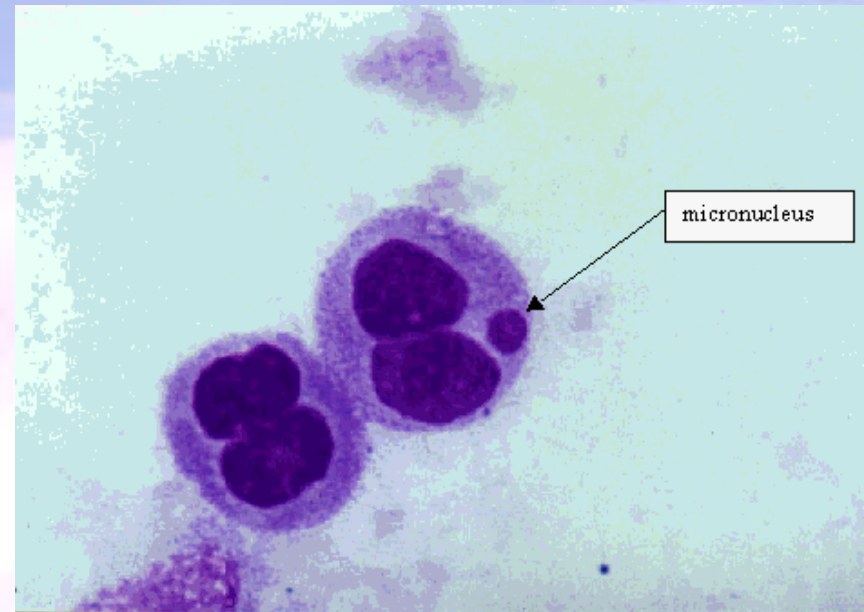
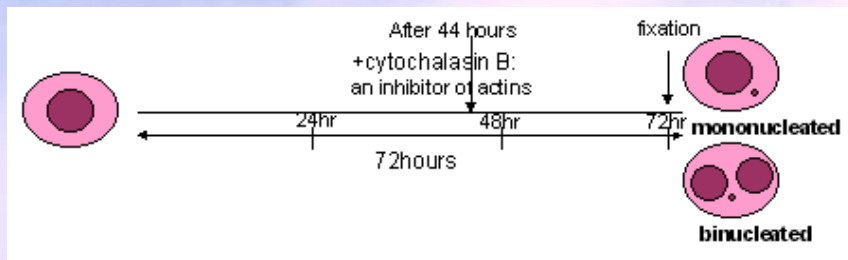
Sasaki (1971) ▲ Kučerová (1972) ■
Bender, Barciński (1969) □ Liniecki, Bajerska (1972) +
Sharpe et al. (1969) ○ Bauchinger (1971) ●
Adams (1970) △

Obr. 35. Vztah dávky záření in vitro a chromosomálních aberací v periferních lidských lymfocytech (podle Linieckého a Bajerské, 1972).

Možno použít jen v krátkou
dobu po ozáření !

Mikrojaderný test jako indikátor radiačního poškození chromozomů

Citlivost od 0,1 - 0,2 Gy !!!



Bergonieho-Tribondeův zákon

RADIOSENZITIVITA – Bergonieho-Tribondeův zákon

Radiorezistence stoupá se zvyšováním morfologické a funkční diferenciacie a s poklesem mitotické aktivity buněk

Radiosenzitivita lidských tkání

Radiosenzitivita lidských tkání a orgánů

1. Nejcitlivější tkáně a orgány – diferenciace buněk (lymfatický, hemopoetický aparát, zárodečné orgány)
2. Tkáně citlivé na záření – rychle se dělící buňky (tenké střevo, kůže)
3. Tkáně méně citlivé na záření – pomalu se dělící buňky (malé cévy, pojivové tkáně)
4. Nejméně citlivá skupina tkání – nedělící se buňky (játra, kost, svalstvo)

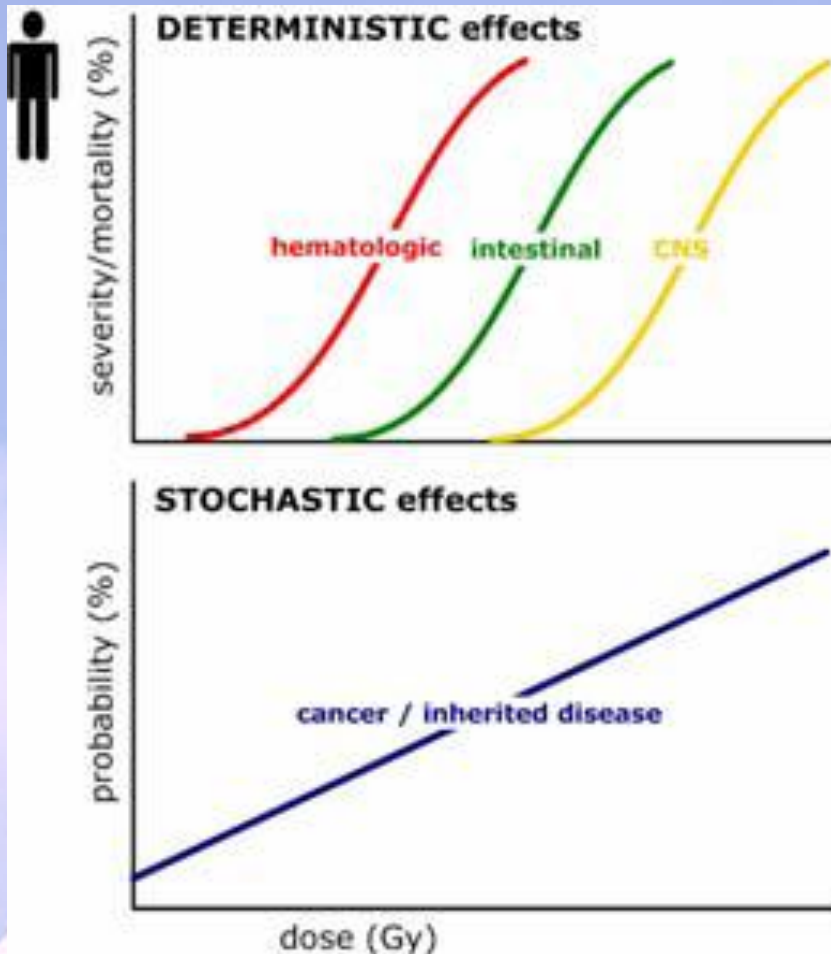
Účinek ionizujícího záření na člověka

- akutní nemoc z ozáření
- akutní lokalizované poškození
- poškození plodu *in utero* → **ÚČINKY DETERMINISTICKÉ**
- nenádorová pozdní poškození

Deterministické účinky – důsledkem poškození (zániku) velkého počtu buněk (prahový efekt)

- zhoubné nádory
- genetické změny → **ÚČINKY STOCHASTICKÉ**

Stochastické účinky – důsledkem změny jedné nebo málo buněk



"Každé ozáření zdravé živé tkáně ionizujícím zářením, a to i velmi malou dávkou, může být pro organismus potenciálně nebezpečné svými pozdními stochastickými účinky. Proto je nutno všemi dosažitelnými prostředky snížit dávky záření na minimum."

Přehled letálních dávek LD₅₀

Tabulka č. 10: Přehled letálních dávek podle druhu organismu

Biologický druh	LD ₅₀ [Gy]
Člověk	4-5
Pes	2,5-3
Myš	7-10
Potkan	7-10
Hmyz	100-1000
Houba	300-500
Prvok	1000-3000

Radiační poškození kůže

Skin Injuries



Akutní nemoc z ozáření

- odpověď organismu na jednorázové ozáření dávkami záření vyššími než **0,7 Gy**
- zahrnuje tři základní syndromy:
 - **Krevní (dřeňová forma)** – celotělové ozáření dávkou **3 až 5 Gy**
 - **Střevní forma** – celotělové ozáření dávkou kolem **10 Gy**
 - **Nervová forma** – ozáření dávkami několik **desítek Gy**

Časově se rozlišují 3 fáze – 1. prodromální (nauzea, zvracení, neklid, bolest hlavy, průjem, slabost)

2. latentní fáze

3. klinická manifestace nemoci z ozáření

Akutní nemoc z ozáření

Dřeňová forma (3-5 Gy)

- nad 300 rad – těžké postižení kostní dřeně
- útlum krvetvorby – postižení kmenových buněk krvetvorby v kostní dřeni
- nevolnost, skleslost, bolesti hlavy
- po období latence přicházejí projevy mikrobiálního rozsevu a krvácení

Střevní forma (kolem 8 Gy a vyšší)

- kritickým orgánem je sliznice tenkého střeva
- příznaky výraznější, závažné obtíže se objevují už 4.- 6. den po ozáření
- krvavé průjmy, příznaky proděravění střevní výstelky

Nervová forma (desítky Gy)

- psychická dezorientace, zmatenost, křeče, bezvědomí, smrt
-

Hematopoeze - počty lymfocytů 24 hod po ozáření - přežívání

Počet lymfocytů je vyšší než $1,5 \times 10^9/l$
Pacient nebyl ozářen významnou dávkou

Počet lymfocytů je mezi $1-1,5 \times 10^9/l$

Je pravděpodobné, že u ozářeného dojde za 3 týdny ke střednímu poklesu granulocytů a trombocytů

Počet lymfocytů je mezi $0,5-1 \times 10^9/l$

Ozáření budou potřebovat léčbu, pro rozvoj těžké formy dřeňového syndromu akutní nemoci z ozáření. Je nutná jejich hospitalizace především pro hemoragické a infekční komplikace 2-3 týdny po ozáření

Počet lymfocytů je pod $0,5 \times 10^9/l$

Obdržená dávka záření může být letální. Je nutná hospitalizace

Lymfocyty jsou nedetekovatelné

Obdržená dávka záření je supraletální a přežití je nepravděpodobné

Základní léčebná strategie radiačního poškození - dřevňová forma

- 1) podpůrná péče (prevence infekcí, její léčba a transfúze)**
 - 2) podávání hematologických růstových faktorů**
 - 3) transplantace kmenových buněk**
-

Nádory indukované ionizujícím zářením

- **rakovina kůže** (prof. expon, jedinci – RTG pracovníci)
- **leukémie** – lékaři, děti ozářené v těhotenství, Japonsko – max. 2 roky po ozáření (ale i 5 až 20 let po expozici)
- **rakovina štítné žlázy** – u lidí léčených v dětském věku zářením na zvětšení štítné žlázy
- **osteosarkomy** – ukládání radionuklidů do kostní tkáně
- **bronchogenní karcinom** – terčem jsou buňky epitelu dýchacích cest

Celotělová dávka záření 0,1 Gy vyvolá u skupiny 200 lidí vznik v průměru jednoho zhoubného nádoru !!!

Působení ionizujícího záření na gamety a na plod

Gametické mutace:

- **klidové oocyty** – malá vnímavost k indukci mutací ionizujícím zářením
- **spermie – vnímavější**, mutace se akumulují ve zrajících spermatogoniích
(250 rad – přechodná sterilita, 500 – 600 rad – trvalá sterilita)

Poškození plodu:

- nejcitlivější v **ranných stádiích**, kdy se tvoří základy orgánů
 - a) ozáření mezi **oploďněním a implantací (11 dní)** – **aborty**
 - b) ozařování v období zakládání orgánů (38 dní) – morfologické abnormality (mikrocefalie, vrozené srdeční vady aj.)
 - c) po 40. dnu embryo radiorezistentnější – **nevyšetřovat těhotné použitím ionizujícího záření !!!!**
-

Ochrana před účinkem ionizujícího záření

1. fyzikální ochrana:

- ❖ vzdálenost (odstup), časový faktor
 - snižování intenzity záření se čtvercem vzdálenosti
 - absorpční materiál – olovo, barytový beton, bor, kadmium, parafin, polyetylen – neutrony

2. chemická ochrana:

- ❖ snížení množství kyslíku, ochranné látky, snížení metabolismu (chlاد)
- ❖ chemické látky zvyšující odolnost vůči ionizujícímu záření – radioprotektiva
- ❖ DRF faktor (dose reduction faktor) – poměr LD 50/30 chráněných zvířat ku LD50/30 zvířat bez ochrany
- ❖ cystein, cysteamin, cystamin, glutation – odstranění volných radikálů

3. biologická ochrana: - léčení po ozáření

- ❖ transplantace kostní dřeně
- ❖ podávání vitamínů (A, B, E, K), kyselina linolová, arachidonová)

Radioprotekce – ochranná opatření snižující účinky ionizujícího záření nebo zvyšující přežívání ozářených jedinců

Chemická radioprotekce

- založená na použití **radioprotektivních látek**
 - A) látky s krátkodobým účinkem
 - **radiprotektivní látky obsahující síru** – SH skupina váže kyslíkové radikály, např. cystamin, AET, gamafos – **DRF až 2,3**
 - **indolylalkylaminy** – způsobují hypoxémii cestou vazokonstrikce (snížení množství kyslíku ve tkáních)
 - **blokátory vápníkového kanálu**
 - B) látky s dlouhodobým účinkem
 - **imunomodulátory** - zvýšená produkce cytokinů – lipopolysacharidy, glukán, IL-1, IL -2
 - **inhibitory syntézy prostaglandinů** – zvyšování hematopoetické aktivity kostní dřeně
 - **dextrazoxan** - vychytává kyslíkové radikály
-