Interakcija jonizujućeg zračenja sa živom materijom

- Osnovne karakteristike interakcije jonizujućeg zračenja sa živim ćelijama
- Kako ćelije umiru pod dejstvom jonizujućeg zračenja?
- Vrste oštećenja DNK
- Mehanizmi oštećenja DNK
- Popravka oštećene DNK
- Hromozomske aberacije

Tipovi ćelija

- Somatske ćelije → mitoza
- Polne ćelije → mejoza

  - Tipovi somatskih ćelija
    - matične ćelije (pr. ćelije hemopoetskog sistema)
    - prelazne ćelije (pr. retikulociti)
    - zrele ćelije

- Voda u sastav živih ćelija ulazi sa 50-80 % dok ostatak čine proteini, masti, šećeri...
- Zbog toga je dominantni primarni akt pri prolasku jonizujućeg zračenja kroz ćeliju generisanje OH·, H· i e^{-}_{aq}
- U nešto manjoj meri zastupjena je direktna jonizacija ćelijskih konstituenata

Kritična meta u živim organizmima je DNK

Dokazi da je DNK molekul glavna meta u ćeliji, čije oštećenje može da dovede do ireverzibilnih promena u funkcionisanju ćelije:

- Kod jednostavnih organizama broj jednostrukih (čija je genetska osnova jedan lanac) i dvostrukih prekida DNK u direktnoj su korelaciji sa biološkom inaktivacijom

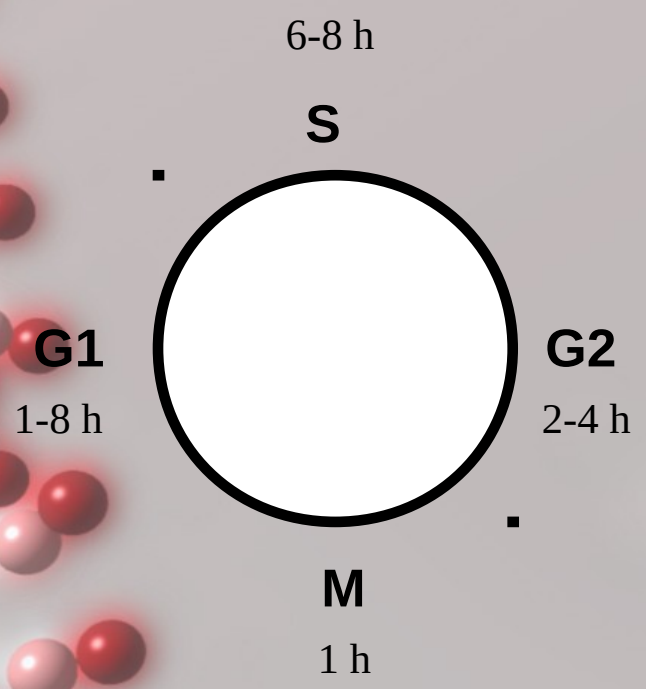
- Za više organizme korelacija između broja oštećenja u DNK i biološke inaktivacije je komplikovanija.

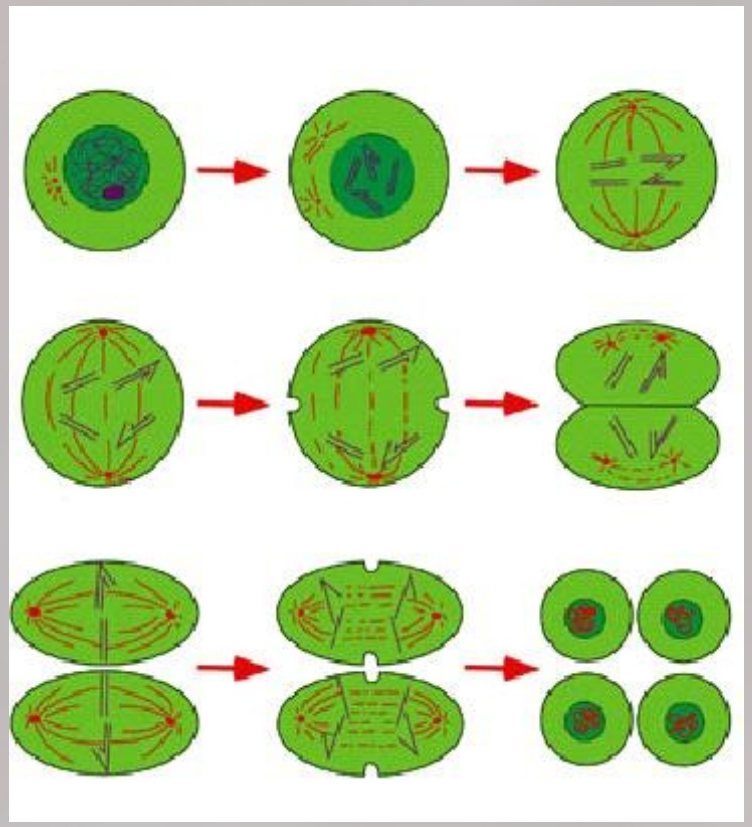
- Mogućnost popravke oštećenja DNK je blisko povezana sa ćelijskim preživljavanjem

- Ćelije koje kao rezultat genetskog defekta nemaju mogućnost popravke DNK oštećenja osetljivije su na dejstvo jonizujućeg zračanja

- Hemijske supstancije koje blokiraju popravku oštećenja DNK, povećavaju osetljivost ćelija na jonizujuće zračenje.

Ćelijski ciklus i mitoza





Radijaciona hemija vode

1) Jonizacija vode pod dejstvom zračenja

$h\nu + H_2O \rightarrow H_2O^+ + e^-$

2) Reakcija jona vode sa drugim molekulom vode

$H_2O^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+ + OH^\cdot$

3) Solvatacija slobodnog elektrona

$e^- + [H_2O]_n \rightarrow e^-_{aq}$

4) Reakcija solvatisanog elektrona sa molekulima vode, Formiranje vodoničnih radikala

$e^-_{aq} + H_2O \rightarrow OH^- + H^\cdot$

Ovo su primarni radikali u vodi. Ovi radikali reaguu direktno sa organskim molekulima.

Reakcije organskih i vodenih raduikala dešavaju se na vremenskoj skali od 10^{-5} do 10^{-10} s

Primarni radikali u vodi: $OH^{\bullet}$, $H^{\bullet}$, e_{aq}^{-}

U prisustvu kiseonika

$$e_{aq}^{-} + O_2 \rightarrow O_2^{\bullet -}$$

$$H^{\bullet} + O_2 \rightarrow HO_2^{\bullet}$$

$$HO_2^{\bullet} \rightarrow O_2^{\bullet -} + H^{+}$$

$OH^{\bullet}$ reaguje u blizini mesta gde je nastao

$O_2^{\bullet -}$ može difundovati na veća rastojanja

Radikali mogu reagovati jedan sa drugim

$$OH\bullet + OH\bullet \Rightarrow H_2O_2$$

$$H\bullet + H\bullet \Rightarrow H_2$$

Radikalski prinosi

Prinos = G vrednost = broj formiranih molekula / 100eV apsorbovane energije

Proizvod	G vrednost
e_{aq}^-	2.6*
$H^\bullet$	0.6*
$OH^\bullet$	2.6
H_2	0.45
H_2O_2	0.75

Eliminacija ovih radikala
Pasivna: hemijska, antiokidansima tiolima, sulfoksidima, vitaminima
Aktivna: dejstvo SOD, katalaze, peroksidaze

*** U prisustvu kiseonika $O_2^{\bullet -}$ (2.6 + 0.6 = 3.2)**

Vremenska skala efektata dejstva jonizujućeg zračenja u ćelijama

1. Brze reakcije 10^{-10} to 10^{-3} s
- apsorpcija energije
- proizvodnja slobodnih radikala
- napad na DNK
- hemijska popravka DNK

2. Biološki procesi 10^{-3} to 10^{4} s
- enzimska popravka of DNK
- “recikliranje” oštećenih ne-DNK molekula
- pogrešno-opravljeno DNK oštećenje fiksirano u genomu

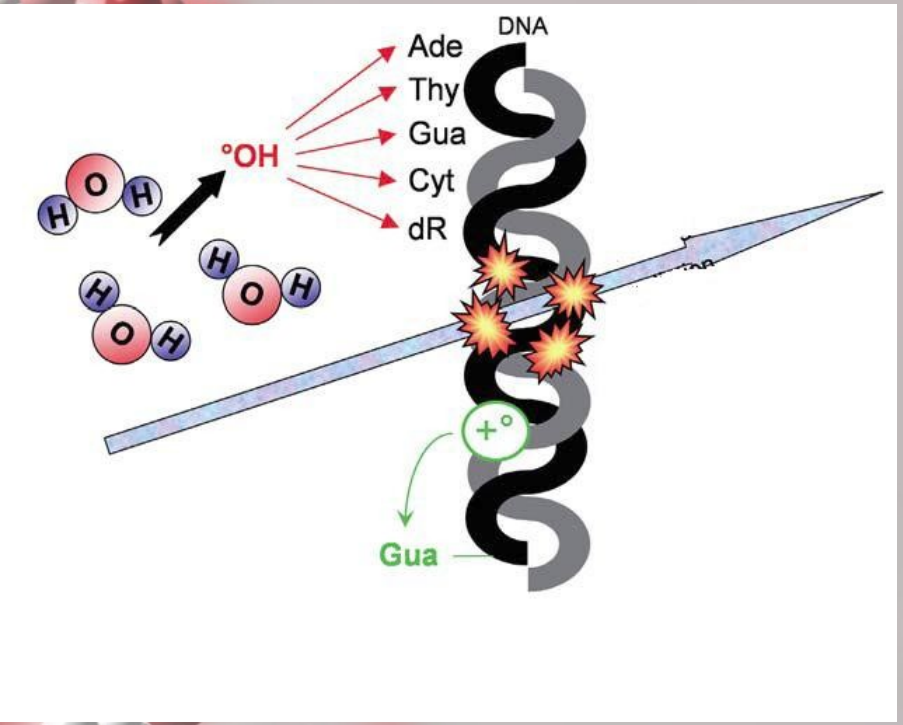
3. Biološke posledice 10^{4} to 10^{9} s
- Genetski efekti u budućim generacijama (nasledni)
- somatski efekti (ćelijska smrt, kancer)

Kritična meta u živim organizmima je DNK

Smrt ćelije pod dejstvom jonizujućeg zračenja

- Post-mitotska smrt
  - Gubitak genetskog materijala
    - » metabolička smrt
    - » odložena apoptotska smrt
  - Genetska nestabilnost
    - » odložena apoptotska smrt
- Smrt u interfazi ćelijskog ciklusa
  - trenutna (brza) apoptoza
- reproduktivna smrt
  - Dugotrajni zastoj (prekid ćelijskog ciklusa, starost, diferencijacija)

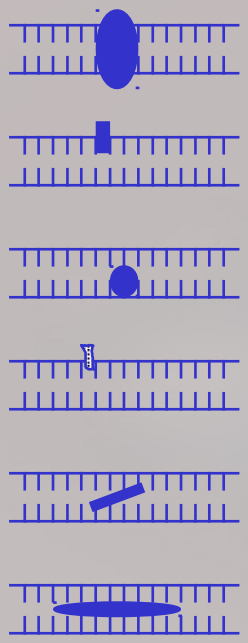
Oštećenje DNK pod dejstvom jonizujućeg zračenja



- Jednostruki prekidi lanca DNK
- Dvostruki prekidi lanca DNK
- Hemijska promena azotnih baza
- Hemijska promena šećernih ostataka
- Umrežavanje između lanaca DNK
- Umrežavanje između matriksnih proteina (histona) i lanca DNK

Broj i tip DNK oštećenja pod dejstvom jonizujućeg zračenja

Tip oštećenja	broj /Gy /diploidna ćelija
Prekid oba lanca	40
Jednostruki prekid lanca	500-1000
Oštećenje baze	1000-2000
Oštećenje šećera	800-1600
DNA-DNA umrežavanje	30
DNA-protein umrežavanje	150



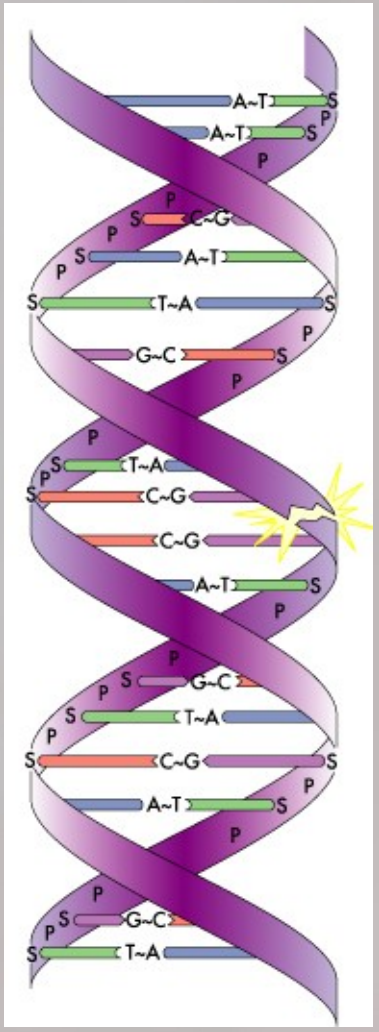
Oštećenje DNK pod dejstvom primarno generisanih $OH^{\bullet}$ radikala

- Vreme života $OH^{\bullet}$ radikala je kratko; u tom periodu ovaj radikal može da migrira par nanometara (~3,5 nm) pre nego što reaguje

- Poprečni presek DNK heliksa ima slične dimenzije, tako da samo hidroksilni radikali koji nastanu u njegovoj neposrednoj blizini mogu da izazovu oštećenje ili prekid/e lanca

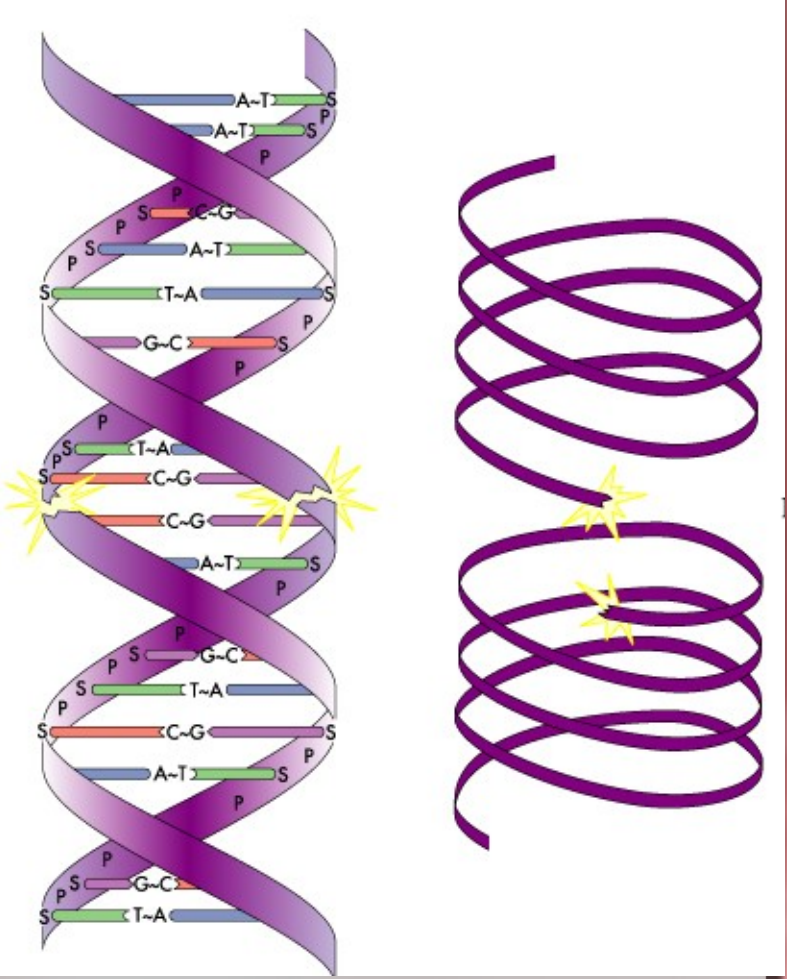
Jednostruki prekid lanca

- Dešava se kao posledica napada $OH^{\bullet}$ radikala na dezoksiribozni ostatak u lancu DNK
- Dejstvom sekundarnih elektrona
- Reakcijom dezoksiriboznog ostatka sa radikalom nastalim od azotne baze
- Oštećenje je popravljivo (error free repair)



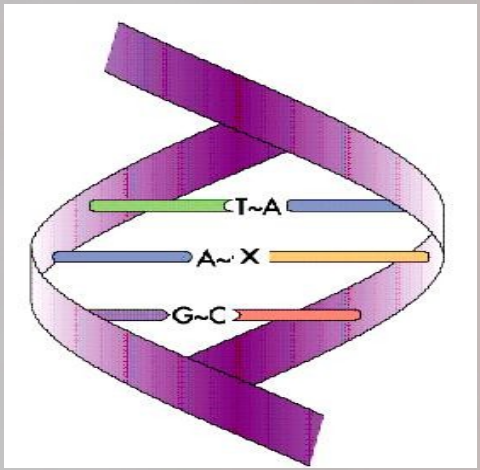
Prekid oba lanca DNK

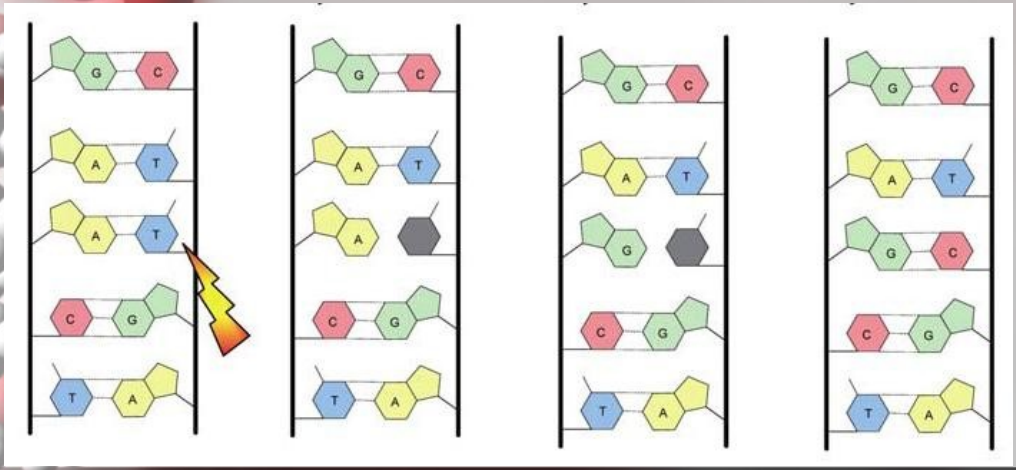
- Dešava se usled prolaza sekundarne naelektrisane čestice/ca
- Dovodi do prekida hromozoma
- Ovakvo oštećenje je teško popravljivo – popravka je podložna greškama
- Ukoliko ovakav događaj ne dovede do smrti ćelije, dolazi do ozbiljnih promena u genetskom materijalu



Oštećenje (delecija) azotna baze

- Teško popravljivo oštećenje
- Uzrok mutacija

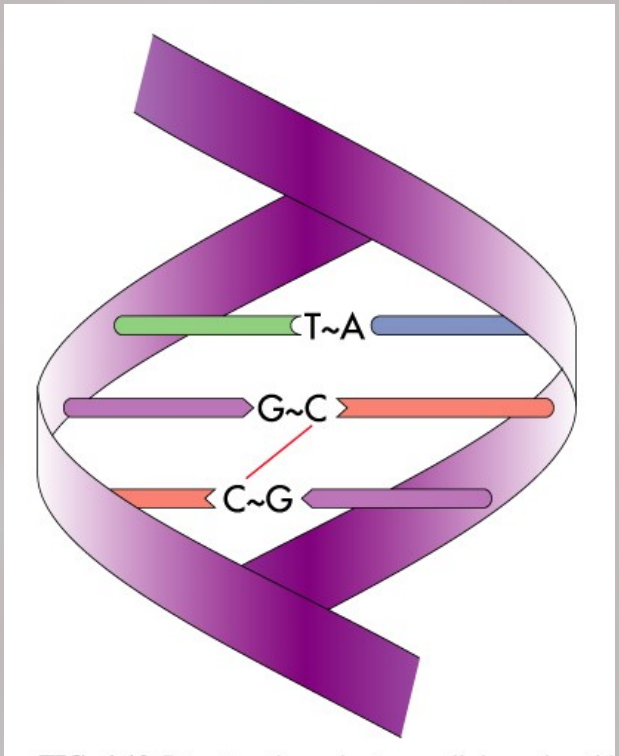




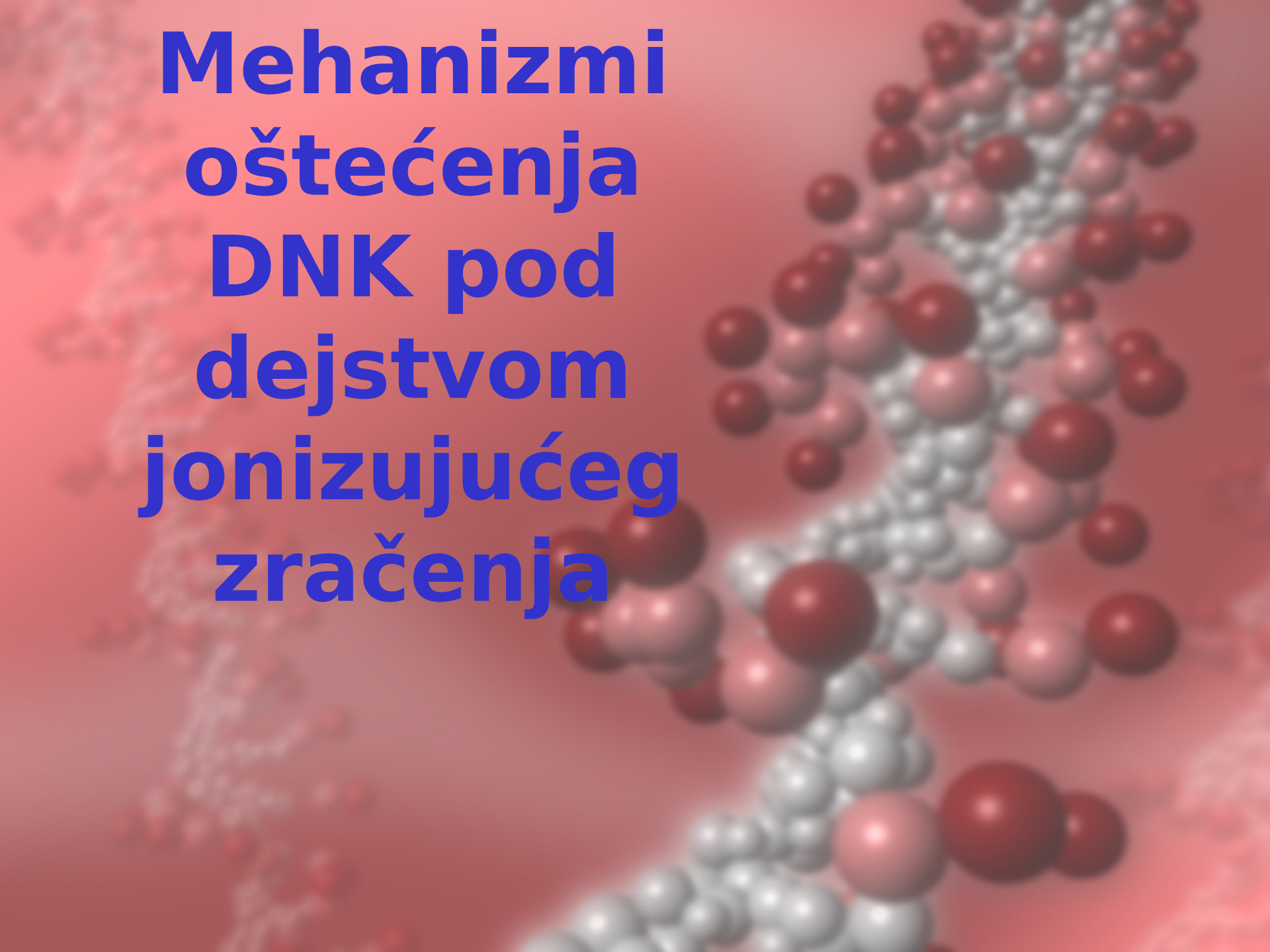
Mutacija zbog oštećenja jedne baze

Umrežavanje baze u DNK heliksu

- Nastaje kao posledica prolaska naelsktrisane čestice
- Uglavnom nastaje izmedju istih baza
- Ometena replikacija DNK



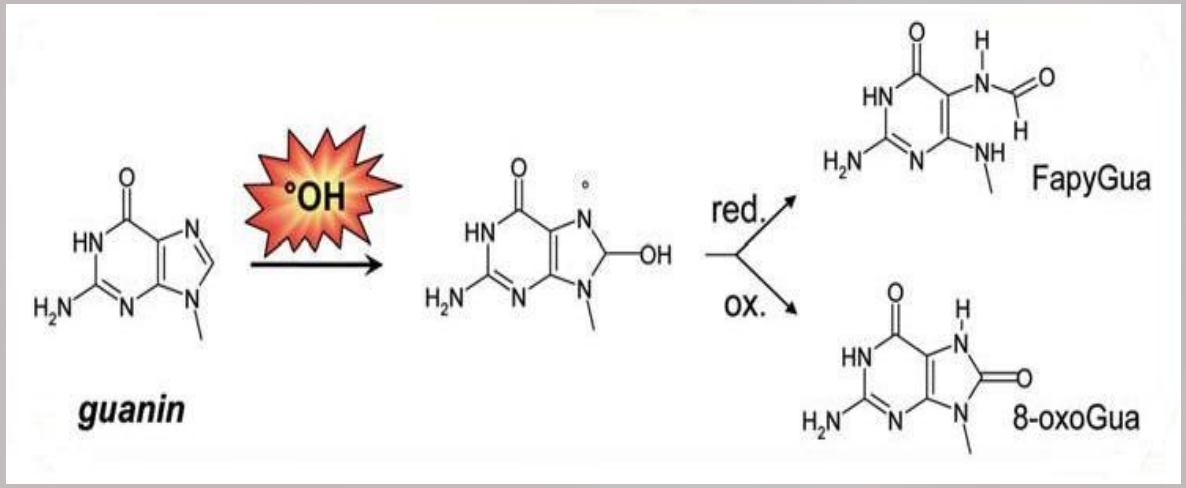
Mehanizmi oštećenja DNK pod dejstvom jonizujućeg zračenja



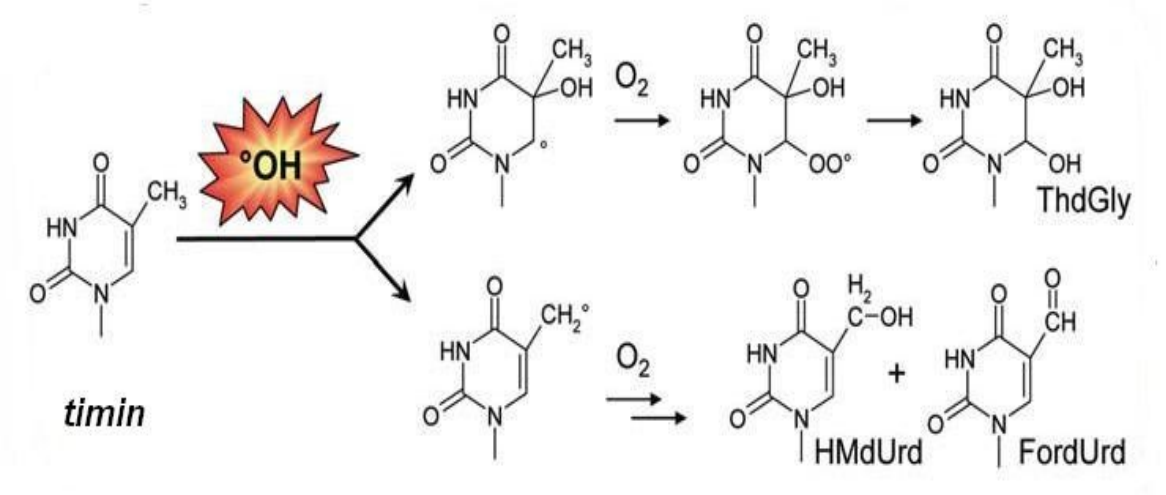
Reakcije sa OH• radikalima

- Difuzija je odlučujući stepen u mehanizmu

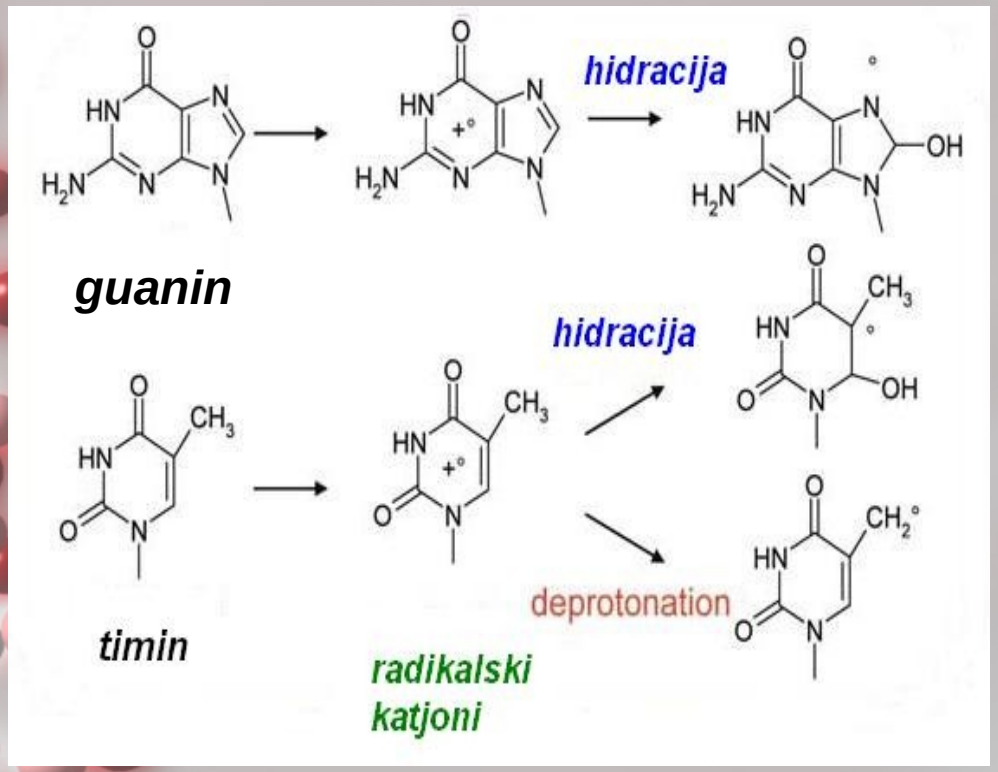
- U interakciji sa **purinskim bazama** (adenin, guanin) dominantna je **adicija OH• radikala u položaju C8** (napad na dvostruku vezu) pri čemu nastaje 8-hidroxi-7,8-dihidropurin-7-il radikal. Ovaj radikal dalje podleže oksidaciji pri čemu se dobija 8-okso-7,8-dihidropurin. Kompetitivna redukcija dovodi do otvaranja imidazolskog prstena i nastajanja formamidopirimidina (*Fapy*)



U interakciji sa **pirimidninskim bazama** (timin, citozin) dolazi do **adicije OH· radikala u položaju C5 i konkurentskog procesa abstrakcije vodonika sa metil grupe,** što dovodi do formiranja ugljenično centriranih radikala. Oni dalje podležu oksidaciji, pri čemu se kao kranji proizvod u prvom slučaju dobija 5,6-hidroksi-5,6-dihidropirimidin, a u drugom smeša 5-(hidroksimetil)-2'-deoksiuridina (HMdUrd) i 5-formil-2'-deoksiuridine (FordUrd).



Direktan uticaj jonizujućeg zračenja na azotne baze



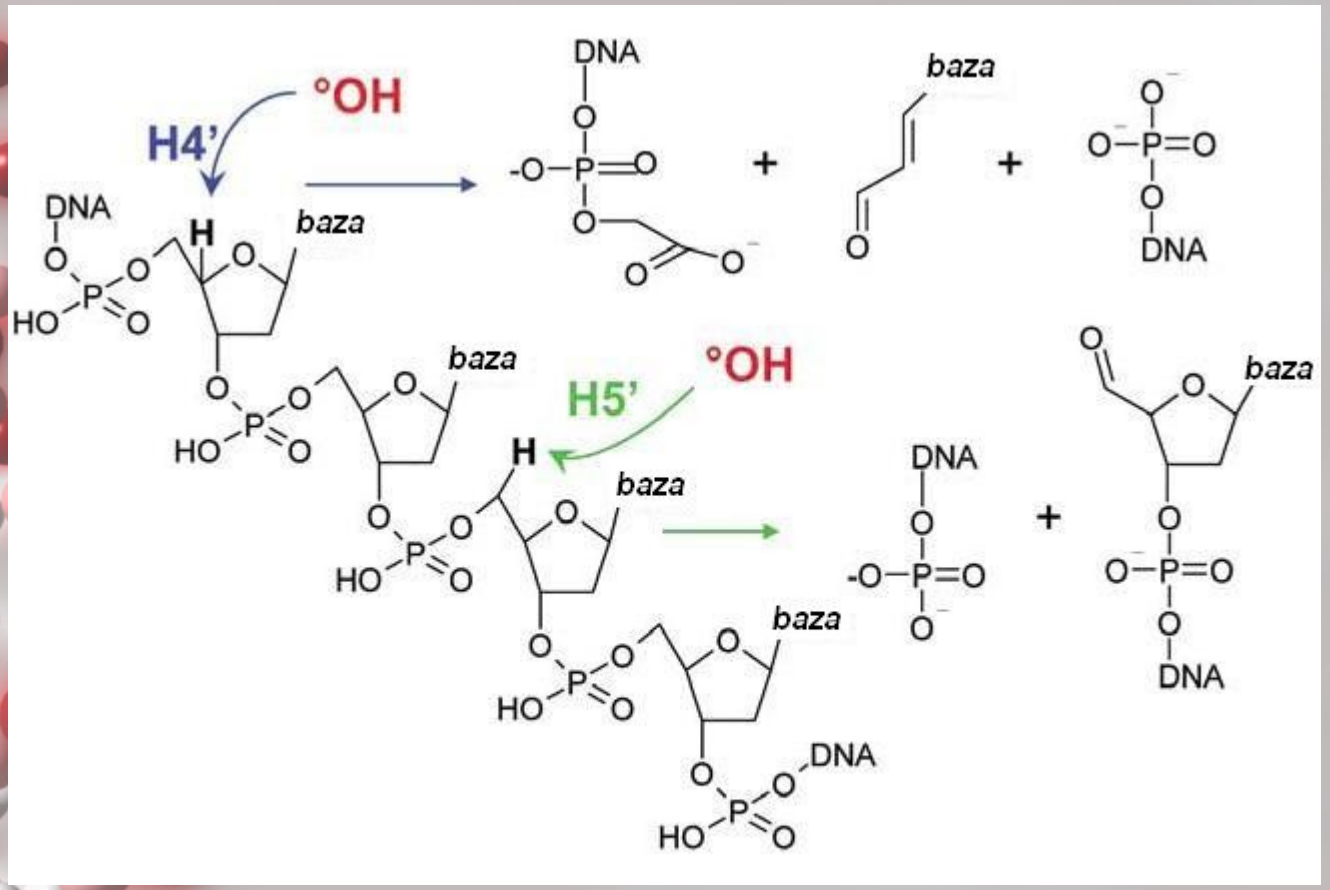
8-hidroksi-7-guanidil radikal

6-hidroksi-5,6-dihidrotimid-5-il radikal

metil-centrirani timil radikal

Radijaciono-indukovano oštećenje u oligonukleotidima i dvostrukom DNK heliksu

•Oštećenje 2-dezoksi riboze u DNK lancu dešava se putem abstrakcije vodonika sa položaja C4´ ili C5´, što u većini slučajeva dovodi do prekida DNK lanca



Radijaciono indukovano oštećenje baze u izolovanoj DNK

- Ispitivanja sa izlaganjem izolovane DNK jonizujućem zračenju u medijumu zasićenom kiseonikom pokazala su da su glavni proizvodi izmenjeni guanidin - 8-okso-7,8-dihidroguanin, kao i HMdUrd i FordUrd.

- U redukcionoj sredini dobijaju se isti produkti kao i u slučaju izolovanih azotnih baza.

- Dvostruko oštećenje azotne baze u lancu DNK se dešava kada nastali pirmidinski ili purninski radikal reaguje sa susednom azotnom bazom. Tako oksidovani timil radikal (peroksi timil radikal) može da reaguje sa susednim guaninom dajući 8-oksoGua/dF tandem oštećenja.

- Primarno nastalo pozitivno naelektrisanje (“šupljina”) može migrirati u DNK lancu, ko ne bude zarobljeno na lokaciji koja pokazuje najniži jonizacioni potencijal (kao što je npr. GG dublet). Tako se stvarno oštećenje može javiti daleko od mesta jonizacije.

Radijaciono oštećenje DNK u ćelijama izloženim jonizujućem zračenju

- Podaci su retki, zbog toga je frekvencija oštećenja niska (1 na milion baza) i što je teško izdvojiti dovoljne količine DNK neophodne za analizu.

- posle izlaganja DNK x- ili γ-zračenju izlaganja Jednostruki : dvostruki prekidi lanca = 25:1

- Purinske i pirimidniske baze, sa izuzetkom adenina su podjednako podložne oštećenju

- Efikasno nastajanje produkata redukcije radikala u ćelijskoj DNK ukazuje da se ona nalazi u okruženju sa relativno malom koncentraciom kiseonika

- Mehanizam oštećenja DNK dejstvom hidroksilnog radikala je dominantan kada je izložena jonizujućem zračenju niskog LET-a

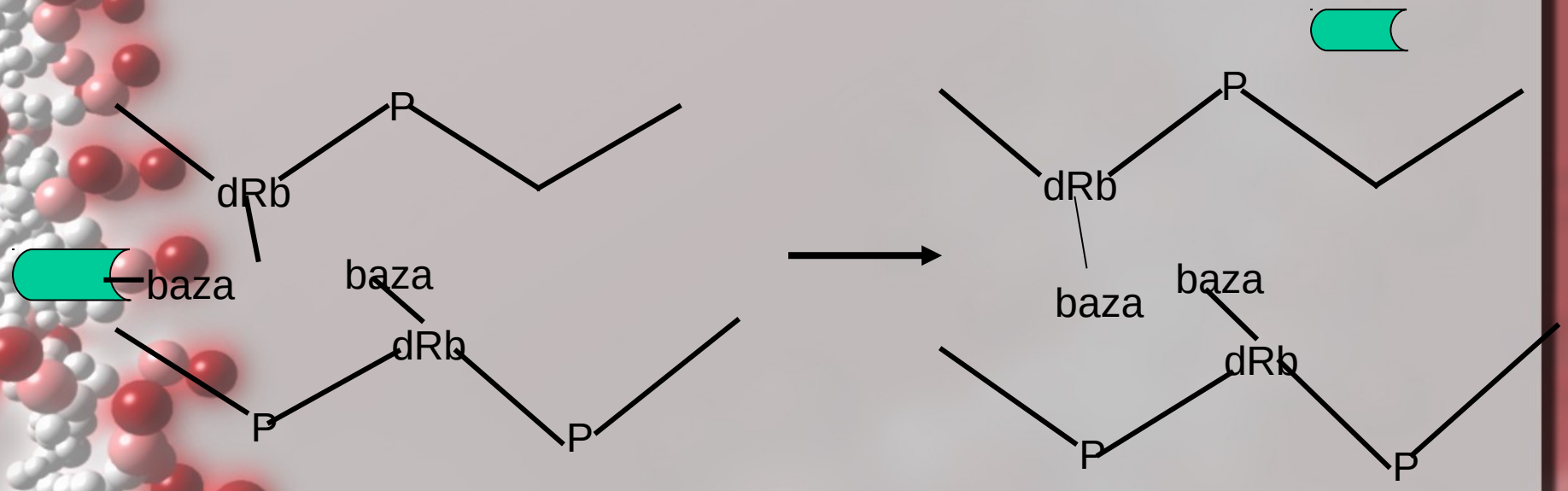
- Istovetna oštećenja nukleotida se javlaju i kod izlaganja čestičnom zračenju (visok LET), samo što su ona zbog efikasnije rekombinacije $OH^{\cdot}$ radikala u njihovom tragu, ređa.

- Verovatnoća nastajanja klasterskih oštećenja (niza od dve ili više oštećenih baza raste sa LET-om

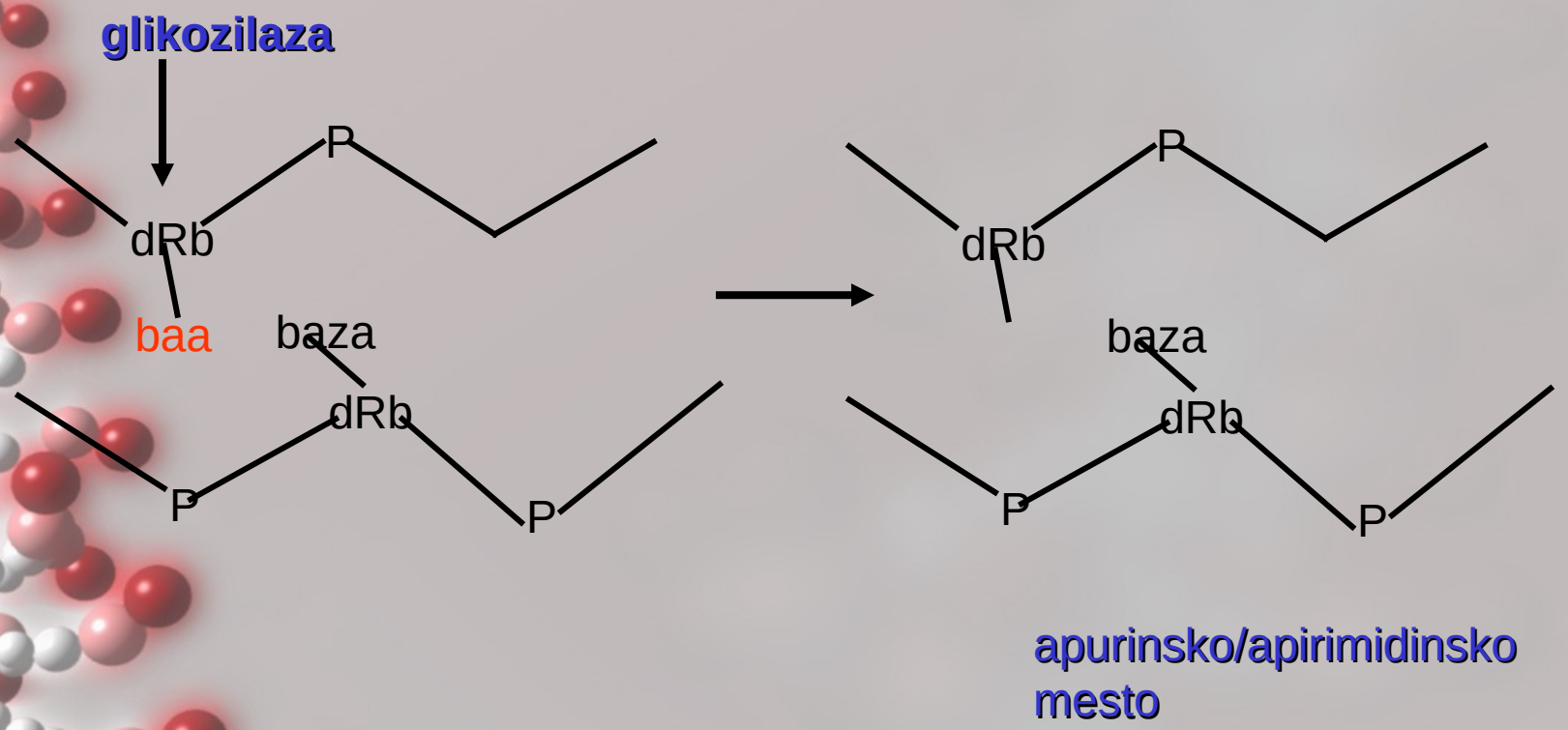
Hijerarhija opravke DNK

- Korekcija oštećenja
  - dejstvo specifičnih enzima za specifično oštećenje t.j. dejstvo alkil transferaza
- Popravka nedostatka baze
  - Jedan nukleotid (apurinski/apirimidinski)
- Popravka pogrešnog sparivanja
  - Editovanje matrice: pogrešna sparivanja/petlje
  - ?mehanizam prekida lanca
- Popravka nedostatka nukletida
  - Isečak dela lanca
- Popravka prekida oba lanca DNK
  - Nehomologno sparivanje krajeva
  - Homologna rekombinacija

Direktna korekcija oštećenja

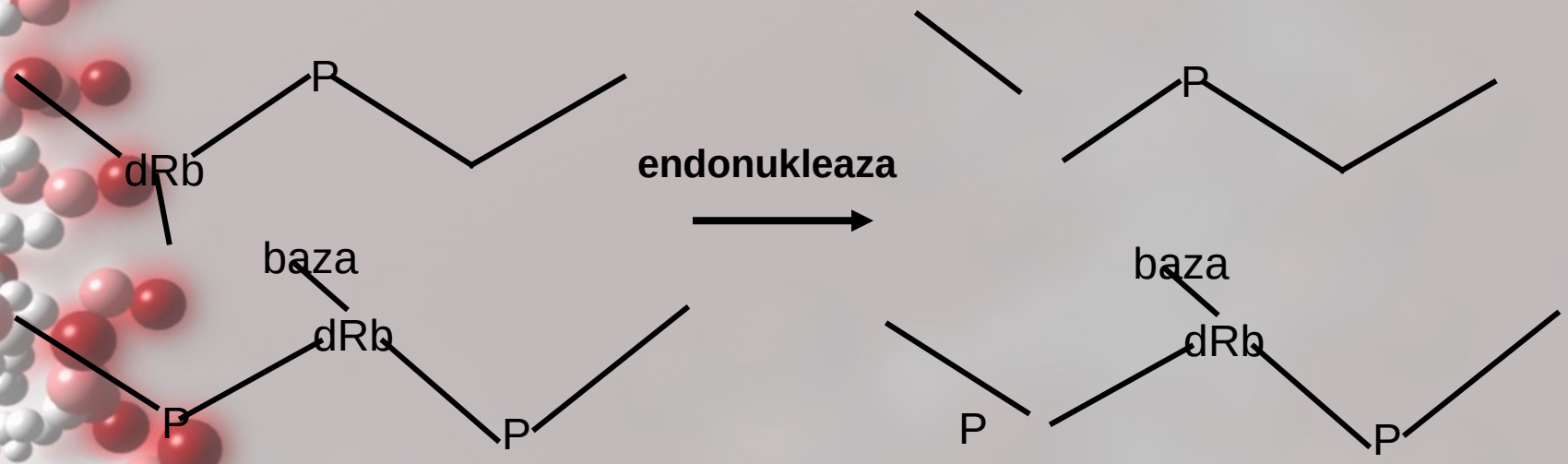


Popravka oštećenja baze



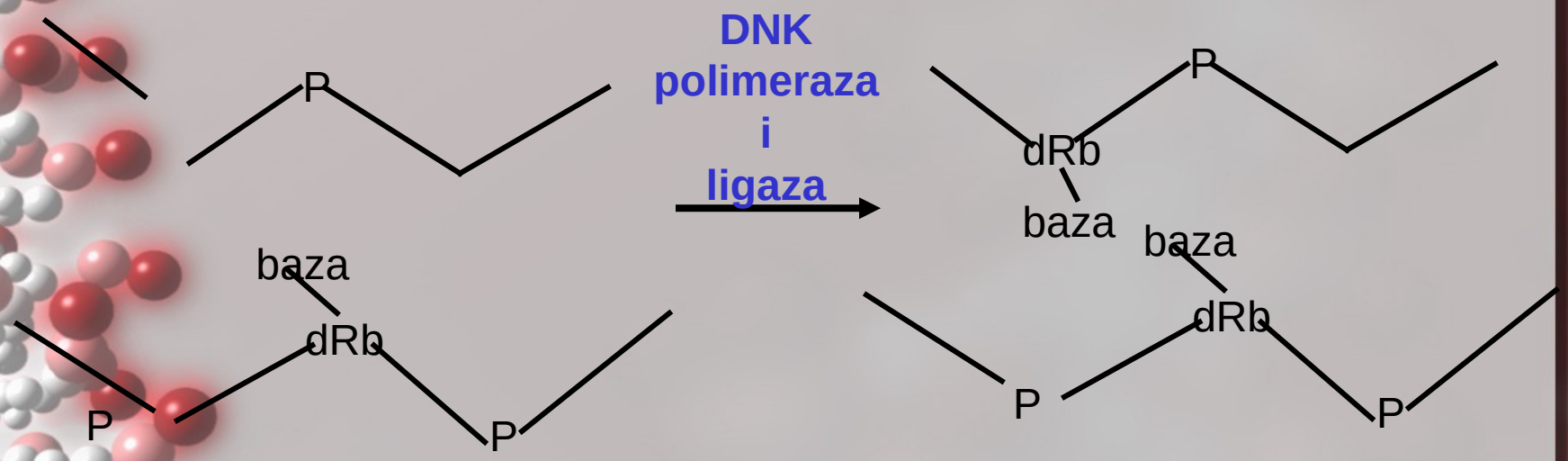
Enzim glikozilaza detektuje oštećenje azotne baze i ostavlja nepopunjeno mesto (apurinska/apirimidinska lokacija)

Popravka nedostatka baze



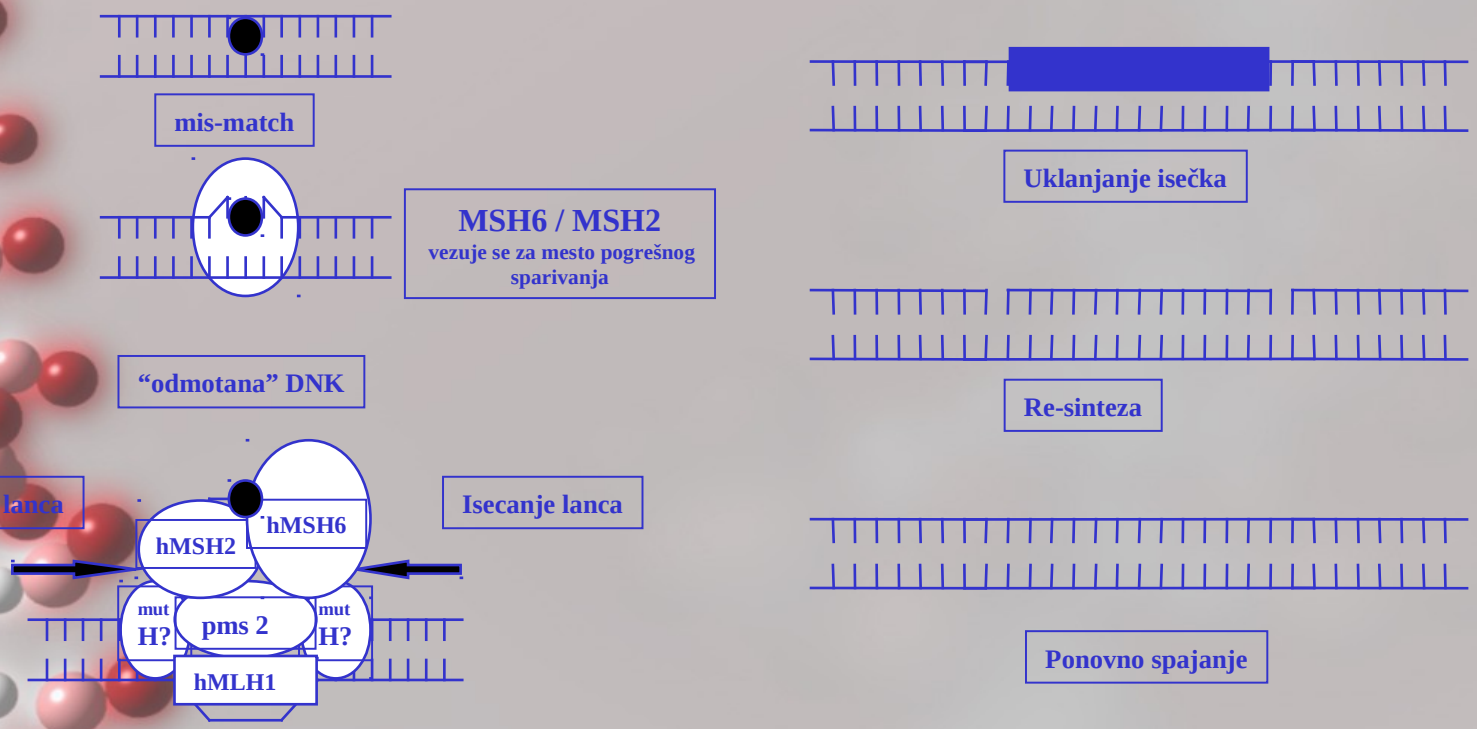
Najčešći mehanizam popravke nedostatka baze uključuje isecanje dela lanca pomoću enzima endonukleaze i ...

Popravka jednostrukog prekida lanca/nedostatka nukleotida



na osnovu matrice iz komplementarnog lanca dejstvom DNK Polimeraze rekonstruiše se nedostajući isečak, dok se dejstvom ligaze vrši spajanje zakrpe sa preostalim delom lanca

Popravka pogrešnog sparivanja



Popravka prekida oba lanca u DNK heliksu

dvostruki prekid DNK

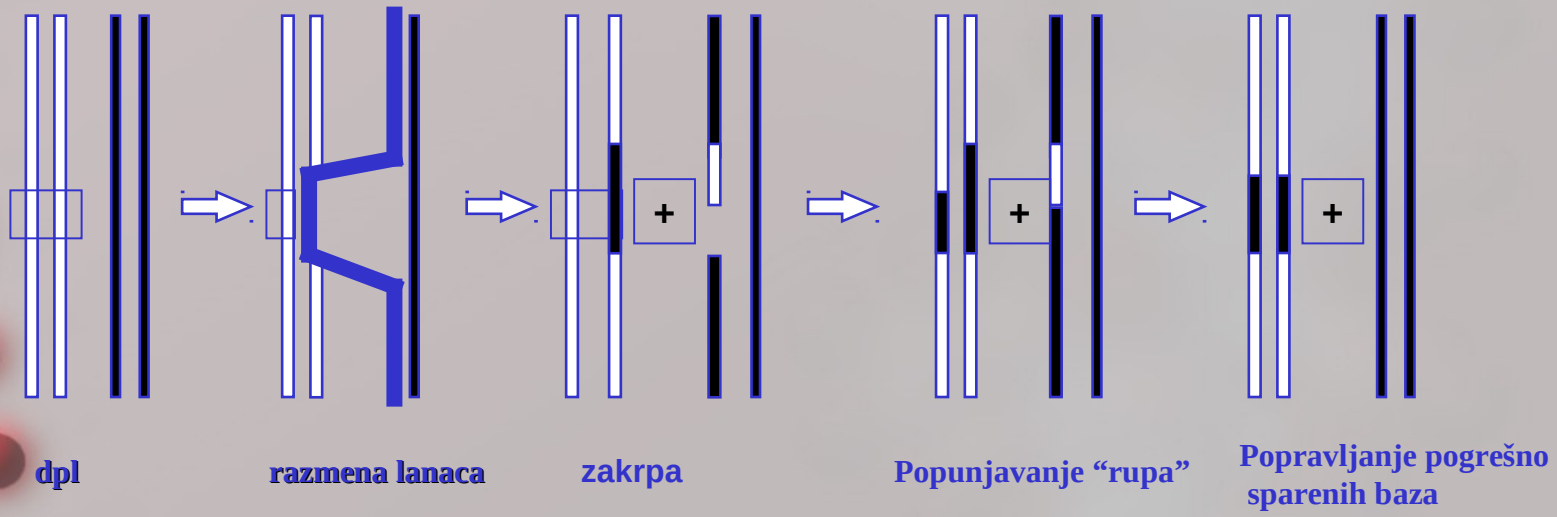
Nehomologo spajanje krajeva

Homologa rekombinacija

- Bez homologije
- Podložno greškama
- Dešava se u G1 fazi

- Homologna matrica
- Bez grešaka u opravci
- Dešava se u S/G2 fazi mitoze

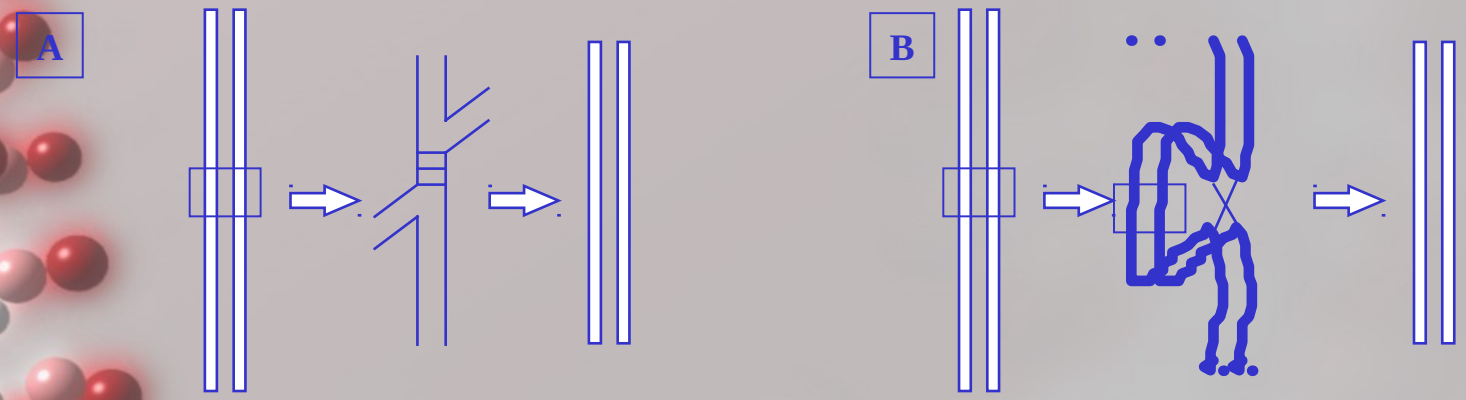
Homologa rekombinacija



Egzonukleaza povlači deo jednog lanca iz intaktnog heliksa, koji se nalazi u blizini mesta dpl. Zatim se enzim recA veže sa izloženi lanac i inicira razmenu izmedju lanaca. Proces se završava isecanjam dela iz intaktnog lanca i rekonstrukcijom nedostajućih delova lanaca u oba dupleksa

dsb

Nehomologo sparivanje



Poravnavanje na osnovu jednog lanca

Sparivanje i isecanje ostataka

Hromozomske aberacije

- Usled izlaganja ćelija jonizujućem zračenju može doći do nastajanja prekida u hromozomima
- Odvojeni fragmenti su “lepljivi” i mogu se pridružiti “lepljivom” kraju lanca
- Nastali fragmenti se različito ponašaju:
  - » Može se uspostaviti originalna konfiguracija
  - » Može doći do trajnog odvajanja – delecije dela hromozoma
  - » Fragmenti se mogu medjusobno spojiti i pridružiti drugim hromozomima, što daje jako izmenjene hromozome.

Tipovi aberacija

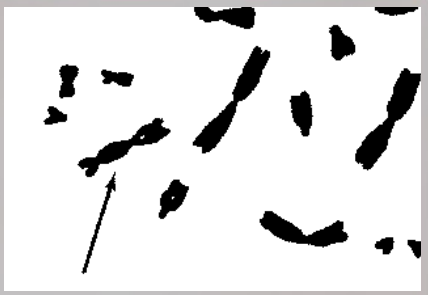
- Hromozomske aberacije su rezultat izlaganja ćelije jonizujućem zračenju dok se ona nalazi u ranoj interfazi (G1), pre duplikacije genetskog materijala.

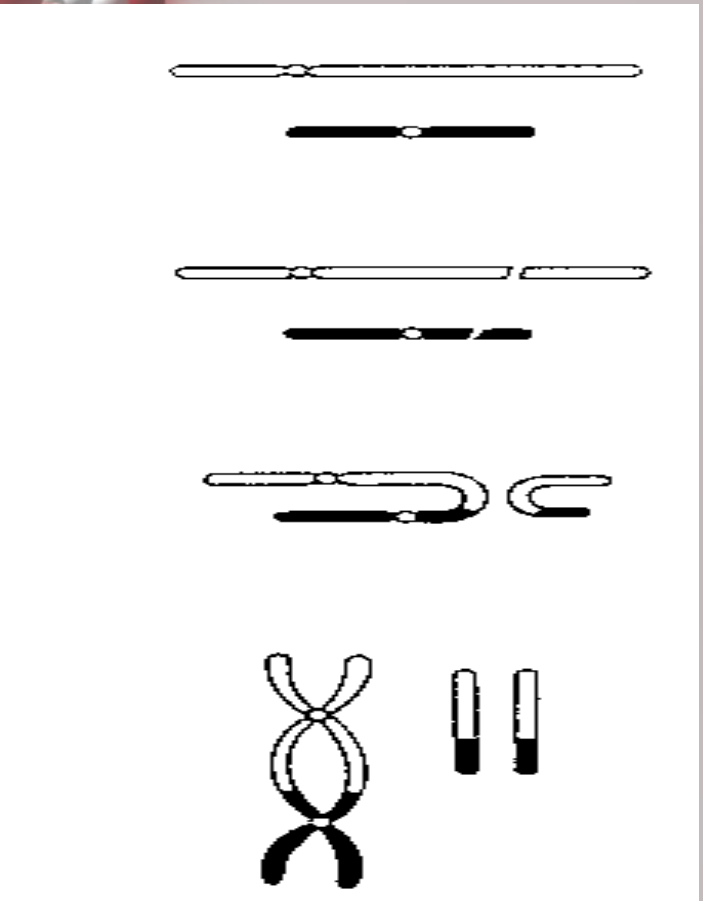
- Hromatidne aberacije se javljaju u kasnoj interfazi (G2), kada je već došlo do duplikacije genetskog materijala i kada se hromozomi sastoje od dve niti hromatina.

- Letalne aberacije
  - Dicentrični hromozom
  - Ciklična aberacija hromozoma
  - Anafazni most (hromatidna aberacija)

- Neletalne aberacije
  - Simetrične translokacije i male delecije
  - Aberacije usled gubitka supresor gena i dejstava onkogena

Dicentrični hromozom





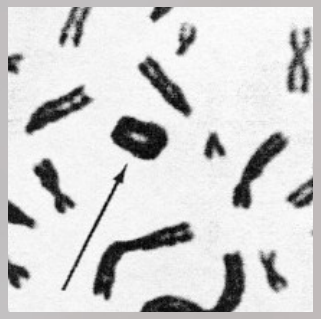
2-različita hromozoma pre replikacije

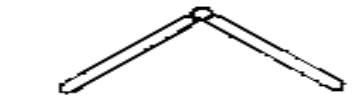
Jednostruki prekid u oba hromozoma

Pogrešno (“nelegitimno”) sparivanje

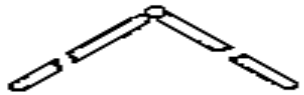
Dicentrični hromozom i acentrični ostatak

Centrični prsten

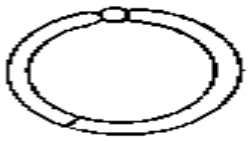




Pre-replikacioni hromozom

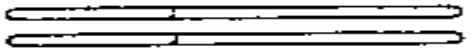


Prekid u obe grane istog hromozoma

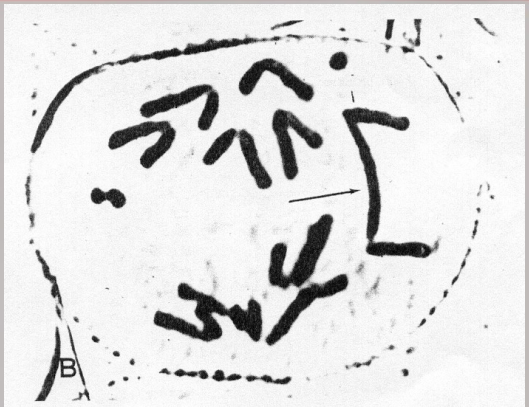


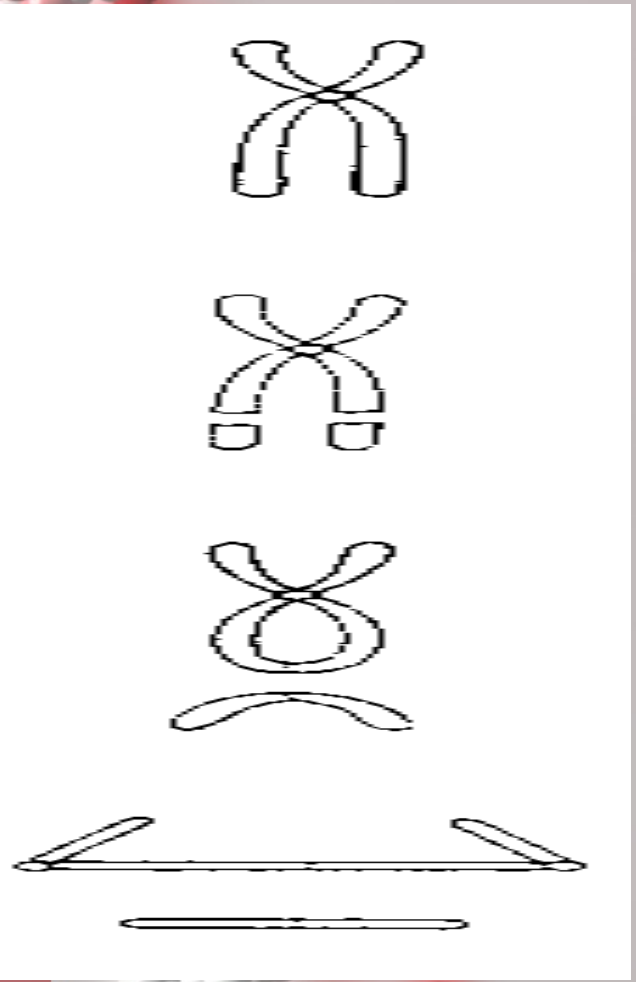
Ciklično sparivanje

Replikacija



Anafazni most





Hromozom posle replikacije

Prekid u obe hromatide

Unija hromatida

Dicentrični hromozom

Acentrični hromozom

Simetrična translokacije

- Uključuje prekid u 2 hromozoma pre replikacije, kada se fragmenti dva hromozoma međusobno razmenjuju
- Dele se na pericentrične (uključuju centromere) and paracentrične (ograničene na jednu granu hromozoma) inverzije
- Translokacije koje su povezane sa nekim malignititetima iazvanim aktivacijom onkogena (npr. Burkitov limfom)