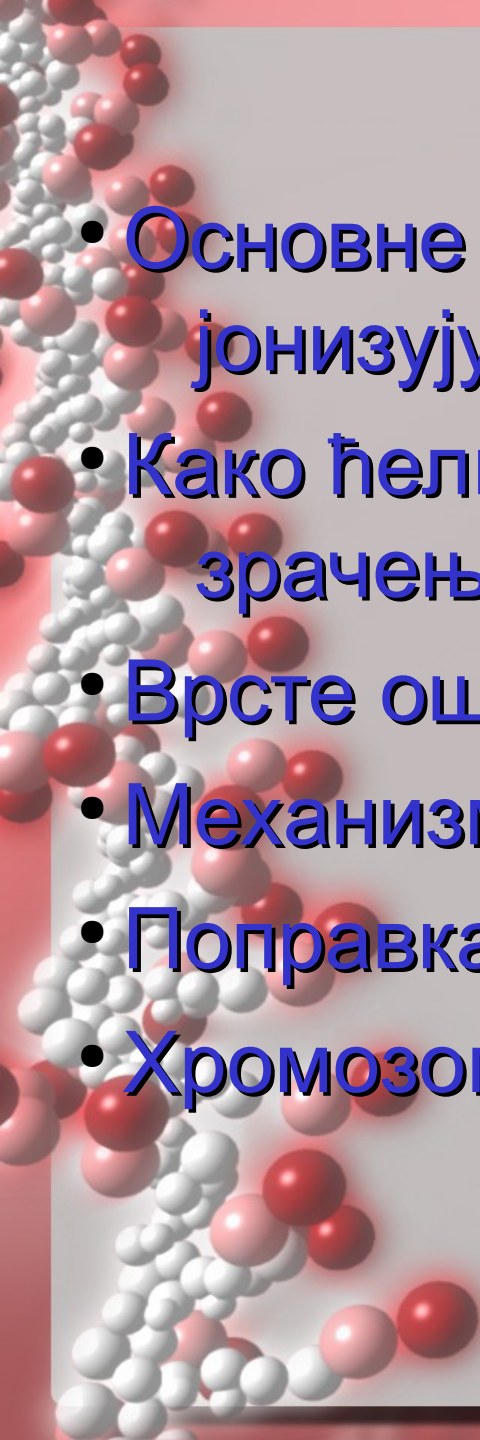
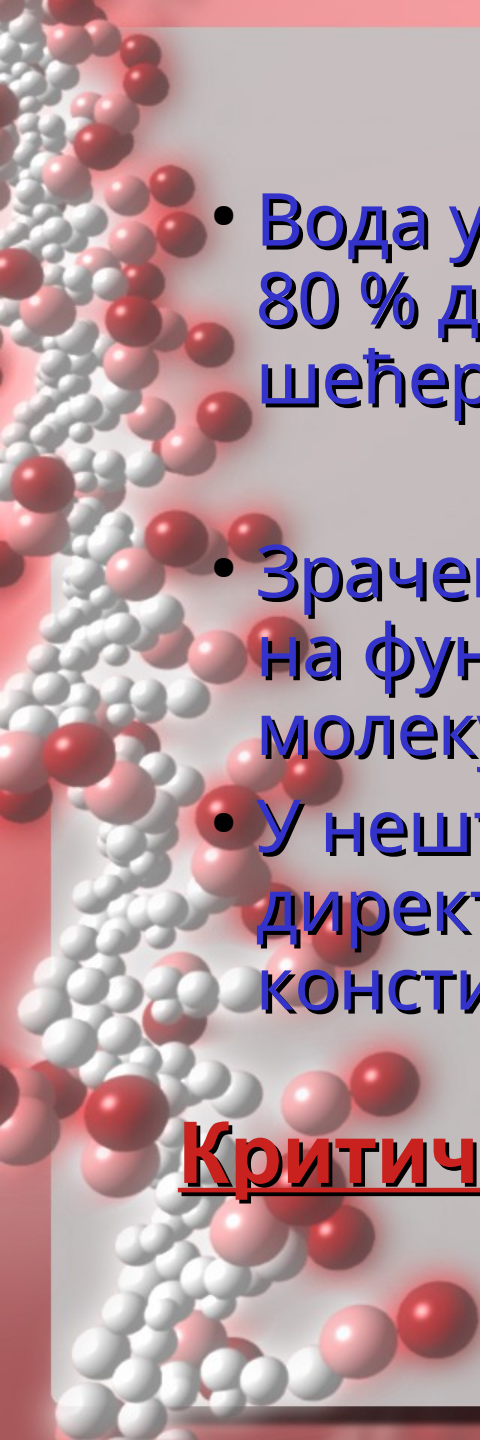


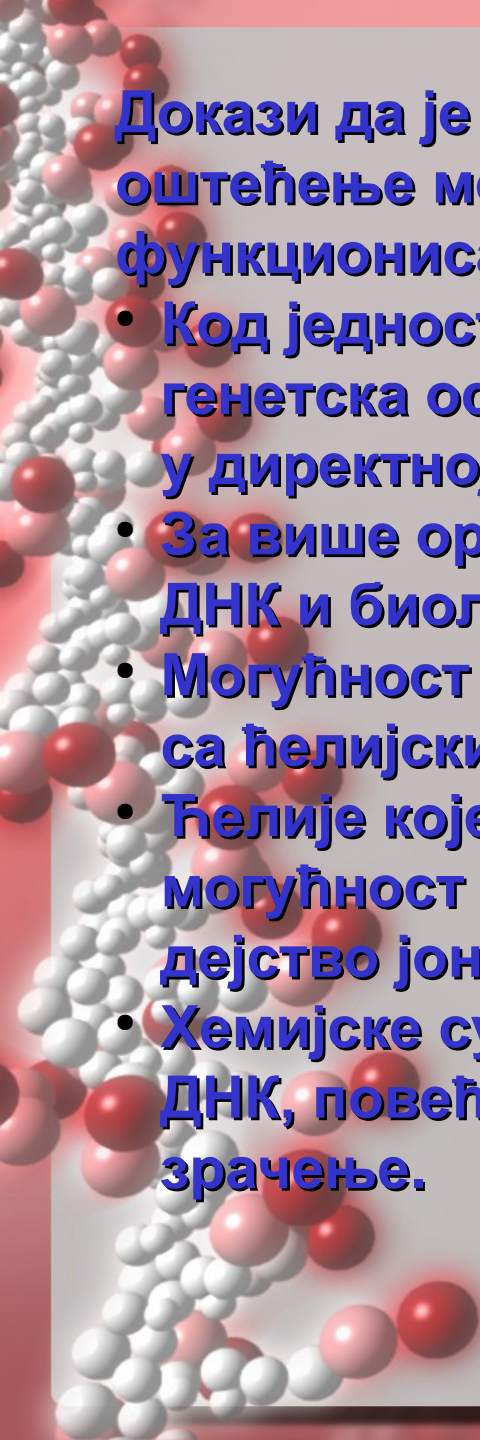
**Интеракција
јонизујућег зрачења са
живом материјом**



- Основне карактеристике интеракције јонизујућег зрачења са живим ћелијама
- Како ћелије умиру под дејством јонизујућег зрачења?
- Врсте оштећења ДНК
- Механизми оштећења ДНК
- Поправка оштећене ДНК
- Хромозомске аберације

- 
- Вода у састав живих ћелија улази са 50-80 % док остатак чине протеини, масти, шећери...
 - Зрачења преко реактивних врста утиче на функцију или доводи до инактивације молекула.
 - У нешто мањој мери заступљена је директна јонизација ћелијских конституената

Критична мета у живим организмима је ДНК



Докази да је ДНК молекул главна мета у ћелији, чије оштећење може да доведе до иреверзибилних промена у функционисању ћелије

- **Код једноставних организама број једноструких (чија је генетска основа један ланац) и двоструких прекида ДНК у директној су корелацији са биолошком инактивацијом**
- **За више организме корелација између броја оштећења у ДНК и биолошке инактивације је компликованија.**
- **Могућност поправке оштећења ДНК је блиско повезана са ћелијским преживљавањем.**
- **Ћелије које као резултат генетског дефекта немају могућност поправке ДНК оштећења осетљивије су на дејство јонизујућег зрачења.**
- **Хемијске супстанције које блокирају поправку оштећења ДНК, повећавају осетљивост ћелија на јонизујуће зрачење.**

Типови ћелија

• Соматске ћелије —————> митоза

• Полне ћелије —————> мејоза

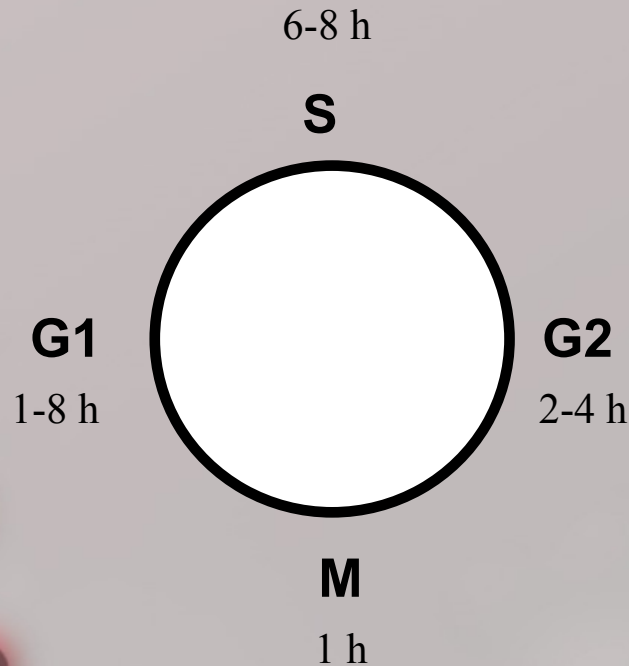
■ Типови соматских ћелија

■ Матичне ћелије (пр. протоћелије у хематопоеетском систему)

■ прелазне ћелије (пр. ретикулоцити)

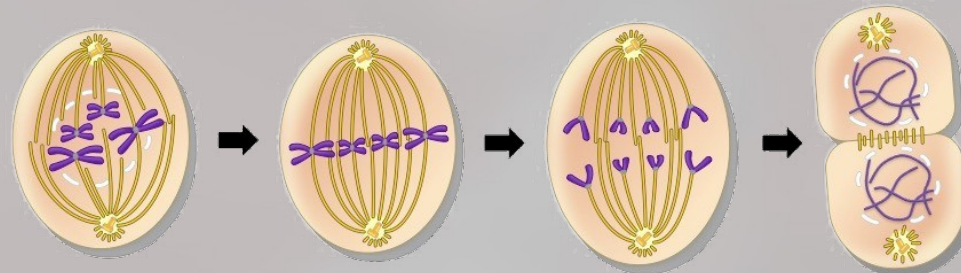
■ зреле (диференциране ћелије)

Ћелијски циклус и митоза



S – фаза синтезе
G1-припрема за фазу синтезе
G2-припрема за деобу
M - митоза

M - митоза



Временска скала ефеката дејства јонизујућег зрачења у ћелијама

1. Брзе реакције 10^{-10} до 10^{-3} s

- апсорпција енергије
- производња слободних радикала
 - напад на ДНК
- хемијска поправка ДНК

2. Биолошки процеси 10^{-3} до 10^4 s

- Ензимска поправка ДНК
- Рециклирање оштећених не-ДНК молекула
- Погрешно-оправљено ДНК оштећење фиксирано у геному

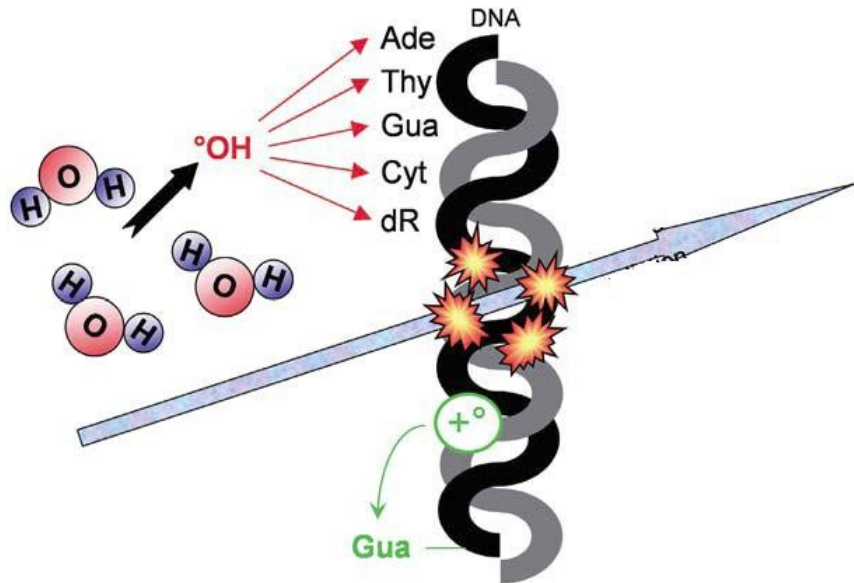
3. Биолошке последице 10^4 до 10^9 s

- Генетски ефекти у будућим генерацијама (наследни)
- Соматски ефекти (ћелијска смрт, канцер)

Смрт ћелије под дејством јонизућег зрачења

- Пост-митотска смрт
 - Губитак генетског материјала
 - Метаболичка смрт
 - Одложена апоптотска смрт
- Генетска нестабилност
 - Одложена апоптотска смрт
- Смрт у интерфази ћелијског циклуса
 - Тренутна (брза) апоптоза
- Репродуктивна смрт
 - Дуготрајни застој (прекид ћелијског циклуса, старост, диференцијација)

Оштећење ДНК под дејством јонизујућег зрачења



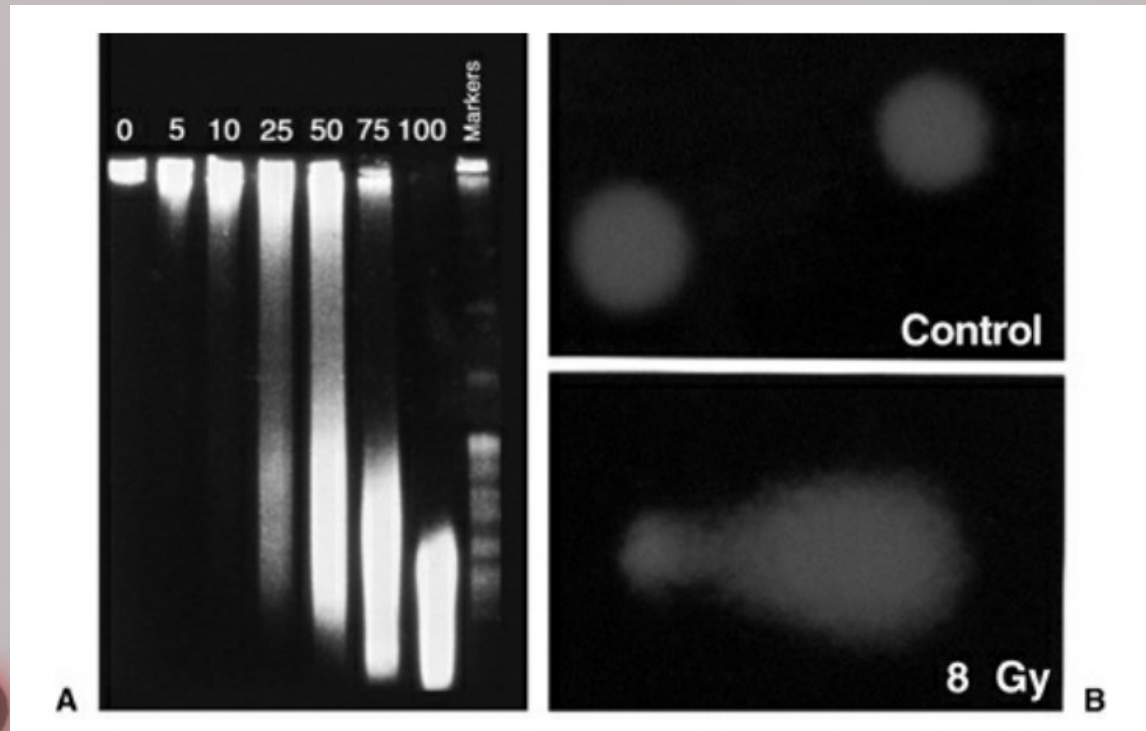
- Једноструки прекиди ланца ДНК
- Двоструки прекиди ланца ДНК
- Хемијска промена азотних база
- Хемијска промена шећерних остатака
- Умрежавање између ланаца ДНК
- Умрежавање између матриксних протеина (хистона) и ланца ДНК

Број и тип ДНК оштећења под дејством јонизујућег зрачења

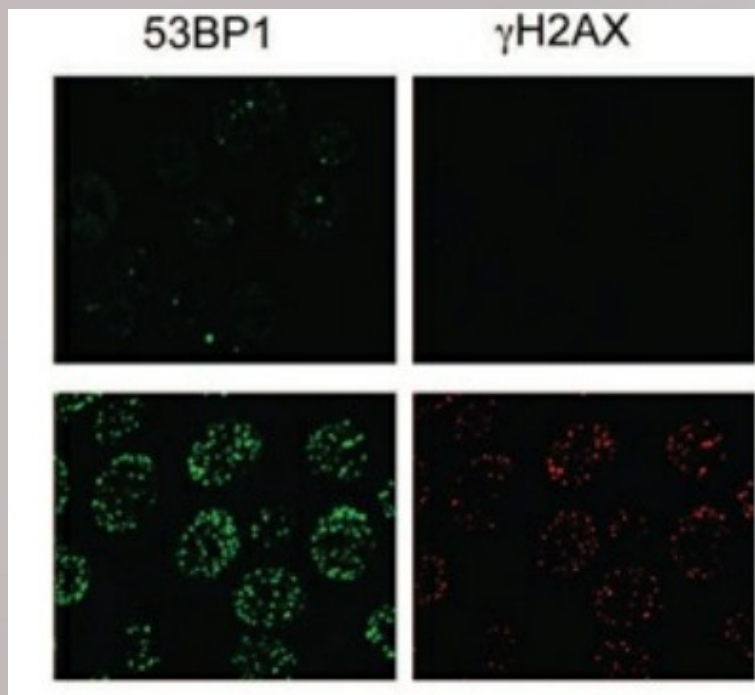
Тип оштећења		број /Gy /диплоидна ћелија
Прекид оба ланца		40
Једноструки прекид ланца		500-1000
Оштећење базе		1000-2000
Оштећење шећера		800-1600
ДНА-ДНА умрежавање		30
ДНА-протеин умрежавање		150

Мерење прекида у ДНК

- Више техника од којих су најпопуларније
 - Гел електрофореза са пулсним пољем
 - Електрофореза на једној ћелији

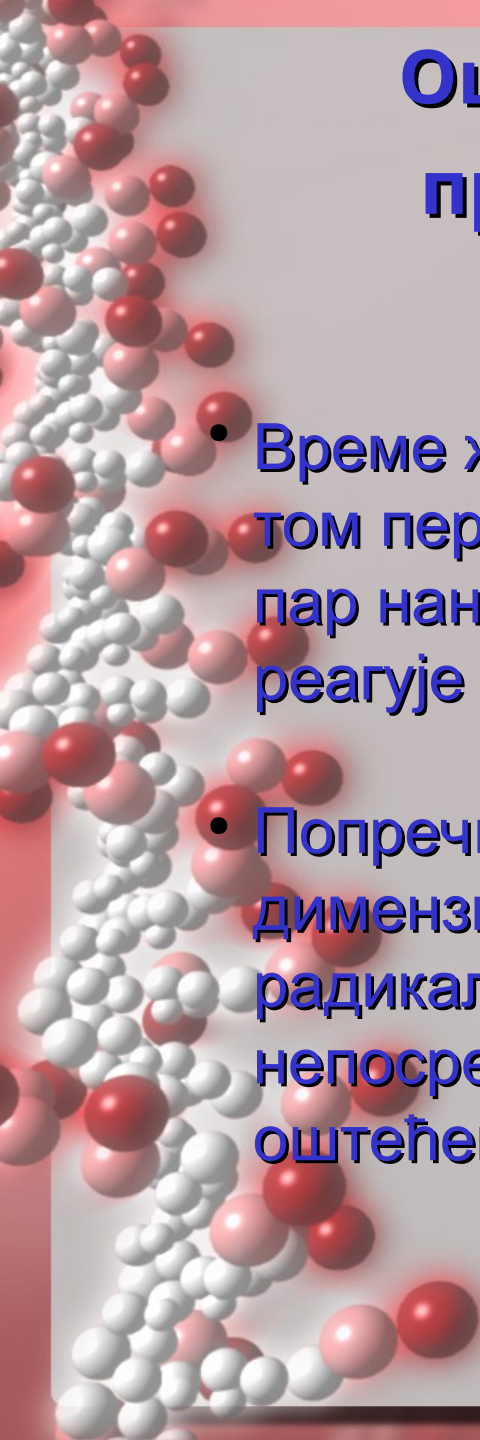


- Техника детекције радијационо индукованих фокуса
- Користе се антитела на H2AX и 53BP1 протеине



контрола

озрачено

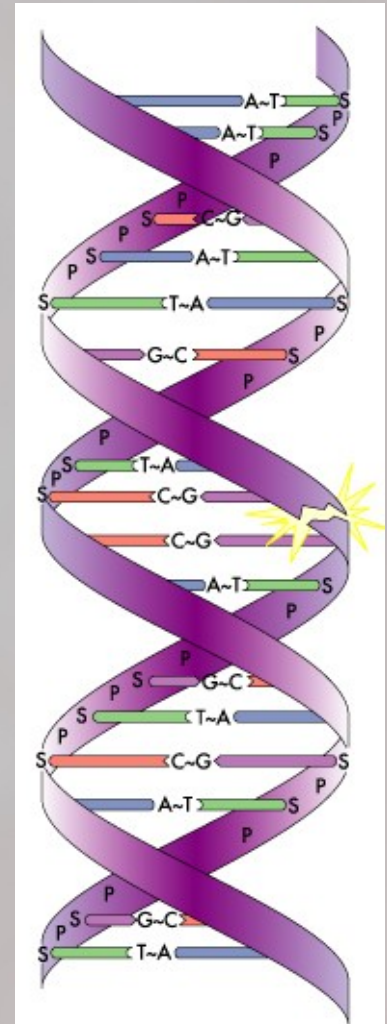


Оштећење ДНК под дејством примарно генерисаних $\text{OH}^\bullet$ радикала

- Време живота $\text{OH}^\bullet$ радикала је кратко; у том периоду овај радикал може да мигрира пар нанометара ($\sim 3,5 \text{ nm}$) пре него што реагује
- Попречни пресек ДНК хеликса има сличне димензије, тако да само хидроксилни радикали који настану у његовој непосредној близини могу да изазову оштећење или прекид/е ланца

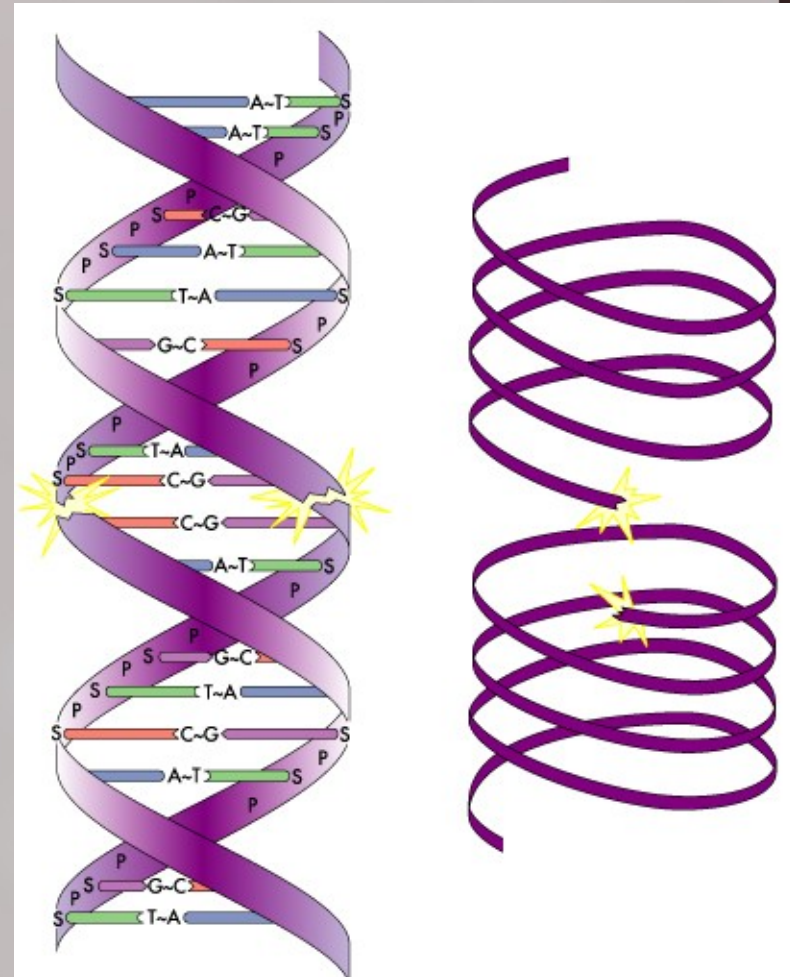
Једнострукки прекид ланца

- Дешава се као последица напада $\text{OH}^\bullet$ радикала на дезоксирибозни остатак у ланцу ДНК
- Дејством секундарних електрона
- Реакцијом дезоксирибозног остатка са радикалом насталим од азотне базе
- Оштећење је поправљиво (error free repair)



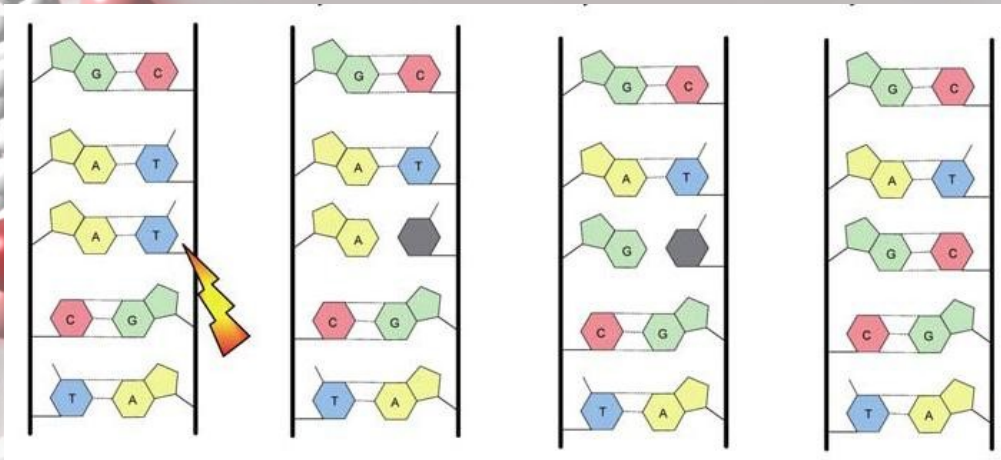
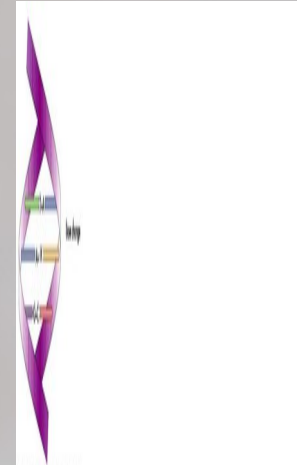
Прекид оба ланца ДНК

- Дешава се услед пролаза секундарне наелектрисане честице/ца
- Доводи до прекида хромозома
- Овакво оштећење је тешко поправљиво – поправка је подложна грешкама
- Уколико овакав догађај не доведе до смрти ћелије, долази до озбиљних промена у генетском материјалу



Оштећење (delecija) azotna baze

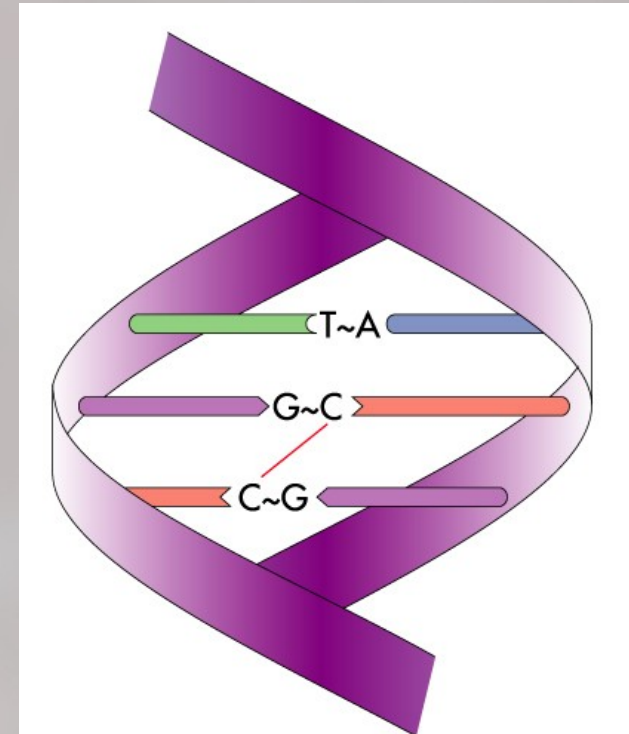
- Тешко поправљиво оштећење
- Узрок мутација



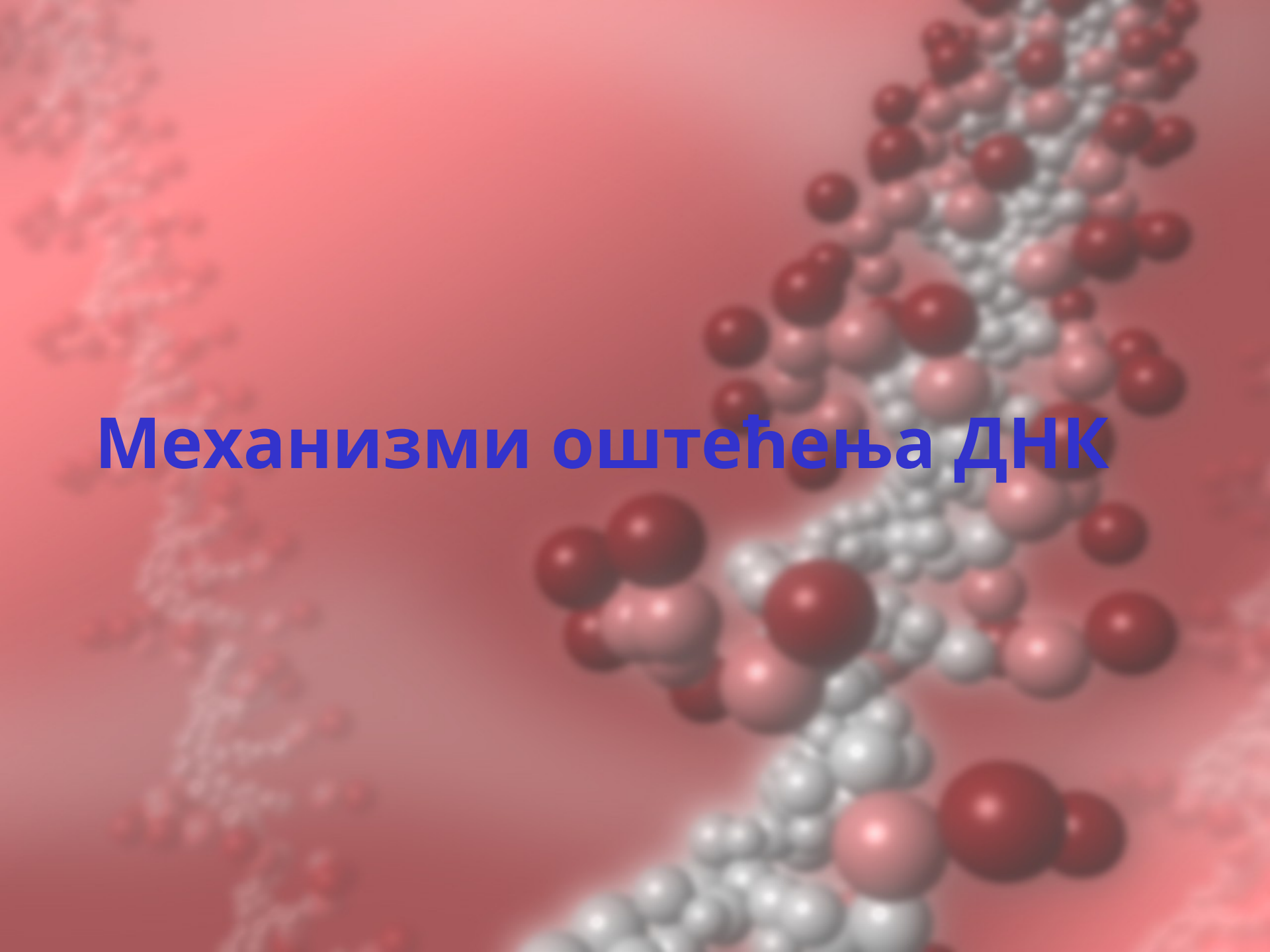
Мутација због
оштећења једне
базе

Умрежавање у ДНК хеликсу

- Настаје као последица проласка наелектрисане честице
- Углавном настаје између истих база
- Ометена репликација ДНК



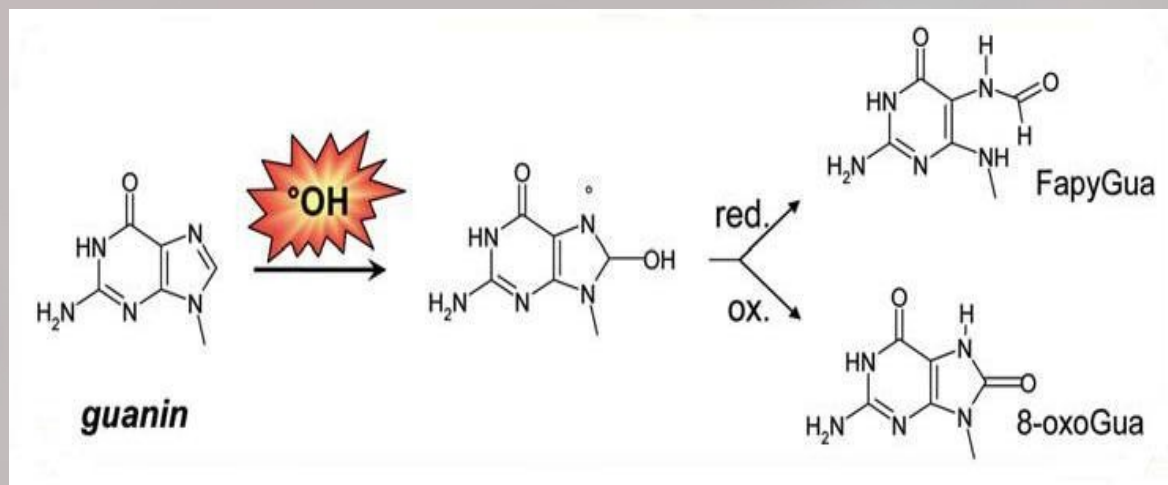
Механизми оштећења ДНК



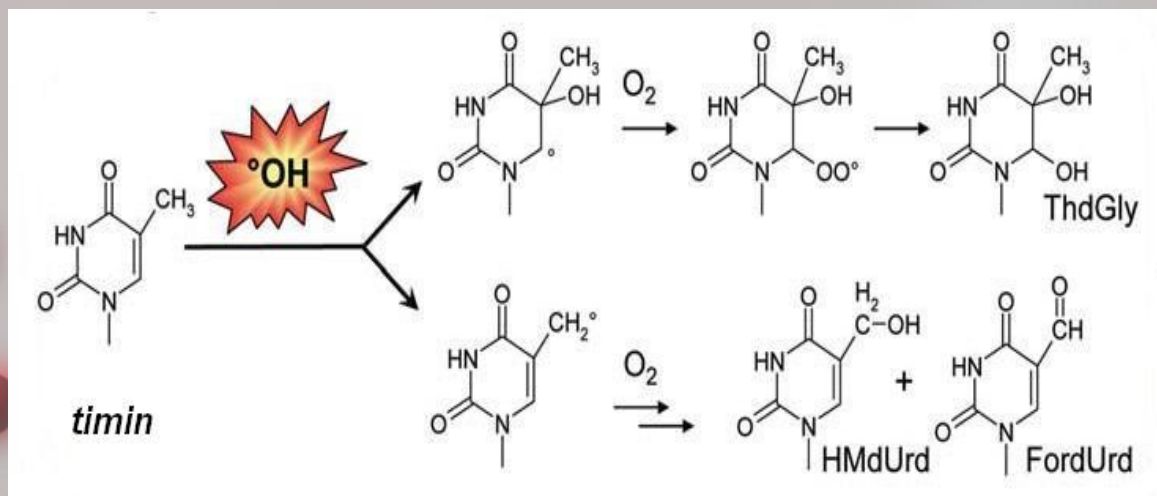
Реакције са $\text{OH}^\bullet$ радикалима

Дифузија је одлучујући степен у механизму

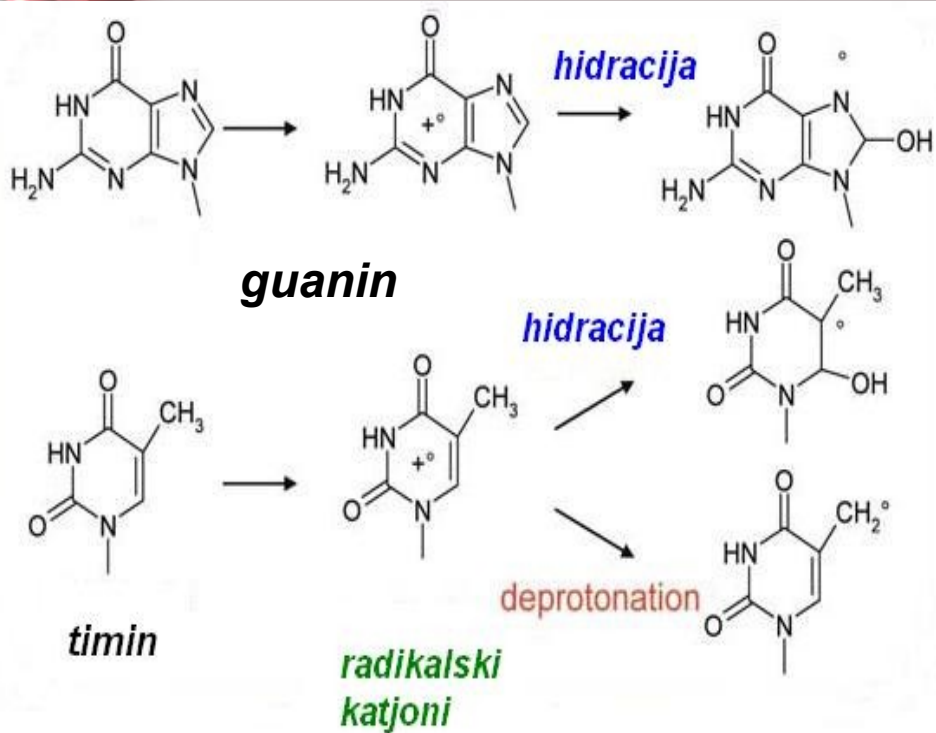
У интеракцији са пуринским базама (аденин, гуанин) доминантна је адиција $\text{OH}^\bullet$ радикала у положају C8 (напад на двоструку везу) при чему настаје 8-хидрохи-7,8-дихидропурин-7-ил радикал. Овај радикал даље подлеже оксидацији при чему се добија 8-оксо-7,8-дихидропурин. Компетитивна редукција доводи до отварања имидазолског прстена и настајања формамидопиримидина (*Fapy*)



У интеракцији са пиримидинским базама (тимин, цитозин) долази до адиције $\text{OH}^\bullet$ радикала у положају C5 и конкурентског процеса абстракције водоника са метил групе, што доводи до формирања угљенично центрираних радикала. Они даље подлежу оксидацији, при чему се као крањи производ у првом случају добија 5,6-хидрокси-5,6-дихидропиримидин, а у другом смеша 5-(хидроксиметил)-2'-деоксиуридина (HMdUrd) и 5-формил-2-деоксиуридина (FordUrd).



Директан утицај зрачења на азотне базе



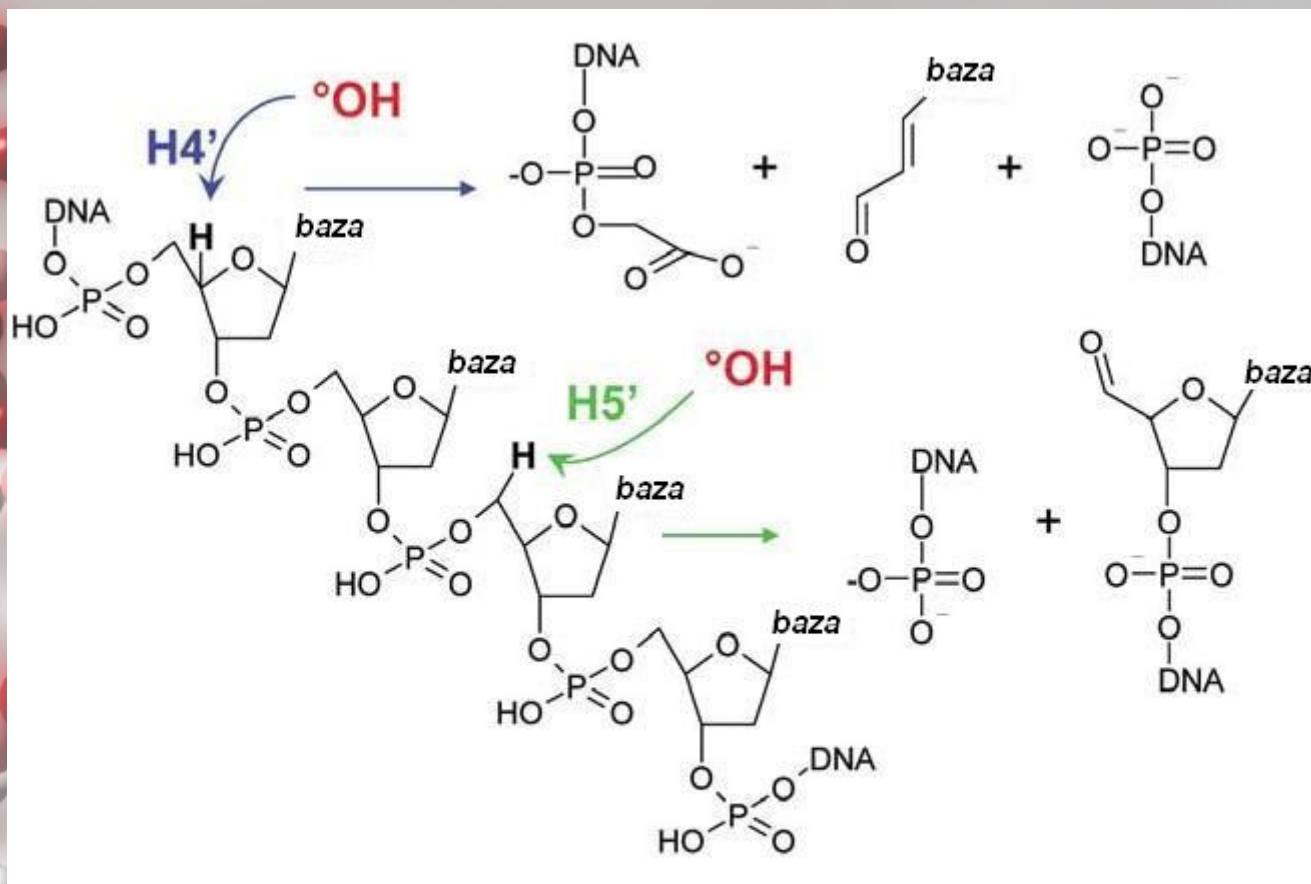
8-хидрокси-7-гуанидил радикал

6-хидрокси-5,6-дихидротимид-5-ил радикал

метил-центрирани тимил радикал

Радијационо-индуковано оштећење у олигонуклеотидима и двоструком ДНК хеликсу

Оштећење 2-дезоксирибозе у ДНК ланцу дешава се путем абстракције водоника са положаја C4' или C5', што у већини случајева доводи до прекида ДНК ланца



Radijaciono indukovano oštećenje baze u izolovanoj DNK

Испитивања са излагањем изоловане ДНК јонизујућем зрачењу у медијуму засићеном кисеоником показала су да су главни производи измењени гуанидин - 8-оксо-7,8-дихидрогуанин, као и HMdUrd i FordUrd.

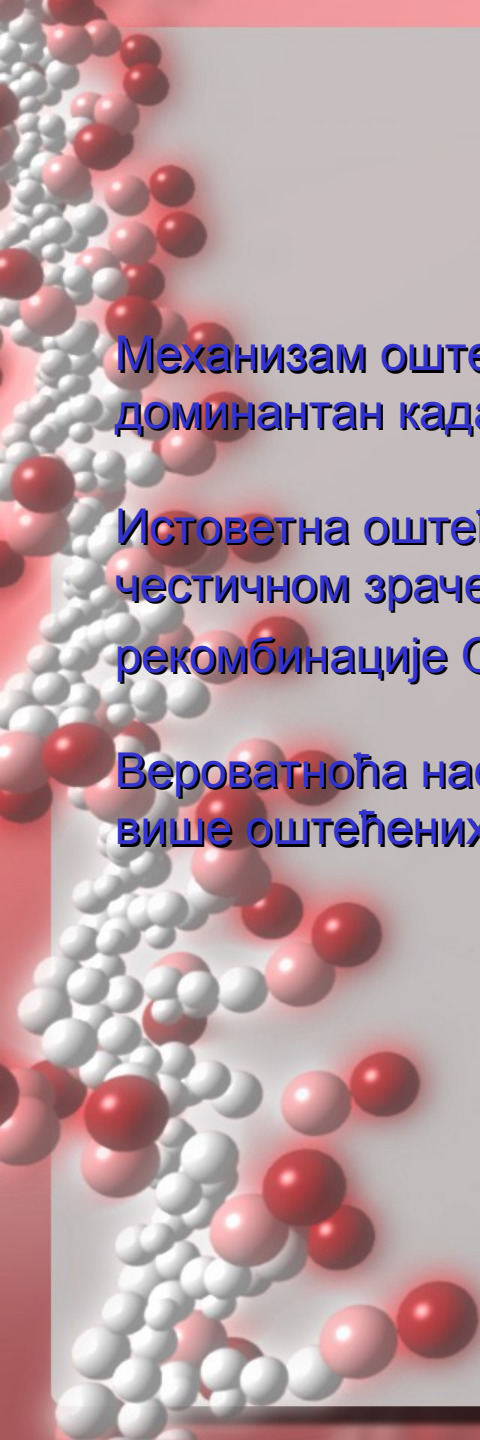
У редукционој средини добијају се исти продукти као и у случају изолованих азотних база.

Двоструко оштећење азотне базе у ланцу ДНК се дешава када настали пиримидински или пурнински радикал реагује са суседном азотном базом. Тако оксидовани тимил радикал (перокси тимил радикал) може да реагује са суседним гуанином дајући 8-оксоGua/dF тандем оштећења.

Примарно настало позитивно наелектрисање (“шупљина”) може мигрирати у ДНК ланцу, ко не буде заробљено на локацији која показује најнижи јонизациони потенцијал (као што је нпр. ГГ дублет). Тако се стварно оштећење може јавити далеко од места јонизације.

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 pirimidinske 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 koncentracijom kiseonika



Механизам оштећења ДНК дејством хидроксилног радикала је доминантан када је изложена јонизујућем зрачењу ниског LET-а

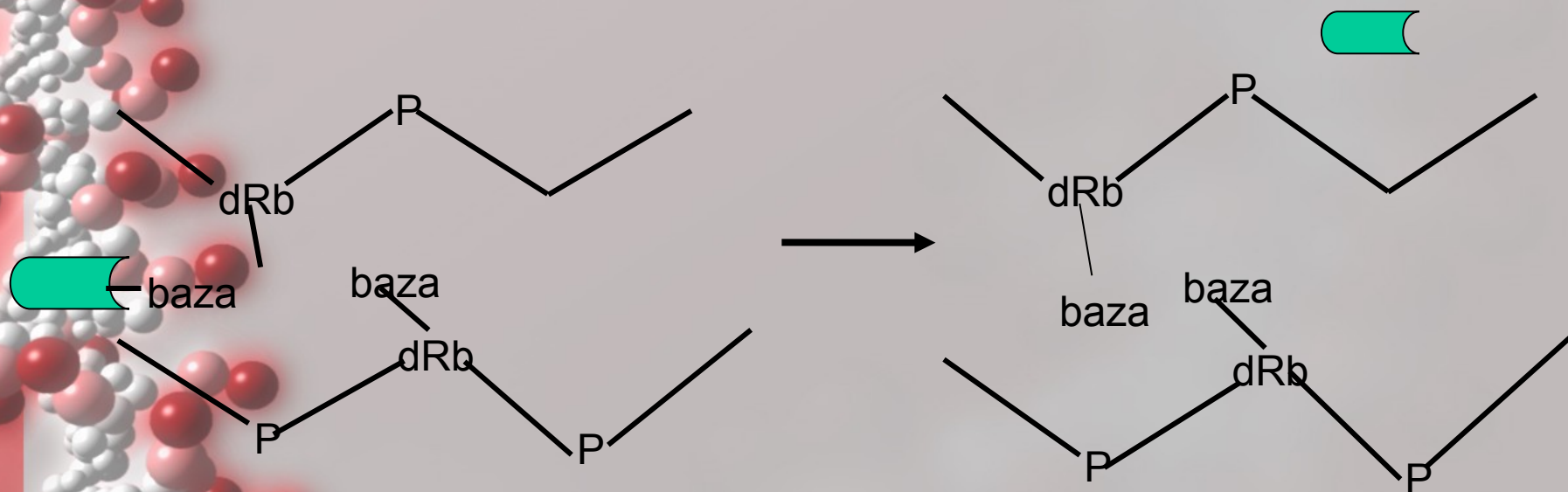
Истоветна оштећења нуклеотида се јављају и код излагања честичном зрачењу (висок LET), само што су она због ефикасније рекомбинације $\text{OH}^\bullet$ радикала у њиховом трагу, ређа.

Вероватноћа настајања кластерских оштећења (низа од две или више оштећених база расте са LET-ом

Хијерархија оправке ДНК

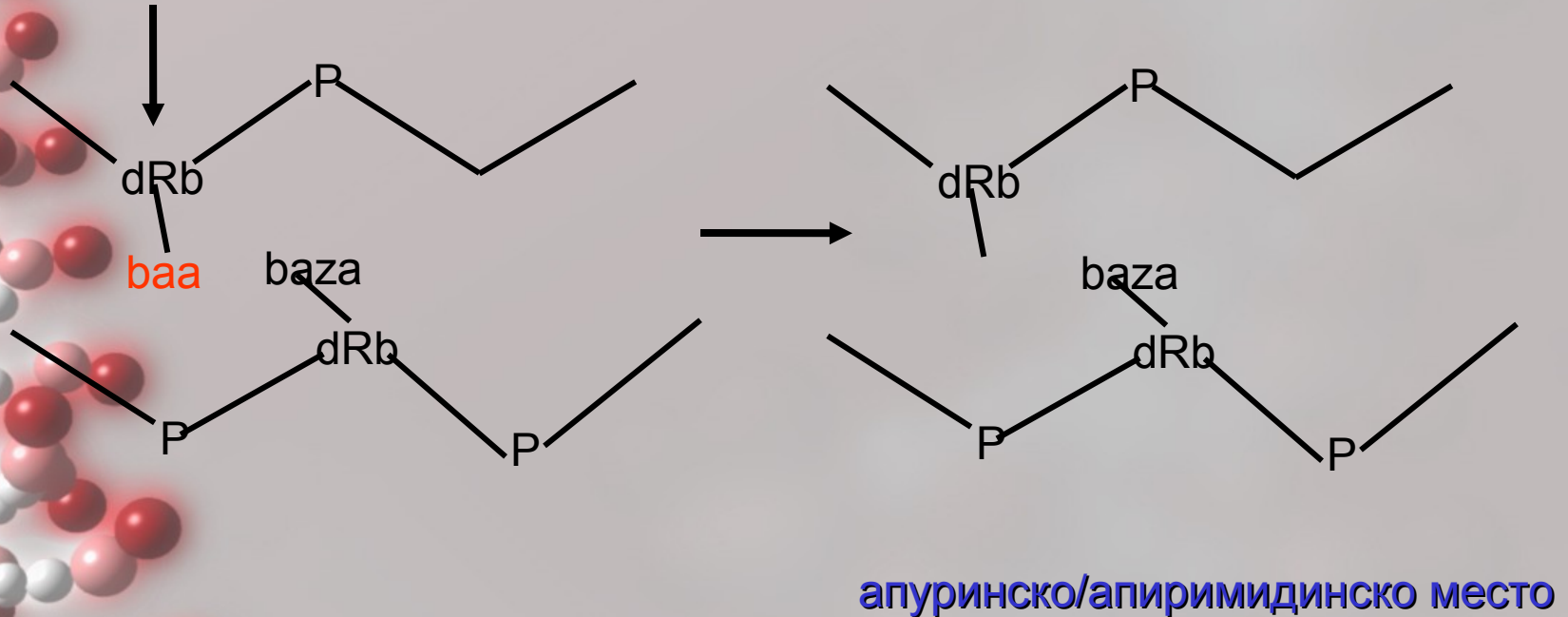
- Корекција оштећења
 - дејство специфичних ензима за специфично оштећење т.ј. дејство алкил трансфераза
- Поправка недостатка базе
 - Један нуклеотид (апурински/апиримидински)
- Поправка погрешног спаривања
 - Едитовање матрице: погрешна спаривања/петље
 - ?механизам прекида ланца
- Поправка недостатка нуклеотида
 - Исечак дела ланца
- Поправка прекида оба ланца ДНК
 - Нехомолого спривање
 - Хомолога рекомбинација

Директна корекција оштећења



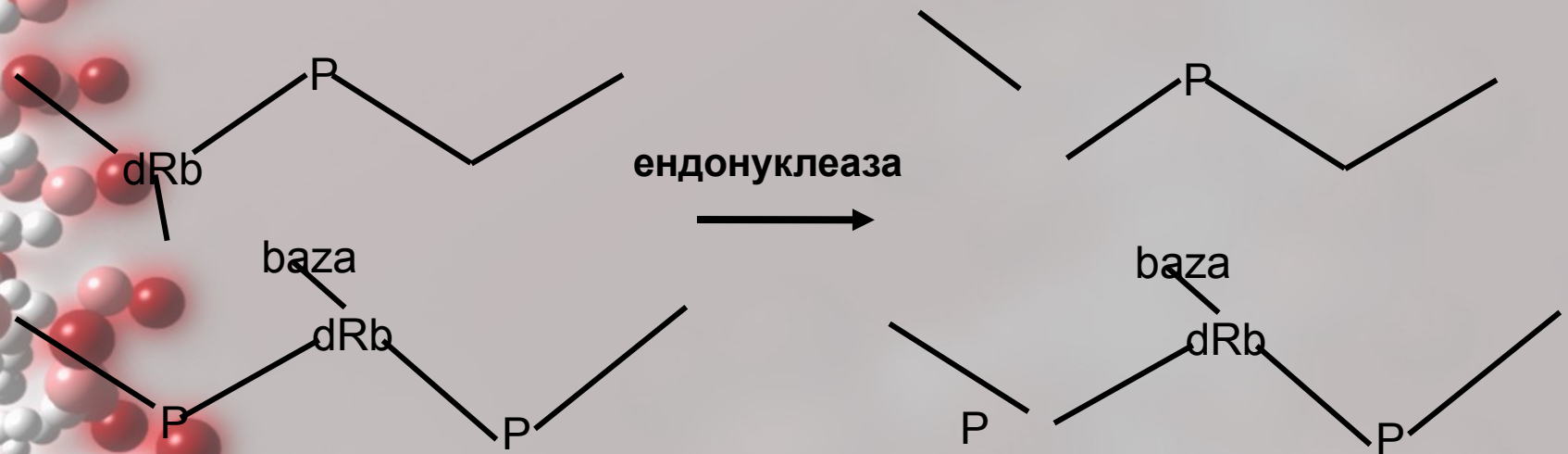
Поправка оштећења базе

гликозилаза



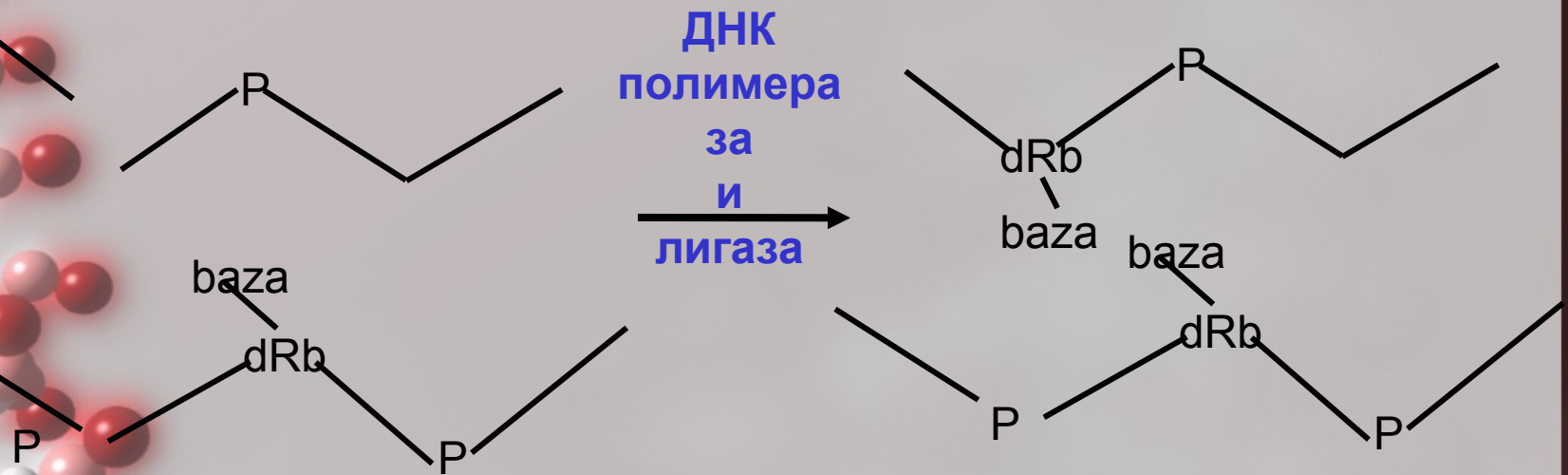
Ензим гликозилаза детектује оштећење азотне базе и оставља непопуњено место (апурино/апиримидино локација)

Поправка недостатка базе



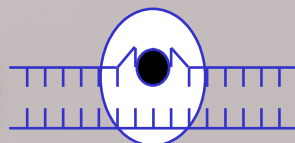
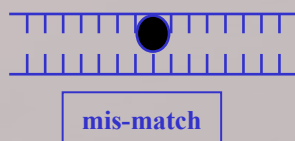
Најчешћи механизам поправке недостатка базе укључује исецање дела ланца помоћу ензима ендонуклеазе и ...

Поправка једноструког прекида ланца/недостатка нуклеотида



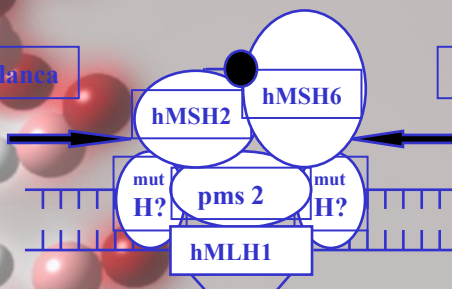
на основу матрице из комплементарног ланца дејством ДНК полимеразе реконструише се недостајући исечак, док се дејством лигазе врши спајање закрпе са преосталим делом ланца.

Поправка погрешног спаривања



“odmotana” DNK

Isecanje lanca



Isecanje lanca



Uklanjanje isečka



Re-sinteza



Ponovno spajanje

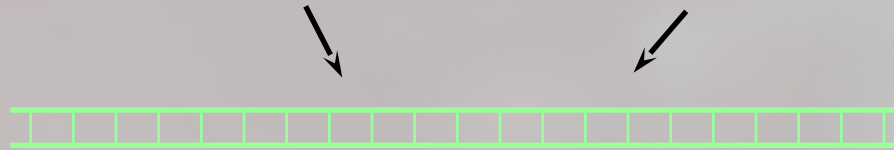
Поправка прекида оба ланца ДНК

Двоструки прекид ланца



Нехомолого спајање
крајева

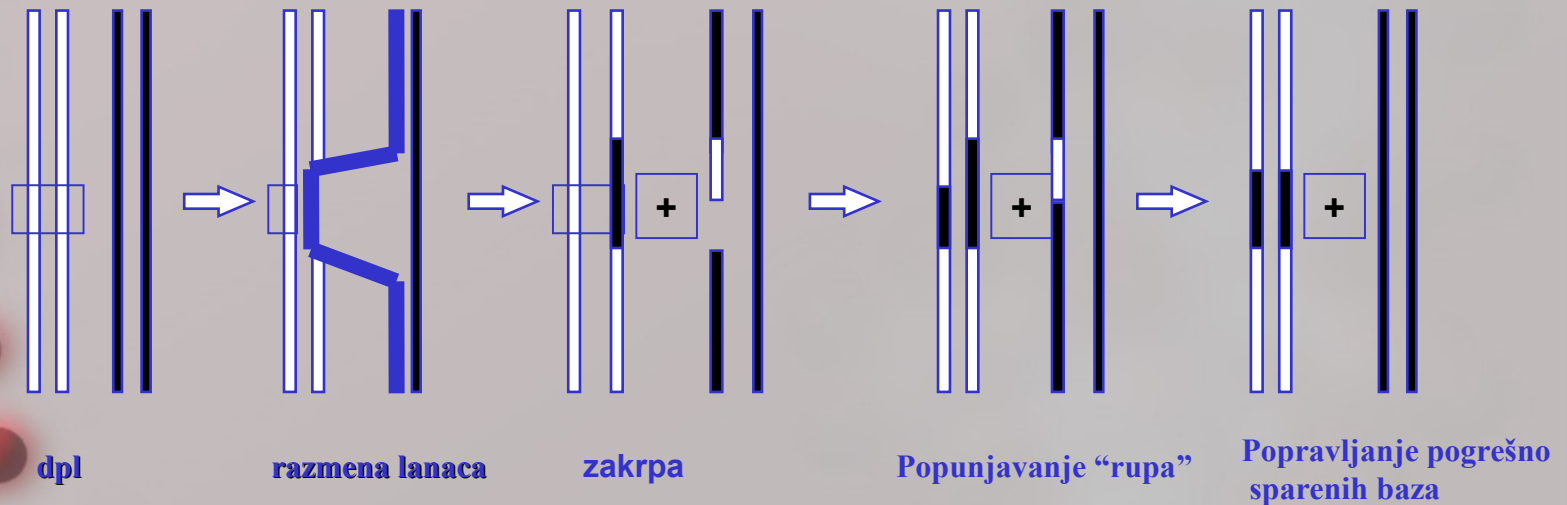
Хомолога
рекомбинација



Без хомологије
Подложно грешкама
Дешава се у G1 фази

Хомологна матрица
Без грешака у оправци
Дешава се у S/G2 фази

Хомолога рекомбинација

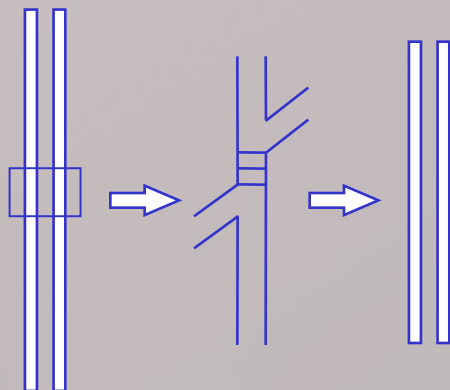


Егзонуклеаза повлачи део једног ланца из интактног хеликса, који се налази у близини места дпл. Затим се ензим гесА веже са изложени ланац и иницира размену између ланаца. Процес се завршава исецањем дела из интактног ланца и реконструкцијом недостајућих делова ланца у оба дуплекса

dsb

Нехомолого спаривање

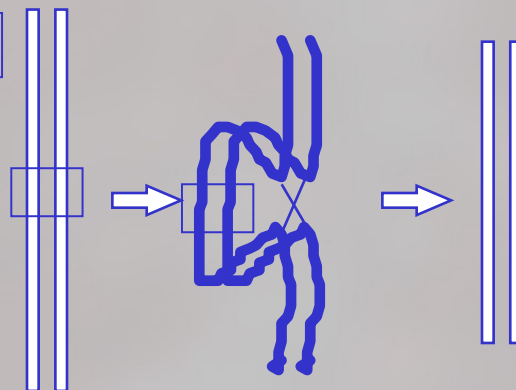
А

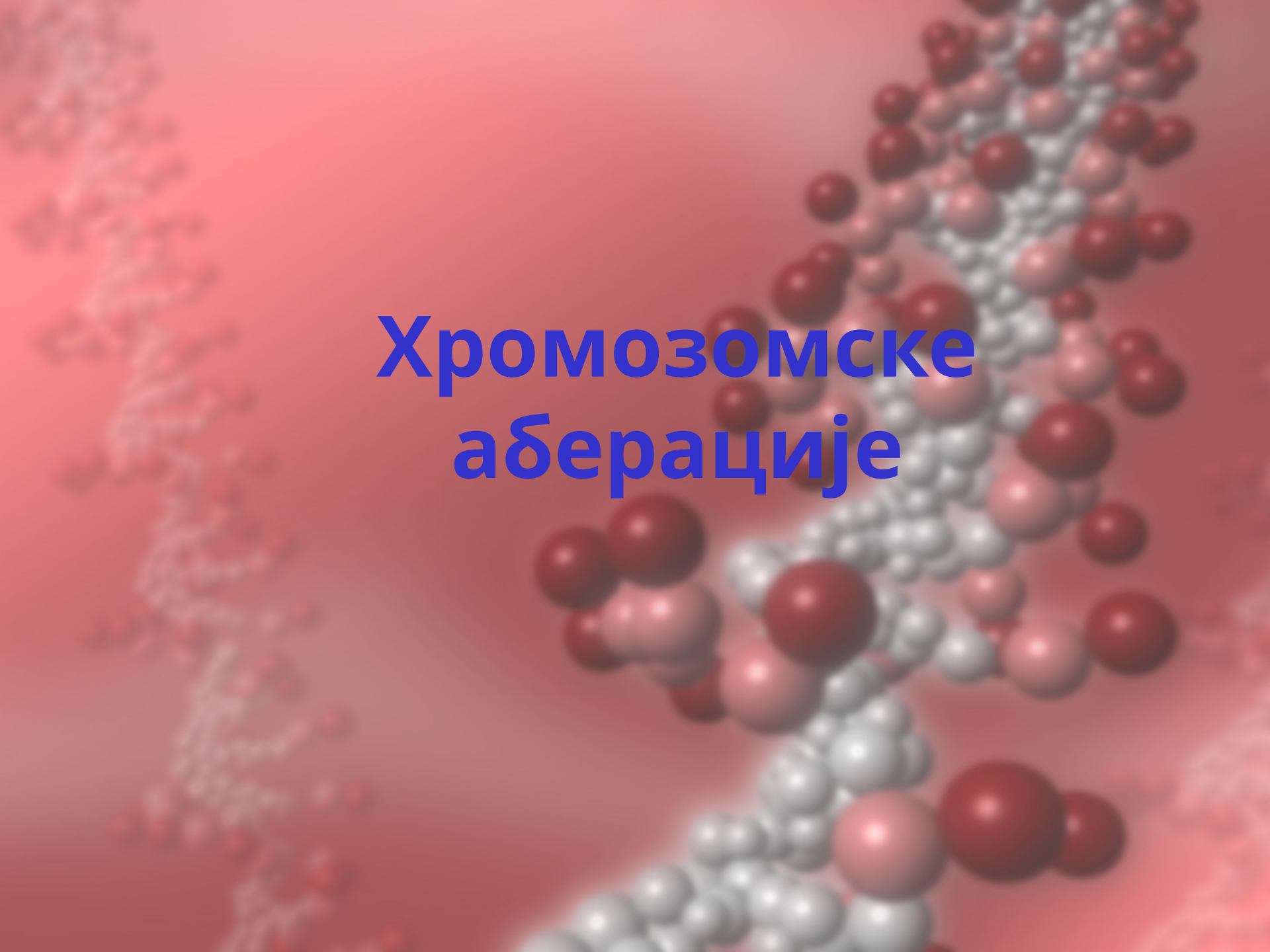


Поравнање
на основу
дела ланца

Спаривање и
исецање
остатака

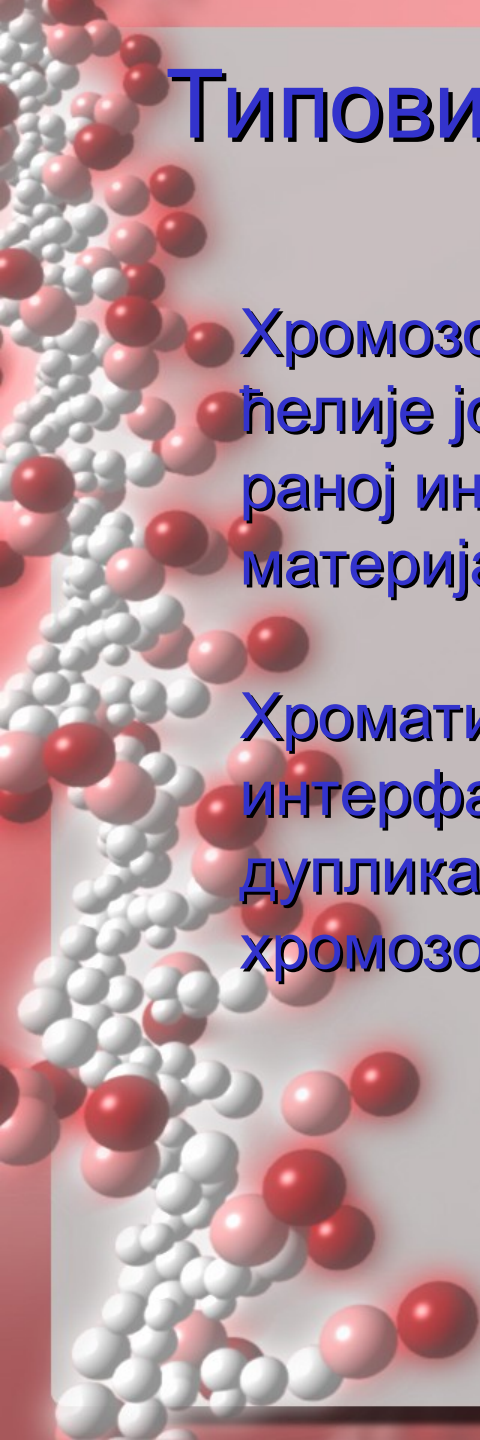
В





Хромозомске аберације

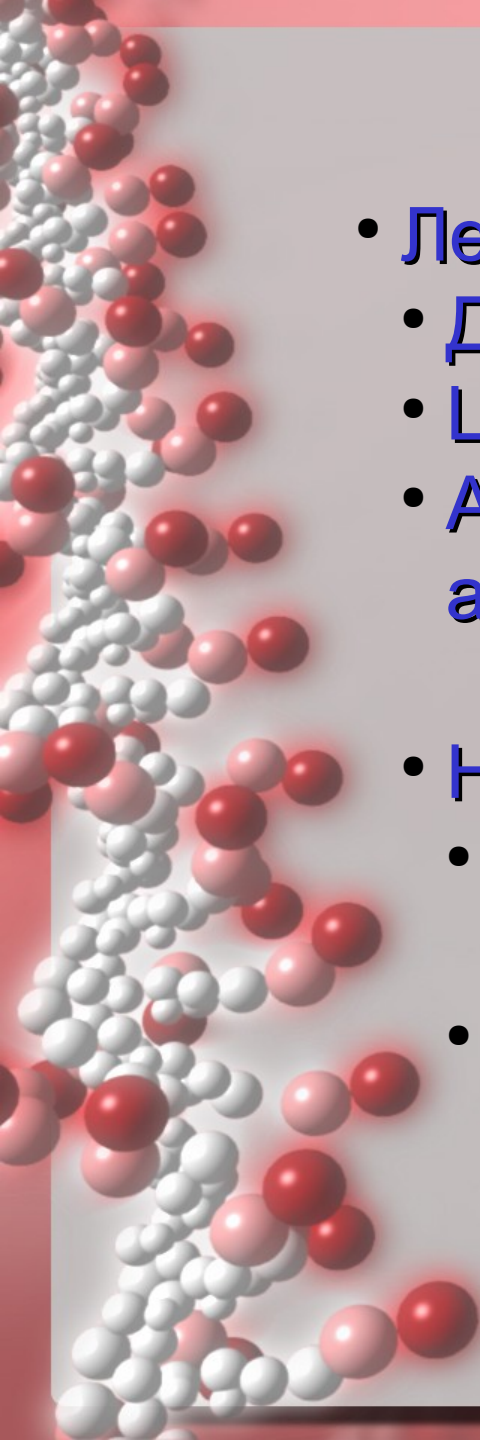
- 
- Услед излагања ћелија јонизујућем зрачењу може доћи до настајања прекида у хромозомима
 - Одвојени фрагменти су “лепљиви” и могу се придружити “лепљивом” крају ланца
 - Настали фрагменти се различито понашају:
 - Може се успоставити оригинална конфигурација
 - Може доћи до трајног одвајања – делеције дела хромозома
 - Фрагменти се могу међусобно спојити и придружити другим хромозомима, што даје јако измењене хромозоме.



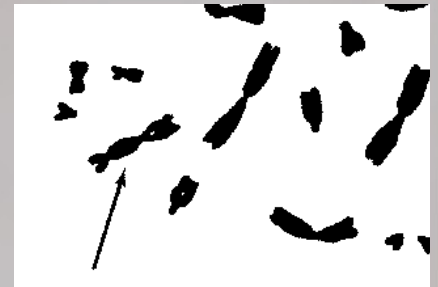
Типови хромозомских аберација

Хромозомске аберације су резултат излагања ћелије јонизујућем зрачењу док се она налази у раној интерфази (G1), пре дупликације генетског материјала.

Хроматидне аберације се јављају у касној интерфази (G2), када је већ дошло до дупликације генетског материјала и када се хромозоми састоје од две нити хроматина.

- 
- Леталне аберације
 - Дицентрични хромозом
 - Циклична аберација хромозома
 - Анафазни мост (хроматидна аберација)
 - Нелеталне аберације
 - Симетричне транслокације и мале делеције
 - Аберације услед губитка супресор гена и дејстава онкогена

Дицентрични хромозом



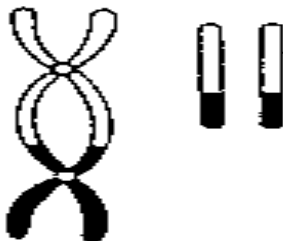
2 различита хромозома пре репликације



Једноструки прекиди у оба хромозома

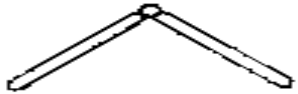


Погрешно („нелегитимно“) спаривање

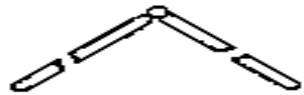


Дицентрични хромозом и ацентрични остаци

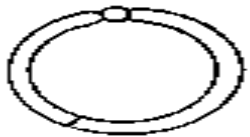
Центрични прстен



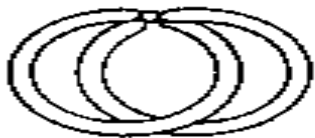
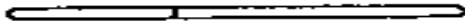
Пререпликациони хромозом



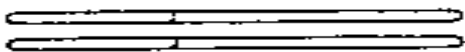
Прекиди у обе гране истог хромозома



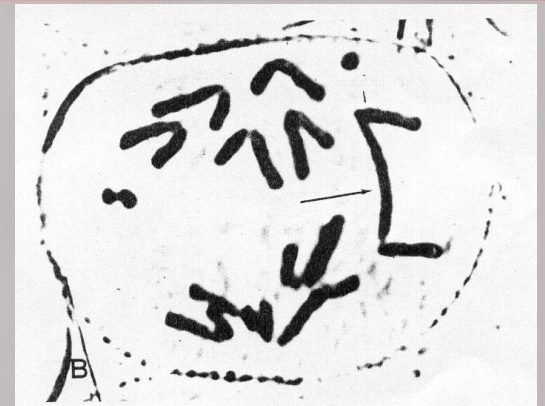
Циклично спаривање



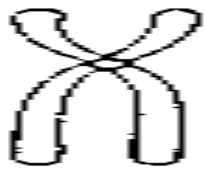
Репликација



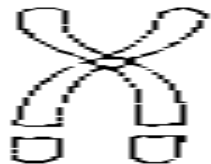
Анафазни мост



Хромозом после репликације



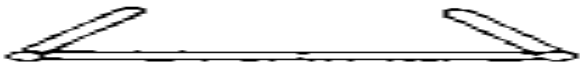
Прекид у обе хроматиде



Унија хроматида



Дицентрични хромозом



Ацентрични хромозом





Симетричне транслокације

Укључују прекид у 2 хромозома пре репликације, када се фрагменти два хромозома међусобно размењују

Деле се на перичентричне (укључују центромере) и парацентричне (ограничене на једну грану хромозома) инверзије

Транслокације које су повезане са неким малигнитетима изазваним активацијом онкогена (нпр. Буркитов лимфом)