

BIODOZIMETRIJA

Nevenka kofjač, Marjan Kofjač

Uvod

BiODOZIMETRIJA je metoda s katero ugotavljamo škodo, ki jo povzročijo ionizirajoča sevanja, kemični agensi in druga škodljiva sredstva na živo celico. Glavnina osnovnih raziskav na tem področju in kako ti mehanizmi delujejo je bila narejena na živalskih celicah in bolj primitivnih organizmih (vinska mušica).

Ionizirajoča sevanja so:

- X žarki,
- Protoni,
- Nevtroni,
- Žarki α , β , γ .

Lastnosti ion. sevanja je, da povzročajo ionizacijo. Enako imenujemo disociacijo molekul, pri kateri nastajajo ioni. Pri prehodu skozi materijo, se visokoenergetski žarki, oziroma delci zaletavajo v atome molekul in izbijajo elektrone. Iz molekul ali atomov tako nastajajo prosti radikali (skupine s prostimi vezmi) ali pa ioni. Ti interagirajo z drugimi molekulami in povzročajo sprostitve prostih elektronov. Velike molekule, kot so npr. DNA in proteini so lažje tarče takšnih sevanj. Molekule z ionizirajočimi ali ekscitiranimi atomi so bolj reaktivne kot molekule v normalnem oziroma nevzbujenem stanju. Povečana reaktivnost v DNA je osnova za mutageni učinek energijskih žarčenj. Nevarnejše je sevanje krajših valovnih dolžin pod 1 nm. Velja pravilo, krajša kot je valovna dolžina, bolj so žarki prodorni in zato nevarnejši.

Frekvenca mutacij je neposredno sorazmerna količini žarkov. Razmerje med frekvenco pojavljanja mutacij in količino prejetega žarčenja je linearna (LET).

Zato je vseeno ali je celica izpostavljena šibkemu žarčenju dalj časa ali krajši čas močnemu žarčenju. Varne doze sevanja ne poznamo.

Poškodbe sesalskih celic zaradi sevanja delimo v tri skupine:

- letalna poškodba, ki je ireverzibilna, nepopravljiva in povzroči smrt celice (LD),

- subletalna poškodba, ki se pri normalnih pogojih lahko obnovi v nekaj urah, razen, če ne pride do dodatne subletalne poškodbe in s prvo lahko tvori letalno poškodbo (SLD),
- potencialna letalna poškodba je tista na katero lahko vplivamo s pogoji okolja (PLP).

Vzroki za nastanek poškodb žive celice

Poškodba katerekoli žive celice, je posledica ionizacije, ki jo povzročijo ion. sevanja (x -žarki, γ -žarki, nevtroni in α -delci). Ob interakciji sevanja s snovjo le-to izbije elektrone iz atomov skozi katere potujejo. Izbiti elektroni povzročajo pozitivno nabite ione. Količina in energija izbitih elektronov je odvisna od vrste sevanja. Ta količina narašča z naraščanjem naboja in mase delcev.

Pomembno je poudariti, da je za določanje bioloških učinkov sevanja nujno določiti vrsto in energijo sevanja, ki definirata prodornost sevanja (količina sevanja na določeni razdalji), ker s tem določamo karakteristiko posameznih sevanj. To je t.i. LET (linear energy transfer). LET je definirala ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurements), kot razmerje dE / dl , pri čemer je dE povprečna količina določenega sevanja, ki deluje na določeno snov na določeni razdalji dl .

Bolj pogosto LET definiramo z enotami keV / mm . LET je za vsako količino in vrsto sevanja specifičen.

LET za 250 kVp (kV vrh) je okrog $2 keV / mm$.

Težki delci imajo npr. LET od 100 do 2000 keV / mm ali več.

Posledica različnih ionizacij z različnimi LET je slučajnostna porazdelitev poškodbe celic in kromosomskih aberacij na celico. Pri nizkem LET je poškodba DNA v celici naključna in slučajna, ker izbiti elektroni potujejo po različnih poteh. Pri visokem LET pa je energija bolj skoncentrirana in usmerjena bolj premočrtno, tako da lahko pričakujemo več celic z različnimi aberacijami.

Limfociti

V praksi uporabljamo kot detekcijski material za ugotavljanje škodljivih učinkov ionizirajočega sevanja na človeka periferne limfocite. Ti se med svojo krožno potjo po telesu praviloma ne delijo in ohranijo informacijo o morebitnem učinku sevanja na telo tudi dalj časa. Odvzeti vzorec krvi v kulturi primerno obdelamo tako, da se limfociti začno deliti in po 48.urah lahko opazujemo metafaze.

Poznamo dva glavna tipa limfocitov, to so T in B celice. Obe vrsti limfocitov izhajata iz celic kostnega mozga. Te nediferencirane celice migrirajo v thymus, kjer verjetno s somatsko mutacijo postanejo T limfociti, odgovorni za celično imunost, B limfociti pa verjetno nastajajo v kostnem mozgu in skrbijo za povečanje imunosti celotnega organizma. Človeški periferni limfociti predstavljajo vrsto celic, ki so v glavnem v interfazi (pre-syntetic) celičnega ciklusa. To je tako imenovana G 0 faza. V tej fazi so biokemične in fiziološke aktivnosti minimalne. Samo 0,2 % ali še manj limfocitov je v fazi G 1 (autosyntetic faza). To je faza v kateri nastajajo nove celične strukture. Ti limfociti so verjetno nastali iz velikih limfoidnih celic ali nezrelih plazmatskih celic. Prisotnost teh limfocitov lahko poveča število redko najdenih mitoz v periferni krvi. Običajni, tako imenovani majhni limfociti so po svoji strukturi samo skupinice DNA obkrožene z majhno količino citoplazme. Te celice lahko stimuliramo in vivo z antigeni ali in vitro z mitogeni. Ti povzročijo po posebnem tehnološkem postopku normalen cikel delitve celice.

Koncentracija limfocitov v periferni krvi niha. Pri odraslem, 21 letnem človeku najdemo približno 2500 limfocitov na mm^3 krvi (1000 - 4800 limfocitov na mm^3 krvi predstavljajo spodnjo in zgornjo mejo). Pri novorojenčku je število limfocitov dvojno, približno 5500 na mm^3 . Normalno je v periferni krvi do 90 % malih limfocitov, okrog 5 % je lahko srednje velikosti. Včasih so ta razmerja lahko tudi drugačna, tako da najdemo lahko tudi do 15 % limfoidnih celic.

V periferni krvi odraslega človeka je 70 % limfocitov tipa T in 30 % tipa B. Pri odraslem zdravem človeku je v organizmu 500×10^9 limfocitov, samo 2 % le-teh to je 2×10^9 pa se nahaja v periferni krvi. Življenska doba limfocitov je različna. Okrog 90 % T limfocitov živi od treh let do nekaj desetletij, 10 % pa živi od enega do deset dni. B limfociti imajo krajšo življensko dobo. Vsak dan se obnovi 2 - 5 % limfocitov.

Za interpretacijo in vivo induciranih kromosomskih aberacij je potrebno, da vsaj 80 % limfocitov nakopičenih v periferni krvi pripada skupini limfocitov, ki so v tej krvi sposobni preživeti (to so limfociti, ki so prešli skozi vranico, limfne bezgavke, ostala tkiva in organe in se ponovno vrnili v krvni obtok).

Čas, ki ga ti potujoči limfociti preživijo v periferni krvi je okrog 30 min. Ugotovljeno je bilo, da je limfocitov te vrste okrog 80 % in da potrebujejo za svoj krog po krvi in notranjih tkivih okrog 12 ur. Zato obstaja velika verjetnost, da se limfociti z mutacijami in aberacijami, do katerih je prišlo v drugih tkivih, pojavijo v periferni krvi.

Popravljalni mehanizmi

Vsi organizmi imajo razvite mehanizme za odpravljanje poškodb DNA. Mehanizme sproži poškodba, ki zaustavi podvojevanje DNA. Poznamo več načinov reparacije. Na različne patološke agense, ki vplivajo na DNA lahko celica reagira z različnimi reparacijskimi mehanizmi.

Fotoreparacija

Ena najpogostejših poškodb je **timinski dimer**, to je tesna povezava dveh diminov v verigi. Pri taki poškodbi poseben encim fotoliza razcepi timinski dimer na dva posamezna timina in podvojevanja verige DNA se lahko nadaljuje. Za normalno delovanje encima je potrebna vidna svetloba. Timinski dimer je značilen za poškodbo celice z UV žarki daljših valovnih dolžin, ki nimajo velikih energij in ne prodrejo globoko v celico.

Ekscizijsko ali izrezovalno popravlanje

To nastane po poškodbi celice z ionizirajočim sevanjem. Pri tej reparaciji poseben encim iz dvojne vijačnice odstrani 12–14 nukleotidov dolg fragment DNA v katerem je poškodba. Ker je informacija o zgradbi DNA ohranjena v kompletni verigi dvojne vijačnice, se nastala vrzel brez težav zapolni. To omogočata dva encima polimeraza DNA I, ki izdelata popravljeno odseka DNA in ligaza, ki poveže še zadnjo razpoko. Delovanje ekscizijskih popravilnih mehanizmov se sproži, kadar ti zaznajo napačno obliko, torej poškodovano DNA.

Popravlanje zmotnih parov

Popravlanje - zamenjava napačno vezanih parov baz z ustreznimi, opravlja encimski kompleks, ki deluje podobno kot encimski kompleks za ekscizijsko popravlanje. Poleg dodatne korekcije redkih napak, ki uidejo popravljanju polimeraze DNA III, odstranjuje posledice krajših delicij (izpad dela ene ali več baz) in insercij (vključitve ene ali več baz preveč).

Rekombinacijsko popravlanje

To nastopi takrat, kadar je dvojna vijačnica DNA tako poškodovana, da je informacija celega dela DNA izgubljena. Običajno nastane takrat, ko sta poškodovani oziroma spremenjeni obe verigi DNA v istem odseku (komplementarna dela obeh verig). Rekombinacijsko popravlanje omogoči pridobitev informacije od sestrške kromatide.

Struktura kromosoma in vpliv ionizirajočega sevanja na kromosom

Pomembno informacijo o škodljivih vplivih fizikalnih in kemičnih agensov dobimo, če proučujemo kromosome v času mitotične ali mejotične delitve celic.

Mitotična delitev **poteka v več fazah :**

- **profaza** – začne se tvorba kromosomov, kromatin se zadebeli, spiralno zavije, iz enakih kromatid nastane kromosom,
- **metafaza** – niti delitvenega vretena povlečejo kromosome v ekvatorialno ravnino; v tej fazi so kromosomi najkrajši in najdebelejši, zato jih najlažje preštajemo,
- **anafaza** – kromatidi se ločita, materinski kromosom se razdeli na dva hčerinska, ki ju niti delitvenega vretena povlečejo proti nasprotnima poloma. To je faza delitve in potovanja kromosomov,
- **telofaza** – kromosomi so na nasprotnih celičnih polih, delitveno vreteno izgine, kromosomi se začno odvijati in daljšati, pretvorijo se v kromatin,
- **interfaza** – po končani delitvi se v hčerinskih celicah prične podvojitev DNA enokromatidnih kromosomov in s tem podvojitev dednega zapisa.

Interfazo delimo na več stopenj :

- **G 1** – nastanejo nove celične strukture,
- **S** – dedni zapis se podvoji; iz vsakega kromosoma nastaneta dve kromatidi, vsaka vsebuje eno molekulo DNA,
- **G 2** – priprava celice na novo mitotsko delitev.

Za celični ciklus je interfaza v metaboličnem smislu najpomembnejša.

Du Prowov model kromosoma

Enkariotski model kromosoma, ki je lepo viden v metafazi predvideva, da je DNA molekula spiralno zvita nitka debeline 230 Å, sestavljena je pretežno iz DNA, histonskih in nehistskih proteinov.

Du Prow je izračunal, da je človeški kromosom sestavljen tako, da ena kromatida vsebuje $2,35 \times 10^{-13}$ g DNA v 230 Å debeli nitki, teži $15,7 \times 10^{-13}$ g .

Dolžina molekule DNA v kromosomu je ocenjena na dolžino 7,3 cm in dolžina nitke je 1306mm.

Prve raziskave, da X-žarki povzročajo kromosomske aberacije je predstavil Muller v svojih genetskih študijah pri vinskih mušicah.

Danes je znano, da je DNA glavna iarča za kromosomske aberacije. Vemo, da kromosomska aberacija ni vedno rezultat neposredne reakcije mutagene snovi na celično DNA. Pri direktnem zadetku DNA se najprej sprožijo popravljalni mehanizmi, aberacija pa nastane kasneje, zaradi napačnega popravila verige.

Kromosomska aberacija je vedno posledica napačnega popravila verige, izjema je le prekinitev obeh kromatid pri direktnem zadetku. Če se to stanje ne popravi, ostane kromosom prekinjen.

Lezij, ki nastanejo po učinku fizikalnih ali kemičnih agensov je več vrst, ločimo jih po obliki poškodbe.

Oblike poškodb :

- prekinitev ene kromatide v vrsti,
- prekinitev obeh kromatid v vrsti,
- poškodbe vezi DNA–DNA,
- poškodbe DNA - proteinske vezi,
- tvorba prostih radikalov,
- vrinjenje napačnih delov verige,
- piramidinski dimerji,
- tvorba apurinskih in apirimidinskih delov.

Teža poškodbe je odvisna od LET in če sta prekinjeni obe kromatidi v kromosomu, obstaja velika verjetnost, da pride do aberacije.

Strukturne kromosomske aberacije

Kromosomske aberacije lahko citološko razdelimo na kromosomske in kromatidne. Kromosomske aberacije nastanejo pri zlomih in pri ponovnih združenjih kromosoma, ter vključujejo celoten kromosom (obe kromatidi na istem mestu). Takšne poškodbe nastanejo pri izpostavljenosti ionizirajočemu sevanju in pri drugih mutagenih dejavnikih med G 0 in G 1 fazo celičnega ciklusa. Izpostavljenost omenjenim dejavnikom v S in G 2 fazi celičnega ciklusa običajno povzroči kromatidne aberacije, kot so zlomi in zamenjave samo na eni od kromatid.



Kromosomske aberacije

- enojni zlom kromosoma; najbolj znani povzročitelji so ionizirajoča sevanja,
- dvojni zlom kromosoma,
- zaokroženi kromosom (Ring chromosome),
- inverzija,
- translokacija.






Kromatidne aberacije

- zlom kromatide,
- fragmenta kromatide,
- obročasti acentrični kromatidi,
- zaokrožena kromatida.




**CHROMOSOME
ABERRATIONS**

Normal	Terminal deletion
	






INTRACHROMOSOME EXCHANGES

Normal	Interstitial deletion	Centric ring and fragment	Acentric ring	Pericentric inversion
				

INTERCHROMOSOME EXCHANGES

Normal	Dicentric and fragment	Symmetrical exchange
		

CHROMATID ABERRATIONS

Normal	Gap	Fragment
		
Normal	Exchange	
		

Literatura :

De Robertis, De Robertis, Jr. Cell and molecular biology. Philadelphia, Lae&Febirger, 1987

Stušek P., Podobnik A., Gogala N. Biologija 1 celica. Ljubljana, DZS, 1997

Grabnar M., Novak T. Biologija 7 in 8 genetika evolucija. Ljubljana, DZS, 1997

Mettler Jr. F. A., Upton A. C. medical effects of ionizing radiation, second edition. Philadelphia, Saunders company, 1995

Tehnicl reports series No. 260. Biological dosimetry. Cromosomal aberration analysis for dose assessment. IAEA, Vienna, 1986

Summer D., Wheldon T., Watson W. Radiation risk, fourth edition. Whithorn, Scotland, Tarragon press, 1994

Al-Sabti K. Sevanje in citogenetske poškodbe. Institut Jožef Stefan, Ljubljana, 1993

Tubiana M., Dutreix J., Wambersie A. Introduction to radiobiology. London, Taylor & Francis, 1990