



BIOFIZYKA RADIACYJNA

wykład #6

Krzysztof Wojciech Fornalski

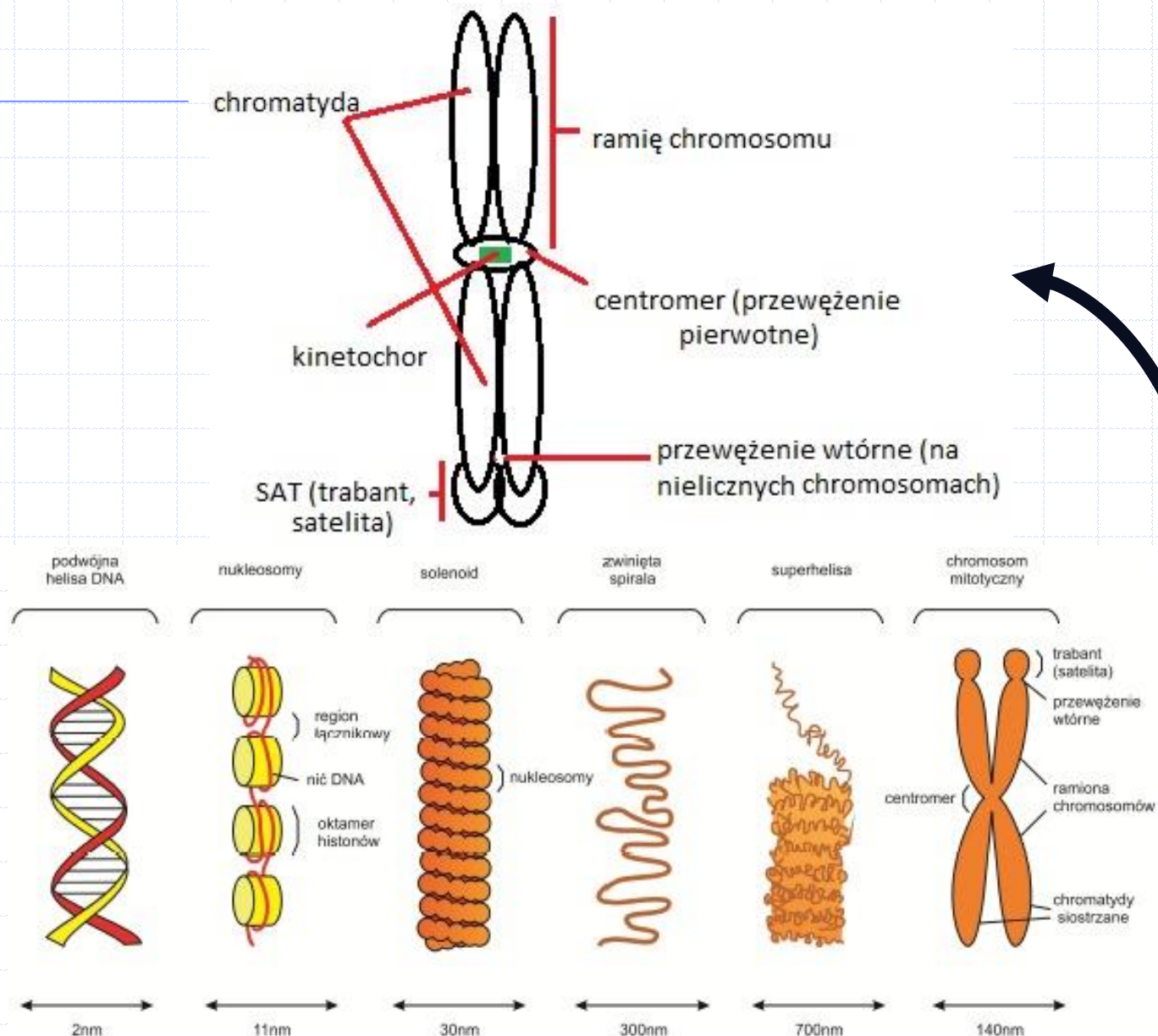
Wydział Fizyki, Politechnika Warszawska





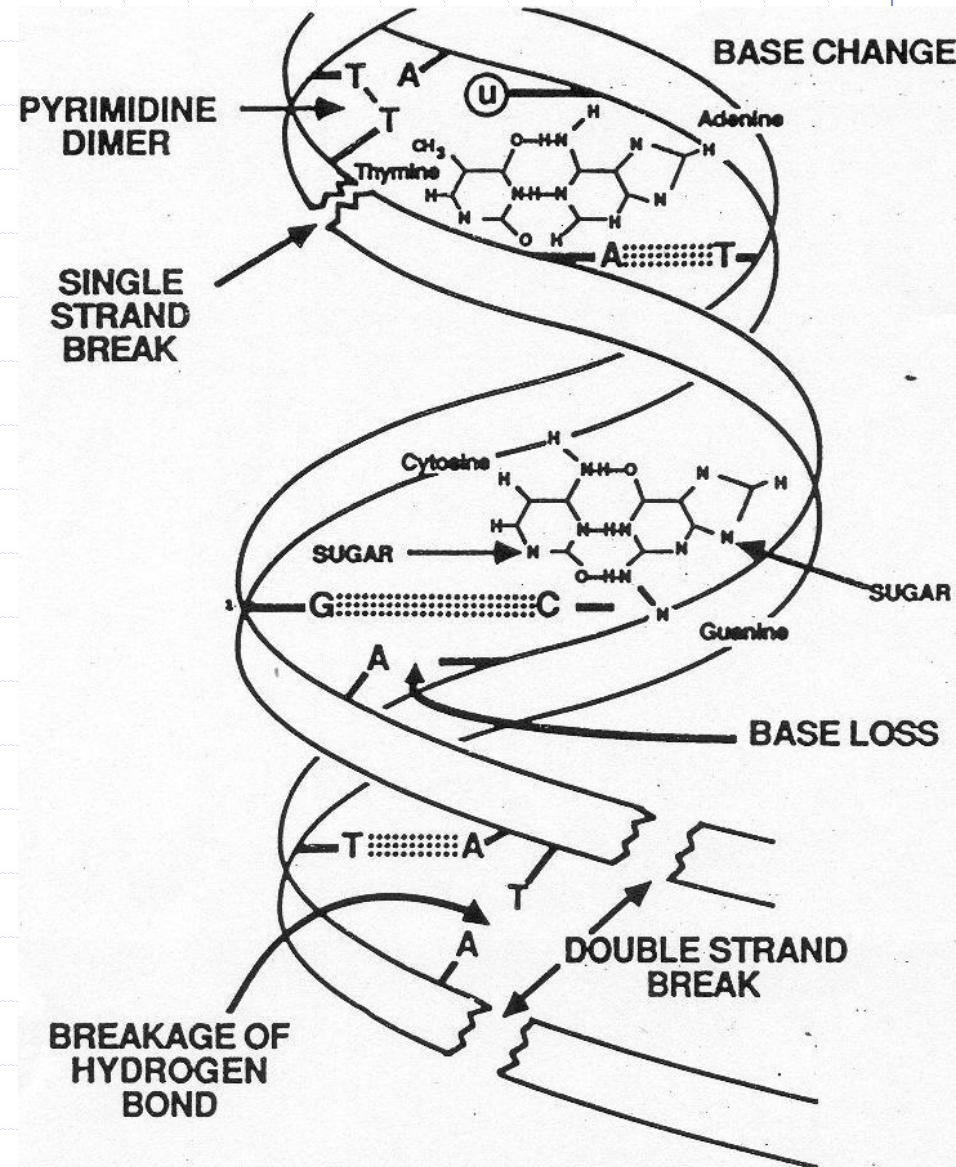
PRZYPOMNIENIE Z POPRZEDNIEGO WYKŁADU

Budowa chromosomu

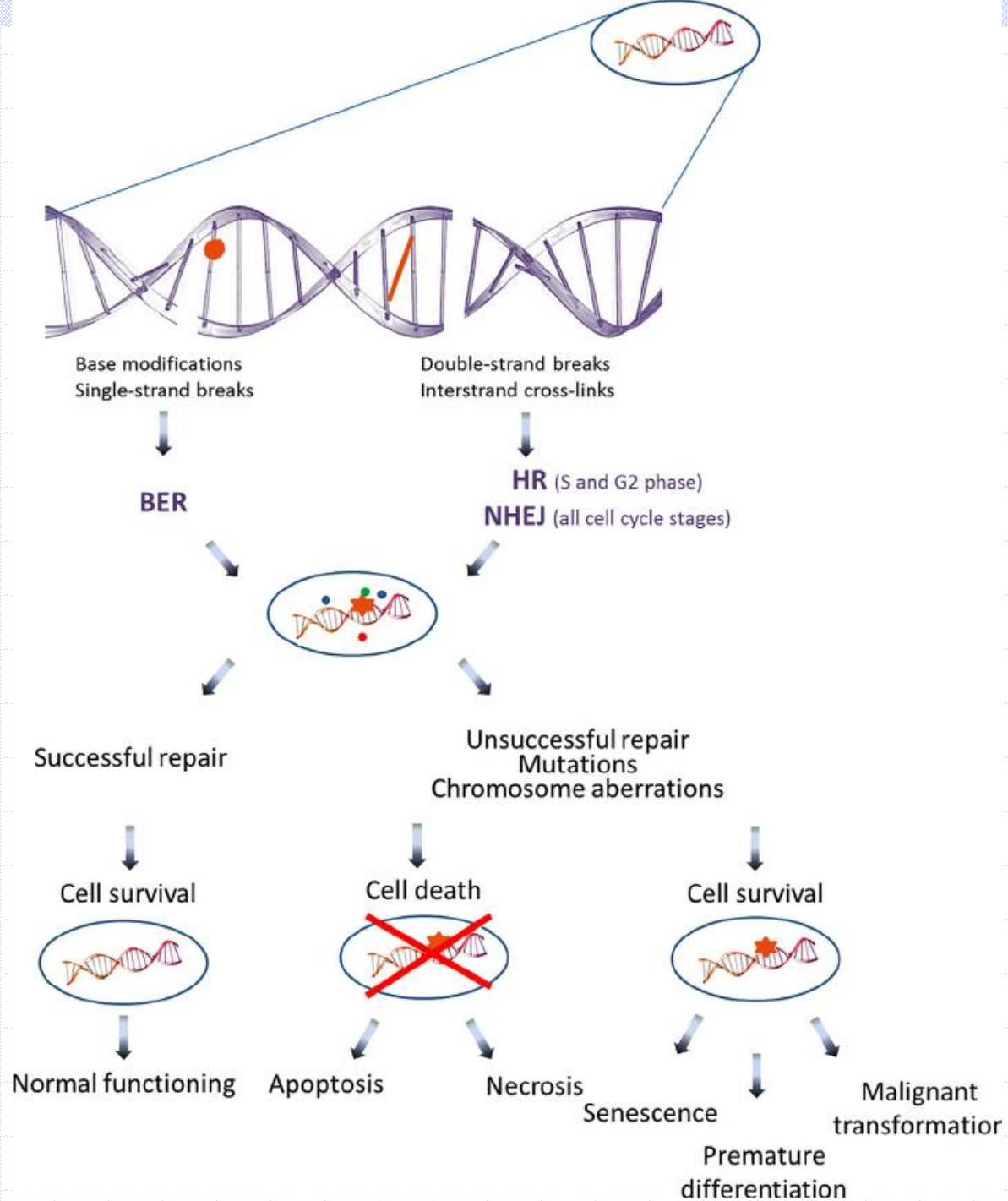


Pęknięcia DNA

- ◆ Pęknięcia łańcucha DNA mogą być **jednoniciowe** lub **dwuniciowe**, gdy obie helisy na raz uległy zerwaniu, a także **uszkodzenia bazy** między nićmi
- ◆ Najbardziej niebezpieczne (ale też najrzadziej spotykane) są pęknięcia dwuniciowe, gdyż grozi to całkowitemu rozerwaniu całego łańcucha

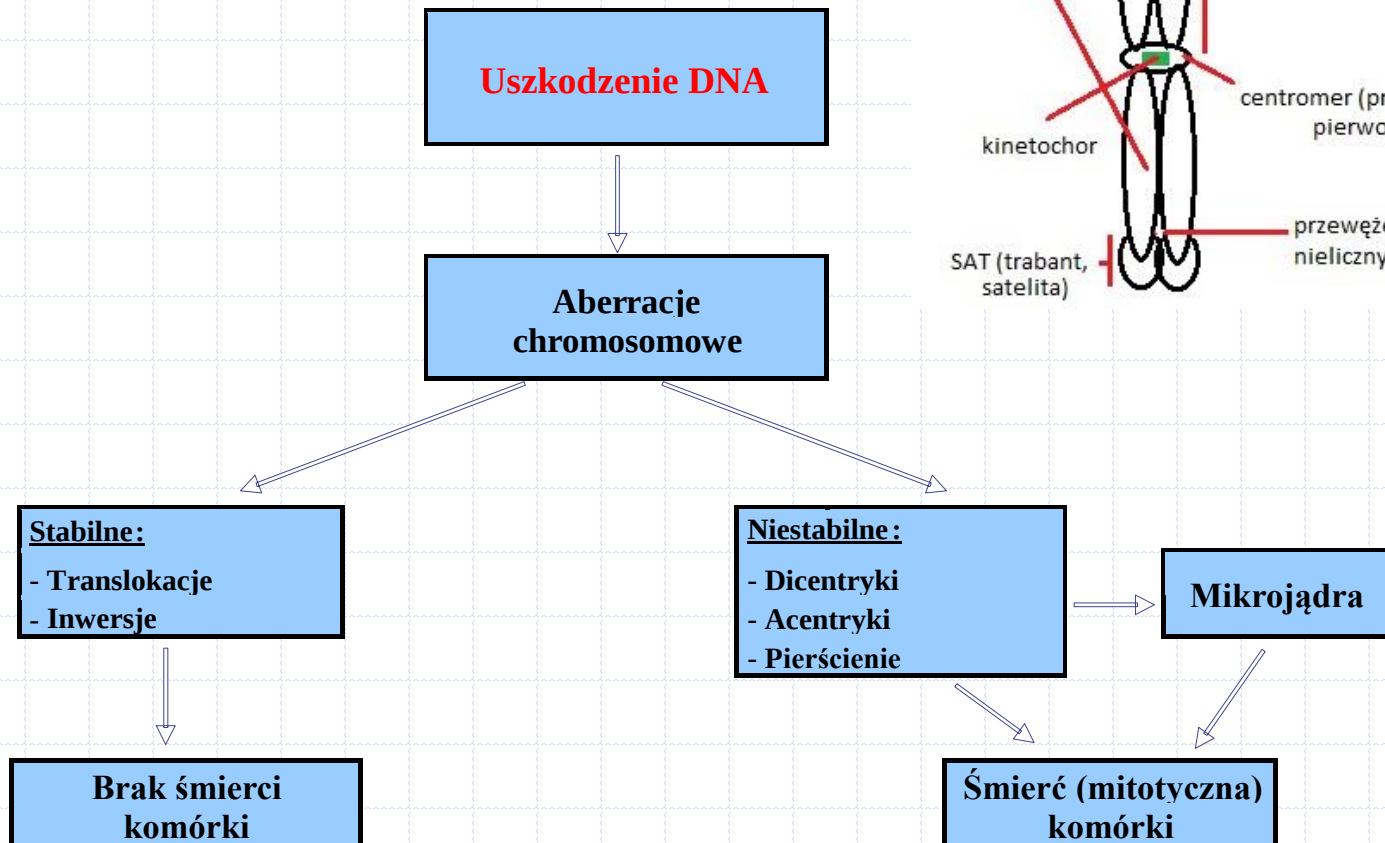
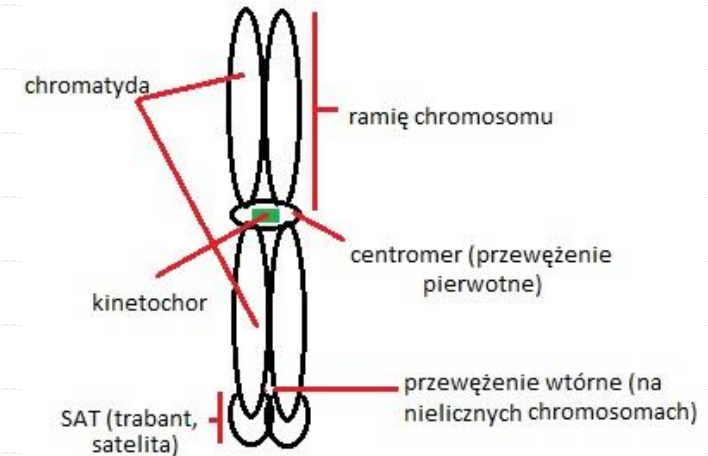


Różne scenariusze

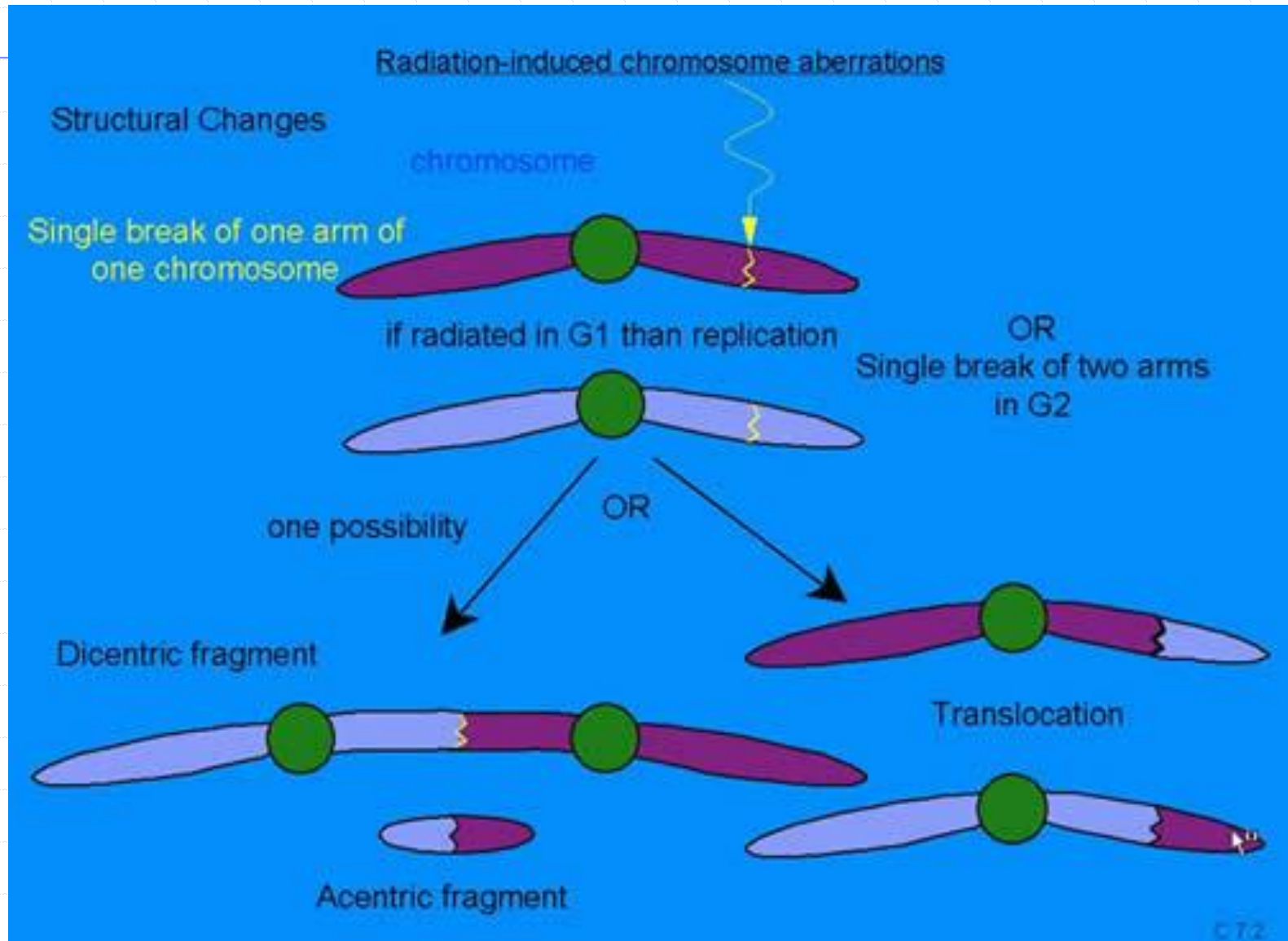


Popromienne aberracje chromosomowe

chromosom:



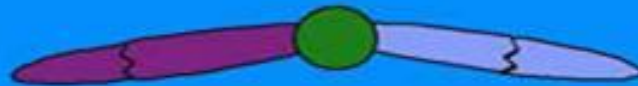
Aberracje chromosomowe



Aberracje chromosomowe

Radiation-induced chromosome aberrations

Structural Changes

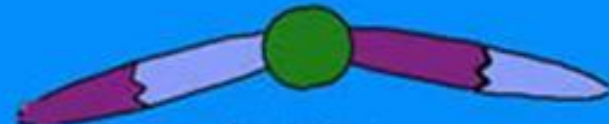


Single break of both arms of a chromosome

Structural Changes



Ring formation

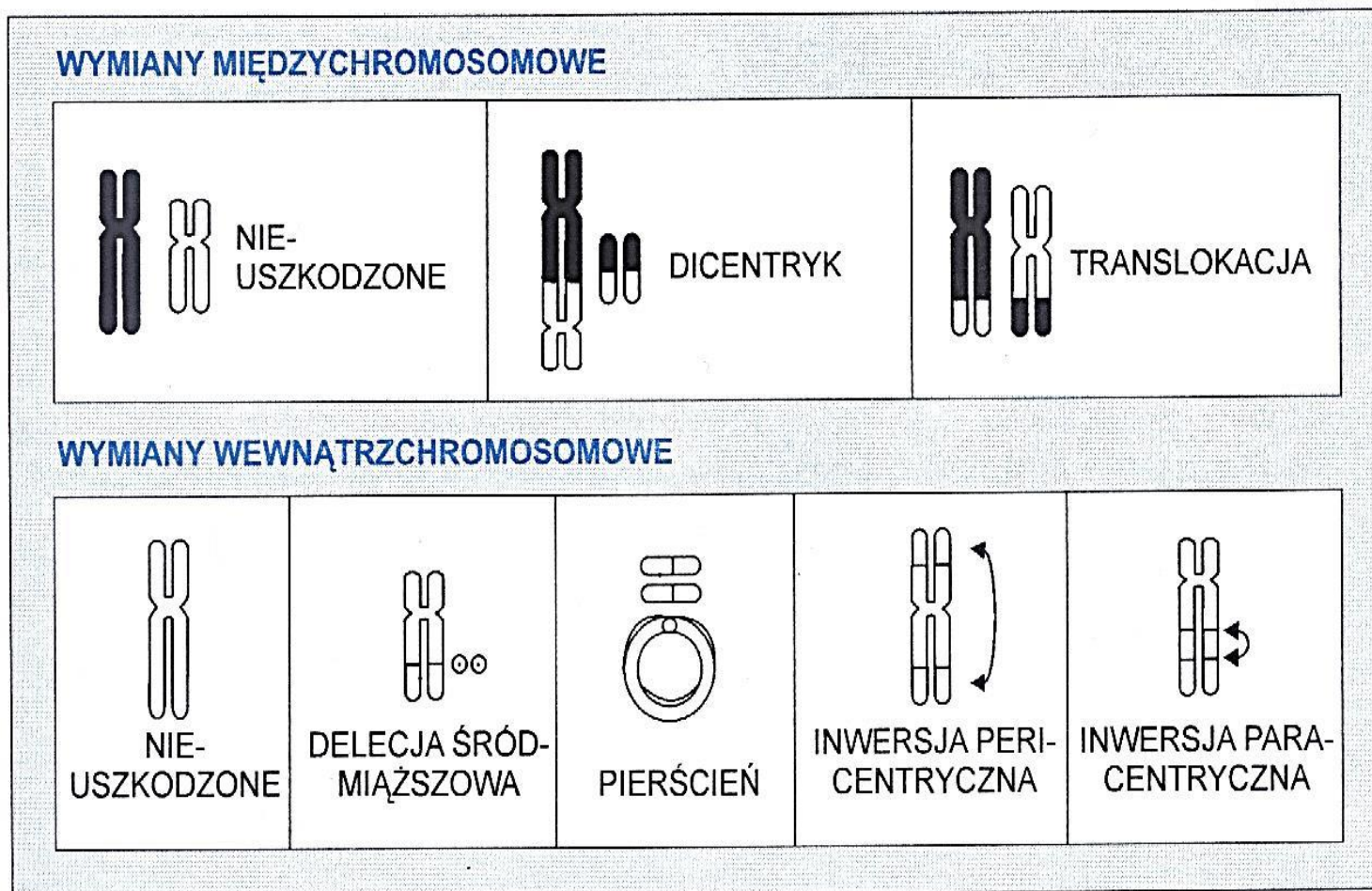


Inversion

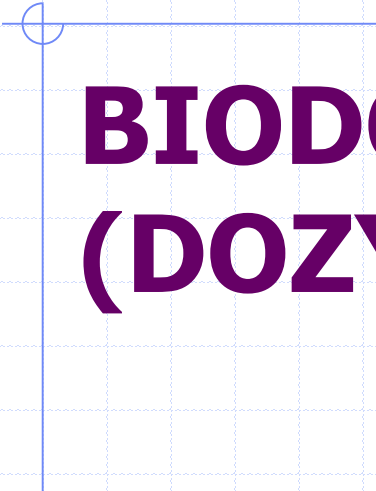


Acentric fragment

Aberracje chromosomowe



Rys. 2. Schemat wymian wewnątrz- i międzychromosomowych obserwowanych w komórkach narażonych na działanie promieniowania jonizującego



BIODOZYMETRIA (DOZYMETRIA BIOLOGICZNA)

Dozymetria biologiczna

- ◆ Szacowanie dawki na podstawie obserwowalnych zmian/uszkodzeń w materiale biologicznym
- ◆ Wyróżniamy dwa rodzaje metod biodozymetrycznych:
 - metody natychmiastowe
 - metody retrospektywne

Metody natychmiastowe

- ◆ Ocena dawki w krótkim czasie po napromienieniu poprzez pomiar zjawisk przemijających, związanych z powstawaniem uszkodzeń DNA (bezpośrednio związanych z ekspozycją na promieniowanie)
- ◆ procesy naprawy uszkodzeń DNA zachodzące w komórce po napromienieniu dość szybko eliminują przyczynę powstawania tych zjawisk, metod natychmiastowych nie można użyć retrospektywnie

Metody natychmiastowe:

- **test kometowy**

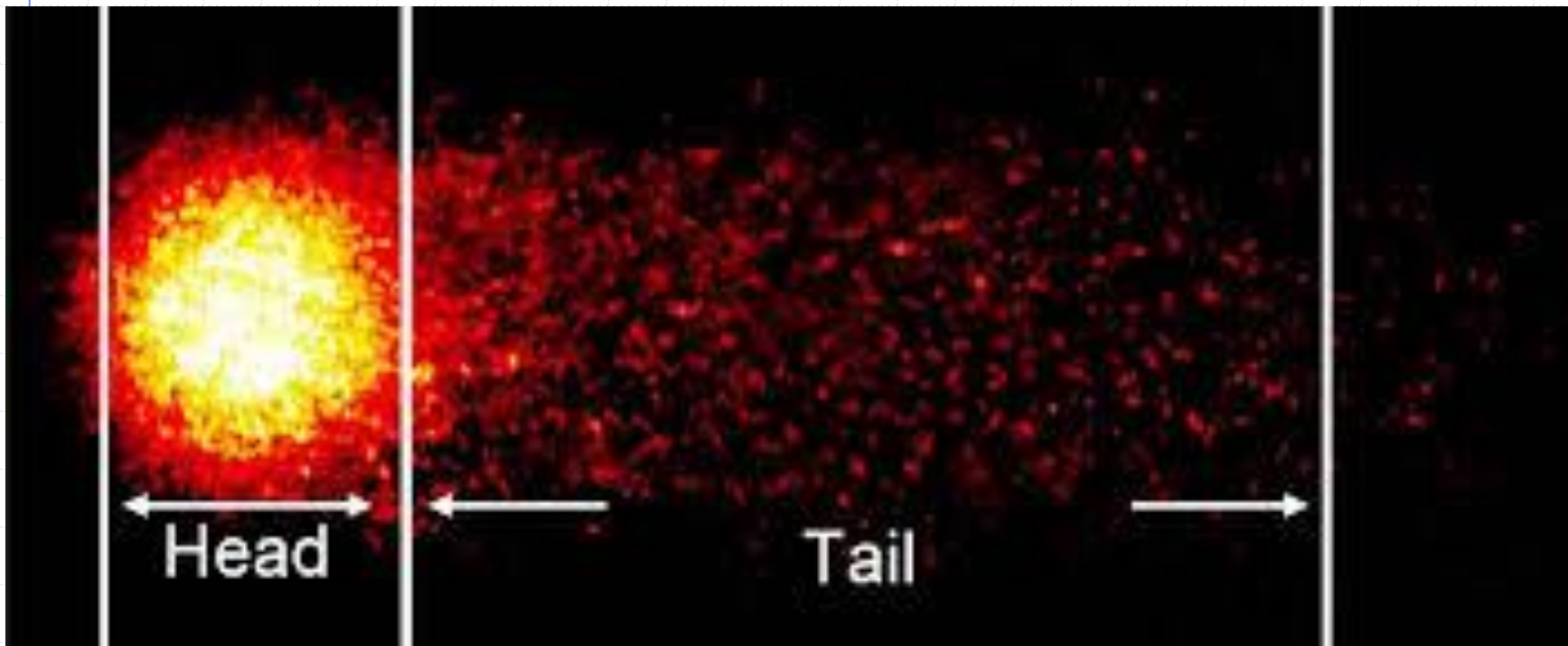
- ◆ Metoda badania narażenia populacji ludzkich na określone czynniki środowiskowe lub endogenne.
- ◆ Oznaczanie uszkodzeń DNA na poziomie pojedynczych komórek w limfocytach krwi obwodowej

Test kometowy

- ◆ umieszcza się komórki pobrane od napromienionej osoby w odpowiednim środowisku; następnie doprowadza się do rozpadu komórek poprzez dezintegrację błony komórkowej (pod wpływem substancji chemicznych) i wylanie się zawartości do środowiska (jest to tzw. liza)
- ◆ podłączenie do niewielkiego napięcia, barwienie barwnikiem fluorescencyjnym DNA
- ◆ ocena wybarwionego DNA przy użyciu mikroskopu
- ◆ w wyniku przyłożonego napięcia uszkodzone DNA wylewa się z jądra w kierunku anody, co powoduje powstawanie ogona; nieuszkodzona część DNA pozostaje związana z macierzą jądrową tworząc "głowę" komety



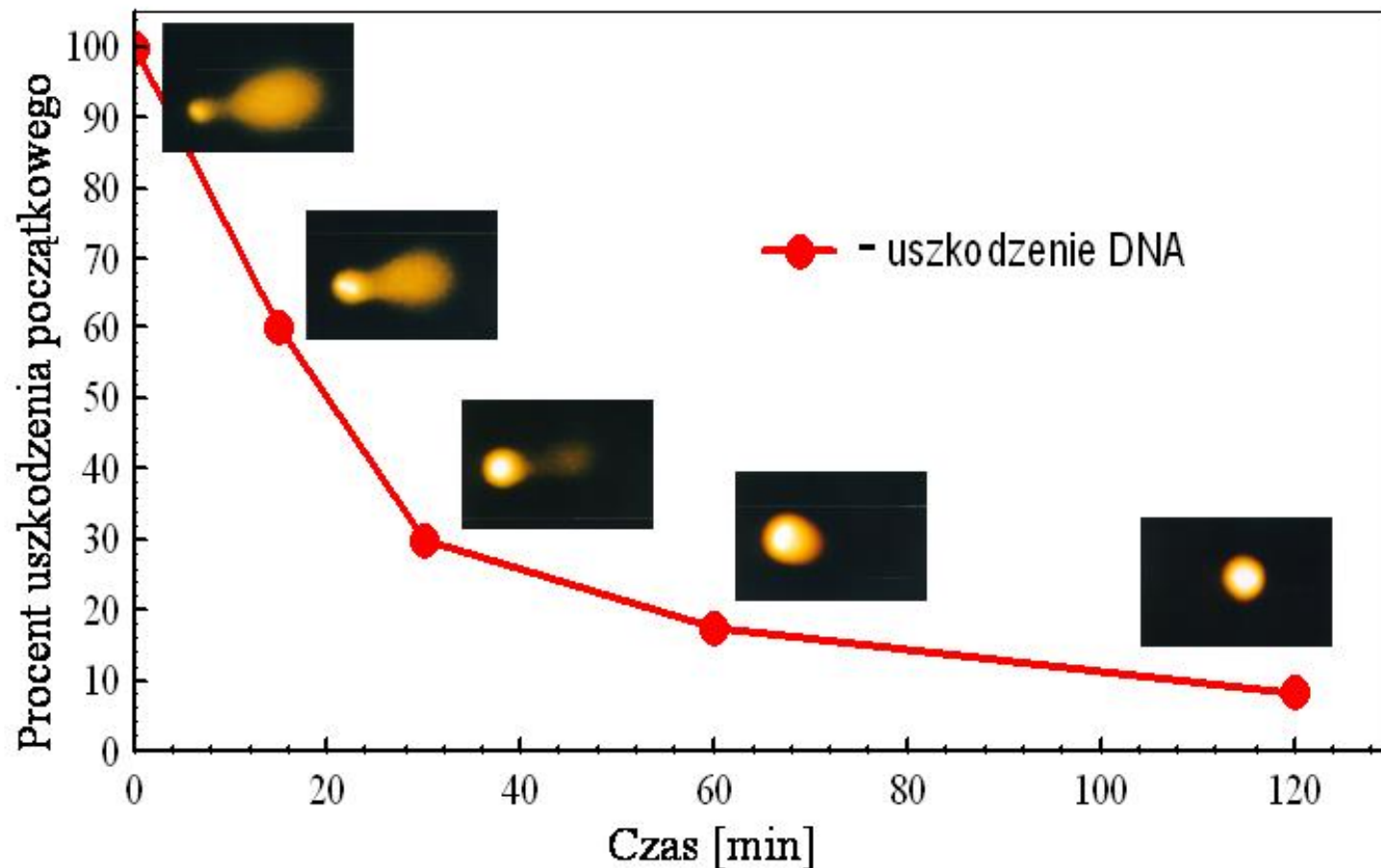
Test kometowy



Test kometowy

- ◆ Prostota wykonania
- ◆ Mała inwazyjność
- ◆ Do przeprowadzenia testu wystarczy kropla krwi z palca
- ◆ Duża czułość
- ◆ Możliwość mierzenia uszkodzeń DNA w pojedynczych komórkach
- ◆ Ale uszkodzenia są szybko naprawiane, więc trzeba się spieszyć

Zanik możliwości testu kometowego z czasem



Naprawa uszkodzeń DNA wywołanych przez dawkę 5 Gy promieniowania X w limfocytach krwi obwodowej człowieka

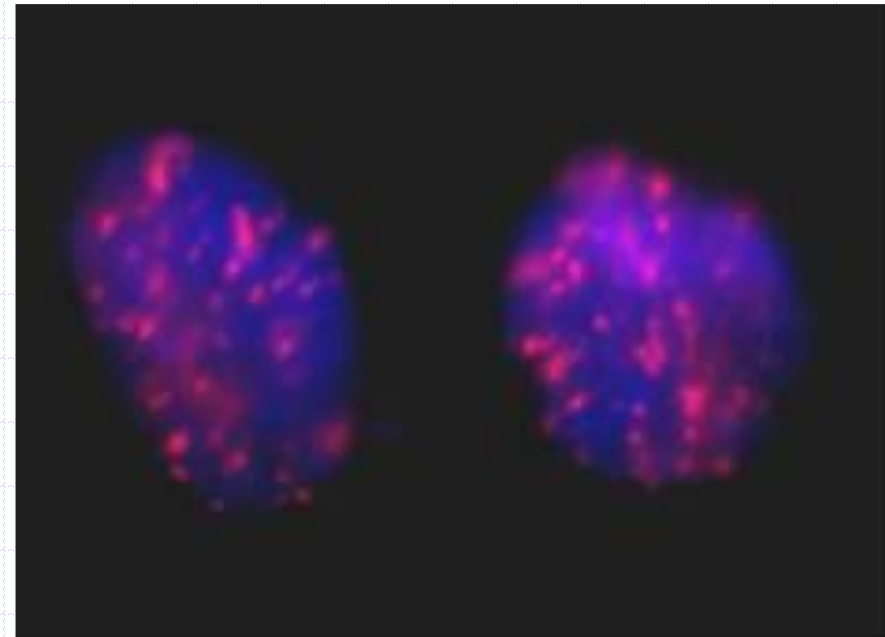
Metody natychmiastowe:

- test ognisk histonu γ H2AX

- ◆ Określenie liczby podwójnoniciowych pęknięć nici DNA (DSB) na podstawie występowania skupisk (ognisk) charakterystycznych białek w miejscach uszkodzeń
- ◆ Histony – białka składowe chromatyny, bezpośrednio związanymi z nićmi DNA
- ◆ W momencie powstania DSB jeden z histonów (H2AX) ulega fosforylacji, dając γ H2AX. Reakcja ta występuje tylko w miejscu powstania DSB. Liczba ognisk γ H2AX odpowiada liczbie DSB
- ◆ Fosforylacja – przyłączenia reszty fosforanowej do atomu nukleofilowego (z nadmiarem elektronów)

Test ognisk histonu γ H2AX

- ◆ Umieszczenie komórek na szkiełku podstawowym
- ◆ Utrwalenie
- ◆ Dodanie przeciwciała wyznakowanego barwnikiem fluorescencyjnym specyficznie wiążącego się z histonem γ H2AX



Test ognisk histonu γ H2AX

WADA

- ◆ szybkie zanikanie ognisk w wyniku naprawy DSB, co uniemożliwia użycie testu w dozymetrii retrospektywnej

ZALETY

- ◆ wysoka specyficzność, histon H2AX ulega fosforylacji tylko w momencie wystąpienia DSB

Metody retrospektywne

- ◆ Jest to zespół metod biodozymetrycznych, które można zastosować po długim czasie od napromienienia (niektóre nawet kilka lat później)
- ◆ Dzielimy je zasadniczo na metody:
 - fizyko-chemiczne
 - cytogenetyczne

Fizyko-chemiczne metody retrospektywne:

- EPR (Electron Paramagnetic Resonance)

- ◆ Elektronowy Rezonans Paramagnetyczny
- ◆ pomiar ilości stałych rodników (spinów ich elektronów) tworzących się w ciele człowieka pod wpływem promieniowania jonizującego
- ◆ np. hydroksyapatyt ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) zawarty w kościach i szkliwie zębów
 - Węglany zawarte w hydroksyapatycie pod wpływem promieniowania jonizującego przekształcają się w anionorodniki węglanowe ($\text{CO}_2^{\bullet-}$).
 - Trwałość: 107 lat.

Fizyko-chemiczne metody retrospektywne:

- EPR (Electron Paramagnetic Resonance)

◆ Przygotowanie próbki:

- oddzielenie korzenia zęba od jego korony i usunięcie z niej dentyny
- kruszenie szkliwa i rozcieranie na proszek.

◆ Pomiar w spektrometrze EPR w paśmie X.

◆ Dawkę pochłoniętą określa się na podstawie wielkości pików sygnału charakterystycznego dla $\text{CO}_2^{\bullet-}$

◆ Czułość: 0,1 Gy

Włosy i paznokcie

- ◆ Analogicznie można badać zmiany we włosach i paznokciach
- ◆ Metoda ta jednak jest mniej precyzyjna niż klasyczny EPR
- ◆ Ciekawostka: współcześnie wykorzystuje się także pomiary układów scalonych (zegarki, telefony) na zasadzie dozymetrów TLD, gdyż urządzenia elektroniczne są zazwyczaj obecne przy ciele człowieka

Cytogenetyczne metody retrospektywne:

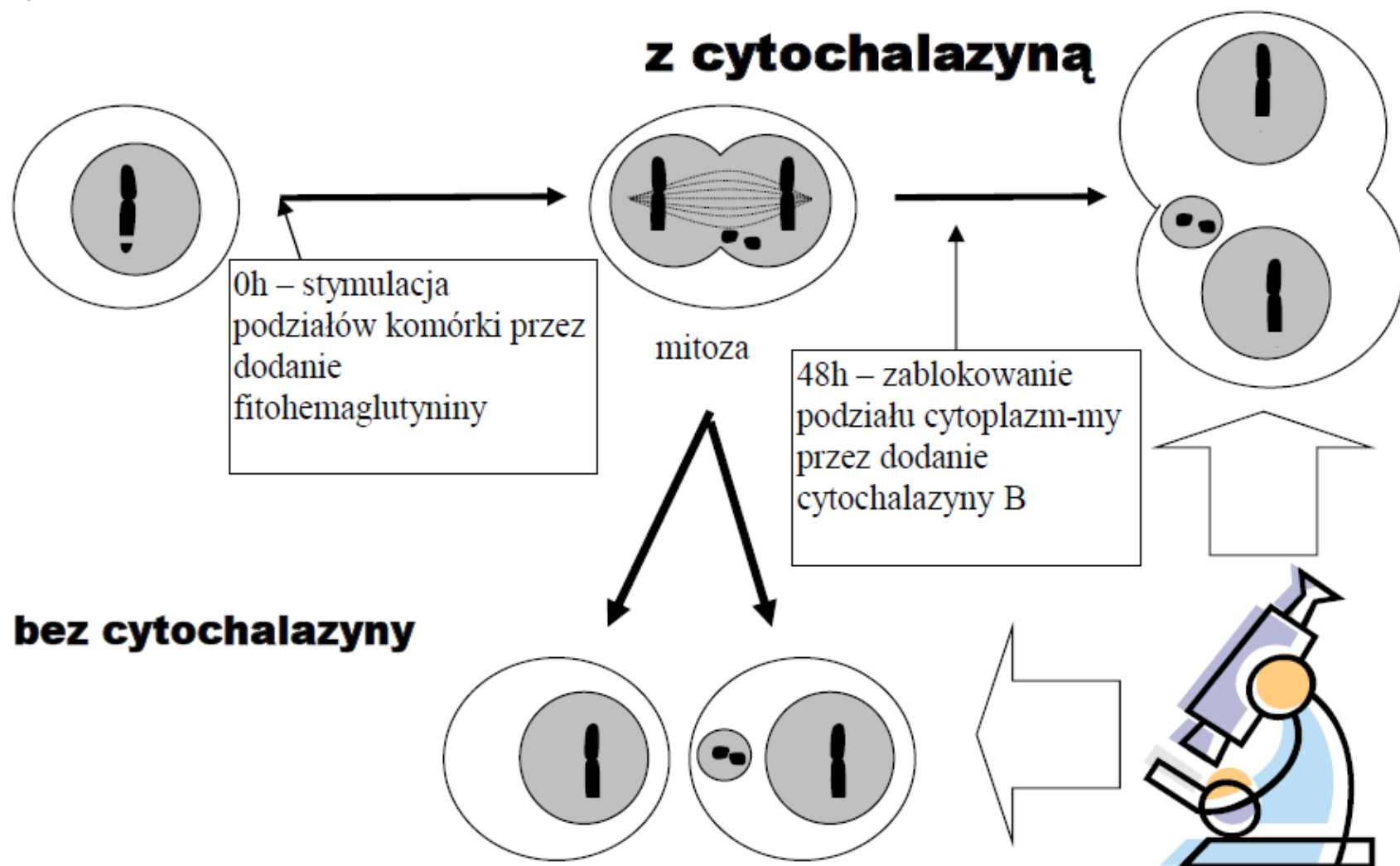
- metoda mikrojądrowa

- ◆ Metoda cytogenetyczna pozwalająca na wykrywanie podwójnoniciowych pęknięć DNA i uszkodzeń wrzeciona podziałowego ujawniających się po podziale komórek
- ◆ Zazwyczaj stosuje się na limfocytach krwi obwodowej
- ◆ Mikrojądro powstaje, jeżeli w czasie mitozy (podziału komórki) cały chromosom lub fragment chromosomu nie zostanie rozdzielony pomiędzy dwa jądra potomne. Powinno ono być:
 - mniejsze niż $\frac{1}{3}$ wielkości normalnego jądra,
 - wyraźnie oddzielone od jądra,
 - podobnie wybarwione jak jądro komórki

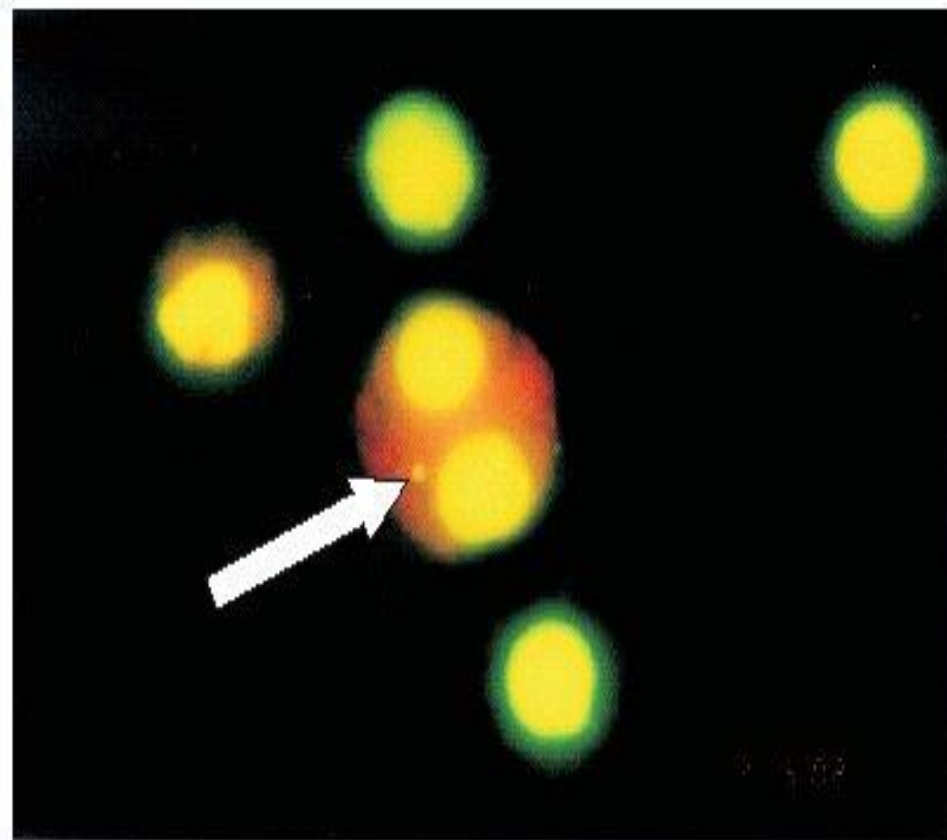
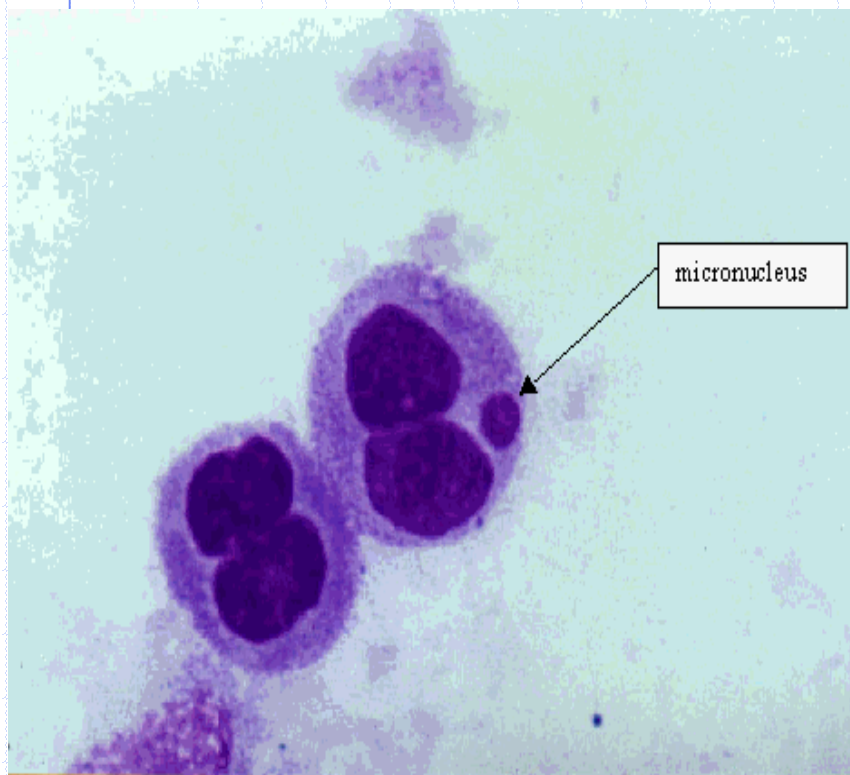
Metoda mikrojądrowa

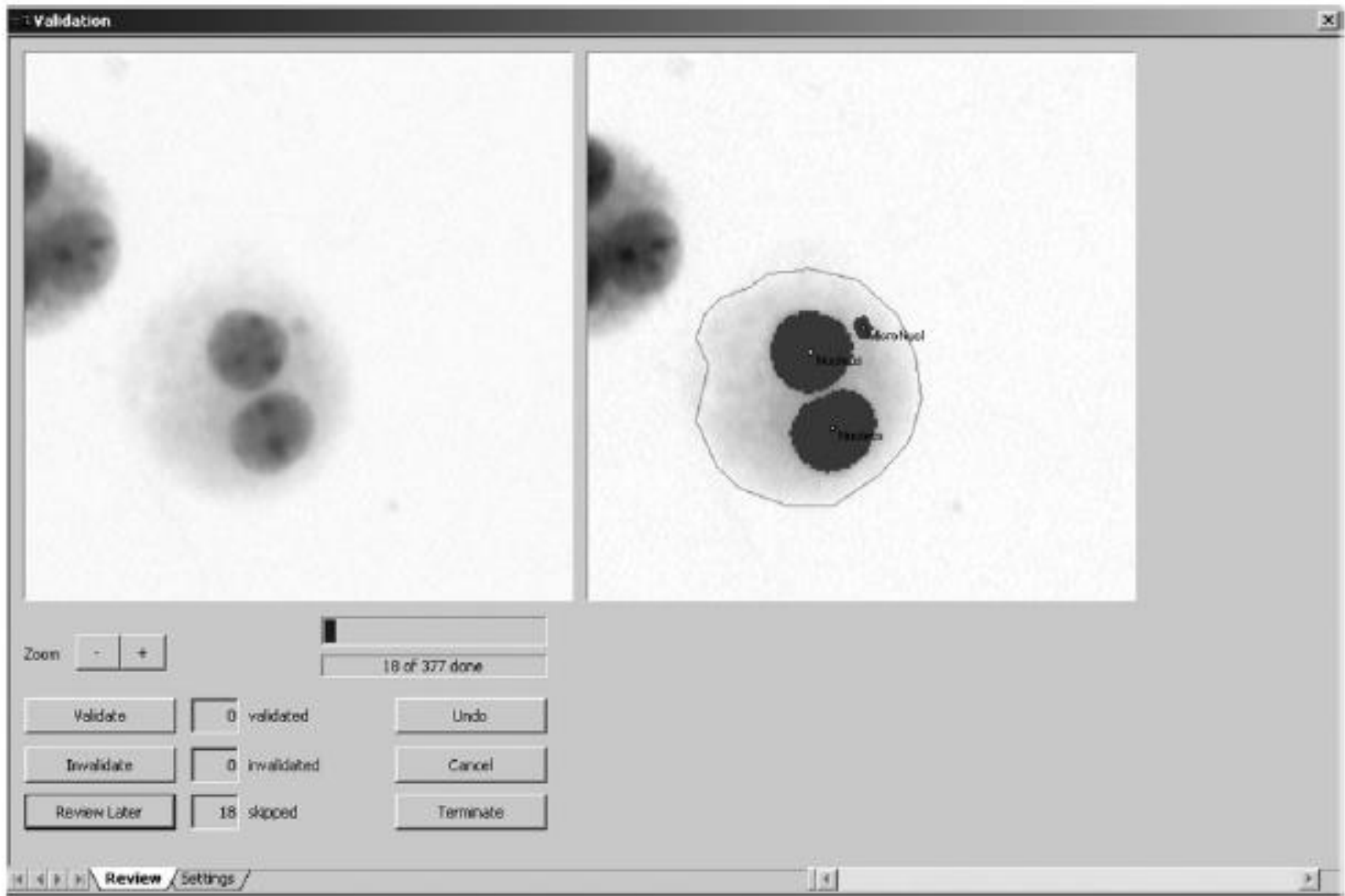
- ◆ Mikrojądra łatwo liczy się przy użyciu mikroskopu
 - w czasie normalnych podziałów komórki (historycznie pierwsza metoda),
 - w komórkach dwujądrzastych stosując cytochalazynę B, która blokuje podział cytoplazmy (cytokinezę)
 - łącząc test z metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*

Metoda mikrojądrowa



Mikrojądra





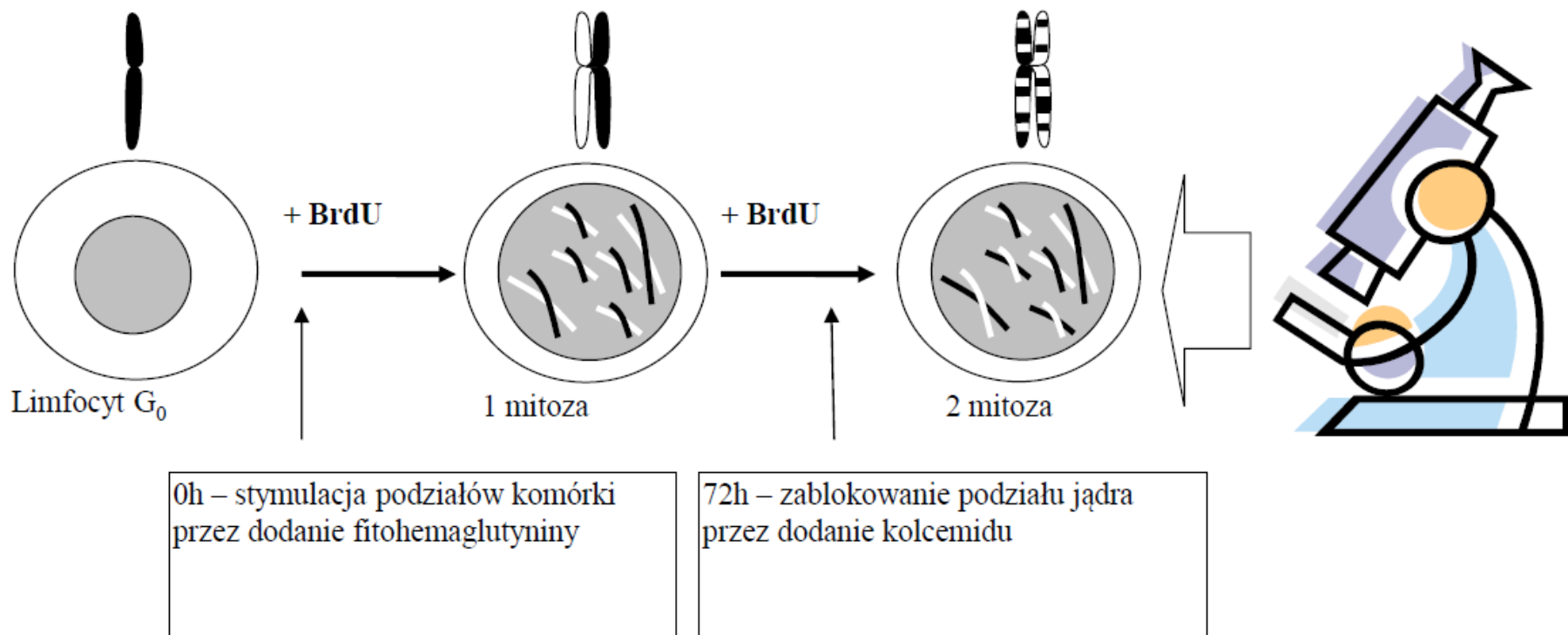
Validation screen for the interactive visual validation step, MN detected by the automated system are presented one by one; for each MN, the scorer has to either validate it or invalidate it (5FP) or label it for future review.

Cytogenetyczne metody retrospektywne:

- SCE (Sister Chromatid Exchange)

- ◆ Metoda wymian odcinków chromatyd siostrzanych
- ◆ Badanie częstości występowania wzajemnych, symetrycznych wymian fragmentów pomiędzy identycznymi sekwencjami DNA obu chromatyd w chromosomie.
- ◆ Ocena w płytkach metafazalnych uzyskanych z hodowli komórek prowadzonych w obecności bromodeoksyurydyny (BrdU), która jest wbudowywana w nić DNA w czasie syntezy
- ◆ W czasie podziału mitotycznego BrdU trafia do jednej z komórek potomnych. Obecność BrdU w DNA można wykryć stosując specjalne metody barwienia
- ◆ W drugiej mitozie (podziale) obserwuje się symetryczne wymiany pomiędzy chromatydami zawierającymi BrdU i tymi, które BrdU nie zawierają

Metoda wymian odcinków chromatyd siostrzanych



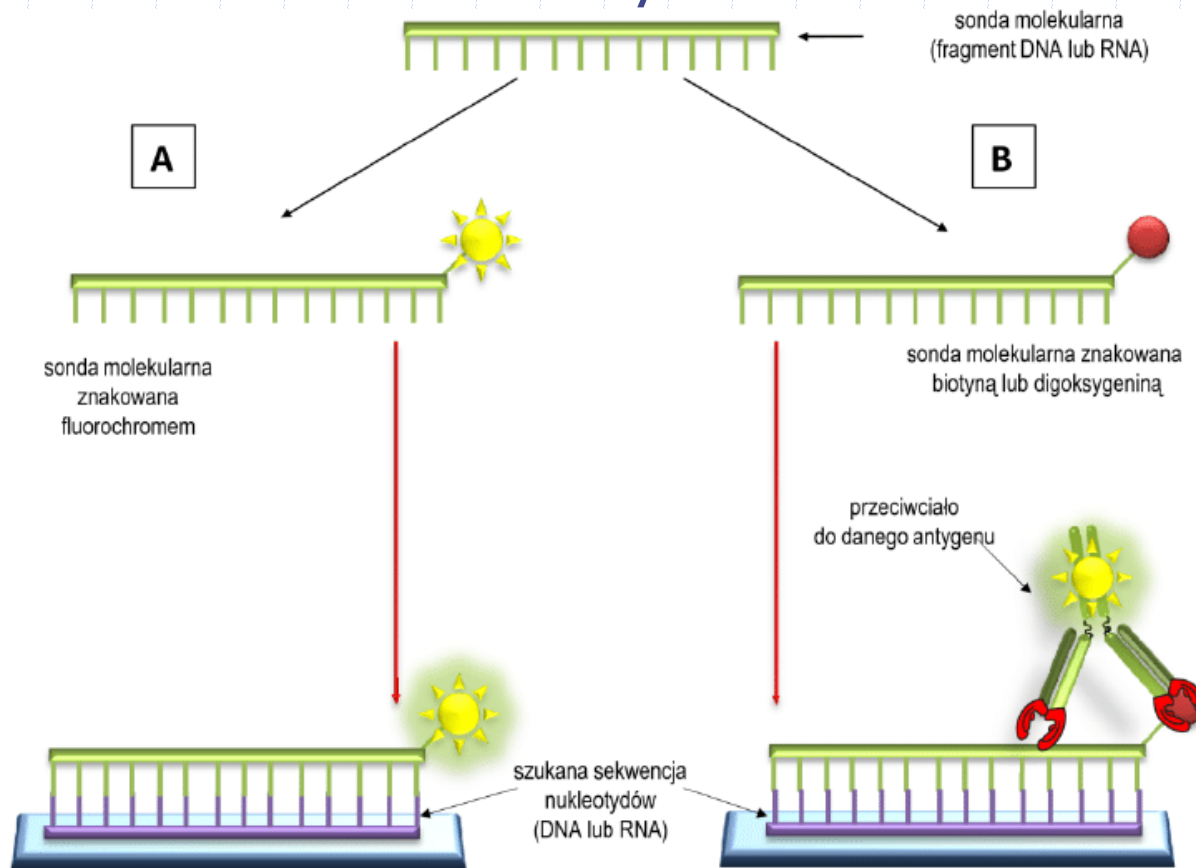
Cytogenetyczne metody retrospektywne:

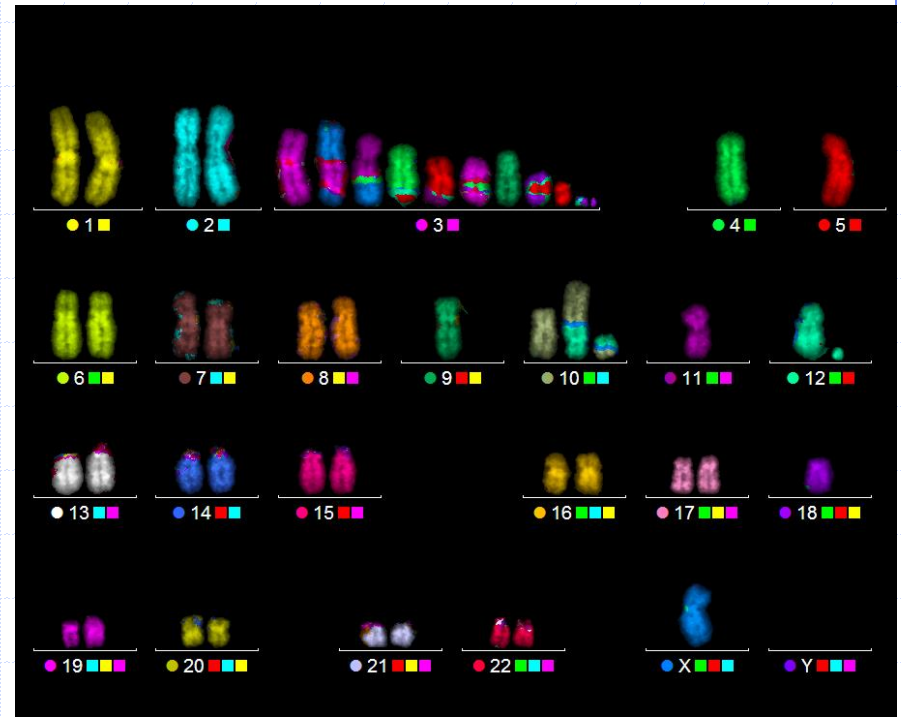
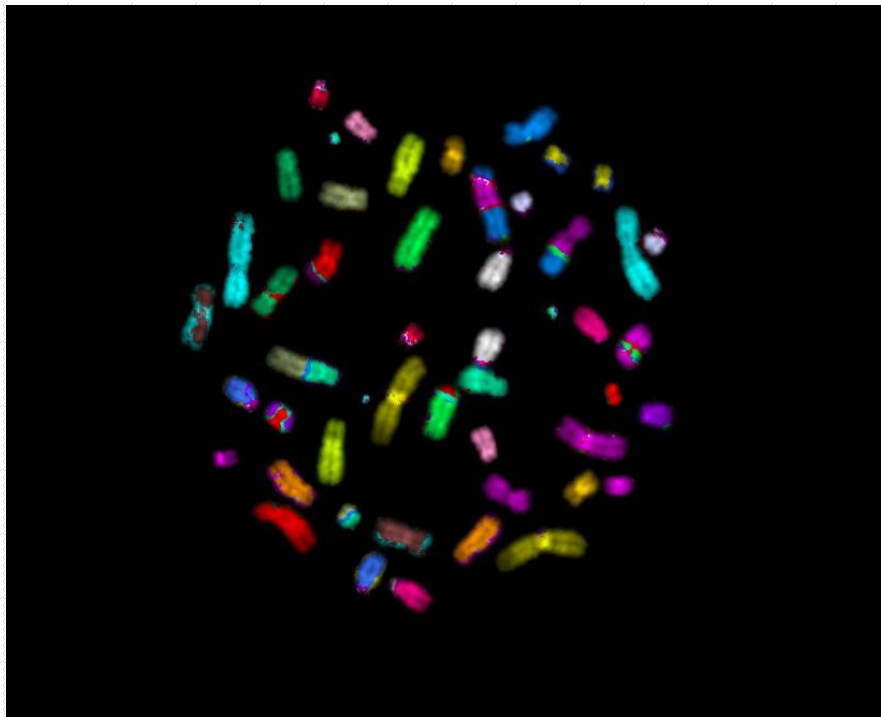
- **FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)**

Technika cytogenetyczna, służąca do wykrywania w badanym materiale genetycznym określonej sekwencji DNA za pomocą fluorescencyjnych sond DNA. Odpowiednie przygotowanie komórek do badania wymaga usunięcia cytoplazmy i utrwalenia jąder komórkowych na szkiełku podstawowym. Fluorescencyjna sonda jest nanoszona na preparat i całość podawana jest krótkotrwałej denaturacji w podwyższonej temperaturze, która powoduje rozerwanie się wiązań wodorowych pomiędzy nićmi DNA. Następnie preparat poddaje się kilkugodzinnej hybrydyzacji, w czasie której fluorescencyjnie wyznakowane odcinki znanego DNA (sonda) wiążą się z komplementarnymi odcinkami badanego DNA. Nadmiar niezhybrydyzowanej sondy usuwa się przez kilkukrotne płukanie preparatu. Tak przygotowany preparat można analizować przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego.

Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ, FISH

In situ to rodzaj techniki badawczej, którą przeprowadza się w utrwalonym chemicznie organizmie, bez naruszenia jego struktury.





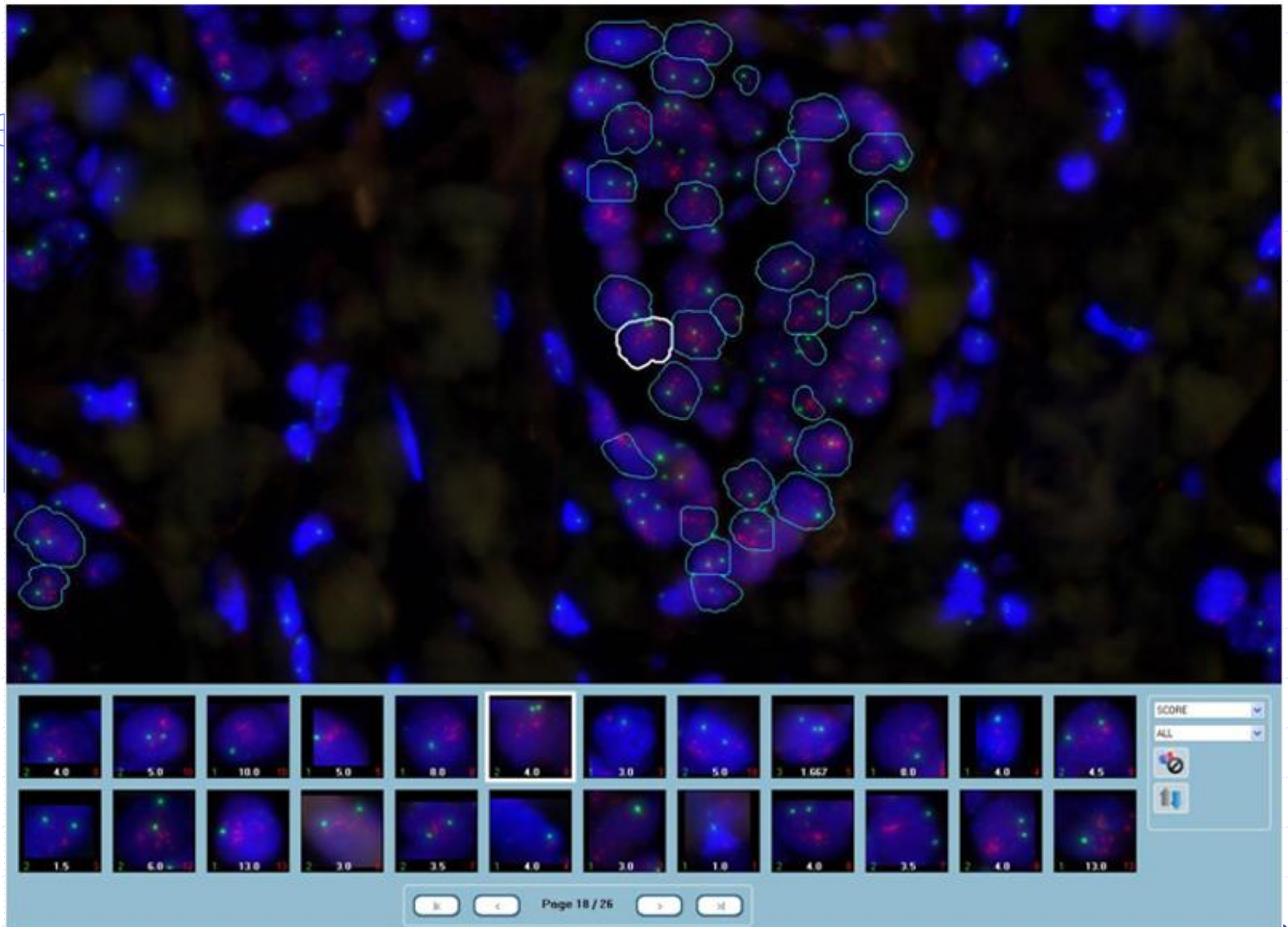
- Metodę FISH stosuje się w przypadkach, gdy zawodzi klasyczna analiza cytogenetyczna (umożliwia ona dużo dokładniejszą analizę translokacji).
- Rozwój techniki wielokolorowej FISH (ang. multicolor FISH), w której każdy chromosom hybryduje z sondą wyznakowaną innym kolorem.
- Umożliwia zbadanie translokacji złożonych z fragmentów kilku chromosomów. Metoda FISH (m-FISH) stanowi istotny postęp w analizie aberracji chromosomowych.
- Wysoki koszt m-FISH i konieczność zastosowania specjalnych wspomaganych komputerowo systemów analizy obrazu.

Skaner D-SIGHT for FISH



- Pełne zarządzanie bazą danych.
- Zautomatyzowana procedura skanowania.
- Mikroskop cyfrowy (podgląd preparatów na żywo).
- Zdalny mikroskop cyfrowy.
- Interfejs www do zdalnego przeglądania cyfrowych preparatów oraz do udostępniania ich (np. telepatologia, konsultacje, itp.).
- analizy Her-2/FISH, ALK/FISH i moduł translokacji (opcjonalnie).

Skaner D-SIGHT for FISH - translokacije



Metoda aberracji chromosomowych

- ◆ Ze wszystkich metod cytogenetycznych najpowszechniej używana jest metoda polegająca na zliczaniu aberracji chromosomowych
- ◆ W szczególności w Polsce najpowszechniej używa się metody bazującej na **aberracjach dicentrycznych** (dicentrykach)