



ННЦ «ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ»

Київського національного університету імені Тараса
Шевченка

РАДІОБІОЛОГІЯ

д.б.н., професор кафедри
біофізики

Мартинюк Віктор Семенович



Київ
2014

© В.С. Мартинюк



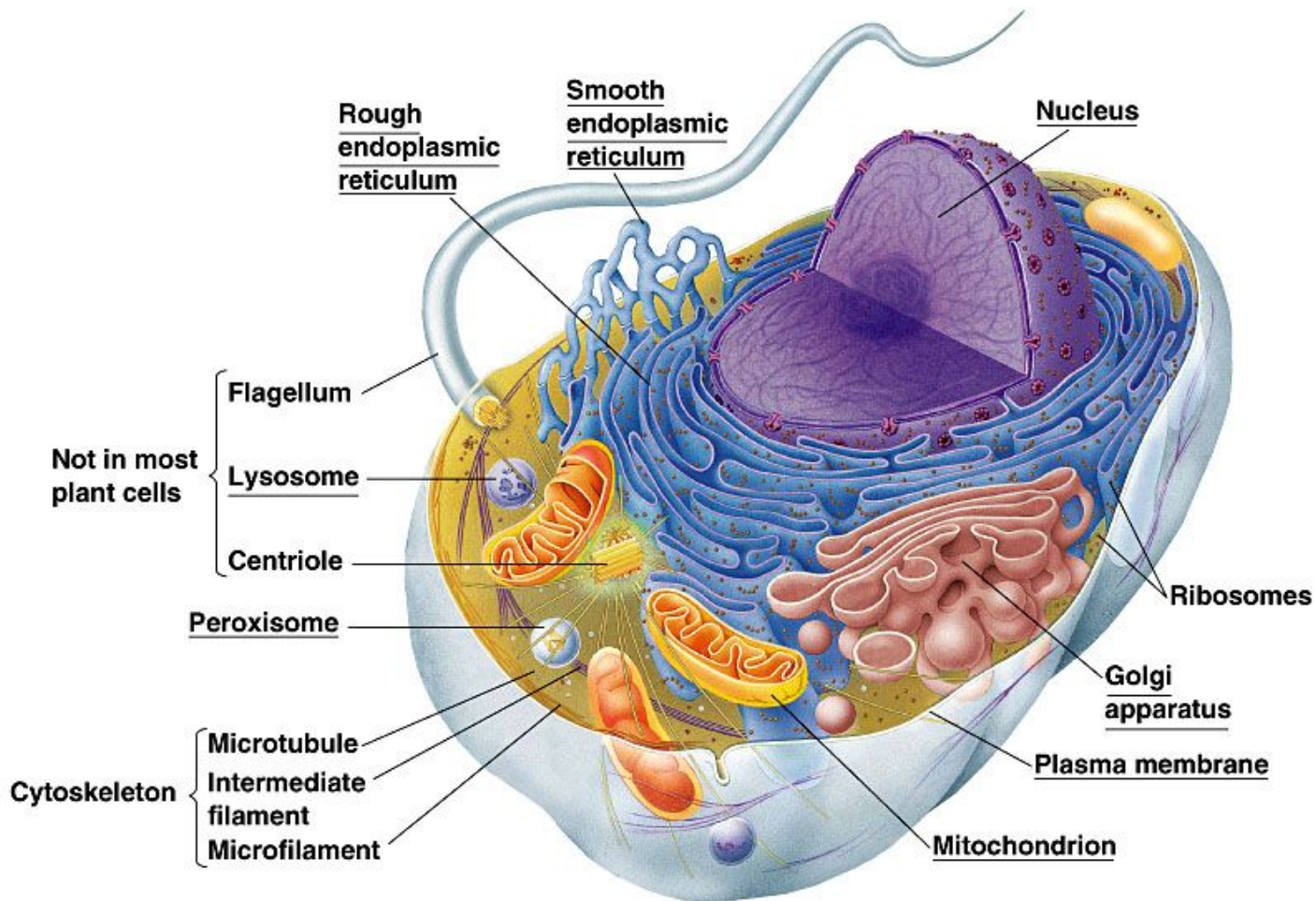
РАДІОБІОЛОГІЯ



Кафедра Біофізики

- Клітинна радіобіологія.
- Теорія мішеней в клітинній радіобіології.
- Зворотні, незворотні і летальні реакції клітин.
- Клітинна радіочутливість і радіорезистентність.
- Основні клітинні механізми радіаційної загибелі клітин (некроз, апоптоз, аутофагія).
- Проліферативна та інтерфазна загибель клітин.
- Моделі виживання клітин.
- Ефекти клітинного циклу.
- Відносна біологічна ефективність дії іонізуючого випромінювання.
- Генетичні і епігенетичні ефекти радіації.

- Теорія мішеней в клітинній радіобіології.





РАДІОБІОЛОГІЯ



- **Клітинна радіобіологія**

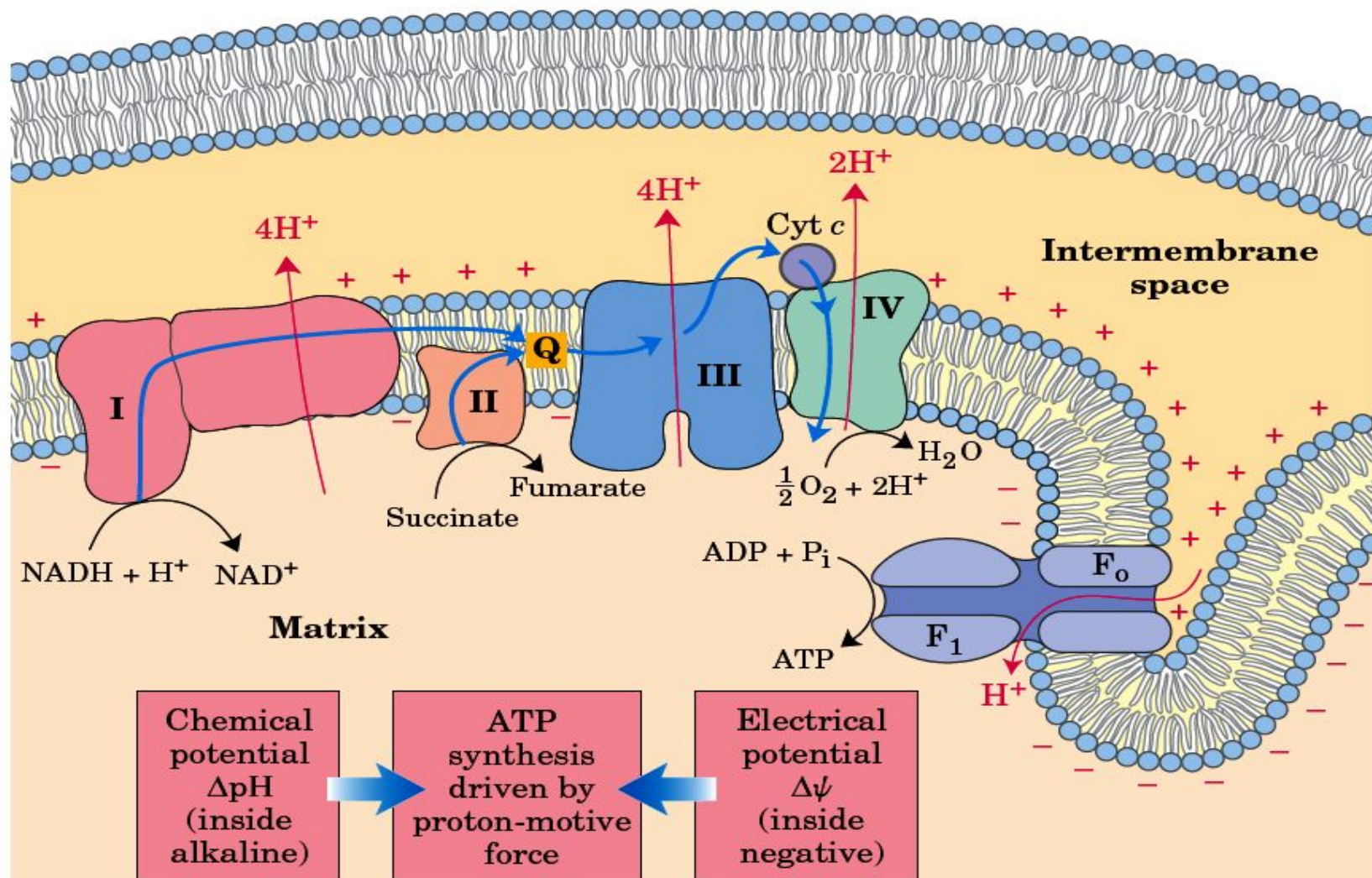
Клітини організму навіть в межах однієї тканини мають різну радіочутливість, яка залежить від стадії їх розвитку, віку, функціонального стану.

Компоненти самої клітини також мають різну радіочутливість.

Найбільша чутливість властива ядру.

Чутливими є також функціонально активні органели, що мають мембрану, в першу чергу мітохондрії.

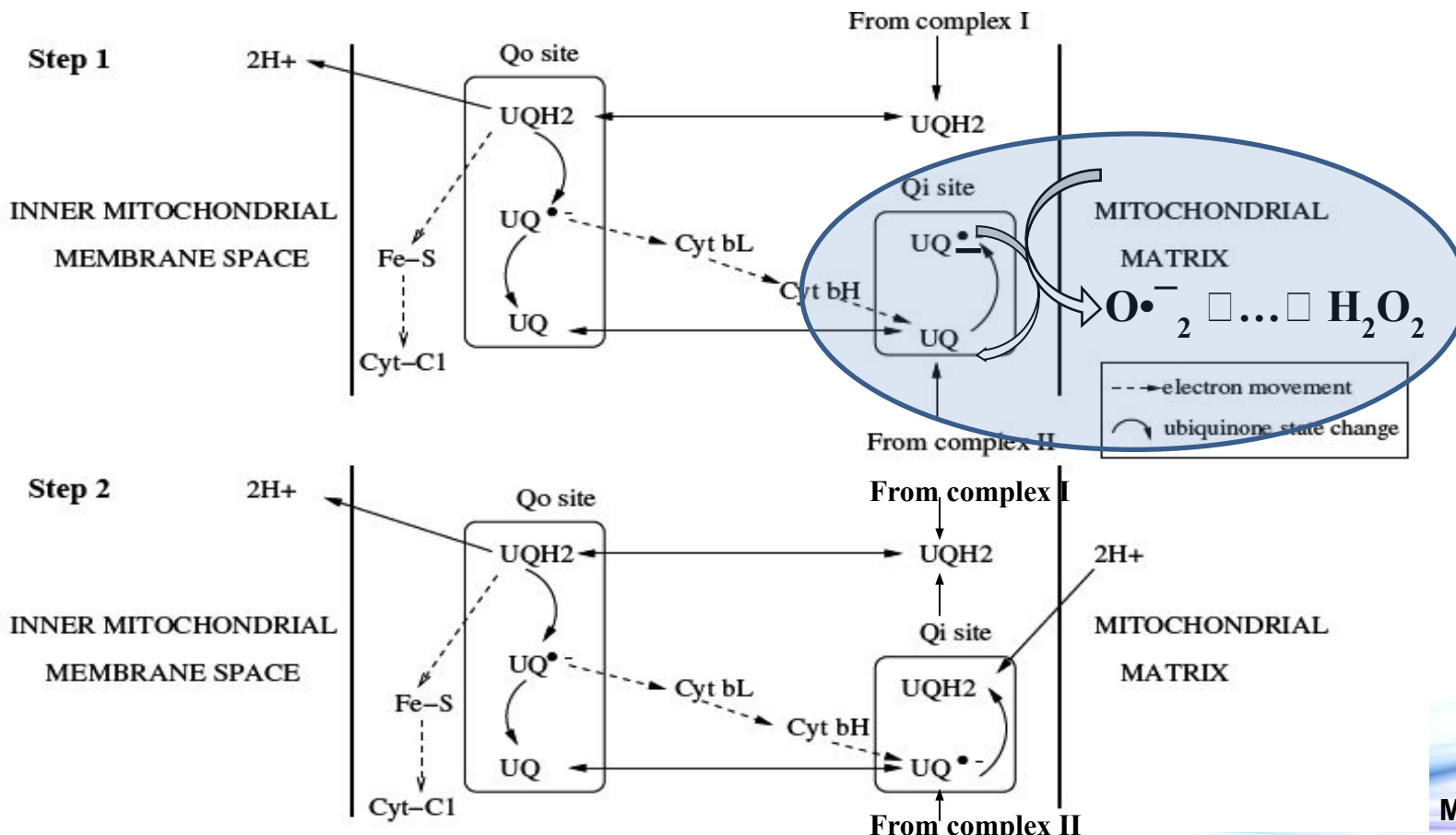
Чутливими є також функціонально активні органели, що мають мембрану, в першу чергу мітохондрії.



- Клітинна радіобіологія

Чутливими є також функціонально активні органели, що мають мембрану, в першу чергу мітохондрії.

Q-цикл Мітчела





РАДІОБІОЛОГІЯ



Негайних морфологічних змін у клітинах при опроміненні в невеликих дозах не виявляється. При великих дозах залежно від їх величини морфологічні з'являються на 2-3 добу.

У цитоплазмі після опромінення відбувається :

- зміна в'язкості - при малих дозах вона знижується , при великих - підвищується;
- вакуолізація цитоплазми (чітко проглядається у клітин крові, червоного кісткового мозку, паренхіматозних органів);
- підвищення проникності мембран для електrolітів і води - з клітини виходить калій, а в ній накопичується натрій (в еритроцитах це призводить до гемолізу);
- підвищення коефіцієнта заломлення, що пов'язано з денатурацією білків плазми і зміною стану води.

Водночас спостерігатися й інші прижиттєві зміни цитоплазми: різні ступені прижиттєвого фарбування, зміни сприйняття кислих і основних барвників, тощо.

Рухливі клітини після опромінення зазвичай приймають округлу форму.



РАДІОБІОЛОГІЯ



Кафедра Біофізики

В ядрі відбувається:

- збільшення розмірів ядер;
- змінюється форма ядра;
- з'являються гігантські ядра;
- сегментація ядер: з'являються трьох-, чотириядерні і багатоядерні клітини;
- некротичні явища - пікноз і рідше лізис ядра.



РАДІОБІОЛОГІЯ



Існує група променевих ушкоджень клітини, які не призводять до загибелі. Ці клітинні реакції називають фізіологічними або кумулятивними ефектами опромінення. Вони проявляються після опромінення і з часом зникають.

Універсальним прикладом променевих реакцій клітин є радіаційне блокування мітозів - кількість клітин, які діляться в популяції після опромінення різко знижується.

На основі цього факту виникла ідея променевого пригнічення розвитку пухлин.



РАДІОБІОЛОГІЯ



Час затримки мітозів строго залежить від дози опромінення і цей ефект проявляється у всіх клітин, незалежно, виживуть вони після опромінення або загинуть.

У досліджах несинхронізованих культурах клітин було знайдено, що затримка клітинного поділу становить приблизно 1 годину на 1 Гр, причому із збільшенням дози опромінення зростає не частка реагуючих клітин, а величина реакції (тривалість затримки поділу) кожної опроміненої клітини.

Найбільш суттєва затримка поділу при опроміненні клітин в синтетичній та постсинтетичній фазах клітинного циклу.

Радіаційне блокування мітозів є захисною реакцією клітин на опромінення.

Затримку мітозів слід відрізнити від повного пригнічення мітозів, коли клітина зберігає життєздатність, але повністю втрачає здатність до поділу.

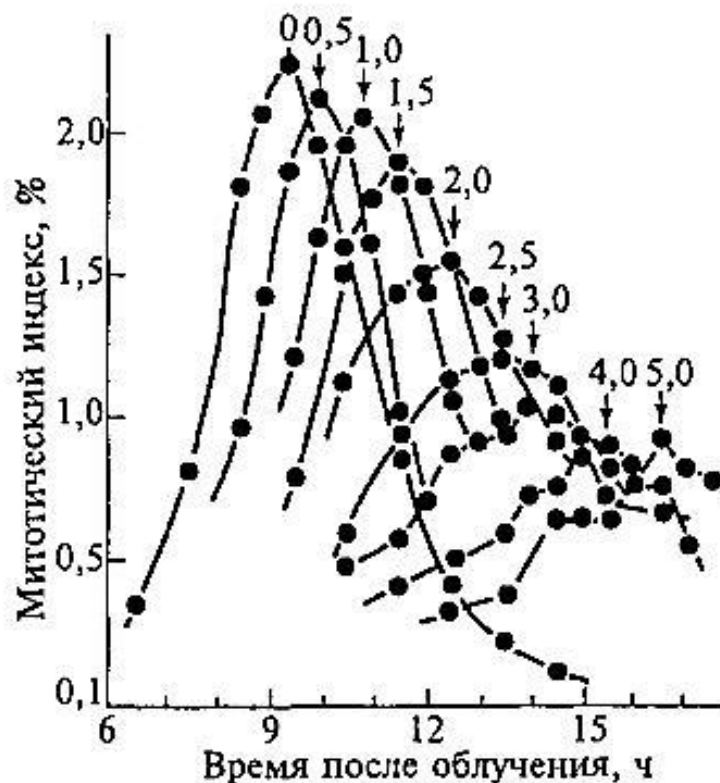


Рис. 7.1. Сдвиг максимума митотической активности клеток почки человека при облучении в середине S -периода (Дж.Ф. Скайф, 1969):

Стрелками показан сдвиг пика волны митозов при воздействии в указанных вверху дозах (Гр)



РАДІОБІОЛОГІЯ



- **Зворотні, незворотні і летальні реакції клітин.**

Летальні реакції клітин.

У радіобіології під клітинною загибеллю розуміють втрату клітиною здатності до проліферації. Клітини, які виживають після опромінення можуть мати здатність до необмеженого поділу.

Типи (форми) радіаційної клітинної загибелі:

1 . Інтерфазна (інтеркінетична) загибель:

- до поділу (під променем);
- без поділу.

2 . Мітотична (репродуктивна) загибель:

- після першого поділу;
- в наступних поділах;
- загибель клітин популяції, що діляться.

Чим вище доза опромінення, тим раніше гинуть клітини.

Однією з форм клітинної загибелі є злиття двох клітин і утворення гігантської клітини. Такі клітини здатні до 2-3 поділів, після чого все одно гинуть.



РАДІОБІОЛОГІЯ



Кафедра Біофізики

- **Летальні реакції клітин.**

Головною причиною репродуктивної загибелі клітин є пошкодження ДНК.

Типи променевих ушкоджень ДНК:

- одиночні і подвійні розриви (саме вони відповідальні за летальний результат опромінення);
- ушкодження азотистих основ нуклеотидів з подальшим їх видаленням з ДНК;
- внутрішньо-і міжмолекулярні зшивки типу ДНК-ДНК, ДНК-білок.



РАДІОБІОЛОГІЯ



- **Клітинна радіочутливість і радіорезистентність.**

Радіочутливість - сприйнятливність клітин, тканин, органів або організмів до впливу іонізуючого випромінювання (для молекул використовують термін радіоуразненості).

Мірою радіочутливості служить доза випромінювання, що викликає певний рівень загибелі опромінюваних об'єктів: для інактивації клітин - показник D37 або D0 на кривій виживаності; для організмів - доза, що викликає загибель 50% особин за певний термін спостереження (LD50).

Радіорезистентність - поняття, протилежне радіочутливості, тобто це стійкість клітин, тканин, органів або організмів до впливу іонізуючого випромінювання.

Радіорезистентність є природною властивістю клітин, тканин або організму в цілому. Але її також можна викликати, піддаючи досліджуваній об'єкт невеликим дозам іонізуючого випромінювання. Такий вплив активує клітинні радіозахисні механізми, що захищає біологічний об'єкт від пошкодження при подальшому впливі іонізуючої радіації.

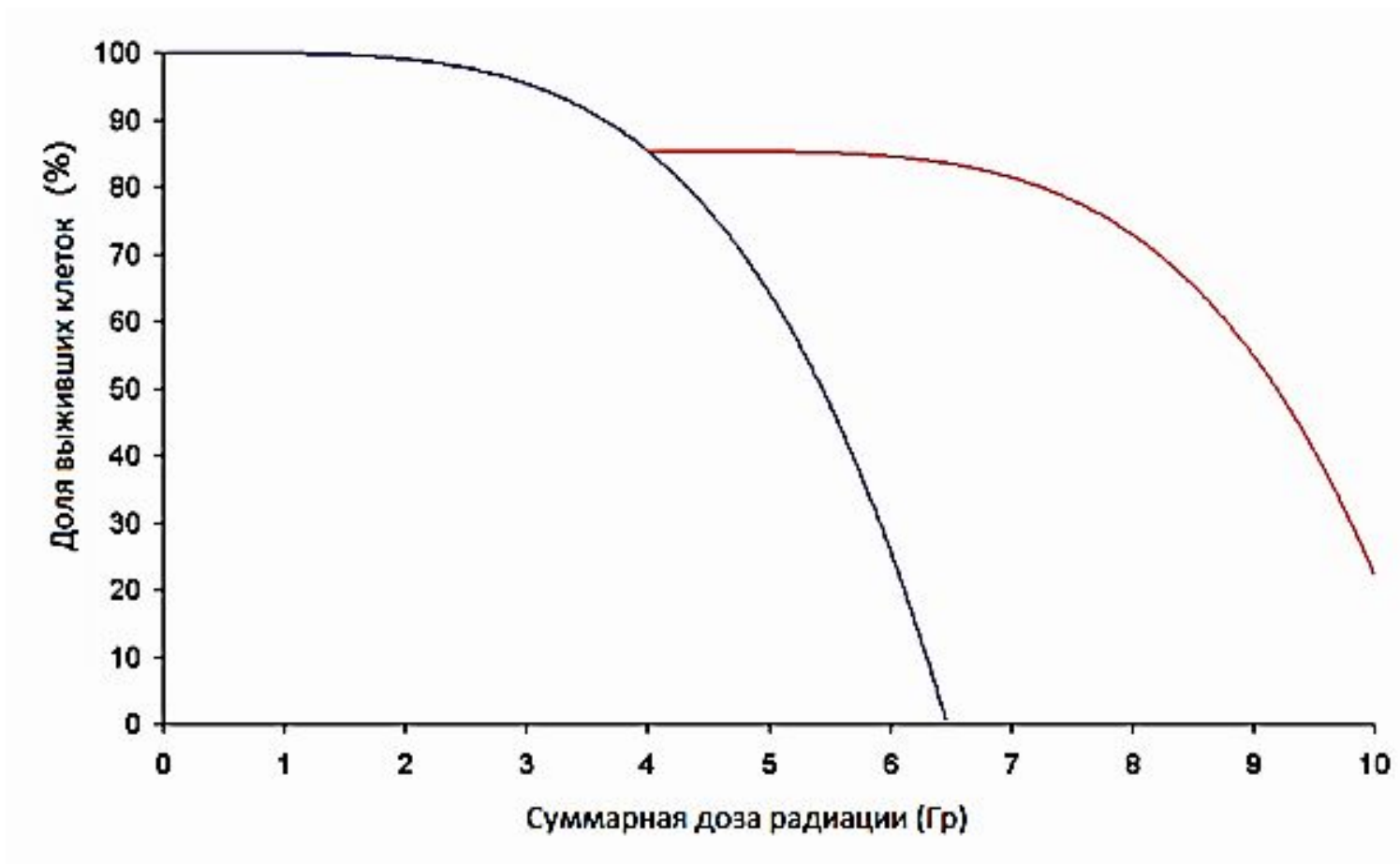


РАДІОБІОЛОГІЯ



Кафедра Біофізики

- Клітинна радіочутливість і радіорезистентність.





РАДІОБІОЛОГІЯ



Кафедра Біофізики

- Основні клітинні механізми радіаційної загибелі клітин (некроз, апоптоз, аутофагія).

Некроз - це один з видів клітинної загибелі при якому відбувається денатурація внутрішньоклітинних протеїнів та ферментативне перетравлення змертвілих клітин.

При некрозі клітини втрачають здатність підтримувати цілісність мембрани, внаслідок чого компоненти клітин виходять за її межі, що викликає запалення оточуючих некроз тканин.

Ферменти, що викликають перетравлення некротичних клітин надходять з їх лізосом, а також з лейкоцитів, що завжди супроводжують запальну реакцію.



РАДІОБІОЛОГІЯ



Кафедра Біофізики

- **Основні клітинні механізми радіаційної загибелі клітин (некроз, апоптоз, аутофагія).**

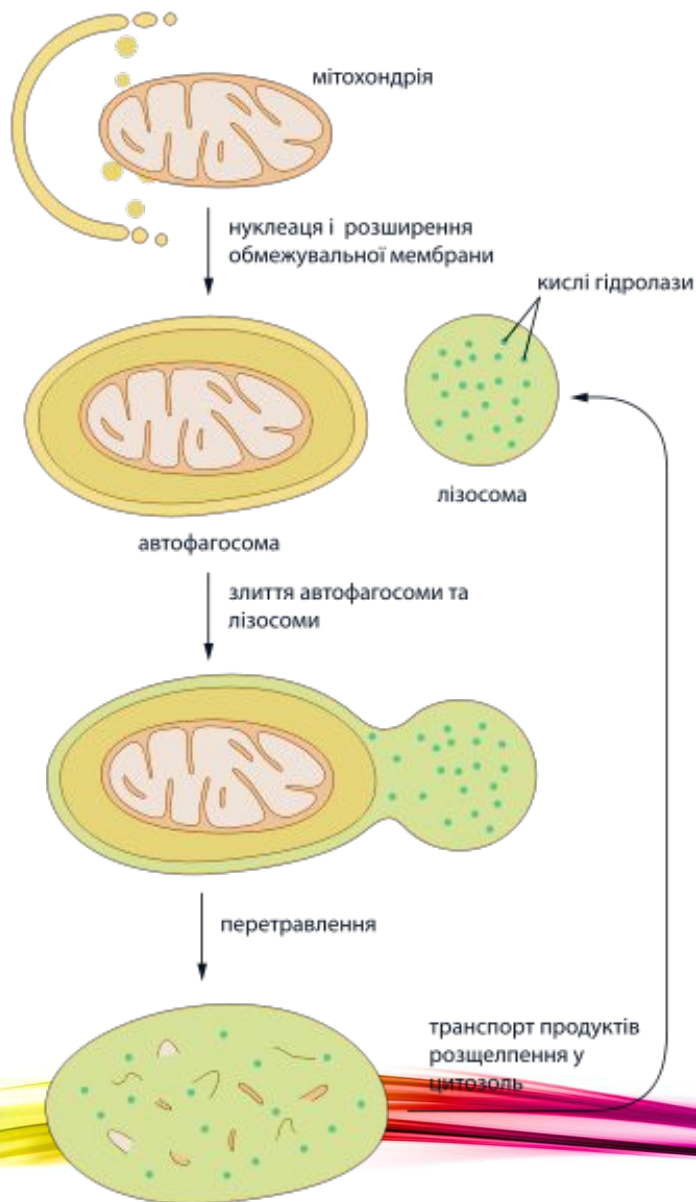
Аутофагія

це процес перетравлення клітиною власних органел та ділянок цитоплазми за допомогою лізосом з метою позбавлення від старих і пошкоджених частин.

Розрізняють три типи аутофагії - мікроаутофагію, макроаутофагію і шаперон-залежну аутофагію .

Мікроаутофагія – перетравлення макромолекул і уламків клітинних мембран лізосомами.

Шаперон-опосередкована аутофагія - перетравлення макромолекул білків в лізосомах, яке відбувається за участю цитоплазматичних білків-шаперонов сімейства hsp – 70 і допоміжних білків і LAMP-2, що є мембранними рецепторами комплексу шаперона і білка, що підлягає транспорту в лізосому .



Макроавтофагія - перетравлення ділянки цитоплазми разом з органеліми шляхом утворення мембранного компартменту, що відокремлює його від решти цитоплазми двома мембранами. Тікий двомембранний компартмент наивають *автофагосомаю*. Автофагосоми зливаються з лізосомами, утворюючи автофаголізосоми.

При автофагії перетравлюються всі органели клітини, залишаючи лише клітинний *дебрис*, що поглинається макрофагами.



РАДІОБІОЛОГІЯ



Кафедра Біофізики

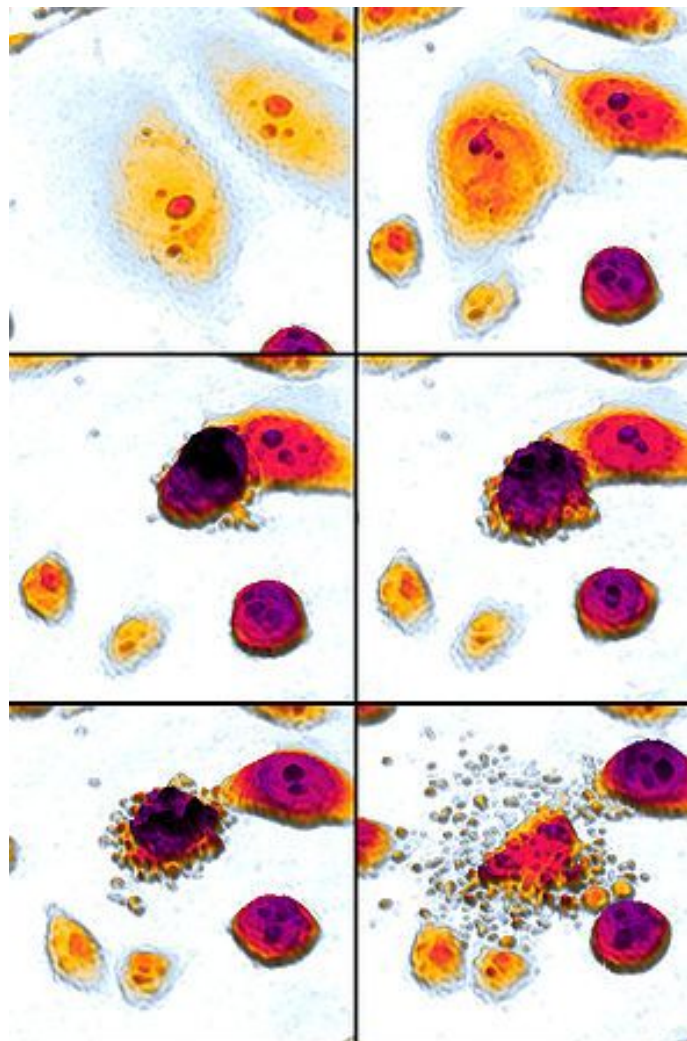
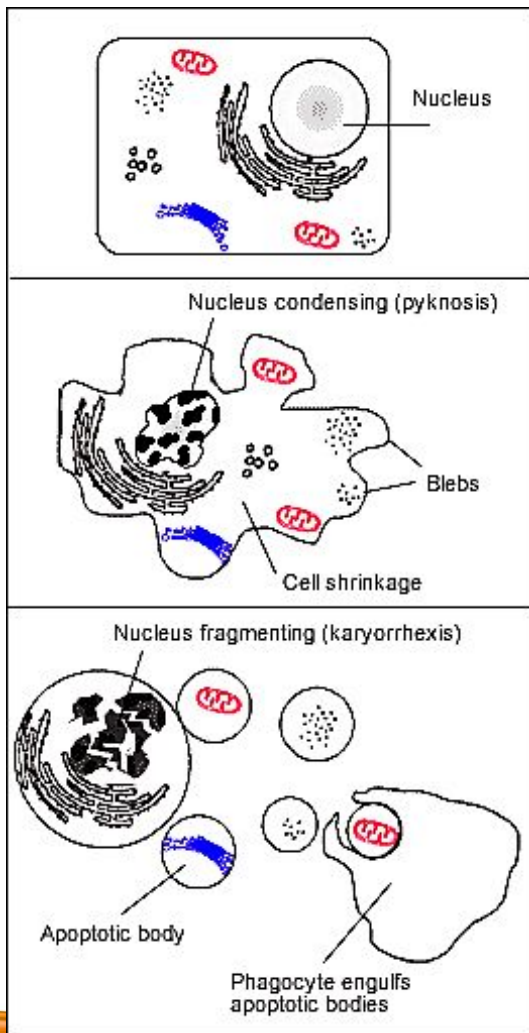
- Основні клітинні механізми радіаційної загибелі клітин (некроз, апоптоз, аутофагія).

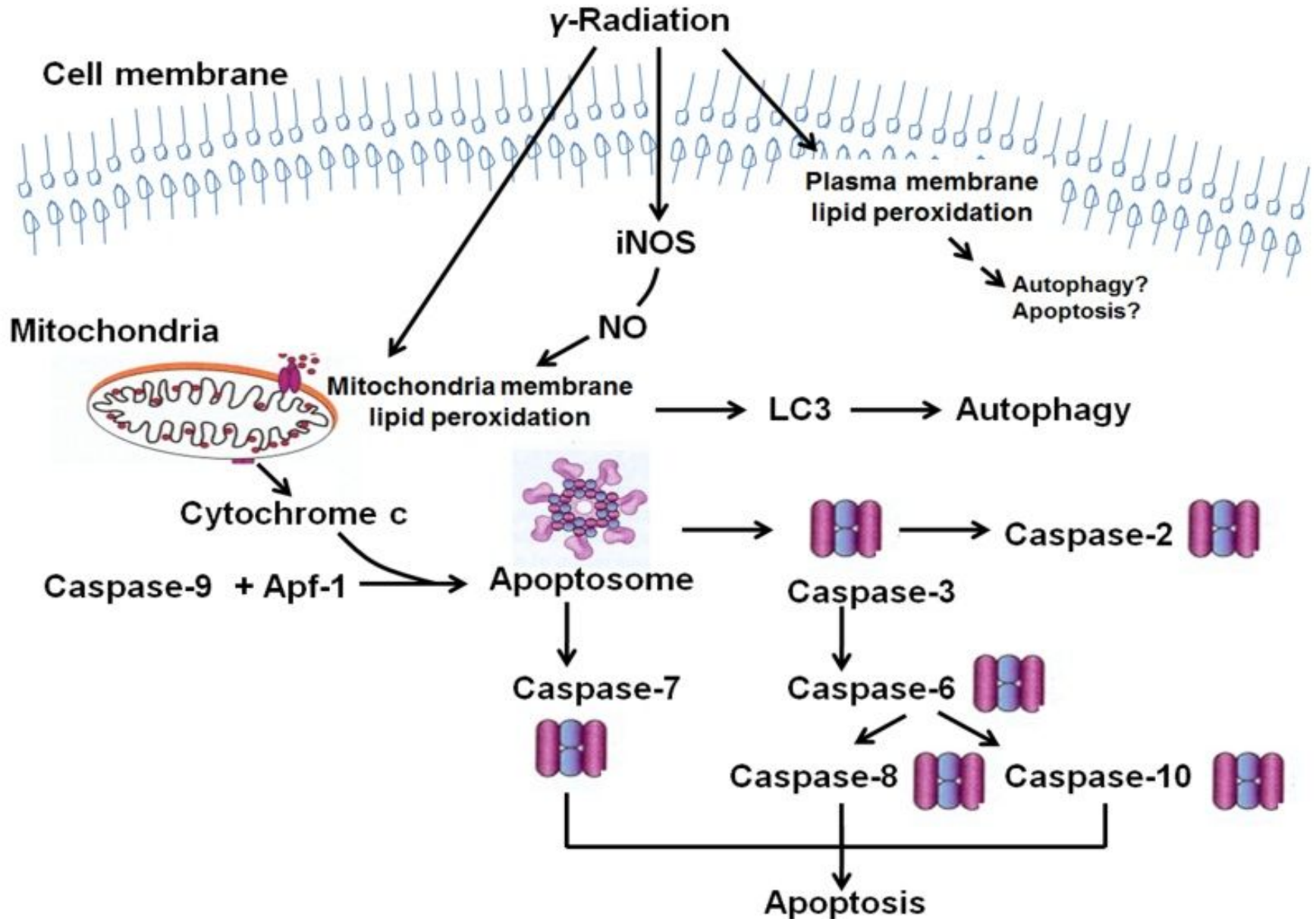
Апоптоз - найбільш розповсюджений тип запрограмованої клітинної смерті.

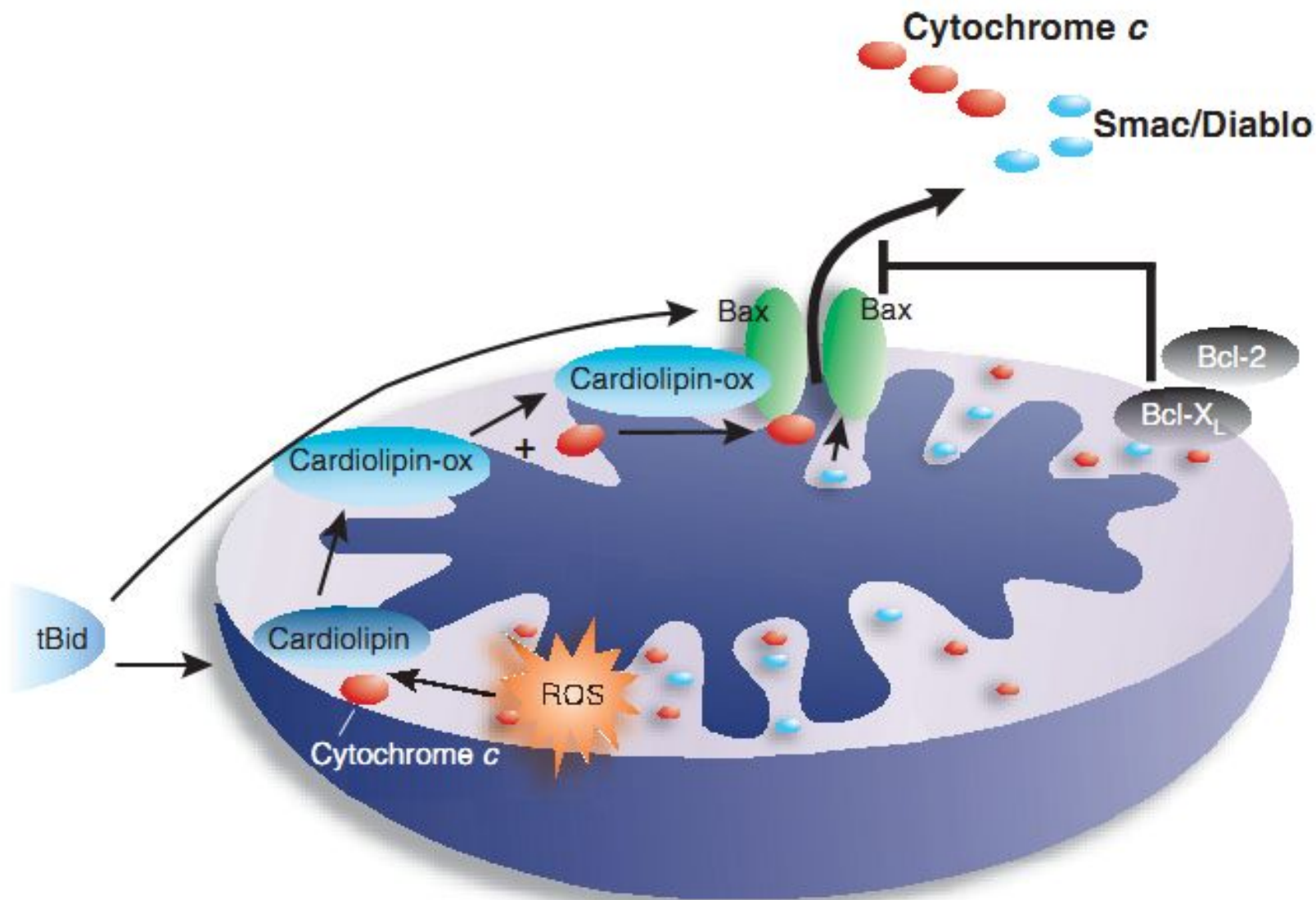
Апоптоз - це сукупність клітинних процесів, що призводять до загибелі клітини.

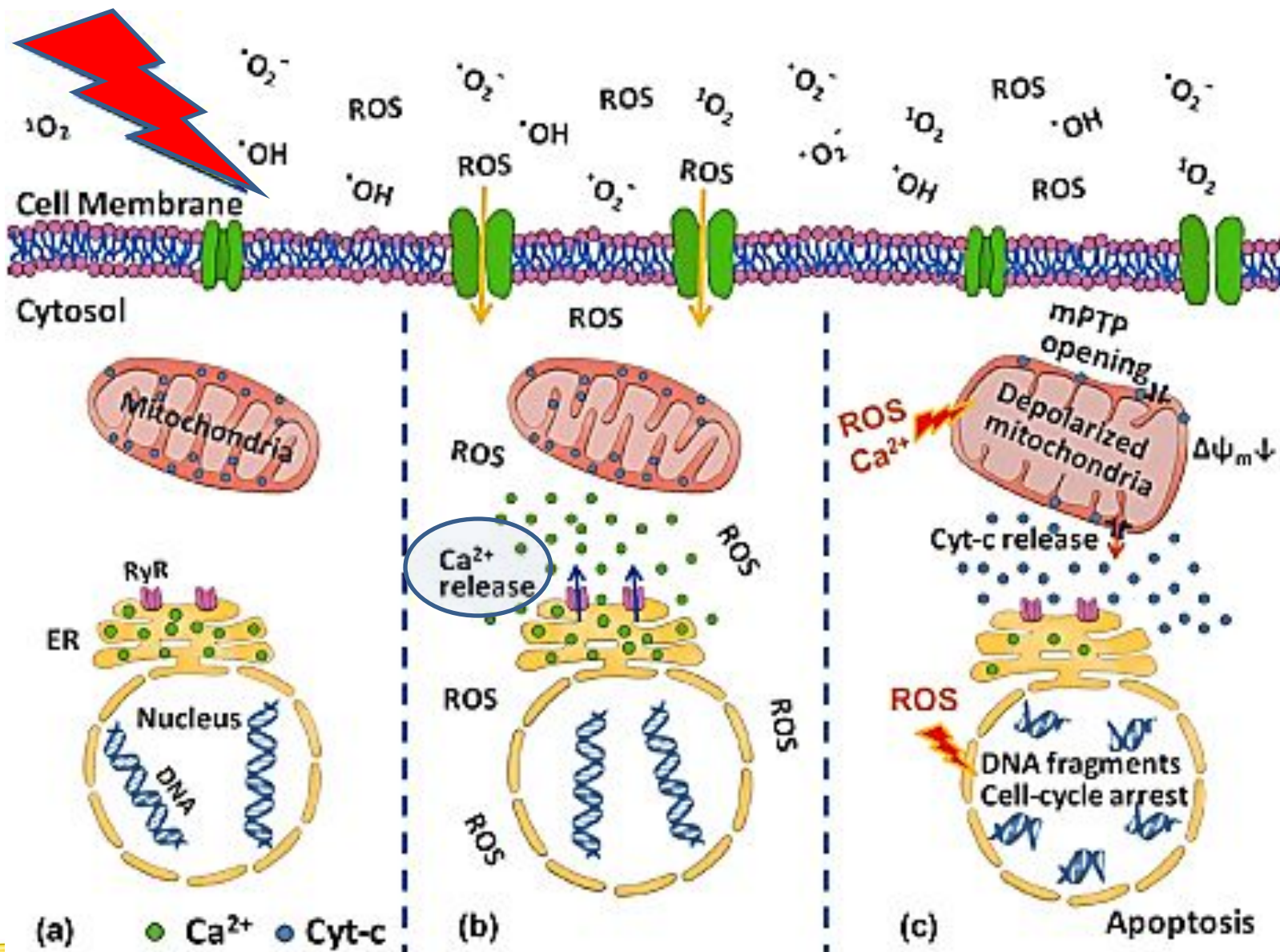
На відміну від некрозу при апоптозі не відбувається руйнування цитоплазматичної клітинної мембрани і, відповідно, вміст клітини не потрапляє в позаклітинне середовище.

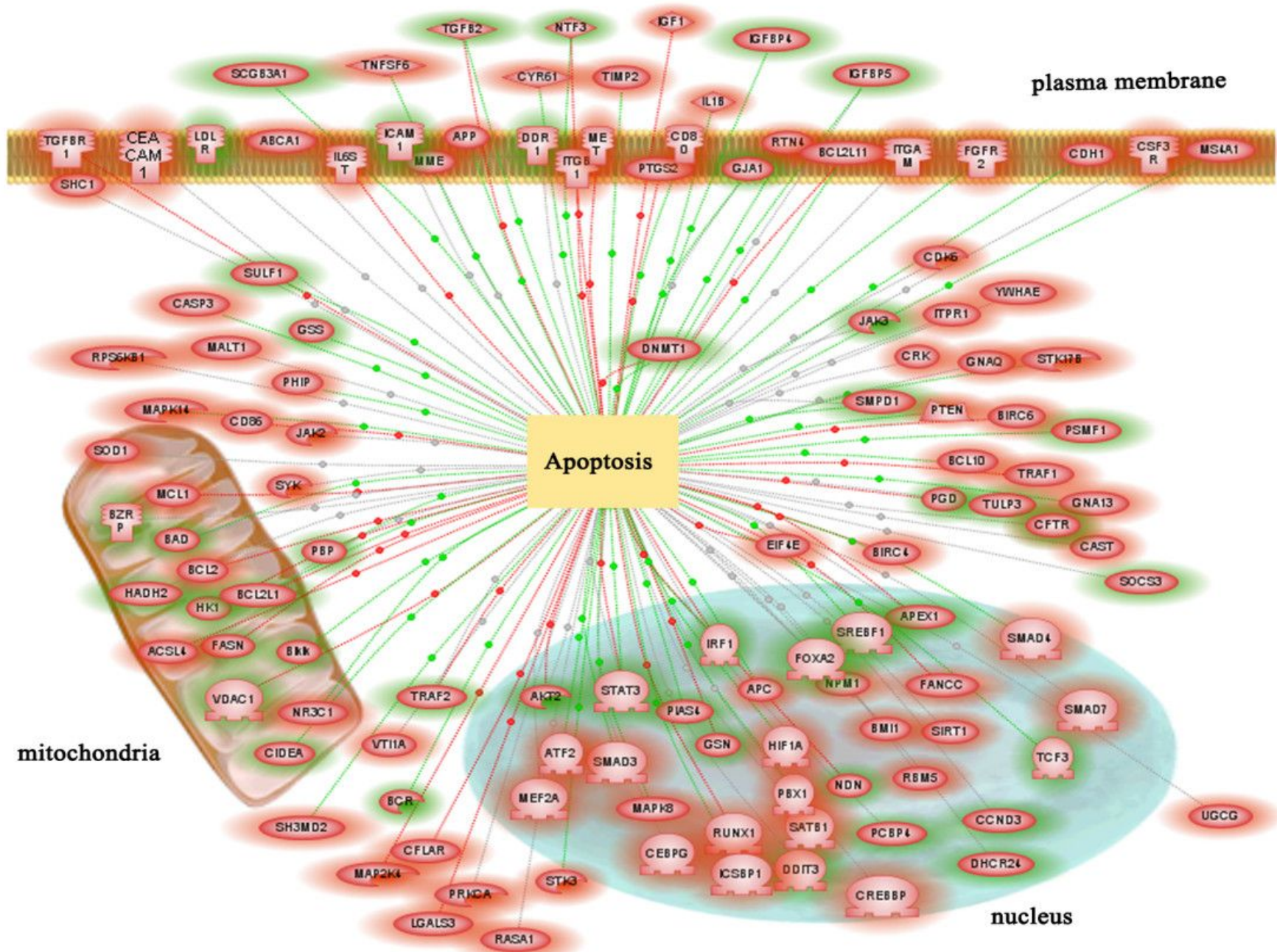
Апоптоз - це сукупність клітинних процесів, що призводять до загибелі клітини.











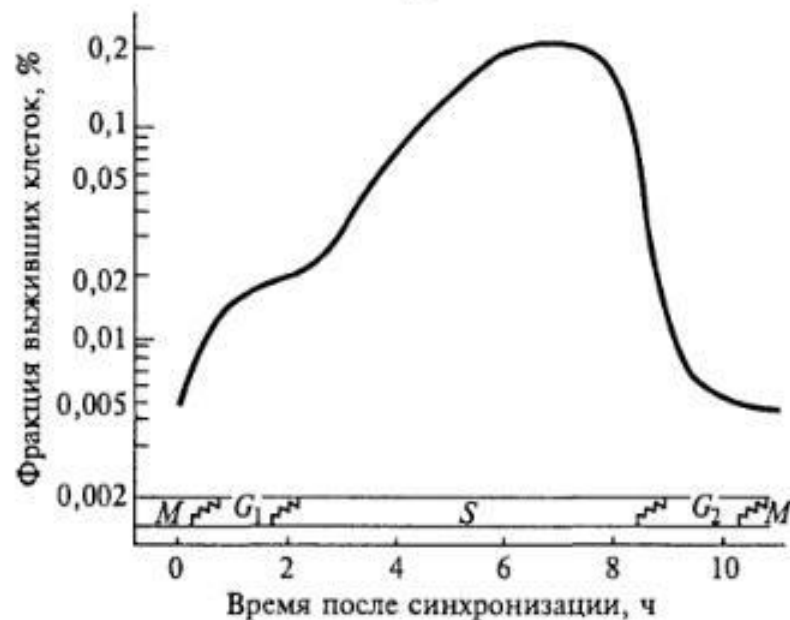
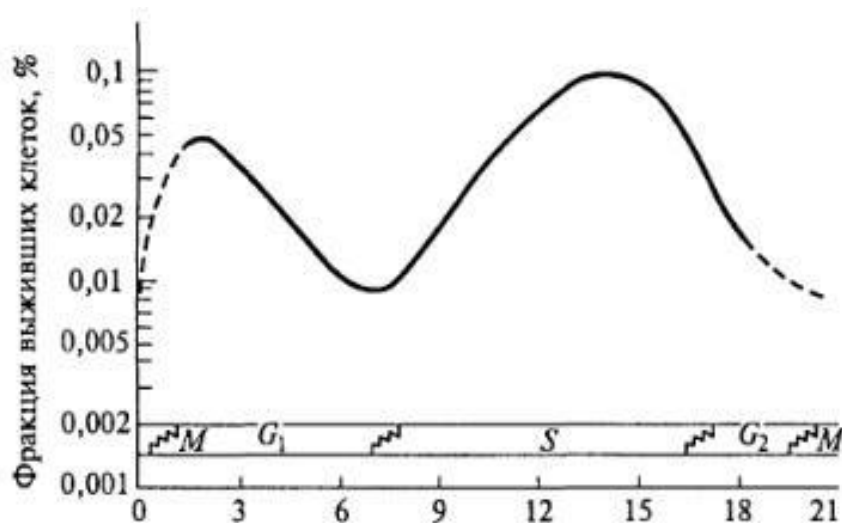


Рис. 8.1. Радиочувствительность клеток на разных стадиях цикла:

а — клетки *HeLa* (карцинома шейки матки человека); *б* — клетки китайского хомячка линии *V-79* (по У. Синклеру, 1970):

генерационный цикл опухолевых клеток человека составляет 21 ч, а клеток китайского хомячка — 10 ч

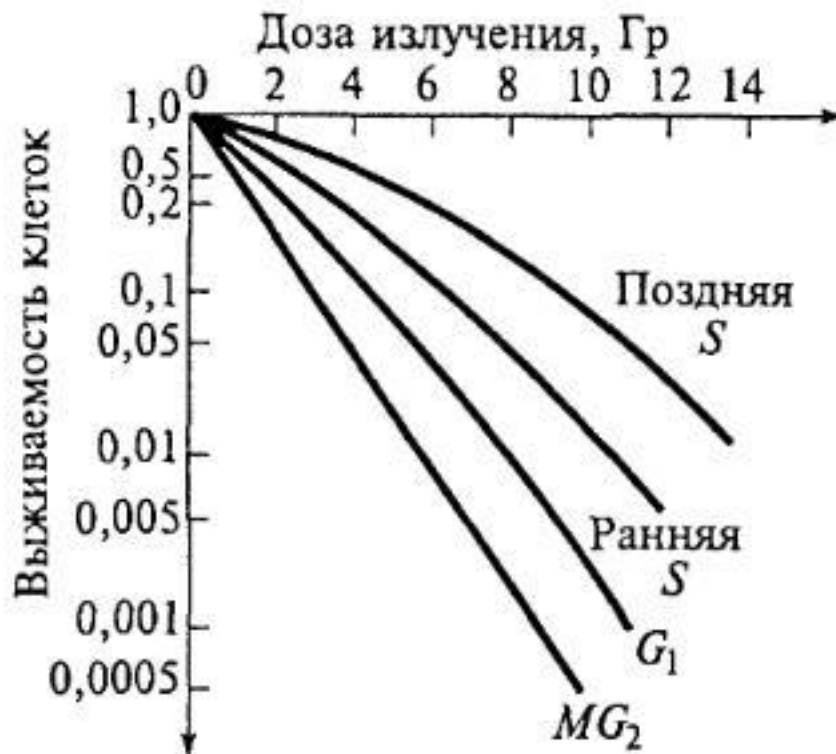
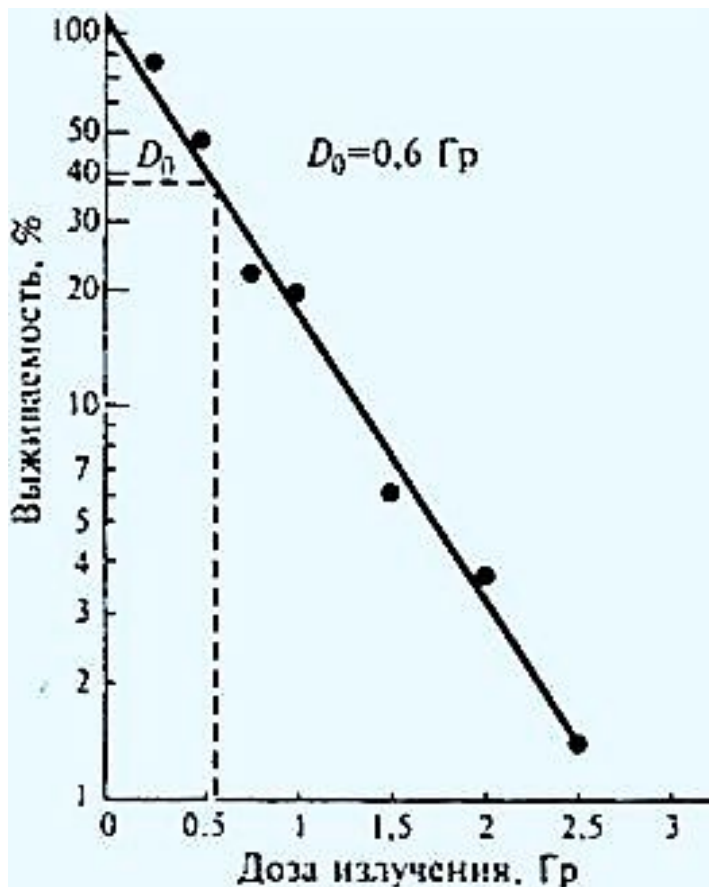


Рис. 8.2. Кривые выживаемости клеток V-79 при облучении на разных стадиях цикла (по У. Синклеру, 1970)

● Моделі виживання клітин.



Графічне представлення залежності кількості клітин, що вижили, від дози опромінення називається кривою виживаності (моделлю виживаності).

Крива виживаності для щільноіонізуючого випромінювання.

$$N = N_0 e^{-(D/D_0)}$$

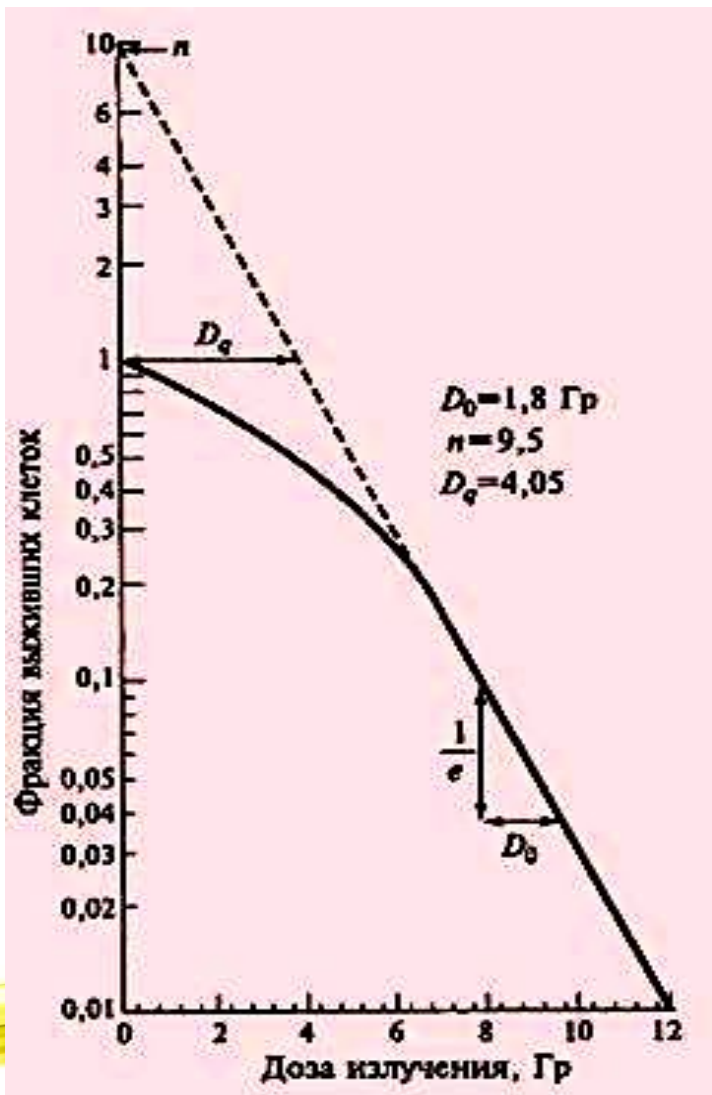
D_0 – інактивуюча доза (на кожний об'єкт припадає одне влучення), при якій кількість живих клітин зменшується в e раз, e показником радіочутливості.

D – доза, що отримав об'єкт.

N_0 – початкове число об'єктів.

N – число об'єктів, що залишилися непошкодженими.

- **Моделі виживання клітин.**



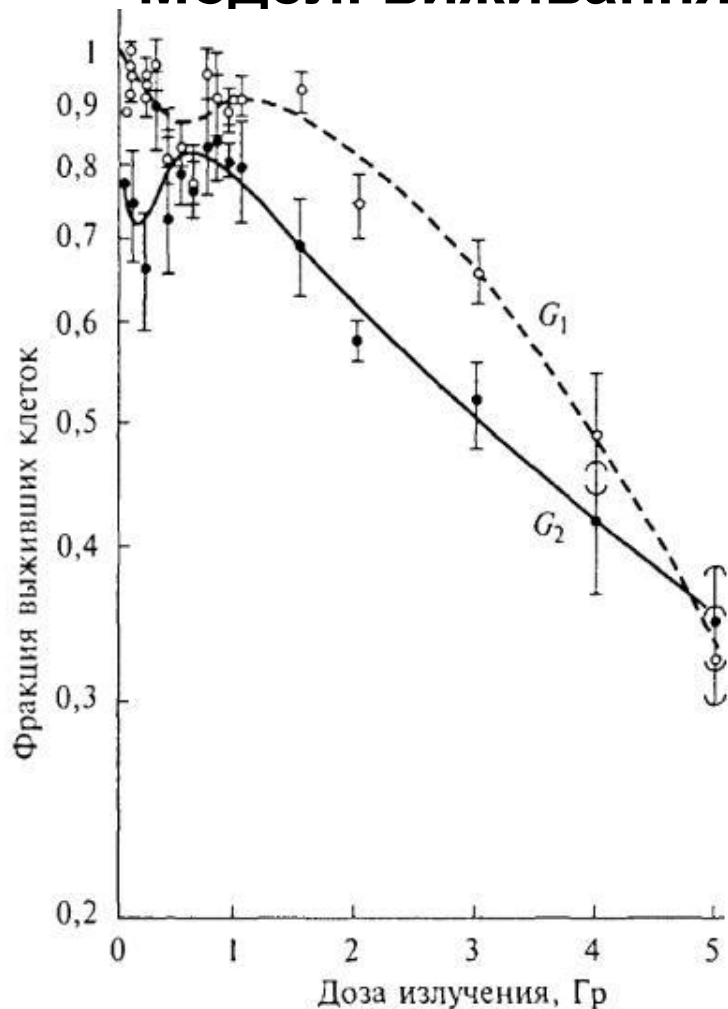
Крива виживаності для слабощільного іонізуючого випромінювання.

D_0 – інактивуюча доза (на кожний об'єкт припадає одне влучення), при якій кількість живих клітин зменшується в e раз, є показни.

D_q – доза, що пов'язана зі здатністю клітин до репарації.

n – показник здатності клітин до виживання.

● Моделі виживання клітин.



Крива виживаності для низьких доз випромінювання.

Пояснення немонотонної залежності пов'язано з недостатньою активністю системи репарації, для повної активації якої необхідний більший рівень ушкодження.

- Віддалені ефекти радіаційного ушкодження клітин.



Рис. 7.13. Длительное снижение клоногенной способности клеток карциномы мочевого пузыря человека линии EJ30-15 после облучения в дозе 6 Гр, проведенного в момент нахождения клеток в S- и G₁-фазах клеточного цикла (по Э. Леонхарду и др., 1998)



РАДІОБІОЛОГІЯ



● Віддалені ефекти і генетична нестабільність

Генетична нестабільність - зміна з високою частотою локалізації, структури або числа копій генів (або їх частин) в геномі протягом онтогенезу особин.

Генетична нестабільність має різні прояви:

- дестабілізація хромосом;
- обміни сестринських хроматид;
- Анеуплоїдія;
- мутації і ампліфікації генів;
- клональна гетерогенність;
- неопластична трансформація.
- активність мобільних генетичних елементів;

Генетична нестабільність негативно позначається на життєдіяльності організмів, зокрема сприяє пухлиноутворенню і старінню.



РАДІОБІОЛОГІЯ



● Генетичні і епігенетичні ефекти радіації.

Основні постулати радіаційної генетики:

- всі види іонізуючих випромінювань, що діють на гамети, підвищують частоту виникнення мутацій;
- іонізуючі випромінювання викликають мутації у всіх вивчених живих організмів, тобто мутагенний ефект цього фізичного фактору є загальним в живій природі;
- іонізуючі випромінювання викликають мутації у всіх соматичних тканинах;
- іонізуючі випромінювання викликають всі відомі типи мутацій - генні, хромосомні і геномні;
- якісно спонтанний та індукований мутагенез не відрізняються один від одного, але є кількісні відмінності в спектрах спонтанних та індукованих мутацій, що проявляється у зрушеннях відносних частот різних мутацій і типів мутацій;
- частота мутацій, що виникають під впливом іонізуючих випромінювань, приблизно пропорційна дозі.



РАДІОБІОЛОГІЯ



- **Генетичні і епігенетичні ефекти радіації.**

Хромосомні аберації при радіаційному ушкодженні:

1.фрагментація хромосом;

2.Утворення хромосомних містків, дицентриків, кільцевих хромосом;

3.поява всередині - і міжхромосомних обмінів.

Частина аберацій (хромосомні місткі та інші) механічно перешкоджають поділу клітини.

Деякі аберації призводять до нерівномірного поділу хромосом і втрати генетичного матеріалу, що викликає загибель клітин через порушення метаболічних ланок, робота яких контролювалась втраченими частинами ДНК.

- Генетичні і епігенетичні ефекти радіації.

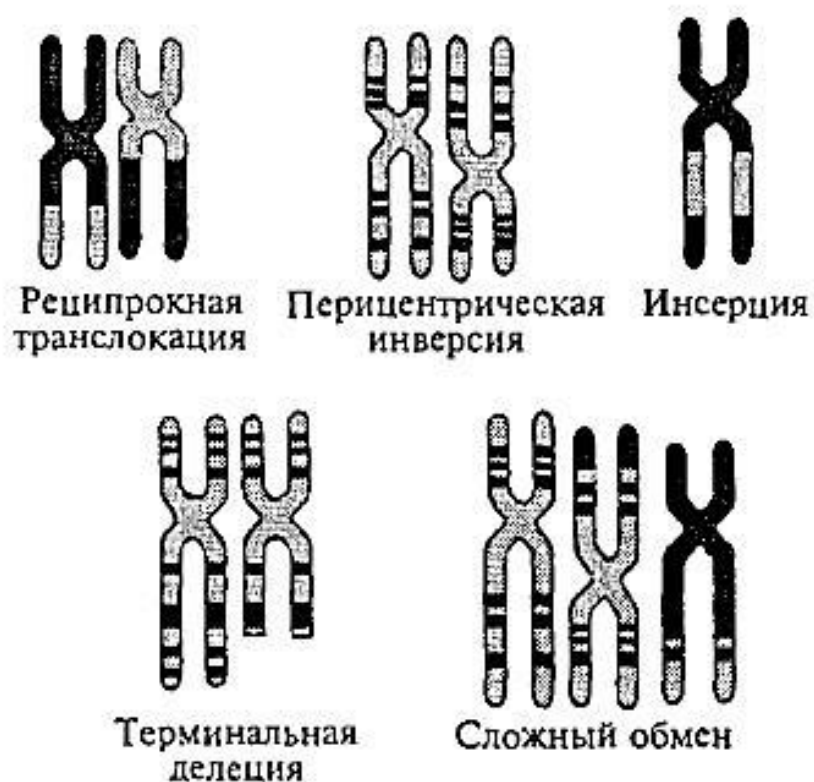
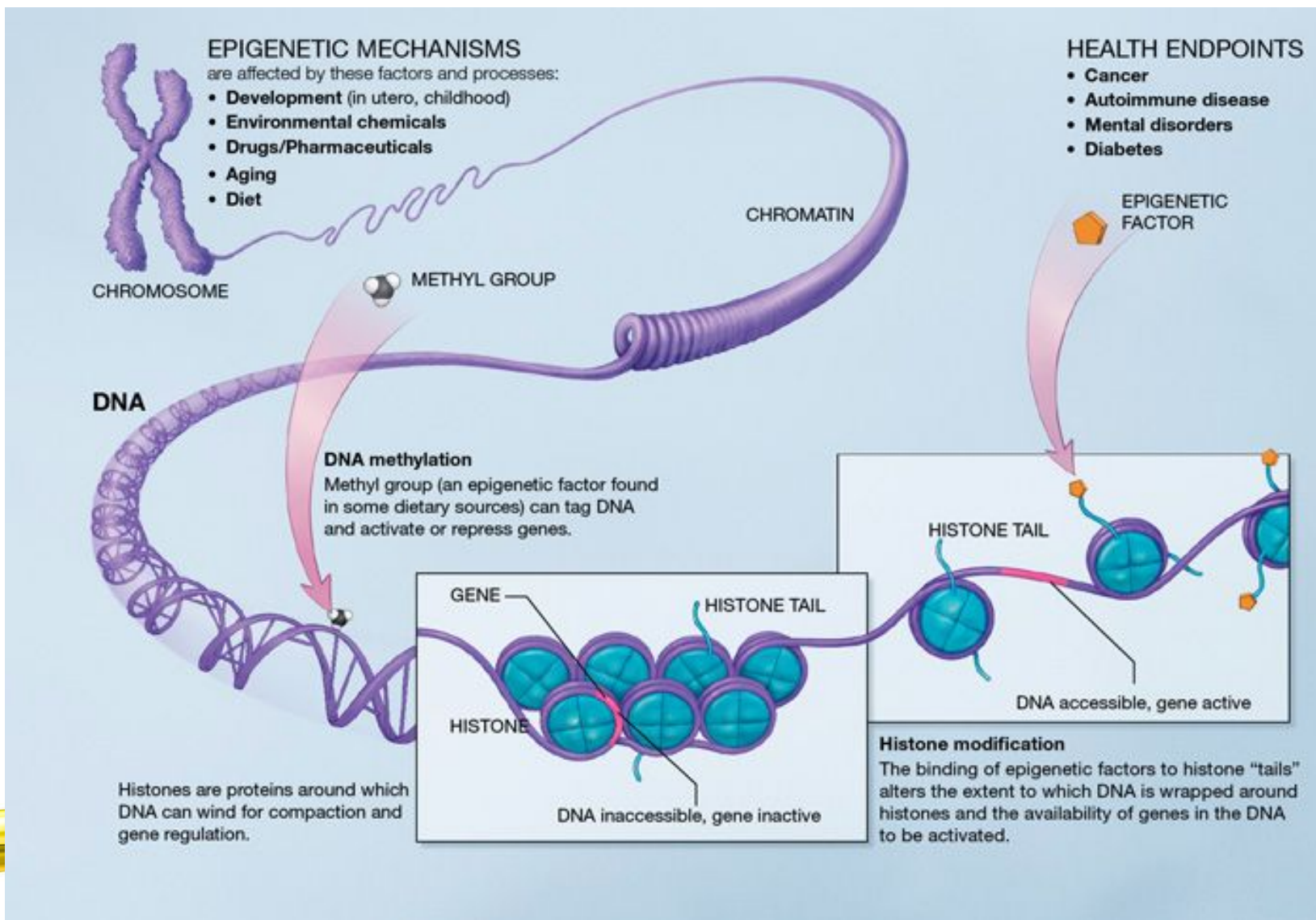


Рис. 7.4. Схема аберацій хромосом, регистрируемых методом G-дифференциальной окраски (по А.В. Севаньяеву, 2003)

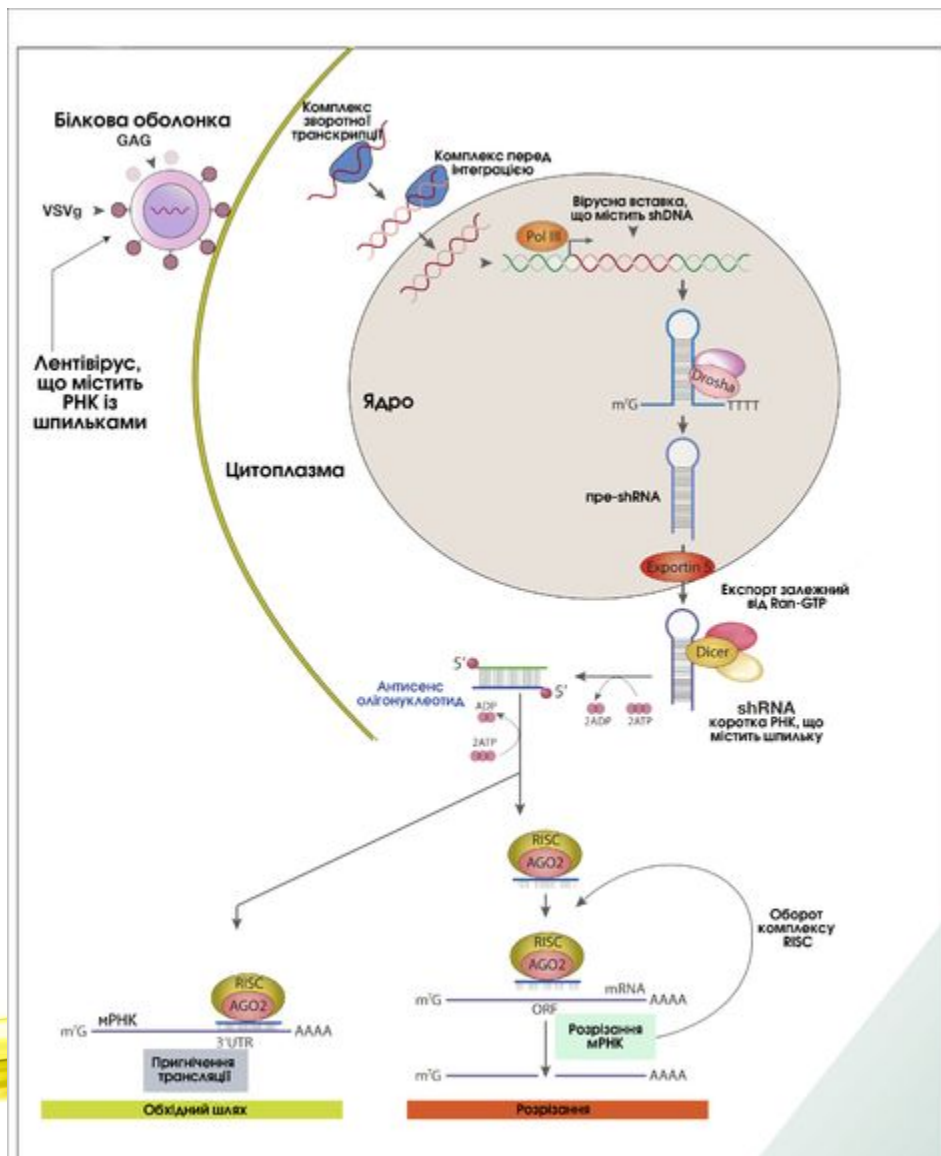
- Генетичні і епігенетичні ефекти радіації.



● Генетичні і епігенетичні ефекти радіації.



● Генетичні і епігенетичні ефекти радіації.



Епігенетика – наука (розділ генетики), що вивчає спадкові зміни в фенотипі або в експресії генів, що зумовлені іншими механізмами, ніж зміна послідовності нуклеотидів ДНК.

Основні епігенетичні механізми:

- метилування ДНК;
- ремоделювання хроматину (ацетилювання та деацетилювання гістонів);
- регуляція на рівні РНК, зокрема РНК-інтерференція;
- пріонізація білків;
- інактивація Х-хромосоми.



РАДІОБІОЛОГІЯ



- **Генетичні і епігенетичні ефекти радіації.**

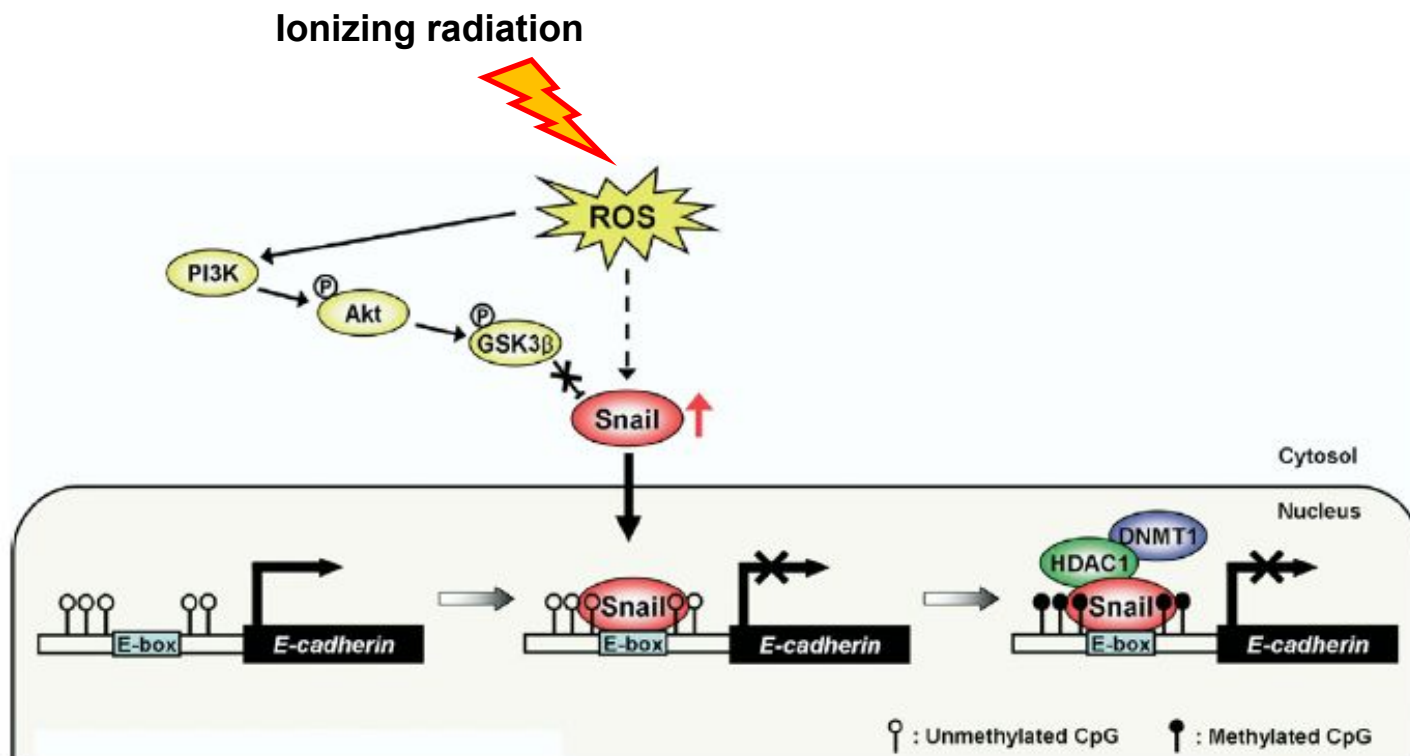
Іонізуюча радіація може бути не тільки шкідливою, а й корисною.

Невеликі дози впливають на механізм метилювання ДНК, завдяки чому активність генів стає такою, якою вона має бути при нормальній життєдіяльності клітини.

Autumn J. Bernal, Dana C. Dolinoy, Dale Huang, David A. Skaar, Caren Weinhouse and Randy L. Jirtle Adaptive radiation-induced epigenetic alterations mitigated by antioxidants . The FASEB Journal article fj.12-220350. Published online November 1, 2012.

● Генетичні і епігенетичні ефекти радіації.

Figure 8. Molecular mechanism of ROS-induced E-cadherin down-regulation. ROS up-regulate Snail expression by activating the PI3K/Akt/GSK3 β pathway and/or other pathways (dashed arrow). Snail binds to E-boxes of the E-cadherin promoter, repressing transcription. Snail induces DNA methylation of the E-cadherin promoter by recruiting HDAC1 and DNMT1.



•SEUNG-OE LIM, JIN-MO GU, MIN SOOK KIM, HYUN-SOO KIM, YOUNG NYUN PARK, CHEOL KEUN PARK, JAE WON CHO, YOUNG MIN PARK and GUHUNG JUNG **Epigenetic Changes Induced by Reactive Oxygen Species in Hepatocellular Carcinoma: Methylation of the E-cadherin Promoter** . GASTROENTEROLOGY

2008;135:2128-2140



РАДІОБІОЛОГІЯ



- **Радіаційний канцерогенез**

Радіаційний канцерогенез (онкогенез або бластомогенез) - це процес перетворення нормальних клітин і тканин організму в пухлинні під впливом іонізуючої радіації.

Радіаційному канцерогенезу передують ряд передпухлинних стадій, які завершуються пухлинним трансформуванням (переродженням).

Перший достовірно виявлений рак шкіри, індукований рентгенівським випромінюванням, був описаний німецьким рентгенологом Х. Фрібеном в 1902 р. через 6 років після відкриття В. Рентгеном променів.

Пізніше з'явилися дані про виникнення злоякісних пухлин у медичних працівників - рентгенологів і радіологів (рак шкіри), шахтарів уранових рудників (рак легенів), робітниць, які наносили на циферблат годинника флюоресцентну фарбу, що містить радій.



РАДІОБІОЛОГІЯ



Кафедра Біофізики

- **Радіаційний канцерогенез**

На цей час достовірно відомо, що дія іонізуючого випромінювання не викликає специфічних форм раку.

Після опромінення збільшується кількість тих видів ракових захворювань, які є типовими для даної популяції людей.

Дія іонізуючого випромінювання збільшує частоту виникнення вже відомих видів ракових захворювань: найчастіше лейкозів, раку молочної залози, яєчників, шкіри і кісток.

Шкірні та кісткові пухлини виникають, як правило, при локальному опроміненні, інші види - в результаті тотального опромінення.



РАДІОБІОЛОГІЯ



Кафедра Біофізики

- **Радіаційний канцерогенез**

Стадія ініціації. Матеріальним субстратом пухлинної трансформації клітин є різного типу радіаційні пошкодження генетичного апарату клітини (генні мутації, хромосомні аберації, рекомбінації), що викликають перетворення протоонкогенів в онкогени або різко підвищують рівень їх експресії.

Гіперекспресія клітинних онкогенів, що викликає пухлинну трансформацію, може мати місце також і в разі стійкого деметилювання ДНК при відсутності яких би то не було ушкоджень самих онкогенів.

Наслідком цих змін є запуск внутрішньоклітинних сигнальних каскадів несанкціонованого пролиферативного сигналу, що викликає неконтрольоване поділ клітин.



РАДІОБІОЛОГІЯ



Кафедра Біофізики

- **Радіаційний канцерогенез**

Стадія промоції. Для пухлинної трансформації клітини є необхідним повторний вплив на клітину або канцерогенного фактора (того ж самого, що викликав ініціацію – іонізуюча радіація, або іншого), або фактора, який не є канцерогеном, але здатний викликати активацію змінених онкогенів. Такий фактор називають – *промотором канцерогенезу.*

Як правило, промотори викликають проліферацію клітин за допомогою активації проліферативних сигнальних каскадів, частіше за участю протеїнкінази С.



РАДІОБІОЛОГІЯ



● Радіаційний канцерогенез

Стадія стовбурової лінії. Поява несанкціонованих сигналів є необхідною, але не достатньою умовою утворення пухлини. Пухлинний ріст стає можливим лише після ухилення трансформованих клітин від подальшого диференціювання, що зазвичай викликається несанкціонованою активністю генів деяких клітинних мікроРНК.

МікроРНК перешкоджають функціонуванню білків, що відповідають за перебіг спеціалізації клітин. Дозрівання трансформованих клітин припиняється і вони в результаті безперервної проліферації і пригнічення апоптозу накопичуються, формуючи пухлину - клон клітин, що мають ряд особливостей, не властивих нормальним клітинам організму.

Для пухлинних клітин характерний високий рівень анеуплоїдії і поліплоїдії, що є результатом нестабільності геному.

Клітини пухлини з найбільш поширеним набором хромосом утворюють стовбурову лінію.



РАДІОБІОЛОГІЯ



- **Радіаційний канцерогенез**

Стадія пухлинної прогресії. У ході розвитку пухлини, в силу її генетичної нестабільності, відбувається часта зміна її клітинного складу і зміна стовбурової лінії. Така стратегія зростання має адаптативний характер, так як виживають тільки найбільш пристосовані клітини.

Пухлинні клітини не здатні реагувати на стимули мікрооточення, що призводить до порушення морфологічних характеристик тканин. Формується пухлинний клон (стовбурова лінія), який синтезує власні цитокіни і йде по шляху нарощування темпів поділу, ухилення від імунного контролю організму і забезпечення інтенсивного кровопостачання.

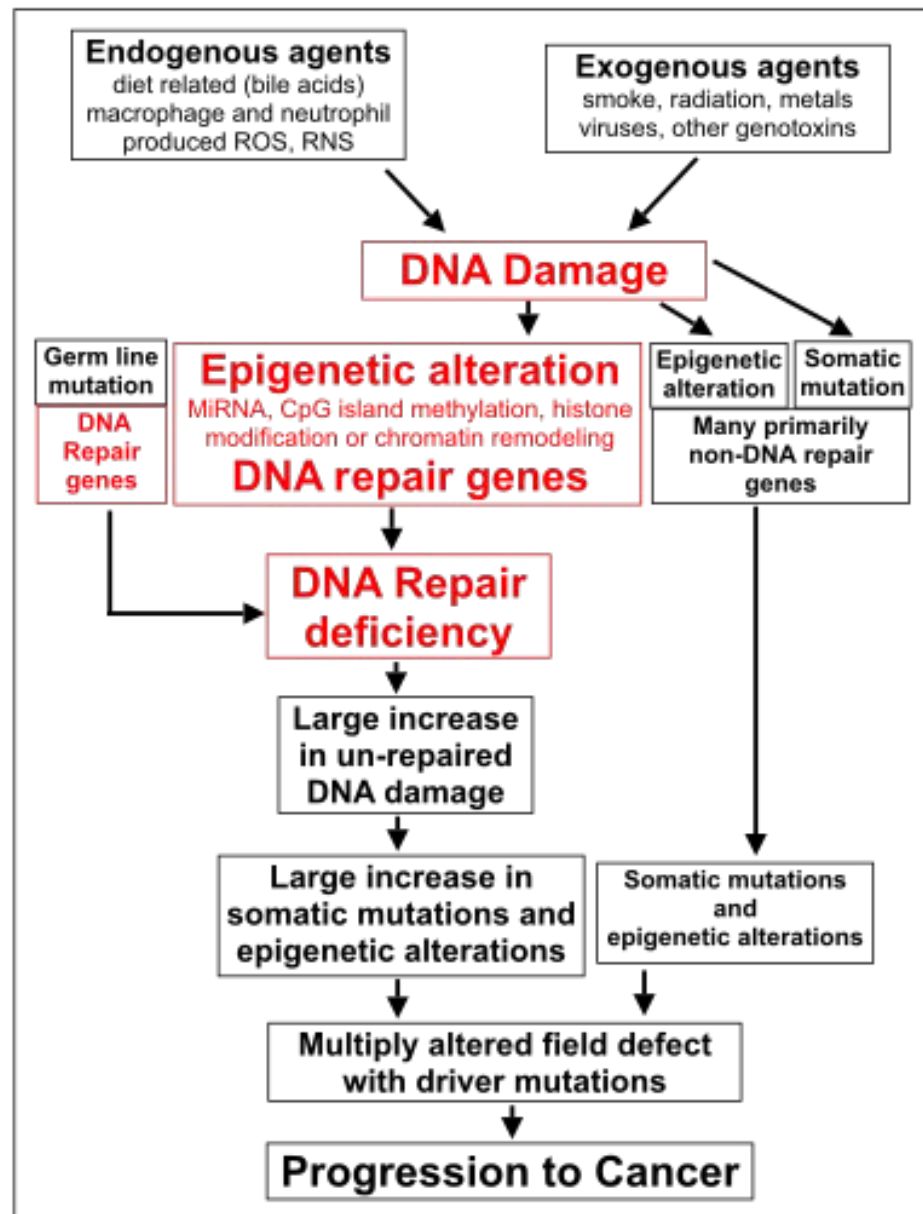
Біологічний сенс пухлинної прогресії полягає в остаточному подоланні перешкод на шляху пухлинної експансії. Пухлинна прогресія відбувається швидко і залежить від появи нової стовбурової лінії пухлинних клітин. Проростаючи в кровеносні і лімфатичні судини пухлинні клітини разносяться по всьому організму, вони осідають в капілярах різних органів і формують вторинні (метастатичні) вогнища пухлинного росту .



РАДІОБІОЛОГІЯ



- **Радіаційний канцерогенез**





РАДІОБІОЛОГІЯ



Кафедра Біофізики

● **Методи досліджень радіаційних ушкоджень біомолекул**

1. Електрофорез ДНК
2. Кометний електрофорез
3. Показники структурної цілісності білків (будь-які фізико-хімічні, біофізичні методи оцінки структурно-функціональних властивостей білків).
4. Показники перекисного окиснення білків.
5. Показники перекисного пошкодження ліпідів (дієнові кон'югаи, гідроперекиси, альдегідні і кетопохідні, Шифови основи та ін.)
6. Стан антиоксидантної системи (концентрація антиоксидантів, активність ферментів антиоксидантної і прооксидантної системи).

A silhouette of a person stands in the center of a dark room. Behind them, numerous bright green laser beams radiate outwards, creating a dramatic, starburst effect. The beams are sharp and vibrant, contrasting sharply with the dark background. The person's silhouette is solid black, and their posture is upright, facing forward.

Дякую за увагу