

Znaczenie promieniowania tła dla komórkowych systemów naprawczych

Prezentacja założeń projektu



Łukasz Wieteska



Pomiary w warunkach mniejszego od naturalnego tła promieniowania jonizującego

Zadanie :

Określenie poziomu uszkodzeń DNA oraz efektywności działania systemów naprawczych w warunkach niskotłowych.

Wyniki:

Badania reakcji komórek na uszkodzenia DNA w warunkach pozbawionych promieniowania jonizującego (np. w podziemnych laboratoriach) mogą dostarczyć dodatkowych informacji o mechanizmach naprawczych , w tym o znaczeniu istnienia promieniowania dla komórki.

Wyniki badań mogą być interesujące dla radio- i chemio terapii nowotworowej, a także w ocenie ryzyka związanego z energetyką jądrową, Składowaniem odpadów radioaktywnych oraz zagrożeń (w tym dla personelu) w medycynie jądrowej.

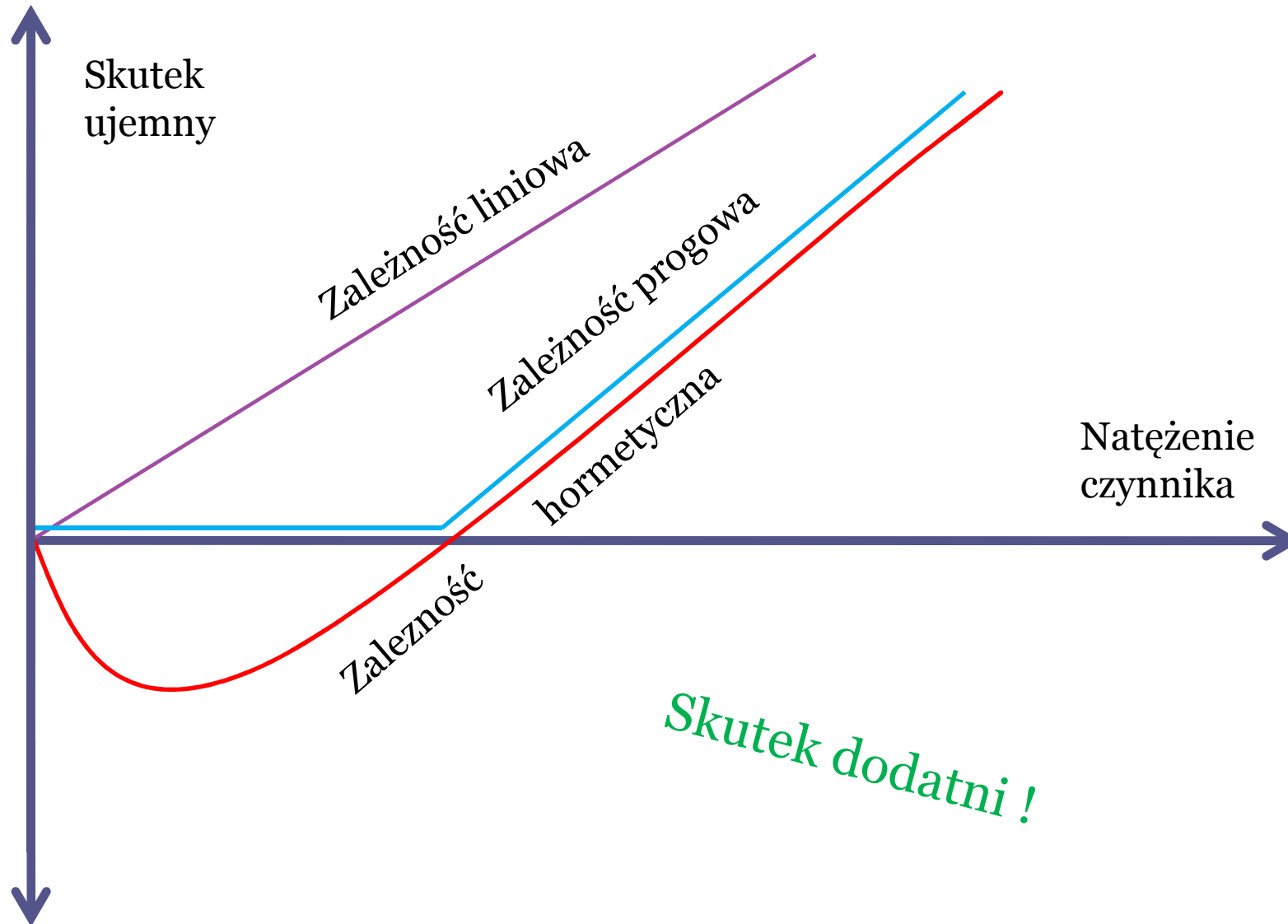
Przy projekcie współpracują:

- Dr Jacek Szabelski - Instytut Problemów Jądrowych w Łodzi
- Prof. Janusz Błasiak – Katedra Genetyki Molekularnej UŁ
- Prof. Janusz Szemraj – Zakład Biochemii Medycznej UM w Łodzi

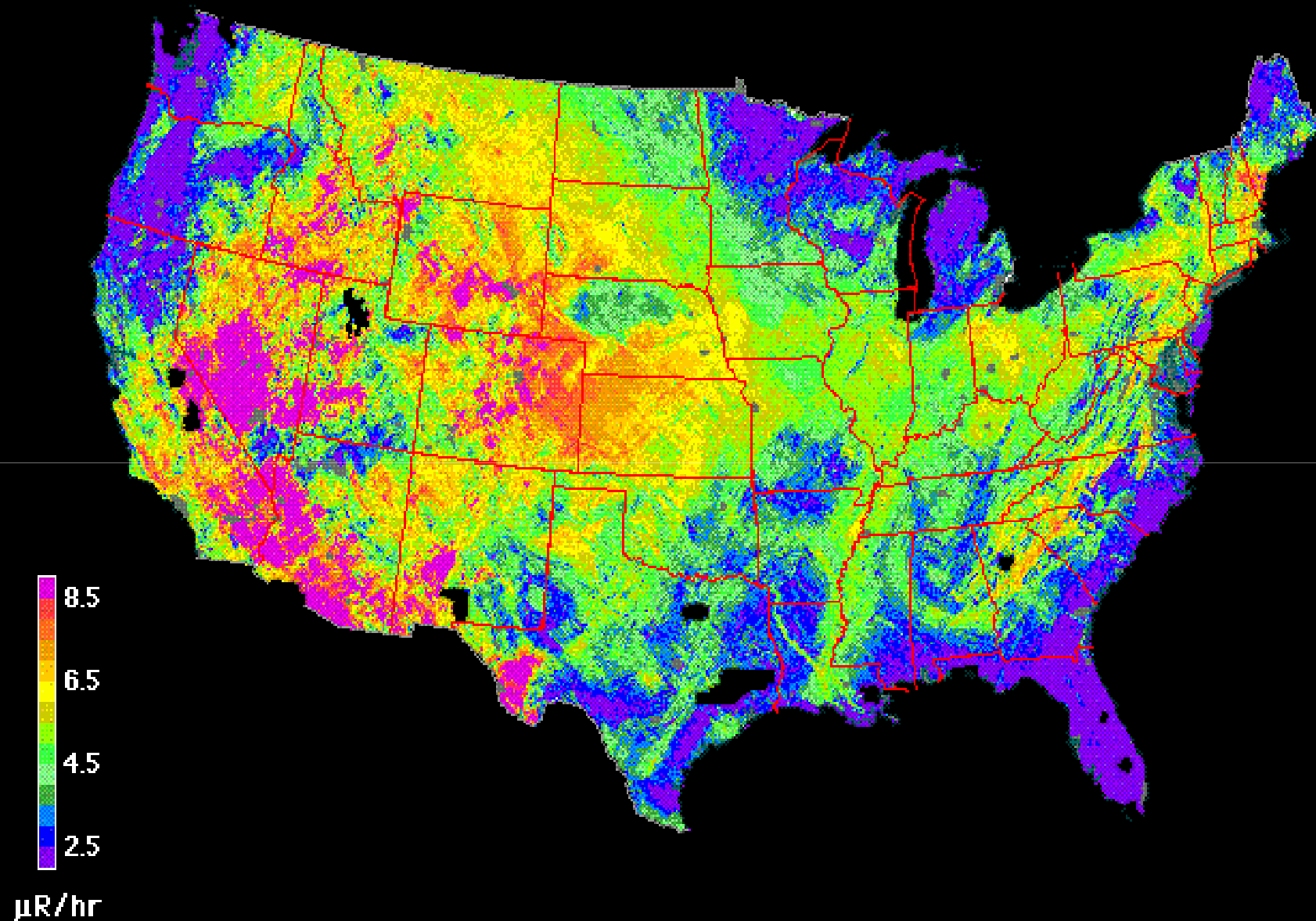
Plan Prezentacji

- Wstęp
 - Hormeza radiacyjna
 - Niejednoznaczność badań
 - Efekty promieniowania na poziomie komórki
 - Komórkowe mechanizmy naprawcze
- Opis projektu
 - Pytania i cele
 - Proponowane pomiary
 - Laboratoria niskotłowe
- Pytania ?

Hormeza

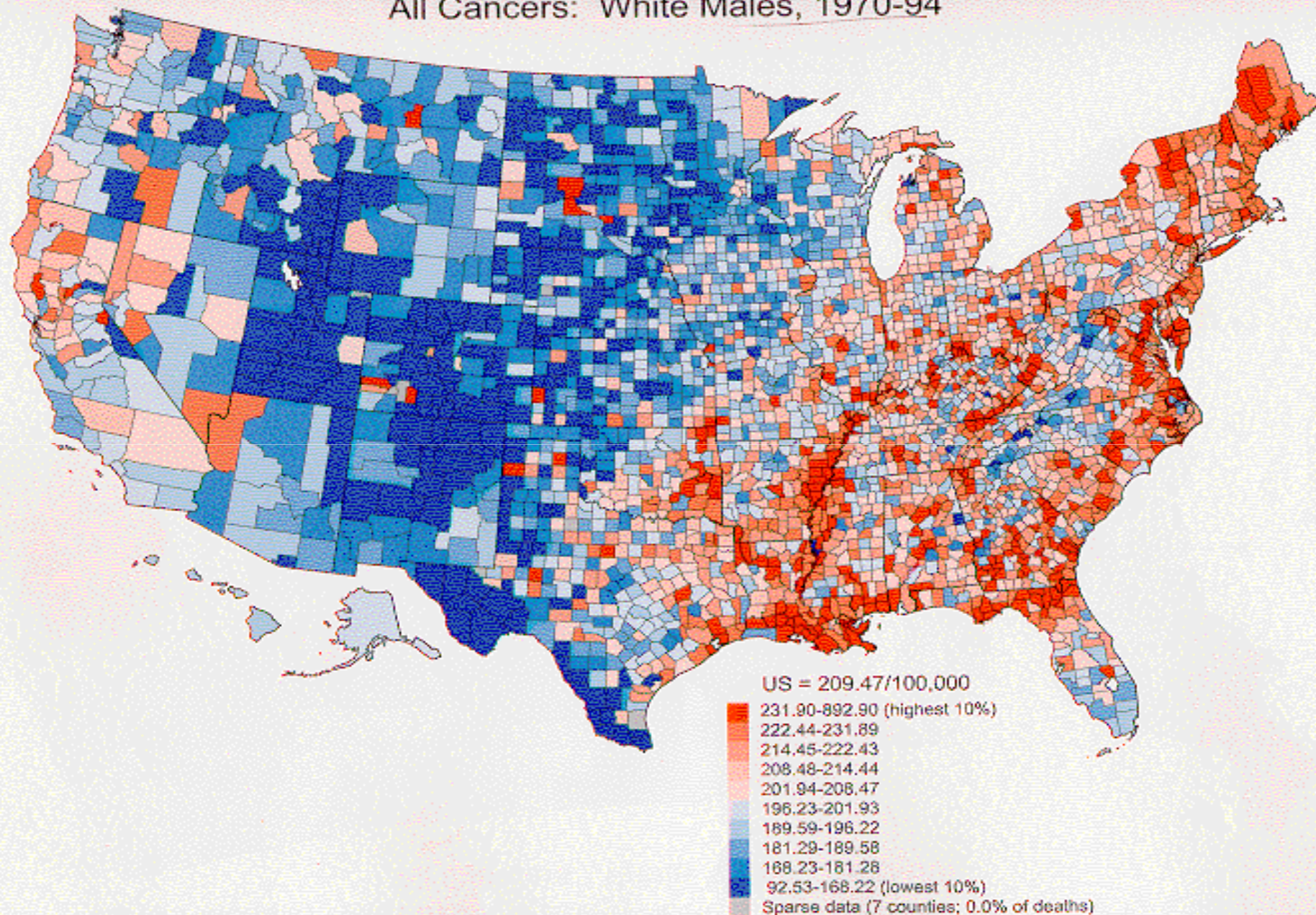


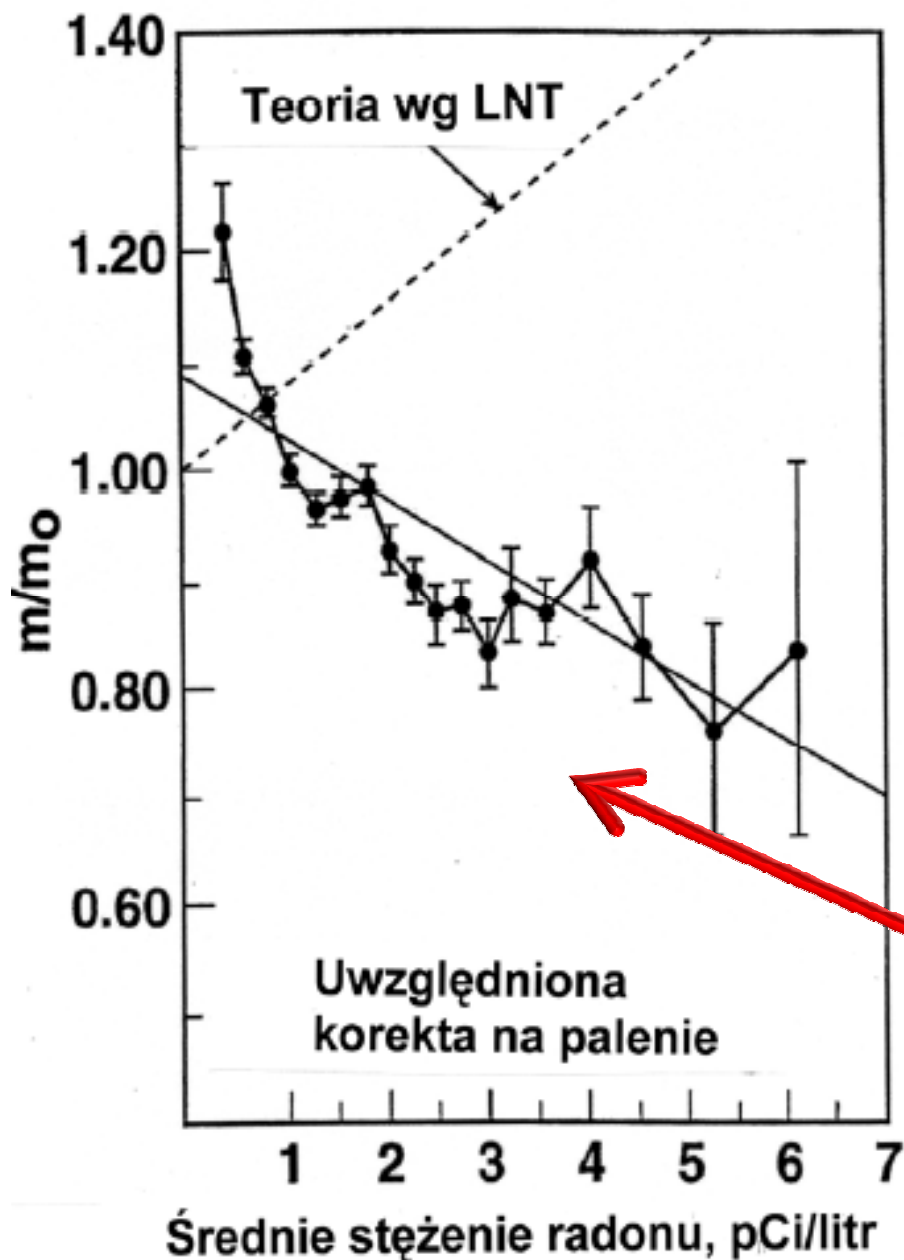
Terrestrial Gamma-Ray Exposure at 1m above ground



Source of data: U.S. Geological Survey Digital Data Series DDS-9, 1993

Cancer Mortality Rates by County (Age-adjusted 1970 US Population)
All Cancers: White Males, 1970-94





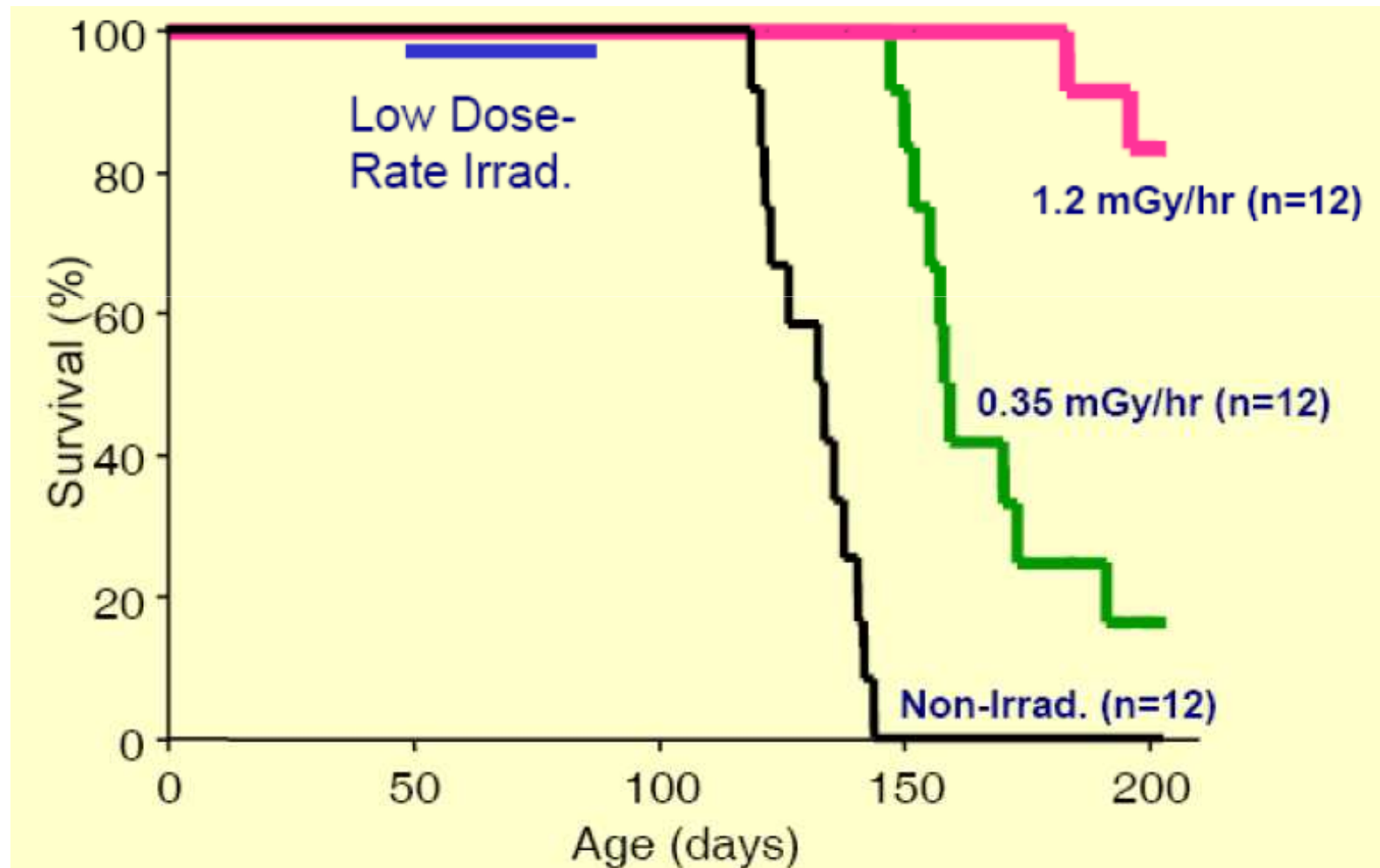
Badania szkodliwości radonu

Stosunek umieralności na raka płuca do stężenia radonu w pomieszczeniach mieszkalnych $n = 272000$ [Cohen 1995]

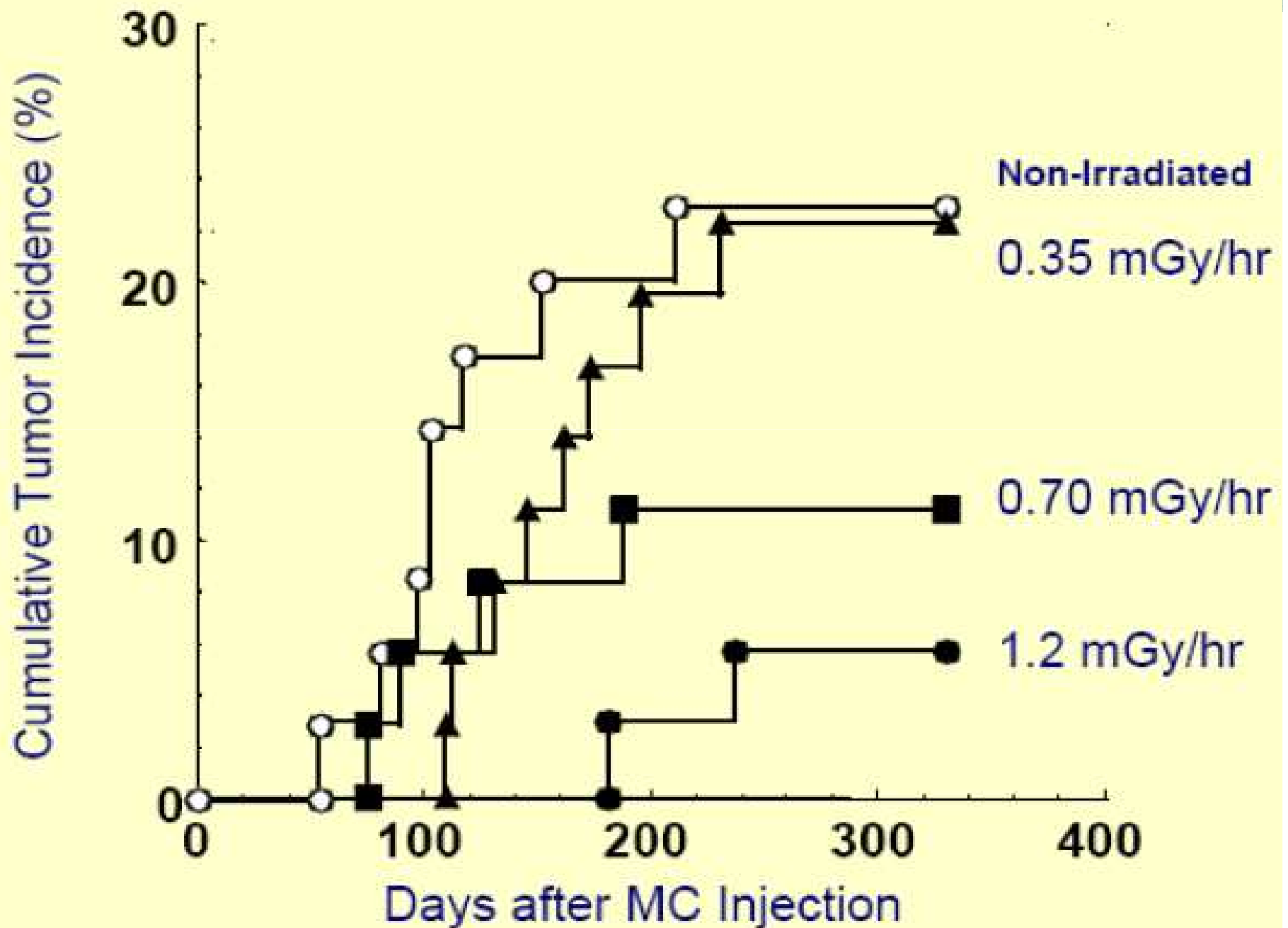
$$1 \text{ pCi/l} = 37 \text{ Bq/m}^3$$

**Im stężenie wyższe,
umieralność niższa !**

Czas życia populacji myszy poddanych napromienieniu w stosunku do grupy kontrolnej



Suppression of MC Induced Skin Tumors by Low Dose Rate Irradiation

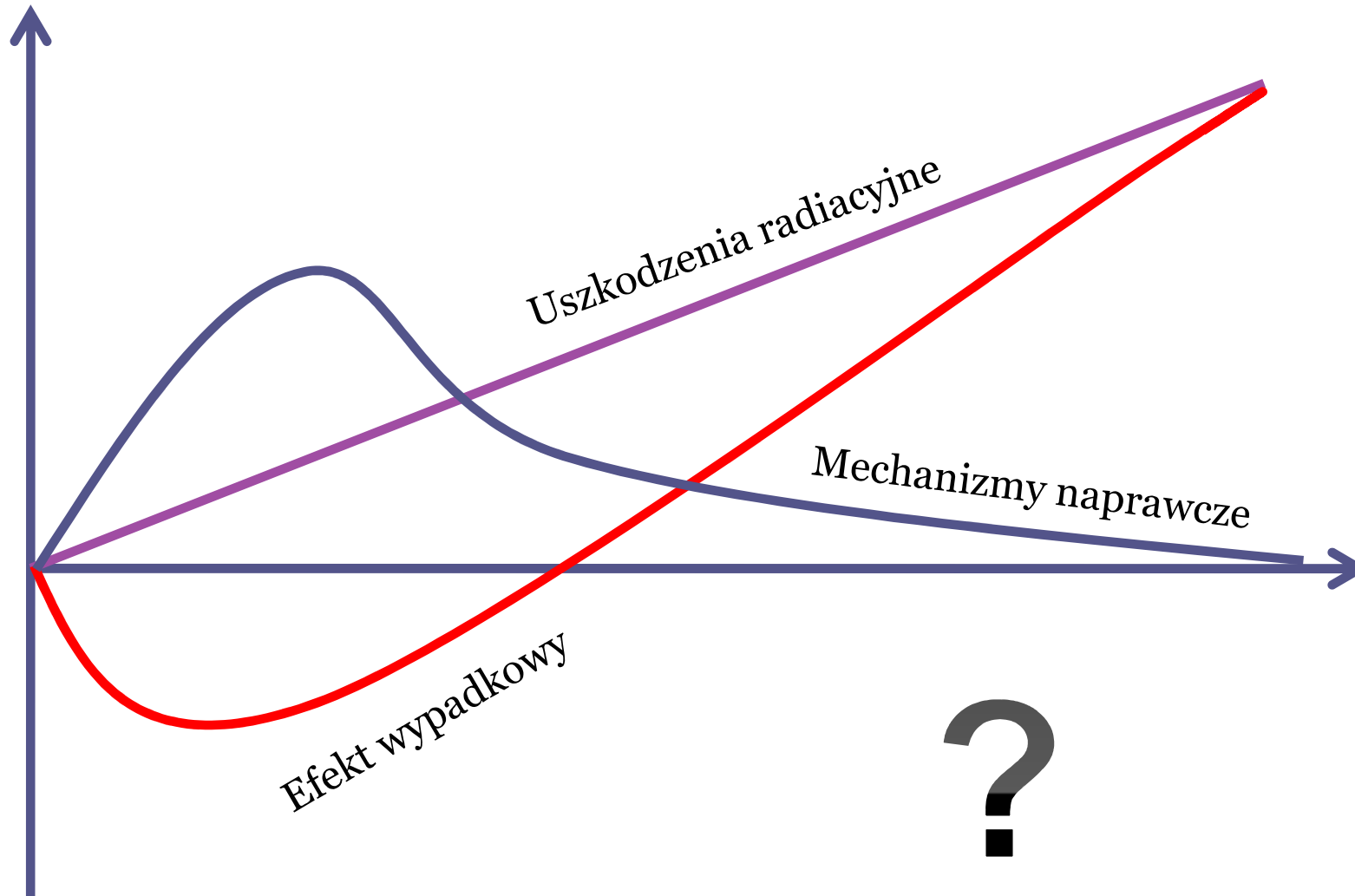




„In Type II diabetic C57BL/KsJdb/db (db) mice, the urine glucose level was improved in some of the mice irradiated at 0.70 mGy/hr, but not in non-irradiated control mice.”
[Kazuo Sakai 2006]

Źródło - ^{137}Cs

Dualny efekt promieniowania



Semicontinuous Low-Dose-Rate Teletherapy for the Treatment of Recurrent Glial Brain Tumors: Final Report of a Phase III Study.

Siker ML, Firat SY, Mueller W, Krouwer H, Schultz CJ.

Department of Radiation Oncology, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI.

Abstract

PURPOSE: Semicontinuous low-dose-rate teletherapy (SLDR) is a novel irradiation strategy that exploits the increased radiosensitivity of glial cells in a narrow range of reduced dose rate. We present the final report of a prospective Phase III study testing the feasibility of SLDR for the treatment of recurrent gliomas.

METHODS AND MATERIALS: Patients with previously irradiated recurrent gliomas were enrolled from November 1993 to March 1998. Patients received SLDR, delivered 6 to 8 hours/day at a dose rate of 40 to 50 cGy/hour for a total dose of 30 to 35 Gy given over 12 days using a modified cobalt-60 treatment unit. Acute central nervous system toxicity after SLDR treatment was the primary endpoint. Overall survival was a secondary endpoint.

RESULTS: Twenty patients were enrolled (14 World Health Organization Grade 4 glioma, 5 Grade 2 glioma, 1 ependymoma). No patients developed \geq Grade 3 central nervous system toxicity at 3 months without radiographic evidence of tumor progression. Overall survival after SLDR was 56% at 6 months, 28% at 12 months, and 17% at 24 months. One patient survived $>$ 48 months, and 1 patient survived $>$ 60 months after SLDR treatment. Re-resection before SLDR treatment significantly improved 1-year overall survival for all patients and patients with Grade 4 glioma.

CONCLUSION: The delivery of SLDR is feasible in patients with recurrent gliomas and resulted in improved outcomes for patients who underwent re-resection. There were 2 long-term survivors ($>$ 48 months). This pilot study supports the notion that reduced dose rate influences the efficacy and tolerance of reirradiation in the treatment of recurrent gliomas.

Copyright © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

dsteve65@aol.com

Abstract

Change comes as a surprise because things do not happen in a straight line. Concealed changes, sometimes for political or social expedience. It has long been recognized that the availability of exploratory tools. There are consequences to risk averse, multiphase dose-responses has the potential to unleash additional and productive in an excellent example of what can be achieved when dogmas are challenged by the accumulation of evidence.

Australas Phys Eng Sci Med. 2009 Dec;32(4):180-7.

A brief review of radiation hormesis.

Jolly D, Meyer J.

Wellington Blood & Cancer Centre, Wellington Hospital, Private Bag 7902, Wellington

Abstract

This paper reviews physical, experimental and epidemiological evidence for radiation hormesis. The scientific community is still divided on the premise of radiation hormesis. The International Commission on Radiological Protection (ICRP) recommends the use of the Linear No Threshold (LNT) model. The LNT model has much less scientific evidence. Much experimentation has suggested that radiation is beneficial to the irradiated cell and organism. There is definite evidence is yet to change official policies on this matter. Application of the LNT model is important that the matter be resolved.

EFFECTIVE AND IMPLICATIONS

Mathematical Modeling of Aging

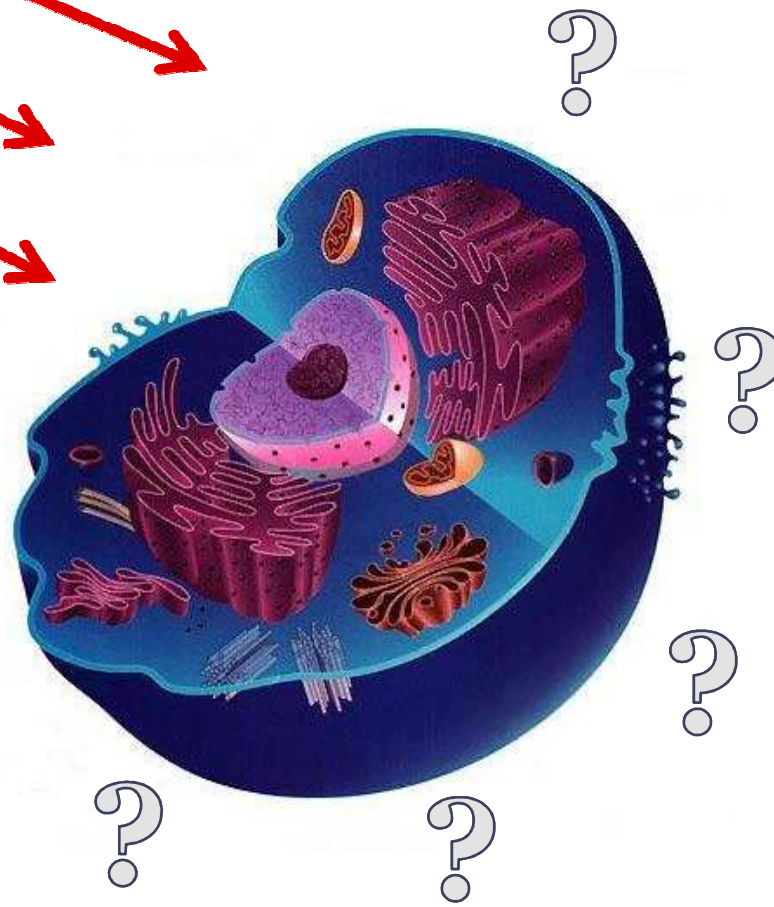
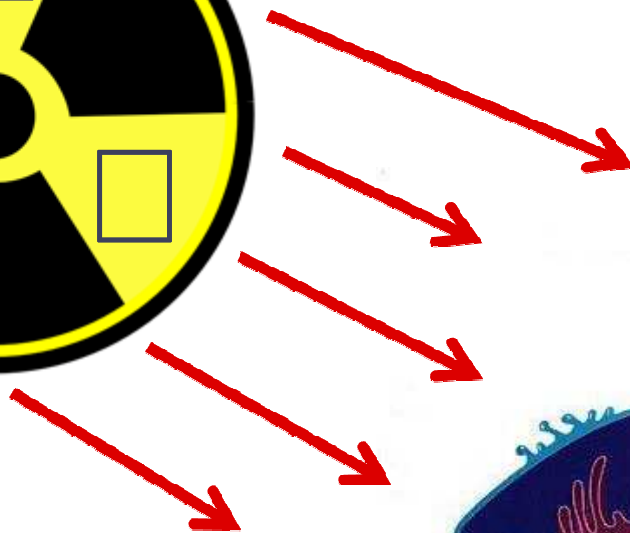
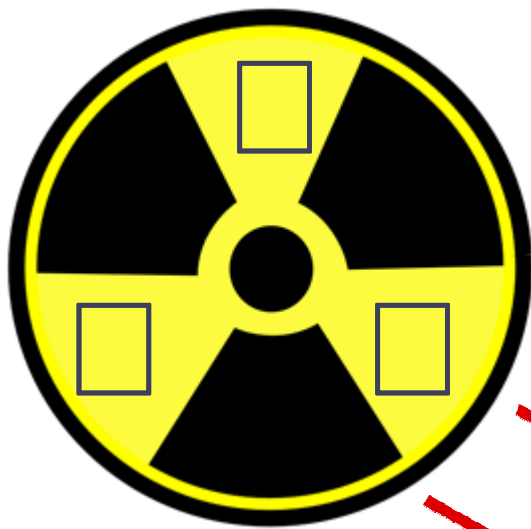
Mathematical models of radiation carcinogenesis under which cancer risk is proportional to the dose rate (LNT model) even a very low dose rate is implemented (DREF). This imposes a response curve for

THE EMERGING LOW-DOSE THERAPY FOR ADVANCED CANCERS

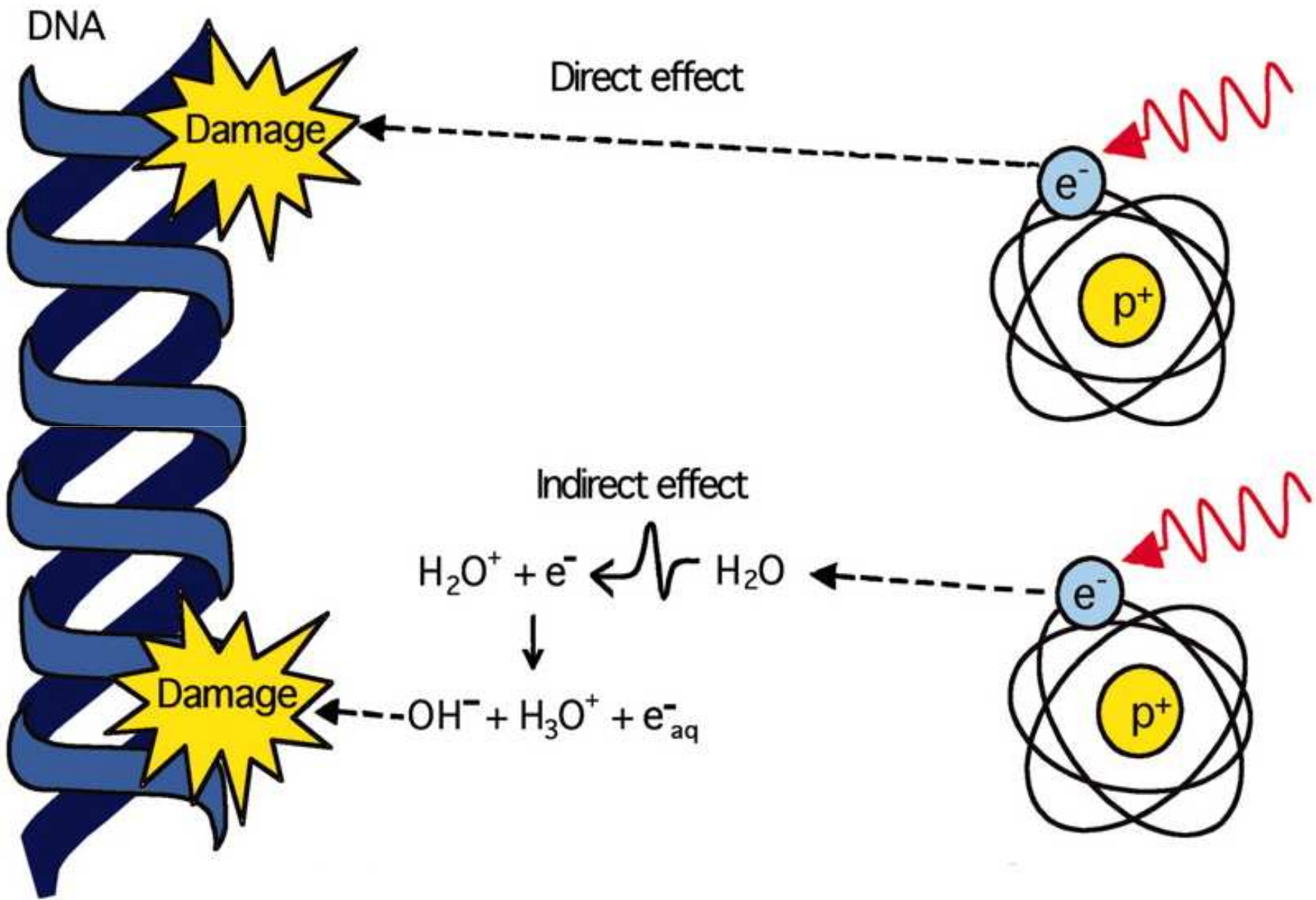
Jahangir Satti □ Department of Radiation Oncology, Albany Medical Center, Albany, NY

□ Generally minute doses of drugs have been prescribed in biotherapies, homeopathy, immunization and vaccinations for centuries. Now the use of low doses of drugs is on the rise to combat serious diseases such as advanced cancers around the world. This new therapeutic approach to address solid tumors and other advanced diseases is a departure from the conventional use of maximum dose protocol. A small dose of the prescribed drug is frequently administered in a continuous fashion, at regular intervals, either as a standard treatment or as a maintenance therapy for a long time. However, this new treatment method lacks any standard for drug quantization, dose fractionation, repetition frequency and duration of a treatment course for an individual patient. This paper reviews literature about metronomic therapy and discusses hormesis: both phenomena occur in low dose ranges. Better mathematical models, computer simulations, process optimization and clinical trials are warranted to fully exploit the potential of low dose metronomic therapy to cure chronic and complicated diseases. New protocols to standardize metronomic dosimetry will answer the age old questions related to hormesis and homeopathy. It appears that this new low-dose metronomic therapy will have far reaching effects in curing chronic diseases throughout the world.

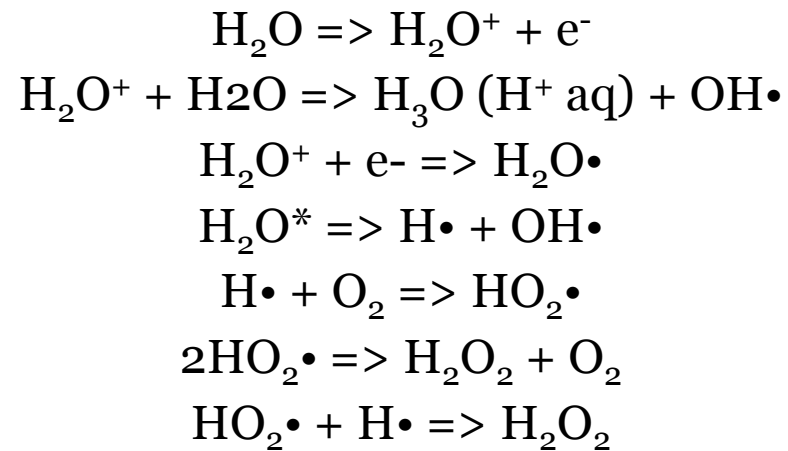
Keywords: metronomic, homeopathy, apoptosis, hormesis, low-dose



Komórkowe efekty promieniowania



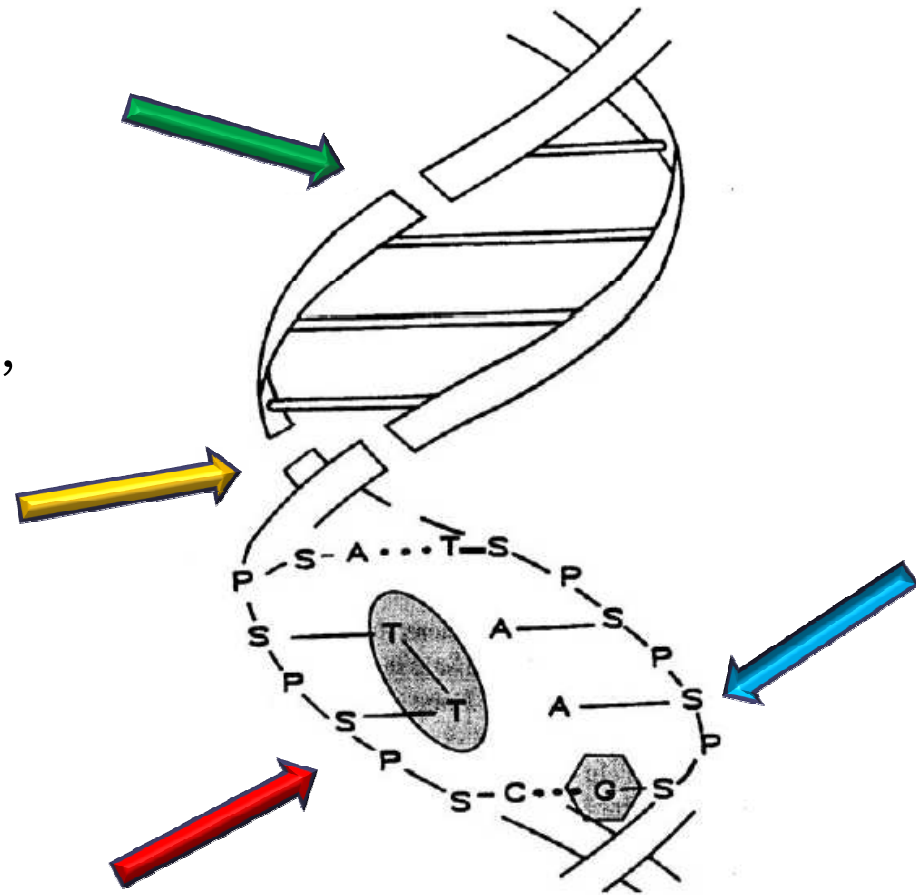
Podstawowym mechanizmem tworzących się w komórce uszkodzeń jest powstanie pod wpływem promieniowania jonizującego wolnych rodników



Każdego dnia w komórce następuje ok. $10^4 - 10^6$ Uszkodzeń spowodowanych naturalnym metabolizmem

Uszkodzenia DNA polegają na:

- ❑ Zerwaniu (pęknięciu) pojedynczej nici DNA
- ❑ Zerwaniu (pęknięciu) podwójnej nici DNA,
- ❑ Uszkodzeniu zasad azotowych,
- ❑ Powstaniu krzyżowych połączeń białek jądrowych z DNA w obrębie jednej lub dwóch nici.



Systemy naprawy DNA

- Naprawa bezpośrednia (DR)
- Naprawa przez wycinanie (ER)
- Naprawa przez wycinanie zasad (BER)
- Naprawa przez wycinanie nukleotydów (NER)
- Naprawa błędnie sparowanych nukleotydów (MMR)
- Naprawa pęknięć dwuniciowych (DSBR)
- system łączenia końców niehomologicznych (NHEJ)

The nonhomologous end-joining repair process

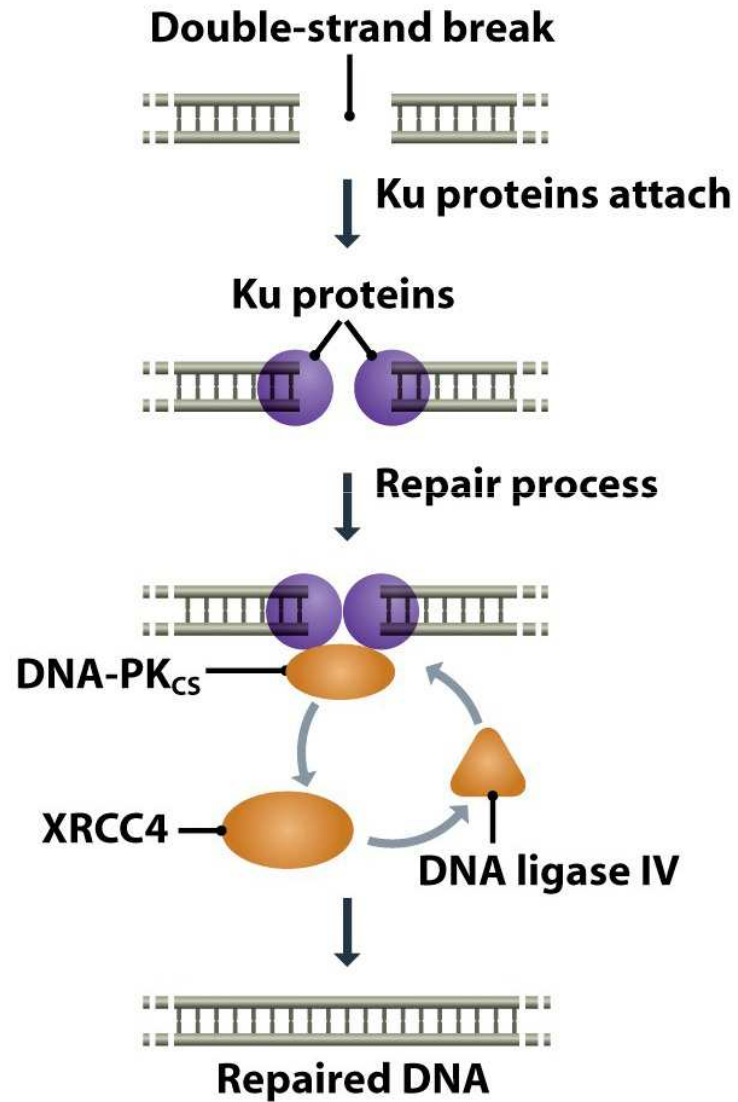


Figure 16-28a Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Naprawa pęknięć DNA

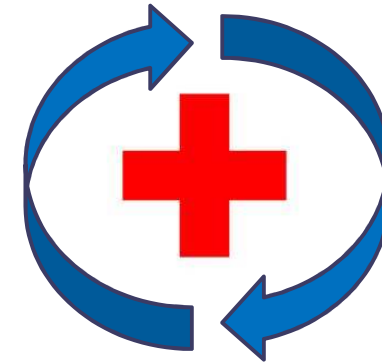
- Pęknięcia w jednej nici są łatwe do naprawienia:
 - polimeraza + ligaza. Białka PARP chronią jednoniciowe fragmenty przed dalszą degradacją
- Pęknięcia dwuniciowe są trudniejsze do naprawienia
 - Powstają np. w wyniku działania promieniowania jonizującego (udział procentowy tych pęknięć jest zdecydowanie większy niż przy udziale innych czynników)
 - Blokują replikację, nienaprawione mogą doprowadzić do utraty dużych fragmentów chromosomu podczas podziału



Podwójne pęknięcie
DNA



Wstrzymanie cyklu
komórkowego



Naprawa



Apoptoza



Naprawa udana, cykl
komórkowy wznowiony

A gdyby udało się w znacznym stopniu
usunąć promieniowanie tła ?



Składniki promieniowania

1. Radon i pochodne (występują rozpady alfa), pochodzi z Ziemi
2. Potas (izotop ^{40}K):
 - zawarty w komórce (bardzo, bardzo trudny do wyeliminowania)
 - głównie rozpad beta
 - zewnętrzny (ściany, meble, szkło)
 - głównie gamma 1461 keV – można wyeliminować
3. Promieniowanie kosmiczne: miony
(podobne do elektronów, przenikliwe, jonizujące)
4. Neutrony – dawki naturalne nie są duże

Pytania wciąż aktualne

- Skoro uszkodzenia DNA spowodowane promieniowaniem to ułamek wszystkich uszkodzeń, czy w takim razie komórki „czują” tło ?
- Czy promieniowanie tła jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórek ?
- Jaki jest mechanizm „odczuwania” promieniowania tła ?
- Czy znajdujemy się obecnie pod wpływem hormezy radiacyjnej ? Gdzie jest optimum ?

Proponowane badania:

- Określenie poziomu uszkodzeń DNA oraz efektywności działania systemów naprawczych w warunkach niskotłowych.
- Określenie poziomu adaptacji komórek do warunków niskotłowych
- Ocena wrażliwości komórek na czynniki uszkadzające w warunkach niskotłowych

Narzędzie podstawowe - niskotłowe laboratorium



Gran Sasso National
Laboratory - Włochy



Instytut Problemów
Jądrowych - Łódź



Sunlab (KGHM) –
Polska (planowane)

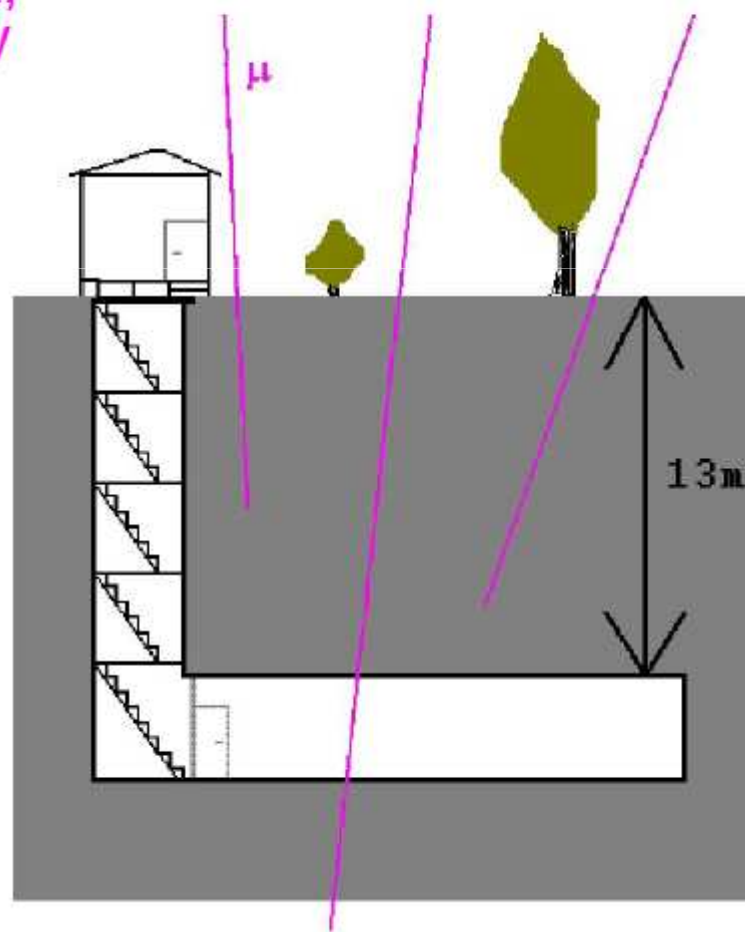
Instytut Problemów Jądrowych – Łódź, podziemne laboratorium (60 m²)

Natężenie mionów promieniowania kosmicznego
jest 10 razy mniejsze niż na powierzchni,
strumień neutronów jest 8 razy mniejszy

Radon:
nawiew powietrza i wyciąg powietrza

Osłony z ołowiu tłumiące zewnętrzne
prom. gamma z potasu-40

elektryczność, internet,
zaplecze mechaniczne i elektroniczne

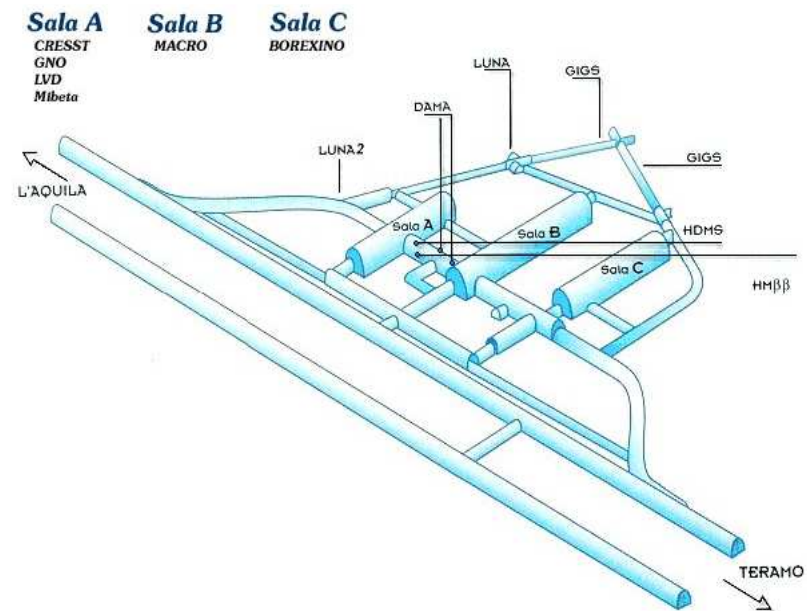


Podziemne laboratorium w Gran Sasso



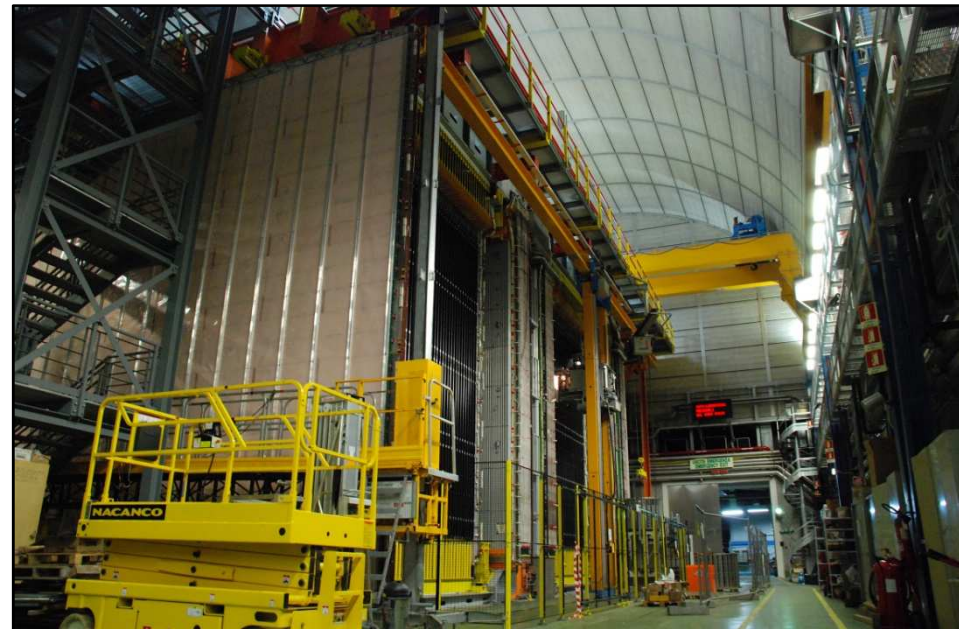
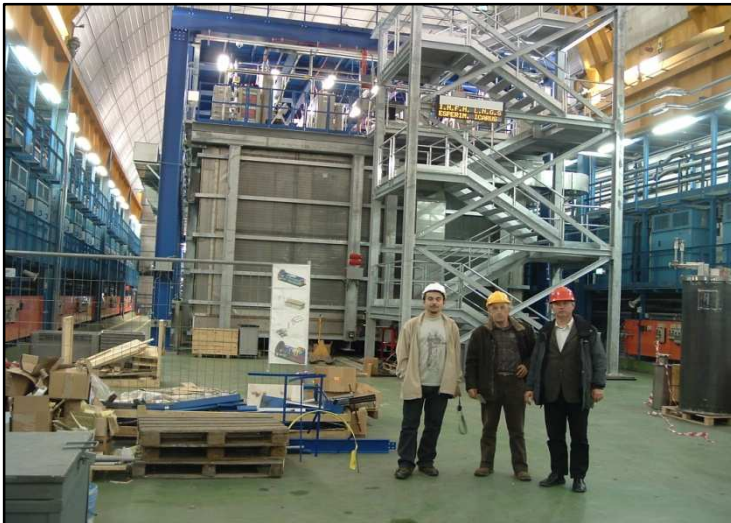
Położenie

- prowincja l'Aquila
- 120 km od Rzymu
- w połowie 10 km tunelu
pod górami Gran Sasso
1400 m warstwa skały



Laboratory Nazionale

G

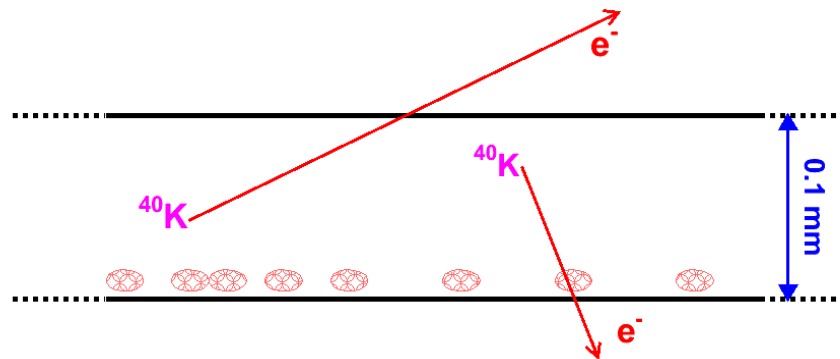


**Sierszowice – Polkowice
KGHM
1 km pod ziemią
zwiedzanie miejsca
dla laboratorium SUNLAB
(planowane laboratorium)**



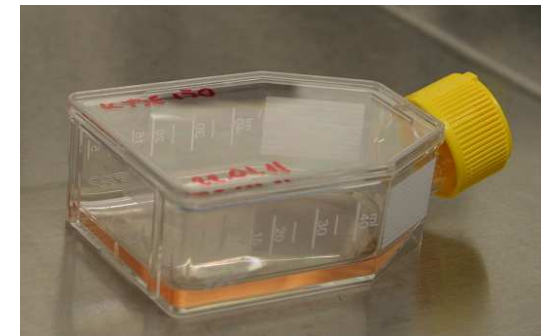
Co zyskujemy w laboratorium podziemnym ?

Lokalizacja	Strumień mionów 1m ²	Liczba jonizacji w 1g hodowli
Powierzchnia ziemi	180/sekundę	40000 jonizacji/sekundę
Laboratorium w Łodzi	20/sekundę	4000 jonizacji/sekundę
Laboratorium w Gran Sasso	15/dobę	3300 jonizacji/ dobę



Jonizacje spowodowane endogennym potasem = 500/sekundę

Pracowania komórkowa



Szczegółowe pomiary

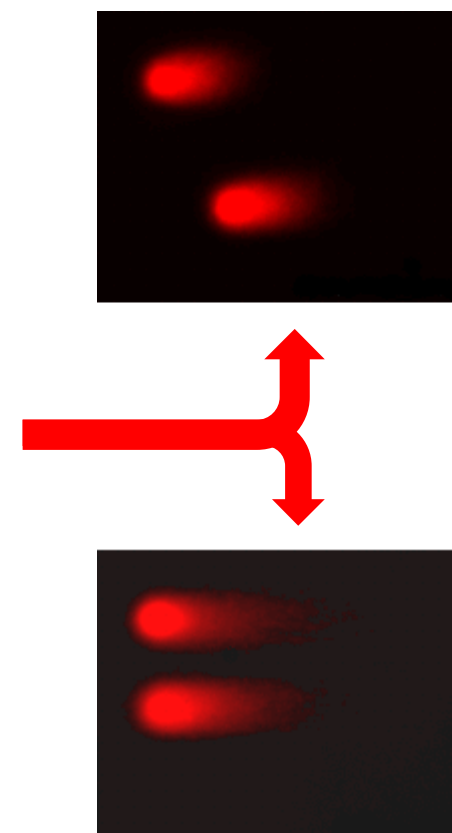
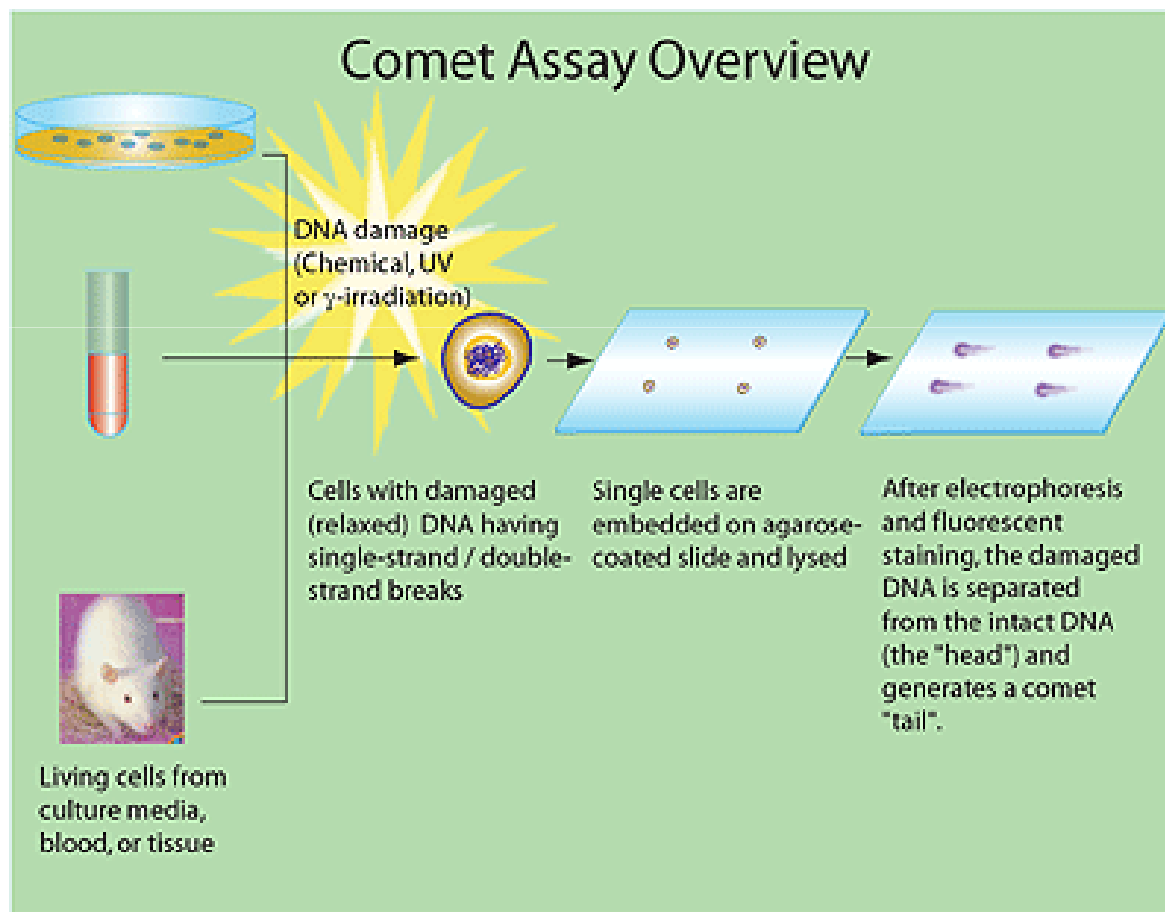
- określenie poziomu endogennych uszkodzeń DNA, z wyszczególnieniem na pęknięcia jedno – dwuniciowe oraz miejsca alkalicznie labilne (technika *comet assay*)
- określenie poziomu pęknięć dwuniciowych techniką elektroforezy w polu zmiennym
- określenie poziomu endogennych oksydacyjnych uszkodzeń DNA (technika *comet assay* z enzymami naprawczymi Endo III (Nth I) i Fpg)
- określenie, tak jak powyżej, poziomu uszkodzeń DNA indukowanych nadtlenkiem wodoru i promieniowaniem jonizującym, kinetyki naprawy tych uszkodzeń
- określenie ekspresji genów biorących udział w naprawie pęknięć dwuniciowych: *RAD51*, *BRCA1/2*, *Ku70/80*, *DNA-PK_{CS}*, *Artemis*, *Cernunnos*, *RAD50*, *RAD52* oraz naprawie innych uszkodzeń: *XPD*, *ERCC1*, *hOGG1*, *hMMLH1*, *hMSH2*, *hRAD23* oraz genów regulujących cykl komórkowy i apoptozę: *p53*, *Bcl-2*.
- Określenie ekspresji genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego *p53*, *BRCA-1* ...



Dziękuję za uwagę

- js@zpk.u.lodz.pl
- l.wieteska@yahoo.com

Comet assay

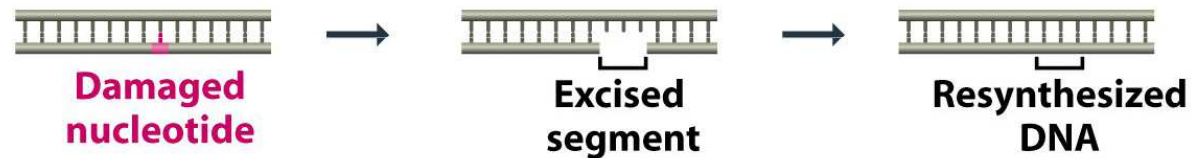


Systemy naprawy DNA

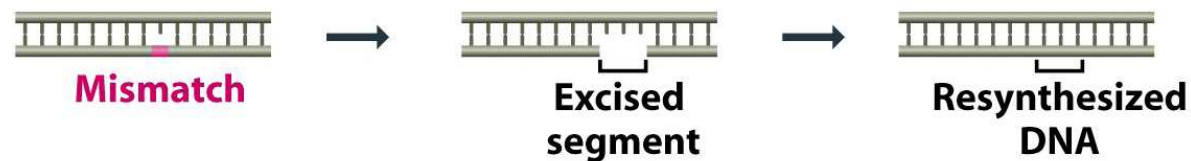
(A) Direct repair



(B) Excision repair



(C) Mismatch repair



(D) Nonhomologous end-joining

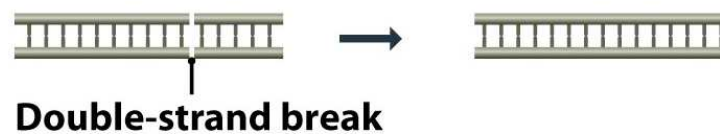
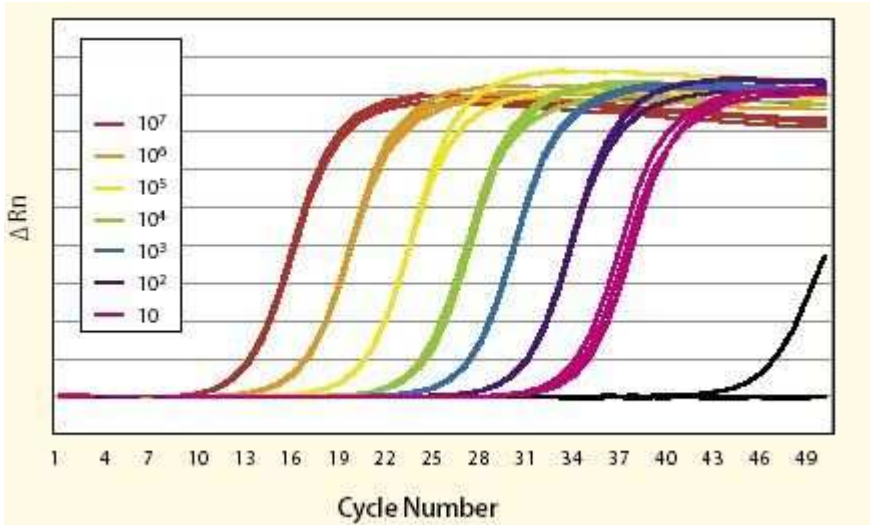
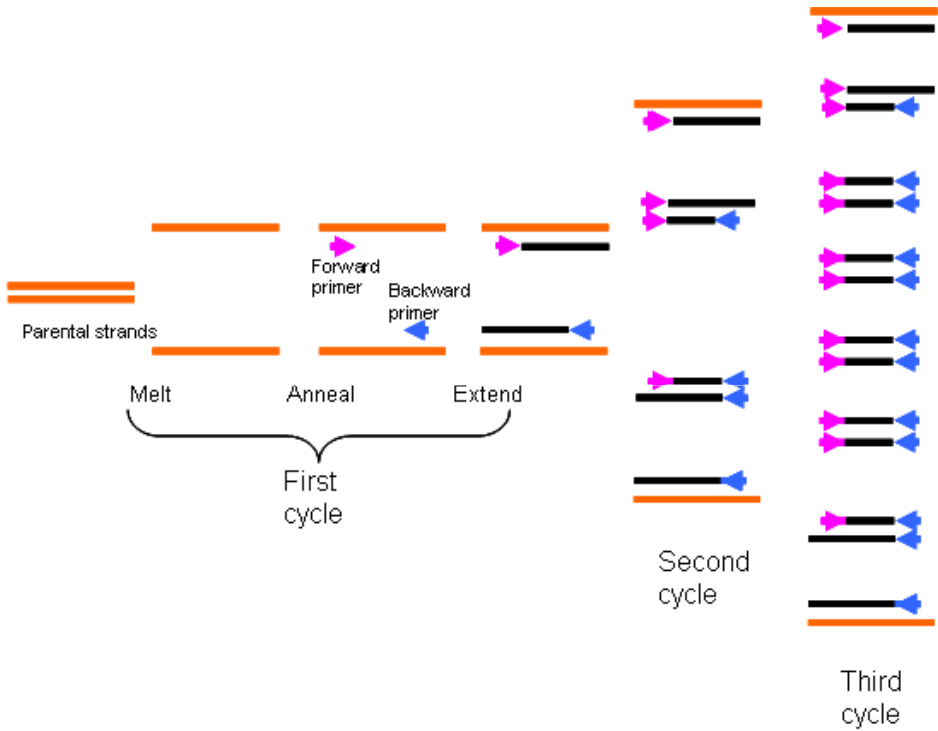


Figure 16-20 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Real-time PCR



System SOS u bakterii

- Przy rozległych uszkodzeniach matrycy (miejsca AP, fotoprodukty, uszkodzone zasady)
- Białko RecA pokrywa matrycę
- Polimeraza V z RecA tworzy **mutasom**
- Replikacja zachodzi, ale generuje wiele błędów

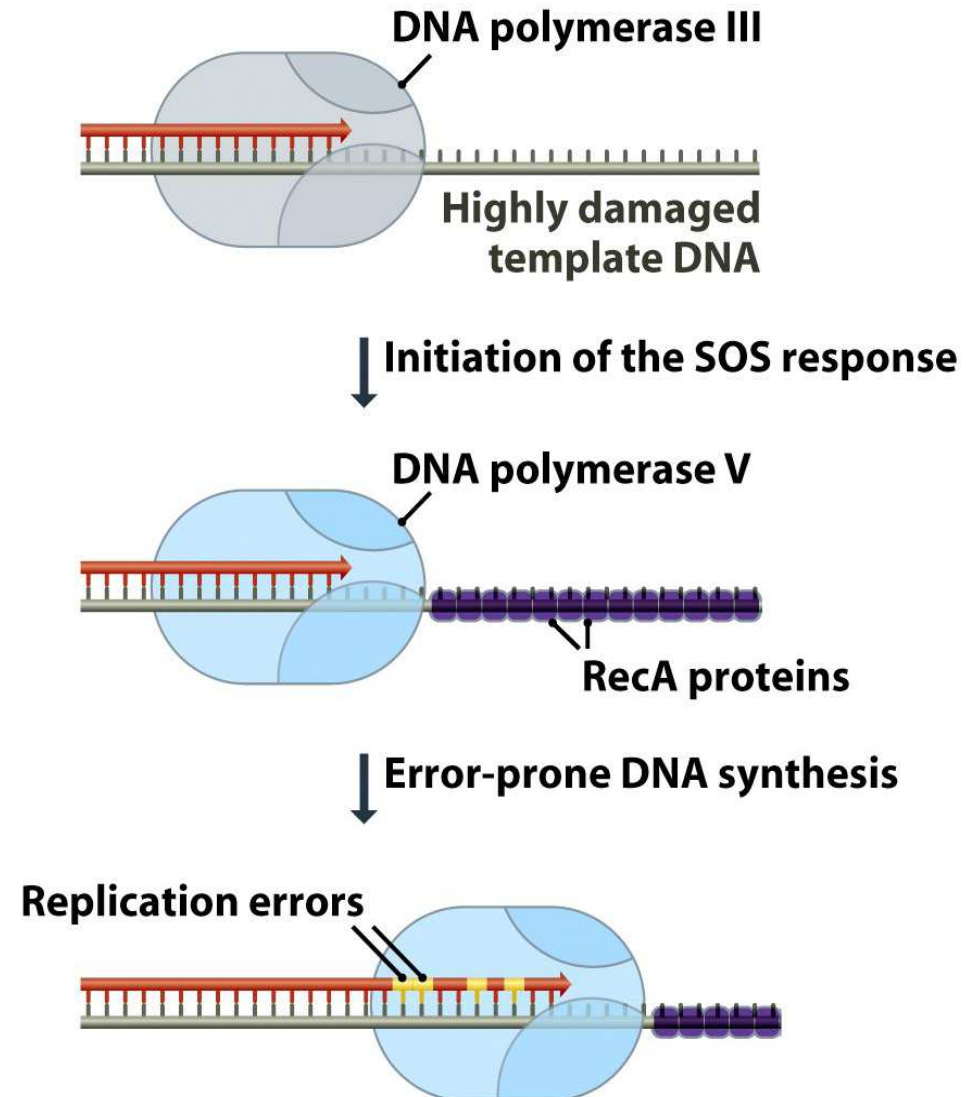


Figure 16-29 Genomes 3 (© Garland Science 2007)

Duże niskotłowe podziemne laboratoria w Europie

LNGS – Gran Sasso (Włochy), 1.5 km, tunel

Bulby (Anglia) – 1.1 km, kopalnia

Slanic (Rumunia) – 200m

Canfranc (Hiszpania) - 850m, tunel

Frejus (Francja) – 3 km, tunel

Baksan (Rosja- 40 km od Elbrusa) – 200m – 3.8km, tunel

Pyhasalmi (Finlandia) – planowane, 1.4 km, kopalnia

Sunlab (Polska – KGHM) – planowane, 1km, kopalnia

**LAGUNA Collab.
pomiaru neutron**



SITE STUDY

Candidate Sites

- Boulby, UK
- Canfranc, Spain
- Fréjus, France
- Pyhäsalmi, Finland
- SUNLAB, Poland
- Slanic, Romania
- Umbria, Italy

LAGUNA Collaboration

100 scientists
more than 20 institutes
10 European countries

potas-40

K-39 i K-41 są trwałe

potas $Z = 19$

K-40: średni czas życia = $1.2 \cdot 10^9$ lat
w 1 mg potasu (w tym 0.012% ^{40}K) mamy ok. 3 rozpady ^{40}K / minutę

Średni skład izotopowy potasu:

- K-39 93.26%
- K-40 0.012%
- K-41 6.73%

K-40 rozpada się na stabilne jądra wapnia Ca ($Z=20$, $A=40$) lub na stabilne jądra argonu Ar ($Z=18$, $A=40$):

● 88.8% rozpad na ^{40}Ca : rozpad beta – emisja elektronu i antyneutrino

● 11.2% rozpad na ^{40}Ar :

◆ ok. 11% wychwyt elektronu i emitowany jest (łatwo mierzalny)

foton gamma $E_{\text{gamma}} = 1.46 \text{ MeV}$

◆ Rzadko: rozpad beta+ - emisja pozytonu i neutrino

w 1 kg ciała mamy ok. 2 g potasu i ok. 70 rozpadów ^{40}K /sek
albo ok. 5000 Bq dla człowieka, 1 rozpad daje 0.5 MeV i stad
0.18 mikroGy/rok (= 0.18 mikroSv/rok z wewnętrznego potasu)

Przykład dla komórek:

stężenie potasu wewnątrz komórki: ok. 140 mM = 140 milimola/litr,

w 1 g komórek mamy 5.5 miligramy potasu

i mamy 15 rozpadów ^{40}K na minutę

Promieniowanie kosmiczne

Miony – cząstki wtórnego promieniowania kosmicznego,
podobne do elektronów, ale ok. 200 razy cięższe,
jonizujące i przenikliwe

Strumień mionów na powierzchni: ok. 180 / (m² s)

Płaska pozioma próbka materii o masie 1 g, gęstości 1g/cm³ (jak woda)
o grubości 100 mikronów ma powierzchnię 100 cm² (horyzontalnie)

Strumień mionów przez poziomą powierzchnię 100 cm²:

1.8 / s na powierzchni ziemi

0.2 / s w podziemnym laboratorium w Łodzi

0.15 / dobę w podziemnym laboratorium w Gran Sasso (Włochy)

Jonizacja

Cząstka (elektron, pozyton, mion) traci ok. 2 MeV na 1 cm wody na jonizację

Masa próbki 1 g (3000 komórek i płyn),

W 3000 komórek jest ok. $1.4 \cdot 10^{-6}$ g potasu, w płynie $1.6 \cdot 10^{-4}$ g potasu

Pozioma próbka o grubości 100 mikronów = 0.1 mm

Rozpad 40K:

- energia elektronu w rozpadzie beta (88% rozpadów) wynosi maksymalnie 1.31 MeV, a średnio ok. 0.5 MeV
- średnia droga w próbce 0.37 mm
- strata na jonizację w próbce dla jednego rozpadu beta: 74 keV
tj. ok 70 tys jonizacji.
- dla 1 g próbki mamy ok. 30 tys jonizacji / minutę (średnio ok. 500 jonizacji/sek)

Promieniowanie kosmiczne:

- średnia droga w próbce: 0.11 mm
- strata na jonizację w próbce dla 1 miona: 22 keV
tj. ok. 22 tys jonizacji
- ◆ na powierzchni ziemi mamy ok. 40 tys jonizacji / sek
- ◆ w podziemnym lab. w Łodzi ok. 4 tys jonizacji / sek
- ◆ w Gran Sasso 3400 jonizacji / dobę

