

BIODOZIMETRIE II: PŘEHLED SOUČASNÝCH METOD A PERSPEKTIVA BODOZIMETRIE

Mgr. Zdeňka VILASOVÁ, mjr. doc. MUDr. Jan ÖSTERREICHER, Ph.D, prof. RNDr. Jiřina VÁVROVÁ, CSc.
Univerzita obrany, katedra radiobiologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové

Souhrn

Práce pojednává o nejdůležitějších dostupných biodozimetrických metodách používaných v klinické a experimentální praxi. Dále autoři informují o dalších možných biodozimetrických přístupech založených na výsledcích recentních výzkumných prací, které mohou být zaváděny ve střednědobém časovém horizontu.

Klíčová slova: Biodozimetrie; Metody; Perspektiva.

Biodosimetry Part II: Summary of Current Methods and Perspective of Biodosimetry

Summary

The work analyzes biodosimetric methods used in experimental and clinical practice. Furthermore, authors inform about possible biodosimetric markers based on results of recent research, which could be developed within middle-term time.

Key words: Biodosimetry; Methods; Perspective.

Přehled v současnosti používaných biodozimetrických metod

Metody biologické dozimetrie jsou mnoha případech, zejména pak u zevně ozářených při radiačních nehodách a haváriích jediným použitelným kritériem, pomocí kterého lze odhadnout absorbovanou eventuálně efektivní dávku pacienta.

Podle doporučení International Atomic Energy Agency (IAEA) – v češtině označované jako Mezinárodní agentura pro atomovou energii – se sídlem ve Vídni patří ke tzv. zlatému standardu biodozimetrie metoda hodnocení chromozomálních aberací. Podstatou této takřka půl století známé metody je odebrání lymfocytů z periferní krve ozářených pacientů, navození mitózy těchto buněk fytohemaglutininem *in vitro* a následná blokáda mitózy lymfocytů v metafázi kolchicinem. Takto ošetřené lymfocyty jsou obarveny klasickým chromatinovým barvením podle Giemsy a je stanovován počet dicentrických a prsténkových chromozomálních aberací (12). Ačkoli je metoda stanovení chromozomálních aberací z ozářených lymfocytů považována za jednu z nejspolehlivějších, má svá významná omezení. Jednou z limitací je nutnost dané laboratoře připravit kalibrační křivku z *ex vivo* ozářených lymfocytů. Dalším omezením jsou biologická variabilita, kvalifikační požadavky na odečítajícího a relativní časová a materiální náročnost přípravy vzorků zne-

možňující použití této metody v polních podmínkách v časovém intervalu do konce prvního dne po ozáření. Na druhé straně lze pozitivně hodnotit přesnost dosahovaných výsledků při stanovení počtu chromozomálních aberací z lymfocytů v dávkách 0,2–6 Gy. Jak vyplývá z výsledků Fedorenka a spol. (3), kteří měřili počet chromozomálních aberací na souboru 22 kosmonautů, odchylky naměřených hodnot nepřesahovaly 110 mGy při celkových hodnotách absorbované dávky do 280 mGy. Obecně uznávaný práh použitelnosti této metody při měření 1000 lymfocytů v jednom vzorku je cca 0,25 Gy. Dalšími hledisky, které je nutné zvážit při posuzování výsledků hodnocení chromozomálních aberací jsou individuální rozdíly a věk pacienta. Se zvyšujícím se věkem se zvyšuje přirozený výskyt translokací v rozmezí 1–14 translokací na 1000 buněk (14).

Modernější modifikací předchozí metody je měření chromozomálních aberací lymfocytů z ozářených pacientů. Podstatou je obarvení jednoho či několika chromozomů metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), kdy je jeden nebo několik chromozomů obarveno specifickou fluorescenční barvou a následně jsou měřeny pozorovatelné aberace charakteru dicentrických a prsténkových chromozomů a navíc tato metoda umožňuje stanovení počtu translokací a inzercí. Jak vyplývá z práce Duranteho a spol. (2) u ozářených onkologických pacientů s obarvením 2. a 4. chromozomu se velikost odchyl-

ky měření pohybuje do cca 1 Gy. Reciproké translokace zachovávají v buňce prakticky všechny geny ve funkčním stavu, a tak se buňky mohou dále dělit. Takovéto aberace lze nalézt v lidských lymfocytech ozářených osob ještě dlouho po ozáření (6). Translokační analýza je metoda pro možnou retrospektivní biologickou dozimetrii, kdy je důležité stanovit obdrženou dávku záření mnoho let po expozici. Citlivost této metody je však limitována možností detekce expozic záření ve vztahu k pozadí, neboť i jiné faktory zvyšují frekvenci translokací. Ideální je stanovení translokací před expozicí a po expozici ionizujícím záření. Je třeba si uvědomit, že např. věk jedince 50 let vede ke zdvojnásobení translokací. Moore a spol. (11) sledovali frekvenci translokací 6–10 let po expozici likvidátorů havárie v Černobylu, kteří byli podle dozimetrických údajů ozáření dávkou 0,25 Gy, a na základě cytogenetické analýzy byla dávka stanovena 0,09 Gy. Frekvence translokací se u likvidátorů v Černobylu zvýšila na 1,12 % (K – 0,66 %, nekuřáci a neozáření, věk 38 let). U kuřáků cigaret se po deseti letech počet translokací zvýšil na 0,89 % a u kuřáků papiros na 1,4 procent. Ze studie vyplývá, že ozáření dávkou 0,09 Gy mělo z hlediska vzestupu translokací větší efekt než kouření cigaret a menší efekt než kouření papiros.

Další biodozimetrickou metodou stanovující velikost absorbované dávky z počtu chromozomálních aberací je premature chromosome condensation (kondenzace chromozómu) – PCC, která se od FISH barvení liší typem buněčného bloku. U vyhodnocovaných lymfocytů se navodí duplikace genetického materiálu s následnou kondenzací chromozomů po první uměle navozené mitóze. Vyhodnocované lymfocyty se nacházejí v různých fázích buněčného cyklu. Přesnost metody se pohybuje mezi 1 a 2 Gy (15).

Další používanou cestou biodozimetrie je průkaz specifické mutace genů na proteinové úrovni.

Na retrospektivní studii likvidátorů Černobylské havárie (1) byla použita metoda detekce mutovaného genu glykoforinu A na proteinové úrovni, respektive nepřímá imunocytochemická detekce mutovaného proteinu glykoforinu A lymfocytů separovaných ze vzorků plné krve ozářených pacientů. Výhodou metody je nízký spodní limit detekce poškození na úrovni 10 mGy s relativně nízkou přesností měření.

Jako biodozimetrický ukazatel u retrospektivní studie u pracovníků v rizikových provozech byla použita proteinová detekce mutace receptoru T-lym-

focytů (TCR) lymfocytů separovaných ze vzorků plné krve. CD 4 pozitivní T-lymfocyty s negativní expresí CD 3 znaku vyplývající z mutace TCR. Ačkoli byl zaznamenán nízký spodní limit pro detekci mutace TCR, odchylky měření byly natolik velké, že nelze zatím uvažovat o širokém praktickém použití této metody.

Celkově lze shrnout, že stanovení intenzity post-radiačních změn v expresi proteinů (ale i genů) je relativně perspektivní cestou biologické dozimetrie. Ačkoli tyto ionizujícím zářením indukované změny zejména na proteinové úrovni nejsou permanentní, přetrvávají nejdéle 1 až 3 dny, má tento typ stanovení několik výhod. Jsou výhodnější oproti měření četnosti neperzistentních poškození genomu, mají nižší práh detekce dosahující až 0,1 Gy, až několikanásobný rozdíl exprese vůči neozářeným vzorkům a v neposlední řadě i nižší technickou a finanční náročnost ve srovnání s testy stanovení četnosti chromozomálních aberací (10).

Nevelkého praktického významu dosáhl odhad efektivní dávky pomocí tzv. comet assay (kometového testu) detekující především jednoduché zlomy DNA. Příčinou neproniknutí kometového testu do biodozimetrické praxe je zejména sama podstata jednoduchých zlomů DNA, které se z 90 % celkového počtu reparují v průběhu prvních 4 hodin po ozáření. Další významným omezením použitelnosti metody je její technologická náročnost. Na druhé straně výhodou kometového testu je jeho relativní přesnost dosahující asi 5 %, tj. odchylka se pohybuje kolem 0,2 Sv při ozáření efektivní dávky 1 Sv.

V rámci časného odhadu absorbované dávky ionizujícího záření použili Van der Schans a spol. (19) ELISA vyšetření používající specifickou monoklonální protilátku (anti-ssDNA) k detekci jednoduchých zlomů DNA. Ačkoli jejich kalibrační křivka má lineární charakter, tento typ poškození DNA byl stanoven pouze u 6 % při ozáření dávkou 5 Gy. Citlivost metody na 95% intervalu spolehlivosti se blíží hodnotě 2 Gy, tj. citlivost metody je na hranici dostatečnosti. Z hlediska vojenského se však jedná o obtížně použitelnou metodu, jelikož optimální výsledky jsou poskytovány u vzorků periferní krve odebrané do jedné hodiny po ozáření, což ve většině případů není možné provést.

Nelze nezmínit také úlohu stanovení frekvence mikrojadra u ozářených lymfocytů. Mikrojádra jsou fragmenty DNA, která se při mitóze buňky včlení do cytoplazmy jedné z dceřinných buněk. U ozářených pacientů se separovaným lymfocytům uměle

navodí buněčné dělení s bloádou cytoskeletu, takže výsledkem je dvoujaderný lymfocyt, který v pozitivním případě obsahuje cytoplasmatické lokalizované mikrojádru o 5–20% velikosti normálního jádra buňky. Významnými nedostatky praktické použitelnosti této metody jsou velká biologická variabilita počtu mikrojader u pacientů před ozáření, z vojenského hlediska zdlouhavý postup stanovení počtu mikrojader dosahující až několik dní a zejména nízká přesnost měření. Jelikož odchylky dosahují hodnot až 3 Gy (7), zůstává stanovení počtu mikrojader použitelnou pouze pro *in vitro* experimenty. Dokonce ani modifikace měření četnosti mikrojader neobsahujících cenromeru nepřinesla *in vivo* na vzorcích pracovníků v riziku ionizujícího záření významné zpřesnění metody stanovení počtu mikrojader (18).

S rozvojem studia fenoménu apoptózy byla sledována možnost využití stanovení odhadu absorbované dávky v závislosti na počtu apoptotických buněk. Vral a spol. (21) měřili frekvenci apoptotických buněk u *ex vivo* lymfocytů 24 hodin po ozáření dávkami 0–6 Gy. Autoři stanovovali apoptotické buňky pomocí elektronmikroskopického vyšetření. Ačkoli frekvence apoptotických buněk je relativně vysoká a dosahovala úrovně 25 % z celkového počtu vyšetřených lymfocytů, výsledná křivka má charakter přirozeného logaritmu a nízká citlivost znemožňuje odlišení vzorků ozářených dávkami nad 1 Gy. U dávek pod 1 Gy je citlivost na úrovni 0,5 Gy.

Perspektivní biodozimetrické ukazatele

V poslední dekádě byla biodozimetrie obohacena novými perspektivními ukazateli z oblasti proto-onkogenů a transkripčních faktorů. Vedoucím pracovištěm v celosvětovém měřítku hledajícím nové biodozimetrické ukazatele je Armed Forces Radiobiology Research Institute (AFRRI) v Bethesdě.

V biologické dozimetrii mohou být využity některé další metody, jako např. řetězová polymerázová reakce (PCR). Touto metodou mohou být analyzovány mutace DNA na lidských lymfocytech. PCR technologie umožňuje detekovat přítomnost mutací v relativně malých množstvích. Prasanna a spol. (13) popsali metodu *in situ* PCR ke kvantifikaci mutací mitochondriální DNA na interfázových lymfocytech. Popsali specifickou delecí akumulující se v DNA mitochondrií, která byla dávko-

vě závislá v rozmezí 0,5–2 Gy. Vzestup této delecí s věkem znamená, že se jedná o trvalou změnu, která by mohla být využita jako bioindikátor v retrospektivních studiích.

Ionizující záření vede ke změnám genové a proteinové exprese, které by mohly být využity jako biologické indikátory obdržené dávky, především při ozáření nízkými dávkami záření (10). Jedná se především o expresi genů spojených s indukci apoptózy případně onkogenů či tumor-supresorových genů. Prokázali dávkovou závislost exprese c-Haas mRNA 17 hodin po *in vitro* RTG ozáření lidských lymfocytů izolovaných z periferní krve zdravých dárců, dávkami do 1 Gy. Na stejném experimentálním modelu provedli Grace a spol. (5) měření mRNA exprese genu GADD45 pomocí metody RT-PCR. Autoři zjistili lineární závislost exprese mRNA 48 hodin po ozáření dávkami 1, 2 a 3 Gy. Přesnost metody lze podle publikovaných výsledků odhadnout na asi 1 Gy.

Ionizující záření působí genotoxický stres a v této souvislosti se mění exprese řady genů i proteinů. Řada změn však je přechodná a jako vhodný indikátor dávky je nutné hledat změny, které přetrvávají delší časové období. Fornace (4) na modelu lidské myeloidní leukemické linie ML-1 prokázal lineární vzestup exprese mRNA některých stresových genů (CIP1/WAF1 a GADD45) s maximem 4 hodiny po ozáření dávkami 0,02–0,5 Gy.

V naší práci (8) jsme pro studium molekulárních mechanismů indukce apoptózy a hledání vhodného biodozimetru zvolili jako model buňky lidské T-lymfocytární leukémie, které se v mnoha ohledech chovají v reakci na ionizující záření jako T-lymfocyty. Jsou velmi citlivé k účinkům záření a je u nich indukována apoptóza, brzy po ozáření. Jak jsme nepřímo prokázali, mají p53 wild formu a na účinek ionizujícího záření odpovídají především poškozením DNA, po kterém je navozena apoptóza tzv. vnitřní cestou právě přes indukci a fosforylaci p53 (17).

Z námi sledovaných ukazatelů indukce apoptózy (sub-G1 vrchol, morfologie, štěpení laminu B a APO2.7) jsme jako nejvhodnější ukazatel vybrali mitochondriální membránový antigen APO2.7 stanovený na nepermeabilizovaných buňkách, který vykazoval lineární dávkovou závislost 16 hodin po ozáření v rozmezí 0–5 Gy. Představuje ukazatel stanovený rychle po ozáření (dávkově závislé změny je možno stanovit ještě 24 hodin po ozáření). Nález lineární dávkové závislosti fosforylované formy p53 na serinu 392 v oblasti malých dávek záření je zcela

Tabulka 1a

Používané a zkoušené metody v biodozimetrii (část I.)

Ukazatel	Typ exp. použitý v praxi	Typ buněk	Spodní práh	Horní práh	Citlivost	Časový interval	Náročnost provedení v polních podmínkách (LEVEL)
Chromozomální aberace (Giemsa)	<i>in vivo</i> doporučeno IAEA	lymfocyty	0,25 Gy	–	0,11-0,5 Gy	Do 24 h	LEVEL 3, náročná na erudici vyšetřujícího
Chromozomální aberace (FISH)	<i>in vivo</i>	lymfocyty	0,25 Gy	–	Do 1 Gy	Do 24 h	LEVEL 4, náročná na erudici a technologické vybavení vyšetřujícího
PCC	<i>in vivo</i>	lymfocyty	0,25 Gy	–	1 – 2 Gy	Do 24 h	LEVEL 4, náročná na erudici a technologické vybavení vyšetřujícího
Mutovaný glykophorin A	<i>ex vivo</i>	lymfocyty	0,01 Gy	–	? Gy	léta	LEVEL 3, náročná na vybavení a erudici vyšetřujícího
CD4+/CD3+ (mutovaný TCR)	<i>ex vivo</i>	lymfocyty	?	?	? Gy	léta	LEVEL 3, náročná na vybavení a erudici vyšetřujícího
Comet assay	<i>in vivo</i>	lymfocyty	0,005 Gy	–	0,2 Sv	Do 1 h	LEVEL 4, nelze včas odebrat vzorek
ELISA detekce jednotlivých zlomů DNA	<i>ex vivo</i>	leukocyty	0,2 Gy	–	2 Gy	Do 1 h	LEVEL 2 - 3

Tabulka 1b

Používané a zkoušené metody v biodozimetrii (část II.)

Ukazatel	Typ exp. použitý v praxi	Typ buněk	Spodní práh	Horní práh	Citlivost	Časový interval	Náročnost provedení v polních podmínkách (LEVEL)
Četnost mikrojader	Ex vivo	Lymfocyty	0,5 Gy	–	Do 3 Gy	Do 24 h	LEVEL 3, nízká citlivost, náročná na erudici vyšetřujícího
Četnost apoptózy	Ex vivo	Lymfocyty	0,5 Gy	–	0,5 – 3 Gy	Do 24 h	LEVEL 4, náročná na erudici vyšetřujícího a technologické vybavení
Expresce c-Haras mRNA	In vitro	Lymfocyty	0,2 Gy	–	Do 0,5 Gy	1 – 17 h	LEVEL 4, náročná na erudici vyšetřujícího a technologické vybavení
Expresce GADD45 mRNA	In vitro	Lymfocyty	0,5 Gy	–	1 Gy	48 h	LEVEL 4, náročná na erudici vyšetřujícího a technologické vybavení
Expresce APO 2.7	In vitro	MOLT-4	0,2 Gy	5 Gy	Do 1 Gy	16 – 24 h	LEVEL 4 (stávající metoda), po optimalizaci možná LEVEL 2 - 3
Expresce TP53Ser 392	In vitro	MOLT-4	0,25 Gy	1 Gy	Do 0,25 Gy	24 h	LEVEL 4, náročná na erudici vyšetřujícího a technologické vybavení

prioritní. Závislost byla lineární 3 hodiny po ozáření dávkami do 1 Gy (20).

Vypracovali jsme 2DE-mapy změn proteinů u buněk MOLT-4 po ozáření vysokou letální dávkou 7,5 Gy v časovém intervalu 0, 2, 5 a 12 hodin po ozáření. Také vypracování 2DE-map pro buňky MOLT-4 jak neozářené, tak ozářené je nález zcela prioritní. Pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-MS jsme identifikovali 28 z výše nalezených proteinů, které vykazovaly signifikantní změny po ozáření. Z těchto proteinů jsme vybrali 3 proteiny Rho-GDI 1, Ran-BP1 a gama PAK kinázu podílející se na buněčné signalizaci a mající vazbu k zástavě buněčného cyklu a indukci apoptózy vyvolané ionizujícím zářením. Aktivace gama PAK kinázy 5 h po ozáření se zdá být zásadní pro určení, zda buňka přežije, či bude indukována apoptóza (Szkanderová a spol., dosud nepublikováno).

Zda je možno indukci apoptózy a s ní spojené změny v proteinové expresi využít jako indikátory dávky záření u lymfocytů izolovaných z periferní krve ozářených, bude předmětem našeho dalšího výzkumu.

Souhrnné informace o jednotlivých metodách zachycuje tabulka 1a, 1b.

Literatura

1. BIGBEE, WL., et al. Biodosimetry of Chernobyl cleanup workers from Estonia and Latvia using the glycophorin A in vivo somatic cell mutation assay. *Radiat. Res.*, 1997, vol. 147, p. 215–224.
2. DURANTE, M., et al. Biodosimetry of heavy ions by interphase chromosome painting. *Adv. Space Res.*, 1998, vol. 22, p. 1653–1662.
3. FEDORENKO, B., et al. Cytogenetic studies of blood lymphocytes from cosmonauts after long-term space flights on MIR station. *Adv. Space Res.*, 2001, vol. 27, p. 355–359.
4. FORNACE, AJ., et al. Stress-gene induction by low-dose gamma irradiation. *Mil. Med.*, 2002, vol. 167, Suppl. p. 13–15.
5. GRACE, MB. – McLELAND, CB. – BLAKELY, WF. Real-time quantitative RT-PCR assay of GADD 45 gene expression changes as a biomarker for radiation biodosimetry. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2002, vol. 78, p. 1011–1021.
6. KOZUBEK, S., et al. The topological organization of chromosomes 9 and 22 in cell nuclei has a determinative role in the induction of t(9,22) translocations and in the pathogenesis of t(9,22) leukemias. *Chromosoma*, 1999, vol. 108, p. 426–435.
7. LEE, TK., et al. Micronuclei in lymphocytes of prostate cancer patients undergoing radiation therapy. *Mutat. Res.*, 2000, vol. 469, p. 63–70.
8. MAREKOVA, M. – VAVROVA, J. – VOKURKOVA, D., et al. Modulation of ionizing radiation-induced apoptosis and cell cycle arrest by all-trans retinoic acid in promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Physiol. Res.*, 2003, vol. 52, p. 599–606.
9. MAREKOVA, M. – VAVROVA, J. – VOKURKOVA, D. Monitoring of premitotic and postmitotic apoptosis in gamma-irradiated HL-60 cells by the mitochondrial membrane protein-specific monoclonal antibody APO2.7. *Gen Physiol Biophys.*, 2003 Jun, vol. 22, no. 2, p. 191–200.
10. MILLER, AC., et al. Proto-oncogene expression: a predictive assay for radiation biodosimetry applications. *Radiat. Prot. Dosimetry*, 2002, vol. 99, p. 295–302.
11. MOORE, DH., et al. A study of the effects of exposure on cleanup workers at the Chernobyl nuclear reactor accident using multiple end points. *Radiat. Res.*, 1997, vol. 148, p. 463–475.
12. MOORHEAD, PS., et al. Chromosome preparation of Leucocytes cultured from peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, 1960, vol. 20, p. 613–616.
13. PRASANNA, PG., et al. Biological dosimetry using human interphase peripheral blood lymphocytes. *Mil. Med.*, 2002, vol. 167, (Suppl), p. 10–12.
14. SOROKINE-DURM, I., et al. The variability of translocation yields amongst control populations. *Radiat. Prot. Dosimetry*, 2000, vol. 88, p. 93–99.
15. SUZUKI, M., et al. Residual chromatin breaks as biodosimetry for cell killing by carbon ions. *Adv. Space Res.*, 1998, vol. 22, p. 1663–1671.
16. SZKANDEROVA, S. – HERNYCHOVA, L. – KASALOVA, I., et al. Proteomic analysis of radiation-induced alterations in L929 cells. *Folia Biol. (Praha)*, 2003, vol. 49, no. 1, p. 15–25.
17. SZKANDEROVÁ, S. – VÁVROVÁ, J. – ŘEZÁČOVÁ, M., et al. Gamma irradiation results in phosphorylation of p53 at serine 392 in human T-lymphocyte leukaemia cell line MOLT-4. *Folia Biol.*, 2003, vol. 49, p. 191–196.
18. THIERENS, H., et al. Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus centromere assay. *Mutagenesis*, 2000, vol. 15, p. 245–249.
19. VAN DER SCHANS, GP., et al. Detection of single-strand breaks and base damage in DNA of human white blood cells as a tool for biological dosimetry of exposure to ionizing radiation. *Mil. Med.*, 2002, vol. 167, Suppl. 1, p. 5–7.
20. VÁVROVÁ, J., et al. *Indukce apoptózy proteinádorovými látkami a ionizujícím zářením*. 1. vyd. Hradec Králové, VLA JEP, 2002. 44 s. Učební texty VLA JEP. Sv. 333. ISBN 80-85109-23-9.
21. VRAL, A., et al. Apoptosis induced by fast neutrons versus ⁶⁰Co γ-rays in human peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1998, vol. 73, no. 289–295.

Korespondence: Mgr. Zdeňka Vilasová
Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: vilasova@pmfhk.cz

Do redakce došlo 19. 10. 2004