

BIODOZIMETRIE: DICENTRICKÁ ANALÝZA A PŘEDČASNÁ CHROMOZOMOVÁ KONDENZACE (PCC)

Jaroslav PEJCHAL, Jan ÖSTERREICHER, Jiřina VÁVROVÁ

Univerzita obrany, katedra radiobiologie Fakulty vojenského zdravotnictví, Hradec Králové

Souhrn

Nedávné události po celém světě poukazují na vzrůstající nebezpečí různých forem terorismu, včetně radiologického nebo nukleárního terorismu. Metody fyzikální dozimetrie jsou mnohdy nespolehlivé či nejsou využívány vůbec. Proto jsou zapotřebí metody, které by přesně určily absorbovanou dávku a pomohly při třídění ozářených pacientů. Cytogenetické metody jsou dosud nejpoužívanějšími metodami biologické dozimetrie. Práce pojednává o cytogenetických metodách – dicentrické analýze a předčasné chromozomové kondenzaci (PCC). Hodnotí tyto metody a srovnává jejich přednosti a nedostatky.

Klíčová slova: Biodozimetrie; Dicentrická analýza; PCC.

Biodosimetry: Dicentric Analysis and Premature Chromosome Condensation (PCC)

Summary

Current events throughout the world underscore the growing threat of different forms of terrorism, including a radiological or a nuclear attack. Physical dosimetric methods have sometimes low validity or are not used at all. Therefore, methods for accurate estimation of absorbed doses to facilitate effective triage are needed. Cytogenetic methods are the most widely used methods in biological dosimetry. The work analyses cytogenetic methods – dicentric analysis and premature chromosome condensation (PCC). The work assesses these methods and compares their advantages and disadvantages.

Key words: Biodosimetry; Dicentric analysis; PCC.

Cytogenetické metody, radiobiologie a AČR

Konec 20. a začátek 21. století je pro Armádu České republiky obdobím transformace a modernizace. Ve snaze modernizovat vzdušné síly byl realizován pronájem švédských víceúčelových bojových letounů JAS-39 Gripen. V konečném důsledku však tento krok neznamenal pouze zisk nástroje na obranu vzdušného prostoru, ale také počátek rozsáhlé spolupráce České republiky a Švédského království v řadě dalších oblastí, kdy v rámci ofsetových programů probíhá transfer technologií použitelných v oblasti ochrany proti zbraním hromadného ničení.

V oblasti radiobiologie zaujala Armádu České republiky možnost transferu technologie, dat a know-how biodozimetrických cytogenetických metod, jimiž AČR nedisponuje, ale které švédská strana plně optimalizovala a zařadila do protokolů sloužících k vyhodnocení následků radionukleárních nehod (68).

Cytogenetické metody dnes tvoří páteř biodozi-

metrie, která v případě nenadálých situací, kdy není fyzikální dozimetr k dispozici nebo za klimatických podmínek, kdy výsledky fyzikální dozimetrie nejsou validní, je jedinou dostupnou metodou odhadu expozice a dávky ionizujícího záření.

Cytogenetické metody

Cytogenetické metody hodnotí přítomnost chromozomových aberací v buňkách. Chromozomové aberace vznikají absorpcí ionizujícího záření v buněčném jádře, což vede k poškození nukleoproteinové struktury chromozomů. Jak přímý efekt (přímá interakce záření s hmotou chromozomů), tak nepřímý efekt (radikály zprostředkovaná interakce) ionizujícího záření vede k široké škále poškození. Dochází k modifikacím bází a deoxyribózy DNA, vznikají intra- a intermolekulární kovalentní vazby molekul DNA a bílkovin, jednoduché a dvojité zlomy DNA (2). Pro vznik chromozomových aberací

je nutná přítomnost dvojíých zlomů DNA vedoucích k porušení kontinuity genetického materiálu. Část dvojíých zlomů je reparována. Pokud nedojde k reparaci DNA nebo proběhne reparace nesprávně vzniká chromozomová aberace.

Cytogenetické metody aberace kvalitativně i kvantitativně hodnotí. Vyhodnocená kvalita a kvantita aberací je následně vztažena k absorbované referenční dávce dané kalibrační křivky, konstruované na základě expozice lymfocytů periferní krve *in vitro* dané kvalitě ionizujícího záření (26). Zralé periferní lymfocyty jsou z radiobiologického hlediska považovány za nejvhodnější bioindikátor celotělové expozice ionizujícímu záření (5, 26).

Z hlediska přesnosti detekce je nutné znát stabilitu měřených parametrů. Cytogenetika dělí aberace na nestabilní, které jsou postupem času organismem eliminovány (dicentrické či vícecentrické chromozomy, acentrické fragmenty, prstenčité chromozomy), a stabilní, které odstraňovány nejsou, nebo je rychlost jejich eliminace velmi nízká (translokace) (26, 74, 75).

Specifická cytogenetických metod je ovlivněna možnostmi geneze dvojíých zlomů DNA působením i jiných genotoxických nox, než je ionizující záření. Dvojité zlomy jsou generovány vlivem chemických agens – yperitem (59), cytostatiky jako jsou inhibitory topoizomeráz (camptothecin, etoposid) (66) nebo např. hydroxyurea (inhibitor ribonukleotidové reduktázy) (33), vznikají vlivem biologických agens – HIV-1 infekce (71), HTLV-1 infekce (37). Také endogenní děje jako V(D)J rekombinace (49) nebo apoptóza (51) vedou k tvorbě dvojíých zlomů. V(D)J rekombinace je proces, při kterém během vývoje lymfoidních buněk dochází k tvorbě široké palety antigen vázajících míst protilátek a receptorů T-lymfocytů (49). V(D)J rekombinace není záležitostí zralých cirkulujících G₀-lymfocytů, které tvoří více než 99 % této populace (26), apoptóza však výtěžnost a přesnost této metody ovlivňovat může.

Třídění cytogenetických metod

Podle způsobu hodnocení chromozomových aberací dělíme cytogenetické metody na přímé a nepřímé. Přímé metody detekují vlastní přítomnost chromozomové aberace. Nepřímé metody sledují parametry, které s přítomností chromozomových aberací pouze souvisí.

Přímé metody:

- Konvenční cytogenetická analýza
- Předčasná chromozomová kondenzace (Premature chromosome condensation, PCC)

Nepřímé metody:

- Analýza mikrojader

Analýza mikrojader detekuje přítomnost mikrojader. Jedná se o malá dceřiná jádra vyskytující se v buňce společně s původním velkým jádrem. Jsou následkem přítomnosti acentrických fragmentů nebo poruch interakce chromozomů s dělicím vřeténkem. V telofázi tyto fragmenty, pokud se objeví mimo dosah zbytku obsahu buněčného jádra, kolem sebe formují samostatný jaderný obal a generují mikrojádru (7). Přímé metody jsou k detekci aberací vhodnější.

Konvenční cytogenetická analýza (dicentrická analýza – DA)

Vzhledem k ceně a efektivnosti dicentrické analýzy proti ostatním cytogenetickým postupům je tato metoda zlatým standardem biodozimetrie. Frekvence dicentrických chromozomů je široce akceptována jako nejspolehlivější indikátor absorbované dávky. Ačkoli výskyt všech druhů chromozomových aberací je dávkově závislý, dicentrická analýza hodnotí pouze přítomnost dicentrických chromozomů. Výskyt prstenčitých chromozomů je méně častější, což by přinášelo nutnost hodnocení podstatně vyššího počtu buněk a analýzu by časově a finančně protěžovalo. Výskyt chromozomových fragmentů je srovnatelný s výskytem dicentrických chromozomů, jejich hodnocení však nese vysoké riziko falešného hodnocení přítomného buněčného detritu (26).

Metoda je založena na 48hodinové kultivaci lymfocytů odebraných exponovaným jedincům a stimulovaných fytohemaglutininem. Poslední 1 h 45 min jsou buňky kultivovány s mitotickými jedy – kolchicinem či kolcemidem, které zastaví kulturu v mitóze, ve které jsou chromozomy nejlépe hodnotitelné mikroskopem (50).

Některé problémy spjaté s DA:

- Laboratorní zázemí a rychlost analýzy
- Nestabilita dicentrických chromozomů
- Mitotický index
- Expozice vysokým dávkám ionizujícího záření
- Kalibrační křivky na podkladě *in vitro* expozice
- Parciální a nehomogenní ozáření

1. Nutnost laboratorního zázemí, nutnost vhodných laboratorních podmínek a časová prodleva mezi získáním vzorku a výsledky analýzy činí z DA metodu méně vhodnou pro polní podmínky. Ačkoli je dnes možné téměř všechny jednotlivé kroky analýzy zautomatizovat a laboratorní práci zjednodušit, není možné tyto kroky urychlit. První výsledky mohou být získány ke konci 3. dne od získání vzorků laboratoří. K 48hodinové kultivaci je nutno připočíst 24 hodin na další zpracování vzorků, včetně finálního kroku odečítání preparátů, kdy i nejzkušenější pracovníci jsou schopni analyzovat maximálně 500 buněk/den (13). Přitom přesnost odhadu této metody je dána množstvím vyhodnocených buněk. Hodnocením 500 buněk je možné provést odhad s přesností 0,1 Gy, hodnocením 1000 buněk s přesností 0,05 Gy (13, 26, 42). Další navýšení hodnocených buněk odhad sice více zpřesní, ale neúměrně časově zatíží.

2. Dicentrické chromozomy jsou nestabilní chromozomové aberace vykazující exponenciální pokles v čase způsobený buněčným obratem (39, 41, 56, 73). Pokud je odběr krve proveden v průběhu prvních několika týdnů po expozici, není nutné výsledky DA podle eliminačních kinetik dicentrických chromozomů korigovat. S delším časovým odstupem musíme ke korekci přistoupit. Problémem však zůstávají značné odlišnosti hodnot poločas eliminace v různých studiích. Ramalho a spol. na podkladě cytogenetických analýz jedinců postižených při radiační nehodě v brazilském městě Goiana určili poločas eliminace dicentrických chromozomů 110 dnů pro vysoké dávky ($> 1\text{Gy}$) a 160 dnů pro nízké dávky ($< 1\text{Gy}$) (56). Z analýz provedených na 18 postižených, kteří obdrželi dávku 1–3 Gy v Estonsku v roce 1994, vychází poločas eliminace na 1 rok (39), což je v souladu s výsledky Thierense a spol., kteří hodnotili poločas eliminace dicentrických chromozomů u 41letého technika náhodně exponovaného při údržbě rentgenky (73). A v neposlední řadě Lloyd a spol. na podkladě analýz náhodně exponovaných zaměstnanců determinovali hodnotu poločas eliminace dicentrických chromozomů 3 roky (41).

Zdá se tedy, že samo ionizující záření ovlivňuje eliminační kinetiku lymfocytů, pravděpodobně vlivem rozsáhlé apoptózy lymfocytů vyskytující se po ozáření (38). Proto nejlepším postupem pro korekci nestability těchto aberací by mohlo být stanovení individuálních eliminačních kinetik na základě opakovaného odběru krve u daného jedince a srovnání

dat s výsledky analýzy stabilních chromozomových aberací (74, 75).

3. Metoda hodnotí pouze malou část buněk, jež jsou ve fázi zpracování vzorků v mitóze. Procento buněk zastavených v mitóze k celkovému počtu buněk je definováno jako mitotický index (MI) (25). MI dicentrické analýzy se pohybuje kolem 3–8 % (11, 55). Jsou zde však další faktory, které MI a tím výtěžnost DA ovlivňují. Buď ji zvyšují, např. mikrogravitace při hodnocení expozice kosmonautů (70), nebo snižují, např. věk (11) nebo expozice vysokým dávkám (viz dále).

4. Při absorpci vysokých dávek ionizujícího záření dochází k masivní lymfopenii *in vivo*. Jedná se o následek fyziologické odpovědi organismu, kdy buňky přestupují z krevního oběhu do tkání a lymfatického systému (1). Masivní lymfopenie snižuje množství dostupných analyzovatelných buněk. Je však možné využít metodu „high-yield chromosome preparation“ k získání dostatečného množství lymfocytů (viz chemicky indukovaná PCC). Stále ale zůstávají dva problémy. Za prvé, prudce klesá výtěžnost DA. Mitotický index lymfocytů exponovaných 10 Gy *in vitro* je 1 % a dále klesá (29). K poklesu mitotického indexu dochází vlivem interfazické apoptózy lymfocytů nebo mitotickým zdržením způsobeným zastavením buněčného cyklu v G_1 a G_2 kontrolním bodě (52, 65). Platí úměra mezi množstvím a závažností chromozomových aberací a mírou opoždění buněčného cyklu (44, 57, 58). Pokud exponované buňky zastaví buněčný cyklus nebo vstoupí do interfazické apoptózy, odhad dávky ionizujícího záření prostřednictvím DA bude podhodnocen z důvodu selekce buněk, které jsou analyzovány (15, 52). Za druhé, při frakcionovaném podání ionizujícího záření, které nemá tak velký efekt na buněčný cyklus z důvodu reparace poškození mezi jednotlivými frakcemi, byla v rozsahu 5–10 Gy pozorována ztráta lineárně-kvadratického charakteru kalibrační křivky (34, 45). Nastává saturace kalibrační křivky dicentrických chromozomů, protože není možné vytvářet neomezené množství dicentrických chromozomů z omezeného množství hmoty v buněčném jádře. Dávky vyšší než 10 Gy nemohou být hodnoceny vzhledem k vysoké úrovni saturace (45).

5. Kalibrační křivky jsou převážně generovány *in vitro* expozicí lidských lymfocytů. Porovnání výsledků DA *in vivo* exponovaných lymfocytů maligních pacientů podstupujících celotělové ozáření s výsledky *in vitro* expozice prokázalo vyšší frekvenci

dicentrických chromozomů *in vitro* jak u nízkých dávek (57,5 cGy) (76), tak u dávek vysokých (až 10 Gy) (34). Dávky odhadnuté na základě *in vitro* konstruované kalibrační křivky mohou být ve skutečnosti podhodnocené (34). *In vivo* kalibrační křivky od pacientů s maligním onemocněním budou velmi důležité pro biodozimetrii a v budoucnosti pravděpodobně *in vitro* konstruované kalibrační křivky nahradí (34).

6. Samostatnou kapitolu tvoří problematika nehomogeního a parciálního (necelotělového) ozáření. V případě vysoce homogeního celotělového ozáření jsou lymfocyty odebrané z periferního krevního oběhu dobrým reprezentativním vzorkem pro odhad dávky ionizujícího záření (10). Z důvodu různé absorpce ionizujícího záření různými tkáněmi však ozáření lidského organismu nikdy nemůže mít plně homogenní charakter. Nehomogenní a parciální expozice dělí populaci lymfocytů na ozářené a neo-ozářené, které není možné od sebe odlišit použitím soudobých laboratorních metod. V případě expozice ionizujícímu záření s nízkou hodnotou lineárního přenosu energie (gamma a rentgenové záření) je však možné homogenitu aproximovat. Proto je možné cytogenetickou analýzu nejlépe využít pro odhad dávky gamma-záření a vysoce energetického rentgenového záření při vnější expozici nebo pro odhad dávky při vnitřní kontaminaci rovnoměrně distribuovaných radionuklidů emitujících gamma záření (^{137}Cs) (26). Hodnocením distribuce dicentrických chromozomů (9) nebo dicentrických a prstenčitých chromozomů (62) v jednotlivých buňkách je také možné provést přesnější odhad než pouhým zjednodušením modelu na průměrné celotělové ozáření. Oba přístupy však potřebují aproximovat homogenitu ozáření a vyžadují, aby odběr krve byl proveden co nejdříve po ozáření organismu k snížení přesnosti odhadu způsobeném eliminací nestabilních aberací z krevního oběhu (26). Přístupy je možné použít jen při expozici vyššími dávkami a z důvodu efektu vyšších dávek při DA je možné provést pouze odhad pokrývající minimálně 20 % (62).

Předčasná chromozomová kondenzace (PCC)

Rozlišujeme tři základní metodické postupy PCC:

- fuzní PCC
- chemicky indikovanou PCC
- rychlá analýza aberací interfazických chromozomů (RICA = rapid interphase chromosome aberration assay)

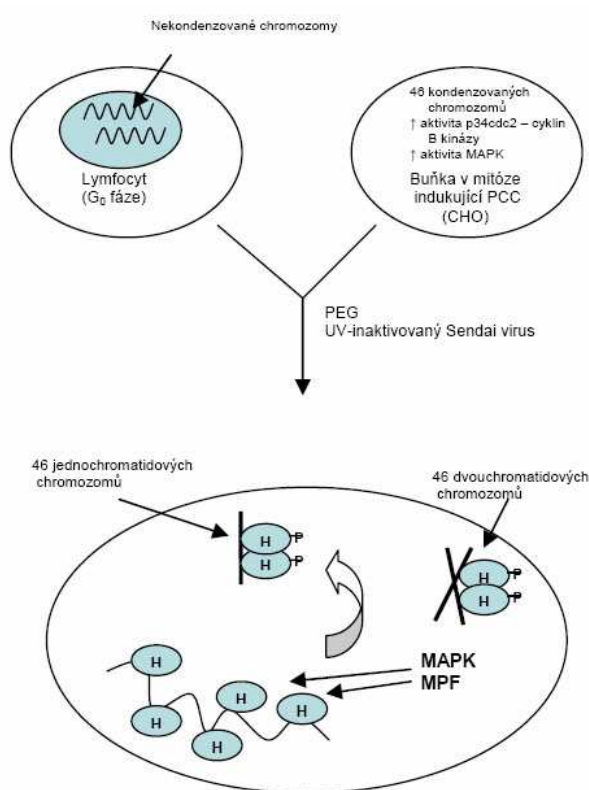
Fuzní PCC

Fuzní PCC je založena na fúzi G_0 -lymfocytů s buňkami v mitóze. Fuzním agens je nejčastěji UV-zářením inaktivovaný Sendai Virus (28, 46) nebo polyethylen glykol (PEG) (46, 48) a indukčními buňkami ovariální buňky čínského křečka.

Ačkoli se jedná o metodu objevenou na počátku 70. let minulého století (28), není její přesný mechanismus doposud znám. Předpokladem je, že indukční buňky jsou zdrojem tzv. kondenzačních faktorů, které ovlivňují strukturu chromozomů. Za jeden z těchto faktorů je považován tzv. maturaci podporujících faktor (MPF). MPF je komplex tvořený cyklinem B a $p34^{\text{cdc}2}$ kinázou (43). Nachází se v buněčném jádře během mitózy a meiózy ve vysoké koncentraci a podílí se na jejich regulaci (24). $p34^{\text{cdc}2}$ -cyklin B kináza je nezbytná k fosforylaci histonu H1 (35), tedy posttranslační modifikaci nukleoproteinové hmoty DNA, ke které dochází během kondenzace chromozomů v mitóze (31). Předchozí studie potvrdili, že vzestup H1 fosforylace nastává v mitóze u řady eukaryot (60). Je však nutné dodat, že Shen a spol. pozorováním buněčné linie δH1 , tedy buněčné linie s vyřazenou expresí histonu H1, prokázali, že ke kondenzaci chromozomů dochází i v nepřítomnosti tohoto histonu (63), a Guo a spol. použitím myši mamární nádorové linie (FT 210) a na teplotu citlivé analogické linie postřádající $p34^{\text{cdc}2}$ -cyklin B kinázovou aktivitu při vyšších teplotách, ukázali, že tento komplex není nezbytný pro navození PCC (22). Samotný význam $p34^{\text{cdc}2}$ -cyklin B kinázy a fosforylace histonu H1 tedy nedokáže kondenzaci chromozomů vysvětlit.

Dalšími faktory podílející se na kondenzaci chromozomů jsou mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK). MAPK jsou obsaženy ve vysokých koncentracích v oocytech (36) a jejich aktivita je nejvyšší po fertilizaci oocyty (64). Tyto serinové/threoninové kinázy jsou společně s MPF důležitým regulačním prvkem maturace oocytů projevující se mikroskopicky ztrátou jadérka, rozpadem jaderné membrány a požadovanou kondenzací chromozomů, jež je prvním krokem progresu oocyty skrz první metafázi meiózy. Na molekulární úrovni je maturace spjata se změnou programu buňky, na které se pravděpodobně MAPK také podílí (36). MAPK jsou aktivovány buď po aktivaci MPF (69, 80)- nebo současně (16) v závislosti na živočišném druhu. Ačkoliv aktivace MAPK není spjata s aktivací MPF (15, 40), bylo prokázáno, že nízká aktivita MAPK je spjata s předčasným poklesem aktivity

MPF (17). Gordo a spol. inaktivovali MAPK injekcí MKP-1 mRNA, která kóduje MAPK fosfatázu, do hovězího oocyty. Pokles aktivity MAPK u těchto oocytů byl spjat s poruchou kondenzace chromatinu (17). Vlastní molekulární mechanismus vlivu MAPK na strukturu chromozomů může být vysvětlen aktivací MAPK aktivovaných protein kináz MSK-1 a MSK-2, které následně fosforylují histon H3 (61). Inhibice jedné z MAPK kaskád (ERK 1/2) zabráňuje fosforylaci histonu H3 (72), která je nezbytným požadavkem pro kondenzaci chromozomů během mitózy (77) a je tím spjata s PCC (28).



Obr. 1: Schematický mechanismus fuzní PCC

Výstupem fuzní PCC jsou vzorky se 46 až 47 jednochromatidovými strukturami lymfocytů G₀ fáze a 46 dvouchromatidovými strukturami indukčních buněk v případě buněk neexponovaných ionizujícímu záření. Prasanna a spol. přičítají zvýšenou úroveň pozadí (47 = 46 chromozomů + 1 odložený fragment) přítomnosti makrofágů, které jsou zdrojem oxidových a peroxidových radikálů (53). S expozicí počet chromozomů lymfocytů G₀ fáze narůstá o přibývajících fragmenty (chromozomové zlomy), jejichž nárůst v rozsahu 0–9 Gy pro rentge-

nové záření (nízký LET) nebo 0–4 Gy pro neutronové záření (vysoký LET) vykazuje lineární dávkovou závislost (4, 53). S využitím proužkovacích technik nebo fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je navíc možné hodnotit dicentrické a prstenčité chromozomy (47, 74, 75).

Protože fuzní PCC nevyžaduje stimulaci lymfocytů a následnou 48hodinovou kultivaci, může být odhad dávky ionizujícího záření vysloven během 24 hodin poté, co laboratoř získá vzorky krve (53). Ze stejného důvodu je tato metoda doposud nejvhodnější k odhadu necelotělového (PB) ozáření, protože můžeme hodnotit i buňky, které by nedošly do mitózy. Touto metodou je možné provést spolehlivý odhad PB ozáření při dávkách 3 Gy a vyšších (4). Darroudi a spol. provedli úspěšně odhad 6 % PB expozice při dávce 5 Gy, kdy dicentrická analýza a analýza mikrojader selhávaly (8).

S fuzní PCC jsou spjaty dva problémy – nízká efektivita výtěžnosti a technická náročnost metody. Nízká výtěžnost je spjata s velmi nízkou frekvencí fúzí 0,05–0,06 % (11), protože PCC se objevuje pouze v malé frakci (< 10 %) s indukčními buňkami, navíc nekonzistentně (48) a možností interference obrazu indukčních buněk s PCC buňkami (4, 48). PCC index (% PCC lymfocytů ke všem lymfocytům vzorku) je signifikantně nižší než mitotický index konvenční cytogenetické analýzy, proto musí být hodnoceno více vzorků, aby byla získána dostatečná statistická data (11). Technická náročnost tkví v manipulaci s indukčními buňkami. Z těchto důvodů je fuzní PCC postupně opouštěna a nahražována jinými postupy PCC.

Chemicky indukovaná PCC

Chemicky indukovaná PCC je navozena prostřednictvím calyculinu A (CalA), okadické kyseliny (OA) (6, 11, 18, 29, 30, 32). Jedná se o aktivní inhibitory eukaryontních proteinových serinových/threoninových fosfatáz (27). OA je silný inhibitor převážně fosfatázy typu 2A (3). CalA inhibuje proteinové fosfatázy typu 1 a 2A ve stejném rozsahu při nižších inhibičních koncentracích než OA (27). Tento rozdíl je zřejmě důvodem 20násobné efektivnosti CalA při indukci PCC v porovnání s OA (6, 30). Inhibice proteinových serinových/threoninových fosfatáz vede k dysbalanci funkce mezi proteinovými kinázami (MPF a MAPK) a fosfatázami ve prospěch kináz a navodí předčasnou kondenzaci

chromozomů *in vitro* (6, 11 a další) i *in vivo* (12). Chemicky indukovaná PCC však vyžaduje stimulaci G_0 -lymfocytů fytohemaglutininem a 48hodinovou kultivaci. Neproliferujících buňky obsahují nízké koncentrace cyklinu B (67), jenž je součástí MPF a pravděpodobně dalších faktorů, které se na kondenzaci chromozomů podílejí, a PCC tak selhává (viz fuzní PCC). U nestimulovaných lymfocytů je však možné dosáhnout parciálních úspěchů při užití extrémně vysokých koncentrací fosfatázových inhibitorů (500–5000 nM CalA, 2–5hodinová inkubace) při současném použití vápníkového iontoměniče A23187. Chromozomy jsou ale morfologicky nehodnotitelné (30). Tento efekt Ca^{2+} iontů je vysvětlován fosforylací histonu H3 prostřednictvím Ca^{2+} dependentních kináz (78, 79).

Podobně jak fuzní PCC dokáže i chemicky indukovaná PCC obcházet problémy spojené s blokem buněčného cyklu, protože kondenzace nukleových kyselin je navozena ve všech fázích buněčného cyklu (11, 18, 30, 32). Chromozomy G_1 -fáze mají jen 1 chromatidu bez zřetelné centromery a jsou podobné chromozomům G_0 fáze fuzní PCC, chromozomy S fáze vykazují částečně kondenzovaný hrudkovitý charakter, pro jakoukoli analýzu nevyužitelný, chromozomy G_2 a M-fáze mají 2 chromatidy a chromozomy obou fází není možné od sebe odlišit. Tato metoda byla proto aplikována k hodnocení buď chromozomů G_2 a M-fáze (18, 29), nebo G_1 , G_2 a M-fáze (11, 30).

Protože není možné odlišit G_2 a M-chromozomy, je mitotický index u chemicky indukované PCC označován jako G_2/M index (32). Tento index je signifikantně vyšší než mitotický index konvenční cytogenetické analýzy nebo fuzní PCC index. Kowalska a spol. prokázali 4–10krát vyšší výtěžnost tohoto indexu (32) a Durante a spol. 4,5–6krát vyšší u mladších jedinců a až 700krát vyšší výtěžnost u jedinců starších v porovnání s konvenční cytogenetickou analýzou (11). V absolutních číslech G_2/M index činí 10–50 % lymfocytů (29, 32). U somatických buněčných linií dosahují CalA a OA 12–99 % G_2/M indexu (19). Coco-Martin a spol. hodnotili efekt CalA a OA na nádorových liniích a dosáhli 10–70 % G_2/M indexu v závislosti na inkubačních podmínkách a typu nádorové linie v porovnání s mitotickým indexem konvenční analýzy (0,9–7,6 %) (6). PCC však nebyla indukována u všech nádorových linií (6).

Hodnocení dicentrických chromozomů je obtížnější než u dicentrické analýzy. S chemicky indu-

kovanou PCC je spojen pokles kvality chromozomů. Při užití Giemsova barvení lze zaznamenat zkrácení a rozvláknění struktur chromozomů. Je obtížnější rozpoznat kontury a centromery a tím odlišit fragmenty a dicentrické chromozomy od nepoškozených chromozomů. Nejlepší kvality chromozomů je dosaženo při 0,5–1hodinové inkubaci v médiu s 500–1000 nM OA nebo 50 nM CalA. S dalším nárůstem koncentrace inhibitorů proteinových fosfatáz a/nebo délkou inkubace je nárůst kvantity kondenzace dekompenzován poklesem kvality (29, 30). Vliv fosfatázových inhibitorů na množství a strukturu chromozomových aberací byl hodnocen pouze u CalA. Bylo prokázáno, že CalA nemá vliv na počet, neovlivňuje proužkování chromozomů a tedy nemá vliv na přítomnost strukturních aberací (32).

Vzhledem k vysoké výtěžnosti chemicky indukované PCC a možnosti možnosti indukovat PCC ve všech fázích buněčného cyklu je tato metoda vhodná pro sledování chromozomálních změn při ozáření vysokými dávkami ionizujícího záření. Chemická indukce PCC může být navozena i při akutní expozici dávkami vyššími než 10 Gy, kdy dicentrická analýza selhává (29). OA efektivně generuje PCC i při dávkách přesahujících 40 Gy *in vitro* (18). K získání dostatečného množství lymfocytů *in vivo* exponovaných vysokým dávkám je možné použít „high-yield chromosome preparation method“ (23). Tato metoda umožní separaci a kultivaci dostatečného množství buněk nezbytných k cytogenetické analýze. Benefit této metody proti klasické kultivaci a separaci byl ověřen při nehodě v japonské Tokai-muře, kdy dva ze tří exponovaných pracovníků měli tak nízké hodnoty lymfocytů, že nebylo možné provést odhad dávky ionizujícího záření klasickou separací a kultivací (23).

Poslední otázkou zůstává, co hodnotit vzhledem k saturaci dávkové křivky dicentrických chromozomů u vysokých dávek. Kanda a spol. a Hayata a spol. využili hodnocení prstenčitých chromozomů (23, 29). Ačkoli k saturaci křivky centrický prstenčitých chromozomů dochází podobně jako u dicentrických chromozomů u dávek vyšších 5 Gy, jev je vysvětlen kompeticí těchto aberací (45), acentrické prstence vykazují další na dávce závislý lineární růst do dávky 20 Gy. U dávek vyšších 20 Gy je pozorována plná saturace křivky, neboť při expozici vzorku *in vitro* dávkou 20 Gy není signifikantní rozdíl výtěžku prstenců proti 40 Gy (29). Vzhledem k jejich charakteristickému tvaru, nečiní obtíže tento druh aberací rozlišit v různých fázích buněčného

cyklu i při velmi špatné kvalitě chromozomů dané působením fosfatázových inhibitorů společně s vysokými dávkami ionizujícího záření. Hodnocení prstenčitých chromozomů tak umožňuje získání výsledků analýzy během 51 hodin vzhledem k snadnému odlišení jejich tvaru. Padesát hodin je počítáno na kultivaci a přípravu preparátů. Pouze 1 hodina stačí k odečtení výsledků jednoho vzorku (29). Další možností je hodnocení celkového počtu chromozomů v kombinaci s G_2/M indexem (20). Množství chromozomů jejich štěpením vzrůstá až k 30 Gy. Při překročení této dávky nastává pokles, který je vysvětlován opětovným spojováním nestabilních fragmentů. G_2/M index zůstává 10 % do dávky 15 Gy, což je následováno jeho snížením na 2 % u 40 Gy. Poslední alternativou je vyhodnocení poměru délky nejdelšího a nejkratšího chromozomu, která vykazuje dávkový vzestup až ke 40 Gy (21).

Rychlá analýza aberací interfazických chromozomů (RICA)

Tato metoda vychází ze znalostí molekulárních mechanismů kondenzace chromozomů. Diferencované neproliferující buňky jako jsou periferní lymfocyty selhávají v indukci PCC při použití fosfatázových inhibitorů (30). U neproliferujících, diferencovaných buněk je koncentrace cyklin dependentních kináz nízká, což je pravděpodobný důvod selhání PCC u G_0 -buněk. Přidáním $p34^{cdc2}$ -cyklin B kinázy do inkubačního média obsahujícího OA a ATP substituuje tento nedostatek kináz a nastává PCC (54, 55). Z praktického hlediska to znamená získání výsledků během prvního dne od dodání vzorku do laboratoře.

Kondenzace však není úplná. Buňky vykazují pouze parciální separaci a kondenzaci chromozomů, proto je nutné použít fluorescenční *in situ* hybridizaci, a chromozomy tak odlišit a ohraničit. Při barvení 1 chromozomu celochromozomovou fluorescenční sondou jsou nepoškozené buňky charakterizovány přítomností 2 fluorescenčních bodů. Tři a více bodů ukazují chromozomovou aberaci – fragment či translokaci (55).

Metoda je vhodná pro odhad absorpce dávky akutního záření v rozsahu 0–7,5 Gy. Méně vhodná je pro protražovanou expozici trvající dny až týdny. Metoda nebyla dosud hodnocena z hlediska problematiky chronického záření, necelotělové a neuniformní expozice a nebyla testována při radiační nehomodě (54, 55).

Využití cytogenetických metod v AČR

AČR v současné době usiluje o aplikaci cytogenetických metod. Tento úkol byl přidělen RN skupině Centra pokročilých studií Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové. RN skupina má k dispozici veškerý materiál nutný k provedení DA a PCC a kalibrační křivku DA švédského výzkumného institutu (FOI), kterou může využít k biodozimetrickému odhadu dávky. Vzhledem k mezilaboratorním rozdílům bude však nutné vytvořit vlastní kalibrační křivky v laboratorních podmínkách AČR k maximalizaci spolehlivosti výsledků těchto metod. V tomto směru bude RN skupina usilovat o sestavení kalibrační křivky dicentrické analýzy v rozsahu 0–5 Gy a kalibrační křivky PCC v rozsahu 0–40 Gy při sledování více parametrů.

Ačkoli k provádění cytogenetické analýzy je zapotřebí vysoce erudovaných specialistů a samotné vyšetření trvá v polních podmínkách déle než vyžadují operační velitelé, jde o dosud jediné známé spolehlivé metody biologické dozimetrie. V budoucnosti však bude nutné nalézt vhodnější bioindikátory ionizujícího záření, které umožní rychlý a efektivní odhad absorbované dávky odpovídající polním podmínkám.

Literatura a prameny

1. ANDERSON, RE. – SPRENT, J. – MILLER, JF. Radiosensitivity of T and B lymphocytes. I. Effect of irradiation on cell migration. *Eur. J. Immunol.*, 1974, vol. 4, no. 3, p. 199–203.
2. BARKER, S. – WEINFELD, M. – ZHENG, J., et al. Identification of Mammalian Proteins Cross-linked to DNA by Ionizing Radiation. *J. Biol. Chem.*, 2005, vol. 280, no. 40, p. 33826–33838.
3. BIALOJAN, C. – TAKAI, A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J.*, 1988, vol. 256, no. 1, p. 283–290.
4. BLAKELY, WF. – PRASANNA, PGS. – KOLANKO, CJ., et al. Application of the premature chromosome condensation assay in simulated partial-body radiation exposures: Evaluation of the use of an automated Metaphase-Finder. *Stem Cells*, 1995, vol. 13, no. 1, p. 223–230.
5. BLAKELY, WF. – BROOKS, AL. – LOFTS, RS., et al. Overview of low-level radiation exposure assessment: Biodosimetry. *Mil. Med.*, 2002, vol. 167, p. 20–24.
6. COCO-MARTIN, JM. – BEGG, AC. Detection of radiation-induced chromosome aberration using fluorescence *in situ* hybridization in drug-induced premature chromosome condensation of tumour cell lines with different radiosensitivities. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1997, vol. 71, no. 3, p. 265–273.

7. COUNTRYMAN, PI. – HEDDLE, JA. The production of micronuclei form chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 1976, vol. 41, no. 2/3, p. 321–332.
8. DARROUDI, F. – FOMINA, J. – MEIJERS, M., et al. Kinetics of the formation of chromosome aberration in x-irradiated human lymphocytes, using PCC and FISH. *Mutat. Res.*, 1998, vol. 404, no. 1/2, p. 55–65.
9. DOLPHIN, GW. Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods, Handling of radiation accidents. *Proc. Int. Symp. Vienn.*, 1969, p. 215–224.
10. DOSSOU, J. – LARTIGAU, E. – M'KACHER, R., et al. Biological dosimetry after total body irradiation (TBI) for hematologic malignancy patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2000, vol. 46, no. 1, p. 123–129.
11. DURANTE, M. – FURUSAWA, Y. – GOTOH, E. A simple method for simultaneous interphase-metaphase chromosome analysis in biodosimetry. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1998, vol. 74, no. 4, p. 457–462.
12. DYBAN, AP. – DE SUTTER, P. – VERLINSKY, Y. Okadaic acid induces premature chromosome condensation reflecting the cell cycle progression in one-cell stage mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 1993, vol. 34, no. 4, p. 402–415.
13. EDWARDS, AA. The use of chromosomal aberrations in human lymphocytes for biological dosimetry. *Rad. Res.*, 1997, vol. 148, p. 39–44.
14. FABRY, L. – LEONÁRD, RD. – DECAT, G., et al. Chromosome aberrations in mixed cultures of in vitro irradiated and unirradiated human lymphocytes. *Strahlenther und Onkol.*, 1988, vol. 164, p. 108–110.
15. FISHER, DL. – BRASSAC, T. – GALAS, S., et al. Dissociation of MAP kinase activation and MPF activation in hormone-stimulated maturation of *Xenopus* oocytes. *Development*, 1999, vol. 126, no. 20, p. 4537–4546.
16. FISSORE, RA. – HE, CL. – VANDE WOUDE, GF. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 1996, vol. 55, no. 6, p. 1261–1270.
17. GORDO, AC. – HE, CL. – SMITH, S., et al. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 2001, vol. 59, no. 1, p. 106–114.
18. GOTOH, E. – ASAKAWA, Y. Detection and evaluation of chromosomal aberration induced by high doses of γ -irradiation using immunogold-silver painting of prematurely condensed chromosomes. *Int. J. Rad. Biol.*, 1996, vol. 70, p. 517–520.
19. GOTOH, E. – ASAKAWA, T. – KOSAKA, H. Inhibition of protein serine/threonine phosphatases directly induces premature chromosome condensation in mammalian somatic cells. *Biomed. Res.*, 1995, vol. 16, no. 1, p. 63–68.
20. GOTOH, E. – TANNO, Y. Simple biodosimetry method for use in cases of high-dose radiation exposure that scores the chromosome number of Giemsa-stained drug-induced prematurely condensed chromosomes (PCC). *Int. J. Radiat. Biol.*, 2005, vol. 81, no. 1, p. 33–40.
21. GOTOH, E. – TANNO, Y. – TAKAKURA, K. Simple biodosimetry method for cases of high-dose radiation exposure using the ratio of the longest/shortest length of Giemsa-stained drug-induced prematurely condensed chromosomes (PCC). *Int. J. Radiat. Biol.*, 2005, vol. 81, no. 5, p. 379–385.
22. GUO, XW. – TH'NG, JP. – SWANK, RA., et al. Chromosome condensation induced by fostriecin does not require p34^{cdc2} kinase activity and histone H1 hyperphosphorylation, but is associated with enhanced histone H2A and H3 phosphorylation. *EMBO J.*, 1995, vol. 14, no. 5, p. 976–985.
23. HAYATA, I. – KANDA, R. – MINAMIHISAMATSU, M., et al. Cytogenetical dose estimation for 3 severely exposed patients in the JCO criticality accident in Tokai-mura. *J. Radiat. Res.*, 2001, vol. 42, p. 149–155.
24. HUO, LJ. – FAN, HY. – ZHONG, ZS., et al. Ubiquitin – proteasome pathway modulates mouse oocyte meiotic maturation and fertilization via regulation of MAPK cascade and cyclin B1 degradation. *Mech. Dev.*, 2004, vol. 121, no. 10, p. 1275–1287.
25. IKEDA, K. – PANT, B. – MISHIRO, A., et al. A convenient method for the evaluation of anti-tumor agents affecting the cell cycle. *J. Biosci. Bioeng.*, 2000, vol. 90, no. 5, p. 574–576.
26. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Biological dosimetry: chromosomal aberration analysis for dose assessment. *Technical reports series* no. 405, Vienna, IAEA, 2001.
27. ISHIHARA, H. – MARTIN, BL. – BRAUTIGAN, DL., et al. Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, vol. 159, no. 3, p. 871–877.
28. JOHNSON, RT. – RAO, PN. Mammalian cell vision: induction of premature condensation in interphase nuclei, *Nature*, 1970, vol. 226, no. 5247, p. 717–722.
29. KANDA, R. – EGUCHI-KASAI, K. – HAYATA, I. Phosphatase inhibitors and premature chromosome condensation in human peripheral lymphocytes at different cell-cycle phases. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 1999, vol. 25, p. 1–8.
30. KANDA, R. – HAYATA, I. – LLOYD, DC. Easy biodosimetry for high-dose radiation exposures using drug-induced, prematurely condensed chromosomes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1999, vol. 75, no. 4 p. 441–446.
31. KOSHLAND, D. – STRUNNIKOV, A. Mitotic chromosome condensation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1996, vol. 12, p. 305–333.
32. KOWALSKA, A. – SREBNIK, M. – WAWRZKIEWICZ, A., et al. The influence of calyculin A on lymphocytes in vitro. *J. Appl. Genet.*, 2003, vol. 44, no. 3, p. 413–418.
33. KUROSE, A. – TANAKA, T. – HUANG, X., et al. Effects of hydroxyurea and aphidicolin on phosphorylation of ataxia telangiectasia mutated on Ser 1981 and histone H2AX on Ser 139 in relation to cell cycle phase and induction of apoptosis. *Cytometry A*, 2006, vol. 69, no. 4, p. 212–221.
34. KUTSUKI, S. – IHARA, N. – SHIGEMATSU, N., et al. Relation between chromosomal aberrations and radiation dose during the process of TBI. *Rad. Med.*, 2005, vol. 23(1), p. 37–42.
35. LANGAN, TA. – GAUTIER, J. – LOHKA, M., et al. Mammalian growth-associated H1 histone kinase: a homolog of cdc2+/CDC28 protein kinases controlling mitotic

- entry in yeast and frog cells. *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9, no. 9, p. 3860–3868.
36. LEE, JH. - CAMPBELL, KH. Effects of enucleation and caffeine on maturation-promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activities in ovine oocytes used as recipient cytoplasts for nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 2006, vol. 74, no. 4, p. 691–698.
37. LEMOINE, FJ. - MARRIOTT, SJ. Genomic instability driven by the human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) oncoprotein, Tax. *Oncogene*, 2002, vol. 21, no. 47, p. 7230–7234.
38. LÉONARD, A. - RUEFF, J. - GERBER, GB., et al. Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods. *Radiat. Prot. Dosimetry*, 2005, vol. 115, no. 1/4, p. 448–454.
39. LINDHOLM, C. Biodosimetry after accidental radiation exposure by conventional chromosome analysis and FISH. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1996, vol. 70, no. 6, p. 647–656.
40. LIU, L. - YANG, X. Interplay of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 1999, vol. 61, no. 1, p. 1–7.
41. LLOYD, DC. - MOQUET, JE. - ORAM, S., et al. Accidental intake of tritiated water: a cytogenetic follow-up case on translocation stability and dose reconstruction. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1998, vol. 73, no. 5, p. 543–547.
42. LLOYD, DC. - PROSSER, JS. - PURROTT, RJ. The study of chromosome aberration yield in human lymphocytes as an indicator of radiation dose. *Report NRPB-M70*. National radiological protection board, 1992. (Technická zpráva, nepublikováno.)
43. MALLER, J. - GAUTIER, J. - LANGAN, TA., et al. Maturation-promoting factor and the regulation of the cell cycle. *J. Cell Sci. Suppl.*, 1989, vol. 12, p. 53–63.
44. NASONOVA, E. - RITTER, S. Cytogenetic effects of densely ionising radiation in human lymphocytes: impact of cell cycle delays. *Cytogenet. Genome Res.*, 2004, vol. 104, no. 1/4, p. 216–220.
45. NORMAN, A. - SASAKI, MS. Chromosome-exchange aberrations in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1966, vol. 11, p. 321–328.
46. OKAYASU, R. - CHEONG, R. - ILIAKIS, G. Comparison of yields and repair kinetics of interphase chromosome breaks visualized by Sendai-virus or PEG-mediated cell fusion in irradiated CHO cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1993, vol. 64, no. 6, p. 689–694.
47. PANTELAS, GE. - ILIAKIS, GE. - SAMBANI, CD., et al. Biological dosimetry of absorbed radiation by C-banding of interphase chromosomes in peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1993, vol. 63, no. 3, p. 349–354.
48. PANTELAS, GE. - MAILLIE, HD. A simple Method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol. *Somatic Cell. Genet.*, 1983, vol. 9, p. 533–547.
49. PASTWA, E. - BLASIAK, J. Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim. Pol.*, 2003, vol. 50, no. 4, p. 891–908.
50. PEJCHAL, J. Protokol dicentrické analýzy. (Dosud nepublikováno.)
51. POLLARD, TD. - EARNSHAW, WC. *Cell Biology*. Philadelphia, Saunders, 2002.
52. PONCELOT, E. - LEONÁRD, A. - LEONÁRD, ED., et al. Biological dosimetry: radiation-induced mitotic delay can lead to an underestimate of the part of the body exposed after non-uniform irradiation. *Strahlenther. Onkol.*, 1988, vol. 164, no. 9, p. 542–543.
53. PRASANNA, PGS. - KOLANKO, CJ. - GERSTENBERG, HM., et al. Premature chromosome condensation assay for biodosimetry: studies with fission-neutrons. *Health Physics Society*, 1996, vol. 72, no. 4, p. 594–600.
54. PRASANNA, PGS. - ESCALADA, ND. - BLAKELY, WF. Induction of premature chromosome condensation by a phosphatase inhibitor and a protein kinase in unstimulated human peripheral blood lymphocytes: a simple and rapid technique to study chromosome aberration using specific whole-chromosome DNA hybridization probes for biological dosimetry. *Mut. Res.*, 2000, vol. 466, p. 131–141.
55. PRASANNA, PGS. - HAMEL, CJC. - ESCALADA, ND., et al. Biological dosimetry using human interphase peripheral blood lymphocytes. *Milit. Med.*, 2002, vol. 167, no. 1, p. 10–12.
56. RAMALHO, AT., et al. Lifespan of human lymphocytes estimated during a six year cytogenetic follow-up of individuals accidentally exposed in the 1987 radiological accident in Brazil. *Mutat. Res.*, 1995, vol. 331, no. 1, p. 47–54.
57. RITTER, S. - NASONOVA, E. - FURUSAWA, Y., et al. Relationship between aberration yield and mitotic delay in human lymphocytes exposed to 200 MeV/u Fe-ions or X-rays. *J. Radiat. Res.*, 2002, vol. 43, p. 175–179.
58. RITTER, S., et al. Effect of LET on the yield and quality of chromosomal damage in metaphase cells: a time-course study. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2002, vol. 78, no. 3, p. 191–202.
59. ROBERTS, JJ. - KOTSAKI-KOVATSI, VP. Potentiation of sulphur mustard or cisplatin-induced toxicity by caffeine in Chinese hamster cells correlates with formation of DNA double-strand breaks during replication on a damaged template. *Mutat. Res.*, 1986, vol. 165, no. 3, p. 207–220.
60. ROTH, SY. - ALLIS, CD. Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role? *Trends Biochem. Sci.*, 1992, vol. 17, no. 3, p. 93–98.
61. ROUX, PP. - BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2004, vol. 68, no. 2, p. 320–344.
62. SASAKI, MS. Use of lymphocyte chromosome aberrations in biological dosimetry: possibilities and limitations. In ISHIHARA, T. - SASAKI, MS., et al. *Radiation-induced chromosome damage in man*. New York, Alan R. Liss, 1983.
63. SHEN, X. - YU, L. - WEIR, JW., et al. Linker histones are not essential and affect chromatin condensation in vivo. *Cell*, 1995, vol. 82, no. 1, p. 47–56.
64. SHIBUYA, EK. - BOULTON, TG. - COBB, MH., et al. Activation of p42 MAP kinase and the release of oocytes from cell cycle arrest. *EMBO J.*, 1992, vol. 11, no. 11, p. 3963–3975.
65. SHINOMIYA, N. New concepts in radiation-induced apoptosis: 'premitotic apoptosis' and 'postmitotic apoptosis'. *J. Cell. Mol. Med.*, 2001, vol. 5, no. 3, p. 240–253.
66. SORTIBRAN, AN. - TELLEZ, MG. - RODRIGUEZ-ARNAIZ, R. Genotoxic profile of inhibitors of topoisomerases I (camptothecin) and II (etoposide) in a mitotic

- recombination and sex-chromosome loss somatic eye assay of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 2006, vol. 604, no. 1/2, p. 83–90.
67. STEINMANN, KE. – BELINSKY, GS. – LEE, D., et al. Chemically induced premature mitosis: Differential response in rodent and human cells and the relationships to cyclin B synthesis and p34^{cdc2}/cyclin B complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1991, vol. 88, no. 15, p. 6842–6847.
68. STRICKLIN, D. – PEJCHAL, J. Summary of the Technical Exchange of the PCC Assay. *Technical Arrangement*, 2005, no. 7. (Technická zpráva, nepublikováno.)
69. SUN, QY. – BREITHART, H. – SCHATTE, H. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1999, vol. 11, no. 7/8, p. 443–450.
70. SUSHKOV, FV. – RUDNEVA, SV. – NADTOCHEI, GA. Experiments with cultures of mammalian cells aboard the biosatellite "Cosmos-782". *Arkh. Anat. Gistol. Embriol.*, 1977, vol. 73, no. 10, p. 28–39.
71. TACHIWANA, H. – SHIMURA, M. – NAKAI-MURAKAMI, C., et al. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer. Res.*, 2006, vol. 66, no. 2, p. 627–631.
72. TIKOO, K. – LAU, SS. – MONKS, TJ. Histone H3 phosphorylation is coupled to poly-(ADP-ribosylation) during reactive oxygen species-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *Mol. Pharmacol.*, 2001, vol. 60, no. 2, p. 394–402.
73. THIERENS, H. – DE RUYCK, K. – VRAL, A., et al. Cytogenetic biodosimetry of an accidental exposure of a radiological worker using multiple assay. *Radiat. Prot. Dosimetry*, 2005, vol. 113, no. 4, p. 408–414.
74. TUCKER, JD. – COFIELD, J. – MATSUMOTO, K., et al. Persistence of chromosome aberration following acute radiation: I, PAINT Translocations, Dicentric, Rings, Fragments, and Insertions. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2005, vol. 45, no. 2/3, p. 229–248.
75. TUCKER, JD. – COFIELD, J. – MATSUMOTO, K., et al. Persistence of chromosome aberration following acute radiation: II, does it matter how translocations are scored? *Environ. Mol. Mutagen.*, 2005, vol. 45, no. 2/3, p. 249–257.
76. VOROBTSOVA, I. – DARROUDI, F. – SEMYONOV, A., et al. Analysis of chromosome aberrations by FISH and Giemsa assays in lymphocytes of cancer patients undergoing whole-body irradiation: comparison of in-vivo and in-vitro irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2001, vol. 77, no. 11, p. 1123–1131.
77. WEI, Y. – YU, L. – BOWEN, J., et al. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, 1999, vol. 97, no. 1, p. 99–109.
78. WHITLOCK, JP. Jr. – AUGUSTINE, R. – SCHULMAN, H. Calcium-dependent phosphorylation of histone H3 in butyrate-treated HeLa cells. *Nature*, 1980, vol. 287, no. 5777, p. 74–76.
79. WHITLOCK, JP. Jr. – GALEAZZI, D. – SCHULMAN, H. Acetylation and calcium-dependent phosphorylation of histone H3 in nuclei from butyrate-treated HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 258, no. 2, p. 1299–1304.
80. ZERNICKA-GOETZ, M. – VERLHAC, MH. – GERAUD, G., et al. Protein phosphatases control MAP kinase activation and microtubule organization during rat oocyte maturation. *Eur. J. Cell Biol.*, 1997, vol. 72, no. 1, p. 30–38.

Korespondence: Npor. MUDr. Jaroslav Pejchal
Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Katedra radiobiologie
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: jaroslav.pejchal@seznam.cz

Do redakce došlo 17. 1. 2007