

METODY BIOLOGICKÉ DOZIMETRIE METHODS OF BIOLOGICAL DOSIMETRY

Zuzana Freitinger Skalická¹, Zdeněk Hon², Friedo Zölzer¹

¹Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, katedra radiologie a toxikologie

²České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství v Kladně, katedra lékařských a humanitních oborů

Summary

Examinations based on biodosimetric methods are implemented in the case of suspect exposure of persons to ionizing radiation. Changes in chromosomes make it possible to detect the level of the exposure, predict the degree of the damage and make decisions on the treatment. In addition, a correlation was demonstrated between enhanced levels of chromosomal aberrations after the exposure to genotoxic factors and increased risk of cancer disease.

There are a number of biodosimetric methods, but their choice depends on the number of persons exposed, laboratory conditions, sensitivity and time factor. The test of micronuclei is one of the methods of choice, since the results can be known as soon as within 48 to 72 hours after sampling the blood and the results are a sufficiently sensitive parameter indicating the ionizing radiation dose. The test of peripheral lymphocyte micronuclei is a standard biodosimetric method, which may be employed in the case of radiation accidents as well as in the monitoring of the occupational exposure of persons. It was developed by Fenech and Morley in 1985 and is based on the detection of small acentric chromosomal fragments, which remain beyond the nucleus in the course of the cell division. These micronuclei are present in the cytoplasm beyond the main daughter nuclei. The micronuclei can contain whole chromosomes as well as their parts only.

Key words: biodosimetry – micronuclear-centromere test – ionizing radiation

Souhrn

Při podezření na expozici ionizujícím zářením se u osob provádí vyšetření pomocí biodozimetrických metod. Změny v chromozomech umožňují detekovat míru expozice, předvídat stupeň poškození a rozhodnout o léčení. Kromě toho byla prokázána korelace mezi zvýšenou hladinou chromozomálních aberací po expozici genotoxickým faktorům a zvýšeným rizikem rakoviny.

Biodozimetrických metod existuje celá řada, ale záleží na množství ozářených osob, laboratorních podmínkách, senzitivitě a časovém faktoru, který test je nejvhodnější. Mikrojaderný test je jedním z metod volby, protože výsledky mohou být známy do 48 až 72 hodin po odběru krve a je dostatečně citlivým ukazatelem dávky ionizujícího záření. Mikrojaderný test periferních lymfocytů je standardní biodozimetrická metoda, kterou lze použít jak v případě radiačních nehod, tak i monitoringu profesního ozáření osob. Byl vyvinut Fenechem a Morleym v roce 1985 a jeho principem je detekce malých acentrických chromozomálních fragmentů, které zůstanou mimo jádro během buněčného dělení. Tato

mikrojádra jsou v cytoplazmě mimo hlavní dceřiná jádra. Mikrojádra mohou obsahovat jak celé chromozomy, tak i pouze jejich části.

Klíčová slova: biodozimetrie – mikrojaderně-centromerový test – ionizující záření

ÚVOD

K profesionálnímu ozáření osob ionizujícím zářením začalo docházet ihned po objevu rentgenového (rtg) záření a radioaktivity, tedy v době, kdy se o rizicích tohoto záření ještě nevědělo. Vysoké dávky jistě obdržel při svých pokusech již W. C. Röntgen a M. Curie-Sklodovská a mnoho jejich následovníků. K profesnímu ozařování pracovníků ionizujícím zářením dochází jak ze zdrojů umělých – rtg přístroje, používání radionuklidů k diagnostice a terapii, jaderné reaktory, urychlovače částic, tak během ozáření ze zdrojů přírodních u pracovníků uranových dolů, úpraven rud apod. (12).

Profesní ozáření osob ionizujícím zářením

Z profesionálních onemocnění způsobených ionizujícím zářením v České republice byla v letech 1974–1998 nejčastěji hlášena rakovina plic u bývalých horníků uranových dolů, nicméně počty hlášených bronchogenních karcinomů v posledních 25 letech klesají. Maximální výskyt plicního karcinomu je mezi 15 a 25 lety od začátku expozice.

Efektivní dávky u zdravotníků jsou velmi nízké a jsou pravidelně kontrolovány Centrálním registrem profesionálního ozáření (CRPO). Podle údajů Státního úřadu pro jadernou bezpečnost (SÚJB) byly v letech 1996–1997 efektivní dávky u exponovaných zdravotnických pracovníků v rozmezí od 1 do 2 mSv/rok, což odpovídá rozmezí hodnot v jiných zemích EU (7). Stejně je tomu i u jiných profesí, u kterých jsou pracovníci vystaveni ionizujícímu záření jako například některá odvětví průmyslu, pracovníci jaderných elektráren atd. Přibližné hodnoty průměrné radiační dávky z jednotlivých zdrojů záření vztažené na 1 člověka za 1 rok jsou uvedené v tab. 1.

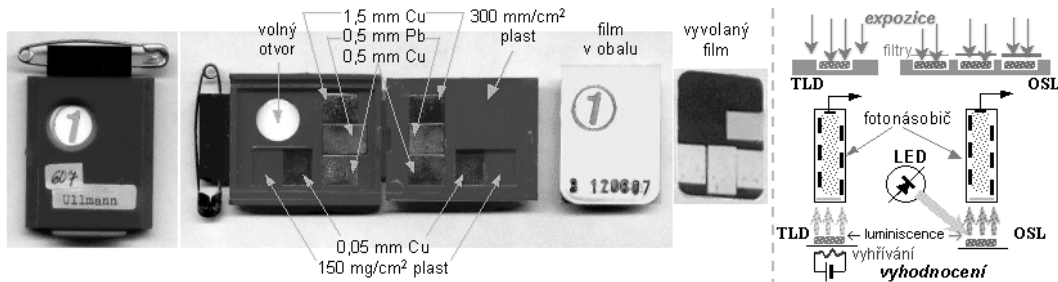
Potřeba osobního monitorování pracovníků vystavených riziku ozáření je dána zákonem č. 18/1997 Sb. (Atomový zákon), ve znění pozdějších předpisů, a prováděcí vyhlášky SÚJB č. 307/2002, v platném znění (16). V § 16 této vyhlášky je definována kategorizace radiačních pracovníků, kteří jsou rozděleni do kategorie A (mohou obdržet efektivní dávku vyšší než 6 mSv ročně) nebo kategorie B (ostatní radiační pracovníci).

Tabulka 1 Přibližné hodnoty průměrné radiační dávky z jednotlivých zdrojů záření vztažené na 1 člověka za 1 rok (12)

Přírodní zdroj záření	Efektivní dávka [mSv/rok]	Podíl v %
Radon (a jeho rozpadové produkty)	1,3	48
Zemské záření	0,45	17
Vnitřní ozáření přírodními radionuklidy v těle	0,25	9
Kosmické záření (sekundární)	0,4	14
Umělý zdroj záření		
Lékařské ozáření (diagnostika, terapie)	0,3	11
Profesní ozáření	0,002	0,08
Technické a spotřební předměty	0,005	0,02
Jaderná energetika (mimo havárie)	0,001	0,04
Radioaktivní spad (jaderné zbraně a havárie)	0,005	0,02

Typy dozimetrie

Termoluminiscenční – TLD dozimetrie je určena pro osobní dozimetrii pracovníků vystavených riziku ozáření fotony u zdrojů záření gama a rtg s energií vyšší než 30 keV, případně elektronů s energií nad 2 MeV v jednoměsíčním nebo tříměsíčním kontrolním období.



Obr. 1 Filmový dozimetr (12)

Prstová dozimetrie je určena pro pracovníky vystavené riziku ozáření u zdrojů gama a rtg záření s energií vyšší než 30 keV, případně elektronů s energií nad 2 MeV, u nichž je třeba měřit dávky na ruce. Pracovník musí být vybaven také TLD nebo filmovým dozimetrem.

Neutronová dozimetrie je určena pro pracovníky, kteří jsou vystaveni riziku ozáření rychlými a intermediálními neutrony. Pracovník musí být vybaven také TLD nebo filmovým dozimetrem (16).

Opticky stimulovaná luminiscence – OSL je metoda, která se rozšířila během posledních 10 let a postupně nahrazuje filmovou a termoluminiscenční dozimetrii. Její přednosti (vysoká citlivost, rychlé vyhodnocení s možností automatizace) umožňují, že integrální osobní OSL dozimetr se stal velmi rychle rozšířeným prostředkem ve světě pro osobní monitorování pracovníků. Stimulace ozářeného OSL materiálu (krystalu $Al_2O_3:C$) zeleným světlem z LED diody má za následek emitování světla modrého, jehož intenzita je úměrná radiační dávce (9).

Pokud není možné stanovit dávku fyzikální dozimetrií, je možné ještě zpětně kvantifi-

kovat dávku, kterou obdržel organismus od zdroje ionizujícího záření, tzv. biodozimetrií. Tento typ dozimetrie je nezbytný v případě náhodného individuálního ozáření, kdy není možné stanovit dávku na základě fyzikální dozimetrie (např. filmového nebo termoluminiscenčního dozimetru) nebo jestliže není možný odečet od tohoto dozimetru (2).

Biodozimetrie

Již v polovině šedesátých let bylo zjištěno, že chromozomální aberace v lymfocytech periferní krve mohou sloužit jako citlivý indikátor radiační expozice. Při podezření na expozici ionizujícím zářením se proto provádí vyšetření pomocí mikroskopové analýzy chromozomů (13, 14). Změny chromozomů umožňují detekovat míru expozice, předvídat stupeň poškození a rozhodnout o léčení. Kromě toho byla prokázána korelace mezi zvýšenou hladinou chromozomálních aberací po expozici genotoxickými faktory a zvýšeným rizikem rakoviny.

Chromozomové aberace jsou mutace na chromozomální úrovni. Dělí se na strukturní nebo numerické. K numerickým aberacím se řadí euploidie, kdy je znásobena celá chromo-

zomová výbava (triploidie, tetraploidie), nebo aneuploidie, kdy se početní odchylka týká pouze některého chromozomu (trisomie, monosomie). Numerické aberace naopak vznikají chybou při rozdělení chromozomů do dceřiných buněk během buněčného dělení (tzv. nondisjunkce) (5).

Strukturální aberace jsou důsledkem chromozomových zlomů, po nichž následuje určitá přestavba. Mohou vznikat spontánně nebo jako následek působení různých vnějších faktorů. Dělí se na balancované (kdy je zachováno původní množství genetického materiálu) a nebalancované (kdy část genetického materiálu chybí, či přebývá). Přesnost detekce dávky je uváděna 0,2 Gy, nicméně u modifikovaného mikrojaderně-centromerového testu lze zpřesnit dávku až na 0,1 Gy (10).

Vybrané biodozimetrické metody

Cytogenetická analýza periferních lymfocytů – CAPL

Metoda cytogenetické analýzy periferních lymfocytů umožňuje detekci, kvalitativní a kvantitativní analýzu chromozomových abnormalit (strukturálních a numerických aberací) v lidských somatických buňkách *in vitro* v optickém mikroskopu. Lze použít jak kultury stabilizovaných buněčných linií, tak primárních buněk, např. lidských lymfocytů. Na lymfocyty se působí mitotickým jedem, např. kolchicinem, aby došlo ke kumulaci dělicích se buněk (C-metáfaze). Buňky jsou ve vhodné době zpracovány a jsou z nich připraveny mikroskopické preparáty. Preparáty jsou obarveny vhodným barvivem. Metafázické buňky jsou analyzovány z hlediska chromozomových abnormalit (3).

Konvenční metoda cytogenetické analýzy periferních lymfocytů je ve světě hodnocena jako biomarker expozice a časného biologického účinku mutagenních a karcinogenních látek. Vzhledem k úzkému vztahu mezi mutagenezí a karcinogenezí má významnou asociaci s rizikem vzniku nádorů při zvýšených hodnotách aberantních buněk (8).

Fluorescenční in situ hybridizace – FISH

Detekuje především stabilní translokace. Slouží k analýze chromozomových odchylek v mitózách i v nedělicích se interfázních

jádrech za použití DNA sond pro specifické chromozomové struktury (centromery, telomery, satelitní DNA), sond pro jedinečné genové kopie (lokus-specifické sondy) a tzv. malovacích sond pro celé chromozomy (15). Podstatou metody je hybridizace neradioaktivně značených DNA sond ke komplementárním úsekům cílové DNA chromozomů nebo interfázních buněčných jader fixovaných na mikroskopickém preparátu a následná vizualizace a analýza fluorescenčních signálů pod fluorescenčním mikroskopem (4). SONDY jsou značeny buď přímo různými fluorochromy, nebo nepřímo, např. biotinem či digoxigeninem. U nepřímo značených sond po hybridizaci následuje detekce pomocí systému protilátek konjugovaných s různými fluorochromy. V současné době jsou používány většinou přímo značené sondy.

Zatímco dicentrické chromozomy nebo prstencové chromozomy a translokace (aberrace chromozomového typu) jsou typickými aberacemi způsobenými ionizujícím zářením, chromatidové zlomy a chromatidové výměny jsou typické pro působení chemických látek. Protože četnost dicentrických chromozomů přesně sleduje dávku ozáření, využívá se cytogenetické vyšetření a stanovení počtu dicentrů k biologické dozimetrii (3).

Mikrojaderný test

Mikrojaderný test spočívá v pozorování fragmentovaného jaderného materiálu, tzv. mikrojaderní, které vznikly působením genotoxických faktorů (11).

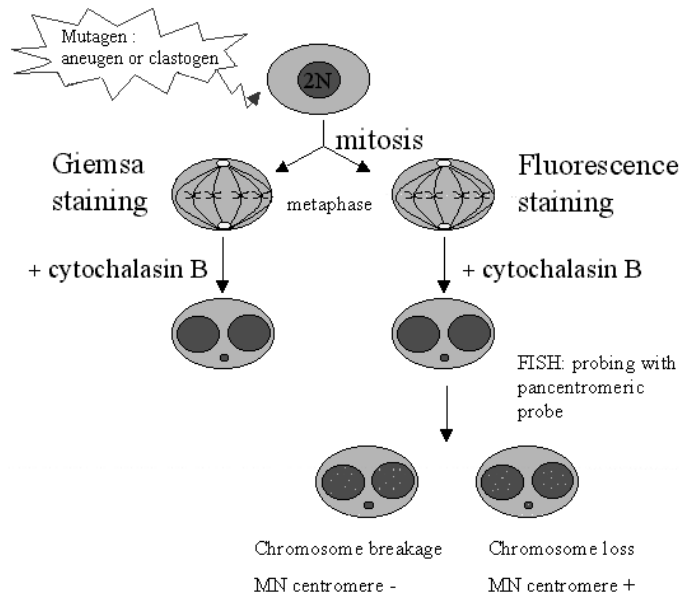
Mikrojádra jsou morfologicky identická, ale menší než hlavní buněčná jádra. Objevují se např. u lymfocytů stimulovaných k mitóze nebo u nezralých červených krvinek. Jejich počítání je obvykle značně jednodušší a rychlejší než u jakýchkoli testů.

Výsledky tohoto testu se vyjadřují buď jako procento dvojjaderných buněk s mikrojadry, nebo průměrný počet mikrojaderní na dvojjadernou buňku (obr. 2).

Všeobecně se za nejnižší detekovatelnou dávku pomocí detekce mikrojaderní považuje dávka v řádu stovek mSv. Byla navržena řada modifikací, z nichž jednou je automatizace pomocí analýzy obrazu, která dovoluje počítat mikrojadra u tisíců buněk místo u stovek, a tak

zajistit větší statistickou spolehlivost výsledků. Touto metodou mohou být detekovány dávky okolo 50 mSv. Další obměnou je počítání mikrojadern v průtokovém cytometru (flow-cytometr) místo pod fluorescenčním mikroskopem, což opět podstatně zvýší množství

počítaných buněk. Tímto způsobem je dokonce možné stanovit dávky mezi 20 a 50 mSv. Třetí možností je využití rozdílu mezi mechanismem spontánní a radiačně indukované tvorby mikrojadern (17).



Obr. 2 Mikrojaderný test (6)

Mikrojaderně-centromerový test

Tento test je modifikací mikrojaderného testu, do kterého se navíc zahrnuje imunofluorescenční značení centromer, a je tedy možné rozlišit mikrojádra vzniklá spontánně (mikrojádra obsahující celé chromozomy) a mikrojádra radiačně indukovaná (mikrojádra obsahující chromozomové fragmenty). Postup i hodnocení jsou stejné jako u mikrojadern pouze s přidáním imunofluorescenčního značení centromer a analýzy vzorků pod fluorescenčním mikroskopem. Odečítá se počet mikrojadern s centromerami a bez centromer ve dvoujaderných buňkách. Jejich poměr je přímo úměrný dávce záření.

Senzitivita mikrojaderně-centromerového testu je limitována hranicí 0,1 Gy z důvodu

poměrně vysokého počtu mikrojadern, které vznikly samovolně (1).

ZÁVĚR

Biologická dozimetrie je nezbytná v případě teroristického zneužití radiačního materiálu (špinavé bomby) nebo při radiačních nehodách a haváriích, při kterých došlo k ozáření osob bez dozimetrů nebo fyzikální dozimetrii nebylo možné vyhodnotit.

Biodozimetrických metod existuje celá řada, ale záleží na množství ozářených osob, laboratorních podmínkách, senzitivitě a časovém faktoru, který test je nejvhodnější. Mikrojaderný test je jedním z metod volby, protože výsledky mohou být známy do 48 až 72 hodin po odběru krve a je dostatečně citlivým ukaza-

telem dávky ionizujícího záření. Modifikací mikrojaderného testu je mikrojaderně-centromerový test, který je citlivější a lze ho použít ke stanovení dávek jak bezprostředně obdržených po expozici ionizujícím zářením, tak i po několika letech od expozice, protože počas mikrojadern v periferních lymfocytech je kolem tří let.

* Článek byl realizován v rámci projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (NPV II 2B08001).

LITERATURA

1. Baran, P.: Fyzikální a biologická dozimetrie uranových horníků. [online]. 2007 [cit. 2011-3-25]. Dostupné z: http://theses.cz/id/sku0uc/downloadPraceContent_adipIdno_7197
2. Department of Atomic Energy, Government of India. [online]. 2011 [cit. 2011-07-03]. Dostupné z: <http://www.igcar.ernet.in/igc2004/sg/biodosimetry.htm>
3. Centrum klinických laboratoří. [online]. 2010 [cit. 2010-09-24]. Dostupné z: <http://prirucka.zu.cz/pokyny-pro-odber-primarnich-vzorku/nesrazlivakrev/>
4. Centrum klinických laboratoří. [online]. 2008 [cit. 2010-01-24]. Dostupné z: http://www.fnhk.cz/cze/original/OLG/Laboratori_prirucka_OLG_2008.pdf
5. Genetika – Váš zdroj informací o genetice. [online]. 2008 [cit. 2011-09-03]. Dostupné z <http://genetika.wz.cz/aberrace.htm>
6. Genotoxicity: The Micronucleus test. [online]. 2007 [cit. 2011-02-23]. Dostupné z: http://cdfc00.ugent.be/HealthRisk/genotoxicitytests/micronucleus_test.htm
7. Navrátil, L. et al.: Klinická radiobiologie. Praha: MANUS, 2005, 222 s. ISBN 80-86571-09-2.
8. Očadlíková, D. et al.: Metody biologického monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí. [online]. 2007 [cit. 2011-03-24]. Dostupné z: <http://www.med.muni.cz/biolspol/mutageneze/full-2007-01.pdf>
9. Osobní dozimetrie online. 2008 [cit. 2011-04-08]. Dostupné z: <http://www.dozimetrie.cz/opticky-stimulovana-luminiscence>
10. Thierens, H., Vral, A.: The micronucleus assay in radiation accidents. Ann Ist Super Sanità 2009, vol. 45, no 3, p. 260–264.
11. Tokikogenetika. [online]. 2010 [cit. 2011-02-15]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Toxikogenetika>
12. Ullmann, V.: Radiační ochrana [online]. 2009 [cit. 2010-09-15]. Dostupné z: <http://astronuklfyzika.cz/RadiacniOchrana.htm>
13. Vilasová, Z., Österreicher, J., Vávrová, J.: Biodozimetrie I: Praktická potřeba biodozimetrie a nejdůležitější aktivované mechanismy po ozáření. [online]. 2005 [cit. 2011-03-10]. Dostupné z: http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL%202_2005/7%20Vilasov%C3%A1-W.pdf
14. Vilasová, Z., Österreicher, J., Vávrová, J.: Biodozimetrie II: Přehled současných metod a perspektiva biodozimetrie [online]. 2005 [cit. 2011-03-10]. Dostupné z: http://www.vojenskaskola.cz/skola/uo/fvz/fakulta/Documents/VZL/2005/VZL3_4_05.pdf
15. Zdravotní ústav se sídlem v Brně. [online]. 2011 [cit. 2011-03-10]. Dostupné z: http://www.zubrno.cz/sluzby_genet.php
16. Zelenka Z.: Celostátní služba osobní dozimetrie. [online]. 2009 [cit. 2011-03-15]. Dostupné z: <http://www.csod.cz/spolecnost/>
17. Ziskané chromozomální aberace [online]. 2010 [cit. 2011-02-15]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Z%C3%ADskan%C3%A9_chromosomov%C3%A9_aberrace

Zuzana Freitinger Skalická, Zdeněk Hon, Friedo Zölzer
zuzana.skalicka@centrum.cz