

## A NAÜ citogenetikai biodozimetria tanfolyama: Alkalmazás a nukleáris veszélyhelyzetre való felkészültségben és reagálásban

Kis Enikő<sup>\*1, 2</sup>

<sup>1</sup> Országos „Frédéric Joliot-Curie” Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet  
1221 Budapest, Anna u. 5

<sup>2</sup> Nemzeti Közszolgálati Egyetem, Katonai Műszaki Doktori Iskola  
1101 Budapest, Hungária krt. 9-11.

\*kise@osski.hu

*Title and Abstract - IAEA Training Course on Cytogenetic Dosimetry: Application in Preparedness For and Response To Radiation emergencies. In case of a radiation accident, the determination of received dose by biodosimetry delivers important supplemental information to serve medical diagnosis. This may be particularly important where physical dosimetry data are not available. The author of this paper briefly describes the conclusions of the international workshop organized by IAEA in 3-5 April 2013 in Belgrade.*

*Keywords- ionizing radiation, biodosimetry, mass casualty events, methods, case studies*

**Kivonat – Egy sugárbaletet esetén a biodozimetria a sérültek által kapott dózis utólagos megállapítása által fontos kiegészítő információkkal szolgálhat az orvosi diagnózis felállításában. Ez különösen fontos lehet olyan esetekben, mikor a fizikai dozimetria adatok nem állnak rendelkezésre. A szerző jelen közleményben röviden ismerteti a NAÜ 2013 április 3-5 között Belgrádban megrendezett nemzetközi workshop-ján elhangzott tanulmányokat és a munkamegbeszélés során levont következtetéseket.**

**Kulcsszavak – ionizáló sugárzás, biodozimetria, tömegszerencsétlenség, módszerek, esettanulmányok**

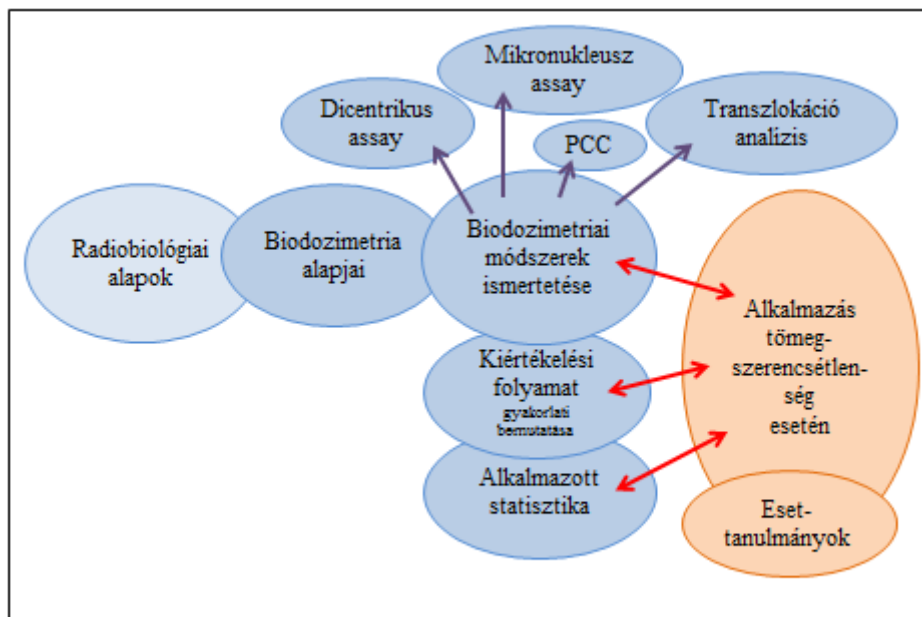
### ELŐSZÓ

2013.04.02-05 között a szerzőnek lehetősége volt részt venni a NAÜ (Nemzetközi Atomenergia-ügynökség) által rendezett „Regional Workshop on Applications of Biodosimetry in Case of a Radiation Emergency” tanfolyamon. A tanfolyam helyszíne a belgrádi Tulip Inn Putnik szálló konferenciaterme volt.

A tanfolyamon a NAÜ-t Eduardo Daniel Herrera Reyes úr képviselte. Három, a biodozimetriában neves tudós tartotta az előadásokat: Marina di Giorgio, Joan Francesc Barquinero Estruch, illetve David Charles Lloyd. A tanfolyamon 24-en vettek részt, 16 Közép-Kelet Európai országból.

A tanfolyam célja a biodozimetria alapjainak elsajátításán kívül egy esetleges katasztrófahelyzetben szükséges intézkedések és teendők összességének átadása, elsajátítása és a környező országok képességeinek megismerése volt.

A színvonalas előadások a radiobiológia alapjaitól különböző sugárbaletetek ismertetéséig igen széles rálátást adtak a biodozimetria tudástárának jelenlegi helyzetére.



1. ábra: A tanfolyam szerkezeti felépítése [1].

## AZ IONIZÁLÓ SUGÁRZÁS BIOLÓGIAI HATÁSAINAK ALAPJAI

Az előadó röviden összefoglalta az ionizáló sugárzás hatásának lehetséges útjait, a biológiai rendszerben okozott károk kialakulásának mechanizmusát.

Az ionizáló sugárzás minden esetben energiát ad át az élő szervezetnek. Az energiaátadás módja függ a sugárzás típusától (alacsony vagy magas LET érték, foton- vagy részecskesugárzás.) A röntgen és  $\gamma$  sugárzás ritkán, míg az  $\alpha$  és neutron sugárzás sűrűn ionizál. Ez utóbbiak nagyobb helybéli kárt okoznak, mint az előbbiek. Az egyenértékű dózis azt adja meg, hogy különböző típusú sugárzások milyen dózisa okoz azonos mértékű hatást.

A magas LET értékű sugárzások egyenesen a DNS-t roncsolják, míg az alacsony LET értékű sugárzások indirekt módon, szabad gyökök képződésén keresztül károsítják a DNS láncot.

A szervezetben nincsenek speciálisan a sugárzásra reagáló rendszerek, a különböző stresszhelyzetekre való reakciók útvonalain történik a jelátvitel és a károk javítása. A sejtek DNS-e az osztódási ciklus folyamán a legérzékenyebb. A javítás a homológ és nemhomológ rekombináció során történik.

Egy sugárbaleset esetén minden információt össze kell gyűjteni. A biodozimetria a biológiai válaszból becsüli meg a sugárzás dózisát. Az ideális módszer sugárzás-specifikus, alacsony háttérű és szórású, dózis-hatásra kalibrálható, hosszantartó hatást mér, könnyű a mintavételezés és gyorsan jutunk eredményhez és aránylag könnyen kiszűrhetőek a hamis pozitívok és negatívok. Ezen követelmények mindenikének megfelelő módszer jelenleg nem létezik.

Előfordulhat, hogy a sugárzás hatásai (hasmenés, hányás, neutrofilok számának hirtelen leesése) később jelennek meg, 2 Gy alatt viszont nem feltétlenül. A testnedvekben lévő biokémiai anyagok változása is információval szolgálhat. A DNS kettős törések 1-3 napon belül kijavíthatók.

Előfordul, hogy a fizikai doziméter nem esik a sugárzás mezejébe vagy nem helyesen mér. Gyakran nem monitorozott emberek kerülnek a sugárzás mezejébe.

A biodozimetria kiegészíti a fizikai méréseket. A tanfolyamon valamennyi napjainkban rutinszerűen használatos módszer megismerésére lehetőség volt. Az előadók részletesen ismertették a módszereket, válaszoltak a feltett kérdésekre.

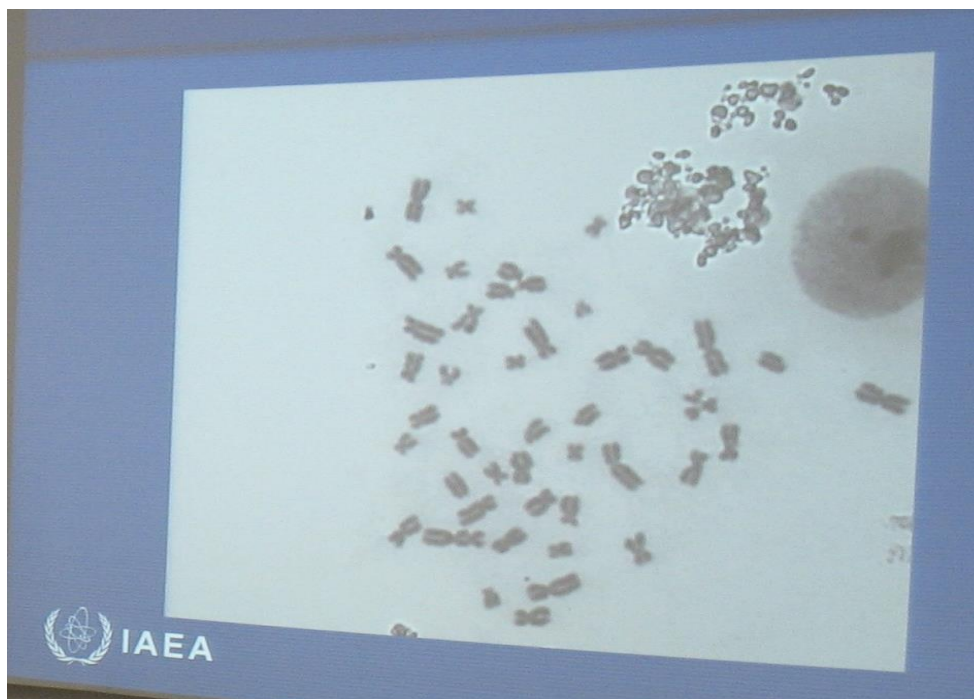
### **Mintavételezés:**

Nagyon fontos, hogy aki a mintát veszi, pár szabályt betartson: véralvadásgátlónak lítium vagy nátrium heparint kell használni, kb. 10 ml mintára lesz szükség. Az EDTA elvonja a kalciumot, a sejt emiatt nem nő. A legjobb mintavételezési időpontnak jelenleg a balesetet követő 24 órát tartják. A szállítás 2-3 napon belül történjen meg, lehetőleg el kell kerülni a szélsőséges hőmérsékleteket. A mintákra láthatóan fel kell írni, hogy nem besugározható és biológiailag veszélyes anyagot tartalmaz.

### **A DICENTRIKUS ASSAY**

Az első, ma is leggyakrabban használt módszer (1960, Oak Ridge, USA), de a legnagyobb gyakorlatot igénylő is. A limfociták által elnyelt dózist méri. Ahhoz, hogy reális eredményt kapjunk a mintavételezéssel meg kell várni, míg a sérült szervezetében keveredik a vér, viszont a balesetet követően a lehető leghamarabb kell elvégezni.

A limfociták a szervezetben nyugvó állapotban vannak, in vitro PHA-nal (fitohemagglutinin A) stimulálni kell az osztódásukat. 48 óra tenyésztés után a sejt kultúrát colcemiddel állítjuk le, amely az osztódási orsót gátolja, így a kromoszómák a kicseppentés során szétszóródnak, láthatóvá válnak. A sejteket hipotonizáljuk és metanol-ecetsavas fizálóval fixáljuk és mossuk. Tárgylemezre való kicseppentés után festjük a kromoszómákat Giemsa oldattal. A kiértékelés mikroszkóppal, szigorú kritériumok alapján történik. A teljes folyamat elvégezhető automatizáltan is.



2. ábra: A dicentrikus kromoszóma assay kiértékelése során a teljes metafázisokban jelenlévő két centromérával rendelkező kromoszómákat kell megszámolni (Fotó: NAÜ) [2].

## RETROSPEKTIV DOZIMETRIA TRANSZLOKÁCIÓ ELEMZÉSEL

Annak ellenére, hogy idővel a transzlokációk is kikopnak, kiesnek a sejtekből, időt állóbbak a dicentrikus kromoszómáknál, felezési idejük kb. 3 év. Alkalmas azokban az esetekben, mikor későn derül ki, hogy valaki magasabb dózisú sugárzásnak volt kitéve. A fluoreszcens kétszínű kromoszóma-festés után jól láthatóvá válnak az egyes kromoszómák sérülései. A módszer hátrányai, hogy költségesebb a dicentrikus assay-nál, bonyolultabb a lemezek elkészítése, a kiértékelés és több gyakorlatra van szükség hozzá.

## A KORAI KROMOSZÓMA KONDENZÁCIÓ ANALÍZIS

A dicentrikus assay 6 Gy felett nem használható, mivel ez a dózis már igen korán előli a limfocitákat, illetve nem élék túl az ezt követő sejtenyészést, nem tudunk elég értékelhető metafázist nyerni. Ennek pótlására vezették be a korai kromoszóma kondenzáció analízist (felső dózis-határa 20 Gy). A kromoszómákat kémiai indukcióval vagy mitotikus sejtekkel való fúzióval olyan esetekben kényszerítik kondenzációra, mikor a sejtek nem osztódnak, így teszik láthatóvá a kromoszómák károsodásait. A módszer előnye a gyorsasága, illetve, hogy a nagyon magas dózisoknál használható. Értékelése során a centrikus gyűrűk (ring) számából következtetnek a dózisra.

## A CITOKINÉZIS BLOKK MIKRONUKLEUSZ ASSAY

Bár nagyon hasonlít a gyakorlati kivitelezése, népszerűbb a kromoszóma assay-nél, mert könnyebben értékelhető. A kultúra leállítása citokalazin B-vel történik, amely nem hagyja szétválni a citoplazmát a sejtosztódás során, így két sejtmag alakul ki a sejtben, illetve látszanak a sejtmagból kilökődött DNS darabok apró, sejtmaghoz hasonló struktúrák formájában. Ezek kromoszóma darabok, amelyeken ritkán van centroméra. Annak ellenére, hogy kevesebb tapasztalat kell hozzá, alacsony dózisoknál megbízhatatlan eredményt ad és nagy a háttér. Gyorsasága miatt viszont egy tömegbalesetet követően ezt a módszert javasolják az áldozatok gyors szűrésére.

## ALKALMAZOTT STATISZTIKA

A limfocitákban lévő dicentrikusok diszkrét valószínűségű eloszlásúak (Poisson eloszlás). A szórást Papworth U tesztjével kell kiszámolni, ha  $U > 1$ , akkor túl nagy a szórás. Standard hibát Chi teszttel számolunk. A konfidencia-intervallum 95%-os.

A dózis-hatás görbe elkészítéséhez alacsony LET értékű sugárzás esetén tíznél több dózist kell választani 0-5 Gy között, ebből 0-1 Gy közét 4-5 dózis essen, a többi pedig 1-4 Gy közé. Magas LET értékű sugárzás esetén a maximum dózis 2 Gy. Fontos, hogy a dózis megbízhatóan legyen leadva, fizikus ellenőrzése mellett. A metafázisok elkülönítésére használjunk FPG (fluoreszcens és Giemsa) festést, biztosan csak az első metafázisokat számoljuk.

Napjainkban már léteznek olyan informatikai programok, amelyek a meglévő dózis-hatás görbe  $\alpha$  (lineáris) és  $\beta$  (quadratrikus) koeficiensének ismeretében az új adatokat illesztik a görbére, kiszámolják a szignifikanciát és a szórást (CABAS, DoseEstimate). Ha nem sikerül szignifikáns  $\alpha$  koeficiens elérni, a dózis-hatás görbe használhatatlan.

## BIODOZIMETRIA TÖMEGBALESETEK ESETÉN

Állandó biodozimetria laboratórium fenntartása költséges és sok esetben kevésbé indokolt. Számos kisebb, atomreaktorral nem rendelkező ország szerződésben áll nagyobb külföldi laborokkal. Balesetek esetén őket kérik fel.

Tömegbaleset alatt olyan nagyszámú áldozattal és kárral járó balesetet értünk, amely meghaladja a helyi hatóságok kezelési képességét. Ilyenkor a tényleges áldozatokon kívül nagy azoknak a száma is, akik pánikba esnek, aggódnak, és vannak, akiknek nincs ténylegesen szükségük ellátásra. A korai klinikai tünetek is lehetnek fals pozitív/negatívak.

Szerte a világon folyamatban van olyan együttműködési hálózatok létrehozása, amelyekben a résztvevők vállalják ilyen esetben a kölcsönös segítségnyújtást. Fontos a hálózatban résztvevő laboratóriumok és módszerek összehangolása, a résztvevők képzése. Nem szükséges a laborok akkreditálása, hiszen a legtöbb labor szabvány-módszereket használ (ISO21243, ISO 19238, NAÜ standard módszere). A NAÜ keretein belül is vannak ilyen együttműködések. Egy világszintű hálózat a RANET, újabb a RENEB, amely jelenleg a dozimetriai módszerek összehasonlítását végzi.

Tömegszerencsétlenség esetén első körben a dózist nem szükséges pontosan meghatározni, hanem dózis-intervallumokat kell megadni (0-1, 1-2, 2-4, 4-6 Gy között), a mikronukleusz assay segítségével. Az acridin-orange festés megkönnyíti az értékelést. Ez a módszer alkalmas biomonitorozásra. Szintén gyorsabb eredményt érünk el, ha mindössze 50 metafázist értékelünk dicentrikus assay esetén. Ez utóbbinak a hátránya, hogy parciális test-dózis meghatározáshoz nem elég. Tapasztalt értékelő ilyenkor használja az ún. „Quickscan” módszert: 50 első ránézésre épnek látszó metafázist értékel. Szintén hatékony módszer lehet ilyenkor a  $\gamma$ H2AX fehérje kimutatása, ám erről a módszerről nem esett szó a workshop keretei között, így bővebben egy másik közleményben foglalkozunk vele.

Az első, gyors szűrést követően a valós sérüléseket szenvedő egyének mintáit további, sokkal precízebb értékelésnek kell alávetni.

## ESETTANULMÁNYOK

A tanfolyam gyakorlati része különböző megtörtént balesetek elemzését is tartalmazta. Az előadók a Chile, Tokaimura, Latin Amerika, Georgia területén történt balesetek biodozimetriai elemzéseit és az azokból származó tanulságokat is megosztották a résztvevőkkel. Talán a legfontosabb tanulság volt, hogy a részleges (parciális) test-dózis és a nem homogén eloszlású egész-test dózis megtévesztő eredményekhez vezethet. Ez esetekben a megfelelően kiválasztott statisztikai módszerek segíthetnek.

## GYAKORLATI KÉRDÉSEK

A különböző módszerek megbeszélése során a tanfolyamon résztvevők számos gyakorlati ismeretre tehetettek szert. Néhányat a teljesség igénye nélkül sorol fel a szerző:

- Egy jól működő, nagyobb kapacitású labor körülbelül 5-6 munkaerővel dolgozik: laborvezető, két biológus és két asszisztens.
- Minden labornak saját dózis-hatás görbét kell létrehoznia valamennyi olyan sugárzástípusra, amely az adott országban használatos. Adatbázisokat kell létrehozni a nem besugározott populációkból (átlagnépesség, orvosok, sugárveszélyes munkahelyen dolgozók) – legalább 5 személyből álló csoportok bevonásával.
- Ma már a teljes dicentrikus assay automatizálva is elvégezhető, de még mindig a manuálisan értékelő rendszerek a legnépszerűbbek.

A dicentrikus kromoszoma-assay sok gyakorlati tapasztalatot igénylő módszer. A szerzőnek lehetősége volt megvitatni a gyakorlati kérdéseit más laborokból származó szakemberekkel.

**IRODALOM:**

- [1] Technical Reports Series No.405. Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. A manual, IAEA, 2001
- [2] IAEA: Cytogenetic dosimetry: Applications in preparedness for and response to radiation emergencies, IAEA, Viena, 2011.