

A hazai biológiai dozimetria szolgálatában, a kezdetektől napjainkig

Gundy Sarolta

Országos Onkológiai Intézet Sugárterápiás Központ, Klinikai Sugárbiológiai és Diagnosztikus Onkocytogenetikai Osztály, Budapest

A szerző átfogó képet nyújt az ionizáló sugárzás biológiai dózisának mérését szolgáló kromoszómadoziméter hazai bevezetéséről és alkalmazási területeiről. Közzéteszi a módszer alapját képező dicentrikus és ring kromoszómaaberrációk, valamint a különböző sugárforrások besugárzási dózisaik közötti összefüggéseket jellemző matematikai értékeket. Példákat mutat be a Magyarországon eddig előfordult baleseti, foglalkozási és lakossági sugárterhelésből származó dózisok becslésére, illetve a vélelmezett sugárexpozíció tényének kizárására. A biológiai dozimetriai módszer sugárterápiában való alkalmazását az egésztest-ekvivalens biológiai dózisok meghatározására, valamint az egyéni sugárérzékenység kimutatására mutatja be saját példákon, olyan esetekre, amelyekről a fizikai dózismérés nem nyújt elegendő információt. Megállapítja, hogy különböző daganatos betegségekben a parciális besugárzások dózis-hatás viszonyait nemcsak a terápiás dózis nagysága határozza meg, hanem a lokalizáció és a térfogat is oly mértékben módosító tényezők, hogy azonos sugárterápiás protokollok és klinikai jellemzők esetén akár 2,5-szeres egyéni érzékenységbeli különbségek is előfordulhatnak. Végül elemzi a biológiai dozimetria jövőjét, a különböző módszerek előnyeit és hátrányait az egyéni sugárérzékenység meghatározásában, ezáltal az egyénre szabott terápia biztosításának érdekében. Magyar Onkológia 59:329–337, 2015

Kulcsszavak: biológiai dozimetria, kromoszómaaberráció, sugárterápia

The author provides a comprehensive picture on introduction and application of chromosome biodosimetry in Hungary for measuring and estimation of biological doses of ionizing radiation. She describes different mathematical equations existing between the frequencies of dicentric and ring chromosome aberrations, and the different radiation doses of various radiation sources which form the basis of the method. She presents examples for estimation of biological doses received at radiation accidents, or cumulated during residential and occupational exposures in Hungary. The method of chromosome dosimetry is also offered to be used in radiotherapy because it allows the calculation of whole-body equivalent biological doses, and the determination of individual radiosensitivity as well, which cannot be fully informative by sole physical dose measurements. Dose-effect relationship in partial body irradiation might be affected by not only therapeutic doses, but also the localization and the volume of irradiated area of the body. In case of the same radiation therapy protocols and clinical features of the patients up to 2.5-fold differences in individual radiosensitivity may occur. Finally, the author analyzes the future state of biological dosimetry, the advantages and disadvantages of the methods to ensure determination of individual radiosensitivity, thereby administration of individualized radiotherapy.

Gundy S. Serving biological dosimetry for 4 decades. Hungarian Oncology 59:329–337, 2015

Keywords: biological dosimetry, chromosome aberrations, radiation therapy

Levelezési cím: Dr. Gundy Sarolta, Országos Onkológiai Intézet, Sugárterápiás Központ, Klinikai Sugárbiológiai és Diagnosztikus Onkocytogenetikai Osztály, Budapest, 1122 Ráth Gy. u. 7–9. Tel.: +36/1/224-8779, fax: +36/1/224-8776, e-mail: gundy@oncol.hu

Közlésre érkezett: 2015. március 25. • Elfogadva: 2015. szeptember 15.

BEVEZETÉS

1979–1982 között „Az ionizáló sugárzás citogenetikai indikátora” címmel egy három részből álló cikksorozatunk jelent meg az *Izotóptechnika* c. folyóiratban (1–3). A publikációk közlését megelőzően egy szűkebb sugárvédelmi szakemberekből álló hatósági grémium felkérésének tettem eleget, amely különböző biológiai dozimetriai módszerek keresésének, bevezetésének vagy kidolgozásának feladatát róttá ránk. Ezt elsősorban a paksi atomerőmű 1982–1987 között történő üzembe helyezése indokolta. A világ vezető sugár-citogenetikai laboratóriumaihoz hasonlóan ugyanis Magyarországon is létre kellett hozni egy új, saját biológiai dozimetriai szolgáltatást, ezen belül a sugárcitogenetikát, amelynek elsődleges követelménye a már ismert módszerek adaptációja, majd azok alkalmazhatóságának kiterjesztése volt.

A biológiai dozimetria az élő szervezet szintjén az ionizáló sugárzás által okozott, sugárexpozícióból származó terhelést, a dózis nagyságának becslését, az akut és távol ható következmények kockázatfelmérését szolgálja. Fő célkitűzése, hogy sugárbaeset gyanúja esetén rutinszerű eljárásban használhassunk olyan módszereket, amelyek kiegészíthetik a fizikai dózismérést, vagy azt akár helyettesíthetik. A bioindikátorok ugyanis fizikai dózismérés hiányában is képesek a sugárexpozíció tényének eldöntésére (4, 5). Ha technikai hiba folytán a fizikai dózismérő túlexponált (pl. a sugárforrás közvetlen közelébe került), vagy ha a vizsgálandó személy nem viselt egyéni fizikai dózismérőt, és sugárexpozíciót szimuláló gyanús szimptomákat produkál (pl. bőrpír, fehérvérsejtszám csökkenése stb.), el kell dönteni, hogy történt-e valódi sugárexpozíció, vagy az esemény gondatlanságból következett be, avagy tényleges „túlexpozíció” történt, ami azonnali orvosi beavatkozást igényel.

A sugárhatás biológiai indikátorainak kidolgozásakor – tekintettel az élő szervezet sokrétű élettani jellemzőire – számos követelményt kell figyelembe venni. A teljesség igénye nélkül a biológiai doziméterekkel szemben támasztott legfontosabb kritériumok a következők:

- sugárspecifitás
- gyors detektálhatóság
- lassú „lecsengés”
- jó reprodukálhatóság
- álpozitív reakcióktól való mentesség
- kis mértékű invazivitás
- gazdaságosság

Többéves munka után a sugárbiológiai és sugárvédelmi kívánalmaknak megfelelően sikerült megteremteni és bevezetni azt a módszert, amely a mai napig nemcsak a hazai, hanem a nemzetközi biológiai dozimetriamódszer-arszenál egyik legelterjedtebb és mind ez idáig a legpontosabb eszköze (4–6). Ez a módszer az ún. „kromoszómadozimetria”, amelynek ta-

pasztalatait, felhasználási területét, feltételeit, lassan 4 évtizedes munkásságom és munkatársaim közreműködése alapján e közleményben szeretném összefoglalni, régi és eddig még nem közölt példák felsorolásával. A „kromoszómadozimetria” ötvözi a különféle citogenetikai módszerek elsajátítását, a sugárzással indukált kromoszómafragilitás rutinszerű értékelését és a sugárbiológia mellett figyelemmel kíséri a sugárfizika és a fizikai dozimetria törvényszerűségeit is.

A KROMOSZÓMAABERRÁCIÓK ÉS A DÓZIS-HATÁS VISZONYOK: A KROMOSZÓMADOZIMETRIA ALAPJA

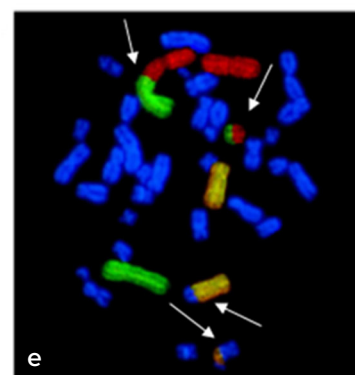
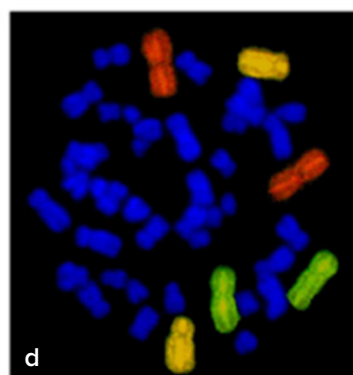
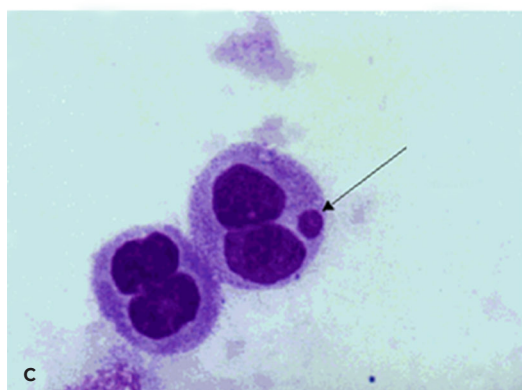
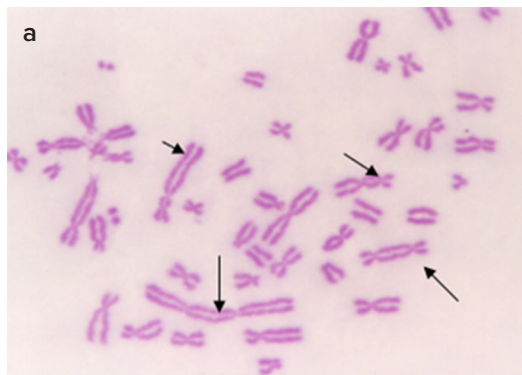
Az eljárás a sugárhatásra kialakuló specifikus konfigurációjú kromoszómaaberrációk, a di- és policentrikus és gyűrű alakú (ring) kromoszómák (1.a, b ábra) gyakorisága és az ionizáló sugárzás dózisa között fennálló matematikai összefüggéssel jellemezhető.

A dózis-hatás összefüggések meglétét az a felismerés szolgálta, hogy az ugyanakkora dózissal *in vivo* (teljestest-besugárzásból származó) és *in vitro* (kísérletesen) indukált kromoszómaaberrációk száma nagyjából megegyezik (7, 8). Tehát, ha a perifériás vérmintákból *in vitro* körülmények között néhány cm^3 -nyit különböző sugárforrásokkal és dózissal besugarazunk, majd a tenyésztett limfocitákból nyert dicentrikus és ring kromoszómaaberrációk gyakoriságát a besugárzó dózisok függvényében egy koordináta-rendszerben ábrázoljuk, az így nyert kalibrációs görbék paraméterei teljestest-ekvivalens biológiai dózis mérését teszik lehetővé. Alacsonyabb dózisoknál (0–2 Gy) ez az összefüggés lineáris, magasabb dózisoknál kvadrátikus, így a másodfokú polinommal jellemezhető egyenleteket az $Y=a+bD+cD^2$ összefüggéssel írhatjuk le, ahol „Y” a dicentrikus+ring aberrációkat jelzi, „a” a dicentrikus és ring aberráció/sejt kontroll, vagyis a háttér értékeit jelenti, „b” és „c” pedig a matematikai összefüggés együtthatója, „D” a dózis.

Alacsony lineáris energiaátadással (LET) járó sugárcitogenetikai történések ezzel az egyenlettel jellemezhetők, sőt, ezek relatív biológiai hatékonysága (RBE-értéke) is megközelítően azonos. Magas LET-értékű sugárzások esetében (protonok, különböző energiájú neutronok, általában a korpuszkuláris sugárforrások vagy a radionuklidok) az RBE-érték magasabb. Ezt a 14,9 MeV energiájú gyors neutronokra számított dózis-hatás értékeink és az $Y=a+bD$ lineáris összefüggést mutató egyenlet magasabb „b” együttható numerikus értéke is kifejezi (1. táblázat), ami a direkt sugárhatás következtében kialakuló, dominánsan nagyobb arányú DNS kettős töréseknek köszönhető.

Tekintettel arra, hogy a sugárterápiás gyakorlatban a korábbi ortovoltos besugárzást a megavoltos besugárzási források, számos esetben radionuklidok alkalmazása váltotta

1. ábra. A sugárhatás citogenetikai indikátorai. A nyíl a dicentrikus **(a)** és ring **(b)** kromoszómákat jelzi. **c)** Mikronukleuszt nem tartalmazó (bal alsó) és mikronukleuszt tartalmazó (nyíllal jelölt) binukleált sejtek. **d-e)** 3 különböző színnel jelölt kromoszómapár FISH-festéssel. **e)** A piros és a zöld régiók közötti kicserélődés transzlokációt jelez. A sárga kromoszómáról letört fragmens szintén transzlokálódott



fel, néhány egyéb sugárforrásra is dolgoztunk ki kalibrációs görbéket (9), melyek paramétereit itt mutatjuk be.

Az ionizáló sugárzás dózis-hatás összefüggésének megállapítása mellett az orvosi diagnosztikai és terápiás eljárások fejlesztésében tehát nagy segítséget jelent az adott sugárforrás relatív biológiai hatékonyságának meghatározása, hiszen az ALARA elv (as low as reasonably achievable), vagyis a legbiztonságosabb sugárterhelés tervezéséhez ezek az információk kulcsfontosságúak. Az RBE meghatározásához a 250 kV röntgen-, vagy a ^{60}Co -gamma-forrást veszik figyelembe referenciaalapul. Példánkban a 14,9 MeV gyors-neutronok esetében pl. az RBE-érték 2,4-szer magasabb, mint a referencia-sugárforrásoké. Mindezt szem előtt tartva, amikor biológiai dózisbecslést végzünk, akkor általában ^{60}Co -gamma- és egésztest-ekvivalens dózisokra vonatkoztatunk, vagyis a szerv vagy szervezet által elnyelt sugárenergia nagyságát úgy adjuk meg, mintha a számított dózis az egész testet érő sugárexpozíció következménye lenne.

Ennek jelentősége az ún. parciális testbesugárzások vagy a kevert sugárforrások (pl. protraált vagy akut+radionuk-

lid sugárzások) esetében van. Ha a testnek csak egy bizonyos részét éri sugárhatás vagy az nem egyenletes eloszlású energaelnyelésből származik, akkor viszont korrekciós faktorok

1. táblázat. Különböző sugárforrással *in vitro* besugárzott humán perifériás vér limfociták dicentrikus+ring kromoszóma-aberrációi. A dózis-hatás összefüggések numerikus paramétereit

Sugárforrás	a	b	c	r ²
250 kV röntgen	-0,034	0,075	0,043	0,996
^{60}Co -gamma	-0,017	0,082	0,044	0,994
6 MeV röntgen	0,045	-0,079	0,071	0,996
23 MeV röntgen	-0,022	0,065	0,047	0,998
14,9 MeV gyors neutron*	-0,021	0,175		0,998

A dózis-hatást jellemző paraméterek lineáris-kvadratikus ($y=a+bD+cD^2$), illetve lineáris* ($y=a+bD$) függvényekkel való közelítése kínálja a legszorosabb konfidenciaintervallumot. A besugárzási dózisok: 0,10; 0,25; 0,50; 1, 2, 3, 4, 5, 6 Gy, a neutronbesugárzás pedig 0–1,14 Gy tartományon belül, 8 besugárzási pontban történt. A paraméterek részletes magyarázata a szövegben található.

2. táblázat. A kromoszómadozimetria baleseti, foglalkozási és lakossági alkalmazási területei

A vizsgálat indikációja	Fizikai (vagy becsült) dózis (Gy)	Dicentrikus +ring (%)	Biológiai dózis (Gy)	Vélemény
1. 111 MBq aktivitású ¹³¹ I izotópot tartalmazó ampullát bontott, a filmdozimétere magas értéket mért	1,00	1	<0,10	Baleseti expozíció nem történt
2. ¹⁹² Ir forrású ipari defektoszkóp meghibásodása, magas fizikai dózisérték	1,38	14	0,8–1,0	Baleseti túlexpozíció történt
3. ¹⁹² Ir forrás, ipari defektoszkóp meghibásodása, magas fizikai dózisérték	1,0	0	<0,10	Baleseti túlexpozíció nem történt
4. 10 éven át neutrongyorsítón dolgozott, majd gyermeke spina bifida diagnózissal született	ismeretlen	0	<0,10	Baleseti túlexpozíció nem történt
5. Röntgentechnikus, rutin hematológiai szűrésen magas leukocitaszám	Ismeretlen	0	<0,10	Baleseti túlexpozíció nem történt, így további orvosi vizsgálatra került sor, ami Hodgkin-lymphomát igazolt
6. Sugárveszélyes munkahelyen dolgozók szűrése (176 személy)	A kumulált dózis 5–30 év között <0,02 Gy/év	Csoportátlag:0,28	<0,10	OR: 1,838 (1,246–2,711) P=0,003 A sugárhatást jelző dicentrikus+ring aberrációk előfordulása a kontrollban szignifikánsan alacsonyabb
7. Kontrollszemélyek szűrése (627 személy)	Csak lakossági átlagos terhelés	Csoportátlag:0,15	<0,10	

alkalmazását ajánlják, amire mind ez idáig számos matematikai modellt dolgoztak ki (10–13). A modellek nagy része tekintetbe veszi a kromoszómaaberrációk Poisson-eloszlását vagy az attól való eltérést (14, 15). Ilyen esetek leggyakrabban a sugárbesugárzásokban vagy a sugárterápiás kezelések során fordulnak elő. Amikor a besugárzás ideje alatt a besugárzott térfogaton az egyébként G₀ illetve recirkulációs fázisban lévő limfociták áthaladnak (4), az individuális sejtek eloszlása a véráramban egy idő múlva kiegyenlítődik. Az *in vitro* körülmények között osztódásra serkentett limfociták kromoszómái pedig mint parányi doziméterek fogják „mérni” az abszorbeált dózist (16). Klasszikusan indikátorként, jól behatárolható körülmények között pedig doziméterként a ⁶⁰Co-gamma egésztest-ekvivalens dózissal fejezzük ki az elnyelt sugárenergia károsító hatásának mérését.

BALESETI, FOGLALKOZÁSI EREDETŰ ÉS LAKOSSÁGI SUGÁREXPÓZÍCIÓK BIOLÓGIAI INDIKÁTORA VAGY KROMOSZÓMADOZIMÉTERE

A 2. táblázatban néhány olyan alkalmazási területet foglaltunk össze, ami tulajdonképpen a biológiai dozimetriai módszerek bevezetését egyáltalán indokoltá tette. A felsorolt 7 eset közül a fizikai dózisméréssel jól egyező biológiai dózist mértünk a 2. esetben. A többi esemény alkalmával a biológiai dozimetria segítségével állapíthattuk meg, hogy

a fizikai doziméter mutatott-e fals pozitivitást (1. és 3. eset), vagy a körülmények, amelyek baleseti expozícióra utaltak, nem álltak fenn (4., 5. eset). A dicentrikus+ring aberrációk számolása a sugárveszélyes munkahelyen dolgozók munkahelyi szűrése is alkalmas módszer (6. sor). A 176, sugaras munkakörben dolgozó személy fizikai dózismérése alapján a vizsgált 5–30 évig terjedő időszakban ugyan soha nem történt dóziskorlát-túllépés (<20 mSv/év), azonban a csoportban a dicentrikus+ring aberrációk előfordulása csaknem 2-szer magasabb volt, mint a kontrollpopulációban (7. sor). Ez a vizsgálat a kockázatfelmérés mellett prevenciók célokat is szolgál, hiszen ahol a jelzett dicentrikus+ring aberráció előfordulása 1% felett van, az magasabb expozíciós hátteret jelezhet, így nem csak a munkakörnyezet mentesíthető a mutagén hatástól, hanem az egyéni egészségvédelmi stratégia is hatásosabb eszközökkel dolgozhat (pl. dohányzás, géntoxikus ágensekkel való kontaktus kerülése, csökkentése stb.). A munkavédelmi előírások betartásának ellenőrzése mellett ezt írja elő a 26/2000 sz. Eü. Min. rendelet is.

A SUGÁRTERÁPIÁS BEAVATKOZÁSOK SORÁN ALKALMAZOTT BIOLÓGIAI DÓZISOK MEGHATÁROZÁSA

Sugárterápiás beavatkozásoknál a besugárzástervezés általában két szempont alapján történik: a besugárzás különböző fizikai tényezőinek, valamint a besugárzandó beteg

aktuális élettani és anatómiai sajátosságainak figyelembevételével. Frakcionált, egésztest- és parciális besugárzások során azonos dózisok és besugárzandó térfogatok, valamint az egyéni érzékenység közötti különbségek, annak tendenciái szintén felmérhetők citogenetikai módszerekkel. A fizikai dózismérés (fantommérés) az egyéni reakciókat nem fedi fel. A besugárzott térfogat és a dózis nagysága, valamint a lokalizáció szerinti érzékenység mind a kezelést követő időpontokban, mind pedig a kezelés folyamán egyénileg is és csoportosan is, továbbá betegségtípusoktól függően is jól követhető a kromoszómadoziméter ^{60}Co -gamma egésztest-ekvivalens dózisok becslésével (3. táblázat).

Differenciált pajzsmirigy-tumörök esetében, ahol az klinikailag elfogadható, vagy jódzotóppal, vagy külső mezős besugárzással kezelik a betegeket. Az alternatív terápiás eljárások során nagyságrendbeli különbséget találtunk a citogenetikai eredmények, vagyis az egész testet érő, inhomogén izotópeloszlásból, de fokozott kiürüléssel járó terhelés biológiai dózisa és a külső mezős besugárzás között. Ez utóbbi modalitás nagyobb dózisterheléssel járt, mint a teljes pajzsmirigy eltávolítását követő jódzotópos kezeléssel származó expozíció. A pajzsmirigydaganatos betegek nyaki régiójában, ha csak a tumorágyat és az accessoricus nyirokcsomókat érte 50 Gy összdózisú parciális besugárzás, akkor mind az indukált dicentrikus+ring aberrációk, mind pedig az elnyelt biológiai dózis jelentősen alacsonyabb volt, mint amikor a felső mediastinum egy része is kezelést kapott (14, 15). Az egyéni érzékenységbeli különbség azonos terápiás dózisok, térfogatok és lokalizációk esetében az egyes csoportokon belül is csaknem kétszeresnek bizonyult.

Hasonló egyéni különbségeket látunk a paraaortalis-parailiacalis (PAO-PIL) régióban kezelt heredaganatos betegeknél. A nagyobb térfogatú testrészekben besugara-

zott betegeknél az egyéni érzékenység meghaladhatja akár a 2,5-szeres értéket.

A besugárzott térfogat és a lokalizációk meghatározó szerepe mellett egy külön érdekes biológiai jelenséget figyelhetünk meg. Amikor több beteg dicentrikus+ring aberrációinak csoportátlagában hasonlítjuk össze a dózisterheléseket, a 3,5-szer kisebb nyaki régióra leadott 50 Gy dózis által okozott aberráció gyakorisága szignifikánsan több sejtkárosodást okozott, mint a jóval nagyobb PAO-PIL térfogatnak 26 Gy dózissal való besugárzása. Ez vélhetően a besugárzandó területen belül elhelyezkedő nyirokcsomók mennyiségétől is függ, aminek jelentős szerepe lehet akár a második primer tumor kialakulásának kockázatbecslésében is (24).

A fentieket összefoglalva megállapítható, hogy a fizikai dózistervezés és dózismérés mögött rejtve maradnak az individuális különbségek és a dózis eloszlásának bizonyos biológiai sajátosságai. Tehát a biológiai dozimetria igen fontos kiegészítője lehet a páciensek sugárvédelmét szolgáló stratégiának is.

A SUGÁRTERÁPIA KÉSŐI HATÁSÁNAK ELŐREJELZÉSE KROMOSZÓMAANALÍZISSEL

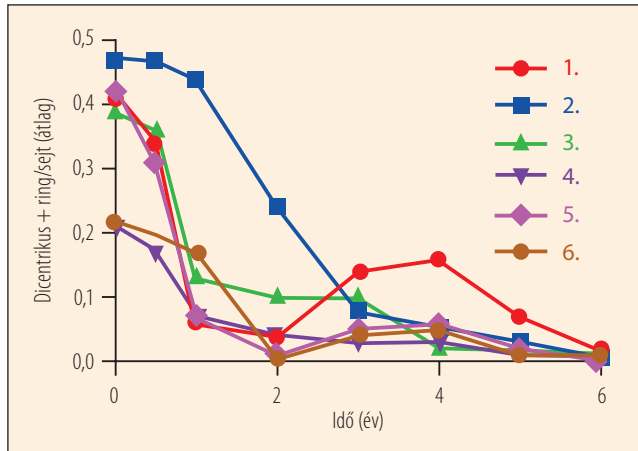
A kromoszómaaberrációk kinetikájának tanulmányozása fontos információkat nyújthat a sugárterápia későbbi radio- és géntoxikus hatásának monitorozásához és a terápia indukálta második tumorok kialakulásának kockázatbecsléséhez.

A kinetika időbeni követése a genetikailag determinált sejtpusztulás mértékéről ad képet, amit a limfocitákból nyert kromoszómák károsodása és a prekurzor-sejtek túlélése vagy pusztulása (az egy sejtre jutó dicentrikus+ring aberrációk aránya) alapján állapíthatunk meg. Emellett

3. táblázat. Individuális variabilitás különböző lokalizációkban és dózisokkal besugárzott daganatos betegek esetében

Betegcsoport (vizsgált személyek száma)	Dicentrikus+ring / sejt min–max egyéni értékek	Dicentrikus+ring csoportátlag $\pm$ SD	Egésztest-ekvivalens becsült biológiai dózis (Gy)	Fizikai dózis
Pajzsmirigydaganat / besugárzott térfogat / *50 Gy összdózis				
1. ^{131}I /izotópinkorporáció (24)	0,00–0,02	1,60 $\pm$ 0,89	<0,20	1,8–4,8 GBq
2. Tumorágy + bilaterális parajuguláris nyirokcsomó-regió* 500 cm ³ (16)	0,11–0,31	19,3 $\pm$ 7,1	1,01–1,96	50 Gy
3. Tumorágy + bilaterális parajuguláris nyirokcsomó-regió + felső mediastinum* 1500 cm ³ (10)	0,21–0,55	44,6 $\pm$ 14,6	1,53–2,79	50 Gy
Heredaganat / besugárzott térfogat / 26 Gy összdózis				
1. PAO-PIL fordított fél Y 5000 cm ³ (26)	0,17–0,47	34,7 $\pm$ 11,1	1,34–2,54	26 Gy
2. PAO-2 PIL / fordított Y 6500 cm ³ (18)	0,13–0,56	35,7 $\pm$ 14,5	1,12–2,80	26 Gy

2. ábra. Dicentrikus+ring aberrációk eliminációja a perifériás vér limfocitákból. Heredaganatos betegek dicentrikus+ring kromoszómaaberrációinak kinetikája, a PAO-PIL régió 26 Gy besugárzása után, 0,5–6 év időintervallumban



a limfociták féléletidejére vonatkozóan szintén információk nyerhetők, ami különösen a csontvelői dózis (a prekurzor-sejtek) érintettségére vonatkoztatható.

Ezt besugárzott heredaganatos betegek perifériás vér limfocita kromoszómaaberrációinak reparációjával, illetve eliminációjával modelleztük. Minthogy a kromoszómaaberrációk és a rákkockázat közötti kapcsolat egyértelmű fennállását a Rákkockázat Biomarkerei (Cancer Risk Biomarkers) c. európai konzorciumi munkánkban egyértelműen bizonyítottuk (25), megállapítottuk, hogy a kromoszómakárosodások mértéke fordítottan arányos a szervezet repairkapacitásával, vagyis minél több az aberráció, annál nagyobb a rákkockázat, ami a repair elégtelenségének, ezáltal a genetikai instabilitásnak a következménye.

Hat beteg dicentrikus+ring aberrációinak kinetikáját követvük a sugárterápia befejezését követő 0,5–6 éven keresztül (2. ábra). A sugárhatást kórismező dicentrikus+ring aberrációk számának feleződése alapján megállapítottuk, hogy az általában már az első év végére bekövetkezhet, de egyes esetekben később alakul ki. Ez a jelenség arra utal, hogy a limfociták féléletideje is egyéni variabilitást mutat. Ezek a klinikai vizsgálati eredmények a retrospektív baleseti dozimetriában is hasznosíthatók, vagyis a sugárterápiás „modellek” a baleseti dozimetria finomítására használhatók.

EGYÉB CITOGENETIKAI INDIKÁTOROK

Mikronukleuszok (MN)

Az ionizáló sugárzás okozta dicentrikus és ring kromoszómaaberrációk értékelése mellett érdemes szót ejteni néhány más citogenetikai technikáról is. Ezek közül leg-

ismertebb és talán másodikként leginkább elterjedt az ún. mikronukleuszteszt. A mikronukleuszok olyan intakt kromoszómákat vagy acentrikus kromoszómafragmenseket tartalmazó képletek, amelyek egy speciális anyag, az ún. citokalazin-B blokkoló hatását követően a mitózis ana- és telofázisa során nem kerülnek át egyik utódsejt magjába sem, hanem önálló képletként a sejt citoplazmájában maradnak (1.c ábra). Interfázisos sejtekben viszonylag gyorsan számolhatók, mind limfocitákból, mind csontvelői sejtekből (17). Ugyanabból a sejtenyészetből még értékelhetők az ún. nukleoplazmahidak is, amelyek a dicentrikus és ring kromoszómák gyakoriságával viszonylag jól korrelálnak, vagy az ún. nukleáris rügyek (nuclear buds), amelyek valamilyen génamplifikáció következményei (18).

Sugárcitogenetikai szempontból inkább csak az ún. binukleáris sejtekben elhelyezkedő mikronukleuszgyakoriságot számoljuk, rendszerint 1000 sejtben, mely a dózissal szintén nő, és az összefüggés a dicentrikus+ring aberrációkhoz hasonlóan lineáris-kvadrátikus egyenlettel jellemezhető. Amíg azonban a dicentrikus+ring aberrációk érzékenysége 0,10 Gy-től 6,0 Gy-ig nyújt elfogadhatóan pontos információt az elnyelt dóziszról, addig a mikronukleuszok 1 Gy alatti dózisoknál számos egyéb ágens (kemikáliák, egyéb aneu- vagy klasztogének) hatására is megjelennek, és általában csak 4,0 Gy-ig érzékenyek (19). A módszer előnye ugyanakkor, hogy gyorsan számolható mind manuálisan, mind automatizálható módszerrel.

Stabil kromoszómaaberrációk, a transzlokációk és a fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) módszer

Míg a dicentrikus és ring kromoszómákat instabil elválásoknak tartjuk, amelyek a sugárexpozíciót követően a limfociták életidejével arányosan eliminálódnak a perifériás vérből (a féléletidő feltételezhetően 3 év), a stabil kromoszómaaberrációk, pl. a transzlokációk, hosszú éveken át perzisztálnak, ezért a régebben bekövetkezett, ún. retrospektív biológiai dózisbecslést is szolgálják. Ugyancsak indikátorai lehetnek a hosszan fennálló krónikus sugárexpozíciónak is.

Biológiai dozimetria céljára csak a genom egy részének (általában 2-3 kromoszómapár) fluoreszcens festékekkel való jelölését végzik el (1.d, e ábra). Az egész genomra extrapolált transzlokációs eseményeket pedig speciális matematikai képletekkel kalkulálják (20). Minthogy a genomnak csak egy részére számolható az elnyelt dózis, a módszer sok hibát is rejt magában, mert számos aberráció rejtve maradhat a kalkuláció során. Ezenkívül a technika sokkal munkaigényesebb, mint a dicentrikus+ring kromoszómák értékelése, és a teljes kromoszómák festéséhez a fluoreszcens próbák meglehetősen drágák.

Ugyancsak FISH módszerrel követhetők nyomon a dicentrikus kromoszómák és a transzlokációk megkülönböztetésére alkalmas pan-centromerikus FISH-próbák, azonban pl. a 7-es vagy 14-es kromoszómapárok festését feltétlenül kerülni kell ez esetekben, mert számos immunológiai kórképpel interferálhat az eredmény, vagyis a módszer sugárspecifitása alacsony (21).

Korai kromoszómakondenzáció (premature chromosome condensation, PCC) analízis

A dicentrikus+ring aberrációkat, valamint a transzlokációkat a limfociták phytohemagglutinin (PHA) mitogénnel való *in vitro* osztódásra való serkentése után, mindig az 1. sejtciklus után kell értékelnünk, mert a későbbi sejtosztódások az aberrációk eliminációjához vagy a sejtek pusztulásához vezethetnek. Ismert, hogy a G0 fázisban lévő limfociták nem egyszerre lépnek be az osztódási fázisba, részben azért, mert a sejtek PHA-kötő képessége sem egyforma, részben pedig azért, mert magasabb dózisoknál a sejtpusztulás mértéke nagy. Így jelentős mitotikus késés fordulhat elő, aminek következtében az elnyelt dózis meghatározása alulbecsültté válik (22). Ezt elkerülendő, PHA-stimuláció nélkül, ún. „intakt” limfocitákat fuzionáltatnak mitózis fázisában lévő kínai hörcsög ovariumsejtekkel, egy fuzionáló szer, a polietilén-glikol (PEG) jelenlétében, amelynek hatására a limfociták kromoszómái a PHA perturbáló hatása nélkül azonnal vizsgálhatók. A módszer előnye, hogy a kromoszómaaberrációk közvetlenül a sugárhatás után már láthatók, az expozíció hatása nagy dózistartományban, 0,2–20 Gy között kimutatható, és a jelenség szinte teljes mértékben sugárspecifikus. Nem csak a dicentrikus, ring és transzlokációs formák, hanem az egyéb kromoszómaaberrációk kimutatására is alkalmas a módszer. Még pontosabbá tehető az eljárás, ha azt FISH-festéssel is kombinálják (23). Külön nagy előny, hogy részleges testbesugárzások esetén a PCC pontosabb képet ad, mint a dicentrikus+ring, vagy a mikronukleusz módszer.

A fenti citogenetikai indikátorok közül elméletileg a legnagyobb remény talán a PCC módszer alkalmazásához fűzhető, de a gyakorlati alkalmazásról sokkal kevesebb információ áll még rendelkezésünkre, mint a dicentrikus+ring aberrációk analízisének esetében.

A JÖVŐ: AZ EGYÉNI SUGÁRÉRZÉKENYSÉG VIZSGÁLATA, MINT A BIODOZIMETRIAI KUTATÁS KULCSA

A biológiai doziméterek használatának egyik legfontosabb követelménye a minimális invazivitás mellett történő alkalmazás. Ennek a feltételnek azért is nagy fontosságot tulajdonítunk, mert egyrészt nem csak a biológiai dozimetria

követelményeit kell, hogy kielégítse, hanem mert ez a preventív medicina kívánalmainak is egy nagyon meghatározó, integráns részét képezi populációs szinten. A genom károsodása/károsítása ugyanis nem csak az egyedfejlődés normális folyamatának felborulásában, hanem a degeneratív betegségek kialakulásának patológiájában is vitathatatlan szereppel bír. A világban ma már egyértelműen elfogadott trend a személyre szabott medicina alkalmazása, amihez az egyetlen elképzelhető pontos biomarker az egyén DNS-ének vizsgálata (26, 27). Ehhez elengedhetetlen az individuális sugárérzékenység sajátosságainak megállapítása és az ezzel kapcsolatos információk bővítése. Az egyéni sugárérzékenység magában foglalja a normális szövet sugárérzékenységének vizsgálatát is.

Az eddigi kutatási irányok áttekintése alapján ez eddig általában 2-féle módon történt:

1. A sugárexpozícióra hiperérzékeny – főleg recesszív genetikai betegségekben szenvedők, pl. ataxia teleangiectasia, Bloom-szindróma, xeroderma pigmentosum stb. betegek sejtjeinek reparációs elégtelenségeit követő vizsgálatok, illetve a DNS-károsodás mellett a reparáció blokkolása vagy elősegítése alapján a sugárhatás celluláris mechanizmusainak megértése (28, 29).

2. Az *in vitro* vizsgálatokból levonható ún. „derivatív” érzékenységi tesztek prediktivitásának értékelése (a sugárhatás *in vitro* vizsgálata vér-, bőrfibroblaszt- vagy egyéb sejt-kultúrákban) még a sugárterápiás beavatkozás megkezdése előtt (19, 27).

Ezek a vizsgálatok jelenleg még nem teljesen alkalmasak általános konzekvenciák levonására az egyéni sugárérzékenységet illetően, noha a DNS károsodása (kromoszómaaberráció, dupla szálú DNS-törés, DNS-reparáció vizsgálata) azért elég jól behatárolható korrelációt mutat az *in vitro* és az *in vivo* normális szöveti reakciók között. Azt is szem előtt kell tartanunk, hogy az eddigi vizsgálatok jobbára eset-kontroll tanulmányok voltak, számuk meglehetősen korlátozott, és mind a kontrollok, mind az esetek ilyenkor túlszelektáltak. Ezért a megállapított törvényszerűségek nem feltétlenül érvényesek az átlagpopulációkra (30).

A sugárterápia a daganatterápiában kulcsszerepet játszik, azonban a daganatos sejtek pusztulása, annak kinetikája szinte minden tumorban más és más. A betegek válaszreakciói és a kezelés mellékhatásai szintén nagy egyéni eltéréseket mutatnak.

Ennek a heterogenitásnak az okai egyáltalán nem ismertek. Pontosan emiatt fontos, hogy azokat a szubpopulációkat, amelyek a legkevésbé, vagy leginkább érzékenyek a sugárterápiára, kellően megismerhessük és különböző kockázati csoportokba sorolhassuk őket (31).

Az egyéni sugárérzékenység megállapítására az általunk eddig felsorolt citogenetikai markerek mellett még egy ígé-

retes rizikóbecslési módszer a kromoszóma teloméráinak vizsgálata. A kromoszómák e „védősapkái” a DNS-molekula TTAGGG ismétlődő nukleotidszekvenciáját tartalmazzák, s legfontosabb feladatuk a genom stabilitásának fenntartása. A kromoszómák telomérarégiója igen sugárérzékeny, főképpen azért, mert a DNS-repair-válaszuk meglehetősen atípusosan zajlik. A rövid telomérák általában érzékenyebbek a sugárhatásra, éppen ezért a hosszúságuk vizsgálata mind a sejtpusztulás, mind pedig az egyéni sugárérzékenység megítélése szempontjából igen lényeges (32, 33). Pl. a teloméra hosszúságától függően lehetne egyes frakciók számát csökkenteni vagy növelni, vagy a teloméra hosszúságát akár farmakológiai eszközökkel is befolyásolni (19).

A jövőben nagy kihívás előtt állnak a különböző molekuláris módszerek, amelyek a DNS-, RNS- és fehérje-anyagcseretermékek változásait veszik figyelembe (27). Ezek között az egyik legdivatosabb és leginkább elterjedőben lévő molekuláris biodozimetriai marker a foszforilált hiszton h2AX protein (gamma-H2AX) vizsgálata, ami a dupla szálú DNS-törések bekövetkeztekor expresszáldó fehérje. Kiterjedt vizsgálatok alapján eddig megállapítható, hogy csak a sugárhatást követő 5 órán belül mutatható ki, nagy individuális eltéréseket mutat, és általában 20 órán belül „lecseng” a reakció (34).

Egy másik és újabb lehetőség a bőr biodozimetriájában kereshető. A bőr szerepének nagy jelentőséget tulajdonítanak különösen a részleges testbesugárzások alkalmával, ahol a bőr által elnyelt dózisterhelés alapján lehet biológiai dózist becsülni. A bőr a biopszia alkalmával könnyen hozzáférhető (bár az invazivitás megkérdőjelezhető), és parciális besugárzások esetében pontosabban mér, mint a limfocita. Hasonló reményeket fűznek a hajfollikulusokban a mikronukleusz és h2AX protein együttes meghatározásához és dóziszfüggésének kimutatásához (30, 35).

Jóllehet a fenti módszerek mindenképpen előremutatóak, valószínűleg csak egy kis töredékét képezik azoknak a próbálkozásoknak, amelyek világszerte folynak az egyéni sugárérzékenység kimutatására. A dicentrikus+ring aberrációk alkalmazása a biológiai, ezen belül a citogenetikai dozimetriában viszont mind a mai napig a legtöbb információt nyújtó módszer, amely nemcsak a baleseti, hanem a sugárterápiás gyakorlatban is egymagában képes eldönteni a sugárhatás tényét, jól definiálható körülmények között az elnyelt sugárenergia nagyságát, és mindezek mellett reális képet nyújt az egyéni sugárérzékenységről. Ugyan a módszer hátránya a munka- és időigényesség, ezt azonban részben automatizált számolási módszerrel, részben az áramlásos citometriai módszer bevezetésével csökkenteni lehet. Előnyei azonban vitathatatlanok, amelyek között a legfontosabb a sugárspecifitás, a viszonylag lassú „le-

csengés”, a kis invazivitás és a gazdaságosság. A jövő kutatási irányát a baleseti dozimetriában a retrospektív dózis mérése jelentheti, amihez a transzlokációs FISH technika a legalkalmasabb, míg a PCC technika az egyik legígéretesebb citogenetikai technikának számít, amennyiben kellő számú adat áll rendelkezésünkre mind a populációs, mind pedig a sugárterápiás alkalmazást illetően.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Publikációs szerzőtársaimon kívül hálás köszönetemet fejezem ki munkatársaimnak: dr. Farkas Gyöngyi és Székely Gábor biológusoknak, Vass Nagyzezsda és Kiss Krisztina asszisztenseknek, akik a munka- és időigényes kromoszómaanalízisek értékelése során nagy rutinra tettek szert, sokéves tapasztalatukkal, biztonsággal alkalmazzák a kromoszómadozimetriát és dózisbecslést, mind baleseti, mind pedig a sugárterápia szakterületén.

Köszönet illeti dr. Lövey József klinikusi munkáját a betegek szakszerű kiválasztásában. Külön hálámat fejezem ki a besugárzási feltételek megteremtéséért és megszervezéséért a klinikai szempontból fontos ka-
librációs görbék elkészítéséhez.

IRODALOM

1. Gundy S, Farkas Gy. Az ionizáló sugárhatás citogenetikai indikátora I. Izotóptechnika 22:214–218, 1979
2. Gundy S, Farkas Gy. Az ionizáló sugárhatás citogenetikai indikátora II. Dózis-hatás kapcsolat. Izotóptechnika 23:183–189, 1980
3. Gundy S, Uray I, Varga PL. Az ionizáló sugárhatás citogenetikai indikátora III. 14.9 MeV energiájú neutronokkal indukált kromoszóma-károsodások. Izotóptechnika 25:242–247, 1982
4. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment: a manual. Technical Report No 405. International Atomic Energy Agency, Vienna 2001
5. Cytogenetic Dosimetry: Applications in preparedness for and response to radiation emergencies. International Atomic Energy Agency, Vienna 2011
6. Gundy S. A kromoszómaanalízis jelentősége a sugárvédelemben. Kandidátusi disszertáció, MTA könyvtár, Budapest 1986
7. Bender MA. Chromosome aberrations in irradiated human subjects. Ann N Y Acad Sci 114:249–251, 1969
8. Bender MA. Human radiation cytogenetics. In: Advances in Radiation Biology, Vol 3. Ed. Augenstein L, Mason R, Zelle M. Academic Press, New York 1968, pp. 2015–2075
9. Gundy S. Sugárbiológia. In: Sugárterápia, Ed. Németh G. Springer, Budapest 2001, pp. 81–91
10. Voisin P. Mathematical methods in biological dosimetry. The 1996 Iranian accident. Int J Rad Biol 76:1545–1554, 2000
11. Sasaki MS, Miyata H. Biological dosimetry in atom bomb survivors. Nature 220:1189–1193, 1968
12. Dolphin GW. Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods. International Atomic Energy Agency, Vienna 1969, pp. 215–224
13. Lloyd D, Purrott RJ, Dolphin GW. Chromosome aberration dosimetry using human lymphocytes in simulated partial body irradiation. Phys Med Biol 18:421–431, 1973
14. Katz N, Ésik O, Füzy M, et al. Külső sugárforrással vagy radiojóddal kezelt pajzsmirigybetegek citogenetikai vizsgálata. Orv Hetil 139:1521–1526, 1998
15. Gundy S, Katz N, Füzy M, et al. Cytogenetic study of radiation burden in thyroid disease patients treated with external irradiation or radioiodine. Mutat Res 360:107–113, 1996

16. Liniecki J, Bajerska A, Wyszyska K. Dose-response relationships for chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes after whole- and partial-body irradiations. Effects immediately after irradiation. *Mutat Res* 110:83–101, 1983
17. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 147:29–36, 1985
18. Fenech M. Cytokinesis–block micronucleus assay. *Nat Protoc* 2:1084–1104, 2007
19. Pernot E, Hall J, Baatout S, et al. Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. *Mutat Res* 751:258–286, 2012
20. Lucas J, Deng W. Views on issues in radiation biodosimetry based on chromosome translocations measured by FISH. *Radiat Prot Dosim* 88:77–86, 2000
21. Bauchinger M, Schmid E, Zitzelberger H, et al. Radiation-induced chromosomal aberrations analyzed by two color FISH with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pan-centromeric DNA probe. *Int J Radiat Biol* 64:179–184, 1993
22. Darroudi F, Natarajan AT, Bentvelzen PA, et al. Detection of total and partial body irradiation in a monkey model: A comparative study of chromosomal aberrations, micronuclei and premature chromosome condensation assay. *Int J Radiat Biol* 74:207–215, 1998
23. Darroudi F, Fomina J, Meijers M, et al. Kinetics of formation of chromosome aberrations in X-irradiated human lymphocytes, using PCC and FISH. *Mutat Res* 404: 55–65, 1998
24. d'Alesio V, Pacelli R, Durante M. Lymph nodes in the irradiated field influence the yield of radiation-induced chromosomal aberrations in lymphocytes from breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57:732–738, 2003
25. Bonassi S, Norppa H, Ceppi M, et al. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: Results from a pooled cohort study of 22,358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis* 29:1178–1183, 2008
26. Cedervall B, Persson L, Polischouk A, et al. Perspective on biological dosimetry from the aspect of individual radiosensitivity: the context of DNA double strand breaks and chromosomal aberrations. *Appl Radiat Isot* 52:1117–1120, 2000
27. Fenech M. Current status, new frontiers and challenges in radiation biodosimetry using cytogenetic, transcriptomic and proteomic technologies. *Radiat Meas* 46:737–741, 2011
28. Gundy S, Bender MA. Increased yields of exchanges but not of deletions in X-irradiated human peripheral blood lymphocytes following PHA stimulation. *Radiat Res* 97:519–525, 1984
29. Leadon SA. Repair of DNA damage produced by ionizing radiation: A minireview. *Semin Radiat Oncol* 4:295–305, 1996
30. Chua MLK, Rothkamm K. Biomarkers of radiation exposure: Can they predict normal tissue radiosensitivity? *Clin Oncol* 25:601–616, 2013
31. Bourquier C, Lacombe J, Solassol J, et al. Late side-effects after curative intent radiotherapy: Identification of hypersensitive patients for personalized strategy. *Crit Rev Oncol Hematol* 93:312–319, 2015
32. Barwell J, Pangon L, Georgiou A, et al. Is telomere length in peripheral blood lymphocytes correlated with cancer susceptibility or radiosensitivity? *Br J Cancer* 97:1696–1700, 2007
33. Zhong YH, Liao ZK, Zhou FX, et al. Telomere length inversely correlates with radiosensitivity in human carcinoma cells with the same tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 367:84–89, 2008
34. Anglin EJ, Salisbury C, Bailey S, et al. Sorted cell microarrays as platforms for high-content informational bioassays. *Lab Chip* 10:3413–3421, 2010
35. Bhogal N, Kaspler P, Jalali F, et al. Late residual gamma-H2AX foci in murine skin are dose responsive and predict radiosensitivity in vivo. *Radiat Res* 173:1–9, 2010