

Kis dózisok hatásának vizsgálata biodozimetriai módszerekkel

Dr. Pesznyák Csilla

BME, Nukleáris Technikai Intézet
Országos Onkológiai Intézet

A biodozimetria meghatározása

- Jelentős szerepe van a biológiai dózis meghatározásában sugárbalet esetén, ha nincs személyi doziméter és tisztázatlanok a körülmények.
- A biodozimetria tanulmányozza azokat a biológiai változásokat a besugárzott személyben, amelyek alkalmasak az adott személyt ért sugárdózis számszerűsítésére.
- A módszer a sugárzás okozta károsodásokat mutatja ki az emberi szervezetben, segítségével becsülhetők a sugárterápia okozta korai vagy késői mellékhatások is.

A biodozimetriai módszer ideális jellemzői

Elvárások a dozimetriában használt biológiai indikátorokkal szemben:

- Sugárzás-specifikus
- Nem invazív
- Reprodukálható – hosszan tartó hatás
- Relatív gyors és pontos dózisbecslés
- Szoros dózis-függés: dózis-hatás görbék
- Az in vivo és in vitro értékek összevethetők
- Könnyen kiszűrhetők a hamis negatív és hamis pozitív értékek

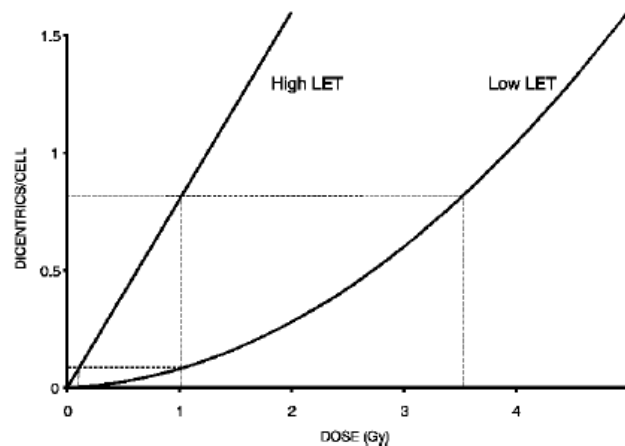
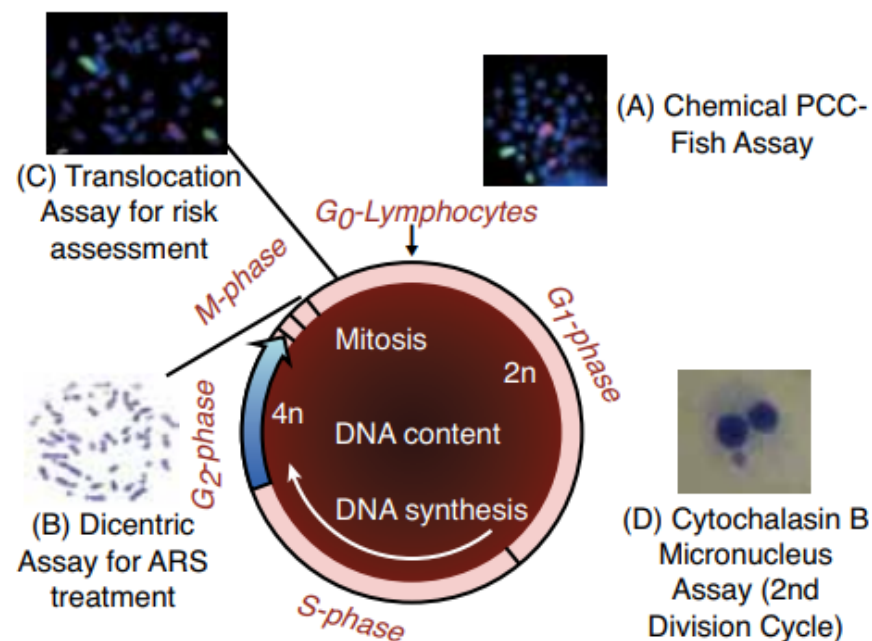


FIG. 2. Typical linear and linear quadratic dose response curves, showing how RBE changes with yield [8].

Biodozimetriai módszerek

A citogenetikai biodozimetriában alkalmazott különböző módszerek a limfociták DNS-ét ért hatások kimutatásán alapulnak, ilyenek pl.

- Dicentrikus és ring kromoszóma teszt,
- PCC próba - korai kromoszóma kondenzáció (premature chromosome condensation assay),
- FISH, transzlokációs teszt,
- Citokinézis blokkolt mikronukleusz teszt,
- γ H2Ax – gamma H2Ax hiszton fehérje teszt



ARS-Acute Radiation Syndrome

Kromoszóma ábrázolása

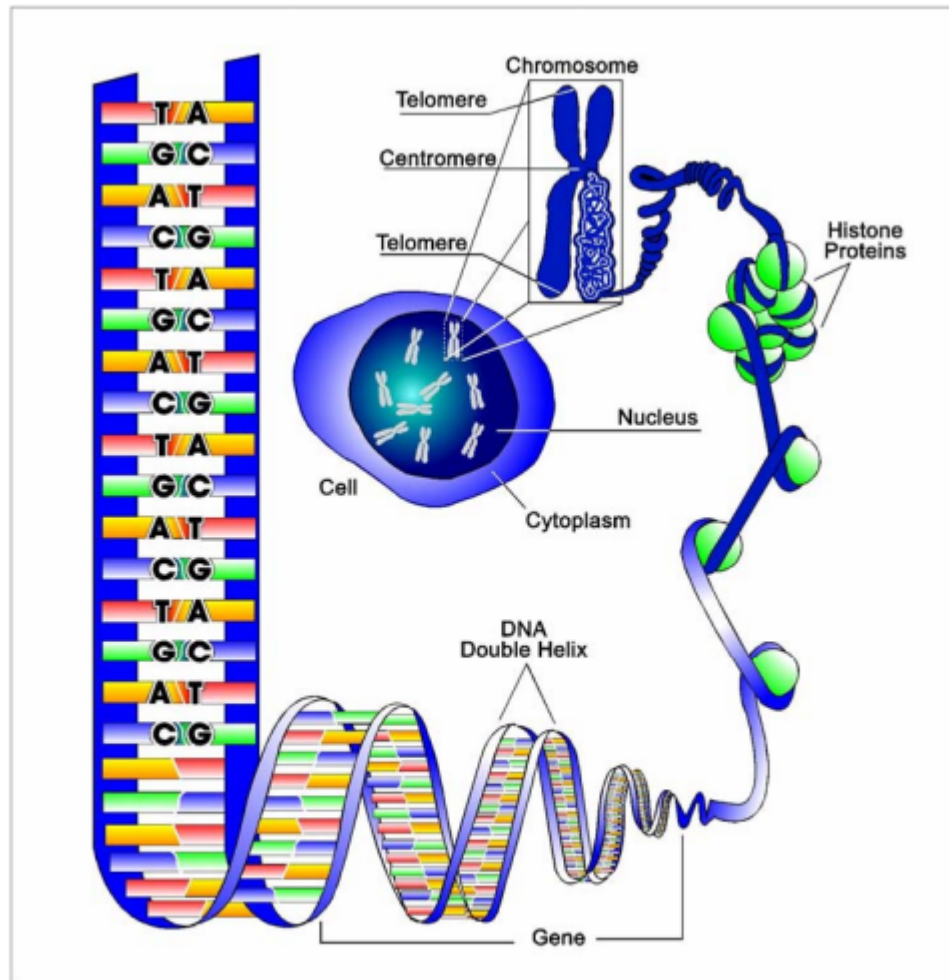
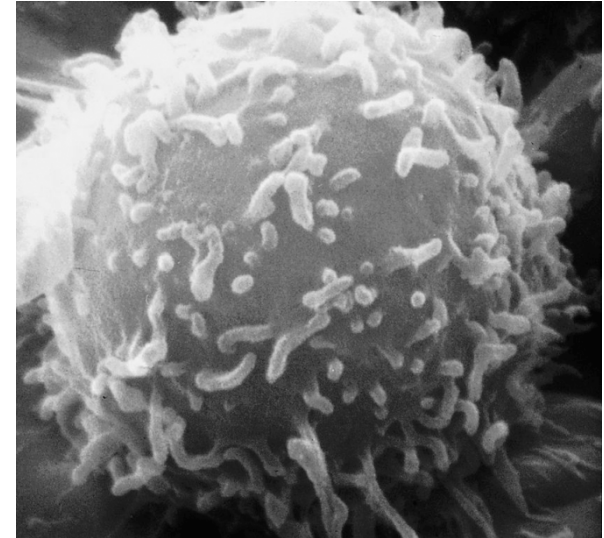


FIG. 6. Schematic illustration of the many different orders of chromatin packing that give rise to the highly condensed metaphase chromosome (courtesy REAC/TS, USA).

Biodozimetriai mintavétel

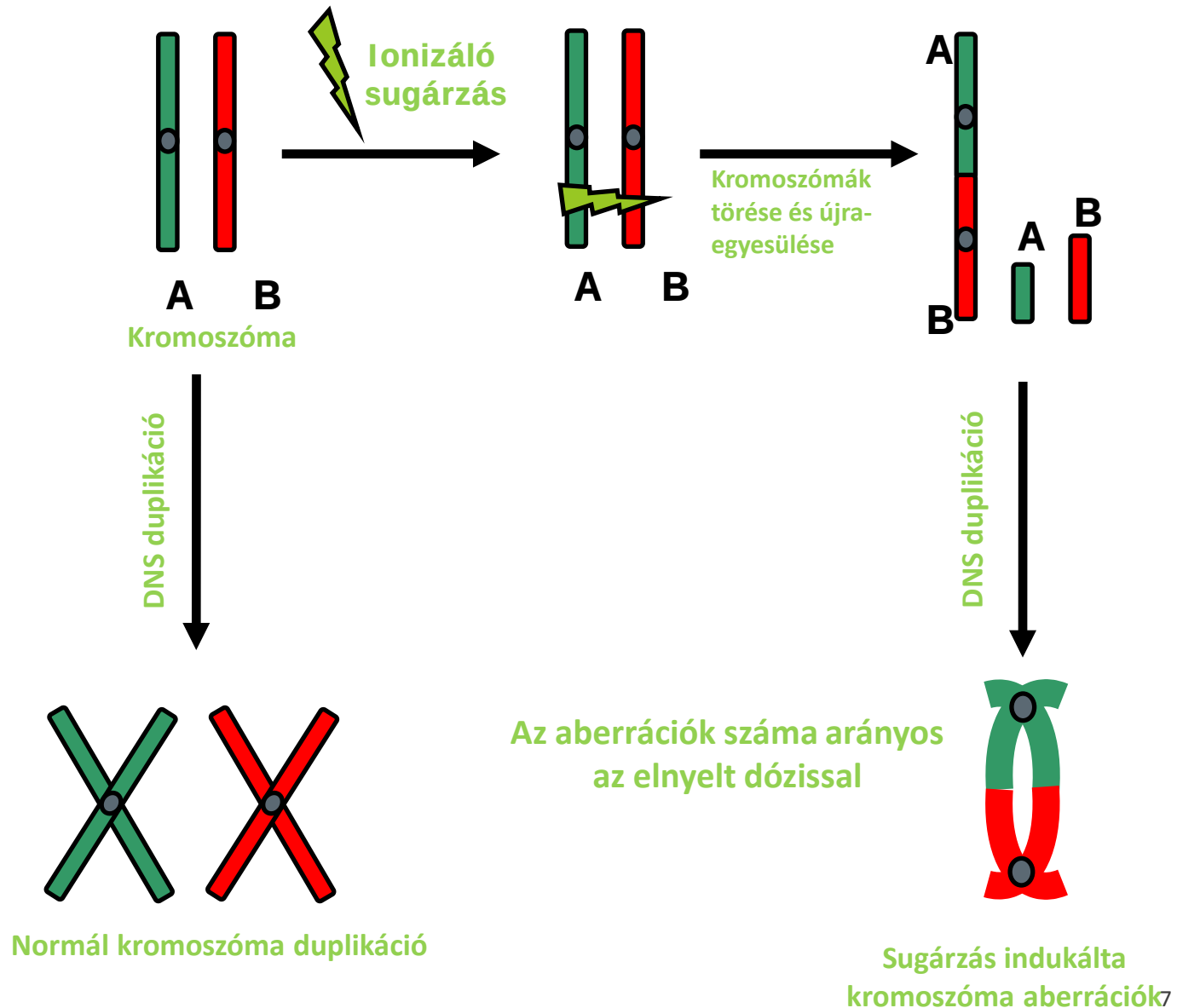
A perifériás vérből származó limfociták:

- könnyen izolálhatóak, nagy számban tenyésztethetők ,
- a vérben legnagyobb részük sejtosztódás szempontjából ún. nyugalmi fázisban van,
- parciális test- vagy egyenetlen dózis esetén a sérült és ép limfociták kb. 24h leforgása alatt egyensúlyba kerülnek – reprezentatív mintavétel.

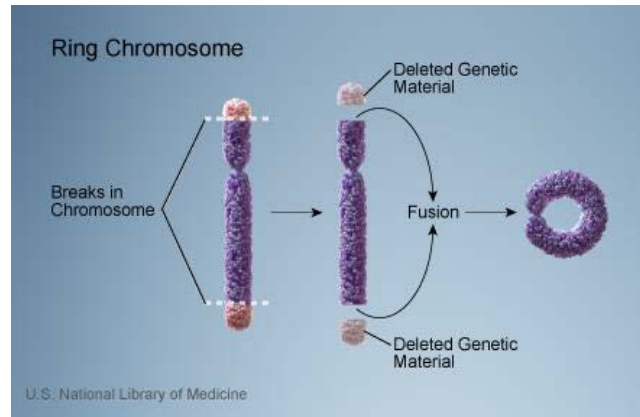
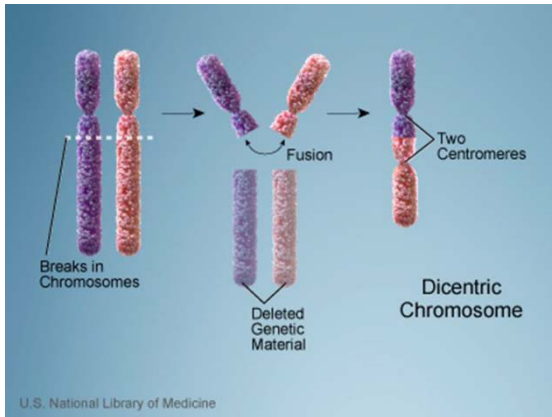


Scanning electron microscope image of human lymphocyte courtesy of Dr. Triche, US National Cancer Institute.

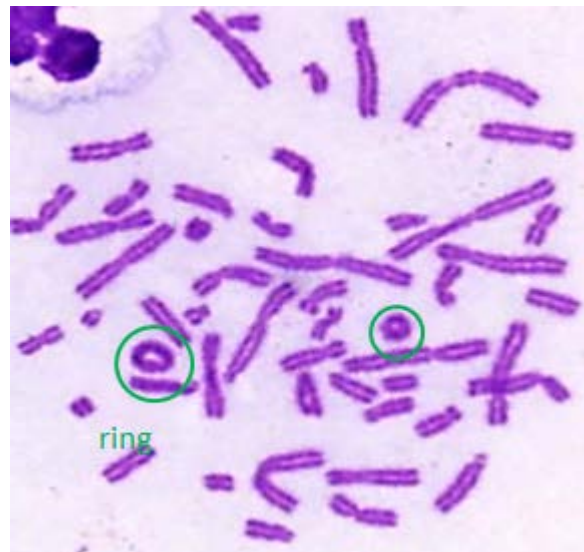
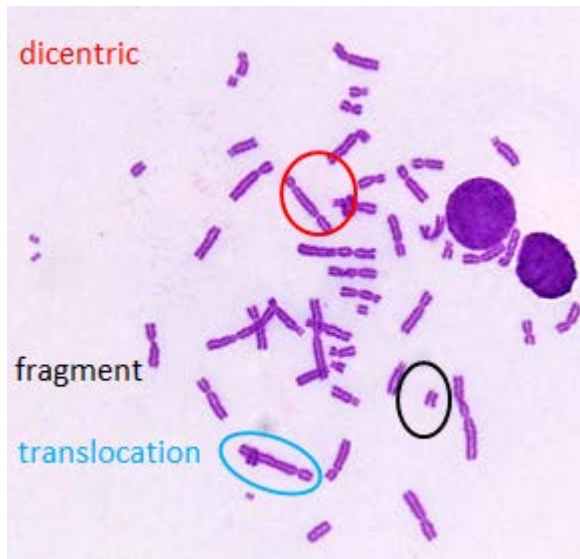
A dicentrikus kromoszóma analízis elvi sémája



Kromoszóma típusú aberrációk



<http://geneticdiseasesforlife.blogspot.hu/2010/10/can-changes-in-structure-of-chromosomes.html>



Kromatid típusú aberrációk



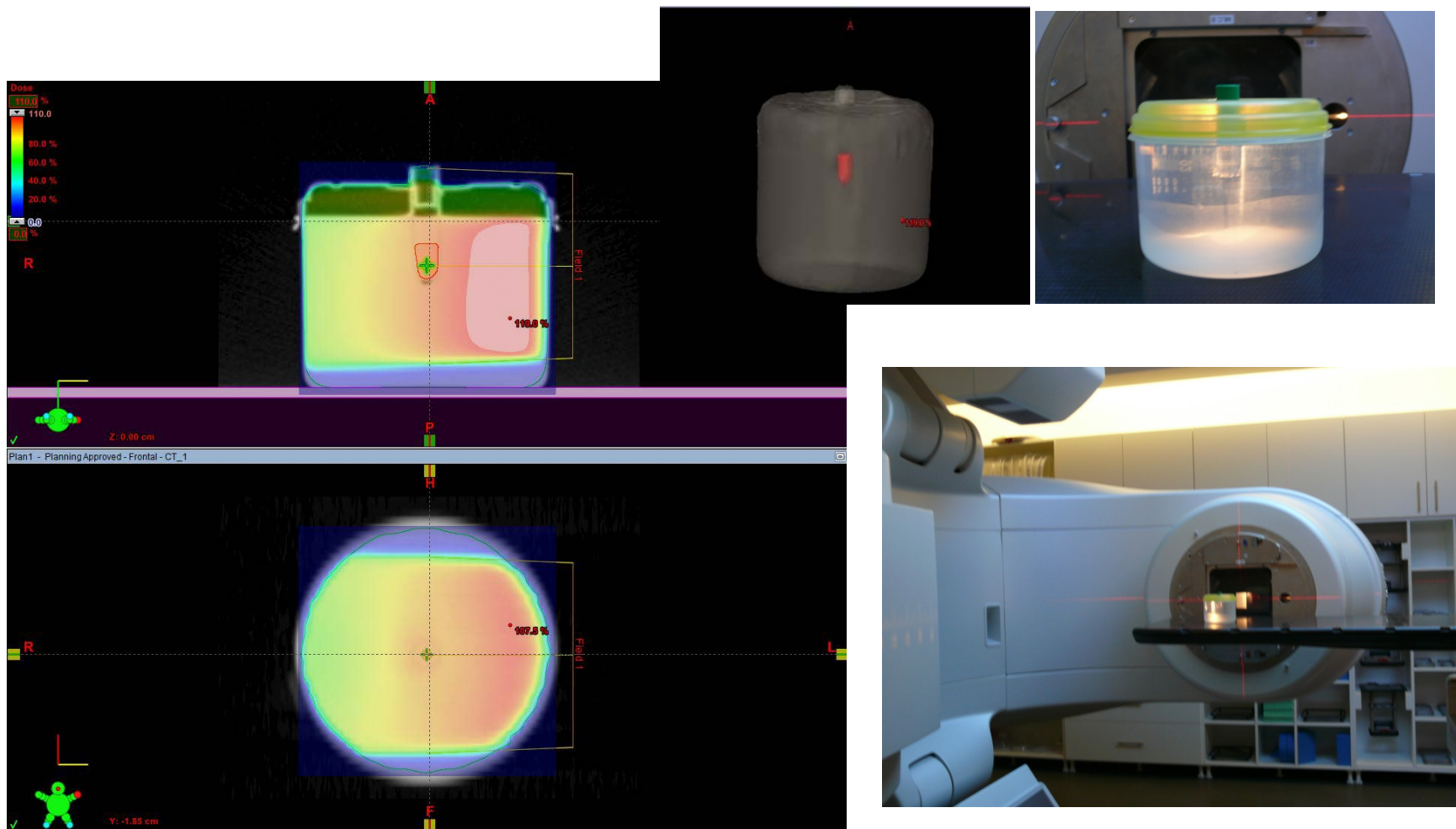
1. Kromatid kicserélődés, 2. Kromatid törés, 3. Gap

Limfocita tenyésztés

- A limfocita tenyésztés kevésbé invazív módszer, mivel az egész szervezetben cirkulál, így könnyű tenyészteni.
- A vér cirkuláló limfocitáinak két fő típusa van, a T és a B limfociták.
- A T limfociták mitogénnel pl. phytohemagglutininnel osztódásra készíthetők.
- A limfociták indukálását követő első osztódási ciklus metafázisában leállítva az osztódást jól láthatók az ionizáló sugárzás hatására kialakult DNS elváltozások kromoszóma aberrációk formájában.
- A kontroll vér (2 cső) + besugarazott vér (3 cső); limfocita tenyésztés.
- 1 dózisgörbe 1 személy véreből felvéve, 7 pontból áll. (K, 0,5; 1; 2; 3; 6; 8 Gy).
- Minden görbét 2-3-szor ismételtünk. 1 pont 200 sejt értékelésének eredménye, az értékelés mikroszkóppal történik.



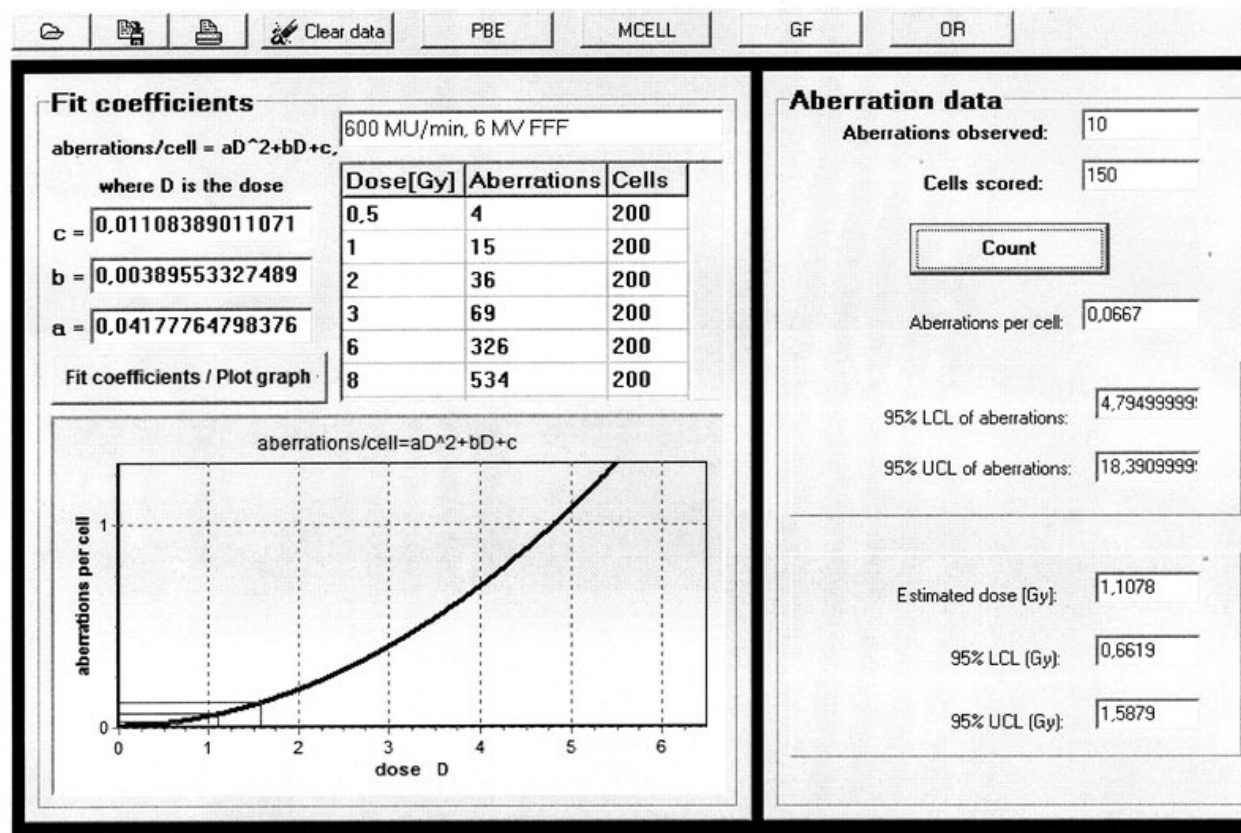
Kalibrációs görbe készítése



Kromoszóma aberrációi fotonbesugárzás esetén

Dózis [Gy]	Kromoszóma aberrációk $\pm$ SE / 100 sejt				
	Kromatid törés	Kromoszóma fragment	Dicentrikus és ring kromoszómák	Transzlokáció	Összes aberráció
0	1,50 $\pm$ 0,70	0,66 $\pm$ 0,66	1,00 $\pm$ 0,57	0	3,16 $\pm$ 1,69
0,5	2,00 $\pm$ 0,44	2,00 $\pm$ 0,95	1,60 $\pm$ 0,60	0	5,80 $\pm$ 1,77
1	2,33 $\pm$ 1,33	4,66 $\pm$ 0,88	6,00 $\pm$ 2,00	0,66 $\pm$ 0,33	13,66 $\pm$ 3,28
2	4,20 $\pm$ 1,16	13,40 $\pm$ 2,48	14,00 $\pm$ 3,86	1,80 $\pm$ 0,91	33,40 $\pm$ 5,87
3	6,66 $\pm$ 4,25	19,33 $\pm$ 4,97	31,00 $\pm$ 4,36	3,33 $\pm$ 0,66	63,33 $\pm$ 5,36
6	5,25 $\pm$ 1,75	70,50 $\pm$ 8,88	152,25 $\pm$ 12,01	11,5 $\pm$ 4,13	247,00 $\pm$ 16,41
8	4,00 $\pm$ 1,73	163,66 $\pm$ 34,50	272,75 $\pm$ 6,21	19,00 $\pm$ 6,15	469,00 $\pm$ 27,53

A dicentrikus és ring kromoszómák dóziszgörbéje, CABAS program



Deperas J. et al. CABAS –a freely available PC program for fitting Calibration curves in chromosome aberration dosimetry. Radiat.Prot. Dosimery2007;124:115-123.

FISH - Fluoreszcens In Situ Hibridizálás

A dupla szálú DNS-molekula szerkezete megfelelő körülmények között megbomlik (DNS-denaturáció), a kettős spirál szétválik, ezáltal az egyszálú DNS hozzáférhetővé válik a denaturált, fluoreszcens festékekkel jelzett DNS-próbák számára. Ezek a DNS-próbák a genom egy-egy kis szakaszát jelenítik meg.

Előnye:

- Transzlokációk kimutatására teljes kromoszóma festés lehetséges
- Retrospektív vizsgálatokra is alkalmas

Hátránya:

- A kor előrehaladtával nő a spontán transzlokációk száma
- Nagyon költséges, komoly felkészültséget és műszerezettséget igényel

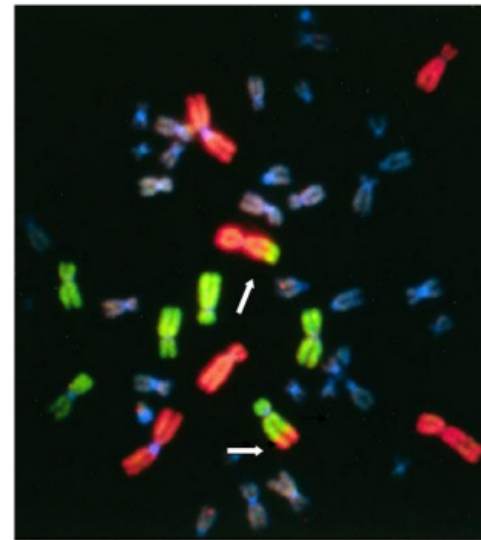


FIG. 13. A metaphase illustrating FISH-based chromosome 'painting' to detect translocations. Chromosome pairs 1, 2 and 4 are 'painted' red and chromosome pairs 3, 5 and 6 are 'painted' green. A reciprocal translocation is illustrated by the two bicolored chromosomes (2 and 5) which have exchanged segments at the ends of their long arms (courtesy Ramsey and Tucker, LLNL, USA).

PCC - Premature Chromosome Condensation (korai kromoszóma kondenzáció)

Korai kromoszóma kondenzáció (PCC) – a kromatin kondenzálódik, amikor nincs mitózisban. Az idő előtti kondenzáció indukálható interfázisban CHO (Chinese hamster ovary) vagy HeLa sejtekbe való beoltással Sendai vírus vagy polietilén-glikol (PEG) felhasználásával, ennek hatására fragmentek alakulhatnak ki az interfázisban lévő magban. Előnye: Gyors módszer, nem kell tenyészteni és nagyobb dózisok becslésére is alkalmas

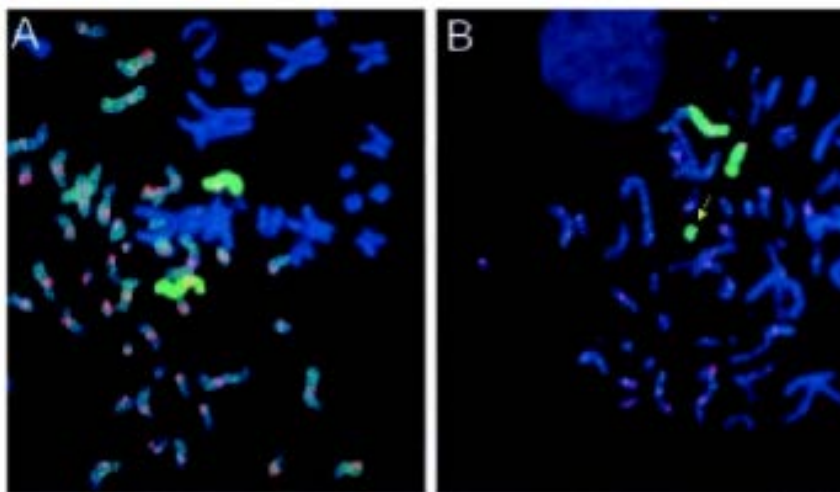
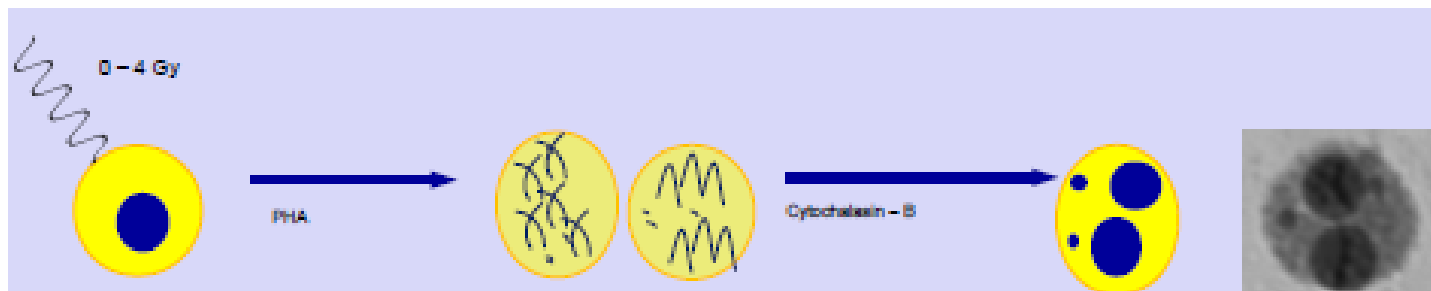


FIG. 37. PCC with double coloured FISH, the combination of chromosome paint (#8) and a pan-centromeric probe for whole genome. In unirradiated control (A) normal PCC. In irradiated cells, arrows indicate (B) excess of break in PCC.

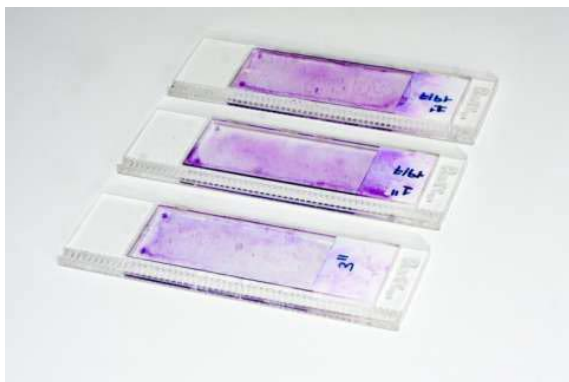
Citokinézis blokkolt mikronukleusz teszt

- A citokinézis blokkolt mikronukleusz (CBMN) teszt arra ad lehetőséget, hogy egy vérminta segítségével retrospektív módon megállapítsuk, hogy mekkora sugárdózist kapott egy páciens.
- Az osztódó limfocitákat a citokinézis elején állítjuk le, ezáltal két sejtmagvú, ún. binukleáris sejteket kapunk, amelyekben látszanak a sugárzás következtében a DNS-ből kilökődött darabok apró, sejtmaghoz hasonló struktúrák formájában.
- Ezek a módszer nevét is adó ún. mikronukleuszok (MN), melyek átlagos gyakorisága arányos az elnyelt dózissal.
- Mikronukleusz kialakulása: a sejtosztódás során egy kromoszóma fragmentum vagy teljes kromoszóma nem került át egyik utódsejtmagba sem, ennek oka a kromoszóma fragmentáció és/vagy osztódási orsó károsodása.



Citokinézis blokkolt mikronukleusz teszt

Kis dózisok esetén kiemelten fontos az, hogy minél kevesebb idő alatt minél több binukleáris sejtet tudjunk megvizsgálni, ezáltal minimalizálva az eredmény statisztikai hibáját. Erre ad lehetőséget a minták automata mikroszkópos feldolgozására (tárgylemezek automata szkennelése és képfeldolgozása).

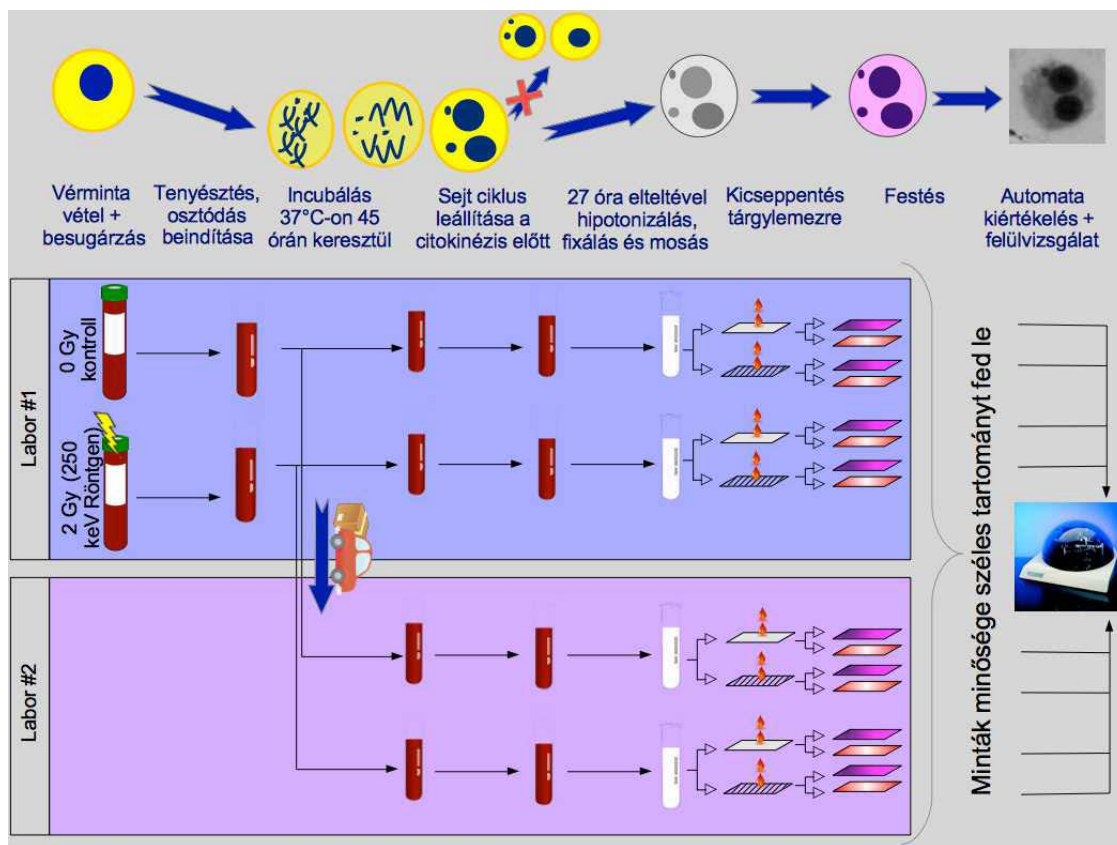


Az erre kifejlesztett Radosys Radometer-MN rendszer tesztelése során azt tapasztaltuk, hogy a NAÜ mintapreparációs protokolljának szigorú követése sem elegendő arra, hogy minden esetben garantálni tudjuk a kész mintán lévő sejtek vizuális tulajdonságainak olyan mértékű reprodukálhatóságát, amely csupán elhanyagolható mértékben befolyásolja az automata képfeldolgozás hatékonyságát.

CBMN - Minta kiértékelés, hatékonyság mérés

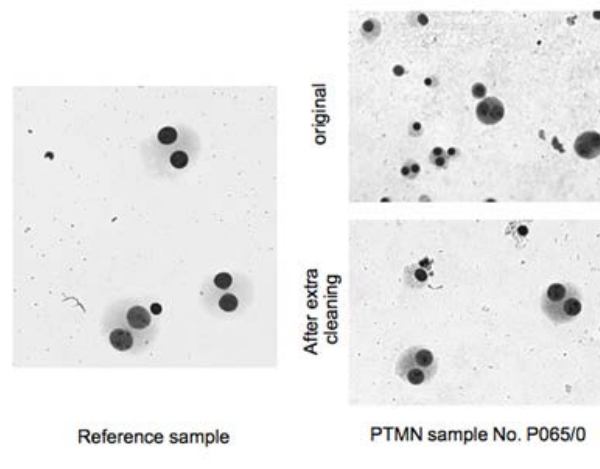
A különböző emberektől származó limfociták mind kissé másképp reagálnak az egyéni biológiai stressz-választól függően.

Az automata szegmentáló szoftverek nagy mértékben támaszkodnak a felismerendő objektumok és azok környezetének alaki és képi tulajdonságaira.



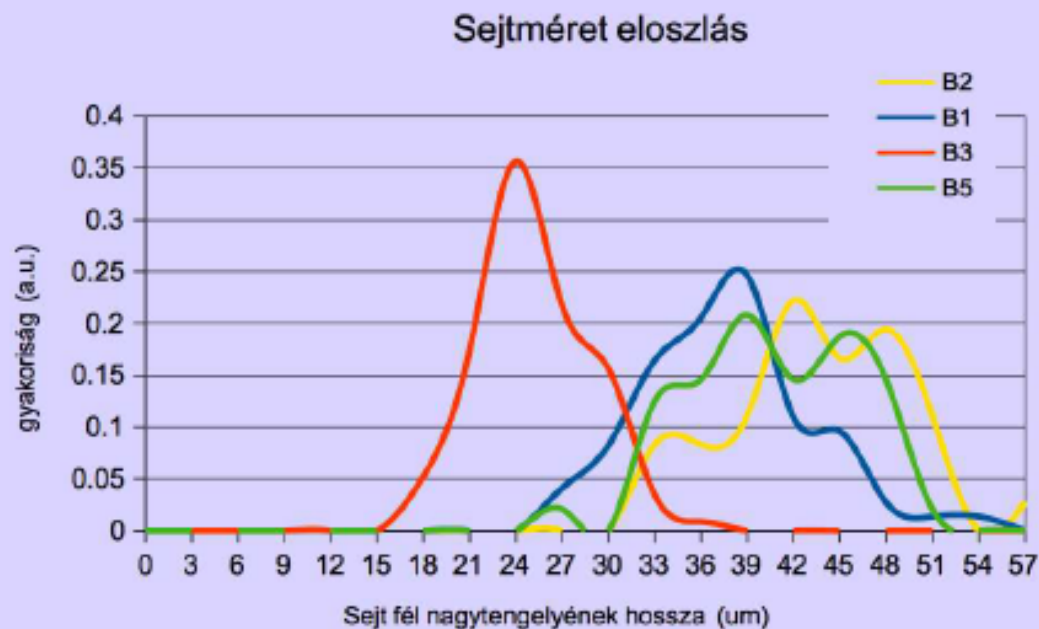
CBMN - Minta minőségi indexek és eredmények

Objektum tulajdonság	Minőséget leíró index	Ideális eset	MN detektálás hibájához való hozzájárulás
Sejt mérete	Az illeszett ellipszis fél nagytengelyének hossza	Minél nagyobb (de még ép membránú) sejt	10%-kal kisebb sejtek esetén a detektálási hatékonyság 8%-ot csökken
Citoplazma textúráltsága - „rűcskösség” - konstans gradiens - sötétebb foltok	1) Szűrkeség szint együttes előfordulási mátrix (GLCM + Haralick descriptors) 2) Irányított gradiensek hisztogramja (HOG – histogram of oriented gradients)	Homogén citoplazma	Típustól függően 10-50%
MN-jellegű műtermékek	a sejten kívüli kis méretű, elegendően sötét objektumok száma	Nincs műtermék	Típustól függően 10-40%
Festődés kontrasztja	1) Michaelson kontraszt citoplazma és sejtmag között 2) Citoplazma és sejtmag szűrkeségi eloszlásának átfedése	Nincs átfedés	Maximum 5%.



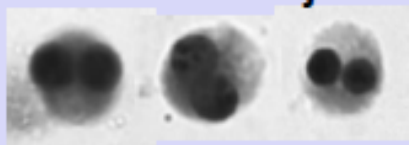
CBMN- Minta minőségi indexek és eredmények

Sejtek mérete:

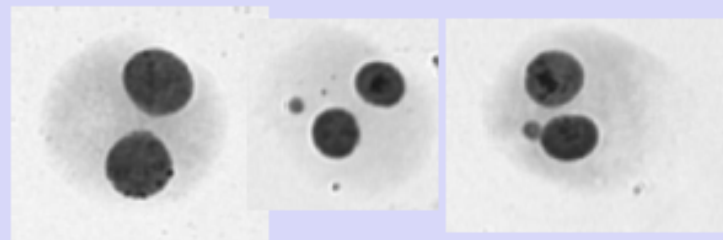


Minta azonosító	Átlagos sejt méret (µm)	MN detektálási arány
B2	41.8	74%
B5	38.7	67%
B1	36.2	58%
B3	25.2	52%

Citoplazma textúrája:

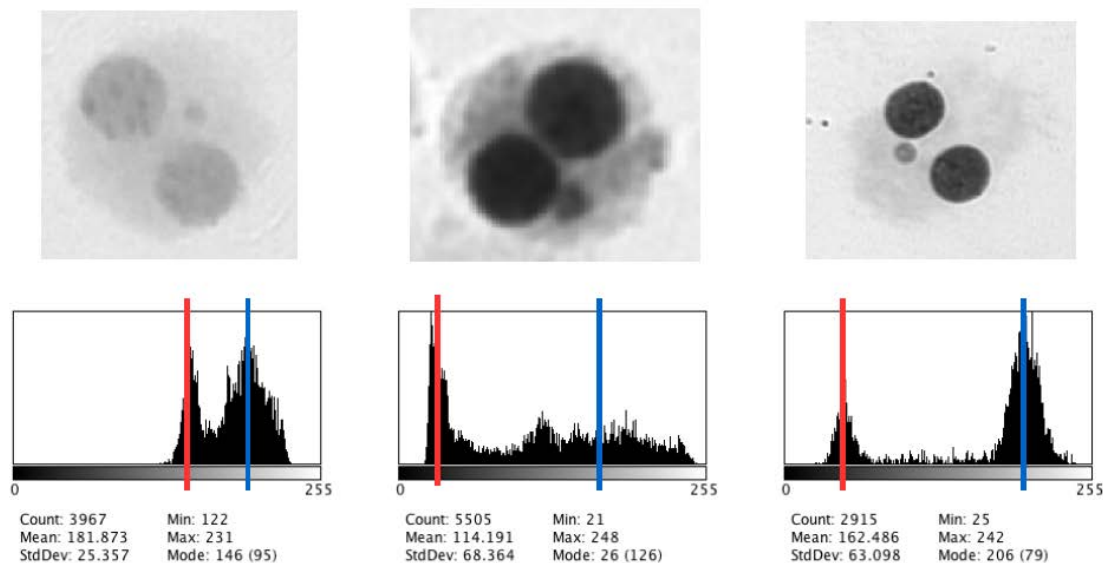


100 pixel = 30 µm

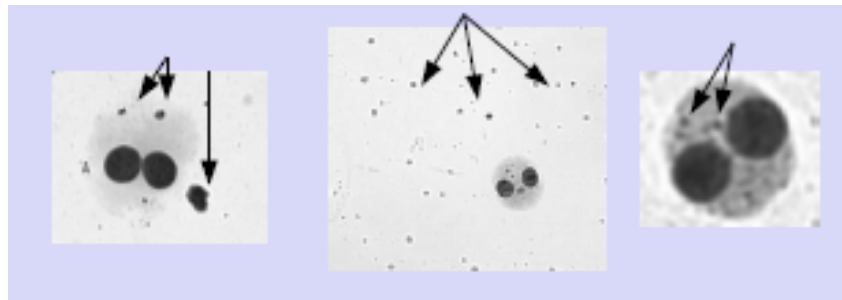


CBMN- Minta minőségi indexek és eredmények

Festődési különbségek



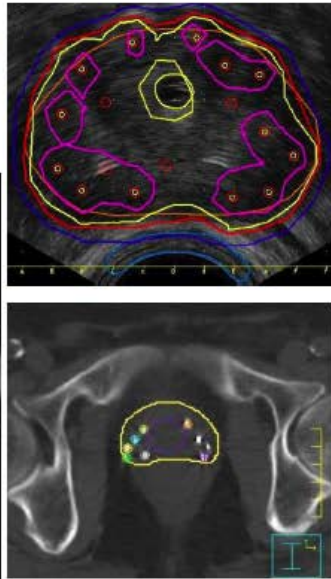
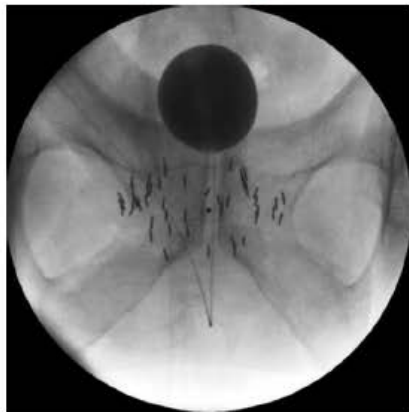
MN-jellegű műtermékek jelenléte:



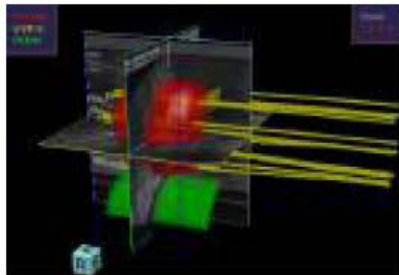
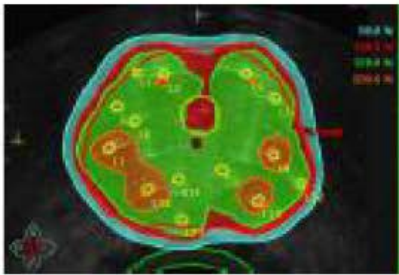
CBMN- Klinikai alkalmazása

Különböző besugárzási technikákkal kezelt prosztata tumoros betegek vizsgálata

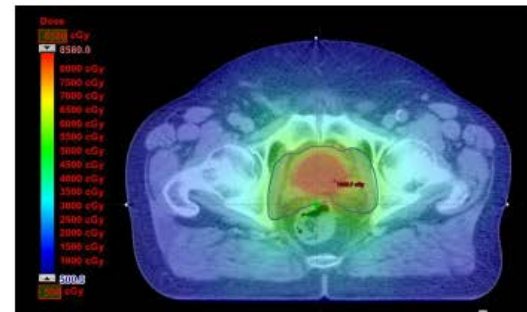
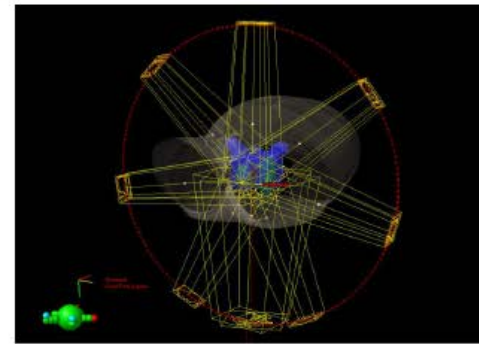
Low dose rate (LDR)
brachytherapy
(seeds)



High dose rate (HDR) brachytherapy



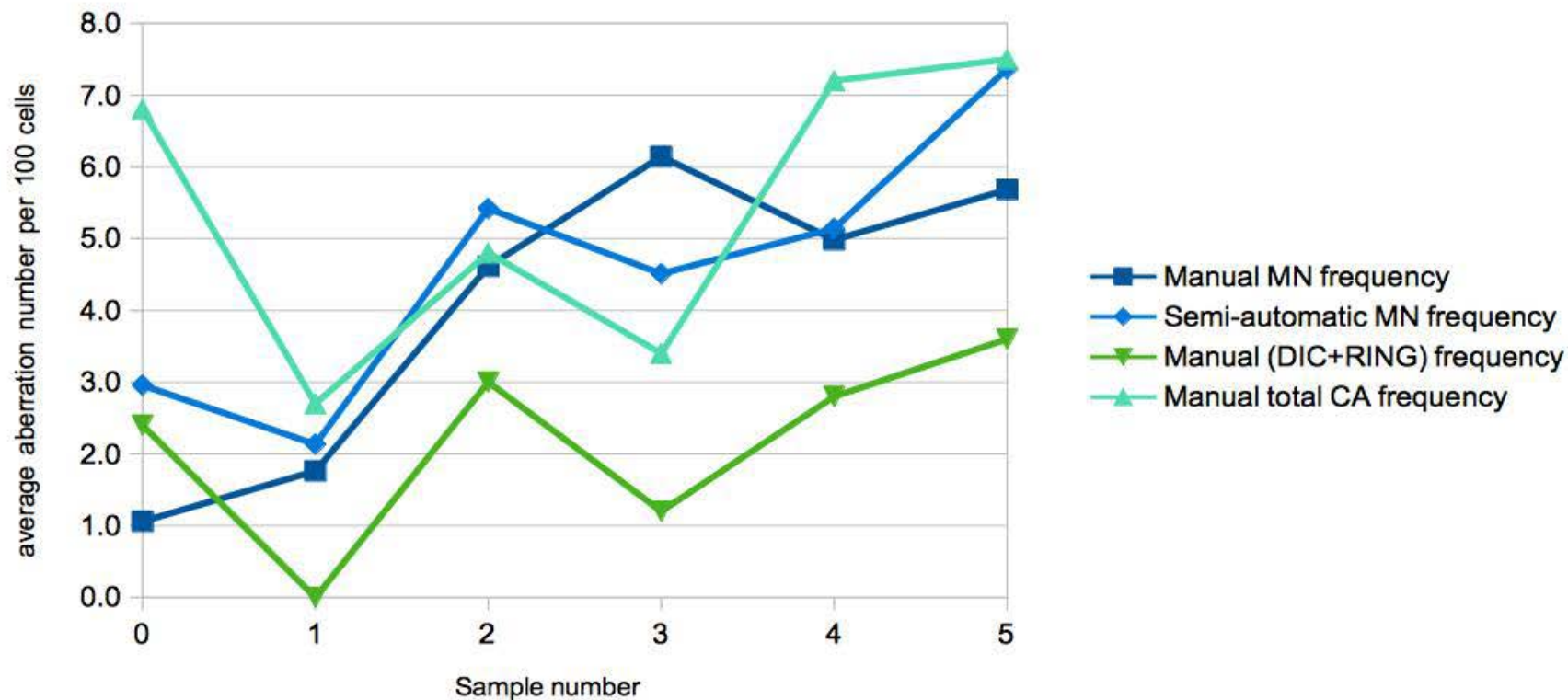
IMRT/IMAT Externap radiation therapy



Hülber T, Kocsis Zs et al, Preliminary results of the study of DNA damage in lymphocytes from patients undergoing prostate low dose rate (seed) brachytherapy, AAMP 2017.

CBMN- Klinikai alkalmazása

Prostata tumoros betegek vizsgálata – kezdeti eredmények



Hülber T, Kocsis Zs et al, Preliminary results of the study of DNA damage in lymphocytes from patients undergoing prostate low dose rate (seed) brachytherapy, AAMP 2017.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap által támogatott VKSZ_14-1-20150021 azonosító számú Nemzeti Nukleáris Kutatási Program keretében zajlik a kutatás.

γ H2Ax próba

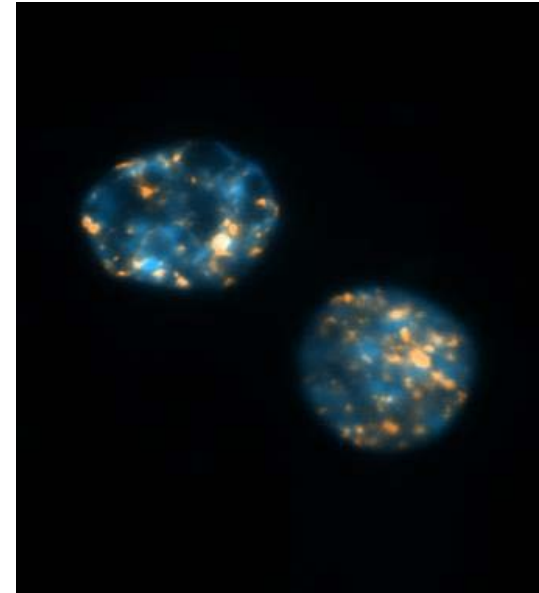
- DNS kettős száltörés (DSB) jelenleg legérzékenyebb vizsgálata
- H2AX hiszton fehérje a DNS kettős száltörés kialakulásának hatására percekben belül foszforizálódik (Ser139) → gamma-H2AX
- A gamma-H2AX fókuszok kezdeti sejtmagonkénti száma arányos a DSB számával

Előnye

- Gyors, nem kell tenyészteni a sejteket
- Automatizálható
- Érzékeny: 0,1 Gy - 5 Gy

Hátránya

- A gyors hibajavítás miatt csak 1 napon belül informatív



A biodozimetriai módszerek jellemzői

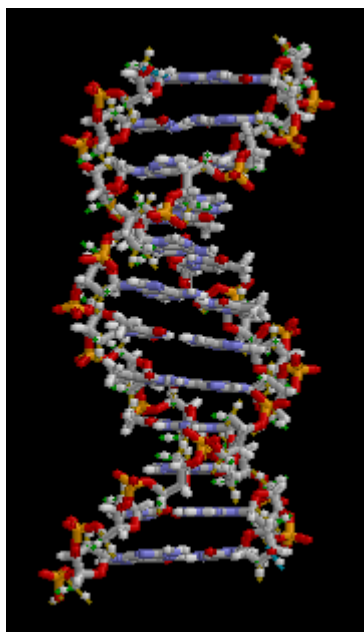
Módszer	Dózis tartomány	Stabilitás	Időigény
Dicentrikus kromoszóma teszt	0,1-5 Gy	Néhány hét	Néhány nap
FISH assay	0,3-5 Gy	Néhány év Retrospektív	Néhány nap
PCC assay	0,1-10 Gy	Néhány hét	2 nap
Mikronukleusz teszt	0,5-5 Gy	Néhány hét	Néhány nap
γ H2Ax próba	0,01-5 Gy	Néhány óra	Néhány óra

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a következő intézeteknek a több éves együttműködést:

1. Országos Onkológiai Intézet, Sugárterápiás Központ, Klinikai Sugárbiológiai és Onkocytogenetikai Osztály
2. OKI KI SSFO, Országos Közegészségügyi Intézet, Közegészségügyi Igazgatóság, Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Főosztály
3. Radosys Kft.

Köszönöm a
megtisztelő figyelmet



Forrás: en.wikipedia.org/wiki/DNA