

ROZPOZNAWANIE CZĘŚCIOWEGO NAPROMIENIENIA CIAŁA PRZY POMOCY TESTU MIKROJĄDROWEGO

Recognition of partial body irradiation using a micronucleus test

Sylwester Sommer, Iwona Buraczewska, Marcin Kruszewski

Streszczenie: Dozymetria biologiczna oprócz oszacowania wysokości dawki powinna mieć możliwość rozpoznawania czy napromienione zostało całe ciało, czy tylko jego część. Bardzo dobrze sprawdza się tutaj test chromosomów dicentrycznych, jednak prowadzone są prace również z innymi testami dozymetrycznymi. Wyniki badań wskazują, że test mikrojądrowy nie pozwala jednoznacznie na rozpoznawanie częściowego napromienienia ciała.

Summary: Biological dosimetry in addition to the estimation of the absorbed dose should be able to recognize whole or partial body irradiation. The dicentric chromosome test works very well here, however, other dosimetry tests are being examined to recognize partial body irradiation. The research results indicate that the micronucleus test does not explicitly allow the recognition of such a situation.

Słowa kluczowe: dozymetria biologiczna, częściowe napromienienie ciała, analiza chromosomów dicentrycznych, test mikrojądrowy

Keywords: biological dosimetry, partial body irradiation, dicentric analysis, micronucleus test

Wstęp

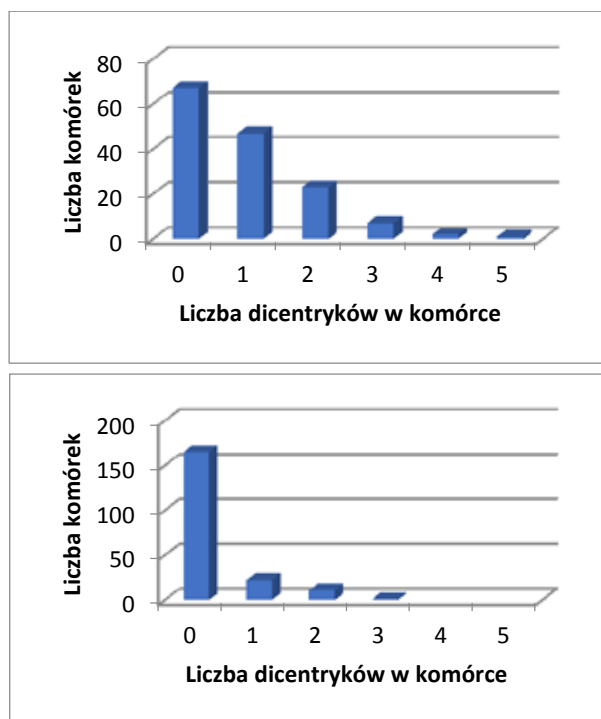
Ostra choroba popromienna rozwija się u osób napromienionych dużymi dawkami promieniowania, wielkości siwertów [1]. O tym, czy choroba popromienna się rozwinie, jaki będzie jej przebieg i jakie będą jej konsekwencje zdrowotne dla osoby napromienionej, decyduje wielkość pochłoniętej dawki promieniowania i jej rozkład w obrębie organizmu [2]. Jeżeli napromieniona została tylko część ciała, to rokowania są znacznie lepsze, niż dla równomiernego napromienienia całego ciała [2]. Jest tak dlatego, że jednym z najbardziej wrażliwych na promieniowanie organów jest szpik kostny, który odpowiada za produkowanie i dojrzewanie elementów morfotycznych krwi. Szpik kostny znajduje się w środku kości długich i kości płaskich, dzięki temu jest równomiernie rozłożony w całym ciele. Jeżeli część ciała nie zostanie napromieniona lub zostanie napromieniona niższą dawką, to część szpiku będzie działała i przejmie funkcję napromienionego szpiku do czasu jego regeneracji.

Dozymetria biologiczna pozwala na odtworzenie dawki pochłoniętej w organizmie człowieka na podstawie zmian molekularnych i morfologicznych w limfocytach krwi obwodowej. Limfocyty są dobrym materiałem na osobisty dozometr, ponieważ łatwo się je pobiera i krążąc po całym ciele „mieszają się”, co powoduje, że bez względu na to, jaka część ciała zostanie napromieniona, to limfocyty tam będą i część z napromienionych limfocytów znajdziemy w próbce krwi.

Analiza chromosomów dicentrycznych pozwala rozpoznać nierównomierne napromienienie

Żeby dobrze przewidzieć jak dana dawka będzie działała na organizm, potrzebne jest ustalenie (oprócz

wysokości dawki), czy napromieniono całe ciało mniej więcej równomiernie, czy tylko jego część. Test chromosomów dicentrycznych, będących złotym standardem dozymetrii biologicznej, bardzo dobrze nadaje się do rozróżnienia całkowitego i częściowego napromienienia ciała. Analizuje się rozkład chromosomów dicentrycznych pomiędzy komórkami (rys. 1). Jeżeli ten rozkład jest zgodny z rozkładem Poissona to mamy do czynienia z równomiernym napromienieniem ciała (rys. 1, wykres górny) [3]. Jeżeli rozkład chromosomów dicentrycznych pomiędzy komórkami odbiega od rozkładu Poissona, to ciało zostało napromienione nierównomiernie (rys. 1, wykres dolny). Dlaczego tak się dzieje? Otóż, gdy wszystkie limfocyty zostały napromienione, to aberracje rozkładają się pomiędzy nimi zgodnie z rachunkiem prawdopodobieństwa zobrazowanym rozkładem Poissona [3]. Jednak gdy w naszej próbce znajdują się komórki, które nie zostały napromienione, to nie będą one miały aberracji. Jeżeli obie populacje limfocytów: napromienione i nienapromienione wymieszamy, to skutkiem tego częstość komórek bez aberracji będzie znacząco większa i nie będzie pasowała do rozkładu Poissona (rys. 1, wykres dolny). Taką sytuację można modelować matematycznie wykorzystując cechy funkcji u , która pozwala określić, czy rozkład jest zgodny z rozkładem Poissona. Jeżeli funkcja u przyjmuje wartości pomiędzy $-1,96$ a $+1,96$, to rozkład jest zgodny z rozkładem Poissona [4, 5]. Na przykład dla rozkładów pokazanych na rys. 1 wartości funkcji u wynoszą: dla górnego wykresu $u = 1,57$, a więc równomierne napromienienie całego ciała, a dla dolnego wykresu $u = 3,48$, a więc napromienienie rozłożone nierównomierne.



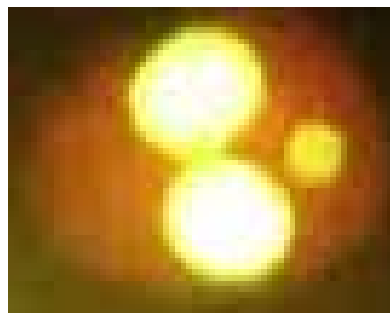
Rys. 1. Rozkład chromosomów dicentrycznych między komórkami po dawce 4 Gy promieniowania X (górny) i w przypadku próbki symulującej częściowe napromienienie ciała (składającej się z mieszaniny nienapromienionych komórek – 50% i komórek napromienionych 4 Gy promieniowania X – 50%; dolny wykres)

Fig. 1. Distribution of dicentric chromosomes among cells after uniform dose of 4 Gy of X-rays (upper graph) and in the case of a sample simulating partial body irradiation (consisting of a mixture of non-irradiated cells - 50% and irradiated cells 4 Gy of X-rays - 50%; lower graph)

Jeżeli stwierdzimy nierównomierne napromienienie ciała, to można obliczyć jaka część komórek została napromieniona i jak się to przekłada na napromienioną część ciała. Znane są trzy matematyczne sposoby takich obliczeń: tzw. „Contaminated Poisson Method” – zaproponowana przez Dolphina (1969) [6], metoda Qdr zaproponowana przez Sasaki i Miyata (1968) [7] oraz metoda oparta na statystyce bayesowskiej – „ZIP Bayesian method” opracowana przez Higuera i innych (2016) [8].

Test mikrojądrowy a rozpoznawanie częściowego napromienienia ciała

Inne metody cytogenetyczne czy molekularne nie pozwalają na wiarygodne odróżnienie napromienienia całego ciała od napromienienia częściowego, chociaż prowadzone są w tym kierunku badania [9, 10]. Jedną z technik, która mogłaby być również użyta jest analiza częstości mikrojąder. Mikrojądra są to fragmenty chromatyny widoczne w cytoplazmie komórki (fot. 1), które powstają w wyniku działania promieniowania lub czynników chemicznych [11]. Ich rozkład między komórkami jest naddyspersyjny, czyli współczynniki u są większe niż 1,96 [2].



Fot. 1. Dwujądrowy limfocyt ludzki z widocznym w cytoplazmie mikrojądrem. Barwienie oranżem akrydyny: cytoplazma komórki wybarwiona na czerwono-brązowo, materiał genetyczny na jaskrawo żółto

Photo 1. Binucleated lymphocyte with a micronucleus visible in the cytoplasm. Acridine orange staining: cell cytoplasm stained red-brown, genetic material bright yellow

W pracy Senthamizhchelvana z 2009 r. badano rozkład mikrojąder między limfocytami u pacjentów poddanych paliatywnej radioterapii jedną dawką wysokości 8 Gy na klatkę piersiową [12]. U każdego z 7 pacjentów wartości funkcji u dla rozkładu mikrojąder były bardzo wysokie, od 39,0 do 43,4 pokazując według autorów nierównomierne napromienienie ciała. Odtworzone wartości dawki promieniowania były lekko niedoszacowane, w granicach 6 Gy na część ciała (w rzeczywistości 8 Gy). Otrzymane rezultaty mogą sugerować przydatność metody mikrojądrowej do odróżnienia napromienienia całego ciała od napromienienia jego części oraz do szacowania dawki w takim scenariuszu napromienienia. Jednak prace Theirensa (2005 i 2014), wcześniejsza o biodozymetrii u ofiary wypadku radiacyjnego wykonywanej różnymi metodami (również testem mikrojądrowym) i późniejsza opisująca rezultaty współpracy laboratoriów europejskich w ramach projektu MULTIBIO-DOSE, w dziedzinie testu mikrojądrowego, nie potwierdziły przydatności tego testu ani do rozpoznawania częściowego napromienienia, ani do odtworzenia dawki w napromienionej części ciała [13, 14].

W ramach projektu NCBiR „Opracowanie wieloparametrowego testu „triage” do oceny narażenia ludności na promieniowanie jonizujące” (2009–2014) badano w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej przydatność testu mikrojądrowego do rozpoznawania częściowego napromienienia ciała. Uzyskane wyniki (Tabela 1 – prezentuje wyniki eksperymentu na krwi jednej osoby. Analogiczne eksperymenty powtórzono 3-krotnie, uzyskując podobne dane) pokazują, że test mikrojądrowy nie może być raczej stosowany do rozpoznawania napromienienia części ciała. Dla niektórych dawek promieniowania zarówno dla próbki całkowicie napromienionej, jak i symulującej częściowe napromienienie wartości funkcji u, obliczone dla ręcznych ocenianych mikrojąder, były niższe lub zbliżone do 1,96. Na podstawie różnic w ich wielkości nie dało się rozpoznać częściowego napromienienia ciała. Wysokie wartości u (oznaczone kolorem żółtym w tabeli) uzyskano tylko dla wysokiej dawki 7 Gy oraz gdy wysokimi dawkami napromieniona była część limfocytów (0/4 Gy i 0/7 Gy). W przypadku półautomatycznego liczenia mikrojąder wartości funkcji u były wyższe niż w przypadku liczenia ręcznego i zasadniczo były podobne

dla całkowitego napromienienia i symulacji częściowego napromienienia. Jedynie sytuacja, kiedy część krwi została napromieniona wysoką dawką promieniowania, rzędu 4–7 Gy, da się rozpoznać: przy stosunkowo niewysokiej częstości mikrojąderek (100–200 na 1000 komórek) współczynniki funkcji u są bardzo wysokie (od 17 do nawet 66). Należy podkreślić,

że otrzymane wyniki są zgodne zarówno z pracami Senthamizhchelvana (2009), który właśnie opisuje sytuację bardzo wysokiej dawki na część ciała, jak i Thierensa (2005 i 2014), który poddaje w wątpliwość przydatność testu mikrojądrowego do rozpoznawania częściowego napromienienia ciała w niższym przedziale dawek [12, 13 i 14].

Tabela 1. Częstości mikrojąderek indukowanych promieniowaniem X w próbce krwi jednego dawcy, liczone ręcznie i pół-automatycznie. Próbkę krwi albo były napromienione całkowicie, albo dla symulacji napromieniania części ciała mieszano napromienione i nienapromienione próbki krwi w proporcji 50% / 50%. Z rozkładów mikrojąderek obliczono wartości funkcji u. Okazało się, że w większości przypadków rozkład mikrojąderek nie jest zgodny z rozkładem Poissona (kolor pomarańczowy, wartości u powyżej 1,96). Na żółto zaznaczono przypadki z bardzo wysokimi wartościami funkcji u

Table 1. Frequencies of X-ray induced micronuclei in blood sample of one donor, manual and semi-automatic scoring. The blood samples were either uniformly irradiated or mixtures of irradiated and non-irradiated blood samples in a 50% / 50% proportion, simulating partial body irradiation were analyzed. Function u values were calculated for micronucleus distribution for each experimental point. It turned out that in most cases the distribution of micronuclei is not consistent with the Poisson distribution (orange color, u values higher than 1.96). Yellow cases with very high u function values are marked

| Liczenie ręczne | | | | Liczenie semi-automatyczne | | | |
|-----------------|---------------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------|
| Dawka (Gy) | Liczba zliczonych komórek | Częstość Mn / 1000 komórek | Wartości funkcji u | Dawka (Gy) | Liczba zliczonych komórek | Częstość Mn / 1000 komórek | Wartości funkcji u |
| 0 | 1000 | 20 | 1,86 | 0 | 3926 | 23 | 16,40 |
| 0,2 | 1000 | 26 | 1,18 | 0,2 | 3819 | 18 | 10,88 |
| 0,5 | 1000 | 42 | 1,23 | 0,5 | 3922 | 35 | 7,62 |
| 0,8 | 1000 | 80 | 2,16 | 0,8 | 4275 | 47 | 10,17 |
| 1 | 1000 | 96 | 0,67 | 1 | 3497 | 61 | 8,74 |
| 2 | 1000 | 316 | 2,87 | 2 | 2809 | 160 | 10,56 |
| 4 | 1003 | 736 | 3,88 | 4 | 4102 | 536 | 26,02 |
| 7 | 1010 | 1063 | 12,50 | 7 | 1709 | 696 | 24,49 |
| 12 | - | - | - | 12 | 1497 | 307 | 57,12 |
| 0/0,5 | 1000 | 39 | 1,46 | 0/0,5 | 3870 | 25 | 8,93 |
| 0/1 | 1000 | 54 | 2,99 | 0/1 | 3960 | 43 | 8,60 |
| 0/2 | 1000 | 135 | 1,32 | 0/2 | 3705 | 84 | 12,17 |
| 0/4 | 1000 | 185 | 17,80 | 0/4 | 4388 | 99 | 41,82 |
| 0/7 | 1000 | 148 | 22,48 | 0/7 | 3549 | 98 | 66,27 |

Wnioski:

1. Test mikrojądrowy nie pozwala jednoznacznie określić, czy mamy do czynienia z całkowitym, czy częściowym napromienieniem ciała.
2. Analiza chromosomów dicentrycznych nadaje się do tego celu znacznie lepiej, co jest jej niewątpliwą przewagą nad testem mikrojądrowym.

Podziękowanie:

Praca powstała w wyniku realizacji projektu POIG 1.3.1 „WNDPOIG.01.03.01-14-054/09 „Opracowanie wieloparametrowego testu triage do oceny narażenia ludności na promieniowanie jonizujące” finansowanego ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju.

Sylwester Sommer,
Iwona Buraczewska,
Marcin Kruszewski,
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej,
Warszawa

Literatura:

- [1] E. J. Hall, A. J. Giaccia. Radiobiology for the radiologist 7th ed. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER, Philadelphia USA, (2012);
- [2] IAEA, „Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies,” EPR-Biodosimetry, Wiedeń, (2011);
- [3] A. A. Edwards, D. C. Lloyd, R. J. Purrot. Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution, Radiat. Environ. Biophys. 16 (1979) 89–100;
- [4] C. R. Rao, I. M. Chakravarti. Some small sample tests of significance for a Poisson distribution, Biometrics 12 (1956) 264–282;
- [5] J. R. K. Savage. Sites of radiation induced chromosome exchanges, Curr. Top. Radiat. Res. 6 (1970) 129–194;
- [6] G. W. Dolphin. “Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods”, Handling of Radiation Accidents (Proc. Int. Symp. Vienna, 1969), IAEA, Vienna (1969), 215–224;
- [7] M. S. Sasaki, H. Miyata. Biological dosimetry in atom bomb survivors, Nature 220 (1968) 1189–1193;
- [8] M. Higuera, P. Puig, E. A. Ainsbury, V. A. Vinnikov and K. Rothkamm. A new bayesian model applied to cytogenetic partial body irradiation estimation. Radiation Protection Dosimetry (2016), Vol. 168, No. 3, pp. 330–336;
- [9] A. Duran, J. F. Barquinero, M. R. Caballín, M. Ribas, P. Puig, J. Egozcue, L. Barrios. Suitability of FISH painting techniques for the detection of partial-body irradiations for biological dosimetry. Radiat Res. (2002) Apr;157(4):461-8;
- [10] A. Lamkowski, F. Forcheron, D. Agay, E. A. Ahmed, M. Drouet, V. Meineke, H. Scherthan. DNA damage focus analysis in blood samples of minipigs reveals acute partial body irradiation. PLoS One. 2014 Feb 3;9(2):e87458;
- [11] M. Fenech, “The in vitro micronucleus technique”, Mutation Research 455, pp. 81–95, 2000;
- [12] S. Senthamizhchelvan, G. S. Pant, G. K. Rath, P. K. Julka, O. Nair. Biodosimetry using micronucleus assay in acute partial body therapeutic irradiation. Physica Medica (2009) 25, 82–87;
- [13] H. Thierens, K. De Ruyck, A. Vral, V. de Gelder, C. A. Whitehouse, E. J. Tawn, and I. Boesman. Cytogenetic biodosimetry of an accidental exposure of a radiological worker using multiple assays. Radiat. Prot. Dosim. 113, 408–414 (2005);
- [14] H. Thierens, A. Vral, C. Vandevoorde, V. Vandersickel, V. de Gelder, H. Romm, U. Oestreicher, K. Rothkamm, S. Barnard, E. Ainsbury, S. Sommer, C. Beinke and A. Wojcik. Is a semi-automated approach indicated in the application of the automated micronucleus assay for triage purposes? Radiation Protection Dosimetry (2014), Vol. 159, No. 1–4, pp. 87–94;