



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

KATEDRA RADIOLOGIE, TOXIKOLOGIE A OCHRANY

OBYVATELSTVA

Bakalářská práce

Použitelnost biodozimetrických metod
k včasnému odhadu absorbované dávky
při radičních nehodách

Vypracoval: Luboš Pavezka

Vedoucí práce: prof. Dr.rer.nat. Friedo Zölzer

České Budějovice 2015

Abstrakt

Zhoršení náhodných rizik spojených s využíváním ionizujícího záření je v současné době nejpravděpodobnější ze čtyř důvodů. Za prvé lze pozorovat vzrůstající poptávku po zdrojích ionizujícího záření při aplikaci v mnoha průmyslových oblastech (sterilizace potravin, ve stavebnictví a strojírenství). Tento nárůst vede ke zvyšování pravděpodobnosti ztráty zdroje nebo k jeho nevhodnému používání nebo skladování. Za druhé pokroky v medicíně generují nové postupy a v důsledku toho jsou do praxe zaváděny nové přístroje, které jsou účinnější, ale také mnohem složitější k obsluze, čímž se zvyšuje riziko náhodného přeexponování osob. Za třetí možnost teroristického útoku pomocí radiačních nebo jaderných zařízení je v současném politicky rozkolísaném světě pravděpodobnější než kdykoli v minulosti. Za čtvrté nedávná havárie ve Fukušimě (Japonsko) znovu upozornila na rizika expozice v případě nehod jaderných elektráren. Všechny tyto události by mohly vést k náhodné expozici jednoho až několika tisíců jedinců, kteří u sebe neměli dozimetry. Proto je nezbytné, aby bylo možné posoudit úroveň expozice takových osob retrospektivně. V současné době jsou tato hodnocení založena na klinické diagnóze (zejména na symptomech ozáření a na zkoumání krevního obrazu). Tyto postupy mohou být doplněny metodami biologické dozimetrie s možností zpětné rekonstrukce dávky. Biologická dozimetrie je důležitá hlavně v případech, když ozářená osoba neměla svůj osobní dozimetr nebo když je kontext ozáření nejasný. Všechny tyto informace by měly pomoci zdravotnickému personálu poskytnout vhodnou lékařskou péči a stanovit následná dlouhodobá zdravotní opatření podle potřeb pacienta. Ke splnění tohoto úkolu musí být odhady dávek včasné a přesné i při rozsáhlých katastrofách s velkým počtem zasažených osob. Tato bakalářská práce je zaměřena na použitelnost různých technik pro různé scénáře malého i velkého měřítka, počínaje ozářením malými dávkami bez potřeby přímé lékařské pomoci až po akutní nemoc z ozáření. Princip biodozimetrie je založen na detekci změn v buněčné tkáni u jednotlivce, které jsou vyvolány ionizujícím zářením a pozdější využití těchto změn ke zjištění dávky retrospektivně a je-li to možné předpovědět následné klinické reakce jednotlivce. Optimálně by změny v organizmu

jedince měly být specifické pro ionizující záření a neměly by být ovlivněny předchozími lékařskými zásahy nebo fyziologickými defekty jedince včetně změn, které by mohly být způsobené stresem a traumaty po ozáření. Existují dva základní typy biodozimetrie s rozdílnými vlastnostmi, které se často doplňují. Jedná se o metody založené na biologických parametrech, jako je aktivace genu nebo detekce chromozomálních abnormalit a metody pracující na základě fyzikálních změn v tkáních. Hlavní faktory pro hodnocení metod jsou časový interval, kdy je možné test biologicky provést, čas na přípravu vzorků a jejich analýzu, dávkové rozpětí, snadnost použití, logistické požadavky, potenciální účinnost, možnost provedení na místě a schopnost podpořit diagnostiku a léčbu pacienta v terapeuticky příhodném časovém okamžiku. Další vývoj biodozimetrie je ovlivněn zejména potřebami činností po velkých nehodách, kde je nezbytné mít nástroj pro identifikaci poškození jedince a jeho zařazení do systému zdravotní péče.

Klíčová slova: radiační dávka, radiační efekty, expozice, ionizující, aberace.

Abstract

A deterioration of the coincidental hazards linked to the use of ionizing radiation is currently observed for four reasons. First, the increasing demand for radiation sources in numerous industrial applications (food sterilization, construction, engineering...) leads to an increasing likelihood of loss of the sources or abnormal/unsuitable use and storage. Second, advances in medicine generate new protocols and tools that are more efficient but also much more complex to execute, increasing the risk of accidental overexposure. Third, the possibility of a terrorist attack using radiological or nuclear devices has to be taken into account. Finally, recent events in Fukushima (Japan) highlight the risks of exposure in the case of nuclear power plant accidents. All these issues could lead to the accidental exposure of one to several thousand individuals not wearing dosimeters. Thus, it is essential to be able to assess the exposure level of victims. Nowadays, this evaluation is based on clinical diagnosis (mainly irradiation symptoms and hematological variations) supplemented with biological dosimetry and physical dose reconstruction. Biological dosimetry is especially important when the personal dosimeter is lacking or when the accidental context is unclear. All this information should help the medical staff to deliver appropriate medical care and to manage the long-term medical follow-up, if required. To fulfil this task, the dose estimates has to be timely, exact and conclusively reached in large-scale disasters. In my bachelor thesis, I have focused on the applicability of the various techniques for different scenarios: small- and large-scale exposures to different levels of a radiation that could manage to the urgent radiation syndrome and exposures with lower doses that do not need direct care, but should be followed for evidence of long-term impacts. The principle of biodosimetry is to utilize changes caused in the individual by ionizing radiation to estimate the dose and, if feasible, to predict or reflect the clinically relevant reaction. Optimally, the changes should be specific for ionizing radiation, and the response should be unaffected by prior medical or physiological variations among subjects, including changes that might be caused by the stress and trauma from a radiation event. There are two basic types of biodosimetry with dissimilar and very often complementary characteristics: those based on changes in biological parameters

such as gene activation or chromosomal abnormalities and those based on physical changes in tissues. Factors advised comprise: time interval when the assay is feasible biologically, time for sample preparation and analysis, dose finding limit, ease of use, logistical demands, potential efficiency, point-of-care eligibility, and the ability to support patient diagnosis and treatment within a therapeutically relevant time point. The development of of biodosimetry has been mainly encouraged by the needs after a large-scale accident, where it is essential to have a tool or device to identify those individuals who would profit to be brought into the medical care system.

Keywords: radiation dose, radiation effects, exposure, ionizing, aberration.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 12. 8. 2015

.....

Luboš Pavezka

Poděkování

Touto cestou bych rád poděkoval prof. Dr.rer.nat. Friedo Zölzerovi za odborné a vstřícné vedení bakalářské práce, cenné rady a připomínky.

.

Obsah

Úvod	8
1 Současný stav	9
1.1 Mechanismus poškození živého organismu ionizujícím zářením.....	18
1.2 Základní techniky biodozimetrie	23
1.2.1 Hematologické testy	23
1.2.2 Metody založené na detekci poškození DNA	26
1.2.2.1 Ložiska gamma-H2AX.....	26
1.2.2.2 Profily exprese genů - DNA microarray	30
1.2.2.3 Proteinový biomarker	32
1.2.2.4 GlycophorinA (GPA) a Hypoxanthin-Guanin-Phosforibosyl-Transferaza (HGPRT).....	34
1.2.2.5 Analýza Comet Assay	36
1.2.3 Metody založené na detekci chromozomálního poškození.....	41
1.2.3.1 Detekce dicentrických chromozomů, kroužků a fragmentů	41
1.2.3.2 Detekce translokací - Fluorescenční in situ hybridizace - FISH.....	43
1.2.3.3 Analýza mikrojader	47
1.2.3.4 Urychlená kondenzace chromozomů - Premature chromosome condensation (PCC)	50
1.2.4 Elektronová paramagnetická rezonance EPR (ESR)	54
2 Výzkumná otázka a metodika výzkumu	58
2.1 Výzkumná otázka	58
2.2 Metodika	58
3 Výsledky	59
4 Diskuze.....	65
5 Závěr	72
6 Seznam použité literatury.....	74

Úvod

Téma mé bakalářské práce jsem si vybral z toho důvodu, že mne tato problematika oslovila po sérii přednášek z radiologie v prvním ročníku mého studia, a proto jsem se začal o tuto oblast zajímat. Součástí tohoto předmětu bylo i orientační seznámení s použitím biologické dozimetrie.

Ještě při studiu na gymnáziu mne fascinovalo zjištění, že je možné v časovém intervalu od řádu desítek minut až po desítky let od ozáření živého organismu zjistit biodozimetrickými metodami expozici ionizujícím zářením a s určitou mírou přesnosti i velikost obdržené dávky ze vzorků živých tkání, ale také ze zkalifikovaných a zrohovatělých tkání jaké jsou třeba kosti, nehty, vlasy a zubní sklovina. Dále mne na radiobiologii a biodozimetrii upoutalo těsné spojení biologie a fyziky, kdy jsou zkoumány v interakci základní stavební elementy živé tkáně - buňky a základní stavební prvky hmoty - molekuly a atomy a jejich vzájemné působení po expozici ionizujícím zářením.

1 Současný stav

Tak jako každý vědecký obor, tak i radiologie má svého otce zakladatele, v našem případě je to především Wilhelm Conrad Röntgen, německý fyzik, jeden z nejtalentovanějších vědců 19. a počátku 20. století. Co bylo faktickým cílem Röntgenova zkoumání večer 8. listopadu 1895 se už nikdy nedozvíme. Zřejmé je, že zakryl katodovou trubici černým papírem, aby ho nerušila záře výboje při sledování světelných jevů indikovaných katodovými paprsky vycházejícími z trubice úzkým hliníkovým okénkem. Poté vstoupila do příběhu objevení paprsků X, jak byly později nazvány, náhoda. Ačkoli by obal neměl nechat projít z výbojky žádné viditelné ani ultrafialové záření, krystalky platnatokyanidu barnatého, nacházející se na vědcově pracovním stole, se v šeru laboratoře slabě zeleně rozsvítily. Wilhelm Conrad Röntgen dostal za tento objev jako první v roce 1901 Nobelovu cenu za fyziku. (1)

Příští léta zaznamenávají prudký rozvoj poznatků o ionizujícím záření. Již v roce 1896, rok po objevení paprsků X, Francouz Antoine Henri Becquerel při výzkumu fluorescence uranových solí objevil přirozenou radioaktivitu. Dále je třeba zmínit jména vědců, jako byli Pierre Curie a jeho žena Marie Curie-Sklodowska, kteří se zabývali teorií radioaktivity. Marie Curie-Sklodowska jako první a doposud jediná na světě dostala Nobelovu cenu jak za fyziku, tak i za chemii a stala se první profesorkou na pařížské Sorbonně a navíc patřila mezi průkopníky, kteří experimentovali s ionizujícím zářením při léčbě zhoubných nádorů.

V kontextu k tématu práce je zapotřebí zmínit další dvě důležitá jména vědců. Jsou to Enrico Fermi a Robert Oppenheimer. První z nich zažehl, udržel a ukončil jadernou reakci. Tato první řízená štěpná reakce proběhla dne 2. prosince 1942 a symbolicky tím odstartovala atomový věk. (2) Druhým je Robert Oppenheimer, který je považován za „otce“ atomové bomby, i když je důležité připomenout, že na vývoji této zbraně se podílely tisíce nejlepších vědců tehdejšího západního světa, včetně výše zmíněného Enrica Fermiho. V rámci projektu nazvaného „Manhattan“ byl proveden dne 16. července 1945 v americkém státě Nové Mexiko první jaderný výbuch pod krycím označením „Trinity“. Program „úspěšně“ vyvrcholil svržením jaderných bomb na

japonská města Hirošimu a Nagasaki. V prvním případě se jednalo o uranovou bombu pojmenovanou „Little Boy“, ve druhém případě o plutoniovou bombu „Fat Man“.

V následující části kapitoly je uvedeno několik důležitých milníků v oblasti mírového využití jaderné energie:

- Dne 20. prosince 1951 byla na pokusném reaktoru EBR-1 ve státě Idaho v USA poprvé vyprodukována elektrická energie z jaderné reakce. Konečný výkon experimentálního reaktoru dosáhl 200 kW.
- Dne 26. června 1954 byla do sítě poprvé dodána elektřina vyrobená v jaderné elektrárně v Obninsku v bývalém SSSR. Jmenovitý výkon elektrárny byl 5 MW. Použity byly reaktory RBMK černobylského typu.
- Dne 27. srpna 1956 byla poprvé připojena k síti první opravdu komerční jaderná elektrárna Calder Hall ve Velké Británii. Její čtyři reaktorové bloky měly maximální elektrický výkon 4 x 60 MW. Toto zařízení však zároveň sloužilo i pro výrobu plutonia pro vojenské účely.
- Dne 18. prosince 1957 byl dosažen historický milník, kdy byla uvedena do provozu jaderná elektrárna v Shippingportu v Pensilvánii v USA. Lze ji považovat za jadernou elektrárnu, která byla poprvé primárně určena výhradně pro mírové účely bez produkce plutonia k vojenským účelům. Tento reaktor o elektrickém výkonu 60 MW měl do budoucna dva hlavní významy, za prvé byl použit také pro pohon plavidel a za druhé z něj vycházela konstrukce dnes nejčastěji používaných typů komerčních tlakovodních reaktorů (americký typ s označením PWR nebo ruský typ s označením VVER). (4)

Z hlediska radiologie a biodozimetrie je nutno udělat krátký exkurs nejvýznamnějších jaderných havárií ve světě, kdy došlo k expozici většího počtu osob. Pro vyhodnocení závažnosti jaderných nehod zavedla Mezinárodní agentura pro atomovou energii (MAAE) sedmi stupňovou škálu pro hodnocení radiačních nehod. (Obr. 1)



Obr. 1 Stupnice INES - The International Nuclear Event Scale. (1)

Přehled nejvážnějších radiačních nehod, při kterých byly použity ve velké míře metody biodozimetrie při zjišťování obdržených dávek obsluhami jaderných zařízení a obyvatelstvem žijícím v blízkosti těchto zařízení:

- Dne 10. října 1957, Sellafield/Windscale (Velká Británie), při požáru grafitového reaktoru v podniku vyrábějícím plutonium pro vojenské využití uniklo do vzduchu velké kvantum radioaktivity. Odhaduje se, že následkem havárie zemřelo 200 osob. Hodnocení INES - 5.
- Dne 28. března 1979, Three Mile Island (USA), se v jaderné elektrárně částečně roztavilo jádro reaktoru a došlo k úniku radioaktivní vody. Důvodem události byl vadný pojistný ventil primárního okruhu. Silné radioaktivní záření uniklo do okolí, jeden člověk zahynul a asi 100 lidí bylo hospitalizováno. Hodnocení INES - 5.
- Dne 26. dubna 1986, Černobyl (SSSR/Ukrajina), explodoval jeden z reaktorů. Tato havárie je považována za nejhorší svého druhu. Údaje o úhrnném počtu

osob, které ve spojitosti s výbuchem a následnou expozicí onemocněly a zemřely, se velice liší. Podle ukrajinských úřadů zemřelo až 125 000 lidí. Hodnocení INES - 7.

- Dne 13. září 1987, ve městě Goiania (Brazílie), byl v nemocnici ukraden starý zdroj záření určený pro radioterapii. Zloději otevřeli olověné schránky upevněné na konstrukci vyřazeného lékařského přístroje. Tato schránka obsahovala cesium ^{137}Cs . Zloděje fascinovalo světélkující modrá záře kamene a poté svůj objev ukázali dalším obyvatelům. Kvůli známkám kontaminace bylo vyšetřeno 112 tisíc lidí, 249 osob bylo kontaminováno a 4 osoby na následky ozáření zemřely. Hodnocení INES - 5.
- Dne 30. září 1999, ve městě Tokaimura (Japonsko), způsobil nesprávný pracovní postup obsluhy nekontrolovanou řetězovou reakci a následnou expozici zaměstnanců v továrně na zpracování uranu pro jaderné elektrárny. Radiaci bylo vystaveno více jak 600 osob, dvě z nich zemřely. Řetězová reakce byla přerušena až druhý den. Hodnocení INES - 4.
- Dne 12. března 2011, Fukušima (Japonsko), jaderná elektrárna Fukušima 1 v severovýchodní části Japonska byla zasažena zemětřesením a následnou vlnou tsunami, po explozi se zhroutil část budovy s reaktorem. Následkem zničení části soustav nezbytných pro ochlazování odstavené elektrárny došlo k masivním únikům radiace z reaktorů a z meziskladu vyhořelého paliva. Přes 150 000 obyvatel v okruhu 20 km bylo evakuováno z nebezpečného okolí elektrárny z důvodu šíření kontaminovaných produktů. Úmrtí způsobená ozářením nebyla potvrzena.
Hodnocení INES - 7. (5)

V následujícím odstavci je uvedena krátká informace o využití ionizujícího záření ve zdravotnictví.

V úvodu je nutno zdůraznit, že lékařské ozařování je jediným případem, kdy je osoba vystavována ionizujícímu záření záměrně s úmyslem zvýšit kvalitu života pacienta anebo mu rovnou život zachovat. V souladu se svým zvláštním posláním,

lékařská ozáření nemají žádné limity. Platí při nich ale dvě základní zásady radiační ochrany, za první princip zdůvodnění a za druhé princip optimalizace. Tato logika vychází z tradičního předpokladu (bráno s velkou mírou obezřetnosti i jistou rezervou), že kterákoliv dávka záření působící na člověka je spojená s možným medicínským rizikem, ale zatím neexistují jasné důkazy o tom, že by i malé dávky mohly způsobit počátek poškození.

V lékařství máme tři hlavní oblasti použití ionizujícího záření:

- Radiodiagnostika
- Nukleární medicína
- Radioterapie

Je možno říci, že dávka, kterou pacient obdrží během běžného vyšetření v rámci rentgenové diagnostiky není nebezpečná, respektive reprezentuje velmi malé riziko, a to i v případě opětovných vyšetření. Přesto přijatelnost dávky ionizujícího záření se pokaždé před její aplikací posoudí, zvláště se zřetelem na její možné přínosy a srovnávací přednosti vůči "konvenčním" metodám i možným rizikům, přičemž je nezbytné vycházet ze zásad odůvodnění a optimalizace. Můžeme však s jistotou tvrdit, že využití radiologických postupů v diagnostice distribuuje relativně velkou dávku do naší populace. Pro kompletnost informace je nezbytné dodat, že ionizující záření se v těle nekumuluje, avšak nebezpečí z jednotlivých expozic se sumarizují. To značí, že s kvantem vyšetření vzrůstá možnost vzniku eventuálního poškození, ale je potřebné si uvědomit, že nebezpečí spojená s normálními vyšetřeními jsou velice malá, nevysoký je proto i jejich úhrn, tedy i možnost indukce nežádoucího následku.

V tabulkách číslo 1 a 2 jsou uvedeny pro představu typické hodnoty efektivních dávek vybraných konvenčních rentgenových a CT vyšetření a orientační klasifikace rizik při ozáření těmito relativně malými dávkami.

Tab. 1 Typické hodnoty efektivních dávek pro vybraná konvenční rentgenová a CT vyšetření

Diagnostický výkon		Typické efektivní dávky (mSv)	Přibližná doba pro stejné ozáření z přírodních zdrojů
<i>Konvenční rentgenová vyšetření</i>	Končetiny a klouby	< 0,01	< 1,5 dne
	Plíce (jeden PA snímek)	0,02	3 dny
	Lebka	0,07	11 dní
	Mamografie (skreening)	0,1	15 dnů
	Kyčle	0,3	7 týdnů
	Pánev, hrudní páteř	0,7	4 měsíce
	Břicho	1,0	6 měsíců
	Bederní páteř	1,3	7 měsíců
	Polykací akt	1,5	8 měsíců
	IVU	2,5	14 měsíců
	Vyšetření žaludku, střevní pasáž	3	16 měsíců
	Irigoskopie	7	3,2 roku
<i>CT vyšetření</i>	CT hlavy	2,3	1 rok
	CT hrudniku	8	3,6 roku
	CT břicha nebo pánve	10	4,5 roku

Tab. 2 Přístup radiační ochrany k označení rizika při ozáření malými dávkami

Velikost efektivní dávky	Riziko
nižší než 0,1 mSv	zanedbatelné
0,1 mSv - 1 mSv	minimální
1 mSv - 10 mSv	velmi nízké
10 mSv - 100 mSv	nízké

Tabulky 1, 2 (10)

Nukleární medicína je lékařská disciplína používající k diagnostice a terapii zavedení radiofarmak (radioaktivní látka) do těla nemocného. Radiofarmaka emitují gamma záření uvnitř těla. Těmito látkami jsou obecně izotopy s krátkým poločasem rozpadu spojené s chemickými sloučeninami, které umožňují specifické fyziologické

procesy, jenž mají být kontrolovány. Radiofarmaka mohou být podávána injekcí, inhalací nebo orálně. Technikou zobrazení nukleární medicíny je scintigrafie. Označení je odvozeno od scintilačního detektoru (lat. Scintilla - jiskra), ve kterém absorpce fotonů záření gamma způsobuje světelné záblesky takzvané scintilace, které jsou následně elektronicky zpracovány a vyhodnoceny. Nukleární medicínské techniky jsou minimálně zatěžující neinvazivní diagnostické metody. Díky značné citlivosti detektorů je pacientovi aplikováno pouze velmi malé kvantum radiofarmaka, které je nutné k získání hodnotné obrazové informace. Radiační zátěž při technikách v nukleární medicíně je porovnatelná a častokrát i menší, než při klasickém rentgenovém vyšetření. Průměrná účinná dávka je 4,6 mSv za diagnostický postup. (4)

Součástí nukleární medicíny je použití otevřených zdrojů ionizující záření k terapii, které působí jen na krátkou vzdálenost, čímž se minimalizují nežádoucí vedlejší účinky a tím i škody na okolních orgánech a tkáních. Léčba je vhodná při nádorových a nenádorových onemocněních jako jsou hypertyreóza, karcinomy štítné žlázy, paliativní léčba kostních metastáz nebo chronická kloubní onemocnění. Terapeutická radiofarmaka jsou rozdělována tak, aby předala maximální radiační dávku do nádoru nebo nemocného orgánu a nezpůsobila ozáření mimo cílové orgány. (4)

Radioterapie je léčba pomocí ionizujícího záření, obvykle jako součást léčby nádoru s cílem kontroly nebo usmrcení maligních buněk. Tato terapie může mít kurativní nebo paliativní charakter.

Radioterapie se používá hlavně k léčbě maligních nádorů senzitivních na záření. Cílem je destrukce tumoru a co možná nejmenší zasažení okolní zdravé tkáně. Ozařování se může provést před operací i po ní, anebo může být i samotnou léčebnou metodou u pokročilých inoperovatelných nádorů. Častokrát se též kombinuje s chemoterapií. Jako hlavní zdroj záření v radioterapii slouží v dnešní době lineární urychlovače, které mohou emitovat fotony nebo elektrony. Novou metodou je ozařování nádoru svazkem protonů, které jsou pomocí magnetického pole urychlovány v kruhovém urychlovači - cyklotronu.

Klasickou radioterapeutickou metodou je rentgenová terapie. Je primárně využívána k nenádorové léčbě například tenisových loktů, artróz kolenních kloubů, patních ostruh, ale i k léčení zhoubných nádorů, například kůže.

V rámci radioterapie existuje submetoda - brachiterapie (z řeckého brachys - z blízka, blízko). Jedná se o techniku, při níž se zdroj záření umísťuje do bezprostřední blízkosti lokalizovaného nádoru nebo do postižené tkáně. Zdrojem záření jsou izotopy, například Radium ^{226}Ra , Cesium ^{137}Cs , Iridium ^{192}Ir , Cobalt ^{60}Co , Zlato ^{198}Au , Jód ^{125}I . Typickým případem použití brachiterapie je léčení gynekologických tumorů.

Jelikož v českém zdravotnictví se v posledních době nestaly žádné závažnější nehody ve zdravotnictví, je v následující části uvedeno několik známých nehod, které se odehrály v různých časových obdobích na různých místech světa:

- 1985 – 1987, Kennestone Regional Oncology Center, Georgia (USA). Na základě poruchy urychlovače Therac-25 pro radiační terapii došlo k šesti radiačním událostem, při kterých byli pacienti masivně předávkováni zářením v řádech desítek Gy. Tři pacienti zemřeli. Tyto nehody byly zaviněny nedostatečnou kontrolou softwaru.
- 24. června 1990, Soreq (Izrael). Operátor komerční ozařovny nedodržel bezpečnostní předpisy na sterilizátoru zdravotnického materiálu a odstranil uvíznutý produkt na dopravníku. V důsledku 1 - 2 minutové celotělové expozice dávkou 10 Gy zemřel 36 dnů po incidentu i přes rozsáhlou lékařskou péči.
- 16. listopadu 1992, Indiana Regional Cancer Center (USA). Po aplikaci brachyterapie, personál ignoroval výstrahy alarmu označující vysokou úroveň radiace mimo aplikační místnost. Pacient byl převezen zpět do pečovatelského domu, kde z něj zdroj později vypadl. Pacient dostal tisíckrát vyšší dávku, než byla naplánována a za několik dní zemřel.
- Srpen 2000 - březen 2001, Instituto Oncologico Nacional (Panama). 28 pacientů léčených na rakovinu prostaty a rakovinu děložního hrdla obdrželo letální dávky záření v důsledku změny v protokolu měření záření použitého bez ověřovacích testů. Tato nedbalost je unikátní svým rozsahem.

- Únor 2001, Onkologické centrum v Bialystoku (Polsko). V nemocnici došlo k selhání lineárního urychlovače, což vedlo k ozáření pěti ženských pacientů nadměrnými dávkami v průběhu léčby rakoviny prsu. Incident byl zjištěn poté, co si jedna pacientka stěžovala na bolestivé pálení ozářených míst. V reakci na to byl povolán místní technik k opravě zařízení, ale ve skutečnosti způsobil další škody. Následně byly informovány příslušné orgány, ale s přístrojem bylo manipulováno, a proto nebylo možné zjistit přesné dávky. Podle odhadu mohly dávky lokálně dosáhnout až 60 Gy. Díky intenzivní léčbě nebyla hlášena žádná úmrtí.
- Únor 2008 - srpen 2009, Cedar Sinai Medical Center v Los Angeles (USA). Špatně nakonfigurovaný software v CT používaný pro mozkovou perfuzi zapříčinil předávkování 206 pacientů, kteří dostali dávky záření asi 8 krát vyšší, než bylo plánováno po dobu 18 měsíců. Pacienti hlásili dočasné vypadávání vlasů a erytém. Díky intenzivní léčbě nebyla hlášena žádná úmrtí.

Nejpravděpodobnější použití biodozimetryckých metod je v současné době z těchto důvodů:

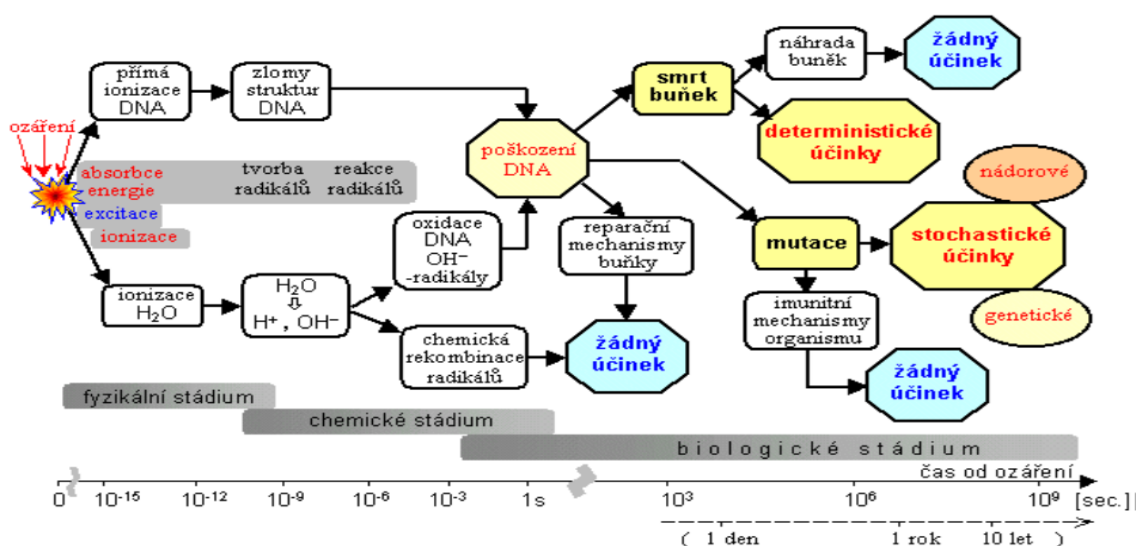
- a) Rostoucí potřeba zdrojů záření při mnoha aplikacích v průmyslu a v zemědělství (sterilizace potravin, kontrola kvality ve stavebnictví a strojírenství) vede k rostoucí pravděpodobnosti ztráty zdrojů, jejich nevhodnému používání nebo k chybnému skladování.
- b) Pokroky v medicíně generují nové postupy a nástroje, které jsou účinnější, ale také mnohem složitější k provedení, čímž se zvyšuje riziko náhodného přexponování osob v důsledku nedodržení stanovených postupů.
- c) Současná mezinárodní politická situace a vznik různých teroristických organizací zvyšují pravděpodobnost spáchání teroristického útoku s využitím radiologických a jaderných zařízení.
- d) Nedávné události v japonské Fukušimě znovu upozornily na rizika expozice v případě havárií jaderných elektráren.

Všechny tyto možnosti by mohly vést k náhodné expozici ionizujícím zářením jedné až několika tisícům osob, které neměly fyzikální dozimetry. Proto je nezbytné, aby bylo možné odhadnout úroveň expozice osob a provedení určení dávky zpětně. (6)

1.1 Mechanismus poškození živého organismu ionizujícím zářením

Pro lepší pochopení biodozimetrických metod je nezbytné objasnění základních principů působení ionizujícího záření na živou hmotu. (Obr. 2)

Absorbování ionizujícího záření v látce má kvantový charakter a vyvolává excitace a ionizace molekul nebo atomů, předáváním energie elektronům. Různé typy ionizujícího záření s různými energiemi se mohou projevit i odlišnými jevy jako například rozptylem, fotoelektrickým efektem, Comptonovým jevem, anebo tvorbou elektron-pozitronových párů (tkz. materializací). V konečném důsledku částice vzniklé sekundárně ztrácejí energii taktéž ionizacemi a excitacemi, a proto se ionizující záření zásadně odlišuje od chemických a fyzikálních faktorů (UV-záření, teplota, jedy, toxiny a další), jež mohou biologické systémy také negativně ovlivňovat.



Obr. 2 Schématické znázornění významných procesů a jejich časové posloupnosti při účincích ionizujícího záření. (9)

Kvantová povaha transferu energie ionizujícího záření ve hmotě směřuje k tomu, že i homogenně ozářený vzorek vykazuje mikroskopické objemy (subjekty, místa) s velkým kvantem excitací nebo ionizací, ale také místa s nulovým transferem energie. Prostřednictvím probability výskytu ionizace, jež je přímo úměrná dávce ionizujícího záření lze určovat množství přežívajících, to znamená nezasažených buněk v závislosti na velikosti obdržené dávky záření. Na podkladě toho je vytvořena takzvaná zásahová teorie (model), jež říká, že k dosažení biologického účinku je třeba, aby byla zasažena zářením určitá senzitivní struktura jednou nebo vícekrát. Taková velmi senzitivní struktura je v biologických organizmech přítomna, jedná se o deoxyribonukleovou kyselinu běžně označovanou DNA (deoxyribonucleic acid). Není podmínkou, aby expozice odpovídala pouze jedné ionizaci popřípadě excitaci, může se jednat též o mnohačetnou ionizaci nebo i průchod částice senzitivní strukturou.

S rozvojem mikro-dozimetrie začalo objasňování diferencí v biologické účinnosti rozdílných druhů záření právě odlišnou distribucí specifické energie. Do té doby se mínilo, že buňka odpovídá na kvanta energie v ní uložené. Tyto předpoklady se ovšem nevyplnily, protože biologická odezva záleží na množství energie, ale i na jejím rozprostření v biologickém objektu. (7)

Biologická tkáň má značný podíl vody a velká část energie ionizujícího záření se z tohoto důvodu pohlcuje ve vodě, a proto je tedy nezbytné znát princip působení ionizujícího záření na molekulu vody. Toto záření způsobuje radiolýzu vody, důsledkem toho vznikají produkty, které jsou vysoce reaktivní, například vodíkový radikál H[•], hydroxylový radikál OH[•], hydratovaný elektron a za současného výskytu kyslíku vzniká také velké kvantum peroxidu vodíku H₂O₂. Všechny tyto produkty jsou schopny způsobovat sekundární reakce s molekulami živé tkáně, jedná se o nepřímé působení záření. Přímý účinek záření je naproti tomu způsoben tím, že energie ionizujícího záření vyvolá poškození biologické molekuly bez zprostředkování. Poměr primárního a sekundárního účinku ionizujícího záření ve vodném roztoku záleží na poměru a koncentraci biologických molekul k molekulám vody. Větší koncentrace molekul vody znamená, že jedné biomolekule přísluší více molekul vody a tím se stává nepřímý účinek záření větší. Buňky reprezentují prostředí s relativně velkou

koncentrací biologických molekul a musíme tedy počítat jak s přímým tak i nepřímým účinkem ionizujícího záření.

Pro buňku je molekula DNA velmi důležitá, protože obsahuje výchozí informace o stavbě a funkci buňky. Organismy tvořené více buňkami mají v molekulách DNA uloženy informace o funkci a struktuře celého organismu jako komplexu, počínaje zrozením a smrtí individua konče. Příznačné pro účinky ionizujícího záření je indukce velkého množství zlomů struktury DNA. Nejdůležitějším typem poškození DNA je přerušení vlákna zrušením fosfodiesterové vazby v řetězci DNA. Jestliže k tomu dojde jenom na jedné straně dvojité šroubovice, nazýváme to jednoduchým zlomem (SSB - single-strand break). Pokud je přerušen i druhý řetězec, může dojít k takzvanému dvojitému zlomu (DSB - double-strand break). Všeobecně lze říci, že poškození DNA jsou velmi heterogenní, vedle jednoduchých zlomů a dvojitých zlomů se objevují poruchy basí, vznikají příčné spoje uvnitř DNA takzvané cross-linky nebo se oddělují oba řetězce tzn. denaturace a jiné. Mnohdy se objevují tyto poruchy zároveň s oběma typy zlomů. (7)

Komplexní poškození vznikají s podstatně větší četností působením hustě ionizujícího záření, které je tvořeno neutronovým, protonovým nebo alfa zářením. Hlavní veličinou ovlivňující působení ionizujícího záření je tzv. lineární přenos energie (LET - Linear Energy Transfer). Mají-li částice záření v látce krátký dolet, jak je to u neutronů, protonů a u částic záření alfa, je absorbovaná energie rozložena podél krátké dráhy. To znamená, že lineární přenos energie je vysoký a vzniklé ionty jsou okolo dráhy rozmístěny velice hustě. Gamma záření, rentgenové a beta záření mají v látce dlouhý dolet a tím je lineární přenos energie nízký a vzniklé ionty jsou podél dráhy rozmístěny řídko. Pro porovnání uvedme, že při nízkém LET vzniká při průchodu vodou nebo tkání asi 100 iontových párů/1 mikrometr, ale při vysokém LET až 2000 iontových párů/1 mikrometr. (9)

Interakci mezi vznikem dvojitých zlomů (DSB) a mutagenním nebo letálním efektem záření se věnuje velká pozornost. Rozměr nereparovaných DSB vzrůstá s vyšším lineárním přenosem energie a to znamená, že se kvalitativní hodnota DSB může různit. Dále je v současnosti věnován zvýšený zájem komplexním defektům DNA

způsobeným v důsledku vyčlenění velkého kvanta energie ionizujícího záření v podobě klastru (shluku poškození), mluvíme zde o lokálně mnohačetně poškozených místech. (8)

DNA molekuly v buňce jsou seskupeny v chromozomech. Chromozomové aberace jsou tvořeny zlomy DNA, tyto aberace jsou považovány za hlavní důvod letálního efektu ionizujícího záření na buňku živé tkáně. To prokazuje obdobnou nebo totožnou souvislost vzniku aberací a letálního účinku záření při různých podmínkách ozáření. Jedná se kupříkladu o vazbu na fázi buněčného cyklu na dávkovou závislost na výskytu kyslíku nebo na fyzikální vlastnosti záření. Četnost výskytu chromosomových aberací je nelineárně závislá na dávce.

DNA zlomy a z toho plynoucí následné chromosomální aberace nejsou zpravidla v souladu s vitálními funkcemi buňky a k zániku buňky dochází nejčastěji při dělení, když separace chromosomů do dceřiných buněk proběhne neúspěšně a zachovaná buňka následně zemře. Buněčné aberace některých typů konzervují v podstatě všechny geny ve funkčním stavu umožňujícím následné dělení, přestože mohou být parciálně pozměněné nebo poškozené. Nebezpečnost těchto změn a poškození spočívá v tom, že mohou vyústit v rakovinové bujení.

Vedle reprodukční smrti se často setkáváme u buňky s apoptózou, která je známa také jako “programovaná smrt”, která se od nekrózy liší tím, že na počátku procesu dochází ke koordinovanému působení jistých enzymů. Jedná se především o přítomnost funkčního genu p53 na němž je apoptóza, která je indukovaná zářením závislá, a který nemusí být nutně přítomen pro apoptózu způsobenou jinými prostředky. Apoptóza je pravděpodobně ochranou živého organismu před rakovinným bujením, protože určitý způsob poškození DNA je stimulem k apoptóze. Buňka, jež není schopná zavčas reparovat své poškození, je pro další život tkáně rizikovou a je tedy příhodnější tuto buňku substituovat zdravou buňkou, a proto proběhne její sebedestrukce. (7)

Vedle letálních následků způsobuje ionizující záření rovněž možnost dědičných mutací v živém organismu, jedná se o změnu v genetickém kódu. Kromě genových poškození jsou to chromosomové aberace, které nevylučují další život buňky.

Následkem genetických transmutací mohou buňky upravit například způsobilost růstu v různorodém prostředí.

V posledním období byla rozsáhlá pozornost soustředěna na komparaci nestejných typů ionizujícího záření se zaměřením na jejich mutagenní efektivitu. Efektivita, neboli účinnost různých druhů ionizujícího záření, se porovnává s použitím takzvané relativní biologické účinnosti (RBE). RBE testovaného druhu záření je koeficient, jenž stanovuje do jaké míry je záření biologicky efektivnější v porovnání s referenčním zářením. Jako referenční záření se používá zpravidla rentgenové nebo gamma záření. Účinnost záření je tím větší, čím menší je dávka nutná pro dosažení definovatelného účinku na živou tkáň. (7)

Pro pochopení působení záření na lidský organizmus je dobré si představit, že lidské tělo je množina sebe-recyklovatelných populací kmenových buněk. Tyto buněčné populace se rozvíjejí v organismech plodu u novorozence, následně se diferencují a jsou kompletně uchovány ve zbytku života pouze v některých buněčných a tkáňových systémech jako je tvorba červených krvinek.

Vezmeme-li organismus člověka jako komplex buněčných populací odlišných růstových profilů, potom na základě našich vědomostí o časovém a prostorovém šíření dávky jsme schopni relativně přesně rekonstruovat patogenetické procesy, které směřují do klinických projevů.

Expozice ionizujícím zářením způsobuje patologické transformace, které se mohou objevit v řádu dnů až týdnů, ale také v průběhu let nebo celých desetiletí, a proto se v minulosti používaly termíny časná a pozdní následky ozáření. V poslední dekádě se začalo používat jiné dělení vycházející z poměru dávky a účinku. Následky ionizujícího záření se z pohledu živého organismu rozdělují na deterministické, kdy po dosažení definované dávky ionizujícího záření efekt zákonitě nastává a stochastické, kdy pravděpodobnost poškození stoupá se zvyšující se dávkou. (10)

1.2 Základní techniky biodozimetrie

1.2.1 Hematologické testy

Lymfo-hematopoetické elementy patří u člověka mezi nejvíce replikovatelné tkáně a jako takové jsou nejvíce radiosenzitivní. Ze vzorků periferní krve je možno velice dobře zjistit míru poškození ozářením, a proto je tato metoda velmi často využívána jako biologický dozimetr.

Normální počet lymfocytů se může ve zdravé dospělé populaci značně lišit. Vzorky získané od malého počtu zdravých osob ukazují fyziologické hodnoty v rozmezí od asi $1,5 - 3,5 \times 10^9$ buněk / litr.

Při nižších dávkách (<2 Gy) vyvolá záření mírnou cytopenii bez významného poškození kostní dřeně. Lymfopenie v periferní krvi se může projevit po 6 - 24 hodinách v závislosti na velikosti dávky. Kinetika vývoje počtů lymfocytů v reakci na záření je stejně důležitá jako absolutní množství lymfocytů. Kromě indukce apoptózy, jejíž efekt není viditelný, před prvním buněčným cyklem se mění i recirkulace lymfocytů. V případě, že se jedná o kombinované poškození ozářením, poraněním nebo popálením, užití zjištění množství lymfocytů jako indikátoru obdržené dávky se stává nehodnověrným. (11)

Osoby zasažené ionizujícím zářením jsou například v americké armádě rozděleni podle počtů lymfocytů 24 hodin po expozici do těchto skupin:

- Množství lymfocytů je větší než $1,5 \times 10^9/l$

Tyto počty lymfocytů značí velkou nepravděpodobnost ozáření pacienta významnou dávkou.

- Množství lymfocytů je v rozmezí $1 - 1,5 \times 10^9/l$

Tato hodnota znamená expozici významnější dávkou. U ozářeného je předpoklad středního poklesu granulocytů a trombocytů během 3 týdnů.

- Množství lymfocytů v rozmezí $0,5 - 1 \times 10^9/l$

Ozáření budou vyžadovat léčbu pro rozvoj těžké formy dřeňového syndromu akutní nemoci z ozáření. Je nezbytná jejich hospitalizace, zvláště pro infekční a hemoragické komplikace 2 až 3 týdny po expozici.

- Počet lymfocytů je pod $0,5 \times 10^9/l$

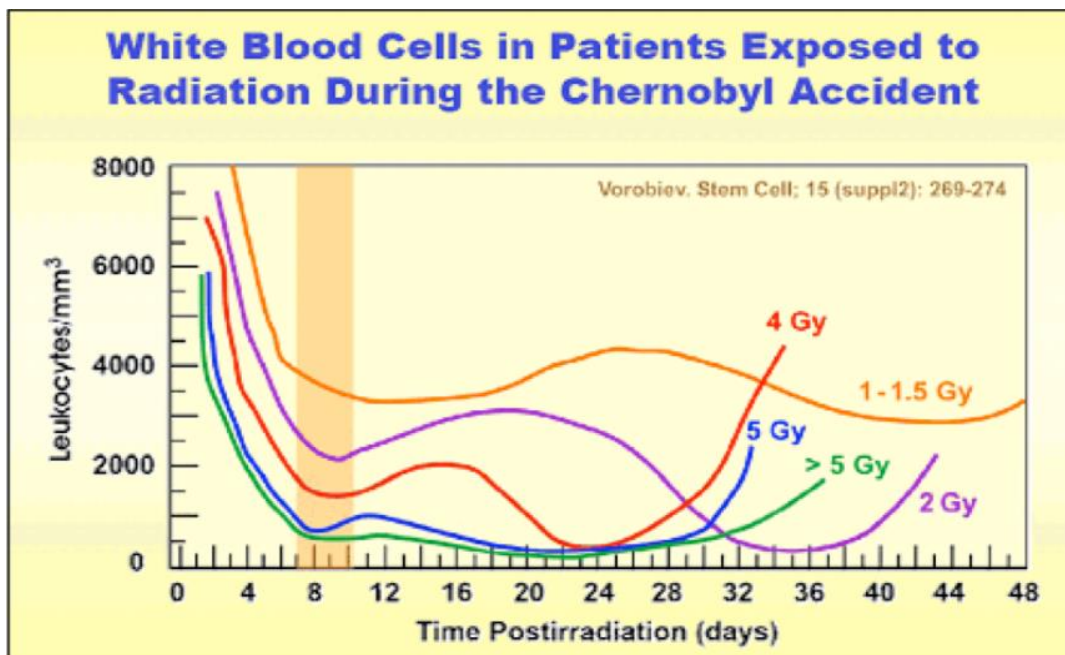
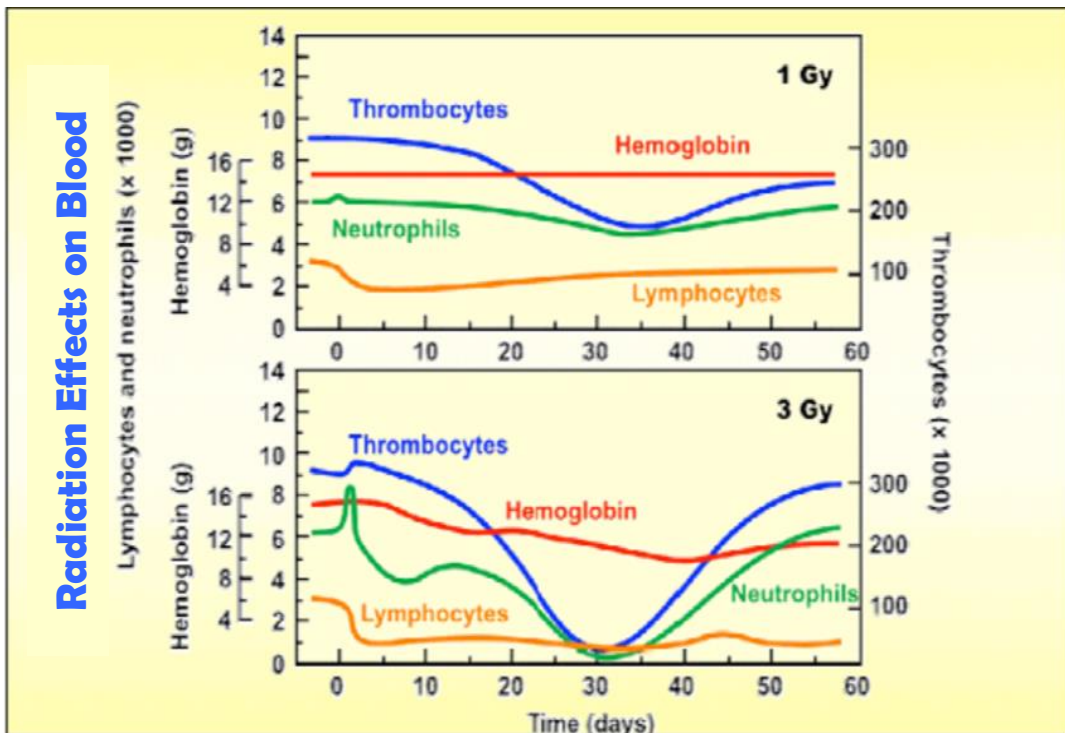
Obdržená dávka záření může být smrtelná. Je nezbytná hospitalizace pro pancytopenické komplikace.

- Lymfocyty nejsou detekovatelné

Dávka záření je supra letální a přežití ozářených je velmi nepravděpodobné. Významný počet takto exponovaných zemře na kardiovaskulární nebo gastrointestinální syndrom během dvou týdnů po ozáření.

Jak již bylo zmíněno výše, je nutno si uvědomit, že individuální množství lymfocytů velice osciluje, a proto by bylo příhodné vědět počet lymfocytů u jedince v období před expozicí. Potom by bylo možné použít pravidlo, že snížení lymfocytů 24 hodin po ozáření pod 50 % počátečních hodnot značí, že osoba byla exponována značnou dávkou záření. (12)

Údaje odhadované po havárii v Černobylu ukázaly, že po významné dávce (> 1 Gy) záření jsou ovlivněny negativně všechny krevní elementy. Zvýšení dávky má rostoucí vliv na změny krevního obrazu a účinky je možné pozorovat dříve. (11), (Obr. 3 a 4)



Obr. 3, 4 Vývoj počtu krevní elementů a bílých krvinek v závislosti na různých dávkách ionizujícího záření a načas. (11)

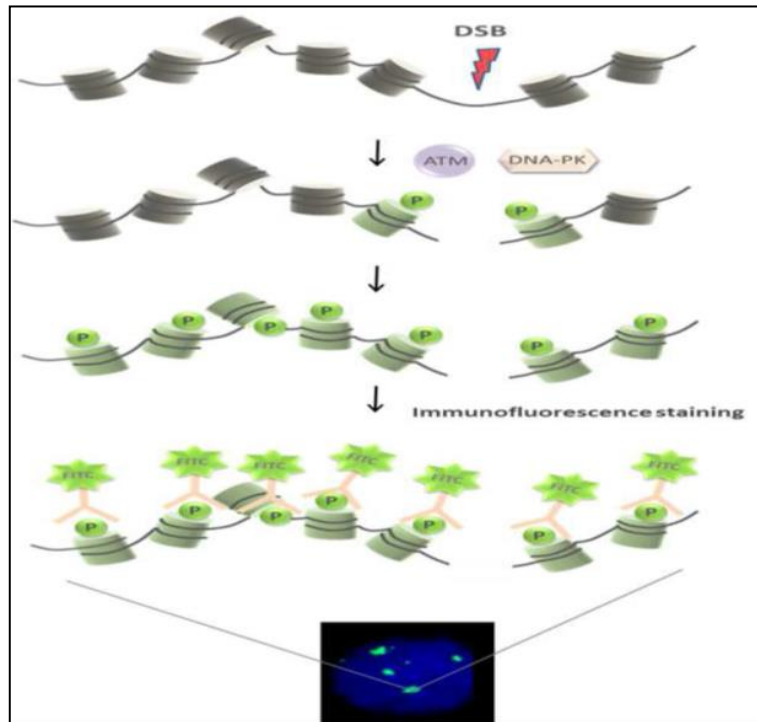
Analýza krevního obrazu dokáže zachytit jen rozsáhlé změny silně redukující funkční schopnost kostní dřeně. Po celotělově a parciálně ozářeném zvířecím modelu bylo prokázáno, že touto technikou nedokážeme zjistit vysoko-dávkové ozáření, které je lokalizované na plochu těla o velikosti jednotek procent. Obecně lze tedy konstatovat, že je tato technika nevhodná k diferenciaci mezi celotělovou a parciální expozicí. (14)

1.2.2 Metody založené na detekci poškození DNA

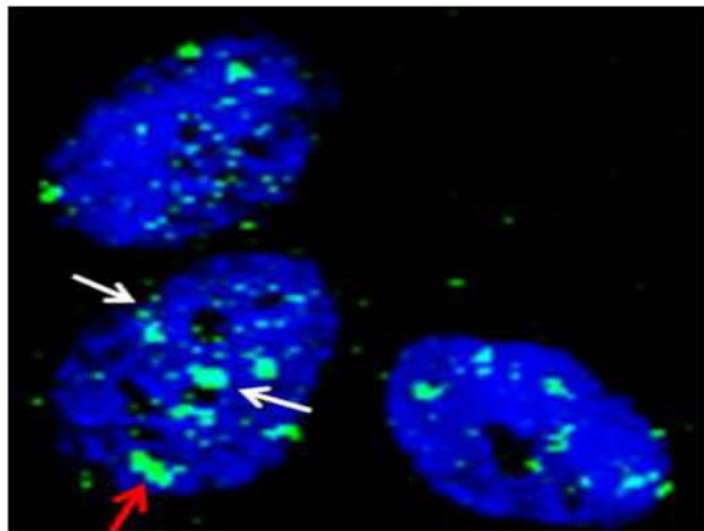
1.2.2.1 Ložiska gamma-H2AX

Měření fosforylace histonu H2AX je v současné době nejvíce citlivý způsob detekce poškození DNA ionizujícím zářením. Fosforylovaný histon H2AX se nazývá gamma-H2AX a je identifikován zvláštními protilátkami. Poté co se tyto látky spojí s fluorofory jsou mikroskopem pozorovatelné jako drobná jasná ložiska. (Obr. 5, 6). Měření gamma-H2AX ložisek je jednou z necitlivějších možností detekce DSB nebo jejich oprav. Množství ložisek a tedy i rozsah fosforylace odpovídají kvantu DSB.

Nejdůležitějším aspektem v detekci gamma-H2AX ložisek je zdroj poškozených buněk, které mají být testovány. Optimálním zdrojem pro tento účel jsou mononukleární buňky periferní krve připravené během centrifugace v gradientu hustoty. Výhoda spočívá v tom, že za prvé mohou být rutinně získány miliony buněk z jednoho mililitru krve a navíc mohou být připraveny během 30 minut v centrifuze, za druhé akvizice není tak invazivní jako biopsie a představuje malé riziko pro pacienty.



Obr. 5 Imunofluorescenční analýza fosforylace H2AX. (6)



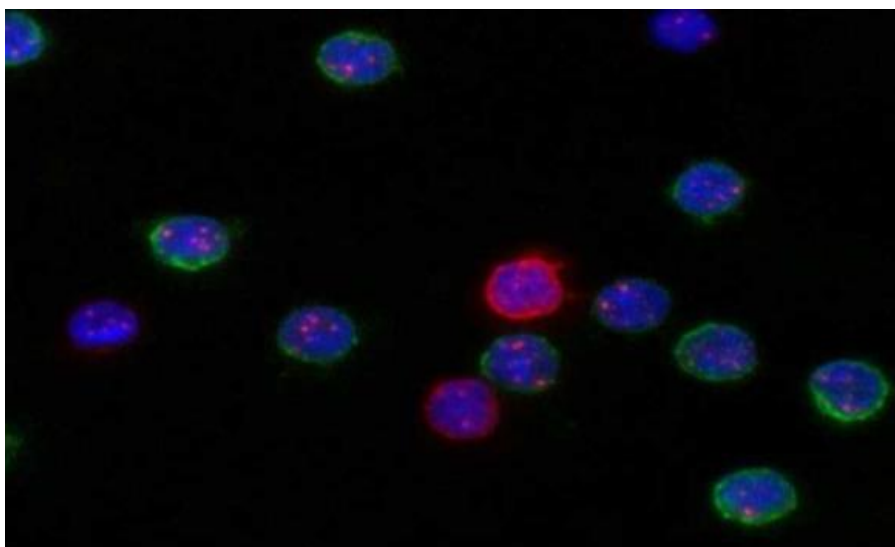
Obr. 6 Heterogenní gamma - H2AX ohniska. (6)

Potenciální problém s krevními mononukleárními buňkami je, že jsou produkovány lymfocyty (80 - 95% T-lymfocyty a 5 - 20% B-lymfocyty), které tvoří 80 až 90% těchto buněk. Kromě toho tento typ buněk obsahuje monocytů (5 - 10%) a variabilní množství kontaminujících neutrofilů. Všechny tyto buňky jsou sice schopné indukovat gamma-H2AX v reakci na ionizující záření, ale úroveň odezvy gamma-H2AX je u neutrofilů a v některých podskupinách lymfocytů nižší. (6)

Možnosti detekce imunocytochemicky značených gamma-H2AX mikroskopickou vizualizací umožňuje sledovat vznik ložisek a společnou lokalizaci gamma-H2AX s dalšími proteiny. Jednotlivá ložiska jsou mikroskopicky viditelná během několika minut po ozáření díky rychlé fosforylaci tisíců molekul gamma-H2AX. Ložiska lze snadno odlišit od relativně homogenního pozadí a tím zároveň detekovat jednotlivé DSB.

V případě „ručního“ sčítání okem přímo v mikroskopu může být dobře vyškolený pracovník poměrně rychlý a přiměřeně přesný, ale po čase se dostaví únava, zvláště v případě velkého počtu vzorků k analýze, proto jsou využívány počítačové softwary, které na základě optické integrální denzity analyzují obraz.

Imunocytochemické označení a další rozpoznání v konfokálním mikroskopu umožňuje pozorovat zrod ložisek a hromadnou kolokalizaci gamma-H2AX s dalšími proteiny a jejich subcelulární lokalizaci. (15)



Obr. 7 Gamma-H2AX ložiska v lidských lymfocytech (CD4 a CD8 subtypy) po ozáření 0,5 Gy gamma-paprsky, 30 minut po expozici. Modrá barva odpovídá DAPI (fluorescenční barvivo); purpurová barva odpovídá označení gamma-H2AX; zelená a červená barva odpovídá CD4 + a CD8 + membránovému značení. (6)

Nejvýhodnější technikou pro zjištění počtů ložisek gamma-H2AX se ukazuje průtoková cytometrie. Tato technika je rychlá, kvantifikace je přesná a vhodná k rutinnímu určení požadovaných parametrů. Buňky jsou napuštěny a permeabilizovány v mořícím buffer roztoku obsahujícím fluorescenčně značené gamma-H2AX protilátky a barviva DNA. Po obarvení v době od 15 minut až do několika hodin mohou být vzorky analyzovány přímo průtokovou cytometrií bez dalšího zpracování. (Obr. 7)

Při této technice lze analyzovat až 100 000 buněk v každém vzorku během několika minut a to umožňuje detekovat i malé podmnožiny gamma-H2AX pozitivních buněk. (6) Metoda průtokové cytometrie je méně náročná na pracovní sílu ve smyslu zkušeností a schopností, ale také je méně analyticky citlivá oproti počítání gamma-H2AX ložisek při použití imunofluorescenční mikroskopie. (15)

Několik studií na pacientech, kteří byli vystaveni velmi nízké dávce záření ukázaly, že test gamma-H2AX je velmi citlivý, a že mohou být detekována ložiska po dávkách nižších než 20 mGy jak pomocí mikroskopu tak průtokovou cytometrií. Velikou nevýhodou, která značně omezuje použití této metody pro havarijní situace je, že

poločas ložisek je v řádu nemnoha hodin. Tato metoda je využitelná především ve zdravotnictví nebo při expozici malého počtu osob. (6)

1.2.2.2 Profily exprese genů – DNA microarray

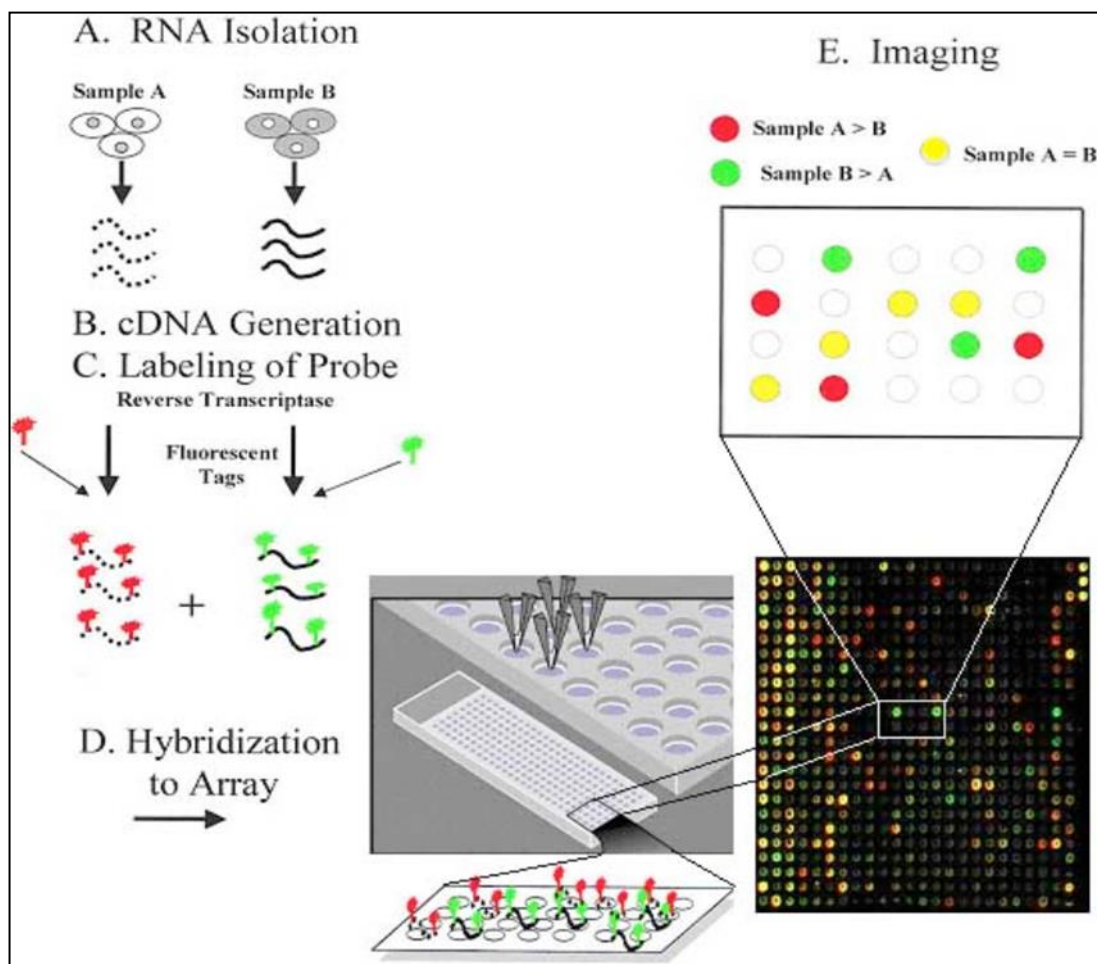
Všechny buňky těla obsahují stejný genetický materiál, ale ne všechny geny jsou stejně aktivní ve stejné buňce. Analýza, které geny jsou aktivní, a které jsou neaktivní, v různých typech buněk pomáhá pochopit fungování buněk, důvody jejich poškození a případné reakce na léčbu. (11)

Genová exprese, při které se v genu DNA uložená informace převádí a uskutečňuje na přesně definované buněčné struktuře anebo funkci, prochází dvěma stádii. Nejdříve vznikne transkripce (kopie, přepis), při které vzniká mediátorová neboli informační RNA (mRNA - messenger Ribonucleic Acid). Její vlákno je kopií konkrétní sekvence báze jednoho z vláken DNA dvojšroubovice. Transkripce (přepsání) DNA do RNA je urychlována enzymem RNA - polymeráza (DNA dependentní). Lineární jednovláknová mRNA molekula po zakončení transkripce se odloučí a přesunuje se do cytoplasmy. Poté je provedena translace (přepis, překlad) mRNA do proteinu, který má sekvenci aminokyselin kódovaných mRNA jako templátem (matricí). Tato syntéza proteinů probíhá v ribosomech. Sdělení se tak tlumočí z "řeči" nukleových kyselin DNA do "jazyka" aminokyselin, z kterých jsou vystavěny proteiny. Vystavěné proteiny mohou být aplikovány samotnou buňkou, eventuálně mohou putovat do dalších orgánů, buněk nebo tkání. (9)

Zatímco ještě před deseti lety bylo možné studovat jen několik genů najednou, vývoj DNA čipů umožňuje simultánní analýzu exprese tisíce genů. Tyto čipy jsou vyrobeny z mnoha molekul DNA nazývaných sondy, které jsou uloženy ve známé pozici na nosiči, kterému říkáme microgrid; odtud pochází název microarrays. (11)

DNA čip známý pod anglickým názvem DNA microarray, je technologie molekulárně-biologické analýzy výrazně paralelního rázu umožňující především analýzu exprese genů. Jde o destičku většinou skleněnou nebo silikonovou s velkým

množstvím řádově desetitisíců, ale i s miliony vzorků jednovláknových oligonukleotidů takzvaných sond, což jsou krátké jednovláknové molekuly DNA. Vždy několik stejných molekul na jednom místě tvoří vlastnosti (features), které jsou na destičce prostorově odděleny. (Obr. 8)



Obr. 8 Schéma výroby mikročipu. (11)

Po kontaktu takovéto destičky se zkoušeným vzorkem - směsí označených DNA oligonukleotidů - dotčené molekuly vzorku (pojmenované jako cílové) hybridizují s komplementárními molekulami zachycenými na destičce. Poté jsou klasicky na bázi fluorescence označena místa, na kterých proběhla hybridizace a je tak určeno, o jaké molekuly oligonukleotidů se ve vzorku jednalo.

V dnešní době existují DNA čipy vyráběné komerčně a rovněž jsou také ve velké míře produkovány ve výzkumných laboratořích pro vlastní potřebu.

Výše popsaný postup lze modifikovat užitím dvou vzorků, například zdravých a ozářených buněk, označených odlišnými barvivy, třeba červeným nebo zeleným. Finálním produktem je relativní informace o diferenci v expresi genů mezi vzorky a je možno jednoduše určit, které geny jsou vlivem mutagenu v buňce podexprimované nebo nadexprimované. I jediný experiment vytváří početné kvantum dat, a proto je pro vyhodnocení výsledků nutné využít postupy bioinformatiky. (19)

Celkově můžeme říci, že určení intenzity postradiačních změn v expresi genu, ale i v proteinu se jeví jako relativně nadějná cesta biologické dozimetrie i přesto, že ionizujícím zářením způsobené změny nejsou stálé, projevují se nejdéle 1 až 3 dny, přesto má tento postup několik předností. Metoda je výhodná v tom, že přeměny genové exprese je možné sledovat u lidských nádorových linií již po expozici dávkami 0,02 Gy in vitro a u periferních myších lymfocytů exponovaných ex vivo dávkami 0,2 Gy. Další předností je menší technická a finanční náročnost ve srovnání s testy zabývajícími se chromozomálními aberacemi. (14, 19)

1.2.2.3 Proteinový biomarker

Organismy reagují na ozáření změnou exprese nebo též post-translační modifikací některých proteinů v buňkách tkání nebo v organických kapalinách, jako je krevní sérum nebo moč. Exprese a profilování proteinu může být použita k měření velikosti obdržené dávky záření a následnému vyhodnocení poškození organismu. Bílkoviny lze snadno získat neinvazivně v moči nebo poloinvazivně v případě odběru krve. (11)

Jejich kvantifikace je rychlá a spolehlivá. Probíhá pomocí techniky imunodetekce ve výše zmíněných biologických tekutinách v buňkách cirkulujících lymfocytů nebo v biopsiích získaných tkáních. Pro zjištění expozice se nejčastěji používají jako bioindikátory dva proteiny; za prvé se jedná o amylázu (enzym zabezpečující štěpení škrobu na jednodušší cukry) jako indikátoru radiačního poškození příušní žlázy, za

druhé je to Flt3-Ligand (Flt3-L), jedná se bioaktivní protein určený pro použití v aplikacích buněčné kultivace ukazující poškození kostní dřeně. Dalším možným indikátorem může být citrulin, což je aminokyselina, kterou lze použít jako fyziologický marker pro poškození epitelu tenkého střeva. (21)

Vzestup sérové amylázy, který je způsoben ozářením slinných žláz, je biochemickým měřítkem počátku účinku záření. Reflektuje mezifáze až po buněčnou smrt serózních slinných buněk. Tato metoda se také používá jako biochemický ukazatel poškození při léčbě karcinomu slinných žláz jódem (^{131}I) i jako biochemický dozimetr pro zjištění míry expozice posádek vesmírných lodí kosmickým zářením při dlouhodobém pobytu ve vesmíru. Aktivita v séru je měřena pomocí chemického analyzátoru krve. Zvýšení sérové amylázy se musí měřit časně (v rozmezí půl až dva dny po podezření na ozáření), aby mohla tato technika sloužit jako biochemický indikátor pro identifikaci osob s potenciálně vážným poškozením tkáně radiací. Dávky, které jsme schopni detekovat touto metodou, jsou v rozmezí 0,5 – 10 Gy.

Flt3-L je hematopoetickým cytokin strukturálně shodný s růstovým faktorem kmenových buněk (SCF), který zodpovídá za produkci zrání a přežívání (potlačování apoptózy) mastocytů a dále je strukturálně shodný s růstovým faktorem 1 (CSF-1), který působí na progenitorové buňky (krvetvorná kmenová buňka z periferní krve) v kostní dřeni a stimuluje jejich proliferaci. CSF faktory jsou úzce propojeny s průběhem reakce na poškození tkáně a různých imunitních reakcí. SC a CSF patří také k cytokinům.

V kooperaci s dalšími růstovými faktory Flt3-L stimuluje proliferaci a diferenciaci různých krevních buněk progenitorů. Množství Flt3-L je zvýšeno v krvi u pacientů s aplastickou anémií (dřeňový útlum). Koncentrace Flt3-L v plazmě nebo séru je během prvních 5 dní po expozici zářením přímo úměrná s dávkou záření, což bylo ověřeno na primátech (1 - 14 Gy). Dávky měřitelné touto metodou jsou v rozpětí 0,25 - 4,5 Gy. (11)

Odchytky v koncentraci Flt3-L v plazmě ukázaly, že přímo reflektují poškození kostní dřeně zářením indukovaným během frakční lokální radiační terapie, což poukazuje na možné využití monitorování Flt3-L jako prostředku pro predikci výskytu leukopenie nebo trombocytopenie v průběhu radioterapie nebo při radiační nehodě. (11)

Plazmové Flt3-L se měří pomocí kvantitativní sendvičové enzymové imunoanalýzy s použitím komerčního testu ELISA (Enzyme - Linked - Immuno - Sorbent - Assay), jedná se o jednu z nejpoužívanějších imunologických technik ke zjišťování protilátek. Soupravy k analýze jsou velice citlivé (méně než 7 pg/ml), konkrétní a neukazující žádnou významnou krosreaktivitu s jinými lidskými cytokiny. Slibnou metodou se jeví tzv. „Western Blot“ v české odborné literatuře rovněž označovaný termínem „Imunoblot“, jedná se o analytickou techniku používanou k detekci speciálního proteinu ve směsi s dalšími proteiny. Dalšími metodami jsou průtoková cytometrie nebo hmotnostní spektrometrie pro identifikaci sad proteinů. (21)

Proteiny se ukazují jako vhodné biomarkery pro použití při detekci ozáření nebo při předpovědi závažnosti nastávajících lézí, protože jejich složení v biologických tkáních a v biologických tekutinách se mění po ozáření. Použitím sady proteinů lze dosáhnout mnohem lepší diagnostický nebo prognostický biomarker než v případě jednoho proteinu, neboť kombinace nespecifických změn se může ukázat jako citlivější, konkrétnější a užitečnější nástroj pro vyhodnocení expozice. V současnosti se jedná o relativně novou biodozimetrickou techniku, která má velký potenciál využití při hromadných radiačních nehodách, ale dosud nebyla ve větším případě ověřena. (21)

1.2.2.4 Glycophorin A (GPA)

a Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferaza (HGPRT)

Glycophorin je glykoprotein, který je umístěn na membráně erytrocytů. Může se vyskytovat ve dvou formách alel M nebo N. Množství mutací lineárně koreluje s velikostí absorbované dávky. Četnost odchylky se nezvyšuje v případě vystavení středně nízkou dávkou, i když akumulovanou po delší dobu. Dalším limitujícím omezením pro použití testu mutací GPA je skutečnost, že geny pro tento antigen se dědí v souladu s klasickými Mendelovými zákony, polovina obyvatelstva exprimuje heterozygotní typ M/N. Při napadení mutagenem se jedna nebo dvě alely GPA genu

mohou inaktivovat v jediné buňce prekursoru erytrocytu (zopakujme si, že dospělé erytrocyty neobsahují DNA a žijí 100 - 120 dnů). Buňky pocházející z těchto poškozených prekursorových buněk jsou emitovány do periferního oběhu a ukazují se jako erytrocyty dvou typů, a to buď N0 nebo M0.

Pro zjišťování výskytu takových buněk se užívají odlišně barvené protilátky zvláště pro M nebo N formy glykoforinu A k imunologickému označení erytrocytů a jednotlivě značené M0 nebo N0 buňky totožně tak jako dvojité značené MN buňky se dále vyhodnocují pomocí průtokového cytometru. (18)

Frekvence mutantů je v řádu 2×10^{-5} , přitom téměř stejná frekvence je indukována dávkou 1 Gy. Z toho lze vyvodit, že tato technika není příliš senzitivní a počítá se obecně s nejnižší měřitelnou dávkou 0,2 – 0,3 Gy. Jelikož tato analýza je závislá na přeměně z dvoubarevného na jednobarevné značení, objevuje se další nevýhoda, protože metoda je použitelná jenom pro polovinu obyvatelstva a to jen pro M/N heterozygotů. Z tohoto důvodu mezinárodní organizace ICRU (Commission on Radiation Units and Measurements) nedoporučuje GPA jako vhodnou metodu pro biologickou dozimetrii. Naproti tomu je potenciálně aplikovatelná jako dozimetr po celé období života, neboť se zdá, že mutantní frekvence jsou stále po dobu desítek roků. Toto bylo doporučeno po analýze údajů jednotlivců přeživších jaderné havárie v Černobylu a jaderného bombardování japonských měst Hirošimy a Nagasaki, u kterých je možno sledovat lineární korelaci na dávce do několika Gy. (18) Naproti tomu nebyla nalezena žádná souvztažnost s dávkou mezi pracovníky v jaderné elektrárně v Sellafieldu, pravděpodobně kvůli relativně vysoké prahové dávce asi 1 - 2 Gy testu GPA. (12)

V předchozím textu je uvedeno, že GPA mutace exprimované v erytrocytech, které jsou indukovány v prekursorových buňkách v kostní dřeni, mohou vzniknout rovněž v periferních krevních buňkách, přesněji v lymfocytech. Nejpodrobněji prozkoumanou odchylkou tohoto druhu je mutace Hypoxanthin - Guanin-Fosforibosyl-Transferázového (HGPRT) genu. Buňky, které neexprimují funkční HGPRT gen, nemohou zužitkovat 6 -thioguanin, což je obdoba hypoxanthinu a guaninu, purinových bází zabíjející buňku při zavedení do DNA. (23)

Mutanty lze proto identifikovat na podkladě jejich odolnosti na 6 – thioguanin a to znamená lymfocyty s mutací HGPRT, které můžou být stimulovány ke zmnožení (proliferaci) v prostředí, kde se vyskytuje tento toxin. Možným způsobem analýzy mutace HGPRT je zjištění schopnosti inkorporacebromdeoxyuridinu (BrdU), obdoby thyminu, jenž je možno detekovat prostřednictvím vhodných protilátek. Tento postup se jeví jako pracný a nevede k použití při velkých radiačních událostech. Dalším handicapem tohoto vyhodnocení je, že mutované lymfocyty, které jsou částečně podobné s lymfocyty s nestabilními chromozomovými aberacemi, se zdají být selektovány oproti situaci in vivo. Objevují se v periferní krvi po dobu mnoha let po expozici, ale s frekvencemi, které nelze odlišit od pozadí. Přesný poločas výskytu neznáme. Samovolná frekvence HGPRT mutací je v rozsahu 10^{-6} - 10^{-5} a indukovaná frekvence v Gy se jeví obdobně jako frekvence pro krátkodobé využití (analýza bezprostředně po ozáření). Navíc test HPRT mutace také vykázal rozdíly v rychlosti obdržení dávky a toto je velmi užitečný parametr pro odhad rizik v oblasti radiační ochrany. (22) Senzitivita této techniky by měla být přibližně shodná s analýzou GPA. Předností HGPRT mutace se zdá být skutečnost, že byla rozsáhle zkoumána na úrovni DNA a byly zjištěny určité typické odlišnosti mezi mutacemi spontánními, mutacemi způsobenými rentgenovým zářením a mutacemi způsobenými zářením alfa. Z tohoto důvodu existuje potenciál dalšího rozvoje speciálních testů pro zjištění typu záření způsobující dané mutace. (18)

1.2.2.5 Analýza Comet Assay

Gelová elektroforéza jednotlivých buněk - The Single Cell Gel Electrophoresis Assay (SCGE) známá jako test Comet Assay je rychlý, citlivý a poměrně jednoduchý způsob, který umožňuje kvantitativní posouzení poškození DNA ionizujícím zářením. Test byl nazván podle podobnosti tvaru, který vzniká po použití této metody s tvarem kosmického objektu - komety. Tato metoda má také velké využití při studiu oprav DNA, protože kombinuje jednoduchost biochemických metod při detekci jednoduchých

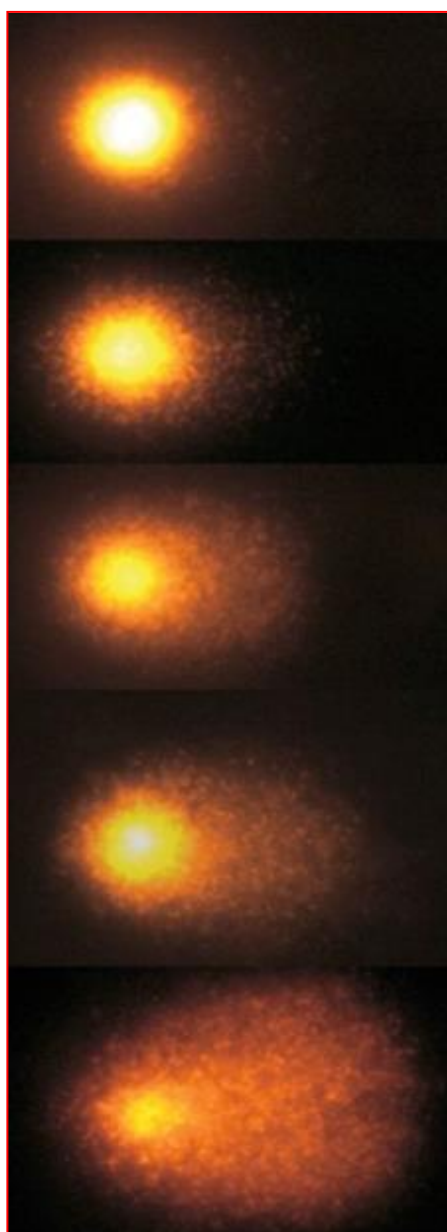
(SSB) a dvojitých zlomů (DSB). Dále lze touto metodou pozorovat křížové vazby (crosslinks), alkali-labilní polohy (ALS), oxidační a alkylační poškození bází a poruchy korelující s apoptózou. (24)

Comet Assay je mikroeletroforetická technika vyhodnocující poruchy DNA přímo v jednotlivých buňkách. (25) Výskyt zlomů v DNA způsobuje lokální relaxaci v superhelixu (nadšroubovice). Projde-li gelem nevelký elektrický náboj, relaxované struktury DNA smyček směřují směrem k anodě a formují ocas komety. Hlavu komety znázorňuje neporušená DNA, jenž nemůže pro svoje rozměry prostupovat gelem. (11)

Testování bylo prováděno na eukaryotických buňkách (buňky s jádrem). Jako měřítko pro vyhodnocení objevujících se komet byl vzat Olive Tail Moment (OTM), který je součinem délky ocasu s procentem DNA v ocasu komety ($OTM = \text{délka ocasu} \times \% \text{ DNA v ocasu} / 100$), což jsou dvě důležité charakteristiky přímo související s poškozením DNA. (24)

Jako první byla aplikována neutrální verze Comet Assay, která využívala pokročilou techniku, kde v neutrálním roztoku byly buňky lyzovány, a potom byla provedena elektroforéza, což je separační metoda s využitím stejnosměrného proudu využívající rozdílných elektroforetických mobilit, při nichž se dělí nabitě molekuly. DNA byla zbarvena fluorescenčním barvicí látkou (akridovou oranží), která vyzařovala zelenou emisi kvantifikovanou fotometrem. Tato neutrální forma analýzy však umožňovala pouze detekci dvojitých zlomů DNA. Další verzí testu Comet Assay je alkalická forma, která využívá délky ocasu k početní kvantifikaci stupně poškození DNA. Pomocí této verze Comet Assay je možno pozorovat oba typy poškození a to s využitím poměru zelené fluorescence pro DSB a červené fluorescence pro SSB. (11)

Možné členění komet do kategorií podle poškození



Typ 1: Kometa bez ocasu, kde genetický materiál zůstává v jádře: žádné genetické poškození

Typ 2: Buňka s malým ocasem, malá migrace fragmentů: lehké genetické poškození

Typ 3: Buňka s viditelným ocasem: střední genetické poškození

Typ 4: Buňka s jasně definovaným ocasem definuje velké poškození s množstvím fragmentů

Typ 5: Skoro všechna DNA je v ocasu: velmi těžké genetické poškození

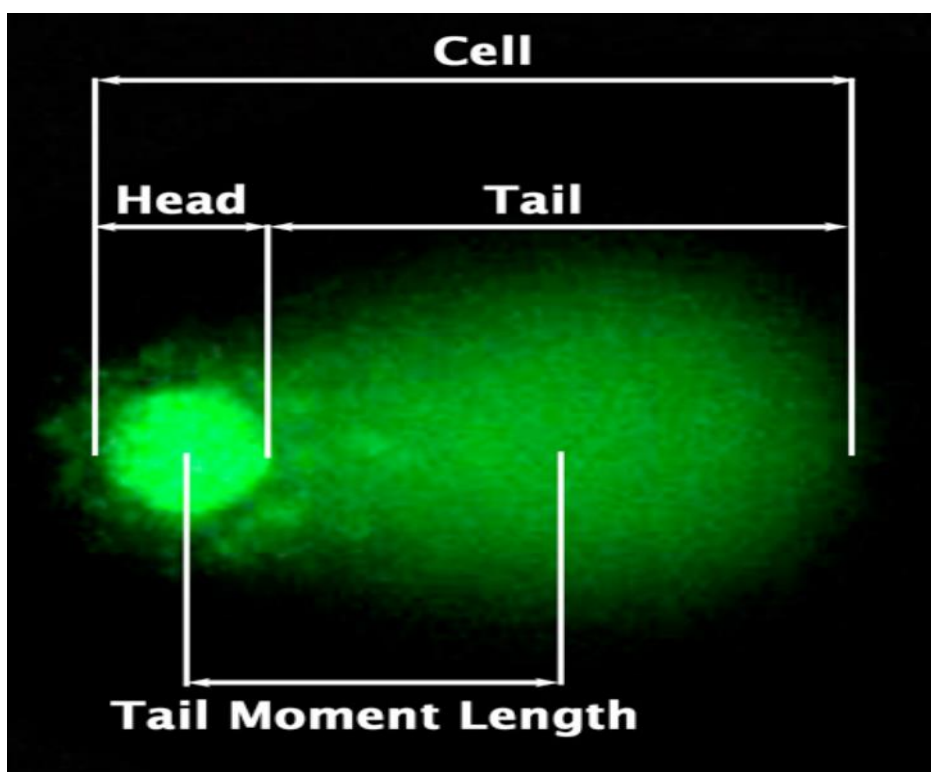
Obr. 9 Kategorie pro vizuální hodnocení analýzy Comet Assay. (11)

Poškození DNA lze zjišťovat dvěma základními způsoby:

Vizuální hodnocení: Pro tuto metodu analýzy pracujeme s 200 buňkami pro každý snímek a ten zařadíme do 5 typů poškození. (Obr. 9) Poté se vypočte index poškození, což je suma součinů procentuálního zařazení buněk náležejících do jednotlivé třídy (typu komety).

ID (index of damage) = $0x$ (počet buněk typu 1) + $1x$ (počet buněk typu 2) + $2x$ (počet buněk typu 3) + $3x$ (počet buněk typu 4) + $4x$ (počet buněk typu 5).

Automatizovaná analýza: Komety jsou sledovány a hodnoceny fluorescenčním mikroskopem opatřeným kamerou spojenou s počítačem. Měření migrace DNA se provádí softwarem pomocí různých analýz obrazu.



Obr. 10 Parametry tzv. komety. (11)

- Tail Length = Délka ocasu je vzdálenost migrace DNA od středu jaderného jádra (Obr. 10)
- Tail % DNA = % DNA přítomná v ocase.
- Tail Moment: Ocasový moment je definován jako součin délky ocasu a % DNA přítomné v ocase.

Hlavní parametry měření pomocí počítačového softwaru je oblast ocasu, % DNA ocasu, délka ocasu nebo součin % DNA v ocasu s délkou ocasu, což tvoří takzvaný ocasový moment. (11)

Nejvýhodnějším parametrem pro hodnocení je procentuální zastoupení DNA v ocasu, které můžeme považovat za dostatečně objemné. (25)

Kometová analýza není určena jenom pro zjišťování a měření řetězcových poškození. Využitím enzymů můžeme například potenciálně detekovat určitější typy poškození DNA. Jedná se především o enzym formamidopyrimidin-DNA-glykosylasu (FPG) detekující oxidované puriny především 8 - oxoguanin, což je molekula, která způsobuje zárodečné mutace. Bylo zjištěno, že zvýšená koncentrace 8-oxoguanine v tělních tekutinách je spojena se zvýšeným rizikem mutagenese a karcinogeneze. Použití enzymů činí metodu SCGE mnohem univerzálnější. (25)

Z hlediska provedení má kometová analýza množství výhod. Je to zvláště snadnost realizace bez nutnosti speciální výbavy, rychlost, relativně nevelké náklady, citlivost, potřeba malého vzorku buněk (do 10000) a v případě užití specifických enzymů taktéž určitou selektivitu. V neposlední řadě je velkou výhodou možnost využití jakýchkoliv eukaryotických buněk, jak in vivo, tak in vitro. Citlivost metody je v rozmezí 0,1 – 8 Gy. (17) Experimentálně byla detekována dávka 0,005 Gy. Nevýhodou je obtížná interpretace výsledků, protože mezi poškozením DNA (indikovaným ohonem komety) a biologickým dopadem tohoto poškození neexistuje přímá interakce. (11, 25)

1.2.3 Metody založené na detekci chromozomálního poškození

1.2.3.1 Detekce dicentrických chromozomů, kroužků a fragmentů

Dicentrické chromozomy jsou abnormální chromozomy se dvěma centromerami na rozdíl od normálních s jednou centromerou. (Obr. 11) Dicentrický chromozóm je dvojnásobně spoután dvěma centromerami a tažen při dělení buňky k opačným pólům vřetena, což může chromozóm zlomit. Zlomené konce chromozomu se mohou spojit v dceřiné buňce a vytvořit nový dicentrický chromozóm. Dicentrické chromozomy proto vedou k nestabilitě chromozomů. (11)

Takovéto chromozomy jsou po obarvení dobře viditelné. Metoda detekce je založena na stimulaci lymfocytů z periferní krve fytohemaglutininem, kdy se lymfocyty uvedou do mitózy a mikroskopicky je následně možné sledovat počet dicentrických aberací v jednotlivých jádrech buněk. Většina chromozomálních aberací je neslučitelná s dalším životem buňky a z tohoto důvodu buňka obvykle zahyne při pokusu o dělení.

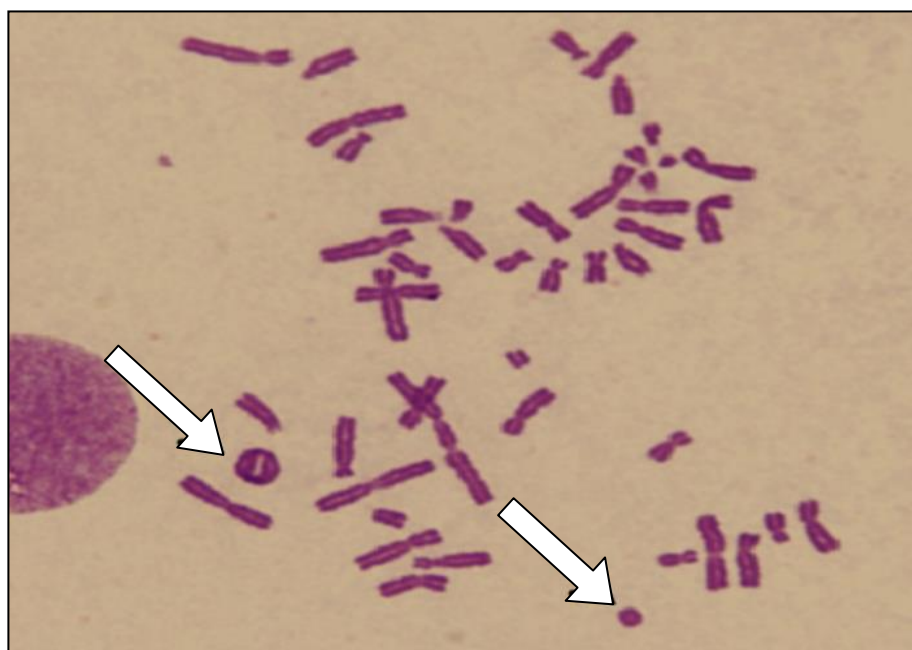
Detekce výskytu dicentrických chromozomů je všeobecně akceptována jako nejhodnověrnější indikátor absorbované dávky, a proto je již mnoho let považována za zlatý standard biologické dozimetrie. I když je výskyt všech typů chromozomových aberací dávkově závislý, dicentrická analýza hodnotí jenom výskyt dicentrických chromozomů.

Výskyt kroužkových chromozomů není tak častý a jejich detekce by přinášela nezbytnost hodnocení značně vyššího množství buněk a zvýšení finančních prostředků a navíc by se časově prodlužovala. (Obr. 12)

Množství chromozomových fragmentů je podobné výskytu dicentrických chromozomů, ale jejich hodnocení nese velké riziko chybného hodnocení přítomného buněčného detritu (neživá organická hmota). (26)



Obr. 11 Dicentrický chromozom s doprovodným acentrickým fragmentem (Giemsa barvení). (28)



Obr. 12 Metafáze se dvěma kroužky (Giemsa barvení). (28)

V odborné literatuře se objevuje v rámci problematiky detekce dicentrických chromozomů termín „Rogue cells“. Tyto buňky jsou definovány jako buňky připravené v metafázi z kultivovaných krevních lymfocytů, které vykazují mimořádně vysokou úroveň poškození chromozomu bez zjevné příčiny. Pro potřeby biodozimetrie jsou tyto buňky z hodnocení obdržené dávky vyloučeny s výjimkou případu, kdy je průkazné ozáření velmi vysokou dávkou. (28)

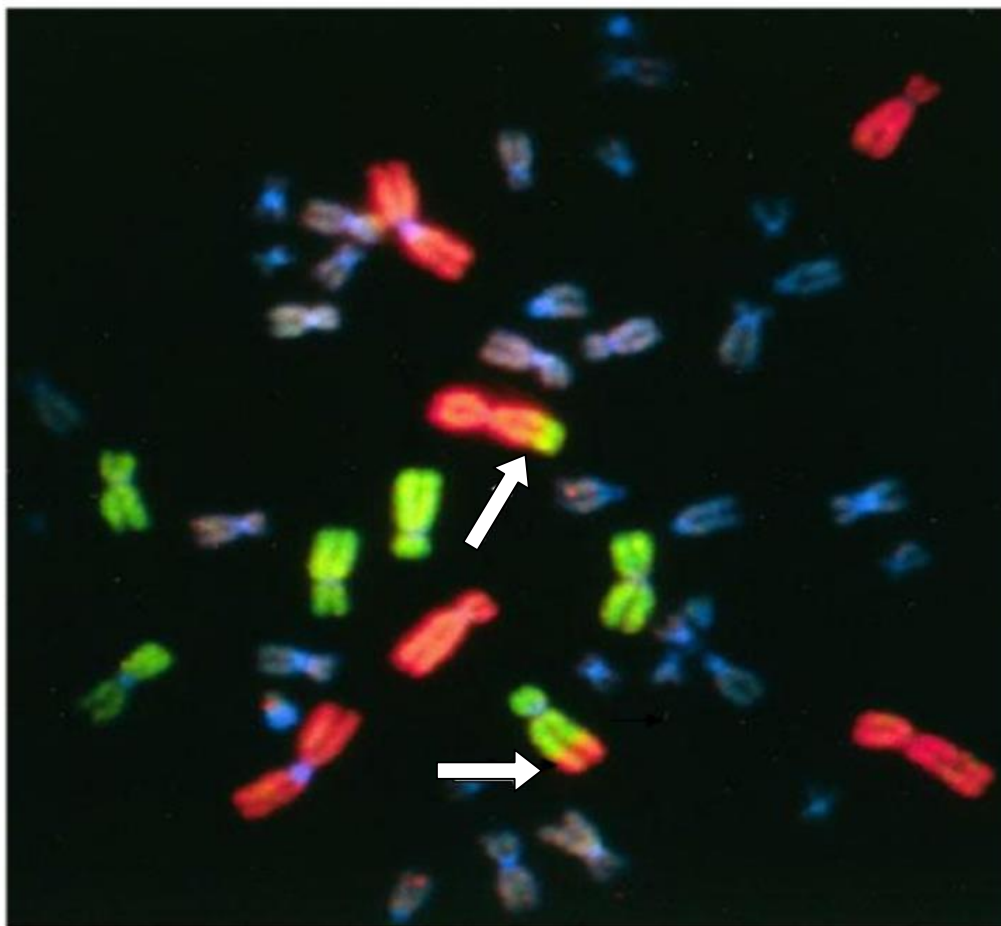
Metoda detekce dicentrických chromozomů je velmi citlivá, specifická a je vhodná i pro stanovení malých dávek záření. Obecně akceptovatelnou dávkou, kterou je možno touto metodou měřit je již 0,1 Gy, je však potřeba vyhodnotit alespoň 1000 buněk. Metoda má některé svoje limity. V případě expozice vyššími dávkami je těžké nalézt tak velké množství buněk v mitóze, protože dochází k její oddálení (v důsledku bloku v některé fázi buněčného cyklu jako reakci na poškození buňky) a dále k depleci lymfocytů a jejich interfázové smrti. Dalším limitem této metody je čas, kdy jsou získány výsledky, neboť inkubace lymfocytů s mitogeny trvá nejméně 48 hodin. Frekvence nestabilních aberací, dicentrických i kroužkových, klesá 6 týdnů po ozáření s poločasem 3 roky. (27, 28)

V případech radiačního ozáření velkého množství osob je metoda detekce dicentrických chromozomů schopna určit velikost obdržené dávky a z toho posoudit zdravotní rizika a potřeby lékařské péče, což se potvrdilo po radiačních haváriích, jako byl Černobyl nebo Goiânia, kde došlo k akutní expozici velkého počtu osob a vzorky krve mohly být poskytnuty v relativně krátké době. Detekce dicentrických chromozomů se stala jednou z hlavních metod biodozimetrie při velkých jaderných nehodách. (11)

1.2.3.2 Detekce translokací - Fluorescenční in situ hybridizace - FISH

Tato metoda detekuje stabilní chromozomové aberace takzvané translokace a je primárně využívána k analýze chromozomových aberací v mitózách i v nedělicích se interfázních jádrech. K tomuto účelu jsou používány DNA sondy pro specifické chromozomové struktury (satelitní DNA, telomery, centromery), malovací sondy pro

celé chromozomy, sondy pro jedinečné genové kopie (lokus-specifické sondy) a genomové sondy. Podstatou techniky je hybridizace neradioaktivně značených DNA sond ke komplementárním částím cílové DNA chromozomů anebo interfázních buněčných jader fixovaných na mikroskopickém preparátu a jejich následná vizualizace (Obr. 13) s rozbořením fluorescenčních signálů pod mikroskopem. (29)



Obr. 13 Příklad barvení chromozomů metodou FISH. Chromozomové páry 1, 2 a 4 jsou barveny červeně a chromozomové páry 3, 5 a 6 jsou barveny zeleně. Reciproké translokace jsou zobrazeny jako dva dvojbarevné chromozomy (2 a 5), které si vyměnili segmenty na konci svých dlouhých ramen. (28)

Ke specifické hybridizaci dochází pouze v případě, že existuje dostatečná komplementarita (vzájemná podmíněnost) mezi sekvencemi jednoduché DNA sondy a DNA chromozomů. Existují dva způsoby detekce fluorescenční sondy, přímý a nepřímý.

Při nepřímém způsobu značení jsou do DNA sond včleněné chemicky modifikované nukleotidy. Základní princip spočívá v tom, že biotin nebo digoxigenin se kovalentně naváží na dUTP (fotoaktivní nukleotid), který se začlení do sekvence sondy namísto thyminu. Po hybridizaci s takto označenou sondou se uskuteční imunodetekce pomocí protilátek konjugovaných s příslušným fluoroforem. (30)

V přímé metodě je do DNA sondy také včleněn dUTP, ale s navázaným fluoroforem. Hybridizační cíl sondy je tedy možné pod fluorescenčním mikroskopem pozorovat bezprostředně po hybridizační reakci. Pro takové metody je nezbytné, aby vazba „sonda - detekovaná molekula“ vydržela poměrně drsné hybridizační a promývací podmínky. Obecnou nevýhodou přímých metod oproti nepřímým je to, že jsou méně senzitivní. I přesto jsou v současné době používány většinou přímo značené sondy. (29)

Metoda FISH techniky sestává z těchto kroků:

- fixace materiálu a zhotovení preparátu s cílovým místem (metafázující chromozomy),
- příprava a značení sond,
- denaturace sondy,
- denaturace cílového místa,
- hybridizace mezi sondou a cílovým místem,
- odstranění nenavázané nebo nespecificky navázané sondy,
- vizuální detekce hybridizačních míst,
- barvení pozadí,
- vyhodnocení a dokumentace (mikroskopem, fotografováním, počítačovým zpracováním fluorescenčního signálu).

Metoda FISH WCP (whole chromosome painting) využívá takzvané "prosvícení" chromozomů fluorescenčními sondami. Celochromozómové sondy hybridyzují s celými

jednotlivými chromozomy v metafázi. Každá taková sonda je vlastně souborem sond, které specificky hybridizují s mnoha jedinečnými sekvencemi podél cílových chromozomů. Oba homologní chromozomy jsou zcela vybarvené, proto se tato technika označuje také jako chromozomální malování. Metoda FISH – WCP je tedy založena na vizualizaci barevných výměn v metafázi chromozomů. Použití vhodného kontrastního barvení vyústí ve vizualizaci zbývajících chromozomů v jiné barvě. Z tohoto důvodu se chromozomy s výměnami (např. translokace) jeví jako dvoubarevné. WCP sondy se používají k identifikaci specifických chromozomů, pro identifikaci strukturálně chromozomálních aberací a k identifikaci selekčních chromozomů. Využití těchto malovacích sond je v postnatální cytogenetice, nádorové cytogenetice, při detekci mutagenních účinků záření a chemikálií (získaných aberací) a v biodozimetrických studiích. Zatímco vzájemné chromozomální výměny (translokace a dicentrické chromozomy) mohou být detekovány použitím sond barvících celé chromozomy pro detekci výměn uvnitř chromozomu, tedy mezi dvěma rameny (pericentrické inverze) nebo v rámci jednoho ramene (paracentrické inverze), musí být použity jiné typy sond. Sondy specifické pro ramena chromozomů umožňují snadnou detekci pericentrických inverzí. Na detekci paracentrických inverzí je vhodné použít sondy specifické pro určité oblasti chromozomů. (30)

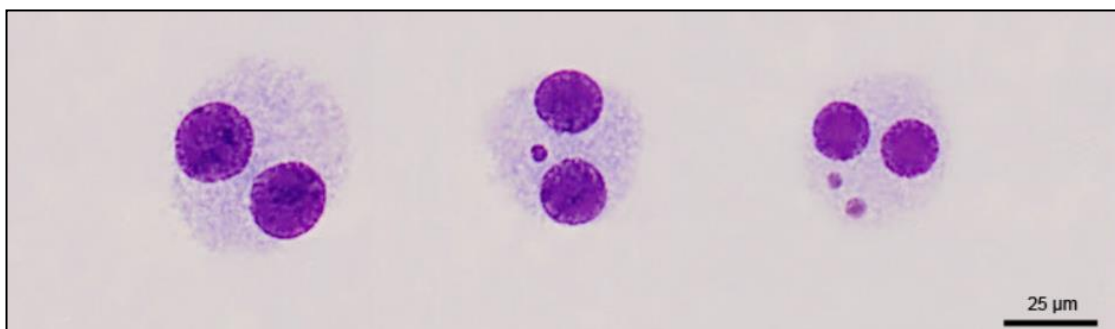
Stabilní translokace uchovávají v buňce prakticky veškeré geny ve fungujícím stavu, a proto jsou schopny se dále dělit. Takové aberace lze najít v lidských lymfocytech exponovaných osob ještě dlouhý čas po ozáření. Translokační analýza je technika pro eventuální retrospektivní biologickou dozimetrii, kdy je možné zjistit velikost dávky záření mnoho let po expozici. Sensitivita metody FISH je však omezena možnostmi detekce množství záření ve vztahu k pozadí, protože i různé jiné faktory stupňují frekvenci translokací. Ideální je určení translokací před a po expozici ionizujícím záření. Je zapotřebí si uvědomit, že například věk jednotlivce 50 let se projevuje ve zdvojnásobení translokací. Byly sledovány frekvence translokací 6 - 10 let po expozici zasahujících osob po havárii v Černobyli, které byly podle dozimetrických měření exponovány dávkou 0,25 Gy a na podkladě cytogenetické analýzy byla dávka stanovena 0,09 Gy. Množství translokací může také v dlouhém časovém horizontu

ovlivnit kouření a znečištěné pracovní nebo životní prostředí. Frekvence translokací se u zasahujících osob v Černobylu zvětšila na 1,12 %. U kuřáků cigaret se po deseti letech počet translokací zvýšil na 0,89 % a u kuřáků papirosek na 1,4 procent. Ze studie plyne, že ozáření dávkou 0,09 Gy mělo z aspektu růstu translokací větší účinek než kouření cigaret a menší účinek než kouření papirosek. (20) Dokonce i v současnosti, více než 70 let po výbuších jaderných bomb v japonské Hirošimě a Nagasaki, mají osoby ozářené po použití těchto zbraní zvýšenou úroveň translokací. Z tohoto důvodu je chromozomální barvení rozvíjeno jako jedna z hlavních metod pro zjišťování a vyhodnocování stabilních aberací i po uplynutí dlouhé doby od expozice. Vzhledem k potřebám metody však analýza translokací poskytuje hodnověrné výsledky při dávkách vyšších než 0,2 Gy.

V tom je zásadní rozdíl od analýzy dicentrických chromozómů (nestabilní aberace), která dokáže spolehlivě analyzovat pouze nedávné nebo akutní radiační expozice, protože buňky, jež obsahují nestabilní aberace, rychle zmizí z populace proliferujících buněk, jelikož zapříčiňují s velkou pravděpodobností mitotické selhání. (18)

1.2.3.3 Analýza mikrojader

Mikrojádra jsou důsledkem vážného poškození DNA. Výskyt mikrojader je přímo závislý na dávce ozáření. Dvojitě zlomy DNA se mnohdy nepodaří opravit. V případě, že dojde k oddělení významnějšího fragmentu DNA od původní dvoušroubovice je možné tento fragment jednoduše rozpoznat po následující mitóze buňky, když fragment setrvává v cytoplazmě jedné z dceřiných buněk. Mikrojádra jsou pak detekovatelná kterýmkoli chromatinovým barvením. (Obr. 14)



Obr. 14 Příklady dvoujádrové buňky bez, s jedním a se dvěma mikrojádry. (28)

Většinou jsou používána tato barviva: 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI), akridinová oranž nebo Giemsovo barvení. (31)

Vzhledem k tomu, že mikrojádra jsou odvozena od chromozomálních aberací, mohou sloužit jako nepřímé indikátory chromozomálních poškození. Při in vitro výzkumech mikrojader vzniklých expozicí záření byly objeveny a potvrzeny vztahy mezi mikrojádry a obdrženou dávkou, což vede k tomu, že mikrojádra mají potenciál použití jako biologického dozimetru.

V porovnání s klasickou tradiční detekcí chromozomálních aberací, detekce mikrojader nevyžaduje vysoce vyškolený personál a je mnohem rychlejší. To umožňuje snadnou analýzu mnoha tisíc buněk ve velmi krátkém čase. (11)

Pro diagnózu mikrojader jsou používána kritéria rozměru mikrojádra, které je v rozmezí od 1/20 do 1/5 velikosti jádra buňky. Menší velikosti značí obvykle artefakty, u rozměrnějších objektů se může jednat o druhé dceřiné jádro nacházející se v totožné buňce při blokádě cytoskeletu. Dalším kritériem je identifikovatelný pás cytoplazmy mezi mikrojádrem a samotným buněčným jádrem. Jestliže není možno rozlišit pás cytoplazmy mezi jádrem buňky a suspektním mikrojádrem, potom se může jednat o výchlipku jaderné membrány, která obsahuje původní chromatinová jádra. Kritérium barvitelnosti mikrojádra je podobné barvení chromatinu dceřiného jádra. Při odlišné barvitelnosti suspektního objektu může dojít k záměně mikrojádra za fagosom (orgánová organela). Množství výskytu mikrojader v ozářených buněčných liniích se různí v souvislosti s radiosenzitivitou buněčné linie. Všeobecně platí, že u dávek

v rozpětí 1 - 10 Gy byl identifikován výskyt mikrojadern od přibližně 0,5 - 10 %. Z experimentálních výsledků plyne, že výskyt mikrojadern u neozářené populace ovlivněné látkami indukující vedlejší účinky je obdobný jako u ozářené populace, jen hodnoty jsou nižší v závislosti na typu experimentu a buněčné linii. Výskyt mikrojadern u takto ovlivněných populací může být časnější, s nižším procentuálním výskytem a zpravidla rychleji odeznívá. (31)

V důsledku toho, že se fragmenty zpravidla formují společně s kroužky a dicentrickými chromozomy, indikuje zvýšená frekvence výskytu mikrojadern expozici ionizujícím zářením analogicky, jako u vyšších četností výskytu nestabilních chromozomálních aberací. Na základě této paralely rovněž platí, že lymfocyty s mikrojadry zaniknou v periferní krvi přibližně během tří let.

Normální výskyt mikrojadern bez expozice je 1 na 100 binukleárních buněk a tento počet vzrůstá lineárně-kvadraticky s dávkou ozáření. Při 0,1 Gy je indukována další 1 ze 100 binukleárních buněk, což je statisticky odlišné vůči pozadí při množství obvykle 500 binukleárních buněk. (18)

Senzitivitu metody můžeme zvýšit mikrojaderně-centromerovým testem. Tento test je variantou mikrojaderného testu, který navíc používá imunofluorescenční značení centromer. Proto je možné rozpoznat mikrojadra vyvinutá spontánně, jež se vyznačují přítomností celých chromozomů a mikrojadra radiačně indukovaná vyznačující se přítomností pouze chromozomových fragmentů. Metoda i způsob vyhodnocení jsou stejné jako u konvenční analýzy mikrojadern. Tato metoda se liší pouze přidáním imunofluorescenčního značení centromery a poté vyhodnocení vzorků pod fluorescenčním mikroskopem. Zjišťuje se rozdíl počtu mikrojadern s centromerami a bez centromer ve dvoujaderných buňkách. Dávka záření je přímo úměrná jejich poměru. Citlivost mikrojaderně-centromerového testu je omezena hranicí 0,1 Gy z důvodu poměrně velkého množství mikrojadern, které vznikly spontánně. (29)

Z důvodu větší citlivosti byla navržena řada modifikací pro vyhodnocení přítomnosti mikrojadern. Jednou z nich je analýza obrazu pomocí automatizace, která umožňuje místo u stovek detekovat výskyt mikrojadern u tisíců buněk, a tím zaručit větší vypovídající hodnotu a spolehlivost výsledků. (31)

Nevýhodou této metody je nutnost perfektní výbavy mikroskopu stejně jako nezbytné softwarové vybavení.

Další možností vyhodnocení je zjišťování mikrojader prostřednictvím průtokové cytometrie. Tato metoda umožňuje v řádu několika sekund počítání a diferenciaci tisíců buněk. Po příslušném značení nebo barvení prostupuje směs buněk úzkým svazkem světla. Tato technika umožňuje detekovat dávky už od 0,2 Gy. (29). Detekuje se rozptýl světla a/nebo fluorescenční signály, které jsou aktivovány každou jednotlivou buňkou nebo v tomto případě jednotlivým jádrem nebo mikrojádrem s dalším zpracováním pro následující počítačovou analýzu. Numerické hodnocení mikrojader průtokovou cytometrií je omezeno určitými technickými překážkami u lymfocytů, ale tato technika byla již úspěšně aplikována v případě retikulocytů (nezralé erytrocyty). Zde je problém s tím, že retikulocyty obsahující mikrojádra jsou obvykle zachyceny ve slezině, a proto může být detekována pouze malá část. Avšak toto malé množství právě dospělých retikulocytů může být zvýšeno imunomagneticky nebo použitím transferinového receptoru. Tato metoda by se mohla aplikovat už při detekci dávky pouhých 3 mGy během 24 h po expozici. (5, 18)

Význačnými slabinami praktické aplikovatelnosti analýzy mikrojader je velká biologická rozmanitost v počtu mikrojader u osob před ozářeními a z časového aspektu pomalý postup určení množství mikrojader dosahující až několik dní. Další slabinou metody je relativní menší přesnost měření.

1.2.3.4 Urychlená kondenzace chromozomů – Premature chromosome condensation (PCC)

Při PCC vyšetření je možnost pozorování chromozomů bez vyvolání kompletního procesu dělení buňky. Není tedy třeba dvoudenní inkubaci lymfocytů a požadovaný výsledek máme k dispozici během 3 až 4 hodin. (32)

Potom co buněčný cyklus vstoupí do mitózy, chromatin kondenzuje do chromozomu se známým tvarem X. PCC technika byla vyvinuta, aby způsobila to, že

chromatin bude kondenzovat, i když není ještě v mitóze, a proto se tato technika nazývá předčasná kondenzace chromosomů (PCC). Tento postup byl zvolen z toho důvodu, že ozářené buňky mohou být poškozeny do té míry, že ani při působnosti mitogenu neproběhne mitóza. Z této příčiny se začala používat metoda urychlení kondenzace, kdy je možnost vyšetřit a vyhodnotit míru poškození chromosomů již v interfázi. Tato metoda byla vyvinuta pro detekci velkých dávek.

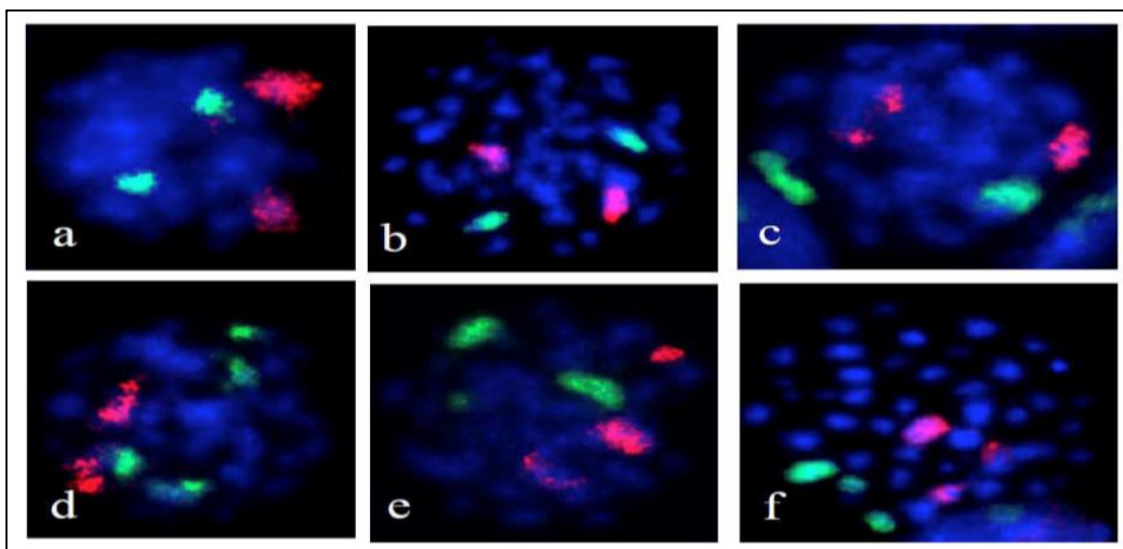
Kondenzace může být indukována v interfázi po fúzi buňky s mitotickými dělicími se buňkami vaječnicků čínského křečka (CHO). (Obr. 15) Alternativně lze použít tzv. HeLa buňky. Jedná se o nádorové buňky izolované z nádoru děložního hrdla s podporou Sendai viru, který je schopen způsobit fúzi eukaryotních buněčných kultur kultivovaných in vitro. Nicméně fúze s pomocí Sendai viru vyžaduje buňky s membránami dobře přijímající viry, což lymfocyty ve fázi G₀ (klidová fáze) nesplňují. Tento problém byl vyřešen použitím polyethylenglykolu (PEG) netoxického a chemicky inertního polymeru, který umožňuje buněčnou fúzi lymfocytů. Použití PEG bylo navrženo primárně pro využití PCC v biologické dozimetrii. Výše popsany postup provedení PCC se nazývá „Fúzní PCC“. (28)



Obr. 15 PCC s fragmenty ukazujícími se ve fázi G₀, po fúzi s použitím ovariálních buněk čínského křečka. (28)

Možnou variantou provedení PCC je chemicky indukovaná PCC, kterou je možno vyvolat prostřednictvím okadické kyseliny (OA) nebo calyculinu A (CalA). Vzhledem k velké výtěžnosti chemicky indukované PCC a schopnosti indukovat PCC ve veškerých fázích buněčného cyklu je tato technika příhodná pro pozorování chromozomálních přeměn při expozici vysokými dávkami ionizujícího záření. Chemickou indukci PCC je možno navodit i během akutní expozice dávkami vyššími než 10 Gy, když se dicentrická analýza nezdaří. OA efektivně vytváří PCC i při dávkách přes 40 Gy in vitro. K vytěžení dostačujícího kvanta lymfocytů ozářených in vivo vysokými dávkami je možné aplikovat „High-yield Chromosome Preparation Method“, což je technika umožňující kultivaci a separaci dostačujícího počtu buněk nezbytných k cytogenetické analýze. Klád této metody oproti klasické kultivaci a separaci byl ověřen při jaderné havárii v japonské Tokai-muře, kdy dva ze tří ozářených měli tak nízké počty lymfocytů, že bylo nemožné provést odhad retrospektivní vyhodnocení dávky záření klasickou separací a kultivací. (26)

Další variantou provedení PCC je rychlá analýza aberací interfazických chromozomů (RICA - The Rapid Interphase Chromosome Assay). Tato metoda umožňuje vizualizaci poškození indukovaných expozicí pomocí sond fluorescenční in situ hybridizace. (28) Tato technika je založena na možnostech molekulárních mechanismů kondenzace chromozomu. Diferencované neproliferující buňky jako periferní lymfocyty jsou neúspěšné v indukci PCC při aplikaci fosfatázových inhibitorů, pravděpodobně z důvodu nízké koncentrace cyklin-dependentních kináz. Přidáním cyklin B kinázy do inkubačního média, ve kterém je obsažena OA a ATP (adenosintrifosfát) nahrazuje tento nedostatečné množství kinázy a nastává PCC. Z praktického pohledu to značí získání výsledku v průběhu prvního dne od dodání vzorku do laboratoře k vyhodnocení. Kondenzace je však nekompletní. Buňky se vyznačují pouze částečnou separací a kondenzací chromozomu, a proto je nezbytné užít metodu fluorescenční in situ hybridizaci (Obr. 16) a chromozomy tímto způsobem ohraničit a odlišit. (26)



Obr. 16 Mikrofotografie ukazující FISH obarvené lidské chromozomy č. 1 (červená) a č. 2 (zelená) v interfázi ozařovaných lymfocytů vizualizovaných testem RICA. Normální buňka produkující dvě červené skvrny a dvě zelené skvrny (A a B), chromozom s aberacemi č. 1 produkuje více než dvě červené skvrny (C), chromozom s aberacemi č. 2 produkuje více než dvě zelené skvrny (D), buňky s více než dvěma zelenými a červenými skvrnami (E a F). (28)

Metoda PCC je velice užitečná pro sledování dějů bezprostředně po ozáření jako jsou procesy - restituce, kinetika restituce chromozomálních zlomů nebo chybné reparace při vzniku anomálií jako jsou dicentriky a translokace. Tyto studie ukazují, že dicentriky, úplné a neúplné translokace a acentrické fragmenty, které je možno sledovat v metafázi, vznikají ve fázi G₀ v rozdílných časech, které jsou závislé na dávce. U lidských lymfocytů při nízkých dávkách záření (1 - 2 Gy) vznikají dicentriky i translokace velmi rychle. Naproti tomu při vyšších dávkách 4 - 6 Gy se frekvence chromozomálních změn zvyšují proporčně s restitucí chromozomálních zlomů (oprav). (28)

1.2.4 Elektronová paramagnetická rezonance EPR (ESR)

Elektronová paramagnetická rezonance (EPR), známá také jako elektronová spinová rezonance (ESR), je fyzikální způsob posouzení absorbované dávky ionizujícího záření. Základním principem této metody je detekce stabilních radikálů. EPR je založena na absorpci mikrovlnné energie volnými radikály v silných magnetických polích. Je možné kvantitativně i kvalitativně určovat volné radikály. Princip EPR je podobný nukleární magnetické rezonanci s tím rozdílem, že měří nepárové (volné) elektrony místo protonů. (33)

Pro měření dávky pomocí EPR využíváme kalcifikované lidské tkáně, jako je zubní sklovina. Dále lze využít nehty, ale musíme počítat s jejich odrůstáním a stříháním, což samo o sobě může zapříčinit tvorbu radikálů. Výhodou nehtů je jejich snadné získání, ale jejich obnova v řádu měsíců zamezuje získání pozdějších informací. Velkou předností využití nehtů se jeví možnost odebrání vzorků ze čtyř různých míst na těle (dvě ruce, dvě nohy). Tento fakt je velmi užitečný při zkoumání, zda došlo k částečnému nebo celotělovému ozáření. Vzorky kostí jsou méně dostupné, ale pro jejich získání lze použít metody mikrochirurgie. Výzkumy vzorků kostí jak od lidí, tak od zvířat ale potvrzují celkově velmi nízkou citlivost. (18) Další možností je použití vlasů, které obsahují keratin stejně jako nehty, ale jejich použití jako biologického dozimetru je omezeno přítomností pigmentu melaninu, který je radioprotektivní, dosud však není tato jeho vlastnost vysvětlena. (34) V posledních letech byly provedeny pokusy s rozdílnými typy vlasů s různými pigmenty, ale opětovně se projevíly velké komplikace s detekcí radikálů indukovaných zářením. Navíc pro vlasy platí stejné limity týkající se odrůstání a stříhání jako pro nehty. (6)

EPR biodozimetrie s využitím ozářených zubů se jeví jako nejužitečnější a nejperspektivnější. Tato metoda je nyní pevně zakotvena v retrospektivních technikách. Využití ozářené zubní skloviny poskytuje informaci o expozici ionizujícího záření desítky let po expozici s detekovatelnou dávkou okolo 0,1 Gy.

Tak jako to platí pro mnoho biodozimetrových metod, individuální dávka může být nejlépe rekonstruována pomocí sond, které jsou v blízkosti ozářeného jedince nebo

kteřé jsou jeho součásti. Hydroxyapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ je hlavní neorganickou složkou zubů respektive zubní skloviny, jenž se jeví jako vhodná sonda pro rekonstrukci dávky, protože po expozici ionizujícím zářením indukuje velmi stabilní radikály, které jsou vhodné pro použití EPR.

Je dobře známo, že fyzikální změny zubní skloviny jsou nejlépe zjistitelné z extrahovaných zubů, a proto jsou tyto nejjvhodnější k biodozimetrickému retrospektivnímu určení obdržené dávky. Jedná se ale o velice invazivní metodu, které se lze vyhnout v případě použití metody *in vivo* nebo provedením miniinvazivního zákroku - biopsie zubu. (35)

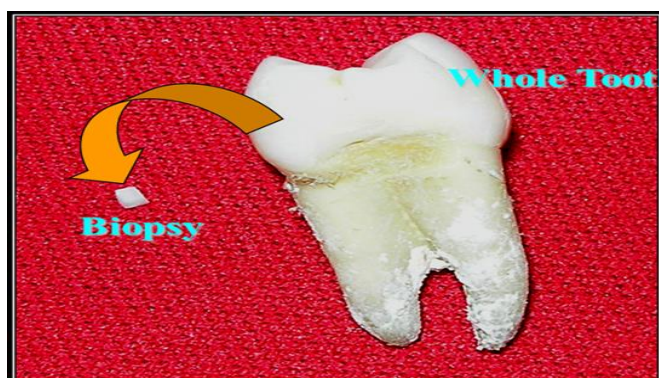
In vivo měření EPR signálů vyvolaných zářením v zubech je bezpečná metoda a v současné době se využívá systém s velkým permanentním magnetem (40 MT). Toto měření lze aktuálně použít „v poli“ pomocí přístroje umístěného v malém osobním vozidle. Metoda, ale vyžaduje relativně velký počet obslužného personálu. (Obr. 17)

V současnosti jsou vyvíjeny systémy s menším magnetem, které umožní větší rozšíření a možné nasazení v případě potřeby třídění pacientů těsně po radiační nehodě. Proveditelnost takových magnetických systémů byla již prokázána a tyto systémy jsou již zkonstruovány ve velikosti a formě, která by mohla být začleněna do zařízení ve tvaru helmy a nasazena na hlavu. Dále vědci pracují na intraorálním magnetu. Předpokládá se, že v řádu několika let bude k dispozici technologie, kdy bude možné získat dostatečnou citlivost s nižší frekvencí a tím i s nižšími požadavky na magnetické pole, a proto bude možné dále snižovat velikost magnetu. Za současného stavu lze v laboratoři pohodlně měřit osoby během pětiminutové akvizice s odchylkou $\pm 0,75$ Gy a prahovou hodnotou nejvýše 2,0 Gy, přičemž výsledek je ihned k dispozici.



Obr. 17 Klinický spektrometr s dobrovolníkem. (6)

Alternativou pro získání vzorků ze zubní skloviny je provedení biopsie zubu. Tato procedura je rychlá a kosmeticky přijatelná. Malé množství přibližně 2 mg se dá vyhodnotit s aplikací vyšší frekvence a tím i vyšší citlivosti EPR. (Obr. 18)



Obr. 18 Schéma provedení biopsie zubu. (36)

Využití takto získaného vzorku vede k včasnému zjištění dávky a to může být klíčové v rozhodovacím procesu při stanovování terapeutické intervence. Dokonce i v případě, že technika biopsie zubu není schopna zabezpečit všechny požadované informace, mohou nastat případy, kdy hodnota takto získaných údajů může odůvodnit odstranění zubu pro měření in vitro. Tento postup by byl použit u osob, u kterých již

existují i jiné známky obdržené dávky ukazující na eventuální ohrožení života. U těchto jedinců by poté mohly být použity potenciálně rizikové léčebné terapie odpovídajícím způsobem. (6)

2 Výzkumná otázka a metodika výzkumu

2.1 Výzkumná otázka

„Jaké metody by byly schopny v případě radiační nehody retrospektivně a dostatečně spolehlivě a senzitivně zjistit velikost obdržené dávky?“

2.2 Metodika

Zpracování práce bylo započato shromážděním dostupné literatury a podkladů z internetu. Po prostudování všech soustředěných zdrojů byl vytvořen template práce. V první fázi studia a zpracování dokumentů byl hlavní důraz položen na problematiku působení ionizujícího záření na živou tkáň. Po zhodnocení působení ionizujícího záření na různé soubory buněk byla provedena analýza poškození jednotlivých buněčných struktur. V dalším kroku zpracování práce byla provedena základní strukturalizace a rozdělení jednotlivých biodozimetrických metod podle působení na živou a neživou tkáň. Pro potřeby zpracování práce byly biodozimetrické metody rozděleny takto: hematologické testy, metody založené na detekci poškození DNA, metody založené na detekci chromozomálního poškození a na metody založené na fyzikálních principech (tj. na detekci radikálů vyvolaných zářením). Poté byly analyzovány možnosti použití jednotlivých biodozimetrických postupů po radiační nehodě z hlediska propustnosti, přesnosti, časového okna k uskutečnění měření, času potřebného k provedení analýzy, požadavků na personál, možnosti automatizace a proveditelnosti na místě nehody. Po zvolení nejvhodnějších metod bylo provedeno jejich porovnání a vyhodnocení.

Porovnáním jednotlivých metod byly zpracovány výsledky s následující diskuzí. Na konci diskuze byla zodpovězena výzkumná otázka.

V „Závěru“ práce byly shrnuty základní teze o všeobecném použití biodozimetrických metod.

3 Výsledky

Na základě provedeného studia biodozimetrických metod byly rozpracovány tyto metody: vyhodnocení hematologických testů; detekce dicentrických chromozomů, kroužků a fragmentů; urychlená kondenzace chromozomů - PCC; analýza mikrojader; analýza profilů exprese genů - DNA microarray; detekce ložisek gamma-H2AX a elektronová paramagnetická rezonance (EPR).

Biodozimetrické metody založené na detekci buněčných změn, které jsou indukovány následkem účinků ionizujícího záření, mají vlastnost být velmi specifické pro jednotlivé osoby. Typickým příkladem je analýza dicentrických aberací, která může být zkreslena různými faktory tak významně, že mohou být stejně důležité jako obdržená dávka. Mezi tyto faktory řadíme například věk, zdravotní stav, stres, životní styl, zaměstnání a pohlaví. Přesto jsou biodozimetrické metody používány jako hlavní nástroj pro třídění obyvatelstva pro lékařské zabezpečení po radiačních nehodách s vysokým počtem exponovaných osob bez fyzikálních dozimetrů. Hlavními parametry pro použití biodozimetrické metody je časová propustnost testu a doba, během které jsou k dispozici přesné výsledky nebo alespoň předběžné odhady. Většina metod vyžaduje specializované laboratoře pro přípravu vzorků a čas na dokončení testů, což klade velké nároky na logistiku, pokud chceme vyhodnotit velké množství vzorků. V závislosti na biologických postupech a časových lhůtách pro posouzení je omezena doba, během které budou jednotlivé biodozimetrické metody použitelné a to nemusí být logisticky možné. (23)

Test kinetiky úbytku lymfocytů LDK - A (Lymphocyte Depletion Kinetic - Assay) je v současné době jediná biodozimetrická technika, která může být provedena mimo specializovanou laboratoř. Provedení kompletního krevního obrazu – Complete Blood Count (CBC) a diferenciálu, tj. procentuálního zastoupení lymfocytů, monocytů, neutrofilních, bazofilních a eosinofilních granulocytů je základním předpokladem pro realizaci této metody a běžně se provádí v místě zasazení – Point of Care (POC) jako jsou lokální nemocnice, spádová onkologická centra a zařízení neodkladné péče. (37)

Vzorky krve odebrané na místě mohou být transportovány do hlavních spádových nemocnic, ale můžou být také poslány k testování do velkých, ale vzdálených komerčních laboratoří. K úbytku lymfocytů v periferní krvi může dojít po vystavení dávce ozáření nad 0,5 Gy, poté dochází po 12 hodinách k exponenciálnímu snížení lymfocytů. Kinetika tohoto poklesu je přímo úměrná absorbované dávce. V odborné literatuře se doporučuje měření okamžitě po ozáření, a potom opakovaní měření každé tři hodiny. Po třech vyhodnoceních je možno zkonstruovat LDK křivku. Novější výzkumy ukázaly, že výpočet dávky lze zjednodušit a odhadnout již pomocí dvou vyšetření lymfocytů. Pro použití just-in-time při radiační havárii má například odborná složka americké armády - The Armed Forces Radiobiology Research Institute (AFRRI) zpracován postup, ze kterého lze odhadnout dávku na základě času radiační nehody a jednoho odběru lymfocytů. Při použití pouze jednoho vzorku krve je absolutní počet lymfocytů porovnáván s průměrnou hodnotou normálního rozmezí vypočteného pro reprezentativní vzorek populace. Nicméně normální počet lymfocytů u zdravých jedinců se pohybuje v relativně širokém rozmezí na základě věku, pohlaví nebo třeba rasy. Proto je vždy v rámci možností upřednostňováno hodnocení kinetiky úbytku ve vzorku většího počtu odběrů vzorků, což poskytne z logiky věci přesnější data v porovnání s odhadem z jednoho odběru. (11)

Test LDK je vhodný pro odhad předběžné dávky v rozmezí přibližně 0,5 Gy - 10 Gy. Pokud chceme provést test LDK je třeba odebrat krev co nejdříve po expozici tak, aby se vytvořil základní kámen v systému třídění exponovaných osob. Toto může být ale obtížné stanovit z jednoho odběru, který je porovnán s průměrnými hodnotami kontrolního vzorku populace. Předběžná velmi hrubá data a základní orientační výsledky mohou být k dispozici za méně než hodinu, pokud jsou vzorky analyzovány na místě. Na základě známých údajů test LDK poskytne velmi dobré výsledky v období 7 - 9 dnů po ozáření v závislosti na výši dávky. Tato metoda se tedy jeví jako užitečná pro třídění osob v časném období po radiační nehodě, ale není tak efektivní pro přesné retrospektivní stanovení dávky. (37)

V poslední době byla zkoumána možnost použití analýzy poměru neutrofilů a lymfocytů (N/L) pro stanovení úrovně ozáření. Zvýšení počtu granulocytů, včetně

neutrofilů, se projevuje v prvních dnech po expozici a potom následuje pokles s kinetikou, která je závislá na dávce ozáření. Hladina neutrofilů u pacienta může být stanovena za použití CBC diferenciálu, a potom lze použít tuto metodu stejným způsobem jako test LDK. Poměr L/N lze použít v prvních dnech po expozici spolu s testem LDK pro počáteční fázi třídění pacientů. Nicméně jsou potřebné ještě další experimentální údaje a informace, které musí být ověřeny před zavedením tohoto testu do standardního použití. Výchozí hodnoty neutrofilů ukazují internacionalizaci a intraindividuální variabilitu podobně jako je to u testu LDK a bude tedy vyžadovat znalost základních počtů neutrofilů pacienta před jeho použitím. Navíc u pacientů s popáleninami nebo jinými traumaty se komplikuje používání této metody po radiační nehodě podobně jako u LDK. (37)

Detekce dicentrických chromozomů (DCA) je v současné době považována za "zlatý standard" pro stanovení absorbované dávky záření a již byla použita v hodnocení stovek lidí s podezřením na ozáření nebo skutečně ozářených. Tato metoda je velmi specifická v reakci na ionizující záření a nízké hladiny počtů dicentrických chromozomů tzv. dicetriků v pozadí způsobují, že je tato metoda velmi citlivá. Zároveň se jedná o jeden z mála testů, kterým lze identifikovat částečnou expozici těla. Metoda DCA prošla standardizací Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO) a bylo ustanoveno, že každá laboratoř si určí své vlastní kalibrační křivky v důsledku mezilaboratorní variability. DCA je výsledkem spojení dvou fragmentů centromer obsahujících chromozom. Tento typ poškození chromozomů je považován za nestabilní aberaci a v pozdějších časových intervalech po expozici vyžaduje použití korekčního faktoru vzhledem k rychlosti mizení. (28)

DCA má možnost detekce dávky v rozsahu 0,1 - 5 Gy. Při dávkách vyšších než 5 - 6 Gy již není jasný vztah mezi dávkou a účinkem, což vede k nepřesnostem v odhadech vysoké dávky. Velké dávky záření způsobují zhoršení proliferace buněk a to směřuje k menšímu počtu buněk dosahujících metafázi, kterou potřebujeme k vlastnímu vyhodnocení. Vzorek krve je možné začít vyhodnocovat prakticky ihned poté, co došlo k expozici, i když se doporučuje vyčkat 12 - 24 hodin pro případ částečné expozice záření tak, aby mohly lymfocyty proudit do krve z postižených orgánů. První relevantní

odhad dávky je možné stanovit třetí den po dopravení vzorku do laboratoře. Vzhledem k nestabilní povaze dicentrických chromozomů bude DCA poskytovat výsledky 3 - 6 měsíců po expozici se značnou závislostí na dávce ozáření. Další analýzu poškození chromozomu po uplynutí této doby můžeme provést metodou FISH k zjištění stabilních translokací. (38)

Detekce mikrojadra se jeví jako další metoda volby při radiačních nehodách. Mikrojádra vznikají během mitózy, kdy se chromozomální segmenty chybně dělí a zůstávají v cytoplasmě místo toho, aby přešla do dceřiného jádra. Mikrojádra jsou stabilní chromozomální aberace a zmizí s poločasem kolem jednoho roku, i když nejsou specifická pro ozáření. Buňky produkující mikrojádra zemřou rychle po velké dávce ozáření a v kombinaci se zpožděním v progresi buněčného cyklu to má za následek méně buněk dosahujících mitózy. Po 72 hodinách kultivace můžeme připravit preparáty ke zpracování. Vyhodnocení mikrojadra je jednodušší než u dicentriků a vyžaduje méně kvalifikovaný personál. Pro standardní biodozimetrické použití se doporučuje vyhodnocení asi 1000 binukleárních buněk. Nedávné výzkumy prokázaly, že vyhodnocení 200 binukleárních buněk umožňuje identifikaci dávek záření >1 Gy s potřebnou dobou k vyhodnocení asi 15 minut. (28)

Test využívající detekce mikrojadra má dávkové rozmezí přibližně od 0,3 do 5 Gy, i když může být dosažen rozsah 0,1 - 15 Gy po modifikaci této metody. Vzorek krve lze odebrat okamžitě s tím, že první výsledky jsou k dispozici během 3 - 4 dnů po kultivaci a začátku zpracování. Experimenty ukázaly, že tato metoda je spolehlivá až do 6 měsíců po expozici. S korekčním faktorem může být doba prodloužena až na 1 rok. (6, 28)

Urychlená kondenzace chromozómu PCC pomocí chemických látek nebo pomocí ovariálních buněk čínské křečka (CHO) umožňuje, aby chromozomální aberace byly zviditelněny přímo v lymfocytech bez dosažení mitózy. Aplikace PCC s použitím CHO buněk je technicky náročnější než chemicky indukovaný test, ale poskytuje rychlejší odhad dávky, protože nevyžaduje kultivaci nebo stimulaci mitogeny.

Konvenční mikroskopické vyhodnocování testu PCC je časově náročné. Použití automatizovaného vyhledávání metafáze zrychlí hodnocení testu. Pro vyhodnocení a třídění vyhodnocení byla vyvinuta metoda s použitím 50 kroužků nebo 300 PCC

buněk analyzovaných v jednom vzorku. Bylo provedeno srovnání testů DCA a PCC a bylo zjištěno, že analýza dicentrických aberací poskytuje lepší odhad v dávkách menších než 6 Gy, zatímco test PCC je lepší pro expozice vyšší než 6 Gy.

Test PCC je lineární v rozmezí dávek 0,2 - 20 Gy . Vzorek krve je možné hodnotit okamžitě po ozáření, ale musíme vzít v potaz reparační procesy DNA, je-li časová prodleva před tím než je vzorek zpracován. Po použití PCC s ovariálními buňkami CHO je první odhad dávky možný za 2 - 3 hodiny, zatímco chemicky indukovaná metoda vyžaduje 51 hodin. Časové okno pro použití PCC je do 7 dní po incidentu, i když v závislosti na stabilitě indukovaných chromozomální poškození se může test PCC použít i v řádu měsíců, podobně jako analýza DCA nebo detekce mikrojader. Test PCC může být použit i k hodnocení částečného ozáření. (28)

V důsledku zlomu dvojitého vlákna DNA, protein H2AX v blízkosti tohoto zlomu fosforyluje během procesu opravy DNA. Množství fosforylovaných proteinů tzv. gamma-H2AX dosahuje vrcholu přibližně 30 minut po ozáření a začíná rychle klesat po prvních 24 hodinách a vrátí se do normálu v průběhu několika dnů v závislosti na dávce záření. Proto se doporučuje, aby zpracování bylo provedeno během 1 - 2 dnů, v ideálním případě asi 30 - 60 minut po expozici. Mikroskopické vyhodnocení je více citlivé u malých dávek záření, ale je náročnější na čas, vyžaduje 4 - 6 hodin pro odhad dávky, zatímco metoda průtokové cytometrie může poskytnout výsledky asi do dvou hodin. Rozsah, ve kterém gamma-H2AX poskytuje přesné posouzení dávky je 0,2 - 5 Gy pro mikroskopii a 0,5 - 10 Gy pro průtokovou cytometrii. Celková hladina intenzity gamma-H2AX je závislá na dávce lineárně až do dávky 100 Gy. Časové okno pro vyhodnocení je relativně úzké 2 - 3 dny, ale přesto se jeví tato technika jako perspektivní při radiační nehodě a následném třídění pacientů pro lékařské účely. (6)

Analýza genové exprese - DNA microarray byla použita k identifikaci genů a signálních drah reagujících na ozáření v periferní krvi tím, že je možné detekovat jejich pozměněnou reakci. Toto se týká i proteinu p53, na kterém jsou závislé opravy DNA včetně signálních drah (p53 je protein kódovaný genem TP53 a současně transkripční faktor blokující zrod nádorů - slouží jako tumor supresorový gen).

Doplňkovými technikami jsou kvantitativní PCR (qPCR - /Real-time/ Polymerase Chain Reaction) a kvantitativní NPA (qNPA - Nuclease Protection Assay), které byly použity k ověření a kombinaci informací v genových souborech k odhadu dávky záření, kterými byla osoba vystavena.

V současné době publikované výsledky ukázaly, že biodozimetrie pomocí profilů exprese genů je relevantní v rozmezí dávky 0,1 - 5 Gy. Metoda genové exprese jako biodozimetrický nástroj je navržen pro point-of-care a pro vysoce výkonné diagnostické skriningové přístroje. V závislosti na použité metodě na potřebné přípravě a množství dostupné automatizace by první výsledky odhadu dávky mohly být k dispozici v časovém rozmezí 9 - 36 hodin po tom co vzorky krve dorazí do laboratoře. Aktuální sady pro analýzu genové exprese mohou být použity 48 - 72 hodin po expozici, i když některé novější techniky by měly prodloužit tuto lhůtu minimálně až na 7 dnů. (37)

EPR (Elektronová paramagnetická rezonance) je metoda biodozimetrie, která je založena na fyzikálních změnách, které se vyskytují v tkáních nezávisle na dalších biologických odpovědích na záření. Záření vytváří signál úměrný dávce, který je stabilizován po dlouhou dobu, jedná-li se o nějakou matrici jako zuby nebo kosti. Signál je také možno detekovat v keratinu nehtů, tyto markery jsou však méně stabilní a mizí během několika týdnů. Kromě toho proces stříhání nehtů pro ex vivo analýzu způsobuje zkreslení a identifikaci signálu. Rozsah detekce dávky s použitím EPR je od 1 Gy až do nejméně 30 Gy s odchylkou $\pm 0,5$ až 1,0 Gy při vyšších dávkách. Skenování zubů může být provedeno okamžitě po ozáření a nejsou žádné biologické procesy, které musí nastat před odběrem vzorků. Doba skenování trvá asi 5 - 25 minut v závislosti na počtu spekter, které jsou nutné pro získání dobrého poměru signálu k šumu. Časově lze skenovat pouze jeden vzorek a výkonnost je tedy závislá na denní kapacitě příslušného strojového vybavení nebo na množství souprav pro vyhodnocení. Proto se při expozici velkého počtu osob (v řádech 100 tisíců) bude muset provozovat současně tisíce strojových platforem. Logistika při provozu tak velkého množství platforem bude složitější a dražší. Oběti musí být vyšetřovány na různých místech, což může ohrozit evakuační úsilí. Navíc, pokud nejsou zuby v případě částečné expozice ozářeny, tato metoda není schopna odpovídajícím způsobem stanovit výši obdržené dávky. (35, 37)

4 Diskuze

Potřeba použití biodozimetrie pro měření radiační dávky retrospektivně se stala velmi důležitou oblastí s vysokou prioritou ve většině vyspělých zemích s cílem připravit se na zvýšenou možnost expozice velkého počtu osob, a to buď při použití jaderných zbraní nebo po radiační nehodě. Biodozimetrie bude hrát klíčovou roli při jaderné události, protože odhad radiační dávky je rozhodující k úspěšnému třídění osob a následné lékařské pomoci. Biodozimetrie je schopna odhadnout velikost dávky a roztrždit jednotlivé osoby do skupin podle požadavku na lékařské zabezpečení; od jedinců, kteří nepotřebují akutní zásah, přes ty, co potřebují další vyšetření, až po osoby, u kterých je nezbytná okamžitá hospitalizace. (23)

Faktory, které mohou významným způsobem modifikovat požadavky na biodozimetrii po jaderné nehodě

Některé faktory mohou mít vliv na požadované informace například tím, že mění požadavky na přesnost, na čas kdy musí být výsledky k dispozici, na potřebu určení homogenity expozic. V dalším textu jsou popsány nejdůležitější faktory, které ovlivňují nasazení a vyhodnocení dozimetrických hodnot. Mohou ale existovat i jiné faktory v závislosti na konkrétních okolnostech, které mohou být důležité v jiných situacích.

Přítomnost kombinovaných zranění

Experimentální data a omezené klinické pozorování ukazují, že záření v kombinaci s jinými poraněními, jako jsou popáleniny a otevřené rány, mají výrazný škodlivý vliv na postradiační lékařskou péči. Dávky okolo 1 Gy v kombinaci s vícečetnými traumaty mohou zvýšit mortalitu z 10% na více než 70%.

Vzhledem k této zjevné synergii dopadů může hrát biodozimetrie velmi důležitou roli v dalším plánování a efektivní péči včetně celkového využití dostupných zdrojů.

Je pravděpodobné, že po radiační nehodě většího rozsahu nebude možné okamžitě léčit všechny osoby s mnohačetnými zraněními v nemocnicích s požadovaným zdravotnickým personálem, a proto bude přesné posouzení dávky v kombinaci s hodnocením zranění velice důležitým kritériem při rozhodování, komu poskytnout plnohodnotnou léčbu a komu v souvislosti s pravděpodobným úmrtím podávat pouze utišující léky. (39)

Požadavky na biodozimetrii mohou být pro tyto účely zcela odlišné. Bude třeba lepší rozlišení dávky pro počáteční screening než pro třídění jednotlivců bez dalšího zranění. Zatímco hraniční dávka pro intenzivní lékařskou péči je pro osoby bez zranění 2 Gy, pro osoby s multitraumaty se jeví jako smysluplnější hraniční dávka <1 Gy. Generálně platí, že výsledky musí být velmi rychle dostupné, což bude ještě důležitější pro osoby zraněné z důvodu naléhavosti a rozhodnutí o typu léčby, která bude zraněnému poskytnuta. Jelikož počet jedinců s traumatem bude pravděpodobně omezen, mohou být použity dozimetrické techniky, které mají nízkou propustnost. (40)

Nehomogenní expozice

Velmi důležité pro lékařské rozhodování je, zda byla expozice rovnoměrně rozložena po celém těle nebo jestli části těla obsahující kostní dřeň byly stíněny. Pro vznik hematologického syndromu je důležité, že pokud máme k dispozici i malý objem neozářené kostní dřevě, významně se snižují účinky záření a navíc můžeme použít tuto dřeň pro doplnění poškozené kostní dřevě. Proto existuje potřeba biodozimetrických technik, u kterých lze rozlišit, zda je expozice homogenní nebo nehomogenní. Pro toto hodnocení je nejvhodnější použití metod založených na fyzikálním principu. I přes některé popsané nevýhody je pro toto rozlišení nejvhodnější metoda EPR s použitím nehtů na ruce a nohy, protože máme čtyři místa odběru (dvě ruce a dvě nohy). Z metod založených na biologické bázi jsou vhodné metody detekce dicentrických chromozomů, detekce mikrojader, PCC a použití proteinového biomarkru. (28)

Expozice s různými dávkovými příkony

Obecný účinek dávkového příkonu na biologické poškození je dobře známý (rozprostření dávky v čase snižuje biologické účinky záření, protože dochází kontinuálně k opravám). Nicméně význam většiny změn v dávkovém příkonu v návaznosti a ovlivnění vzniku akutní nemoci z ozáření (ANO) není vyřešen. Většina scénářů předpokládá, že expozice bude trvat po velmi krátkou dobu a při vysokých dávkách. Je však pravděpodobné, že za určitých okolností bude ozáření způsobeno především radioaktivním spadem, který způsobí kontaminaci předmětů a terénu. Tím bude expozice časově rozložena a obyvatelstvo bude zasaženo nižšími dávkami. Příkladem tohoto scénáře je havárie v Černobylu.

V současné době nejsou žádné biodozimetrické metody, které poskytují jednoznačné informace o dávkovém příkonu. Fyzikální metoda EPR ze své podstaty umožňuje zjištění pouze celkové dávky bez možnosti určit rychlost obdržení. Techniky založené na biologickém základě mohou být ovlivněny dávkovým příkonem, ale tato závislost nebyla dosud přesně zjištěna. (39)

Potřeba biodozimetrie při hodnocení dlouhodobých účinků expozice

Zatímco mnoho aspektů biodozimetrie pro akutní expozici se vztahuje také na vyhodnocení dlouhodobých účinků ionizujícího záření, některé postupy se ale podstatně liší. Dva okruhy otázek nabývají zvláštního významu, a to úroveň dávek a oblast logistiky.

Příslušné expozice pro dlouhodobé následky jsou mnohem nižší než ty, které způsobí ANO. To zvyšuje potřebu přesnosti odhadů dávky, ale snižuje požadavek pokrýt širokou škálu dávek zejména těch na horním konci, protože dlouhodobé přežití po ozáření vysokými dávkami je nízké. Logistické požadavky na rychlé měření a okamžitý výstup se výrazně snižují pro účely posuzování dlouhodobé expozice. Stejně tak naléhavost a nutnost zpracovávání velkého množství vzorků současně je pro tento účel diskutabilní, protože z důvodu dlouhodobosti není nutná tak rychlá akce.

V současné době se věnuje největší pozornost událostem, které nastaly měsíce nebo roky před samotným dozimetrickým měřením. Tato měření se týkají účinků ozáření pro pochopení základní etiologie působení ionizujícího záření na lidskou tkáň a dále mají za cíl pomáhat s péčí o osoby ozářené v oblasti zdravotní péče, ale také s jejich požadavky na kompenzace v důsledku onemocnění v souvislosti s ozářením. Jako nejlepší techniky pro tato měření dlouhodobých účinků se jeví EPR, detekce translokací (FISH) a glykoforinu A (GPA). (39)

Srovnávací vlastnosti biodozimetrických metod

Jak již bylo mnohokrát uvedeno, různé biodozimetrické metody mají rozdílné vlastnosti a jsou založeny na sledování odlišných parametrů. Fyzikální metody měření detekují změny způsobené přímo zářením a nevyžadují biologické zpracování a mohou tedy být měřeny bezprostředně po expozici a přetrvávají do nekonečna.

Biologické metody jsou založeny na reakci živých tkání na ionizující záření. Těmito metodami lze posoudit jak poškození, tak opravy jednotlivých orgánových systémů. Použití jednotlivých technik se do té míry liší za určitých okolností, že využití jednotlivých metod bude záležet na okamžitých podmínkách a možnostech logistického zabezpečení. Je třeba si uvědomit, že někdy určitá charakteristika metody může být za určitých podmínek výhodou a někdy ta samá charakteristika se stává nevýhodou limitující použití. (Tab. 3)

<i>Parametr</i> <i>Metoda</i>	Složitost analýzy	Dávkové rozmezí (Gy)	Čas potřebný pro vyhodnocení	Časové okno k provedení analýzy	Možnost automatizace
Krevní obraz	Jednoduchá, denní hodnocení	0,4 - 4	<1 h	12 h - 7 d	Ano
Dicentrics	Technická expertíza	0,1 - 5	55 + h	3 - 6+ měs	Ne
PCC	Jednoduchá, levná, rychlá	0,1 - 20	CHO 2 - 3 h Chem 51 h	1 týd - 6+ měs	Ano
Mikrojádru	Rychlá, jednoduchá	0,3 - 5	3+ d	6 měs - 1 r	Ano
Genová exprese	Technická expertíza	0,2 - 8	9 - 36 h	48 - 72 h	Ano
Gamma- H2AX	Technická expertíza	0,1 - 10	2 - 6 h	12 - 48 h	Ano
EPR	Složitě vybavení	>0,5	5 - 25 min	Celý život	Ne

Tabulka 3 Srovnání některých důležitých parametrů vybraných metod.
(17, 22, 23, 28, 40)

Čas potřebný k prvnímu odhadu dávky

Pro okamžité vyhledávání zasažených osob (screening) a jejich třídění (triage) je žádoucí mít výsledky okamžitě k dispozici. Některé biodozimetrické techniky mohou poskytnout okamžité výsledky v místě měření. Pro jiné účely, například pro kategorizaci dříve tříděných osob a při péči o pacienty při léčbě v nemocničním prostředí, nemusí být bezprostřednost tak důležitá. Některé dozimetrické techniky používají vzorky, které vyžadují značnou dobu zpracování. Například v případě dicentriků se změny projeví až po buněčném dělení. Je zřejmé, že techniky zajišťující rychlé a na místě dostupné výsledky jsou neúčinnější a používají se tam, kde čas je rozhodující. Jedná se především o hematologické testy založené na měření úbytku lymfocytů. Velmi rychlou metodou se jeví také metoda urychlené kondenzace

chromozomů (PCC) s použitím ovariálních buněk čínského křečka. Tato metoda má ovšem nevýhodu v požadavku na vysokou odbornost vyhodnocovacího personálu. (28)

Požadavky na odborné pracovníky

Mnoho v současnosti používaných nebo navrhovaných biodozimetrických technik vyžaduje zvláštní odborné znalosti. Takové vědomosti mohou být poskytovány prostřednictvím předchozí odborné přípravy všech potenciálních pracovníků podílejících se na vyhodnocování a třídění osob. Jsou dva přístupy k řešení možného nedostatku expertů. Buď transportovat odborníky na místo radiační nehody, nebo převést vzorky k domovským laboratořím těchto expertů. Avšak každá z těchto alternativ bude pravděpodobně obtížně realizovatelná, pokud dojde k události ve velkém měřítku zahrnující těžké poškození infrastruktury a logistického zabezpečení na teritoriu nehody. Navíc pracovníci zdravotní služby budou v rámci velké radiační nehody zahlceni dalšími povinnostmi.

U skutečně velkých nehod bude proto pravděpodobné, že bude nezbytné, aby některé techniky byly prováděny i za účasti nevyškoleného odborného personálu po krátké instruktáži. To klade důraz na automatizaci a zjednodušení postupů, které budou použity k dosažení vysoké propustnosti screeningu a třídění.

Všechny tyto problémy se stávají méně naléhavé pro menší incidenty, když potenciálně exponovaní jedinci mohou být převezeni do lékařských zařízení. (39)

Přesnost

Požadavek přesnosti každé metody biodozimetrie se liší podle účelu analýzy. Chceme-li zjistit dlouhodobé účinky ionizujícího záření, přesnost měření je velmi důležitá, protože je třeba rozvíjet informace o vztahu mezi dávkou a dlouhodobými účinky. V ideálním případě by se přesnost měla pohybovat v řádech milligray. Na druhou stranu, pro třídění do kategorií léčby akutních účinků jsou akceptovatelné nepřesnosti v řádu 0,5 - 1 Gy. Pro počáteční screening je klíčovým parametrem prahová

hodnota. Snahou je vyhnout se falešným negativním měřením, protože falešné pozitivní výsledky mohou být zachyceny bez následků v dalším zdravotnickém procesu.

Pro speciální účely v případě třídění raněných osob s popáleninami a dalšími zraněními v kombinaci s ozařováním může být požadavek větší přesnosti při zjišťování dávky z důvodu silného synergického účinku zranění a ozáření klíčový. (39)

Použitelnost pro obyvatelstvo

Je pravděpodobné, že některé z biodozimetrických technik se nebudou vztahovat na všechny osoby v populaci. Například někteří jedinci nemusí být vhodní pro EPR dozimetrii zubů, protože nemají žádné přirozené zuby. Demografické faktory, jako je věk (nízký, vysoký) nebo etnický původ, mohou mít vliv na použitelnost technik nebo interpretaci jejich výsledků. Na druhou stranu je nepravděpodobné, že bude potřeba kompletního vyšetření všech osob, které byly potenciálně vystaveny záření za účelem provedení počátečního screeningu a třídění. Místo toho může být dávka odhadnuta na základě údajů jiných osob, které byly přítomny na stejném místě v průběhu radiační nehody. (39, 40)

Odpověď na výzkumnou otázku:

Z výsledků a z provedené diskuze vyplývá, že všechny rozpracované metody jsou schopny v případě radiační nehody retrospektivně a dostatečně spolehlivě a senzitivně zjistit velikost obdržené dávky.

5 Závěr

1. *Biodozimetrie je soubor komplexních a rozdílných technik, z nichž každá má své výhody a nevýhody.*
2. *Metody založené na biologických základech mají schopnost být velmi citlivé a reflektující biologickou odezvu na radiační ozáření.*
3. *Biologických metody mají potenciál zkreslení výsledků vlivem řady různých faktorů jako je stres, popáleniny a poranění. Dále mohou být tyto výsledky ovlivněny individuálními vlastnostmi jedince.*
4. *Metody založené na fyzikálních základech mohou poskytnout informace o celkové dávce i o dávce v určitých místech na těle, kdykoli po expozici s možností okamžitého vyhodnocení. Není předpoklad, že výsledky budou ovlivněny komorbiditami nebo individuálními rozdíly v reakci na ozáření.*
5. *Fyzikální metody neindikují biologické důsledky expozice nebo změny v dávkách.*
6. *Použití jednotlivých metod dozimetrie se liší v závislosti na tom, zda je cílem okamžitý screening, třídění, určení rizika u jedinců s významnou expozicí nebo určení dalšího směřování péče o pacienta v průběhu následné léčby.*

- 7. Je nepravděpodobné, že by se jakákoli metoda nebo arbitrární způsob dozimetrické analýzy staly dominantními postupy pro většinu situací.*
- 8. Nejužitečnější informace mohou být získány při použití více zkoordinovaných technik. Jako velice výhodné se jeví použití kombinace metod postavených na fyzikální a biologické bázi.*
- 9. Biodozimetrická data budou ještě více relevantní v kombinaci s údaji s jinými typy informací o expozici. (39,40,41)*

6 Seznam použité literatury

1. KUSALA, Jaroslav. *Rentgenové záření*. Vzdělávací web skupiny ČEZ, 2014. [Online] [Citace: 5. leden 2015] Dostupné z: <http://www.cez.cz/>.
2. Autor: redakce. National Geographic Česko. *Odstartoval atomový věk. Enrico Fermi jako první zažehl a udržel řízenou štěpnou reakci*. [Online] [Citace: 9. leden 2015] Dostupné z: <http://www.national-geographic.cz/>.
3. HOUDEK, František. *Einstein, Planck a Curie-Sklodovská za první světové války*. Moderní dějiny. Vzdělávací web pro učitele a žáky, 2014. [Online] [Citace: 10. leden 2015] Dostupné z: <http://www.moderni-dejiny.cz/>, <http://technet.idnes.cz/>.
4. World nuclear association. *Outline History of Nuclear Energy*. [Online] [Citace: 12. leden 2015] Dostupné z: <http://www.world-nuclear.org/Information-Library/>.
5. HANDRLICA, Jakub. *Právní rámec pro využívání jaderné energie a ionizujícího záření*. Plzeň: Nakladatelství Aleš Čeněk, 2013. ISBN 978-80-87284-33-9.
6. MITSURU, Neno et al. *Current Topics in Ionizing Radiation Research*. National Institute of Radiological Sciences, Japan, 2012. [Online] [Citace: 17. leden 2015] ISBN 978-953-51-0196-3. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/current-topics-in-ionizing-radiation-research>.
7. Státní ústav radiální ochrany - SURO. *Biologické účinky ionizujícího záření*. 2000. [Online] [Citace: 19. leden 2015] Dostupné z: <https://www.suro.cz/>.
8. CLANCY, Suzanne. *DNA Damage & Repair: Mechanisms for Maintaining DNA Integrity Scitable by nature education*. Nature Publishing Group, 2014. [Online] [Citace: 20. leden 2015] Dostupné z: <http://www.nature.com/scitable>.
9. ULLMAN, Vojtěch. *Jaderná fyzika a fyzika ionizujícího záření. Jaderná a radiální fyzika, nukleární medicína*. [Online] [Citace: 25. leden 2015] Dostupné z: <http://astronuklfyzika.cz/Fyzika-NuklMed.htm>.
10. Státní úřad pro jadernou bezpečnost - SÚJB. 1. leden 1993. *Stručný přehled biologických účinků záření*. [Online] [Citace: 29. leden 2015] Dostupné z: <https://www.sujb.cz/>.

11. GIOVANETTI, Anna., SGURA, Antonella and AVERSA, Giorgia. *Biological dosimetry: How to measure the absorbed dose in different scenarios*. ENEA. Sorrento 2011. ISBN:978-88-8286-264-0 [Online] [Citace: 31. leden 2015]
Dostupné z: <http://www.enea.it/en/publications/abstract/Biological-dosimetry>.
12. VÁVROVÁ, Jiřina a FILIP, Stanislav. *Radiosenzitivita hematopoetického systému*. Praha: Galén, Edice Alma Mater 2002. ISBN 80-726-220-05.
13. SÚKUPOVÁ, Lucie. *Akutní nemoc z ozáření*. Institut klinické a experimentální medicíny, Praha 2013. [Online] [Citace: 1. únor 2015]
Dostupné z: <http://www.sukupova.cz/akutni-nemoc-z-ozareni/>.
14. PEJCHAL, Jaroslav., ÖSTERREICHER, Jan., ZÁRYBNICKÁ, Lenka., ŠINKOROVÁ, Zuzana., TICHÝ, Aleš a VÁVROVÁ, Jiřina. *Biodozimetrické postupy*. Hradec Králové: Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví a katedra radiobiologie, Centrum pokročilých studií. Vojenské zdravotnické listy, ročník LXXIX, 2010, č. 2.
15. ŘEZÁČOVÁ, Martina., HAVELEK, Radim., LUKÁŠOVÁ, Emílie., KÁŠOVÁ, Emílie a VÁVROVÁ, Jiřina. *Referát fosforylovaný histon H2AX - nový indikátor poškození DNA*. Hradec Králové: Univerzita obrany, 2011. Chemické listy 105, 108-113.
16. HERNÁNDEZ, Laia., TERRADAS, Mariona., MARTÍN, Marta., TUSELL, Laura and GENESCÁ, Anna. *Highly Sensitive Automated Method for DNA Damage Assessment: Gamma-H2AX Foci Counting and Cell Cycle Sorting*. International Journal of Molecular Sciences, 30. červenec 2013. ISSN 1422-0067. [Online] [Citace: 3. únor 2015] Dostupné z: www.mdpi.com/journal/ijms.
17. PERNOT, Eileen., HALL, Janet., BAATOUT, Sarah., BENOTMANE and ABDERRAFI, Mohammed. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research, radiation biomarkers for potential use in epidemiological studi*, Science Direct 2012. [Online] [Citace: 5. únor 2015] Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/>.
18. Kolektiv autorů. *Radiobiologie*. [Online] [Citace: 6. únor 2015] SirdikDotCom.
Dostupné z: <http://fbmi.sirdik.org/>.
19. GOETZ, Pavel a kolektiv. *Vybrané kapitoly z lékařské biologie II*. Praha: Karolinum, 139 s., 1.vyd. 2002. ISBN 80-246-0320-9.

20. VILASOVÁ, Zdeňka., ÖSTERREICHER, Jan a VÁVROVÁ, Jiřina. *Biodozimetrie II.: Přehled současných metod a perspektiva dozimetrie*. Hradci Králové: Univerzita obrany, katedra radiobiologie Fakulty vojenského zdravotnictví. Vojenské zdravotnické listy, ročník LXXIV, 2005, č. 3-4.
21. GUIPAUD, Olivier and BENDERITTER, Marc. *Protein biomarkers for radiation exposure: towards a proteomic approach a new investigation tool*. Laboratoire de Radiopathologie et de Thérapies Expérimentales, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Fontenay-aux-Roses, France 2009.[Online] [Citace: 8. únor 2015.]
Dostupné z: www.iss.it/publ/anna/2009/3/453278.pdf.
22. KAUR, S Harpreet. *Evaluation of ionizing radiation exposure for biodozimetry validation of whole chromosome painting*. Sri Ramachandra University, Indie 2012.
[Online] [Citace: 9. únor 2015.]
Dostupné z: <http://shodhganga.inflibnet.ac.in/handle/10603/4972>
23. AMUNDSON, A. Sally., Bittner, Michael., Meltzer, Paul., Trent, Jeffrey and Fornace, Albert J, Jr. *Biological indicators for the identification of ionizing radiation exposure in humans*. National Cancer Institute. Bethesda, USA 2015. ISSN 1473-7159 89 [Online] [Citace: 10. únor 2015] Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/>
24. KOTULOVÁ, H., TAREBOVÁ, B. A. a JASKÓOVÁ, Z. *Aplikace in vitro testů pro hodnocení genotoxicity kontaminant v ovzduší*. Katedra biologie a ekologie, 2014.
[Online] [Citace: 19. únor 2015] Dostupné z:
<http://konference.osu.cz/svk/sbornik2014/pages/budoucnost/biologie-a-ekologie.html>
25. DVOŘÁK, Miroslav a MATĚJČKOVÁ, Milena. *Principy využití kometové analýzy při detekci poškození DNA*. Biochemický ústav, Lékařská fakulta. [Online] [Citace: 21. únor 2015.] Dostupné z: <http://portal.med.muni.cz/pracoviste-110512-biochemicky-ustav>.
26. PEJCHAL, Jaroslav, ÖSTERREICHER, Jan a VÁVROVÁ, Jiřina. *Biodozimetrie: Dicentrická analýza a předčasná chromozomová kondenzace (PCC)*. Hradec Králové: Univerzita obrany, Katedra radiobiologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, 2007. Vojenské zdravotnické listy, ročník LXXVI, 2007, č. 3.

27. ÖSTERREICHER, Jan a VÁVROVÁ, Jiřina. *Přednášky z radiobiologie*. Hradec Králové: Ústav radiobiologie a imunologie, Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, 2003. Praha: Manus, 2003, ISBN 80-86571-01-7.
28. International Atomic Energy Agency. *Cytogenetic dosimetry: Applications in preparedness for response to radiation emergencies*. Vienna, 2011, IAEA-EPR [Online] [Citace: 26. únor 2015] Dostupné z: <http://www.iaea.org/books>.
29. FREITINGER-SKALICKÁ, Zuzana., HON, Zdeněk a ZÖLZER, Friedo. *Metody biologické dozimetrie*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, katedra radiologie a toxikologie. ISSN1801-0261, ISSN 1804-7858 [Online] [Citace: 26. únor 2015] Dostupné z: <http://casopis-zsfju.zsf.jcu.cz/prevence-urazu-otrav-a-nasili/prohlaseni>.
30. LAKATOŠOVÁ, Martina a HOLEČKOVÁ, Beata. *FISH ako metóda detekcie radiačne indukovaných genetických poškodení*. Rádiobiologická konferencia venovaná 20. výročiu jadrovej havárie v Černobyle: Zborník príspevkov. Košice: Ústav genetiky, Univerzita veterinárského lekárstva 2006, s. 132-140. ISBN 80-8077-026-3.
31. ÖSTERREICHER, Jan., VOGT, Jürgen., BUTZ, Tilman., PRŮCHOVÁ, Šárka a MACELA, Aleš. *Vedlejší účinky ionizujícího záření III: Reakce buněk v okolí ozářené oblasti na buněčné úrovni a možnosti jejich inhibice*. Ústav radiobiologie a imunologie Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové, Abteilung für Nukleare Festkörperphysik, Universität Leipzig, Vojenské zdravotnické listy ročník LXXII, 2003, č. 6.
32. NAVRÁTIL, Leoš, a další. *Diagnostika a péče o nemocné při radiačních haváriích*. Klinická radiobiologie. Amos. [Online] [Citace: 27. únor 2015] Dostupné z: <http://www.eamos.cz/amos/index.php>.
33. HOLEČEK, V. *Volné radikály, antioxidanty a jak dále?* Plzeň: Mulačova nemocnice, 2006, Sv. Klin. Bioche. Metab, str. 140-145. [Online] [Citace: 28. únor 2015] Dostupné z: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0603-140.pdf>

34. TURICK, E. Charles, a další. *Gamma radiation interacts with melanin to alter its oxidation-reduction potential and results in electric current production*. College of Medicine. Montefiore Medical Park, USA. 2011. [Online] [Citace: 1. březen 2015]
Dostupné z: <http://www.journals.elsevier.com/bioelectrochemistry/>.
35. Atomic Energy Agency - IAEA *Use of Electron Paramagnetic Resonance Dosimetry with Tooth Enamel for Retrospective Dose Assessment*. Pub. International, 2002. LAEA-TECDOC-1331, ISBN 92-0-119402-1. [Online] [Citace: 3. březen 2015]
Dostupné z: <http://www-pub.iaea.org/books/iaeabooks/6646/>
36. ROMANYUKHA, A., REYES, R. A., TROMPIER, F., BENEVIDES, L. A. and SWARTZ, H. M. *Electron Paramagnetic Resonance Biodosimetry in Teeth and Fingernails*. Slide player. [Online] [Citace: 4. březen 2015]
Dostupné z: <http://slideplayer.com/slide/1701943/>.
37. SULLIVAN, M. Julie., PATAJE, G. S. a další. *Assessment of Biodosimetry Methods for a Mass-Casualty Radiological Incident: Medical Response and Management Considerations*. US National Library of medicine, National institutes of Health. PMID: PMC3810609 [Online] [Citace: 5. březen 2015]
Dostupné z: <http://www.nlm.nih.gov/>.
38. SWARTZ, M. Harold, a další. *Biological Dosimetry by the Triage Dicentric Chromosome Assay – Further validation of International Networking*. US National Library of medicine, National institutes of Health. PMID: PMC3176593 [Online] [Citace: 10. březen 2015] Dostupné z: <http://www.nlm.nih.gov/>
39. SWARTZ, M. Harold, a další. *Critical Assesment of Biodosimetry Metods for Large – Scale Incident*. US National Library of medicine, National institutes of Health. PMID: PMC4086260 [Online] [Citace: 11. březen 2015.]
Dostupné z: <http://www.nlm.nih.gov/>
40. LENHART, K. Martha and HÉBERT, F. Edward. *Medical Consequences of Radiological and Nuclear Weapons*. US Army Medical Department Center and School Fort Sam Houston, Texas. ISBN 978-0-16-091693-9 [Online] [Citace: 21. březen 2015]
Dostupné z: <http://www.cs.amedd.army.mil/>

41. GARTY, G., KARAM, A. and BRENNER, D. J. *Infrastructure to Support Ultra High Throughput Biodosimetry Screening after a Radiological Event*. US National Library of medicine, National institutes of Health. PMID: PMC3169379 [Online] [Citace: 31. března 2015] Dostupné z: <http://www.nlm.nih.gov/>.