NEMZETI KÖZSZOLGÁLATI EGYETEM KATONAI MŰSZAKI DOKTORI ISKOLA

Deli Gábor

Kisdózisú sugársérülések laboratóriumi vizsgálata polimeráz láncreakció segítségével, különös tekintettel a DNS károsodásra

Doktori (PhD) értekezés tervezet

Témavezető:

Csurgai József PhD

BUDAPEST, 2022

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉ	ES	7
A kutatás	i téma aktualitása és fontossága	8
A tudomá	nyos probléma megfogalmazása	9
Kutatási c	célkitűzések	9
Hipotézis	ek	10
H1		10
H2		10
Н3		10
H4		11
Н5		11
Kutatási 1	nódszerek	11
A dolgoza	at tartalmi felépítése	12
1. AZ IONIZ	ZÁLÓ SUGÁRZÁS	13
1.1. Su	gárzások fajtái	13
1.2. Su	gárterhelés	15
1.2.1.	Természetes sugárterhelés	15
1.2.2.	Mesterséges sugárterhelés	17
1.3. Kö	vetkeztetések	
2. A SUG	ÁRZÁS EMBERI SZERVEZETRE GYAKOROLT HATÁSA	21
2.1. Sej	tszintű hatások	
2.2. Su	gárzás indukálta kromoszómaelváltozások	
2.2.1.	Sugárzás indukálta DNS léziók	27
2.2.2.	Kromoszóma aberrációk	
2.2.3.	Kromatida típusú aberrációk	
2.2.4.	Mikronukleusz	
2.3. Szt	tochasztikus hatások	39

	2.4.	Det	erminisztikus hatások	. 40
	2.5.	Egy	véni sugárérzékenység	. 42
	2.6.	Rac	liomimetikumok	. 43
	2.7.	Kez	zelési lehetőségek	. 49
	2.8.	Kö	vetkeztetések	. 50
3.	AZ	ION	NZÁLÓ SUGÁRZÁS HATÁSAINAK KIMUTATÁSI LEHETŐSÉGEI	51
	3.1.	Sze	mélyi doziméterek	. 51
	3.1	.1.	Foton és β-sugárzás	. 52
	3.1	.2.	Neutronsugárzás	. 54
	3.1	.3.	Belső sugárterhelés	. 54
	3.2.	Bio	fizikai technikák	. 55
	3.2	.1.	Optikailag stimulált lumineszcencia eljárás (OSL)	. 55
	3.2	.2.	Elektron spin rezonancia (EPR)	. 56
	3.3.	Bio	dozimetria	. 56
	3.3	.1.	A dicentrikus kromoszóma analízis	. 58
	3.3	.2.	A mikronukleusz teszt	. 60
	3.3	.3.	Premature Chromosome Condensation (PCC)	. 62
	3.3	.4.	Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH)	. 64
	3.3	.5.	γ-H2AX	. 67
	3.3	.6.	Comet assay	. 68
	3.3	.7.	mRNS markerek	. 69
	3.3	.8.	Fehérje, DNS és RNS markerek	. 70
	3.3	.9.	Új biomarkerek és fejlesztési lehetőségek	. 71
	3.4.	Kö	vetkeztetések	. 71
4.	AN	MITO	OKONDRIÁLIS DNS ÉS DIAGNOSZTIKAI JELENTŐSÉGE	. 73
	4.1.	An	nitokondrium felépítése és működése	. 73
	4.2.	DN	S repair folyamatok a mitokondriumban	. 74

	4.3.	A mitokondriális DNS osztódása	76
	4.4.	Oxidatív károsodások hatása a mitokondriális DNS-re	76
	4.5.	Az mtDNS károsodásainak előfordulása betegségekben	78
	4.5	5.1. A mitokondriális genom károsodásával összefüggő kórképek	80
	4.6.	Sugárzások hatása a mitokondriális DNS-re	80
	4.7.	A mitokondriális "Common deléció"	83
	4.8.	Deléciók és duplikációk vizsgálata a mitokondriális DNS-ben	84
	4.9.	PCR, mint a sugárkárosodás kimutatásának eszköze	85
	4.9	0.1. Mitokondriális deléciók és duplikációk kimutatása PCR k	észülék
	seg	gítségével	88
	4.10.	Következtetések	89
5	. SA	JÁT VIZSGÁLATOK	90
	5.1.	Dicentrikus kromoszóma analízis	91
	5.1	.1. DIC módszer sugárhatás vizsgálatára	91
	5.1	.2. Bleomycin kezelés hatására kialakuló DIC vizsgálata	92
	5.1	.3. Eredmények	93
	5.1	.4. Következtetések	95
	5.2.	Mikronukleusz teszt	95
	5.2	2.1. A MN tulajdonsága és használhatósága	95
	5.2	2.2. A MN Módszer	96
	5.2	2.3. Eredmények	98
	5.2	2.4. Következtetések	99
	5.3.	Az alkalmazott PCR alapú módszer bemutatása	100
	5.3	3.1. Az mtDNS tulajdonságai és alkalmazhatósága	100
	5.3	3.2. A PCR mérésekhez használt primerek bemutatása	100
	5.3	3.3. A PCR reakciók menete interkalálódó festékkel	104
	5.3	3.4. A mitokondriális TD vizsgálata fluoreszcens probe-okkal	106

5.	3.5.	Statisztikai analízis	106
5.	3.6.	A PCR termékek ellenőrzése	107
5.	3.7.	A biológiai minta kiválasztásának elve CD és TD kimutatására	109
5.4.	CD) kimutatása Jurkat sejteken (Előkísérlet)	110
5.	4.1.	Hipotézis	110
5.	4.2.	Módszer	110
5.	4.3.	Eredmények	111
5.	4.4.	Következtetés	111
5.5.	CD) kimutatása vérlemezkedús frakcióban (PRP) (Előkísérlet)	112
5.	5.1.	Hipotézis	112
5.	5.2.	Módszer	112
5.	5.3.	Eredmények	112
5.	5.4.	Következtetések	114
5.6.	CD) kimutatása teljes véren, ionizáló sugárzás hatására	115
5.	6.1.	Hipotézis	115
5.	6.2.	Módszer	116
5.	6.3.	Eredmények	118
5.	6.4.	Következtetések	124
5.7.	AC	CD kimutatása teljes véren, bleomycin kezelés után	124
5.	7.1.	Hipotézis	124
5.	7.2.	Módszer	124
5.	7.3.	Eredmények	125
5.	7.4.	Következtetések	127
5.8.	Mit	tokondriális tandem duplikáció (TD) kimutatása teljes véren, id	onizáló
sugá	sugárzás hatására129		
5.	8.1.	Hipotézis	129
5.	8.2.	Módszer	129

	5.8.3.	Eredmények 13		
	5.8.4.	Következtetések		
AZ I	ELVÉGZ	ZETT KUTATÓMNKA ÖSSZEFOGLALÁSA133		
ÖSSZEGZETT KÖVETKEZTETÉSEK 135				
ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK, TÉZISEK136				
KUTATÁSI EREDMÉNYEK GYAKORLATI FELHASZNÁLHATÓ-SÁGA 138				
AJÁNLÁSOK				
TÉMAKÖRBŐL KÉSZÜLT ÉS LEKTORÁLT FOLYÓIRATBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓIM				
KÖS	SZÖNET	NYILVÁNÍTÁS 142		
IRO	DALOM	1JEGYZÉK 142		

BEVEZETÉS

Kismértékű háttérsugárzás folyamatosan éri a szervezetünket, ez a földsugárzásból és a kozmikus sugárzásból tevődik össze. Földsugárzásnak jelen esetben a természetes háttérsugárzásnak azon komponensét értjük, ami a Föld magmatikus anyagában és kérgében előforduló ősi radioaktív izotópok (²³⁸U, ²³⁵U, ²³²Th,⁴⁰K) és leányelemeik folyamatos bomlásának eredményeképpen éri az élő szervezetet. Magyarországon a háttérsugárzás értéke 1,75 mSv/év [1] Ennek sokszorosa érheti a szervezetet katasztrófahelyzetben, például egy nukleáris-, vagy munkahelyi baleset vagy terrortámadás során, nagy volumenű ipari baleset esetén (Csernobil, Fukushima).

Az ionizáló sugárzás képes egészségkárosodást okozni olyan módon, hogy közben a sugárzás ténye észrevétlen marad. Nincsen specializálódott érzékszervünk az ionizáló sugárzás érzékelésére, pedig a legkisebb expozíció is maradandó nyomot hagyhat a sejtjeinkben. Sugárexpozíció történhet úgy, hogy az érintettek nem is észlelik, és utólag sem értesülnek róla. A katasztrófavédelem egyik fontos feladata a sugárvédelem. Katasztrófa, váratlan helyzet esetén viszont az előre tervezett védelem nem mindig végrehajtható, vagy csak részben valósul meg és mivel a Magyar Honvédség a katasztrófavédelmi, ezen belül a nukleárisbaleset-elhárítási feladatokban általában jelentős szerepet vállal, így mint a parancsnoki, mint a végrehajtó állomány tartózkodhat a természetesnél lényegesen magasabb dózistérben. A fizikai dozimétert nem viselő személyeknél a sugárdózis mértékét csak utólag, különböző biodozimetriai eljárások segítségével lehet megbecsülni. A biodozimetria az érintettek laboratóriumi vizsgálatával arra ad választ, hogy történt-e sugárexpozíció, a jelenlévők mekkora sugárzást és abból eredő sejtkárosodást szenvedtek el. Ezáltal a sérültek megfelelő orvosi kezelésben, jogorvoslatban részesülhetnek. A sugárexpozíciónak látható tünetei bőrreakció, hányás, fejfájás, hasmenés - csak nagyobb, 1 Gray feletti elnyelt dózis esetén jelentkeznek, helyzettől függően akár több órás késéssel. Ezek nem specifikusak, könnyen összetéveszthetők más betegségek tüneteivel, ezért előfordulhat, hogy a betegek nem a megfelelő kezelést kapják, ha az orvos nem gyanakszik sugárexpozícióra. (például: Alekszandr Litvinyenko esete) Sugárexpozíció történhet ismert sugaras esemény kapcsán is, de ilyenkor sem tudjuk pontosan, hogy az egyes embereket a terepviszonyok és az ott töltött idő alapján mekkora hatás érte, hiszen például a sugárérzékenység személyenként eltérhet. Katasztrófahelyzetben, például egy nukleáris-, vagy munkahelyi baleset vagy terrortámadás során, a jelenlévők sugárterhelésnek lehetnek kitéve, sőt nagy volumenű ipari baleset esetén attól akár több ezer kilométer távolságra, vagyis az érintett ország határain túl is érheti sugárzás az emberi szervezetet. (például: Csernobil, Fukushima). Minden tömeges baleset esetén az intézkedő parancsnokságnak az érintettek közt egy sürgősségi sorrendet kell felállítani, ezt a folyamatot nevezzük triage-nak. Egy tömegeket érintő esemény során a rengeteg ember között sokan lesznek olyanok, ahol a klinikai tünetek esetlegesen nem is manifesztálódnak, de esetükben a későbbiekben jelentősen megnő a különböző daganatos megbetegedések kockázata, valamint számolni kell azzal is, hogy lesznek emberek, akiknél ugyan tünetek mutatkoznak, de azok nem a sugárexpozíció kapcsán alakultak ki. (stressz, vegyi anyagok, trauma).

A kutatási téma aktualitása és fontossága

A jelenlegi biodozimetriai gold standard módszerek, melyek kromoszómatöréseket, és azok következményeit vizsgálják a sejtek mikroszkópos morfológiájára, noha érzékenyek és pontosak, de nagyon időigényesek, több napos sejttenyésztést, manuális mintafeldolgozást, valamint statisztikai számításokat igényelnek. Az adatfeldolgozáshoz mikroszkópos fényképezésre, a megfestett szövettani mintát hordozó üveglemezek tárolására és a nagy mennyiségű digitális kép archiválására van szükség. Ezek a metodikák kis áteresztőképességgel rendelkeznek, ami miatt a triage során, vagy betegkövetésre csak korlátozott mértékben használhatóak. Világszerte számos próbálkozás van a klasszikus módszerek automatizálására, amely jelentősen megnöveli az áteresztőképességget, de a tenyésztési időt nem csökkenti, valamint a szubjektivitáson sem változtat, mivel az értékelőnek ellenőrizni kell a felvételeket. Ezért egyre több laboratórium keres új targeteket (mRNS és fehérjeexpressziós vizsgálatok) az elszenvedett sugárterhelés kimutatására, erre a gyorsan fejlődő molekuláris biológiai módszerek adnak lehetőséget.

Funkciójából adódóan, a Magyar Honvédségnek fel kell készülni egy ABV műveleti környezetben történő feladatvégrehajtásra, vagy akár hazai környezetben egy esetleges nukleáris veszélyhelyzetben történő katasztrófavédelmi tevékenységre. Ez természetesen együtt jár jelentősebb sugárterhelések elszenvedésének kockázatával.

A fentebb említett módszerekkel meg lehet határozni egy ilyen feladatra kijelölt katonák sugárzási érzékenységét, és a panaszokkal, vagy csak nagyobb sugáraexpozícióval visszaérkező személyek ellenőrzésével, majd a meghatározott sugárzási sérülések esetén kiválasztható a megfelelő terápia.

A polimeráz láncreakció (PCR) egy, a nukleinsav láncok sokszorozásán alapuló molekuláris biológiai eljárás, mely alkalmas az egyes DNS/RNS szakaszok egyedi azonosítására is. A módszer térhódításával új eszköz kínálkozik a biodozimetria számára, mivel az ionizáló sugárzás károsítja a DNS-t, legyen szó a magi, azaz kromoszomális DNS-ről, vagy a mitokondriális DNS-ről, ezen kívül megváltoztatja egyes fehérje mRNS-ek expressziós mintázatát. A molekuláris biológiai módszerek egyik előnye a mikroszkópos eljárásokkal szemben, hogy ezek az eljárások szélesebb körben használtak, használatuk gyorsabban megtanulható és kevesebb gyakorlatot igényel, mint a mikroszkópos számláláson alapuló technikáké. A sugárzás okozta DNS károsodások PCR technológiával kimutathatók, de biodozimetriai módszert még nem építettek rá. A szükséges infrastruktúra és a működtető molekuláris biológusok az ország több intézményében jelen vannak, katasztrófahelyzetben könnyebb a külső laborokat bevonni, segítséget találni, mint a nehézkes mikroszkópos munka esetén.

A tudományos probléma megfogalmazása

Az elszenvedett sugárterhelés megállapítását célzó jelenlegi gold standard módszerek, noha érzékenyek és pontosak, de nagyon időigényesek, több napos sejttenyésztést, manuális mintafeldolgozást, aprólékos mikroszkópos munkát, valamint statisztikai feldolgozást igényelnek. Az adatfeldolgozáshoz mikroszkópos fényképezésre, a megfestett szövettani mintát hordozó üveglemezek tárolására és a nagy mennyiségű digitális kép archiválására van szükség. A megvalósítás nehézkes, költséges, mert sok munkaórát jelent, a kivitelezőktől speciális gyakorlatot kíván, ami megnehezíti, hogy szükség esetén nagyobb erőket, további laborokat lehessen bevonni. A kiértékelés nagyon szubjektív, ezért a biodozimetriai munkához csatlakozó laboratóriumoknak saját dózis-hatás görbét kell felvenni, ami több hónapos-éves nagyságrendű munkát jelent. Ezek a metodikák nagyon kis áteresztőképességgel rendelkeznek, ami miatt a triage során csak korlátozott mértékben használhatóak.

Nagy tömegeket érintő események során a triage-hoz szükség van egy olyan eljárásra, amely rövidebb idő alatt, nagyobb áteresztőképességgel teszi lehetővé a potenciálisan sérült személyek vizsgálatát.

Kutatási célkitűzések

A kutatás célja a sugárhatás mechanizmusával kapcsolatos megfigyelések, és az ezt, valamint az egyéni sugárérzékenységet befolyásoló anyagok vizsgálatára alkalmas módszerek feltérképezése.

Mindezek tükrében célom a jelenleg használatos metodikáknál gyorsabb, áteresztőképességű, objektív módszer beállításának költséghatékony, nagy megalapozása a modern PCR technika segítségével, amely a megfelelő target kiválasztása után alkalmas lehet biodozimetriai célokra, valamint jelentősen lerövidítheti a vizsgálatra fordítandó időt, így alkalmas személyi sugárterhelés utólagos meghatározására, valamint katasztrófahelyzetben nagy tömegek triage-ához előszűrő vizsgálatként és/vagy követésre.

A PhD munkám célja ennek a molekuláris biológiai módszernek megalapozása, vagyis egy ehhez szükséges target szekvencia megtalálása, és a felmerülő lehetőségek alkalmazhatóságának körültekintő vizsgálata, kiválasztása, a teszt további fejlesztéséhez.

Hipotézisek

A kutatás céljainak megfelelően a 4. és az 5. fejezetben részletesen tárgyalt kutatási kérdések alapján a következő kutatási hipotéziseket állítottam fel:

H1

A jelenleg gold standard eljárásként alkalmazott kromoszóma aberrációs módszer alkalmas akár a determinisztikus értékek alatti sugárterhelések kvalitatív megállapítására, illetve azok kvantitatív becslésére is.

H2

A mikronukleusz mérési eljárás alkalmas a kromoszóma aberrációs módszerrel hasonlatosan az analóg sugárterhelések minőségi és mennyiségi analízisére, figyelembe véve a kémiai-biokémiai eredetű interferencia hatásokat is.

H3

Az ionizáló sugárzás károsítja a DNS-t legyen szó a magi, azaz kromoszomális DNSről, vagy a mitokondriális DNS-ről, megváltoztatja egyes fehérjék expressziós mintázatát, az mRNS-ek szintjén. Ezek az elváltozások PCR technológiával kimutathatóak, így lehetőség van a sugárzás okozta sérülések detektálására és mennyiségi jellemzésére. Ily módon egy jól mérhető, sugárzás hatására megváltozó, lehetőleg sok kópiában jelen levő DNS szekvencia esetén beállítható egy olyan PCR technikán alapuló eljárás, amely alkalmas lehet mind biodozimetriai vizsgálatokra, mind triage céljából nagy tömegek esetén előszűrésre, utánkövetésére.

H4

A véralkotók in vitro vizsgálatával kialakítható egy olyan eljárás, amelynek alapján a limfociták, vérlemezkék és magának a teljes vérnek a vizsgálatával megállapíthatóak a determinisztikus, illetve a determinisztikus küszöb alatti sugárterhelések minőségi és mennyiségi jellemzői.

H5

A mitokondriális DNS besugárzásos vizsgálatával feltárhatóak olyan DNS károsodások, amelyek alapján a determinisztikus küszöb alatti dózisértékek huzamosabb idő elteltével is elfogadható szignifikanciával is detektálhatóak.

Kutatási módszerek

A készülő dolgozat célja tulajdonképpen egy olyan új vizsgálati módszer, amelynek az alapja az ionizáló sugárzás DNS károsító hatásának PCR technikával történő kimutatása. Ennek megfelelően elméleti és gyakorlati kutatási módszereket választottam a célkitűzésem megvalósítására.

A kutatás során megvizsgáltam más hasonló rendszerek felépítését, működését. Megvizsgáltam a hagyományos citogenetikai eljárások alkalmazhatóságát. Ez részben irodalomkutatást jelentett, másrészről sejttenyésztési és mikroszkópos munkát, a hagyományos képfeldolgozó módszerek alkalmazását, valamint molekuláris biológiai módszereket, DNS izolálást, a valós idejű PCR technikát, gélelektroforézist.

Központi lépés volt módszereim között a vér egyes alkotóelemeinek vizsgálata annak tükrében, hogy melyik sejttípus felel meg leginkább a PCR vizsgálat céljából. A kiválasztott sejttípus besugárzásra került, több különböző dózissal (röntgensugárzás), majd a DNS izolálás után a kinyert DNS mintát vizsgáltam PCR segítségével. Több eltérő DNS szekvenciát vizsgáltam meg abból a szempontból, hogy melyik felel meg leginkább a tervezett módszerrel szemben támasztott követelményeknek, ami a további PCR vizsgálatokhoz volt szükséges.

A dolgozat tartalmi felépítése

A tudományos célkitűzéseim alapján a doktori értekezést öt egymásra épülő tartalmi fejezetre bontva dolgozom ki.

Az első fejezetben bemutatom az ionizáló sugárzást, mint fizikai jelenséget és egyes típusait. Rövid leírást adok kialakulásának fizikai hátteréről és természetes, illetve mesterséges előfordulásukról.

A **második fejezetben** az ionizálós sugárzás emberi szervezetre gyakorolt biológiai hatásait ismertetem a sejt, szövet és szervezet szintjén.

Az értekezés **harmadik fejezetében** bemutatom az ionizálós sugárzás szervezetre gyakorolt hatásainak kimutatási lehetőségeit, ismertetem azokat a vizsgálati eljárásokat, melyek a klasszikus biodozimetria alapját képezik, valamint a már folyamatban lévő és potenciális fejlesztési irányokat.

A **negyedik fejezetben** bemutatom a vizsgálataim alapjául szolgáló mitokondriális DNS sajátosságait, részletes leírást adok az általam elvégzett molekuláris biológiai vizsgálatokról, valamint ezek eredményeiről.

Az ötödik fejezetben a saját vizsgálataimat, valamint a metodikai beállítások során nyert tapasztalatokat mutatom be. A fejezetben felvázolok néhány irányt, a kutatás esetleges folytatásával kapcsolatban.

1. AZ IONIZÁLÓ SUGÁRZÁS

A sugárzásokat sugárfizikai és sugárbiológiai szempontból két alapvető csoportra oszthatjuk: ionizáló és a nem ionizáló sugárzásokra.

Ionizáló sugárzásnak nevezünk minden olyan sugárzást, amelynek elegendő energiája van a velük semleges közegben kölcsönhatásba lépő atomok és molekulák ionizációjához és így elektromos töltésű részecskéket (ionokat) hoz létre. Amennyiben a sugárzás részecskeenergiája az ionizációs energiánál kisebb, még nagyobb fluxus mellett sem lesz képes az ionizációra.

Az ionizáció, mint fizikai folyamat megelelő körülmények között kémiai reakciókat hozhat létre, ami pedig az élő szervezetben biológiai elváltozásokhoz vezethet. Az ionizáló sugarak állhatnak töltött részecskékből, de semleges részecskék, pl. neutronok is képesek ionizációt kiváltani. [2]

1.1. Sugárzások fajtái

1895-ben, W. C. Röntgen felfedezésével vette kezdetét az ionizáló sugárzás tudományos kutatása. Az általa X-sugárzásnak nevezett, láthatatlan, katódsugárcsőből eredő sugárzás felfedezéséért 1901-ben megkapta az első fizikai Nobel-díjat [3] Ahogy egyre több fajta ionizáló sugárzást írtak le egyre részletesebben, a könnyebb áttekinthetőség végett azokat a részecske- vagy elektromágneses természetük alapján két nagy csoportba osztották.

Részecskesugárzásnak tekinthető minden olyan sugárzás, ahol anyagi részecske közli az energiát, ilyen az α - és a β -, proton- és neutron-sugárzás. Az első esetben ⁴He²⁺ szabadul ki egy instabil atommagból, béta-sugárzásnál egy nagy energiájú e⁻ (elektron) vagy e⁺ (pozitron) hagyja el az atomot, miközben (negatív béta bomlás esetén) az atommag egyik neutronja protonná alakul, vagy (pozitív béta bomlás esetén pedig) egy proton neutronná alakul át. [3]

A részecskesugárzások egy része közvetlenül ionizáló sugárzás, vagyis a töltéssel rendelkező részecske elegendő kinetikus energiával rendelkeznek ahhoz, hogy közvetlenül ionizációt okozzon. Vannak azonban közvetve ionizáló sugárzások, amelyek esetében a fotonok és a töltéssel nem rendelkező partikulumok másodlagos töltött részecskéket szabadítanak fel és az ionizáció ezeknek köszönhetően megy végbe.

[2]

Gamma- és röntgen-sugárzásnál az elektromágneses sugárzás különféle spektrumairól beszélünk, ennek összefoglalását látjuk az első ábrán.



1. ábra: Az elektromágneses sugárzás spektruma [4]

A röntgensugárzás nagyobb hullámhosszú (ezáltal kisebb energiájú) része az elektromágneses spektrumon belül az ibolyántúli tartományba esik, ezt nevezzük lágy röntgensugárzásnak. A kisebb hullámhosszú (ezáltal nagyobb energiájú), melyet kemény röntgensugárzásnak nevezünk, a gamma-sugárzással szomszédos tartományba esik, részben át is fed azzal. Ezért az utóbbi kettőt nem is a hullámhosszuk, hanem a keletkezésük mögött álló fizikai folyamatok alapján különböztetik meg. A gamma-sugárzás atommagok átalakulása során jön létre, míg a röntgensugárzást nagyenergiájú elektronfolyamatok (nagy sebességre felgyorsított elektronok és egy anyagi közeg kölcsönhatása) hozzák létre. [5]

Röntgen-sugárzás kétféleképpen keletkezhet. Az egyik, amikor egy nagy energiájú foton találkozik egy atommag erőterével (erre a célra a nagy rendszámmal és magas olvadásponttal rendelkező atomok, pl. molibdén vagy wolfram a legalkalmasabbak), amely lefékezi őt, miközben energia szabadul fel. Ezt nevezik fékezési röntgensugárzásnak. A másik esetben a nagy energiájú foton képes az atom belső elektron héjáról kilökni egy elektront, vagy egyes pozitív bétabomló izotópok elektronbefogással a legbelső, 1s pályáról egy elektront inverz bétabomlással befognak (ilyen pl. a ²²Na, bomlásainak mintegy 90,5 %-ban pozitron emitter, de 9,5 %-ban elektronbefogó), így a legbelső pályán elektronhiány képződik, vagyis az elektronszerkezet erősen gerjesztett állapotba kerül. Az így megüresedett helyre az atom egy külső héjáról pótlódik vissza az elektron, ennek során a vegyértékhéj és a legbelső, 1s pálya energia átmenete a két héj pályaenergia-különbségének megfelelő kvantum kibocsátással jár, ami keV-os nagyságrendű, tehát a röntgensugárzás spektrumába esik. Mivel egy adott elem atomjának pályaenergia különbsége szigorúan elemspecifikus érték (ezért az elektronbefogás elemanalitikában is használatos jelenség), így ebben az esetben karakterisztikus röntgen-sugárzásról beszélünk.

Az instabil atomok átalakulásakor a gerjesztett atommagok alacsonyabb (stabilabb) energiaszintre való kerülésekor kisugárzódott energia mennyiséget nevezzük gammasugárzásnak. Ezek a sugárzások mind a természetes folyamatok, mind a mesterséges emberi tevékenységek eredményeképpen megtalálhatók környezetünkben. Az egyes sugárforrásokból származó sugárterhelések népesség szintű arányait az alábbi ábra mutatja:

1.2. Sugárterhelés

Azokat a sugárforrásokat, melyek hatással vannak az élő szervezetre eredetük alapján természetes és mesterséges sugárforrásokra oszthatjuk.

1.2.1. Természetes sugárterhelés

A természetes eredetű sugárterhelés független az emberi tevékenységektől, a környezetünkben természetes módon előforduló sugárforrásokat kell érteni alattam, mint például a kozmikus sugárzást, vagy a testünkben található természetes radioaktív anyagok sugárzását. A radioaktív anyagok, melyek a természetes eredetű sugárterhelésért felelősek, megtalálhatóak a környezet minden elemében, mint például a talajban, az építőanyagokban, a levegőben, az élelmiszerekben, az ivóvízben is.

A háttérsugárzás - amely a kozmikus sugárzásból, valamint a környezetben található természetes eredetű radioaktív izotópok által kibocsátott sugárzásból áll – folyamatosan körülvesz minket és időben közel állandó. A természetes háttérsugárzás azoban eltérést mutathat a földrajzi hely függvényében, jelentős mértékben függ az adott hely sajátosságaitól (például magasság, kőzet összetétele). A globális háttérsugárzás értéke átlagosan 2,4 mSv/ év, melyhez hozzájárul a mesterséges forrásokból származó háttérsugárzás. Hazánkban az átlagos természetes háttérsugárzás 3-4 mSv/év, a magasabb érték oka javarészt a talaj magasabb urán és tóriumsor tartalma következtében jelenlévő magasabb levegő-radonkoncentráció. [2]



2 ábra: A különböző sugárforrásokból származó sugárterhelések megoszlása. Az ábráról leolvasható, hogy a radonból származik a sugárterhelés jelentős része. (Beltéri tartózkodás) a földi és a kozmikus sugárzás jelentősége is kisebb, mint a röntgendiagnosztikai eljárásoké vagy a táplálákkal bevitt izotópokból származóé. [6]

A kozmikus sugarak egy része a légkör atomjaival ütközve magreakciót vált ki, melynek eredményeképpen úgynevezett kozmogén izotópok keletkeznek. Ilyen, kozmikus sugárzás hatására a sztratoszférában létrejövő izotópok a ³H, ¹⁴C, ⁷Be. A kozmikus sugárzásból eredő dózisterhelés a tengerszinten mindössze 0,27 mSv/év, azonban 4 kilométeres magasságban ez 2 mSv/év körüli értékre nő. Egy 7-12 km magasban például Európa- Észak-Amerika viszonylatban megtett repülőút sugárterhelése 30-45 µSv, de az űrhajósok ennél jelentősen nagyobb sugárterhelésnek vannak kitéve. A kozmogén radioaktív izotópoktól (belélegzéssel és fogyasztásal) eredő átlag belső sugárterhelés 10µSv/év. [2]

A kozmogén radionuklidokat leszámítva mára már csak azok a radioizotópok (illetve ezek bomlástermékei) vannak jelen a Földön (a mesterségesen előállított izotópokat nem véve számításba), amelyek felezési ideje összemérhető a Föld korával. A dózisterhelés szempontjából az alapvető radionuklidok a ⁴⁰K, a ²³²Th és az ²³⁸U. A belégzéssel és az élelmiszerfogyasztással a szervezetbe kerülő radionuklidok okozta belső effektív dózis évi 0,29 mSv (ebből 0,19 mSv a ⁴⁰K-tól, 0,1 mSv pedig az ²³⁸U-tól és a ²³²Th-tól származik). [7]

A bennünket érő természetes sugárterhelés több mint fele (1,26 mSv/év) a ²²²Rn izotóptól származik. Mindhárom bomlási sorban keletkezik radon. Gáznemű izotóp lévén a szabadban gyorsan felhígul, viszont zárt terekben, épületekben feldúsulhat. A lakásokban mérhető évi átlagos radon-koncentráció átlaga világszinten 40 Bq/m³, ez az érték szabadban 5-10 Bq/m³. A belélegzett radon legnagyobb részét ki is lélegezzük, azoban a gáz kis része bekerül a véráramba, azzal pedig eljut a különböző szövetekbe. A radon rövid életű bomlástermékei (²¹⁸Po, ²¹⁴Pb, ²¹⁴Bi és ²¹⁴Po) azonban a levegő aeroszol részecskéihez tapadnak és ezek a részecskék belélegezve megtapadhatnak a légzőszervek nyálkahártyájan, szöveteiben, elsősorban a tüdőben. [7]

A sugárzás forrása	Atlag évi effektív dózis [mSv]
Kozmikus eredetű sugárzás	0,39
Természetes izotópok külső sugárzása	0,48
Természetes izotópok belégzése	1,26 (1,15 ²²² Rn)
Természetes izotópok elfogyasztása	0,29
Összesen	2,4

1. táblázat: Természetes forrásból származó évi átlagos lakossági sugárterhelés

1.2.2. Mesterséges sugárterhelés

A bennünket érő mesterséges sugárterhelés egy főre eső értéke világszinten 0,7-2 mSv/év (a fejlett országokban tapasztalhatóak magasabb értékek), melynek nagyobb része a különböző orvosi felhasználásokból, a diagnosztikából és a sugárterápiából származik. A PET és CT vizsgálatok diagnosztikus térhódításával párhuzamosan, főként a fejlett országokban egyre növekszik a mesterséges sugárterhelés mértéke. Ezek a képalkotó diagnosztikai eljárások annak ellenére (gyakran indokolatlanul) kiszorítják a klasszikus röntgenvizsgálatot, hogy az töredékannyi sugárterheléssel jár. [2][8]

Természetes módon az érintetteknek a sugárzás orvosi felhasználásából a betegségek megállapítása és gyógyítása révén közvetlen haszna számazik, és a sugárexpozíció kockázatvállalása itt a legnyilvánvalóbb az egyén számára is. Az ilyen módon nyert orvosi haszon mellett az ionizáló sugárzás orvosi alkalmazásai nem csak a betegeknek, hanem a családjuknak, környezetüknek, valamit az egészségügyi szakszemélyzetnek is jelenthetnek többletzkockázatot.

Az Európai Unióban a Tanács 2013/59/EURATOM Irányelve "Az ionizáló sugárzás miatti sugárterhelésből származó veszélyekkel szembeni védelmet szolgáló alapvető biztonsági előírások megállapításáról" az a szabályozó, amely meghatározza a foglalkozási, orvosi és lakossági sugárterhelésnek kitett személyek egészségének az ionizáló sugárzás veszélyeivel szembeni védelmét szolgáló egységes alapvető biztonsági előírásokat. [9] Ezzel összhangban van a magyar szabályozóként a "487/2015. (XII. 30.) Korm. rendelet az ionizáló sugárzás elleni védelemről és a kapcsolódó engedélyezési, jelentési és ellenőrzési rendszerről". Ezek határozzák meg a sugárveszélyes munkahelyeken dolgozókra és a lakosságra vonatkozó dóziskorlátokat. A foglalkozási sugárterhelésre vonatkozó effektív dóziskorlát évi 20 mSv. Különleges körülmények között vagy a nemzeti jogszabályokban meghatározott bizonyos sugárzási helyzetekben azonban az illetékes hatóság egy-egy évben ennél nagyobb, de legfeljebb 50 mSv nagyságú effektív dózist is jóváhagyhat, amennyiben bármely egymást követő öt évben – azokat az éveket is ideértve, amikor a korlátot meghaladták – az éves átlagos dózis nem haladja meg a 20 mSv értéket. A lakossági sugárterhelésre vonatkozó dóziskorlát az összes jóváhagyott tevékenységből a lakosság tagjait ért éves sugárterhelések összegére érvényes, ez az effektív dóziskorlát 1 mSv/év. A korlátok nem vonatkoznak az egyén érdekében végrehajtott orvosi eljárásokból származó, vagy baleseti sugárterhelésre. [9] Jelen munka készítésekor a jogszabályi környezet átalakulóban van, azonban ennek a részletes kidolgozása jelenleg is tart, a 487/2015. kormányrendeletet az OAH rendeletei váltják fel. [10] Érdemes tisztában lennünk azzal is, hogy a dózisbecsléseket általában átlagos méretű felnőttre vonatkoztatva adják meg és a páciens méretétől és az alkalmazott képalkotó technikától függően jelentős eltéréseket mutathatnak. A 10 és 100 mSv közötti dózistartományban a sugárexpozíció okozta kockázat vita tárgyát képezi, ez az a dózistartomány, amely az orvosi képalkotás, különösen a CT szempontjából releváns. Egyetlen hasi CT vizsgálat dózisterhelése megközelítőleg 10 mSv és a több CT vizsgálaton vagy egy multifázisos CT vizsgálaton átesett betegek is ebbe a dózistartományba esnek. Jellemzően ebbe a dózistartományba esnek a kardiológiai képalkotó eljárások is. [11] A téma jelentősége miatt irodalomkutatást végeztem és egy összefoglaló közleményt írtam az orvosi sugárterhelésről, nem csak a betegek, hanem az orvosok és a szakdolgozók szemszögéből is. [12]

Képalkotó eljárások	Effektív sugárdózis (mSv)		
CT – komputertomográfia			
Orrmelléküregek	0,6		
Fej	2		
Mellkas	7		
Has és medence	10		
Multifázisos has és medence	31		
Fogászati CT	0,2		
Radiog	ráfia		
Végtagok	0,001		
Mellkas	0,1		
Ágyéki gerinc	0,7		
Has	1,2		
Fogászati röntgen	0,005		
Fogászati panoráma röntgen	0,01		
Nukleáris	medicina		
Tüdő ventilláció/perfúzió	2		
Csont scan	4,2		
Szív perfúzió (99mTc sestamibi)	12,5		
Fluoroszkópia			
Nyelésröntgen	1,5		
Koronária angiográfia	5-15		
Egyéb			
Mammográfia	0,7		
Csont denzitometria (DEXA)	0,001		

2. táblázat: Az orvosi képalkotó eljárások átlagos sugárterhelése [11]

Nem állnak rendelkezésre olyan epidemiológiai adatok a 10 mSv alatti dózisterhelésről (a radiográfiás vizsgálatok, néhány nukleáris medicina eljárás és CT vizsgálat dózistartománya) amelyek a daganatos megbetegedések megnövekedett kockázatára utalnának. Ezeknek az adatoknak a hiánya azonban nem jelenti azt, hogy a kockázat nincs jelen, pusztán az ilyen alacsony dózisterhelés megnövekedett kockázatának statisztikai kimutatására a nagy volumenű epidemiológiai vizsgálatok sem voltak képesek. [13]

A mesterséges eredetű sugárterhelés részeként az orvosi sugárterhelésen kívül az ipari tevékenységek által okozott, valamint a kutatásokból és a nukleáris fegyverkezésekből származó többlet sugárterhelést is figyelembe kell venni.

A sugárterhelés szempontjából az építőanyagoknak kettős szerepe van. Egyrészt maguk is lehetnek mesterséges sugárforrások, másrészt árnyékolóként a sugárvédelemben kiemelt szerepük van. A fa, mint építőanyag mindkét szempontból elhanyagolható, míg a tégla, beton és kő elemek viszont meghatározó szereppel bírnak. Ezek az építőanyagok sok esetben megnövelik a belőlük épült épületek belsejében mérhető dózisteljesítményt, valamint radonforrásként sem elhanyagolhatóak. Az építőanyagok természetes radioaktivitása az ²³⁸U és a ²³²Th bomlási soroktól, azok leányelemeitől, illetve a ⁴⁰K izotóptól származik. Az általuk kibocsátott sugárzás mértéke függ eredetüktől, geológiai tulajdonságaiktól, valamint a gyártási és feldolgozási technológiától is. [2]

Az uránbányászat és az ércfeldolgozás által a lakosságra nézve többletterhelést a radongáz környezetbe kerülése okoz. Ha megvizsgáljuk a teljes nukleáris üzemanyagciklus globális kibocsátását és annak környezeti hatásait, azt tapasztaljuk, hogy az ezáltal keletkezett hosszú felezési idejű radioaktív izotópok, amelyek a környezetbe kerülve könnyen terjednek, (például ³H, ¹⁴C, ⁸⁵Kr és a ¹²⁹I) globális mértékű dózis-hatást is okozhatnak. Ennek a világszintű éves effektív dózisa hozzávetőlegesen 0,02 μSv, ami gyakorlatilag elhanyagolható a természetes eredetű sugárterhelés mellett. [2]

1996-ig 520 kísérleti légköri atomrobbantást végeztek. 1963-tól azonban az atomcsendegyezmény megkötésével jelentősen csökkent a robbantások által a légkörbe kerülő izotópok mennyisége. Ezeknek a kísérleti robbantásoknak a nagyobb részét az északi félktekén hajtották végre, így az itt élők ebből a tevékenységből eredő többlet sugárterhelése hozzávetőlegesen másfélszerese a déli féltekén élőkének. Lakossági szempontból elsősorban az élelmiszereket beszennyező izotópok, valamint a talajra kiülepedett radioaktív szennyeződések hordoznak számottevő, a környezeti sugárterhelést megnövelő hányadot. A legjelentősebb sugárterhelést okozó izotópok: ¹⁴C, ¹³⁷Cs, ⁹⁵Zr, ⁹⁵Nb, ⁹⁰Sr, ¹⁰⁶Ru, ¹⁴⁴Ce, ¹³¹I, ³H. [3]

1.3. Következtetések

A fejezetből látszik, hogy akaratlanul is folyamatosan ki vagyunk téve ionizáló sugárzásnak. Habár ennek mértéke egyes orvosi alkalmazások kivételével elhanyagolható, folyamatosan figyelmet kell fordítani arra, hogy azokat a munkavállalókat, akik megnövekedett sugárterhelésnek vannak kitéve (például radiológiai asszisztensek, légiutas-kísérők) rendszeresen monitorozzák az egészségkárosodások elkerülése végett.

2. A SUGÁRZÁS EMBERI SZERVEZETRE GYAKOROLT HATÁSA

Amikor az ionizáló sugárzás áthalad egy tárgyon, elektronokat választ le az atomokról, amelyeken keresztül halad, így pozitív töltésű ionokat hagyva hátra. Az elsődleges események, ionizációk és gerjesztések eloszlása az ionizáló részecske nyomvonala mentén a sugárzás típusától függően változik. Fontos meghatározni egy adott sugárzás egységnyi pályahosszúság alatt leadott energiamennyiségét, mivel ez a jellemző meghatározza az adott sugárzás típus hatékonyságát a különböző biológiai hatások kiváltásában. [14]

A különböző típusú sugárzások energiaátadásának leírására használható összehasonlító kifejezés a lineáris energiatranszfer (LET). Az egységnyi úthosszra eső energiaveszteség (LET) dimenziója: keV/µm. Értéke minél nagyobb, annál nagyobb lesz a biológiai hatás. Alacsony LET-sugárzás a röntgen-, a gamma-, elektron- és betasugárzás. Magas LET-értékű sugárfajta az alfa-részecske, gyors neutron, proton. [15] A széles LET-tartományú sugárzások esetében (pl. neutronsugárzás) az átlagos LET érték származtatható. Ezt úgy kaphatjuk meg, hogy az egyes LET-intervallumokat a leadott energia (vagy dózis) vagy a megtett pálya hosszának megfelelően súlyozzuk. Ezek adják meg a dózis átlagát, illetve a sugárzás útjának átlagos LET értékét. Úgy tűnik, hogy a sugárzás útjának átlaga a megfelelő mennyiség a relatív biológiai hatékonyság (RBE) változásainak leírására kromoszómakárosodások esetében. [16] A 250 kVp (kilovolt csúcs) röntgensugarak nyomvonalának átlagos LET-értéke körülbelül 2 keV/µm, összehasonlításképpen a nehéz, töltött részecskék 100–2000 keV/µm vagy nagyobb átlagos LET-értékkel rendelkeznek. Fontos figyelembe venni, hogy ugyanazon és különböző típusú sugárzások jelentősen eltérhetnek a pálya egységnyi hosszán leadott energia mennyiségében, és ez egyértelműen megváltoztathatja a különböző típusú sugárzások biológiai hatékonyságát. A különböző LET értékű sugárzások ionizációs eloszlásának egyik következménye a kromoszóma-rendellenességek sejtek közötti gyakoriságbeli eloszlása. Alacsony LET-értékű vagy gyengén ionizáló sugárzás esetén az ionizáció bármely adott dózisnál véletlenszerűen oszlik el a sejtek között, különösen mivel nagyon sok nyomvonal lesz. A DNS-károsodás is véletlenszerűen oszlik el a sejtek között, és feltételezve, hogy azonos valószínűséggel bármilyen károsodás potenciálisan aberrációvá alakulhat át, ezért az aberrációk is véletlenszerűen oszlanak el a sejtek között. Kimutatták, hogy ez a helyzet röntgen- vagy y-besugárzást követően, ahol az indukált kromoszóma-rendellenességek Poisson-eloszlást mutatnak. Magas LET-érték vagy sűrűn ionizáló sugárzás esetén az ionizációs pályák nem véletlenszerűen oszlanak el a sejtek között, és az energia "diszkrétebb csomagokban" adódik át. Egyenértékű dózisok mellett a besugárzási utak száma sokkal alacsonyabb lesz, mint alacsony LET-értékű sugárzás esetén. Az eredmény - ugyanazokat a feltételezéseket téve - akárcsak az alacsony LET sugárzásnál, az, hogy az indukált aberrációk nem véletlenszerűen oszlanak meg a sejtek között. Bármilyen megfigyelt átlagos aberrációs gyakoriság mellett több olyan sejt lesz, amelyben több aberráció és nulla aberráció van, mint amennyi a Poisson-eloszlásból várható. [14]

Abban az esetben, amikor a sugárzás energiájának elnyelődése abban a molekulában történik meg, amelyikben a szerkezeti és működési elváltozások kialakulnak, akkor direkt hatásról, ellenkező esetben, amikor az energiaelnyelődés és az ezáltal kiváltott hatás más molekulában alakul ki, indirekt hatásról beszélünk. Mivel az emberi test víztartalma több, mint 60%, az ionizáló sugárzás is nagy valószínűséggel és gyakorisággal lép kölcsönhatásba a vízmolekulákkal. [17]



3. ábra: Az ionizáló sugárzás a sejt örökítőanyagát károsító direkt és indirekt hatása [18]

2.1. Sejtszintű hatások

A sugárzás tehát direkt és indirekt módon is megváltoztathatja az azt elnyelő anyag molekuláinak szerkezetét. A sejtekben két olyan célpont található, melyek a sugárzásra különösen érzékenek, és amelyek sérülése jól észlelhető biológiai következményekkel jár. Egyik a sejtmagban nyugalmi állapotban kromatin struktúrába rendeződött DNS, másik pedig a sejt membránrendszere. A DNS-ben bekövetkező változások a sejt további működésére is kihathatnak, megváltozott működésű, vagy éppen működésképtelen fehérjék, enzimek szintéziséhez vezethetnek. [17]

A biológiai hatásokról általánosságban elmondható, hogy a besugárzáshoz képest órákkal vagy akár napokkal, évekkel később manifesztálódnak. [2] Ez a biológiai hatás függ egyrészt a károsodott sejtalkotóktól, másrészt pedig a sugárzás által érintett sejtek minőségétől és állapotától is. Számos sugárhatást befolyásoló biológiai tényező létezik, például hogy gyorsan osztódó vagy nyugalmi állapotú sejtről van-e szó, a hibajavításhoz szükséges gének működése, tumor szupresszor gének működése, illetve a gyökfogó vegyületek jelenléte és mennyisége. A sugárzás okozta sejtkárosodás legsúlyosabb módja, ha a genetikai állományt kódoló molekula, a DNS sérül, legyen az magi, azaz genomiális vagy mitokondriális. Ez lehet egyláncú, kétláncú törés, vagy a bázisok károsodása. Ebben az esetben sejt további túlélése a keletkező károsodások kijavításának hatékonyságától függ. [18]



4. ábra: A kromoszómák többszintű felépítésének vázlatos rajza. A DNS hisztonfehérjék köré tekeredve képes a metafázis során tapasztalható kromoszómákká kondenzálódni [<u>14</u>]

A humán kariotípus az ember kromoszóma-szerelvénye, 23 pár különböző méretű lineáris kromoszómából áll, így minden diploid sejtben összesen 46 kromoszóma található. A humán kromoszómák általában hét csoportba osztják A-tól G-ig, valamint egy pár X és Y nemi kromoszóma. [<u>19</u>]

A DNS kettős spirál alakú molekula, melyben a két lánc egymással komplementer. Ionizáló sugárzás hatására a DNS-ben kialakulhatnak egyláncú DNS-törések, ilyenkor csak a DNS egyik lánca törik el, valamint létrejöhetnek kétláncú DNS-törések is, ebben az esetben a DNS mindkét lánca eltörik egymással szemközti pozícióban. (5. ábra) A töréseken kívül kialakulhatnak egyéb károsodások is, mint például bázis-károsodások, bázis-vesztés, a két lánc denaturációja, a DNS két lánca közötti intramolekuláris

keresztkötések, valamint DNS fehérje keresztkötések a DNS és a környező fehérjék között. A DNS károsodások kialakulása pusztán fizikai-kémiai folyamatok eredménye, ennek megfelelően a sejtek sugárérzékenysége nem játszik szerepet benne. A DNS károsodások száma egyenes arányosságot mutat a dózissal. A DNS károsodások közül legnagyobb jelentőséggel a kétláncú DNS-törések bírnak. Kialakulásuk közel specifikus az ionizáló sugárzásra. Csak nagyon kevés olyan biológiai ágens van, amely képes kétláncú DNS-törések létrehozására. Még a legismertebb és a leggyakoribb karcinogénként tekintett UV-sugárzásra sem jellemző kétláncú DNS-törések kialakítására (elsősorban timin-dimerek jönnek létre, ezek viszont nem keletkeznek ionizáló sugárzás hatásra). Néhány kemoterápiás szer, például a bleomycin képes kétláncú DNS-törések kialakítására, az ilyen szereket később ismertetem. Ennek ismerete azért fontos, mivel, ha egy sejt kétláncú DNS-töréseket vagy azok eredményeképp kialakuló elváltozásokat tartalmaz, és az egyén (akitől a sejt származik) nem esett át kemoterápiás kezelésen, akkor feltehetően a sejt (és ezáltal a személy) sugárexpozíciónak volt kitéve. Ha sugárexpozíció gyanúja merül fel, akkor a kétláncú DNS-törések következtében kialakult specifikus kromoszóma aberrációk (dicentrikus-, gyűrű alakú kromoszóma) számából biodozimetriai módszerekkel retrospektív módon (akár hónapokkal az expozíció után is) megbecsülhetjük az elnyelt dózist. A sejtek sugárérzékenységét alapvetően nem a kialakult DNS károsodások száma, hanem a kétláncú DNS-töréseket javító folyamatok eredményessége, valamint a sejtosztódás befolyásolja. Ha a sejtben egy egyláncú DNS-törés alakul ki, vagy ugyan mind a két lánc eltörik, de ezek az egyláncú törések messze vannak egymástól, akkor a sejt a másik, nem károsodott láncon meglévő genetikai információ segítségével könnyen, jobbára hiba nélkül ki tudja javítani ezeket a károsodásokat. Ha azonban egymással szemben alakul ki két törés, az eltört DNS végek könnyen elmozdulhatnak egymástól és ekkor a javítás nagyon nehézzé válhat, ami által megnő a hibás javítás, vagy a ki nem javítás esélye. [2]

A kettősszálú DNS törésének felismerésére és javítására számos, egymásal párhuzamos reakcióút is kialakult az evolúció során. A törések felismerését különböző kinázok végzik, az általuk végzett foszforilációs lépések megakadályozzák a törött végek elmozdulását, leállítják a sejtciklust, valamint a javítást végző enzimek törés helyére történő eljutását is segítik. A károsodás jellege alapvetően meghatározza, hogy apoptózis történik-e. Az eukarióta sejtekben a kettős törések javítására két alapvető mechanizmus alakult ki: a homológ rekombináció (HR) és a nem-homológ vég-a-

véghez illesztés (NHEJ: Non-homologous end joining). Ezek konzervatív javítómechanizmusok, amelyek nagy pontossággal és gyorsan javítják a kettős DNS lánctöréseket, azonban bár kis valószínűséggel, de a hiba lehetősége is adott. [2][3]

A törések következtében kialakuló DNS károsodásának többféle formája létezik. A kromoszóma típusú károsodások, mint például a dicentrikus kromoszómák és a centrikus ringek a sugárzásra jellemzőek, [14] a kromatida típusúak (triradiálisok, quadradiálisok) vegyi anyagok [20][21] és örökletes betegségek esetében fordulnak elő, [22] míg az úgynevezett minute-ek soron kívül átíródott génállomány részletekből alakulnak ki, sugárzás hatására is kialakulhatnak, azonban utalhatnak kóros állapotokra is. [23]

Azokban a sejtekben, melyek a sejtciklus nyugalmi szakaszában vannak, a DNS törés kisebb jelentőségű, mivel ebben az esetben az érintett szakasz kis valószínűséggel pótolhatatlan. Osztódó sejteknél azonban egy ki nem javított, vagy rosszul kijavított kettős lánctörés létfontosságú gének elvesztésével járhat, amely végzetes lehet. Ez az oka annak, hogy a gyorsan osztódó sejtek (például csontvelő, őssejtek) sugárérzékenyebbek, míg a kevésbé vagy egyáltalán nem osztódó sejtek (például idegsejt, izomsejtek) sugárrezisztensebbek. A később tárgyalt determinisztikus sugárhatás alapja ezeknek a DNS-károsodásoknak a következtében kialakuló sejtpusztulás, amely ha bizonyos mennyiségű sejtet érint, akkor az károsítja az adott szerv vagy szervrendszer működését. Ha a sejt túléli a sugárexpozíciót, kialakulhatnak mutációk, melyek száma az idő előrehaladtával (akár generációkon átívelve) felhalmozódhat, megnövelve ezzel a különböző daganatok kialakulásának kockázatát. Ez áll a késői sugárválaszként megjelenő sztochasztikus hatás kialakulásának hátterében. Mindezek tükrében érthető DNS károsodás esetén a sejtciklus automatikus ideiglenes leállítása, hogy a sejtnek legyen ideje ezeket a töréseket kijavítani. [18]

2.2. Sugárzás indukálta kromoszómaelváltozások

Az első publikált bizonyíték arra vonatkozóan, hogy a röntgensugarak kromoszómarendellenességeket okozhatnak, Müller Drosophilán végzett genetikai vizsgálataiból származott. [24] Ezt követően számos tanulmány készült, amely megerősítette ezt és a folyamat mögött álló mechanizmus működésére vonatkozóan állított fel hipotéziseket. [25][26][27] Sax feltételezése szerint a törés kialakulása után a különálló kromoszómák sérült régiói érintkeznek egymással, ezek a végek elmozdulnak és végül egyesülve cseréket hoznak létre. Ő írta le elsőként a dicentrikus kromoszómákat. [26] Ezt Revell úgy képzelte el, hogy a sérült pontok nem teljes értékű törések, hanem instabil helyek, amelyek kölcsönhatásba léphetnek hasonló helyekkel, és így páronkénti cserék alakulhatnak ki. [27] Egy harmadik elképzelés szerint, amelyet később Chadwick és Leenhouts publikált, ez egy lézió/nem-lézió kölcsönhatás, amikor is a Revell értelmezése szerint vett sérült hely kölcsönhatásba léphet egy sértetlen kromoszómával, és így csere alakul ki. [28]

2.2.1. Sugárzás indukálta DNS léziók

Az ionizáló sugárzásra jellemző, hogy időben és térben olyan diszkrét energiaátadási folyamatok zajlanak le, amelyek közvetlenül és közvetve károsítják a DNS-t főként a víz radiolízise során keletkező reaktív gyökök keletkezése révén. [29] Az ionizáló sugárzás számos különböző típusú károsodást képes kiváltani a DNS-ben, beleértve a báziskárosodást (BD), az egyszálú törést (SSB), az abázikus helyeket (AS), a DNS-protein keresztkötéseket (DPC) és a kettős szálú töréseket (DSB). (5. ábra)



 ábra. Ionizációs mintázat alacsony és magas LET értékű sugárzás esetén (A) és sugárzás által indukált DNS elváltozások (B). [30]

A víz radiolíziséből származó ionpár (H₂O⁺ és e⁻) kialakításához szükséges energia ~20 eV, az ionizáló sugárzás által leadott energia száz eV-ig terjedő energiatartományba tehető (átlagosan 60 eV). Mivel ez az átlagos energia körülbelül három ionpár előállításához elegendő, a keletkező gyökök egy konkrét régió közelében reagálnak el. A keletkező DNS-léziók bármilyen típusú sugárzás esetén lehetnek egyedi DNS-léziók, mint SSB-k, AS-k vagy BD-k, valamint többszörös sérülési helyek (MDS) vagy klaszteres DNS-léziók. [31] A DNS-ben keletkező MDS-léziók tartalmazhatnak egy vagy több DSB-t, több SSB-t és BD-t is. Az összetett klaszteres DNS-léziókat

nehezebb, vagy akár nem is lehet kijavítani, és így potenciálisan letális kromoszómarendellenességek kialakulásához vezethetnek. [32] A sejt komplex jelátvitellel, sejtciklus-ellenőrző ponttal és javítási útvonalakkal rendelkezik annak érdekében, hogy reagálni tudjon a DNS-károsodásokra. A BD-k, az AS-k és az SSB-k kijavítására több folyamat is létezik, mint például a bázisexcíziós repair (BER), a nukleotid-excíziós repair (NER) és az egyszál-törés javítása (SSBR). [33][34] A DPC-ket a NER és a homológ rekombinációs repair (HRR) javítja. [35] A DSB-k kritikus léziók, hibás javításuk vagy ki nem javításuk kromoszóma-rendellenességek, például a dicentrikusok vagy transzlokációk kialakulásához vezethet. [37] A HRR és a nem homológ láncvégegyesítés (NHEJ) a két fő mechanizmus, amely a DSB-k javításáért felel. [38][39] Míg az NHEJ a sejtciklus minden fázisában nagymértékben hozzájárul a DSB javításához, a HRR kisebb mértékben járul hozzá a G1-ben, és fokozatosan egyre nagyobb szerepet játszik, ahogy a sejtek a cikluson keresztül a G2-be jutnak. [40]

2.2.2. Kromoszóma aberrációk

A szám- és szerkezetbeli kromoszóma-rendellenességek csoportosítása több évtizedes hagyományokon alapul. [41][42] A perifériás limfociták alapesetben nyugvó sejtpopuláció, és a sejtciklus G0 szakaszában tartózkodik. A sugárzás által kiváltott kromoszóma-rendellenességek következésképpen kromoszóma típusúak lesznek, vagyis a sérült kromoszóma mindkét kromatidáját érintik. Az ionizáló sugárzás S-fázis független klasztogén, ellentétben az UV-sugárzással és a kémiai mutagénekkel, amelyek S-fázis függő ágensek. Ezért ionizáló sugárzás hatására G0/G1 fázisú sejtek kezelése után kromoszóma típusú aberrációk indukálódnak, míg a G2/S fázisú sejtek esetében kromatida típusú aberrációk alakulnak ki. Az UV sugárzás és a vegyi anyagok azonban a sejtciklus minden szakaszában többnyire kromatida típusú aberrációkat idéznek elő. Amennyiben ionizáló sugárzásnak kitett G0/G1 sejtekben kromatida típusú aberrációkat tapasztalunk, akkor feltételezhető, hogy ezek vagy nem sugárzás által indukáltak, vagy már áthaladtak egy második, in vitro sejtcikluson.

Éppen ezért a kromatida típusú aberrációknak kevés szerep jut a biológiai dozimetriában, mivel nem a G0 limfociták besugárzása indukálja őket. Mindazonáltal a kromoszómakárosodás általános hátterének részeként jelen vannak, és megnövekedett gyakoriságot is tapasztalhatunk, amennyiben a besugárzás gyanúja miatt vizsgált személy korábban kémiai klasztogéneknek is ki volt téve. Ezért kiemelten fontos, hogy a mikroszkópos értékelést végzők ne csak a kromoszóma-típusú aberrációkat ismerjék,

hanem kromatida típusúakat is, és az értékelés során ne keverjék össze őket. A késleltetett kromoszóma-instabilitás és a bystander jelenségek iránti növekvő figyelem ismételten ráirányítja az érdeklődést a kromatida rendellenességekre.

2.2.2.1. Instabil aberrációk

1. Dicentrikus kromoszómák

A dicentrikus kromoszómák (6. ábra) a biológiai dozimetria szempontjából a legfontosabb kromoszóma aberrációk. Ezek detektálása az a módszer, amit a biodozimetriai eljárások gold standard-jének tartanak. [43] Irodalomkutatás végeztem, hogy körbejárjam ezt a témát, itt összefoglamon röviden, hogy miért és mennyire specifikus ez a képlet az ionizáló sugárzásra.



6. ábra: 4 Gy-es röntgensugárzással besugárzott limfocita kromoszómakészlete. Saját ábra, Giemsa festés, 100x-os nagyítás

(1: dicentrikus kromoszóma, 2: acentrikus kromoszóma, 3: minute)

A dicentrikus kromoszómák megjelenése a metafázisos sejtben ionizáló sugárzás hatására utal. Ez a képlet úgy alakul ki, hogy két közeli helyen egyszerre keletkezik törés a DNS szálban. Az ionizáló sugárzás gyorsan, körülbelül egyenes vonalban halad át a szöveten, nyomvonalán rövid életű reaktív gyökök képződnek, ezek hozzák létre az egymás melletti kettősszálú DNS töréseket, a távolabbi területeket érintetlenül hagyva.

A DIC kialakulása egy kicserélődés a két törött kromoszóma centromert tartalmazó darabjai között, olyan formában, hogy a két centromert tartalmazó

kromoszómatöredékek egyesülnek a javítás során, amelyet teljes formájában egy acentrikus fragmentum kísér, ami ezeknek a kromoszómáknak az acentrikus fragmentjaiból áll. [44] Különösen nagy dózisok után kialakulhatnak multicentrikus kromoszómák is. A tricentrikusokat két fragmentum, a quadricentrikusokat három fragmentum kíséri, és így tovább.



7. ábra: Tricentrikus kromoszóma. Nagy dózisok esetén a törések nagy száma miatt kialakulhatnak multicentrikus kromoszómák. Giemsa festés, 100x-os objektív, saját felvétel.

Egyetlen nagy lineáris energiatranszferrel (LET) rendelkező részecske több kettős szálú DNS-törést (DSB) okozhat a sejtmag viszonylag kis régiójában. A kromatin kondenzációja nagy távolságban elhelyezkedő DNS-szegmenseket hozhat egymás közelébe, növelve annak valószínűségét, hogy mindkét szegmenst ugyanaz a magas LET-értékű részecske károsítja. [44] Az ionizáló sugárzás kettős lánctörést hoz létre térben és időben közel a részecske pályája mentén, miközben az áthalad a sejtmagon, és ez által maximalizálja a folyamatok kölcsönhatásának lehetőségét a DNS sérülési helyein, valamint azok hatékonyságát a dicentrikus kromoszómák (DIC) indukciójában. [45]

Egyes vegyi anyagok hatására is törhet a DNS lánc, elméletileg megtörténhet, hogy egy időben és egymás melletti szálak törnek el, lehetőséget biztosítva a felcserélődésre és a dicentrikus kromoszóma kialakulására. A valóság azonban az, hogy a kémiai anyagok hatására létrajövő törések helye és ideje véletlenszerű, csak nagyon nagy, többnyire már letális dózisban nő meg a valószínűsége annak, hogy a törések egymás szomszédságában alakuljanak ki. Ilyen nagy dózisban a sejt többi része is károsodik, már nem tud létrejönni felismerhető DIC formátum, de valószínűleg már a metafázis sem. [45]

Kivételt jelent a radiomimetikumokhoz tartozó bleomycin, ami koncentráltan sok törést és ezáltal DIC-et tud létrehozni, mivel a reakcióban kémiailag nem változik, csak katalizátorként vesz részt. Más vegyi anyagok hatására jellemzően kromatida aberrációk, triradiális, vagy quadradiális kromoszómák alakulnak ki. [<u>46</u>]

A DIC-ek mellett az első osztódás során szükségszerűen acentrikus kromoszómák jelennek meg, ezek azonban a következő osztódás során elveszhetnek. Nagyon jellegzetes a minute-ek megjelenése, ezek nem csak sugárzásra, hanem kémiai anyagokra is utalhatnak, valamint tumoros kórképek gyakori kísérői. [47]

Ahogy azt fentebb láttuk, a dicentrikus kromoszómák kialakulásához DNS-károsodás kell, hogy történjen a két érintett, nem replikálódott kromoszómában, úgy, hogy a sérült kromoszómák egyes darabjai egymás között kicserélődhessenek. Ez a kicserélődés történhet a közvetlenül a sugárzás által kiváltott DNS-száltörések hibás kijavításaként, vagy a bázissérülések kivágása során bekövetkező hibás javítás eredményeként. A két kromoszómában lévő lézióknak közel kell lenniük egymáshoz, úgynevezett "kapcsolódási távolságon" belül, hogy a hibás javítás megtörténhessen. Ez a meghatározott méretű régió tekinthető célpontnak. Ezen a célponton belül két lézió kialakulására van szükség, egy-egy mindkét nem replikálódott kromoszóma DNS kettős hélixében. Ez a célpont vagy kölcsönhatási zóna kicsi, általában 1,0 µm-nél kisebb átmérőjűnek tekinthető. Az alacsony LET értékkel rendelkező sugárzások alacsony ionizációs frekvenciával rendelkeznek az egységnyi út során. Így kicsi a valószínűsége annak, hogy egyetlen részecske pályája során két ionizáció következzen be egymáshoz nagyon közel. Legalább két ionizációra van szükség ahhoz, hogy a kromoszómák olyan módon károsodjanak, hogy dicentrikus kromoszóma alakulhasson ki. Sokkal nagyobb a valószínűsége annak, hogy a két léziót két független pálya ionizációja hozza létre. Az egy pályán kialakult dicentrikus kromoszómák száma lineárisan arányos a dózissal, míg a két részecskepálya által kiváltott dicentrikus kromoszómák száma a dózis négyzetével arányos. 0,5 Gy alatti dózisoknál annak a valószínűsége, hogy két pálya áthalad egy célponton, elég kicsi ahhoz, hogy szinte kizárólag egy pályán és alacsony gyakorisággal keletkezzenek dicentrikusok.

A dózis növekedésével a két pálya által kiváltott dicentrikus száma is növekszik. Így az alacsony LET értékű sugárzás által kiváltott dicentrikusok dózis-hatás görbéje egy- és kétsávos események kombinációja lesz, ahol az előbbi gyakrabban fordul elő alacsony, az utóbbi pedig sokkal gyakoribb magas dózisok esetén. [48]

2. Centrikus gyűrűk

A gyűrűs kromoszóma (centrikus ring) ugyanazon kromoszóma különböző karjain lévő két törés összekapcsolódása révén jön létre, amit egy acentrikus fragmentum is kísér. (8. ábra) A humán limfocitákban ezek a centrikus gyűrűk sokkal ritkábban fordulnak elő, mint a dicentrikus kromoszómák. Eltérő vélemények vannak arról, hogy a dózisbecslés során a dicentrikusokkal együtt számolni kell-e, vagy figyelmen kívül kell-e hagyni őket.



8. ábra: A centromert tartalmazó gyűrűkromoszómák hasonlóképpen alakulnak ki, mint a dicentrikus kromoszómák, de itt a két kettősszáltörés ugyanazon kromoszóma ellentétes karjain jön létre. Az első osztódásnál még fellelhető a folyamat során keletkező acentrikus fragment is. Giemsa festés, 4Gy-el besugárzott minta, 100x-os objektív, saját felvétel.

3. Acentrikus fragmentek

Acentrikus kromoszóma fragmentek a fent leírt aberrációktól függetlenül is kialakulhatnak. Különböző méretű terminális vagy intersticiális deléciók eredményei lehetnek, de az eredetüket nem minden esetben lehet meghatározni. Az acentrikus gyűrűket, ahol a kromoszóma fragmenteken belül tiszta terek láthatók, általában intersticiális deléciónak tekintik, míg a kettős pontként megjelenő minute-ok többnyire terminális deléciók vagy korábbi, kóros génamplifikáció eredményei. [23][49][50]

2.2.2.2. Stabil aberrációk

1. Reciprok transzlokációk

A reciprok transzlokáció két különálló kromoszóma terminális részeineknek kicserélődése. A transzlokációk különböző típusait eredetileg G-sávozási technika és kariotipizálás segítségével írták le, azonban ezek az eljárások túlságosan munkaigényesek a rutin biológiai dozimetriához, valamint a kromoszómaszárak azonosítása is kevésbé megbízható Giemsa festéssel. Giemsa festéssel pedig a transzlokációk nem figyelhetők meg megbízható módon. A FISH módszerrel detektált reciprok transzlokációk azonban már alkalmasak biodozimetriára is, ez később ismertetésre kerül. A FISH módszerrel ezek kétszínű monocentrikus kromoszómákként jelennek meg.



9. ábra: Reciprok transzlokáció. A DNS károsodás következtében kialakuló receiprok transzlokációk ugyancsak sugárterhelésre utalhatnak. FISH módzserrel mutatható ki. Saját ábra

2. Robertson-transzlokáció

A Robertson-transzlokáció úgy keletkezik, hogy az egyik kromoszóma hozzákapcsolódik a másikhoz. Amikor FISH módszerrel csak egy darab kétszínű kromoszóma látható, ezt gyakran terminális, hiányos vagy egyirányú transzlokációnak nevezik. A teljes kromoszóma, centromer és telomer fluoreszcens próbák kombinációját használva azonban számos terminálisnak vagy hiányosnak vélt transzlokációról kiderül, hogy valójában reciprok transzlokációk. A jelenlegi nézet szerint valódi terminális transzlokációk az összes transzlokáció kis százalékát teszik ki, például 4 Gy besugárzás esetén körülbelül 5%. [51]

3. Intersticiális transzlokációk (inzerciók)

Ebben az esetben az egyik kromoszóma acentrikus darabja egy másik kromoszóma karjába épül be.

4. Stabil és nem stabil sejtek

A retrospektív, FISH alapú biológiai dozimetria azért lehetséges, mert a stabil aberrációk, mint például a reciprok transzlokációk sikeresen átjutnak a mitózison és átkerülnek a leánysejtekbe. Ahhoz azonban, hogy ez sikerüljön, a teljes genomnak stabilnak kell lennie. A transzlokáció nem feltétlenül tud átjutni a sejtosztódáson, ha ugyanabban a sejtben van egy független és instabil struktúra, például egy dicentrikus kromoszóma vagy acentrikus fragment. Ennek köszönhetően, nem csak az aberrációk egyes típusait, hanem a sejt egészének stabilitását is figyelembe kell venni. Ezt a koncepciót Buckton és munkatársai ismerték fel 1967-ben, akik bevezették a Cs és Cu jelölést a stabil és instabil sejtekre. [52] Ez a koncepció ismét előtérbe került a FISH által végzett retrospektív biológiai dozimetria elterjedésével, melynek során bebizonyosodott, hogy a reciprok transzlokációk stabilabbnak tűnnek, mint a Robertson-transzlokációk. [53][54]

2.2.3. Kromatida típusú aberrációk

A kromatida típusú aberrációkban a legtöbb esetben egyetlen kromatida érintett és nem a teljes kromoszóma, mint a kromoszóma-típusú aberrációk esetében. Kialakulásuk főleg vegyi anyagok hatására fordul elő, sugárexpozíció esetén nem jellemző. [14] A kromatida típusú aberrációkat általában ugyanúgy osztályozzák, mint a kromoszóma típusúakat.

2.2.3.1. Terminális és intersticiális deléciók

A terminális deléció a kromatida fragment eltávolodása a léziótól. (10. ábra)

Ha nincs elmozdulás, akkor a centrikus és acentrikus régiók közötti nem festődő régió szélességének nagyobbnak kell lennie, mint egy kromatida szélessége ahhoz, hogy az aberrációt terminális deléciónak tekintsük. Ez utóbbi meghatározás a terminális deléciók (kromatida törések) és az akromatikus léziók (gap-ek) megkülönböztetésére szolgál. A kromatida típusú intersticiális deléciók sokkal nehezebben megfigyelhetők, mint kromoszóma típusú megfelelőik, részben annak köszönhetően, hogy a deletált fragmentum gyakran elválik a kromoszómától, és nem marad észrevehető. [14]


 10. ábra: Kromoszomális deléciók. A törések hatására egyes szakaszok eltűnnek a kromoszómából. Saját ábra

2.2.3.2. Akromatikus léziók

Az akromatikus léziók (vagy gap-ek), a kromoszómák nem vagy nagyon enyhén festődő régiói, amelyek az egyik kromatidában, vagy mindkét testvérkromatidában, látszólag azonos lókuszokon jelen vannak. Ha a nem festődő régió szélessége kisebb, mint egy kromatidáé, akkor a jelenséget akromatikus léziónak nevezzük. Vizsgálat során általában javasolt az akromatikus léziók rögzítése, de mindig a kromatida delécióktól elkülönítve. Gyakoriságukat nem szabad beleszámítani a sejtenkénti aberrációk összegébe, mivel jelentőségük és kapcsolatuk más aberráció típusokkal jelenleg nem világos. [14]

2.2.3.3. Izokromatida deléciók

Az izokromatida deléciók kivételt képeznek a kromatida típusú aberrációk csoportján belül, mivel mindkét kromatidát érintik ugyanazon a helyen. Kimutatható, hogy a

sejtciklus S- és G2-fázisában a sugárzás indukálja őket, ahogy más kromatida típusú aberrációkat is.

A letört végek gyakran egyetlen fragmentummá forrnak össze, sok esetben a törés nyomán a kromatidák centrális része is összeforr, centrikus kromatidagyűrűt képezve. Az előforduló testvérkromatida egyesülések jellegétől függően több típus is lehetséges. Ha testvérkromatida egyesülés lép fel, az izokromatida aberrációkat meg lehet különböztetni a kromoszómatípus terminális delécióitól. Humán sejtekben a testvérkromatida egyesülés ritka esemény, az izokromatida deléciók többsége pedig nem egyesülő proximális és disztális típusú. Az acentrikus fragmentum legtöbbször nem kapcsolódik a kromoszóma deletált centrikus részéhez. [14]

2.2.3.4. Aszimmetrikus cserék

Az aszimmetrikus cserék (karok közötti cserék és aszimmetrikus kromatidacserék) a kromoszóma típusú dicentrikus kromoszómák kromatida típusú megfelelői. [14]

2.2.3.5. Szimmetrikus cserék

A szimmetrikus cserék (szimmetrikus kromatidacserék), a kromoszóma-típusú reciprok transzlokációk kromatida típusú megfelelői.

A kromatida típusú szimmetrikus cserék esetében a szomatikus párosítás fenntartja az kapcsolatot a cserében részt vevő kromoszómák között, így ezek kromoszóma-sávozási eljárások hiányában is könnyen megfigyelhetők. [14]

2.2.3.6. Triradiálisok

A triradiális (háromkarú képlet) úgy írható le, mint egy izokromatida deléciót tartalmazó kromoszóma és egy kromatida deléciót tartalmazó második kromoszóma közötti kapcsolat. [41]

2.2.4. Mikronukleusz

A mikronukleuszok (MN) az anafázisban letört és visszamaradt kromoszómafragmensekből vagy teljes kromoszómákból jönnek létre, amelyek nem kerülnek bele a leánysejtek magjába. (11. ábra) Ezek különálló, gömb alakú objektumokként jelennek meg a leánysejtek citoplazmájában, amelyek morfológiája és festődési tulajdonságai azonosak a sejtmagokéval. [55] A dicentrikus kromoszómák

mellett a mikronukleuszok számának vizsgálata az egyik legmeghatározóbb biodozimetriai eljárás.



11. ábra: Röntgensugárzás hatásáta kialakult mikronukleusz. Ha a sérült kromoszómák, fragmentek a sejtosztódás során nem tudnak a pólusokra vándorolni, külön maghártya képződik körülöttük a telofázisban és mikronukleuszként maradnak fent. 100-szoros objektív Giemsa festés, saját felvétel

2.3. Sztochasztikus hatások

Látható, hogy az ionizáló sugárzás következtében kialakulhat akut szövetkárosodás is, amely súlyos esetben halált is okozhat. Ezek mellett az akut következmények mellett olyan hosszú távú hatásokkal is számolni kell, mint a különböző távon daganatok kialakulása. Ezek alapján az ionizáló sugárzásnak két alapvető biológiai, egészségügyi hatását tudjuk elkülöníteni. Az egyik csoport az eleve elrendelt, determinisztikus, a másik pedig a véletlenszerű, sztochasztikus hatások. A konkrét egészségügyi hatások a szervezet sugárexpozíciójának körülményeitől függenek. Egy baleseti, munkahelyi sugárexpozíció, de akár egy sugárterápiás beavatkozás, vagy egy radiológiai diagnosztikai vizsgálat is eredményezheti ugyanazt a szervezeti szintű sugárhatást. [2] A sztochasztikus, véletlenszerű hatások közé soroljuk a daganatok keletkezését, valamint a különböző öröklődő megbetegedések kialakulását. Ezeket a hatásokat az expozíciót túlélő sejtekben kialakuló mutációk okozzák, ha a testi sejtekben alakul ki a mutáció, akkor az daganatos megbetegedésekhez vezethet, ha pedig az ivarsejtekben, akkor öröklődő megbetegedések alakulhatnak ki, akár generációkkal később. A jelenleg elfogadott sugárhatás modell alapján a sztochasztikus hatásoknak nincs küszöbdózisuk, tehát a lehető legkisebb sugárdózis is kiválthatja őket. A sztochasztikus hatásokra jellemző, hogy magának a hatásnak (például a kialakult daganatos megbetegedés) a súlyossága nincs összefüggésben az azt kiváltó dózissal, akár egészen kis dózisok hatására is kialakulhatnak nagyon súlyos megbetegedések is. Ezek alapján elmondható tehát, hogy a sztochasztikus hatások súlyossága nem, viszont a gyakorisága függ a dózistól. Ennek megfelelően az elnyelt dózis növekedésével a sztochasztikus hatások kialakulásának valószínűsége is növekszik. Mivel valószínűségi hatásokról beszélünk, a nagyobb dózis csak nagyobb kialakulási valószínűséggel jár, de nem predesztinálja a hatás kialakulását, így akár olyan eset is előfordulhat, ahol a nagy dózis következtében nem alakul ki megbetegedés, azonban egy kisebb dózis kiváltja azt. Mint azt fentebb is említettem, a sztochasztikus hatások akár az expozíció után generációkkal később is képesek kialakulni, így látenciaidejük adott esetben rendkívül hosszú is lehet. [2][3]

2.4. Determinisztikus hatások

A determinisztikus hatások, a sztochasztikus hatásokkal ellentétben olyan hatások, amelyeknek van egy küszöbdózisa, amely felett a hatás biztosan be fog következni. Ez alatt a küszöbdózis alatt a szervezeti szintű hatás nem alakul ki, azonban a küszöbdózis felett a hatás minden esetben kialakul, a hatás súlyossága pedig függ a dózistól, valamint az érintett szerv sugárérzékenységétől. [3] Ennek megfelelően a nagyobb dózisnak történő expozíció – habár egyénenként eltérhet – súlyosabb tüneteket fog eredményezni. Amennyiben a küszöbdózis alatti besugárzás ér valakit, az nem jelenti azt, hogy semmilyen hatás nem alakul ki. A determinisztikus hatások az ionizáló sugárzás sejtpusztító hatása miatt alakulnak ki, ami viszont arányos a dózissal. Ennek megfelelően alacsony dózisoknál is tapasztalható sejtpusztulás, a szervezeti szintű tünetek kialakulásához viszont a sejtpusztulás mértékének el kell érnie egy olyan mértéket, ahol az adott szerv működése már jelenetősen károsodik. [2]

A determinisztikus hatások közé tartozik a klasszikus sugárbetegség, valamint annak egyes tünetcsoportjai: a csontvelői (hemopoetikus) szindróma, a gyomor-bélrendszeri (gasztrointesztinális) szindróma, és az agyi-érrendszeri (celebrovaszkuláris) szindróma. A klasszikus sugárbetegség fent említett szindrómái, az elszenvedett dózis függvényében, egy bizonyos küszöbdózis felett alakulnak ki. Általában már 1,5 Gy egésztest dózis felett jelentkezhetnek a csontvelői szindróma tünetei, amelyek

súlyossága arányos az elnyelt dózissal. Az LD₅₀ dózis emberben (a kezelés nélkül a besugárzott személyek fele meghal) 3,5-4 Gy; a gyomor-bélrendszeri tünetcsoport tüneteinek kialakulása 10 Gy felett történik meg, és 15-20 Gy fölött jelentkezhetnek az agyi-érrendszeri szindróma tünetei. Az alábbi összefoglaló táblázat megmutatja az egyes dózisok által kiváltott biológiai hatásokat:

Tünetek	1-2 Gy	2-6 Gy	6-10 Gy	10-15 Gy	50- Gy
Hányinger, Hányás	3 óra	2 óra	1 óra	30 perc	<30 perc
Hányás valószínűsége	1 Gy: ~5% 2 Gy: ~ 50%	3 Gy: 100%	100%	100%	100%
Vezető tüneteket okozó szervek	Vérképző rendszer	Vérképző rendszer	gyomor- bélrendszer	gyomor- bélrendszer	központi idegrendszer
Főbb tünetek	mérsékelt fehérvérsejt szám csökkenés	súlyos feh. vérsejt szám csökkenés, bevérzések, fertőzések	hasmenés, láz, elekrolit egyensúly zavar	hasmenés, láz, elekrolit egyensúly zavar	görcsök, remegés, elesettség
Sugárbetegség súlyossága	könnyű	közepes (2-4 Gy) súlyos (4-6 Gy)	rendkívül súlyos, halálos	rendkívül súlyos, halálos	rendkívül súlyos, halálos

3. táblázat: Az akut sugárbetegségek során jelentkező tünetek idő- és dózisfüggése [56]

Az akut sugárbetegség szindrómáin kívül ide sorolhatók még az időben jobban elhúzódó, bőrben kialakuló elváltozások (például bőrpír, égési sérülés, teleangiektázia). [2]

A determinisztikus hatásnak tekinthető a sugárterápia során a daganatos sejtek és a környező normálszövetek károsítása, elpusztítása is. Ezek mellett a sugárterápia következtében természetszerűen a fentebb említett sztochasztikus hatások is kialakulhatnak. [2] A sugárterápia célja a daganatos sejtek elpusztítása, azonban minden esetben egészséges sejtek és szövetek is óhatatlanul belekerülnek a sugártmezőbe, éppen ezért a terápiát úgy kell elvégezni, hogy az egészséges szövetekben csak elfogadható szintű károsodás alakuljon ki. Az egészséges szövetekben kétfajta sugárkárosodás alakulhat ki: a korai- és a késői normálszöveti károsodások. A korai károsodások általában a frakcionált sugárterápia ideje alatt, a terápia megkezdésétől számított 90 napon belül alakulnak ki. Ilyen korai károsodások például a gyulladásos folyamatok, fekélyek, vagy súlyosabb esetben nekrózis kialakulása a normálszöveti területeken. A késői hatások a sugárterápia megkezdése után 90 napnál később alakulnak ki, akár évek

múlva is megjelenhetnek. A normálszöveti károsodások (legyenek azok korai-, vagy késői kárososdások) kialakulásának az esélyét jelentősen befolyásolják a sugárterápia alapvető paraméterei, mint az alkalmazott összdózis, frakciódózis és a kezelési idő. A két csoport közül a késői mellékhatások okoznak nagyobb problémát, mivel ezek már a terápia befejezése után alakulnak ki, így lefolyásukat már nem lehet befolyásolni a terápia módosításával. Ezekre a kései hatásokra - a korai hatásokkal ellentétben - az is jellemző, hogy nem gyógyíthatók és a kialakulásuk után folyamatosan súlyosbodnak. Ennek megfelelően az alkalmazott sugárterápiás protokollok kialakításánál alapvető szempont az, hogy a késői károsodások gyakoriságát elfogadható szinten tartsák, azt pedig, hogy mi tekinthető elfogadható gyakoriságú károsodásnak, azt minden esetben a célszövet határozza meg. [2]

Egy jellemzően gyakori késői mellékhatás például a fibrózis, mely számos szövetet érinthet (bőr, izom, gasztrointesztinális traktus) és évekkel a sugárterápia után is kialakulhat. Az ionizáló sugárzás következtében kialakuló fibrózis egyes gyulladásos citokinek megváltozott működésével hozható kapcsolatba. [57]

2.5. Egyéni sugárérzékenység

Az egyéni sugárérzékenység alatt az élőlényeknek azt a tulajdonságát értjük, hogy a sugárzás kémiai és fizikai hatásaival szemben eltérő a fogékonyságuk, azokra más minőségben reagálnak. Ez megnyilvánulhat az egyes sejtek, szövetek és szervek, így végső soron az egész szervezet szintjén is. A genetikai anyag bizonyos változásai az egyén sugárzásérzékenységének drámai változásához vezethetnek. Már a sugárterápia történetének korai szakaszában nyilvánvalóvá vált, hogy az egyének eltérően reagálnak a sugárzásra. Ez többek között az akut mellékhatások és/vagy késői hatások, például másodlagos rosszindulatú betegségek fokozott előfordulásában is megmutatkozott.

A sejtek, így a szövetek sugárérzékenységét számos tényező befolyásolja, ilyenek a sejtbiológiai folyamatok szabályzó mechanizmusai, a sejt regenerációs kapacitása, antioxidáns kapacitása, valamint az alapvető genetikai tulajdonságok. A szövetek sugárérzékenységét az őket felépítő sejtek sugárérzékenysége, illetve a különböző sugárérzékenységű sejtek aránya határozza meg. A sugárérzékenységet nagymértékben befolyásolja maga a sejtciklus is, mivel a sejtosztódás során a nyugalmi állapotban lévő sejtek sugárrezisztensebbek, míg az osztódó sejtek sugárérzékenyebbek. [56]

A kutatások arra engednek következtetni, hogy a sugárérzékeny személyek DNS hibajavító képességei gyengébbek, vagy erősebben reagálnak a sugárzás okozta

károsodásokra, így az ő esetükben a DNS vizsgálatakor több sugársérülésre utaló károsodás mutatható ki. [3][58][59][60] A sugárérzékenységet számos egyéb külső és belső tényező is befolyásolja, például az antioxidánsokkal való megfelelő ellátottság javíthatja, míg a dohányzás, vagy egyes hormonok vérbeli koncentrációja ronthatja (ilyen például az ösztrogénszint megemelkedése a terhesség során). [60][61] Számos olyan eset ismert, amikor egyes gének mutációja a DNS javítás hibáit okozza. Az ennek következtében kialakuló örökletes betegségek egyik jellemző tünete a fokozottabb sugárérzékenység. Ilyen betegségek például az ataxia teleangiektázia (ATM gén mutációja), retinoblasztóma (RB1), Fanconi-anémia (FANC-gének) és a Downszindróma is. [60][61][62] Az irodalmi adatok alapján a cukorbetegek (diabetes mellitus) fokozottabb sugárérzékenységet mutatnak az átlagpopulációhoz képest. [62][63][64]

Számos biológiai végpont létezik, melyek biomarkerként alkalmazhatóak a sugárérzékenység kimutatására és meghatározására. Ilyenen például a mikronukleuszok kialakulása, a kromoszóma aberrációk frekvenciájának növekedése, a DNS repair hatékonysága, a sejtosztódás minősége, valamint egyes genetikai, epigenetikai markerek. [14][58][62][65][66] Az ilyen célra alkalmazható módszerek közül néhányat biodozimetriai célokra is alkalmaznak. Az egyéni sugárérzékenység indikátora lehet a különböző antioxidánsok koncentrációja, ezek ugysanis szükségesek a sugárzás okozta szabadgyökök ártalmatlanításához. [3][67]

Az egyéni sugárérzékenység vizsgálata hasznos részét képezheti a sugárveszélyes munkakörben dolgozók alkalmassági vizsgálatának, de akár a különböző sugárterápiák során is fontos információt nyújthat.

2.6. Radiomimetikumok

Az ionizáló sugárzás emberi egészségre gyakorolt hatása a múlt század óta jól ismert. Bizonyos vegyszerek hasonló tüneteket okoznak az élő szervezetekben, mint az ionizáló sugárzás, ezért Dustin 1947-ben radiomimetikumoknak nevezte el ezeket a vegyi anyagokat. [68] Azóta eltelt több mint 70 év, és ezt a kifejezést manapság már számos olyan vegyületekre is használjuk, amelyek a múlt század közepén még nem voltak ismertek. Fontosnak tarom a radiomimetikus vegyületek és a sugárzás hatásának összehasonlítását, mivel így részletesebb képet kaphatunk a hatásmechanizmusokról. Ennek kapcsán átfogó irodalomkutatást végeztem a témában, melynek egy kétrészes review formájában történő publikálása jelenleg folyamatban van. [69] A sugárzás hatásának számos különböző célpontja, módja és szintje van. A radiomimetikus vegyületek ezeknek a hatásoknak csak bizonyos szegmenseit képesek utánozni, nem mindegyiket, így a radiomimetikus kifejezés használata nem mindig egyértelmű, ennek megfelelően ez a kifejezés nem elterjedt. Idővel azonban egyre több vegyületet fedeztek fel, így a fogalom folyamatosan bővült. Ha összehasonlítjuk azokat a vegyületeket, amelyekre a fogalom eredetileg kiterjedt, illetve amelyeket később fedeztek fel, vagy írtak le, akkor azt látjuk, hogy az utóbbiak teljesen más mechanizmus szerint működnek. A sugárzás molekuláris biológiai hatásaival kapcsolatos ismereteink gyarapodnak, ezért időszerűnek tűnik a radiomimetikus kifejezés további finomítása, akár szűkítése, újraértelmezése is.

1952-ben Boyland listát készített azokról a biológiai hatásokról, amelyeket mind ionizáló sugárzások, mind radiomimetikus vegyszerek okozhatnak. [70] A következő néhány évtizedben számos hasonló hatású vegyületet írtak le, vagy fedeztek fel. 1963ban Elson publikálta az első átfogó áttekintést a radiomimetikumokról Boyland munkáját véve alapul, amelyet kibővített. [71]

Csak néhány radiomimetikum, például streptonigrin, bleomycin, m-AMSA képes DSB-t indukálni. [72][73][74] Ezt azonban sokkal véletlenszerűbb módon teszik térben és időben, ezáltal korlátozódik a létrejövő DSB-k közötti interakció valószínűsége. Ezért a kémiailag indukált DSB-k nagyobb valószínűséggel acentrikus fragmenteket hoznak létre, mintsem DIC képződését indukálnák. [45] Annak ellenére, hogy a DIC kialakulását széles körben ionizáló sugárzásra specifikus markernek tartják, a bleomycin képes kiváltani ezt az aberrációt. [48] 1963-ban Elson nem tudta megemlíteni a DIC képződését az összefoglalójában, mint radiomimetikus hatást (csak a kromoszómakárosodást említette), mert bár a bleomycint - amely az ionizáló sugárzásnak ezt a specifikus hatását is képes kiváltani - izolálták, az ezt leíró tanulmány erre a hatásra nem terjed ki. [75]

Jelenlegi molekuláris biológiai ismereteink alapján a radiomimetikumok nemcsak kémiai szerkezetük vagy eredetük, hanem hatásmechanizmusuk alapján is csoportosíthatók.

A klinikai értelemben vett radiomimetikus hatások eredete molekuláris szinten, elsősorban DNS-károsodásokban és azok nem megfelelő helyreállítási folyamatában (kromoszómatörés, kromoszómán belüli és kromoszómák közötti transzlokációk), [48], valamint sejtszintű változásokban (fehérvérsejtszám, sejthalál) kereshető. [71] A szervezet szintjén ezek olyan tünetekhez vezethetnek, mint sugárterhelés esetén, mint

például láz, égéses sérülések, hólyagok, fogyás, csontvelő-hiperplázia, gyakran leukocitopéniával és immunszuppresszióval párosulva.

A radioaktív izotópok ionizáló sugárzással sugározzák be a tumorsejteket, és ezáltal diagnosztikai képalkotásra használhatók. A radiomimetikus vegyületek nem bocsátanak ki sugárzást; így a fizikai doziméter nem képes kimutatni a belőlük származó expozíciót, ellentétben az izotópokkal vagy izotóppal jelölt diagnosztikai és terápiás vegyületekkel. Míg a sugárterápiában a radioaktívan jelölt ágenseket adott esetben radiomimetikus vegyületekkel helyettesíthetik [76], ez a diagnosztikai eljárások esetében nem így van.

Sok radiomimetikus vegyületet izoláltak és szintetizáltak a rákterápia fejlesztésére és annak során az elmúlt fél évszázadban. A molekuláris biológia rohamos fejlődése adta a hátteret ezen vegyületek hatásmechanizmusának jobb megértéséhez.

Az alkiláló szerek elektrofil vegyületek, melyek képesek kovalensen kapcsolódni különböző molekulák elektronban gazdag funkciós csoportjaihoz. Ha ezek a nukleofil célcsoportok könnyen hozzáférhetők, az újonnan kötődő és a leváló funkciós csoport átmenetileg egyidejűleg is kötődhet a célmolekulához.

Az elektronban gazdag molekulák vagy ionok (például OH-, H₂O, halogenidek, alkoholok, tiolok és aminok) és az ezeket tartalmazó fehérjék és nukleinsavak ideális célpontjai a nukleofil szubsztitúciónak.

Alkiláló szerek							
Nitrogén mustárok	Nitrózeureák	Alkil szulfonátok	Platina alapú szerek	Etilénamin és metilénamin származékok	Triazének		
ciklofoszfamid	karmusztin	buszulfán	ciszplatin	altretamin	dacarbazin		
klórmethin	lomusztin		karboplatin	tiotepa	procarbazin		
uramusztin	sztreptozocin		nedaplatin		temozolomid		
melfalán			oxaliplatin				
klorambucil			szatraplatin				
meklóretamin							
ifoszfamid							

4. táblázat: Alkiláló szerek csoportosítása [69]

A nitrogénmustár radioimimetikus hatásának felfedezését az a felfedezés követte, hogy a nitrogén- és kénmustárok mutációkat okoznak a Drosophilában, [77] és a sugárzáshoz hasonlóan kromoszómakárosodást okoznak. [78] Orvosi felhasználásuk ezen a hatásukon alapul, 1942-ben előbb állatkísérletekkel, majd klinikai kísérletekkel elkezdődött a limfóma gyógyítása. [79]

Mivel a sugárzás által kiváltott citológiai károsodás szorosan összefügg a sejtmagot érő hatásokkal (ez jól látható a kromoszómák morfológiai változásain), a sugárzás bizonyos citológiai hatásait olyan vegyületek is kiválthatják, amelyek megzavarják a nukleinsavak, különösen a DNS normál metabolizmusát. Számos antimetabolikus vegyületet tesztelnek lehetséges kemoterápiás szerként, különösen leukémia elleni szerként. Ezekről a vegyületekről a 5. táblázatban nyújtok rövid áttekintést. [71]

Antimetabolitok					
Purin analógok	Pirimidin analógok	Folsav antagonisták (Antifolátok)			
6-merkaptopurin	5-fluorouracil (5-FU)	metotrexát			
azatioprin	floxuridin	pemetrexed			
merkaptopurin	citozine-arabinozid	pralatrexát			
fludarabin	6-azauracil	trimetrexát			
tioguanin	gemcitabin	edatrexát			
cladribin	azacitidin	raltitrexed			
	capecitabin				
	citarabin				
	decitabin				
	trifluridin/tipracil				

5. táblázat: Antimetabolitok csoportosítása [69]

Számos mikroorganizmus termel antibiotikumot (például penicillin, sztreptomicin), hogy gátolja más fajok növekedését/szaporodását, de a bleomycinről szóló 1966-os első tanulmányt követően azt találták, hogy egyes baktériumok radiomimetikus aktivitással rendelkező vegyületeket termelnek. [75] Azóta sok ilyen vegyületet izoláltak. A termelő baktériumok mind az Actinobacteria (sugárgombák) törzsbe tartoznak. Gram-pozitív, aerob organizmusok, a telepeken gyakran nőnek a gombákéhoz hasonló, kiterjedt micéliumok. Csak két olyan enediyn vegyületet ismerünk, a shishijimycint és a namenamycint, amelyeket nem baktériumok, hanem zsákállatok termelnek.

A bakteriális eredetű radiomimetikus vegyületek három fő csoportra oszthatók. Az első a radiomimetikus glikopeptidek (mint például a tallysomycin és a bleomycin), a második csoport az enedinek (például neocarzinostatin és C-1027), a harmadik pedig a kinon antibiotikumok, a mitomicinek.

Természetes formájukban ezek a molekulák gyakran fehérjébe ágyazódnak; a termelő mikroorganizmusok így védekeznek a szekretált vegyület citotoxikus hatása ellen. [80]

Termelő organizmus	Antibiotikum	
Streptomyces verticillus	bleomycin	
Streptoalloteichus hindustanus	tallysomycin	
Streptomyces verticillus	phleomycins (zeocin)	
Streptomyces flavoviridis	zorbamycin	

 táblázat: Radiomimetikus hatású glikopeptid antibiotikumokat termelő mikroorganizmusok. [<u>81</u>]

A bleomycin és más természetes glikopeptid antibiotikumok nem riboszómális hibrid peptid-poliketid termékek. Az aglikon peptid/poliketid/peptid láncát a bleomycin megaszintáz állítja elő, amely egy nem riboszómális peptid szintázt (NRPS) és egy poliketid szintáz (PKS) alegységet is tartalmaz. Ezeket a nem riboszómális peptideket és poliketideket aminosavakból és rövid karbonsavakból építik fel a fent említett bakteriális enzimek. [81]

A bleomycin citogenetikai hatása az 1970-es évek óta ismert. A bleomycin nagyméretű hidrofil molekula, amely többnyire nem képes a biológiai membránokon átdiffundálni. [82]

A bakteriális eredetű radiomimetikus glikopeptidek működésükhöz fémionra (például vas, rézion) és molekuláris oxigénre is szükségük van. Megjegyzendő, hogy a Fe²⁺ionok maguk is DNS-károsító hatással bírnak. [83][84] A glikopeptid molekula fémionokkal komplexet képez, amely ezt követően megköti az oxigént, mivel ez a kapcsolat nem stabil, szabad gyökök és oxidált ionok képződéséhez vezet. [85] Ezek a reaktív gyökök egyszálú töréseket okozhatnak a DNS-ben. Körülbelül minden 10. egyszálú törésre jut egy második törés is a szomszédos DNS-láncon, ami DSB-t eredményez. [73]

Több vizsgálat eredménye alapján a bleomycin citogenetikai hatása leginkább a magas LET sugárzáséhoz hasonlítható, mivel magas LET sugárzás esetén a DIC-et tartalmazó sejtek eloszlása hasonló és a dózis-hatás összefüggés is lineáris. Feltételezhető, hogy a bleomycin kezelés után megfigyelt nagy statisztikai variancia az eltérő limfocita-szubpopulációknak és azok eltérő bleomycin-érzékenységének köszönhető. [48]

A radiomimetikumok közül a bleomycin hatása hasonló leginkább az ionizáló sugárzáshoz, és a hatásmechanizmus hasonlóságai miatt a bleomycin akár DIC-t is létrehozhat. [86] A DIC kialakulásához legalább két DSB-re van szükség egymás közvetlen közelében. Az ionizáló sugárzás egy egyenes vonal mentén - ahol a sugárzás

áthalad a sejten - okoz DNS-töréseket, és elvileg bármilyen sugárzádózis, akár két törés is DIC-t indukálhat. [45] A legtöbb radiomimetikum alacsony koncentrációban nem képes többszörös töréseket létrehozni kis távolságokon belül, [45] mert véletlenszerűen oszlanak el a DNS körül, és mert maguk is kémiai átalakuláson mennek keresztül a DNS-törés során. Ezzel szemben minden Fe-bleomycin komplex több oxidációs és redukciós cikluson megy keresztül, és a bleomycin általában nem inaktiválódik a bázis-felszabadulási reakcióban [87], így számos törést és DIC-t képezhet. [48]

A bleomycin nem zavarja meg közvetlenül a DNS-replikációt, így a sejtciklustól függetlenül hat. Attól függően, hogy a sejtciklus melyik fázisában lép kölcsönhatásba, kromoszóma és kromatida típusú aberrációkat is okozhat, de csak kis mértékben indukál testvérkromatidák közötti transzlokációt. [48]

2.7. Kezelési lehetőségek

Mivel dolgozatom a diagnosztikai eljárások áttekintésére és fejlesztésére irányul, fontosnak tartom néhány gondolat erejéig áttekinteni a jelenleg rendelkezésre álló kezelési lehetőségeket is a teljesség igénye nélkül, hiszen a diagnosztika célja, hogy a szükséges információkkal támogassa a megfelelő terápia kiválasztását.

Azokban a sejtekben, melyek az ionizáló sugárzás hatására kijavíthatatlan DNS károsodást szenvedtek, sejtpusztulási folyamat indul meg. A károsodott és elpusztult sejteket tartalmazó szövetben szomszédsági hatással gyulladásos folyamatok indulnak meg, szöveti átrendeződés történik, vagy fibrózis alakulhat ki.

Ennek a folyamatnak a kezelésében a gyulladásgátlók hatékonyak, például az olyan nem-szteroid gyulladáscsökkentők, mint az aszpirin és az ibuprofen. Az elpusztult sejtek pótlását segíthetjük növekedési faktorok, hematopoetikus növekedési faktorok granulocita kolónia stimuláló faktor (G-CSF), illetve a granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (GM-CSF) adásával. Ha a hámszövetek folytonossága sérül a nekrózis következtében, az fertőzéshez, vagy szepszishez is vezethet. Ez a veszély fokozódik az immunrendszer sejteinek pusztulása miatt is. Iilyen esetekben a fibrotikus folyamatokat gátló TGF- β gátlók és glukokortikoidok is hasznosnak bizonyulnak. Ezen kívül alkalmaznak ACE gátlókat, a vese és a tüdő, izoflavonokat a csontvelő, sztatinokat és proteáz gátlókat az agy védelmére sugárterápia során. [2]

Akut sugárbetegség esetén a gyógyulási esély - a kapott sugárdózis nagysága mellett nagymértékben függ a megfelelő ellátástól. Ennek során az immunsérültté vált szervezet további külső behatások elleni védelmét szolgáló elkülönítés, a fertőzések megelőzése és kezelése, a vérzések megakadályozása és csillapítása, a vérképző és immunrendszeri regeneráció támogatása, és szükség esetén a vérképző őssejtek pótlása a legfontosabb.

Az emésztőrendszeri kórforma kezelésében a fentiek mellett a sérült bélhám regenerációjának serkentése, a szervezet folyadék és elektrolit egyensúlyának biztosítása, a belekből felszívódó bakteriális és egyéb toxikus anyagok hatására fellépő mérgezettségi állapot kezelése, valamint a többszervi elégtelenség megelőzése játszik főszerepet.

A hematopoetikus szindróma kezelése számos tényezőtől függhet, mint például a becsült dózis, az expozíció módja és a jelentkező tünetek. A citokinekkel történő rövidtávú terápia alacsonyabb dózisok (<3Gy) esetén lehet alternatíva. Nagyobb dózisok (>7Gy), vagy traumás vagy égési sérülésekkel való kombinált sérülések esetén a transzfúzióval, citokinekkel és akár őssejt terápiával történő hosszú távú kezelés lehet megoldás. [88]

2.8. Következtetések

Az ionizáló sugárzás emberi szervezetre gyakorolt hatásának számbavétele után az látszik, hogy bár az ionizáló sugárzás számos szinten és ezen szinteken belül is számos ponton képes különféle károsodást okozni a szervezetünkben, ezek egyike sem tekinthető teljesen specifikusnak. A dicentrikus kromoszómák megjelenése a legegyedibb indikátora az ionizáló sugárzásnak, azonban ezek megjelenését is kiválthatják kémiai anyagok. Ezek alapján véleményem szerint szükség van a hatásmechanizmusok pontosabb megismerésére, hogy a jelenlegieknél sokkal egyedibb hatásokat tudjunk detektálni.

3. AZ IONIZÁLÓ SUGÁRZÁS HATÁSAINAK KIMUTATÁSI LEHETŐSÉGEI

A személyi sugárvédelem feladata, hogy a sugárveszélyes munkakörben dolgozó biztonságos személyek számára biztosítsa а munkafeltételeket és az egészségkárosodások elleni hatékony védelmet. Ennek egyik alapvető pillére az, hogy a munkavállalót érő sugárzást egy adott dóziskorlát alatt kell tartani. Ehhez azonban szükséges az érintettek által kapott dózis monitorozása, ami különböző doziméterek segítségével lehetséges. Ezek a dózismérők különböző fizikai vagy kémiai elven működhetnek és hasonlítanak a biológiai anyagokra. Az emberi szervezetet ért sugárzás számos komponensből áll. ezek komponensek meglehetősen széles а energiatarományban sugárzástípusok különböző mozoghatnak, а különböző valószínűséggel adja le energiájukat, valamint a különböző szövetek is eltérő sugárválaszt adhatnak, sugárérzékenységük is eltér. Mindezek függvényében ezek a dózismérők számos szempontból másképp viselkednek, mint az emberi szövetek, szervek. A különböző dózismérőket együttes, kombinált használata megoldást jelenthet a fenti problémára. A sugárveszélyes munkahelyeken dolgozók mind külső, mind belső sugárterhelését mérik.

3.1. Személyi doziméterek

Mind a külső, mind a belső forrásból származó sugárterhelés mérésére számos eljárás áll rendelkezésre. Azt, hogy az adott dózismérővel milyen sugárzási energiatartományt és dózistartományt lehet mérni, elsősorban a detektor jellemzői szabják meg. Ezek a személyi dózismérők alapvetően lehetnek aktív dózismérők (a válaszjelet közvetlen kijelzésként érzékelhetjük) és passzív dózismérők (a detektor utólagos kiértékelést igényel). Aktív dózismérő például a gáztöltésű és szilícium detektorok, ezek folyamatos működésükből fakadóan folyamatos tápellátást igényelnek. A passzív dózismérők közé taroznak a filmdózismérők, a termolumineszcens dózismérők (TLD), az optikailag stimulált lumineszcens (OSL) dózismérők, a radio-fotolumineszcens dózismérők (RPL) és a szilárdtest nyomdetektorok, ezek a dózismérők a kiértékelési fázisban igényelnek energiát, a besugárzási periódusban nem. A megfelelő dózismérő kiválasztását befolyásolja a mérendő sugárzás típusa, illetve az is, hogy milyen információkra van szükségünk. [7]

3.1.1. Foton és β-sugárzás

Filmdózismérők: Az eljárás alapját az adja, hogy a fényképészeti filmek érzékenyek az ionizáló sugárzásra. Ez az érzékenység arányos a film emulzió vastagságával, valamint összetételével. A dózismérési periódus végén az előhívott filmeken denzitometriás eljárással meghatározzák a feketedés mértékét. A kiértékelendő dózismérő filmjének feketedését egy ismert dózisokkal előállított kalibráló filmsorozattal vetik össze. A filmek emulziójának alapanyaga zselatinba ágyazott ezüst-bromid. Mivel mind az ezüst, mind a bróm nagy rendszámú elem, a filmek energiafüggése nagy. A feketedés energiafüggését lehet csökkenteni a kis energiájú fotonokat elnyelő szűrők alkalmazásával, vagy szűrőanalízissel, amikor több különböző anyagú és vastagságú szűrőt alkalmazva határozzák meg a sugárzás átlagenergiáját. [7]



12. ábra: Filmdózismérő felépítése [7]

3.1.1.1. Termolumineszcens dózismérők (TLD):

Ezek a dózismérők a termolumineszcencia jelenségén alapulnak, amikor egy szigetelő anyagban (jelen esetben a dózismérő anyagának kristályai) az ionizáló sugárzás hatására a szabad elektronok és az anyag hibahelyein befogódnak és onnan melegítés hatására lépnek ki. A melegítés hatására az elektronok fénykibocsátás mellett visszatérnek az alapállapotukba. Ez az emittált fény arányos az anyag által elnyelt dózissal. Erre a célra alkalmas anyagok például a kvarc, a LiF, a BeO és az Al₂O₃. A TLD-k kiértékelését TLD kiértékelővel végzik, a kilépő fotonok detektálását pedig fotoelektron-sokszorozó méri. [7]



13. ábra: Termolumineszcens dózismérő. Saját kép

3.1.1.2. Optikailag stimulált lumineszcens dózismérők (OSL):

A technológia alapvetően abban tér el a termolumineszcens dózismérőktől, hogy a lumineszcenciát itt nem a doziméter anyagának melegítése váltja ki, hanem a megfelelő hullámhosszú fénnyel történő megvilágítás. A használatban lévő OSL dózismérők alapanyaga Al₂O₃. Fontos tulajdonságuk, hogy a TLD-kkel ellentétben a megvilágítás során nem törlődik teljesen a tárolt információ, így megfelelően nagy dózis (~10mSv) esetén lehetőség van újbóli leolvasásra. [7]

3.1.1.3. Radiofotolumineszcens dózismérők (RPL):

Az RPL dózismérők ezüsttel aktivált foszfát-üveg alapúak, melyekben az ionizáló sugárzás hatására lumineszcens centrumok alakulnak ki. Ezeket UV fénnyel megvilágítva az elnyelt dózissal arányos látható fénykibocsátást kapunk. A TLD-kkel ellentétben a kiolvasás után a centrumok változatlanok maradnak, így többszöri kiolvasás is lehetséges, azonban a rövid (1-3 hónap) időtartamok dózisának megállapítására kevéssé alkalmasak. [7]

3.1.1.4. Tolldoziméterek:

A tolldoziméterek lényegében normálállapotú levegőt tartalmazó, kisméretű ionizációs kamrák, melyek a beépített kvarcszálas elektrométer révén közvetlen kiolvasású. A tolldoziméter a személyi dozimetriában alkalmazott legrégebbi eszközök egyike, a kis

méretük és tömegük, valamint egyszerű használatuk miatt a mai napig használják őket. Hátrányuk a viszonylagosan kis méréstartományuk. [7]

3.1.1.5. Elektronikus dózismérők:

Az elektromos személyes dózismérő olyan elektronikus eszköz, amely rendelkezik például folyamatos monitorozási képességgel és dózisteljesítmény méréssel, amely lehetővé teszi a riasztásos (hang és fény) figyelmeztetéseket és a kummulatív dózis többszöri leolvasását. Detektoruk jellemzően GM-cső vagy szilícium dióda. Méretük változó, az egészen kis, kártya mérettől az összetettebb, saját kijelzővel rendelekező készülékekig többféle kivitelben készülnek. [7]

3.1.2. Neutronsugárzás

A neutronsugárzások személyi dozimetriája meglehetősen összetett feladat. Ennek oka, hogy a neutronok energiája rendkívül széles tartományban mozog és egyetlen dózismérő típus sem képes a teljes energiatartományt lefedni. A legtöbb munkahelyi neutron dózisteljesítmény mérő méretéből fakadóan nem alkalmas személyi dozimetriára. Erre a célra a fent említett hiányossággal számos eljárás létezik (például magfotoemulzió, szilárdtest nyomdetektorok, buborékdetektorok), az egyes eljárások alkalmazhatóságát az általuk lefedett energiatartomány határozza meg. [7]

3.1.3. Belső sugárterhelés

Olyan esetekben, amikor a detektálandó sugárzás nem külső forrású, hanem a szervezetbe bejutott radionuklidról van szó, több módszer is rendelkezésre áll. Ezek közül a megfelelő kiválasztását döntően befolyásolja maga az adott izotóp. Ezeknek a módszereknek az alapvető csoportosítása, hogy az izotóp mennyiségét egy műszerrel közvetlenül mérjük, vagy a szervezetből kiürült izotóp aktivitását mérjük, és ebből következtetünk vissza a szervezetben levő mennyiségre. A közvetlen módszerek (például egésztest számláló) akkor alkalmazhatók, amennyiben az izotóp nagy energiájú γ -sugárzó. A β -sugárzó, vagy a kis energiájú γ -sugárzó izotópok esetében a közvetlen eljárások jöhetnek szóba, olyan a különböző biológiai mintákkal, mint például a vizelet, vér, vagy akár kilélegzett levegő.

A fent leírtakból jól látszik, hogy szükség van olyan eljárásokra, amelyekkel akkor is meg lehet becsülni az elszenvedett dózist olyan esetekben is, ahol az érintettek nem viseltek személyi dozimétert. (Azokban az esetekben is ajánlott, ha az érintettek viseltek személyi dozimétert, mert a két eljárás más hatást mér: valós idejű fizikai hatást, illetve annak későbbi, biológiai következményét, ami geometriai viszonyoknak és az egyéni sugárérzékenységnek megfelelően még azonos doziméter értékek mellett is eltérő lehet) Ezekben az esetekben különböző biodozimetriai eljárásokat alkalmazhatunk, melyek különböző biológiai mintákból (többnyire vérből) adnak becslést az elszenvedett dózis mértékére. Jelenleg több ilyen eljárás is használatos dozimetriai célokra.

A biodozimetriai eljárásokkal szemben támasztott követelmények közül kiemelkedően fontos lehet a katasztrófahelyzetben történő alkalmazhatóság. Ilyen esetekben ugyanis nem csak néhány személyen kell vizsgálatot végezni, hanem az esemény sajátosságaitól függően akár több ezer emberen is. Ezeket az embereket meg kell vizsgálni és el kell dönteni, hogy igényelnek-e orvosi ellátást, illetve az orvosi ellátás szükségessége, sürgőssége és az ellátás mértéke alapján kategorizálni kell őket. Ezt a folyamatot nevezzük triage-nak, amely nagy volumenű eseményeknél sok minta rövid idő alatti megvizsgálását teszi szükségessé.

3.2. Biofizikai technikák

A dózisbecslés biofizikai technikái meglehetősen kiforottak. Ezek az eljárások az elektron paramágneses rezonancia (EPR), termolumineszcencia, optikailag stimulált lumineszcencia (OSL) és nukleáris aktivációs technikák. A 'biofizikai' kifejezés abból ered, hogy ezeket az eljárásokat jellemzően a fizikai tudományok területén alkalmazzák, azonban a kiindulási mintatípus lehet biológiai minta is (például haj, köröm, fogzománc/csont), így átmenetet jelentenek a biodozimetria irányába. Ellentétben a biológiai vizsgálati módszerekkel, ezek a módszerek nem tükrözik a biológiai választ még akkor sem, ha biológiai mintákból végezzük el őket. Általánosságban a minta átvételétől a dózisbecslésig eltelt idő 1-48 óra között van, az elvárt pontosság függvényében.

3.2.1. Optikailag stimulált lumineszcencia eljárás (OSL)

A 3.1.1.2 alpontban volt róla szó, hogy Al₂O₃ tatartalmú személyi doziméterek forgalomban vannak és ahogyan az ugyanezen az elven készített dózismérőnél láttuk, az optikailag stimulált lumineszcencia eljárás (OSL) lehetővé teszi a dózisbecslést azáltal, hogy a besugárzott tárgyak által megvilágítás hatására történő fénykibocsátását méri. Olyan minták, mint a fogak, kerámia protézisek, vagy bizonyos személyes tárgyak, mint például a mobiltelefonok és egyéb elektronikai eszközök alkalmasak ilyen vizsgálatokra. Az OSL előnye, hogy erős jelet detektál és érzékeny is (a kimutathatóság mGy-től néhány Gy tartományban van), azonban nagy hátránya, hogy a mért jel nem stabil az időben. [89]

3.2.2. Elektron spin rezonancia (EPR)

Az elektron spin rezonancia (ESR), vagy elektron paramágneses rezonancia (EPR) két olyan technika, amely a sugárzás hatására keletkező szabadgyökök mennyiségét méri. Erre a célra számos ember által alkotott tárgy mellett olyan biológiai anyagok is alkalmazhatóak, mint a fogzománc, csont és a köröm. Az ESR érzékenysége igen jó, meglehetősen széles dózistartományban képes dózisbecslést adni és a mért jel is évekig stabil marad. Hátránya a viszonylag magas alsó kimutatási hatá (50 mGy), így az eljárás alacsony dózisok esetén kevésbé érzékeny. [89]

3.3. Biodozimetria

Baleseti sugárexpozíció esetén az egészségügyi következmények előrejelzése és gyógyítása érdekében az ionizáló sugárzás elnyelt dózisának becslésére van szükség. Fizikai doziméterekkel a dózismérő készülékben elnyelődött sugárzó energiáról nyerhetünk közvetlen információt. A biodozimetiai módszerek segítségével viszont olyan változásokat detektálunk, melyek az egyén sejtjeiben, vagy szöveteiben alakulnak ki ionizáló sugárzásnak való kitettség hatására. [90] Tulajdonképpen a biodozimetria is a retrospektív dozimetria egy formája, ahol a szervezet egyes sejtjei lesznek a vizsgálati minták. A klinikai kezelési döntések szempontjából a fizikai dozimetriai adatok mindig alárendelt szerepet játszanak a biológiai paraméterekkel szemben.

A dózisbecslésre alkalmas klinikai tünet-alapú rendszerek többsége jól behatárolt, a dózisbecslési bizonytalanságok az egyéni válaszreakciók nagyfokú változatosságából, valamint olyan egyéb tényezőkből erednek, mint például a fertőzések.

A gyakorlatban alkalmazott biodozimetriai módszerek alapvetően a sugársérülés hatására kialakuló közvetlen biológiai választ detektálják. Kialakulhatnak közvetett válaszok is, amikor a sugárexpozíció során az érintett sejtekből felszabaduló anyagok hatására a nem exponált sejteknek is megváltozik a metabolizmusa, ezt a jelenséget nevezzük szomszédsági hatásnak. [91]

A biodozimetriai módszerek egyik alaptípusa a fehérvérsejtek kromoszómáiban bekövetkező változásokat detektálja. Ezek az úgynevezett citogenetikai módszerek: mikronukleusz teszt (MN), dicentrikus kromoszóma analízis (DIC), fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH), "premature" kromoszóma kondenzáció (PCC). Az eljárások másik alaptípusa pedig a DNS-károsodás és DNS-repair, génaktiváció, metabolom és proteom biomarkereit vizsgálja. [90]

A jelenleg használt biodozimetriai módszerek nem specifikusak az ionizáló sugárzásra, mivel az eredményeket számos egyéb faktor is befolyásolja, mint például a kor, betegségek, stressz, életmód és a nem. [92] A leginkább specifikus a dicentrikus kromoszóma analízis, dicentrikus kromoszómákat az ionizáló sugárzás mellett egyedül a bleomycin eetében írtak le. [48]

A dicentrikus kromoszómák vizsgálatán alapuló biológiai dozimetriát az 1960-as évek közepe óta alkalmazzák. Az azóta eltelt évek során az eljárás jelentős fejlődésen ment át és manapság számos állam sugárvédelmi programjának rutin elemévé vált. [93] Alkalmazásának több ezer tényleges vagy feltételezett túlexpozíció során szerzett tapasztalata igazolta a módszer használatának létjogosultságát, és segített meghatározni annak korlátait is. A kromoszómakárosodás biomarkerein alapuló biológiai dozimetria különösen fontos, mivel a fizikai dozimetriával ellentétben figyelembe veszi az egyéni sugárérzékenységet is.

A kromoszóma-rendellenességek vizsgálatának dozimetriai célokra történő alkalmazása gyakran nagyon fontos adatot jelent egy nukleáris vagy radiológiai veszélyhelyzetet vizsgálata során. [94] Egy ilyen helyzetben a diagnosztikai információk származhatnak más biológiai alapú sugárzási biomarkerekből, a megjelenő klinikai tünetekből, valamint fizikai mérésekből is (például személyi doziméterek). A sérültek és tanúk meghallgatásából származó olyan alapvető tényekre vonatkozó információk, mint a helyszínen töltött idő és a sugárforrástól való távolság, szintén segíthetnek a dózisbecslésben. Mindezek az információforrások biológiai dozimetriával való kombinálása vezet az eset lehető legvilágosabb értékeléséhez.

Hosszú időn keresztül a limfociták felhasználásával végzett dicentrikus kromoszóma analízis volt az egyetlen rendelkezésre álló biológiai dozimetriás módszer, és ma is ez a leggyakrabban alkalmazott technika. A dicentrikus kromoszómák és egyéb rendellenességek más sejtekben is megfigyelhetők, például bőrfibroblasztokban és a szájnyálkahártya hámsejtjeiben. Napjainkban azonban már számos más biológiai végpont is létezik, mint például a mikronukleuszok, transzlokációk, aberrációk a korai kondenzált kromoszómákban, valamint számos, molekuláris biológiai eljárásokkal megcélozható target, mint például a génexpressziós markerek.

Megbízható biodozimetriára a foglalkozási sugárvédelemben is szükség van a feltételezett kisdózisú sugárexpozíciók megerősítésében vagy elvetésében.



14. ábra: Az egyes markerek megjelenése attól függ, hogy milyen szerepetjátszanak a repair mechanizmus folyamatában. Azok a markerek detektálhatók hosszabb ideig, amelyek fennmaradó változásokat (DNS hibák) tükröznek. Saját ábra

3.3.1. A dicentrikus kromoszóma analízis

A centromer régió a kromoszómák befűződése, a sejtosztódás során ide tapadnak a húzófonalak. A centromer kinetokór fehérjéi biztosítják a DNS és a húzófonalak tubulinja közötti kapcsolatot a sejtosztódás során. Dicentrikus kromoszómák ionizáló sugárzás hatására alakulhatnak ki a DNS-repair folyamatok hibájának következtében; ezek a kromoszómák két centromer régióval rendelkeznek. Az ionizáló sugárzás hatására DNS törések keletkeznek a kromoszómákban, amennyiben ezeket az eltört végeket a repair folyamatok nem az eredeti helyükre építik vissza, akkor a két centromer tartalmú rész fúziója révén dicentrikus kromoszóma jön létre, azok a kromoszómarészletek, amik nem tartalmaznak centromert, acentrikus fragmentként maradnak vissza. A folyamat során a dicentrikus kromoszómáknál jelentősen ritkábban

gyűrű alakú kromoszóma is létrejöhet. Mindkét fent leírt elváltozás nagyon súlyos rendellenességnek számít, ezek miatt általában a sejt további osztódásra már nem képes. A dicentrikus kromoszómák kialakulása csaknem kizárólag sugárzás hatására történik meg. [2][48]

Az eljárás dózistartománya, valamint időablaka megfelelő biodozimetriai célokra, azonban a levett vérminta tenyésztésére és a fehérvérsejtek osztódásának indukciójára is szükség van. Az így kapott minták feldolgozása mikroszkóppal történik.

A vizsgálat során olyan kromoszómák számolása történik, melyeknek két centromer régiója van, ezek a fent leírt dicentrikus kromoszómák. A mikroszkópos feldolgozás során sok esetben a kromoszómák elhelyezkedése miatt az acentrikus fragmentek könnyebben azonosíthatóak, mint magukat a dicentrikus kromoszómák.

A dicentrikus kromoszómák gyakorisága akut sugárzás esetén humán, keringő limfocitákban tisztán lineáris-kvadratikus dózis-hatást mutat megközelítőleg 5 Gy dózisértékig. Az egészséges populáció esetében a dicentrikus kromoszómák háttér értéke meglehetősen alacsony (~1 dicentrikus/1000 sejt). Emiatt az alacsony dicentrikus háttérnek köszönhetően a módszer érzékenysége meglehetősen jó, egésztest dózis esetében az alsó kimutatási határ megközelítőleg 0,1 Gy (500–1000 metafázis vizsgálata esetén). [95][96] A módszer hátránya, hogy a dicentrikus kromoszómák a limfociták cserélődésével eltűnnek, így a sokkal korábbi (évek) besugárzások esetén csak mérsékelten használható az eljárás. Az eljárás sok munkaórát igénylő mikroszkópos értékelésen alapul és csak részben automatizálható, valamint az értékeléshez komoly gyakorlat szükséges, ezek a tényezők is limitálják a módszer használhatóságát.







16. ábra: 4 Gy-el besugárzott metafázis DIC-el acentrikus fragmenttel és double minutetel. A dicentrikus kromoszómák számát a dózis-hatás görbével összevetve közelítő becslést adhatunk az elszenvedett dózisra nézve. saját ábra, Giemsa festés, 100-szoros objektív

3.3.2. A mikronukleusz teszt

Az 1980-as évek közepén jelentős technológiai újítás volt a citokinézis blokkolása tenyésztett limfocitákban anélkül, hogy a sejtmag osztódását gátolták volna úgy, hogy cytochalasin B-t (Cyt-B) adtak a tápfolyadékhoz. A citokinézis blokkolása binukleáris sejtek (BN) képződését eredményezi, azáltal, hogy megakadályozza a két leánysejt elválását. [97][98] Ezzel az eljárással lehetséges megkülönböztetni az osztódó és a nem osztódó sejteket, és specifikusan csak a BN-sejtekben értékelni az MN-okat. A BN-sejteken belüli mikronukleuszok számolása tovább finomítható centromer próbák használatával, amelyek lehetővé teszik az acentrikus kromoszómafragmentekből származó mikronukleuszok megkülönböztetését a teljes kromoszómákból származóktól.

[99][100] Az MN értékelés automatizálásának jelenlegi fejlesztései új perspektívákat nyithatnak az assay alkalmazására tömeges sugárzási balesetek és rutin biomonitoring esetén. [101]

A dicentrikus kromoszóma analízishez hasonlóan a mikronukleusz teszthez is perifériás vérből nyert limfociták tenyésztésére van szükség, melyek a keringésben nem osztódó sejtek. A vizsgált aberrációk azonban csak a sejtosztódás alkalmával válnak detektálhatóvá. Ex vivo mintákban a limfocitákban a sejtosztódást a vizsgálat során phytohemagglutininnal kezelve lehet beindítani. A sejttenyésztési lépés a dicentrikus kromoszóma analízis esetében 2, a mikronukleusz teszt esetében pedig 3 napot vesz igénybe, mivel a két vizsgálat során a sejtosztódás más fázisában alakulnak ki a vizsgált képletek. A dicentrikus kromoszómák vizsgálatának során metafázisban állítják meg a sejtosztódást colcemid, a mikronukleuszok vizsgálata során pedig telofázisban cytochalasin-B segítségével. A sejtek tárgylemezre preparálása és a preparátum Giemsa-festése közel azonos eljárással történik. [102]

A sejtosztódás telofázisában alakul ki a maghártya a leánymagok körül. A cytochalasin-B gátolja az aktin-polimerizációt, ezáltal megakadályozza a leánysejtek szétválását a sejtosztódás során, így a kezelés hatására a limfocitákból binukleáris sejtek alakulnak ki, melyek olyan sejtek, melyek citoplazmája nem vált ketté, azonban már két sejtmag van jelen. Mikronukleuszok azokból a DNS törések által kialakult acentrikus fragmentekből vagy egész kromoszómákból keletkeznek, melyek az osztódás során nem tudnak az utódsejtekbe vándorolni. [3] Az így kialakult mikronukleuszok a binukleáris sejtek citoplazmájában könnyen azonsítható képletekként jelennek meg, melyek morfológiája és festődési tulajdonságai megegyeznek a sejtmagokéval. [103]

A mikronukleuszok kialakulása nem tekinthető sugárzásspecifikusnak, mivel számos klasztogén és aneugén anyag, valamint az öregedés hatására is képződhetnek. Ennek ellenére foglalkozási-, orvosi-, és balesetszerűen bekövetkező besugárzások esetén is gyakran alkalmazzák, mivel alaposan validált és standardizált eljárás. [104] A dicentrikus kromoszómákhoz hasonlóan a mikronukleuszok sem stabil citogenetikai elváltozások, mivel a perifériás vér természetes megújulása és a limfociták cserélődése révén idővel eltűnnek a besugárzás után. Ennek megfelelően ebben az esetben is limitált a módszer használhatósága a több évvel ezelőtt történt besugárzások esetén.

A mikronukleusz teszt alsó kimutatási határa 0,2–0,3 Gy. [95] A korral és az életmóddal összefüggésben nagymértékben és nagy variabilitással megnő a spontán mikronukleusz képződés valószínűsége (különösen nők esetében). [104]

Habár egy nappal hosszabb a vérminták tenyésztési ideje, mint a dicentrikus kromoszóma analízis esetében, jelentősen könnyebben értékelhető és ennek következtében rövidebb mikroszkópos feldolgozást igényel, így könnyen alkalmazható dozimetriai célokra, valamint katasztrófa helyzet esetén triage-ra. A kiértékelés módja a mikronukleuszok összeszámolása, vagyis, hogy 100 binukleáris sejtre hány mikronukleusz jut. Az [100] alapján a NAÜ 2011-es kiadványa [14] tartalmazza a morfológiai kritériumokat.



17. ábra: 2 illetve 6 mikronukleuszt tartalmazó binukleáris limfociták. Giemsa festés,60-szoros objektív. Saját felvétel

3.3.3. Premature Chromosome Condensation (PCC)

Amikor a sejtek belépnek a mitózisba, a kromatin a jellegzetes alakú kromoszómákba kondenzálódik. Léteznek olyan technikák is, amelyek segítségével a kromatin akkor is kondenzálható, amikor a sejt nincs a mitózis fázisában, ezt korai kromoszóma kondenzációnak (PCC) nevezik. A korai kondenzáció indukálható úgy, hogy az interfázisos sejteket mitotikus kínai hörcsög ovárium sejtekkel (CHO) vagy HeLa sejtekkel fuzionáltatunk Sendai vírust vagy polietilénglikolt (PEG) használva fúziós ágensként. [105] A Sendai vírussal történő fúzióhoz azonban olyan sejtekre van szükség, amelyek membránja különösen fogékonyak a vírusrészecskékre, a G0 fázisú limfociták azonban nem ilyen sejtek, így nem fuzionáltathatóak Sendai vírussal megfelelő módon. A biológiai dozimetria esetében ezt a nehézséget a PEG felhasználásával sikerült megoldani. [106]

A gyors és pontos dózisbecslést igénylő esetekben a sejtfúziós PCC is egy az alkalmazható biodozimetriai módszerek közül. [14][107] A PCC során a vizsgálatot a

fent leírt két citogenetikai eljáráshoz (DIC, MN) hasolóan perifériás limfocitákból végzik el, azonban itt nincs szükség a limfociták osztódásának indukciójára. Ezeket a nem stimulált limfocitákat fuzionáltatják osztódásban lévő kínai hörcsög ovárium sejtekkel (CHO) polietilén-glikol (PEG) jelenlétében. A módszer segítségével a Giemsa-val festett PCC-fragmentek és gyűrűk száma alapján gyors dózisbecslésre van lehetőség. [106][108] Az eljárás számos egyéb technikával kombinálható, mint például C-sávozással, [109] fluorescens in situ hibridizációval (FISH), specifikus DNS-könyvtárak használatával, telomer-centromer (TC) festéssel, vagy nukleinsav probe-ok (PNA) használatával, melyek tovább növelik a módszer specifitását. Ez utóbbi esetben a PCC fragmentek, transzlokációk, valamint a dicentrikus kromoszómák és centrikus gyűrűk egyidejű detektálása is lehetséges, ennek megfelelően gyorsan meglejhetősem pontos dózisbecslést kaphatunk. [110][111][112]



18. ábra: PCC. A nagyméretű hörcsög kromoszómák és az apróbb humán kromoszómák jól megkülönböztethetők. A kromoszómadarabok számából lehet következtetni a sugárterhelésre. [14]

A módszer alkalmazási tartománya meglehetősen széles, alacsony dózistartománytól egészen az akut dózisokig alkalmazható, alacsony és magas LET értékek mellett is. A PCC alkalmazásával el lehet különíteni a teljes-, és résztest besugárzásokat, mivel a

limfocitákat nem tenyésztik és/vagy stimulálják, a normál sejtek eloszlása jó megközelítéssel a besugárzást nem kapott limfociták arányát mutatja a keringő vérben. A PCC-vizsgálat során a fúzió hatására kialakuló, a 46 normál kromoszómához képest többlet PCC-fragmentek számát vizsgálják. Alacsony LET értékű sugárzás esetén átlagosan 4-5 extra fragmentum/sejt/Gray tapasztalható. A fragmentumok hossza is informatív lehet, a dózis növekedésével ugyanis nő a hosszú fragmentek száma és aránya is. [113] A spontán, besugárzás nélkül kialakuló PCC fragmentek száma a dicentrikus kromoszómák kialakulásához hasonló nagyságrendű, 1–3/1000 sejt. [103] A feltételezett sugárterheléstől a vérvételig eltelt idő befolyásolja az eredményt, ennek függvényében eltérő eredményeket kaphatunk. Amennyiben a besugárzástól számítva sok idő telik el a mintavételig, az értékelés során a repair mechanizmusok hatását is figyelembe kell vennünk. Az erre irányuló vizsgálatok kimutatták, hogy a besugárzástól számított 4 óra múlva a PCC-fragmentek száma duplája volt az 1, illetve 7 nappal későbbi értékeknek, ezzel szemben az 1 és 7 napos értékek között nem tapasztaltak szignifikáns eltérést. [114]

3.3.4. Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH)

A fluoreszcens in situ hibridizáció során fluoreszcensen jelölt DNS próbákat kapcsolnak (hibridizálnak) a target DNS szakaszhoz, így lehetőség van adott DNS szakaszok jelenlétét és lokalizációját kimutatni a kromoszómában. Ezután fluoreszcens mikroszkópia segítségével könnyen azonosíthatók egyes genetikai aberrációk. A módszert a daganatos megbetegedések diagnosztikája mellett már több éve használják retrospektív biodozimetriára is. A legáltalánosabb és elterjedtebb verzió az egyszínű FISH (sFISH), amely lehetővé teszi különféle, kromoszómák közötti változások detektálását, ilyenek a dicentrikus kromoszómák és transzlokációk is. A FISH-nek számos változata létezik, a többszínű FISH-t a kromoszómák közötti transzlokációk vizsgálata, a multiplex FISH-t (M-FISH) pedig a teljes genom analízis során alkalmazzák. Amennyiben a páncentromerikus és telomerikus probe-okat különböző kromoszóma festék probe-okkal kombinálját a transzlokációk és a dicentrikus kromoszómák, valamint az egy- és kétirányú transzlokációk is pontosan elkülöníthetővé válnak. Az időben elhúzódó besugárzásoknál, mint például a foglalkozási sugárártalmak és a múltban történt besugárzások esetében általában a transzlokációkat vizsgálják a dózisbecslés során. A különféle transzlokációk frekvenciája több évig állandó a limfocitákban, [53][115][116][117] azonban a háttérfrekvencia erősen függ a kortól, a korral jelentős növekedést mutat, [<u>118</u>][<u>119</u>] valamint egyénenként jelentős eltéréseket mutathat, még hasonló korú és hasonló dózist elszenvedő személyek esetében is. A tudományos kutatások azt mutatják, hogy a nem és a rassz nem befolyásolja a transzlokációk háttérfrekvenciáját, azonban a dohányzás vélhetőlen igen. [<u>119</u>]

A FISH alkalmazásával a detektálás alsó határa 0,5 Gy környékére tehető kummulatív dózisban, [53] a fent leírt befolyásoló tényezők miatt azonban fiatal, nem dohányzó személyek esetébenn akár 0,2 Gy sugárexpozíció is kimutatható. Résztest besugárzás esetén a transzlokációkat hordozó a sejtek gyakran instabilak, így a frekvencia az idő előrehaladtával csökken. [53] A vizsgálathoz időigényes hibridizációs folyamatra, valamint osztódó limfocitákra van szükség, így az eljárás a minta kézhezvételétől számított megközelítőleg 5 nap alatt adhat leghamarabb eredményt.



 19. ábra: Dicentrikus kromoszóma FISH vizsgálata. A dicentrikus kromoszómák azonosítását objektívebbé teszi a centromer fluoreszcens festése. [14]

Az egyes FISH-technikák olyan esetekben is alkalmazhatók, ahol az érintettek nagy LET értékű sugárzástól szenvedtek el expozíciót. Plutóniummal dolgozó munkások esetében évekkel a besugárzás után is ki tudtak mutatni megnövekedett transzlokációs frekvenciát. [103] Magas LET értékű sugárzások esetében a transzlokációk mellett egyéb aberrációk is alkalmas biomarkerek lehetnek, ilyenek az inzerciók valamint az intra-kromoszómális és komplex aberrációk.

Az érvényben lévő standardizálási megállapodások alapján csak a "teljes" sejtek értékelhetőek a vizsgálat során, azaz ahol minden megjelölt elem megtalálható, illetve mind a 46 kromoszóma jelen van. A populáció alapú vizsgálatokhoz személyenként ~300 genom ekvivalens sejt értékelése szükséges, a pontos dózisbecsléshez azonban

személyenként ~1000 genom ekvivalens sejt értékelésére van szükség. [103] Vannak próbálkozások az eljárás automatizálásra (például LUCIA automatizált mikroszkópos kontrollrendszer), azonban akárcsak a többi citogenetikai eljárás esetében, teljesen automata megoldás ebben az esetben sincs. [95] A módszert genetikai és diagnosztikai vizsgálatokra rendszeresen alkalmazzák, de jó alkalmazhatósága ellenére biodozimetriai célokra kevéssé elterjedt, mivel kivitelezése sok gyakorlatot igényel és a fluoreszcens jelölés miatt a többi citogenetikai eljáráshoz képest a költsége is magasabb.

3.3.5. γ-H2AX

Az ionizáló sugárzás legkárosabb hatása, amit a sejtekben okozhat, a kettős szálú DNS lánctörés (DSB). Mivel a ki nem javított, és a hibásan kijavított törések daganatos elváltozásokhoz, illetve akár közvetlenül sejthalálhoz is vezethetnek, a sejteknek gyorsan kell reagálnia a keletkező törésekre, annak érdekében, hogy olyan gyorsan és hatékonyan behatárolják és kijavítsák őket, amennyire lehetséges. Ilyen esetekben az osztódó sejtekben is leáll a sejtciklus a javítás idejére. Mindkét folyamat – a hibajavítás és a sejtciklus leállítása –, kapcsolódik a sejtciklushoz, illetve a növekedés szabályozásához és számos fehérje aktiválódásával, valamint gének átíródásával jár. [120]

Kettős szálú DNS törés esetén a repair mechanizmus első lépéseként a H2AX hisztonfehérje a 139-edik helyen foszforilálódik. Ennek megfelelően a duplaszálú DNS lánctörés – mely az ionizáló sugárzás azonnali hatása – γ -H2AX antitesttel kimutatható, mivel a H2AX foszforilációja gyorsan kialakul a DNS eltört szakaszain. [121][122][123]

Lehetőség van a foszforilált hisztonfehérje immuncitokémiai kimutatására, melynek során a kialakuló fluoreszcens fókuszok a magi DNS kettősszálú töréseinek érzékeny indikátorai. A módszer legnagyobb hátránya, hogy besugárzás után csak rövid ideig alkalmazható (24–48 óra) a DNS javító enzimek nagy hatékonysága miatt, melyek rövid idő alatt sok törést kijavítanak. [103][124][125] Mivel a γ-H2AX fókuszok kialakulása a duplaszálú DNS törésekre adott válasz, így a fókuszok száma a lánctörések kijavításával csökken. Ezeknek a kétszálú töréseknek a kijavítása kétfázisú kinetikával történik: egy néhány óráig tartó gyors fázist egy lassú fázis követ. [126] A kiértékelési folyamat során a fókuszok mikroszkópos összeszámolása szükséges.

Az értékelés során vizsgált γ-H2AX fókuszok száma nem csak a besugárzott sejttípustól és az elszenvedett dózistól függ, hanem az eltelt időtől is, ezért a pontos dózisbecslés érdekében ismernünk kell a besugárzás óta eltelt időt. [<u>127</u>]

A mikroszkópos értékelés ebben az esetben is hosszadalmas, így vannak törekvések a módszer automatizálására, ilyen például a RABIT-munkaállomás. [128]

3.3.6. Comet assay

Egy 1 Gy nagyságrendű röntgen besugárzás nagyjából 1000 db egy-láncú és 40 db kétláncú DNS-törést válthat ki a sejtekben. [1] A comet assay segítségével kimutathatók a DNS egyláncú és kettős láncú törései is. [129]

Maga a módszer tulajdonképpen egy sejtszintű agaróz gélelektroforézis. A sejtet alacsony olvadáspontú (37°C) agaróz szuszpenzióba ágyazzuk (így megakadályozva az elmozdulását), majd a feltárjuk (lizáljuk). Ezt egy lúgos (pH>13) vagy semleges közegben elvégzett elektroforézis követi, attól függően, hogy minden (egyláncú és kettős láncú), vagy csak a kettős láncú DNS törések kimutatása a célunk (magas pH hatására a DNS denaturálódik, egyláncú lesz, így az egyláncú törések is detektálhatóvá válnak).

A lizált sejt DNS-e az elektroforézis során elmozdul a gélben. Minél jobban károsodott a DNS, annál kisebb darabokra tört maga a molekula a sugárzás hatására, a kisebb darabok pedig egység idő alatt messzebb jutnak a gélben. A DNS-t specifikus fluorescens festékkel megfestve a mikroszkópos kép alapján értékelhetővé válik az elmozdulás mértéke. A módszer a "comet" nevet a DNS-folt jellegzetes, üstökös alakja miatt kapta, a gélben történő migráció során a DNS fragmentumok egy üstökös (comet) csóvájára emlékeztető alakba rendeződnek.



20. ábra: Comet assay Sejtszintő elektroforézis során a kisebb töredezett DNS darabok gyorsabban mozognak az elektromos térben. DNS festéssel üstökös forma látszik, a fej:csóva arány a töredezettséget jelzi. Az ábrán 0-6 Gy-el besugárzott sejtek comet assay képe látható. [130]

A comet assay, amely tulajdonképpen 'egy sejt elektroforézis', egy érzékeny, gyors és praktikus módszer a DNS-károsodások és repair mechanizmusok sejtszintű vizsgálatára, [131] ennek megfelelően alkalmas lehet sugárérzékenység vizsgálatára is. [1][131] A módszer előnye, hogy nem igényel osztódó sejteket, azonban biodozimetriai célokra csak rövid időkorlátok között alkalmas, mivel a sejtek gyorsan kijavítják a vizsgált DNS-töréseket. Ez az időkorlát meglehetősen rövid: 0,5–4 óra, [132] azonban az alsó detektálhatósági határ 0.05 Gy. [134] A comet assay segítségünkre lehet az egyéni sugárérzékenység megállapításában, és más biodozimetriai módszerekkel kombinálva javítja az azokkal kapott dózisbecslések pontosságát, habár az ezzel kapcsolatos összefüggések ellentmondásosak. [1]

3.3.7. mRNS markerek

A tömegeket, akár több ezer embert érintő nukleáris, vagy radiológiai balesetek miatti fenyegetettség miatt indokolt egy gyors biodozimetriai módszer megléte a triage céljából. Az ilyen irányú fejlesztésben ígéretes eredmények születtek már mind genomikai, mind proteomikai megközelítéssel. [135]

Az emberi sejtekben, szervezetben különféle környezeti stresszfaktorok hatására számos különböző jelátviteli út aktiválódik, valamint a génexpressziós mintázat gyorsan és összetett módon megváltozáik. Az ionizáló sugárzás egy a számos ilyen stresszfaktor közül, így a fent leírt folyamatok egy sugárexpozíció nyomán is elindulnak. A jelenség önmagában igen szerteágazó, a kiváltott válasz és a génexpressziós mintázat is függ az egyes sejttípusok sugárérzékenységétől. Az egyes génexpressziós mintázatok lehetnek dózis- és stresszfüggőek, ezek a megváltozott génexpressziós szintek az expozíció után akár napokig is jelen lehetnek, ezáltal megteremtve a lehetőséget a dózisbecslésre. [136] A DNS-károsodás észlelésében, illetve a sejtciklus szabályozásában résztvevő fehérjék között például a H2AX, az ATM, a CDKN1A és a TP53 vizsgálata potenciálisan alkalmazható biodozimetriaia célokra, de számos egyéb fehérje, mint például a DXR, BAX, DDB2, ACTN1 is potenciális biodozimetriai markarré válhat. [137]

A génexpressziós módszereknek három, jól definiált protokollokal rendelkező kulcslépése van, ezek az RNS-extrakció, a jelölés és a hibridizáció. A génexpressziós módszerek kiválóan használhatóak egyrészről a sugárválaszban résztvevő gének azonosítására kis mintaszám esetén, másrészt kvantitatív reverz transzkripciós real-time polimeráz láncreakciós módszerek segítségével (qRT-PCR) kisszámú sugárválasz gén expressziós szintje határozható meg néhány órán belül, akár több százas mintaszám esetén is.

Jelenleg ezek a módszerek még gyerekcipőben járnak, meglehetősen kevés tanulmány foglalkozik az egyes gének expressziójának sugárzásra való specificitásával, valamint számos exogén faktor létezik, melyek zavaró hatása is vizsgálatra szorul. Ahhoz, hogy a módszerből megbízható biodozimetriai eljárás lehessen a jövőben, meg kell vizsgálni az egyes sugárzástípusokra adott válaszok közötti különbségeket, valamint meg kell határozni a bizonytalanságát és alkalmazhatóságát az olyan összetett események vonatkozásában, mint például egy résztest besugárzás. [103]

3.3.8. Fehérje, DNS és RNS markerek

Az ionizáló sugárzás egyik fő hatása, hogy károsítja a nukleinsavakat (DNS, RNS), azonban a károsodások mellett a sugárzásra adott válaszreakció során egyes gének aktiválódnak, míg mások deaktiválódhatnak, így a különféle termékeket kódoló gének expressziós szintje megváltozhat a sugárexpozíció hatására. [103] A DNS károsodások mellett ezeknek a génexpressziós változásoknak a kimutatására is lehetőség van.

A sugárválasz során szervezet fehérjéinek mennyisége és lokalizációja is megváltozik, valamint mind a sejt-, szövet és szervezet szintjén számos enzimatikus módosítás történik. Ezek a megváltozott menyiségek és az egyes változások proteomikai módszerek segítségével kimutathatóak vérből vagy vizeletből. Az egyes fehérjék vizsgálatára számos technika áll rendelkezésre, ezen módszerek egyik legnagyobb

előnye, hogy szinte kivétel nélkül modern, automatizált eljárások, így a minta átvételétől az eredményig eltelt idő általában órákban mérhető. [103]

3.3.9. Új biomarkerek és fejlesztési lehetőségek

A fentiek tükrében nem kérdés, hogy szükség van biodozimetriai fejlesztésekre, melyek egyrészről a meglévő, nehézkesen értékelhető módszerek automatizálását célozzák, másrészről olyan új biomarkerek kutatását, amelyek az eddigieknél gyorsabb és objektívebb módszerek beállítását tehetik lehetővé.

Az irodalomban találhatóak arra vonatkozó írások és kísérletek, [103] melyekben már több olyan módszert is megvizsgált az összehasonlítás során, melyek csak néhány éves múltra tekintenek vissza és részben még további kutatásokra szorulnak. Ezekről elmondható, hogy pont ebből fakadóan többnyire nem alkalmasak olyan szintű biodozimetriai vizsgálatokra, mint a már elterjedt, jól leírt eljárások. A fejlesztés során fontos szempont, hogy az adott módszer alkalmazható legyen nagy volumenű események során is, triage céljára.

Az optimális vizsgálat széleskörben elfogadott, széles detektációs tartományú, szenzitív, specifikus, olcsó, gyors, automatizálható, tömegek tesztelésére alkalmas, könnyen reprodukálható. A gyakorlatban tökéletes teszt nincs, és a különböző biodozimetriai módszerek jellemzői egymástól nagy fokban eltérnek, [103] ezek ismeretében kiválasztható az adekvát biomdozimetriai vizsgálat. Így tömegkatasztrófa esetén triázsolásra nagy áteresztőképességű, újabb tesztet célszerű választani, akár akkor is, ha az kevéssé specifikus, míg egy foglalkozás-egészségügyi kérdésben csak a biztosító által is elfogadott (és a szabályzatokban foglalt) teszt jöhet szóba.

Általánosságban elmondható, hogy az újabb eljárások sokkal gyorsabban biztosítanak eredményt, mint a hagyományos módszerek, azonban pontosságban ugyan megközelítették a mikronukleusz tesztet, de elmaradnak a jelenleg "gold standard"-nek tartott dicentrikus kromoszóma analízistől. [<u>138</u>]

3.4. Következtetések

A fejezetben áttekintett irodalmakból látszik, hogy az egyént ért ionizáló sugárzás hatását számos ponton tudjuk detektálni. Szintén számos eljárás áll rendelkezésre és áll fejlesztés allatt ahhoz, hogy a tényleges biológiai károsodásokat felmérjük. Az eljárások sajátosságai, illetve az előző fejezetben említett nehézségek azonban arra engednek

következtetni, hogy a jelenleg használatban levő módszerek mellett szükség van új eljárások fejlesztésére ahhoz, hogy teljes képet kaphassunk a szervezet sugárterhelésére vonatkozóan. Mindezek mellett a fejezetben említett technikák egymás mellett, rendszerben történő alkalmazása is átfogóbb képet eredményezhet.
4. A MITOKONDRIÁLIS DNS ÉS DIAGNOSZTIKAI JELENTŐSÉGE

Egyre több ismeretünk van az ionizáló sugárzás emberi szervezetre és sejtekre gyakorolt hatásáról. Számos kutatás igazolja, hogy a sugárexpozíciót elszenvedő sejt sorsát nem csak a kialakuló DNS károsodások határozzák meg, hanem az egyéb sejtalkotók sugárzásra kialakult károsodása is döntően befolyásolhatja azt. Ilyen, sugárhatás szempontjából kritikus szerepet játszó sejtalkotók a mitokondriumok, a fehérjeszintézist végző riboszómák és maga a sejtmembrán is. Ezeknek az alkotóelemeknek a károsodása közvetlen és gyors módon befolyásolja a sejt számos alapvető funkcióját (mint például a permeabilitását vagy a fehérjeszintézist) és összességében a sejt metabolizmusára és a sejten belüli, valamint a sejtek közötti kommunikációra is hatással van. [139]

4.1. A mitokondrium felépítése és működése

A mitokondriumban játszódik le a zsírsavak oxidációja (béta-oxidáció), valamint a mitokondrium belső membránja tartalmazza a légzési lánc (terminális oxidáció) működéséhez szükséges fehérjéket, emiatt itt történik a legjelentősebb mértékű ATPszintézis. Sejten belüli számuk jelentősen változhat a sejt típusától és állapotától függően. A mitokondriumot alkotó és abban működő fehérjék a nukleáris genomban, valamint a mitokondriális DNS-ben (mtDNS) vannak kódolva. A mitokondriális genom uniparentális öröklődésű, anyai ágon öröklődik. Az emberi mitokondriális DNS (mtDNS) egy 16569 bázispár hosszúságú, cirkuláris, kettősszálú DNS molekula, amely összesen 37 gént, 13 fehérjét, 22 transzfer RNS-t, a riboszóma egy kis és egy nagy alegységét (rRNS) kódolja. [140] Ezek között a kódoló szakaszok között található egy 1,1 kb hosszú nem kódoló régió, az úgynevezett displacement loop (D-hurok), a képlet 3 szálú DNS-ből áll, a könnyű láncon elkezd szintetizálódni egy ezzel komplementer szál, a folyamat leválasztja az eredeti nehéz láncot, innen a régió neve. A szintézis megáll, a D hurok végén, az mtDNS nyugvó állapotba kerül az egyszálú DNS szakaszthoz sabilizáló fehérjék kapcsolódnak. [141] A D-hurok (16024-576 bp a Cambridge referencia szekvencia szerint) a mitokondriális replikáció és transzkripció inicializációjához szükséges szekvenciákat tartalmazza, vagyis itt található a nehéz lánc szintézis kiinduló pontja. A könnyű lánc szintézis kiinduló pontja a tRNS-ek génjei között van, a D-huroktól messze. [142] Az mtDNS az egyes mitokondriumokban eltérő kópiaszámban van jelen, átlagosan 2-10 kópia fordulhat elő.

4.2. DNS repair folyamatok a mitokondriumban

A sejtmagban található DNS-el ellentétben a mitokondriális DNS-t nem védik hiszton fehérjék, ezért az oxidatív foszforiláció során felszabaduló reaktív oxigéngyököknek való kitettség nagyobb mértékben károsíthatja. A mitokondriumok DNS javító mechanizmusai kisebb hatékonysággal működnek, mint a magban található repair mechanizmusok, e két fenti hatás eredményeképpen a mtDNS sokkal sérülékenyebb az oxidatív hatásokkal szemben, mint a magi DNS. Mivel ezek a DNS hibajavító mechanizmusok lassabbak ezért a mtDNS mutációs rátája is magas. [143] Ma már számos mutációjuk ismert és a különböző polimorfimusok és delécióik kapcsolata is ismert egyes betegségekkel. [144][145][146]



21. ábra: A mitokondriális genom felépítése [147]

A mtDNS is képes rekombinációra, de a sejten belül marad, így heteroplazmiás mitokondriumok alakulhatnak ki. [148] Ezeket a heteroplazmiás mtDNS molekulákat hordozó, valamint a sejtben található többi mitokondrium képes a sejtben fúzióra, illetve fisszióra. A károsodások kompenzálása lényegében egy másik mitokondrium segítségével történik meg, a károsodás a mitokondrium működésében és aktivitásában csak a komoly sérülések esetében jelenik meg, a hibajavítás csökkent hatékonysága ilyen módon kerül ellensúlyozásra. [149]

4.3. A mitokondriális DNS osztódása

A mitokondriális DNS replikációjáért a DNS-polimeráz gamma komplex felelős, amely egy 140 kDa-os katalitikus DNS-polimerázból és két 55 kDa kiegészítő alegységből áll, előbbit a POLG, utóbbiakat a POLG2gén kódolja. [150] A repliszómát a DNS polimeráz, a TWINKLE és mitokondriális SSB (single-strand *b*inding) fehérjék alkotják. A TWINKLE egy helikáz, amely a dsDNS rövid szakaszait tekeri ki 5'-3' irányban. [151] Ezek a polipeptidek a magi genomban vannak kódolva.

A mitokondriális transzkripciós faktor A vagy a TFAM egy mitokondriális DNS-t (mtDNS) kötő fehérje, amely elengedhetetlen a genom fenntartásához, és részt vesz az mtDNS replikációjában, transzkripciójában és javításában. [152]

Az embriogenezis során a mtDNS replikációja szigorú szabályokat követ [153] A magzatfüggelék irányú differenciációt mutató sejtekkel ellentétben azok a hólyagcsírasejtek, amikből később az embrió keletkezik, szelektíven csökkent mtDNS kópiaszámmal rendelkeznek, így korlátozott számú temlpát áll rendelkezésre a klonális amplifikációhoz. Ez a mitokondriális palacknyak-hatás, ami biztosítja, hogy egyféle mtDNS kerül átadásra az embrió testi sejtekbe, beleértve az ivarsejteket is, így rögzül vagy eliminálódik a mitokondriális génhiba a női csírasejtekben. Amennyiben rögzül és súlyos, annak átörökítése nem valószínű, mert már a gaméta érése sem tud végbemenni. [154] A blasztociszta stádiumában a nagy gyakoriságú mtDNS replikáció a trofektoderma sejtjeire jellemző. [153] Ezzel szemben a belső sejttömeg sejtjei korlátozzák az mtDNS replikációját, amíg meg nem kapják a jeleket a meghatározott sejttípusokká differenciálódásra. [153]

4.4. Oxidatív károsodások hatása a mitokondriális DNS-re

Az mtDNS károsodásának öt fő típusa van,1. az alkilezés okozta károsodás, 2.hidrolízis okozta károsodás, 3. addukt képződés, 4 bázis eltérés és 5. DNS-szálszakadás azaz. egyszálú DNS-törés (SSB) és kettős szálú DNS-törés (DSB)] A cirkuláris mtDNS lineáris mtDNS-vé alakítható a DSB-nek köszönhetően, szétesik a nukleoid szerkezet. Ezeket a károsodásokat-károsodást számos tényező okozza, a replikáció során fellépő hibák bizonyos bázishibákhoz vezethetnek, ahol a módosított bázisokat tartalmazó nukleotidok beépülnek az mtDNS-be.

Az oxidatív károsodás okozza az mtDNS károsodásának nagy részét. A mitokondriális légzészavar és közvetve az ionizáló sugárzás is reaktív oxigénfajtákat (ROS) termel,

ami báziskárosodást (DNS-bázisok oxidációját és a bázishelyek leválását), SSB-t és DSB-t eredményez, akár deléciót okozhat. [155]

Az ionizáló sugárzásról ismert, hogy több sejtes és biológiai hatást vált ki akár a nukleáris DNS-sel való közvetlen kölcsönhatás révén, akár reaktív oxigéngyökök képzésével, ami további DNS-károsodáshoz vezet. Bár a mitokondriumok rendszeresen fokozott oxidációs stressznek vannak kitéve, a legtöbb tanulmány a nukleáris DNS szerepére összpontosít, mint a sugárzás okozta sejtpusztulás legfontosabb célpontjára. Ez a nézőpont megállhatja a helyét, amennyiben a sejtek elpusztítására összpontosítunk, azonban a túlélő sejtekben a sugárzás hosszú távú hatása kóros működéshez vezethet a túlélő sejtekben és a belőlük felépülő szövetekben. Mivel a mitokondriális degeneratív betegségek lassú progressziót mutatnak, gyakran károsodott oxidatív foszforilációval járnak, érdekes modellekként szolgálhatnak a mitokondriumok sugárterhelésére. Yoneda és mtsai. [156] felvetették, hogy az oxidatív stressz mtDNS mutációkhoz és deléciókhoz vezet, ami ezután az elektrontranszport lánc dezintegráltságát, majd a reaktív oxigéngyökök fokozott termelődését eredményezi. A mitokondriális oxidatív foszforiláció során jelentős mennyiségű ROS keletkezik, amely mitokondriális és nukleáris DNS károsodást okozhat. Az mtDNS-hez is számos fehérje kapcsolódik, ezáltal nukleoid alakul ki, amely bizonyos fokú védettséget biztosít, [155] azonban hiányzik a hisztonok védőhatása, és mivel a mitokondriális DNS általában kevésbé hatékonyan javítódik, mint a nukleáris DNS, a mitokondriális DNS mutációs gyakorisága 10-1000-szer nagyobb. [157] Mivel az mtDNS-ben található összes gén elengedhetetlen a mitokondriumok biogeneziséhez és bioenergetikai funkciójához, minden olyan mutáció, amely e gének megváltozott expressziójához vezet, várhatóan az energia-anyagcsere hiányát és az oxidatív foszforiláció során intermedierként felszabaduló ROS fokozott termelését okozza. [158][159] A mitokondriális degeneratív betegségek mellett feltételezték, hogy az mtDNS mutációk és deléciók egész életen át tartó felhalmozódása hozzájárul az öregedési folyamathoz. [160][161] Ezt támasztják alá az oxidatív foszforiláció korral összefüggő csökkenése, valamint az mtDNS mutációk és deléciók felhalmozódása. Ezen folyamatok jelzőjeként mind az öregedés, mind a mitokondriális degeneratív betegségek egy 4977 bázispáros mtDNS-deléció felhalmozódását mutatják, amelyet "common deléciónak" neveznek. [162] Ennek a specifikus mtDNS-deléciónak a helyét két 13 bp-os ismétlődő szakasz határolja, az ezen ismétlések közötti DNS-károsodás a DNS-replikáció során nem megfelelő párosodást eredményezhet, így deléciót okozva.

Ezt "slip-replication" mechanizmusnak nevezik, [163][164][165] és megmagyarázza, hogy a véletlenszerű DNS károsodás miért okozhat ilyen konkrét deléciót. Tanulmányok kimutatták, hogy ez a deléció felhasználható az mtDNS oxidatív károsodásának markereként, [166][167][168][169][170] még nagyon alacsony dózisú károsodások után is, mivel az elváltozás jelenléte lényegében felerősödik az mtDNS replikációja során. Az mtDNS sugárkárosodása sok egypéldányos deléciót és mutációt eredményez az mtDNS-ben, amelyek kevéssé alkalmasak biodozimetriai vizsgálatokra, vagy dózisbecslés elkészítéséhez. Azonban a "common deléció" könnyebben detektálható egyedülálló képződési mechanizmusa miatt, így az mtDNS károsodásának nagyon érzékeny markere. Annak ellenére, hogy a besugárzást követően az mtDNS károsodásnak csak a töredékét képviseli, a teljes károsodás reprezentatív helyettesítője.

A sérült mtDNS sorsa a (gyakran csak részleges) helyreállítás base/clipping excision repair (BER) és mismatch repair (MMR) mechanizmussal, a mitofágia, a mtDNS felszabadulás vagy a degradáció.

A fő stratégia az organellumok szintjén a sérült mtDNS eltávolítására a mitofágia és a nukleáz által közvetített degradáció, illetve hogy a sérült mtDNS a mitokondriumokból a citoszolba szabadul fel, és a felszabaduló mtDNS szignálmolekulaként stimulálja a veleszületett immunválaszt, vagy lebontódik a TREX1 által. Ezenkívül a mitokondriális fúzió lehetővé teszi, hogy ép mtDNS kerüljön a mitokondriumba a sérült mtDNS-ek funkciójának kompenzálására, a mitokondriális hasadás pedig lehetővé teszi a mitokondriumok károsodott részei elválasztását és lebontását, fenntartva a mitokondriumok egészségét. [155]

4.5. Az mtDNS károsodásainak előfordulása betegségekben

Az mtDNS-ben kialakuló deléciók PCR-rel végzett komplex vizsgálata korábban már rávilágított ennek az információnak a gyakorlati hasznosságára a bőr UVexpozíciójának biomarkereként. [171] Kimutatták, hogy a mitokondriális genetikai instabilitás az emberi rosszindulatú daganatok sokféle változatában, szinte bármilyen komplexitási szinten jelentkezik. Homoplazmatikus vagy heteroplazmatikus mtDNS pontmutációkat találtak, amelyek prevalenciája széles spektrumon mozgott, a colorectalis karcinóma eseteinek körülbelül kétharmadában jelen voltak, míg a heredaganatokban szenvedők esetében gyakorlatilag hiányoztak. Heteroplazmatikus deléciót találtak mellrákban, elsősorban posztmenopauzás betegeknél, ebben az esetben esetlegesen kapcsolat lehet az öregedő sejtekkel. [172] A közelmúlt eredményei alapján a primer tumorok mutációs forró pontja kifejezetten az mtDNS D-hurkában (311–315 bázis) található erősen polimorf homopolimer C szakaszhoz kapcsolódik. A vizsgált daganatok több mint egyötöde mutatott szomatikus mutációkat, deléciókat és inzerciókat ebben a mononukleotid ismétlődésben. [173]

A pajzsmirigybetegségek esetében a Hashimoto-thyroiditis kapcsán a vizsgált mtDNS elváltozásokat a 4977 bp hosszúságú "common deléció"-ként (CD) határozták meg, amely egyes esetekben független volt, más esetekben társult a citokróm-c oxidáz egyidejű hibáival a mirigy érintett régióiban, azonban nem volt jelen a az egészséges területeken. [174] Egy párhuzamos vizsgálat kimutatta, hogy ez a mutáció nemcsak Hashimoto-thyroiditis esetén mutatható ki, hanem Hürthle-sejtes karcinómában, valamint multinoduláris golyvában és follikuláris adenómákban is megtalálható, oxifil sejtelváltozásokkal vagy anélkül. [175] Ebben az esetsorozatban, a normál pajzsmirigyszövetben, izolált esetben, az enyhe limfocitás pajzsmirigygyulladás jelenlététől függetlenül nem volt ilyen mutáció, és a leggyakrabban előforduló pajzsmirigy rosszindulatú daganatban, a papilláris pajzsmirigyrákban a CD nem volt kimutatható. Ezektől az eredményektől némileg eltérve egy korábbi, 12 onkocitikus pajzsmirigydaganaton végzett vizsgálat nem mutatott megnövekedett mtDNS-deléció mennyiséget a daganatokban a kontrollhoz képest. [176]

Maximo és mtsai [177] a CD jelenlétét a pajzsmirigydaganatok bármely kórszövettani változatában változó százalékban mutatták ki. A follikuláris karcinóma és a follikuláris adenóma mellett a vizsgált esetek 12,5-33,3%-ában a tumor melletti normál pajzsmirigyszövetben kis hányadban CD-t találtak az összes többi pajzsmirigydaganattípusban. Az mtDNS szisztematikus elemzése különböző pajzsmirigybetegségekben szignifikáns különbséget mutatott a pontmutációk előfordulási gyakoriságában a pajzsmirigypatológiás esetek és a kontrollszövetek között, különösen a pajzsmirigykarcinómás esetek és a kontroll populáció között. [178]

Továbbá statisztikai szignifikanciát találtak az összes szekvencia-variáns típus eltérő megoszlásában a karcinómák és a kontrollok között, ellentétben a jóindulatú daganatokkal és a nem neoplasztikus betegségekkel. A mitokondriális genom szekvenálása szignifikáns különbséget mutatott ki a nem csendes mutációk prevalenciájában a komplex I génekben a follikuláris adenóma és a papilláris pajzsmirigyrák között. [177] Fontos, hogy a tumor melletti normál parenchyma is gyakran tartalmazott mtDNS szekvencia variánsokat a komplex I és IV régiókban, ami

azt mutatja, hogy a pajzsmirigydaganat nem az egyetlen olyan szövettípus, amely mutált mtDNS-t tartalmazhat.

4.5.1. A mitokondriális genom károsodásával összefüggő kórképek

Az elmúlt években felismerték, hogy a különböző mtDNS mutánsok különböző degeneratív betegségekkel és öregedési folyamatokkal társulnak. A legelterjedtebb, nagyméretű deléciókról először az olyan mitokondriális miopátiában szenvedő betegek szöveteinek vizsgálata során számoltak be, mint például krónikus progresszív ophthalmoplegia (CPEO) és Kearns-Sayre szindróma (KSS). [179] A hasonló deléciókat hordozó mutáns mtDNS alacsony szintje fordul elő és halmozódik fel a normális öregedés során. [179]

Ionizáló sugárzás hatására reaktív oxigéngyök felszabadulást mértek mitokondriumokban, erről többek között azt feltételezik, hogy a nem-célzott sugárhatások egyik kiváltó oka lehet [180], sőt léteznek olyan irodalmi adatok is, amelyek arra engednek következtetni, hogy az összes nem-célzott sugárhatás a mitokondrium működésére vezethető vissza, és fontos szerepet játszik az α -sugárzás következtében kialakuló genotoxikus hatásban, valamint a genomiális instabilitás kialakulásában. [181]

4.6. Sugárzások hatása a mitokondriális DNS-re

Az mtDNS evolúciója 10–100-szor gyorsabb, mint a magi DNS, melynek számos oka van. A leggyakrabban leírtak a mitokondriumra jellemző reaktív oxigéngyökök agresszív környezete, az mtDNS polimeráz vizsonylagos pontatlansága, a DNS repair mitokondriális rendszereinek javítás során történő csúszása, az mtDNS szerkezetének sajátosságai, a mitokondriális membrán térbeli közelsége, valamint az mtDNS replikációjának és transzkripciójának sajátosságai. [182]

Az ionizáló sugárzás egy olyan erőteljes genotoxikus hatás, amely hozzájárulhat a nukleinsavak túlzott mutageneziséhez, kimutatták, hogy az mtDNS-ben mind a pontmutációk, mind a nagymértékű deléciók kialakulhatnak. [183] A γ-sugárzás által kiváltott DNS-károsodás vizsgálata az mtDNS repair-rendszereinek relatív hatékonyságának értékelése céljából a sugárzás okozta lánctörések nagyobb arányát és a DNS-változások hosszabb perzisztenciáját mutatta a mitokondriumokban, a sejtmaghoz

viszonyítva. [<u>184</u>] Ez alapján az mtDNS-t kritikus targetnek tekinthetjük a reaktív oxigéngyökök, például hidrogén-peroxid szempontjából. [<u>185</u>]

Az mtDNS deléciók könnyen kimutathatóak a nem osztódó szövetekben, például az agyban és az izmokban, de ritkán észlelhetők viszonylag rövid felezési idővel rendelkező sejtekben (például a vér alakos elemeiben). A leggyakrabban jelentett deléció egy 4977 bp-os deléció vagy "common deléció" (CD), amelyet eredetileg mitokondriális miopátiában szenvedő betegeknél figyeltek meg. [160] Ez a deléció meglehetősen sok vizsgálat tárgyát képezte már, kimutatták az életkorral kapcsolatos felhalmozódását különböző szövetekben, beleértve az agyat, a szívet, a vesét, az izmokat, a májat és a vért. [163][186][187][188][189] Kimutatták, hogy a CD nagyobb gyakorisággal fordul elő a napsugárzásnak való fokozott kitettség hatására, a deléció megnövekedett szintje inkább fotográfiai, mint kronológiai öregedéssel jár. [190][191][192][193][194][195] A D-hurok az mtDNS genom legfontosabb szabályozó helye. Ez tartalmazza a nehéz lánc replikációs origóját, és tartalmazza a promótereket mindkét szál transzkripciójához. Egy 260 bp hosszú tandem duplikációt (TD) írtak le a D-hurokban, ami feltételezhetően összefügg az olyan nagyméretű deléciókkal, mint a CD. [196] Ezt a felfedezést követően 150 és 200 bp méretű TD-król és a korábban közölt 260 bp TD-kről azt találták, hogy korfüggő módon fordulnak elő olyan szövetekben, mint az izom, a here és a bőr. [197][198] Beszámoltak arról, hogy ezek a TD-k nagyobb gyakorisággal fordulnak elő a napsugárzásnak kitett bőrön, mint a napsugárzásnak ki nem tett bőrön. [199] Az UV sugárzás a nem melanoma típusú bőrrák fő meghatározója. Fontos tényező az oxidatív károsodás kialakulásában, amely DNS törésekhez és olyan DNS fototermékek előállításához vezethet, mint a timidin dimerek, amelyek nem javíthatók az mtDNS-ben. [200] Ezen kívül az mtDNS a mátrixban helyezkedik el, amely a belső membrán közvetlen közelében található, ahol az elektrontranszport láncban folyamatosan reaktív oxigéngyökök termelődnek. Ez, valamint a védő funkcióval bíró hisztonok hiánya teszi az mtDNS-t az UV-indukálta DNS károsodások érzékeny markerévé а nukleáris DNS-hez képest. [195][201][202][203][204] Végül minden sejt akár több ezer másolatot is tartalmazhat az mitokondriális genomból, és ezért a mitokondrium nagyon magas (akár 90%) károsodott mtDNS arányt is képes elviselni a megmaradt vad típus komplementálásával. [205][206] Ez az oka annak, hogy a sejtek képesek felhalmozni ezeket a fotokárosodásokat az mtDNS-ben anélkül, hogy a sejtek működését veszélyeztetnék. Nemrégiben azt tapasztalták, hogy a napsugárzásnak gyakran kitett bőrben egy 3895 bp-os mtDNS-deléció a gyakoribb, szemben a csupán esetenként napsugárzásnak kitett bőrrel. [207] A CD előfordulását vizsgáló tanulmányok [191][192][193][194] szempontjából fontos, hogy a napsugárzásnak különböző mértékben kitett a bőrből hasonlítsanak össze mintákat. Ez potenciálisan korrigálhatja az általában napsugárzásnak kitett területekről nyert minták (pl. arc és kéz) eredményeit az időnként napsugárzásnak kitett területek mintáival (pl. törzs és lábak).

Ebben a tanulmányban megvizsgálták a CD előfordulási gyakoriságát három, napsugárzásnak különböző mértékben exponált területről vett bőrmintákban, ehhez Armstrong (2004) korábbi meghatározását alkalmazták, nevezetesen ritkán, alkalmanként és általában napsugárzásnak kitett terület. A CD és a TD-k közötti korábbi feltételezett összefüggések miatt a TD-k előfordulási gyakoriságát és a CD-vel való kapcsolatát is vizsgálták.

Kimutatták, hogy UV-A sugárzásnak való ismételt expozíció hatására a CD indukálható humán dermális fibroblasztokban. [208] Egy másik tanulmányban Koch és mtsai (2001) leírták, hogy az UV sugárzás növelte a CD szintjét humán keratinocitákban. Azt is kimutatták, hogy a CD szintje csökkent a tenyésztés hatására, összehasonlítva a sejtek azonnali feldolgozásával.

Ahogy azt fentebb bemutattam, a sugárkezelés hatására nemcsak citoplazma, hanem mitokondriális eredetű reaktív oxigéngyökök is felszabadulnak, [158] amelyek potenciálisan károsíthatják a nukleáris és a mitokondriális örökítő anyagot is. [73] A hibajavítási mechanizmus beindulásához idő kell, ugyanis a felszabaduló gyökök miatt kialakuló oxidatív stressz csökkenti a DNS polimeráz γ hatékonyságát, ezáltal lassítja a hibajavítási mechanizmust, a perzisztensen felszaporodó mitokondriális károsodás pedig idővel elpusztíthatja a sejtet. [209] A mitokondriális deléciók felszaporodása normál körülmények között is megtörténhet, a sugárzás hatására történő mitokondriális DNS károsodás a légzési lánc csökkent aktivitásának, valamint a kialakuló és perzisztensen fennálló oxidatív stressz következménye. [143] A sugárzás okozta mitokondriális DNS károsodás a sejtosztódás után is megmarad, [210] és így genomiális instabilitáshoz vezethet. [73] A mitokondriális DNS elváltozásai érintik az alapvető mitokondriális struktúrákat, ami a mitokondriális eredetű oxidánsok felszaporodásához vezethet és végül a nukleáris DNS sérülését eredményezheti. [211]

Ricchetti és munkatársai szerint a sugárkezelést követően a mitokondriális DNS egyes fragmentjei a sejtmagba vándorolnak, és ott a nukleáris DNS-be inzertálódnak, ezzel mutációkat és DNS-töréseket hoznak benne létre, [212] ezáltal genomiális instabilitást

okozva. Ezt a megfigyelést támasztja alá, hogy magas dózisú γ-sugárkezelést követően egy órával már megfigyeltek mitokondriális eredetű DNS fragmenteket idegsejtek citoszoljában, [213] valamint az is, hogy élesztő modellben már megfigyelték a mtDNS beépülését a nukleáris genomba. [214] Amennyiben az így létrejött inzerció a DNS regulátor elemeit is érint, a károsodás permanensen is fennmaradhat. [73] Mindezeken felül az ionizáló sugárzás hatására kialakuló és hosszan fennálló mitokondriális oxidatív stressz tumoros elváltozásokhoz és korai öregedéshez vezethet. [215]

4.7. A mitokondriális "Common deléció"

Korábban már említésre került a tény, miszerint a mitokondriális DNS-ben a különböző hatások képesek töréseket okozni, a molekula sajátságainak köszönhetően pedig ezen törések hatására egyes szakaszok elveszhetnek a molekulából, deléciók alakulhatnak ki. A humán mitokondriális DNS leggyakoribb deléciója az úgynevezett "Common deléció" (CD). [216] Maga a deléció egy 4977 bázis nagyságú szakaszt érintő elváltozás, a mitokondriális DNS-en a 8470-13446 közötti régió esik ki. Nagy méreténél fogva számos gént érint, ilyenek az oxidatív foszforiláció génjei, az ATPáz 6, ATPáz 8, citokróm oxidáz III gének, a NADH-alegységeit alkotó ND3, ND4, ND4L, és ND5, valamint egyes tRNS-ek génjei. Kialakulásának oka két 13 bázispár hosszúságú direkt ismétlődés a genomban, melyeknél úgynevezett mutációs forrópontok jönnek létre, ahol a DNS könnyebben törik, majd újraegyesül. [217] A CD jelenléte emberekben több betegséggel is kapcsolatba hozható, több forrás is leírta a deléció megnövekedett előfordulási gyakoriságát Kearn's Sayre szindrómás esetekben. [218][219] Az irodalmi adatok alapján olyan további betegségekben is emelkedett a CD mutáns mitokondriumok száma, mint a Pearson-szindróma, [220] miopátia [221] és egyes szívbetegségek. [222] Különböző tumorokban is kimutatták a deléció gyakoriságának megváltozását, például emlőrákos betegeknél, [172] pajzsmirigy daganatos esetekben. [223]

A reaktív oxigéngyökök jelenlétében, valamint UV sugárzás okozta stressz hatására is megnövekszik a CD előfordulása. [224] A CD az öregedésben is szerepet játszik, [225] számos tanulmány mutatott ki összefüggést a delécióó felszaporodása és a szöveti öregedés között, [226][227] valamint a szöveti öregedés következtében kialakuló betegségek, mint az Alzheimer kór, [228] vagy az atherosclerosisos szívelégtelenség között. [163] Ennek lehetséges magyarázata, hogy az öregedéssel járó folyamatokban mind a reaktív oxigéngyökök mennyisége, mind a spontán mutációk száma jelentősen

megnövekszik, [229] ez pedig elősegítheti a deléciók, és köztük a CD kialakulását. Kimutatták, hogy ionizáló sugárzás hatására is megemelkedik a deléciót hordozó mitokondriumok száma, ezáltal sugárzás mitokondriális DNS károsító hatásának markereként is használható. [230][231]

Sejtvonalakon végzett vizsgálatokkal kimutatták, hogy a deléció hosszú ideig fennmaradhat. [232] Amennyiben nagy számban fordul elő a sejtben, mitokondriális funkciókiesést, ez pedig emelkedett ROS termelést vált ki. [233][234] Mennyiségének változása követhető polimeráz láncreakcióval, a valós idejű polimeráz láncreakció pedig különösen érzékeny és számszerűsíthető eredményeket nyújt. [235]

4.8. Deléciók és duplikációk vizsgálata a mitokondriális DNS-ben

Mivel sejten belül több mitokondrium található és mitokondriumonként is több példányban megtalálható a mitokondriális genom, így sejtenként akár több ezres példányszámban is jelen lehet. A két lánc bázisösszetételében eltér, így megkülönböztetünk egy citozinban gazdag könnyű és egy guaninban gazdag nehéz láncot. Jelen kutatás során a célom az volt, hogy a mitokondriális genomban olyan változást találjak, amely megbízható indikátor lehet az ionizáló sugárzás expozíciójára.

A cirkuláris genom sérülése következtében, ha a DNS lánc eltörik, a javítás során egyes szakaszok "kieshetnek" a genomból, ezt a jelenséget nevezik deléciónak. A kutatás szempontjából fontos az úgynevezett "common deléció" nevű deléciós szakasz. Ez egy megközelítőleg 5 ezer bázispár hosszúságú deléció, ami nagyságrendileg a genom egyharmada. A mitokondriális genomban több különféle deléció is megjelenhet, de ezek közül ez a deléció fordul elő a leggyakrabban. A delécióval kiesik a genomból 5 tRNS gén, valamint 7 egyéb gén is. Ezek a gének a mitokondriális elektrontranszport lánc egyes komplexeinek alegységeit kódolják. Ennek következtében az elektrontranszport lánc működése sérül, mai az ATP szintézis zavarához vezet. Ezek a hatások akkor jelentkeznek, ha a genom 60%-a hordozza a deléciót. [236]

Az általánosan elfogadott modell szerint a deléciók osztódás közben alakulnak ki. Ehhez a mitokondriális DNS osztódási sajátosságára van szükség. A nehéz lánc szintézise hamarabb indul meg, mint a könnyű láncé, így egy hosszú, egyláncú struktúra alakul ki. Mivel a genomban sok a komplementer szekvencia, így ez az egyszálú struktúra lehetővé teszi, hogy ezek a szekvenciák "egymásra találjanak" és keresztkötés alakuljon ki. Így egy hurok alakul ki. Ezt később az exonukleázok eltávolítják, és a replikáció folytatódik tovább. A folyamat végére 1 vad típusú, normál DNS-t és egy deléciós mutánst kapunk. Ezzel szemben a kutatási eredmények arra utalnak, hogy a deléció kialakulásához nincs szükség osztódásra. Valamilyen külső hatásra - mint például az ionizáló sugárzás – létrejön egy kettős lánctörés. Ezt a törést a repair mechanizmusok javítani tudják, azonban, ha az exonukleázok túlműködése miatt a kelleténél hosszabb szekvencia válik egyszálúvá, akkor létrejöhet egy, a fentihez hasonló keresztkötés. A kimaradó szálakat az exonukleázok itt is eltávolítják. Fontos különbség, hogy itt a fentivel ellentétben nem 50%-os a deléciós arány, hanem 1 normál DNS-ből kapunk 1 deléciósat. [236]

Fontos megjegyezni, hogy a mitokondriális betegségeken kívül a mitokondriumok működésbeli zavara kapcsolatba hozható a cukorbetegség, az Alzheimer-kór és a Parkinson-kór kialakulásával is, így a mitokondriális deléciók ezeknek a betegségeknek a kialakulásában is szerepet játszhatnak.

Mitokondriális deléciók ionizáló sugárzás hatására is kialakulhatnak. A "common delécó" szint megnő az ionizáló sugárzás hatására. [230] Ez már alacsony dózisoknál is gyorsan, rövid idő alatt mérhető.

A "common deléció" mellett alternatívát jelenthet a tandem duplikációk vizsgálata. Ezek egymás után azonos polaritással kétszer ismétlődő szakaszok. Logikus feltételezés, hogy kialakulásukhoz két egyidejű törésre van szükség kis távolságon belül. Ez hasonó mechanizmus lehet, mint a dicentrikus kromoszómák kialakolásakor, így a párhuzamosan zajló repair folyamatoknak itt is esélye van felcserélni a DNS szálakat kialakítva ezzel a mitokondriumban a tandem duplikációt (akár triplikációt is). A D-hurok párhuzamos szerkezete megnövelheti ennek az esélyét. Ezzel szemben a deléció egyetlen duplaszálú törés után kialakulhat.

A deléciókkal ellentétben a duplikációk nem okoznak funkcióvesztést a genomban, így a kisebb szelekciós nyomás miatt tovább maradhatnak fent. Ez a jelenség hasonló beállítások mellett, de eltérő kísérleti körülmények között, ugyanazzal a rendszerrel detektálható, mint a mitokondriális deléciók.

4.9. PCR, mint a sugárkárosodás kimutatásának eszköze

A polimeráz-láncreakció (szokásos rövidítése PCR, amely az angol polymerase chain reaction elnevezésből származik) egy molekuláris biológiai technológia a DNS enzimatikus amplifikálására (azaz a kópiák megsokszorozására) élő szervezet, (például E. coli vagy élesztő) igénybevétele nélkül. A technológia lehetővé teszi a DNS egy kis darabjának megsokszorozását analízis céljából. A PCR általánosan használt módszer az

élettudományi kutatásokban és egészségügyi laboratóriumokban a legkülönfélébb feladatokra (például örökletes betegségek kimutatása, fertőző betegségek diagnosztikája, apasági vizsgálatok elvégzésére).

A PCR-t a DNS-szál egy rövid, jól definiált szakaszának amplifikálására használják. Ez lehet egyetlen gén vagy csak egy génrészlet. Az élő szervezetekkel ellentétben a PCRfolyamat csak kis DNS-szakaszok másolására képes, ezek hossza általában legfeljebb 10 kbp (kilobázispár). Bizonyos módszerek akár 40 kbp méretű szakaszokat is képesek lemásolni, de még ez is elenyésző egy eukarióta sejt kromoszomális DNS-ének méretéhez képest.

Az eljárás elve az, hogy a kétszálú DNS-szakaszt (hődenaturációval) egyszálúvá alakítjuk, majd megszintetizáltatjuk mindkét szál komplementer párját. Ezt ciklikusan megismételve exponenciális módon felsokszorosítható a kiválasztott DNS-szakasz. A reakciót végző polimeráz enzim működéséhez szükséges egy dupla szálú DNS szakasz is, ahonnan a DNS szintézis el tud indulni. Ez teszi lehetővé azt, hogy szelektíven csak azt a DNS-szakaszt sokszorosítsuk fel, amelyikre szükségünk van. [237]

Az amplifikálandó DNS-szakaszt a szekvenciaspecifikus primerek kiválasztásával határozhatjuk meg. A primerek rövid, mesterséges DNS-szálak – 50 nukleotidnál (általában 18-25 bp) kevesebb alkotja őket – amelyek komplementerek az amplifikálandó DNS-szakasz elejével és végével. Hozzákapcsolódnak a DNS-templáthoz ezeken a kezdő- és végpontokon, ahová a DNS-polimeráz kötődik, és a primert felhasználva megindítja egy új DNS-szál szintézisét.

Az egyszálú DNS-szakasz ismert részével komplementer primer a megfelelő körülmények között az adott komplementer szekvenciához be fog kötődni (a bázispárosodás szabályainak megfelelően: adenin-timin, citozin-guanin bázispárok alakulnak ki). A reakció lejátszódásához szükséges még DNS-dependens DNS-polimeráz, valamint dezoxi-nukleotid-trifoszfátok (dNTP), melyek segítségével a feltapadt primer 3' végétől elkezdődik a komplementer lánc polimerizációja. A polimerizációs reakciót egy idő után leállítjuk a hőmértsékleti különbségek megváltoztatásával, a két szálat (új és régi) pedig szétválasztjuk (hődenaturációval). A reakcióban az eredeti szállal (vagy egy részével) azonos szekvenciájú termék polimerizálódik. [237]

Ez a folyamat elvben a végtelenségig folytatódhat, ha minden polimerizációs/hődenaturációs ciklus után újra hozzáadjuk a kétféle primert és az enzimet (a hődenaturáció működésképtelené teszi az enzimek többségét) és újrafuttatjuk a reakciót, minden lépésben duplázódni fog a templátként szolgáló szakasz komplementer szálainak mennyisége. Az ismétlődő beméréseket elkerülendő a reakció kezdetekor nagyon sok, mindkét szállal komplementer primert és hőstabil polimerázt mérünk a reakcióelegybe, így a két komplementer szál képes egyszerre szintetizálódni. Ilyen felállás mellett csak a hőmérsékletet kell ciklikusan változtatni ahhoz, hogy minden ciklusban duplázódjon az adott DNS-szakasz. [237]



22. ábra: A PCR elve: A polimeráz láncreakció a specifikusan tervezett primer-ek bekötődésével indul, amikből kiindulva a polimeráz enzim folytatja a szintézist. A készülék ciklikusan változtatja a hőmérsékletét, melegítve a DNS kettős láncok elválnak, így dupla mennyiségű primerkötőhely válik szabaddá. Az alacsonyabb hőmérséklet a szintézisnek kedvez, így lesz minden ciklusban exponenciálisan több termék. [238]

A valós idejű, angolul real-time PCR módszer lényege, hogy a DNS sokszorosítást kvantitatívan tudjuk nyomon követni. Ezzel a technikával nagy pontossággal meg tudjuk határozni a fluoreszcensen jelölt DNS templát kiindulási és ciklusonkénti mennyiségét, ami sok szempontból igen hasznos lehet (pl. genetikai betegségek, vírusfertőzések gyors kimutatása). Az eljárás a kutatásomban is hasznos eszköz, segítségével az ionizáló sugárzásra kialakuló DNS szekvencia eltéréseket (pl. mitokondriális deléciók, duplikációk) ki lehet mutatni.

4.9.1. Mitokondriális deléciók és duplikációk kimutatása PCR készülék segítségével

Akár a deléciós, akár a duplikációs elváltozásokat szeretnénk vizsgálni, PCR segítségével van rá lehetőségünk. Alapos irodalomkutatás során feltérképeztem a szakirodalomban az ilyen irányú alkalmazások körét, ez volt az első és legfontosabb lépés a későbbi kísérletek megtervezéséhez. Az ionizáló sugárzás hatására kialakuló mitokondriális deléciók, például a "common deléció" kimutatása alacsony dózisoknál is érzékeny eljárás lehet, mivel az elváltozás már alacsony dózisoknál is gyorsan, rövid idő alatt mérhetővé válik. A módszer előnye, hogy mivel több mitokondriális DNS kópia van jelen sejtenként, a vizsgált elváltozás statisztikailag jó eséllyel alakul ki még kis dózisú sugárexpozíció esetén is. A PCR reakció során a teljes mitokondriális DNS mennyisége mellett, szükséges meghatározni a vad típusú, valamint a deléciót hordozó DNS mennyiségét is. [239]

A tandem duplikációk esetében is hasonló a helyzet, annyi különbséggel, hogy a vizsgálathoz úgynevezett 'back-to-back' primer párra van szükség, ahol az amplifikáció csak akkor eredményez dupla szálú terméket, ha duplikálódik a vizsgált szakasz. Az 5. fejezetben mindkét eljárás metodológiáját részletesen kifejtem.

A műszer és reagens igényét figyelembe véve vizsgálat a katasztrófa helyszínén elvégezhető, akár konténeres körülmények között is. A mitokondriális deléció gyorsan kialakul, és sokáig fennmarad. A vizsgálat előtenyésztést nem igényel, a mérést a PCR készülék végzi, ennek megfelelően az eredmény objektív. A PCR rendszerben nagyszámú minta rövid idő alatt, párhuzamosan mérhető és az eljárás gyors kimutatást tesz lehetővé.

Mindezek tükrében a mitokondriális deléció és/vagy duplikáció mérése katasztrófavédelmi szempontból igen fontos lehet. A segítségével akár a helyszínen, rövid idő alatt nagyszámú mintán el lehet végezni a vizsgálatot. Olyan esetekben is, ahol csak kis dózis érte az érintetteket, így látszólag tünetmentesek. Helyszíni előszűrő vizsgálatként használva csökkenti a hagyományos módszerekkel megvizsgálandó személyek számát, így nagy tömegeket érintő katasztrófahelyzetben segítheti a gyors triage-t és segítséget nyújthat a megfelelő kezelés kiválasztásában.

4.10. Következtetések

A vonatkozó irodalmak áttekintésével rávilágítok arra a megközelítésre, hogy a magi DNS mellett a mitokondriumok DNS-e is károsodik sugárexpozíció hatására. A mitokondriális DNS a maginál jóval nagyobb kópiaszámban jelen lévő örökítőanyag, így az ismertetett korszerő és objektív laboratóriumi módszerrel vizsgálva megfelelő target lehet egy kidolgozandó biodozimetriai vizsgálathoz.

5. SAJÁT VIZSGÁLATOK

Saját vizsgálataim arra irányulnak, hogy miként lehetne legalább részben kiváltani az ionizáló sugárzás biodozimetriai detektálására gold standardnak tekintett dicentrikus kromoszóma analízist, valamint az egyszerűbben értékelhető, de ugyancsak sejttenyésztésen és mikroszkópos vizsgálaton alapuló mikronukleusz tesztet egy sejttenyésztést nem ignylő és PCR eljáráson alapuló módszerrel. Az MH EK JTKI Sugárbiológiai laboratóriumában a hagyományos metodikák is alkalmazásban vannak, ezeknek a módszereknek a tökéletesítésén és új területeken való felhasználásán is dolgozom. [102]

A kalibrációs görbék felvételéhez és a vizsgálatokhoz a vérmintákat egészséges önkéntesek adták, akik a mintavételt megelőző 10 napban nem vettek be gyulladáscsökkentő gyógyszereket. A vérminták a teljes vizsgálat során megkülönböztethető, de anonim módon voltak kezelve. A minták besugárzása minden vizsgálat esetében szobahőmérsékleten, fantom nélkül, röntgen besugárzó készülékkel történt erre kiképzett szakszemélyzet által. Az egyes besugárzott dózisokhoz tartozó műszaki paramétereket az 7. táblázatban foglaltam össze.

A minták besugárzása Precision X-Rad 225XLi készüléken történik, 200kV gyorsítófeszültségű röntgensugarakkal, több dózisban.

Dózis (Gy)	Réz szűrő	Távolság (cm)	Idő	Dózisteljesítmény
	(mm)			
0,01	0,3	40	42 sec	1,4 cGy/min
0,05	0,3	40	67 sec	4,4 cGy/min
0,1	0,3	40	63 sec	9,4 cGy/min
0,5	0,3	40	59 sec	49,1 cGy/min
1	0,3	40	60 sec	98,8 cGy/min
2	0,3	40	121 sec	99,6 cGy/min
4	0,3	40	243 sec	99,6 cGy/min

7. Táblázat: A vizsgálatok során alkalmazott dózisok besugárzási paraméterei

5.1. Dicentrikus kromoszóma analízis

A biodozimetria élettani hátterének és eszköztára alapvető tulajdonságainak ismeretében kutatásomat az alapvető eljárások megismerésével és azok katasztrófavédelmi alkalmazhatóságának felmérésével kezdtem.

5.1.1. DIC módszer sugárhatás vizsgálatára

Az eljárást a NAÜ által javasoltak alapján az MH EK JTKI Sugárbiológiai Laboratóriumában készített saját laboratóriumi protokoll alapján végeztem. Ez alapján a lítium heparinnal alvadásgátolt vérvételi csövekbe levett vénás vérből 0,8ml-t 9ml 10% FCS-t és antibiotikumot, valamint antimikotikumot tartalmazó RPMI-1640 médiumba mértem, majd a sejtosztódás indukálására 200µl 133 µg/ml phytohaemagglutinin-M-t adtam hozzá. Ezt követően 45 órán keresztül inkubáltam a csöveket 37 °C-on. A 45 óra leteltével 100 µl 10 µg/ml Colchemid hozzáadásával leállítottam a sejtosztódás azonos fázisába (metafázis) kerülhessnek. Ezután egy hipotonizálási, valamint több metanolecetsav 3:1 arányú keverékével történő mosási és centrifugálási lépés után a sejteket tárgylemezre cseppentettem, majd Giemsa festéssel tettem láthatóvá a képleteket. Az értékelés fénymikroszkóppal történt, a NAÜ ajánlása alapján, melynek során az értékelt metafázisokban meg kell számolni a normális, illetve a rendellenességeket mutató kromoszómákat, valamint kromoszóma töredékeket. (lásd 6. ábra)

A dózis-hatás görbe felvételéhez szükség van a vérminták különböző dózisokkal történő besugárzására. Esetemben a besugárzásra az NNK-SSFO budafoki telephelyén volt lehetőség. A Precision X-Rad 225XLi típusú röntgen besugárzó készüléket szakképzett személy kezelte, a besugárzott dózisok pedig 0; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 Gy voltak. Az egyes lemezeken a NAÜ által javasolt értékelési kritériumok alapján 100 metafázist leszámolva a kapott értékeket a grafikonon jelölve készült el az értékelés alapjául szolgáló dózis-hatás görbe. Mivel az értékelés részben szubjektív, minden biodozimetriai laboratóriumnak saját dózis-hatás görbét kell készítenie a pontos dózisbecslés érdekében. Ennek a görbének a felvétele a JTKI Sugárbiológiai laboratóriumában is folyamatban van, melyben munkám során én is részt veszek.



 23. ábra: DIC vizsgálathoz alkalmazott dózis-hatás görbe különbségei a sugárzás típusától függően, [96] alapján szerkesztve.

Munkám során alkalmam nyílt egy automatizált DIC értékelő mikroszkóppal és szoftverrel dolgozni. Mivel a DIC analízis egyik legnagyobb hátránya az értékelés időigénye, az alkalmazhatóságnak fontos szempontja a lehetséges továbbfejlesztési irányok ismerete. Az ezzel kapcsolatos tapasztalataimat az 5.1.4. fejezetben fejtem ki.

5.1.2. Bleomycin kezelés hatására kialakuló DIC vizsgálata

A módszer specificitását fizsgálva a besugárzás helyett bleomycines kezelést alkalmaztam a vérmintákon. A bleomycin radiomimetikum és erős citosztatikum, kemoterápiás szer, így speciális feltételek szükségesek a kezeléséhez, a bleomycint az Országos Onkológiai Intézet bocsátotta a rendelkezésemre és az ő felügyeletük mellett történt a vérminták kezelése. A vizsgálatot a fentebb leírt DIC vizsgálattal szemben úgy végeztem, hogy a besugárzás helyett а bleomycint három különböző végkoncentrációban (0-10-30µg/ml) a tenyésztés előtt adtam a vért tartalmazó tápoldathoz és pontosan 3 órát inkubáltam vele. Ezután centrifugálást követően a sejteket HBSS-ben átmostam és ismét tápoldattal töltöttem fel a csöveket (ez a tápoldat már nem tartalmazott bleomycint). Ezek után a lépések után a teljes folyamat megegyezett az 5.1.1. fejezetben leírtakkal. Az összehasonlítás végett a bleomycin betegtájékoztató alapján előírt átlagos alkalmazási adagja 10-15 mg/alkalom, amely 60 év alatti korosztályban nem haladhatja meg a teljes 400 mg-ot.

5.1.3. Eredmények

5.1.3.1. Sugárzás

A módszer specifikusnak tekinthető a sugárzásra, azonban ez a specificitás nem 100%os. A bleomycines kezelés hatására kialakló dicentrikus kromoszómák bizonyítják, hogy egyetlen módszer sosem nyújthat teljes bizonyossággal dózisbecslést.

A módszer nagyfokú specificitása mellett a hátránya az időigényessége. A teljes tenyésztési és feldolgozási folyamat több mint 2 napot vesz igénybe, az értékelés pedig nehézkes, hiszen minden egyes sejt esetében meg kell számolni a teljes kromoszómaállományt. A NAÜ ajánlás alapján 500 metafázis, vagy 100 dicentrikus kromoszóma alapján lehet megbízható dózisbecslést adni, ez egy gyakorlattal rendelkező értékelő személy számára is több nap, így a besugárzástól a leghamarabbi dózisbecslésig eltelt idő megközelítőleg egy hét. [102]

5.1.3.2. Bleomycin

A bleomycines kezelés hatására a 30 mikrogram/ml-es koncentráció esetében már kialakultak dicentrikus kromoszómák, így kísérletes módon sikerült bizonyítani, hogy nem csak ionizáló sugárzás hatására alakulnak ki ezek az elváltozások.



24. ábra: 30µg/ml bleomycin kezelés hatására kialakult dicentrikus kromoszóma. 100szoros objektív, Giemsa festés, saját fotó



25. ábra: Limphocyta kromoszómakészlete – a 30 microgram/ml bleomycin dicentrikus kromoszóma és acentrikus fragment kialakulását eredményezte in vitro. 100-szoros objektív, Giemsa festés, saját fotó Mivel a bleomycin erős kemoterápiás szer, használata engedélyhez kötött, így a vizsgálatokat az Országos Onkológiai Intézet munkatársainak útmutatásával és felügyelete mellett végeztem el.

5.1.4. Következtetések

Nagy volumenű sugaras esemény esetén a feladat kettős. Tünetmentes személyeknél tudnunk kell, hogy érte-e őket ionizáló sugárzás. A módszer nagyfokú specificitása miatt ezt a feledatot be tudja tölteni. Ha a sugársérülés gyanúja igazolást nyert, annak mértéke a következő kérdés. Erre már más módszerek is vannak.

Ha a módszert triage céljából alkalmazzuk, az értékelendő metafázisok számát le lehet ugyan csökkenteni, de a tenyésztési fázis nem csökkenthető, tehát 3-4 napnál hamarabb semmiképpen nem lehet dózisbecslést adni a módszer segítségével.

A módszer egy megfelelő mikroszkóppal és szoftverrel jól automatizálható, azonban tapasztalataim alapján, csak a metafázisos sejtek tárgylemezen történő megkeresését gyorsítja fel jelentősen, az egyes metafázisok kiértékelése továbbra is manuálisan kell, hogy történjen. Van lehetőség arra is, hogy a szoftver maga döntse el, hogy az egyes metafázisokban van-e DIC, valamint meghatározza ezek számát, azonban ennek nagyobb a hibaszázaléka, mint ha manuálisan értékelik a lemezt, így megítélésem szerint kevésbé alkalmas pontos dózisbecslésre.

A DIC-ek jelenléte alapján sugárterhelés tényét igazolni vagy kizárni jó pontossággal tudjuk, azzal a fenntartással, hogy figyelembe kell venni a esetleges radiomimetikumok által okozott DIC-ek esélyét is. A dózis-hatás görbével vannak bizonytalanságok, minden értékelőnek célszerű saját maga által felvett görbét használni. Ha nem tudjuk, hogy mennyi idő telt el, millyen típusú vagy milyen arányú vegyes sugárzás érte a személyt, mekkora testfelületen, nem tudjuk megbecsülni a dózist. Az egyéni sugárérzékenység is eltér, az éppen fennálló károsodás mértékét viszont pontosan látjuk.

5.2. Mikronukleusz teszt

5.2.1. A MN tulajdonsága és használhatósága

Ionizáló sugárzás hatására a DNS-ben kettősszálú törések alakulnak ki. Ennek következtében létrejönnek olyan kromoszóma töredékek, amelyekhez a normális egy helyett kettő, vagy nulla darab húzófonal kapcsolódik. A sejtosztódás során ezek a képletek nem képesek egyik utódsejtmagba sem átvándorolni, így a telofázisban keletkező két leánysejtmagokon kívül rekedve mikronukleuszokat hoznak létre. A besugárzott egyén limfocitáiban a mikronukleuszok előfordulási gyakorisága dózisfüggést mutat, s ez által biológiai doziméterként alkalmazhatók. A mikronukleuszok megjelenése azonban egyrészt nem specifikus a sugárexpozícióra, másrészt ezzel a vizsgálati módszerrel is meglehetősen nehezen különíthető el a részleges- és egésztest-expozíció (amennyiben a MN darabszám sejtenkénti eloszlása jelentősen eltér, felmerül a résztest besugárzás gyanúja). A magas háttérszint és kifejezett korfüggőség jelentősen csökkenti e vizsgálati módszer megbízhatóságát és biodozimetriai célokra történő alkalmazhatóságát (azzal együtt is, hogy az értékelés jelentősen egyszerűbb és gyorsabb a DIC-hez képest).

5.2.2. A MN Módszer

A módszer kivitelezése nagyfokú hasonlóságot mutat a fent leírt dicentrikus kromoszóma analízissel, ezt az eljárást is a NAÜ által javasoltak alapján az MH EK JTKI Sugárbiológiai Laboratóriumában készített saját laboratóriumi protokoll alapján végeztem. A vizsgálat ebben az esetben is lítium heparinnal alvadásgátolt vérvételi csövekbe levett vénás vérből indul ki, annyi különbséggel, hogy 9,5ml tápoldathoz 0,5ml vért mértem. A sejtosztódást szintén phytohaemagglutinin-M-el stimuláltam, majd ebben az esetben is 45 órán keresztül inkubáltam a csöveket 37 °C-on. A mikronukleusz teszt esetében a 45. óra után 400µl cytochalasin-B hozzáadásával állítható meg a sejtosztódás a telofázisban, mivel a cytochalasin-B gátolja a leánymagok szétválását. Ezt követően a mintákat tovább inkubáltam 37 °C-on a 72. óráig. Az ezután következő hipotonizálási, mosási és centrifugálási lépések szinte teljesen megegyeznek a dicentrikus kormoszóma analízis esetében leírtakkal. A folyamatot ezesetben is a minták tárgylemezre cseppentése és Giemsa festése zárta. A lemezek értékelése szintén fénymikroszkóppal történt a NAÜ ajánlása alapján, melynek során a binukleáris sejtekben jelen levő mikronukleuszokat kell megszámolni, dózisonként 1000 sejtben. Az eredményt az értékelés végén 100 binukleáris sejtre vonatkoztatva kell megadni (26. ábra). A dózisbecsléshez ebben az esetben is dózis-hatás görbe felvételére van szükség, melyhez a besugárzás a fent leírtaknak megfelelően zajlott, a dicentrikus kromoszóma analízistől eltérően 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 Gy sugárdózisokkal.



26. ábra: Binukleáris sejtek 0, illetve 5 darab mikronukleusszal. Giemsa festés, 60szoros objektív, saját felvétel



27. ábra: Az MH EK JTKI Sugárbiológiai laboratóriumának általunk alkalmazott MN kalibrációs görbéje. Saját készítés

5.2.3. Eredmények

Az általam elvégzett dicentrikus kromoszóma és mikronukleusz preparálások, valamint az ezekből készített lemezek értékelése alapján elmondható, hogy a módszer tenyésztési ideje 1 nappal hosszabb, mint a dicentrikus kromoszóma analízis esetében, azonban a mikroszkópos értékelés jelentősen könnyebb, ezáltal gyorsabb is. Ennek megfelelően a két módszer időigénye hozzávetőlegesen megegyezik, mivel azonban a limfociták tenyésztése számos minta esetében is szimultán történik, az értékelés viszont csak egyesével lehetséges, nagy mintaszám esetén a mikronukleusz teszt gyorsabban eredményezhet dózisbecslést a teljes mintaszámra vonatkoztatva. Egy nagy volumenű esemény során, ahol adott esetben több száz minta vizsgálatára kerülhet sor, mintaszám függvényében mindkét fenti eljárással több hétbe telik a dózisbecslés elvégzése az összes mintán. Habár a mikronukleusz teszt értékelése nagyrészt automatizálható, a módszer specificitás limitáló tényező а biodozimetriai alkalmazhatóság vonatkozásában.

Irodalmi adatok alapján [240] az látszik, hogy az elnyelt dózis növekedésével nem csak a mikronukleuszok száma növekszik, hanem az eloszlásuk is megváltozik: megnő a több mikronukleuszt tartalmazó sejtek aránya. A résztest besugárzás természetéből adódóan az adott testrészre nagyobb, míg a szervezet egészére arányosan kisebb sugárterhelést jelent, azonban az így besugárzott limfociták a nagy sugárterhelés miatt több mikronukleuszt fognak tartalmazni. Ebben az esetben sok mikronukleusz nélküli sejt mellett kisszámú, több mikronukleuszt tartalmazó sejt lesz jelen. [102]

Az általam kiértékelt minták esetében elvégeztem a mikronukleuszokat tartalmazó sejtek eloszlásának vizsgálatát a mikronukleuszok száma alapján. Az 28. ábrán látható eredmények ezt a tézist támasztják alá. Ennek megfelelően a mikronukleuszok eloszlásfüggvénye alapján a résztest besugárzás tényének megállapítására is lehetőség nyílik. Ennek igazolása azonban további, állatkísérletes vizsgálatokat igényel. Úgy gondolom, a dóziseloszás függvény egy pontosabb dózismeghatározást tesz lehetővé, ezért érdemes lehet a fejlesztésre.



28. ábra: Különböző számú MN-t tartalmazó sejtek eloszlása a besugárzott dózis függvényében. Saját ábra

Részt vettem két misszióból hazaérkezett tünetes személy mintájának értékelésében DIC és MN módszerrel, [102] esetükben megállapítást nyert a DIC-ek hiánya alapján, hogy a közelmúltban nem érte őket kimutatható sugárkárosodás, de a mikronukleusz számuk emelkedett volt, valamint az egyik személynél több double minute is tapasztalható volt, ami egyéb forrásból származó károsodásokra utal. Véleményem szerint ebből következik, hogy az egyén biológiai károsodásainak pontos felméréséhez több biodozimetriai eljárás kombinációban való alkalmazása a legmegfelelőbb megközelítés.

5.2.4. Következtetések

A mikonukleusz teszt manuális számolása egyszerűbb, kevesebb gyakorlatot igényel, mint a DIC módszer esetében, véleményem szerint objektívebb és manuálisan is elég gyors eredményt ad.

Habár a MN teszt értékelése egyszerűbb, mint a DIC esetében, a módszer kevésbé specifikus, így az eredményeket fenntartással kell kezelni. Vizsgálati rendszerben, esetleg triázs során alkalmazva azonban hasznos biodozimetriai eszköz lehet. A mikronukleusz szám eloszlás alapján következtetni tudunk az elszenvedett sugárterhelés

mértékére, különösen hasznos lehet ez a módszer, ha valakit résztest besugárzás ért. [241] A mikronukleuszok sejtenkénti eloszlásának figyelembe vételével pontosabb biodozimetriai eredményt adhatunk. Balaest esetén ugyanis nem életszerű, hogy ez egész testet egyenletesen érje a sugárzás

5.3. Az alkalmazott PCR alapú módszer bemutatása

5.3.1. Az mtDNS tulajdonságai és alkalmazhatósága

Kézenfekvő feltételezésnek tűnik, hogy az ionizáló sugárzás DNS károsító hatását olyan DNS szakaszon célszerű detektálni, ami a lehető legnagyobb kópiaszámban van jelen, ezáltal nagyobb a matematikai valószínűsége annak, hogy a sugárzás okozta károsodást ki tudjuk mutatni. A centromerek és a telomerek ismétlődő szakaszokkal rendelkező részei, valamint a mitokondiumok saját DNS-e is potenciálisan megfelelhet ezekhez a vizsgálatokhoz, a választásom végül az irodalomkutatás alapján a mitokondriumokra esett, mivel azon kívül, hogy a magi DNS-nél nagyobb kópiaszámban fordulnak elő, itt a sugárérzékenység is nagyobb a helyben játszódó terminális oxidáció miatt. Az irodalmi adatok alapján [242] a leggyakrabban kialakuló mtDNS deléciót, a "common deléció"-t vizsgálva képet kaphatunk a mtDNS károsodásának mértékéről.

A műszer és reagens igényét figyelembe véve a vizsgálat a katasztrófa helyszínén elvégezhető, akár kitelepült körülmények között is. A mitokondriális deléció gyorsan kialakul, és sokáig fennmarad. A vizsgálat sejttenyésztést nem igényel, a mérést a PCR készülék végzi, ennek megfelelően az eredmény objektív. A PCR rendszerben nagyszámú minta rövid idő alatt, párhuzamosan mérhető és az eljárás gyors kimutatást tesz lehetővé.

5.3.2. A PCR mérésekhez használt primerek bemutatása

A PCR készülékkel végzett mérés a során az alábbi génszakaszok vizsgálata történik, az egyes szakaszokhoz tervezett primerpárokkal:

5.3.2.1. "CD"

A common deléció kimutatására, a CD-mtDNA4977 szakasz detektálásához a primerpár a 4977 bp hosszú deléciós szakasz két végére lett tervezve és a PCR olyan beállítások mellett ment végbe, hogy termékképződés csak abban az esetben menjen végbe, ha a deléciós szakasz nincs jelen a genomban. (29. ábra) A ciklusidő rövidsége

miatt a vad típusban ez a szakasz nem tud felsokszorozódni, a deléciósban viszont igen, így ennek a segítségével pedig a deléciós DNS mennyiségét tudom mérni.



29. ábra: A CD meghatározása PCR segítségével. Az alkalmazott beállítások mellett csak abban az esetben van amplifikáció, ha a CD kialakul a mitokondriális DNS-ben. Saját ábra

5.3.2.2. "TD"

A mitokondriális DNS-ben kialakuló tandem duplikáció kimutatásához egy back-toback primerpárt terveztem. Amplikonként a keresett 193 bp-ból álló szakasz duplikációja után kialakuló mtDNS szekvenciát vettem alapul. A kiválasztott primerpár 5' végei között 9 bázis távolság van, amely a nem duplikálódott szekvencián egymással ellentétes irányban inicializálná a DNS szintézisét, azonban, és csakis akkor, ha a duplikáció megtörtént a PCR reakció során termékképződést tapasztalunk. (30. ábra)



30. ábra: A mitokondriális DNS tandem duplikációja estén a primerkötőhelyek is megkettőződnek. Az egymással ellentétes irányba íródó primerekkel csak a megfelelő duplikációt tartalmazó mtDNS-ből képződik PCR termék. Saját ábra

5.3.2.3. "Minor"

A mitokondriális genom "minor arc" részének egy szakaszát sokszorosítja fel, ez a normál és a deléciós DNS-ben is jelen van (ezen a szakaszon ritkán alakulnak ki deléciók). Ezzel tudom mérni az összes mitokondriális DNS (mtDNS) mennyiségét.

5.3.2.4. "Major"

A primerpár a DNS, azon belül is a "major arc" azon szakaszára lett tervezve, amely kiesik a genomból a deléció során, így ezzel mérni tudom a deléció nélküli, vad típusú DNS mennyiségét A primerpár alkalmazása néhány mérés után feleslegesnek bizonyult, mivel a deléció nagyon alacsony számban fordul elő, emiatt a Minor és a Major primerpárok által mért kópiaszám nem adott megkülönböztethető eredményt.

5.3.2.5. "GAPDH"

A sejtmagban lévő DNS (nukleáris vagy nDNS) mennyiségét, amely a sejtek számával arányos a "GAPDH" gén mennyiségének változásán keresztül az alkalmazott sugárzási dózisok mennyiségének függvényében vizsgálom.

A vizsgálatok során alkalmazott primerek szekvenciáját a 8. táblázatban ismertetem. A nem saját tervezésű primerek esetében a hivatkozás a forrásművet jelöli. A primereket az Integrated DNA Technologies szintetizálta.

Náz	Doríció	Szalyzanaja 5', 2'	Termék	
INEV POZICIO		Szekvencia 3 - 3	hossza	
CD Forward [<u>17</u>]	mt 8295- 8323	CCCACTGTAAAGCTAACTTAGCATTAACC	374 bn	
CD Reverse [<u>243]</u>	mt 13642- 13621	AGGTTGACCTGTTAGGGTGAGA	C. C. C.	
D Forward (saját)	mt 406- 428	TTTTTGGCGGTATGCACTTTTAAC	185 bp	
D Reverse (saját)	mt 376- 396	GAAATCTGGTTAGGCTGGTG		
Minor Forward [244]	mt 16,528- 16,548	CTAAATAGCCCACACGTTCCC	83 bp	
Minor Reverse [<u>244]</u>	mt 23-42	AGAGCTCCCGTGAGTGGTTA		
GAPDH Forward [227]	ch 12,p12 6537970- 6537989	CGACCACTTTGTCAAGCTCA	332 hn	
GAPDH Reverse [227]	ch 12,p12 6538301- 6538282	AGGGGTCTACATGGCAACTG	, 552 op	

8. Táblázat: A vizsgálat során alkalmazott primerek

5.3.3. A PCR reakciók menete interkalálódó festékkel

A qPCR mérések BioRad CFX96 Touch[™] Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) és Light Cycler készülékkel készültek.

A kitleírásnak megfelelően 20 μl PCR mix ~100 ng DNS-t tartalmazott templátként, valamint 10 μl QuantiNova SYBR Green PCR mastermixet és a forward és reverse primereket 0,7-0,7 μM koncentrációban. A DNS koncentráció ellenőrzésére Qubit fluoriméterrel történt a gyártó leírása alapján.

A PCR-reakció paramétereit az 9. táblázat foglalja össze. A fluoreszcens jel leolvasása minden ciklus polimerizációs lépése után megtörtént. A PCR-reakció után a kapott termék megelelőségének ellenőrzésére olvadási görbe analízist alkalmaztam.

Denaturáció és Enzimaktiválás		2 perc	95°C
	Denaturáció	30 másodperc	95°C
50x	Annealing	30 másodperc	60°C
	Polimerizáció	60 másodperc	72°C
Végső extenzió		10 perc	72°C

9. táblázat mitokondriális CD detektálására használt PCR reakcióban alkalmazott hőmérsékleti ciklusok



31. ábra: egy CD kimutatását célzó PCR-reakció amplifikációs görbéje (saját mérés). Az ábra a mérőeszköz saját szoftverével készült, a szoftver nyelve angol, ezért a feliratok mérete és nyelve nem állítható

5.3.4. A mitokondriális TD vizsgálata fluoreszcens probe-okkal

Az előző fejezetben leírt kísérleti felállás specifitásának javítása érdekében a PCR reakciót SYBR Green interkalálódó festék helyett specifikus probe-okkal végeztem el. Ezek olyan fluoreszcensen jelölt oligonukleotidok, amelyek komplementerek a PCR termékkel és akkor adnak fluoreszcens jelet, ha az előre meghatározott termék jelen van a PCR reakcióban, így a reakció során képződő esetleges melléktermékek nem torzítják a mérési eredményeket. Az előzetes eredményeim alapján be tudtam szűkíteni, mely - irodalomban már leírt - tandem duplikációk jöhetnek szóba, mint target. Az irodalmi adatok alapján alkotott amplikonra terveztem két FAM-jelölt probe-ot. Ez az eljárás specifikusabb az eredeti felállásnál, így a vizsgálatoktól tisztább képet vártam a sugárhatásról a fenti két DNS módosulás tekintetében.

A módszer megegyezett az előző fejezetben ismertetettel, azzal az eltéréssel, hogy a PCR reakcióhoz használt primerek eltértek (5.3.2. fejezet), a reakcióhoz a fent leírt saját tervezésű probe-okat adtam, valamint a SYBR Green interkalálódó festéket tartalmazó Master mixet a fluoreszcens probe-oknak megfelelő Master mix-re cseréltem. A kiindulási DNS minták megegyeztek a korábbi vizsgálatoknál leírtakkal. A probe-okat az Integrated DNA Technologies szintetizálta.

Név	Szekvencia 5'-3'
GAPDH	CCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGA
Minor	TCACGATGGATCACAGGTCTATCACC
TD1	CCCTCCCACTCCCATACTACTAATCTC
TD2	CGCTTCTGGCCACAGCACTTAAAC

10. táblázat: A fent leírt primerekkel együtt alkalmazott saját tervezésű fluoreszcens probe-ok szekvenciája

5.3.5. Statisztikai analízis

A kísérleti adatokat (fluoreszcencia értékek és az ezek alapján készült amplifikációs görbék) a BioRad CFX 96 PCR készülék saját programjával gyűjtöttem össze. Az adatokat ezután MS Excellel rendszereztem. Mivel küszöbciklusok nem lineárisak és inverzek a mennyiségükben, bevezettem a virtuális példányszám-transzformációt a ciklusidőkből, amely már lineáris, lehetővé téve a nyers adatok statisztikai feldolgozását. Az adatokat a statisztikai elemzésekhez az $1/(2^{Ct}) = E$ egyenlettel linearizáltam.

A sejtmagok, a mitokondriumok és a deléciós mitokondriumok térfogategységre eső számarányát a GAPDH, Minor, CD minták mért Ct (küszöbciklus) értékeiből számítottam az 1/(2^Ct) képlet alkalmazásával.

A statisztikai elemzés során felhasznált kísérleti adatokat átlag \pm SD formátumban mutatom be, mivel a donorok minden dózishoz tartozó mintájából két párhuzamos mérés készült. A nem megfelelő termék képződése miatt kizárt mérési pontok azt eredményezik, hogy az egyes pontokhoz eltérő számú mérési eredmény társulhat. A több mérési eredménnyel rendelkező pontokon a pontok átlagát rendeltem az adott donorhoz. Ez alól kivételt képez a statisztikai ellenőrzés folyamán elvégzett normalitás teszt, ahol a pontokat külön vettem figyelembe.

A 4977 bp-os mtDNS deléciós arányát egyirányú varianciaanalízissel vizsgáltam. Az összes statisztikai elemzést 'ratio paired' t-ptóbával végeztem, GraphPad Prism6 statisztikai szoftver segítségével. A P <0,05 értéket statisztikailag szignifikáns különbségnek tekintem.

5.3.6. A PCR termékek ellenőrzése

5.3.6.1. A PCR termékek ellenőrzése az olvadáspontok alapján

Az interkalálódó festékkel elvégzett PCR esetében bármilyen termék fluoreszcens jelet ad, ahol amplifikáció történik. Az amplifikáció végén azonban olvadási görbék felvételével pontosan ellenőrizhető a specifikus termék jelenléte. Ennek lényege, hogy a reakció során keletkezett termékeket a készülék nagyon lassan, fokozatosan melegíti fel. Amikor a termék eléri az olvadáspontját, a DNS két szála elválik egymástól, a festék elválik a DNS-től, a fluoreszcencia így hirtelen lecsökken. A melegítés során detektált fluoreszcencia adja az olvadási görbét ("melting curve"), melynek deriváltjáról olvasható le az olvadási hőmérséklet.





5.3.6.2. A PCR termékek ellenőrzése gélelektroforézissel

A PCR termékeket etídium-bromiddal festett, 1%-os agaróz gélelektroforézissel választottam el. Az elkészült gélek értékelését Alpha Innotech Fluorchem 5500 Gel Imaging System készülékkel végeztem. Az értékelés során csak azokat a mintákat vettem figyelembe, amelyekben a gélelektroforézis során a várt termék jelent meg (8. táblázat). Ahol nem, azt az értéket nem vettem figyelembe a számításnál, ha mindkettő jó volt átlagolással képeztem a mérési pontot, azzal számoltam tovább. Mivel a használt primerpár más típusú törléseket is kimutathat, azok a minták is kizárásra kerültek, ahol a várt termék mellett más termékek is megjelennek, és a nem várt termék hangsúlyosabb.


33. ábra: CD vizsgálathoz készült PCR termékek gélelektrofortikus képe. Balról a 7. és

a 14. pozícióban levő termékek kizárásra kerültek az adatfeldolgozásból a nem megfelelő termék képződése miatt (a 2. és a 11. pozícióban nem található minta, míg az utolsó kettőben rendre a Minor és a GAPDH gének amplifikált terméke található). Saját felvétel

5.3.7. A biológiai minta kiválasztásának elve CD és TD kimutatására

Az emberi szervezetben rengeteg sejttípus létezik, amely alkalmas lehet a mitokondrium változásainak vizsgálatára. A megfelelő mintatípus kiválasztásánál fontos szempont volt, hogy könnyen hozzáférhető biológiai mintát válasszak. A módszerbeállítás kezdeti lépéseit Jurkat sejtvonalon végeztem. Ez egy humán T limfocita eredetű sejtvonal, vagyis a humán mitokondriumokra tevezett PCR primerekkel működik, a teljes vérre tervezett méréseimhez jó modellnek tűnt. Az állatkísérletes mintákat éppen a mitokondriumok fajok közötti eltérései miatt nem tartottam célravezetőnek. A Jurkat sejtek hátránya, hogy immortalizált sejtvonal lévén állandó osztódásban van, ezáltal a repair enzimek is másképp működnek, mint a keringésre jellemző nyugvó limfocitákban.

A kísérletsorozat következő lépéseként már valódi vért használtam kiindulási mintának. Mivel munkahelyemen, az MH EK JTKI-ban hagyománya volt a PRP frakció, azaz a vérlemezkedús vérplazma használatának más mérésekben, ez célszerű választásnak tűnt, mivel a vérlemezkék nem tartalmaznak sejtmagot, mitokondriumot viszont igen. Irodalomból ismert, [245] hogy ionizáló sugárzásra in vivo érzékenyen reagálnak. A vérlemezkedús plazma után következő mintatípusként a teljes vér használhatóságát vizsgáltam, mint kiindulási minta.

A vizsgálatokhoz a vérmintákat nátrium-citráttal alvadásgátolt vérvételi csövekbe vette az erre kiképzett szakszemélyzet. A laboratóriumi gyakorlatban a vérlemezkéken végzett vizsgálatokhoz a nátrium-citrátot használják leggyakrabban, mint alvadásgátlót (a véralvadás gátlása mellett is lehetővé teszi a vérlemezkék aktivációját), ezért a vizsgálataimhoz én is ezt alkalmaztam. Ez alól kivételt képeznek a bleomycinnel végzett vizsgálatok, ahol lítium-heparinnal kezelt csövekbe történt a vérvétel, mivel a bleomycin nem stabil savas közegben és ez az alvadásgátló a legkevésbé savas kémhatású a forgalomban levő vérvételi csövek közül.

5.4. CD kimutatása Jurkat sejteken (Előkísérlet)

5.4.1. Hipotézis

A Jurkat sejtvonal egy limfocita eredetű sejtvonal, amely használható modellsejtnek a PCR vizsgálatokhoz. Nem volt szükség vérvételre, (így etikai engedély sem szükséges hozzá) és már a kutatásom kezdetén rendelkezésre állt. A Jurkat sejtvonallal kezdtem a mérés beállítását. Ezzel az eljárással a vérvételt ebben az esetben a Jurkat sejttenyészetből történő mintavétel helyettesítette.

Később hátránynak bizonyult az erőteljes és a sejtek állapotától, sejtsűrűségtől függő, változó osztódási ráta, ami megnehezítette a sejtszám beállítását hosszabb időre, a mérés időtartamára. Mivel az osztódó és a nyugvó sejtek sugárérzékenysége eltérő, a Jurkat tenyészet csak korlátozottan volt alkalmas a mérések modellezésére, azonban a módszer technikai részleteinek a beállításához megfelelő volt. Ennek megfelelően a további méréseket vénás véren végeztem.

5.4.2. Módszer

A minták besugárzása az 5.1 fejezetben leírtak szerint történt. A minták besugárzása sejttenyésztő flaskákban történt, az 5.1. fejezetben leírt tenyésztő médiumban. A

besugárzás és a nukleinsav izolálás közt eltelt idő 24 óra volt. A nukleinsav izolálást QIAamp DNA Blood Mini Kit segítségével végeztem, a gyártó ajánlása alapján. Az így kapott teljes DNS izolátumokat használtam fel a polimeráz láncreakció (PCR) vizsgálatokhoz. A PCR reakció során SYBR Green interkalálódó festéket tartalmazó Master mixet (Quantinova) használtam. A méréseket BioRad CFX96 Real-Time PCR készüléken végeztem. A fent ismertetett primerekkel a vizsgálati rendszerben a GAPDH, a Minor és a CD szakaszok egymáshoz viszonyított mennyiségét vizsgáltam.





34. ábra: A CD és a Minor primerpárokkal az első szakaszon. exponeciális görbéket látunk. Jurkat sejt izolátum minta, 0, 0.5 és 2 Gy besugárzás után. BioRad CFX96 készülék. Saját diagram

A Jurkat-sejteken történő méréssorozat a későbbi, tényleges mérések beállításában játszott fontos szerepet, de csak korlátozottan alkalmas a limfociták működésének a modellezésére. A tenyészet alkalmas volt a mérési rendszer alapvető paramétereinek a beállítására.

5.4.4. Következtetés

Az előzetes eredmények bebizonyították, hogy a tervezett kísérleti rendszer önállóan limfocitákon is működik, így feltételezhetően a vér többi alakos elemének esetében is működni fog.

5.5. CD kimutatása vérlemezkedús frakcióban (PRP) (Előkísérlet)

5.5.1. Hipotézis

A vérlemezkék nem osztódnak és nincs sejtmagjuk sem, így DNS tartalmuk mitokondriális eredetű. Sugárhatásra nagyon érzékeny, ezért várható sok common deléció kialakulása.

5.5.2. Módszer

A vért vénás vérvétel útján, nátrium-citráttal alvadásgátolt vérvételi csövek felhasználásával, szakképzett személyzet gyűjtötte. A mintákat a besugárzandó dózisok számának megfelelően 1,5 ml térfogatú mikrocentrifuga csövekbe osztottam szét, légköri oxigén alatt a csövekbe 1,4 ml vért adtam. A levett vér PRP frakcióját 15 percig 100g-n történő centrifugálással választottam el. A minták besugárzása az 5.1 fejezet szerint történt, a PRP frakció készítése a besugárzás után 24 órával, közvetlenül az izolálás előtt történt.

A nukleinsav izolálást a PRP frakcióból QIAamp DNA Blood Mini Kit segítségével végeztem, a gyártó ajánlása alapján. Az így kapott teljes DNS izolátumokat használtam fel a polimeráz láncreakció (PCR) vizsgálatokhoz.

A PCR reakció során SYBR Green interkalálódó festéket tartalmazó Master mixet (Quantinova) használtam. A méréseket LightCycler 2.0 Real-Time PCR készüléken végeztem. A fent ismertetett primerekkel a vizsgálati rendszerben a Minor és a CD szakaszok egymáshoz viszonyított mennyiségét vizsgáltam. Magi markert ebben a kísérleti felállásban nem vizsgálam, mivel a vérlemezkék nem rendelkeznek sejtmaggal. A kíserleti adatok statisztikai feldolgozása az 5.3.5. fejezet alapján történt.

5.5.3. Eredmények

A mintáknak nagy volt a szórása a preparátum készítése miatt, ezért a kiindulási értéket, a kontroll értéket egységnyinek tekintettem. Amint az a 35. ábrán látszik, a deléciós DNS mennyisége növekszik a kontroll mintákhoz képest és maximumot mutat 0.5 Gy besugárzás hatására. Tovább vizsgálva a körülményeket azt tapasztaltam, hogy a mitokondriális DNS maga is hasonló képet mutat. Ez azonban csak DNS szintézissel magyarázható. A két mérés hányadosából az látszik, hogy a DNS szintézis erőteljesebb, mint a CD kialakulás.



35. ábra: A mitokondriális DNS detektálása vérlemezke frakcióban. Ez a növekedés 24 órával a besugárzás után csak DNS szintézissel magyarázható. Saját diagram



36. ábra: A mitokondriális DNS deléciók a vérlemezke frakcióban növekedést mutattak egy harang görbe alapján. A maximum 0,5 Gy-nél volt megfigyelhető. Saját diagram



37. ábra: A mitokondriális DNS és a deléciók detektálása vérlemezke frakcióban. A hányados a mtDNS-re jutó deléciós mtDNS molekulák arányát jelzi. Saját diagram

A CD forma növekedését nem látjuk az ábrán, sőt mintha csökkenés történne, bár nem szignifikáns. Az előző grafikonokból arra következtetek, hogy a mitokondriumok aktiválódása és az mtDNS szintézise, és a deléciós forma eliminációja kezdődött meg a sugárzás hatására. Ebben a mérésben még nem alkalmaztam magi markrert, így nem lehet megmondani, hogy a jelenlévő limfociták magi DNS szintézise szintén beindul-e a háttérben.

5.5.4. Következtetések

A CD forma mennyiségének növekedését ionizáló sugárzás hatására vérlemezkkedús preparátumban sem igazolni, sem kizárni nem sikerült.

A centrifugálással készített vérlemezke preparátumokat mikroszkóppal is megvizsgáltam, ennek során azt tapasztaltam, hogy a preparátumok limfocitákkal kis mértékben szennyezettnek, azonban az egyes preparátumok limfocita tartalma eltért. Ez a későbbi vizsgálatok során jelentős fokú bizonytalanságot okozott, ugyanis az eredmények azt mutatják, hogy a preparátum készítése nem jól reprodukálható és az alacsony DNS tartalom miatt nehézségek léptek fel az izolátumok minőségével kapcsolatban is. Léteznek tiszta vérlemezkéket előállító preperátumok is, de ezek biodozimetriai célból nem gazdaságosak. A rossz reprodukálhatóság és a magas szóás ellenére az eredmények bíztatóak. Az eredmények értelmezésében nehézséget jelent, hogy nem ismert milyen a DNS repair szintje egy olyan sejtorganellumban, aminek már nincs sejtmagja. A deléció kialakulásánál a láncvégek összekapcsolásához ugyanis szükséges az enzimek működése, ez sejtmag híján nehézségekbe ütközhet. A vizsgálatok során már a kezeletlen mintáknál is magas volt az értékek szórása így a változás mértékét ábrázoltam a kezeletlen minták átlagához viszonyítva, azonban ez ugyan azt mutatja, hogy van változás a dózis növekedésével, a magas szórás értékek miatt az eljárás dozimetriai vizsgálatokra nem alkalmas. A vérlemezkék élettartama a keringésben 7-10 nap, így a vizsgálat gyakorlati alkalmazhatósága korlátozott.

A minor marker növekedése a kontrollhoz képest a besugárzott mintákban, különösen 0,5 Gy körül a mitokondriumok aktivációjára utal. A vizsgálat felhívta a figyelmet a vérlemezkék heterogenitására és komplex viselkedésére. A fiatal vérlemezkék a keringésben több mRNS-t tartalmaznak a citoplazmában, a levett vérben 24 óra múlva már kevesebb RNS tartalmú vérlemezke van. [246] Arra vannak adatok, hogy a vérlemezkében is folyik DNS szintézis, azonban a repair tevékenységet nem sikerült detektálni. [247] Tekintettel arra, hogy a levett vért sugározzuk be, a vérlemezkék öregedésével, és az ebből adódó szórással is számolni kell. Ezen kívül aktiválódás esetén a fehérvérsejtekhez kötődhetnek, ezért egy része esetleg nem jelenik meg a PRP frakcióban. Ez mindenképpen egyfajta szelekciót jelent. A később alkalmazott teljes vér preparátumnál, amelynek ez a frakció is szerves alkotórésze ezekre a körülményekre is figyelemmel voltam. A későbbiekben még érdekes lehet majd az egyes sejttípusok teljes mitokondriális DNS-ének külön-kölön vizsgálata a specificitás növelésére, azonban a vérlemezkedús frakció - bár egyszerűen, gyorsan előállítható, a sejtszennyezés, és az esetleges szelektív vérlemezke vesztés miatt nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket a dozimetriai fejlesztés szempontjából.

5.6. CD kimutatása teljes véren, ionizáló sugárzás hatására

5.6.1. Hipotézis

Számos közlemény jelent meg arról, hogy teljes vérből nem minden esetben mutatható ki egyforma mértékben a CD forma. [248][249] A CD kimutatására a legtöbb szerző

sejtvonalakat vagy állandósult szövetek primer preparátumát használja. [<u>17</u>][<u>223</u>] Én ennek ellenére a teljes vért választottam, mert a vér az egyik legkönnyebben hozzáférhető szövet, a párhuzamosan zajló hagyományos biodozimetriai vizsgálatokban is ezt használják.

A vérlemezkéken végzett mérések arra engedtek következtetni, hogy a sejtmag hiánya csökkenti a módszer alkalmazhatóságát, így feltételezhető, hogy a teljes véren végzett vizsgálatok a vér komplexitása okán hitelesebb képet adnak a módszer alkalmazhatóságáról és csökkentik az adatok szórását.

5.6.2. Módszer

A mintákat a besugárzandó dózisok számának megfelelően 1,5 ml térfogatú mikrocentrifuga csövekbe osztottam szét, légköri oxigén alatt a csövekbe 1,4 ml vért adtam. A vákuum fontos, hogy elkerüljük a vérminta atmoszférikus oxigénnel való érintkezését, hogy megőrizzük vénás jellegét, mivel a mitokondrium szabad gyökök képződését befolyásolhatja az oxigén mennyisége. [2] A vér színe a vér oxigénellátásának indikátora.



38. ábra: A vér színe változik az oxigenizáltság fügvényében. A bal oldali csőben a vér több oxigénnel volt inkubálva, így az világosabb színű, mint a jobb oldali minta, ahol a vérminta fölött kevesebb levegő maradt a csőben. Saját felvétel

A minták besugárzása az 5.1 fejezet szerint történt. A besugárzás a vérvétel után 2 órával történt, a DNS-izolálás a besugárzást követően 3, 24, illetve 48 órával végeztem el. A besugárzást követően a vérmintákat 3/24/48 órán át szobahőn fénytől védve inkubáltam. A nukleinsav izolálást QIAamp DNA Blood Mini Kit segítségével végeztem, a gyártó ajánlása alapján. Az így kapott teljes DNS izolátumokat használtam fel a polimeráz láncreakció (PCR) vizsgálatokhoz. A PCR reakció során SYBR Green interkalálódó festéket tartalmazó Master mixet (Quantinova) használtam. A méréseket BioRad CFX96 Real-Time PCR készüléken végeztem. A fent ismertetett primerekkel a vizsgálati rendszerben a GAPDH, a Minor és a CD szakaszok egymáshoz viszonyított mennyiségét vizsgáltam. A PCR-termékeket az 5.3.4 fejezet szerint agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. A kíserleti adatok statisztikai feldolgozása az 5.3.5. fejezet alapján történt.

5.6.3. Eredmények

5.6.3.1. GAPDH

Glicerinaldehidfoszfát-dehidrogenázt (GAPDH-t) egyetlen nukleáris gén kódolja, amely a 12-es kromoszómán helyezkedik el. Kromoszómális elhelyezkedése 12p13.31. Ennek az amplikonnak a mennyisége a sejtek számára utal, a DNS-szintézis fokozza, az apoptózis csökkenti a kópiaszámot. Természetesen a génnek két példánya van a diploid magban. A GAPDH szint változása a DNS szintézist vagy a sejtpusztulást tükrözheti.

A virtuális példányszám változását a GAPDH (magmarker), a Minor (mitokondriális marker) és a CD (deléciós marker) Ct értékeiből számítottam.

A GAPDH gén mennyiségében nem tapasztalható szignifikáns különbség a nem besugárzott mintához képest.



39. ábra: GAPDH gén mennyisége besugárzás hatására 3 órával a besugárzás után. Saját diagram



40. ábra: GAPDH gén mennyisége besugárzás hatására teljes vérben. A sejtenkénti nDNS mennyiség a besugárzás után egy nappal sem mutat jelentős változást az alkalmazott röntgen besugárzás dózisának függvényében. Vagyis sem jelentősebb nDNS szintézis, sem degradáció nem mutatható ki. Saját diagram

Az ábrából talán úgy tűnik, bár statisztikailag nem igazolható, hogy a sugárzás 0,5-1 Gy körül a limfociták osztódását megindítja, 2-4 Gy körül a sejtpusztulás jelei láthatók, különösen a hosszabb, 24 órás inkubálás után. Ez utalhat a limfociák aktiválódására, ami a sugárzás hasznos hatása lehet, illetve a nagyobb dózisoknal a citotoxikus hatásra, ami a sugárterápia alapja, azonban nem tekinthetünk el attól, hogy ez ex vivo vérminta, a hatások eltérhetnek a szervezetben tapasztaltaktól.

5.6.3.2. Minor

A Minornak nevezett termék a mitokondriális DNS kisebbik ívéből származik, erről lett elnevezve. [244] Ez a szekvencia nem tartalmaz hipervariábilis részt, és ez a régió ritkán szenved deléciót. Ennek a terméknek az mennyisége a sejtekben az mtDNS szintézisének köszönhetően növekedhet, mitofágia során csökkenhet. Ilyen hatást azonban nem tapasztaltam ebben a mérésben, vagyis a mitokondriumok száma jó vonatkoztatási alapot ad a deléció vizsgálatához.

Az GAPDH-val (40. ábra) arányosan változott a mitokondriumok száma is, így a hányadosuk gyakorlatilag állandó (NS, P> 0,05, aránypáros t-próba).



41. ábra: Teljes vérben a sejtenkénti mtDNS mennyiség a besugárzás után 3 órával nem mutat jelentős változást az alkalmazott röntgen besugárzás dózisának függvényében.
Megjegyzés: a magvas sejtekben a GAPDH 2 kópiával van jelen, vagyis egy sejtre kb.
80-90 mtDNS jut. Nagy azonban a különbség az egyes sejtes alkotók mitokondrium száma között. [250] Saját diagram



42. ábra Teljes vérben a sejtenkénti mtDNS mennyiség a besugárzás után egy nappal sem mutat jelentős változást az alkalmazott röntgen besugárzás dózisának függvényében. Vagyis sem jelentősebb mtDNS szintézis, sem degradáció nem mutatható ki. Saját diagram

Az ábrából látható, hogy a mitokondriumok sejtenkéni száma nem változik jelentősen az ionizáló sugárzás hatására az általunk alkalmazott dózistartományban sem 3 sem 24 óra elteltével. Ez azt mutatja, ha indul is DNS szintézis a magban, ezzel az mtDNS szintézis lépést tart, így a hányadoson nem kimutatható a változás.

5.6.3.3. A common deléciós "CD" marker

A vérlemezke preparátumon tett előkísérletek alapján, mikor is a Minorral való osztás után - mivel az egészséges mitokondiumokra vonatkoztattam - elveszett a CD változás kimutathatósága, a CD marker vizsgálatára a korábbi időpont tűnt igéretesnek, a besugárzástól számított 3 órás, amikor még a gemomi és a mitokondriális DNS esetleges szintézisével kevésbé kell számolni. Amint az az előző 2-2 grafinon összehasonlításával megfigyelhető, ebben az időpontban a GAPDH és a min marker is egyenlenesebb, változás nélküli képet mutatott, kisebb szórással, mint a 24 órás. Természetesen arra is kíváncsi voltam, így 24 órás preparátumok is készültek. A deléciós mitokondriális DNS mennyisége a besugárzás hatására érzékenyen változik. Jelen kísérleti körülmények között megfigyelhetjük, hogy a CD marker érzékenyebben reagál a sugárexpozícióra, mint az mtDNS markere a Minor. A CD marker tekintetében a kis dózisoknál tapasztalható emelkedés után nagyon meredek esés látszik, ami már 1 Gy-nél is megfigyelhető.



43. ábra: A deléciós és az egészséges mtDNS arányának változása a besugárzott dózis függvényében 3 óra elteltével (n=7). 0-0,5 Gy között emelkedést tapasztalható, ami 1 Gy-nél visszaesik az alapszintre. Saját diagram



44. ábra: A deléciós mtDNS molekulák aránya az mtDNS teljes mennyiségéhez
 viszonyítva a besugárzás után 3 órával. Saját diagram

A CD arány egy ideig nő, majd csökken és talán újabb növekedés is történne, azonban ez már nem látszik az általam választott dózistartományban. Ilyen viselkedés mögött általában minimum két ellentétes hatás áll. Az előzőekből látható, hogy az alkalmazott dózistartományban a relatív sejtszám nem változott, és a mitokondriális DNS teljes mennyisége enyhe csökkenést mutatott nagy dózisok esetén. Ez utóbbi valószínűleg a sugárzás által kiváltott apoptózis kezdetét jelzi, amely a besugárzás után 3 órával sejtszinten/a magi gének szintjén nem mutatható ki. Ennek megfelelően a Minor marker mennyisége csökken, míg a GAPDH esetében ez nem figyelhető meg. A deléciós mtDNS aránya alacsonyabb dózisoknál a besugárzott dózist függvényében növekszik, nagy dózisoknál ez az arány jelentősen csökken, ami valószínűleg annak is köszönhető, hogy a mitofágia folyamata először a sérült mitokondriális DNS-t érinti. [251] Feltételezhetően kevesebb DNS kettős törés esetében a repair, míg több törés esetén a DNS degradációja van túlsúlyban. 24 órával a besugárzás után, bár a kép némileg még emlékeztet a 3 órásra, a CD képződés mintázata megváltozik. Ez talán abból a tényből adódik, hogy a CD képződése nem eléggé sugárzásspecifikus, és egy 24 órával korábban levett vérmintában lehetnek olyan fizikai, biokémiai hatások, amik a képződést elősegíthetik. A 43. és a 44. ábrát összevetve azt látjuk, hogy a mintákban eltérő mértékben ugyan, de a CD-t tartalmazó mtDNS aránya növekedet. Mindenesetre törekedni kell majd minél frissebb vérrel beállítani a későbbi dozimetria tesztet.

5.6.4. Következtetések

A kapott adatok alapján elmondható, hogy mivel az általam detektált deléció egy enzimes, aktív repair folyamat során alakul ki, ennek az időigényével is számolni kell. A CD/Min eredmények maximumot mutató görbe lefutása emlékztet a Schilling at al [17] által (sejttenyészeten, de hasonló kísérleti összeállítással) kapott görbe lefutására, ami arra utal, hogy feltehetően általános érvényű jelenséggel szembesültem. Az eredmények ex vivo 48 óra elteltével már nehezen reprodukálhatóak, a hosszú távú alkalmazhatóság meghatározására feltehetően állatkísérletes modell beállítására lesz szükség.

5.7. A CD kimutatása teljes véren, bleomycin kezelés után

5.7.1. Hipotézis

A radiomimetikus vegyületeket és hatásaikat a 2.6. fejezetben ismertettem. Az Országos Onkológiai Intézet jóvoltából volt alkalmam az ionizáló sugárzás hatását összehasonlítani a bleomycin hatásával, a dicentrikus kromoszóma analízis és a "common deléció" alapú PCR módszer segítségével. A bleomycinre vonatkozó DIC eredményeket az 5.1.4. fejezetben már ismertettem.

A bleomycin erős citosztatikus hatású vegyület, mely dicentrikus kromoszómák kialakulását is képes előidézni. Mivel az ehhez szükséges törések kialakulásával párhuzamosan a mitokondriális deléciók kialakulásához szükséges DNS töréseket is kialakíthatja, potenciálisan növelheti a "common deléció" mennyiségét a kezelt mintákban.

5.7.2. Módszer

A Li-heparinos vérvételi csőben levett vérminták bleomycinnel történő kezelése a DIC és a CD módszer esetében megegyezett, azaz a bleomycint három különböző végkoncentrációban (0-10-30µg/ml) a tenyésztés előtt adtam a tápoldathoz és pontosan 3 órát inkubáltam vele, ezután történt az első DNS izolálás. A tenyésztett vérből 2,5 ml oldatot vettem ki, lecentrifugáltam (2500 rpm, 5 perc), majd a felülúszót eltávolítottam és a pellet teljes térfogatát használtam DNS izoláláshoz (QIAamp DNA Blood Mini Kit). A második DNS izolálás 24 óra, a harmadik pedig 48 óra inkubálás után történt, olyan módon, hogy ezekből a csövekből is eltávolítottam 3 óra után a bleomycint centrifugálással.

A PCR vizsgálatok körülményei és a beállítások megegyeztek az 5.3. fejezetben leírtakkal. Ebben a vizsgálatsorozatban a GAPDH, a Minor és a CD szakaszok egymáshoz viszonyított mennyiségének meghatározását végeztem. A kísérleti adatok feldolgozása is az 5.3.5. fejezetben leírtaknak megfelelően történt.

5.7.3. Eredmények

Feltételezve, hogy a DNS törés és a repair mechanizmusa hasonló az ionizáló sugárzásnak és a bleomycinnek történő expozíció esetben, az 5.3.9. fejezetben bemutatottakhoz hasonló eredményeket vártam a bleomycinnel kezelt vérminták vizsgálat során is.





45. ábra: Bleomycin hatása a GAPDH magi marker mennyiségére. Saját diagram

A magi marker tulajdonképpen nem mutat változást egyik vizsgált időpillanatban sem, ez arra utal, hogy a bleomycin kezelés (0-10-30 µg/ml) nem indított sem DNS szintézist, sem pedig DNS degradációt a magban. (Alacsony dózisú sugárzás esetén más

preparátumban megfigyeltem DNS szintézisre utaló emelkedést, bleomycinnél nem ez a helyzet) Saját diagram



5.7.3.2. Minor



Az mtDNS mennyisége a GAPDH-hoz hasonlóan nem mutat változást a bleomycin kezelést követő 3-24-48 órában. Ez alátámasztja a magi marker által mutatott eredményeket.



47. ábra: Deléciós mtDNS aránya a bleomycin és a kezeléstől eltelt idő koncentráció függvényében. Saját diagram

Az eredményekből az látszik, hogy a 30µg/ml bleomycint tartalmazó csövekben nem szignifikánsan, de csökkenő tendenscia fedezhető fel a deléciós forma arányában a deléciós forma aránya. A kezeletlen és a 10µg/ml bleomycint tartalmazó mintákban egymáshoz viszonyítva minden vizsgált génszakasz mennyisége és aránya változatlan volt. Az előző ábrával összevetve láthatjuk, hogy a deléciós mtDNS érzékenyebb a bleomycinre, mint az egészséges. Nem valószínű, hogy a delécióval több bleomycin kötőhely alakulna ki, valószínűleg a mitokondriumok membránja kevésbé stabil, ami könnyebb bejutást tesz lehetővé a molekulának. Korábban a 43. és 44. ábrán sugárzás esetében is megfigyelhető átmeneti CD növekedés azonos mintában, 24 óra elteltével. Ez a Bleo-30 mintánál is megfigyelhető, ennek a magyarázatához is további vizsgálatokra lesz szükség. Az azonban látszik, hogy a bleomycin láthatóan csökkenést okoz a CD mennyiségében.

5.7.4. Következtetések

Az irodalmi adatok alapján elmondható, hogy a bleomycin a DNS törés tekintetében az 5'-TGTA tetranukleotid szekvenciát részesíti előnyben. [252] Figyelembe véve, hogy a

mtDNS-ben a fenti szekvenciák többsége úgy helyezkedik el, hogy DNS törés esetén abból nem alakul ki CD, a bleomycin által kiváltott CD képződés mennyisége elmarad az ionizáló sugárzás ugyanezen hatásától. Wang és munkatársai [242] munkájukban nem tudták kimutatni a CD jelenlétét bleomycin kezelés hatására HepG2 (hepatoblastoma) sejtvonalon. Saját méréseim alapján én is azt tapasztaltam teljes véren, amit Wang és munkatársai a HepG sejtvonalon, hogy nem volt kimutatható CD növekedés bleomycin hatására. Az eredményekből az látszik, hogy a bleomycin egyik alkalmazott dózisban, olyan dózisban, amely DIC-eket kialakít, sem növeli meg a kialakult CD arányát mtDNS teljes mennyiségén belül. Ez alapján feltételezésem szerint a mtDNS szekvenciájában nincs, vagy csak kevés olyan szakasz található, ahol a bleomycin képes törést okozni és ezzel CD kialakulását indukálni. A 10 és a 30 µg/ml bleomycin koncentrációval kezelt vérminták elgondolkodtató eredményt adnak. A 10 µg/ml-es mintában a CD aránya a kontrollhoz képest gyakorlatilag nem mutat változást a három vizsgált időpillanat egyikében sem. 30 µg/ml bleomycin-nel kezelt mintákban azonban, csökkenés mutatkozott. A GAPDH és a Minor gének változatlan mennyiségéből látszik, Az eredményekből kitűnik, hogy sem sejtosztódás (magi DNS szintézis) nem volt, sem a mitokondriumok nem osztódtak, így ez nem állhat a deléciós mtDNS arányának csökkenése mögött. Elképzelhető, hogy a bleomycin a CD-t tartalmazó DNS molekulák szelektív degradációjához vezetett. Potenciális magyarázat lehet, hogy a bleomycin alapesetben nem képes átjutni a mitokondriumok membránján és ez az állapot változik meg a magasabb dózis esetében, mivel például a keletkező szabad gyökök károsíthatják a membránt. A CD-tartalmú mtDNS vesztés valószínűleg közvetett hatással jön létre. A károsodott mitokondriális DNS-t tartalmazó részt a mitokondrium képes lefűzni, a sejt képes aktív lebontás vagy mitofágia útján eltávolítani. [155] Potenciális magyarázat lehet az is, hogy a sugárzással ellentátben a bleomycin nagyobb valószínűséggel töri el a DNS-t több ponton is, az így eltört molekulát a sejt azonban nehezebben javítja ki (többek között a hisztonfehérjék hiánya miatt), így a CD sem tud kialakulni. Az 5.3.2 fejezetben említettem, hogy a Major és a Minor markerek mennyisége közt sem volt kimutatható a különbség, mert nagyon kevés a CD-vel rendelkező mtDNS, vagyis nem látszik a hiánya a több nagyságrenddel nagyobb mennyiségben jelenlevő markerhez képest. Az alacsony vizsgálati elemszám miatt mindezek megerősítéséhez, valamint a háttérben álló mechanizmus megismeréséhez további vizsgálatokra lesz szükség.

5.8. Mitokondriális tandem duplikáció (TD) kimutatása teljes véren, ionizáló sugárzás hatására

5.8.1. Hipotézis

Lee és munkatársai [197] már a 90-es évek elején megfigyeltek két tandem duplikációt, (egy 260 és egy 200 bp) idős személyek izmainak mitokondriumában. [197] A 200 bpos duplikációt életkorfüggőnek találták. Mások azt is megfigyelték, hogy gyakran fordul elő a common delécióval együtt. [211] A mitokondriális tandem duplikációk előfordulásának az ionizáló sugárzással való kapcsolatát eddig még nem vizsgálták. úgy gondolom, nehezen különíthető el az akkumulálódott dózis és az életkor hatása mivel sugárzás egész életünk során éri a szervezetünket. Az említett 200 bp hosszúságú duplikáció ezért ígéretes lehet biodozimetriai célokra, ha ez egy, a "common deléció" esetében alkalmazotthoz hasonló vizsgálati rendszerben kimutathatóvá válik. Remélhetőleg hosszabb távon kimutatható markert találok így, ugyanis nem esik ki génszakasz, ezért kisebb szelekciós nyomással kell számolni, így hosszabban megmarad az elváltozás, mint pl. CD esetén, ahol sok gén kiesik.

Mivel az általam tervezett primerpár elméletileg több ismert duplikációt is amplifikálhat, az átfedések miatt a későbbiekben tervezem szekvenálással igazolni, hogy a 301-493 pozícióban levő szakasz duplázódásáról van-e szó a sugárzás esetén. Mivel a leírt duplikációk többsége spontán megjelenik az öregedés során, így ezek halmozódására lehet számítani. Interkalálódó festék alkalmazása esetén első közelítésben az adott szakaszra jellemző összes duplikáció mennyiségi meghatározása lesz célravezető.

5.8.2. Módszer

Az 5.3.2. fejezetben leírtak szerint ebben az esetben a 2 primer egymással ellentétes irányban helyezkedik el (back-to-back, de 9 bázis távolságra egymástól, így lehetett stabilabb primer párt tervezni), a primereknek ugyan van hova bekötődni, és a szintézis is elindul, de távolodva történik, nem éri el a másik primer kötőhelyét (30. ábra). A ciklusidő végén az amplifikáció változó helyen ér véget, ezért azokban a mintákban, ahol nincs specifikus termék, a gélelektroforézis során elkent folt látható. Ha a duplikáció létrejött a sugárzás hatására az mtDNA molekulán 2-2 helyre tudnak kötődni a primerek, vagyis tandem duplikáció esetén mindkét primernek még egy-egy kötőhelye alakul ki, így egy pár reverz és forward mindenképpen szembe kerül egymással, ilyen

esetben a duplikálódott szakasz exponenciálisan sokszorozódik, a gélelektroforézis során határozott sávot látunk. Ez előző gondolatmenetből következően duplikáció (és akár triplikáció) egyidejű jelenléte esetén két (triplikáció esetén három) ilyen sáv alakul ki. A gélelektroforézissel történő ellenőrzéskor az eltérő hosszúságú termékek elkülönülő sávokként jelentkeznek.

A vizsgálat módszertanilag megegyezett az 5.6.2 fejezetben leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy a kimutatáshoz használt primerek részben eltértek, valamint az 10. táblázatban bemutatott fluoreszcens probe-okat alkalmaztam. A fent ismertetett primerekkel és probe-okkal a vizsgálati rendszerben a GAPDH, a Minor szakaszok mennyiségét, valamint a TD szakasz jelenlétét vizsgáltam.



48. ábra: A jel határozott sáv formájában jelenik meg leggyakrabban 200 bp körül. Ha egy sáv sem jelent meg, a gélelektroforézis során a smear megjelenése jelzi a negativitást. A pozitivitást a smear hiánya. Saját felvétel

Minden duplikációt detektálok, ami tartalmazza a 376-427 szakaszt, és elég kicsi ahhoz, hogy adott PCR ciklus alatt az enzim a szintézis során előre haladva elérje a másik primer kötőhelyét is.

5.8.3. Eredmények

Az interkalálódó festékkel elvégzett PCR mintákból futtatott gélekben összeszámoltam a határozott sávokat. Ez az összeg az alkalmazott dózisok függvényében jól mutatja az arányosságot.



49. ábra: A duplikáció ritkább, mint a CD. A gélelektroforézis során a sávok megjelenését detektáltam, és az összegüket ábrázoltam. A kis elemszám miatt talán még nem egyértelmű az összefüggés, de ígéretes markernek tűnik. Saját diagram

A TD-t illetően az PCR vizsgálat eredményei nem egyértelműek, ugyan a fluoreszcens probe-ok alkalmazása a várakozásoknak megfelelően növelte a módszer specifitását, azonban a duplikáció annyira kis kópiaszámban van jelen, hogy ez feltehetően a módszer kimutatási határán van. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy az interkalálódó festékkel kapott eredmények egy része műtermék lehet.

Az volt a tapasztalatom a probe-os mérés során, hogy ugyanazon mintákon alkalmazva a két probe közül csak az egyik adott jelet TD-re, a másik esetében egyáltalán nem volt amplifikáció. Lehetséges magyarázat lehet a jelenségre, hogy a DNS mutációt tartalmaz a probe kötőhelyén, a duplikálódott szakaszok közti forradás helye máshol van a várthoz képest és ez interferál az egyik probe bekötődésével. A kérdésre választ adhat a PCR termékek szekvenálása, és az eredmények tükrében a probe-ok újratervezésétől specifikusabb teszt fejlesztése várható.

5.8.4. Következtetések

Méréseimben leggyakrabban egy kb 190 bp hosszúságú termék jelent meg a gélben. Ez megfelelhet a Krishnan cikk második leggyakrabb duplikáció típusának, [211] ugyanis esetemben 9 bázisnyi távolság van a két tervezett primer között, ezért ez a szakasz az amplikonból hiányzik.

A dulpikáció ritkábban fordul elő, nem rendelhető hozzá mennyiségi érték, inkább csak van-nincs megállapítás. A statisztikai analízise ezért nem kivitelezhető a CD esetében leírt módon. Az eredményeket a gélelektroforézis során kapott a specifikus sávok alapján értékelem: duplikáció 1, triplikáció 2 pont. Manuálisan összegeztem és a besugárzás függvényében ábrázoltam.

Az alkalmazott interkalálódó Sybr Green detektálás a duplikáció esetén nem a megfelelő választás, probe-os megoldásra van szükség, hogy a keletkező aspecifikus termék zavaró hatását kiküszöböljük.

Számos tanulmány talált már összefüggést a sugárzás és a CD között. A sugárzás és a TD közti összefüggés felderítésére irányában ez a munka úttörő próbálkozás. A duplikáció jobb markere lehet a sugárzásnak, mivel a mitokondriumok kevésbé valószínű, hogy mitofágia alá kerülnek, ha nem veszítenek el egy fontos gént, és a rövid génszekvencia megkettőzése nem lehet jelentős hátránya a szintézis során.

A bemutatott probe alapú PCR vizsgálat működőképesnek bizonyult, azonban az eredményekből az látszik, hogy egy konkrét duplikáció kimutatására a vizsgálat önmagában nem alkalmas az alacsony kiindulási kópiaszám miatt. Erre megoldást jelenthet például a kezdeti mtDNS kópiaszámának megsokszorozása, vagy a kapott termékek szekvenálása és a kapott adatok részletes elemzése.

AZ ELVÉGZETT KUTATÓMUNKA ÖSSZEFOGLALÁSA

Disszertációmban elsőként az ionizáló sugárzás alapvető tulajdonságait ismertetem. Részletesen bemutatom a különböző forrásokból érkező sugárterhelések fajtáit, egymáshoz viszonytott arányukat, valamint igyekszem tiszta képet adni ezeknek a sugárterheléseknek a tényleges mértékéről.

A második fejezetben áttekintem azokat a biológiai hatásokat, amiket az előző fejezetben ismertetett sugárterhelések kiváltanak az emberi szervezetben. Ennek több, egymásra épülő szintje ismert, melyeket részletesen megvizsgálok és illusztrálok. A fejezetben kitérek a fent említett károsodások egyénenkénti eltéréseire, valamint az olyan ágensek ismertetésére is, amelyek a sugárzáshoz hasonló elváltozásokat okoznak a szervezetben.

A harmadik fejezetben bemutatom azokat az eszközöket, amelyek alkalmasak az egyéni sugárterhelés meghatározására. Ezek alapvetően fizikai módszereken alapuló eszközök. Ismertetem azokat a biodozimetriai módszereket, amelyek alkalmasak erre a célra, illetve részletesebb képet adhatnak a tényleges biológiai károsodás mértékéről. Szót ejtek az egyes technikák alkalmazhatóságáról, illetve röviden áttekintem az egyes eljárások paramétereit és egymáshoz viszonyított előnyeit.

A negyedik fejezetben ismertetem a mitokondiumot és a DNSének felépítését. Ennek kapcsán bemutatom azon sajátosságait, amelyek alkalmassá tehetik biodozimetriai vizsgálatokra. Ezen tulajdonságok kapcsán megvizsgálom azokat a biológiai targeteket és eljárásokat, amelyeket rendszerbe szervezve lehetőség nyílik egy új, az eddigieknél gyorsabb és objektívebb biodozimetriai eljárás kifejlesztésére.

Az ötödik fejezetben részletesen ismertetem a kutatás során elvégzett laboratóriumi vizsgálataimat. Első lépésként a két legáltalánosabban használt citogenetikai biodozimetriai eljárást vizsgáltam, melynek során a kivitelezhetőségüket és a kiértékelésüket vizsgáltam gyakorlati szempontból. Ezután mitokondriális DNS-el végzett molekuláris biológiai vizsgálatokat végeztem, melyeket idő- és logikai sorrendben mutatok be, a módszer alapvető paramétereinek beállításától a különböző mintatípusokon elvégzett vizsgálatok részletes eredményeiig. A kapott eredményekből látszik, hogy a módszer ígéretes eszköz lehet a biodozimetria eszköztárában, különösen nagy mintaszám esetén, így katasztrófavédelmi szempontból jelentős segítség lehet.

Az elvégzett vizsgálataim alapján ajánlást tettem az eredmények felhasználására, valamint ismertettem az eredmények gyakorlati felhasználhatóságának irányait, illetve korlátait.

ÖSSZEGZETT KÖVETKEZTETÉSEK

A dicentrikus kromoszóma vizsgálaton alapuló gold standard metódus a sugárhatások detektálására alkalmas a mennyiségi analízisre vonatkozó korlátai mellett, azonban a tenyésztés és a mikroszkópos vizsgálat okozta időszükséglet triage célra való alkalmasságát erősen kétségbe vonja, ami indokolja egy olyan metódus kialakítását, amely nem csak a sugárhatások kvantitatív analízisére használható, hanem az időszükséglete megfelel triage céljára, ami adott esetben kiemelten fontos mint a honvédségi, mint az általános katasztrófavédelmi feladatok végrehajtásában.

A mikonukleusz teszt manuális feldolgozása egyszerűbb, kevesebb gyakorlatot igényel, mint a DIC módszer esetében, így az objektívebb és manuálisan is elég gyors eredményt szolgáltat. Nagyon értékes jellemzője az MN módszernek, hogy a mikronukleusz szám eloszlás alapján következtetni tudunk az elszenvedett sugárterhelés mértékére, különösen hasznos lehet ez a módszer, ha valakit résztest besugárzás ért.

A véren végzett mitokondriális vizsgálatok váratlan és rendkívül hasznos eredménnyel zárultak, mivel azt a feltételezésemet, hogy a mitokondriális DNS-ben sugárhatásra kialakuló károsodások nem csak egyértelműen bizonyítják az elszenvedett dózisokat, akár a determinisztikus küszöb alatt, hanem azok mennyiségére is elfogadható szignifikanciával jellemzett információt is szolgáltatnak. Külön említésre méltó, hogy az általam vizsgált radiomimetikum, a bleomycin hatása élesen elkülöníthető a sugárhatástól, ezáltal a módszer egyfajta specifikus jelleget hordoz a sugárzás vonatkozásában. Természetesen az egyéb kémiai reagensek az adott vizsgálatokra vonatkozó interferencia hatását még szükséges kutatni.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK, TÉZISEK

- Laboratóriumi vizsgálatokkal, az adatok elemzésével *igazoltam*, hogy sugárterhelés tényét a laboratóriumunk által is használt kromoszóma aberrációs módszerrel, a DIC-ek jelenléte alapján jó pontossággal tudjuk igazolni vagy kizárni, azzal a fenntartással, hogy figyelembe kell venni az esetleges radiomimetikumok által okozott DIC-ek esélyét is. Továbbá *igazoltam*, hogy a sugársérülés mértékére a DIC módszerrel csak közelítő becslést tehetünk, több külső tényező és más tesztek eredményeinek figyelembevételével és annak ellenére, hogy az eljárás gold standard metódusként alkalmazott, valamint a NAÜ és más nemzetközi szakmai szervezetek által ajánlott módszer, a viszonylag kis (D < 1 Gy) determinisztikus dózisok esetén a munkám tapasztalatai szerint csak feltételesen alkalmazható.
- Laboratóriumban végzett kísérletekkel *igazoltam*, hogy a manuális MN mérés hasznos adattal szolgál, nem csak a sugársérülés mértékére, hanem a sugárbehatás *testi eloszlására* is, ezért további automata mikroszkópos fejlesztésre érdemes.
- Laboratóriumi kísérletek során *igazoltam*, hogy a Jurkat sejtek tenyészete alkalmas a később teljes véren végzendő PCR mérési rendszer alapvető paramétereinek a beállítására, és ajánlom másoknak is hasonló célból.
- 4. Besugárzásos kísérletekkel megállapítottam, hogy a vérlemezke dús plazma preparátum a limficiták jelenléte és a magas szórás értékek miatt dozimetriai vizsgálatokra nem alkalmas. A vérlemezkék élettartama a keringésben 7-10 nap, így a vizsgálat gyakorlati alkalmazhatósága is korlátozott.
- 5. A besugárzásos kísérleteim során *bizonyítottam* azt, hogy a teljes véren a CD marker 3-24 óra közt mérhető, és ionizáló sugárzás hatására az általam alkalmazott dózistartományban (0-0,5 Gy között) szignifikáns növekedést mutat teljes vérben. Ebben a dózistartományban még nincsenek klinikai tünetek, ezért az eredmény különösen értékes támpontot ad teszt fejlesztéshez. Ezzel kapcsolatban *megállapítottam*, hogy a bleomycin, noha a DIC létrehozás tekintetében hasonlóan viselkedik az ionizáló sugárzáshoz, az mtDNS-en nem indukál CD növekedést ugyanazon dózistartományban teljes vérben.
- 6. Laboratóriumi kísérleteim során tudományosan, *elsőként bizonyítottam*, hogy teljes véren is kimutatható egy kb 200, bázis hosszúságú tandem duplikáció az

mtDNS-ben, a besugárzott vérben nagyobb valószínűséggel megtalálható. Mivel ezt az eredményt alkalmasnak ítéltem a sugárkárosodás hosszú távú kimutatására, így a rendszer finomítását próbos megoldással megkezdtem és *kidolgoztam* egy, a sugárbiológiában alkalmazható eljárás alapjait a sugárkárosodások hosszú távú kimutatására, ami beilleszthető a honvéd egészségügy sugárdózis értékelési eljárásrendjébe. Eddig senki nem foglalkozott a tandem duplikáció és az ionizáló sugárzás kapcsolatának vizsgálatával.

KUTATÁSI EREDMÉNYEK GYAKORLATI FELHASZNÁLHATÓ-SÁGA

A kutatásom szakirodalmat áttekintő része átfogóan összefoglalja az ionizáló sugárzás emberi szervezetre gyakorolt hatását, valamint ennek kimutatási lehetőségeit. Az irodalomkutatás eredményeiből jól látszik, hogy a sugárexpozíció biológiai és fizikai sajátosságai révén számos olyan terület van, ahol finomítani kell és lehet a vizsgálati rendszereken, ehhez jó kiindulási alap jelen kutatás.

A sugárterhelés kimutatására alkalmas biológiai targetek részletes bemutatása és vizsgálata azok nagy száma miatt alapvetően túlmutat jelen kutatás határain, azonban hasznos adalék lehet a jövőbeli biodozimetriai kutatások megalapozásához és új vizsgálati módszerek kifejlesztéséhez.

A kutatás eredményeként kidolgoztam egy eljárást, amely a hagyományos citogenetikai eljárásoknál gyorsabb és objektívebb, PCR alapú biodozimetriai módszer alapja lehet és a honvéd egészségügyben, továbbá a nukleárisbaleset-elhárítási feladatokban részt vevő polgári egészségügyi intézményekben is nagy segítségét nyújthat a sugárterhelések meghatározásában. A technológia konkrét biodozimetriai módszerré fejlesztése további vizsgálatokat igényel, azonban ennek tökéletes kiindulópontja lehet kutatásom.

Kutatásom során rámutattam egy új target jelentőségére, a duplikációra.

AJÁNLÁSOK

PhD értekezésemben megfogalmazott eredményeket ajánlom elsősorban azoknak, akik a sugárbiológia és a biodozimetria témakörén belül végeznek kutatást. Jelen értekezés számos hasznos információt tartalmaz a jövőbeli kutatások elkezdéséhez.

A részletes bevezető áttekintést és a témában írt összefoglaló közleményeimet ajánlom azoknak, akik most kapcsolódnak be a mitokondriális DNS károsodás, a radiomimetikumok hatása és a dozimetriai kutatásba.

A gyakorlati felhasználhatóság miatt értekezésem hasznos segédlet lehet egy nagy áteresztőképességű és objektív biodozimetriai módszer kifejlesztéséhez, mely fontos eszköz lehet a Magyar Honvédség és civil laboratóriumok eszköztárában is, mivel egy sugárexpozícióval járó katasztrófahelyzetben, vagy műveleti körülmények között jelentősen felgyorsíthatja a triage folyamatát és lerövidítheti az ellátásig vezető időt.

Ajánlom dolgozatomat további kutatások elvégzéséhez a sugárbiológia, biodozimetria és sugárvédő vegyületek témakörében.

TÉMAKÖRBŐL KÉSZÜLT ÉS LEKTORÁLT FOLYÓIRATBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓIM

Deli Gábor: A sugárkárosodás laboratóriumi vizsgálatának katonai jelentősége. In: Földi László. Szemelvények a katonai műszaki tudományok eredményeiből III. Budapest, 2022, ISBN:9789635317035; 9789635317042

Deli Gábor: Cytogenetic detection tools for effects of ionizing radiation on human, Hadmérnök, XIII. évfolyam 3. szám – 2018. szeptember

Deli Gábor, Emődy Katalin, Mátyus Mária, Papp Sándor, Pataki Ágnes: Citogenetikai vizsgálat sugárkárosodás gyanúja miatt. Esetismertetés, Hadmérnök, XIII. Évfolyam 4. szám – 2018. december

Deli Gábor: Sugárterhelés a gyógyászatban, Honvédorvos, 2018 LXX. Évfolyam 2018/3–4. szám (megjelenés éve: 2019)

Deli Gábor, Papp Sándor, Pataki Ágnes, Mátyus Mária: Hagyományos és PCR alapú biodozimetriai módszerek a katasztrófavédelemben. Honvédorvos, LXX. évfolyam 2018/1–2. szám (megjelenés éve: 2019)

Deli Gábor: Az ionizáló sugárzás emberi szervezetre gyakorolt hatásának korszerű kimutatási lehetőségei, Honvédorvos, LXXI. évfolyam, 2019/1-2. szám (megjelenés éve: 2020.)

Gábor Deli: Radiomimetic compounds and their application Part I., Hadmérnök, Évf. 17 szám 1 (2022), 101–115. doi: doi.org/10.32567/hm.2022.1.7

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Csurgai József alezredesnek, valamint kutatási terület vezetőmnek Dr. Földi László ezredesnek, akik kiterjedt szakmai tudásukkal és javaslataikkal nagyban hozzájárultak a dolgozatom elkészüléséhez. Ezúton szeretnék köszönetet mondani minden kedves volt és jelenlegi munkatársamnak, akik segítették a munkámat. Külön köszönet illeti Angyalné Dr. Pataki Ágnest a rengeteg szakmai észrevételért és segítségért, valamint Kulin Flórát és Papp Sándort, akik számos ponton nyújtottak segítséget az értekezés elkészítéséhez. Szeretnék köszönetet mondani Lumniczky Katalinnak és az NNK SSFO Sugárorvostani Osztály munkatársainak, amiért szakmai tudásukkal hozzájárultak szakmai fejlődésemhez, valamint lehetővé tették a minták besugárzását. Köszönet illeti meg az Országos Onkológiai Intézet részéről Dr. Jurányi Zsoltot, Dr. Székely Gábort és Kiss Krisztinát, akik lehetővé tették a bleomycinnel kapcsolatos vizsgálataimat és számos szakmai észrevétellel is elláttak. Szintén köszönettel tartozom családom és barátaim és legfőképp menyasszonyom kitartó türelméért és támogatásáért is.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Kiss E., Sáfrány G., Solymosi J.: A sugárérzékenység vizsgálatának katasztrófavédelmi jelentősége, *Hadmérnök*, VIII. Évf. 4. szám, 104-112.
- [2] Pesznyák CS., Sáfrány G.: Sugárbiológia. Budapest, Typotex Kiadó, 2016.
 ISBN 978-963-279-952-0
- [3] Turai I., Köteles GY. (szerk.): Sugáregészségtan. Budapest, Medicina Kiadó, 2014.
- [4] Szegedi Tudományegyetem Elektronikus Tananyag Archívuma: Az elektromágneses spektrum, https://eta.bibl.uszeged.hu/2173/2/az elektromgneses spektrum.html, Letöltve: 2022.10.12.
- [5] Szegedi Tudományegyetem Elektronikus Tananyag Archívuma: *Röntgensugárzás*, https://eta.bibl.u-szeged.hu/2173/2/rntgensugrzs.html, Letöltve: 2022.10.12
- [6] Kiss Balázs: Fizikai dózisfogalmak és az ionizáló sugárzás mérése, Semmelweis Egyetem, https://semmelweis.hu/oralisdiagnosztika/files/2020/09/Sugv%C3%A9d-Kiss-M-Dozimetria_KB_20200916_mod.pdf, Letöltve: 2022.07.11.
- [7] Fehér I., Deme S. (szerk.): Sugárvédelem, Budapest, ELTE Eötvös Kiadó, 2010, ISBN: 9789632840802
- [8] UNSCEAR: Sources and Effects of Ionizing Radiation, Vol. I., New York United Nations Publication, 2010, ISBN 978-92-1-142274-0
- [9] Az Európai Unió Tanácsának 2013/59/Euratom irányelve, Letöltve: 2022.02.16. https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013L0059&from=HU
- [10] 2/2022. (IV. 29.) OAH rendelet az ionizáló sugárzás elleni védelemről és a kapcsolódó engedélyezési, jelentési és ellenőrzési rendszerről, Letöltve: 2022.07.11. https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a2200002.oah
- [11] Lin, E.C.: Radiation Risk From Medical Imaging, *Mayo Clin Proc.*, 2010, 85(12):1142-1146, https://doi.org/10.4065/mcp.2010.0260
- [12] Deli Gábor: Sugárterhelés a gyógyászatban, *Honvédorvos*, 2018. (70) 3–4. szám:37-51

- [13] Verdun, F.R., Bochud, F., Gudinchet, F. et al.: Radiation risk: what you should know to tell your patient. *Radiographics*, 2008, 28:1807-1816, https://doi.org/10.1148/rg.287085042
- [14] International Atomic Energy Agency: Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies, Vienna, 2011
- [15] Dr. Mózsa S.: Az ionizáló sugárzások biológiai hatása (Főiskolai jegyzet), Budapest, 1998, ISBN: 2399996311640
- [16] Edwards, A.A., Lloyd, D.C., Purrott, R.J.: Dicentric chromosome aberration yield in human lymphocytes and radiation quality. A resume including recent results using alpha particles, *Microdosimetry*, 1981, Vol. 2 1263–1273.
- Schilling-Tóth B., Sándor N., Kis E., et al.: Analysis of the common deletions in the mitochondrial DNA is a sensitive biomarker detecting direct and nontargeted cellular effects of low dose ionizing radiation. *Mutation Research*, 2011, Vol. 716, No. 1-2, 33–39. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.07.018
- [18] Sándor Nikolett: Sugárérzékenységért felelős gének azonosítása, hatásmechanizmusuk vizsgálata, Doktori értekezés, https://repo.lib.semmelweis.hu/handle/123456789/8346 (Letöltve: 2020.03.19.) https://doi.org/10.14753/SE.2019.2244
- [19] Schaffer, L.G., Tommerup, N.: *Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*, ISCN, Karger, Basel, 2005.
- [20] Satoh, T., Hatanaka, M., Yamamoto, K. et al.: Application of mFISH for the analysis of chemically-induced chromosomal aberrations: a model for the formation of triradial chromosomes, *Mutation Research* 504 2002, 57–65 https://doi.org/10.1016/s0027-5107(02)00079-9
- [21] Poirier, V., Papadopoulo, D.: Chromosomal aberrations induced by ethylene oxide in a human amniotic cell line in vitro, *Mutation Research*, 1982, 104, 255-260, https://doi.org/10.1016/0165-7992(82)90153-1
- [22] Kuhn, E.M., Therman, E.: Origin of symmetrical triradial chromosomes in human cells, *Chromosoma*, 1982, 86(5):673-81. https://doi.org/10.1007/BF00285610
- [23] Gebhart, E.: Double minutes, cytogenetic equivalents of gene amplification, in human neoplasia – a review, *Clin. Transl. Oncol.*, 2005, 7(11):477-85 https://doi.org/10.1007/BF02717000

- [24] Müller, H.J.: Artificial transmutation of the gene, Science, 1927, 66:84–87.
 https://doi.org/ 10.1126/science.66.1699.84
- [25] Painter, T.S., Müller, H.J.: Parallel cytology and genetics of induced translocations and deletions in Drosophila, *J. Hered.*, 1929, 20:287–298.
- [26] Sax, K.: Types and frequencies of chromosomal aberrations induced by Xrays, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1941, 9:93–103. https://doi.org/10.1101/SQB.1941.009.01.012
- [27] Revell, S. H.: A new hypothesis for chromatid exchanges. *Proc. Radiobiol. Symp. Liege*, p. 243–253. London, Butterworth 1955.
- [28] Chadwick, K.H.: Leenhouts, H.P., The rejoining of DNA doublestrand breaks and a model for the formation of chromosomal rearrangements, *Int. J. Radiat. Biol.*, 33 (1978) 517–529. https://doi.org/10.1080/09553007814550431
- [29] Mozumder, A., Magee J.L.: Model of tracks of ionizing radiations for radical reaction mechanisms, *Radiat Res.*, 1966, 28:203–14. https://doi.org/10.2307/3572190
- [30] Georgakilas, A.G.: Processing of DNA damage clusters in human cells: current status of knowledge, *Mol. BioSyst.*, 2008, 4:30–35. https://doi.org/10.1039/b713178j
- [31] Ward, J.F.: DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: Identities, mechanisms of formation and repairability, *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, 1988, 35:95–135. https://doi.org/10.1016/s0079-6603(08)60611-x
- [32] Rydberg, B.: Radiation-induced DNA damage and chromatin structure, *Acta Oncol.*, 2001, 40:682–685. https://doi.org/10.1080/02841860152619070
- [33] Fortini, P., Dogliotti, E.: Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short and long-patch repair subpathways, *DNA Repair*, 2007, 6:398–409. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.008
- [34] Caldecott, K.W.: Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin, DNA Repair, 2007, 6:443–453. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.006
- [35] Ide, H., et al.: Repair of DNA-protein crosslink damage: Coordinated actions of nucleotide excision repair and homologous recombination, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 2008, 52:57–58. https://doi.org/10.1093/nass/nrn029
- [37] Jeggo, P.A., Löbrich, M.: Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability, *DNA Repair*, 2006, 5:1192–1198. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.05.011
- [38] Wyman, C., Kanaar, R.: Homologous recombination: down to the wire, *Curr. Biol.*, 2004, 14:R629–R631, https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.049
- [39] Hefferin, M.L., Tomkinson, A.E.: Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining, DNA Repair, 2005. 4:639–648. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.12.005
- [40] Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L.H., Löbrich, M.: Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle, *Mol. Cell. Biol.*, 2003, 23:5706–5715, https://doi.org/10.1128/MCB.23.16.5706-5715.2003
- [41] Savage, J.R.K.: Annotation: Classification and relationships of induced chromosomal structural changes, J. Med. Genet., 1976, 13:103–122. https://doi.org/10.1136/jmg.13.2.103
- [42] Evans, H.J.: Chromosome aberrations induced by ionizing radiations, *Int. Rev. Cytol.*, 1962, 13:221–321. https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60285-5
- [43] Voisin, P.: Standards in biological dosimetry: A requirement to perform an appropriate dose assessment, *Mutation Research*, 2015, 793:115–122, https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.06.012
- [44] Deli Gábor: Cytogenetic detection tools for effects of ionizing radiation on human, Hadmérnök, 2018. XIII. évf 3. szám pp. 179-192.
- [45] Deli G.: Az ionizáló sugárzás emberi szervezetre gyakorolt hatásának korszerű kimutatási lehetőségei, *Honvédorvos*, LXXI. évf., 2019, 71(1-2):31-45
- [46] Bignold, L. P.: Mechanisms of clastogen-induced chromosomal aberrations: a critical review and description of a model based on failures of tethering of DNA strand ends to strand-breaking enzymes, *Mutat Res.*, 2009, 681(2-3):271-298. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.11.004
- [47] Gebhart, E.: Double minutes, cytogenetic equivalents of gene amplification, in human neoplasia - a review. *Clin Transl Oncol.*, 2005, 7(11):477-85. https://doi.org/10.1007/BF02717000
- [48] Hoffmann, W., Schmitz-Feuerhake, I.: How radiation-specific is the dicentric assay?, *Journal of Exposure Analysis and Enzironmental Epidemiology*, 1999, 2:113–133, https://doi.org/10.1038/sj.jea.7500008

- [49] Mestres, M.: et al., Analysis of alpha-particle induced chromosome aberrations in human lymphocytes, using pan-centromeric and pan-telomeric probes, *Int. J. Radiat. Biol.*, 2004, 80:737–744. https://doi.org/10.1080/09553000400017416
- [50] Benkhaled, L. Barrios, L., Mestres, M., Caballin, M.R., Ribas, M., Barquinero, J.F.: Analysis of gamma-rays induced chromosome aberrations: a fingerprint evaluation with a combination of pan-centromeric and pan-telomeric probes, *Int. J. Radiat. Biol.*, 2006, 82:869–875.
- [51] Fomina, J., Darroudi, F., Boei, J. J., Natarajan, A.T.: Discrimination between complete and incomplete chromosome exchanges in X-irradiated human lymphocytes using FISH with pan-centromeric and chromosome specific DNA probes in combination with telomeric PNA probe, *Int. J. Radiat. Biol.* 2000, 76:807–813. https://doi.org/10.1080/09553000050028968
- [52] Buckton, K.E., Smith, P.G., Court Brown, W.M.: The estimation of lymphocyte lifespan from studies on males treated with X-rays for ankylosing spondylitis, *Human Radiation Cytogenetics*, North-Holland, Amsterdam 1967, 106–114.
- [53] Edwards, A.A., Lindholm, C., Darroudi, F., et al.: Review of translocations detected by FISH for retrospective biological dosimetry applications. *Radiation Protection Dosimetry*, 2005, 113(4):396–402. https://doi.org/10.1093/rpd/nch452
- [54] Duran, M., Barquinero, J.F., Caballin, M.R, Ribas, M., Barrios, L.: Persistence of radiation-induced chromosome aberrations in a long-term cell culture, *Radiat*. *Res.*, 2009, 171:425–437. https://doi.org/10.1667/RR1504.1
- [55] Countryman, P.I., Heddle, J.A.: The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes, *Mutat. Res.*, 1976, 41:321–331. https://doi.org/10.1016/0027-5107(76)90105-6
- [56] Dr. Somlai János (szerk): Sugárvédelem in Dr. Domokos Endre (szerk): Környezetmérnöki Tudástár, Pannon Egyetem – Környezetmérnöki Intézet, Veszprém, 2011, ISBN: 978-615-5044-39-7
- [57] Sottili, M., Mangoni, M., Terziani, F., Trombetta, L., Loi, M., Cappelli, S., Di Brina, L., Livi, L.: Biological basis of radiation-induced pulmonary fibrosis. *Journ. of Tum*, 2015, 3(3): 325-331.
- [58] E. Dikomey, K. Borgann, I. Brammer, U. Kasten-Pisula: Molecular mechanisms of individual radiosensitivity studied in normal diploid human fibroblasts. *Toxicology*, 2003, 193:125-135. https://doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00293-2

- [59] K. M. Greilich-Bode, F. Zimmermann, W.-U. Müller, B. Pakisch, M. Molls, F.
 Würschmidt: Clinical, molecular- and cytogenetic analysis of a case of severe radiosensitivity. *Current Genomics*, 2012, 13:426-432. https://doi.org/10.2174/138920212802510475
- [60] Köteles Gy.: A sugárhatást módosító tényezők bővülése, *Fizikai Szemle*, 2000,
 11:374 http://wwwold.kfki.hu/fszemle/archivum/fsz0011/koteles.html
 (2022.04.29).
- [61] Kanda, R.: Improvement of Accuracy of Chromosome Aberration Analysis for Biological Radiation Dosimetry. J. Radiat. Res., 2000, 41:1-8. https://doi.org/10.1269/jrr.41.1
- [62] M. Fernet, J. Hall: Genetic biomarkers of therapeutic radiation sensitivity. DNA Repair, 2004, 3:1237–1243. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.019
- [63] Zhang, X. J., Sun, J. G., Sun, J., Ming, H., Wang, X. X., Wu, L., Chen, Z. T.: Prediction of radiation pneumonitis in lung cancer patients: a systematic review. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.*, 2012, 138:2103–2116. https://doi.org/10.1007/s00432-012-1284-1
- [64] L. Budäus, M. Bolla, A. Bossi, C. Cozzarini, J. Crook, A. Widmark, T. Wiegel: Functional outcomes and complications following radiation therapy for prostate cancer: a critical analysis of the literature. *Eur Urol.* 2012, 61, 1:112-27. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2011.09.027
- [65] Huber, R., Braselmann, H., Geinitz, H., Jaehnert, I., Baumgartner, A., Thamm, R., Figel, M., Molls, M., Zitzelsberger, H.: Chromodomal radiosensitivity and acute radiation side effect after radiotherapy in tumour patients – a follow up study. *Radiation Oncology*, 2011, 6:32-39. https://doi.org/10.1186/1748-717X-6-32
- [66] Burnet, N.G., Nyman, J., Turesson, I., Wurm, R., Yarnold, J.R., Peacock, J.H.: The relationship between cellular radiation sensitivity and tissue response may provide the basis for individualising radiotherapy schedules. *Radiotherapy and Oncology*, 1994, 33:228-238. https://doi.org/10.1016/0167-8140(94)90358-1
- [67] Köteles Gy., Bognár G., Dám A., Kerekes A., Thuróczy Gy.: Sejtbiológia és népegészségügy. *Magyar Onkológia*, 2004, 48, 2:121–125.
- [68] Dustin P.: Some New Aspects of Mitotic Poisoning, *Nature*, 1947, 159:794-797. https://doi.org/10.1038/159794a0

- [69] Deli G.: Radiomimetic compounds and their application Part I., *Hadmérnök*, 2022, Évf. 17 szám 1, 101–115. https://doi.org/10.32567/hm.2022.1.7
- [70] Boyland E.: Azione biologica delle radiazioni e delle sostanze radiomimetiche, *Endeavour*, 1952, 11:87-91
- [71] Elson L.A.: Radiation and radiomimetic chemicals: comparative physiological effects. Butterworths, Washington, 1963.
- [72] Kashyap, D., Tuli, H.S., Sak, K., Garg, V.K., Goel, N., Punia, S., Chaudhary, A.: Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression. *Current Pharmacology Reports* 2019, 5:79–86 https://doi.org/10.1007/s40495-019-00171-y
- [73] Azzam E.I., Jay-Gerin J.P., Pain D.: Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett*, 2012, 327(1-2):48-60. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.012
- [74] Cannan W.J., Pederson D.S.: Mechanisms and Consequences of Double-strand DNA Break Formation in Chromatin, J Cell Physiol. 2016, 231(1):3–14. https://doi.org/10.1002/jcp.25048.
- [75] Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T., Okami, Y.: New antibiotics, bleomycin A and B., *J Antibiot (Tokyo)*. 1966, 19(5):200-9.
- [76] Elfarra A.A.: (szerk.) Advances in bioactivation research, Springer-Verlag New York, New York, 2008, ISBN: 978-0-387-77299-8, https://doi.org/10.1007/978-0-387-77300-1
- [77] Auerbach C., Robson J.M., Carr J.G.: The Chemical Production of Mutations, *Science*, 1947, 105(2723):243-7. https://doi.org/10.1126/science.105.2723.243
- [78] Darlington C.D., Koller P.C.: The chemical breakage of chromosomes, *Heredity* 1947, 1:187–221, https://doi.org/10.1038/hdy.1947.13
- [79] Gilman A.: The initial clinical trial of nitrogen mustard. Am J Surg. 1963, 105:574-8. https://doi.org/10.1016/0002-9610(63)90232-0
- [80] Galm U., Hager M.H., Van Lanen S.G. Ju, J., Jon S. Thorson, J.S., Shen, B.: Antitumor antibiotics: bleomycin, enediynes, and mitomycin. *Chem Rev.* 2005, 105, (2):739–58. https://doi.org/10.1021/cr030117g
- [81] Coughlin J.M., Rudolf J.D., Wendt-Pienkowski E., Wang, L., Unsin C., Galm, U., Yang, D., Tao, M., Shen, B.: BlmB and TlmB Provide Resistance to the Bleomycin Family of Antitumor Antibiotics by N-Acetylating Metal-Free

Bleomycin, Tallysomycin, Phleomycin, and Zorbamycin, *Biochemistry*. 2014, 53 (44):6901-9. https://doi.org/10.1021/bi501121e

- [82] Arora, G., Sajid, A., Kalia, V.C.: Drug Resistance in Bacteria, Fungi, Malaria, and Cancer. Cham, Springer International Publishing, Switzerland, 2017, ISBN: 978-3-319-48682-6, https://doi.org/10.1007/978-3-319-48683-3
- [83] Chen, J., Stubbe, J.: Bleomycins: towards better therapeutics, *Nat. Rev. Cancer* 2005, 5(2):102–112. https://doi.org/10.1038/nrc1547
- [84] Ayene, I.S., Koch, C.J., Krisch, R.E.: DNA strand breakage by bivalent metal ions and ionizing radiation, *Int J Radiat Biol.* 2007, 83(3):195-210. https://doi.org/10.1080/09553000601146956
- [85] Poddar, S., Talukder, G., Sharma, A.: Chromosome Damage Induced by Ferric Chloride in Human Peripheral Lymphocytes, *Int J Hum Genet*, 2004, 4(4):261-264 https://doi.org/10.1080/09723757.2004.11885904
- [86] Benkhaled, L., Xunclá, M., Caballín, M.R., Barrios, L., Barquinero J.F.: Induction of complete and incomplete chromosome aberrations by bleomycin in human lymphocytes. *Mutation Research* 2008, 637:134–141. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.07.013
- [87] Dorr R.T.: Bleomycin pharmacology: mechanism of action and resistance, and clinical pharmacokinetics. *Semin Oncol.* 1992, 19(2 Suppl 5):3-8.
- [88] Deli Gábor: A sugárkárosodás laboratóriumi vizsgálatának katonai jelentősége.
 In: Földi László. Szemelvények a katonai műszaki tudományok eredményeiből
 III. Budapest, 2022 ISBN:9789635317035; 9789635317042
- [89] Swartz, H.M., Williams, B.B., Flood, A.B.: Overview of the principles and practice of biodosimetry, *Radiat Environ Biophys.* 2014, 53(2): 221–232. https://doi.org/10.1007/s00411-014-0522-0.
- [90] Flood, A.B., Ali, A.N., Boyle, H.K., Du, G., Satinsky, V.A., Swarts, S.G., Williams, B.B., Demidenko, E., Schreiber, W., Swartz, H.M.: Evaluating the Special Needs of the Military for Radiation Biodosimetry for Tactical Warfare against Deployed Troops: Comparing Military to Civilian Needs for Biodosimetry Methods, *Health Physics*, 2016, Vol. 111, No. 2 169–182., https://doi.org/10.1097/HP.000000000000538
- [91] Somosy Z., Galántai R.T., Horváth GY., Gachályi A.: A szomszédsági hatás és lehetséges szerepe az arterioszklerotikus folyamatokban. *Honvédorvos*, 64. évf 2012., 3-4. szám, 185-201.

- [92] Sullivan, J.M., Prasanna P.G.S., Grace, M.B., Wathen, L.K., Wallace, R.L., Koerner, J.F., Coleman, C.N.: Assessment of Biodosimetry Methods for a Mass-Casualty Radiological Medical Response Incident: and Management Considerations, Physics, Vol. 105. No. Health 2013. 6:540-54. https://doi.org/10.1097/HP.0b013e31829cf221
- [93] International Atomic Energy Agency: Biological Dosimetry: Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment, Technical Reports Series No. 260, IAEA, Vienna, 1986.
- [94] Turai, I.: The IAEA's co-ordinated research project on biodosimetry, 1998–2000, Int. J. Appl. Radiat. Isot. 2000, 52(5):1113–1116. https://doi.org/10.1016/s0969-8043(00)00055-5
- [95] Romm, H., Oestreicher, U., Kulka, U.: Cytogenetic damage analysed by the dicentric assay, *Ann. Ist. Super. Sanita*, 2009, 45(3):251-259.
- [96] International Atomic Energy Agency: *Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A manual*, IAEA Technical Report Series 405, 2001.
- [97] Fenech, J., Morley, A.A.: Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat. Res.* 1985 147(1-2):29–36. https://doi.org/10.1016/0165-1161(85)90015-9
- [98] Fenech, J., Morley, A.A.: Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of in vivo ageing and low-dose X-irradiation, *Mutat. Res.* 1986, 161(2):193–198. https://doi.org/10.1016/0027-5107(86)90010-2
- [99] Vral, A., Thierens, H., De Ridder, L.: In vitro micronucleuscentromere assay to detect radiation-damage induced by low doses in human lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.* 1997. 71(1):61–68. https://doi.org/10.1080/095530097144427
- [100] Fenech, M.: Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nat. Protoc.* 2007, 2:1084–1104. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77
- [101] Willems, P., et al.: Automated micronucleus (MN) scoring for population triage in case of large scale radiation events, *Int. J. Radiat. Biol.* 2010, 86(1):2–11. https://doi.org/10.3109/09553000903264481
- [102] Deli G.; Emődy K.; Mátyus M.; Papp S.; Pataki Á.: Citogenetikai vizsgálatsugárkárosodás gyanúja miatt, Esetismertetés, *Hadmérnök*, 2018, XIII. évf. 4. szám, pp. 340-348
- [103] Ainsbury, E.A., Bakhanova, E., Barquinero, J.F., et al.: Review of retrospective dosimetry techniques for external ionising radiation exposure. *Radiation*

 Protection
 Dosimetry,
 2011,
 147(4):573–592.

 https://doi.org/10.1093/rpd/ncq499

 </td

- [104] Fenech, M: The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Research*, 1993, 285(1):35–44. https://doi.org/10.1016/0027-5107(93)90049-1
- [105] Pantelias, G.E., Maillie, H.D.: A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol, *Somat. Cell. Genet.* 1983, 9(5):533–547. https://doi.org/10.1007/BF01574257
- [106] Pantelias, G.E., Maillie H.D.: The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biological dosimetry. *Radiation Research*, 1984, 99(1):140-150.
- [107] Terzoudi G.I., Pantelias G.E.: Cytogenetic methods for biodosimetry and risk individualization after exposure to ionising radiation. *Radiation Protection Dosimetry*, 2006, 122(1-4):513-520. https://doi.org/10.1093/rpd/ncl509
- Boada, A.I.L., Aguilera, I.R., Terzoudi, G.I., Mesa, J.E.G., Pantelias, G., García, O.: Rapid assessment of high-dose radiation exposures through scoring of cell-fusion-induced premature chromosome condensation and ring chromosomes. *Mutat Research*, 2013, 757(1):45-51. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.06.021
- [109] Pantelias, G.E., Iliakis, G.E., Sambani, C.D., Politis, G.: Biological dosimetry of absorbed radiation by C-banding of interphase chromosomes in peripheral blood lymphocytes. *Int J Radiat Biol.*, 1993, 63(3):349-354. https://doi.org/10.1080/09553009314550461
- [110] M'kacher, R., El Maalouf E., Terzoudi, G. et al.: Detection and automated scoring of dicentric chromosomes in non-stimulated lymphocyte prematurely condensed chromosomes following telomere and centromere staining. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2015, 91(3):640-649. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2014.10.048
- [111] Karachristou, I., Karakosta, M., Pantelias, A. et al.: Triage biodosimetry using entromeric/telomeric PNA probes and Giemsa staining to score dicentrics or excess fragments in non-stimulated lymphocyte prematurely condensed

chromosomes. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2015, 793:107-114. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.06.013

- [112] Terzoudi, G.I., Pantelias, G., Darroudi, F. et al.: Dose assessment intercomparisons within the RENEB network using G0-lymphocyte prematurely condensed chromosomes (PCC assay). *Int J Radiat Biol.*, 2017, 93(1):48-57. https://doi.org/10.1080/09553002.2016.1234725
- [113] González, J.E., Romero, I., Gregoire, E., Martin, C., Lamadrid, A.I., Voisin, P., Barquinero, J.F., García, O.: Biodosimetry estimation using the ratio of the longest:shortest length in the premature chromosome condensation (PCC) method applying autocapture and automatic image analysis, *Journal of Radiation Research*, 2014, 55(5):862–865. https://doi.org/10.1093/jrr/rru030
- [114] Darroudi, F., Fomina, J., Meijers, M. et al.: Kinetics of the formation of chromosome aberrations in X-irradiated human lymphocytes, using PCC and FISH. *Mutation Research*, 1998, 404(1-2):55–65. https://doi.org/10.1016/s0027-5107(98)00095-5
- [115] Tawn, E.J., Whitehouse, C.A.: Persistence of translocation frequencies in blood lymphocytes following radiotherapy: implications for retrospective radiation biodosimetry. J. Radiol. Prot., 2003, 23(4):423–430. https://doi.org/10.1088/0952-4746/23/4/005
- [116] Lloyd, D.C., Moquet, J.E., Oram, S. Edwards, A.A., Lucas, J.N.: Accidental intake of tritiated water: a cytogenetic follow-up case on translocation stability and dose reconstruction. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1998, 73(5):543–547. https://doi.org/10.1080/095530098142095
- [117] Lindholm, C., Edwards, A.: Long-term persistence of translocations in stable lymphocytes from victims of a radiological accident. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2004, 80(8):559–566. https://doi.org/10.1080/09553000412331283498
- [118] Whitehouse, C.A., Edwards, A.A., Tawn E.J. et al.: Translocation yields in peripheral blood lymphocytes from control populations. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2005, 81(2):139–145. https://doi.org/10.1080/09553000500103082
- [119] Sigurdson, A.J., Ha, M., Hauptmann, M. et al.: International study of factors affecting human chromosome translocations. *Mutation Research*, 2008, 652(2):112–121. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.01.005
- [120] Schmidt-Ullrich, R.K., Dent, P., Grant, S., Mikkelsen, R.B., Valerie, K.:Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiation Research*, 2000,

153(3):245–257. 7587(2000)153[0245:stacrr]2.0.co;2

- Pilch, D.R., Sedelnikova, O.A., Redon, C., Celeste, A., Nussenzweig, A., Bonner, W.M.:.: Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol.*, 2003, 81(3):123–129. https://doi.org/10.1139/o03-042
- [122] Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., Bonner W.: Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2002, 12(2):162–169. https://doi.org/10.1016/s0959-437x(02)00282-4
- [123] Sedelnikova, O.A., Pilch, D.R., Redon, C., Bonner, W.M.: Histone H2AX in DNA damage and repair. *Cancer Biol. Ther.*, 2003, 2(3):233–235. https://doi.org/10.4161/cbt.2.3.373
- [124] Flood, A.B., Boyle, H.K., Du, G., et al.: Advances in a framework to compare bio-dosimetry methods for triage in large-scale radiation events. *Radiation Protection Dosimetry*, 2014, 159(1–4):77–86. https://doi.org/10.1093/rpd/ncu120
- [125] Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. et al.: Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of Cell Biology*, 1999, 146(5):905–915. https://doi.org/10.1083/jcb.146.5.905
- [126] Sedelnikova, O.A., Horikawa, I., Redon, C. et al.: Delayed kinetics of DNA double-strand break processing in normal and pathological aging. *Aging Cell*, 2008, 7(1):89–100. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00354.x
- [127] Redon, C.E., Dickey, J.S., Bonner, W.M., Sedelnikova, O.A.: γ-H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Adv Space Res.*, 2009, 43(8):1171–1178. https://doi.org/10.1016/j.asr.2008.10.011
- [128] Garty, G., Chen, Y., Salerno, A. et al.: The RABIT: a rapid automated biodosimetry tool for radiological triage. *Health Physics*, 2010, 98(2):209–217. https://doi.org/10.1097/HP.0b013e3181ab3cb6
- [129] Gunasekarana, V., Raj, G.J., Chand, P.: A Comprehensive Review on Clinical Applications of Comet Assay. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2005, 9(3):GE01-GE05. https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/12062.5622
- [130] Wang Y., Xu, C., Du L.Q., Cao, J., Liu, J.X., Su, X., Zhao H., Fan FY., Wang,B., Katsube, T., Fan, S.J., Liu, Q.: Evaluation of the Comet Assay for Assessing

the Dose-Response Relationship of DNA Damage Induced by Ionizing Radiation, *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14(11):22449-22461; https://doi.org/10.3390/ijms141122449

- [131] Li, J., Wang, Y., Du, L., Xu, C., Cao, J., Wang Q., Liu, Q., Fan, F.:Nested PCR for mtDNA 4977 bp deletion and comet assay for DNA damage a combined method for radiosensitivity evaluation of tumor cells. *Oncology Letters*, 2014, 7(4):1083-1087. https://doi.org/10.3892/ol.2014.1819
- [132] Zhao, J., Guo, Z., Zhang, H., Wang, Z., Song, L., Ma, J., Pei, S., Wang, C.: The potential value of the neutral comet assay and γH2AX foci assay in assessing the radiosensitivity of carbon beam in human tumor cell lines. *Radiol. Oncol.* 2013, 43(3):247-257. https://doi.org/10.2478/raon-2013-0045
- [134] Vijayalaxmi, Tice, R.R., Strauss, G.H.: Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutation Research*, 1992, 271(3):243-52. https://doi.org/10.1016/0165-1161(92)90019-i
- [135] Deperas-Kaminska, M., Bajinskis A., Marczyk M. et al.: Radiation-induced changes in levels of selected proteins in peripheral blood serum of breast cancer patients as a potential triage biodosimeter for large-scale radiological emergencies. *Health Physics*, 2014, 107(6):555-563. https://doi.org/10.1097/HP.000000000000158
- [136] Paul, S., Amundson, S.A.: Development of gene expression signatures for practical radiation biodosimetry. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2008, 71(4):1236–1244. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.03.043
- [137] Lee, Y., Canadell, MP., Shuryak, I., et al.: Candidate protein markers for radiation biodosimetry in the hematopoietically humanized mouse model, *Scientific Reports*, 2018, 10;8(1):13557, https://doi.org/10.1038s41598-018-31740-8
- [138] Rothkamm, K., Beinke, C., Romm, H., et al.: Comparison of Established and Emerging Biodosimetry Assays. *Radiat Research*, 2013, 180(2):111–119. https://doi.org/10.1667/RR3231.1
- [139] Somosy Z. (2000). Radiation response of cell organelles. *Micron*, 31(2):165-81. https://doi.org/10.1016/s0968-4328(99)00083-9

- [140] Anderson, S., Bankier, AT., Barrell, B.G. et al.: Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature*, 1981, 290:457-465. https://doi.org/10.1038/290457a0
- [141] Jiang, M., Xie, X., Zhu, X. et al.: The mitochondrial single-stranded DNA binding protein is essential for initiation of mtDNA replication. *Sci Adv.* 2021, 2;7(27):eabf8631. https://doi.org/10.1126/sciadv.abf8631
- [142] Clayton, D.A.: Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA, *Annu. Rev. Cell Biol.* 1991, 7:453-78. 10.1146/annurev.cb.07.110191.002321
- [143] Wang, W., Esbensen, Y., Kunke, D., Suganthan, R., Rachek, L., Bjoras, M., Eide, L.: Mitochondrial DNA damage level determines neural stem cell differentiation fate. *J Neurosci*, 2011, 31(26):9746–9751. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0852-11.2011
- [144] Holt I.J., Harding A.E., Morgan-Hughes J.A.: Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, 1988, 331:717–719. https://doi.org/10.1038/331717a0
- [145] Wallace D.C.: Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. *Mitochondria*, 1999, 283(5407):1482-1488. https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1482
- [146] Wallace D.C.: Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen*, 2010, 51(5):440-450. https://doi.org/10.1002/em.20586
- [147] Chocron, E.S., Munkácsy, E., Pickerin, A.M.: Cause or casualty: The role of mitochondrial DNA in aging and age-associated disease, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019, 1865(2):285-297. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.09.035
- [148] Stefano, G.B., Bjenning, C., Wang, F., Wang, N., Kream, R.M.: MitochondrialHeteroplasmy, *Adv Exp Med Biol.* 2017, 982:577-594. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55330-6_30.
- [149] Scott, I., Joule, R.J.: Mitochondrial fission and fusion. *Essays in Biochemistry*, 2010, 47: 85–98. https://doi.org/10.1042/bse0470085
- [150] Yakubovskaya, E., Chen, Z., Carrodeguas, J.A., Kisker, C., Bogenhagen, D.F.: Functional human mitochondrial DNA polymerase gamma forms a heterotrimer. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006, 281(1): 374–82. https://doi.org/10.1074/jbc.M509730200
- [151] Jemt, E., Farge, G., Bäckström, S., Holmlund, T., Gustafsson, C.M., Falkenberg,M.: The mitochondrial DNA helicase TWINKLE can assemble on a closed

circular template and support initiation of DNA synthesis. *Nucleic Acids Research*. 2011, 39(21): 9238–49. https://doi.org/10.1093/nar/gkr653

- [152] Kang, I., Chu, C.T., Kaufman, B.A.: The mitochondrial transcription factor TFAM in neurodegeneration: emerging evidence and mechanisms. *FEBS Lett*. 2018, 592(5):793-811. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12989
- [153] St John, J.C., Facucho-Oliveira, J., Jiang, Y., Kelly, R., Salah, R.: Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Human Reproduction Update*. 2010, 16(5):488–509. https://doi.org/10.1093/humupd/dmq002
- [154] Johnston, I.G., Burgstaller, J.P., Havlicek, V., Kolbe, T., Rülicke, T., Brem, G., Poulton, J., Jones, N.S.: Stochastic modelling, Bayesian inference, and new in vivo measurements elucidate the debated mtDNA bottleneck mechanism". *eLife*. 2015, 4:e07464. https://doi.org/10.7554/eLife.07464
- [155] Liao, S., Chen, L., Song, Z., He, H.: The fate of damaged mitochondrial DNA in the cell, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2022, 1869(5):119233. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119233
- [156] Yoneda, M., Katsumata, K., Hayakawa, M., Tanaka, M. and Ozawa, T. : Oxygen Stress Induces an Apoptotic Cell Death Associated with Fragmentation of Mitochondrial Genome. 1995, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209(2):723– 729. https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1559
- [157] Richard, S.M., Bailliet, G., Paez, G.L., Bianchi, M.S., Peltomaki, P. and Bianchi, N.O.: Nuclear and Mitochondrial Genome Instability in Human Breast Cancer, *Cancer Res.*, 2000, 60,(15):4231–4237.
- [158] Leach, J.K., Van Tuyle, G., Lin, P.S., Schmidt-Ullrich, R., Mikkelsen, R.B.: Ionizing Radiation-induced, Mitochondria-dependent Generation of Reactive Oxygen/Nitrogen. *Cancer Res*, 2001, 61(10):3894–3901.
- [159] Attardi, G., Schatz, G.: Biogenesis of mitochondria., *Annu. Rev. Cell Biol.* 1988, 4, 289–333. https://doi.org/10.1146/annurev.cb.04.110188.001445
- [160] Wallace, D.C.: Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerativediseases? Science, 1992, 256(5057),628–632. https://doi.org/10.1126/science.1533953
- [161] Jessie, B.C., Sun, C.Q., Irons, H.R., Marshall, F.F., Wallace, D.C., Petros, J.A.: Accumulation of mitochondrial DNA deletions in the malignant prostate of

patients of different ages. *Exp. Gerontol.* 2001, 37(1):169–174. https://doi.org/10.1016/s0531-5565(01)00153-x

- [162] Cortopassi, G.A., Arnheim, N.: Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res.* 1990, 18(23):6927–6933. https://doi.org/10.1093/nar/18.23.6927
- [163] Cortopassi, G.A., Shibata, D., Soong, N.W., Arnheim, N.: A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(16):7370–4, https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7370
- [164] Schon, E.A., Rizzuto, R., Moraes, C.T., Nakase, H., Zeviani, M., DiMauro, S.: A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. Science, 1989, 244(902):346–349. https://doi.org/10.1126/science.2711184
- [165] Shoffner, J.M., Lott, M.T., Voljavec, A.S., Soueidan, S.A., Costigan, D.A., Wallace, D.C.: Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86(20):7952– 7956. . https://doi.org/10.1073/pnas.86.20.7952
- [166] Ames, B.N.: Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutat. Res.* 1989, 214(1):41–46. https://doi.org/10.1016/0027-5107(89)90196-6
- [167] Ames, B.N.: Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer, *Free Radic. Res. Commun.* 1989, 7(3-6):121–128. https://doi.org/10.3109/10715768909087933
- [168] Fraga, C.G., Shigenaga, M.K., Park, J.W., Degan, P., Ames, B.N.: Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87(12):4533–4537. https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4533
- [169] Lee, H.C., Pang, C.Y., Hsu, H.S., Wei, Y.H.: Differential accumulations of 4,977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994,1226(1):37–43. https://doi.org/10.1016/0925-4439(94)90056-6
- [170] Gerhard, G.S., Benko, F.A., Allen, R.G., Tresini, M., Kalbach, A., Cristofalo,V.J., Gocke, C.D.: Mitochondrial DNA mutation analysis in human skin

fibroblasts from fetal, young, and old donors. *Mech. Ageing Dev.* 2002, 123(2-3):155–166. https://doi.org/10.1016/s0047-6374(01)00328-1

- [171] Ray, A. J., Turner, R., Nikaido, O., Rees, J. L., and Birch-Machin, M. A. The spectrum of mitochondrial DNA deletions is a ubiquitous marker of ultraviolet radiation exposure in human skin. J. Investig. Dermatol., 2000, 115(4):674–679, https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00092.x
- [172] Bianchi, M. S., Bianchi, N. O., Bailliet, G.: Mitochondrial DNA mutations in normal and tumor tissues from breast cancer patients. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1995, 71(1): 99–103, https://doi.org/10.1159/000134072
- [173] Sanchez-Cespedes, M., Parrella, P., Nomoto, S., Cohen, D., Xiao, Y., Esteller, M., Jeronimo, C., Jordan, R. C., Nicol, T., Koch, W. M., Schoenberg, M., Mazzarelli, P., Fazio, V. M., and Sidransky, D. Identification of a mononucleotide repeat as a major target for mitochondrial DNA alterations in human tumors. *Cancer Res.*, 2001, 61(19):7015–7019.
- [174] Muller-Hocker, J., Jacob, U., Seibel, P.: Hashimoto thyroiditis is associated with defects of cytochrome-c oxidase in oxyphil Askanazy cells and with the common deletion (4,977) of mitochondrial DNA. *Ultrastruct. Pathol.*, 1998, 22(1):91–100, https://doi.org/10.3109/01913129809032263
- [175] Maximo, V., Soares, P., Rocha, A. S., Sobrinho-Simoes, M. The common deletion of mitochondrial DNA is found in goiters and thyroid tumors with and without oxyphil cell change. *Ultrastruct. Pathol.*, 1998, 22(3):271–273, https://doi.org/10.3109/01913129809033479
- [176] Tallini, G., Ladanyi, M., Rosai, J., and Jhanwar, S. C. Analysis of nuclear and mitochondrial DNA alterations in thyroid and renal oncocytic tumors. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1994, 66(4):253–259. https://doi.org/10.1159/000133706
- [177] Maximo, V., Soares, P., Lima, J., Cameselle-Teijeiro, J., Sobrinho-Simoes, M.: Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology: a study with emphasis on Hurthle cell tumors. *Am. J. Pathol.*, 2002, 160(5):1857–1865. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61132-7
- [178] Yeh, J. J., Lunetta, K. L., van Orsouw, N. J., Moore, F. D., Jr., Mutter, G. L., Vijg, J., Dahia, P. L., Eng, C.: Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in

cases with thyroid tumours. *Oncogene*, 2000, 19(16):2060–2066. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203537

- [179] Wang, Z.C., Wang, X.M., Jiao, B.H., Jin, Y.X., Miao, M.Y., Zhu, K.J., Ni, Q.G.: Detection of mitochondrial DNA deletion by a modified PCR method in a 60Co radiation-exposed patient. *IUBMB Life*. 2003, 55(3):133-7. https://doi.org/10.1080/1521654031000110181
- [180] Morgan, W.F.: Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation I-II. *Radiation Res*, 2003, 159(5):567-596. https://doi.org/10.1667/0033-7587(2003)159[0567:nadeoe]2.0.co;2
- [181] Zhang, B., Davidson, M.M., Hei, T.K.: Mitochondria regulate DNA damage and genomic instability induced by high LET radiation. *Life Sci Space Res (Amst)*, 2014, 1:80-88. https://doi.org/10.1016/j.lssr.2014.02.006
- [182] Brown, W. M., George, M., Jr., and Wilson, A. C.: Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76(4):1967–1971, https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1967
- [183] Kawasaki, K., Suzuki, T., Ueda, M., Ichihashi, M., Reguer, G., Yamasaki, H.: CC to TT mutation in the mitochondrial DNA of normal skin: relationship to ultraviolet light exposure. *Mutat. Res.*, 2000, 468(1):35–43, https://doi.org/10.1016/s1383-5718(00)00038-3
- [184] May, A., Bohr, V. A. Gene-specific repair of gamma-ray-induced DNA strand breaks in colon cancer cells: no coupling to transcription and no removal from the mitochondrial genome. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, 269(2):433–437. https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2264
- [185] Yakes, F. M., van Houten, B.: Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94(2):514–519. https://doi.org/10.1073/pnas.94.2.514
- [186] Corral-Debrinski, M., Shoffner, J.M., Lott, M.T., Wallace, D.C.: Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. Mutat Res, 1992, 275(3-6):169–180. https://doi.org/10.1016/0921-8734(92)90021-g
- [187] Simonetti, S., Chen, X., DiMauro, S., Schon, E.A.: Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: analysis by quantitative PCR.

Biochim Biophys Acta, 1992, 1180(2):113–22, https://doi.org/10.1016/0925-4439(92)90059-v

- [188] Kadenbach, B., Munscher, C., Muller-Hocker, J.: Mutations of mitochondrial DNA support human aging. Aging (Milano), 1993, 5(1):73–5. https://doi.org/10.1007/BF03324129
- [189] Melov, S., Shoffner, J.M., Kaufman, A., Wallace, D.C.: Marked increase in the number and variety of mitochondrial DNA rearrangements in aging human skeletal muscle. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(20):4122–6. https://doi.org/10.1093/nar/23.20.4122
- [190] Pang, C.Y., Lee, H.C., Yang, J.H., Wei, Y.H.: Human skin mitochondrial DNA deletions associated with light exposure. *Arch Biochem Biophysiol*, 1994, 312(2):534–8. https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1342
- [191] Yang, J.H., Lee, H.C., Lin, K.J., Wei, Y.H.: A specific 4977-bp deletion of mitochondrial DNA in human ageing skin. Arch Dermatol Res, 1994, 286(7):386–90. https://doi.org/10.1007/BF00371798
- [192] Yang, J.H., Lee, H.C., Wei, Y.H.: Photoageing-associated mitochondrial DNA length mutations in human skin. Arch Dermatol Res, 1995, 287(7):641–8. https://doi.org/10.1007/BF00371736
- Berneburg, M., Gattermann, N., Stege, H., Grewe, M., Vogelsang, K., Ruzicka, T., Krutmann, J.: Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system. Photochem Photobiol, 1997, 66(2):271–5. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb08654.x
- Birch-Machin, M.A., Tindall, M., Turner, R., Haldane, F., Rees, J.L.: Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo- rather than chronologic aging. J Invest Dermatol, 1998, 110(2):149–52. https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00099.x
- [195] Birch-Machin, M.A.: Mitochondria and skin disease. *Clin Exp Dermatol*, 2000, 25(2):141–6. https://doi.org/10.1046/j.1365-2230.2000.00605.x
- [196] Brockington, M., Sweeney, M.G., Hammans, S.R., Morgan-Hughes, J.A., Harding, A.E.: A tandem duplication in the D-loop of human mitochondrial DNA is associated with deletions in mitochondrial myopathies. *Nat Genet*, 1993, 4(1):67–71. https://doi.org/10.1038/ng0593-67

- [197] Lee, H.C., Pang, C.Y., Hsu, H.S., Wei, Y.H.: Ageing-associated tandem duplications in the D-loop of mitochondrial DNA of human muscle. *FEBS Lett.*, 1994, 354(1):79–83. https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01063-3
- [198] Wei, Y.H., Pang, C.Y., You, B.J., Lee, H.C.: Tandem duplications and largescale deletions of mitochondrial DNA are early molecular events of human aging process. *Ann NY Acad* Sci.., 1996, 786:82–101. 10.1111/j.1749-6632.1996.tb39054.x
- [199] Yang, J.H., Lee, H.C., Chung, J.G., Wei, Y.H.: Mitochondrial DNA mutations in light-associated skin tumors. *Anticancer Res.*, 2004, 24(3a):1753–8
- [200] Clayton, D.A., Doda, J.N., Friedberg, E.C.: The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71(7):2777–81. https://doi.org/10.1073/pnas.71.7.2777
- [201] LeDoux, S.P., Wilson, G.L., Beecham, E.J., Stevnsner, T., Wassermann, K., Bohr, V.A.: Repair of mitochondrial DNA after various types of DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis*, 1992, 13(11):1967–73. https://doi.org/10.1093/carcin/13.11.1967
- [202] Croteau, D.L., Bohr, V.A.: Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. J Biol Chem, 1997 272(41):25409–12. https://doi.org/10.1074/jbc.272.41.25409
- [203] Pascucci, B., Versteegh, A., van Hoffen, A., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H., Dogliotti, E.: DNA repair of UV photoproducts and mutagenesis in human mitochondrial DNA. J Mol Biol., 1997, 273(2):417–27. https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1268
- [204] Sawyer, D.E., Van Houten, B.: Repair of DNA damage in mitochondria. *Mutat Res*, 1999, 434(3):161–76. https://doi.org/10.1016/s0921-8777(99)00027-0
- [205] Chomyn, A., Martinuzzi, A., Yoneda, M., Daga, A., Hurko, O., Johns, D., Lai, S.T., Nonaka, I., Angelini, C., Attardi, G.: MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(10):4221–5. https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4221
- [206] Sciacco, M., Bonilla, E., Schon, E.A., DiMauro, S., Moraes, C.T.: Distribution of wild-type and common deletion forms of mtDNA in normal and respiration-

deficient muscle fibers from patients with mitochondrial myopathy. *Hum Mol Genet*, 1994, 3(1):13–9. https://doi.org/10.1093/hmg/3.1.13

- [207] Krishnan, K.J., Harbottle, A., Birch-Machin, M.A.: The use of a 3895 bp mitochondrial DNA deletion as a marker for sunlight exposure in human skin. J Invest Dermatol, 2004, 123(6):1020–4. https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23457.x
- [208] Berneburg, M., Grether-Beck, S., Kurten, V., Ruzicka, T., Briviba K., Sies, H., Krutmann, J.:: Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J Biol Chem.*, 1999, 274(22):15345–9. 10.1074/jbc.274.22.1534
- [209] Graziewicz, M.A., Day, B.J., Copeland, W.C.:. The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(13):2817–2824. https://doi.org/10.1111/10.1093/nar/gkf392
- [210] Bogenhagen, D., Clayton, D.A.: Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly. *Cell*, 1977, 11(4):719–727. https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90286-0
- [211] Kim, G.J., Fiskum, G.M., Morgan, W.F.: A role for mitochondrial dysfunction in perpetuating. *Cancer Res*, 2006, 66(21):10377–10383. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3036
- [212] Ricchetti, M., Fairhead, C., Dujon, B.: Mitochondrial DNA repairs double-strand breaks in yeast. *Nature*, 1999, 402(6757):96–100. https://doi.org/10.1038/47076
- [213] Patrushev, M., Kasymov, V., Patrusheva, V., Ushakova, T., Gogvadze, V., Gaziev, A.I.: Release of mitochondrial DNA fragments from brain mitochondria of irradiated mice. Mitochondrion, 2006, 6(1):43–47. https://doi.org/10.1016/j.mito.2005.12.001
- [214] Cheng, X., Ivessa, A.S: The migration of mitochondrial DNA fragments to the nucleus affects the chronological aging process of Saccharomyces cerevisiae. *Aging Cell.*, 2010, 9(5):919–923. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00607.x
- [215] Shay, J.W., Werbin, H.: New evidence for the insertion of mitochondrial DNA into the human genome: significance for cancer and aging. *Mutat Res*, 1992, 275(3-6):227–235. https://doi.org/10.1016/0921-8734(92)90026-1

- [216] Schon, E.A., Rizzuto, R., Moraes, C.T., Nakase, H., Zeviani, M., DiMauro S.: A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science*, 1989, 244(4902):346-349. https://doi.org/10.1126/science.2711184
- [217] Samuels, D.C., Schon, E.A., Chinnery, P.F.: Two direct repeats cause most human mtDNA deletions. *Trends in Genetic*, 2004, 20(9):393-8. https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.07.003
- [218] Zeviani, M., Moraes, C.T., DiMauro, S., Nakase, H., Bonilla, E., Schon, E.A., Rowland, L.P.: Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology*, 1988, 38(9):1339-46. https://doi.org/10.1212/wnl.38.9.1339
- [219] Ramírez-Miranda, A., Navas-Pérez, A., Gurria-Quintana, L., Vargas-Ortega, J., Murillo-Correa, C., Zenteno, J.C.: PCR-based detection of heteroplasmic deleted mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmogia*, 2008, 83(3):155-160. 10.4321/s0365-66912008000300005
- [220] Rötig, A., Cormier, V., Blanche, S., Bonnefont, J.P., Ledeist, F., Romero, N., Schmitz, J., Rustin, P., Fischer, A., Saudubray, J.M.: Pearson's marrow-pancreas syndrome: a multisystem mitochondrial disorder in infancy. *J Clin Invest*, 1990, 86(5):1601-1608. https://doi.org/10.1172/JCI114881
- [221] Sciacco, M., Bonilla, E., Schon, E.A., DiMauro, S., Moraes, C.T.: Distribution of wild-type and common deletion forms of mtDNA in normal and respirationdeficient muscle fibers from patients with mitochondrial myopathy. *Human Molecular Genetics*, 1994, 3(1):13-19. https://doi.org/10.1093/hmg/3.1.13
- [222] Lin, P.H., Lee, S.H., Su, C.P., Wei, Y.H.: Oxidative damage to mitochondrial DNA in atrial muscle of patients with atrial fibrillation. *Free Radic Biol Med*, 2003, 35(10):1310–1318. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.07.002
- [223] Rogounovitch, T.I., Saenko, V.A., Shimizu-Yoshida, Y., Abrosimov, A.Y., Lushnikov, E.F., Roumiantsev, P.O., Ohtsuru, A., Namba, H., Tsyb, A.F., Yamashita, S.: Large deletions in mitochondrial DNA in radiation-associated human thyroid tumors. *Cancer Res*, 2002, 62(23):7031-7041.
- [224] Berneburg, M., Plettenberg, H., Medve-König, K., Pfahlberg, A., Gers-Barlag, H., Gefeller, O., Krutmann, J.: Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion in vivo in normal human skin. J Invest Dermatol, 2004, 122(5):1277-1283. https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22502.x

- [225] Bua, E., Johnson, J., Herbst, A., Delong, B., McKenzie, D., Salamat, S., Aiken, J.M.: Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *Am J Hum Genet.*, 2006, 79(3):469-480. https://doi.org/10.1086/507132
- [226] Eshaghian, A., Vleugels, R.A., Canter, J.A., McDonald, M.A., Stasko, T., Sligh, J.E.: Mitochondrial DNA deletions serve as biomarkers of aging in the skin, but are typically absent in nonmelanoma skin cancers. *The J Invest Dermatol*, 2006, 126(2):336-344. https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700088
- [227] Kaneko, N., Vierkoetter, A., Kraemer, U., Sugiri, D., Matsui, M., Yamamoto, A., Krutmann, J., Morita, A.: Mitochondrial common deletion mutation and extrinsic skin ageing in German and Japanese women. *Experimental Dermatology*, 2012, 1:26-30. https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2012.01499.x
- [228] Corral-Debrinski, M., Horton, T., Lott, M.T., Shoffner, J.M., McKee, A.C., Beal, M.F., Graham, B.H., Wallace, D.C.: Marked Changes in Mitochondrial DNA Deletion Levels in Alzheimer Brains. *Genomics*, 2002, 23(2):471–476. https://doi.org/10.1006/geno.1994.1525
- [229] Chen, J.H., Halesy, C.N., Ozanne, S.E.: DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(22):7417– 7428. https://doi.org/10.1093/nar/gkm681
- [230] Prithivirajsingh, S., Story, M.D., Bergh, S.A., Geara, F.B., Ang, K.K., Ismail, S.M., Stevens, C.W., Buchholz, T.A., Brock, W.A.: Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation. *FEBS Letters*, 2004, 571(1-3): 227–232. https://doi.org/ 10.1016/j.febslet.2004.06.078
- [231] Murphy, J.E.J, Nugent, S., Seymour, C., Mothersill, C.: Mitochondrial DNA point mutations and a novel deletion induced by direct low-LET radiation and by medium from irradiated cells. *Mutat Res*, 2005, 585(1-2):127-136. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.04.011
- [232] Chen, B., Zhong, Y., Peng, W., Sun, Y., Hu, Y.J., Yang, Y., Kong, W.J.: Increased mitochondrial DNA damage and decreased base excision repair in the auditory cortex of D-galactose-induced aging rats. *Mol Biol Rep.*, 2011, 38(6):3635-3642. https://doi.org/10.1007/s11033-010-0476-5
- [233] Peng, T.I., Yu, P.R., Chen, J.Y., Wang, H.L., Wub, H.Y., Weic, Y.H., Jou, M.J.: Visualizing common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis upon oxidative stress. *Biochim*

 Biophys
 Acta,
 2005,
 1762(2):241–255.

 https://doi.org/10.1007/10.1016/j.bbadis.2005.10.008
 1762(2):241–255.

- [234] Majora, M., Wittkampf, T., Schuermann, B., Schneider, M., Franke, S., Grether-Beck, S., Wilichowski, E., Bernerd, F., Schroeder, P., Krutmann, J.: Functional Consequences of Mitochondrial DNA Deletions in Human Skin Fibroblasts. *Am J Pathol*, 2009, 175(3):1019–1029. https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080832
- [235] Nicklas, J.A., Brooks, E.M., Hunter, T.C., Single, R., Branda, R.F.: Development of a Quantitative PCR (TaqMan) Assay for Relative Mitochondrial DNA Copy Number and the Common Mitochondrial DNA Deletion in the Rat. *Environ Mol Mutagen*, 2004, 44(4):313–320. https://doi.org/10.1002/em.20050
- [236] Krishnan, K.J., Reeve, A.K., Samuels, D.C., Chinnery, P.F., Blackwood, J.K., Taylor, R.W., Wanrooij, S., Spelbrink, J.N., Lightowlers, R.N., Turnbull, D.M.: What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nat Genet*. 2008, 40(3):275-9. https://doi.org/10.1038/ng.f.94
- [237] Wunderlich Lívius: *Molekuláris biológiai technikák*, Typotex Kiadó, Budapest, 2014, ISBN: 978-963-279-172-2
- [238] *Polymerase Chain Reaction*, Wikipédia, https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase chain reaction, Letöltve: 2022.06.16.
- [239] Deli Gábor, Papp Sándor, Pataki Ágnes, Mátyus Mária: Hagyományos és PCR alapú biodozimetriai módszerek a katasztrófavédelemben. *Honvédorvos*, 2018, LXX. évf., 1–2. szám, 27-32.
- [240] Lusiyanti, Y., Alatas, Z., Syaifudin, M., Purnami, S.: Establishment of a Doseresponse Curve for X-ray-Induced Micronuclei in Human Lymphocytes, *Genome Integrity*, 2016, 7:7, https://doi.org/10.4103/2041-9414.197162
- [241] Shuryak, I., Turner, H.C., Perrier, J.R. et al.: A High Throughput Approach to Reconstruct Partial-Body and Neutron Radiation Exposures on an Individual Basis. Sci Rep., 2020, 10:2899. https://doi.org/10.1038/s41598-020-59695-9
- [242] Wang, L., Kuwahara, Y., Li, L., Baba, T., Shin, R., Ohkubo, Y., Ono, K., Fukumoto, M.: Analysis of Common Deletion (CD) and a novel deletion of mitochondrial DNA induced by ionizing radiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, 2007, 83(7):433 – 442. https://doi.org/10.1080/09553000701370878
- [243] Schilling-Tóth Boglárka: Az ionizáló sugárzás indukált molekuláris változások vizsgálata normál fibroblasztokban és tumor sejtekben, Doktori értekezés,

https://repo.lib.semmelweis.hu/handle/123456789/5614, (Letöltve: 2020.03.06.) https://doi.org/10.14753/SE.2016.1871

- [244] Phillips, N.R., Sprouse, M.L., Roby, R.K.: Simultaneous quantification of mitochondrial DNA copy number and deletion ratio: A multiplex real-time PCR assay, *Scientific Reports*, 2014, 4:3887. https://doi.org/10.1038/srep03887
- [245] International Atomic Energy Agency, Effects of ionizing radiation on blood and blood components: A survey, IAEA, Vienna, 1997. ISSN 1011-4289
- [246] Buttarello, M., Mezzapelle, G., Freguglia, F., Plebani, M.: Reticulated platelets and immature platelet fraction: Clinical applications and method limitations. *Int J Lab Hematol.* 2020, 42(4):363-370. https://doi.org/10.1111/ijlh.13177
- [247] Soslau G.: De novo synthesis of DNA in human platelets. Arch Biochem Biophys. 1983, 226(1):252-6. https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90291-6
- [248] Ahmadi, M., Golalipour, M., Samaei, N.M.: Mitochondrial Common Deletion Level in Blood: New Insight Into the Effects of Age and Body Mass Index. *Curr Aging* Sci. 2019, 11(4):250-254. https://doi.org/10.2174/1874609812666190201163421
- [249] Wang P., Liu Y.L., Han, L., Zhao, F.L., Guo, F., Wang, X.A., Lv, Y.M.: Mitochondria DNA 4 977 bp Common Deletion in Peripheral Whole Blood from Healthy Donors, *Biomedical and Environmental Sciences*, 2013, 26(12):990-993. https://doi.org/10.3967/bes2013.035
- [250] Mengel-From, J., Thinggaard, M., Dalgård, C., Kyvik, K.O., Christensen, K., Christiansen, L.: Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells declines with age and is associated with general health among elderly. *Hum Genet*. 2014, 133(9):1149-59. https://doi.org/10.1007/s00439-014-1458-9
- [251] Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., J. Lemasters J.: Minireview: Selective Degradation of Mitochondria by Mitophagy, Arch Biochem Biophys. 2007, 462(2):245–253c10.1016/j.abb.2007.03.034
- [252] Murray, V., Chen, J.K., Chung, L.H.: The Interaction of the Metallo-Glycopeptide Anti-Tumour Drug Bleomycin with DNA. Int J Mol Sci. 2018, 19(5):1372. https://doi.org/10.3390/ijms19051372