

STRATEGICZNY PROJEKT BADAWCZY NARODOWEGO CENTRUM BADAŃ I ROZWOJU P.T. „TECHNOLOGIE WSPOMAGAJĄCE ROZWÓJ BEZPIECZNEJ ENERGETYKI JĄDROWEJ”

ZADANIE NR 6. ROZWÓJ METOD ZAPEWNIENIA BEZPIECZEŃSTWA
JĄDROWEGO I OCHRONY RADIOLOGICZNEJ DLA BIEŻĄCYCH
I PRZYSZŁYCH POTRZEB ENERGETYKI JĄDROWEJ

CEL 2: ROZWÓJ METOD DOZYMETRII BIOLOGICZNEJ ORAZ
BIOFIZYCZNYCH MARKERÓW I INDYKATORÓW WPŁYWU
PROMIENIOWANIA NA ORGANIZMY ŻYWE. (ETAPY 6, 7, 8, 9 i 10)

*Strategic research project of The National Centre for Research and Development
'Technologies supporting the development of safe nuclear power'
Research task No. 6 „Development of nuclear safety and radiological protection
methods for the nuclear power engineering's current and future needs”
Objective 2. Development of the biodosimetry and biophysics markers
of ionizing radiation in leaving beings*

Kamil Brzóska, Maria Kowalska, Marcin Kruszewski,
Anna Lankoff, Sylwester Sommer

Dozymetria biologiczna pozwala odczytać dawkę pochłoniętą promieniowania jonizującego w organizmie i jest niezbędnym elementem systemu ochrony radiologicznej. Aby zapewnić większą wiarygodność uzyskanych wyników metoda analizy dicentryków zostanie akredytowana w 2 laboratoriach, a w jednym istniejąca akredytacja zostanie rozszerzona o biodozymetrię mieszane-go promieniowania gamma i neutronowego. Jedną ze strategii dostosowania dozymetrii biologicznej do scenariusza masowego zdarzenia jest łączenie laboratoriów we współdziałającą sieć. Założenia takiej sieci zostały opracowane i opisane. W trakcie projektu wypróbowano nowe, obiecujące metody: analizę ekspresji genów (m.in. FDXR, GADD45A) na poziomie mRNA z wykorzystaniem techniki PCR oraz metody oparte na PCC (przedwczesnej kondensacji chromosomów), w szczególności RICA (The Rapid Interphase Chromosome Assay). Obie metody okazały się skutecznymi metodami dozymetrii biologicznej.

Biological dosimetry allows to read the absorbed dose of ionizing radiation in the body and is an essential element of the system of radiological protection. To ensure greater reliability of the results obtained by dicentric assay method will be accredited in 2 laboratories, and one existing accreditation will be extended to biodosimetry of mixed gamma and neutron radiation. One of the strategies to adapt biological dosimetry to the mass events scenario is to combine laboratories in cooperating network. Assumptions of such a network have been developed and described. The new methods of biological dosimetry have been investigated: analysis of gene expression (including FDXR, GADD45A) at the mRNA level using PCR method and methods based on the PCC (premature chromosome condensation), in particular RICA (The Interphase Chromosome Rapid Assay). Both methods have proven to be effective methods of biological dosimetry.

Słowa kluczowe: dozymetria biologiczna, test chromosomów di centrycznych, ekspresja genów, promieniowanie neutronowe, szybka identyfikacja osób napromienionych

Key words: biological dosimetry, dicentric assay, gene expression, neutron radiation, radiation triage

Szeroki wachlarz tematów dotyczących dozymetrii biologicznej w Strategicznym Projekcie Badawczym „Technologie wspomagające rozwój bezpiecznej energetyki jądrowej” świadczy o konieczności prowadzenia badań nad wpływem promieniowania na organizm ludzki, a szczególnie ciągłego rozwijania i podtrzymywania metod dozymetrii biologicznej. W kontekście Programu Polskiej Energetyki Jądrowej, tego typu prace mogą być pomocne w wielu jego aspektach:

- Percepcja ryzyka promieniowania jest jednym z istotnych czynników w procesie kształtowania akceptacji społecznej dla przemysłu jądrowego. Generalnie społeczeństwo lepiej poinformowane i mające zaufanie do władz, widzące, że rozwój programów jądrowych jest dobrze przygotowany, transparentny, kompleksowo realizowany i powiązany z nauką jest bardziej skłonne do zaakceptowania takiego programu. Dozymetria biologiczna pozwalająca na odtworzenie dawek indywidualnych mogłaby być ważną częścią tego procesu.
- Pomimo przewidywalnej niskiej awaryjności obiektów jądrowych, wzrastające zagrożenie atakami terrorystycznymi z użyciem materiałów rozszczepialnych oraz możliwość wykorzystania elektrowni jądrowych jako potencjalnych obiektów klasycznego ataku terrorystycznego zwiększa możliwość narażenia na napromienienie jonizujące ogółu społeczeństwa. Poza tym, jak pokazuje historia, awarie w elektrowniach jądrowych zdarzają się również w wyniku splotu niekorzystnych zdarzeń środowiskowych, czy błędów ludzkich. W każdym z tych przypadków dozymetria biologiczna jest niezbędnym uzupełnieniem, a w pewnych scenariuszach jedyną metodą odtworzenia, czy też potwierdzenia dawek indywidualnych.
- Laboratoria zajmujące się radiobiologią i realizujące badania naukowe w tej dziedzinie mogą być zapleczem eksperckim (częścią TSO) dla dozoru jądrowego w zakresie wpływu promieniowania na zdrowie człowieka.
- Istnieją też prawne przesłanki zobowiązujące służby zajmujące się ochroną radiologiczną do utrzymania dozymetrii biologicznej (indywidualne odtworzenie dawki) w każdym kraju członkowskim: wydawnictwo Międzynarodowej Agencji Energii Atomowej - General Safety Standards, General Safety Requirements Part 3 oraz Dyrektywa Rady Europejskiej 2013/59/EURATOM artykuł 69 4 b.
- Metody dozymetrii biologicznej i biologii molekularnej mogą pomóc zrozumieć efekty zdrowotne długotrwałego działania niskich dawek na jakie mogą być narażeni pracownicy przemysłu jądrowego.

W ramach realizacji etapu 6, 7 i 8 w dwóch laboratoriach: IChTJ i IFJ rozpoczęto proces akredytacji oceny narażenia ludzi na promieniowanie jonizujące w oparciu o pomiar częstości występowania chromosomów dicentrycznych, a w CLOR rozszerzono akredytację o procedurę wyznaczania dawki pochłoniętej mieszanego promieniowania gamma i neutronowego.

Analiza częstości występowania chromosomów dicentrycznych jest obecnie uznawana za najbardziej wiarygodną metodę dozymetrii biologicznej do oceny narażenia ludzi na promieniowanie jonizujące (rys.1, 2)



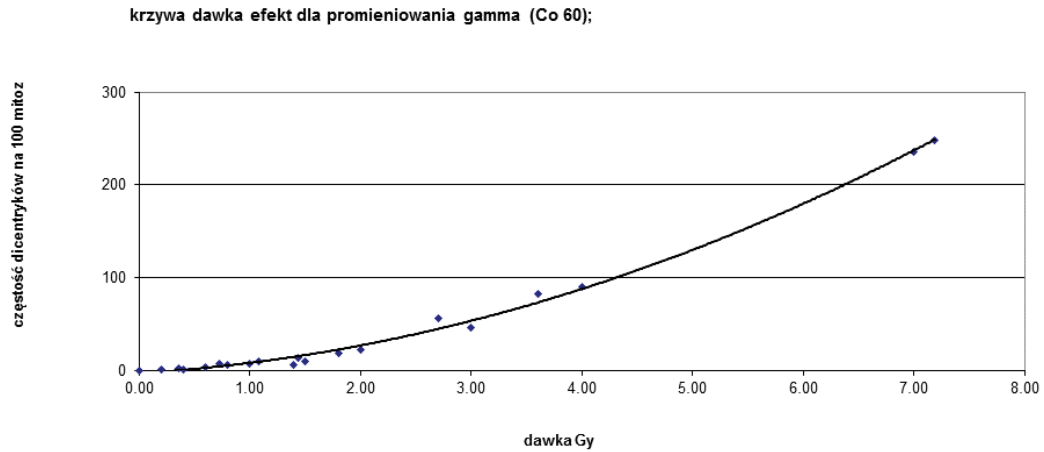
Rys. 1. Zdjęcie mitozy z chromosomem dicentrycznym w czerwonej elipsie (S. Sommer)

Figure 1. Mitotic cell with dicentric chromosome in red ellipse

Jednak z uwagi na praco- i czasochłonność metody, w przypadku narażenia na promieniowanie dużej grupy osób otrzymanie wyników w akceptowalnym z medycznego punktu widzenia przedziale czasu staje się bardzo trudne lub wręcz niemożliwe.

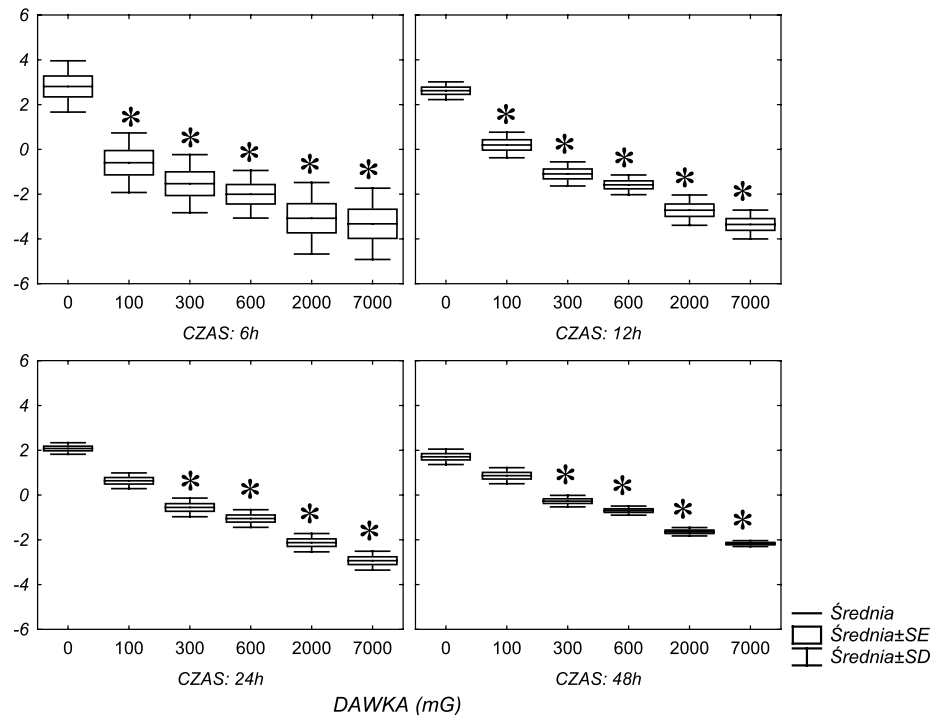
Akredytacja tej metody w trzech niezależnych laboratoriach pozwoli na stworzenie podwalin sieci laboratoriów biodozymetrycznych, które współpracując ze sobą, a także z laboratoriami zagranicznymi zagwarantują znaczne skrócenie czasu potrzebnego na analizę dużej liczby próbek. Opracowane zostały założenia (w ramach etapu 6, IChTJ) utworzenia takiej sieci oraz opisano, w jaki sposób takie organizacje działają na świecie.

W ramach etapu 7 (IFJ) zbadano wpływ czynników genetycznych na przebieg procesów naprawy DNA w komórkach krwi obwodowej poddanych działaniu promieniowania jonizującego. Jest to wkład w opracowanie metody szybkiej identyfikacji populacji najbardziej narażonej na działanie promieniowania jonizującego (o zwiększonym ryzyku zapadalności na nowotwory), np. wśród pracowników elektrowni jądrowej, i umożliwienie tej grupie ludzi podjęcie świadomego wyboru w momencie zatrudnienia na stanowisku narażonym na działanie promieniowania jonizującego.



Rys. 2. Analiza chromosomów dicentrycznych odbywa się poprzez porównanie częstości chromosomów dicentrycznych w badanej próbce z wartościami na krzywej kalibracyjnej otrzymanej w doświadczeniach *in vitro*. Na rysunku przedstawiono przykładową krzywą dawka – efekt (S. Sommer)

Figure 2. Dicentric assay: dose estimation is performed by the comparison of *in vitro* dose effect curve with frequency of dicentric chromosomes in the sample. Chart above depicts *in vitro* dose effect curve



Rys. 3. Ekspresja genu *FDXR* w napromienionej krwi od 6 dawców wyrażona jako wartości ΔCt (delta Ct) odwrotnie proporcjonalne do poziomu mRNA. Gwiazdki oznaczają istotną statystycznie różnicę w stosunku do próbki kontrolnej (ANOVA + test Tukey'a post hoc). (K. Brzóška)

Figure 3. The *FDXR* gene expression in irradiated blood from 6 donors, expressed in ΔCt (delta Ct) inversely proportional to the mRNA level. The asterisks show statistically significant difference to the control (ANOVA + Tukey post hoc test)

Opracowanie i akredytacja procedury wyznaczenia pochłoniętej dawki mieszanego promieniowania gamma i neutronowego w oparciu o pomiar częstości występowania chromosomów dicentrycznych w limfocytach krwi obwodowej osoby narażonej zostało zrealizowane w ramach etapu 8 w CLOR. Otrzymano jedyną krzywą kalibracyjną dla promieniowania mieszanego w naszym kraju. Odpo-

wiada ona bezpośrednio na zapotrzebowanie wynikające z energetyki jądrowej. Dodatkowo do konstruowania tej krzywej zastosowano metody analizy bayesowskiej, co jest również zupełną nowością.

Tworzenie sieci laboratoriów nie jest jedynym sposobem zapewnienia odtworzenia dawki w realnym czasie w trakcie zdarzeń o dużej liczbie potencjalnie napromie-

nionych osób. Możliwe są inne strategie: automatyzacja metod, podejście przesiewowe – „triage” (szybsza analiza mniejszej liczby komórek kosztem zmniejszenia wiarygodności wyniku) oraz poszukiwanie nowych, szybszych metod biodozymetrycznych.

Nową metodą o dużym potencjale zastosowania w badaniach wysokoprzepustowych, nad którą pracuje się w wielu laboratoriach na całym świecie jest analiza ekspresji genów na poziomie mRNA (transkryptomu) w komórkach krwi obwodowej z wykorzystaniem techniki PCR, z detekcją produktu w czasie rzeczywistym (qPCR). Analizy oparte na metodzie qPCR są szybkie, możliwe do zautomatyzowania, dokładne i wiarygodne. IChTJ jest jedyną instytucją w Polsce, gdzie prowadzone są tego typu badania.

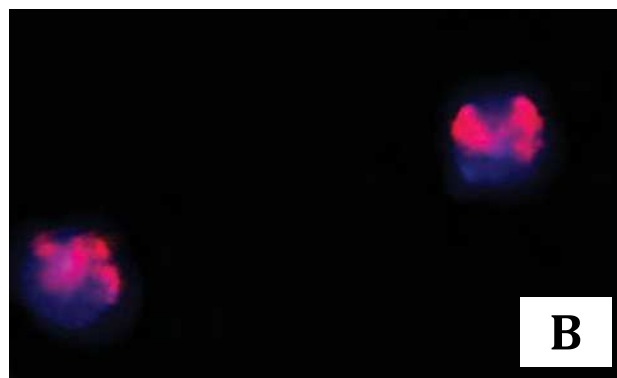
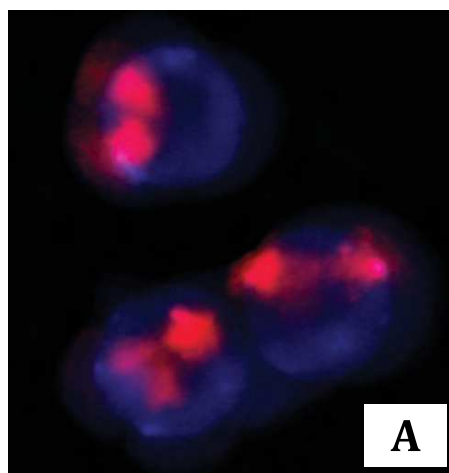
W trakcie badań prowadzonych w ramach etapu 9 krew pobraną od sześciu zdrowych dawców napromieniono dawkami promieniowania X z zakresu 0–7 Sv, po czym zbadano poziom ekspresji wybranych genów. W przypadku jedenastu spośród badanych genów (*BAX*, *BBC3*, *CDKN1A*, *DDB2*, *FDXR*, *GADD45A*, *GDF15*, *MDM2*, *SESN2*, *TNFRSF10B*, *TNFSF4*) zaobserwowano istotny wzrost ekspresji w napromienionych próbkach. Pięć spośród badanych genów (*ATF3*, *BCL2*, *PLK3*, *SERPINE1*, *VWCF*) nie wykazało zmian ekspresji pod wpływem promieniowania jonizującego. Nie stwierdzono istotnego spadku ekspresji w odpowiedzi na promieniowanie jonizujące w przypadku żadnego z badanych genów. Na rys. 3. dla przykładu pokazano zmianę ekspresji genu *FDXR* w czterech punktach czasowych, po dawkach w przedziale 0–7 Sv.

Uzyskane wyniki sugerują, że stosując analizę ekspresji genów do celów dozymetrii biologicznej można będzie z dużą wiarygodnością odróżnić próbki napromienione od próbek nienapromienionych. Dokładne oszacowanie dawki pochłoniętej będzie jednak trudne z uwagi na znaczącą zmienność ekspresji genów pomiędzy poszczególnymi dawkami, zarówno jeśli chodzi o poziom ekspresji we krwi nienapromienionej jak również poziom indukcji po napromienieniu. Wydaje się, że opisywana metoda będzie bardzo przydatna do szybkiego przebadania dużej grupy ludzi i zidentyfikowania osób w przypadku których dawka pochłonięta przekracza wartość progową na poziomie 100–300 mGy. Niezbędne są dalsze badania przeprowadzone na większych grupach dawców pozwalające dokładniej oszacować zmienność międzyosobniczą ekspresji genów oraz wpływ takich czynników jak płeć, wiek, palenie tytoniu, polimorfizmy genetyczne i rozmaite schorzenia na wiarygodność otrzymanych wyników.

W ramach etapu 10 testowano nową, potencjalnie bardzo przydatną metodę dozymetrii biologicznej RICA (The Rapid Interphase Chromosome Condensation) (fot.1.). Metoda została opisana po raz pierwszy w 1997 i 2000 r. przez Prasanna. Jeżeli wierzyć publikacjom metoda miała cechować się 4 zaletami: być szybka w wykonaniu, łatwa w analizie, przydatna do oceny wielu próbek w krótkim czasie i możliwa do automatyzacji.

Metoda RICA polega na liczeniu częstości dodatkowych terytoriów chromosomowych. Na fot.1. widoczne są wybarwione na czerwono terytoria chromosomu nr 1 lim-

focytów krwi obwodowej. Normalnie obserwuje się 2 terytoria chromosomu nr 1. W wyniku uszkodzenia chromosomu pojawiają się dodatkowe terytoria. W panelu A i B, widoczne są odpowiednio 1 i 3 terytoria, które zostały indukowane promieniowaniem. Zgodnie z otrzymanymi w trakcie realizacji projektu wynikami, metoda RICA pozwala na oszacowanie dawki w przedziale dawek 0–3 Gy. Dla tych wartości uzyskaliśmy liniowe krzywe dawka–efekt dla promieniowania X i promieniowania gamma. Przy większych wartościach dawek nie obserwowano zależności liniowej występowania dodatkowych terytoriów chromosomowych od dawki promieniowania, ich częstość ulegała wysyceniu. Jest to sprzeczne z danymi literaturowymi, gdzie obserwowano zależność liniową do dawek rzędu 25 Gy.



Fot. 1. Zdjęcia jąder limfocytów napromienionych 5 Gy promieniowania X, przygotowanych metodą RICA i nakropionych na szkiełko przy pomocy cytopspinu. Widoczne wybarwione metodą FISH terytoria chromosomu nr 1 (na czerwono) (S. Sommer)

Photo 1. Picture of nuclei of the lymphocytes after irradiation with 5 Gy X-rays, dropped by cytopspin. Nucleolus chromatin was artificially condensed by RICA method and territories of chromosome 1 painted in red by FISH DNA-probes are visible

Oprócz metody RICA analizowano również przydatność dla celów dozymetrii biologicznej innej metody cytogenetycznej PCC (Przedwczesnej Kondensacji Chromosomów). Skonstruowano i następnie sprawdzono krzywe kalibracyjne dla:

- PCC indukowane fuzją z komórkami CHO;
- chemicznie indukowane PCC – analiza częstości dodatkowych fragmentów PCC;
- chemicznie indukowane PCC – analiza częstości długich chromosomów;
- chemicznie indukowana PCC – analiza częstości pierścieni.

Każda z wyżej wymienionych metod PCC może być użyta w biodozymetrii. W przypadku odtworzenia wysokich

dawek promieniowania najlepsze są metody chemicznie indukowanej PCC, dobrze działające nawet do 30 Sv, kiedy klasyczna analiza dicentryków jest nieprzydatna. Metoda fuzji limfocytów z komórkami CHO skuteczna jest w zakresie dawek od 0 do 10 Sv, ale ze względu na kinetykę zanikania dodatkowych fragmentów można jej użyć tylko do 48 godzin po napromienieniu.

Prace wykonane w ramach celu 2 prezentowano na kilku konferencjach. Powstała jedna publikacja naukowa, druga będzie opublikowana niebawem – jest po pierwszych pozytywnych recenzjach oraz opublikowano jedno sprawozdanie.

Przykładowe doniesienia konferencyjne:

Lp.	Autorzy	Tytuł	Konferencje
1.	Kamil Brzóska, Maria Wojewódzka, Tomasz Stępkowski, Marcin Kruszewski	Real-time PCR analysis of expression of DNA damage responsive genes as a biomarker for biological dosimetry	Global Conference on Radiation Topics ConRad 2013. Monachium, Niemcy, 13-16.05.2013, plakat;
2.	Kamil Brzóska	Classical and modern methods in biological dosimetry	Regional Workshop on Regulatory Control of Radioactive Discharges to the Environment. Warszawa, Polska; 17-21.06.2013, referat
3.	Kamil Brzóska, Marcin Kruszewski	Gene expression signatures in blood as a biomarker for biological dosimetry	XVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Badań Radiacyjnych im. Marii Skłodowskiej-Curie. Polska, Białowieża, 23-26 września 2013, referat sekcyjny
4.	Kamil Brzóska	Towards development of transcriptional biodosimetry for identification of irradiated individuals and assessment of absorber radiation dose	4th Annual RENEB Meeting. Włochy, Rzym, 4-6 marca 2015, referat
5.	Sylwester Sommer, Iwona Wewiór, Iwona Buraczewska, Teresa Bartłomiejczyk, Irena Szumiel, Marcin Kruszewski	PCC methods in biological dosimetry: PCC fragments, PCC rings, unusually long PCC fragments, the Rapid Interphase Chromosome Assay (RICA)	Monachium, Niemcy, 13-16.05.2013, plakat

Publikacje:

Lp.	Autorzy	Tytuł	Wydawnictwo
1.	Kamil Brzóska, Marcin Kruszewski	Toward the development of transcriptional biodosimetry for the identification of irradiated individuals and assessment of absorbed radiation dose	Radiation and Environmental Biophysics 2015, DOI 10.1007/s00411-015-0603-8
2.	Sylwester Sommer	Technologie wspomagające rozwój bezpiecznej energetyki jądrowej	Ekatom NR 4/1 2012
3.	Sylwester Sommer, Iwona Buraczewska, Katarzyna Sikorska, Teresa Bartłomiejczyk, Irena Szumiel, Marcin Kruszewski	The rapid interphase chromosome assay (RICA) implementation: comparison with other PCC methods	Po pozytywnych recenzjach w Nukleonice

*dr Maria Kowalska,
Centralne Laboratorium Ochrony Radiologicznej,
Warszawa*

*prof. dr hab. Marcin Kruszewski,
prof. dr hab. Anna Lankoff,
dr Sylwester Sommer,
dr Kamil Brzóska,
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej,
Warszawa*