

## SOUČASNÉ TRENDY V BIDOZIMETRII A JEJÍ UPLATNĚNÍ VE VOJENSKÉ MEDICÍNĚ

### CURRENT TRENDS IN BIDOSIMETRY AND ITS APPLICATION IN MILITARY MEDICINE

<sup>1</sup>Mgr. Marcela Jeličová, <sup>1</sup>Mgr. Anna Lierová, <sup>1</sup>Mgr. Lenka Zárybnická, Ph.D.,  
<sup>1</sup>doc. MVDr. Zuzana Šinkorová, Ph.D., <sup>2</sup>Ing. Radovan Metelka, Ph.D.

<sup>1</sup>Katedra radiobiologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové,  
[marcela.jelicova@unob.cz](mailto:marcela.jelicova@unob.cz)

<sup>2</sup> Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

**Abstrakt:** V současné době je biodozimetrie rychle se rozvíjejícím oborem radiobiologie. Biodozimetrie se při radiačních událostech či rozsáhlých užití jaderných zbraní stává důležitým prostředkem hodnocení rozsah události a umožňuje tak optimalizaci intervence integrovaného záchranného systému a predikci následků události. Ionizující záření mění strukturu, funkci a syntézu nukleových kyselin, čímž způsobuje nevratné změny a poškození. Ke kvantifikaci těchto poškození slouží základní biodozimetrické metody jako ukazatelé zpětného odečtu obdržené dávky. Článek podává přehled nejběžnějších aplikací používaných v klinickém výzkumu i praxi. Je zaměřen jak na standardní cytogenetické testy, tak na nové trendy a možnosti biodozimetrie se zaměřením na oblast vojenské medicíny. Průtoková cytometrie se stala nenahraditelnou v klinické medicíně a v současné době se zvažuje její využití i v oblasti polního zdravotnického systému. Další metodou, která se jeví jako velmi perspektivní pro detekci poškození způsobené ionizujícím zářením a tím stanovení zpětného odečtu obdržené dávky, je elektrochemická analýza nukleových kyselin. Ta představuje novou, dosud méně používanou alternativu k dosavadním metodám a hlavním očekáváním je zpřesnění výsledků a zkrácení doby analýzy.

**Klíčová slova:** biodozimetrie, ionizující záření, poškození DNA, průtoková cytometrie, elektrochemická detekce

## ÚVOD

Rostoucí počet rizikových režimů vlastních nukleární zbraně a možnost teroristických útoků špinavými bombami vytváří nová rizika pro všechny státy tak, jak dochází ke změně bezpečnostního prostředí celého světa. Na rozdíl od situací, při kterých lze expozici osob ionizujícímu záření předpokládat a tedy i cíleně měřit dávku ozáření například osobními dozimetry, úroveň náhodného a nepředvídatelného ozáření, ke kterému dochází při nehodách a útoku zbraněmi emitujícími ionizující záření, lze určovat pouze ex post a to na základě měření poškození tkání a buněk ozářeného organismu. Protože ionizující záření vyvolává poškození základních stavebních kamenů buněk, jejich genetické informace a v konečném důsledku i buněk samotných, je předpoklad, že absorbovaná dávka je úměrná rozsahu poškození organismu. Z tohoto předpokladu vycházejí současné radiobiologické metody zaměřené na kvalifikovaný, zpětný odhad obdržené dávky záření, kterému byl suspektně ozářený jedinec vystaven. Z praktického hlediska jsou na metodu radiobiologického určení dávky kromě co největší přesnosti kladeny i další požadavky jako jsou dostupnost analyzovaného materiálu a hlavně rychlost stanovení.

### 1. Klasické biodozimetrické postupy

Biodozimetrie zahrnuje cytologické metody, sloužící především k monitorování krevního obrazu a cytogenetické metody, které jsou zaměřeny na přítomnost chromozomových aberací v lymfocytech [1]. V důsledku působení ionizujícího záření na organismus nastávají také změny ve struktuře DNA a tím dochází ke vzniku chromozomových aberací [2]. V současné době je za zlatý standard biodozimetrických metod považován test dicentrických chromozomů. Dicentrické chromozomy jsou nestabilní chromozomové aberace vznikající fúzí dvou fragmentů chromozomu, přičemž vzniká chromozom se dvěma centromerami. Běžně užívanou cytogenetickou metodou je také stanovení počtu mikrojader, který je z hlediska náročnosti jednodušší než test dicentrických chromozomů. Mikrojádra jsou fragmenty chromozomů, které zůstávají volně v cytoplasmě, místo přechodu do dceřiných jader [3, 4]. Sledování zastoupení dicentrických chromozomů v jádrech periferních lymfocytů je tak jednou z hlavních metod klasické biodozimetrie, podle které je možné zpětně stanovit obdrženou dávku ionizujícího záření. Odebraná periferní krev je stimulována fytohemaglutinem, který způsobí replikaci DNA a nastartuje buněčné dělení,

při kterém jsou pozorovány chromozomální abnormality. Případné změny jsou pak pozorované v optickém mikroskopu [2].

## **2. Průtoková cytometrie**

Průtoková cytometrie patří mezi laboratorní metody umožňující rychlou analýzu buněk na základě jejich optických a fluorescenčních vlastností. Je využívána zejména na stanovení povrchových i vnitřních antigenů buněk periferní krve, tělních tekutin a tkání. Specifické antigeny jsou detekovány monoklonálními protilátkami s fluorochromy [5]. Množství a intenzita fluorescence poskytuje informaci o složení populací buněk, které se mění v závislosti na obdržené dávce ionizujícího záření. Tento fakt, že jsou krevní buňky vysoce senzitivní k expozici ionizujícímu záření, vedl k poměrně četným pokusům o využití cirkulujících leukocytů jako biodozimetrických indikátorů obdržené dávky, která je rozhodujícím parametrem pro indikaci léčby zaměřené buď na podporu krvetvorby, nebo pokus o záchranu krvetvorby transplantací kmenových a progenitorových buněk. Sledování změn zastoupení leukocytárních populací a subpopulací lymfoidních řad v krevním oběhu a funkční testy imunitního systému lze tak s úspěchem použít při sledování zdravotního stavu vojáků a jeho změn po vystavení poškozujícím vlivům, které způsobuje v závislosti na dávce střední až těžké poruchy krvetvorby patřící k nejzávažnějším projevům nemoci z ozáření [2].

### **2.1 Změny proteinového profilu jako indikátor buněčného poškození (H2AX)**

Histon H2AX patří mezi jeden z nejdůležitějších proteinů odpovídající za integritu genomu. Jako reakce na poškození DNA, zejména na indukci dvojitých zlomů ionizujícím zářením, je H2AX pomocí kináz fosforylován na ser139 na svém c-konci [6]. Vzhledem k tomu, že fosforylace histonu H2AX je jeden z prvních dějů zahájených v reakci na dvojitě zlomy, reflektuje její míra množství poškození DNA. Proto lze fosforylovaný histon  $\gamma$ H2AX považovat za dobrý biodozimetrický marker ke zpětnému odečtu absorbované dávky záření [7]. K detekci fosforylace H2AX se využívá specifických protilátek a průtokové cytometrie. Tento imunocytochemický přístup umožňuje menší náročnost a vyšší citlivost oproti jiným metodám [8].

### **3. Elektrochemická detekce nukleových kyselin**

Zcela nový nástroj pro biodozimetrii by mohla představovat elektrochemická detekce poškozené DNA. Elektrochemická analýza nukleových kyselin představuje novou, dosud méně používanou alternativu k dosavadním optickým metodám [9]. Předmětem studia elektrochemie je přenos elektronů mezi analyzovanou látkou ve vodním prostředí a elektrodou do tohoto prostředí ponořenou, přičemž se tento přenos elektronů projeví změnou sledovaného signálu. Na základě toho lze zjistit přítomnost dané látky, studovat její strukturu či interakci s jinými molekulami. Ukázalo se, že nukleové kyseliny jsou elektrochemicky aktivní. Za elektrochemické signály DNA jsou odpovědný redukční a oxidační elektrodové děje jednotlivých bází řetězce DNA a tyto signály reflektují změny ve struktuře DNA [10]. Pomocí této metody lze detekovat jak přímé poškození řetězce molekuly DNA, tak změny vnitřních redoxních dějů nukleových kyselin nebo detekovat látky, které nukleové kyseliny poškozují, jako například volné radikály [11].

#### **3.1 Biosenzory**

V posledních letech se k detekci nukleových kyselin využívají biosenzory, což jsou zařízení, složená z citlivé vrstvy, která specificky interaguje s molekulami analytu, a z převodníku signálu, který interakci převádí na měřitelný signál [12]. Konstrukce funkčního elektrochemického biosenzoru zahrnuje výběr vhodných pracovních elektrod, modifikaci povrchu elektrody a blokování neobsazeného povrchu elektrody proti nesespecifické adsorpci nesespecifické DNA a dalších látek [10]. Druh pracovní elektrody se volí v závislosti na druhu analytu, uspořádání experimentu a režimu měření [11]. Pro sestavení senzorů se užívají nejčastěji elektrody na bázi uhlíku (např. skleněná uhlíková elektroda (GCE), elektroda z pyrolytického grafitu (PGRE), uhlíková pastová elektrody (CPE), uhlíkové filmové elektrody (CFEs), tištěné elektrody (SPCEs) a elektrody modifikované uhlíkovými nanočásticemi) nebo modifikované rtuťové elektrody (visí rtuťová kapková elektroda (HMDE) nebo rtuťová filmová elektroda (MFE)) [12].

Biosenzor pro detekci poškozené DNA obsahuje elektrodu s DNA přímo na jejím povrchu, což umožňuje studium interakcí molekuly DNA imobilizované na povrchu elektrody v roztoku s analytem, který působí jako promotor mezi elektrodou a biologickou molekulou. Interakce mezi nimi jsou poté převedeny na elektrické signály. Pro navržení takového DNA modifikovaného senzoru je nezbytné pochopit strukturu a elektroaktivní vlastnosti nukleových kyselin [13]. Dvoušroubovici DNA tvoří dva antiparalelně spojené

polynukleotidové řetězce složené z nukleotidů. Nukleotidy obsahují cukr deoxyribózu, fosfátové skupiny a jednu ze čtyř nukleových bází. Informační funkci mají právě báze, jimiž může být adenin (A), guanin (G), cytosin (C) nebo thymin (T). Všechny báze vykazují elektroaktivitu a z hlediska orientace se nacházejí na vnitřní straně šroubovice, což ovlivňuje jejich vzdálenost a dostupnost pro elektrody [14]. Je třeba brát v úvahu fakt, že na obou elektrodách dochází k různým redoxním dějům. Adenin a cytosinové zbytky se na rtuťových elektrodách redukují [11], kdežto na uhlíkových elektrodách dochází k oxidaci všech bází [12]. Také záleží na struktuře sledované DNA. Signály jednovláknové DNA na elektrodách se výrazně liší od signálů dvouřetězové DNA. Nukleové kyseliny vykazují také vysokou afinitu k samotným elektrodám a dochází na jejich povrchu k absorpci, čehož lze využít přímo ke sledování molekulárních interakcí nebo analýze nebezpečných látek poškozující nukleové kyseliny [11].

## ZÁVĚR

Kvalifikované zpětné stanovení míry poškození organismu ionizujícím zářením a určení absorbované dávky je důležité pro včasné zahájení léčby akutní nemoci z ozáření. Z tohoto důvodu vyvstává praktická potřeba validních biodozimetrických ukazatelů do 24 hodin po ozáření. Na základě tohoto požadavku jsou rozšiřovány techniky urychlující a zkvalitňující analýzu obdržené dávky. Jde zejména o metody, které jsou oproti klasickým biodozimetrickým metodám (stanovení dicentrických chromozómů a mikrojader) méně časově i technicky náročné, ale stejně citlivé. Je zvažováno využití průtokové cytometrie k rychlé analýze změn lymfocytárních populací v periferní krvi, které korelují s obdrženou dávkou, nebo např. využití elektrochemických biosenzorů k okamžité a velmi citlivé detekci poškození struktury na molekulární úrovni nukleových kyselin. Tato metoda v provedení biosenzorů nabízí zpětně stanovit absorbovanou dávku i neškoleným personálem.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Pejchal, J. et al; *Biodozimetrické postupy*, Vojenské zdravotnické listy, 2010, 64 (2)
- [2] Šinkorová, Z.; Zárybnická, L. *Uplatnění průtokové cytometrie ve vojenské medicíně a radiobiologii*. Vojenské zdravotnické listy, 2008, 4
- [3] Sullivan, J. M. et al. *Assessment of Biodosimetry Methods for a Mass-Casualty Radiological Incident*. Health Physics 2013, 105(6): 540-554.

- [4] World Health Organization; *Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies*. International Atomic Energy Agency, Department of Nuclear Safety and Security, Incident and Emergency Centre, 2011.
- [5] Brown, M.; Wittwer, C.; *Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology*. Clinical chemistry, 2000, 46.8: 1221-1229.
- [6] Darzynkiewicz, Z., et al. *Analysis of individual molecular events of dna damage response by flow and image assisted cytometry*. Methods in cell biology, 2011, 103: 115.
- [7] Řezáčová, M., et al. *Fosforylovaný histon H2AX-nový indikátor poškození DNA*. Chemické Listy, 2011, 105: 108-113.
- [8] Tanaka, T., et al. *Cytometric analysis of DNA damage: phosphorylation of histone H2AX as a marker of DNA double-strand breaks (DSBs)*. Chromatin Protocols: Second Edition, 2009, 161-168.
- [9] Bartošík, M.; Paleček, E.; Vojtěšek, B.; *Elektrochemická analýza nukleových kyselin, bílkovin a polysacharidů v biomedicině*. Klinická onkologie, 2014, 27.3.
- [10] Vysokoškolské skriptum, Senzory, VŠCHT Praha, 2007
- [11] Paleček, E. et al. *Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage*. Biosensors and Bioelectronics, 1998, 13.6: 621-628.
- [12] Vyskočil, V., et al. *Electrochemical DNA biosensors—useful diagnostic tools for the detection of damage to DNA caused by organic xenobiotics (A review)*. Sensing in Electroanalysis. 2012. p. 141-162.
- [13] Brett, AM Oliveira. *Electrochemistry for probing DNA damage*. Encyclopedia of Sensors, 2006, 3: 301-314.
- [14] Diculescu, V. C. et al. *Electrochemical DNA sensors for detection of DNA damage*. Sensors, 2005, 5.6: 377-393.