

SUGÁRÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLATOK: A KOLONIA-KÉPZŐ ASSAY ÉS A COMET-ASSAY PRÓBÁJA

RADIATION SENSITIVITY STUDIES: THE TRIAL OF THE COMET-ASSAY AND COLONY-FORMING ASSAY

KIS Enikő

(ORCID: 0000-0002-6761-0423)

kise@osski.hu

Absztrakt

Az orvosi gyakorlatban közismert tény, hogy a sugárterápiára adott biológiai válasz egyénenként eltérő. Számos kutató és szerző foglalkozik az egyéni sugárérzékenység fogalmával, lehetséges gyakorlati következményeivel és kimutatásával. Célszerű lenne hasonló eljárást bevezetni a sugárbaesetek helyszínén, vagy egyéb sugárveszélyes területen bevetésre kerülő katasztrófavédelmi dolgozók és katonák körében is. Jelen tanulmányunkban egyik lehetséges, bár a nemzetközi irodalomban még meglehetősen vitatott szűrési módszer alkalmazhatóságát tárgyaljuk.

A szerző ezúton szeretne köszönetet mondani dr. Sáfrány Gézának, MD, PhD, DSc a munka elvégzéséhez és a cikk megírásában nyújtott segítségéért.

Kulcsszavak: egyéni sugárérzékenység, katasztrófavédelem, sugárveszélyes környezet, comet-assay, kolónia-képző assay

Abstract

It is well known, that the biological answer for radiation treatment varies between patients. Many researchers and authors are focusing on the potential practical consequences of individual radio sensitivity. It would be useful to introduce a similar procedure for disaster workers or soldiers who might work in a radiation hazard area. We discuss here a possible, but rather controversial method for screening radiation sensitivity.

Keywords: individual radiation sensitivity, disaster management, radiation hazard area, comet-assay, colony forming assay

A kézirat benyújtásának dátuma (Date of the submission): 2019.02.07.

A kézirat elfogadásának dátuma (Date of the acceptance): 2019.03.11.

A SUGÁRÉRZÉKENYSÉG VIZSGÁLATÁNAK AKTUALITÁSA

Az első atomerőmű üzembe helyezése óta (1954, Oroszország) a világban 438 atomerőmű működik. A Csernobil-i (1986) illetve Fukushima-i (2011) katasztrófák elővigyázatosságra intenek. 1940-1999 között 417 sugárbaesetet tartanak számon, amely balesetekben 3003 személy szenvedett sugárterhelést. [1, 178. old.] A Csernobili katasztrófából adódóan 137 olyan személyt tartanak nyilván, akik klinikai tünetet eredményező sugárterhelést kaptak. Az első áldozatok a mentésben résztvevő tűzoltók és az erőmű dolgozói közül kerültek ki. [1, 178. old.; 2, 453. old.]

Legyen tettelegesség vagy baleset, az előre nem tervezett (baleseti) sugáréxpozíció lehetősége a radioaktív anyagok orvosi, kísérleti, energetikai vagy katonai felhasználásának szempontjából fennáll.

Egy esetleges katasztrófa esetén kritikusan fontos ismeret lehet a sérülteket kezelő orvos számára a mentési személyzet egyéni sugárérzékenysége, amely jelentősen befolyásolhatja az adott egyén sugárhatásra adott választ, a sugársérülést követő felépülésének folyamatát. Hosszú távon szeretnénk olyan, minimálisan invazív mintavétellel járó, gyorsan kivitelezhető szűrési eljárást kidolgozni, amely lehetővé teszi, hogy felmérhessük a sugárszövődmények kialakulásának veszélyét egyrészt a kórházi sugárkezelésre szoruló betegekben, másrészt a sugárveszélyes környezetben dolgozóknak is. Ezáltal például a radiológusok, a katonák, tűzoltók sugárérzékenysége akár az alkalmassági vizsgálat részeként is felmérhetővé válna.

AZ EGYÉNI SUGÁRÉRZÉKENYSÉG ÉS A COMET-ASSAY

A sugárterápiára kerülő betegekben a kezelés megkezdése előtt elvégzett egyéni sugárérzékenység felméréséből következtetni lehetne a korai és késői sugárterápiás szövődmények kialakulásának az esélyére. A várható kockázatok ismerete a beteg sugárterápiájának egyéni kialakítását is lehetővé tenné.

A sugárterápiával kezelt betegek mintegy 5-10%-ában alakulnak ki súlyos korai, illetve késői sugárszövődmények a nem daganatos sejtek extrém sugárérzékenysége, illetve fokozott elhalása miatt. A lehetséges mellékhatásokat a bőrpírtól a teljes szöveti nekrozison keresztül a genetikai instabilitásig különböző osztályozási rendszerekbe sorolják. Leggyakoribb a korai és késői mellékhatásokra való tagolás. A korai mellékhatások közé sorolják például a bőrpírt, mucositis-dermatitist, hajvesztéséget, míg késői mellékhatás lehet teleangiectázia¹, vagy fibrózis². [3, 103. old.] Irodalmi adatok alapján az egészséges szövetekben kialakuló korai és késői sugárterápiás szövődmények kockázata felbecsülhető a betegekből származó fibroblaszt³ és limfocita sejtek sugárérzékenységének vizsgálatával. [4, 125-126. old.; 5, 613. old.] Ez a két sejtípus a szervezet minden pontján előfordul, ráadásul a limfociták begyűjtése vérvétel útján alacsony invazivitású folyamat.

A fenti premisszák alapján az egyéni sugárérzékenységgel kapcsolatos vizsgálatok legmegfelelőbb alanyai jelenleg a sugárterápiára kerülő betegekből származó sejtek, illetve szövetminták. Ennek oka, hogy mivel ezek a sejtek a kezelt terület közelében helyezkednek el, a teljes radioaktív kezelés időtartama alatt a pontosan ismert és jól dokumentált dózisu sugárnyaláb útjába kerülnek. A betegek sugárzásra adott reakciói a továbbiakban nyomon követhetőek a klinikai monitorozásnak köszönhetően.

¹ hajszálerek tartós kitágulása

² fibrózis: adott szövet elpusztult sejtjeit fibrociták helyettesítik - hegesedés

³ a legáltalánosabban előforduló kötőszöveti sejt

A sugárzás hatására keletkező DNS lánc-törések száma állandó az adott dózisa a sejt típusától és sugárérzékenységétől függetlenül.⁴ Az egyes sejtek és egyedek sugárkárosodással szemben való ellenállása ezen törések kijavításának minőségéből, valamint időtartamából adódik. Ha a károsodott sejt nem tudja kijavítani a DNS-ében az ionizáló sugárzások által létrehozott egy- vagy kétláncú töréseket, elpusztul. Az emberi sejtek pusztulásának egyik leghatékonyabb *in vitro*⁵ nyomon követése kolónia-képző assay segítségével lehetséges. [4, 126. old.]

Az egyéni sugárérzékenység tehát összefüggésben van a sejtek DNS javító képességével. Az egyén sorsára nézve végső soron a sejtekben lévő DNS-javító (repair) enzimek szintje, az őket kódoló génekben esetleg jelenlevő mutációk, illetve az adott sejt osztódási állapota, a sérült DNS kijavítására rendelkezésre álló idő meghatározó lesz. Ez utóbbit a sejtciklus szabályozásában szerepet játszó különböző fehérjék számottevően befolyásolják. [1, 110-111. old.; 6, 932. old.; 7, S14-15. old.]

Feltételezhető tehát, hogy amennyiben mérni tudnánk a sejtek DNS javításának hatékonyságát, a javítás nyomán visszamaradó DNS-törések mennyiségét és ezek egyének közötti eltérését, valamint be tudnánk bizonyítani, hogy mindez összefüggésben van az esetleges klinikai mellékhatások előfordulásával az illető személyben, egyszerűen és gyorsan kezelhető módszert tudnánk kidolgozni a sugárzásra adott egyéni reakció szűrésére. Erre alkalmas módszer az egy-sejt elektroforézis vagy comet-assay, melynek segítségével a sugárkezelés következtében keletkező, illetve bizonyos idő elteltével hátramaradó, még töredezett DNS mennyiségét lehet az egyes sejtek szintjén kimutatni. [8, 190. old.; 9, 206-221. old.]

A nemzetközi orvosbiológiai folyóiratokban megjelent cikkek egy része szerint a különböző dózisokkal besugarazott sejtekben visszamaradó ún. reziduális DNS törések mennyisége összefüggésben van az egyéni sugárérzékenységgel. [4, 126-128. old.; 11, 931-936. old.; 12, 284-287. old.; 13, 645. old.; 15, 85. old.] Munkánk célja hosszú távon az egyéni sugárérzékenység felmérése még a sugárterápia megkezdése előtt a kórházi betegekben, másrészt alkalmassági vizsgálatként egy esetleges radiológiai vagy nukleáris incidenst követő helyszíni helyreállító munkálatokon dolgozó katonák és katasztrófavédelmi munkások körében. Ezen tanulmányban a kolónia képző assay valamint a comet-assay, mint lehetséges sugárérzékenység-kimutató módszer alkalmazhatóságát vizsgáltuk egy daganatos beteg-populáción.

MÓDSZEREK

Betegcsoportok

A vizsgálatok során 123 sugárterápiás betegből vettünk biológiai mintát (vérmintát és bőr-biopsziát) és azokat maradéktalanul feldolgoztuk. A vizsgálatokhoz felhasznált biológiai minták túlnyomó többségét Prof. Dr. Ésik Olga, Országos Onkológia Intézet, Budapest, bocsátotta rendelkezésünkre. (etikai engedély: ETT TUKEB 6008/1/ETT/2002). A betegekből származó bőr-biopsziás mintákból primér fibroblaszt-sejtkultúrákat indítottunk és klonogén-assay-vel mértük a fibroblasztok sugárérzékenységét. A fibroblasztok sugárérzékenységének további analizésére bevezettük a comet-assayt, amely lehetőséget nyújtott a repair-kapacitásuk mérésére is. A vérmintákat *in vitro* körülmények között besugaraztuk és a sejtek DNS-repair

⁴ 1Gy kis LET értékű sugárzás 1000 db egyláncú 40 db kétláncú törést okoz a DNS-ben [1, 58. old.]

⁵ laboratóriumi körülmények között, sejt-tenyésztéssel történő kísérletek

képességét mértük comet-assay-vel. Az eredményeinket statisztikai programok segítségével a betegek fibroblasztjainak sugárzásra adott *in vitro* túlélési arányával, valamint *in vivo* az egyéni klinikai sugárérzékenységgel vetettük össze.

A kontroll csoportba kezelés előtt álló sugárterápiás betegeket, valamint egészséges gyerekek fitymáiból származó primér fibroblasztokat soroltunk (K). A másik mintavételi csoportba olyan, már sugárterápiában részesülő betegek kerültek, akik bár felépültek a daganatos betegségükből, a sugárterápia következtében a sugármező által befogott területen toxikus reakciójuk alakult ki. Ezeket a betegeket további négy csoportba soroltuk:

- emlődaganatos betegek, akikben bőrfibrózis vagy teleangiectázia alakult ki (64 minta).
- toxikus késői idegrendszeri tüneteket mutató betegek (18 minta).
- olyan betegek, akikben a sugárterápia következtében mucositis/dermatitisz alakult ki (14 minta).
- olyan, vegyes betegcsoport (21 minta), amelyben az eddig említettektől eltérő toxikus sugárreakciók alakultak ki.

Sejtenyésztés és sugárkezelés

Primér fibroblaszt kultúra kialakítása

Fibroblaszt-sejtkultúra kialakítása céljából a bőrmintákat apró, 0,5x0,5mm-es darabkákra vágtuk, majd antibiotikumot tartalmazó PBS-pufferben mostuk. A bőrdarabkákat 25cm² felületű tenyésztő edénybe tettük és 1,5ml 40% főtális borjú-szérumot tartalmazó Dulbecco's Modified Mediumot (DMEM)⁶ adtuk, amely a bőrdarabkák letapadását szolgálta. Ezt követően a médiumot 5 ml térfogatra és 20% szérumtartalomra egészítettük ki. Körülbelül tíz nappal a bőrdarabkák letapadása után jelennek meg a környező területen a fibroblasztok, amelyek további 1-2 hét múlva begyűjthetők és tovább olthatók. A primer fibroblaszt-kultúrákat 20% szérum tartalmú DME-médiumban tartottuk fent.

A fibroblasztokat 10% FBS tartalmú DMEM tápban 5% CO₂ tartalmú légkörben 37°C-on tenyésztettük, majd a teljes konfluencia elérése után sugárkezeltek. A sugárkezelést 1-, 2-, 4- valamint 6Gy ⁶⁰Co- γ sugárzással végeztük (Gammatron-3 Siemens, Erlangen, Németország).

A primer fibroblasztok használatának hátránya, hogy kb. 2-3 hétig tart a sejtkultúra kialakítása. Mivel a fehér vérsejtek sugárérzékenysége szintén vizsgálható alkális és neutrális comet-assay-vel, a vérminták begyűjtése pedig egy egyszerű és alacsony invazivitású folyamat, úgy döntöttünk, hogy az azonos betegek vérmintáin is vizsgáljuk az *in vitro* sugárérzékenységet, összevetve azt a klinikumban mért sugárterápiára adott válasszal.

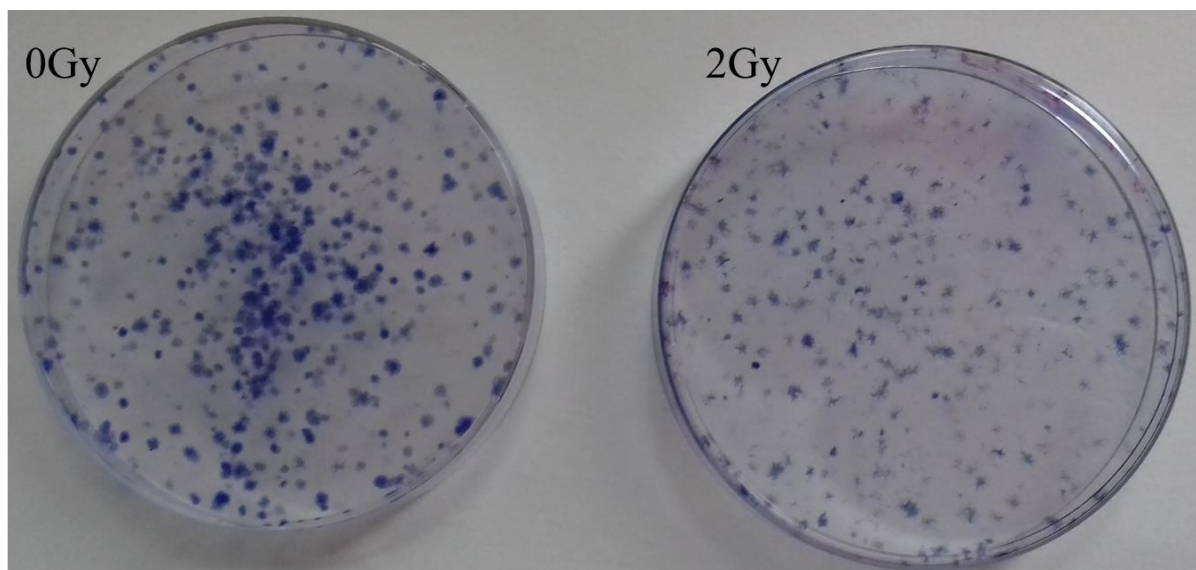
Vérminták

A vérmintákat a vérvételt követően 3 órán belül *in vitro* sugaraztuk be 2Gy dózissal, ⁶⁰Co- γ sugárzással (Gammatron-3 Siemens, Erlangen, Németország). Közvetlenül a besugárzást követően lúgos és semleges comet-assay-vel mértük a DNS-törések gyakoriságát. A DNS-repair-kapacitás nyomon követésére a besugarazott vérmintákat 5% CO₂ tartalmú légkörben 37°C-on négy órát inkubáltuk, és ezt követően ismételtén elvégeztük a comet-assay-t.

⁶ a humán sejtek laboratóriumi körülmények között történő tenyésztéséhez használatos oldat.

Klonogén assay

A primer sejt kultúrák kialakítása után meghatároztuk a fibroblasztok regenerálódó képességét. A sugárérzékenység vizsgálata során 100mm átmérőjű Petri- csészére 500-1500 sejtet oltottunk ki. Tizenkét órával később a sejteket 0,5-, 1-, 2- és 4Gy-vel sugárkezeltek (Co^{60} - γ) majd kolónia képző-assay-vel követtük nyomon a sejtek túlélését. Amennyiben egy sejt túlél és osztódik, sejt-kolóniák jönnek létre, amelyek metanolos fixálást és CBB R-250 festést követően szabad szemmel is láthatóvá válnak. A túlélő sejtek frakcióját százalékosan fejeztük ki. A sejtek egy részében csak a 2Gy besugárzást túlélő frakciót (surviving fraction at 2Gy=SF2 érték) határoztuk meg. (1. ábra)



1. ábra kezeletlen kontroll (0Gy), illetve 2Gy-vel sugárkezelt fibroblasztok kolóniái. (saját fotó)

Comet-assay

A klonogén assay hátránya, hogy a besugárzás után kb. két hét múlva kapunk csak eredményt. Ezért szeretnénk volna bevezetni egy gyorsabb módszert, az alkális és a neutrális egy-sejt elektroforézis (comet) assay használatát is az egyéni sugárérzékenység vizsgálatára.

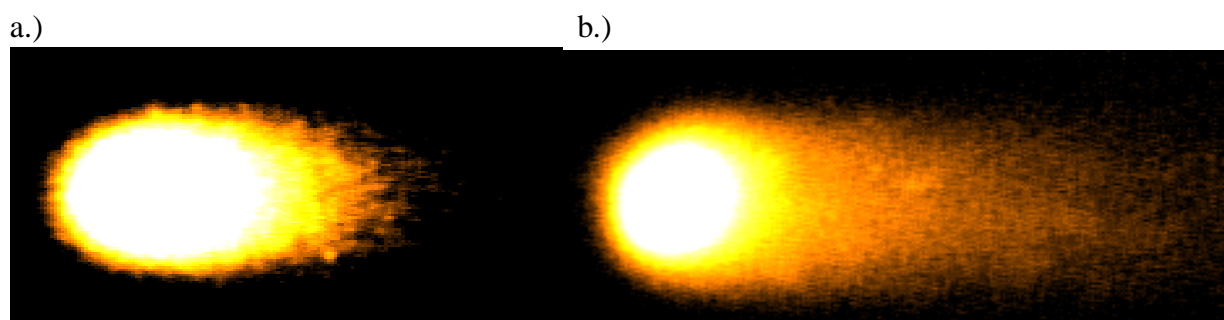
A DNS törések nagy mennyisége, illetve a repair elégtelensége a sejtet különböző molekuláris útvonalak irányába tolja el, amelyek a sejt pusztulásához vezetnek. A comet-assay vagy egy-sejt gél-elektroforézis segítségével kimutathatók a sugárzás hatására keletkező, illetve a javítás hiányossága miatt bizonyos idő elteltével visszamaradó egy- és kétláncú törések is. A két adat különbségéből a sejtek DNS javító képességére lehet következtetni.

A comet-assay során a sejt kultúrában növekvő fibroblasztokat a teljes konfluencia állapotában sugárkezeltek. A sejttenyésztő flaskákban besugárzott sejtek egy részét a sugárkezelést követően azonnal letripszineztek és 0,5%-os lágy agarba (LMPA) ágyazták, ezt követően pedig 1% triton-x100 és 10% DMSO tartalmú oldatban éjszakán át lizálták. Ezután az egy láncú DNS törések vizsgálatához a lemezekre rögzített sejtek DNS láncát erősen alkáli pH-jú (0,3M-os NaOH, pH>13) pufferben 30 percen keresztül szobahőn denaturálták. Az elektroforézist 25mV feszültségen és 300mA áramerősségen folytatták le. (2. ábra) A kétláncú törések elektroforetikus kimutatásához szükséges 1mV/cm feszültséget 1,8l térfogatú, neutrális pH-jú

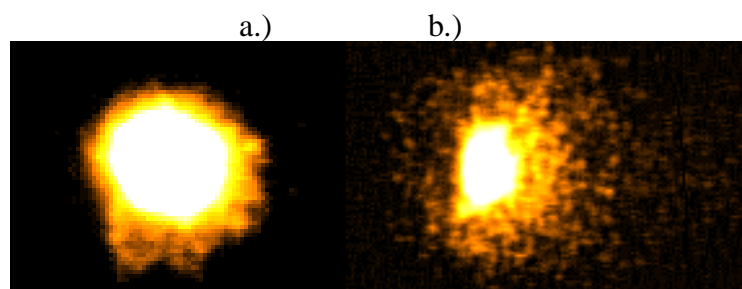
(TBE, pH: 8,3) puffer oldat segítségével érték el. (3. ábra).⁷ [8, 9 nyomán kidolgozott módszer.] A DNS repair-kapacitás nyomon követésére a besugározott minták hátralévő részét 37°C-on és 5% CO₂-t tartalmazó környezetben négy órát inkubáltuk, ezt követően pedig ismételt elvégeztük a comet-assay-t.

Az eljárás alapja az, hogy az elektroforézis során a sejtmagban lévő DNS az anód felé vándorol. A DNS fragmentumok elmozdulása elsősorban a súlyuktól függ, ez esetben pedig a sugárzás hatására a benne keletkező törések számától. Az ép, illetve a töréseket nem tartalmazó nagy molekulás DNS a magban marad és az elektroforézis után ez adja az üstökös (comet) magját. A sugárzás hatására összetört DNS pedig a comet csóváját alakítja ki. A magban és a csóvában jelenlévő DNS-mennyiség aránya adja meg a DNS-károsodás mértékét. A neutrális közegben végzett elektroforézis kizárólag a kétláncú DNS törések vizualizálására alkalmas. Az alkálikus comet-assay segítségével az egy- és kétszálú törések egyaránt kimutathatóak. [16, 951-955.old.]

A kiértékelés etídium-bromidos festést követően, Zeiss fluorescens mikroszkóppal, a Kinetic Imaging Comet4 számítógépes szoftverének segítségével történt.



2. ábra Egyláncú DNS törések besugarazatlan (a) és besugarazott sejtekben (b). A fényképeken az erős fényes folt az eredetileg a sejtmagban található DNS, a mögötte elhúzódó darabok az elektroforézis során elvándorolt, sérült DNS. (etídium-bromidos festés, saját fotó)



3. ábra Kétláncú DNS törések besugarazatlan (a) és besugarazott sejtekben (b). A fényképeken az erős fényes folt az eredetileg a sejtmagban lévő DNS, a mögötte elhúzódó darabok az elektroforézis során elvándorolt, sérült DNS. (etídium-bromidos festés, saját felvételek)

A kiértékelés során a Comet4 program által felajánlott paraméterek közül az Olive Tail Moment (OTM), valamint a Tail Factor-t használtuk fel, az eredményeket Excel Macros és Excel programokkal értékeltük ki. [14] Az OTM egy globális comet-paraméter: egyaránt

⁷ A saját laboratóriumi körülményeink között (elektroforézis tálca alakja) a futtató puffernek ezen térfogata adta a megfelelő feszültséget.

figyelembe veszi a töredezett DNS mennyiségét és a nucleoidtól való eltávolodásának mértékét, míg a Tail Factor a tulajdonképpeni töredezett DNS százalékos arányát fejezi ki az alábbi képletek alapján:

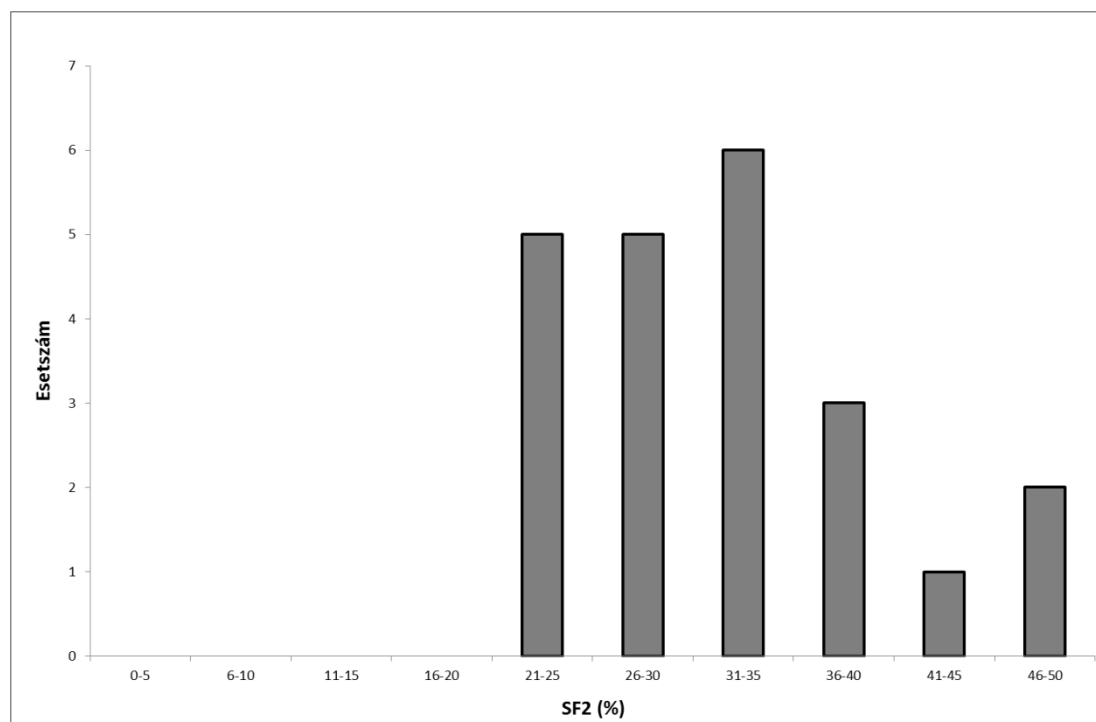
$$\text{OTM} = [(\text{csóva átlaga} - \text{mag átlaga}) \times \text{a csóvaDNS \%}/100]$$

$$\text{Tail Factor} = \text{Tail DNA} = \text{a csóvában található DNS-százalék átlaga.}$$

EREDMÉNYEK

Primer fibroblasztok sugárérzékenységének vizsgálata klonogén-assay-vel

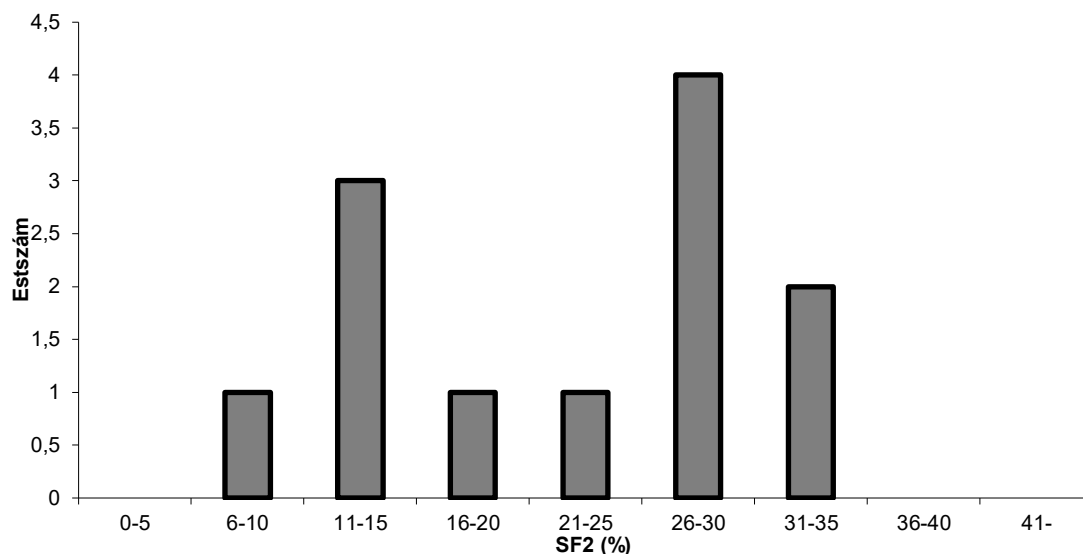
A Módszerek fejezetben leírt csoportokból származó primer fibroblasztok túlélését határoztuk meg *in vitro* besugárzás után. Mint említettük, a kontroll csoport két részből állt. Az egyiket az egészséges gyerekek fitymaiból származó primer fibroblasztok képezték. Itt a túlélési görbék lefutása egy igen szűk tartományba esett. A másik kontroll csoport a sugárterápia előtt álló betegeket tartalmazta. E betegekből származó fibroblasztok *in vitro* sugárérzékenysége megegyezett az egészséges gyerekek fibroblasztjainak sugárérzékenységgel. Az összesített kontroll csoport SF2 értékeinek megoszlását az 1. grafikon szemlélteti. A kontroll betegcsoportból származó minták SF2 értékei a 20-50%-os túlélési tartományba esnek.



1. grafikon Kontroll betegek SF2 értékeinek eloszlása. A kontroll betegek sejtjeinek 20-50%-a éli túl a 2Gy dózisú sugárkezelést.

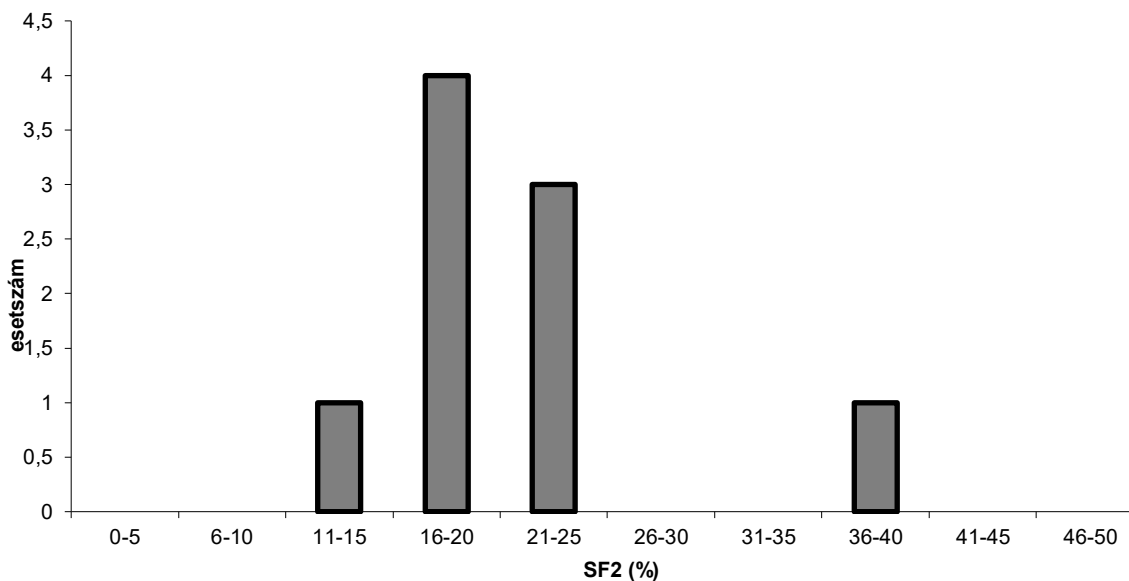
Sikerült igen jelentős számú mintát (mind vér, mind pedig bőr biopszia) nyernünk olyan betegekből, amelyekben a sugárterápia következtében már valamilyen korai vagy késői toxikus sugár-reakció kialakult. Ezeket a betegeket tüneteik alapján a Módszerek fejezetben már említett négy nagy csoportba osztottuk.

Azokban a betegekből, amelyekben a sugárterápia következtében valamilyen idegrendszeri mellékhatás alakult ki, az SF2-értékek balra, azaz a sugárérzékeny frakciók felé tolódtak el, négy beteg esetében pedig a fibroblasztoknak mindössze 6-15%-a élte túl a 2Gy sugárkezelést (2. grafikon).



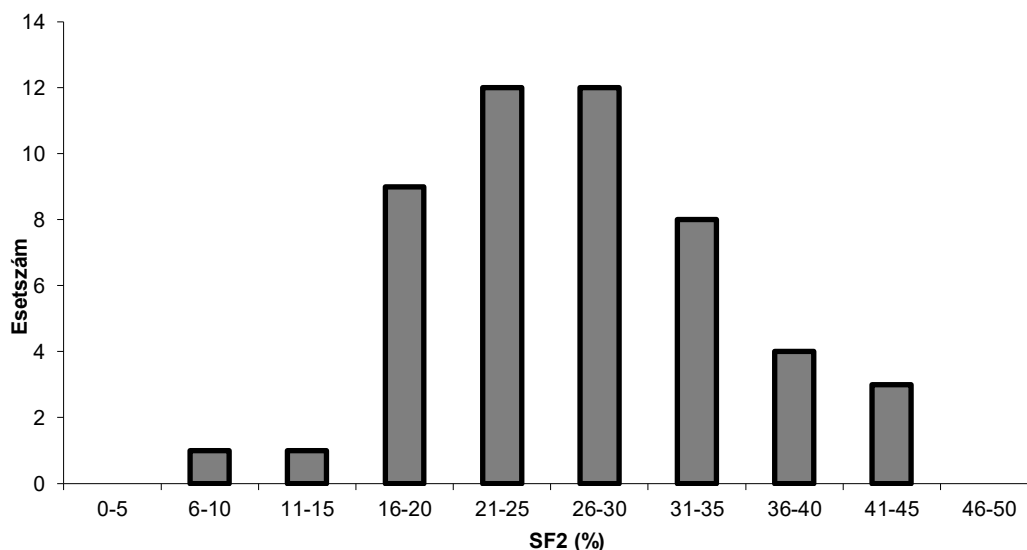
2. grafikon Idegrendszeri mellékhatásokat elszenvedő betegek fibroblasztjainak SF₂ értékei. Látható, hogy a betegek körülbelül felének a fibroblasztjai gyengébb túlélést mutatnak, mint a kontroll betegcsoporté.

A következő betegcsoportba olyan betegek tartoztak, amelyekben a külső sugár- és/vagy brachyterápia következtében bőrrendszeri és subcutan szöveti mellékhatások alakultak ki. E betegcsoport SF₂-értékei mérsékelten térnek el a kontroll csoportétól (3. grafikon).



3. grafikon Sugárhatásra mucositis-dermatitiszes mellékhatásokat mutató betegek SF₂ értékei.

A 4. grafikon emlődaganatos betegek fibroblasztjainak túlélését mutatja be. A grafikonon látható, hogy e betegek túlnyomó többségének a fibroblasztjai a kontroll csoportéhoz hasonlóan 20-45%-ban éltek túl a sugárkezelést, mindössze 11 beteg sejtjeinek a túlélése volt 20% alatti. Ez egy, a klinikai mellékhatások szempontjából is nagyon vegyes betegcsoport volt, amelyben egyaránt voltak olyan betegek, akiknek súlyos sugárzás okozta mellékhatásai voltak és olyanok is, akik meglehetősen jól viselték a sugárterápiát. Ennek ellenére nem sikerült korrelációt kimutatnunk a klinikai sugárérzékenység és az *in vitro* sugárérzékenység között.

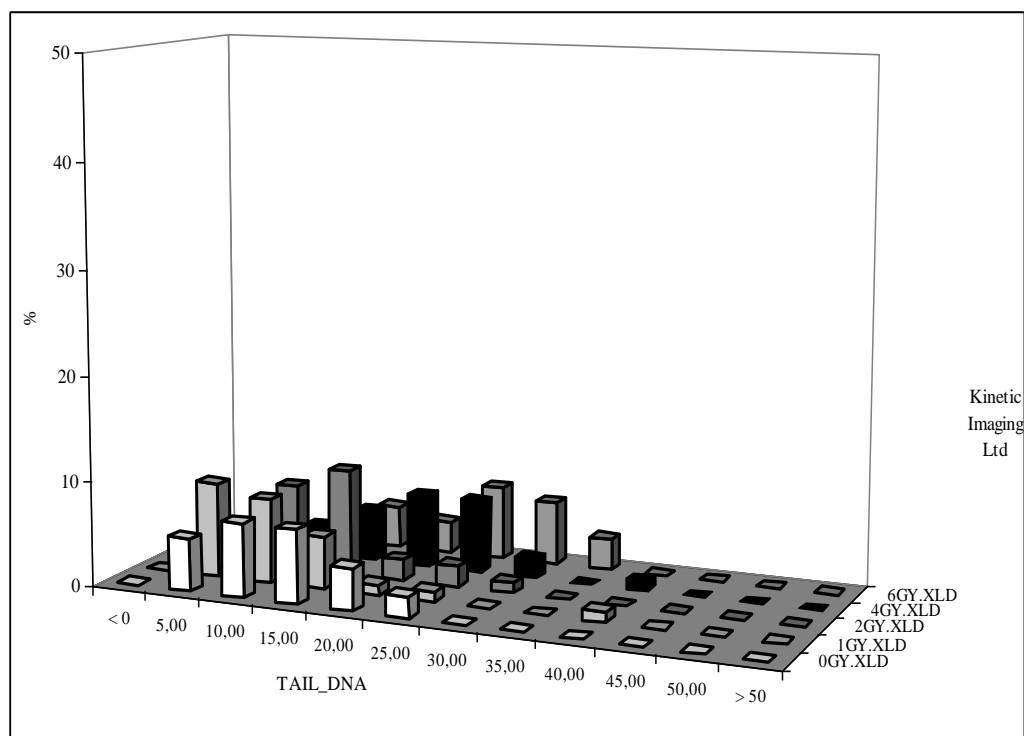


4. grafikon Emlődaganatos betegekből származó fibroblasztok SF₂ értékei

Alkálikus és neutrális comet-assay alkalmazása fibroblasztok sugárérzékonységének mérésére

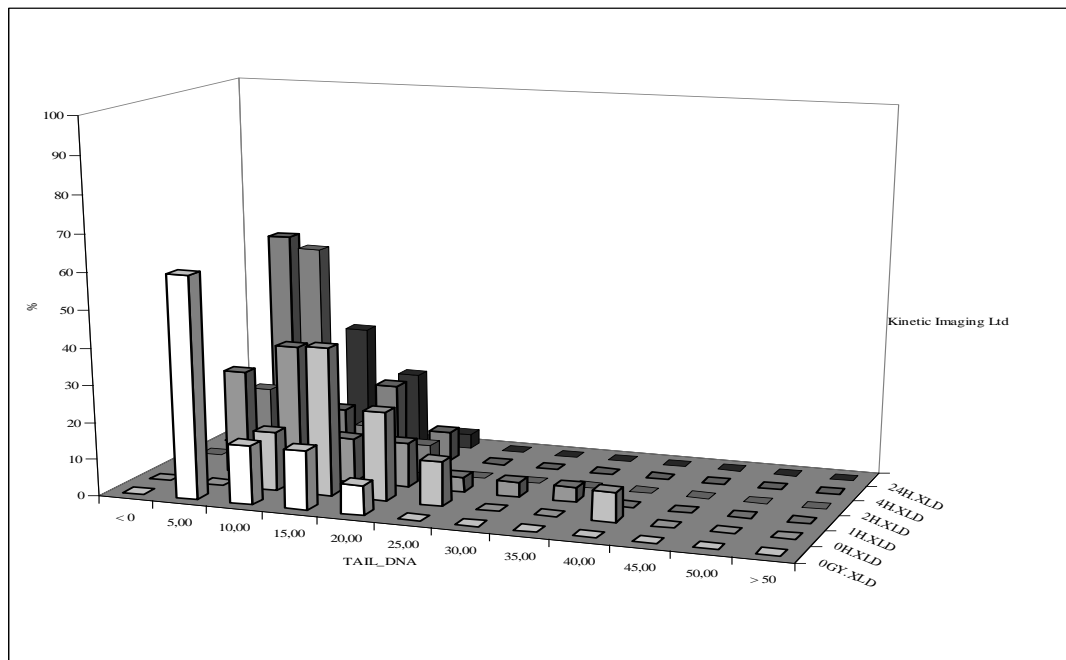
A klonogén assay segítségével tulajdonképpen a sejtek sugárzás-okozta károsodásainak kijavítódása után lehet mérni azok túlélését, amely végső soron a sejten belüli folyamatok eredménye. Az egyes fibroblaszt-sejtek sugárzás okozta DNS károsodásainak és azok repair-jének a vizsgálatát elvégeztük alkálikus és neutrális comet-assay-vel is. Először azonban tanulmányoztuk a DNS károsodás dózistól való függését (0,5 – 6Gy), majd pedig a DNS törések kijavítódásának időbeli folyamatát (0, 10, 20, 30, 60, 120, 240 perc).

A sugárzás hatására keletkező DNS lánc-törések száma a sejt típusától és sugárérzékonyságától függetlenül állandó egy adott dózisu sugárkezelést követően, viszont a dózis függvényében nő. Az 5. grafikonon látható, hogy a kétláncú DNS törések következtében keletkező DNS fragmentumok a dózis emelkedésével arányosan egyre nagyobb mennyiségben mutathatók ki (tail DNA): a besugarazatlan kontroll mintában a csóva mag felőli részén tömörül a DNS, míg a 6 Gy-el kezelt sejtek esetén a csóva sejtmagtól távolabb eső részére csoportosul át, ami a jelentős mennyiségű DNS törésnek köszönhető.



5. grafikon Kétláncú törések következtében kialakuló DNS fragmentumok eloszlása különböző dózisok függvényében, fibroblasztokban. Az első sorban a kezeletlen kontroll, majd egymást követően az 1-, 2-, 4- és 6 Gy dózissal besugarazott fibroblasztokban keletkező kétláncú DNS törések mennyiségét tüntettük fel Kinetik Imaging program segítségével. Az egyre nagyobb számú törés következtében egyre nagyobb mennyiségű DNS vándorol ki a sejtmagból.

A továbbiakban vizsgáltuk a törések keletkezésének és kijavítódásának időbeli dinamikáját a kezelést követő 30 perccel, 1-, 2-, 4- és 24 órával. A legmagasabb töredezettségi értékeket a sugárkezelést követő egy órán belül mértük. A sejten végbemenő javító folyamatoknak köszönhetően a DNS törések száma és eloszlása a sugárkezelést követően mindössze 4 órán belül visszacsökken a kontroll értékekre (6. grafikon).



6. grafikon Kettős láncú DNS törések javításának időkinetikája 6 Gy-el besugarazott fibroblasztok esetén. Az első sorban a kezeltlen kontroll, a másodikban a sugárkezelést követően keletkező törések, majd 1-, 2-, 4 és 24 óra elteltével még jelen lévő, úgynevezett reziduális töréseket ábrázoltuk Kinetic Imaging program segítségével.

A sugárterápia következtében különböző sugárzás okozta mellékhatásokat elszenvedő betegek fibroblasztjait kezeltük 6Gy dózissal sugárzással *in vitro*, majd egy-sejt elektroforézissel vizsgáltuk az egy- és kétláncú DNS törésekből kifolyólag megjelenő DNS fragmentumok arányát. Adataink azt mutatják, hogy a kezelésre idegrendszeri toxikus mellékhatásokkal reagáló betegek fibroblasztjaiban több egyláncú DNS-törés keletkezik, mint a kontroll csoportban. Érdekes azonban, hogy mind a kontroll-, mind a súlyos mellékhatásokat szenvedett betegcsoportok fibroblasztjainak sejtmagvaiban gyakorlatilag maradéktalanul kijavítódnak ezek a törések. Jelen kísérleteinknek nem volt célja a javítás minőségéről információt biztosítani. A neutrális assay-vel nem találtunk szignifikáns összefüggést sem a primer, sem pedig a reziduális, 6 Gy-vel besugarazott fibroblasztok DNS-károsodásai valamint a megfelelő sejtvonalak SF2-értékei, vagy a betegek klinikai sugárérzékenysége (sugárkezelésre adott reakciói) között sem. Az adatok értékelésének statisztikai erejét további vizsgálatokkal lehetne emelni.

Beteg kategória	pH	OTM		Tail- DNA	
		0h	4h	0h	4h
Kontroll betegek	8,3	12,08	4,27	19,36	10,45
	13	22,97	3,90	33,48	10,70
Idegrendszeri mellékhatásokat szenvedett betegek	8,3	12,98	3,23	18,74	9,21
	13	58,45	3,74	53,20	9,65

1. táblázat 6 Gy-vel sugárkezelt fibroblasztok comet-assay eredményei: kezelés után közvetlenül (0h) és 4 órás javítódást követően (4h). A feltüntetett számok a betegek fibroblasztjain mért OTM és Tail-DNA értékek átlagait mutatják

Alkálikus és neutrális comet-assay alkalmazása vérmintákon a limfociták sugárérzékenységének kimutatására

A fibroblasztokon végzett kísérletek meglehetősen időigényesek, mivel 2-4 hét alatt lehet létrehozni egy bőrbioopsziából fibroblaszt kultúrát, amelyet fenntartani és tenyészteni kell a kísérlet esedékességéig. Mivel a vérvétel egy jóval kevésbé invazív mintavételezési eljárás, és a vérből származó limfociták azonnal rendelkezésre állnak a kísérletekhez, a comet-assay kísérleteinket ugyanazon betegek limfocitáin is elvégeztük.

A DNS-törések alapszintjét alkálikus, és a neutrális comet-assay-vel vizsgáltuk besugározatlan mintákon. Az alapszint adataink szerint gyakorlatilag nulla, nem függ a korábbi sugárterápiától. A betegekből származó vérmintákat alkálikus comet-assay-hez 2 Gy, neutrálishoz 4 Gy ⁶⁰Co-gamma sugárzással kezeltük, és vizsgáltuk a közvetlenül a besugárzás után kialakuló DNS lánc-töréseket (kezdeti károsodás), valamint a sugárkezelést követően négy órával még fennálló elváltozásokat (reziduális-, visszamaradó károsodás) is.

A sugárterápia következtében idegrendszeri mellékhatásokat mutató betegek esetében az *in vitro* besugárzás után közvetlenül, alkálikus comet-assay-vel nézve a DNS-károsodásokat, nem találtunk különbséget a kontroll csoporthoz viszonyítva. Négy órával a besugárzás után nézve a károsodásokat, az idegrendszeri mellékhatásokkal rendelkező betegeknél általában jóval több reziduális károsodás maradt vissza. Hasonló eredményeket kaptunk neutrális assay-vel is. Mucositis/dermatitises, valamint emlőtumoros betegeknél nem találtunk különbségeket egyik assay-vel sem a kontroll csoporthoz viszonyítva.

Beteg kategória	OTM		Tail- DNA	
	0h	4h	0h	4h
Kontroll betegek	44,07	17,86	38,27	22,15
Idegrendszeri mellékhatásokat szenvedett betegek	41,43	23,33	37,71	26,32
Mucositis vagy dermatitis típusú mellékhatásokat szenvedett betegek	18,14	3,23	21,68	10,15
Emlődaganatban szenvedő betegek	12,96	7,07	20,74	11,81

2. táblázat 2 Gy-el besugározott limfocitákban bekövetkező egyláncú törések (0h) és javítódásuk hatékonysága 4 óra múlva (átlagok).

EREDMÉNYEK TÁRGYALÁSA ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A fibroblaszt-minták SF2-értékeinek és a betegekben kialakuló toxikus sugárreakcióknak az összevetésével kapott adatok azt valószínűsítik, hogy az SF2-értékek meghatározásával felbecsülhető a korai és késői toxikus sugárreakciók kialakulásának a kockázata. Azokban a betegekben, akiknek a fibroblasztjai sugárérzékenyek, sokkal nagyobb a valószínűsége a mellékhatások kialakulásának, mint a sugárrezisztenciát mutató fibroblasztokkal rendelkező betegek esetében. Előbbi betegek esetében kerülendő a szokásosnál nagyobb biológiaiilag effektív dózissal végzett sugárterápia és a sugármező a lehető legkisebb szükséges területre korlátozandó.

Véleményünk szerint eredményeink a munkahelyi sugárexpozíció eseteire is alkalmazhatók. Azok a személyek, akik a fibroblasztjainak túlélése az átlagosnál alacsonyabb tartományba esik (SF2<25%-nál), a sztochasztikus (pl. daganat keletkezés) sugárhatások szempontjából egy jelentősebb kockázati csoporthoz tartoznak és az esetleges következmények korai diagnózisa érdekében fokozott megfigyelést igényelnek.

A comet-assay módszere saját laboratóriumunk körülményei között alkalmas a sugárzás különböző dózisa által okozott és a javítás során visszamaradó DNS törések kimutatására.

Különbségek mutatkoznak a különböző mellékhatásokat szenvedett betegek limfocitáiban átlagosan visszamaradó egyláncú DNS törések mennyiségében 2 Gy besugárzás hatására, viszont jelenlegi álláspontunk szerint nincs meghatározó jellegű korreláció az egyes betegek limfocitáiban visszamaradó DNS sérülések és sugárterápiát követő klinikai mellékhatások között.

Annak ellenére, hogy 6 Gy besugárzást követően a kezdeti egyláncú DNS törések között igen jelentősnek tűnik a különbség az IR és a K betegek fibroblasztjai esetében, a DNS javító folyamatokat követően e két csoport közötti különbségek eltűnnek. A klinikai sugárkezelésre változatos módon reagáló emlődaganatos betegekből származó, 4 Gy-vel sugárkezelt vérmintákban sem találtunk szignifikáns korrelációt a kétláncú DNS törések javítódása és a betegek klinikai mellékhatások között. Mivel a DNS által az agaróz gélen megtett távolság függ annak a molekuláris tömegétől, valószínű, hogy annak ellenére, hogy a törések mennyisége állandó, a letört DNS fragmentumok molekuláris tömegében mutatkozik különbség e két csoport között. Úgy tűnik, hogy nem a DNS törések mennyisége, hanem a helye és a javítódás minősége lehet meghatározó a sejt életvitele szempontjából. Mindazonáltal a betegekben kialakuló mellékhatások és DNS javító folyamataik minősége között fennálló összefüggések vizsgálatára ezen tanulmány nem terjed ki. A továbbiakban érdekes lenne egy olyan vizsgálatot folytatni, amely a DNS javító mechanizmusok mögött rejlő genetikai és molekuláris sajátosságok (génexpresszió, gén promoter metiláció, különböző fehérjék koncentrációja, stb.) közötti különbség vizsgálatát célozza meg a fent említett magasabb kockázatú betegcsoportokban. Eredményeink alapján ugyanis a két betegcsoport elhatárolható egymástól, de az egyéni klinikai sugárreakciók és a comet csóva DNS mennyisége, illetve e mennyiség repairt követő csökkenésének mértéke között nem sikerült szignifikáns kapcsolatot kimutatni.

Világszerte a comet-assay-t már genotoxicitás-tesztelésére, humán biomonitorozásra, valamint különböző organizmusok ökogenotoxikológiai vizsgálatára használják. [16, 950. old.] Ennek ellenére, saját kísérleti körülményeink között úgy tűnik, nem alkalmas egyéni különbségek meghatározására, hiszen annak ellenére, hogy valóban igen különböző eredményeket kaptunk az egyes egyének között (mintáink szórása igen magas értéket ért el), az egyének értékei és klinikai sugárreakciójuk között nem találtunk korrelációt. Hasonló eredményeket mutatnak be a hamburgi egyetem munkatársai 2001-ben megjelent cikkükben [11, 936. old.], ahol fordított korrelációt találtak a sejtek 2Gy besugárzást követő túlélése és 5Gy besugárzás során keletkezett töredezett DNS mennyiség között, de nem találtak összefüggést a javítás után visszamaradt DNS mennyiség és a sugárérzékenység között. A csóvában található DNS fragmentumok mennyiségének jelentős eltérése közvetlenül a sugárkezelést követően a különböző betegcsoportokban arra utalhat, hogy a DNS molekuláris szerkezeti összetétele következtében egyes régiókban gyakrabban fordul elő kettős lánc törés.

A nemzetközi irodalomban nincs konszenzus a comet-assay sugárérzékenység-vizsgálatokra való alkalmasságát illetően. Eredményeink alátámasztják azt a feltételezést, miszerint a normál szövet radiotoxicitása a DNS javító rendszeren kívül több tényező függvénye. A jelenleg általánosan elfogadott paradigma értelmében a sugárzásra adott biológiai válasz olyan multimolekuláris folyamat, amelyben a résztvevő fehérjék gén-átíródásának, az epigenetikai folyamatoknak és a genom metilációs állapotának is számottevő szerepe van. [5, 613. old.; 17, 1196-1198. old.; 18] A továbbiakban az ezen folyamatokban szerepet játszó gének vagy fehérjék vizsgálata egy esetleges PCR- vagy antigén-antitest alapú módszer kidolgozásához vezethet.

FELHASZNÁLT IRODALOM

- [1] GY. KÖTELES (szerk.): Sugáregészségtan. Medicina Könyvkiadó RT., Budapest, 2002
- [2] UNSCEAR: Exposures and effects of the Chernobyl accident, Annex J. 2000 Report to the General Assembly.
http://www.unscear.org/docs/reports/2000/Volume%20II_Effects/AnnexJ_pages%20451-566.pdf (2012.10.15)
- [3] S. L. TUCKER, F. B. GEARA, L.J. PETERS, W. A. BROCK: How much could the radiotherapy dose be altered for individual patients based on a predictive assay of normal-tissue radiosensitivity? *Radiotherapy and Oncology*, 38 (1996) pp: 103-113, DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-8140\(95\)01669-4](https://doi.org/10.1016/0167-8140(95)01669-4)
- [4] E. DIKOMEY, K. BORGMANN, I. BRAMMER, U. KASTEN-PISULA: Molecular mechanisms of individual radiosensitivity studied in normal human fibroblasts. *Toxicology*, 193 (2003) pp: 125-135, DOI: [10.1016/S0300-483X\(03\)00293-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00293-2)
- [5] W.U. MULLER, T. BAUCH, G. STÜBEN, H. SACK, C. STREFFER: Radiation sensitivity of lymphocytes from healthy individuals and cancer patients as measured by the comet assay. *Radiat. Environ. Biophys.*, 40 (2001) pp: 83-89
- [6] T.M. PAWLIK, K. KEYOMARSI: Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 59/4 (2004) pp: 928-942, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.03.005>
- [7] M. BELLI, O. SAPORA, M. A. TABOCCHINI: Molecular targets in Cellular Response to Ionizing Radiation and Implications in Space Radiation Protection. *J. Radiat. Res.*, 43 (2002) pp: S13-S19
- [8] N.P. SINGH, M.T. MCCOY, R.R. TICE, E.L. SHNEIDER, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, in: *Exp. Cell Res.*, 175 (1988) pp: 184-191, DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- [9] R.R. TICE, E. AQUIRELL, D. ANDERSON, B. BURLINSON, A. HARTMANN, H. KOBAYASHI, Y. MIYAMAE, E. ROJAS, J.C. RYU, Y.F. SASAKI: Single cell gel/Comet-assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35 (2000) pp: 206-221
- [10] D. BOWDEN, M.R. BUCKWALTER, J.F. MC BRIDE, D.A. JOHNSON, B.K. MURRAY, L. O'NEILL: Tail profile: a more accurate system for analyzing DNA damage using the Comet-assay. *Mutation Research*, 537 (2003) pp: 1-9, DOI: [10.1016/S1383-5718\(03\)00056-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00056-1)
- [11] I. BRAMMER, M. ZOLLER, E. DIKOMEY, Relationship between cellular radiosensitivity and DNA damage measured by Comet-assay in human normal, NSB and AT fibroblasts. *Int. J. Radiation Biology*, 77/9 (2001) pp: 929-938, DOI: <https://doi.org/10.1080/09553000110064222>
- [12] A. DASU, J. DENECAMP, Inducible repair and intrinsic radiosensitivity: a complex but predictable relationship? *Radiation Research*, 153 (2000) pp: 279-288, DOI: [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2000\)153\[0279:IRAIRA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2000)153[0279:IRAIRA]2.0.CO;2)

- [13] E. DIEM, S. IVANCSITS, H.W. RUDIGER: Basal levels of DNA strand breaks in human leukocytes determined by comet-assay. *J. Toxicol Environ Health A.*, 65/9 (2002) pp: 641-648, DOI: <https://doi.org/10.1080/15287390252900331>
- [14] A. EJCHART, SADLEJ-SOSNOWSKA: Statistical evaluation and comparison of comet-assay results. *Mutation research*, 534 (2003) pp: 85-92, DOI: [10.1016/S1383-5718\(02\)00250-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00250-4)
- [15] D. TWARDELLA, J. CHANG-CLAUDE: Studies on radiosensitivity from an epidemiological point of view – overview of methods and results. *Radiotherapy and Oncology*, 62 (2002) pp: 249-260, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-8140\(01\)00491-1](https://doi.org/10.1016/S0167-8140(01)00491-1)
- [16] A. AZQUETA, A. R. COLINS: The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch. Toxicol.*, 87 (2013) pp:949-968, DOI: [10.1007/s00204-013-1070-0](https://doi.org/10.1007/s00204-013-1070-0)
- [17] E. DIKOMEY, K. BORGMANN, J. PEACOCK, H. JUNG: Why recent studies relating normal tissue response to individual radiosensitivity might have failed and how new studies should be performed. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 56/4 (2003) pp: 1194-1200, DOI: [10.1016/S0360-3016\(03\)00188-3](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(03)00188-3)
- [18] M. FERNET, J. HALL: Genetic biomarkers of therapeutic radiation sensitivity. *DNA Repair* 3, (2004) pp: 1237-1243, DOI: [10.1016/j.dnarep.2004.03.019](https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.019)