

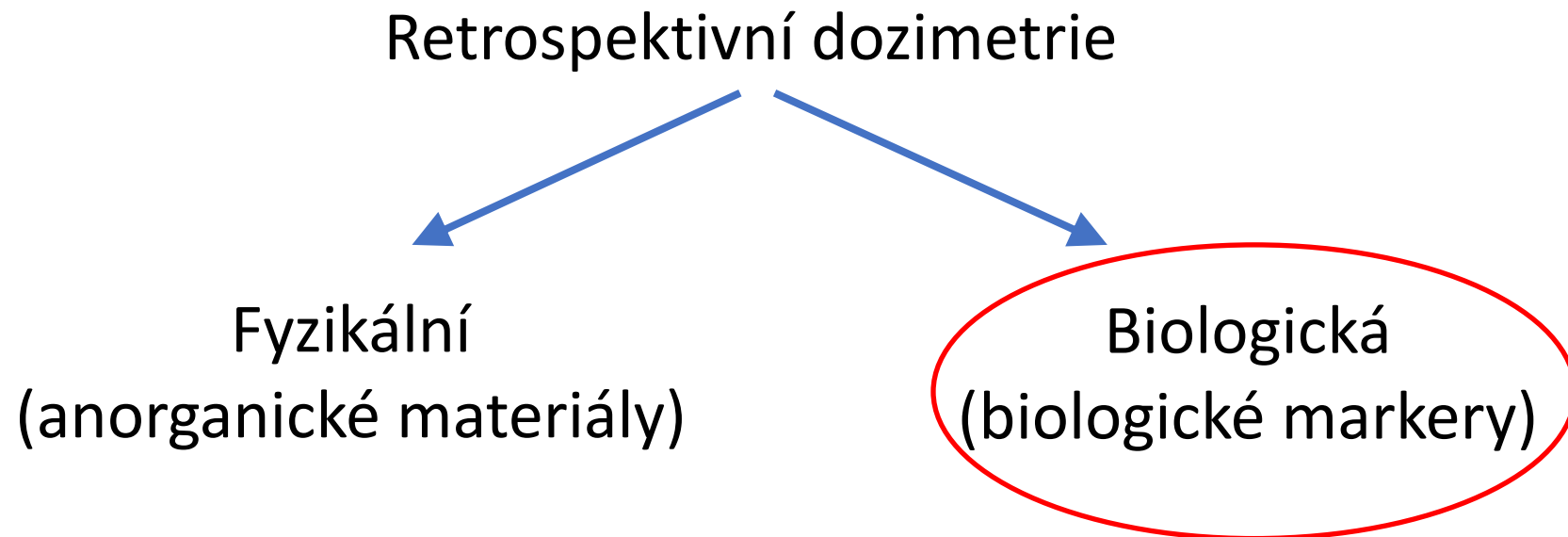
Biologické markery ionizujícího záření pro účely retrospektivní dozimetrie

RNDr. Jakub Vávra

Seminář ČSOZ, 27.6.2023

Motivace – retrospektivní dozimetrie

- Suspektní ozáření osob nevybavených standardními dozimetry
- Konfirmace údajů z dozimetru



Obsah

- **Biologické makromolekuly**
 - Deoxyribonukleová kyselina (DNA)
 - Ribonukleové kyseliny (RNA)
 - Proteiny
- **Centrální dogma molekulární biologie**
- **Struktura a funkce biologických makromolekul**
- **Koncept ideálního markeru retrospektivní dozimetrie**
- **Metody biologické retrospektivní dozimetrie**
 - DNA jako biologický marker ionizujícího záření
 - RNA jako biologický marker ionizujícího záření
 - Proteiny jako biologické markery ionizujícího záření

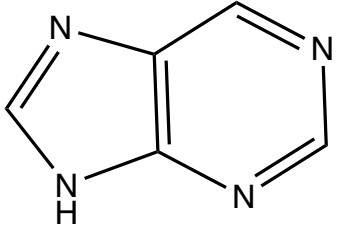
Obsah

- **Biologické makromolekuly**
 - Deoxyribonukleová kyselina (DNA)
 - Ribonukleové kyseliny (RNA)
 - Proteiny
- **Centrální dogma molekulární biologie**
- **Struktura a funkce biologických makromolekul**
- **Koncept ideálního markeru retrospektivní dozimetrie**
- **Metody biologické retrospektivní dozimetrie**
 - DNA jako biologický marker ionizujícího záření
 - RNA jako biologický marker ionizujícího záření
 - Proteiny jako biologické markery ionizujícího záření

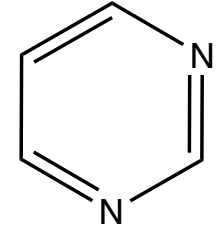
Deoxyribonukleová kyselina (DNA)

- Polymerní molekula složená z deoxyribonukleotidů
- **Deoxyribonucleic acid**
- Nukleová báze + deoxyribosa + fosfát = **deoxyribonukleotid**

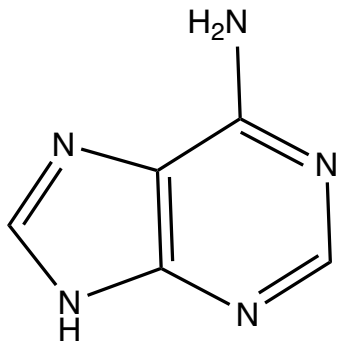
Nukleové báze v DNA



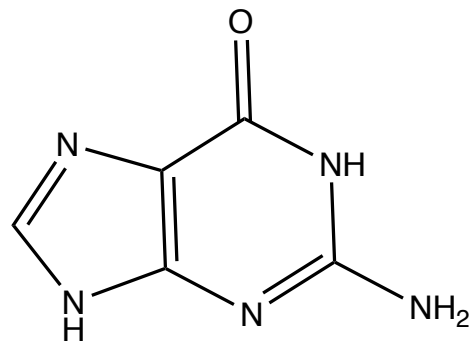
purinové



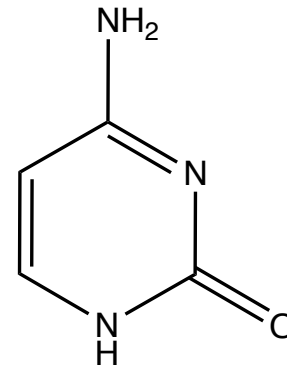
pyrimidinové



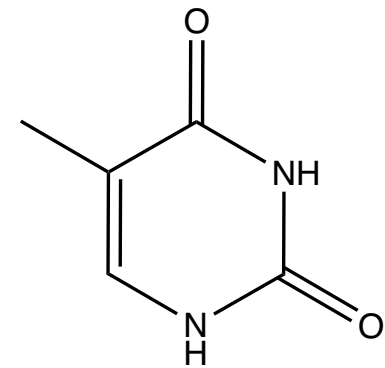
Adenin



Guanin



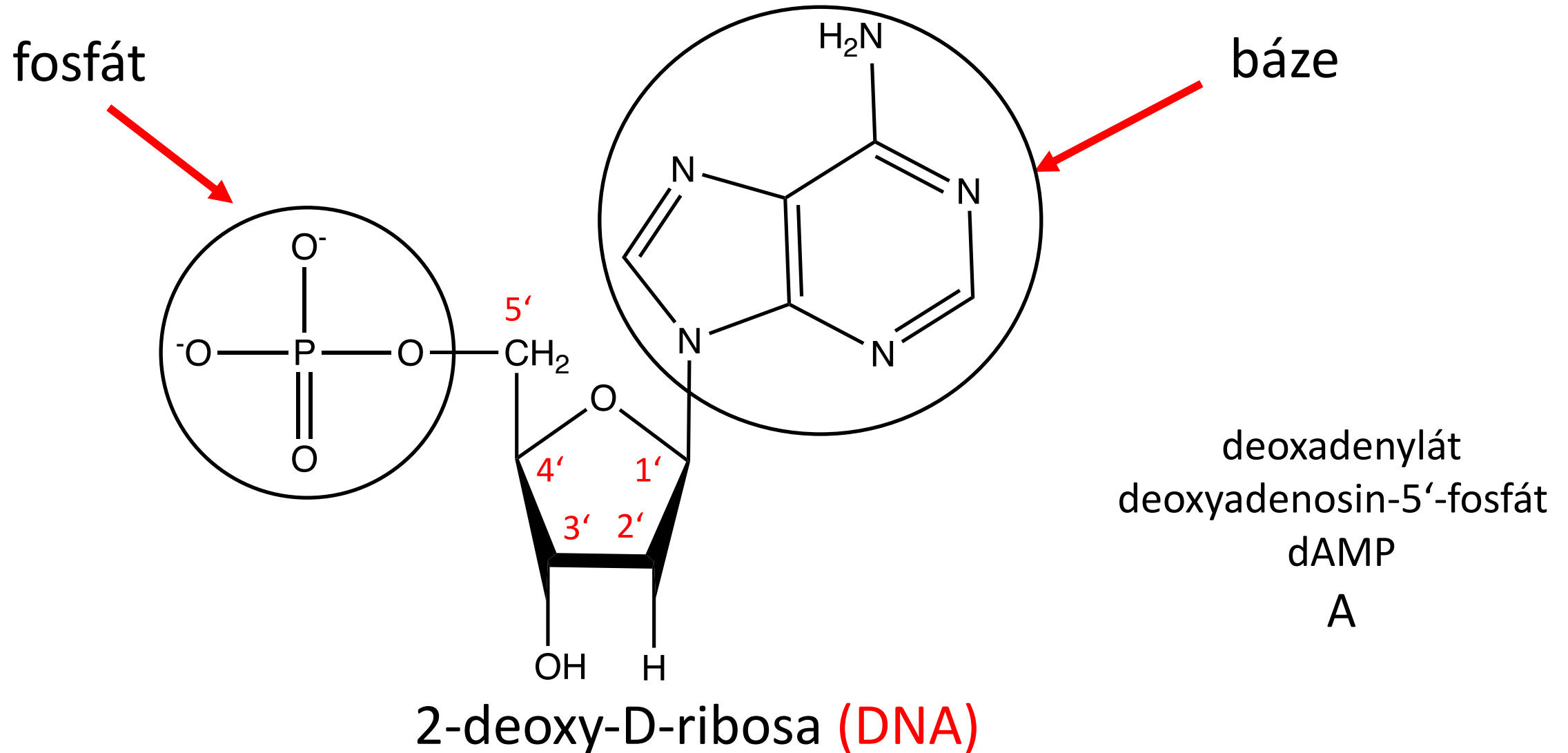
Cytosin



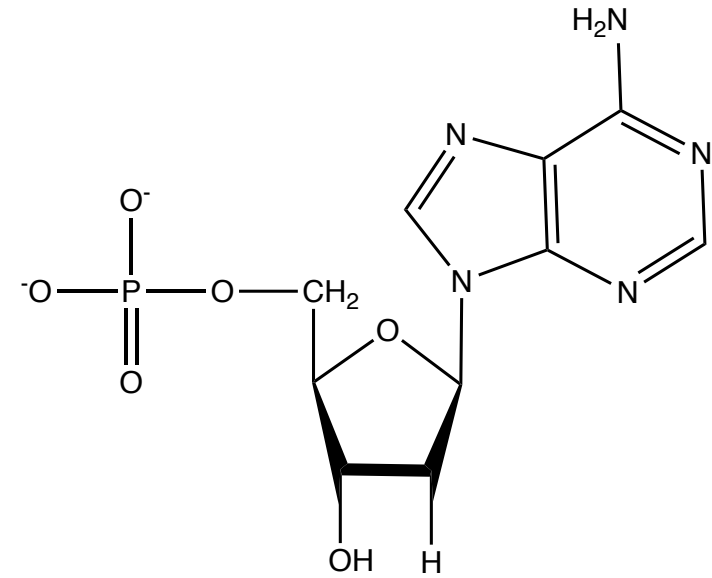
Thymin

(pouze v DNA)

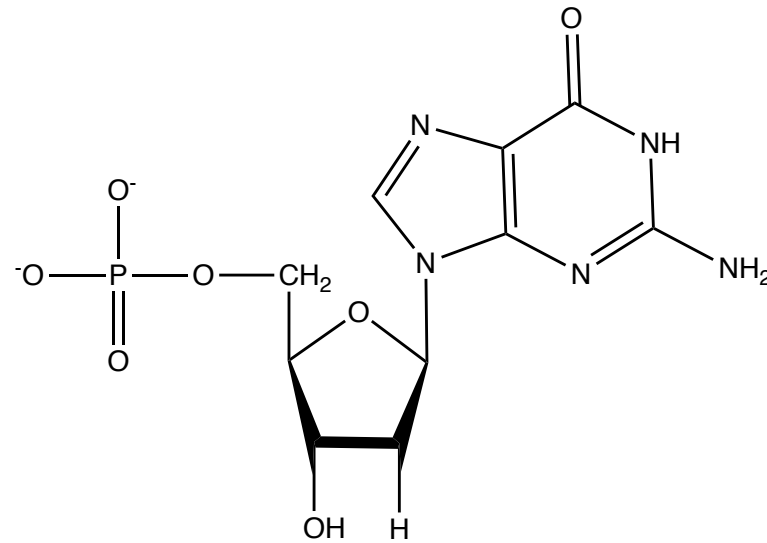
Báze + deoxyribosa + fosfát = deoxyribonukleotid



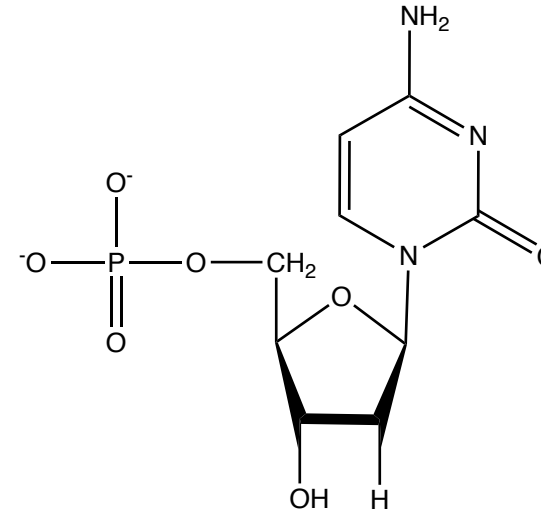
Báze + deoxyribosa + fosfát = deoxyribonukleotid



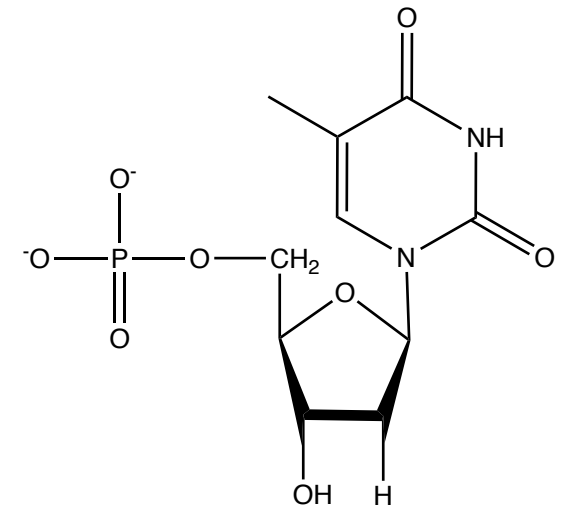
deoxyadenosin-5'-fosfát
dAMP
A



deoxyguanosin-5'-fosfát
dGMP
G



deoxycytidin-5'-fosfát
dCMP
C

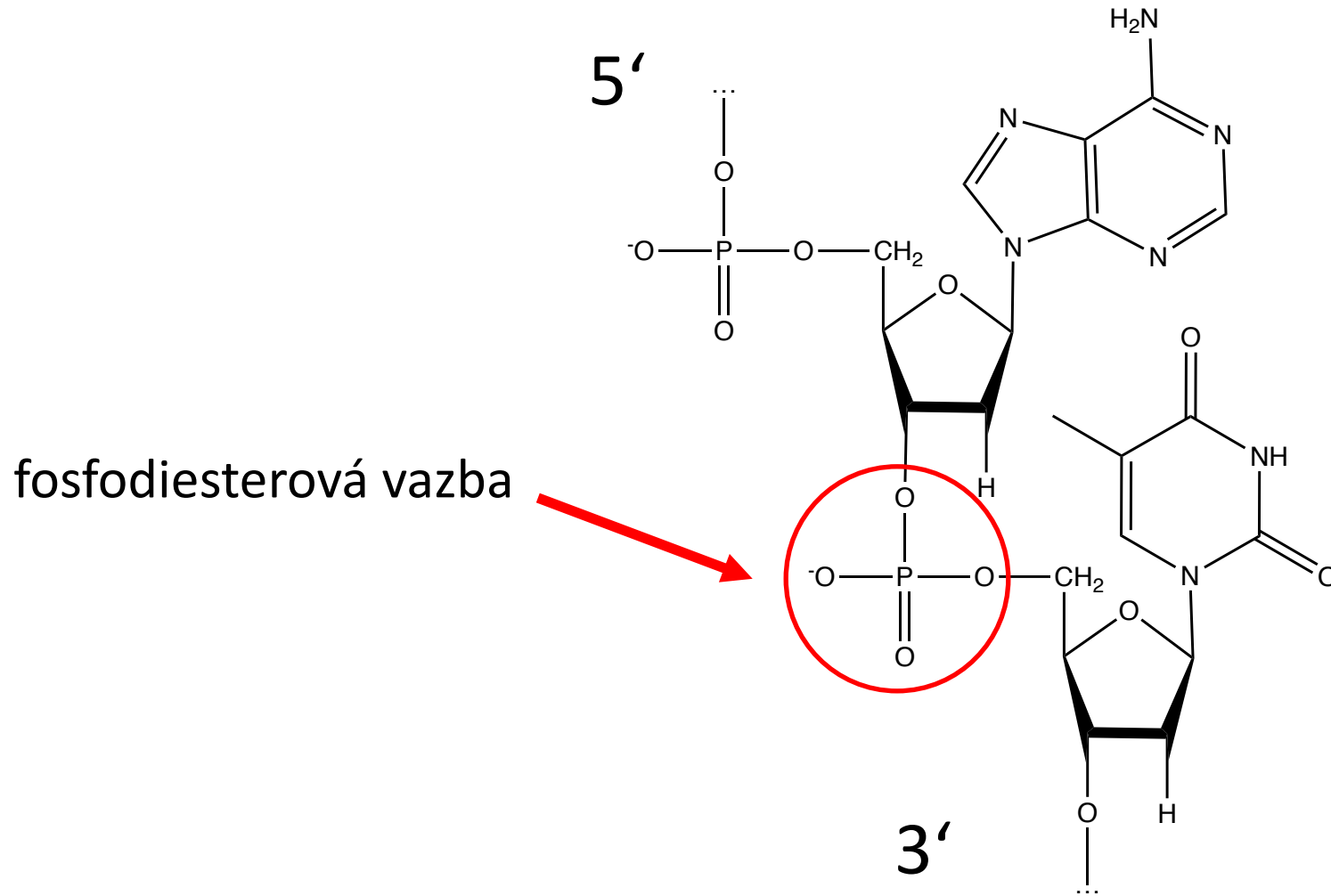


deoxythymidin-5'-fosfát
dTMP
T

(pouze v DNA)

DNA

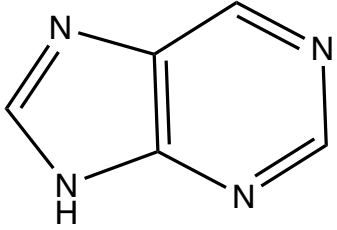
- Polymerní molekula složená z deoxyribonukleotidů



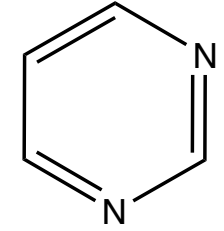
Ribonukleové kyseliny (RNA)

- Polymerní molekuly složené z ribonukleotidů
- **Ribonucleic acid**
- Nukleová báze + ribosa + fosfát = **ribonukleotid**

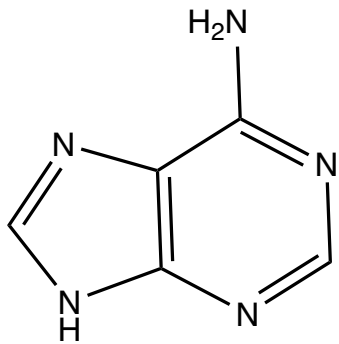
Nukleové báze v RNA



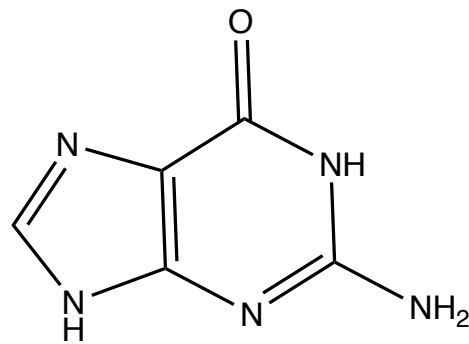
purinové



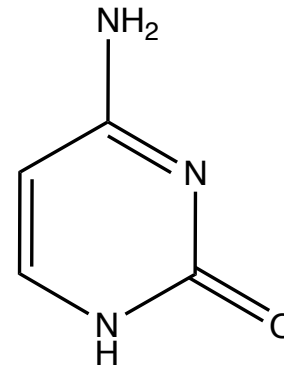
pyrimidinové



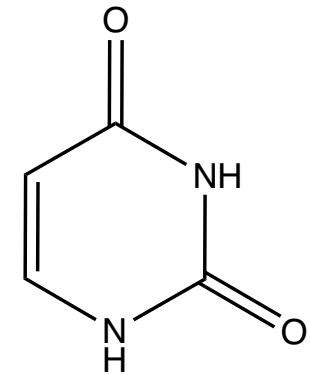
Adenin



Guanin



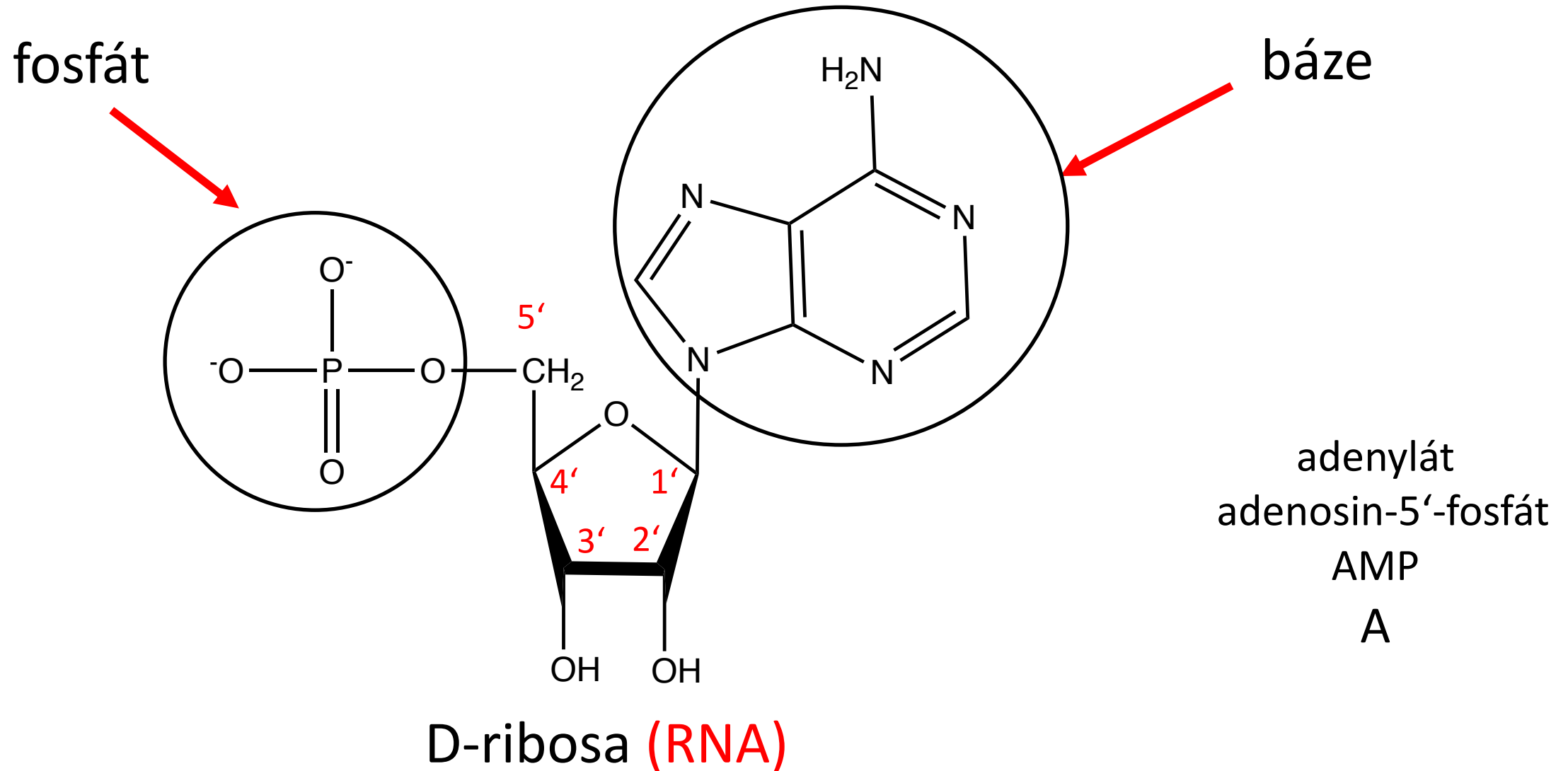
Cytosin



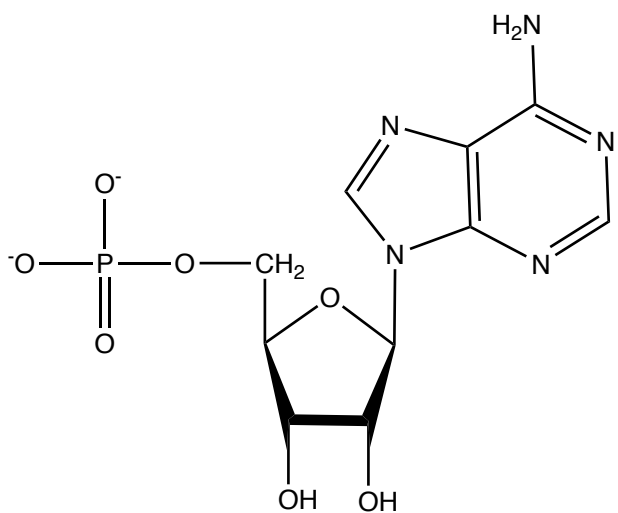
Uracil

(pouze v RNA)

Báze + ribosa + fosfát = ribonukleotid



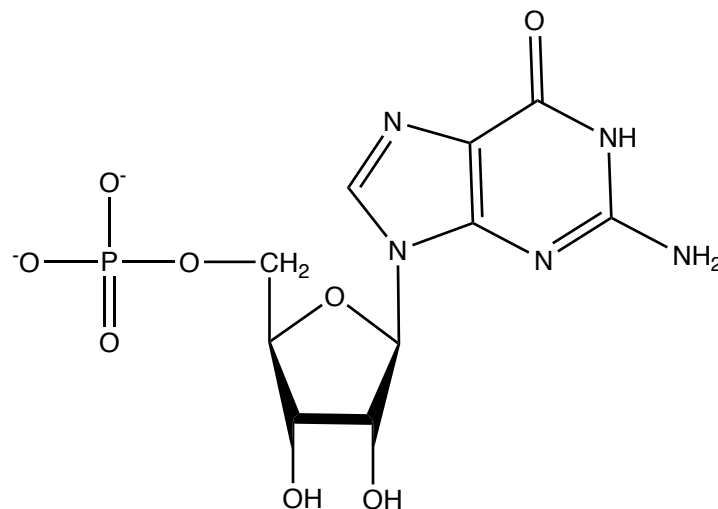
Báze + ribosa + fosfát = ribonukleotid



adenosin-5'-fosfát

AMP

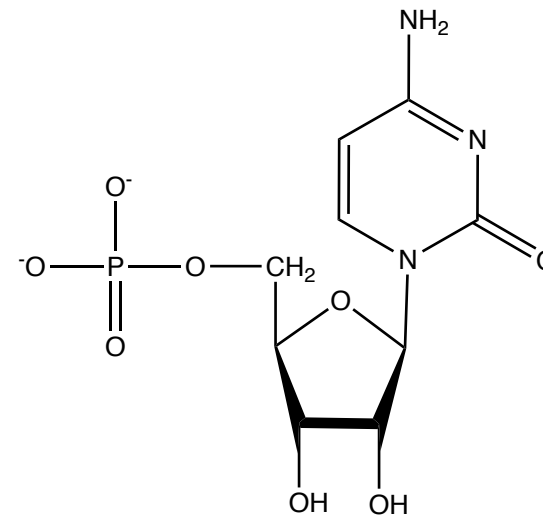
A



guanosin-5'-fosfát

GMP

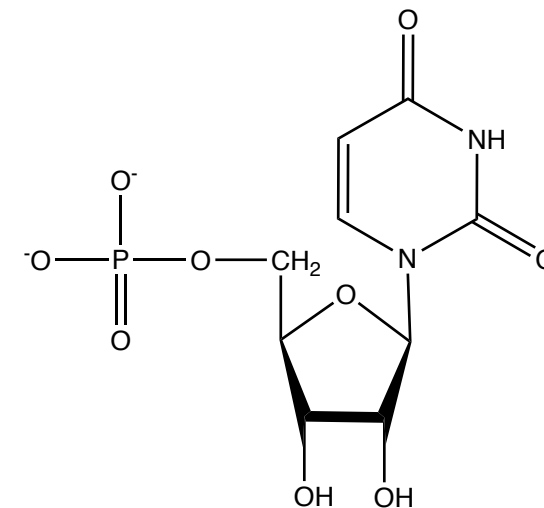
G



cytidin-5'-fosfát

CMP

C



uridin-5'-fosfát

UMP

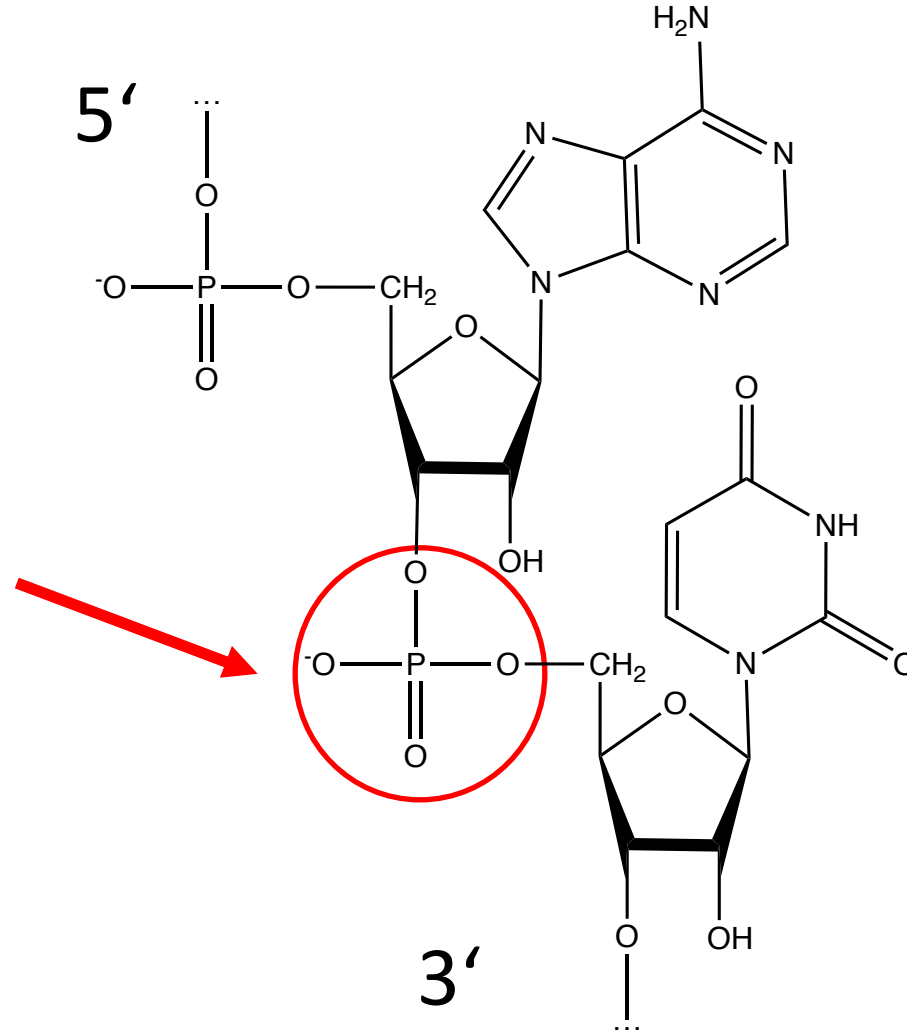
U

(pouze v RNA)

RNA

- Polymerní molekula složená z ribonukleotidů

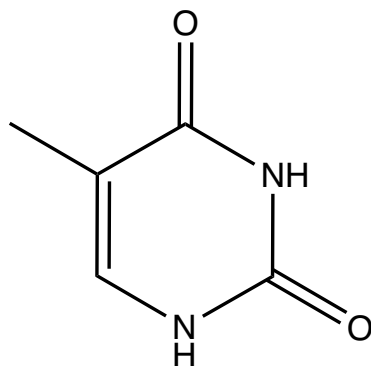
fosfodiesterová vazba



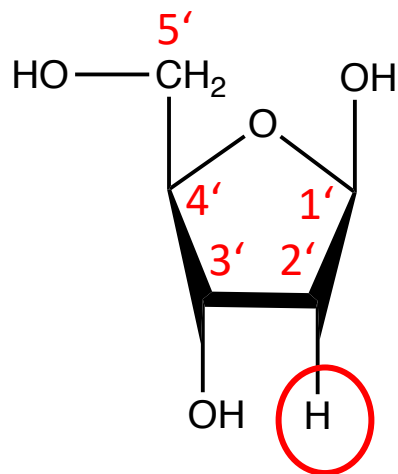
DNA

Deoxyribonukleotidy

Thymin
(pouze v DNA)



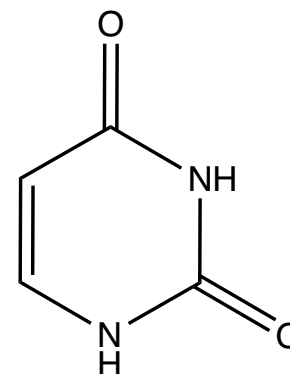
2-deoxy-D-ribosa
(pouze v DNA)



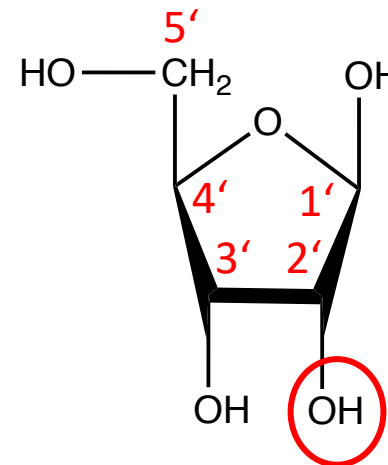
RNA

Ribonukleotidy

Uracil
(pouze v RNA)



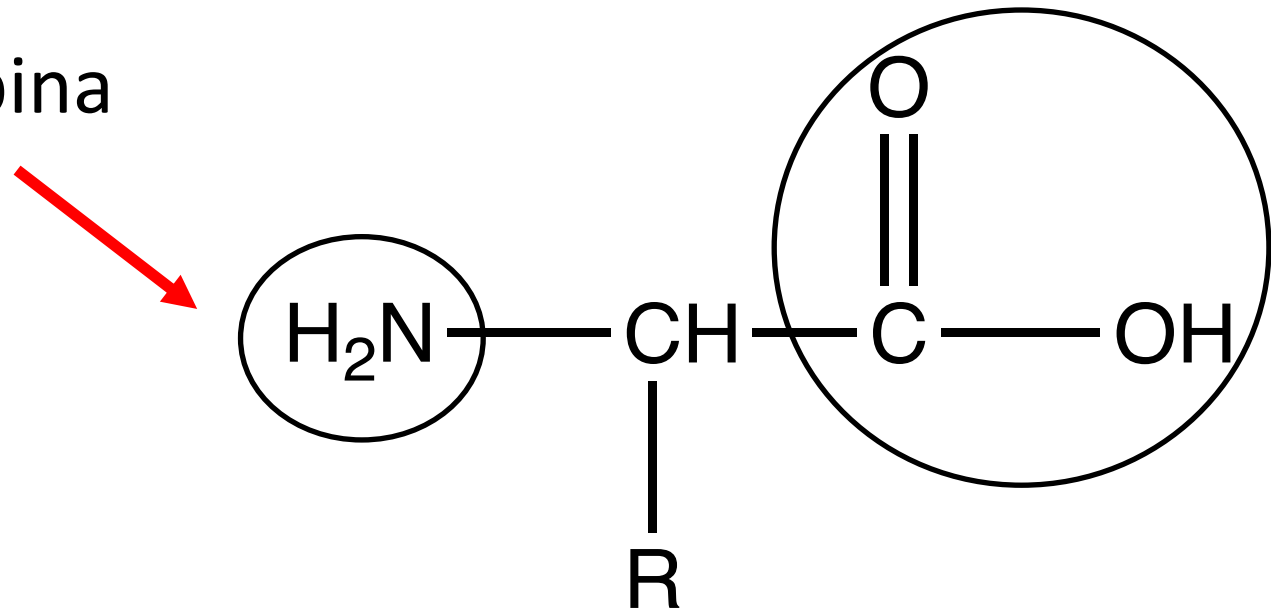
D-ribosa
(pouze v RNA)



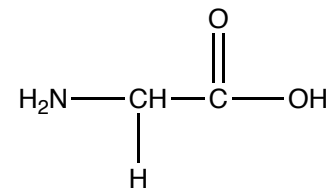
Proteiny

- Polymerní molekuly složené z aminokyselin – 20 kanonických biogenních

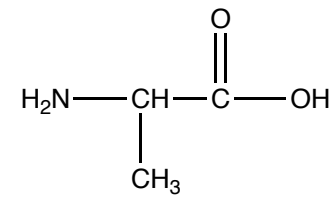
aminoskupina



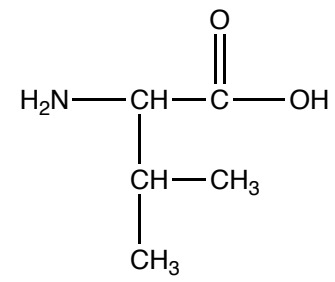
karboxylová skupina



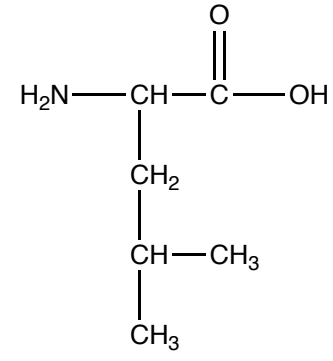
Glycin (Gly, G)



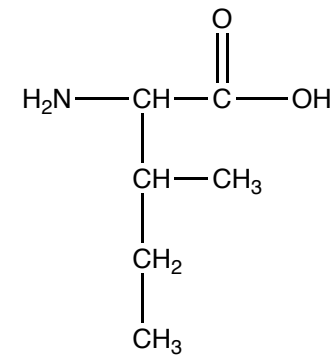
Alanin (Ala, A)



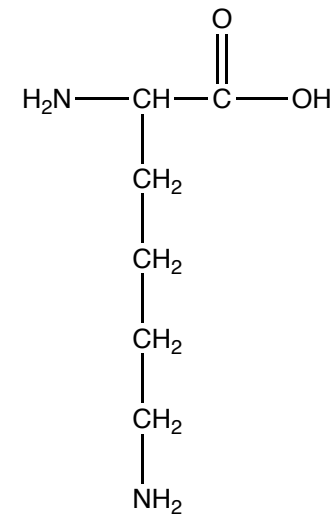
Valin (Val, V)



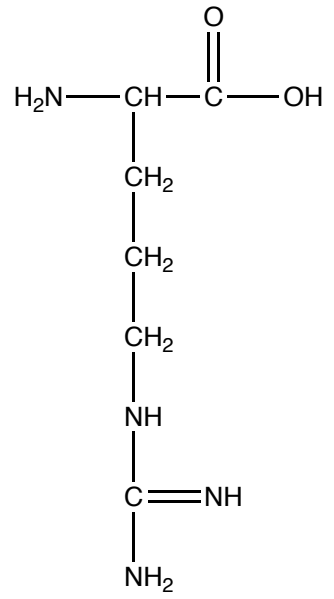
Leucin (Leu, L)



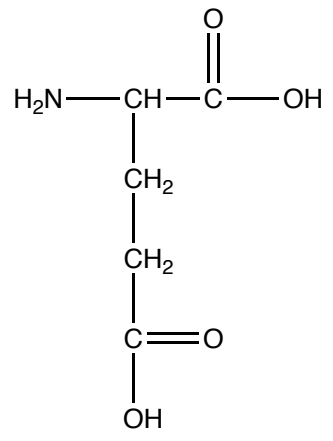
Izoleucin (Ile, I)



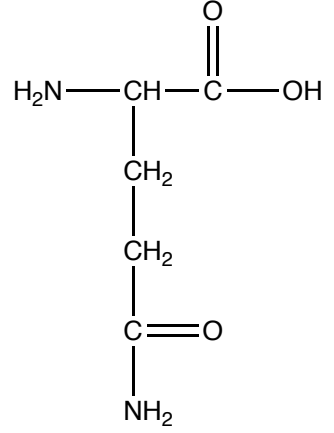
Lysin (Lys, K)



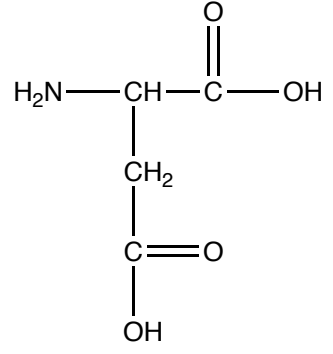
Arginin (Arg, R)



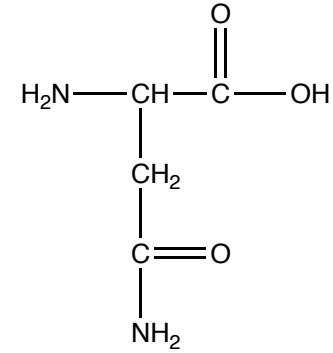
Kyselina glutamová (Glu, E)



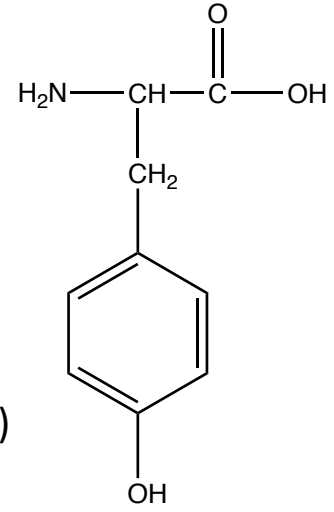
Glutamin (Gln, Q)



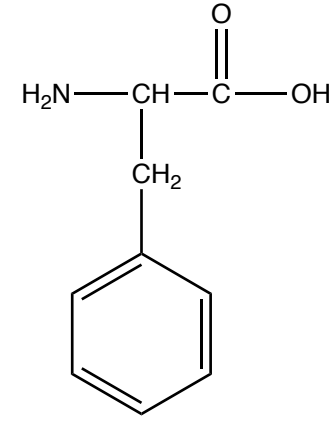
Kyselina asparagová (Asp, D)



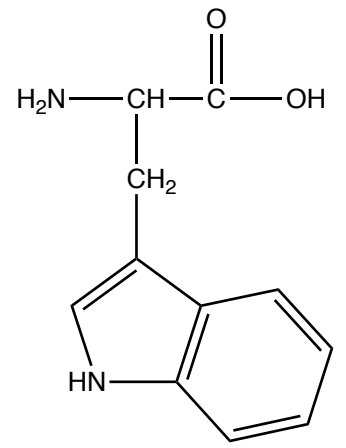
Asparagin (Asn, N)



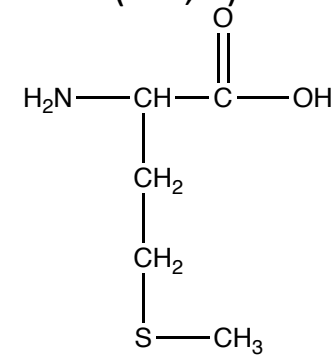
Tyrosin (Tyr, Y)



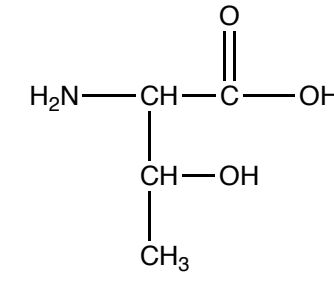
Fenylalanin (Phe, F)



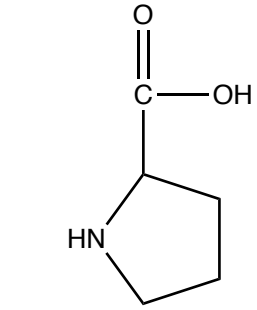
Tryptofan (Trp, W)



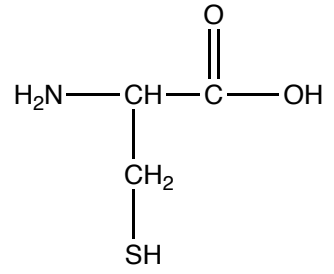
Methionin (Met, M)



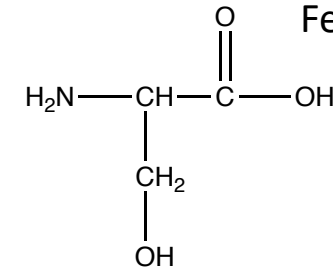
Threonin (Thr, T)



Prolin (Pro, P)

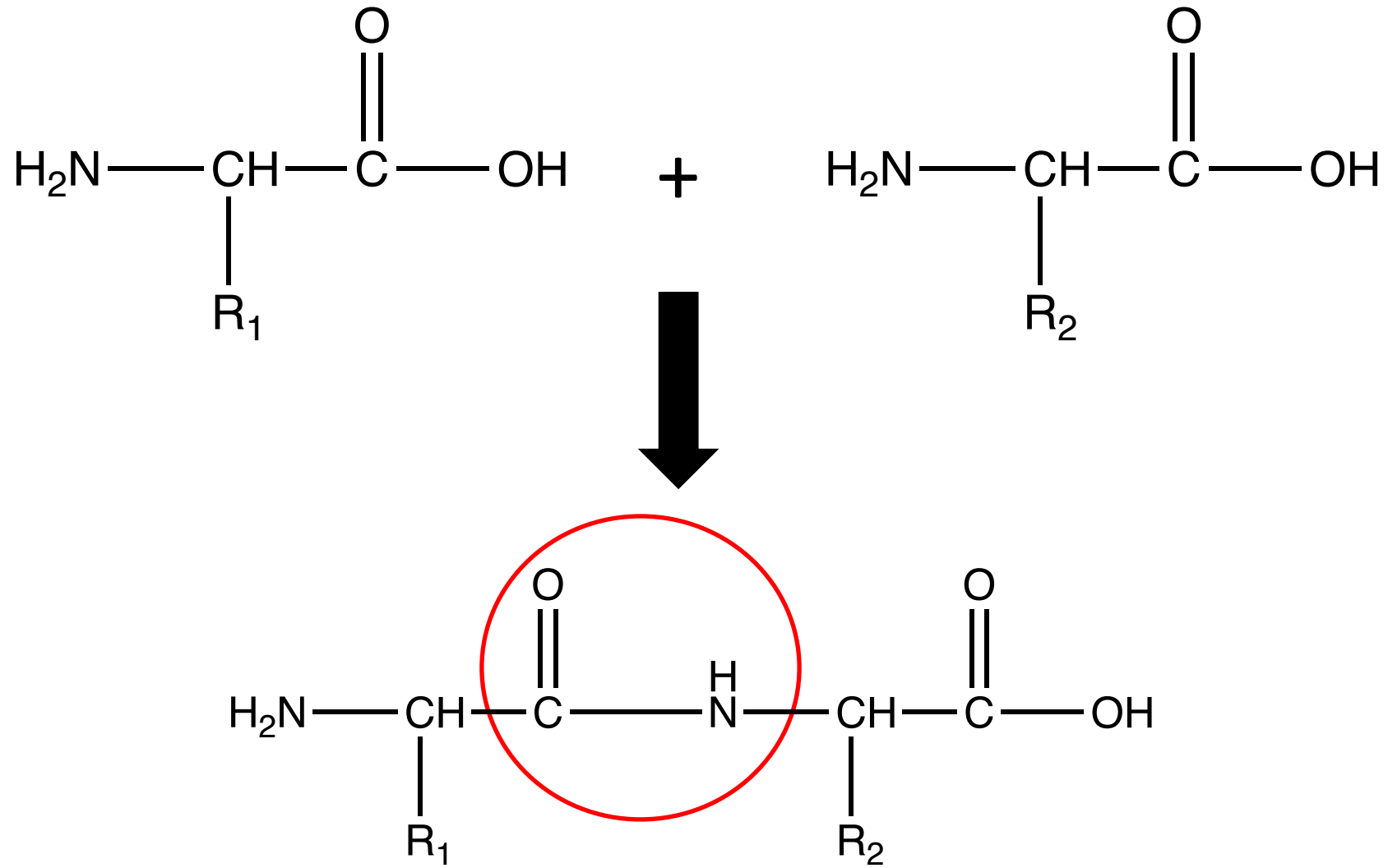


Cystein (Cys, C)



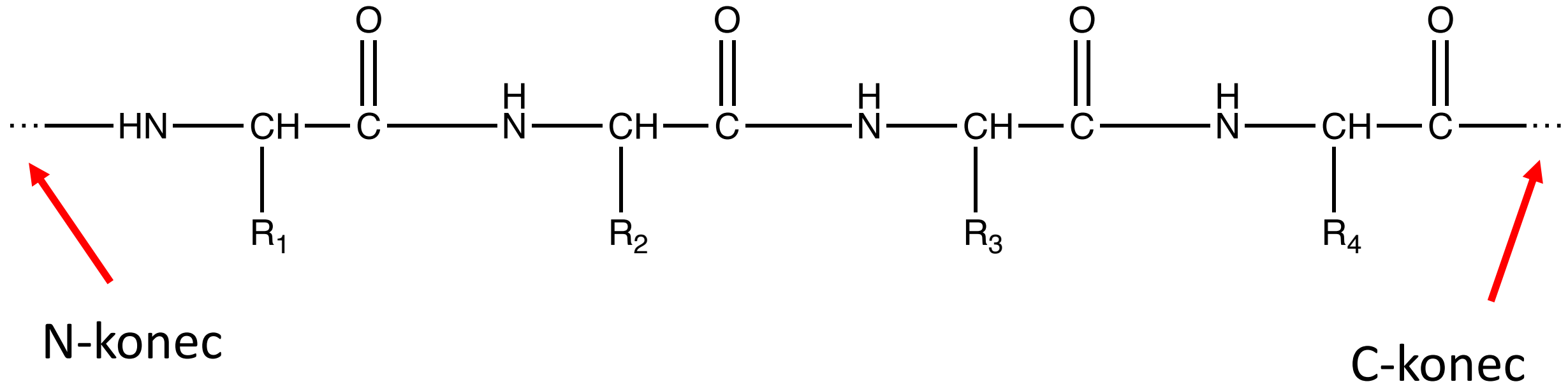
Serin (Ser, S)

Peptidová vazba



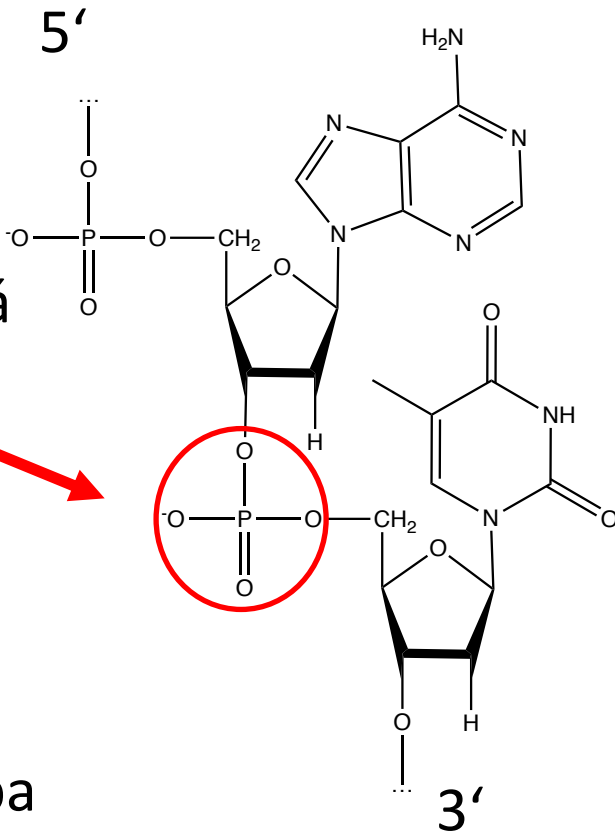
Proteiny

- Polymerní molekuly složené z aminokyselin

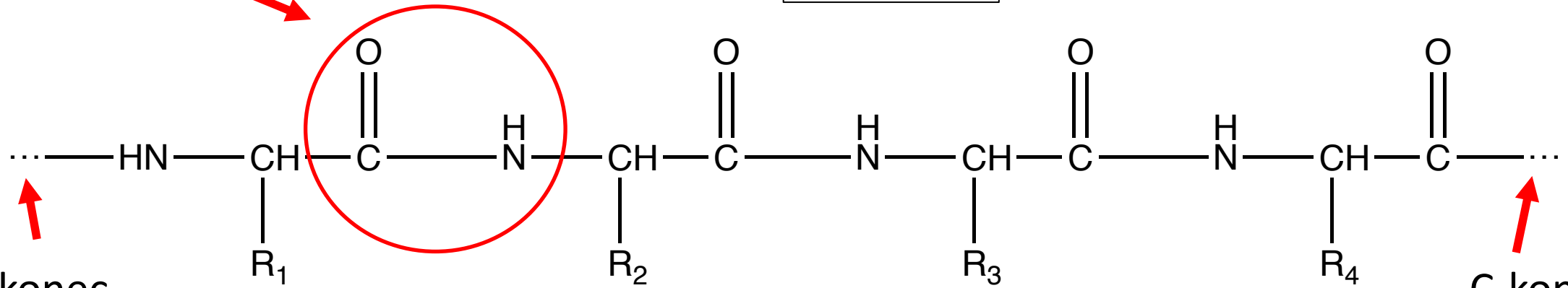


DNA

fosfodiesterová
vazba

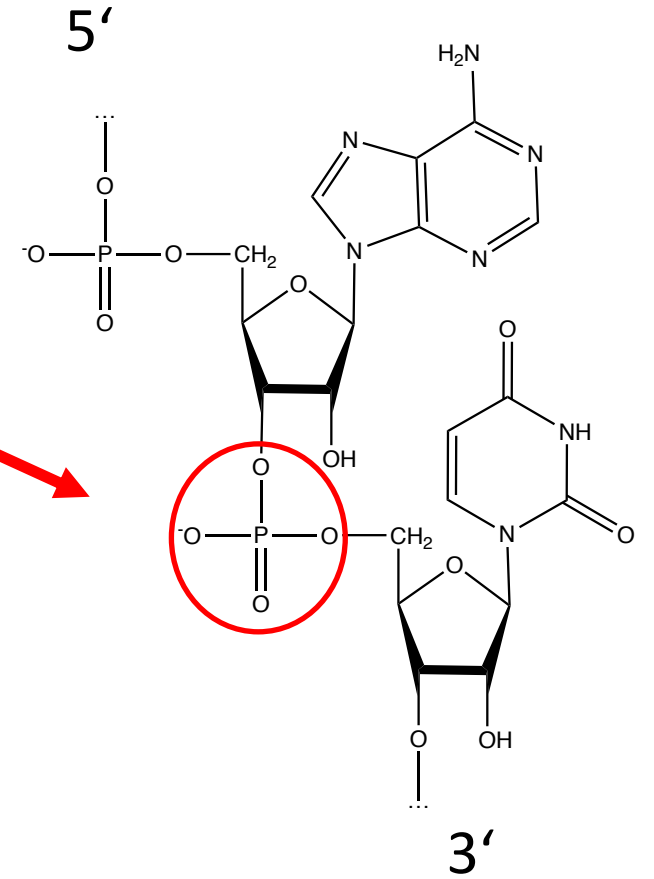


peptidová vazba



RNA

fosfodiesterová
vazba



Proteiny

N-konec

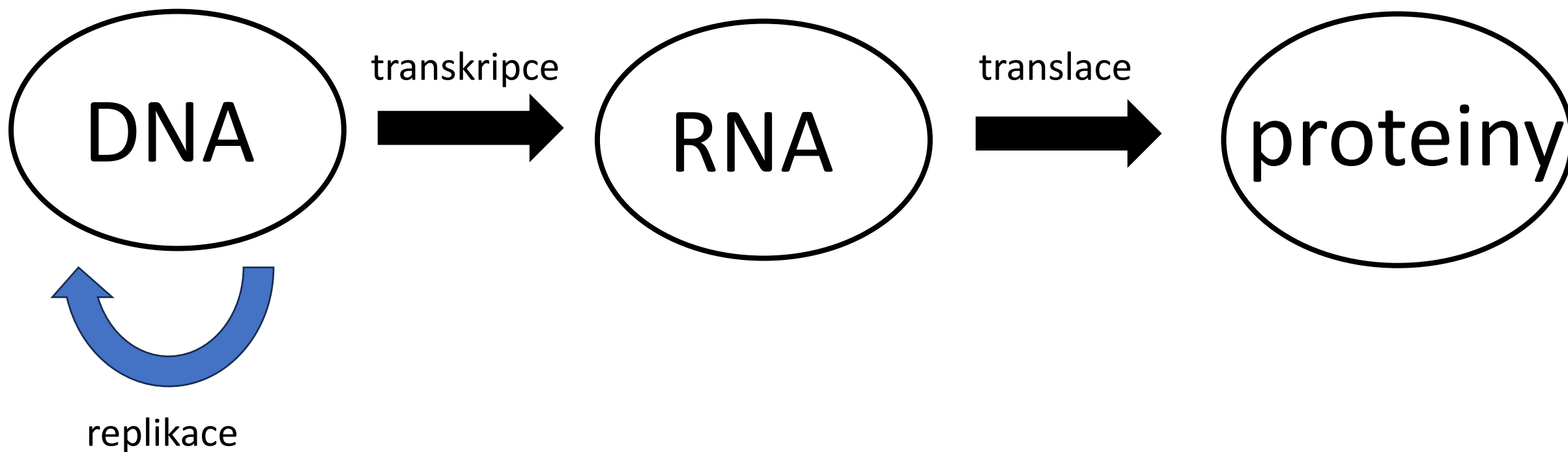
C-konec

Obsah

- **Biologické makromolekuly**
 - Deoxyribonukleová kyselina (DNA)
 - Ribonukleové kyseliny (RNA)
 - Proteiny
- **Centrální dogma molekulární biologie**
- **Struktura a funkce biologických makromolekul**
- **Koncept ideálního markeru retrospektivní dozimetrie**
- **Metody biologické retrospektivní dozimetrie**
 - DNA jako biologický marker ionizujícího záření
 - RNA jako biologický marker ionizujícího záření
 - Proteiny jako biologické markery ionizujícího záření

Centrální dogma molekulární biologie

- Přenos informace mezi biologickými makromolekulami



Obsah

- **Biologické makromolekuly**
 - Deoxyribonukleová kyselina (DNA)
 - Ribonukleové kyseliny (RNA)
 - Proteiny
- **Centrální dogma molekulární biologie**
- **Struktura a funkce biologických makromolekul**
- **Koncept ideálního markeru retrospektivní dozimetrie**
- **Metody biologické retrospektivní dozimetrie**
 - DNA jako biologický marker ionizujícího záření
 - RNA jako biologický marker ionizujícího záření
 - Proteiny jako biologické markery ionizujícího záření

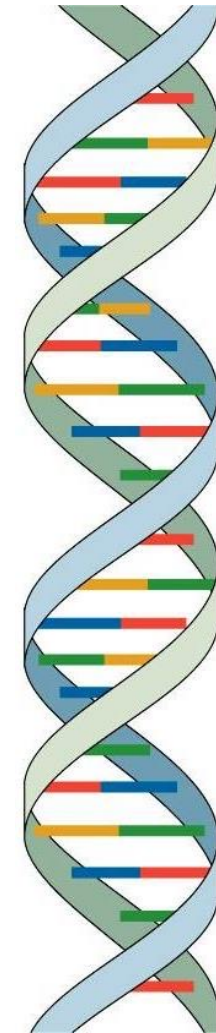
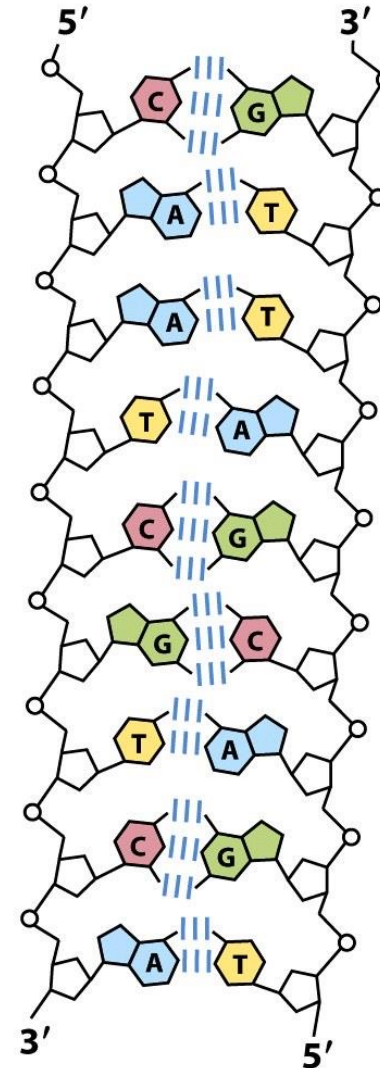
Struktura DNA

- H-vazby mezi bázemi různých řetězců:

A – T (2)

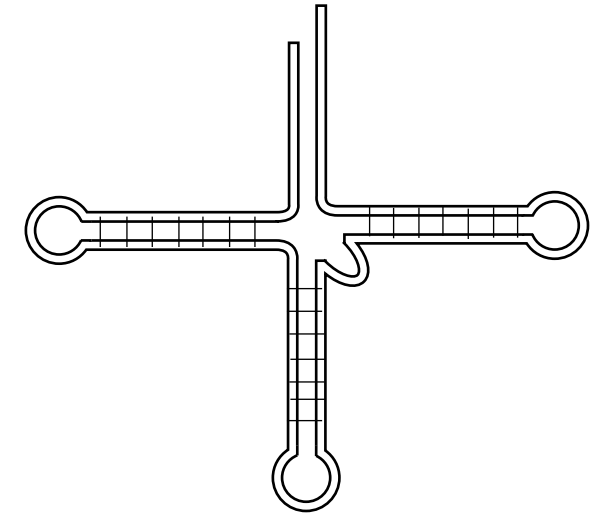
G – C (3)

- pravotočivý dvojitý helix (dvoušroubovice)
- antiparalelní, komplementární řetězce
- vně – cukr-fosfátová kostra
- uvnitř – báze
- B forma – kanonická
(perioda 3,4 Å a 34 Å)

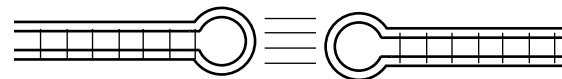


Struktura RNA

- Většinou jednovláknová molekula
- Sekundární struktura – krátké intramolekulární motivy
H-vazby: A – U (2), C – G (3)

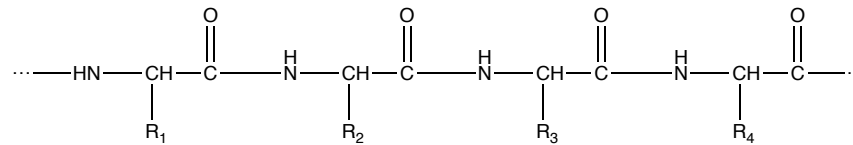


- Terciární struktura – přechodné interakce dvou molekul RNA
(výjimečně i přechodné dvoušroubovice)

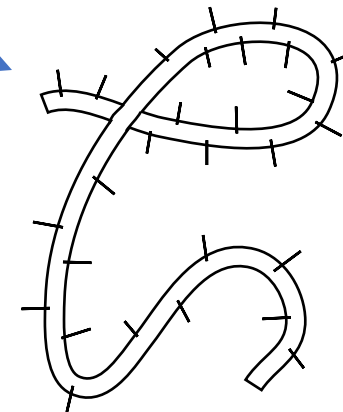
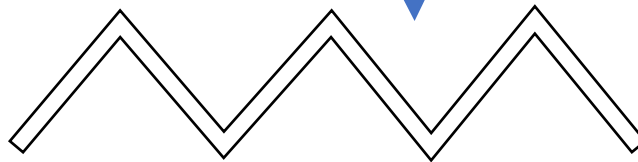
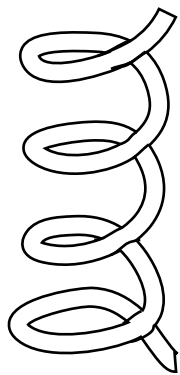


Struktura proteinů

- Primární struktura – sekvence

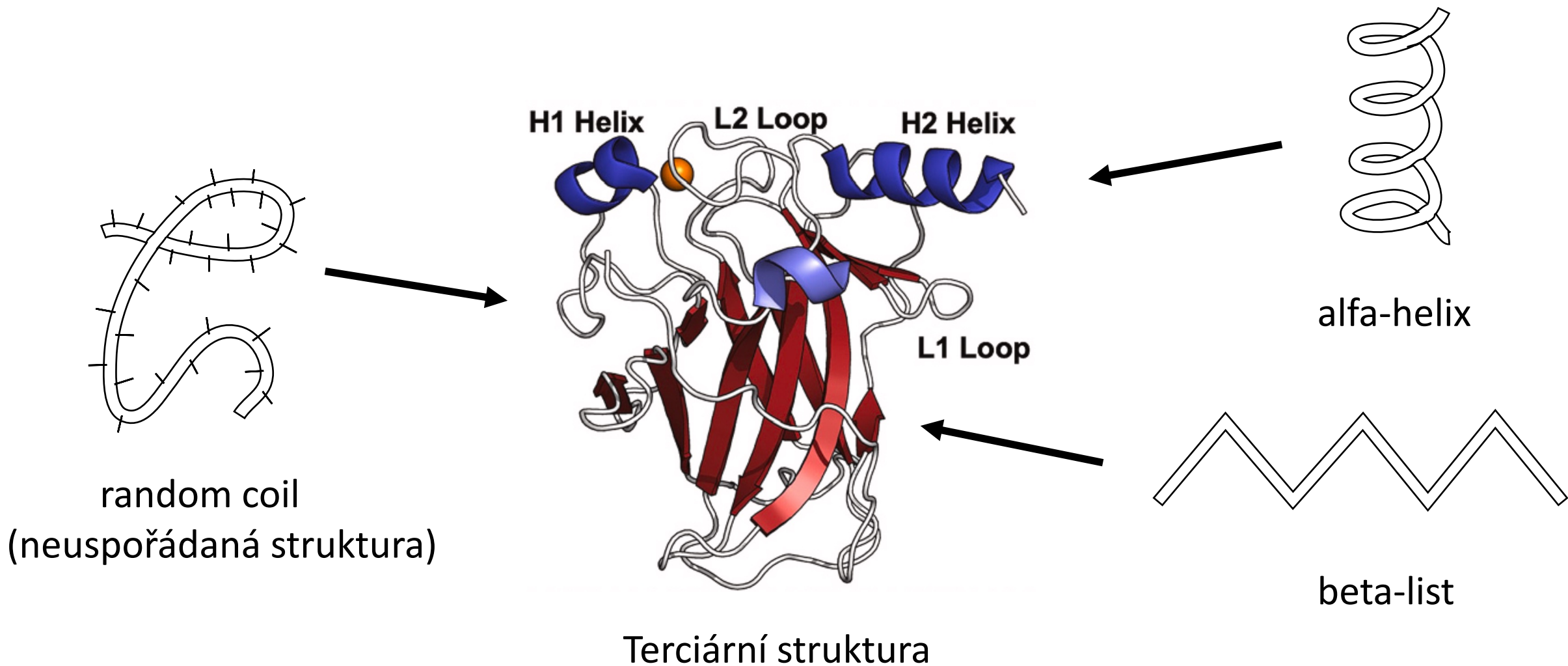


- Sekundární struktura – alfa-helix, beta-list, random coil

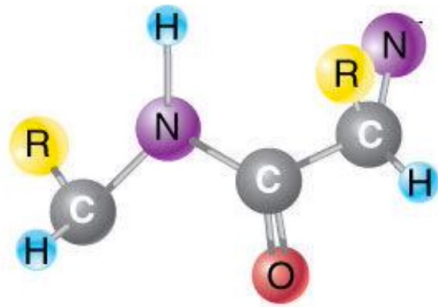


- Terciární struktura – 3D uspořádání
- Kvarterní struktura – uspořádání podjednotek

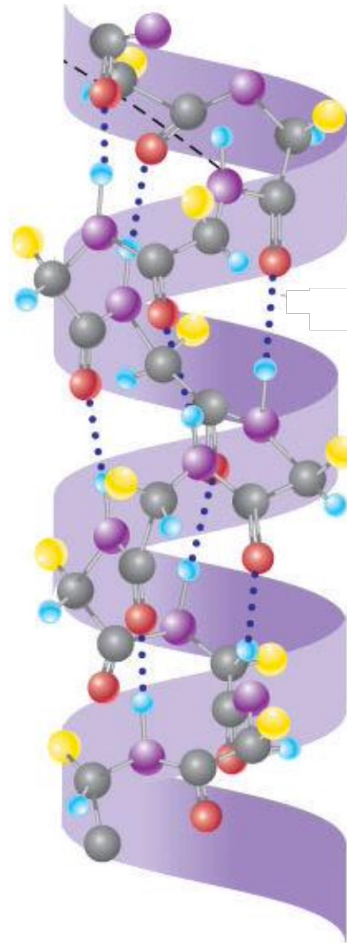
Struktura proteinů



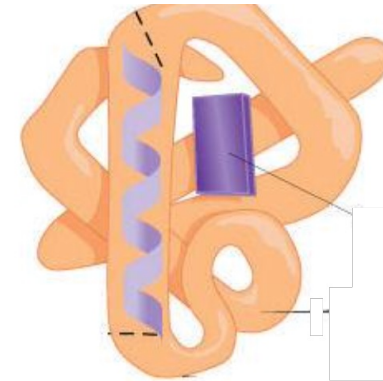
Struktura proteinů



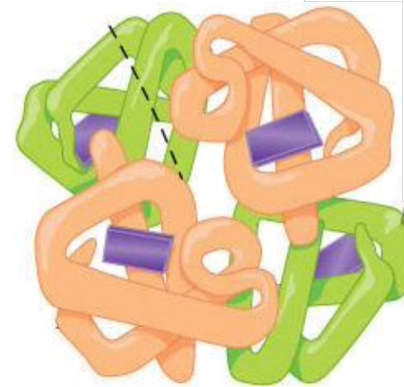
Primární struktura



Sekundární struktura



Terciární struktura



Kvarterní struktura

© 2010 Pearson Education, Inc.

Funkce biologických makromolekul

DNA

- Nositelka genetické informace

RNA

- Přenos informace z DNA do proteinů
- Regulace genové exprese
- (Katalýza – ribozymy)
- (Nositelka genetické informace)

Proteiny

- Strukturní funkce
- Transport a skladování
- Katalýza – enzymy
- Regulace procesů
(hormony, signalizace)
- Homeostáza
- Ochrana organismu
- Nutrienty
- Pohyb
- ...

Struktura a funkce biologických makromolekul

- Komplexita a variabilita struktur a funkcí roste v pořadí:

DNA < RNA < Proteiny

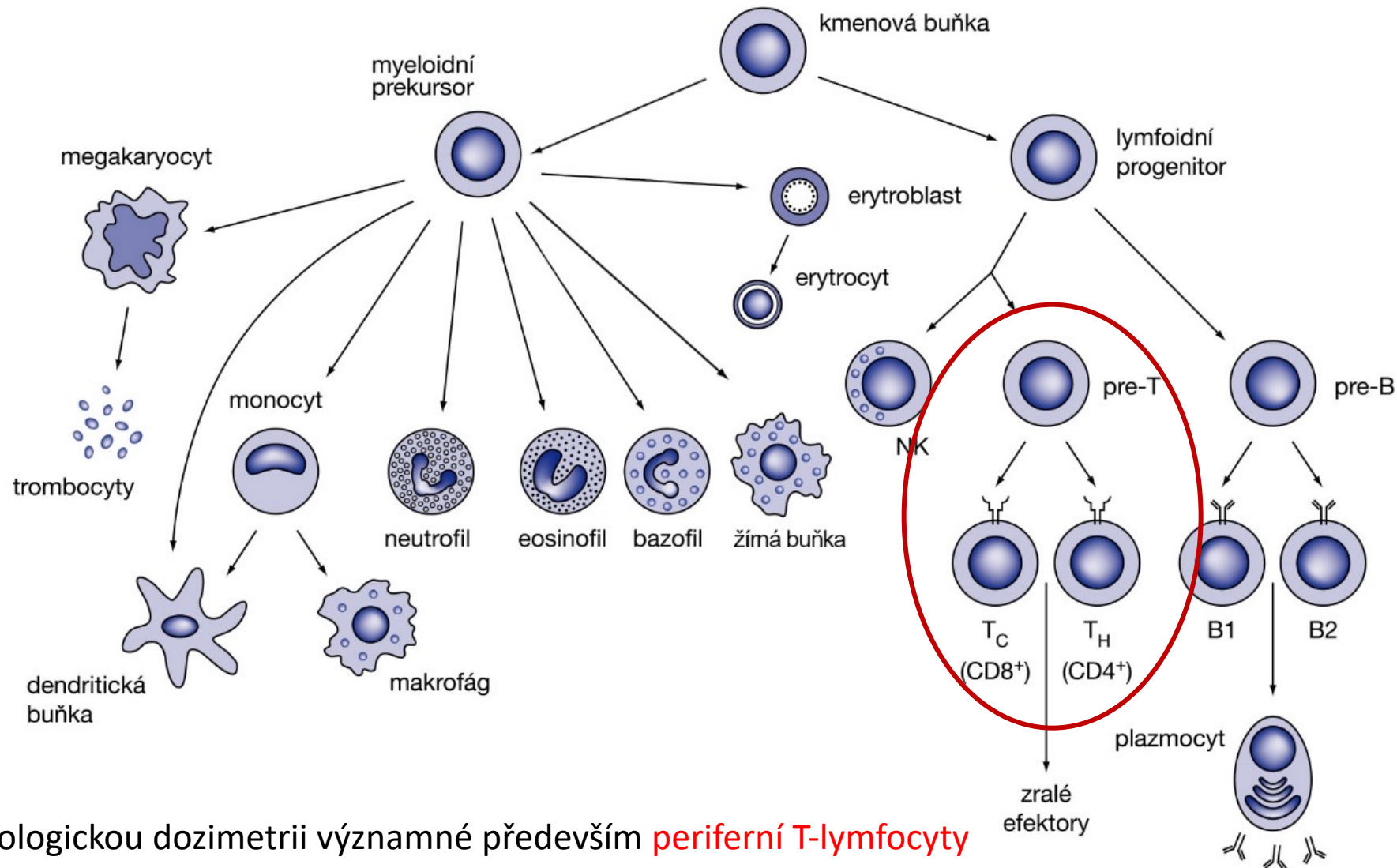
Obsah

- **Biologické makromolekuly**
 - Deoxyribonukleová kyselina (DNA)
 - Ribonukleové kyseliny (RNA)
 - Proteiny
- **Centrální dogma molekulární biologie**
- **Struktura a funkce biologických makromolekul**
- **Koncept ideálního markeru retrospektivní dozimetrie**
- **Metody biologické retrospektivní dozimetrie**
 - DNA jako biologický marker ionizujícího záření
 - RNA jako biologický marker ionizujícího záření
 - Proteiny jako biologické markery ionizujícího záření

Ideální marker retrospektivní dozimetrie

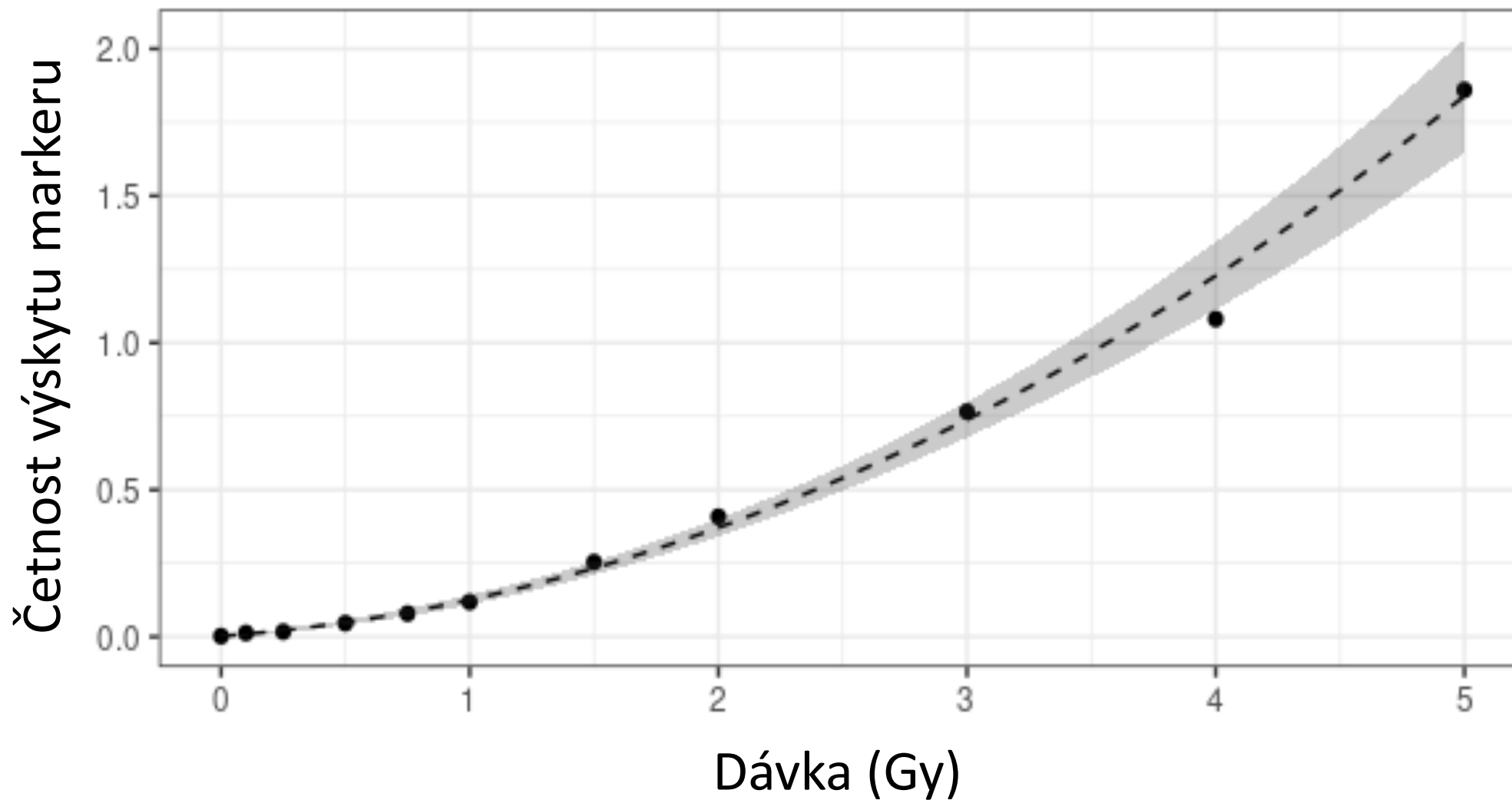
- Nízká četnost spontánního výskytu
- Vysoká specifita vůči IR
- Vysoká stabilita v čase
- Možnost kalibrace (pro různé kvality záření)
- Nízká interindividuální variabilita
- Aplikovatelnost ve vhodném intervalu dávek
- Snadný odběr vzorků
- Krátká doba analýzy
- Nízká cena
- Srovnatelnost analýzy (*in vivo* a *in vitro*)
- Reprodukovatelnost

Diferenciace krevních buněk



- pro biologickou dozimetrii významné především **periferní T-lymfocyty**

Kalibrační křivka

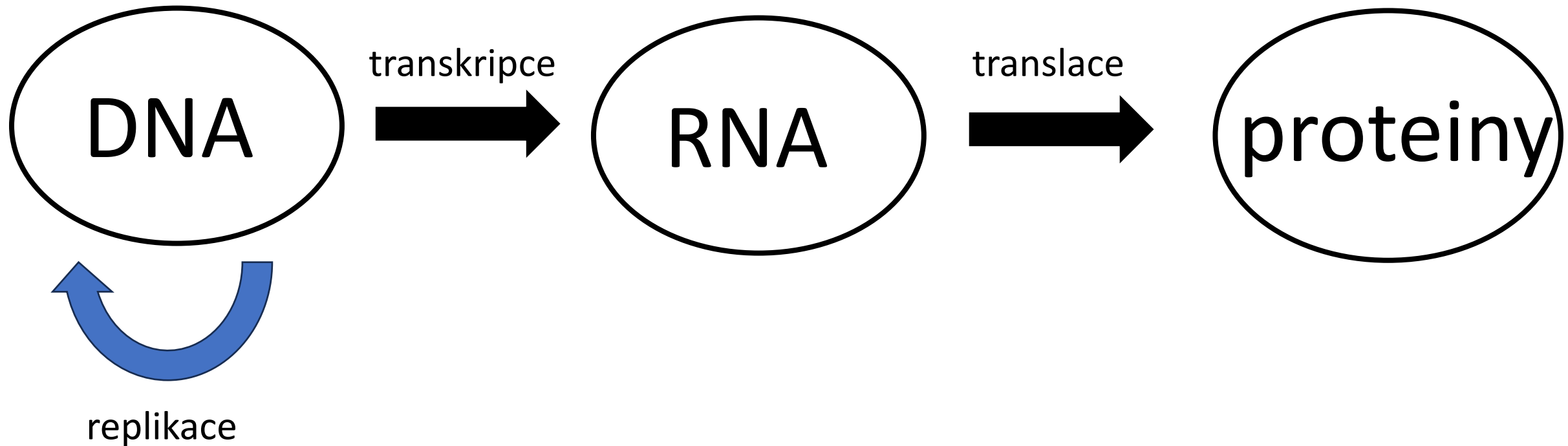


Obsah

- **Biologické makromolekuly**
 - Deoxyribonukleová kyselina (DNA)
 - Ribonukleové kyseliny (RNA)
 - Proteiny
- **Centrální dogma molekulární biologie**
- **Struktura a funkce biologických makromolekul**
- **Koncept ideálního markeru retrospektivní dozimetrie**
- **Metody biologické retrospektivní dozimetrie**
 - DNA jako biologický marker ionizujícího záření
 - RNA jako biologický marker ionizujícího záření
 - Proteiny jako biologické markery ionizujícího záření

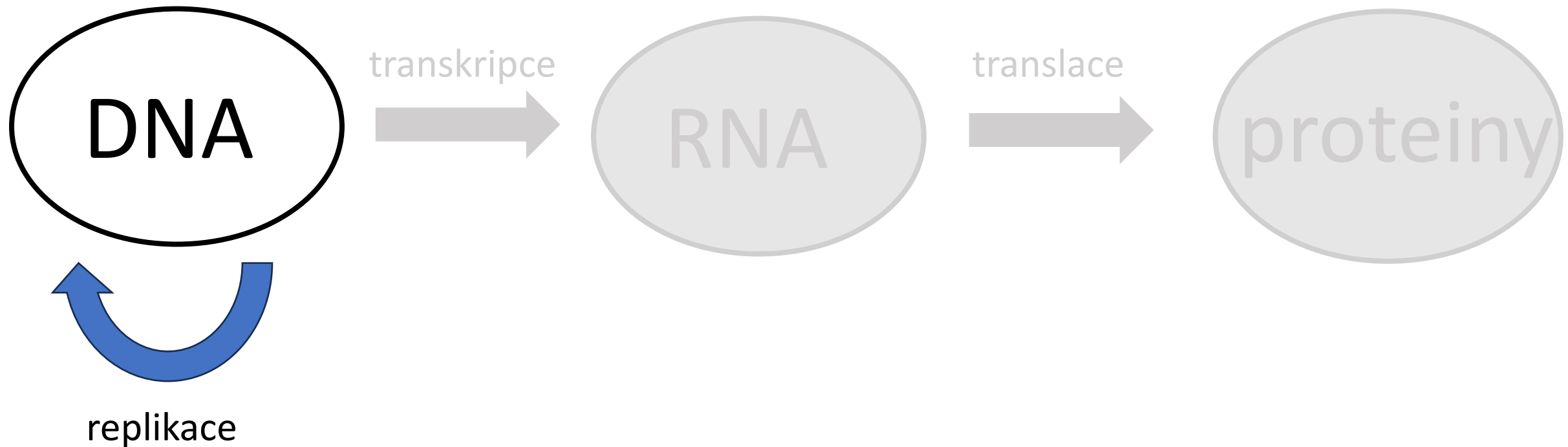
Metody biologické retrospektivní dozimetrie

Centrální dogma molekulární biologie:



Metody biologické retrospektivní dozimetrie

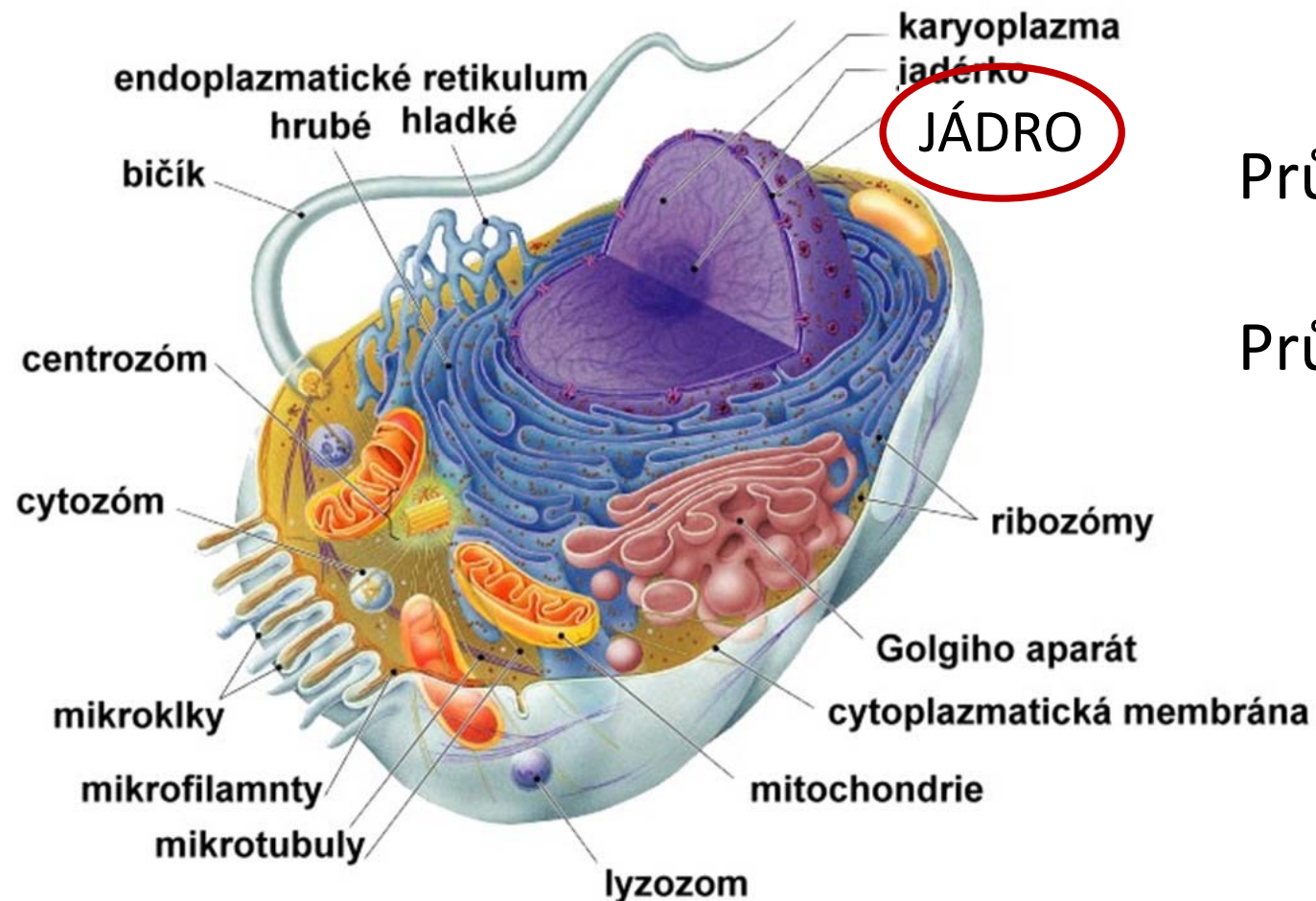
Centrální dogma molekulární biologie:



DNA

replikace

Stavba eukaryotické buňky



Průměr lidské buňky $\approx 20 \mu\text{m}$

Průměr jádra $\approx 10 \mu\text{m}$

DNA



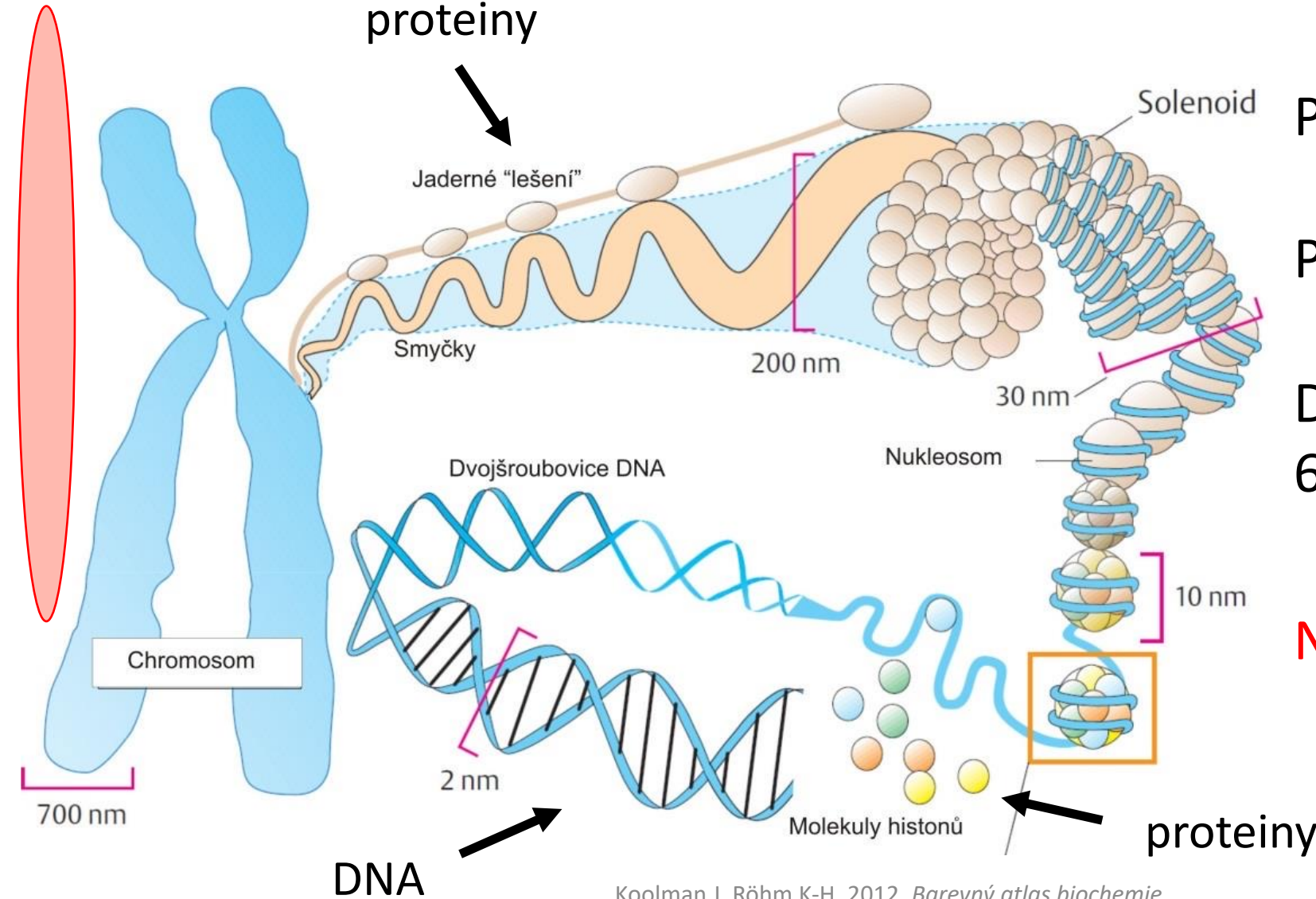
Organizace DNA v jádře

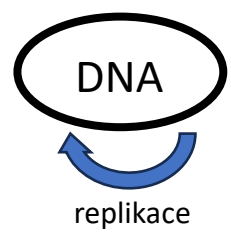
Průměr lidské buňky $\approx 20 \mu\text{m}$

Průměr jádra $\approx 10 \mu\text{m}$

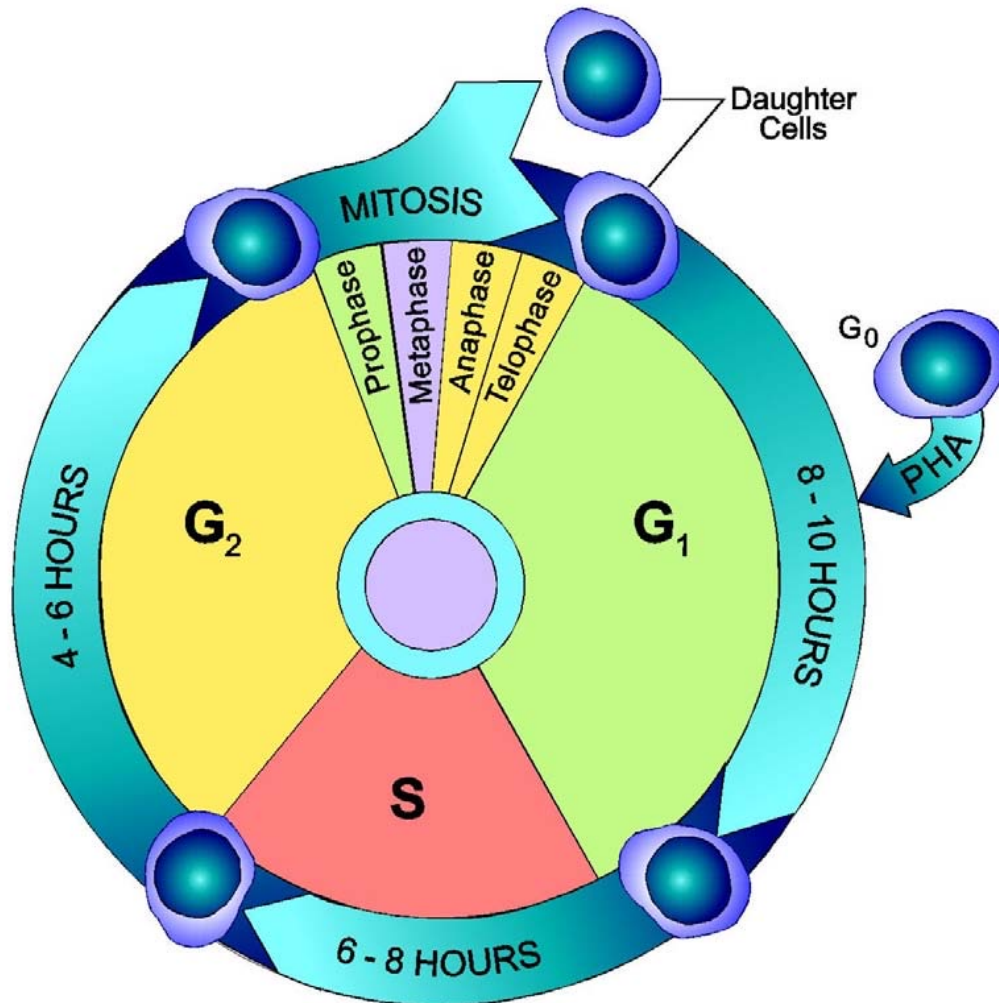
Diploidní lidský genom $\approx 6 \cdot 10^9 \text{ bp} \approx 2 \text{ m}$

NUTNÁ KOMPRESÍ





Buněčný cyklus



lidská buňka \approx 20 - 24 hod.

Interfáze

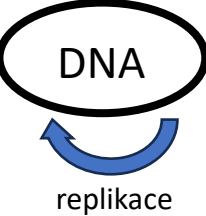
- G_1 – růst, příprava na replikaci
- S – replikace DNA
- G_2 – příprava na mitózu a dělení

Mitóza

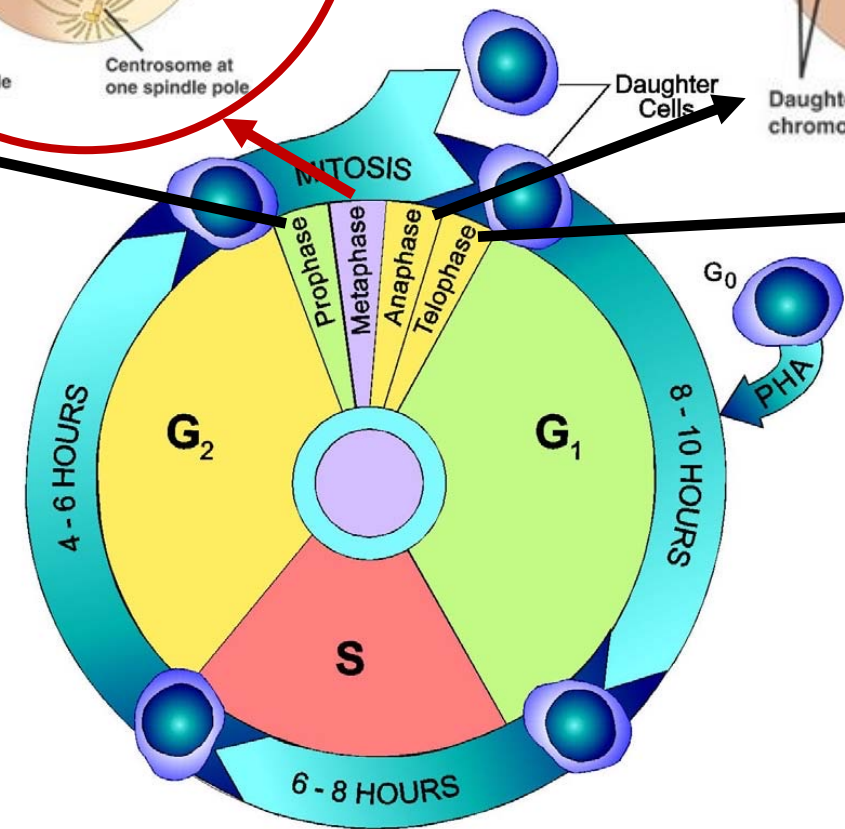
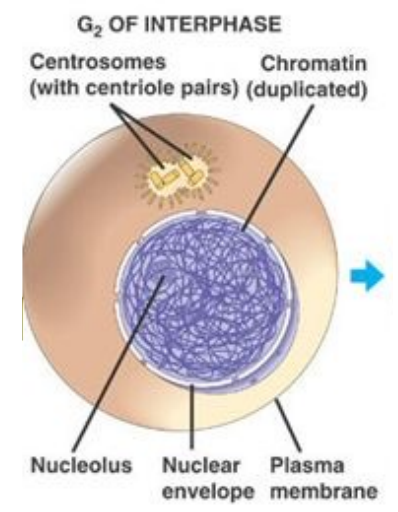
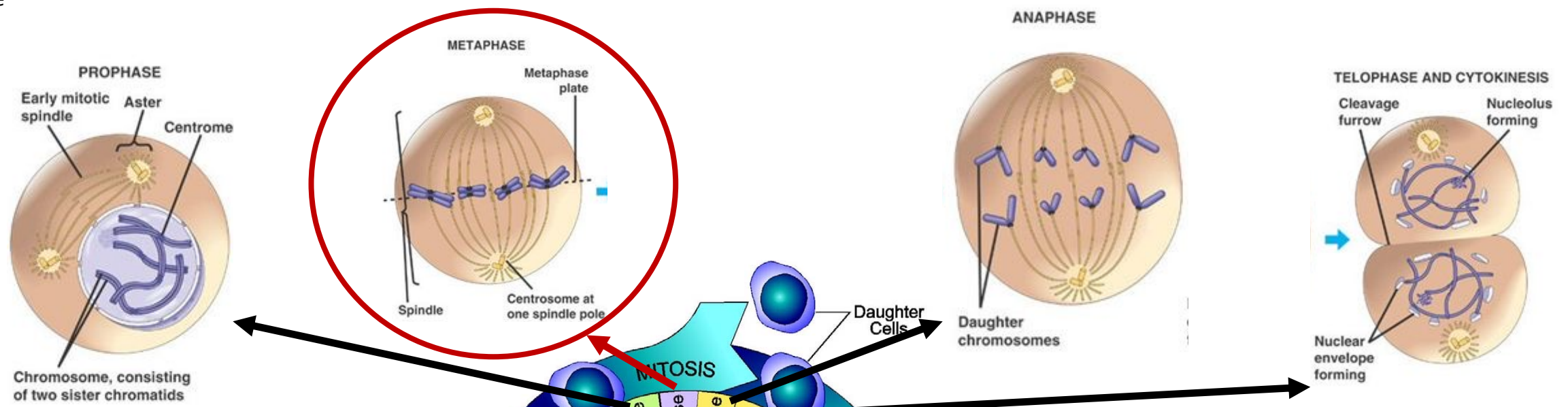
- Profáze – kondenzace chromosomů
- Metafáze – chromosomy v rovině
- Anafáze – rozchod chromosomů
- Telofáze – dělení jádra (karyokineze)

Cytokineze (buněčné dělení)

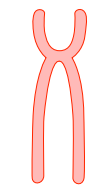
G_0 – „klidový stav“

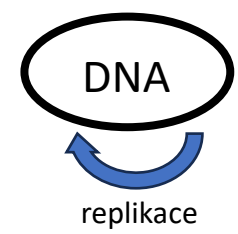


Buněčný cyklus – změny morfologie chromosomů

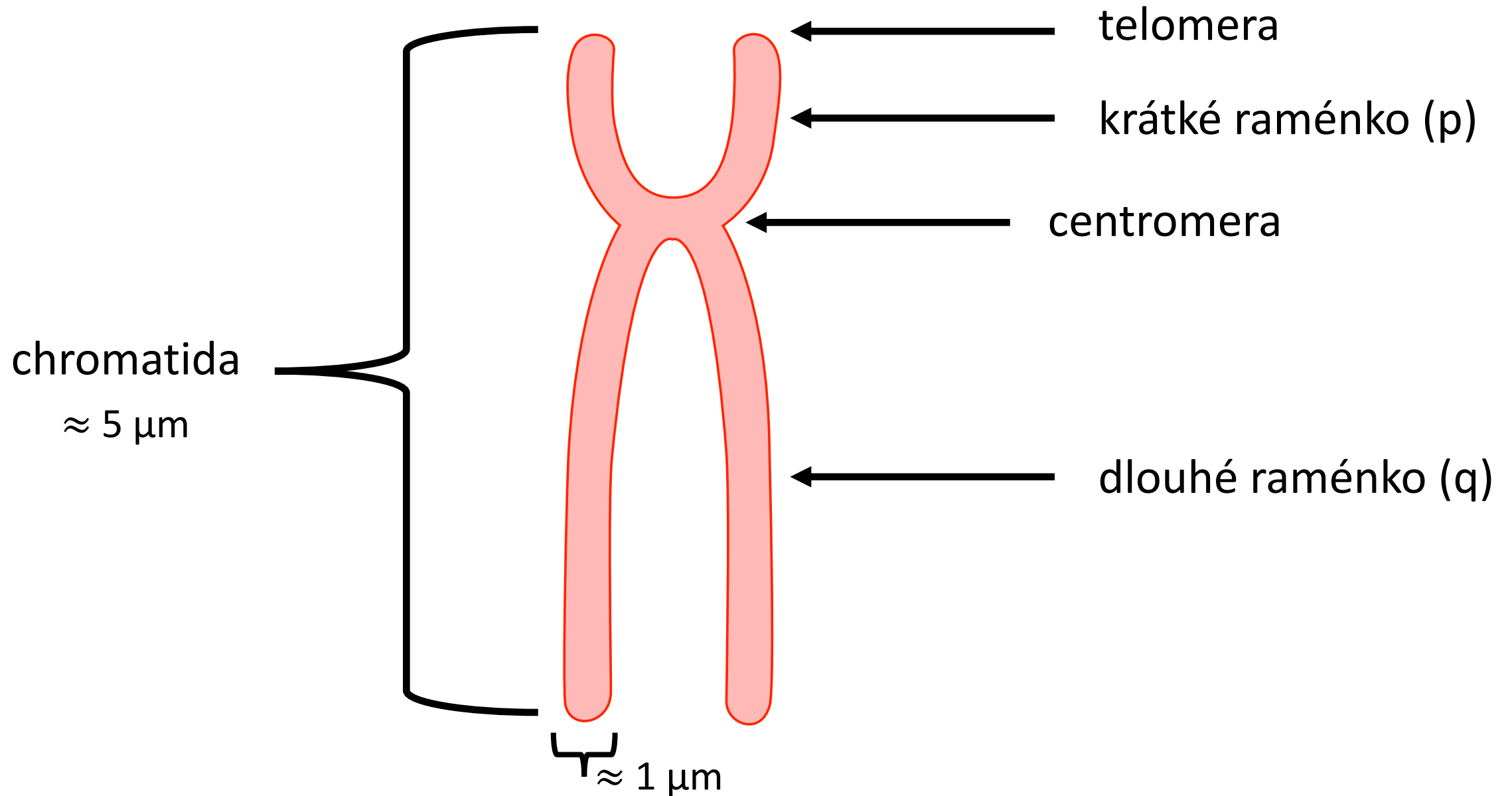


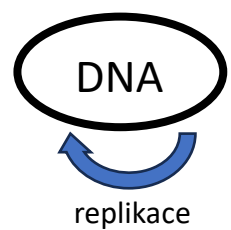
G_1 – 1 chromatida
 S, G_2 , M – 2 sesterské chromatidy





Stavba chromosomu v metafázi





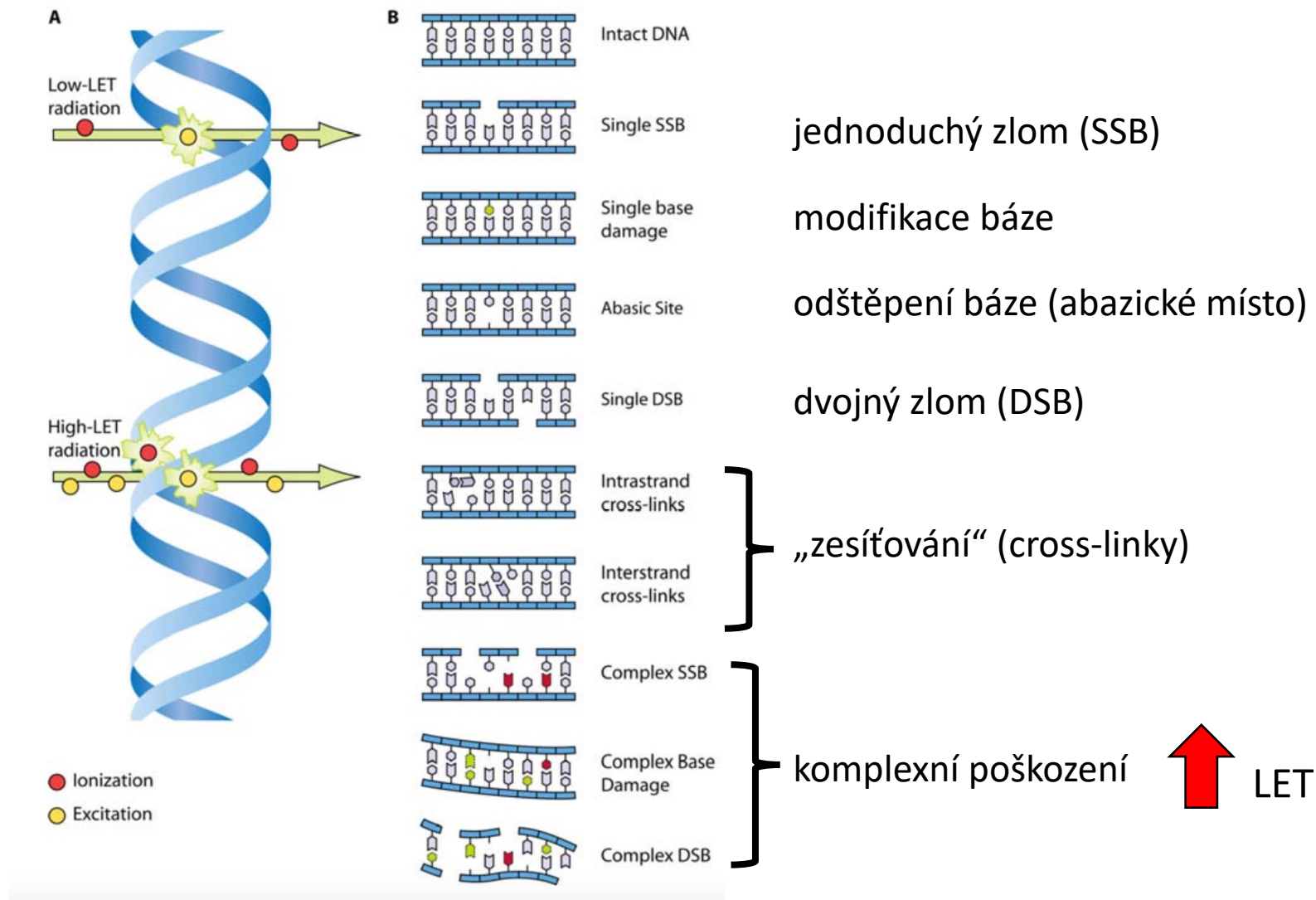
Interakce IR s DNA

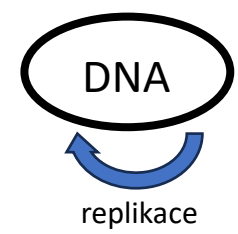
1 Gy, 1 buňka:

- ≈ 100 000 ionizací
- ≈ 40 DSB
- ≈ 1000 SSB
- ≈ 1000 modifikací bází
- ≈ 1000 odštěpení bází

X

opravné mechanismy buňky



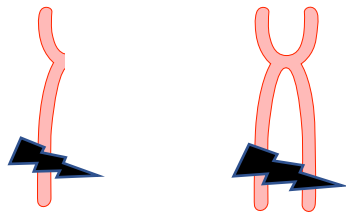


Strukturní chromosomové aberace

- translokace, delece, inverze, inzerce, zlomy...



Chromosomový typ



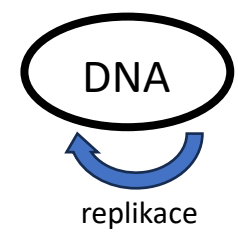
IR

Chromatidový typ



S, G₂, M








S-dependentní klastogeny

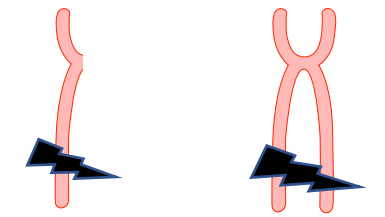


Strukturní chromosomové aberace - přehled

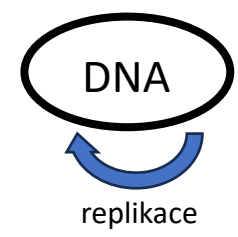
Examples of 2-lesion **Chromosome-type** aberrations

chromosomový typ

	INTERCHANGE	INTER-ARM INTRACHANGE	INTRA-ARM INTRACHANGE	"BREAK" DISCONTINUITY
A	 <p>dicentric</p>	 <p>centric-ring</p>	 <p>interstitial deletion</p>	
S	 <p>reciprocal translocation</p>	 <p>pericentric inversion</p>	 <p>paracentric inversion</p>	



IR

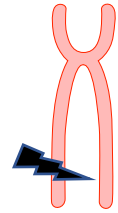


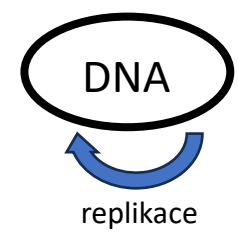
Strukturní chromosomové aberace - přehled

Examples of 2-lesion **Chromatid-type** aberrations

chromatidový typ

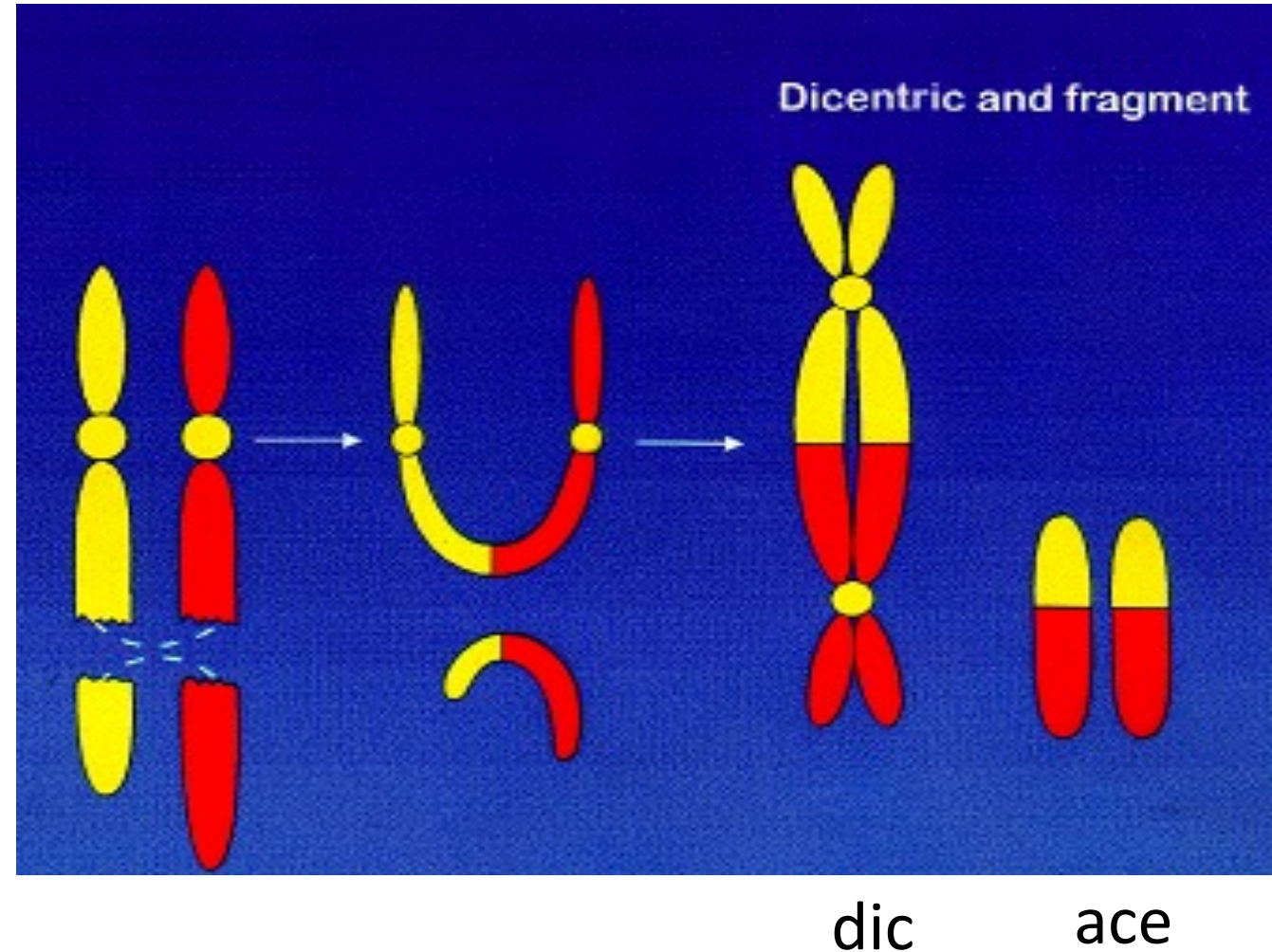
	INTERCHANGE	INTER-ARM INTRACHANGE		INTRA-ARM INTRACHANGE		"BREAK" DISCONTINUITY
A	 dicentric	 (=centric ring)	 (=dicentric)	 interstitial deletion	 isochromatid deletion	
S	 reciprocal translocation	 pericentric inversion	 duplication/ deletion	 paracentric inversion	 (=duplication/ deletion)	 some are incomplete intra-arm intrachanges

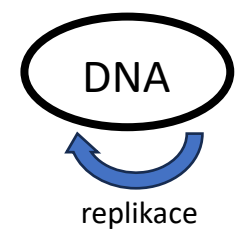




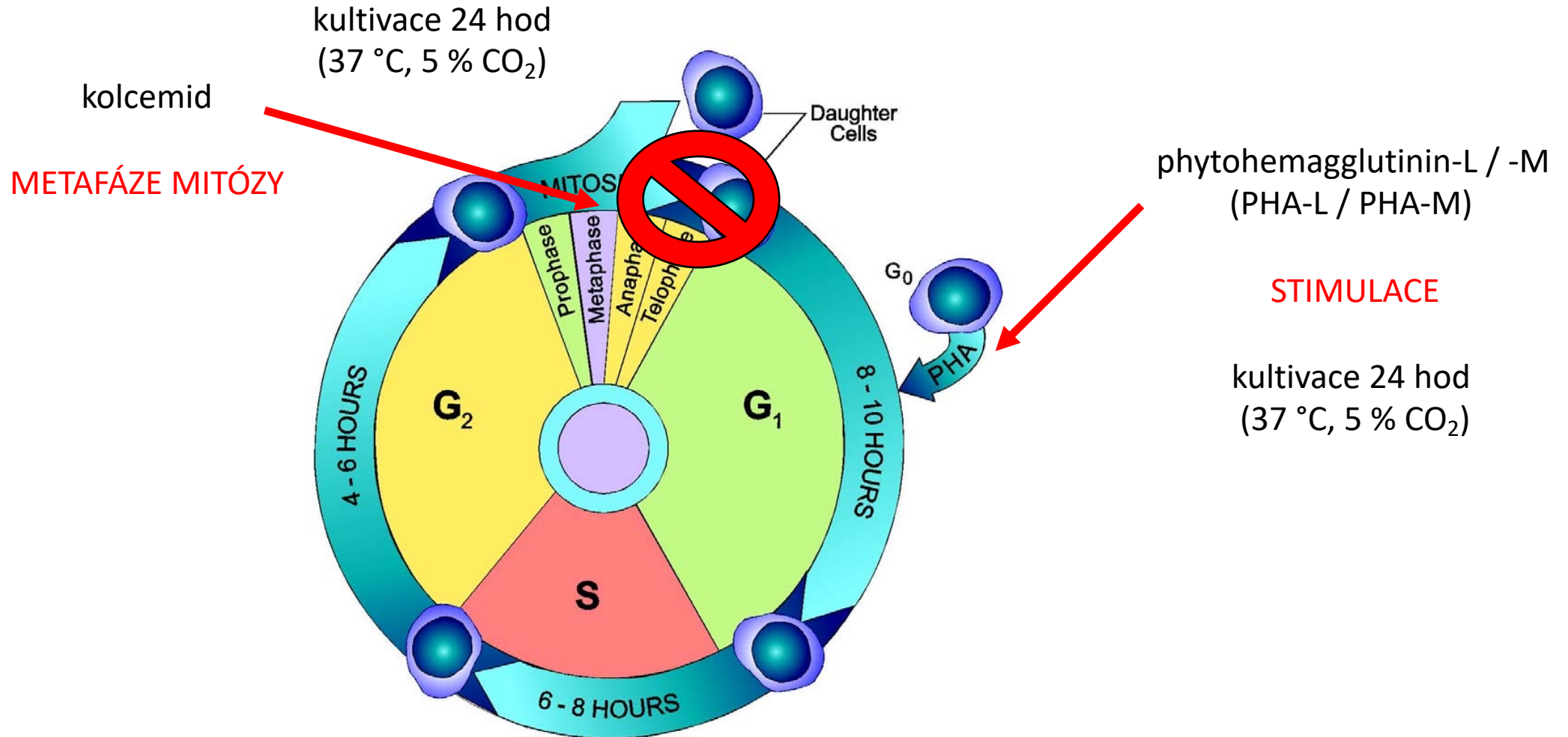
Analýza dicentrických chromosomů

- 2 DSB / 2 chromosomy
 - Nesprávná fúze
 - Dicentrický chromosom
 - Acentrický fragment
-
- Specifické pro IR





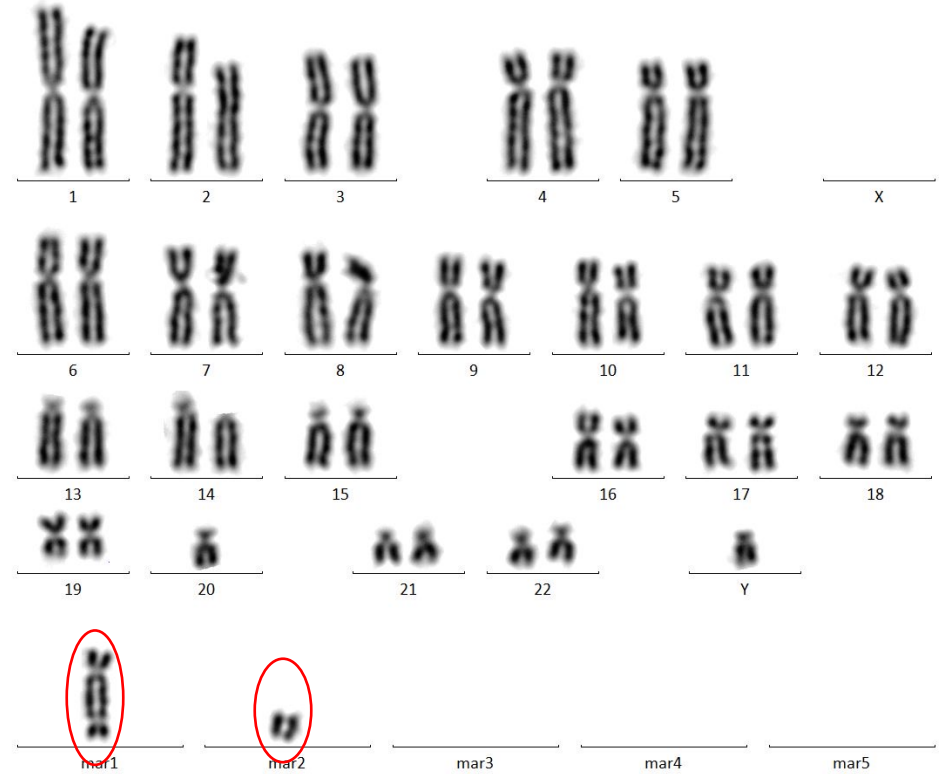
Analýza dicentrických chromosomů



DNA

replikace

Analýza dicentrických chromosomů



dic

ace

DNA

replikace

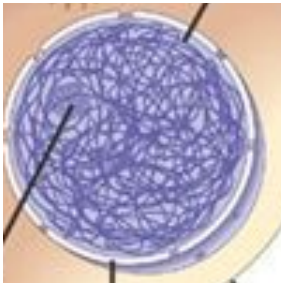
Předčasná chromosomová kondenzace - PCC

(premature chromosome condensation)

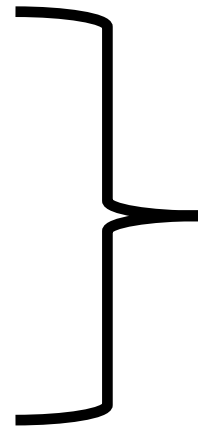
Fůzně-indukovaná

Chemicky-indukovaná

T-lymfocyt

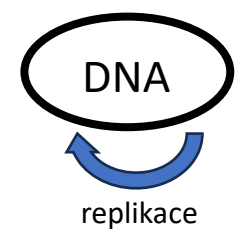


Buňka v metafázi



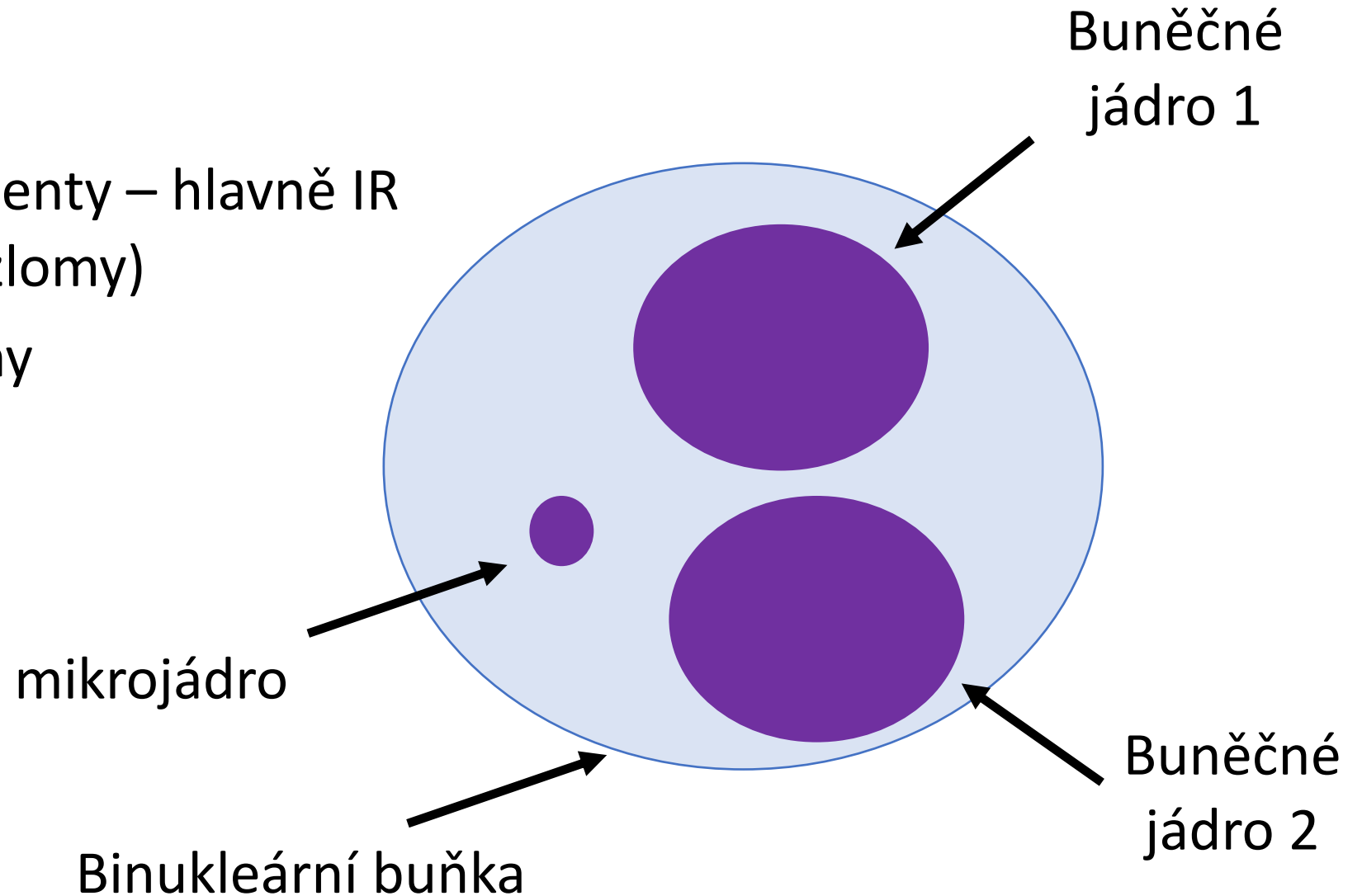
Okadaová kyselina
Calyculin A

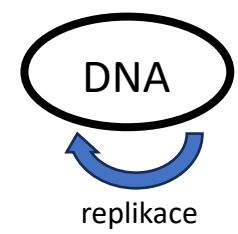
(inhibitory fosfatas)



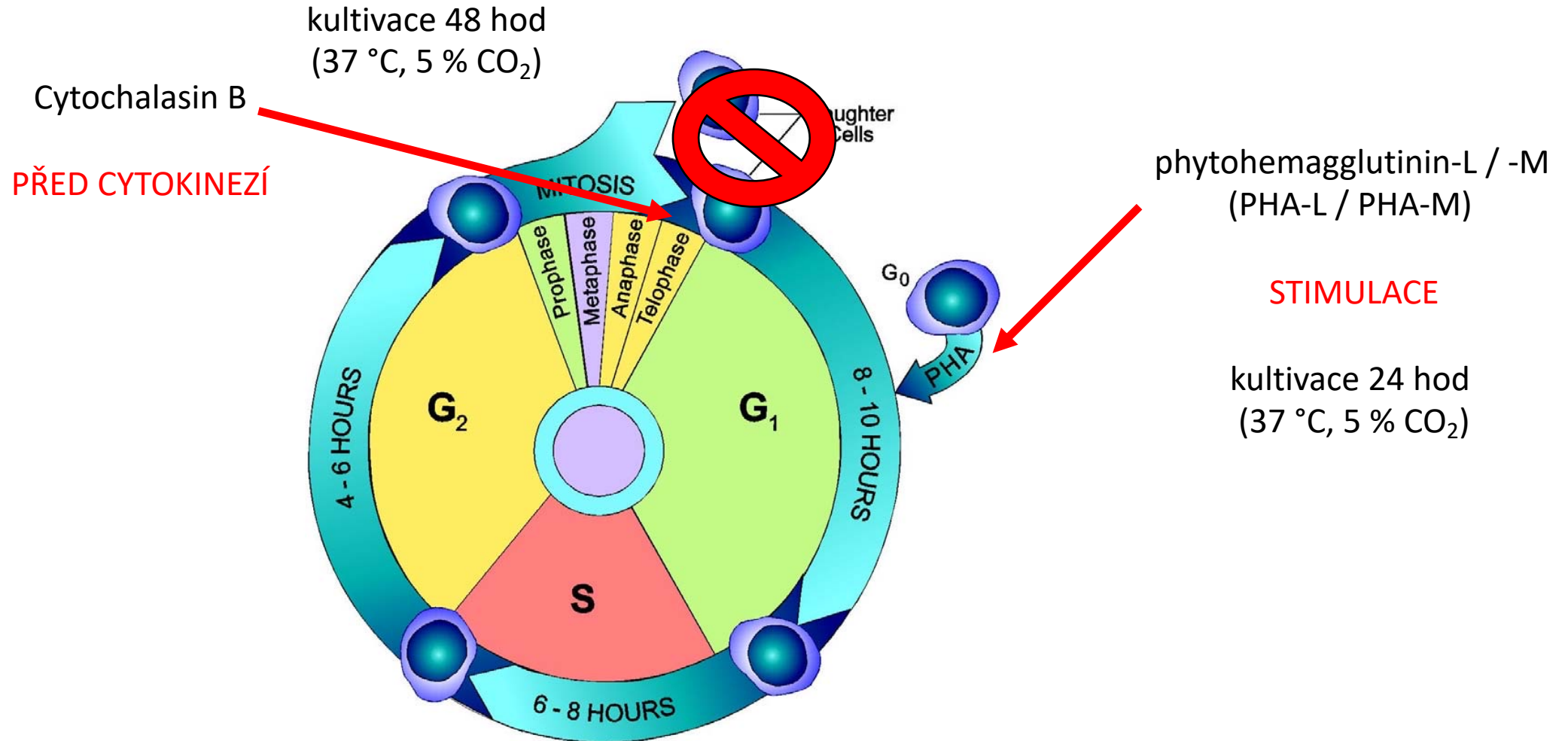
Analýza mikrojaderní

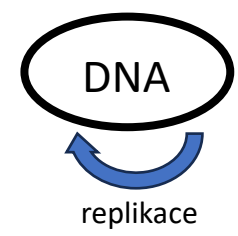
- DSB:
 - Acentrické fragmenty – hlavně IR (Chromosomové zlomy)
- “Volné” chromosomy
- Nespecifické pro IR



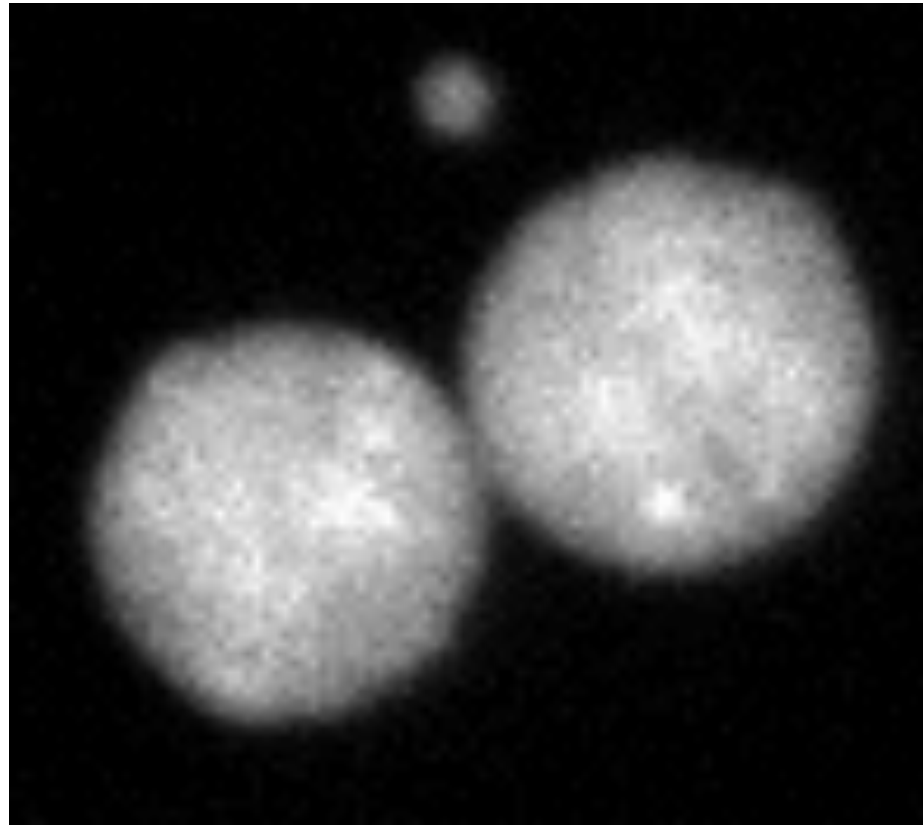


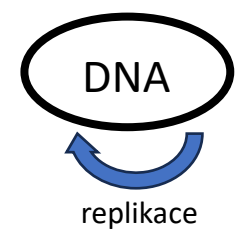
Analýza mikrojadern





Analýza mikrojader





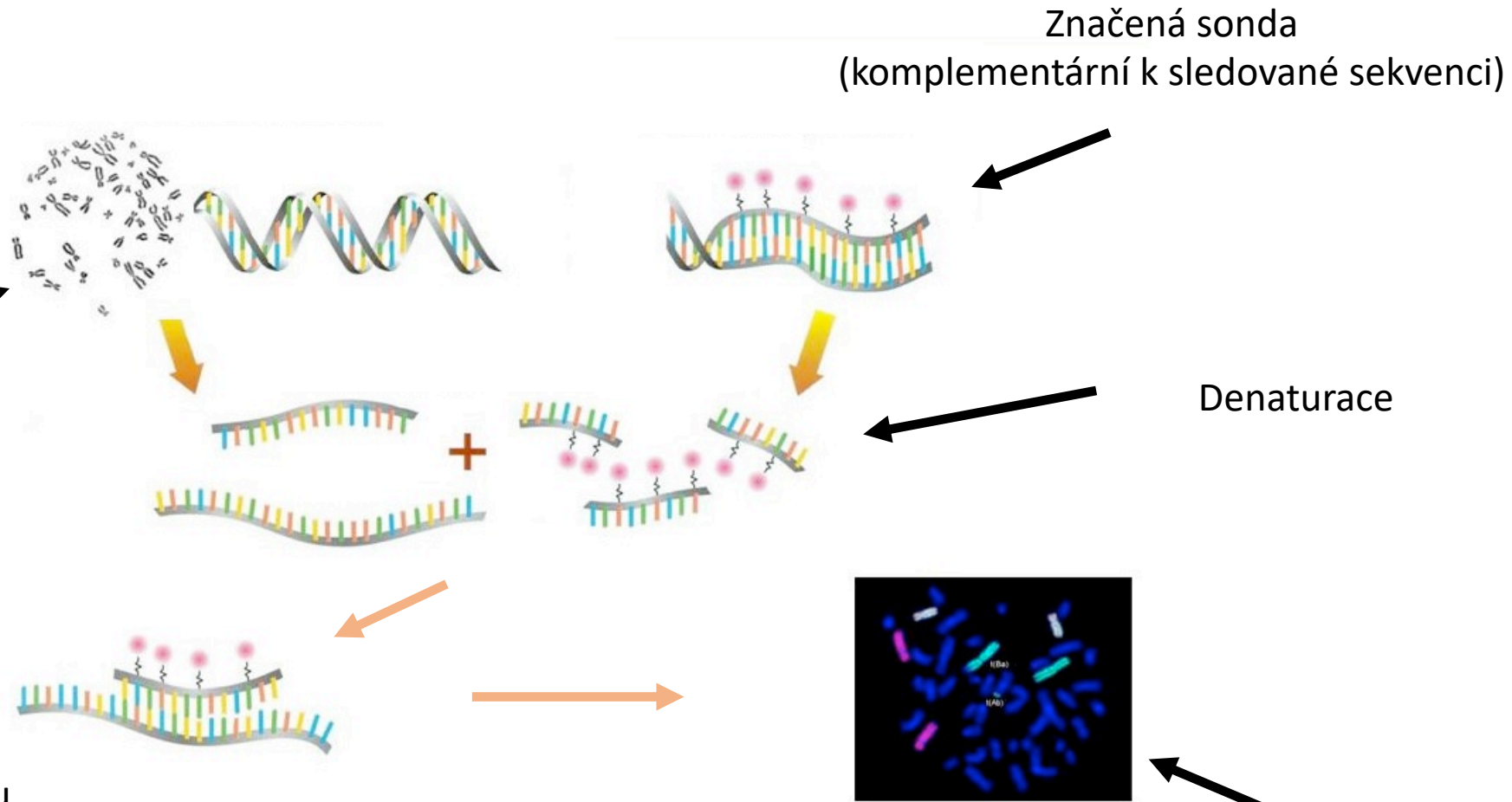
Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

- Translokace
- (Dicentrické chromosomy)
- (Acentrické fragmenty)

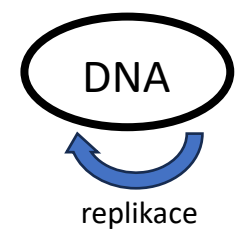


Buňka v metafázi mitózy
(příprava analogická analýze
dicentrických chromosomů)

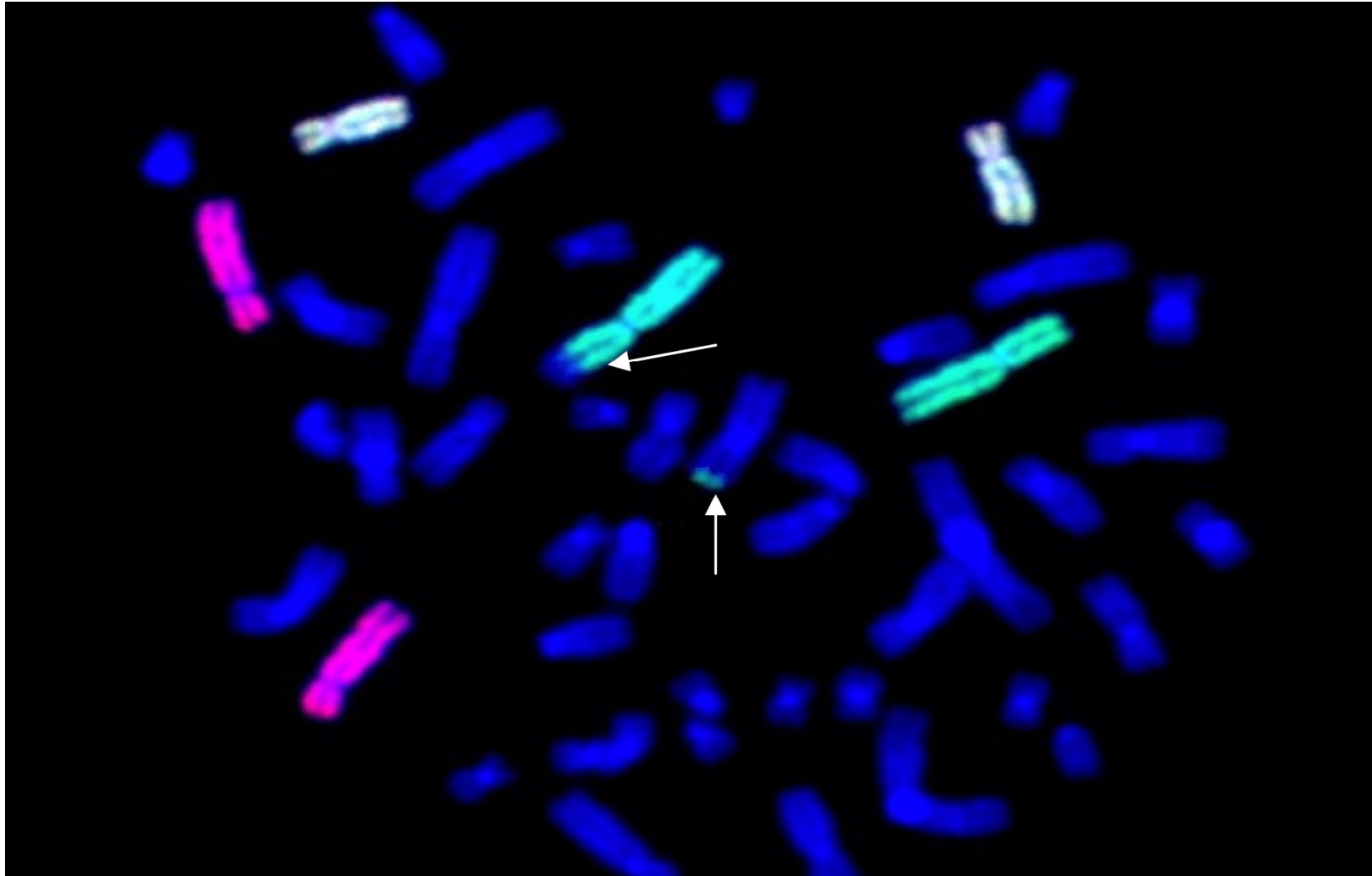
Hybridizace DNA se značenou sondou



Fluorescenční vizualizace



FISH - translokace



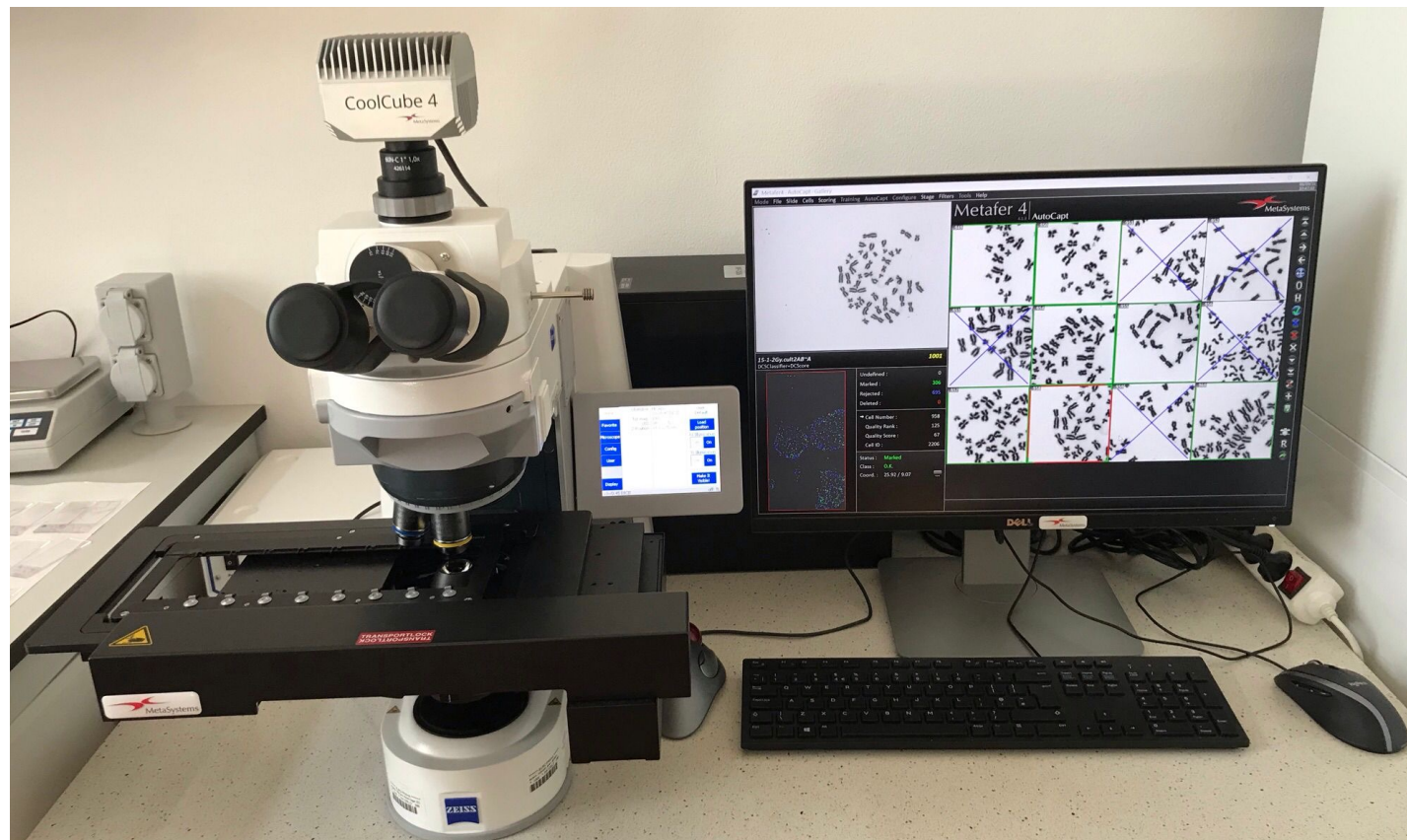
DNA

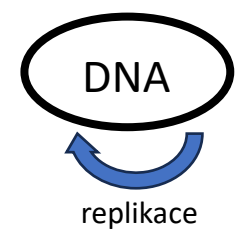


replikace

Automatizace mikroskopických metod

- Automatický skenovací mikroskopický systém Metafer





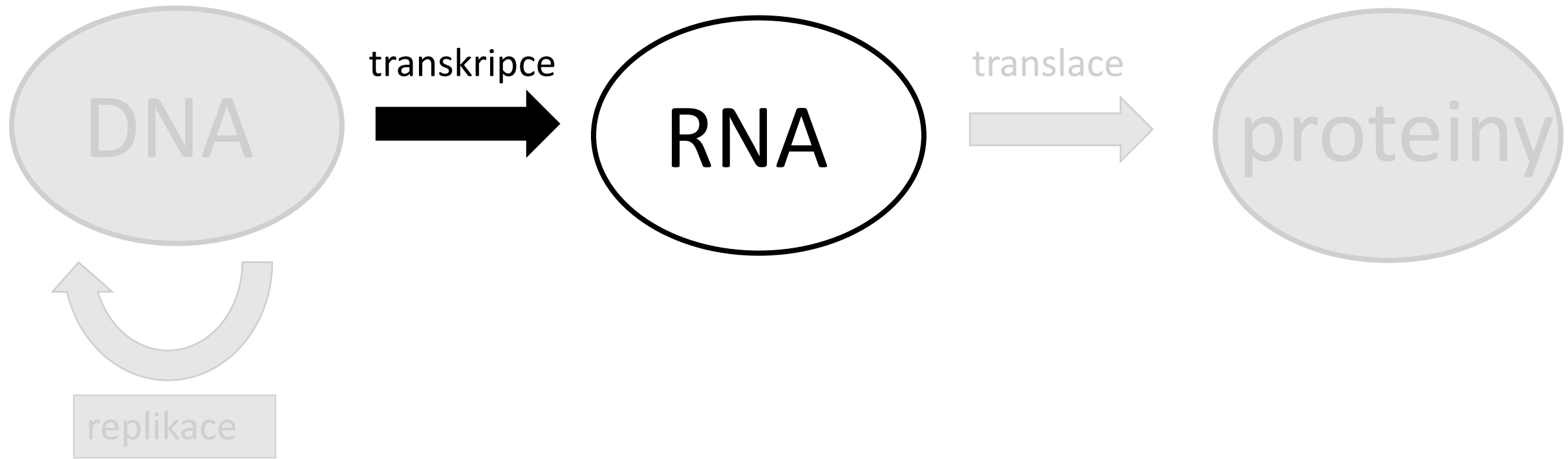
Somatické mutace

- Mutace v genu pro glykoforin A (prekurzory erytrocytů)
- Mutace v genu pro hypoxantin-guanin fosforibosyltransferasu (T-lymfocyty)
- Nutná optimalizace

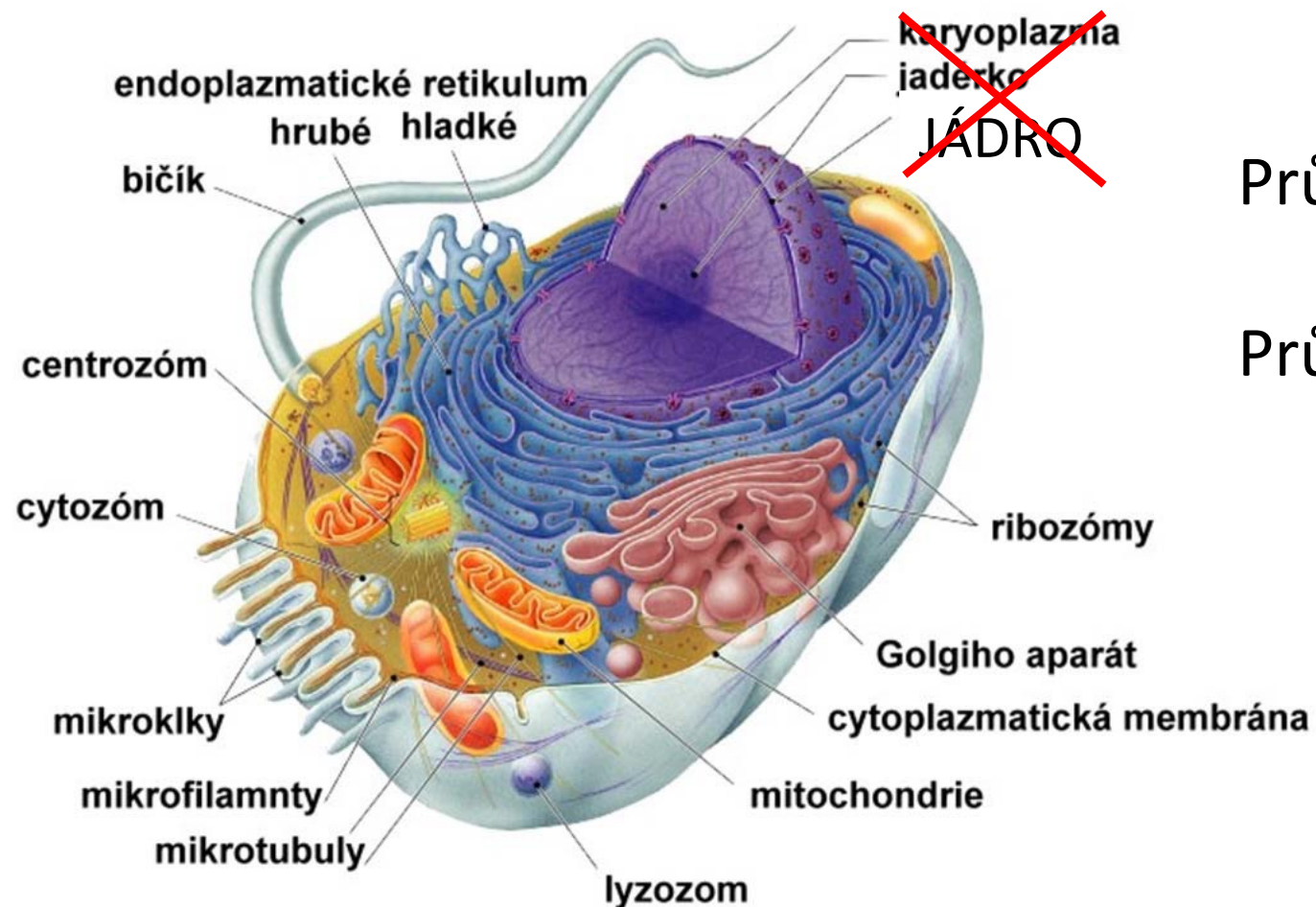
- Další inovativní přístupy?

Metody biologické retrospektivní dozimetrie

Centrální dogma molekulární biologie:



Stavba eukaryotické buňky

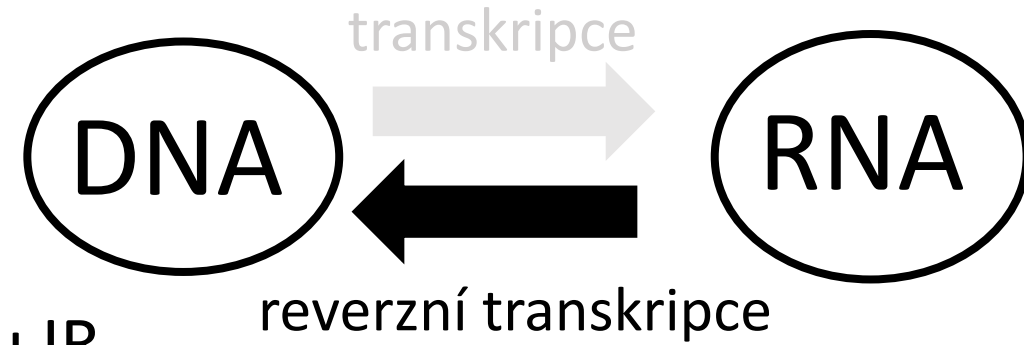


Průměr lidské buňky $\approx 20 \mu\text{m}$

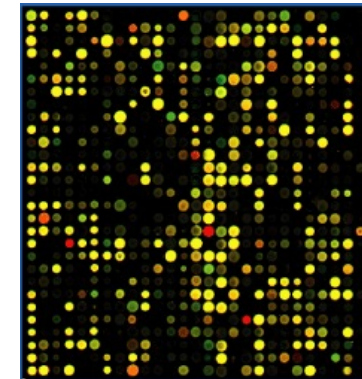
Průměr jádra $\approx 10 \mu\text{m}$



Genová exprese

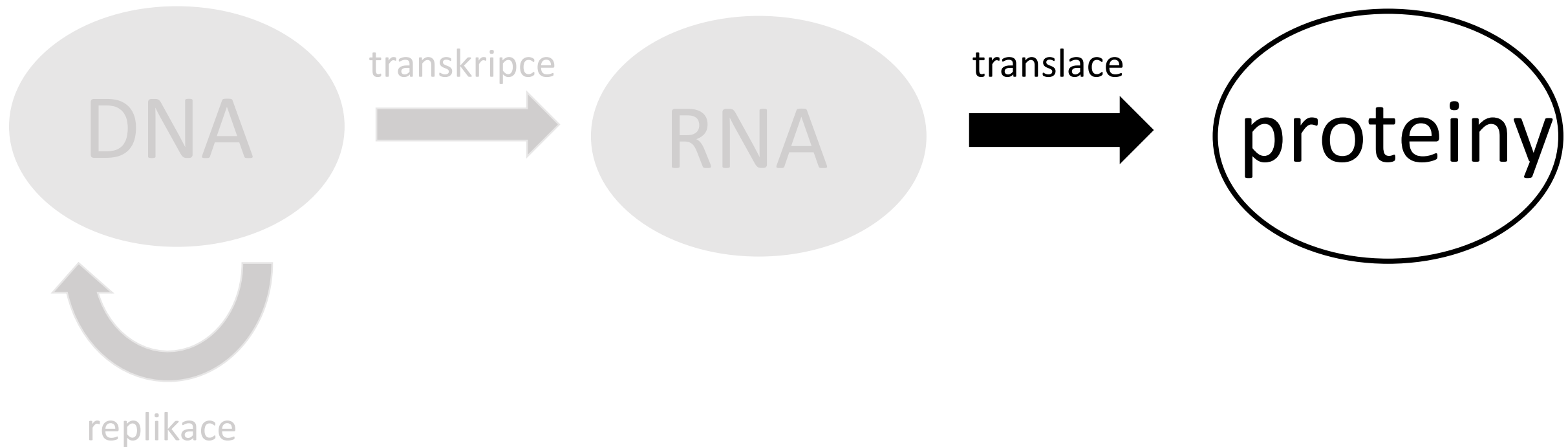


- Modulace exprese vybraných genů v důsledku IR
- Kvantifikace molekul RNA o specifické sekvenci
- Identifikace nových RNA markerů – DNA čipy
- Kvantifikace omezeného setu RNA – kvantitativní PCR (qPCR)
- *DDB2, FDXR, TRAF4, TRIAP1...* - indukce prostřednictvím IR, další markery?



Metody biologické retrospektivní dozimetrie

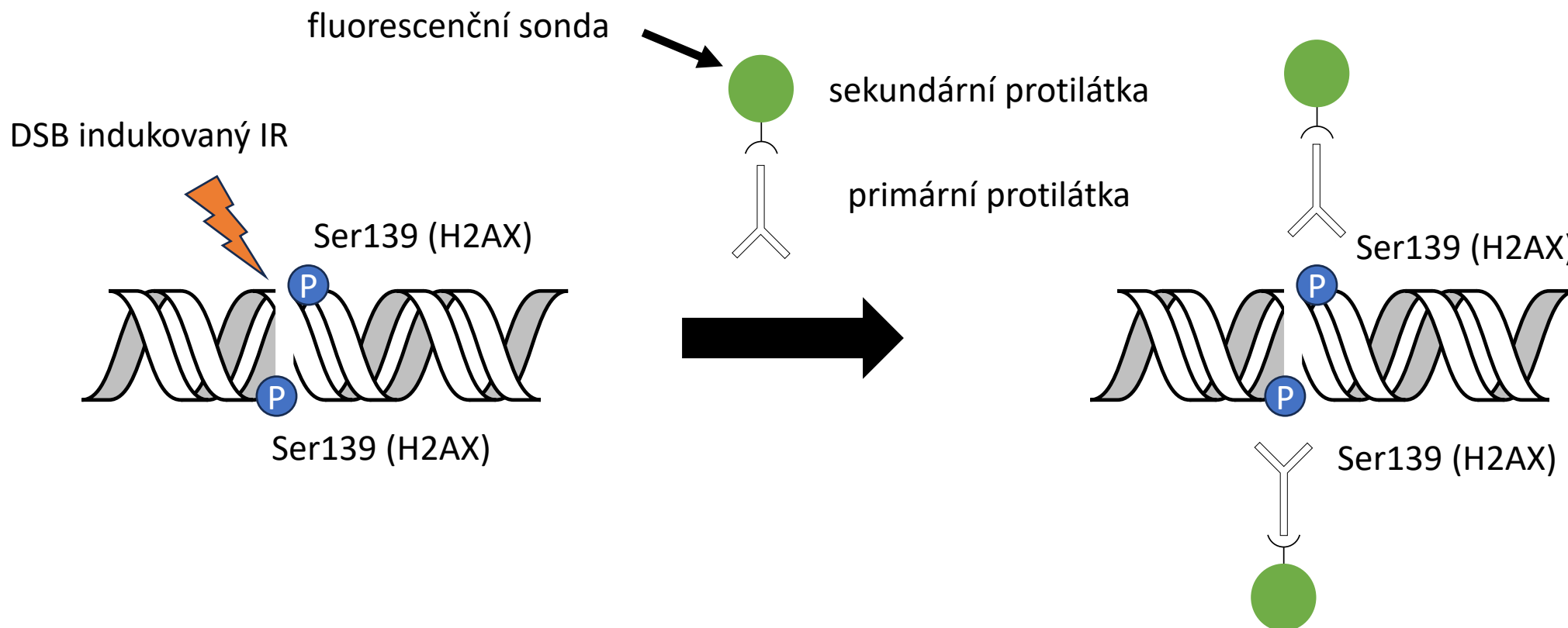
Centrální dogma molekulární biologie:



translace
→ proteiny

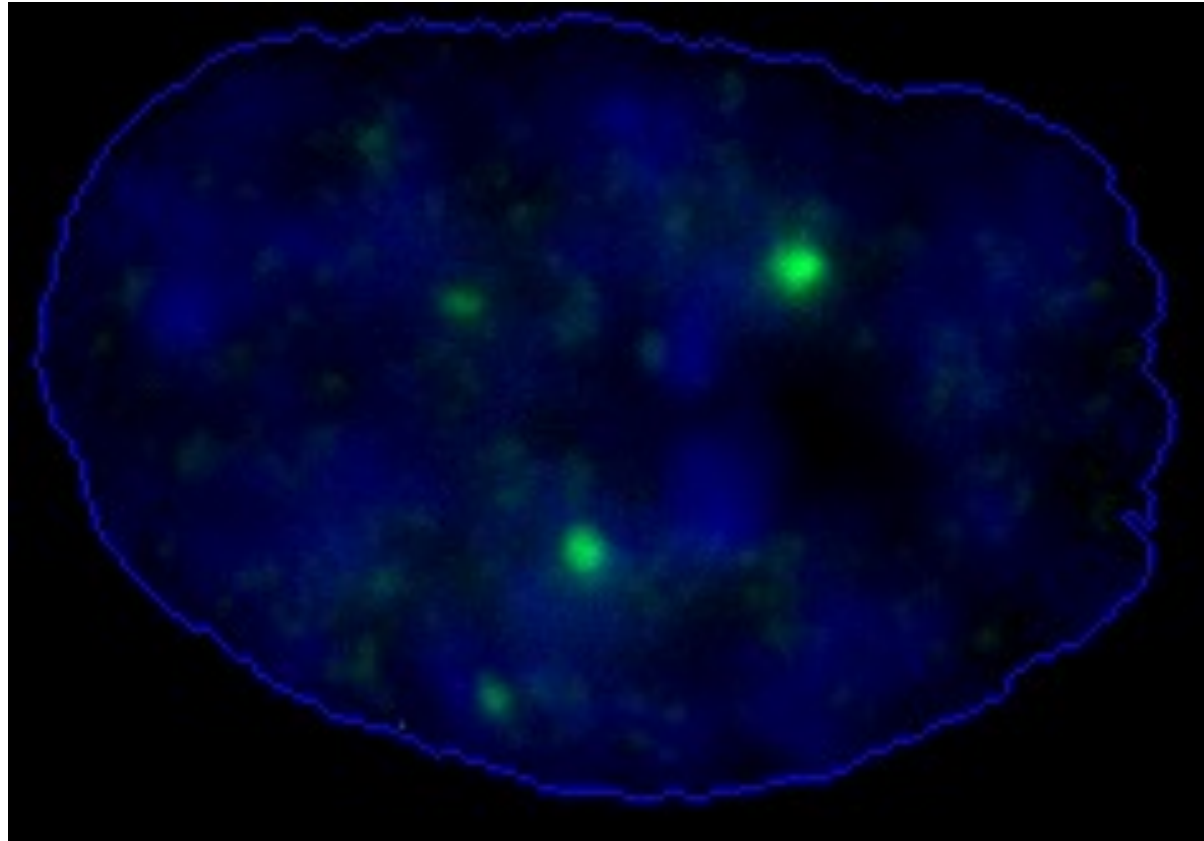
Fosforylovaná forma histonu H2AX (γ H2AX)

- Fosforylace histonového proteinu H2AX na Ser139 v důsledku DSB
- Detekce prostřednictvím protilátek + fluorescenční mikroskopie



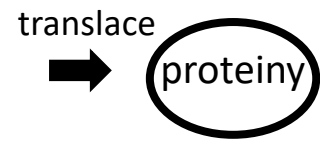
translace
→ proteiny

Fosforylovaná forma histonu H2AX (γ H2AX)



Proteinové markery

- C-reaktivní protein (CRP) – zánětlivé procesy, nespecifický vůči IR
- Amylasy – slinné žlázy, nespecifické vůči IR
- Ferredoxinreduktasa (FDXR) – oxidoreduktasa, přenos elektronů
- p53 – transkripční faktor, nespecifický vůči IR



Proteinové markery

- Kvantitativní stanovení - proteomika
 - Koncentrace v plazmě / buňkách
 - Hmotnostní spektrometrie
- Modulace aktivity, posttranslační modifikace, strukturní změny?...
 - Nutno provést další výzkum

Další přístupy

- Metabolomika – hmotnostní spektrometrie, HPLC...
- Hematologické parametry – krevní obraz
- Kombinace více nespecifických, ale rychlých metod?

Metody biologické retrospektivní dozimetrie

	DCA	PCC	MN	FISH	γ H2AX
Typ zkoumaných aberací	ac, dic, (k)	ac, dic, k, (t)	mikrojádra	(ac, dic, k,) t	DSB
Expozice	Akutní	Akutní	Akutní	Akutní / chronická (t)	Akutní
Detekční rozsah	0,1 – 5 Gy	0,2 – 20 Gy	0,3 – 4 Gy	0,25 - 4 Gy	0,01 – 4 Gy
Doba analýzy	> 48 hod.	> 2 hod.	> 72 hod.	> 72 hod.	> 24 hod.
Specifičnost vůči IR	✓	✓	✗	✗	✓
Nehomogenní ozáření	✓	✓	✗	✗	✓
Použitelnost pro triáž	✓	✓	✓	✗	✓
Stabilita signálu	měsíce	měsíce	měsíce	roky (t)	≈ 24 hod.
Náročnost analýzy	střední	vysoká	nízká	vysoká	střední
Standardizace	ISO 19238 ISO 21243	✗	ISO 17099	ISO 20046	✗

ac (acentrický fragment), DCA (analýza dicentrických chromosomů), dic (dicentrický chromosom), DSB (dvojný zlom DNA), FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace), k (chromosomový kruh), MN (analýza mikrojader), t (translokace), γ H2AX (fosforylovaná forma histonu H2AX)



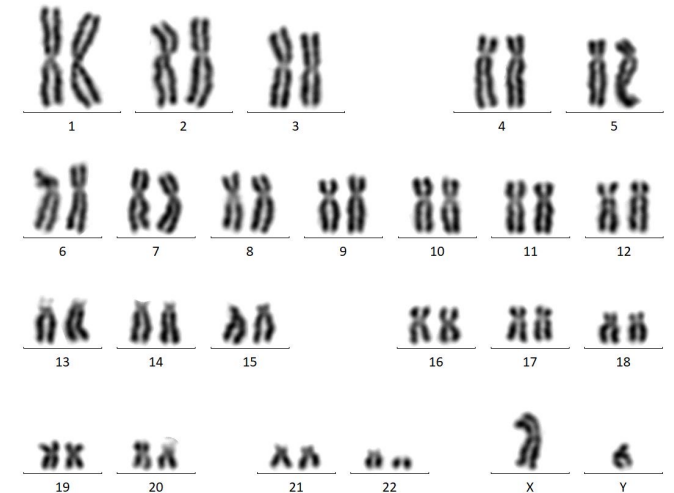
Hledáme dobrovolníky




- Pro účely implementace metod biologické retrospektivní dozimetrie hledáme dobrovolné dárce krve
- Odběr 1-3 x 10 ml žilní krve
- Kontakt:

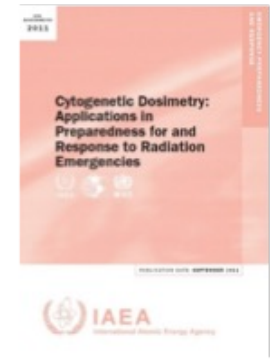
Jakub Vávra

jakub.vavra@suro.cz



- Odběry probíhají po domluvě na adrese: Jabloňová 8, Praha 10 
- Možnost zaslání individuálního karyogramu či grafických výstupů

Reference I



- IAEA 2011. *Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies*.
- ISO 19238:2014. *Radiation protection - Performance criteria for service laboratories performing biological dosimetry by cytogenetics*.
- ISO 21243:2022. *Radiation protection - Performance criteria for laboratories performing cytogenetic triage for assessment of mass casualties in radiological or nuclear emergencies - General principles and application to dicentric assay*.
- ISO 17099:2014. *Radiological protection — Performance criteria for laboratories using the cytokinesis block micronucleus (CBMN) assay in peripheral blood lymphocytes for biological dosimetry*.
- ISO 20046:2019. *Radiological protection — Performance criteria for laboratories using Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) translocation assay for assessment of exposure to ionizing radiation*.
- Lehninger AL, et al. 2013. *Lehninger principles of biochemistry*.
- Rodwell V, et al. 2018. *Harper's Illustrated Biochemistry*.

Reference II

- Oestreicher U, *et al.* 2017. *Int. J. Radiat. Biol.*: 20-29.
- Ainsbury EA, *et al.* 2011. *Radiat. Prot. Dosimetry.*: 573-592.
- Romm H, *et al.* 2009. *Ann. Ist. Super. Sanita.*: 251-259.
- Rothkamm K, *et al.* 2013. *Radiat. Res.*: 111-119.
- Vral A, *et al.* 2011. *Mutagenesis.*: 11-17.
- Edwards AA, *et al.* 2005. *Radiat. Prot. Dosimetry.*: 396-402.
- Rothkamm K, *et al.* 2013. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*: 170-173.
- Vandevoorde C, *et al.* 2015. *Int. J. Radiat. Biol.*: 653-663.
- Kabacik S, *et al.* 2010. *Int. J. Radiat. Biol.*: 1-15.
- Li W, *et al.* 2022. *Life.*: 99.
- Cavalcanti MB, *et al.* 2015. *An. Acad. Bras. Cienc.*: 1783-1790.
- Lee Y, *et al.* 2018. *Sci. Rep.*: 13557.
- ...