

SUGÁRVÉDELEM

**Eötvös Loránd Fizikai Társulat
Sugárvédelmi Szakcsoportjának
On-line Folyóirata
<https://www.elftsv.hu/svonline>**

**XI. Évfolyam 1. szám
2018**

BUDAPEST

HU ISSN 2060-2391

Kiadó: az Eötvös Loránd Fizikai Társulat Sugárvédelmi Szakcsoport

Kiadásért felelős: Bujtás Tibor, a Szakcsoport elnöke

Főszerkesztő, a Szerkesztőbizottság elnöke: Vincze Árpád

Szerkesztő: Pesznyák Csilla

A szerkesztőbizottság tagjai:

Csige István,

C. Szabó István,

Déri Zsolt,

Elek Richárd,

Fehér Ákos

Katona Tünde,

Pesznyák Csilla,

Petrányi János,

Rónaky József

A szerkesztőség elérhetősége:

Levelezési cím: 1539 Budapest, PF. 676.

e-mail: avincze67@gmail.com

HU ISSN 2060-2391

A CITOGENETIKAI DOZIMETRIA SZEREPE A SUGÁRVÉDELEMBEN

Farkas Gyöngyi^{*1}, Kocsis S. Zsuzsa¹, Székely Gábor¹, Mihály Dalma¹, Pesznyák Csilla^{1, 2}, Major Tibor¹, Polgár Csaba^{1,3}, Jurányi Zsolt¹

¹Országos Onkológiai Intézet, 1122 Budapest, Ráth György u.7-9.

²Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, 1111 Budapest, Műegyetem rkp. 3.

³Semmelweis Orvostudományi Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Onkológiai Tanszék, 1122 Budapest, Ráth György u. 7-9.

*farkas.gyongyi@oncol.hu

A kézirat beérkezett: 2018.05.04..

Közlésre elfogadva: 2018.06.17.

Cytogenetic dosimetry in case of radiological emergency. In radiation accidents it is very important to determine the dose exposition to the individuals. Biological dosimetry has an important role in the investigations and it can provide useful information on cytogenetic effect of different therapeutical modalities as well. In our work peripheral blood lymphocytes were irradiated in vitro with a Varian TrueBeam linear accelerator and chromosomal aberrations were analysed. Dose response relationships for the number of dicentrics induced with a photon source were fitted by the linear-quadratic model. CABAS software (Chromosomal Aberration Calculation Software) was used to calculate the curves. In the case of any accidental exposition the most appropriate dose curve should be considered.

Keywords- biological dosimetry, dicentric and ring chromosomes, linear-quadratic model

Sugárbalet esetén nagyon fontos meghatározni a balesetet szenvedett személy expozíciós dózisát. A biológiai dozimetriának fontos szerepe van a vizsgálatokban és hasznos információt nyújt az eltérő terápiás kezelések citogenetikai hatásának összehasonlításához is. Munkánkban perifériás vér limfocitákat sugaraztunk be in vitro Varian TrueBeam lineáris gyorsítóval és a kromoszóma aberrációkat analizáltuk. A fonsugárzás hatására képződött dicentrikus kromoszómák számának dózis-hatás összefüggését vizsgáltuk a lineáris-kvadrátikus modell alkalmazásával. CABAS szoftvert (Chromosomal Aberration Calculation Software) alkalmaztunk a görbék elkészítéséhez. Baleseti expozíció esetén az adott körülménynek legmegfelelőbb görbét kell alkalmaznunk.

Kulcsszavak – biológiai dozimetria, dicentrikus és ring kromoszómák, lineáris-kvadrátikus modell

BEVEZETÉS

A biológiai dozimetria a sugárzás okozta károsodásokat mutatja ki az emberi szervezetben és segítségével a sugárterápia okozta korai vagy késői mellékhatások is becsülhetők. A biodozimetrián belül a citogenetikai módszereknek fontos szerepük van a fizikai dózismérés eredményének megerősítésében. Gyakran a citogenetikai analízis az egyetlen mérési módszer az abszorbeált (elnyelt) dózis becslésére, ha fizikai dózismérő nem áll rendelkezésre. A humán perifériás vér limfociták kromoszóma aberrációs tesztjét baleseti expozíció kimutatására először 1962-ben használták [1]. Azóta számos baleset esetén alkalmazták dózisbecslésre pl. a csernobili (Ukrajna), a goiâni (Brazília) és a tokaimurai (Japán) katasztrófáknál, de foglalkozási túlexpozíciók gyanúja esetén is. A becsült dózis jól korrelált

az akut sugárzási szindróma súlyosságával. A sugárbaesetek megerősítették a citogenetikai dozimetria létjogosultságát a sugárexpozíció korai kimutatásában, ennek hatására több ország létesített biológiai dozimetriai laboratóriumot. A Nemzetközi Atomenergiái Ügynökség ajánlásával a módszert standardizálták és rutinszerűen használják [2, 3]. A citogenetikai károsodások mérése alkalmas a sugárterápia mellékhatásainak becslésére is.

A citogenetikai biodozimetriában alkalmazott különböző módszerek a limfociták DNS-ét ért hatások kimutatásán alapulnak, pl. korai kromoszóma kondenzáció (premature chromosome condensation (PCC) assay), dicentrikus és ring kromoszóma teszt, transzlokációs teszt, mikronukleusz teszt, Comet-assay. Vizsgálatunkban a legismertebb és leggyakrabban használt módszerrel, a dicentrikus és ring kromoszómák kimutatásával foglalkoztunk. A limfociták a véráramban keringve és a nyirokutakba bejutva a szervezet valamennyi szervével kapcsolatba kerülnek, így általuk a behatolási kaputól függetlenül bárhol észlelhető a sugárexpozíció, a limfociták ezáltal egésztest expozíciót reprezentálnak. A vér cirkuláló limfocitáinak két fő típusa van, a T és a B limfociták. A T limfociták mitogénnel pl. phytohemagglutininrel osztódásra készíthetők. A limfociták indukálását követő első osztódási ciklus metafázisában leállítva az osztódást jól láthatók az ionizáló sugárzás hatására kialakult DNS elváltozások kromoszóma aberrációk formájában. Savage [4] írta le és osztályozta az indukált kromoszómális elváltozások közti kapcsolatokat. A dicentrikus és ring alakú kromoszómák specifikusak az ionizáló sugárzásra és mennyiségük arányos a sugárzás dózisával. Kis LET értékű sugárzás esetén a dózishatás görbe lineáris-kvadratikussá; nagy LET értékű sugárzás esetén a kapcsolat lineáris. Az exponált személy vér limfociták dicentrikus kromoszóma számából lehet következtetni az abszorbeált dózissra, ha a kapott értéket megfelelő kalibrációs görbéhez viszonyítjuk. A dicentrikus assay-t a biodozimetria "gold standard" módszerének tartják az alacsony háttér szintje (1 dicentrikus kromoszóma 1000 sejtben), a nagy érzékenysége (küszöb dózis 0,05 Gy), a nem jelentős egyedi különbségek miatt, valamint hogy parciális besugárzás becslésére is alkalmas.

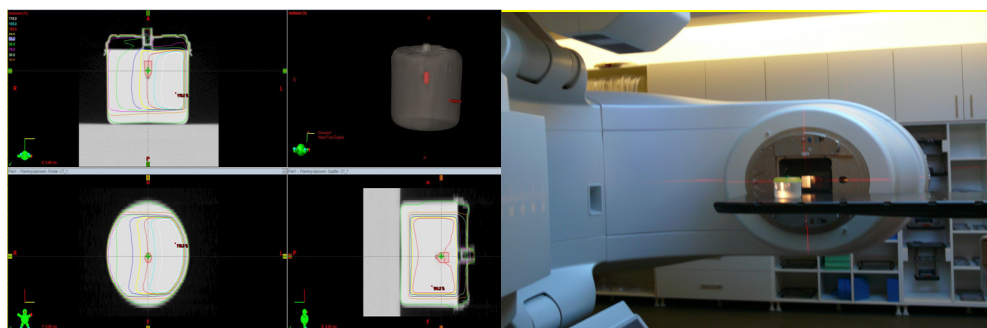
Hazánkban a hagyományos Cobalt-60 (1,25 MeV) besugárzó készülékeket ma már felváltották a sokkal korszerűbb lineáris gyorsítók (6-18 MV). A különböző laboratóriumok kalibrációs görbéi között eltérések lehetnek, ezért javasolják, hogy minden laboratórium saját kalibrációs görbével rendelkezzen [5, 2, 6]. Jelen munkában in vitro kalibrációs görbét vettünk fel dicentrikus kromoszóma assay segítségével 6 MV lineáris gyorsítón. A kapott adatokból CABAS program segítségével lineáris-kvadratikussá görbét illesztettünk és számoltuk a görbe lineáris és kvadratikussá koefficienseit. A program alkalmas arra, hogy lineáris gyorsítón történő baleset esetén, az exponált személy kromoszóma aberrációjából megbecsüljük a kapott dózist, az azonos készüléken, korábban felvett in vitro dózis-hatás görbék ismeretében. Eredményeinket összehasonlítottuk az irodalmi adatokkal.

ANYAG ÉS MÓDSZER

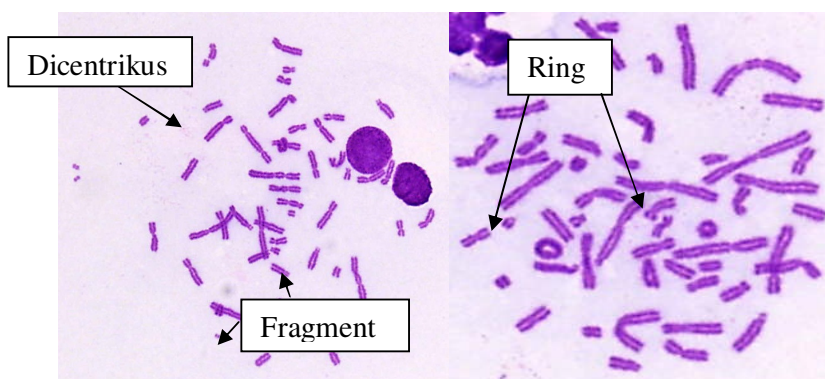
Limfocita tenyésztés és metafázisos kenetkészítés: három egészséges, nem dohányzó önkéntes személytől (két nő, egy férfi, életkor: $43,6 \pm 3,4$ év) Li-heparinnal alvadésgátolt perifériás vénás vért vettünk és azt besugaraztunk lineáris gyorsítón. A vért 2 ml-ként kriocsőbe mértük ki. A homogén dóziseloszlás érdekében a kriocsövet vízzel telt műanyag fantomba helyezve végeztük a besugarazást. A besugárzás-tervezés után (Varian Eclipse program, 1. ábra) - a sugármező izocentrumában szobahőmérsékleten történt, 8x8 cm-es mezőmérettel, 600 MU/min 6 MV FFF (Flattening filter free) fotonsugárzással, 0,5-től 8 Gy tartományban Varian TrueBeam besugárzókészülékkel. A kromoszómaanalízis első osztódásban lévő perifériás vér limfocita kultúrákból származó sejteken történt: 0,8 mL vért adtunk 9 ml RPMI-1640 (Gibco) tápvelőhöz, amit kiegészítettünk 15% borjúsavóval és penicillin/streptomycinnel (0,5 ml/L). A limfocitákat phytohaemagglutinin M kezeléssel

készítettük osztódásra (0,2 mL, Gibco). Az inkubálás 50–52 óráig 37 °C-on történt. Az osztódási ciklus befejeződése előtt 2 órával colcemiddel (0,2 ml/L Gibco) blokkoltuk a sejteket. Az inkubáció után centrifugáltuk és 0,075 M KCl-el 15 percig 37 °C-on hypotonizáltuk, majd hideg metanol-ecetsav keverékével 4-5-ször fixáltuk a lymphocytaikat. A metafázisos sejtosztódásokat tárgylemezre cseppentettük és 3% Giemsa oldattal festettük meg. A limfocitatenyészetekből a kromoszómák preparálása az IPCS ajánlások alapján történt [7-8]. Személyenként és dózispontonként minimum 200 metafázist értékeltünk, 1500-szoros fénymikroszkópos nagyítás mellett. A szerkezeti aberrációk közül a következő aberráció típusokat különítettük el: kromatid -(deléció, exchange), kromoszóma típusú aberrációk (dicentrikus és ring kromoszómák (2. ábra) és a hozzájuk tartozó fragment, kromoszómatörés, ill. transzlokáció), valamint összes aberráció.

A mért értékekre lineáris-kvadratikus modellfüggvényt illesztettünk. CABAS 2.0 programot használtunk a dózisgörbék felvételéhez és meghatároztuk az α és β értéket [9].



1. ábra. A besugárzás terve és beállítás a besugarázáshoz



2. ábra. Dicentrikus és ring kromoszómaaberrációk

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

A dózis növelésével mindegyik típusú aberráció értéke nőtt, a kromatid törések száma a dózissal lineárisan és csak kis mértékben, míg a kromoszóma típusú aberrációk száma: a dicentrikus és ring kromoszómák, kromoszóma fragmentek, transzlokációk valamint az összes aberrációk száma négyzetesen növekedett. Kísérletünkben a kis dózisosknál (≤ 1 Gy) az acentrikus kromoszóma fragmentek (nem tévesztendő össze a dicentrikus kromoszóma mellett keletkező fragmenttel) és a kromatid törések, míg >2 Gy-nél a fragmentek mellett a dicentrikus kromoszómák domináltak (1. táblázat). A transzlokációk száma körülbelül egy

nagyságrenddel alacsonyabb volt, mint a dicentrikusok és ringek száma. Bár a kromoszóma törések száma is négyzetes növekedést mutat a besugárzás hatására, – ellentétben a dicentrikus és ring kromoszómákkal – nem csak sugárzás, hanem vegyi expozíció hatására is képződnek kromoszómatörések, ezért nem tekintjük sugárzás specifikus biomarkernek.

1. táblázat: Perifériás vér limfociták kromoszómaaberrációi lineáris gyorsítón történő fotonbesugárzást követően (Varian TrueBeam 600 MU/min, 6 MV FFF módban 8x8 cm mezőméret, 3 kísérlet átlaga)

Dózis Gy	Kromoszómaaberrációk $\pm$ SE /100 sejt				
	Kromatid törés	Kromoszóma fragment	Dicentrikus és ring kromoszómák	Transzlokáció	Összes aberráció
0	1,50 $\pm$ 0,70	0,66 $\pm$ 0,66	1,00 $\pm$ 0,57	0	3,16 $\pm$ 1,69
0,5	2,00 $\pm$ 0,44	2,00 $\pm$ 0,95	1,60 $\pm$ 0,60	0	5,80 $\pm$ 1,77
1	2,33 $\pm$ 1,33	4,66 $\pm$ 0,88	6,00 $\pm$ 2,00	0,66 $\pm$ 0,33	13,66 $\pm$ 3,28
2	4,20 $\pm$ 1,16	13,40 $\pm$ 2,48	14,00 $\pm$ 3,86	1,80 $\pm$ 0,91	33,40 $\pm$ 5,87
3	6,66 $\pm$ 4,25	19,33 $\pm$ 4,97	31,00 $\pm$ 4,36	3,33 $\pm$ 0,66	63,33 $\pm$ 5,36
6	5,25 $\pm$ 1,75	70,50 $\pm$ 8,88	152,25 $\pm$ 12,01	11,5 $\pm$ 4,13	247,00 $\pm$ 16,41
8	4,00 $\pm$ 1,73	163,66 $\pm$ 34,50	272,75 $\pm$ 6,21	19,00 $\pm$ 6,15	469,00 $\pm$ 27,53

A limfocitákban lévő dicentrikus kromoszómák eloszlását a 2. táblázat mutatja. Ahhoz hogy egyszerű variancia analízist alkalmazhassunk, a mért pontok populációjának normál eloszlásúnak kell lennie. A szórást Papworth U tesztjével számolva az U értékének -1,96 és +1,96 között kell elhelyezkedni.

2. táblázat: Perifériás vér limfociták dicentrikus és ring kromoszóma-aberrációinak megoszlása lineáris gyorsítón történő fotonbesugárzást követően (Varian TrueBeam 600 MU/min, 6 MV FFF módban 8x8 cm mezőméret), σ : variancia, y : átlag, 1 kísérlet)

Dózis Gy	Vizsg. sejtszám	Dic +R átl/ sejt	Dic+ R össz.	Dicentrikus és ring kromoszómák megoszlása										σ2/y	U érték
				0	1	2	3	4	5	6	7	8			
0	100	0,01	1	99	1	0	0	0	0	0	0	0	-0,91	-0,1	
0,5	200	0,02	4	196	4	0	0	0	0	0	0	0	-0,64	-0,28	
1	200	0,08	15	186	13	1	0	0	0	0	0	0	0,02	1,38	
2	200	0,18	36	168	28	4	0	0	0	0	0	0	1,03	0,60	
3	200	0,35	69	141	50	8	1	0	0	0	0	0	2,03	-0,38	
6	200	1,63	326	47	58	44	30	16	4	1	0	0	3,40	-0,78	
8	200	2,67	534	30	21	44	37	31	18	10	1	1	4,32	0,40	

A táblázatból látható, hogy ennek a feltételnek megfeleltek a kapott értékek, így alkalmazhattuk az összehasonlító statisztikát. A CABAS programot használtuk a dóziszgörbék felvételéhez (3. ábra). Ez a program az internetről letölthető ingyenes program, a Nemzetközi Atomenergiai Ügynökség ajánlásával. Az így kapott görbe esetén meghatároztuk az α és β értékeket. 600 MU/min 6 MV esetén: $\alpha=0,004 \text{ Gy}^{-1}$, $\beta=0,044 \text{ Gy}^{-2}$.

A lineáris-kvadratikuss modell egyenlete:

$$Y=c + \alpha \times D + \beta \times D^2$$

ahol Y = a dicentrikus és ring kromoszómaaberrációk száma/sejt, D a sugárzás dózisa Gray-ben, c a háttér érték, α a lineáris, β a kvadratikus együttható. A 2. táblázatból számolt görbe egyenlete: $Y=0,11+0,004D+0,044D^2$. A kapott értékeket összehasonlítottuk más kutatók röntgen- és gamma-sugárzásokkal kapcsolatos vizsgálati eredményeivel. Érdemes dóziszgörbét készíteni a különböző energiájú sugárzásokra külön gamma- és külön röntgensugárzásra, hogy minden baleset esetén minél jobban közelítsük az expozíciós körülményt. Röntgen, ill. Co-60 gamma-sugárzásnál eltér a görbék meredeksége, a röntgen meredekebb, mint a Co-60 gamma, mivel különböző a LET értékük. A röntgen hatásosabban indukálja a dicentrikus kromoszómaszámot, mint a Co-60 gamma-sugárzása. Általában az energia csökkenésével az α -érték kisebb lesz (csökken). Az α -érték LET függő, míg β -érték a dózisteljesítménytől függ. Tehát, ha csökkentjük a dózisteljesítményt a lineáris komponens kezd dominálni [10]. A koefficiensek kis értéke megtévesztő, mert egy darab sejtre vonatkoztatott értékekről van szó. A háttér érték jelenti a spontán (besugarazás nélkül) előforduló dicentrikus és ring kromoszómák számát. Ha nem találunk a besugarazatlan vérmintában dicentrikus kromoszómát, ajánlott az elméleti értékkel számolni (1 dicentrikus előfordulás 1000 sejtben), így nem adódhat a biológiaiilag értelmetlen negatív együttható [11].

A kalibrációs görbék paramétereire különböző tényezők lehetnek hatással pl. a limfocita donorok, a tenyésztés körülményei közötti különbségek, lemez preparálási és az értékelési különbségek. Már taglaltuk a sugárzás típusának, az alkalmazott dózisteljesítménynek, ill. a fotonenergia hatását a kromoszómaaberrációk képződésére. Ezért is fontos a különböző típusú készülékekre, illetve minden laborra saját kalibrációs görbéknek a felvétele. Fontos az alkalmazott dózistartomány megadása is a görbék összehasonlíthatósága szempontjából, mivel ugyanannak a görbének különbözőek az együtthatói, ha pl. 0–3, 0–6, 0–8 Gy közötti értékekkel számolunk. Érdemes minél szélesebb tartományt vizsgálni, mert ha egy kisebb tartományban rendelkezünk dóziszgörbével, az extrapolálás nagyobb értékre a biológiai dózis alulbecslését jelenti [12]. Azonban 8 Gy fölött ennél a módszernél már technikai problémáink adódhatnak, a limfociták lassú osztódása, a rossz minőségű metafázisok, a nehezen értékelhető nagyszámú és összetett aberráció miatt.

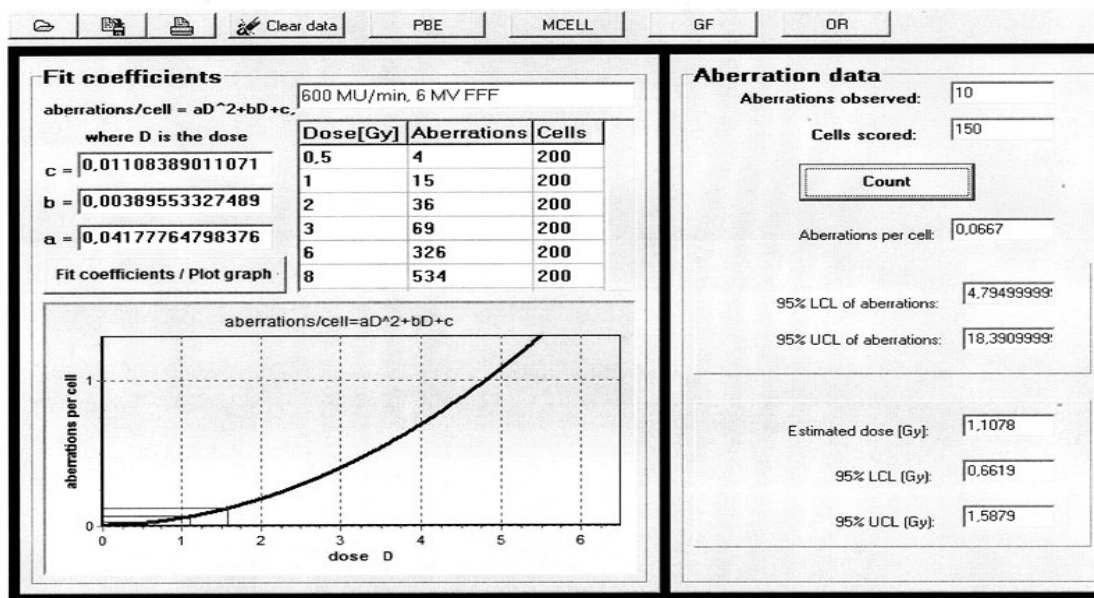
A CABAS program alkalmas arra is, hogy baleset esetén az exponált személy limfocitáinak kromoszómaaberrációiból a kalibrációs görbe segítségével becsüljük az elszennvedett dózist. (Példa a 3. ábrán.) Abban az esetben, ha parciális (részleges) besugárzás történt, a vér egy részében a dicentrikusok száma Poisson eloszlást mutat. Viszont a vérnek abban a részében, ami nem kapott expozíciót nincs aberráns kromoszóma. Ebben az esetben a kontaminált Poisson modellt, ill. programot lehet alkalmazni (Ctam Poiss program) [13] vagy Sasaki Qdr módszerével [14] az IAEA leírása szerinti képletekkel becsülhetjük a kapott dózist.

A kontaminált Poisson módszer a következő képletet alkalmazza [15]:

$$y/(1-e^{-y}) = x/(N-n_0)$$

ahol y = a dicentrikus kromoszómák átlaga a besugarazott mintában, e^{-y} Poisson valószínűsége azoknak a sejteknek a besugarazott mintában, amelyekben nincs dicentrikus kromoszóma, x a dicentrikusok száma, N a vizsgált sejtek száma, n_0 a dicentrikust nem tartalmazó sejtek száma.

Sürgős esetben először 20 metafázis értékelendő, amennyiben a dicentrikusok száma 4, vagy a fölött van, a becsült dózis ≥ 2 Gy (az alsó konfidencia határ 0,85 Gy). Ebben az esetben még 50 metafázist szükséges értékelni, hogy eldönthetővé váljon a dicentrikusok eloszlásának homogenitása. A továbbiakban kalibrációs görbe, ill. kockázatbecslési táblázat segítségével becsülik a kapott dózist. Azonban ha kevés sejtet értékelünk, alulbecsülhetjük az expozíciós



3. ábra, A dicentrikus és ring kromoszómák dóziszgörbéje (CABAS program)

dózist kis LET értékű, kis dózisu sugárzás esetén, ill. ha a test kis részét érte a sugárzás, ezért lehetőség szerint 500 metafázist értékeljünk. A biológiai dozimetria döntő fontosságú lehet vélelmezett expozíció esetén is. A következőkben példának egy megtörtént esetet ismertetünk. Egy fizikai doziméterrel rendelkező sugárterápiás asszisztens, aki a besugárzástervezésen dolgozott az egyik kórházban, időnként besegített a sugárterápiás munkába. A dózismérőt csak azokon a napokon viselte, más napokon a vezérlő helyiség egyik fiókjában tárolta. Gépcserék miatt, miután a helyiséget ki kellett üríteni, a fiók doziméterével együtt az egyik gyorsító kezelő helyiségébe került, ahol – minden bizonnyal fékezési röntgensugárzás érte. A TL-dózismérője 670 mSv-et mutatott. Az asszisztentstől vért vettünk és kromoszómavizsgálatot végeztünk. Háromszáz sejtben egy dicentrikus kromoszómát találtunk és az összes aberrációk száma sem volt magasabb 5%-nál (amit negatív értéknek tekintünk). Citogenetikai vizsgálatunkkal (amivel megerősíthetjük vagy kizárhatjuk az expozíció tényét) jelen esetben kimutattuk, hogy nem történt a dolgozót érintő valós expozíció. Ennek következtében eltekinthettek a dolgozó klinikai megfigyelésétől (sugárbetegség nem fog kialakulni), illetve nem kellett őt eltiltani a foglalkozása gyakorlásától.

KÖVETKEZTETÉSEK

Sugárbaeset esetén nagyon fontos, hogy becsülni tudjuk a balesetet szenvedett személy által kapott biológiai dózist, hogy támpontot nyújtsunk a kezelést végző orvosnak. Vélelmezett expozíció esetén, ha nulla a vizsgált személy dicentrikus és ring kromoszóma száma 200-500 sejtben, megnyugodhatunk, hogy nem történt expozíció. A kapott dóziszgörbét nemcsak sugárbaeset esetén lehet felhasználni dózisbecslésre, hanem a terápiás kezelésben is figyelembe vehetjük a kapott eredményeket. Az általában használt 2 Gy dózisfrakció kromoszómákra gyakorolt hatása különböző energiáknál és dózisirátáknál közel azonos. Azonban ha nagyobb frakciódózisokat használunk (6–8 Gy), nagyobb aberrációs különbségeket találtunk az alkalmazott modalitások között, azaz nagyobb szerepet játszanak a besugárzási különbségek. Ezek az adatok pl. hypofrakcionált kezelésnél lehetnek jelentősek. A módszer alkalmas arra is, hogy genetikai sugárérzékenység gyanúja esetén a beteg véré-

besugarazva 3 és 6 Gy-jel és a kapott kromoszómaaberrációkat a dózisgörbével összehasonlítva megállapítsuk az illető beteg sugárérzékenységét. Utóbbi esetben, például a csontvelőtranszplantációhoz más előkezelést kell választani.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők ezúton is szeretnék megköszönni Vass Nagyezsda és Kiss Krisztina munkáját a kromoszómaaberrációk értékelésében.

IRODALOM

- [1] Bender MA, Gooch PC. Somatic chromosome aberrations induced by human whole-body irradiation: the “Recuplex” criticality accident. *Radiat Res.* 1966;29: 568–582. Bender MA, Gooch PC.
- [2] International Atomic Energy Agency. *Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment: A Manual*. Vienna, Austria: IAEA; 2001.
- [3] International Standardization Organisation. Radiation protection-Performance criteria for laboratories performing cytogenetic triage for assessment of mass casualties in radiological emergencies-General principles. Geneva: ISO Office; 2008. ISO 21243.
- [4] Savage JRK. Annotation: Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J Med Genet* 13 (1976) 103-122.
- [5] Lloyd D C, Edwards A A and Prosser J S. Chromosome aberrations induced in human lymphocytes in vitro acute X and gamma radiation. *Radiat Prot Dosim* 15:83-88. 1986.
- [6] IAEA-International Atomic Energy Agency Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies, EPR Biodosimetry, Vienna. 2011.
- [7] Carrano AV, Natarajan AT. International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res* 204:379–406, 1988.
- [8] Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International programme on chemical safety. *Mutat Res* 463:72 111, 2000.
- [9] Deperas J, Szluinska M, Deperas-Kaminska M, Edwards A, Lloyd D, Lindholm C. et al. CABAS: a freely available PC program for fitting calibration curves in chromosome aberration dosimetry. *Radiat. Prot. Dosimetry* 2007;124:115-123.
- [10] Bauchinger M. Microdosimetric aspects of the induction of chromosome aberrations. In: Ishihara T and Sasaki MS (Editors), *Radiation induced chromosome damage in man*. New York: Alan R. Liss, Inc.:1983.
- [11] HPA-RPD-011 Szluinska M, Edwards A A and Lloyd D C. 2005.
- [12] Vinnikov VA, Ainsbury E A, Maznyk NA, Lloyd D C and Rothkamm K. Limitations associated with analysis of cytogenetic data for biological dosimetry, a review. *Radiat Res* 2010;174, 403-414.
- [13] Dolphin G W. Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods. IAEA, Vienna, Vol. Handling of Radiation Accidents, 215-224. 1969.
- [14] Sasaki MS and Miyata H. Biological dosimetry in atomic bomb survivors. *Nature*, Vol. 1968; 220, No. 5173, pp. 1189-1193.
- [15] [15] Lloyd DC, Edwards AA, Natarajan AT and Darroud F. Biological dosimetry applied to in-vitro stimulated partial body irradiation. Treatment and biological dosimetry of exposed persons, post-Chernobyl action. 1991. 50-80, Luxembourg.

A pályamű a SOMOS Alapítvány támogatásával készült

SZEMÉLYI FELÜLETI SZENNYEZETTSÉG ELLENŐRZŐ SUGÁRKAPU REKONSTRUKCIÓ A PAKSI ATOMERŐMŰBEN

Makovecz Gyula*, Bujtás Tibor és Kiss Mihály
MVM Paksi Atomerőmű Zrt., 7031 Paks, Pf. 71

*makoveczgyp@npp.hu

A kézirat beérkezett: 2018.05.15

Közlésre elfogadva: 2018.07.11.

Reconstruction of the whole body surface contamination monitors in Paks NPP

The reconstruction of the whole body surface contamination monitors at the Paks Nuclear Power Plant finished in April 2017. 19 MAB type whole body surface contamination monitors have been replaced by 24 ARGOS whole body surface contamination monitors. Small Items Monitors have been installed at the entrances of changing rooms. Documentation Contamination Monitors have been placed at the border of the radiation controlled and the supervised area. In the article will be shown the advantages of the new whole body contamination monitors, the transfer in their places, putting the equipment into operation, the communication with the Radiation Monitoring System and the operational experience.

Keywords: ARGOS whole body contamination monitor, Documentation, Contamination Monitor, Small Items Monitor.

2017 áprilisában fejeződött be a személyi felületi szennyezettség ellenőrző sugárkapuk rekonstrukciója a Paksi Atomerőműben. A 19 darab MAB típusú sugárkapu helyén 24 darab ARGOS típusú egy-, illetve kétlépéses sugárkapu lett szolgálatba állítva. A rekonstrukció keretében a fekete öltözők bejárataihoz kiseszköz ellenőrző kamrák kerültek elhelyezésre. Az ellenőrzött zóna és a felügyelt terület közötti iratforgalmazást mappa monitorok segítik. A cikk bemutatja az új sugárkapuk előnyeit, helyszínre történő telepítésüket és beüzemelésüket, a továbbított információk megjelenítését a Sugárvédelmi Ellenőrző Rendszerben, valamint az eddigi üzemeltetési tapasztalatokat.

Kulcsszavak: ARGOS sugárkapu, mappa monitor, eszköz ellenőrző karma.

A REKONSTRUKCIÓ SZÜKSÉGESSÉGÉNEK OKAI

A Paksi Atomerőműben 1993-ban lettek rendszerbe állítva a MAB GKM 600 típusú személyi felületi szennyezettség ellenőrző sugárkapuk (a továbbiakban sugárkapuk). Az eltelt huszonnégy év alatt a detektorok érzékenysége csökkenése, a méréstechnika fejlődése és az az elvárás, hogy a sugárvédelem nagyobb hatékonysággal és biztonsággal tudja ellátni a feladatát, indokoltá tette ezeknek a sugárkapuknak a cseréjét.

A sugárkapu rekonstrukció indokoltságának okai:

- Az éves hitelesítés/kalibrálás során a Paksi Atomerőmű Metrológiai Üzemének szakemberi már a 2000-es évek közepén észlelték a proporcionális detektorok előregedését. A detektorok érzékenysége egy-egy sugárkapu átlagában 0,2–7,6%-ot csökkent a MATEC Kft. 2008-as vizsgálata szerint. A detektorok 13%-nál az érzékenység romlása meghaladta a 10%-ot. A vizsgálat óta pedig újabb tíz esztendő telt el [1].
- Az ilyen típusú proporcionális detektorok már nem beszerezhetőek, a gyártó beszüntette a gyártásukat, így cseréjük nem lehetséges.
- Tartalék alkatrész hiányában hosszú távon a javításuk sem volt megoldott.

AZ ÚJ SUGÁRKAPUK KIVÁLASZTÁSA

Az új személyi felületi szennyezettség ellenőrző sugárkapuk kiválasztásánál szempont volt, hogy csak béta-sugárzók detektálására legyenek mindenképpen alkalmasak, alfa- és gamma-sugárzók elsődleges detektálásának az igénye nem merült fel. Méréstechnikai oldalról követelményként fogalmazódott meg a nagyobb érzékenység, kisebb mérési távolság és az alacsonyabb kimutatási határ.

Az alfa-sugárzók közvetlen detektálása azért nem merült fel igényként, mert a hosszú távú mérési programok (helyiségmérések és technológiai mérések) eredményei alapján nem indokolt a munkavállalók folyamatos detektálása alfa-szennyezettségre. A Paksi Atomerőmű rendelkezik két darab MAB HFM 2100AB típusú, ruhadetektorral ellátott kéz-láb monitorral, amelyek, amennyiben szükséges, lokálisan kitelepíthetők. Ahogyan például a 2003-as üzemzavarhoz kapcsolódó munkáknál – legutóbb 2015-ben, az alfa-sugárzó izotóppal szennyezett hulladékok végleges tárolásra történő előkészítésekor – minden esetben megtörtént. Az alfa-sugárzók folyamatos detektálása esetén továbbra is szükség lett volna öblítő gáz alkalmazására.

A gamma-sugárzók közvetlen detektálása egy gyors adatot szolgáltatott volna belső sugárterhelésre. A Paksi Atomerőmű belső sugárterhelésre vonatkozó behívási rendszere megfelelő, a kockázatos csoportban lévő személyek ellenőrzése gyakoribb. Azoknál a munkavállalóknál pedig, akiknél felmerül az inkorporáció gyanúja, azonnali, soron kívüli ellenőrzés történik. Mindezeket figyelembe a gamma-sugárzók közvetlen detektálásának az igénye elvetésre került. A végül megvásárolt ARGOS-5PB, kétlépéses sugárkapuknál egyébként rendelkezésre álltak az úgynevezett Zeus gamma-detektorok. Ezeket a béta-sugárzókat kimutató plastik szcintillációs detektorok mögött helyezték volna el. A test ellenőrzését három nagyméretű, a fej ellenőrzését egy kisméretű gamma-sugárzókat detektáló plastik szcintillációs detektor végezte volna [2].

Az alkalmazandó detektortípusnál a plastik szcintillációs detektorokra esett a választás. Ennek a típusnak a beszerzési ára magasabb, mint a gázátöblítéses proporcionális számlálóké, de az üzemeltetési költségük alacsonyabb. A plastik szcintillációs detektorokhoz ugyanis nincs szükség öblítő gázra. A gázöblítés mennyisége normál üzemben 5-8 l/h volt. Az öblítéshez használt gázkeverék: 82% argon, 18% szén-dioxid. Az öblítő gáz szükségtelenségével egy plusz hibaforrás is kizárásra került és jelentős éves költségmegtakarítást sikerült elérni [3].

A beruházás összege miatt közbeszerzés keretében valósult meg a rekonstrukció, több gyártó jelentkezett. Az új eszközöknek rendelkezniük kellett érvényes típusvizsgálattal és első hitelesítéssel. Mindezeket összegezve a végleges döntéskor a Canberra ARGOS-5PB, kétlépéses és az ARGOS-1PB, egylépéses sugárkapu került kiválasztásra. A kétlépéses sugárkapu abban különbözik az egylépésestől, hogy előbbiben először szemből, majd megfordulás után háttal is történik mérés, elérve így a 360°-os ellenőrzést.

A rekonstrukció keretében megvalósítani tervezett kiegészítő eszközök: eszköz ellenőrző kamrák és mappa monitorok kiválasztása hasonló elvek mentén történt.

A SUGÁRKAPUK TELEPÍTÉSÉNEK ÉS ÜZEMBE HELYEZÉSÉNEK LÉPÉSEI

A hosszas előkészítést követően két ütemben történt meg a sugárkapuk cseréje:

- 2016.09.30 – 2016.12.31., 12 sugárkapu üzembe helyezése.
- 2017.01.01 – 2017.04.20., 12 sugárkapu és a kiegészítő eszközök üzembe helyezése.

Hat darab egylépéses ARGOS-1PB sugárkapu lett elhelyezve a főépületi kijáratokhoz. Az öltözők bejárataihoz kilenc darab kétlépéses, fix fejdetektoros ARGOS-5PB sugárkapu lett telepítve, öt kis, négy nagy eszközmonitorral. Az öltözők kijáratainál pedig kilenc darab kétlépéses, mozgó fejdetektoros ARGOS-5PB sugárkapu lett üzembe helyezve.



1. ábra. ARGOS-5PB kétlépéses sugárkapu

Az előkészítés magába foglalta a sugárkapuk pontos típusának és számának kiválasztását, a gyártónál történő helyszíni ellenőrzést és a sugárkapuk üzem közbeni működésének megtekintését.

A korábbi MAB GKM 600 és az új ARGOS-5PB típusú sugárkapuk paramétereinek összehasonlítása az 1. táblázatban látható. Az alsó kimutatási határ és a detektorok összes felülete az a két adat, amely méréstechnikai szempontból a legfontosabb.

1. táblázat. Az öltöző bejáratú MAB és ARGOS típusú sugárkapuk adatai [2, 3]

Adat	MAB GKM 600	ARGOS-5PB
Magasság [mm]	2320	2284
Mélység [mm]	1000	1132
Szélesség [mm]	980	1043
A detektorok típusa	gázátöblítéses proporcionális számláló	plasztik szcintillációs detektor
A detektorok száma [db]	19	25
testfelületnél [db]	12	18
cipő [db]	2	3
fej [db]	1	1
kéz [db]	4	3
A kézdetektorok felülete [cm ²]	280	579
A testdetektorok felülete [cm ²]	950	579
A detektorok összfelülete [cm ²]	15 370	14 475 (28 950)*
A mozgásérzékelő szenzorok száma [db]	7	7
Alsó kimutatási határ [Bq/cm ²]	0,2	0,1

*- a kétlépéses technológia 28 950 cm² mérési felületet jelent.

A felhasználási környezet függvényében, az alábbi nuklidokra került meghatározásra a detektorok hatásfoka a típusvizsgálat során. A hatásfok meghatározása 10x10 cm felületű sugárforrással, 0,5 mm vastag finomhálósával történt. A detektorokon 1,2 mg/cm²-es Al-bevonatú fólia volt. Az értékeket a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat. Az ARGOS-5PB típusú sugárkapuk detektorainak hatásfoka [4]

Radionuklid	Kontakt 4 π hatásfok [%]
¹³⁷ Cs	21,3
⁶⁰ Co	14,9
³⁶ Cl	21,6
¹⁴ C	4,6
⁹⁰ Sr(+ ⁹⁰ Y)	28,7

Az új sugárkapuk működési helyükre történő szállítása jelentős tervezési és szervezési feladatot jelentett az előkészítés alatt. A sugárkapuk szétszerelve történő szállításához a gyártó Canberra (a jelenlegi Mirion Technologies) nem járult hozzá. A sugárkapuk méretéből adódóan a lépcsőházban, liftkabinban történő szállítás nem volt kivitelezhető.

A beszállítás egyetlen lehetséges módja a liftaknában történő emelés maradt. Ehhez legyártásra került egy emelhető keret, amit a liftkabin alá rögzítettek, ezzel történt meg a sugárkapuk feldaruzása az Egészségügyi Laborépület második emeletére. A földszinti és a második emeleti vízszintes irányú mozgatásra is egy speciális eszköz készült, amellyel állítva és fektetve is szállíthatóak voltak a sugárkapuk. Erre azért volt szükség, mert a liftkabin alá történő be- és kigördítés, valamint a kabin emelkedése és süllyedése közben folyamatosan változtatni kellett a sugárkapu dőlésszögét. Ezekhez kapcsolódóan két rámpa készült a liftaknába történő be- és kigördítéshez.



2. ábra. A speciális sugárkapu szállító eszköz

Járulékos feladatként meg kellett oldani a régi sugárkapuk szétszerelését és kiszállítását, az ezekhez kapcsolódó gázrendszer és villamos kábelezés elbontását. Több helyszínen jelentős építészeti átalakítást kellett elvégezni, főleg azokon a területeken, ahol eszköz ellenőrző kamrák, mappa monitorok vagy plusz sugárkapuk lettek üzembe helyezve.

Az új sugárkapuk üzembe helyezéséhez kapcsolódóan el kellett végezni az új villamos, irányítástechnikai és kamera rendszer kiépítését.

A munkák koordinálása is szétágazó feladat volt, hiszen a munkákban az MVM Paksi Atomerőmű Zrt. mellett az MVM OVIT Zrt., az MVM ERBE Zrt., a Paksi Mérnöki Kft., a Pöry Erőterv Zrt., a Canberra-Packard Kft., az Oktel Kft., a Scadanet Kft. és a VF a.s. vett részt.

AZ ÚJ SUGÁRKAPUK ELŐNYEI

A régi MAB típusú sugárkapuk elkerülhetetlen cseréje mellett az ARGOS típusú új sugárkapuk olyan tulajdonságokkal is bírnak, melyek alátámasztják a rekonstrukció indokoltságát, szükségességét és sikerességét:

- A nagyméretű, színes LCD kijelzőn és hangutasítással is tájékoztatást adnak a sugárkapuk a felhasználó számára. Ezek a tájékoztatások tartalmazzák a pozíció felvételére vonatkozó utasításokat, a helytelen testhelyzetet, a mérési időt, az esetleges kontamináció tényét és helyét.
- A kétlépéses sugárkapuk sorompóval lettek ellátva, kiküszöbölve az esetleges „átsurranás” veszélyét, lehetőségét.
- A zuhanyzók utáni kétlépéses sugárkapuk mozgó fejdetektorral lettek üzembe helyezve, ezzel az utolsó ellenőrzési ponton a munkavállalók magasságkülönbsége (150 és 203 cm között) kiegyenlítésre került.
- Az eredeti 19 darab MAB sugárkapu helyén 24 darab ARGOS típusú sugárkapu lett rendszerbe állítva. Egy-egy plusz sugárkapu lett üzembe helyezve a főépületekből történő kilépési pontoknál, a műszaki öltöző be-, illetve kijáratánál, valamint a női öltöző kijáratánál. Ezeken a helyeken kisebb lett az egy kapura jutó leterheltség és elhasználódás.



3. ábra. ARGOS-1PB egylépéses sugárkapu

- Kamerarendszer került kiépítésre a sugárkapukhoz, rögzítési és visszaellenőrzési funkcióval. Ennek segítségével a meghibásodások, az esetleges sugárvédelmi szabálysértések és a sugárkapukat ért sérülések is rögzítésre kerülnek, lehetőséget adva a visszanézésre.
- A rekonstrukció keretében az új sugárkapuknak a villamos betáplálása is át lett alakítva, új elsődleges és szünetmentes betáplálást biztosítva.
- Az új sugárkapuk diagnosztikai értékei integrálva lettek a Sugárvédelmi Ellenőrző Rendszerbe. Ezzel bővebben foglalkozik a következő fejezet. [2, 5, 6]

A SUGÁRKAPUK MEGJELENÍTÉSE A SUGÁRVÉDELMI ELLENŐRZŐ RENDSZERBEN

A huszonegy új sugárkapu diagnosztikai adatai integrálva lettek a Sugárvédelmi Ellenőrző Rendszerbe. A sugárkapuk harminc másodpercenként egy szerverpárra küldik az adatokat (beleértve a villamos betáplálás adatait is), tizenkét sugárkapu a szerverpár egyik, tizenkettő pedig a másik szerverére. A szerverek az adatokat tükrözik a másikra, az adatvesztés így kiküszöbölhető. A szerverekre egy új adatgyűjtő szoftver került telepítésre, ennek a feladata a ciklikusan érkező státuszüzenetek folyamatos monitorozása és a kapott adatok továbbítása az adatbázisba. Amennyiben 120 másodpercig nem érkezik adat egy sugárkapuról, az adatgyűjtő szoftver kommunikációs hibás állapotúvá állítja a sugárkapu státuszát. Az új villamos betáplálás gyűjtött jelei is láthatóak az összefoglaló sémaképen.

Az üzemeltető és a karbantartó szervezet számára biztosítottak a sugárkapuk összefoglaló és részletes diagnosztikai információi [7].

Helyiség	Összegzett sugárkapu státusz			
Sugárkapu a vendég öltözőben	00XR62			
Sugárkapu a férfi öltöző előtt	00XR83	00XR84		
Sugárkapu a férfi öltöző fürdő után	00XR85	00XR86		
Sugárkapu a női öltöző előtt	00XR91			
Sugárkapu a női öltöző fürdő után	00XR92	00XR93		
Sugárkapu az 1. öltöző előtt (bűfé)	00XR78	00XR79	00XR80	00XR81
Sugárkapu az 1. öltöző fürdő után	00XR76	00XR77		
Sugárkapu a 2. öltöző előtt	00XR89	00XR90		
Sugárkapu a 2. öltöző fürdő után	00XR87	00XR88		
Sugárkapu az I. kiépítés átjáró folyosón	01XR05	01XR06	01XR07	
Sugárkapu a II. kiépítés átjáró folyosón	02XR05	02XR06	02XR07	
Sugárkapu szünetmentes betáplálás EÜ. épület pince:				00ER47 GY. HIBA
Sugárkapu alelosztók 00FD36, 00FD37:				00FD36 GY. HIBA

4. ábra. Összefoglaló sugárkapu diagnosztika a Sugárvédelmi Ellenőrző Rendszerben

A részletes diagnosztikai információk a sugárkapuk általános adatait tartalmazzák, többek között az ajtóra, a sorompóra, a szenzorokra, a betáplálásra, a mozgó fejedetektorra (ha van)

vonatkozóan. Ezen kívül a diagnosztika külön-külön adatot szolgáltat a kétlépéses sugárkapuk huszonöt, az egylépéses sugárkapuk harminc detektoráról. A következő adatok érkeznek a Sugárvédelmi Ellenőrző Rendszerbe: alacsony háttér, magas háttér, nagyfeszültség hiba, szennyezett detektor, magas számlálási idő, kalibrálás megfelelősége. Személyi kontamináció esetén a szennyeződést detektáló detektor színjelzése piros, kommunikációs hiba esetén világosszürke, szerviz üzem alatt sötétszürke színűre vált.

Sugárkapu: 00XR82 - a vendég öltözőben

✓ SERDP203 1.
✓ SERDP303 2.

Sugárkapu státusz	RENDBEN	Detektor sorszám	1
Ajtónyitó panel	RENDBEN	Detektor üzemel	RENDBEN
Szenzor panel	RENDBEN	Detektor hiba	NEM
Kiegészítő szenzor panel	RENDBEN	Nincs kalibrálva	NEM
Fej motorvezérlő panel	RENDBEN	Alacsony háttér érték	NEM
Degradált üzemmód	RENDBEN	Túl magas háttér érték	NEM
Riasztási teszt	RENDBEN	Nagyfeszültség hiba	NEM
Homéroséklet	RENDBEN	Live Time Error	NEM
Adatbázis	NINCS	Szennyezett detektor	NEM
Kijáratí ajtó	RENDBEN	Magas háttér érték	NEM
Bejáratí sorompó	RENDBEN	Magas számlálási idő	NEM
Fej motor	RENDBEN	Nulla beütés	NEM
+12V OK	RENDBEN	Újrakalibrálás szükséges	NEM
Vészstop gomb	INAKTIV		
Kijáratí biztonsági kulcs	INAKTIV		
Aktuális homéroséklet	37.00 C		
+12V	12.00 V	Sugárkapu adat frissülés	10:35:49
+5V	5.10 V	Képernyő frissülés	10:35:55

The right panel shows a 3D schematic of the detector array, consisting of 25 numbered blocks arranged in a grid-like structure.

5. ábra. Részletes kétlépéses sugárkapu diagnosztika a Sugárvédelmi Ellenőrző Rendszerben

A SUGÁRKAPUK MŰKÖDÉSÉT KIEGÉSZÍTŐ ESZKÖZÖK

Az új sugárkapuk működésének támogatására a sugárkapu rekonstrukció keretében három további berendezésfajta is beüzemelésre került:

- Négy darab kiseszköz ellenőrző kamra, a fekete öltözők bejárataihoz.
- A Dozimetriai Szolgálat munkájának segítésére a kis eszköz ellenőrző kamrákkal megegyező működésű, de nagyobb méretű nagy eszköz ellenőrző kamra.
- Az ellenőrzött zóna és a felügyelt terület közötti iratforgalmazást lebonyolító két darab mappa monitor [6].

Eszköz ellenőrző kamrák üzemeltetése

A négy fekete öltöző bejáratához kiseszköz ellenőrző kamrák (SIM-27G) lettek beépítve. Belső méretük 300 x 300 x 300 mm, térfogatuk 27 liter. Az öltözőbe lépés előtt a kamra segíti az ekkora méretet nem meghaladó személyes tárgyak ellenőrzését. A kamra négy darab plastik szcintillációs detektorral rendelkezik (az ajtókon nincs detektor), a detektorok felülete egyenként 784 cm². A detektorok árnyékolását 5 mm vastagságú ólom biztosítja. Mérési tartománya 120 Bq–3 MBq, 25–300 000 s⁻¹. Energia tartománya 60 keV–2,5 MeV.

A Dozimetriai Szolgálat munkáját egy darab nagyesczköz ellenőrző kamra (SIM-101G) támogatja. Belső mérete 450 x 450 x 500 mm, térfogata 101 liter. A kamra hat plasztik szcintillációs detektorral rendelkezik, a detektorok felülete egyenként 1800 cm². A detektorok árnyékolását 25 mm vastagságú ólom biztosítja. Mérési tartománya 124 Bq–3 MBq, 21–510 000 s⁻¹. Energia tartománya 60 keV–2,5 MeV [6, 8, 9].

A mappamonitorok üzemeltetése

Az ellenőrzött zóna és a felügyelt terület (korábbi üzemi terület) közötti iratforgalmazás sugárvédelmi ellenőrzése érdekében két mappamonitor (DMC-300F) került elhelyezésre az Egészségügyi Laborépület földszintjén. Az eszközök A4-es formátumú, 30 mm vastagságú dokumentáció ellenőrzését teszik lehetővé, két plasztik szcintillációs detektor segítségével. A detektorok felülete egyenként 875 cm², az aktív területük 704 cm². A detektorok árnyékolását 25 mm vastagságú ólom biztosítja. A mappamonitor által minimálisan kimutatható felületi aktivitáskoncentráció 0,1 Bq/cm² ⁹⁰Sr (+⁹⁰Y) esetén. Mérési tartománya 25–62 000 s⁻¹. Energia tartománya 60 keV–2,5 MeV. [6, 10]

EDDIGI ÜZEMELTETÉSI TAPASZTALATOK

Jelenleg mintegy egy éves üzemeltetési tapasztalat áll rendelkezésre az utolsóként üzembe helyezett új sugárkapu tekintetében is. A próbaüzem alatt több megoldandó feladat is rögzítve lett, ezek a következők voltak [6]:

- Változó háttér üzenet és érvénytelen mérés. A detektor fizikai megnyomásával jelentkezett. A munkavállalók tájékoztatásával, a mérés közbeni odafigyeléssel számossága jelentősen csökkent. Szintén ez az üzenet jelentkezett radioaktív minták sugárkapu közelében történő szállításánál. Ez a szabályozások pontosításával került kiküszöbölésre.
- A mozgó fejdetektoros sugárkapuknál az infraérzékelő pontatlanságából adódóan előfordult, hogy a fejdetektor nekiütközött a mérés alatt álló személy fejének. Ez az infraérzékelők távtartóra történő szerelésével lett megszüntetve.
- A kétlépéses sugárkapuk ajtaja korai bezáródásának problémája a foglaltsági idő növelésével oldódott meg.
- Az eszköz ellenőrző kamrák fogantyújának nem optimális fogási irányának megfordítását kellett elvégezni.
- Helyhiány miatt a női öltöző bejáratához csak egy új sugárkapu került telepítésre. Ez a műszakváltások idején a mérésre várók feltorlódását eredményezi, a kétlépéses mód miatt megnövekedett mérési időből adódóan. A jövőben meg kell vizsgálni egy további sugárkapu elhelyezésének lehetőségét.
- A kétlépéses sugárkapuk szenzorai megkövetelik, hogy a mérés alatt álló személy a lehető legközelebb helyezkedjen el a detektorokhoz. Ez a minimális mérési távolság az ellenőrzött zónában elszenvedett és jegyzőkönyvezett személyi kontaminációk számának emelkedését vonta maga után, amivel az üzemeltetők előzetesen számoltak.

IRODALOM

- [1] A MAB GKM600 sugárkapu detektorainak érzékenységsökkenés vizsgálata (Matec Kft., 2008.)
- [2] ARGOS-5PB Kétlépéses személyi sugárkapu gépkönyv (Canberra-Packard Kft.)Elérhetőség: http://www.canberra.com/products/hp_radioprotection/pdf/Argos-PB-SS-C40628.pdf. A letöltés időpontja: 2018.03.01.

- [3] MAB GKM 600 Technisches Handbuch
- [4] ARGOS-5PB típusvizsgálati jegyzőkönyv (MKEH, 2014.05.06.)Elérhetőség: <http://mkeh.gov.hu/index.php?name=OE-eLibrary&file=download&keret=N&showheader=N&id=98766>. A letöltés időpontja: 2017.12.19.
- [5] ARGOS-1PB Egylépéses személyi sugárkapu gépkönyv (Canberra-Packard Kft.)
- [6] Makovecz Gyula: Új sugárkapuk hatása a sugárvédelemre, DO szakmai továbbképzés, Balatonfüred, 2018.02.06.
- [7] SER SCADA kapcsolat – rendszerterv (Scadanet Kft.)
- [8] SIM-27G, műszaki dokumentáció (VF a.s.). Elérhetőség: [http://vf1.ideal-studio.cz/files/upload/produkty/SIM/VF-DataSheet%2520SIM%2520series%2520\(Small%2520Items%2520Monitors\).pdf](http://vf1.ideal-studio.cz/files/upload/produkty/SIM/VF-DataSheet%2520SIM%2520series%2520(Small%2520Items%2520Monitors).pdf).A letöltés időpontja: 2018.03.01.
- [9] SIM-101G műszaki dokumentáció (VF a.s.). Elérhetőség: [http://vf1.ideal-studio.cz/files/upload/produkty/SIM/VF-DataSheet%2520SIM%2520series%2520\(Small%2520Items%2520Monitors\).pdf](http://vf1.ideal-studio.cz/files/upload/produkty/SIM/VF-DataSheet%2520SIM%2520series%2520(Small%2520Items%2520Monitors).pdf).A letöltés időpontja: 2018.03.01.
- [10] DMC-300F műszaki dokumentáció (VF a.s.). Elérhetőség: [http://vf1.ideal-studio.cz/files/upload/produkty/DCM-300/VF-Datasheet%2520DCM-300%2520series%2520\(Document%2520Contamination%2520Monitor\).pdf](http://vf1.ideal-studio.cz/files/upload/produkty/DCM-300/VF-Datasheet%2520DCM-300%2520series%2520(Document%2520Contamination%2520Monitor).pdf). A letöltés időpontja: 2018.03.01.

Készült a SOMOS Alapítvány támogatásával.

RÉSZLEGES AGYI SUGÁRKEZELÉS KORAI ÉS KÉSŐI KÖVETKEZMÉNYEI PATKÁNYOKBAN

Tőkés Tünde^{*1,5}, Plangár Imola², Szabó Emília Rita¹, Mán Imola³, Brinyiczki Kitti⁴, Reiszt Zita⁴, Boros Mihály⁵, Hideghéty Katalin^{1,6}

¹ELI-ALPS, ELI-HU Nonprofit Kft., 6720 Szeged, Dugonics tér 13.

²MTA-KOKI, Lendület Idegi Jelátvitel Kutatócsoport, 1083 Budapest, Szigony utca 43.

³Avidin Kft., 6726 Szeged Alsó Kikötő sor 11.

⁴SZTE-ÁOK Patológiai Intézet, 6725 Szeged Állomás u. 2.

⁵SZTE-ÁOK Sebészeti Műtéttani Intézet, 6720 Szeged, Szőkefalvi-Nagy Béla u. 6.

⁶SZTE-ÁOK Onkoterápiás Klinika, 6720 Szeged, Korányi fasor 12.

[*tunde.tokes.phd@gmail.com](mailto:tunde.tokes.phd@gmail.com)

A kézirat beérkezett: 2018.07.11.

Közlésre elfogadva: 2018.08.08.

Acute and late consequences of partial brain irradiation in rats. We detected early biochemical signs of peripheral inflammatory activation, and examined the late histological consequences of irradiation. Rats were subjected to 40 Gy irradiation of the hippocampus, or served as non-treated control (n=6, each). Three hours after the irradiation, TNF- α , IL-6 and IL-10 changes were measured, and histopathologic damages were determined after 4 months of irradiation. The circulating cytokines were significantly increased after irradiation. Histopathological examination revealed important amounts of macrophage density, reactive gliosis and necrosis. Brain irradiation induced measurable pro- and anti-inflammatory cytokine changes and caused significant histopathological alterations.

Keywords: brain irradiation, cytokines, necrosis, macrophage, reactive gliosis

A sugárterápia fontos szerepet játszik az agyi tumorok kezelésében. Célunk az volt, hogy detektáljuk a hippokampusz irradáció-okozta korai perifériás gyulladásos aktivációt, valamint a késői szövettani elváltozásokat. Patkányok egy-egy csoportját 40 Gy fokális agyi sugárkezelésnek tettük ki, míg további csoportok kontrollként szolgáltak (n=6, csoportonként). Vizsgáltuk az akutan bekövetkező TNF- α , IL1- β , IL-6 és IL-10 változásokat és a késői hisztopathológiai károsodásokat. A keringő TNF- α , IL-6, IL-10 szintje szignifikánsan megemelkedett a besugárzást követően. A szövettani vizsgálatokkal jelentős makrofág denzitást, reaktív gliózist és nekrozist mutattunk ki. Az agyi sugárkezelés szignifikáns pro-, és anti-inflammatorikus citokin változásokhoz, valamint szövettani elváltozásokhoz vezet.

Kulcsszavak: agyi sugárkezelés, nekrozis, makrofág, reaktív gliózis

BEVEZETÉS

Napjainkban, az agyi sugárterápia gyakori és sikeresen alkalmazott módszer különböző elsődleges agyi tumorok és metasztázisok kezelésében [1-2]. A besugárzási technikák fejlődésével a dózis egyre szelektívebben adható le a kívánt céltérfogatban, azonban a mellékhatások nem küszöbölhetők ki teljesen, így a betegek gyakran számolnak be mellékhatásokról is, mint például, intersticiális ödéma és megemelkedett intrakraniális nyomás [3-4]. A sugárzás-indukálta kedvezőtlen mellékhatások hátterében számtalan potenciális mechanizmus állhat a központi idegrendszerben (KIR); megállapították, hogy például a *de novo* képződő gyulladást okozó mediátorok, vagy azok előalakjai kulcsfontosságú szerepet játszanak a sugárterápia-asszociált szövetkárosodásban [5]. Kimutatták, hogy a tumor nekrozis faktor- α (TNF- α) és az interleukin-1 β (IL-1 β) gének nagyon gyorsan aktiválódnak agyi sugárkezelés után, és ezek a citokinek szerepet játszanak az

ödéma kialakulásában is [6-14]. A gyulladást okozó citokinek képződésének és szétterjedésének egyensúlyát a gyulladás gátló citokinek, mint az interleukin-10 (IL-10) tartják fent, mely csökkenti a TNF- α aktivitását és gátolja az interleukin-6 (IL-6) termelődését [15-16]. Korábbi tanulmányok alapján a TNF- α szintje 2-8 óra között tetőzik, ami 24 órával a besugárzást követően gyakran visszaáll a kezdeti szintre [17]. A citokinek mérete és szerkezete limitáló tényezők, melyek kizárják a passzív diffúziót a vér-agy gáton keresztül. Mindazonáltal, egésztess besugárzás után a periférián képződött citokinek bejutnak az agyi szövetekbe, ez pedig azt feltételezi, hogy átmenetileg megsérül az a mechanizmus, amely ezeknek az anyagoknak az átjutását kontrollálja a vérből a cerebrospinális folyadékba. Így elképzelhető, hogy az agyi sugárkezelés nem kívánt következményeként sérül a vér-agy gát áteresztőképessége, és az agyban képződött anyagok kijutnak a perifériára, amennyiben ez a barrier mechanizmus kétoldalú. Feltételezésünk szerint, a sugárterápia olyan perifériás gyulladást okozó mediátorok megjelenésével jár, melyek eredeti képződési helye a besugárzott agyszövet.

A KIR sugárkezelését követően nem csak akut, de szubakut és késői posztirradiációs reakciók is előfordulnak. A sugárkezeléssel kiváltott késői agysérülés (late or delayed radiation injury (LDRI)) jól dokumentált szövödmény, amely 3 hónap és 10 év között jelentkezik a sugárkezelés után (az esetek 70 százaléka az első 2 évben fordul elő). Humán adatok szerint az LDRI előfordulási gyakorisága 5% és 37% között van, és a kialakulás valószínűsége nagyobb sugárdózisokkal lineárisan nő. A hatékony kezelés hiányában a LDRI rendkívül súlyos, irreverzibilis állapothoz vezethet, progresszív állapotromlást és halált okozhat. Az LDRI elsődleges mechanizmusa az endotél (vagy endotélsejtek) sérülése, vagy az oligodendroglia közvetlen károsodása. A posztirradiációs minták kórszövettani vizsgálata különböző mennyiségű endotélsejt apoptózist, gliózist, szöveti nekrozist, meszesedést, gyulladást, vaszkuláris proliferációt és hyalinizációt, továbbá diffúz CD4+ és CD8+ T-sejt infiltrációt mutatott [18-24].

A hippocampus az egyik legfontosabb agyi struktúra, sérülése esetén tanulási és memória zavarok lépnek fel [25-27]. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a sugárkezelés után jelentkező kognitív diszfunkció hátterében a hippocampus szubgranuláris zónájában bekövetkező neurogenesis károsodása áll [28].

Korábban kifejlesztettünk egy olyan, jól reprodukálható, megbízható kísérleti modellt, mely széles körben alkalmazható fokális agyi sugárkezelés következményeinek feltárására [29]. Mindezek ismeretében a célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a hippocampus besugárzás korai, biokémiai, és késői, hisztopatológiai következményeit.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Állatok

A kísérleteket felnőtt Sprague-Dawley hím patkányon (200-230g) végeztük (n=24). Az állatokat kontrollált körülmények között, 12 órás fény/12 órás sötét cikluson tartottuk, szabadon hozzáférhettek az élelemhez és vízhez. Minden kísérletet az Európai Tanács 86/609/EGK irányelvének megfelelően végeztünk, az egyetemi Munkahelyi Állatjóléti Bizottság engedélyével.

Bilaterális hippocampus besugárzást követő korai elváltozások

Korábbi előkísérletek és dózis-hatás görbék felállítása után meghatároztuk azt a dózist, mellyel egy egyszeri, rész-agy besugárzással olyan neurofunkcionális, morfológiai és biológiai elváltozásokat tudtunk kimutatni, amely a kísérleteink számára már releváns lehet. A patkányok sugártoleranciája eltér az emberétől, korábbi tanulmányaink alapján a funkcionális

és struktúrális változások, mint a sejt szám csökkenés, vagy demyelinizáció a 40–100 Gy dózistartományban figyelhető meg, így jelen kísérletünkben alkalmazott dózist 40 Gy-ben állapítottuk meg [29].

A sugárkezelés előtt, a hippocampusz körbehatárolása CT-alapú (Emotion 6, Siemens AG) 3D konformális XIO™ kezeléstervező rendszerrel történt. Két ellentétes, izocentrikus, laterális, 1 cm átmérőjű kör alakú mezőt alkalmaztunk, mellyel biztosítottuk a homogén dóziseloszlást. A mező profilt és a kollimátor kimeneti faktorát film dozimetriával és pinpoint ionizációs kamrával mértük ki. Az állatokat 5%-os klorál-hidráttal oldattal elaltattuk, majd hanyatt fekvő helyzetben, fűtőpárnára helyeztük. Az altatás fenntartására a jobb oldali vena jugularisba kanült vezetünk be. A sugárkezelt csoport egyedeit (n=6) egy speciális fektető állványra helyeztük (3 állat/állvány) és mindkét féltekei hippocampusz besugárzást végeztünk kobalt 60 ágyú (Terragam K01; SKODA UJP, Prága, Cseh Köztársaság) alkalmazásával, mezőellenőrző felvétellel (film), 40 Gy (1 Gy/2.25 perc) dózisban, a két ellentétes, oldalsó mezőn keresztül. A kontroll állatok (n=6) ugyanezen az előkészületen estek át, de sugárkezelést nem kaptak.

Plazma TNF- α , IL-1 β , IL-6 és IL-10 meghatározás

Három órával a besugárzást követően vérmintákat (0.5 ml) vettünk az inferior vena cava keresztül, előre hűtött EDTA-tartalmú polipropilén csövekbe, 1000 g-n centrifugáltuk 20 percig, és feldolgozásig -70 °C-on tároltuk. ELISA kitek segítségével meghatároztuk a plazma TNF- α , IL-1 β , IL-6 és IL-10 (Quantikine ultrasensitive ELISA TNF- α IL-1 β , IL-6 és IL-10 kitek patkányok számára; Biomedica Hungaria Kft, Magyarország) koncentrációját. A legalacsonyabb detektálási szint a TNF- α és IL-1 β esetében < 5 pg/ml, az IL-10 esetében <10 pg/ml, míg az IL-6 esetében 21 pg/ml volt.

Az agyi sugárkezelést követő késői elváltozások

Egyoldali fokális hippocampusz besugárzás

Klorál-hidráttal altatás mellett az állatok fejének pozícióját rögzítettük, és Emotion 6 CT scanner (Siemens AG, Erlangen, Németország) segítségével megterveztük a sugárzás geometriáját. A tervezett dózis leadása egyszeri frakcióban, lineáris gyorsítóval (Primus IMRT; Siemens, Németország) 300-900 monitoregység/perc dózisirátával történt, dóziseloszlását 6 db 1 cm-es elektron nyalábbal, 15x15cm elektron kollimátorba helyezhető inzerttel, melyet dozimetriai mérésekkel ellenőriztünk. 40 Gy dózissal, 6 MeV energiájú laterális elektron nyalábbal történtek a besugárzások, 100 cm forrás-bőr távolság mellett. Így az elektron nyalábok kedvező dózis gradiense limitálta a releváns sugárdózis elnyelődését az ellenoldali agyféltekében. Tehát, az összdózis nagy része az azonos oldali hippocampuszban és corpus callosumban nyelődött el egy 4x6x8mm-es térfogatban. Szövettani vizsgálataink azt mutatták, hogy az ellenoldali féltekét ért szórt sugárzás mértéke elhanyagolható volt (adatot nem mutatunk).

A besugárzás egyszerre 6 állaton történt (n=6), helyzetverifikáció (mezőellenőrző film) után, míg a kontroll állatok (n=6) nem kaptak sugárkezelést [29]. A beavatkozást követően az állatok visszakerültek az eredeti ketrecükbe, és 4 hónapon keresztül folyamatos megfigyelés alatt éltek tovább; figyeltük az esetleges bőrelváltozások mértékét, és hetente testtömeg mérés történt. 120 nappal az irradiációt követően a sugárkezelt és kontroll patkányokat is elaltattuk, transzkardiálisan perfundáltuk, és hematoxylin-eozin (H&E) festést alkalmaztunk hisztológiai értékelés céljából.

Agyi hisztopathológia

Foszfát pufferes sóoldattal, majd 4%-os paraformaldehid-foszfátpuffer oldattal történő perfúzió után a teljes agyakat paraformaldehidben fixáltuk egy napon keresztül, mielőtt 6 egyforma részre osztottuk volna, amiket azután paraffinba ágyasztunk. 30 µm vastagságú metszeteket készítettünk H&E szövettani értékelésre. Axio Imager.Z1 (EC Plan Neofluar 40x/0.75 M27; Freiburg, Németország) fénymikroszkóppal vizsgáltuk a metszeteket, és felvételeket készítettünk AxioCam MR5 kamera segítségével. A digitális fotók analízise ProR Plus 6.1 software (MediaCybernetics Inc., Bethesda, MD, USA) használatával történtek.

A kiértékelés vakon, kódok alapján történt, két gyakorlott patológus segítségével, egymástól függetlenül, pontozási rendszer (1-től 4-ig, vagy nem értékelhető) alkalmazásával, melyben a vizsgált paraméterek a nekrosis, makrofág denzitás és reaktív gliózis voltak. Nekrosis esetében a pontozás a következőképpen alakult: 1: nem detektálható; 2: a látótér kevesebb, mint 50%-ban látható nekrosis; 3: a látótér több mint 50%-ban látható nekrosis; 4: a nekrosis mértéke kitölti a látóteret, vagy kiterjed mindkét agyféltekére. Makrofág denzitás pontozási rendszere: 1: nincs habos makrofág a látótérben; 2: kevesebb, mint 5 habos makrofág a látótérben; 3: 5-10 makrofág a látótérben; 4: több mint 10 makrofág/látótér. Reaktív gliózis pontozó rendszere: 1: nincs; 2: enyhe; 3: mérsékelt; 4: súlyos.

Statisztikai analízis

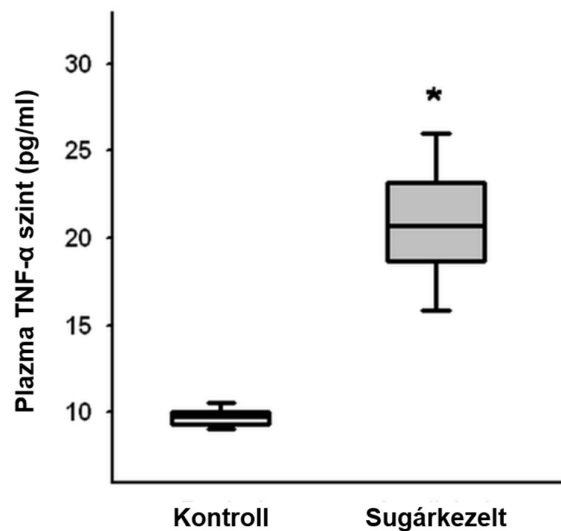
Az adatok analízise SigmaStat és StatView statisztikai szoftver csomagok (SigmaStat, Jandel Scientific, Erkrath, Németország; StatView 4.53, Abacus Concept Inc., Berkeley, CA, USA) segítségével történt. A nem-Gauss eloszlású adathalmaz miatt nem-parametrikus módszereket alkalmaztunk. Egy utas ANOVA és Fisher's PLSD *post hoc* tesztet használtunk a szövettani kiértékelés során, a csoportok közötti különbségek kimutatására pedig Kruskal-Wallis egy utas ANOVA on ranks, és Dunn-féle *post hoc* tesztet választottuk. Az ábrákon és az eredményekben a medián értékeket (M), és a 25. és 75. percentiliseket, valamint az átlag $\pm$ S.E.M ábráztuk. $p < 0.05$ és $p < 0.001$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

Az agyi sugárkezelés korai hatásai

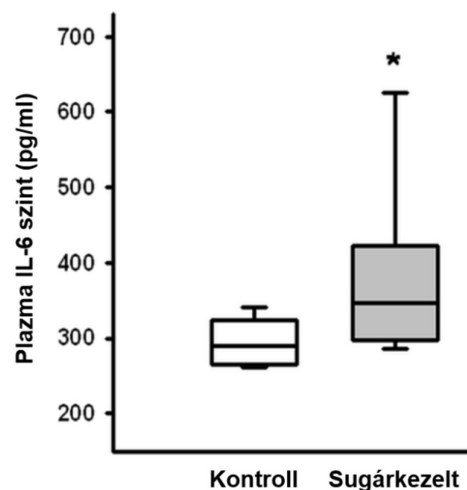
3 órával az irradiációt követően, a pro-, és anti-inflammatorikus citokinek szintje szignifikánsan megemelkedett a perifériás keringésben.

Hippokampusz besugárzás hatására szignifikánsan megemelkedett a plazma TNF- α szintje (M:20.7; p25:18.7; p75:23.2) a kontroll csoporthoz képest (M:9.7; p25:9.3; p75:10.06; 1. ábra).



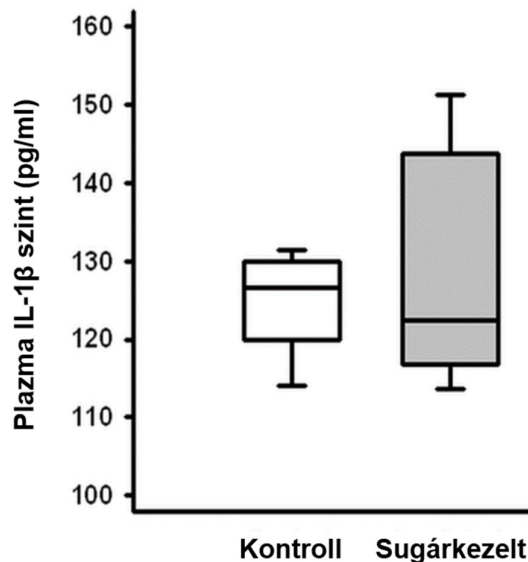
1. ábra. Plazma tumor nekrosis faktor-alfa változás hippokampusz besugárzás után. Medián értékeket és a 25. és 75. percentiliseket ábrázoltuk. * $p < 0.05$ a kontroll csoporthoz viszonyított szignifikáns emelkedést jelöli.

Az IL-6 koncentráció is jelentősen magasabb volt 3 órával a sugárkezelés után (M:347.2; p25:297.4; p75:422.3), mint a nem kezelt csoportban (M:289.6; p25:264.7; p75:323.9; 2. ábra).



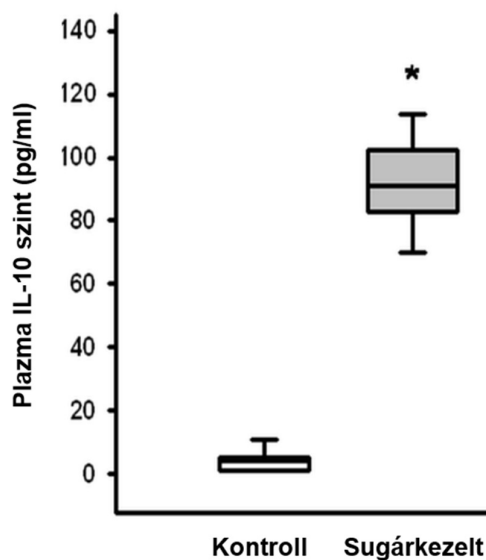
2. ábra. Plazma interleukin 6 változás hippokampusz besugárzás után. Medián értékeket és a 25. és 75. percentiliseket ábrázoltuk. * $p < 0.05$ a kontroll csoporthoz viszonyított szignifikáns emelkedést jelöli.

A plazma IL-1 β esetében nem találtunk különbséget a csoportok között (kontroll: M:126.5; p25:119.8; p75:129.9; sugárkezelt: M:122.3; p25:116.7; p75:143.8; 3. ábra).



3. ábra. Plazma interleukin 1-beta szintek hippocampusz besugárzás után. Medián értékeket és a 25. és 75. percentiliseket ábrázoltuk.

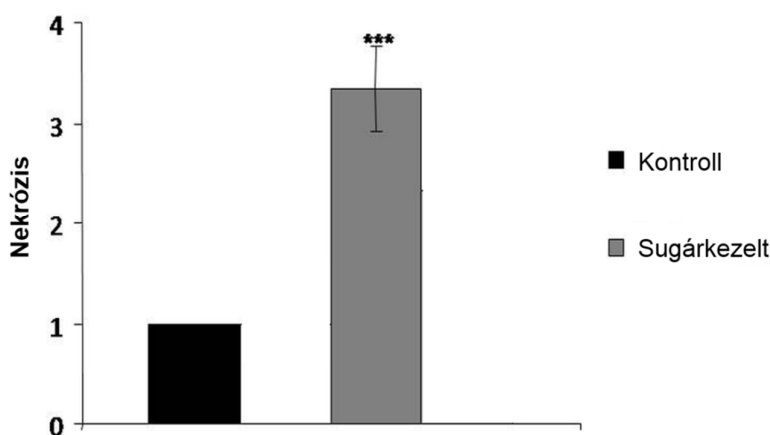
Az IL-10 plazma szintje szignifikánsan magasabb volt a sugárkezelést követően (M:90.7; p25:82.6; p75:102.1; 4. ábra), mint a sugárkezelést nem kapott csoportban (M:4.1; p25:1.2; p75:5.04).



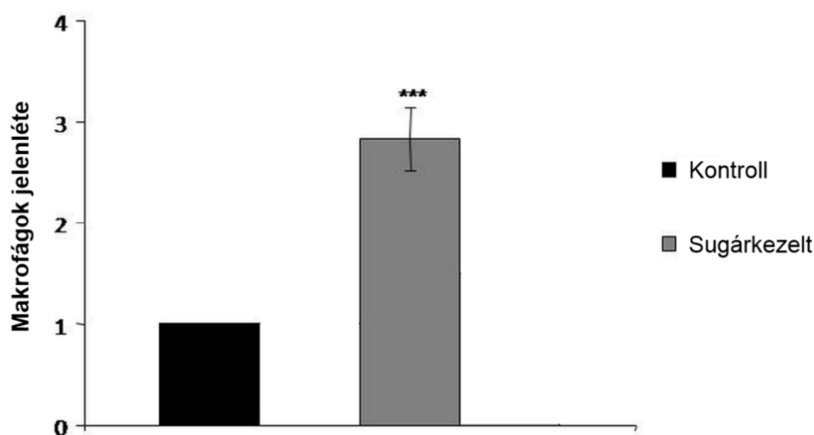
4. ábra. Plazma interleukin 10 változások hippocampusz besugárzás után. Medián értékeket és a 25 és 75 percentiliseket ábrázoltuk. * $p < 0.05$ a kontroll csoporthoz viszonyított szignifikáns emelkedést jelöli.

Agyi sugárkezelés késői hatásai

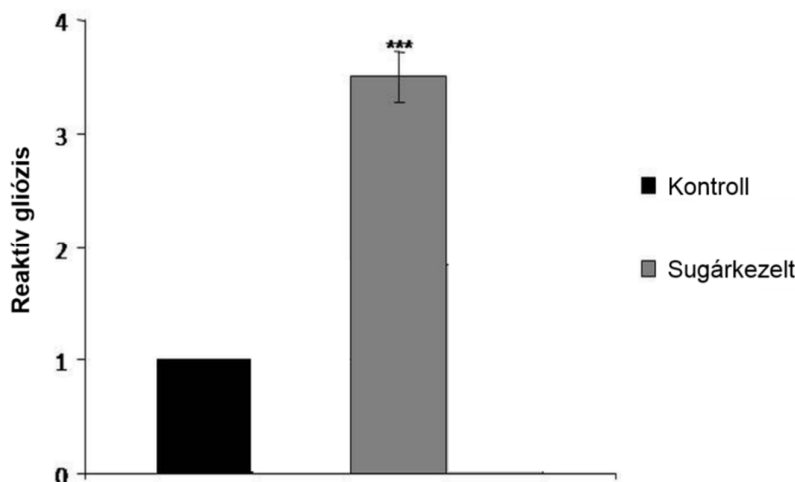
Kísérleteink során a hippocampusz-besugárzás késői következményeit vizsgáltuk 4 hónappal a sugárkezelést követően. A nekrózis jeleit, makrofág denzitást és reaktív gliózist értékeltük a 40 Gy dózisú sugárkezelésnek kitett agyi régiókban. Besugárzás után mérsékelt nekrózist tapasztaltunk, mely kiterjedt a szürke és fehér állományra is (5. ábra). A habos makrofágok jelenléte (6. ábra), és a reaktív asztrogliózis mértéke (7. ábra) is szignifikánsan megemelkedett a sugárkezelt csoportban, a kontroll csoporthoz képest.



5. ábra. Nekrózis mértéke 120 nappal a sugárkezelés után. Az ábrákon az átlag $\pm$ S.E.M. értékeket ábrázoltuk. *** $p < 0.001$ a kontroll csoporthoz viszonyított szignifikáns emelkedést jelöli.



6. ábra. A makrofágok jelenléte 120 nappal a sugárkezelés után. Az ábrákon az átlag $\pm$ S.E.M. értékeket ábrázoltuk. *** $p < 0.001$ a kontroll csoporthoz viszonyított szignifikáns emelkedést jelöli.



7. ábra. Reaktív gliózis mértéke 120 nappal a sugárkezelés után. Az ábrákon az átlag $\pm$ S.E.M. értékeket ábrázoltuk. *** $p < 0.001$ a kontroll csoporthoz viszonyított szignifikáns emelkedést jelöli.

ÖSSZEFOGLALÁS

Rágcsálókval végzett kísérleteink során sikerült kifejlesztenünk egy olyan speciális, részleges agyi besugárzási technikát, mely jól definiálva csak az egyik félteke hippocampusz és a corpus callosum területét érinti, hasonlóan a humán gyógyászatban alkalmazott agyi sugárterápiához [30]. A kísérletes elrendezés és a pro-, és anti-inflammatórikus citokinek kiválasztása a központi idegrendszeri akut gyulladásos reakciók során betöltött kulcsfontosságú szerepük alapján történt [31-32]. Számtalan tanulmány leírta, hogy a TNF- α és IL-1 β gének overexpressziója összefüggésben állhat az agyi sugárkezelésre bekövetkező molekuláris válaszokkal [8, 10, 33]. *Vice versa*, azt is kimutatták, hogy a perifériás TNF- α termelés káros szerepet játszik az idegi túlélésben, vagy a hippocampuszban zajló differenciációban [22, 34-35], habár a hippocampusz besugárzás perifériás biokémiai következményeit korábban nem vizsgálták.

A kísérleti elrendezés lehetővé tette, hogy különbséget tegyünk az agyi sugárkezelés direkt, helyi és a távoli (absztrópalis), perifériás hatásai között. Mi figyeltük meg először, hogy 3 órával az agyi sugárkezelést követően, a gyulladásos citokinek szintje szignifikánsan megemelkedik a perifériás keringésben, mely következtében egyes távoli szervekben is tapasztaltunk elváltozásokat, mint például a máj homeosztázisban, ahol jelentős eltéréseket mutattunk ki [36]. Ezt a jelenséget azzal magyarázhatjuk, hogy az irradiáció után egy szignifikáns, lokális pro-inflammatórikus válasz aktiválódik az agyban, aminek következtében a vér-agy gát ideiglenesen megnyílik, és az aktivált gyulladásos mediátorok (például, a vizsgálatunkban periférián detektált citokinek) a keringésbe kerültek.

Az IL-6 egy multifunkcionális gyulladást okozó citokin, melynek szerepe van az egésztest besugárzás utáni gyulladásos válaszok közvetítésében [37], és néhány tanulmány szerint a megemelkedett IL-6 fehérje expressziója lehet a felelős a sugárzás-indukálta gyulladásért az agyban [33, 38-39]. Ezen kívül, arról is beszámoltak, hogy az egésztest besugárzásnak kitett rágcsálókban szelektíven aktiválódott az NF- κ B, és ennek következtében megemelkedett a TNF- α , IL-1 α , IL-1 β és IL-6 mRNS expressziója nyirokszövetben [40].

A gyulladást okozó mediátorok megemelkedése befolyásolhatja az IL-10 emelkedését, mely alulszabályozza a TNF- α aktivitását, gátolja a hosszú idejű IL-6 termelést [15-16], blokkolja

az NF- κ B aktivitást és közrejátsszik a JAK-STAT szignalizációs útvonal szabályozásában; ezért gyulladásgátló citokinnek minősül agyi sugárreakció esetén [41]. Az akut mellékhatások molekuláris pathomechanizmusa nem áll közvetlen összefüggésben a késői hatásokkal, melyek egy része azonban visszavezethető az endotélsejt apoptózis indukcióra, és következményes mikrokeringési zavarokra, valamint a neuronok homeosztázisát fenntartó gliális elemek károsodására. Az idegsejtek közül a hippocampusz területén található neurogenesisben szerepet játszó neuroprogenitor őssejtek a legérzékenyebbek. [42-43].

A hippocampusz az agy legfőbb területe, mely kritikus szereppel bír a tanulás és memória folyamatok során [44], és számtalan adat bizonyítja, hogy a sugárkezelés ezekben a funkciókban károsodást okoz [28, 45-46]. A hippocampuszon belül, a Gyrus Dentatus (GD) az a régió, amely a legérzékenyebb az irradiációra [47]. Szövettani elváltozások korábbi vizsgálata ahhoz a felfedezéshez vezetett, miszerint az agyi sugárkezelés módosította a GD szemcsés sejtjeinek dendritjeit, valamint idő-függően a CA1 régió piramis sejtjeinek bazális dendritjeit is [48]. A kísérleteink során az adott dózissal besugárzott agyterületen 4 hónappal az irradiáció után nemcsak a hippocampusz szövetében, hanem az előírt dózissal ellátott teljes térfogatban szignifikáns patológiai eltéréseket detektáltuk. A patológiás zavarok, úgy, mint a vaszkuláris károsodás és a demyelinizáció az irradiáció késői következményei, ami szövettani vizsgálatokkal feltárható [49, 50].

Sikerült kidolgoznunk egy olyan megbízható, jól reprodukálható rágcsló modellt, mellyel fokális agyi besugárzás korai és késői hatásait, valamint esetleges sugármódosító anyagok és eltérő sugárminőségek biológiai hatásait egyaránt vizsgálhatjuk.

TÁMOGATÁS

Az Európai Unió és az Európai Regionális Fejlesztési Alap által támogatott ELI-ALPS projekt (GINOP-2.3.6-15-2015-00001); valamint a Laserlab-Europe, melyet az Európai Unió Horizon 2020 Kutatási és Innovációs programja (654148) támogat.

IRODALOM

- [1] Kalifa C, Grill J: The therapy of infantile malignant brain tumors: current status. *J Neurooncol* 2005;75:279-285.
- [2] Khuntia D, Tome WA, Mehta MP: Radiation technique in neuro-oncology. *Neurotherapeutics* 2009;6:487-499.
- [3] Kirste S, Treier M, Wehrle SJ, Becker G, Abdel-Tawab M, Gerbeth K, Hug MJ, Lubrich B, Grosu AL, Momm F: Boswellia serrata acts on cerebral edema in patients irradiated for brain tumors: a prospective, randomized, placebo-controlled, double-blind pilot trial. *Cancer* 2011;117:3788-3795.
- [4] Liu Y, Xiao S, Liu J, Zhou H, Liu Z, Xin Y, Suo WZ: An experimental study of acute radiation-induced cognitive dysfunction in a young rat model. *AJNR Am J Neuroradiol* 2010;31:383-387.
- [5] Denham JW, Hauer-Jensen M: The radiotherapeutic injury - a complex 'wound'. *Radiother Oncol* 2002;63:129-145.
- [6] Botchkina GI, Meistrell ME 3rd, Botchkina IL, Tracey KJ: Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol Med* 1997;3:765-781.
- [7] Daigle JL, Hong JH, Chiang CS, McBride WH: The role of tumor necrosis factor signaling pathways in the response of murine brain to irradiation. *Cancer Res* 2001;61:8859-8865.

- [8] Gaber MW, Sabek OM, Fukatsu K, Wilcox HG, Kiani MF, Merchant TE: Differences in ICAM-1 and TNF-alpha expression between large single fraction and fractionated irradiation in mouse brain. *Int J Radiat Biol* 2003;79:359-366.
- [9] Han SK, Song JY, Yun YS, Yi SY: Effect of gamma radiation on cytokine expression and cytokine receptor mediated STAT activation. *Int J Radiat Biol* 2006;82:686-697.
- [10] Hong JH, Chiang CS, Campbell IL, Sun JR, Withers HR, McBride WH: Induction of acute phase gene expression by brain irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33:619-626.
- [11] McBride WH, Chiang CS, Hong JH, Withers HR: Molecular and cellular responses of the brain to radiotherapy. In: Khayat D and Hortobagyi G, editors, *Current Clinical Topics in Cancer Chemotherapy*. Cambridge, MA: Blackwell Science Inc; 1997. p. 91-101.
- [12] Meistrell ME 3rd, Botchkina GI, Wang H, Di Santo E, Cockcroft KM, Bloom O, Vishnubhakat JM, Ghezzi P, Tracey KJ: Tumor necrosis factor is a brain damaging cytokine in cerebral ischemia. *Shock* 1997;8:341-348.
- [13] Mohanty S, Dey PK, Sharma HS, Singh S, Chansouria JPN, Olsson Y: Role of histamine in traumatic brain edema. An experimental study in the rat. *J Neurol Sci* 1989;90:87-97.
- [14] Shimada R, Nakao K, Furutani R, Kibayashi K: A rat model of changes in dural mast cells and brain histamine receptor H3 expression following traumatic brain injury. *J Clin Neurosci* 2012;19:447-451.
- [15] Huaux F, Arras M, Vink A, Renauld JC, Lison D: Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors p55 and p75 and interleukin-10 downregulate TNF-alpha activity during the lung response to silica particles in NMRI mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21:137-145.
- [16] Marshall JS, Leal-Berumen I, Nielsen L, Glibetic M, Jordana M: Interleukin (IL)-10 inhibits long-term IL-6 production but not preformed mediator release from rat peritoneal mast cells. *J Clin Invest* 1996;97:1122-1128.
- [17] Daigle JL, Hong JH, Chiang CS, McBride WH: The role of tumor necrosis factor signaling pathways in the response of murine brain to irradiation. *Cancer Res* 2001;61:8859-8865.
- [18] Ansari R, Gaber MW, Wang B, Pattillo CB, Miyamoto C, Kiani MF: Anti-TNFA (TNF-alpha) treatment abrogates radiation-induced changes in vascular density and tissue oxygenation. *Radiat Res* 2007;167:80-86.
- [19] Belka C, Budach W, Kortmann RD, Bamberg M: Radiation-induced CNS toxicity-molecular and cellular mechanisms. *Br J Cancer* 2001;85:1233-1239.
- [20] Li YQ, Chen P, Haimovitz-Friedman A, Reilly RM, Wong CS: Endothelial apoptosis initiates acute blood-brain barrier disruption after ionizing radiation. *Cancer Res* 2003;63:5950-5956.
- [21] Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, Palmer TD: Irradiation induces neural precursor cell dysfunction. *Nat Med* 2002;8:955-962.
- [22] Monje ML, Toda H, Palmer TD: Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 2003;302:1760-1765.
- [23] Tofilon PJ, Fike JR: The radioresponse of the central nervous system: a dynamic process. *Radiat Res* 2000;153:357-370.
- [24] Zhao W, Robbins ME: Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: therapeutic implications. *Curr Med Chem* 2009;16:130-143.
- [25] Abayomi OK: Pathogenesis of irradiation-induced cognitive dysfunction. *Acta Oncol* 1996;35:659-663.
- [26] Abayomi OK: Pathogenesis of cognitive decline following therapeutic irradiation for head and neck tumors. *Acta Oncol* 2002;41:346-351.

- [27] Roman DD, Sperduto PW: Neuropsychological effects of cranial radiation: current knowledge and future directions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;31:983–998.
- [28] Rola R, Raber J, Rizk A, Otsuka S, Van den Berg SR, Morhardt DR, Fike JR: Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Exp Neurol* 2004;188:316–330.
- [29] Hideghéty K, Plangár I, Mán I, Fekete G, Nagy Z, Volford G, Tőkés T, Szabó E, Szabó Z, Brinyiczki K, Mózes P, Németh I: Development of a small-animal focal brain irradiation model to study radiation injury and radiation-injury modifiers. *Int J Radiat Biol* 2013;89:645–655.
- [30] Kalm M, Karlsson N, Nilsson MK, Blomgren K: Loss of hippocampal neurogenesis, increased novelty-induced activity, decreased home cage activity, and impaired reversal learning one year irradiation of the young mouse brain. *Exp Neurol* 2013;247:402–409.
- [31] Dinarello CA: Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095–2147.
- [32] Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ: The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487–501.
- [33] Marquette C, Linard C, Galonnier M, Van Uye A, Mathieu J, Gourmelon P, Clarençon D: IL-1 β , TNF- α and IL-6 induction in the rat brain after partial-body irradiation: Role of vagal afferents. *Int J Radiat Biol* 2003;79:777–785.
- [34] Liu YP, Lin HI, Tzeng SF: Tumor necrosis factor- α and interleukin-18 modulate neuronal cell fate in embryonic neural progenitor culture. *Brain Res* 2005;1054:152–158.
- [35] Vezzani A, Moneta D, Richichi C, Aliprandi M, Burrows SJ, Ravizza T, Perego C, De Simoni MG: Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia* 2002;43:30–35.
- [36] Tőkés T, Varga G, Garab D, Nagy Z, Fekete G, Tuboly E, Plangár I, Mán I, Szabó RE, Szabó Z, Volford G, Ghyczy M, Kaszaki J, Boros M, Hideghéty K: Peripheral inflammatory activation after hippocampus irradiation in the rat. *Int J Radiat Biol* 2014;90:1–6.
- [37] Kishimoto T: Interleukin-6: From basic science to medicine – 40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 2005;23:1–21.
- [38] Linard C, Ropenga A, Vozenin-Brotans MC, Chapel A, Mathe D: Abdominal irradiation increases inflammatory cytokine expression and activates NF- κ B in rat ileal muscularis layer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G556–G565.
- [39] Linard C, Marquette C, Mathieu J, Pennequin A, Clarençon D, Mathé D: Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-irradiation in the rat: Effect of an NF- κ B inhibitor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:427–434.
- [40] Zhou D, Yu T, Chen G, Brown SA, Yu Z, Mattson MP, Thompson JS: Effects of NF- κ B1 (p50) targeted gene disruption on ionizing radiation-induced NF- κ B activation and TNF- α , IL-1 α , IL-1 β and IL-6 mRNA expression *in vivo*. *Int J Radiat Biol* 2001;77:763–772.
- [41] Ward JL, Harting MT, Cox CS Jr, Mercer DW: Effects of ketamine on endotoxin and traumatic brain injury induced cytokine production in the rat. *J Trauma* 2011;70:1471–1479.
- [42] Monje ML, Palmer T: Radiation injury and neurogenesis. *Curr Opin Neurol* 2003;16:129–134.
- [43] Zhao C, Deng W, Gage FH: Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 2008;132:645–660.
- [44] Izquierdo I, Medina JH: Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 1997;68:285–316.

- [45] Raber J: Unintended effects of cranial irradiation on cognitive function. *Toxicol Pathol* 2010;38:198-202.
- [46] Yazlovitskaya EM, Edwards E, Thotala D, Fu A, Osusky KL, Whetsell WO Jr, Boone B, Shinohara ET, Hallahan DE: Lithium treatment prevents neurocognitive deficit resulting from cranial irradiation. *Cancer Res* 2006;66:11179-11186.
- [47] Monje M: Cranial radiation therapy and damage to hippocampal neurogenesis. *Dev Disabil Res Rev* 2008;14:238-242.
- [48] Chakraborti A, Allen A, Allen B, Rosi S, Fike JR: Cranial irradiation alters dendritic spine density and morphology in the hippocampus. *PLoS One* 2012;7:e40844.
- [49] Brown WR, Thore CR, Moody DM, Robbins ME, Wheeler KT: Vascular damage after fractionated whole-brain irradiation in rats. *Radiat Res* 2005;164:662-668.
- [50] Plangár I, Szabó ER, Tőkés T, Mán I, Brinyiczki K, Fekete G, Németh I, Ghyczy M, Boros M, Hideghéty K: Radio-neuroprotective effect of L-alpha-glycerylphosphorylcholine (GPC) in an experimental rat model. *J Neurooncol.* 2014;119:253-261.

GERINCES MODELL ALKALMAZÁSA KÜLÖNBÖZŐ SUGÁRMINŐSÉGEK RELATÍV BIOLÓGIAI EFFEKTIVITÁSÁNAK TESZTELÉSÉRE

Szabó Emília Rita^{*1}, Tőkés Tünde¹, Róbert Polanek¹, Diósdí Ákos³, Pesznyák Csilla², Czifrus Szabolcs², Hideghéty Katalin^{1,3}

¹ELI-ALPS, ELI-HU Nonprofit Kft., 6720 Szeged, Dugonics tér 13, Magyarország

²Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, 1111 Budapest, Műegyetem rkp. 3.

³Onkoterápiás Klinika, Szegedi Tudományegyetem, 6720 Szeged, Korányi Fásor 9.

[*rita.szabo@eli-alps.hu](mailto:rita.szabo@eli-alps.hu)

A kézirat beérkezett: 2018.06.12

Közlésre elfogadva: 2018.08.08

Vertebrate model to examine the biological effectivity of different radiation qualities. The main purpose of our radiobiological research was to introduce and validate the zebrafish embryo model for the ionizing radiation effects examination, and to determine relative biological effectivity (RBE) of the laser-driven ionizing radiation beam qualities. In our preliminary experiments we have performed a dose-effect examination for wild-type zebrafish embryos in different post-fertilization ages. In the present study, after careful dosimetry measurements, series of viable zebrafish embryos in different post-fertilization (hpf) time were exposed to single fraction, whole-body, 6 MV photon and to reactor fission neutron sources at the Research Institute of the Budapest University of Technology and Economics. Survival as well as various morphological abnormalities of each embryos were detected at 24 hour intervals from the irradiation up to 7 days to determine the LD₅₀ value and to define the RBE. For conventional photon source irradiation, the LD₅₀ was 20 Gy, the same destruction was detected at 2 Gy dose level delivered by the reactor fission neutrons. Therefore the RBE is 10. Dose-dependent changes were observed macroscopically and microscopically for the same dose differences. The results confirmed that the zebrafish embryo model is suitable for detecting damages caused by different types of ionizing radiation, and for comparison of different radiation qualities.

Keywords – zebrafish embryos, relative biological effectivity, fission neutron

Sugárbiológiai kutatásaink célja, a Zebradánió halembrió modell bevezetése, alkalmazása és különböző vizsgálati végpontok kidolgozása ionizáló sugárzás hatásának vizsgálatára, későbbiekben lézer indukált ionizáló sugárzás relatív biológiai hatékonyság (RBE) meghatározására. Vizsgálataink során gondos dozimetriai méréseket követően különböző poszt-fertilizációs korban lévő vad típusú embriók besugárzását hajtottuk végre 6 MV foton, valamint neutronforrással a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem kutató reaktorában. Túlélést, különböző szervi és morfológiai rendellenességeket detektáltunk a megtermékenyítést követően 24 óránként 7 napig, az LD₅₀ érték, valamint az RBE meghatározására. A 24 poszt fertilizációs (hpf) korú embriók konvencionális foton forrással való irradiációja során az LD₅₀ érték 20 Gy, azonos pusztulást határoztunk meg a reaktor neutronnal történő 2 Gy esetében, így az RBE érték 10. Dózisfüggő elváltozások voltak megfigyelhetők makroszkopikusan, illetve mikroszkopikusan, az azonos nagyságú dózis különbségek esetében. A megfigyeléseinkből származó eredményeink megerősítették, hogy a Zebradánió halembrió modell alkalmas a különböző típusú ionizáló sugárzás okozta károsodások detektálására, sugárminőségek összehasonlítására.

Kulcsszavak – Zebradánió, relatív biológiai effektivitás, neutronforrás

BEVEZETÉS

A sugárbiológia több évtizedes kutatásai nagymértékben hozzájárultak az ionizáló sugárzás hatásának megismeréséhez, amely mind a sugárvédelem fejlődését, mind széleskörű alkalmazását, a terápiás felhasználás optimalizálását tették lehetővé. A kutatások jelentősen javították a rákos sejtek pusztítását, a normál szövetműködés megőrzését, amely a sugárterápia hatékonyságának fokozását tette lehetővé javítva a terápiás indexet [1]. Az elmúlt években, jelentősen fejlődtek a sugárkezelési technikák, amelyek hozzájárultak a rákkezelés kimenetelének javulásához [2, 3]. A fokozott konformalitással rendelkező fejlett foton besugárzási technikák és a szupravezető ciklotron / szinkrotron alapú részecske gyorsító berendezések révén gyorsan terjedő hadronterápia egyre több daganatos beteg számára elérhetővé vált [4]. A töltött részecske-terápia nagyobb térbeli dózírozási pontosságot eredményez a Bragg-csúcs által jellemzett energia eloszlás miatt. További innovatív sugárzási megközelítések lehetősége merült fel, melyek tudományos értékelése folyamatban van a terápiás index további javítása érdekében, beleértve a bór neutron befogás terápiát (BNCT) [5], a nagy teljesítményű lézer impulzusokat, ultra intenzív és nagyon nagy energiájú elektronterápiát (VHEE) [6], az orvosi mikrobeam besugárzást [7] valamint a Bor Proton befogással kiegészített proton terápiát (BPFEPT) [8]. Ezen új, és korábbi hadron terápiás modalitások egyes típusainak lineáris energia átadása (LET) lényegesen nagyobb a foton/elektron nyalábokénál, fokozott biológiai hatékonyságot eredményezve. A relatív biológiai hatékonyság (RBE) meghatározása ezért kiemelt fontosságú, mind a malignus mind az ép szövetekre vonatkozóan.

A legtöbbet kutatott nagy LET és nagy RBE értékű sugárzás a neutron sugár. Bár terápiás jelentősége lényegesen csökkent, de bizonyos indikációs körben még mindig alkalmazott a neutron irradiáció. Valamint sugárvédelmi szempontból egyre fontosabb, és jó fizikai referenciája lehet más nagy LET-ű sugárzások vizsgálatához fejlesztett biológiai rendszereknek. A lakosság számára a kozmikus sugárzás a legnagyobb neutron expozíció. Magasabb neutronsugárzásnak vannak kitéve a nukleáris reaktorok dolgozói, a légitársaságok legénysége, az űrhajósok, az orvosok és a klinikai radioterápiában részt vevő betegek. A neutronok biológiai hatása iránti érdeklődést az űrkutatás terén elért eredmények tovább növelik. A neutronok energiafüggő biológiai hatásainak ismerete a nagyszámú kutatás ellenére sem teljes körű, bár, és más ionizáló sugárforrásokkal való összehasonlításáról, mint például a röntgen-fotonok, gamma-sugarak fotonjai és alfa részecskék jelentős mennyiségű adat áll rendelkezésre [9,10]. A sugárzás bármely típusának biológiai tulajdonságai az energiaelnyelési mintázatból származnak, amely meghatározza a DNS károsodásának és potenciális javításának tulajdonságait és mennyiségét [4].

A sejtenyészetek és a kis emlősállatok jól bevált, széles körben alkalmazott modellek a preklinikai kutatásokban. A rendkívül szelektív és a kombinált sugárzási technológia gyors fejlődésének korában új *in vivo* modellre is szükség van a különböző sugárminőségek tanulmányozásához egy komplex szervezetben [1].

A tradicionális sugárbiológiai rendszerek mellett a Zebradánió (*Danio rerio*) embrió, gerinces modell alkalmazása köztes lépést biztosít az *in vitro* sejtenyészet-alapú és kisemlősállat-vizsgálatok között. E modellszervezet számos előnnyel rendelkezik: 70% -os humán genetikai hasonlóság jellemzi, számos a fejlődéssel, DNS javítással kapcsolatos kulcsfontosságú génnel rendelkezik, melyek jól konzerváltak a két faj között és megfelelnek a humán DNS szakaszoknak [11]. Mivel gerinces szervezetek, ezért komplex biológiai folyamatok vizsgálhatók esetükben. Az említett tulajdonságok mellett az embriók megközelítőleg 0,5-1 mm átmérőjűek, könnyen kezelhetők laboratóriumi körülmények között, és nem igényelnek steril feltételeket. Az embriók nagy hozama, gyors embrionális fejlődése és az

optikai átlátszósága megkönnyíti a szervek rendellenességeinek folyamatos megfigyelését [12].

Ezek a jellemzők, kombinálva a könnyű kezelhetőséggel a kísérleti körülmények között lehetővé tették, hogy a jelen tanulmányban a Zebradánió embrió rendszert alkalmazzuk foton- és neutronsugárzások okozta károsodások vizsgálatára, valamint relatív biológiai effektivitás (RBE) meghatározására.

MÓDSZEREK ÉS MÉRÉSTECHNIKA

Zebradánió embriókezelés és a besugárzás előkészítése

Kísérleteinket laboratóriumi tenyésztésű vad típusú (AB) Zebradánió embriókkal végeztük. Az elvégzett kísérleteket az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (XXXII./1838.2015) hagyta jóvá, valamint a kísérleteink során figyelembe vettük a laboratóriumi állatok gondozására és felhasználására vonatkozó irányelveket.

A kifejlett egyedeket speciális szaporító medencékben ívattuk, és az embriók a szaporítást követő reggelen lettek megtermékenyítve. *Ezt követően az embriókat összegyűjtöttük és 0,1% metilén-kék oldattal átmostuk, majd sztereo mikroszkóp (Stemi 508, Stand K LAB, Carl Zeiss) alatt szétválogattuk. Az életképes és egészséges fejlődést mutató embriókat 5 ml E3 médiumot tartalmazó 10 cm-es Petri-csészékbe helyeztük és normál körülmények között 28,5 °C-on tartottuk. A válogatást illetve fertőtlenítést követően az embriókat 96 lyukú plate-be (1 embrió/well) illetve a neutron besugárzás által megkívánt tartó edénybe (Eppendorf-csőbe) pipettáztuk, majd a besugárzást követően a lemezekben végeztük a mikroszkópos megfigyeléseket, napi fotó dokumentálást.*

Előkísérleteink során vizsgáltuk a legalkalmasabb poszt-fertilizációs (hpf) életkort. Ehhez 1 hpf, 3 hpf, 6 hpf, 24 hpf embriókat irradiáltunk foton forrással, 0, 5; 10; 15, 20 Gy dózisszinteken. *A pharyngula periódusban (24 hpf) lévő embriókat 0–2,5 Gy neutron és 0-20 Gy referencia sugárral az RBE meghatározás céljából sugaraztuk be.*

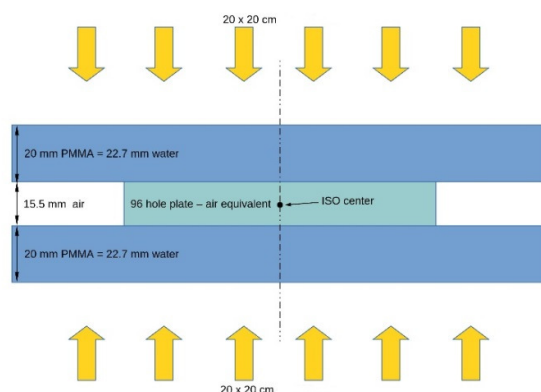
A kísérleteket háromszor ismételtük mindkét intézetben, ugyanazon fejlettségi stádiumban lévő embriók alkalmazásával és az értékelést 168 órával a besugárzás után végeztük. A különböző intézetekbe való szállításhoz az embriók számára szükséges állandó standard 28,0 °C-os hőmérsékletet, hordozható inkubátor (Ranger MX45, Lynd Products) biztosította.

A besugárzás beállítása és tesztelése

Foton besugárzás

A dózis-hatás görbék, valamint az RBE meghatározásához, referencia sugárforrásként lineáris gyorsító által létrehozott 6 MV-fotont használtunk (Primus2 Siemens, Onkoterápiás Klinika, Szegedi Tudományegyetem).

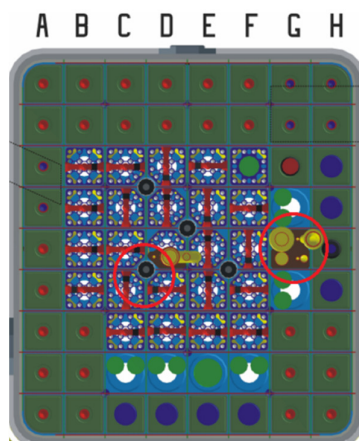
Az embriókat tartalmazó 96 lyukú lemezeket két (2 cm vastagságú) polimetil-metakrilát (PMMA) lapok közé helyeztük a kiegyenlítő hatás kompenzálására, a homogén sugárterhelés biztosítására. Az izocentrum a lemezek geometriai központjában volt. A tervezett dózisok felezve lettek leadva, egyik fele fentről (gantry szög 0°), a másik fele alulról (gantry szög 180°), ezáltal is maximalizálva a 20x20 cm-es sugármező homogenitását (1. ábra). Ez az izocentrikus beállítás biztosította, hogy az embriók mozgásából származó dózis-bizonytalanság kiküszöbölhető legyen. A csoportokat szobahőmérsékleten 5–20 Gy közötti dózistartományban 5 Gy-es növekedéssel adtuk, 3 Gy/perc dózisteljesítmény mellett, és a forrás felületi távolság (SSD) 100 cm volt.



1. ábra. A sugárterhelés kísérleti beállítása

Neutron besugárzás

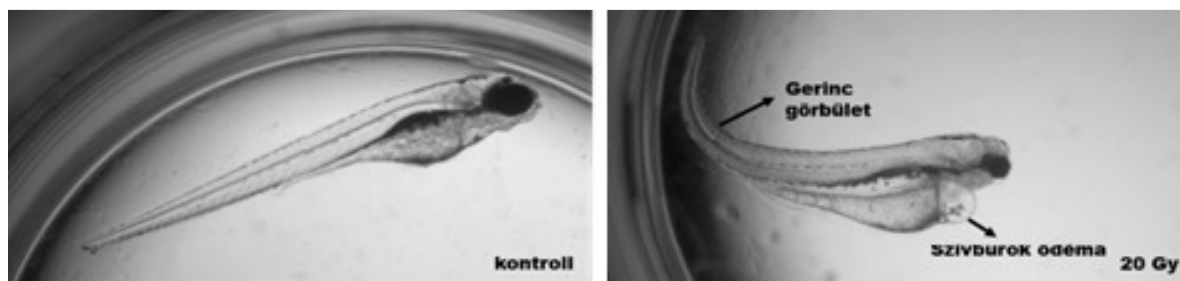
A neutron besugárzást a Budapesti Műszaki Egyetem Oktató reaktorában a pneumatikus csőposta rendszerrel végeztük (2. ábra). A pneumatikus polietilén csőrendszer külső átmérője 25 mm, a fal vastagsága 2 mm, belső átmérője 21 mm. A cső közepébe egy polietilénből készült műanyag besugárzási tok helyezhető el, ami maximálisan 30 g tömegű minta besugárzását teszi lehetővé. A tok 50 mm hosszú és 14 mm az átmérője. A besugárzási idő 2 másodperctől 2 óráig lehetséges, és a minta szállítási ideje 3 s. A pneumatikus csőposta rendszer kétféle indító-fogadó állomással rendelkezik: az egyik a „gyors” csatorna, ami a reaktor aktív zónájának a közepébe viszi a mintát, a másik a termikus csatorna, ami a zóna szélén található és víz veszi körül (2. ábra „G”). Az embrió besugárzások a termikus csatornában történtek. A reaktor teljesítménye a kísérlet során 200 W volt, a besugárzás 36, 49, 63 és 72 s volt. A besugárzás helyén a dózisteljesítmény Monte Carlo MCNP szimulációval lett kiszámolva. A Monte Carlo modellt a neutron-fluxus és a dózisteljesítmény-mérések segítségével validálták az aktív zónában és annak környezetében. A számítások szerint a besugárzás helyén a neutronok és fotonok (gamma-sugárzás) dózisteljesítménye $1,27 \pm 0,04$ Gy / perc. Ennek megfelelően a kísérletek során kapott dózisok kb. 0,76 és 1,52 Gy volt a 36 s és 72 s hosszú besugárzás esetén, a besugárzás bizonytalansága 0,14 Gy/perc.



2. ábra: A pneumatikus csőposta rendszer termikus csatornája a „G” oszlopában található.

Vizsgálati végpontok elemzése

A két eltérő sugárminőséggel megtörtént besugárzást követően az embriók fejlődési státuszát, az életképességet és a különböző morfológiai rendellenességeket rendszeresen detektáltunk 24 óránként a besugárzást követően 168 óráig. Az életképességet Zeiss Axio Imager Z1 fényáteresztő inverz mikroszkóppal végeztük 10x és 20x nagyításon, valamint reprezentatív képeket rögzítettünk AxioCam MR5 kamera segítségével a deformált egyedek esetében. A 3. ábra, a súlyosabb morfológiai rendellenességeket mutatja, mint a szívburok ödéma és a gerinc görbület, amelyeket feljegyeztünk és értékeltünk a túlélés mellett, RBE meghatározás vizsgálati végpontjaként. A megfigyelési periódust minden manipuláció nélkül hajtottuk végre, kivéve a friss embrió médium adagolást, mely kétnaponta történt. Az embrionális túlélésre vonatkozó kritérium a szív összehúzódások jelenléte valamint a sejtáramlás volt. A túlélést és a morfológiai rendellenességeket az élő egyedek arányában értékeltük ki a következők szerint: Túlélés % = túlélő egyedek száma / az embriók teljes száma; Torzulás % = a rendellenességgel rendelkező egyedek száma / a túlélő embriók teljes száma.



3. ábra. Zebradánió besugárzás utáni morfológiai elváltozásai

A szövettani vizsgálathoz a kontroll és a kezelt embriók csoportjainak egyedeit 7 napos mikroszkópos megfigyelés után, 4 mg / ml trikain-metánszulfonát (Sigma-Aldrich TM) 1: 100 hígításban lettek bódítva ezt követően 3 napig fixálva 4%-os formalinba. A fixálás megtörténte után az embriók paraffinba lettek ágyazva, majd 4 µm vastagságú metszetek készültek belőlük, melyeket hematoxilin-eozinnal festettünk. A metszeteket Zeiss Axio Imager Z1 fénymikroszkóppal elemeztük, 5x és 20x nagyításokon, illetve reprezentatív képek lettek készítve a szövettani elváltozásokról. Kezelt csoportonként 15 egyed vizsgálata történt meg.

Statisztikai analízis

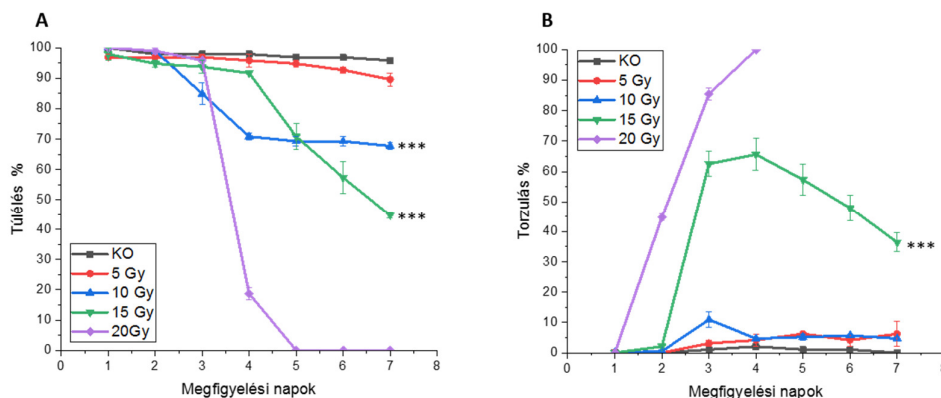
Az adatok analízise Origin 2017 64 bit statisztikai szoftver segítségével történt. Mindegyik kísérlet háromszor lett megismételve, 96 embrióval (n = 96) minden csoportban. Az ábrákban az értékeket a három egyedi vizsgálat átlaga ± szórásával (SD) fejezzük ki, p értékeket < 0,05 tekintettük szignifikánsnak. A túlélési görbék összehasonlítására log-rank tesztet alkalmaztunk Bonferroni korrekcióval. A torzult csoportok közötti szignifikáns különbségek statisztikai meghatározásához Chi-négyzet próbát alkalmaztunk.

EREDMÉNYEK

Túlélési végpont az RBE meghatározásához

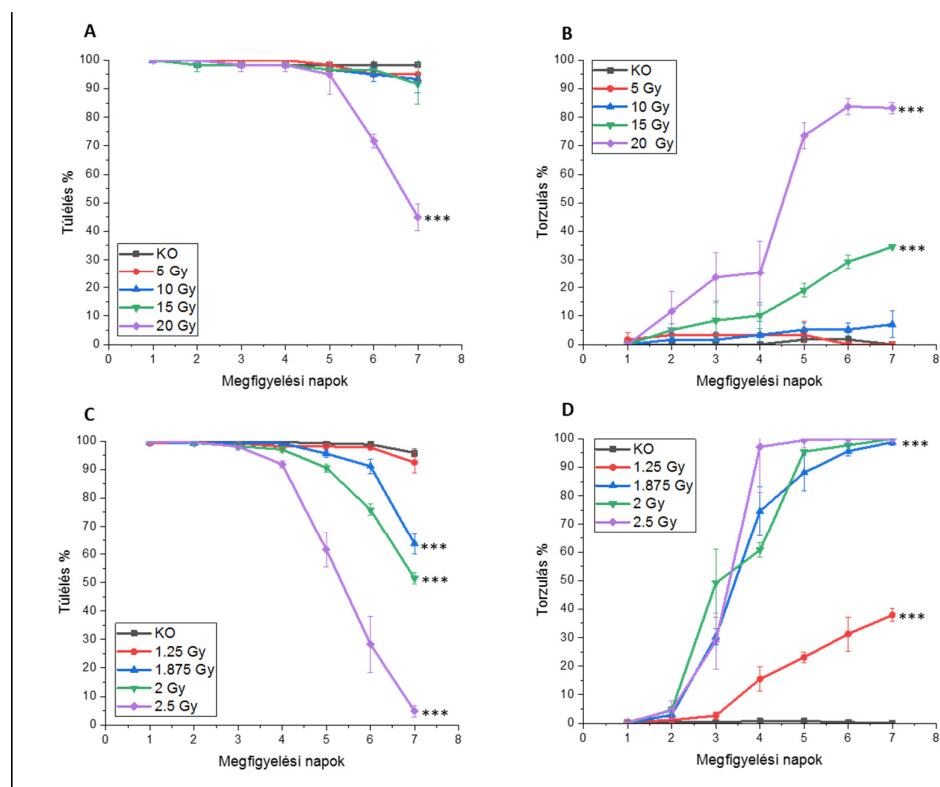
Az embriók túlélése erős összefüggést mutatott az embriók korával, valamint a dózis szintekkel. A hétnapos megfigyelési periódus alatt, a megtermékenyítést követő 6 órában besugárzott embriók esetében nem volt releváns halálozás 5 Gy-es csoportokban, míg 20 Gy esetében több mint 80% már a megfigyelést követő 4. napon elpusztult. A 4-5. naptól kezdve

a túlélési görbe 10 és 15 Gy-el besugárzott csoportok esetén szignifikáns csökkenést mutatott. A 7. napon az embriók 70% -a volt életben a 10 Gy-es csoportokban, és 50%-os túlélést lehetett meghatározni a 15 Gy-vel besugárzott csoportok esetében. Ezért a 6 hpf embriók esetében a 15 Gy dózis szinten volt meghatározható az LD₅₀ érték (4. ábra A). 100%-os mortalitás fordult elő 20 Gy-vel besugárzott csoportok esetében az 5. napon, és a legtöbb egyed pusztulását súlyos morfológiai rendellenesség előzte meg (4. ábra B).



4. ábra. Foton sugárzás hatása a 6 hpf Zebradánio embriók fejlődésére és a túlélésre. A. dózis-hatás ábrázolása, B. morfológiai rendellenességek napi megfigyelésének értékelése.

Az ionizáló sugárzásra a 24 órás embriók kevésbé voltak érzékenyek, esetükben az LD₅₀ érték 20 Gy-nek minősült a hetedik napon. Az alacsonyabb dózisok (5–15 Gy) kisebb mértékben befolyásolták az embriók túlélését (5. ábra A). Különböző fejlődési rendellenességeket tudtunk detektálni, mint például szívburok ödéma, gerinc görbülete, test megrövidülése és a szem méretének csökkenése az 5 Gy-nél magasabb dózis szinteken. Az embriók 60-80%-a, amelyek 15-20 Gy-nek lettek kitéve a megfigyelés harmadik napján releváns fejlődési rendellenességet mutattak (5. ábra D). A túléléshez hasonlóan a morfológiai elváltozások megjelenése és mértéke az embriók korától illetve a leadott dózistól függően jelentkeztek.



5. ábra. Foton és neutronsugárzás hatása a túlélésre, valamint a torzulásra 24 órás embriók esetében.

A további kísérleteink a neutronsugárzás biológiai hatásának vizsgálatára vonatkoztak. Ez esetben is túlélést vizsgáltunk 7 napon keresztül 24 órás embriók felhasználásával, és az LD_{50/7} értéket 2 Gy-nél határoztuk meg. A besugárzást követő hetedik napon a 2,5 Gy-nél a teljes csoport pusztulást mutatott (5. ábra C). Torzulások tekintetében már a harmadik napon jelentkeztek az elváltozások. A negyedik napon pedig a 2,5 Gy-es csoport 90%-a mutatott valamilyen rendellenességet. Még a legalacsonyabb besugárzásnál (1,25 Gy) is jól megkülönböztethető eltéréseket tapasztaltunk a kontroll csoporthoz képest (5. ábra D).

A túlélési görbék vizsgálata során (5. ábra A, C), az LD_{50/7} értékei, 2 Gy a hasadásos neutron és a γ -sugárzás esetében 20 Gy volt, így az RBE 10-re határozható meg.

$$\text{RBE} = \frac{6 \text{ MV foton LD}_{50/7}}{1 \text{ MeV neutron LD}_{50/7}} = \frac{20 \text{ Gy}}{2 \text{ Gy}} = 10$$

Egyszerűsített megközelítést alkalmaztunk az élő embriók látható fejlődésbeli rendellenességeinek vagy morfológiai változásainak (gerinc görbület, perikardiális ödéma) rögzítésére. A sugárzást követő 4. és 5. napi megfigyelés esetében a különböző morfológiai rendellenességek értékelhető adatokat szolgáltatottak a különböző sugárzás-minőségek összehasonlításához, ami egyezést mutat a túlélési vizsgálatok eredményeivel. A hatodik sugárzás utáni napon az életképes embriók számának csökkenése növelte a malformáció elemzés bizonytalanságát.

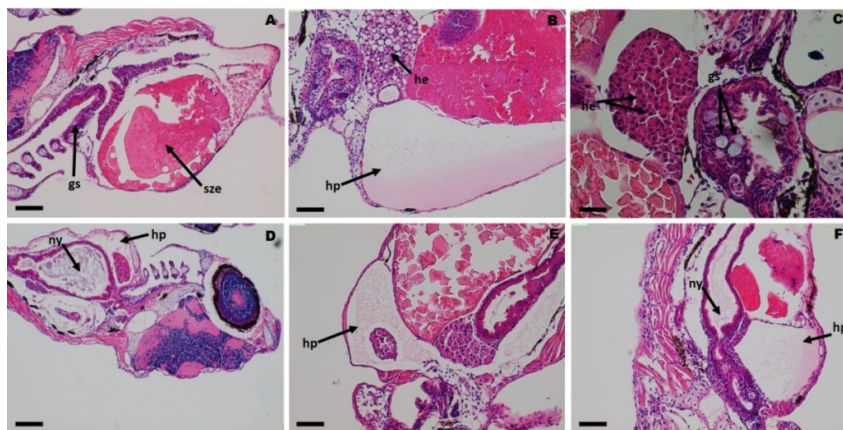
Hisztológiai értékelés

A hisztopatológiai vizsgálat számos elváltozást mutatott, például a nyálkahártya eltűnését és a szubkután ödéma kialakulását 10 Gy-el illetve 20 Gy-el besugárzott csoportok esetében, melyek 6 hpf-en és 24 hpf-en voltak kezelve. A megfigyelt egyedekben az idegszövet normális volt. A 6 hpf 5 Gy-el besugárzott egyedek esetében megfigyelhető volt a kopolytű

többrétegű hámjában a goblet sejtek megfogyása (6. ábra A). A szövettani analízis dóziszfüggő perikardiális romlást mutatott, mint pl. enyhe fokú hydropericardium (hp) (6. ábra D) a legalacsonyabb dózisszinten, és ugyanez a rendellenesség kifejezőbb volt a magasabb dózis szinteken (6. ábra B, E, F).

A hepatocyták egyszerű patológiás jelei voltak megfigyelhetők 10 Gy dózis szinten (6. ábra B) valamint a 20 Gy-vel kezelt csoportok egyedei esetében is (6. ábra C). A mikroszkópos megfigyelések során arra a következtetésre jutottunk, hogy minden besugárzott egyed esetében észlelhető volt a vesekárosodás. Továbbá zavarokat lehetett meghatározni a szik hólyag esetében is, nagymértékű ödéma volt megfigyelhető a 10 vagy 20 Gy-vel besugárzott csoportokban, melyek a megtermékenyítést követő 24 órában voltak kezelve. Ezen kívül látható volt, hogy a szikanyag állományában vakuólumok jelentek meg a 6 hpf 5 Gy hatásának kitett csoportban (6. ábra A).

Végül meghatároztuk a sugárzás kórszövettani hatását a fejlődő gasztrointesztinális rendszerre. Mindegyik besugárzott csoportban nagy mennyiségű nyálka volt jelen a bélfluxusban (6. ábra D) és a 20 Gy-el besugárzott csoportban, a bélnyálkahártyában számos goblet sejt volt megtalálható (6. ábra C). A 20 Gy-vel kezelt csoportban szabálytalan alakú sejtek és nagyobb, hiperkróm magok voltak megfigyelhetők. Az oszlopos sejtek mérsékelten rendezetlenek, valamint a citoplazma szélesebb volt a bélrendszerben.

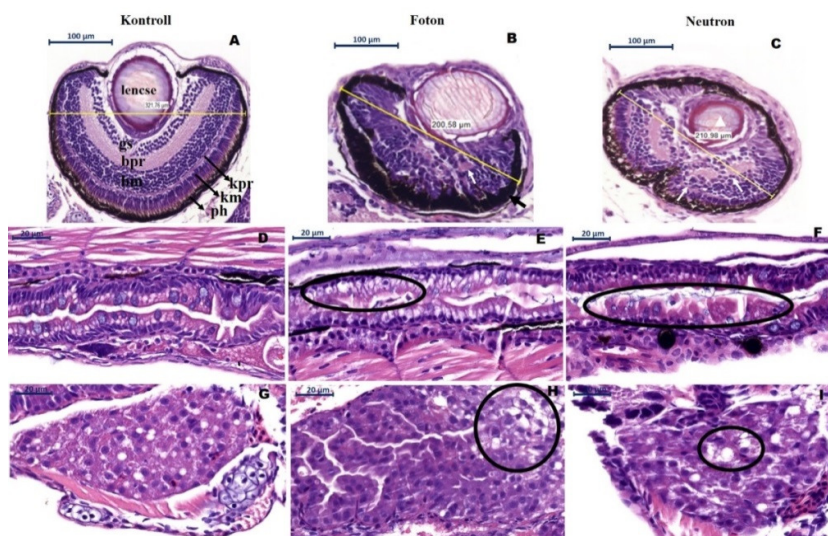


6. ábra. A besugárzott embriók különböző szövettani elváltozásai. **A.** a kopolytű többrétegű hámjában a goblet sejtek (gs) megfogyása volt megfigyelhető, a szikzacskó vizenyővel (sze), a szikanyag állománya vakuólumokkal jellemezhető. **B.** súlyos hydropericardium (hp), szöveti vizenyő, hepatocyták hydropikus (he) és patológiás egyszerű zsíros elfajulása. **C.** pycnotikus magvú hepatocyták (he), a bél lumenében kis mennyiségű nyálka volt megfigyelhető, goblet sejtek (gs) a bél nyálkahártyájában. **D.** A vékonybél lumenében nagy mennyiségű nyálka (ny) volt megfigyelhető. Mellette enyhe fokú hydropericardium (hp) alakult ki. **E.** súlyos fokú savós-fibrines jellegű hydropericardium (hp). **F.** súlyos hydropericardium (hp), a bél lumenében nagy mennyiségű nyálka (hurut) volt megfigyelhető. HE. 90X. Scale bar 200 μ m.

A különböző sugárminőség közötti szövettani elváltozások vizsgálatára a szem, a gyomor-bélrendszer és a máj elemzésére került sor a különböző szövet típus sugárzási válaszáinak meghatározása céljából. A koronális metszetek vizsgálata során a szemek térfogata és rétegszerkezete elváltozást mutatott a vizsgált egyedek esetében. A normál nem kezelt embrió retina sejtrétegei a következők: ganglion sejtréteg (gs), belső plexiform réteg (bpr), belső magréteg (bm), külső plexiform réteg (kpr), külső magréteg (km) pigmentált hám (ph) (7. ábra A). A különböző típusú ionizáló sugárkezelés hatására a retinális rétegek jelentősen megváltoztak. A belső és külső plexiform réteget (bpr, kpr) nehéz elkülöníteni, szinte

hiányzik (7. ábra B, C), vagy egyes egyedekben teljesen eltűnt. A retinális pigmentált hám (ph) specifikusan megvastagodott mind a foton (7. ábra B), mind a neutron besugárzás hatására (7. ábra C). Mindezek a sejt elváltozások nagyobb mértékben jelentkeztek a magasabb dózisszinteken. A besugárzás a szemlencse elhomályosítását eredményezte, térfogat veszteséget (7. ábra C fehér háromszög) valamint a szem átmérőjének jelentős csökkenésével járt a kontrollhoz képest mely $321,76 \pm 21 \mu\text{m}$ valamint $200,58 \pm 21 \mu\text{m}$ volt a foton, $210,98 \pm 32 \mu\text{m}$ a neutron besugárzás esetében.

A kontroll egyedekkel ellentétben a besugárzott mintákban a sugárzás a gasztrointesztinális rendszer szövetének dezorganizációjához és az ezt követő mikroerózióhoz vezetett. A goblet sejtek száma részleges csökkenést mutat a 20 Gy-es foton és 2 Gy neutronnal besugárzott csoportokban (7. ábra E, F, bejelölt rész). A szövettani vizsgálatok során a májban dózisfüggő elváltozások voltak észlelhetőek, a kezelt csoportokban a szövet lazulását és dezorganizációját figyeltük meg (7. ábra H, I). A neutronnal besugárzott csoportokban, a májsejtekben agresszív nekrozis is megfigyelhető volt.



7. ábra. Sugárzás okozta különböző szöveti elváltozások. Túlélő embriók esetén 168 hpf expozíció után H&E festett metszetek A szem; D bélrendszer; G máj - kontroll, B szem; E bélrendszer; H máj - foton 20 Gy, C szem; F bélrendszer; I máj - neutron 2 Gy. Az A ábra a különböző sejtrétegeket mutatja: lencse, bpr és kpr belső és külső plexiform réteg; gs ganglion sejtréteg; bm és km belső és külső magréteg valamint a ph retinális pigmentált hám. (20x nagyítás, 100 μm). A neutronnal kezelt embriók esetében csökkent a szemlencse térfogata C (fehér háromszög). A sugárzás hatására a belső és külső plexiform rétegeket nehéz volt megkülönböztetni, esetlegesen el is tűntek (B, C fehér nyílak), valamint a pigmentált hám megvastagodást mutatott (B, fekete nyíl). A sugárzási típusoktól függetlenül a megfigyelt egyedek esetében a goblet sejtek száma a bélrendszerben csökkenést mutatott (E, F bekarikázott rész). A H, I fekete körökben a szövetek lazulása, a sejtek rendezetlensége és a májsejtek nekrozisa volt megfigyelhető.

KÖVETKEZTETÉS

A Zebradánió halembrió rendszer megbízható *in vivo* modellnek bizonyult, a különböző ionizáló sugárzások biológiai hatásainak vizsgálatára, valamint az RBE meghatározására. Nagyszámú egyedek felhasználásával a túlélési arány jól reprodukálható eredményeket

mutatott a különböző kezelések esetében. E gerinces modell további fejlesztése, kvantitatív végpontok kidolgozásával, így a morfológiai károsodások és a szövettani változások mennyiségi értékelésével jelentősen hozzájárul a jövőben a különböző sugárminőségek, kombinált megközelítések akut, és késői biológiai hatásának kutatásához.

IRODALOM

- [1] Steel G. G: Basic Clinical Radiobiology, First published in Great Britain, 1993.
- [2] Peeters A, Grutters JP, Pijls-Johannesma M, Reimoser S, De Ruyscher D, Severens JL, Joore MA and Lambin P 2010 How costly is particle therapy? Cost analysis of external beam radiotherapy with carbon-ions, protons and photons *Radiother Oncol.* 95 45-53
- [3] Allemani C et al and CONCORD Working Group 2015 Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet.* 385 977-1010
- [4] Specht HM, Neff T, Reuschel W, Wagner FM, Kampfer S, Wilkens JJ, Petry W and Combs SE 2015 Paving the Road for Modern Particle Therapy - What Can We Learn from the Experience Gained with Fast Neutron Therapy in Munich? *Front Oncol.* 5 262
- [5] Barth RF et al 2012 Current status of boron neutron capture therapy of high grade gliomas and recurrent head and neck cancer *Radiat Oncol.* 7 146
- [6] Schüler E, Eriksson K, Hynning E, Hancock SL, Hiniker SM, Bazalova-Carter M, Wong T, Le QT, Loo BW Jr and Maxim PG 2017 Very high-energy electron (VHEE) beams in radiation therapy; Treatment plan comparison between VHEE, VMAT and PPBS. *Med Phys.* 44 2544-55
- [7] Bräuer-Krisch E et al 2015 Medical physics aspects of the synchrotron radiation therapies: Microbeam radiation therapy (MRT) and synchrotron stereotactic radiotherapy (SSRT) *Phys. Med.* 31 568-83
- [8] Yoon D.K., Jung J.Y. and Suh T.S 2014 Application of proton boron fusion reaction to radiation therapy: A Monte Carlo simulation study *Appl. Phys. Lett.* 105 223507
- [9] Candy Y.P. Ng, Eva Y. Kong, Alisa Kobayashi, Noriyoshi Suya, Yukio Uchihori, Shuk Han Cheng, Teruaki Konishi, and Kwan Ngok Yu 2016 Non-induction of radioadaptive response in zebrafish embryos by neutrons *J Radiat Res.* 57 210–219
- [10] C.Y.P.Ng, E.Y.Kong, A. Kobayashi, N.Suya, Y.Uchihori, S.H.Cheng, T. Konishi, K.N.Yu 2015 Neutron induced bystander effect among zebrafish embryos *Radiat Physics and Chem.* 117 153-159
- [11] Geiger GA, Parker SE, Beothy AP, Tucker JA, Mullins MC, Kao GD. Zebrafish as a “Biosensor”? Effects of Ionizing Radiation and Amifostine on Embryonic Viability and Development. *Cancer Res* 2006; 66:8172-81
- [12] McAleer MF, Davidson C, Davidson WR, Yentzer B, Farber SA, Rodeck U, et al. Novel use of zebrafish as a vertebrate model to screen radiation protectors and sensitizers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 61:10-3