

# 10

## KROMOSOMIANALYYSI ALTISTUSSELVITYKSESSÄ

Carita Lindholm

### SISÄLLYSLUETTELO

10.1	Yleistä .....	142
10.2	Säteilyn aiheuttamat kromosomivauriot .....	142
10.3	Annosarviointi lyhyen ajan kuluessa altistuksesta .....	142
10.4	Taannehtiva säteilyannosarviointi .....	146

## 10.1 | Yleistä

---

Kromosomianalyysiä käytetään ihmisen saaman säteilyaltistuksen arvioinnissa silloin, kun epäillään annosylitystä, eikä henkilökohtaista annosmittaria ole käytetty. Analyysi voidaan tehdä myös silloin, kun fysikaalisin keinoin suoritettu annosmittaus halutaan varmentaa. Kromosomianalyysi on tärkein säteilyannoksen määrittämiseen tähtäävistä biologisista menetelmistä. Säteily aiheuttaa solun kromosomeihin vaurioita, joiden määrän perusteella säteilyannos voidaan selvittää. Kromosomivaurioita tutkitaan mikroskoopin avulla yleensä ääreisverenkierron imusoluista eli lymfosyyteistä, jotka on stimuloitu jakautumaan soluviljelyssä.

## 10.2 | Säteilyn aiheuttamat kromosomivauriot

---

Kromosomivauriot näkyvät solun jakautumisvaiheessa, jolloin tuman DNA on tiiviisti pakkautunutta. Vauriot ovat seurausta DNA-molekyylissä tapahtuneista, ionisoivan säteilyn aiheuttamista kaksoisjuostekatkoksista, joita solun korjausmekanismit eivät ole korjanneet, tai ovat korjanneet väärin. Kromosomivaurioita on useita eri tyyppisiä. DNA-katkosten virheellisen korjaamisen ansiosta muodostuu rakenteellisia muutoksia, joissa kromosomien välillä tai kromosomin sisällä on tapahtunut materiaalin uudelleenjärjestäytymistä. Kahdessa eri kromosomissa tapahtuneet DNA-katkokset voivat virheellisen korjauksen vuoksi johtaa joko niin sanottuun disentriseen kromosomiin, jossa samassa kromosomikappaleessa nähdään kaksi kurouma-aluetta, tai translokaatio-kromosomin muodostumiseen, jolloin kahden kromosomin välillä on tapahtunut materiaalin vaihto. Jos DNA-katkosten korjausta ei tapahdu lainkaan, nähdään irrallisia kromosomipalasia. Yleisimmät kromosomivauriotyypit on esitelty kuvassa 10.1.

## 10.3 | Annosarviointi lyhyen ajan kuluessa altistuksesta

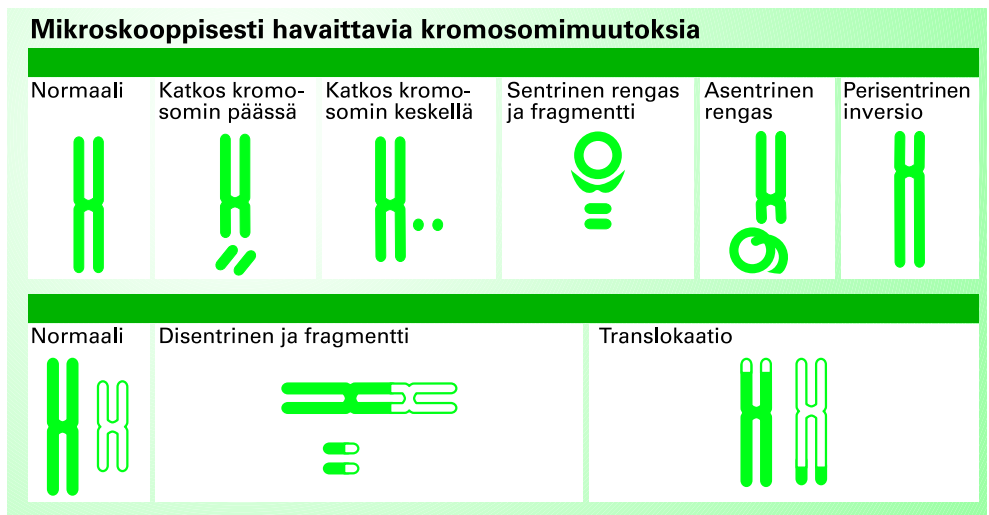
---

### Menetelmä

Lyhyen ajan kuluessa säteilyaltistuksesta suoritettava annosarviointi tehdään tutkimalla disentrisiä kromosomeja lymfosyyteistä. Lymfosyyttien etu moneen muuhun solutyyppiin nähden on niiden helppo saatavuus verinäytteen avulla. Lisäksi verenkierrossa olevat lymfosyytit ovat lepovaiheessa, joten ne voidaan stimuloida jakautumaan viljelyolosuhteissa, ja mah-

dolliset DNA molekyyliissä tapahtuneet vauriot saadaan näkyviin. Verinäyte otetaan kyynärtaipeen laskimosta heparinoituun näyteputkeen. Näytteenotto suoritetaan aikaisintaan 24 tuntia säteilyaltistuksen jälkeen, jotta varmistetaan imusolujen tasainen jakautuminen verenkierrassa. Toisaalta näytteenotto tulisi suorittaa enintään neljä viikkoa altistuksesta, koska analyysin teho heikkenee tämän jälkeen. Jos epäillään hyvin suurta säteilyaltistusta, näyte on otettava parin päivän sisällä altistuksesta, sillä valkosolujen määrä verenkierrassa saattaa pudota ratkaisevasti tämän jälkeen, eikä riittävää solumäärää saada talteen. Kromosomianalyysi suoritetaan mahdollisimman tuoreesta, mieluummin korkeintaan vuorokautta aikaisemmin otetusta verinäytteestä.

Kokoverestä tehdään lyhytaikaiset soluviljelyt ravinneliuokseen, johon on lisätty T-lymfosyyttien jakautumista stimuloivaa mitogeneä, fytohemagglutiniinia (PHA). Viljelypullot tai -putket sijoitetaan 48 tunniksi +37°C viljelykaappiin. Muutama tunti ennen tämän ajan päättymistä viljelyihin lisätään solujen jakautumista estävää kemikaalia, kolkisiinia, joka pysäyttää solut spesifiseen kohtaan jakautumisvaihetta, eli metafaasiin, jossa kro-



**KUVA 10.1 Mikroskooppisesti havaittavia kromosomivaurioita**

Kromosomivaurio voi tapahtua joko yhden kromosomin sisällä tai kahden (tai useamman) kromosomin välillä. Säteilyn annosarvioinnissa on tähän asti käytetty lähinnä helposti tunnistettavia disentriisiä kromosomeja. Uudet niin sanotut kromosomimaalausmenetelmät (FISH, fluoresenssi *in situ* hybridisaatio) ovat mahdollistaneet myös translokaatioiden tehokkaamman havaitsemisen. Menetelmässä osa kromosomeista "maalataan" käyttämällä hyväksi näille kromosomeille spesifisiä DNA-koettimia ja niihin liitettyjä fluoresoivia väriaineita.

mosomit näkyvät hyvin selvästi. Soluja turvotetaan ylimääräisen sytoplasmän poistamiseksi ja lopuksi suoritetaan solujen fiksointi, eli kiinnitetään solun muoto ja rakenteet. Solususpensiosta tehdään objektilaseille preparaattit, jotka värjätään kromosomivärillä. Kromosomeja voidaan tämän jälkeen tutkia valomikroskoopin avulla.

Preparaatilta etsitään metafaaseja pienellä suurennoksella. Kromosomi-analyysi tapahtuu suuremmalla, noin 1 000-kertaisella suurennoksella. Jotta metafaasi voidaan hyväksyä analysoitavaksi, siinä on oltava 46 kromosomien kurouma-aluetta, niin sanottua sentromeeria. Kaikki havaitut kromosomivauriot kirjataan ylös. Ihmisen saaman säteilyannoksen arvioinnissa käytetään disentrinen kromosomien frekvenssiä näytteessä, eli disentrinen lukumäärää analysoitujen metafaasien määrää kohden. Disentriset ovat helposti havaittavia ja niiden tausta-arvo kontrolliväestössä on suhteellisen pieni. Vain ne disentriset kromosomit, joiden yhteydessä nähdään sellainen asentinen fragmentti joka kokonsa puolesta sopii disentrinen muodostumiseen, otetaan mukaan annosarviointiin. Esimerkki disentrinen kromosomin sisältävästä metafaasista on kuvassa 10.2, katso kuvaliite kirjan lopussa.

## Annosarviointi

Annosarviointi tapahtuu vertaamalla analyysissä saatua disentrinen kromosomien frekvenssiä kokeellisesti aikaansaatuun annosvastekäyrään. Käyrää varten verta säteilytetään koeputkissa eri annoksilla, ja käsitellään sen jälkeen kuten edellä. Useimmissa biologisen dosimetrian laboratorioissa annosvastekäyrä perustuu hyvin akuutteihin eli alle puoli tuntia kestäviin säteilytysaikoihin. Havaituista disentrinen kromosomien määristä eri annoksilla muodostetaan sovite, joka matalan LET-säteilyn ollessa kyseessä noudattaa lineaaris-kvadraattista yhtälöä

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2 \quad (10.1)$$

jossa Y on disentrinen kromosomien frekvenssi näytteessä, C disentrinen tausta-arvo väestössä, D on absorboitunut kokokehoannos,  $\alpha$  on lineaarinen ja  $\beta$  kvadraattinen käyräkerroin. Analysoimalla 500 metafaasia pystytään toteamaan pienimmillään noin 100 mGy:n akuutti kokokehoannos gamma- tai röntgensäteilyä. Mikäli kyseessä on korkea säteilyaltistus, vaurioiden määrä on suuri, ja annos pystytään luotettavasti arvioimaan pienemmän metafaasimäärän avulla. Esimerkiksi yhden grayn annos voidaan määrittää riittävällä tarkkuudella 200 metafaasin avulla.

Disentristen avulla voidaan luotettavasti arvioida korkeintaan 6–8 Gy:n annos röntgen- tai gammasäteilyä. Tieto säteilylähteen laadusta on oleellista disentrisiin perustuvassa annosarvioinnissa, sillä säteilyn energiansiirtokyvyn kasvaessa disentristen ja säteilyannoksen välinen yhteys muuttuu lineaariseksi (esimerkiksi neutronisäteily). Annosarvion epävarmuus ilmoitetaan yleensä 95 prosentin luotettavuusvälinä. Luotettavuusväli määrittää tällöin ne rajat, joiden sisällä annosarvio on oikea 95 prosentissa tapauksista. Annosarvion epävarmuus määräytyy näytteessä olleiden disentristen kromosomien Poisson-jakauman lisäksi itse annosvastekäyrään liittyvästä epävarmuudesta.

Lineaaris-kvadraattiseen annoskäyrään perustuva säteilyannoksen arviointi on kaikkein luotettavin niissä tapauksissa, joissa altistus on mahdollisimman samankaltainen kokeellisesti suoritettujen säteilytyksen kanssa. Täsmällisin annosarvio saadaan siis tapauksissa, joissa koko kehoon on kohdistunut tasainen altistus hyvin lyhyen ajan sisällä. Annosylitystapauksissa, kuten säteilyonnettomuuksissa, altistuminen saattaa tapahtua useamman tunnin tai päivän kuluessa, jolloin akuuttia annosvastekäyrää ei voida suoraan käyttää. Pidemmän ajan kuluessa tapahtunut altistus tuottaa vähemmän disentrisiä kuin sama annos akuuttina altistuksena tuottaa. Altistusajan vaikutus voidaan huomioida annosarviointia tehtäessä ajasta riippuvaisen korjauskertoimen avulla. Tällöin kvadraattinen käyräkerroin pienenee altistusajan pidentyessä. Lopulta, kun kyseessä on yli vuorokauden kestävä säteilyaltistus, annosvaste on käytännössä lineaarinen.

Annosylitystapauksissa altistus saattaa olla hyvin epätasaista ja kohdistua vain tiettyyn kehon osaan. Tieto altistuksen epätasaisuudesta on tärkeää altistuneen henkilön lääketieteellisen hoidon kannalta varsinkin, kun kyseessä ovat suuret annokset. Epätasainen altistus tuottaa osaan lymfosyyteistä enemmän disentrisiä kuin tilastollinen odotusarvo antaa olettaa. Kyseistä ylihajontaa voidaan käyttää epätasaisen altistuksen mittarina. Osakehoaltistuksessa annoksen arviointi disentristen avulla suoraan akuutista annosvastekäyrästä antaa keskimääräisen annoksen koko kehoon.

Varsinaisen osakehoannoksen arviointiin on olemassa kaksi menetelmää. Toinen malli perustuu disentristen ylihajontaan kaikkien analysoitujen solujen osalta. Sen sijaan niin sanotussa Qdr-mallissa lasketaan disentristen osuus ainoastaan epästabileja kromosomivaurioita sisältävissä metafaseissa. Osakehoannoksen lisäksi molempien mallien avulla voidaan arvioida altistuneen alueen koko. Kehoon joutuneet, tiettyihin elimiin tai kudoksiin hakeutuvat radioaktiiviset aineet muodostavat myös eräänlaisen osakehoaltistuksen. Kromosomianalyysin avulla ei kuitenkaan voida arvi-

oida elimeen kohdistuneen altistuksen suuruutta. Sen sijaan, jos radionuclide jakautuu tasaisesti kehoon, kuten cesium ja tritium, niiden aiheuttama kokokehoannos voidaan arvioida disentristen määrän avulla.

Disentristen kromosomien frekvenssiin perustuva annosarviointi on laajimmin levinyt biologinen menetelmä säteilyaltistuksia selvitetessä. Pohjoismaissa analyysiä tehdään rutiininomaisesti ainoastaan Säteilyturvakeskuksesta. Annosylitystä epäiltäessä tulisi ottaa yhteys Säteilyturvakeskukseen mahdollisen kromosomianalyysin tarpeellisuuden selvittämiseksi. Tätä kirjoitettaessa analyysin hinta on noin 1 000 euroa + alv. Analyysin suorittaminen kestää noin viikon.

#### 10.4 | Taannehtiva säteilyannosarviointi

Disentristen avulla tapahtuva annosarviointi on mahdollinen suhteellisen lyhyellä aikavälillä säteilyaltistuksen jälkeen. Tämä johtuu siitä, että tutkittavien lymfosyyttien elinkaari on rajallinen. Uusia soluja tuotetaan kantatasolujen jakautumisen avulla. Disentristen määrä vähenee kuitenkin samalla, sillä tämä kromosomivauriotyyppi aiheuttaa epävakaisuutta solunjakautumisessa, ja osa soluista kuolee. Annosarvioon liittykin näin ollen suhteellisen suuria epävarmuuksia jo muutaman kuukauden kuluttua altistuksesta. Päinvastoin kuin disentristet, translokaatiotyypin vauriot ovat pysyviä, sillä ne eivät aiheuta ongelmia solunjakautumisessa joten niiden määrä ei vähene ajan kuluessa. Translokaatiot mahdollistavat säteilyannoksen määrittämisen silloinkin, kun altistuksesta on kulunut hyvinkin pitkä aika. Vain osa translokaatiokromosomeista pystytään luotettavasti havaitsemaan tavanomaisilla värjäysmenetelmillä. 1980-luvun lopulla kehitetty kromosomimaalaus-tekniikka, joka perustuu kromosomien spesifiseen tunnistamiseen DNA-koettimien avulla metafaasipreparaatilta, on helpottanut huomattavasti translokaatioiden analyysia. Koettimet saadaan näkyville niihin kiinnitetyn fluoresoivan väriaineen avulla. Yleensä koettimilla kateetaan vain kolme isoa kromosomiparia, jotka muodostavat noin 20 prosenttia koko genomista. Taustavärjäys toisella fluorokromilla tuo esille maalattujen ja taustavärjättyjen kromosomien väliset vaihdokset, eli translokaatiot ja disentristet kromosomit. Näiden kahden kromosomivaihdostyyppien erottamiseksi maalausmenetelmään kuuluu myös sentromeerien leimaaminen niille spesifisillä koettimilla. Esimerkki translokaatioita sisältävästä metafaasista on kuvassa 10.3, katso kuvaliite kirjan lopussa.

Translokaatioiden nopea ja helppo analyysi kromosomimaalaustekniikalla on antanut mahdollisuuden taannehtivan annosmäärityksen suorittamiseen.

Kromosomimaalaustekniikan käyttö biologisessa annosmäärityksessä perustuu oletukselle, että säteilyn aiheuttamat vauriot jakautuvat tasaisesti kaikkiin kromosomeihin. Koska vain osa kromosomeista maalataan, translokaatioiden kokonaistiheys ( $F_C$ ) arvioidaan käyttämällä kaavaa

$$F_C = F_p / 2.05 f_p (1-f_p) \quad (10.2)$$

jossa  $F_p$  on translokaatioiden frekvenssi kromosomimaalauksen jälkeen, ja  $f_p$  on maalattujen kromosomien osuus kaikista kromosomeista. Koska kaikkia kromosomeja ei maalata, metafaaseja on analysoitava huomattavasti enemmän kuin disentristen analyysissä. Usein tarvitaan useita tuhansia metafaaseja luotettavan tuloksen saavuttamiseksi.

Monissa varhaisimmista tutkimuksista havaittiin, että tiettyjen kromosomien suhteen vaurioiden frekvenssi ei vastannut odotettuja, kromosomin suhteelliseen DNA määrään perustuvia arvoja. Esimerkiksi kromosomi numero 4:n osallistuminen oli paljon odotusarvoa yleisempää. Viimeaikaisimmat suuret aineistot ovat kuitenkin osoittaneet, että kromosomien välillä ei ole suuria eroja säteilyn aiheuttamien vaurioiden esiintymistiheydessä. Kromosomivaurioiden uudentyyppinen havainnointi maalaustekniikalla aiheutti myös tarpeen kehittää uusi järjestelmä niiden kuvailemiseen. On todettu, että perinteinen luokittelujärjestelmä on riittämätön maalauksen avulla havaittujen monimutkaisten uudelleenjärjestäytymisten luonnehtimiseen. Kromosomimaalausta varten on kehitetty useita nimikkeistöjä, mutta biologinen annosmääritys translokaatioiden avulla asettaa tiettyjä ehtoja terminologian suhteen. Tutkimusten mukaan translokaatioiden annosvaste antaa luotettavimman tuloksen silloin, kun translokaatiotapahtuma, eli molemmat siihen osallistuvat kromosomit, kuvataan yhtenä kokonaisuutena.

Yksi tärkeimmistä kysymyksistä kromosomimaalauksen käytöstä taannehtivana annosmittarina on translokaatioiden pysyvyys. Vaikka translokaatiot ovatkin niin sanottuja stabiileja kromosomivaurioita solunjakautumisessa, useat tekijät saattavat kuitenkin vaikuttaa niiden todelliseen säilymiseen perifeerisen veren lymfosyyteissä. Paras lähestymistapa tämän asian selvittämiseksi on seurata säteilyonnettomuuksissa altistuneiden henkilöiden translokaatiotiheyttä säännöllisin väliajoin useamman vuoden ajan. Näin on tehty esimerkiksi tutkimalla Virossa 1994 tapahtuneen säteilyonnettomuuden uhreista muutamia kertoja vuodessa otettuja verinäytteitä. Pian onnettomuuden jälkeen suoritetussa FISH-analyysissä todettiin yhtä paljon translokaatioita ja disentrisiä kromosomeja. Kun kromosomivaurioita seurattiin kahden vuoden ajan onnettomuuden jälkeen, translokaatiofrek-

venssin havaittiin pääpiirteittäin säilyvän samalla tasolla. Havainnot tukevat translokaatioiden käyttöä annosarvioinnissa ainakin muutaman vuoden sisällä altistuksesta. Disentristen kromosomien määrä puolestaan putosi jyrkästi näiden kahden vuoden aikana. Näkyvää translokaatioiden vähenemistä tapahtui kuitenkin yhdellä onnettomuusuhrilla. Kyseinen henkilö oli altistunut hyvin suurelle säteilyannokselle, joka jatkui pitkään ja jakautui epätasaisesti. Tästä voidaan päätellä, että osakehoon useita vuosia aikaisemmin kohdistunutta annosta ei mahdollisesti pystytä määrittämään luotettavasti FISH-tekniikan avulla. Myös tietyt kokeelliset tulokset tukevat tätä havaintoa. Tapauksissa, joissa translokaatioanalyysiä ei ole voitu suorittaa heti altistuksen jälkeen, on vuosia myöhemmin tehtyjen analyysien tuloksia verrattu alkuperäisiin disentristen kromosomien määrään. Näin menetellen Brasilian Goianiassa 1987 tapahtuneessa onnettomuudessa uhreilla, joilla annos ylitti yhden grayn, translokaatiotaajuudet olivat huomattavasti pienemmät kuin heti onnettomuuden jälkeen havaittujen disentristen vastaavat luvut. Tämän tuloksen arveltiin viittaavan siihen, että korkeilla annoksilla translokaatiot eivät ole ajallisesti stabiileja. Goianian uhrien altistus oli mitä suurimmassa määrin myös hyvin epätasaista ja heterogeenistä. Epätasaisuudella ja heterogeenisyydellä on ilmeisesti on myös suuri merkitys translokaatioiden stabiilisuuteen.

Translokaatioiden stabiilisuus solunjakautumisen aikana mahdollistaa yhdestä solusta peräisin olevan translokaation merkittävän monistumisen. Esimerkiksi immunologisen reaktion aiheuttama lymfosyyttimuistisolun eksponentiaalinen lisääntyminen, kuten virusinfektion seurauksena, saattaa lisätä klonaalisesti muodostuneiden translokaatioiden taajuutta väliaikaisesti. Yleisesti arvellaan, että kloonilla ei ole merkittävää vaikutusta annosmääritykseen. Niiden toteamiseen on kuitenkin olemassa suhteellisen yksinkertaisia tilastollisia menetelmiä.

Kromosomimaalaustekniikan avulla hankitut aineistot ovat tuoneet esille translokaatioiden voimakkaan ikäriippuvuuden. Translokaatioiden määrä kasvaa ei-lineaarisesti iän myötä, nousun ollessa jyrkin noin 50 ikävuoden jälkeen. Tämä tosiasia vaikuttaa suoraan translokaatioiden käyttöön taannehtivana annosmittarina. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että mitä vanhemmasta henkilöstä on kyse, sitä epävarmemmaksi annosmääritys translokaatioiden avulla muodostuu. Epävarmuutta voidaan pienentää lisäämällä analysoitavien metafaasien lukumäärää, mutta tämäkään ei aina ole riittävä toimenpide. Kansainvälisen yhteistyön tuloksena pyritään luomaan iästä riippuvainen korjauskerroin, jonka avulla iän vaikutus analyysin tehokkuuteen voitaisiin minimoida. Translokaatioanalyysin avulla suoritettava annosarvio riippuu siis tutkittavan henkilön



iästä ja analysoitujen metafaasien lukumäärästä. Esimerkiksi pienin luotettavasti arvioitava akuutti kokokehoannos gammasäteilyä on 50-vuotiaalla henkilöllä noin 0,5 Gy. Tähän tulokseen päästään analysoimalla noin 3 000 metafaasia, johon kuluu 2–3 päivää. Jos kyseessä on kumulatiivinen altistus, yhden grayn annos voidaan varmuudella määrittää tutkimalla 10 000 metafaasia. Nuoremman, esimerkiksi 20-vuotiaan akuutti gammasäteilyaltistus voidaan taannehtivasti todeta translokaatioiden avulla, jos annos on ylittänyt noin 0,3 graytä. Useiden epävarmuustekijöiden johdosta translokaatioihin perustuvaa taannehtivaa annosarviointia ei ainakaan vielä käytetä rutiinimenetelmänä.