

NBC-skydd
901 82 Umeå
090-10 66 00

NBC-/bioteknik orientering

Nr 24 september 2001

Framtidens biodosimetri - FISH and chips

Micael Granström och Björn Sandström

Tack vare den snabba utvecklingen inom molekylärbiologin finns det idag ett antal potentiella metoder för att från ett blodprov kunna bestämma hur mycket strålning en människa utsatts för (biodosimetri). I Sverige saknas flera fungerande metoder för detta samtidigt som behovet kanske aldrig har varit större. Allt fler svenskar deltar i internationella uppdrag i länder där strålskydd kan saknas och där strålningen kan ligga på en helt annan nivå än normen i västvärlden. Dessutom har risken ökat för att radioaktivt material ska komma på avvägar, t ex via smuggling. Ett par av de metoder som presenteras här har fördelar som att de kan utföras av icke-specialister och att de inte kräver avancerad utrustning. De andra metoderna kanske fortfarande kräver att experter utvärderar resultaten och även en del specialutrustning. De metoderna har dock potentialen att ge ett mer exakt svar. **För Sveriges del skulle det vara bra att ha tillgång till både en enkel snabbmetod och en metod som ger ett mer exakt resultat.**

Inledning

Biodosimetri innebär att man från ett blod- eller vävnadsprov fastställer om en person exponerats för joniserande strålning. Nedan följer ett par påståenden, som hörts i debatten kring biodosimetri.

”Biodosimetri, men räcker det inte med dosimeter?”

- Alla som blir strålskadade eller får tillräckligt höga stråldoser för att det ska vara intressant att veta den exakta dosen bär inte fysikaliska dosimetrar. Detta är speciellt tydligt vid oförutsedda olyckor med radioaktiva ämnen.
- Även om man bär fysikalisk dosimeter kan den visa fel eller manipuleras. Dosimetern har kanske varit nära en strålkälla i flera timmar medan personen som förväntades bära dosimetern befann sig långt därifrån. Endast i idealfallet kommer en dosimeter som sitter på bröstet att visa den ”sanna” dosen.

”Biodosimetri, men vi kan skicka proverna till England?”

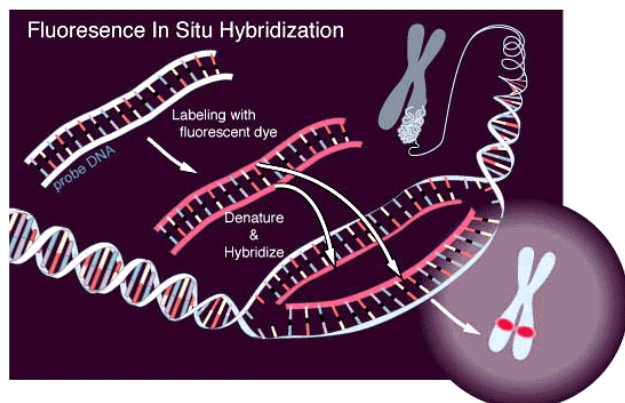
- I de fall en person fått en relativt liten stråldos och man vill få bekräftelse på detta räcker det ganska bra att skicka proverna till England och få svar några veckor senare. Samma sak kan gälla för forskningsprojekt där det är viktigt med ett så exakt svar som möjligt. Om man däremot snabbt vill utesluta att personal som t ex deltar i internationella operationer, utsatts för en stråldos som skulle kunna ge akuta skador, är det viktigare med ett snabbt svar än med hög precision i resultatet.

Olika krav på svaret leder till användande av olika metoder och det är därför naturligt att man utvecklar olika metoder för biodosimetri. Vissa är snabba (timmar till någon dag) och inte alltför precisa i lågdosområdet, medan andra kan ta flera veckor att utföra men ger ett mycket exakt svar. Det behövs metoder som vid en olycka snabbt kan användas för att sortera de drabbade i olika kategorier. Det kan vara en fördel om metoden kan sättas upp på exempelvis en vårdcentral i närheten av olycksplatsen. Däremot är kraven helt andra vid forskningsprojekt avseende t ex lågdosområdet. Vid epidemiologiska studier är kravet att svaret måste vara så precist som möjligt och ha en rimlig chans att detektera skador i det dosintervall man tror föreligger, annars vore det oetiskt att försöka göra studien.

Metoder

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

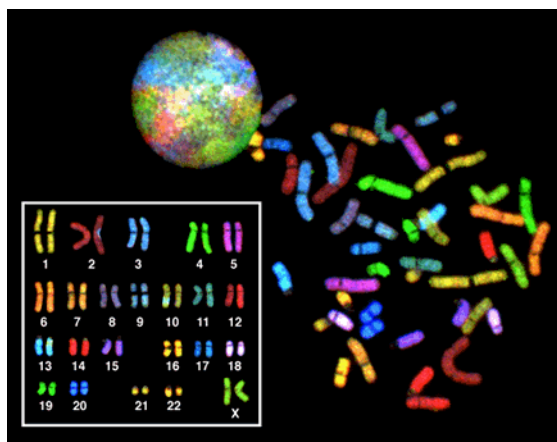
En relativt ny metod för detektion av kromosomskador är FISH. Här färgas specifika kromosomer (delar av arvsmassa) in med fluorescerande färger (Fig.1). Oftast används tre olika färger vilket gör att tre kromosomer kan analyseras samtidigt. Eftersom kromosomerna får olika färg är det ganska enkelt, även för ett otränat öga, att se uppkomna skador. De skador som söks är s.k. translokationer, d.v.s. omflyttning av fragment mellan olika kromosomer. Utrustningen som behövs är traditionell cellodlingsutrustning samt ett fluorescensmikroskop.



Figur 1. Metodik för FISH. Fluorescensmärkta DNA-bitar kopplas till en kromosom.

Spectral Karyotyping (SKY)

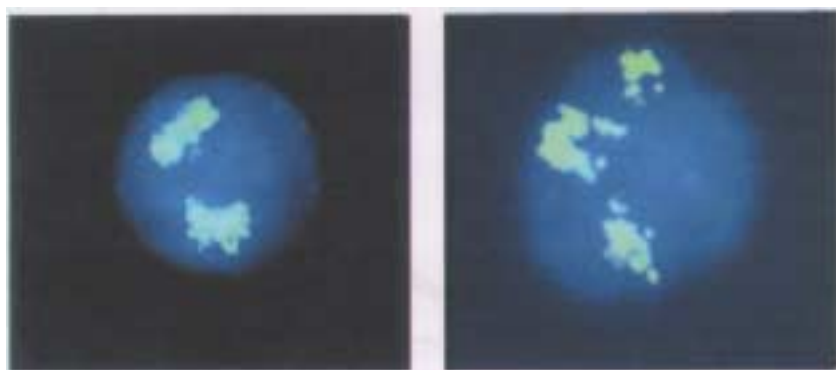
En metod som utvecklats från FISH presenterades första gången 1996 och kallas för SKY. Denna är också en teknik som bygger på infärgning av kromosomer. Genom att använda en färg per kromosom och speciell mjukvara, kan denna metod användas för att separera alla 24 humana kromosomerna (Fig.2). SKY har en högre känslighet eftersom den omfattar ett större antal kromosomer. Denna metod är dock än så länge mest lämpad för forskningsändamål, dels på grund av kostnaden per prov, dels för att det krävs specialutrustning.



Figur 2. Exempel på hur SKY kan se ut efter inmärkning och mjukvaru-behandling.

Premature Chromosome Condensation (PCC)

Ett problem med att leta efter kromosomskador med ovanstående tekniker är att cellerna måste vara på väg att dela sig, för endast då "packas" DNA:t i cellen i form av kromosomer. PCC är en metod där cellerna "luras" genom tillsats av vissa kemikalier till att packa sina kromosomer trots att cellerna inte är på väg att dela sig. Genom att kombinera detta med infärgning av en specifik kromosom med FISH så kan man leta efter "prickar". En oskadad cell har två prickar medan om en skada finns på den infärgade kromosomen så kan tre eller flera prickar iakttagas (Fig. 3). Detta är en relativt enkel metod som inte kräver någon speciell utrustning mer än traditionell cellodlingsutrustning och ett fluorescensmikroskop.



Figur 3. PCC visande kromosom 1 inmärkning. A Kontrollprov B Bestrålat prov.

Realtids-PCR

Realtids-PCR är en metod som bygger på traditionell PCR men med fördelen att reaktionsförloppet (amplifieringen) kan följas kontinuerligt. På detta sätt erhålls ett tillförlitligt kvantitativt mått på det DNA (eller RNA) man vill studera. En begränsning i den här metoden är att förändringarna i DNA:t kan leda till att just de skadade cellerna dör, vilket innebär att DNA:t bryts ner och att det inte finns något DNA att amplifiera. Ett alternativ till att studera cellkärnans DNA är att studera mutationer i mitokondrie-DNA. Mitokondrierna är cellernas energiproducenter och finns i stort antal (~ 1000) i cellerna så förändringar i dessa är lättare att finna. Det har också visat sig att celler som utsatts för någon form av stress, t.ex. joniserande strålning, gör sig av med en specifik bit av sitt mitokondrie-DNA. Ju högre stråldos cellerna utsatts för desto mer finns av denna mutation. Med realtids-PCR kan mängden mutationer sedan bestämmas och därigenom erhålls ett mått på stråldosen. Denna metod kräver fortfarande en del utveckling innan den är redo för fältbruk, men har möjligheten att bli en snabb och enkel metod. I princip räcker det med ett instrument plus de nödvändiga kemikalierna.

DNA-chips



Strålning eller andra former av stress sätter igång en mängd reaktioner i en cell. Med s.k. microarrayteknik kan förändringen i vilka genfunktioner som uttrycks på grund av denna stress spåras (Fig.4). Strålning ger ett specifikt mönster av gener som slås på (röda) eller av (gröna). Med denna metod kan dessutom genuttrycket kvantifieras vilket skulle ge en uppfattning om stråldosen. Detta är ytterligare en metod för specialisten i laboratoriet.

Figur 4. Micro-array som visar skillnader i hur olika gener uttrycks.

Kravet på tillgång till biodosimetri har aldrig varit större

Vårt försvars internationella åtaganden medför att behovet av biodosimetri för svenskar aldrig varit större. Stråloluckorna i tredje världen ökar för närvarande dramatiskt. Bara det senaste året har dödsolyckor inträffat i både Thailand och Egypten. Nyligen rapporterades att Kina under de fem första månaderna av år 2000 hade sju tillbud med stulna strålkällor. I både Kosovo och Bosnien har incidenter med strålkällor rapporterats, lyckligtvis var det i båda fallen ganska svaga strålkällor.

Framtidens NBC-detektor

Microarrayteknik kommer i framtiden att kunna användas för att kontrollera om en människa utsatts för strålning, för smittämnen, C-stridsmedel eller andra kemikalier. Vad som krävs är att vi lär oss de olika genmönster som uppträder efter exponering för varje agens. Harpestrakterien bör ge ett mönster och sorkpestvirus ett annat. Innan vi lärt oss hur alla tänkbara mönster ser ut och om det är möjligt att helt skilja olika ämnen åt krävs det säkert 10-20 år av fortsatt forskning. När kunskap om vilka gener som slås på eller av finns kan metoder med hjälp av t.ex. realtids-PCR sättas upp och snabb detektion av olika agens blir möjlig.

Referenser

Schröck, E. *et al.*, Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes. *Science* 273; 494-497, **1996**

Coco-Martin, J.M. *et al.*, Detection of radiation-induced chromosome aberrations using fluorescence *in situ* hybridisation in drug-induced premature chromosome condensations of tumour cell lines with different radiosensitivities. *Int.J. Radiat. Biol* 71; 265-273, **1997**

DNA-analys på chips öppnar möjligheter till enkel och snabb identifiering av mikroorganismer. *NBC-Bioteknik* 15, **1998**

För en översiktsartikel om FISH se: Waters J.J. *et al* FISH. *J.Clin. Pathol. Mol. Pathol.* 51; 62-70 **1998**

Stora framsteg har gjorts och utvecklingen fortsätter inom det biotekniska området. Produkter som tagits fram med biotekniska metoder används inom det medicinska området (läkemedel, antivirala och antibakteriella substanser, blodsubstitut, biosensorer) såväl som inom andra områden (material, elektroniska komponenter, miljövård).

Den snabba utvecklingen har resulterat i ett allt större informationsflöde och betydelsen för hot från och skydd mot biologiska och kemiska stridsmedel är betydande. I syfte att belysa detta samt andra frågor av betydelse för totalförsvaret följer en analysgrupp vid FOI NBC-skydd kontinuerligt utvecklingen inom det bioteknologiska området.

Arbetet redovisas i denna skriftserie, "NBC-/bioteknik orientering", (ca 4 nummer per år). Kontaktperson och ansvarig vid FOI NBC-skydd är Britta Häggström. Tel. 090/10 66 00. NBC-bioteknik/orientering finns fr.o.m. nummer 15 på FOI:s hemsida (www.foi.se).