PRÁCE PŮVODNÍ

616-001.28:616.155.244]-092.9

ZMĚNY MEGAKARYOCYTŮ U KRYS OZÁŘENÝCH RELATIVNĚ MALOU DÁVKOU RTG ZÁŘENÍ

MUDr. Vojtěch VONDRÁČEK, technická spolupráce Jarmila FRANCOVÁ, Vilém MÁKA

Předneseno zkráceně na Symposiu o účincích ionisujícího záření a použití radioisotopů v biologii a medicíně Praha, říjen 1958

Ve svých předchozích sděleních jsme zdůraznili význam sledování kvalitativních změn krevních buněk u pokusných zvířat po účinku subletálních dávek rtg. záření. K obdobnému cíli jsme zaměřili sledování změn destičkové krvetvorby po malé dávce rtg. záření. Dostupná literatura o dané problematice, zejména o megakaryocytech, je skrovná a týká se většinou větších dávek rtg. záření. Mnozí autoři jsou toho názoru, že záření poškozuje megakaryocyty a redukuje jejich počty současně s ostatními elementy kostní dřeně. Podle Blooma jsou megakaryocyty v kostní dřeni králíka po celotělové dávce 800 r poškozeny až po buňkách červené a myeloidní řady. Po této dávce se megakaryocyty v kostní dřeni za 2 dny téměř nevyskytují. Úprava začíná ve třetím týdnu. Po dávce 400 r je zapotřebí k objevení se maximálního poškození delší doby než u dávek vyšších. U myší se počty megakaryocytů v kostní dřeni vcelku nemění po dávce 350 r. Menší dávky jako např. 50 r nepůsobí podle autora pravděpodobně žádné změny (2,3). Jacobson uvádí, že megakaryocyty a buňky myeloidní řady, zejména nezralé, jsou kvalitativně zhruba stejně citlivé na poškození zářením (6). Sipovskij předpokládá, že rtg. záření v kostní dřeni králíka primárně poškozuje megakaryocyty a vyvolává v nich časné degenerativní změny. Ochotskij pokládá megakaryocyty za nejlabilnější elementy kostní dřeně (7). Belgičtí autoři zjistili u králíka po lokálním ozáření zadní končetiny za 24 hodin vzestup počtu abnormálních megakaryocytů v kostní dřeni o 10 až 50 % (1). Megakaryocytopatie a současná trombocytopenie je popisována u osob vystavených účinku ionisujícího záření a u nemocných ozařovaných k terapeutickým účelům (8).

Ve své práci jsme sledovali změny megakaryocytů a trombocytů u krys po jednorázové celotělové dávce 50 r. Řešili jsme tyto otázky: jak se mění počty megakaryocytů a trombocytů u krys v prvém týdnu po ozáření, jaké kvalitativní změny megakaryocytů po této dávce je možné zjistit v prvém týdnu po ozáření v preparátu fixovaném a supravitálním.

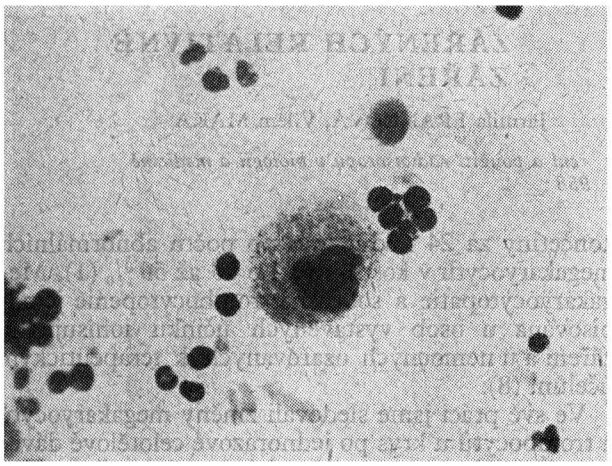
Metodika

Pokusy byly prováděny na bílých krysách, převážně samcích. Ozařováno bylo 10 sérií po 5 zvířatech přístrojem Supersanax při 180 kV, 15 mA, filtru 1 mm Al, ½ mm Cu, vzdálenost 70 cm, příliv 17 r/min. Počty megakaryocytů při běžném způsobu získávání kostní dřeně nejsou velké. Vyšli jsme proto z práce Lindella a Zajiceka, kteří sledovali kvantitativní změny megakaryocytů po větších dávkách rtg. záření a jejichž metodika umožňuje sledování megakaryocytů ve větších počtech (9). Jejich metodiku jsme poněkud zmodifikovali a doplnili vyšetřováním trombocytů a sledováním kvalitativních změn megakaryocytů. Suspensi dřeňových elementů z krysích femurů

jsme připravovali tak, že byla z vypreparovaného femuru zvířeti v etherové narkose oddělena rourovitá část těsně pod trochantery a nad epikondily a proplachována příslušnými roztoky. K počítání megakaryocytů bylo používáno 1 ccm 5% roztoku citrátu sodného (1 díl) a 0,7% roztoku NaCl (4 díly). Počítáno v Bürkerově komůrce nad 100 velkými čtverci. Dřeňové nátěry byly zhotovovány ze suspense dřeňových buněk v králičím séru a panopticky barveny. Pro pozorování v luminiscenčním mikroskopu byl femur proplachován roztokem akridinoranže (1 : 10 000) v množství 0,5 ccm. Při počítání trombocytů jsme vyzkoušeli metodu Foniovu, Feisslyho a Brecher-Cronkiteovu (4). Nejvýhodnější se nám jevila metoda Brecher-Cronkiteova s ammonium oxalátum. Hodnoty trombocytů námi uváděné jsou stanoveny touto metodou.

Výsledky

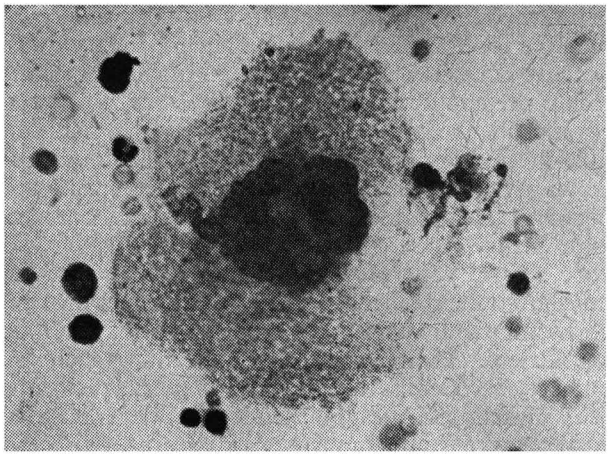
Průměrný počet megakaryocytů stanovený nad 100 velkými čtverci Bürkerovy komůrky byl u neozářených zvířat 11 ± 2,2. Po ozáření poklesla tato průměrná hodnota nejvíce 2. den na 6 ± 1,7 a 4. den na 6,6 ± 0,28. Koncem týdne byl zaznamenán návrat k výchozím hodnotám. Rozpočet megakaryocytů jsme sledovali podle zjednodušeného schématu Heilmeyerova (tabulka č. 1.) (5). Počítali jsme většinou 50 buněk. Ukázalo se, že 1. a 2. den po ozáření



Obr. 1. Basofilní granulovaný megakaryocyt neozářené krysy (velikost 41 μ, zvětšení 7×60)

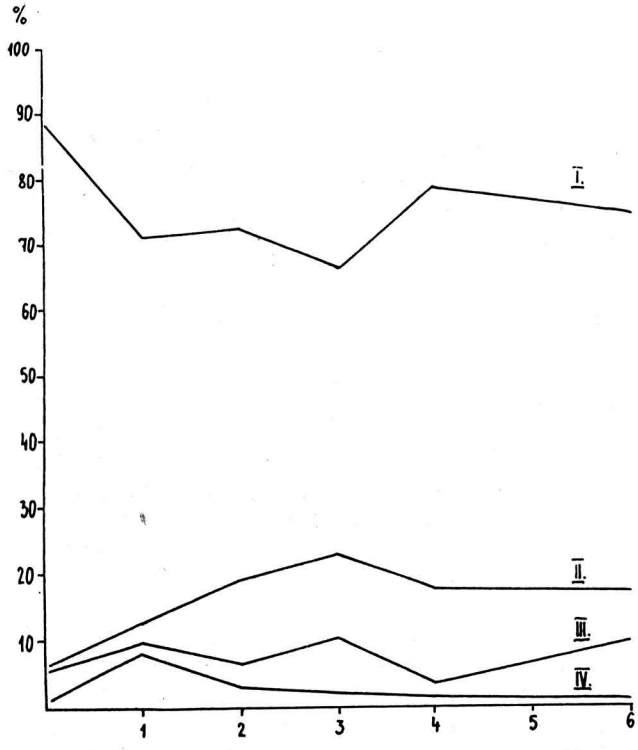
dávkou 50 r došlo v rozpočtu megakaryocytů k posunu doleva, který je 3. den vystřídán pozvolným návratem k výchozím hodnotám. Tento posun doleva je statisticky významný. Současně s diferenciálem jsme u každé série měřili okulárovým měřítkem průměr megakaryocytů nejméně na 100 buňkách. U neozářených i ozářených zvířat kolísaly rozměry od 20 do 60 μ, jen ojediněle byly zjištěny hodnoty od 60 do 80 μ. Extrémní hodnota 110 μ byla naměřena 4. den po ozáření (mikrofotografie 1., 2.). Zvýšená fagocytosa a vakuolisace nebyly u těchto buněk po ozáření pozorovány.

Ke stanovení kvalitativních změn megakaryocytů jsme použili luminiscenční mikroskopie jako doplňující metody (10). Do vlastního hodnocení je pojato



Obr. 2. Neutrofilní granulovaný megakaryocyt zvětšeného průměru ozářené krysy (dávka 50 r, velikost 110 μ, zvětšení 7×60)

30 zvířat. Kostní dřeň byla supravitálně barvena akridinoranží. V jednom preparátě bylo hodnoceno 20 až 40 buněk, celkový počet hodnocených buněk byl 1500. Na podkladě vlastních zkušeností jsme si megakaryocyty v luminiscenčním obraze rozdělili do 4 skupin. Hlavním vodítkem nám při tom byla intensita luminiscence jednotlivých buněk. Zjistili jsme totiž, že u některých megakaryocytů po ozáření uvedenou dávkou je luminiscence jader a plasmy výraznější a že se může měnit zbarvení plasmy i jádra. Toto jsme si ověřili i na vyšších dávkách. Pomocné rozdělení megakaryocytů v luminiscenčním obraze ukazuje tabulka č. 2. U neozářených zvířat největší část megakaryocytů, tj. 87,8 % bylo zařazeno do prvé skupiny, 6,2 % do skupiny druhé, 5,4 % do skupiny třetí a jenom 0,6 % do skupiny čtvrté. Po ozáření



Graf 1. Počty megakaryocytů v luminiscenčním obraze. Osa x – dny po ozáření, osa y – percentuální zastoupení jednotlivých skupin pozorovaných elementů. (Jednotlivé skupiny označeny I—IV)

bylo ve druhé skupině prvý až šestý den po ozáření 2—3× více buněk než před ozářením. Ve třetí skupině bylo 1., 3. a 6. den po ozáření 2× více buněk než před ozářením. Také ve čtvrté skupině se objevilo více buněk zejména 1. a 2. den po ozáření (graf č. 1). Jsou tedy zvýšené počty buněk druhé, třetí a čtvrté skupiny megakaryocytů, tedy buněk se zvýšenou luminiscencí jádra i plasmy vhodným kritériem jejich změn.

Počty trombocytů jsme vyšetřili u neozářených zvířat 210×. Zjistili jsme přitom hodnoty v rozsahu nejčastěji kolem 700 000 až 1 000 000. Trombocyty byly počítány před ozářením většinou 3× a po ozáření 1., 2., 3., 4. a 6. den. V prvých šesti dnech po ozáření kolísají jejich počty obdobně jako u zvířat neozářených.

Diskuse

Na rozdíl od některých literárních údajů došli jsme k závěru, že megakaryocyty u krys možno řadit mezi krevní elementy, jež jsou vhodným ukazatelem změn vyvolaných i poměrně malými dávkami rtg. záření. V práci je zdůrazněno hodnocení kvalitativních změn megakaryocytů. Vyplývá z toho, že i naše předešlá pozorování, zejména bílé krvetvorby, byla zaměřena tímto směrem. Domníváme se, že u krys dochází v destičkové krvetvorbě po uvedené dávce rtg. záření k obdobným poruchám zrání a diferenciace, jako jsme viděli v myeloidní složce u krys, králíků a psů po subletálních dávkách (12).

Pro to svědčí změny v rozpočtu megakaryocytů, výskyt megakaryocytů s větším průměrem a zvýšená segmentace jader.

Sledování megakaryocytů v luminiscenčním obraze ukazuje, že luminiscenční mikroskopie může být významným příspěvkem ke stanovení časných kvalitativních změn i po tak malé dávce záření jako je 50 r. Naše nálezy v tomto směru jsou v dobré shodě s pozorováním Meisela a spol. (11). Podle nich se po ozáření zřetelně zesiluje luminiscence buněčného jádra. Tuto okolnost si vysvětlují tím, že po ozáření dochází ke zvýšenému slučování fluorochromů s jadernou blanou a hmotou.

Závěr

Počty megakaryocytů v kostní dřeni krys ozářených jednorázově 50 r se zmenšily nejvíce 2. a 4. den po ozáření. Prvý a druhý den po ozáření uvedenou dávkou převažují mladší formy megakaryocytů, třetí den nastává pozvolný návrat k výchozím hodnotám. Byly nalezeny megakaryocyty zvětšeného průměru. Zvýšená luminiscence jader a plasmy megakaryocytů se ukázala vhodným kritériem pro posouzení jejich kvalitativních změn i po relativně malé dávce rtg. záření. Počty trombocytů v obvodové krvi krys po uvedené dávce nevyjadřují v prvém týdnu po ozáření žádnou tendenci a kolísají obdobně jako u neozářených zvířat.

Tab. č. 1

ROZPOČET MEGAKARYOCYTŮ

(Upraveno podle Heilmeyera)

I.		*promegakaryocyty*
II.	*1*	*malé granulované buňky s basofilní plasmou*
	2	*velké granulované buňky s basofilní plasmou*
	3	*negranulované buňky s basofilní plasmou*
	4a	*negranulované buňky s neutrofilní plasmou*
	4b	*granulované buňky s neutrofilní plasmou*
	5	*jádra se zbytky plasmy*
III.		*volná jádra*

Tab. č. 2

POMOCNÉ ROZDĚLENÍ MEGAKARYOCYTŮ (MGC) V LUMINISCENČNÍM OBRAZE

I. MGC se špinavě zelenou plasmou a matně zeleným jádrem.
II. MGC se špinavě zelenou plasmou a výrazně zeleně luminiskujícím jádrem.
III. MGC s načervenalou plasmou a zeleně luminiskujícím jádrem často neostře ohraničeným.
IV. MGC s načervenalou až červenou plasmou s výrazně zeleně až žlutozeleně luminiskujícím jádrem.

Písemnictví

1. *Bacq, Z. M., Alexander, P.:* Fundamentals of radiobiology, 1. vyd., 328—329, London 1955.
2. *Bloom, M., Bloom, W.:* Histopathology of irradiation from external a. internal sources, National nuclear energy series IV, Vol. 22 I, Chap. 6, 166—70, New York 1948.
3. *Bloom, W., Hollaender, A.:* Radiation biology, National research council, Vol. I., Part 2, Chap 17, 1099, New York 1954.
4. *Brecher, G., Cronkite, E. P.:* A. J. clin. Path., 23, 15, 1953.
5. *Heilmeyer, L., Begemann, H.:* Handbuch der inneren Medizin, Blut und Blutkrankheiten, 4. vyd., sv. 2, 772—783, Berlin 1951.
6. *Jacobson, L. O., Hollaender, A.:* Radiation biology, National research council, Vol. I., Part 2, Chap. 16, 1044—47, New York 1954.
7. *Jegorov, A. P., Bočkarev, V. V.:* Krovetvorenije i ionizirujuščaja radiacija, 2. vyd., 90—93, Moskva 1954.
8. *Kassirskij, I. A., Aleksejev, G. A.:* Kliničeskaja gematologija 89—94, 301—307, 319, Moskva 1955.
9. *Lindell, B., Zajicek, J.:* Experientia, 13/1, 27—29, 1957.
10. *Meisel, M. N. a spol.:* Žurnal obščej biologiji, 12, 312, 1951.
11. *Meisel, M. N.:* Vsjesajuznaja konferencija po primeněniju izotopov i jaděrnych izlučenij, Radiobiologija, 26—36, Moskva 1958.
12. *Vondráček, V., Šmíd, A.:* Lékařské zprávy (Hradec Králové) roč. 3, č. 7., 8., 164—171, 1958.