

616.36-001.28-036.15-092.9:615.7/-001.28-084/

MODIFIKÁCIA ŽIARENÍM INDUKOVANÉHO LATENTNÉHO POŠKODENIA PEČENE POTKANOV ADETURONOM

RNDr. K. KROPÁČOVÁ, CSc., doc. RNDr. E. MIŠUROVÁ, CSc.
Prírodovedecká fakulta Univerzity P. J. Šafárika, Košice

Skúmanie rádioprotektívnych účinkov niektorých fyzikálnych zásahov a chemických látok je založené väčšinou na sledovaní životne dôležitých ukazovateľov poškodenia, ako je mortalita zvierat, stav krvotvorby alebo poškodenie gastrointestinálneho traktu (Gerebtzoff a Bacq 1954, Mole a Temple 1957, Kuna 1973, Kuna 1978, Kuna 1981, Kuna 1982). Z teoretického hľadiska i z praktických dôvodov pokladáme však za potrebné poznať aj možnosti ochrany pred latentným poškodením, ktoré sa neprejaví bezprostredne, ale môže sa manifestovať pri určitých záťažových alebo patologických stavoch organizmu.

Pre skúmania takéhoto druhu je vhodným modelovým systémom pečeň. Ožiarenie vyvoláva v nej vznik latentného poškodenia, ktoré sa prejaví v priebehu indukovanej proliferácie (napr. parciálnou hepatektómiou) niektorými biochemickými a morfológickými zmenami, hlavne inhibíciou syntézy DNA a mitotickej aktivity a chromozómovými abnormalitami (Cater a spol. 1956, Stevenson a Curtis 1961, Poliščuk 1973, Giližano a Malinovskij 1977). V predchádzajúcej práci (Kropáčová a spol. 1980) sa zistilo, že rozvoj latentného poškodenia pečene možno zmierniť aplikáciou jednej z klasických rádioprotektívnych látok — cysteamínom.

Cieľom tejto práce je doplnenie informácií o rozsahu latentného poškodenia pečene po jednorazovom ožiarení rtg lúčmi a zistenie možnosti ovplyvnenia latentného poškodenia novším druhom rádioprotektívnej látky — adeturonom. Adeturon bol syntetizovaný v r. 1973 vo Vedeckovýskumnom ústave rádiobiológie a rádiohygieny v Sofii a jeho ochranný efekt bol testovaný na základe prežívania zvierat, stave krvotvorby a zmien gastrointestinálneho traktu (Pantev 1984).

Materiál a metodika

Pokusy sme robili na samcoch potkanov kmeňa Wistar (SPF) o priemernej telesnej hmotnosti 200 g, kŕmených štandardnou laboratórnou potravou *ad libitum*.

Všetky zvieratá boli podrobené $\frac{2}{3}$ parciálnej hepatektómii (PHE) a rozdelené do 5 skupín:

1. skupina — neožiarené operované zvieratá (K).
2. skupina — neožiarené zvieratá, ktorým bol 30 min pred operáciou podaný adeturon (A).
3. skupina — zvieratá ožiarené 60 min pred operáciou jednorazovou celotelovou dávkou 5742 mGy (O).
4. skupina — zvieratá, ktorým bol 30 min pred ožiarení (tj. 90 min pred operáciou) podaný adeturon (A+O).
5. skupina — zvieratá, ktorým bol podaný adeturon 30 min po ožiarení (tj. 30 min pred operáciou), (O+A).

Podmienky ožarovania

Zvieratá boli celotelove ožiarené terapeutickým rtg prístrojom TUR-T-250 pri týchto podmienkach: 200 kV, 16 mA, filtre 0,5 mm Al+0,5 mm Cu, dávkový príkon 430,65 mGy/min.

Aplikácia adeturonu

Adeturon (S-2-aminoetyl izotiourea adenosin 5 trifosfát — syntetizovaný vo Vedeckovýskumnom ústave rádiobiológie a rádiohygieny v Sofii) bol aplikovaný intraperitoneálne v dávke 15 mg/100 g telesnej hmotnosti.

Parciálna hepatektómia bola urobená podľa štandardného postupu (Higgins a Anderson 1931) a zvieratá boli vyšetrené na 24., 30., 48.

hodinu, 3., 7. a 14. deň po operácii. V jednotlivých časových intervaloch bolo vyšetrených po 5 zvierat z každej skupiny.

Z tkaniva regenerujúcej pečene sme zhotovili roztlakové preparáty farbené Feulgenovou metódou. Pri zhodnotení 50 000—60 000 buniek v každej vyšetrovanej skupine sme zaznamenali všetky mitotické figúry a chromozómové abnormality v postmetafáze. Na základe týchto údajov sme vypočítali mitotický index (MI), tj. počet mitotických figúr pripadajúcich na 1000 buniek, pomer počtu metafáz k počtu profáz (M/P) a percento chromozómových abnormalít z celkového počtu postmetafázových figúr nájdených medzi uvedeným počtom vyhodnotených buniek.

Štatistickú významnosť sme hodnotili analýzou variance a Duncanovým testom (Duncan 1955).

Výsledky

Mitotický index. V regenerujúcej pečeni kontrolných zvierat (K) sa mitotické figúry do 24. hodiny po PHE nachádzajú len ojedinele (obr. 1). V nasledujúcich hodinách mitotický index prudko vzrastá k maximu ($26,84 \pm 0,56 \%$) na 30. hodinu. V priebehu ďalšieho obdobia MI rýchle klesá a od 7. dňa po operácii sú jeho hodnoty blízke hodnotám intaktnej pečene.

Po podaní adeturonu (A) mali zmeny MI podobný priebeh ako u kontrolných zvierat, ale jeho hodnoty sa pohybovali väčšinou na štatisticky významne vyššej úrovni (tab. 1).

U zvierat ožiarených dávkou 5742 mGy (O) sme na 24. hodinu po operácii nenašli žiadne mitotické figúry. Maximálny počet mitóz sme zaznamenali až na 48. hodinu po PHE. V tomto období bol ich počet približne 3,5krát nižší v porovnaní s maximálnymi hodnotami neožiarených kontrolných zvierat (K). V nasledujúcich dňoch mitotická aktivita klesala a na 14. deň po operácii neboli zistené žiadne mitotické figúry.

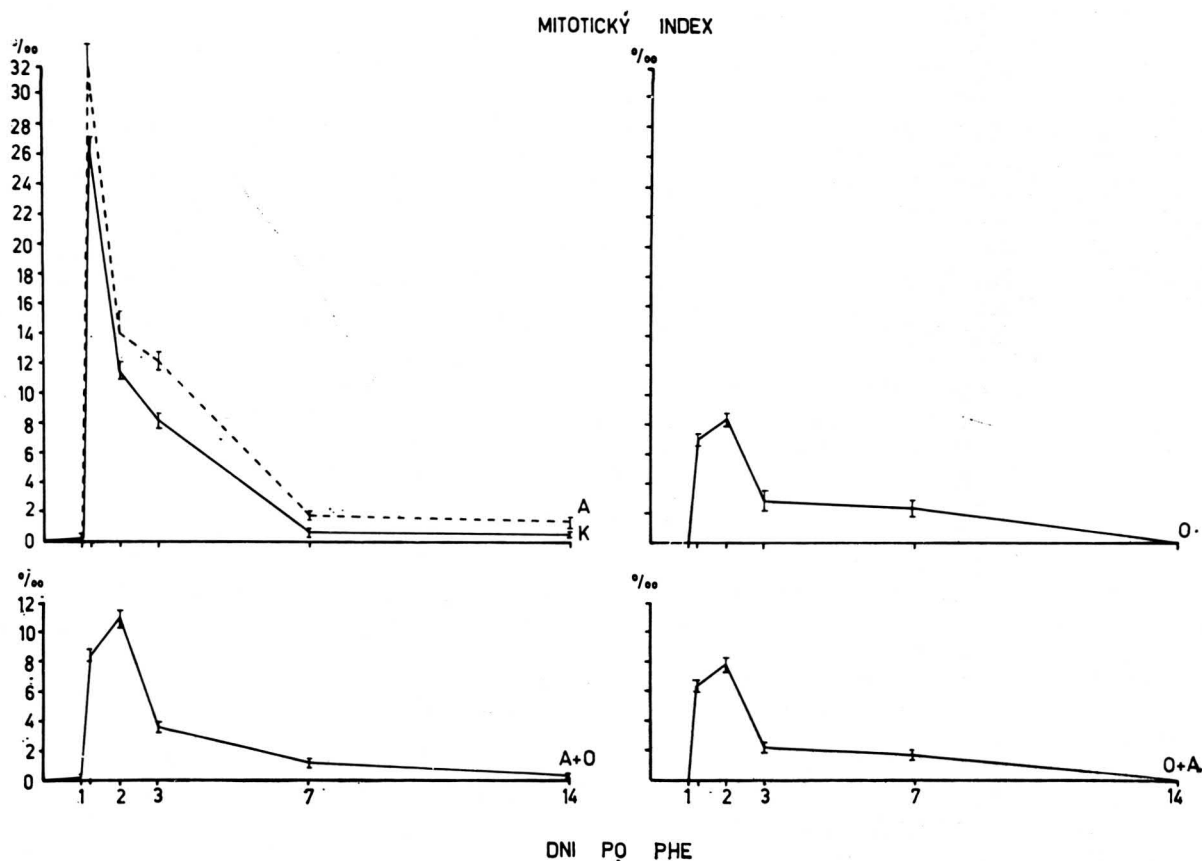
Pri aplikácii adeturonu 30 min pred ožiarení (A+O) bol priebeh zmien MI podobný ako po samotnom ožiarení, ale jeho hodnoty na 30. a 48. hodinu boli signifikantne vyššie ($P < 0,05$).

Aplikácia adeturonu 30 min po ožiarení (O+A) nemala žiadny modifikujúci efekt.

Pomer M/P. Pomer počtu metafáz k profázam u kontrolných zvierat (K) od 24. do 30. hodiny po PHE vzrástol viac ako dvojnásobne (obr. 2). Zvýšené zastúpenie metafáz pretrvávalo do 3. dňa po operácii.

Samotný adeturon hodnoty pomeru M/P podstatne neovplyvnil.

Ožiarenie dávkou 5742 mGy (O) spôsobilo



Obr. 1. Mitotický index v regenerujúcej pečeni kontrolných potkanov a po jednorazovom ožiarení dávkou 5742 mGy rtg lúčov a aplikácii adeturonu.

K — kontrola; A — adeturon; O — ožiarenie; A+O — adeturon+ožiarenie; O+A — ožiarenie+adeturon.

Tab. 1

Mitotický index (‰) v regenerujúcej pečeni potkanov po ožiarení a aplikácii adeturonu

SKUPINA	DOBA PO PHE					
	24 h	30 h	48 h	72 h	7. deň	14. deň
KONTROLA	0,27 ± 0,06	26,84 ± 0,56	11,48 ± 0,47	8,24 ± 0,52	0,75 ± 0,12	0,60 ± 0,12
ADETURON	1,10 ± 0,07	31,06 ± 1,86**	13,97 ± 1,21**	12,20 ± 0,60**	1,80 ± 0,25	1,43 ± 0,14
OŽIARENIE	0,00 ± 0,00	7,02 ± 0,39**	8,38 ± 0,53**	2,86 ± 0,63**	2,50 ± 0,40*	0,00 ± 0,00
ADETURON + OŽIARENIE	0,01 ± 0,00	8,46 ± 0,26**	11,00 ± 0,15	3,60 ± 0,15**	1,20 ± 0,15	0,16 ± 0,06
OŽIARENIE + ADETURON	0,00 ± 0,00	6,16 ± 0,33**	7,16 ± 0,60**	2,27 ± 0,12**	1,80 ± 0,26	0,00 ± 0,00

V tabuľke sú uvedené priemerné hodnoty ± smerodajné odchýlky od priemeru. Štatistická významnosť rozdielov v porovnaní s neožiarenými kontrolami (K) *P < 0,05; **P < 0,01. Štatistická významnosť rozdielov v porovnaní s ožiarenými zvieratami (O) .P < 0,05; ..P < 0,01.

Tab. 2

Pomer počtu metafáz k počtu profáz (M/P) v regenerujúcej pečeni potkanov po ožiarení a aplikácii adeturonu

SKUPINA	DOBA PO PHE					
	24 h	30 h	48 h	3. deň	7. deň	14. deň
KONTROLA	0,88 ± 0,42	2,01 ± 0,13	1,60 ± 0,08	1,64 ± 0,04	1,18 ± 0,37	1,14 ± 0,08
ADETURON	1,34 ± 0,07*	1,81 ± 0,12	1,67 ± 0,05	1,76 ± 0,06	1,14 ± 0,08	1,17 ± 0,12
OŽIARENIE	0,00 ± 0,00	2,41 ± 0,05*	2,49 ± 0,19**	1,44 ± 0,40	1,56 ± 0,09	0,00 ± 0,00
ADETURON + OŽIARENIE	0,00 ± 0,00	1,98 ± 0,04	2,11 ± 0,12*	1,68 ± 0,12	1,31 ± 0,06	0,00 ± 0,00
OŽIARENIE + ADETURON	0,00 ± 0,00	2,18 ± 0,01	2,49 ± 0,05**	1,67 ± 0,16	1,85 ± 0,20**	0,00 ± 0,00

Vysvetlivky sú uvedené pri tabuľke 1.

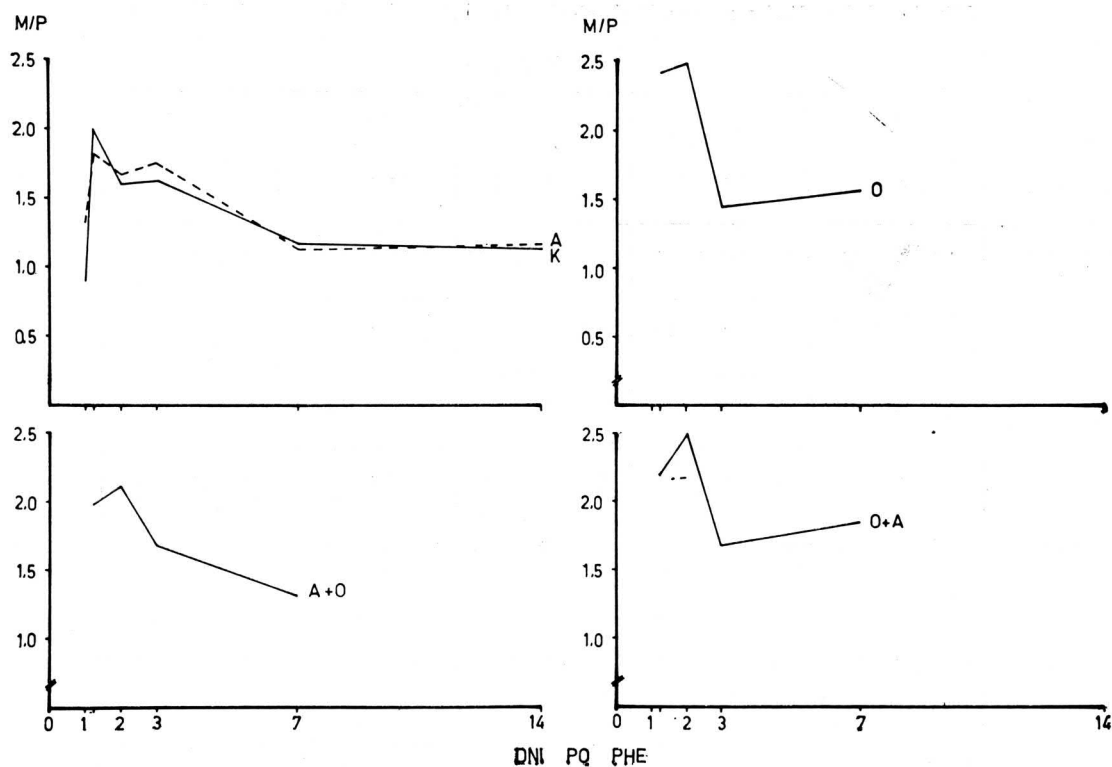
Tab. 3

Chromozómové abnormality (%) v regenerujúcej pečeni potkanov po ožiarení a aplikácii adeturonu

SKUPINA	DOBA PO PHE					
	24 h	30 h	48 h	72 h	7. deň	14. deň
KONTROLA	0,00 ± 0,00	1,79 ± 0,78	5,01 ± 3,00	6,67 ± 3,32	12,50 ± 3,01	0,00 ± 0,00
ADETURON	0,00 ± 0,00	3,83 ± 2,00	5,25 ± 2,71	2,78 ± 2,60	5,55 ± 4,56	0,00 ± 0,00
OŽIARENIE	0,00 ± 0,00	94,51 ± 3,93**	95,27 ± 2,90**	91,66 ± 8,33**	88,89 ± 9,11**	0,00 ± 0,00
ADETURON + OŽIARENIE	0,00 ± 0,00	71,33 ± 1,41**..	67,96 ± 0,74**..	66,03 ± 3,31**..	61,11 ± 14,67**.	0,00 ± 0,00
OŽIARENIE + ADETURON	0,00 ± 0,00	75,00 ± 1,67**.	72,14 ± 1,48**..	75,47 ± 2,48**	75,00 ± 14,43**	0,00 ± 0,00

Vysvetlivky sú uvedené pri tabuľke 1.

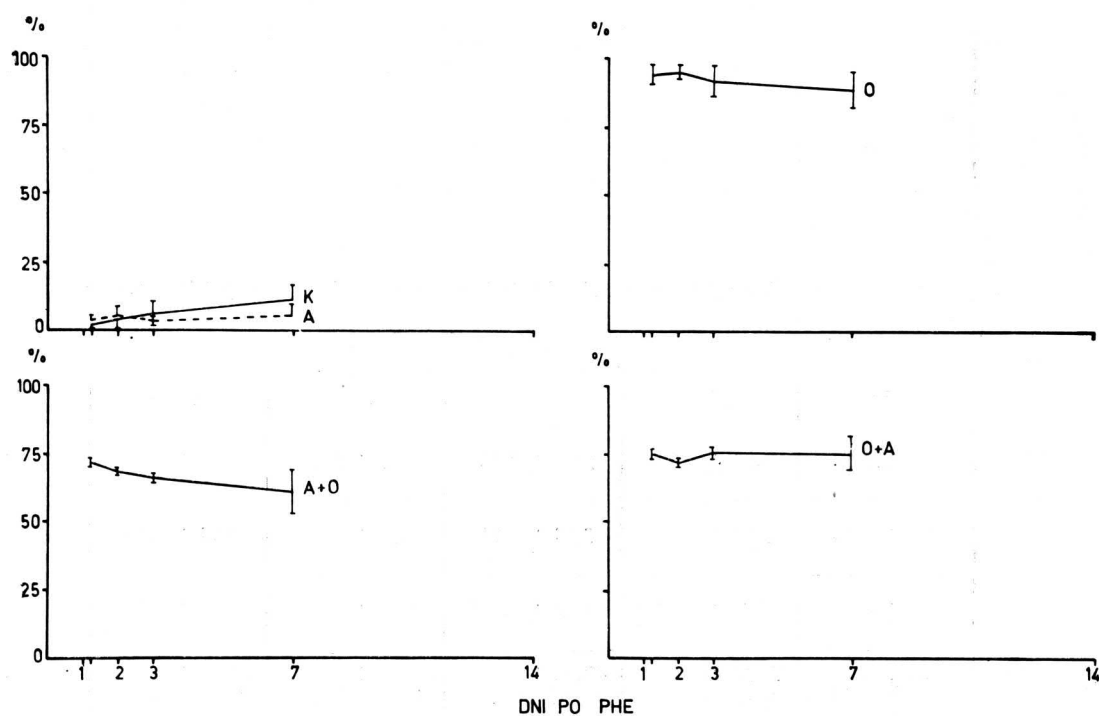
POMER M/P



Obr. 2. Pomer počtu metafáz k počtu profáz (M/P) v regenerujúcej pečeni kontrolných potkanov a po jednorazovom ožiarení dávkou 5742 mGy rtg lúčov a aplikácii adeturonu.

K — kontrola; A — adeturon; O — ožiarenie; A+O — adeturon+ožiarenie; O+A — ožiarenie+adeturon.

CHROMOZÓMOVÉ ABNORMALITY



Obr. 3. Chromozómové abnormality v regenerujúcej pečeni kontrolných potkanov a po jednorazovom ožiarení dávkou 5742 mGy rtg lúčov a aplikácii adeturonu.

K — kontrola; A — adeturon; O — ožiarenie; A+O — adeturon+ožiarenie; O+A — ožiarenie+adeturon.

zvýšenie pomeru M/P oproti kontrolným hodnotám od 30. hodiny po operácii (tab. 2). Do 30. hodiny a na 14. deň pomer M/P nie je vyčíslený, pretože v týchto obdobiach sa mitotické figúry vyskytovali len vo veľmi malom počte.

Positívny efekt adeturonu sa prejavil pri jeho aplikácii pred ožiarením (A+O), pretože hodnoty pomeru M/P v porovnaní s kontrolami boli zvýšené iba na 48. hodinu po operácii.

Pri podaní adeturonu po ožiarení (O+A) boli hodnoty pomeru M/P podobné ako po samotnom ožiarení.

Chromozómové abnormality. V regenerujúcej pečeni kontrolných zvierat (K) a zvierat, ktorým bol pred operáciou podaný adeturon (A), bolo 1,8–12,5 % aberantných postmetafáz (obr. 3, tab. 3).

Ožiarenie vyvolalo do 30. hodiny po PHE prudký vzrast počtu chromozómových abnormalít, ktoré sa počas celého vyšetřovaného obdobia vyskytovali v 90–95 % postmetafáz.

Frekvencia chromozómových abnormalít bola adeturonom pozitívne ovplyvnená hlavne pri jeho aplikácii pred ožiarení (A+O). U zvierat tejto skupiny v priebehu celého vyšetřovaného obdobia bol výskyt chromozómových abnormalít signifikantne nižší než po samotnom ožiarení (O).

Pri podaní adeturonu po ožiarení (O+A) sa jeho modifikujúci efekt prejavil menej výrazne. Štatisticky významný rozdiel v porovnaní s ožiarinými zvieratami (O) sme zaznamenali len na 30. a 48. hodinu po PHE.

Diskusia

Vysokodiferencované bunky pečene dospelých organizmov majú nízku proliferatívnu aktivitu a sú relatívne rádiorezistentné. Bunky pečene si však udržiavajú schopnosť syntetizovať DNA a deliť sa, keď sú k deleniu nejakým spôsobom, napr. parciálnou hepatektómiou, stimulované.

Na 4. hod. po PHE vstupuje veľká časť buniek synchronne z G_0 štádia do presyntetickej G_1 fázy nasledovanej ďalšími fázami interkinézy a mitózy (Malinovskij a spol. 1973, Zorin a spol. 1975). Regenerujúca pečeň nadobúda tak charakter rádiosenzitivného tkaniva a naviac sú jej bunky až do 48. hodiny po PHE viacmenej synchronizované (Grigorjev a spol. 1971, Fabiánová a spol. 1977), preto tento modelový systém je zvlášť vhodný pre štúdium latentného poškodenia a možnosti jeho ochrany.

Jednorazové ožiarenie dávkou 5742 mGy spôsobilo oneskorené zahájenie mitózy v regenerujúcej pečeni menej ako o 6 hodín, čo súhlasí s údajmi Gilijana a Malinovského (1976), ktorí pri ožiarení jednorazovou dávkou 630 rad pred PHE zistili zabrzdenie mitotickej aktivity o 4 hodiny. Maximálny počet mitotických figúr sme po tejto dávke zaznamenali o 18 hodín neskôr

ako u neožiarených kontrolných zvierat (Kropáčová a Mišúrová 1981). V neskorších intervaloch po PHE sa rozdiel medzi hodnotami mitotického indexu u ožiarených a kontrolných zvierat stráca.

Z uvedených výsledkov vyplýva, že jednorazové ožiarenie ovplyvňuje predovšetkým prvú vlnu mitózy, ktorá u kontrolných zvierat nastupuje do 30. hodiny po PHE.

Inhibícia mitotickej aktivity indukovaná žiarením bola pozitívne ovplyvnená podaním adeturonu pred ožiarení v podobnom rozsahu ako pri aplikácii cysteamínu (Kropáčová a spol. 1980).

Vzrast pomeru M/P indukovaný žiarením bol tiež čiastočne zmiernený adeturonom, resp. cysteamínom, iba pri aplikácii pred ožiarení.

Výraznejšie sa prejavil ochranný efekt uvedených rádioprotektívnych látok na frekvenciu chromozómových abnormalít. Pri aplikácii adeturonu 30 minút pred ožiarení bola frekvencia chromozómových abnormalít približne o 20 percent nižšia ako po samotnom ožiarení (Kropáčová a spol. 1980).

Pri postiradiačnej aplikácii adeturonu alebo cysteamínu bol efekt menej výrazný, pretože počet aberantných postmetafáz bol iba o 18 %, respektíve o 12 % nižší ako po samotnom ožiarení.

Uvedené nálezy svedčia o tom, že rádioprotektívne látky — adeturon a cysteamín — čiastočne zabráňujú vzniku latentného poškodenia v orgánoch s nízkou proliferatívnou aktivitou.

Na základe hodnôt MI a pomeru M/P v regenerujúcej pečeni potkanov pri postiradiačnej aplikácii rádioprotektívnych látok predpokladáme, že mechanizmy zúčastňujúce sa pri bunkovom delení sú v intaktnej pečeni poškodené už počas ožiarenia alebo v priebehu niekoľkých nasledujúcich minút, pretože zmeny týchto parametrov pri postiradiačnej (do 30 min) aplikácii adeturonu, respektíve cysteamínu boli podobné ako po samotnom ožiarení, alebo dokonca ešte väčšie.

Na druhej strane znížená frekvencia chromozómových abnormalít zistená aj v prípade postiradiačnej aplikácii adeturonu, respektíve cysteamínu, ukazuje, že žiarením indukované latentné poškodenie genetického materiálu sa prehĺbuje aj po ožiarení a môže byť aspoň čiastočne ovplyvnené rádioprotektívnou látkou podanou v tomto čase.

Súhrn

Sledovali sme zmeny mitotického indexu, (MI), pomeru metafáz k profázam (M/P) a frekvenciu chromozómových abnormalít indukované v pečeni potkanov jednorazovým celotelovým ožiarení rtg lúčmi dávkou 5742 mGy v priebehu 14-dňovej regenerácie po parciálnej hepatektómii.

Keďže ionizujúce žiarenie vyvoláva v intakt-

nej pečeni latentné poškodenie, sledovali sme modifikujúci vplyv rádioprotektívnej látky — adeturonu na rozsah tohoto poškodenia.

Na základe zmien MI a pomeru M/P v regenerujúcej pečeni predpokladáme, že mechanizmy zúčastňujúce sa pri bunkovom delení sú poškodené v intaktnej pečeni už počas ožiarenia alebo v priebehu niekoľkých nasledujúcich minút, pretože zmeny týchto parametrov pri postiradiačnej aplikácii adeturonu (do 30 min) boli podobné ako po samotnom ožiarení.

Na druhej strane znížená frekvencia chromozómových abnormalít zistená aj v prípade postiradiačnej aplikácii adeturonu ukazuje, že latentné, žiarením indukované poškodenie genetického materiálu sa prehlbuje aj po ožiarení a môže byť čiastočne ovplyvnené rádioprotektívnou látkou použitou v tomto čase.

Literatúra

1. CATER, D. B. - HOLMES, B. E. - MEE, L. K.: Cell division and nucleic acid synthesis in the regenerating liver of the rat. *Acta Radiol.*, 46, 1956, s. 655.
2. DUNCAN, D. E.: Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 11, 1955, s. 1.
3. FABIÁNOVÁ, B. - KROPÁČOVÁ, K. - MIŠUROVÁ, E.: Soderžanie DNK i veličina kletočnych jader v regenerirujušej pečeni krys. *Bjull. eksper. biol. med.*, 3, 1977, s. 369.
4. GEREBTZOFF, M. A. - BACQ, Z. M.: Examen histopathologique de souris irradiées après injection de cysteamine. *Experientia*, 10, 1954, s. 341.
5. GILIJANO, N. J. - MALINOVSKIJ, O. V.: Sintez DNK i mitotičeskaja aktivnost v kletkach regenerirujušej pečeni krys posle rentgenovskogo oblučeniya na stadijach G₀ i G₁. *Citologija*, 18, 1976, s. 1284.
6. GILIJANO, N. J. - MALINOVSKIJ, O. V.: Vychod chromosomnykh aberracij inducirovannykh x-oblučenijem v kletkach regenerirujušej pečeni krys v različnyje periody regeneracionnogo cikla. *Citologija*, 19, 1977, s. 367.
7. GRIGORJEV, J. G. - SAVČENKO, N. J. - RYŽOV, U. I.: Citogenetičeskaja charakteristika dejstvija protonov vysokoj energii na model regenerirujušej pečeni krys. In: *Voprosy radiobiologii i biologičeskogo dejstvija citostatičeskich preparatov*. TOMSK, 3, 1971, s. 5.
8. HIGGINS, G. M. - ANDERSON, Q. M.: Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver white rat following partial surgical removal. *Arch. Path.*, 12, 1931, s. 187.
9. KROPÁČOVÁ, K. - MIŠUROVÁ, E. - PRASLIČKA, M.: Influence of cysteamine and rtg irradiation on mitotic activity and chromosomal abnormalities in regenerating liver of rats. *Radiobiol. Radiother.*, 1, 1980, s. 55.
10. KROPÁČOVÁ, K. - MIŠUROVÁ, E.: Mitotičeskaja aktivnost i chromosomnye aberacii v regenerirujušej pečeni krys posle rentgenovskogo oblučeniya. *Bjull. eksper. biol. med.*, 3, 1981, s. 359.
11. KUNA, P.: Význam tkáňové hypoxie pro zvýšení radiorezistence savčího organismu. *Voj. zdrav. Listy*, 42, 1973, s. 128.
12. KUNA, P.: Možnosti chemické radioprotekce v případě neutronového ožáření. *Voj. zdrav. Listy*, 48, 1978, s. 238.
13. KUNA, P.: Radioprotective and hemodynamic action of cystamine given i.m. in rats. *Radiobiol. Radiother.*, 22, 1981, s. 793.
14. KUNA, P.: Nástup radioprotektivního účinku gama-fosu (WR-2721) u myší. *Čas. Lék. čes.*, 121, 1982, s. 912.
15. MALINOVSKIJ, O. V. et al.: Eksperimentaľnoje obnaruženije granicy meždu periodami G₀ i G₁ u kletok regenerirujušej pečeni krys. *Citologija*, 15, 1973, s. 1048.
16. MOLE, R. M. - TEMPLE, D. M.: Intestinal damage by radiation and its chemical modification. *Nature*, 180, 1957, s. 1278.
17. PANTEV, T. T.: Podchodi metodologija i eksperimentalni rešenija v farmakochimičnata zaščita ot joniziraščite lčenija. *Avtoreferat na disertacija*. Sofia 1984.
18. POLIŠČUK, A. M.: Vlijaniye rentgenovskogo oblučeniya na sintez DNK i kinetiku kletočnoj populacii v regenerirujušej pečeni krys. II. Oblučeniye kletok v periodach S i G₂. *Citologija*, 15, 1973, s. 712.
19. STEWENSON, K. G. - CURTIS, H. J.: Chromosomal aberrations in irradiated and nitrogen mustard-treated mice. *Radiat. Res.*, 15, 1961, s. 774.
20. ZORIN, A. V. - ISANIN, N. A. - JAKOVLEV, A. J.: Analiz kinetiki perechoda kletok k sintezu DNK v sistemach so stimulirovannoj proliferacii. III. Regenerirujuščaja pečen. *Citologija*, 17, 1975, s. 783.

Kľúčové slová: Jednorázové celotelové ožiarenie; Latentné poškodenie pečene; Vplyv adeturonu.