

616.71-018.46-036.12:616-001.28

DLOUHODOBÉ POŠKOZENÍ KOSTNÍ DŘENĚ VYVOLANÉ IONIZUJÍCÍM ZÁŘENÍM

RNDr. Jiřina VÁVROVÁ, CSc.

Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav JEP, Hradec Králové

(náčelník: genmjr. prof. MUDr. Jaroslav Vaňásek, CSc.)

Úvod

Pozdní účinek ionizujícího záření na normální tkáň je jedním z důležitých faktorů limitu-

jících dávku záření v radiační terapii. Z hlediska obnovy poškození vyvolaného ozářením v jednotlivých tkáních můžeme tyto rozdělit do dvou skupin: 1. rychle odpovídající tkáň,

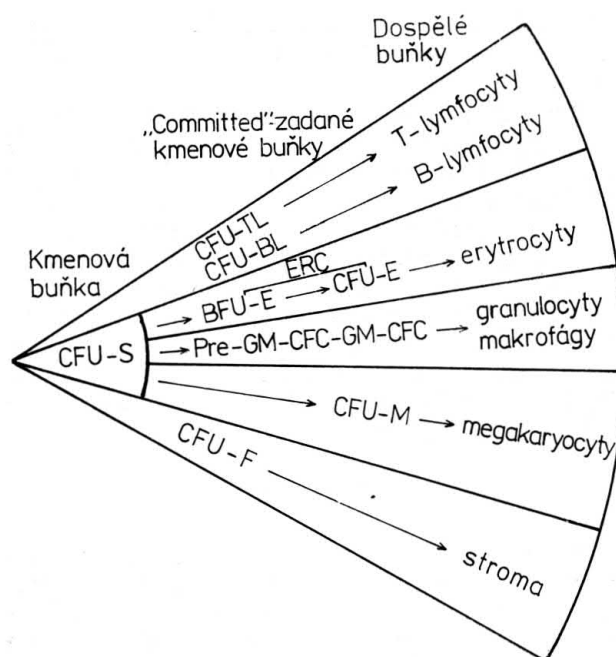
kam patří především krvetvorné a lymfatické tkáně a střevní epitel; 2. pomalu odpovídající tkáně (plíce, ledviny, mícha). U rychle obnovujících se tkání začíná regenerace obvykle dny, nejpozději týdny po ozáření a v případě nižších dávek záření vede k rychlé obnově poškozené tkáně. U pomalu odpovídajících tkání je regenerace méně významná a k úpravě radičního poškození dochází nitrobuňčnou reparací v jádře a v subcelulárních cytoplasmatických strukturách. U těchto tkání poškození vyvolané zářením zůstává dlouho latentní a projevuje se až měsíce či roky po ozáření.

Při celotělovém ozáření živého organismu gama zářením v dávkách nižších než 5 Gy (u člověka) a 7 Gy (u myši) je přežití ozářeného organismu závislé především na stupni poškození krvetvorby. Přes poměrně dobrou počáteční úpravu krvetvorby na úrovni periferního krevního obrazu chceme v tomto sdělení upozornit na přetrvávající deficit v populaci kmenových buněk krvetvorby mající za následek dlouhodobé poškození krvetvorby.

Radiosenzitivita kmenových buněk krvetvorby

Mezi nejcitlivější buňky k účinkům ionizujícího záření patří kmenová buňka krvetvorby ($D_{0.01} = 0,8 - 1$ Gy) (McCulloch a Till, 1962), označovaná u myši jako CFU-S a tvořící — při aplikaci dřevných či slezinných buněk letálně ozářeným příjemcům — makroskopicky viditelné kolonie. Tato buňka má jednak schopnost sebeobnovy a také se může diferencovat ve více typů krevních buněk. U ostatních živočichů (vyjma mladých krys) ani u člověka se přímý důkaz kmenové buňky krvetvorby zatím nepodařil. Mezi kmenovou buňkou krvetvorby a diferencovanými buňkami v periferní krvi je dlouhá řada buněčných typů. Na obr. 1 je schematicky znázorněna hierarchie hematopoetických buněk. Stále zůstává otevřena otázka existence pluripotentní hematopoetické kmenové buňky. Islam (1985) na základě experimentů s buňkami z kostní dřevě fétů a kostní dřevě od pacientů s akutní myeloidní a chronickou granulocytární leukémií předpokládá, že endostelové buňky (plošné, endotelu podobné buňky, které pokrývají povrch kostní trabekuly) v lidské kostní dřevě jsou multipotentní kmenové buňky schopné transformace a migrace do kostí, kde se mohou přeměnit na osteoblasty či osteoklasty, nebo do kostní dřevě, kde jsou předchůdci všech hematopoetických buněk a buněk stromatu kostní dřevě.

Většina zadaných kmenových buněk je detekována jejich schopností produkovat kolonie in vitro při použití růstových médií a kolonie stimulujících faktorů. Pouze CFU-S lze u myši testovat in vivo a také stanovení ERC se provádí in vivo. V experimentech na zvířatech — především myších — bylo získáno mnoho údajů o přežívání progenitorových buněk v závislosti na dávce záření. Na obrázku 2 jsou zná-



Obr. 1. Schematické znázornění hematopoetické diferenciace

CFU-S — buňky tvořící kolonie na myších slezinách (kmenová buňka)

„Committed“ — zadané kmenové buňky — kmenové buňky krvetvorby, které se mohou diferencovat již pouze jedním směrem

ERC — buňky citlivé na erythropoetin

BFU-E — jednotka vytvářející explozivně vznikající kolonie erytrocytů řady (velmi nezralá kmenová buňka erytrocytů řady)

CFU-E — jednotka vytvářející kolonie erytrocytů řady

preGM-CFC — progenitorové buňky vytvářející kolonie granulocytů a makrofágů v difúzních komůrkách

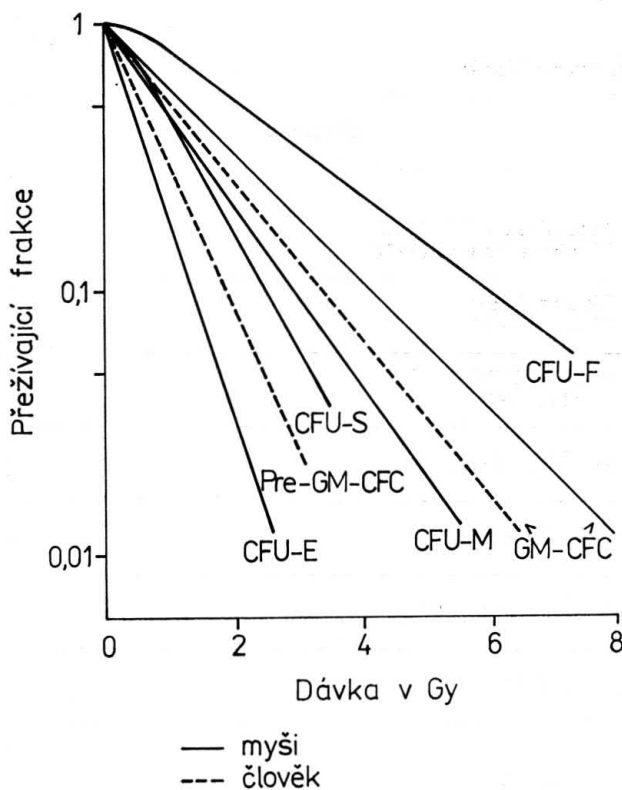
GM-CFC — buňky vytvářející kolonie granulocytů a makrofágů

CFU-F — jednotka vytvářející kolonie stromatických buněk

CFU-TL — buňky vytvářející kolonie T lymfocytů

CFU-BL — buňky vytvářející kolonie B lymfocytů

zorněny křivky přežití jednotlivých progenitorových buněk v závislosti na dávce záření, po ozáření buď in vivo (u myši), či in vitro (u lidí). Z obrázku je patrná lineární závislost mezi logaritmem množství přežívajících buněk a dávkou záření (neboli exponenciální závislost mezi množstvím kmenových buněk a dávkou záření). V případě ozáření malými dávkami (asi do 1 Gy) u některých kmenových buněk (především CFU-S a CFU-F) tato závislost neplatí, na křivce je patrné tzv. „raménko“; znamená to, že ve skutečnosti po takto malých dávkách přežívá více buněk, než odpovídá lineární závislosti mezi logaritmem počtu přežívajících buněk a dávkou záření. Tuto skutečnost charakterizuje v matematických modelech extrapolací číslo n , nebo použijeme-li lineárně kvadratických parametrů poměr α/β . Nejpatrnější je raménko u fibroblastických progenitorových buněk CFU-F a u myších CFU-S. Pro frakci přežívajících buněk $[S]$ platí vztah:



Obr. 2. Přežívání hematopoetických a stromatických progenitorových buněk po akutních dávkách ionizujícího záření (Hendry, 1985). Zkratky jako u obr. 1

$$S = n \cdot \exp \{-D/D_0\}$$

n = extrapolační číslo

D = celková dávka záření

D_0 = dávka záření, po které přežívá 37 % buněk

Použijeme-li k popisu křivkového modelu lineárně kvadratických parametrů, pak platí:

$$S = \exp - (\alpha D + \beta D^2)$$

α a β jsou konstanty pro různé tkáně a různé typy záření. V případě, že se netvoří raménko platí, že $\alpha = 1/D_0$. Poměr α/β je měřítkem zakřivení křivky přežití buněk po ozáření, důležitý především pro odpověď buněk na nízké dávky záření (Denekamp, 1986).

Hodnoty D_0 (charakterizující citlivost kmenových buněk k ionizujícímu záření) pro jednotlivé progenitorové buňky, jak byly získány z literatury, jsou popsány v tabulce 1. Z tabulky je zřejmé, že většina experimentů byla provedena na myších, kde granulocyto-makrofágové prekurzory se zdají být rezistentnější než erytroidní prekurzory a než CFU-S. Největší radiorezistence byla popsána pro CFU-F (stromatické progenitorové buňky), kde produkují kolonie především fibroblasty (u lidí), u myší tvoří kolonie i buňky endoteliální a makrofágy.

Jak je patrné z tabulky 1 radiosenzitivita hematopoetických progenitorových buněk je značná, avšak krvetvorný systém patří mezi rychle se obnovující tkáně (Withers, 1984), u kterých

regenerace začíná brzy po ozáření (24–48 hodin). Úprava radiačního poškození nitrobuňčovou reparací v jádře a subcelulárních cytoplazmatických strukturách, důležitá pro reparaci poškození u pomalu odpovídajících tkání, má u krvetvorného systému jen minimální úlohu (Kimler aj., 1984).

Reziduální poškození krvetvorby

U myši musí být zachováno alespoň 1–2 % buněk kostní dřeně, nebo 0,5 % z celkového množství CFU-S (Darenskaja, 1974), aby regeneraci buněk bylo zajištěno přežití ozářených myši (u lidí je procento nutné k přežití větší). Zničilo-li ozáření více než 90 % kmenových buněk krvetvorby, regenerace probíhá exponenciálně (Nečas a Znojil, 1985); naopak v případě menšího poškození než 90 % je regenerace pomalá. Normálního počtu CFU-S může být dosaženo dříve po iniciálním větším poškození než v případě malého iniciálního poškození.

Po ozáření myši vysokými subletálními dávkami byla pozorována dobrá obnova kmenových buněk krvetvorby zajišťující dlouhodobou funkci kostní dřeně. V průběhu prvních tří týdnů po ozáření je zkrácen buněčný cyklus a 40 až 60 % CFU-S vstupuje do mitózy (u normálních myši 10–20 %). Za 3 týdny je regenerace prakticky ukončena a zůstávají pouze reziduální defekty hemopoézy (např. množství CFU-S je asi na 80 % kontrolních hodnot; jsou-li buňky kostní dřeně transplantovány letálně ozářenému příjemci, je jejich schopnost obnovit příjemcovu krvetvorbu snížena). Tyto defekty se z počátku málokdy objeví na úrovni počtu krevních elementů, protože deficit v hematopoéze je kompenzován zvýšeným počtem dělení kmenových buněk krvetvorby i buněk progenitorových. Přes dlouhodobou funkci těchto mechanismů dochází od šesti měsíců po jednorázovém ozáření 5 Gy k hlubokému (40 % kontrolních hodnot) poklesu počtu CFU-S v kostní dřeně, při konstantním počtu jaderných buněk ve femuru (Vávrová a Petýrek, 1986). Za 12 měsíců po ozáření 5 Gy se reziduální poškození přetrvávající na úrovni kmenových buněk krvetvorby od 6. měsíce projevilo i vznikem anémie, přestože především populace erytroidních progenitorových buněk má značnou schopnost zvětšit se, umožňující jí za stresových podmínek z malého počtu kmenových buněk v průběhu 5–10 dělení znásobit populaci na velké počty erytroblastů a tím zachovat pro organismus důležité počty erytrocytů v periferní krvi.

Všechny kompenzační mechanismy na úrovni kmenových buněk krvetvorby i na úrovni progenitorových buněk mohou fungovat jen po určitou omezenou dobu a jak slábnou, dochází k hypoplazii kostní dřeně a později i poklesu krevních elementů. Po opakovaném ozáření, např. 4×5 Gy s intervalem 21 dní mezi jednotlivými ozářeními, jsou změny ještě daleko více patrné. Změny počtu CFU-S ve femuru myši po

Tab. 1

Hodnoty D_0 pro progenitorové buňky

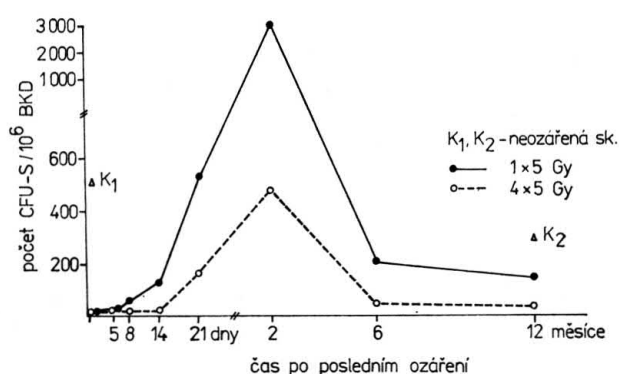
Buňky	Zdroj	D_0 (Gy)	Literatura
Myš CFU-S	kostní dřeň	0,8—1,2 (γ)	McCulloch a Till (1962) Hendry a Howard (1971)
CFU-BL CFU-TL	slezina slezina	0,9 (γ) 1,8 (γ)	Hendry (1985) Hendry (1985)
PreGM-CFC GM-CFC	kostní dřeň kostní dřeň	1,4 (γ) 1,6—2,4 (γ)	Gordon (1975) Gordon (1975)
CFU-M	kostní dřeň	1,3 (γ)	Nakeff aj. (1979)
CFU-E	kostní dřeň	0,7 (γ)	Nakeff aj. (1979)
BFU-E	kostní dřeň	0,7 (γ)	Wagemaker aj. (1979)
CFU-F	kostní dřeň	1,5—4 (X, γ)	Xu aj. (1983)
Člověk PreGM-CFC GM-CFC	kostní dřeň kostní dřeň	0,9 (γ) 1,2—1,6 (γ)	Gordon (1975) Hendry (1985) Kimler aj. (1984)

γ – gama záření; X – RTG záření
zkratky jako u obr. 1

jednorázovém [5 Gy] a opakovaném [4×5 Gy] ozáření jsou znázorněny na obrázku 3. K úpravě počtu CFU-S v kostní dřeni po jednorázovém ozáření dochází 21. den a po čtvrtém ozáření 5 Gy až 60. den. 6 a 12 měsíců po ozáření byl u obou skupin patrný hluboký pokles v počtu CFU-S (výraznější u skupiny ozářené 4×5 Gy).

Hendry aj. (1983) sledovali změny periferního krevního obrazu během jednoho roku po ozáření RTG v dávce 4×4,5 Gy (interval mezi ozářeními 21 dní). Zatímco počet leukocytů 2 měsíce po ozáření přetrvával na 70 % kontrolních hodnot, počet erytrocytů byl v této době již normalizován, avšak v dalším období začal klesat. 4 měsíce po ozáření dosáhl 50 % kontrolních hodnot a na těchto počtech setrval až do konce experimentu (12 měsíců). Je pravděpodobné, že na obnově krvetvorby se z velké části podílí také slezina [24. den po ozáření bylo pozorováno 20násobné zvýšení počtu GM-CFC ve slezině; 53. den byl návrat k normě]. Po opakovaném ozáření dochází pravděpodobně ke změnám v obnovovací schopnosti CFU-S produkovat stejné množství dceřiných CFU-S jako produkují neovlivněné CFU-S. To je také problém účinku cytostatických látek.

Dávka 4×5 Gy představuje maximálně tolerovanou dávku záření z hlediska časných účinků. Dlouhodobé poškození krvetvorby vyvolávají však i dávky menší, např. 4×1,5 Gy s in-



Obr. 3. Změny počtu CFU-S ve femuru myši celotělově ozářené gama zářením dávkou 1×5 Gy a 4×5 Gy

tervalem 21 dní mezi jednotlivými dávkami [Xu aj., 1983] nebo jednorázová dávka 5 Gy [Vávrová a Petýrek, 1986]. Při frakcionaci 0,3 Gy denně [celkově 4,5 Gy] bylo množství CFU-S ve femuru za 6 měsíců po ozáření sníženo na 50 % oproti kontrolní skupině. Z hlediska dlouhodobého poškození krvetvorby toleruje organismus celotělovou dávku 0,9 Gy (jednorázově), anebo dávku 1,5 Gy (frakcionováno 0,1 Gy za den) [Rubin aj., 1981].

Efektivní krvetvorba je produktem vzájemné spolupráce mezi kmenovými buňkami krvetvorby a jejich podpůrným stromatem, poskytujícím výhodné mikroprostředí pro regulaci jejich proliferace a diferenciace. Zatímco kmenové

buňky krvetvorby v organismu cirkulují, hemopoéza je limitována v kostní dřeni a v menším stupni i v jiných krvetvorných orgánech. Důkazem toho je tzv. „homíng“ neboli vcestování a usídlení transplantovaných buněk kostní dřeni ve dření či slezině letálně ozářených myši. Po vysokých dávkách lokálního ozáření kostní dřeni je pozorována dvoufázová aplazie. První fáze je vyvolána destrukcí kmenových buněk krvetvorby, a když kmenové buňky z neozářených částí osídlí ozářenou část kostní dřeni, krvetvorba se zde obnoví. Později však dojde k dlouhodobě přetrvávající aplazii v ozářené části kostní dřeni, která je výsledkem poškození hematopoetického mikroprostředí. Buňky stromatu tvoří v kultuře in vitro fibroblastické kolonie (CFU-F). Tyto buňky mají větší radiorezistenci ($D_0=2$ Gy) oproti CFU-S.

Při dlouhodobém sledování počtu CFU-F v kostní dřeni po celotělovém ozáření myši RTG paprsky dávkou 4,5 Gy je podobně jako u CFU-S pozorována 2 měsíce po ozáření obnova na 80 % výchozích hodnot a 12 měsíců po ozáření pokles počtu CFU-F na 50 % výchozích hodnot. Také opakované ozáření $4 \times 4,5$ Gy vyvolává 6 měsíců po ozáření hluboký pokles počtu CFU-F ve femuru (10 % výchozích hodnot). Po ozáření $4 \times 1,5$ Gy s 21denními intervaly mezi jednotlivými ozářeními na rozdíl od CFU-S byla pozorována kompletní obnova jejich počtu (Xu aj., 1983). Lze tedy říci, že menší dávky záření poškozuji CFU-F méně než CFU-S. Při dávkách větších bylo pozorováno stejné dlouhodobé poškození.

Závěr

Kmenová buňka krvetvorby patří mezi nejcitlivější buňky co se týká účinku ionizujícího záření ($D_0=1$ Gy). V časném období (1–2 měsíce) po celotělovém ozáření vysokými subletálními dávkami záření je hematopoetická obnova téměř kompletní (počet CFU-S je na úrovni neozářené skupiny, počet krevních elementů je obnoven). Tento stav je zabezpečen kompenzačními mechanismy na úrovni kmenové buňky krvetvorby i na úrovni tzv. zadaných kmenových buněk, kde je urychlen buněčný cyklus a více klidových buněk vstupuje do mitózy. Přesto však záření vyvolává reziduální poškození především na úrovni sebeobnovy těchto buněk. V průběhu času kompenzační mechanismy slábnou a dochází k hypoplazii kostní dřeni a poklesu krevních elementů (6 až 12 měsíců po ozáření). Jako prahová dávka z hlediska dlouhodobých změn krvetvorby je považována celotělová dávka 1 Gy pro jednorázové ozáření a 1,5 Gy pro frakcionované ozáření.

Krvetvorné mikroprostředí je méně citlivé k účinkům ionizujícího záření než kmenové buňky krvetvorby (D_0 pro CFU-F je 2 Gy). Po malých dávkách záření dochází z hlediska

dlouhodobého poškození ke kompletní obnově počtu CFU-F, avšak větší dávky vyvolávají stejné dlouhodobé poškození CFU-F jako CFU-S. Jak velký je příspěvek poškození hematopoetického mikroprostředí k pozdním změnám projevujícím se na úrovni kmenových buněk krvetvorby není zatím zcela jasné.

Souhrn

Práce hodnotí účinek ionizujícího záření na hematopoetické tkáně z hlediska dlouhodobých účinků. Ukazuje se, že i když po celotělovém ozáření vysokými subletálními dávkami ionizujícího záření dojde v průběhu dvou měsíců téměř ke kompletní obnově těchto tkání, v průběhu 6–12 měsíců po ozáření se projevuje reziduální poškození krvetvorby, především na úrovni kmenových buněk krvetvorby a jejich sebeobnovy.

Literatura

1. DARENSKAJA, N. G.: Biologičeskije efekty neravnomernych lučevych vozdejstvij. Moskva, Atomizdat 1974. 132 s.
2. DENEKAMP, J.: Cell kinetics and radiation biology. Int. J. Radiat. Biol., 49, 1986, 2, s. 357–380.
3. GORDON, M. Y.: A comparison of the radiosensitivity and o. e. r of human and mouse marrow progenitor cells cultured in agar in diffusion chambers. Int. J. Radiat. Biol., 28, 1975, s. 285–290.
4. HENDRY, J. H.: Review: Survival curves for normal-tissue clonogens. Int. J. Radiat. Biol., 47, 1985, č. 1, s. 3–16.
5. HENDRY, J. H. - HOWARD, A.: The response of haemopoietic colony-forming units to single and split doses of gamma-rays or D-T neutrons. Int. J. Radiat. Biol., 19, 1971, č. 1, s. 51–64.
6. HENDRY, J. H. - XU, C. X. - TESTA, N. G.: A cellular analysis of residual haemopoietic deficiencies in mice after 4 repeated doses of 4,5 Gy X rays. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 9, 1983, s. 1641–1646.
7. ISLAM, A.: Haemopoietic stem cell: A new concept. Leukemia Res., 9, 1985, č. 11, s. 1415–1432.
8. KIMLER, B. F. - PARK, C. H. - YAKAR, D. - MIES, R. M.: Lack of recovery from radiation-induced sublethal damage in human haematopoietic cells. Br. J. Cancer, 49, 1984, suppl. 6, s. 221–225.
9. McCULLOCH, E. A. - TILL, J. E.: The sensitivity of cells from normal mouse bone marrow to gamma radiation in vitro and in vivo. Radiat. Res., 16, 1962, s. 822.
10. NAKKEFF, A. - McLELLAN, W. L. - BRYAN, J. - VALERIOTE, F. A.: Response of megakaryocyte, erythroid and granulocyte-macrophage progenitor cells in mouse bone marrow to gamma-irradiation and cyclophosphamide. Exp. Haematol. Today, 1979, s. 99–104.
11. NEČAS, E. - ZNOJIL, V.: Oscillation in stem cell proliferation after 1,5 and 2,6 Gy total body irradiation. In: Abstracts of 19th Annual Meeting European Society for Radiation Biology, Praha 1985, s. 160.
12. RUBIN, P. - BENNETT, J. M. - BEGG, C. - BOZDECH, M. J. - SILBER, R.: The comparison of total body irradiation vs. Chlorambucil and Prednisone for remission induction of active chronic lymphocyte leukaemia: an ecol. study. I. Total body irradiation-response and toxicity. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 7, 1981, s. 1623–1632.
13. VÁVROVÁ, J. - PETÝREK, P.: Změny v regeneraci krvetvorných a lymfoidních tkání po opakovaném

- gama ozáření u myši. In: Sborník věd. prací VLVDÚ JEP, Hradec Králové, v tisku.
14. WAGEMAKER, G. - PETERS, M. F. - BOL, S. J. L.: Induction of erythropoietin responsiveness in vitro by a distinct population of bone marrow cells. *Cell Tissue Kinet.*, 12, 1979, s. 521—537.
 15. WILSON, F. D. - GRADY, L. O. - McNEILL, C. J. - MUNN, S. L.: The formation of bone marrow derived fibroblastic plaque in vitro. *Exp. Hematol.*, 2, 1974, s. 343—354.
 16. WITHERS, H. R.: Biological basis for modifying conventional fractionation regimens in radiotherapy. *Strahlentherapie*, 160, 1984, s. 670—677.
 17. XU, C. X. - HENDRY, J. H. - TESTA, N. G.: The response of stromal progenitor cells in mouse marrow to graded repeated doses of X-rays or neutrons. *Radiat. Res.*, 96, 1983, s. 82—89.
- Klíčová slova: Ionizující záření; Hematopoetické tkáně; Reziduální poškození krvetvorby.