

539.16.08:542.98:612.112.94:614.898.5

OPTIMALIZACE VÝBĚRU METODY PRO STANOVENÍ PROLIFERAČNÍ ODPOVĚDI PERIFERNÍCH LYMFOCYTŮ NA MITOGENY V OBLASTI NÍZKÝCH DÁVEK OZÁŘENÍ RYCHLÝMI NEUTRONY CYKLOTRONU

Mjr. MUDr. Z. REFKA, RNDr. M. ŠVEC, Ing. P. AGANOV, plk. doc. MUDr. V. SVOBODA, CSc., Ing. F. PODZIMEK, CSc.
Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie, Praha
(náčelník: plk. MUDr. V. Kotlář, CSc.)
Vojenská lékařská akademie JEP, Hradec Králové
(náčelník: plk. prof. MUDr. P. Kuna, DrSc.)

Úvod

Se vzrůstajícím využíváním zdrojů ionizujícího záření (IZ) se zvyšuje počet lidí podléhajících se na profesionální i neprofesionální expozici. Pro stanovení somatických i genetických následků expozice IZ, pro terapeutické postupy a v neposlední řadě pro sledování úrovně radiační ochrany jsou vhodné nejen paralelní znalosti o obdržené dávce pomocí dozimetrického stanovení či fyzikálních výpočtů, ale i o stupni ovlivnění organismu ve vztahu dávka – účinek na základě některého citlivého biologického systému.

Na biologickou dozimetrii a indikaci expozice organismu je kladena řada požadavků (4, 9, 12, 13, 16), které se zatím nedaří zcela splnit. Přestože existuje více přístupů k řešení této problematiky, největšího praktického uplatnění dosáhla analýza chromozomových aberací, a i ta má řadu obtíží v interpretaci výsledků a je technicky náročná (4).

Jedním z přístupů k řešení biologické dozimetrie je sledování ovlivnění proliferačních charakteristik lymfocytů (3). Lymfocyty jsou elementy radiosenzitivní, lehce dostupné, cirkulují v celém organismu, a jsou tak reprezentantem průměrné celotělové dávky. Pokud nedojde ke stimulaci vnějším podnětem, neproliferují, přežívají značnou dobu a těchto více než 99 % lymfocytové populace se nachází v Go fázi. Testy proliferace mitogeny stimulovaných lymfocytů jsou v praxi široce využívány. V převážné většině se pracuje se separovanými buňkami. Tyto metody se uplatňovaly i v řadě pokusů při studiu radiosenzitivity a odezvy lymfocytů (1, 2, 5, 6, 7, 10, 14, 15). V experimentech byly testovány poměrně vysoké dávky ionizujícího záření většinou ve fixním kultivačním čase.

V naší práci jsme při optimalizaci metodiky použili proliferaci stimulovaných lymfocytů z plné krve, ozáření bylo provedeno řadou nízkých dávek rychlých neutronů. Byly použity tři různé dostupné mitogeny a pět rozdílných časů kultivace. Vzorky byly ozářeny in vitro ve snaze eliminovat eventuální ovlivnění celého organismu stresem, subklinickou infekcí laboratorních zvířat apod. Cílem bylo tedy poznat ovlivnění rychlosti a intenzity odpovědi ozáření rychlými neutrony v oblasti nízkých dávek při použití různých koncentrací dostupných mitogenů a stanovit optimální kultivační časy (časová rozmezí) pro jednotlivé dávky záření.

Materiál a metoda

Mikrometodu lymfoblastické transformace z plné krve, včetně stanovení optimálních koncentrací mitogenů pro stimulaci buněk a hodnocení výsledků, jsme podrobně popsali již dříve (18).

Principem uvedené metody je měření tritiovaného prekursoru nukleových kyselin (^3H -thymidinu), který je inkorporován do mitogenem stimulovaných lymfocytů. Množství vestavěného radionuklidu je úměrné kvantu vyprodukované DNK a měří se kapalinovým scintilačním počítacím beta aktivity, tj. počtem impulsů za minutu (CPM).

Kultivační médium

RPMI-1640 (ÚSOL, Praha) bylo obohaceno přidáním 0,3 g glutaminu (ÚSOL, Praha) na 1 litr. Dále byla přidána antibiotika, a to penicilin dras. sůl 100 j/1ml a streptomycin 100 $\mu\text{g}/1\text{ml}$; pH bylo upraveno 7,5% roztokem kyselého uhličitanu sodného (ÚSOL, Praha) do rozmezí 7,2–7,4.

Mitogeny

Roztoky s různou pracovní koncentrací mitogenů byly připraveny ze zásobních roztoků přidavkem 0,9% chloridu sodného, skladovány byly při teplotě -20°C , což zaručuje reprodukovatelnost výsledků.

Do testu byly použity:

fytohemagglutinin (PHA, Phytohaemagglutinin, HA-15, Wellcome, Velká Británie) v koncentraci 120 $\mu\text{g}/1\text{ml}$ média;

konkanavalin-A (CON-A, Concanavalin-A, Pharmacia, Upssala, Švédsko) v koncentraci 15 $\mu\text{g}/1\text{ml}$ média;

pokeweed mitogen (PWM, Pokeweed mitogen, Serva, Feinbiochemica, Heidelberg /New York/) též v koncentraci 15 $\mu\text{g}/1\text{ml}$.

Provedení

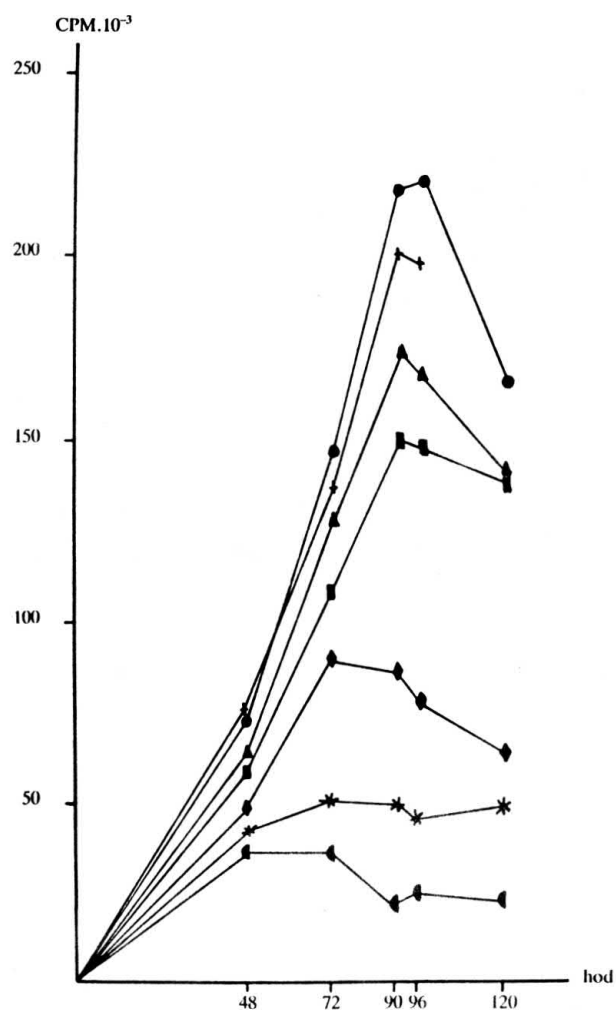
Heparinizovaná venózní krev od sedmi dárců byla rozdělána po 2 ml do stříkaček pro jednorázové použití. Stříkačky s plnou krví dárců pak byly ozářeny

dávkami 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; a 3,0 Gy. Krev určená jako kontrolní nebyla ozářena. Ozáření bylo provedeno na izochronním cyklotronu U 120 M UJF ČSAV, Řež rychlými neutrony vznikajícími při reakci $^9\text{Be} (d, n) ^{10}\text{B}$. Vzorky byly umístěny 50 cm od terče v ose svazku, 5 cm od ústí kolimátoru o průměru 160 mm. Energie deutronů byla 20 MeV, proud 1,2–1,5 $\mu\text{A} \cdot \text{s}^{-1}$, střední energie rychlých neutronů 7,6 MeV. Příkon tkáňové kermy od neutronů činil 105 $\text{mGy} \cdot \text{min}^{-1}$, kontaminace svazku zářením gama byla menší než 3,5 %. Bližší údaje o dozimetrických charakteristikách jsou v práci Podzimek aj. (17).

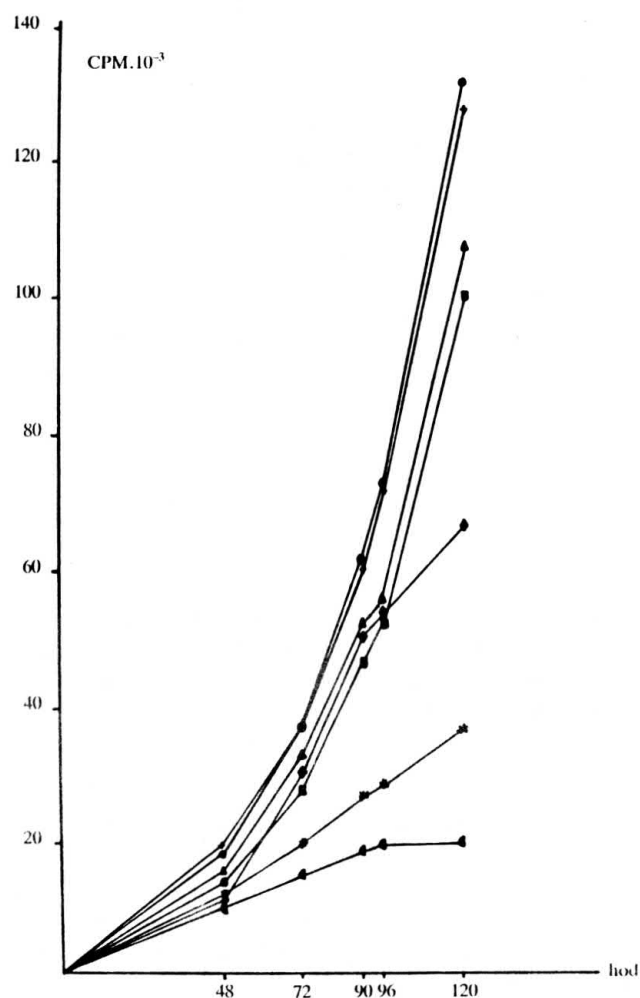
S krví dárců (kontrolní i ozářenou stoupajícími dávkami) byl proveden test lymfoblastické transformace a kultivován v pěti časových variantách 48, 72, 90, 96 a 120 hodin takto: trojice jamek mikrotitračních desek byly naplněny médiem bez mitogenu (pozadí) a médiem s mitogeny příslušných koncentrací o objemu 100 μl . Krev dárců zředěná médiem 1 : 10 byla přidána à 100 μl . (Dávkování krve se děje za per-

manentního míchání na elektromagnetické míchačce, aby nedocházelo k sedimentaci buněčné suspenze); naplněné desky byly inkubovány po příslušnou dobu v termostatu +37 °C s 5% CO_2 a 90% vlhkostí (Hae-reus, Hanau). Následovalo přidání 40 kBq tritiem značeného thymidinu o měrné aktivitě 980 GBq/mM v množství 5 μl , (ÚVVVR, Praha) a inkubace pokračovala ještě 18 hodin za stejných podmínek. Ukončena byla zchlazením desek na -20 °C. Kultury byly dále zpracovány pomocí automatického sklízeče buněk a kapalinového scintilačního počítače beta částic LKB 1217-Rackbeta (18).

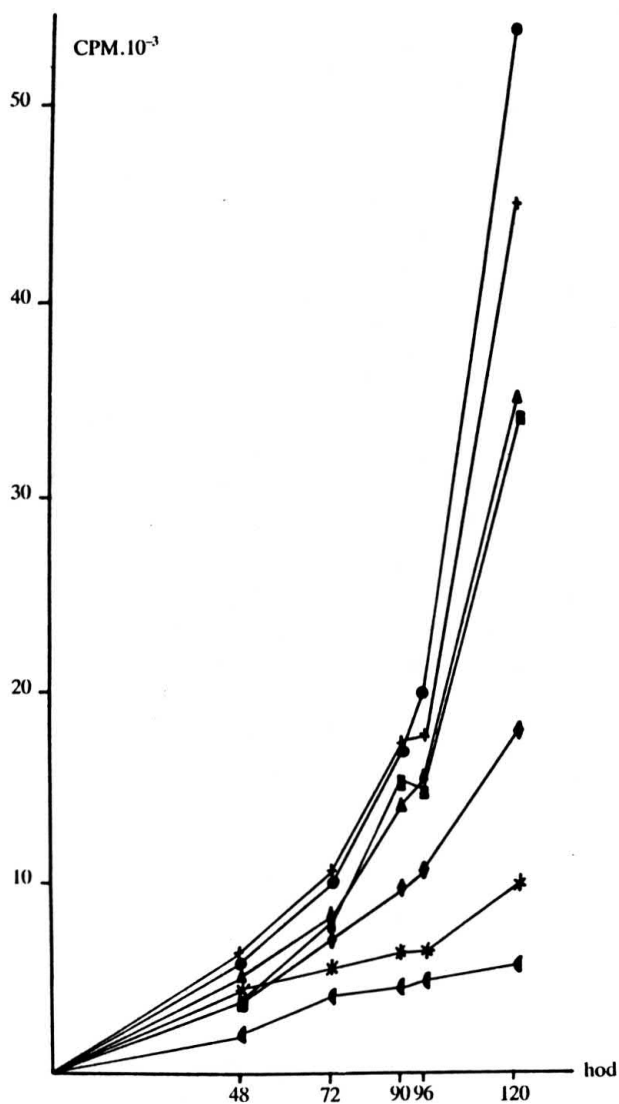
Statistické hodnocení bylo provedeno vypočítáním aritmetického průměru a směrodatné odchylky pro každý triplet dárce, testovanou dávkou mitogenu a kultivační čas. Výpočet byl proveden pro celou testovanou skupinu. Pro každý mitogen, kultivační čas a dávku byl dále zjištěn procentuální podíl odezvy ozářených vzorků k příslušným kontrolám s nulovou dávkou. Pro výpočty odezvových (přežívacích) křivek, hodnoty D_{37} a směrnice byl použit vztah $f = e^{-bD}$, kde f představuje frakci odezvy, b je hodnota směrnice přežívací křivky v semilogaritmickém měřítku a D je hodnota dávky.



Obr. 1. Průběh proliferace PHA mitogenem stimulovaných lymfocytů v závislosti na kultivačním čase a ozáření. Průměrné hodnoty 7 dárců testovaných v tripletech (=21 kultivací) osa x – průměrné hodnoty CPM; osa y – kultivační čas. Grafické symboly znázorňují ozáření vzorků rychlými neutrony v Gy O (●); 0,1 (+); 0,25 (▲); 0,5 (■); 1,0 (◆); 2,0 (*) 3,0 (◼).



Obr. 2. CON-A mitogen; sledované parametry stejné jako v textu pro obr. 1



Obr. 3. PWM mitogen; sledované parametry stejné jako v textu pro obr. 1

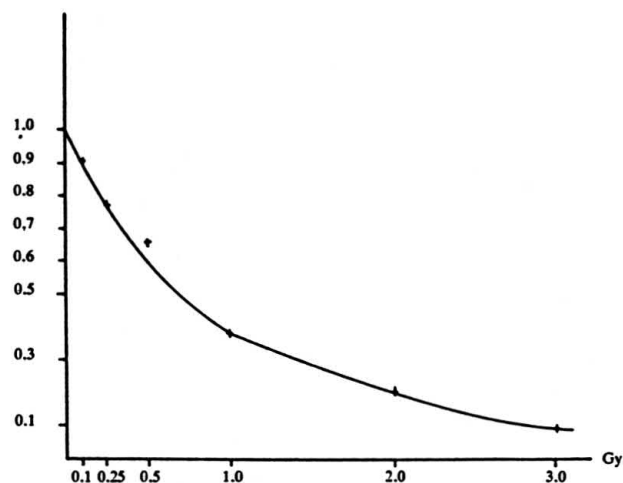
Výsledky

Průběh odezvy proliferace lymfocytů stimulovaných mitogeny (PHA, CON-A a PWM) buněk ozářených i neozářených testovaných v závislosti na době kultivace uvádí obr. 1, 2, 3.

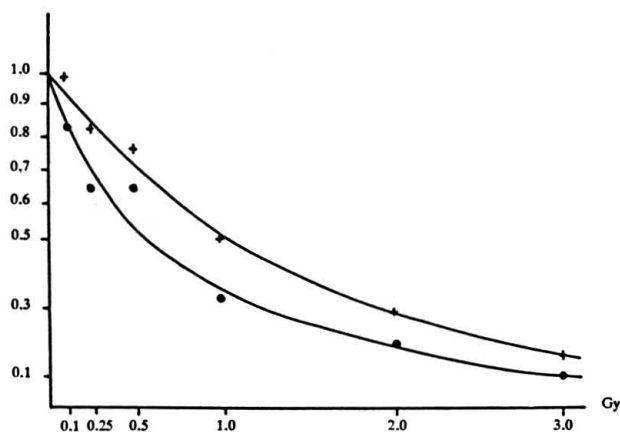
Výsledky jsou prezentovány jako průměrné hodnoty celé skupiny dárců.

Průměrné hodnoty skupiny dárců v relativních ukazatelích prezentuje obrázek 4 a 5.

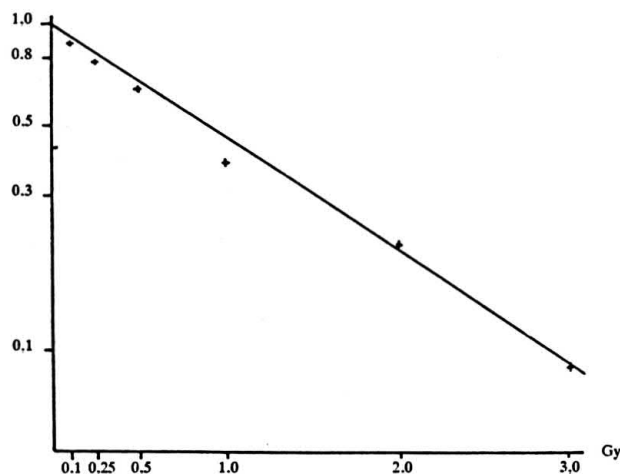
Jako 1 (100 %) byla vzata průměrná hodnota CPM u neozářených buněk; k ní jsou vztaženy hodnoty ozářených vzorků v testovaných dávkách záření pro PHA, CON-A a PWM. Pro PHA jsou uvedeny výsledky pro kultivační čas 90 hodin, pro CON-A a PWM čas 120 hodin. Obdobné výsledky v semilogaritmickém vynesení křivek uvádějí obrázky 6, 7, 8.



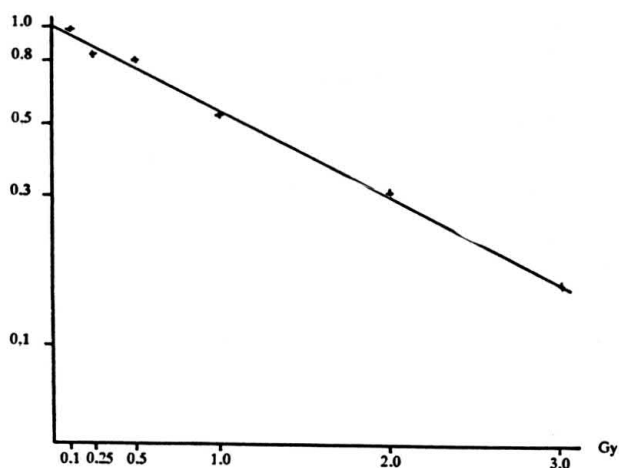
Obr. 4. Relativní odezva ozářených lymfocytů v závislosti na dávce. Hodnoty CPM při nulové dávce uvedené jako 1 (100 %). Mitogen PHA; kultivační čas 90 h. Výsledky hodnocené z parametrů 7 dárců testovaných v tripletech (=21 kultivací).



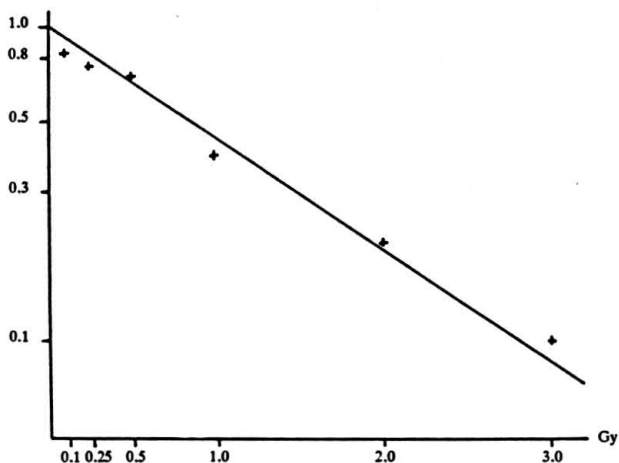
Obr. 5. Relativní odezva ozářených lymfocytů v závislosti na dávce. Hodnoty CPM při nulové dávce uvedené jako 1 (100 %). Mitogeny: CON-A (+); PWM (●); kultivační čas 120 h. Výsledky hodnocené z parametrů 7 dárců testovaných v tripletu (=21 kultivací).



Obr. 6. Semilogaritmické vynesení křivky z obr. 4. Lineární regresní analýza provedena metodou nejmenších čtverců.



Obr. 7. Semilogaritmické vynesení křivky z obr. 5 pro CON-A mitogen



Obr. 8. Semilogaritmické vynesení křivky z obr. 5 pro PWM mitogen

Společné hodnoty skupiny dárců D_{37} a směrnice pro všechny mitogeny, testované dávky a kultivační časy jsou v tab. 1.

Z tabulky lze vyčíst, že nejvyšší citlivost pro stanovení dávky záření při použití PHA jako mitogenu je při kultivačním čase 90 hodin a pro CON-A a PWM 120 hodin.

Diskuse

Výsledky prokázaly vysokou citlivost testu v systému z plné krve, který odstraňuje nepříznivý vliv separačních technik (8, 11). Výhodou je i poměrně malý objem odebírané krve (2 ml) a možnost rychlého zpracování velkého množství vzorků při zabezpečení vhodné přístrojové techniky.

Závěry této práce potvrzují náš předpoklad, že při posuzování odezvy u rozdílně ozářených lymfocytů stimulovaných různými mitogeny není vhodné použít pouze jeden, shodný kultivační čas. To však ani ne-

Tabulka 1

Mitogen	kult. čas	D_{37}	b
PHA	48	3,89	$2,573 \cdot 10^{-4}$
	72	1,95	$5,122 \cdot 10^{-4}$
	90	1,22	$8,224 \cdot 10^{-4}$
	96	1,24	$8,050 \cdot 10^{-4}$
	120	1,45	$6,890 \cdot 10^{-4}$
CON-A	48	4,42	$2,264 \cdot 10^{-4}$
	72	3,24	$3,089 \cdot 10^{-4}$
	90	2,28	$4,394 \cdot 10^{-4}$
	96	2,13	$4,702 \cdot 10^{-4}$
	120	1,56	$6,400 \cdot 10^{-4}$
PWM	48	3,64	$2,748 \cdot 10^{-4}$
	72	3,16	$3,162 \cdot 10^{-4}$
	90	2,23	$4,492 \cdot 10^{-4}$
	96	2,01	$4,973 \cdot 10^{-4}$
	120	1,10	$8,363 \cdot 10^{-4}$

Hodnoty D_{37} a b ve vztahu k použitým mitogenům (PHA, CON-A, PWM), kultivačním časům a testovaným dávkám. Výsledky počítané z parametrů 7 dárců testovaných v tripletech (= 21 kultivací) pro každý mitogen a kultivační čas. Použit vztah $f = e^{-bD}$, kde f = relativní odezva lymfocytů, e = základ přirozeného logaritmu, b = směrnice přežívací křivky v semilog. měřítku, D = dávka (Gy)

překvapuje, poněvadž jednotlivé mitogeny stimulují různé subpopulace lymfocytů s rozdílným nástupem a průběhem proliferace (4). Z obrázků vyplývají malé rozdíly v hodnotách CPM ozářených buněk proti neozářeným, v kultivačních dobách 48, resp. 72 hodin u všech použitých mitogenů. Výraznější rozdíly se objevují u PHA 90 a 96 hodin pro CON-A a PWM při 120hodinové kultivaci. Ve výsledkové části uvádíme jen neoptimálnější průběhy jednotlivých křivek pro PHA mitogen, a to při 90hodinové, u CON-A a PWM 120hodinové kultivační době. U těchto vztahů jsme zjistili hodnoty D_{37} a směrnice vyjadřující největší senzitivitu testu pro stanovení dávky záření. Uvedené výsledky jsou ve shodě s předpokladem, že ovlivnění proliferace lymfocytů ionizujícím zářením neovlivňuje ani tak počet vstupujících buněk do proliferacího cyklu jako zpoždění a ovlivnění dalších cyklů po expozici zářením (1, 10). Literární údaje (1) uvádějí zachování některých biochemických funkcí lymfocytů i po vysokých dávkách gama záření při zastavení proliferační schopnosti. Na přežívacích křivkách jsme nenalezli prahovou oblast. Sledované snížení odezvy se projevilo již v nejnižší testované dávce, tj. u 0,1 Gy, a to u všech mitogenů, bylo-li použito optimálních časů kultivace.

Hodnoty D_{37} a směrnice potvrzují předpoklady o vyšší radiosenzitivitě B-lymfocytů (buněk stimulované PWM). V případě výpočtu individuálních přežívacích křivek jsme nacházeli některé odchylky v hodnotách D_{37} , např. u PHA (90 h) – 1,7 Gy, CON-A (120 h) – 2,0 Gy, PWM (120 h) – 0,5 Gy způsobené buď rozdílnou radiosenzitivitou, nebo individuální

odezvou na stimulaci lymfocytů mitogeny. K bližšímu zhodnocení individuálních rozdílů bude třeba zpracovat větší soubor vyšetření.

Prezentované výsledky jsme nemohli porovnat obdobnou prací, neboť v dostupné literatuře jsme takovou nenalezli. Přibližně podobné uspořádání testu bylo použito v práci Horkého (8) – pro PHA jako mitogen a expozici rtg zářením. Hodnoty D_{37} se pohybovaly kolem 2.5 Gy.

Závěrem konstatujeme, že uspořádání testu s použitím plné krve, při vhodné volbě kultivačních podmínek – jak byly námi ověřeny – poskytuje jednoduché a velmi citlivé hodnocení odezvy periferních lymfocytů i při expozici nízkými dávkami ionizujícího záření. Umožňuje vyšetření většího množství vzorků s využitím automatického zpracování z malých objemů krve.

Souhrn

Autoři testovali odezvu proliferace periferních lymfocytů ozářených nízkými dávkami rychlých neutronů za použití několika mitogenů a kultivačních časů. Jsou uvedeny výsledky odezvových křivek a parametrů radiosenzitivity lymfocytů. V optimálním uspořádání testu se prokázala jeho značná citlivost. O prezentovaných výsledcích je diskutováno.

Literatura

1. AGARWAL, S. et al.: DNA Replication in X Irradiated Human Lymphocytes. *Cancer Res.*, 41, 1981, s. 3 973 až 3 978, 3 978.
2. AKIYAMA, M. et al.: Peripheral Lymphocyte Response to PHA and T Cell Population Among Atomic Bomb survivors. *Radiat. Res.*, 93, 1983, s. 572–580.
3. BARNES, C. – ILBERY, P. – RICKINSON, A.: Form and Function of the Lymphocytes as a Radiation Dosimeter and Indicator of Immunosuppression. *Med. J. Aust.*, 1, 1971, s. 369–378.
4. Biological Dosimetry: Chromosomal Abberation Analysis for Dose Assessment. Technical Report Sciences No 260; International Atomic Agency, Vienna 1986.
5. BLOM, E. et al.: Immune function in Aging Atomic Bomb Survivors Residing in United States. *Radiat. Res.*, 96, 1983, s. 399–410.
6. FORSLUND, T. et al.: Peripheral Blood Lymphocyte Subsets in Radiologists Exposed to Ionizing Radiation. *Acta Radiologica Oncology*, 24, 1985, s. 415–417.
7. HANNAN, M. – GIBSON, D.: Caffeine Sensitation of Cultured Mammalian Cells and Human Lymphocytes Irradiated with Gama Rays and Fast Neutrons. *Radiat. Res.*, 104, 1985, s. 94–101.
8. HORKÝ, J.: Manifestation of Radiation Injury of Human Lymphocytes Using PHA Mitogenic Stimulation in Different Culture Systems. *Physiologica Bohemoslovaca*, 35, 1986, s. 497–504, s. 497–504.
9. ITOGI NAUKI I TECHNIKI, serija Radiocionnaja biologija, Biologičeskaja indikacija lučevogo poraženija, Moskva 1980.
10. JAKOVLEV, A.: Kinetika proliferativnych procesov induciovannych PHA v oblučennych lymfocytach. *Radiobiologija*, 23, 1986, s. 449–453.
11. KNOX, S. – SHIFRINE, L. – ROSENBLATT, L.: Assessment of the in Vitro Radiosensitivity of Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Radiat. Res.*, 89, 1982, s. 575–589.
12. KÖTTELES, G.: Cell Membranes in Radiation Injury. *Isotopenpraxis*, 22, 1986, s. 361–368.
13. KÖTTELES, G. – ALMASSY, Z. – KUBASOVA, T.: Availability and Problems of Biological Indicators for Radiation Injury. In 11. Regional Congress of IRPA, Radiation Protection Meeting, Proceedings Vol 1, Vienna, 1984.
14. RISWIJK, R. – SYBESMA, B. – KATER, L.: A Prospective Study of the Changes in Immunostatus Following Radiotherapy for Hodgkins Disease. *Cancer*, 53, 1984, s. 62–69.
15. SCHWARTZ, J. – DARR, J. – GAULDER, M.: Survival and PHA Stimulation of Gama Irradiated Human Peripheral Blood T Lymphocyte Subpopulations. *Mutation Research*, 107, 1983, s. 413–425.
16. ŠIMŠA, J. aj.: Možnosti využití některých biochemických indikátorů při diagnostice a posouzení účinnosti terapie radiálního poškození. *Voj. zdrav. Listy*, 52, 1987, s. 47–58.
17. PODZIMEK, F. et al.: The Possibilities of Biological Object Irradiation of Czechoslovak Neutron Sources. Abstracts of European Society for Radiation Biology, 19th. Annual Meeting, Prague 26.–30. 9. 1985.
18. ŠVEC, M. – REFKA, Z. – RÁKOSNÍK, P.: Mikrometoda testu blastické transformace lymfocytů z plné krve a některé její podmínky. *Voj. zdrav. Listy*, 56, 1987, č. 3, s. 127–131.

Klíčová slova: Periferní lidský lymfocyt; Test lymfoblastické transformace z plné krve; Rychlé neutrony cyklotronu; Radiosenzitivita; In vitro metoda; Biologická dozimetrie.