

616.24-002-001.29-092.9

HISTOLOGICKÁ EXPRESE RADIAČNÍ PNEUMONITIDY NA MYŠÍM MODELU¹Npor. MUDr. Jan ÖSTERREICHER, ¹doc. RNDr. Jiřina VÁVROVÁ, CSc., ²MUDr. Jan NOŽIČKA,¹doc. MUDr. Pavel PETÝREK, CSc.

Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

¹(rektor: plk. doc. MUDr. Svatopluk Býma, CSc.)

Fingerlandův ústav patologie Fakultní nemocnice, Hradec Králové

²(přednosta: prof. MUDr. Ivo Šteiner, CSc.)**Úvod**

Radiační pneumonitida (RP) patří v současnosti mezi nejvíce život ohrožující komplikace dřeňového syndromu, dosud jediné efektivně léčitelné formy akutní nemoci z ozáření (ANO). Radiační pneumonitida se obvykle manifestuje mezi 4.-6. měsícem, přičemž histologicky sledovatelné maximum změn bylo zjištěno za 24 týdnů po ozáření. Souhrnný přehled vývoje a diagnostiky morfologických změn jsme již publikovali (4).

RP se projevuje především mezi 17.-30. týdnem po ozáření, což je období charakteristické pro manifestaci klinických projevů RP. Během tohoto období je možné sledovat signifikantní snížení tělesné hmotnosti a zvýšení hmotnosti plic (10). Histologickým vyšetřením lze v této fázi diagnostikovat intersticiální a alveolární edém, ztlustění alveolo-kapilárních sept, zánětlivou infiltraci sept alveolů, zvýšenou buněčnost vazivové tkáně a přítomnost intraalveolárně lokalizovaných nejen hyalinních blanek, ale i pěnovitě změněných makrofágů (1, 3, 5, 7).

Po 30 týdnech od ozáření RP nebyla popisována (7), neboť se postižený buď uzdraví, nebo se od tohoto data objevují změny příznačné pro radiační fibrózu.

Vzhledem k závažnosti této nozologické jednotky bylo přistoupeno ke sledování exprese RP pomocí histologického vyšetření.

Materiál a metoda**Experimentální zvířata a ozáření**

K experimentu byli použiti myši samci kmene (C57Bl/6xDBA/2)F₁ ve stáří 8-12 týdnů o hmotnosti 24-34 gramů. Pokusná zvířata byla ozařována lokálně na oblast hrudníku. Byla rozdělena do čtyř skupin:

1. kontrolní, neozařená skupina (6 myši),
2. skupina ozařená dávkou 14 Gy gama záření (18 myši),
3. skupina, která obdržela 16 Gy (18 myši)
4. skupina ozařená 18 Gy ionizujícího záření (18 myši).

Zvířata byla odebírána po 6 myších za 18, 24 a 30 týdnů po ozáření. Laboratorní zvířata byla

krmena dietou DOS-2B a napájena vodovodní vodou ad libitum. Zvířata byla ozářena gama záření použitím kobaltového zdroje Chisotron Chirana ve vzdálenosti 1 m od zdroje, dávkovým příkonem 0,3 Gy/min. Před ozářením byla navozena lehká narkóza roztokem složeným z 1 dílu Romety R, ze 3 dílů Narkamonu a ze 12 dílů fyziologického roztoku. Tento narkotizační roztok byl aplikován intramuskulárně v dávce 10 ml/kg. Lokální ozáření hrudníku myši bylo realizováno ve fixační komoře s 10 cm silnou vrstvou olovených destiček zabraňujících ozáření ostatních částí těla dávkou větší než 2-3 % (6).

Histologické vyšetření

Po uplynutí daných časových intervalů byly myši usmrceny cervikální dislokací. Při pitvě odebrané plíce byly fixovány ve formolu, tkáňové partikule posílány zalitý do parafínu a histologické preparáty byly obarveny hematoxylinem-eozinem (k diagnostice RP) a Gramovým barvením (k posouzení bakteriální infekce).

Diagnostickými známkami RP byly určeny intersticiální a alveolární edém, ztlustění alveolo-kapilárního septa, zánětlivá infiltrace sept alveolů, přítomnost intraalveolárně lokalizovaných hyalinních blanek a makrofágů. Exprese RP ve sledovaných histologických preparátech byla rozdělena do pěti kategorií: 0 %, 1-25 %, 26-50 %, 51-75 % a 76 až 100 %.

Vyhodnocení výsledků

Výsledky byly sumarizovány a graficky vyjádřeny. Dále mezi graficky znázorněné hodnoty byla vložena polynomiální spojnice trendu 4. stupně.

Výsledky

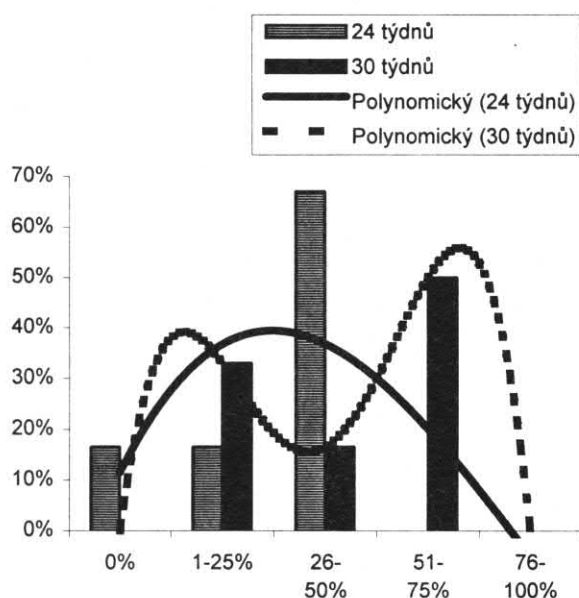
Před koncem časového intervalu 24 týdnů po ozáření uhynuly 2 myši, obě ozářené nejvyšší dávkou 18 Gy. Ve skupině přežívající 30 týdnů po ozáření došlo k úhynu 4 myši ze 6 ozářených dávkou 18 Gy a také jedné myši ozářené dávkou 16 Gy.

Při histologickém vyšetření plic laboratorních zvířat Gramovým barvením nebyla nalezena infekční agens. U kontrolní, neozařené skupiny ne-

byla zjištěna přítomnost RP. RP nebyla diagnostikována ani u ozářených (14-18 Gy) za 18 týdnů po ozáření.

V histologickém vyšetření u skupin od 24 týdnů po ozáření byla RP diagnostikována a klasifikována podle výše uvedeného rozdělení.

U myši ozářených nejnižší dávkou 14 Gy bylo v časovém intervalu 24 týdnů po ozáření pozorováno 1-25% postižení plicní tkáně RP v 16,7 %, 26-50% postižení v 66,7% a RP v histologickém řezu nebyla přítomna v 16,7%. V časovém intervalu 30 týdnů po ozáření dávkou 14 Gy byla v různém rozsahu pozorována RP u všech ozářených. 1-25% exprese RP v histologickém řezu byla nalezena ve 33,3 %, 26-50% postižení RP v 16,7 % a 51-75% přítomnost RP v histologickém preparátu byla určena v 50 % všech případů. Hodnoty vyjadřuje graf 1.

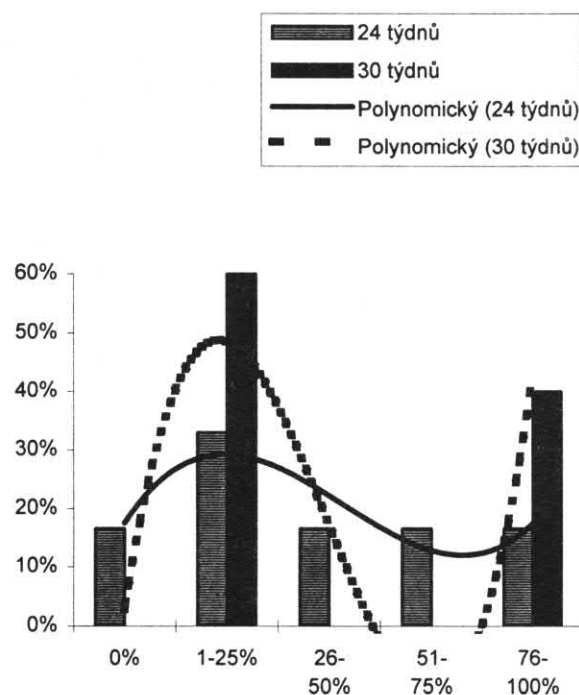


Procentuální postižení plic radiační pneumonitidou sledované v histologickém řezu.

Graf 1 Expresí radiační pneumonitidy po 24 a 30 týdnech od ozáření dávkou 14 G.

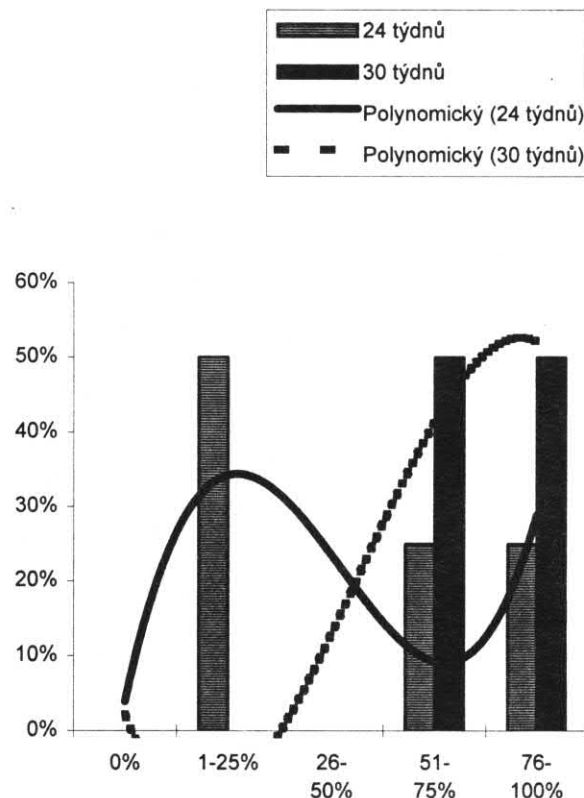
Laboratorní zvířata vykazovala po 24 týdnech od ozáření dávkou 16 Gy 1-25% expresi RP ve 33,3 % případů, v ostatních kategoriích výskytu RP pak po 16,6 %. V časovém intervalu 30 týdnů po ozáření dávkou 16 Gy vykazovala laboratorní zvířata ve všech případech expresi RP. Šedesát procent zvířat bylo postiženo 1-25% přítomností RP a 40 % vykazovalo RP 76-100%. Výsledky jsou zaneseny v grafu 2.

Při histologickém vyšetření jedinců přežívajících 24 týdnů po ozáření dávkou 18 Gy (4 ze 6) byla stanovena 1-25% exprese RP v 50 %, 51-75% přítomnost RP ve 25% a 76-100% postižení plic RP ve 25 % případů. Po ozáření 18 Gy přežívala 30 týdnů pouze 2 zvířata ze 6 ozářených. U jednoho byla stanovena 51-75% exprese RP a u druhého 76-100%. Výsledné ukazatele shrnuje graf 3.



Procentuální postižení plic radiační pneumonitidou sledované v histologickém řezu.

Graf 2 Expresí radiační pneumonitidy po 24 a 30 týdnech po ozáření dávkou 16 Gy



Procentuální postižení plic radiační pneumonitidou sledované v histologickém řezu.

Graf 3 Expresí radiační pneumonitidy za 24 a 30 týdnů po ozáření dávkou 18 Gy

Diskuse

Naše výsledky ukazují, že míra exprese RP v plicní tkáni nesignifikantně stoupá se zvyšující se dávkou záření ve sledovaných intervalech 24 týdnů a 30 týdnů po ozáření.

Pokud dále předpokládáme, že v časovém intervalu 24 týdnů po ozáření byla zachycena počáteční stadia rozvoje nemoci oproti skupině zvířat hodnocených 30 týdnů po ozáření, je možné si z polynomiálních spojnic trendů jednotlivých graficky vyjádřených hodnot odvodit domněnku, že s postupem rozvoje RP se ozáření jedinci diferencují do dvou skupin. První z nich reprezentují zvířata vykazující méně než 50% exprese RP v histologickém řezu. Druhou skupinu charakterizují myši s více než 50% postižením plic RP. Je možné předpokládat, že v první skupině se nacházejí jedinci v raných stadiích rozvoje nemoci, především po ozáření nižšími nadprahovými dávkami (14 Gy), kteří se buď uzdraví, anebo dojde k takovému rozvoji RP, že se zařadí do druhé skupiny. Zvířata v druhé skupině velmi pravděpodobně patří mezi ta, která na následky RP hynou.

Rozvoj RP je také ovlivněn kmenem laboratorních myší, na kterém byl experiment uskutečněn. Down a Steel (3) uvedli, že myši kmen C57Bl (jeden z rodičů F₁ hybridů užitých v naší práci) je radiorezistentnější než kmene CBA, C3H, LFA1, TO, CD-1, RFM, BALB/c a Sch(ICR/BR). U tohoto myšního kmene nastupuje později po ozáření zvýšení dechové frekvence (3), což koreluje se zvýšenou exprese RP (2). Také histologické změny odpovídající rozvoji RP a úhyn na následky RP byl zjištěn později než u kmene CBA. Down a Steel (3) v případě RTG ozáření hrudníku stanovili pro myši CBA/J hodnotu LD_{50/180} 14,5 Gy a pro myši C57Bl 21 Gy. Byl patrný rozdíl i v době úhynu pokusných zvířat. Zatímco radiosenzitivnější myši kmene CBA/J hynuly mezi 110. až 130. dnem po ozáření, myši C57Bl hynuly později.

Také experimenty prováděné na našem pracovišti (10) dokázaly, že myši samice (CBA/J x C57Bl/10)F₁ hynuly při lokálním ozáření hrudníku dávkami blízkými LD_{50/180} mezi 150.-180. dnem po ozáření, podobně jako myši C57Bl.

Travis (7) popsala akutní plicní změny v případě lokálního ozáření hrudníku myši kmene CBA. Manifestace histologického obrazu RP vrcholila mezi 16. a 24. týdnem po ozáření, po 30. týdnu od ozáření však nebyla RP již pozorována.

Přítomnost známek RP 30 týdnů po ozáření u myši (C57Bl/6xDBA/2)F₁ je závažný údaj. Možnou příčinou sledovaného stavu v této práci je, že se nástup RP u jedinců námi testovaného kmene (C57Bl/6xDBA/2)F₁ objevuje později a po vyšších dávkách záření než u myši kmene CBA.

Z histologických nálezů po 30 týdnech po ozáření lze předpokládat, že myši (C57Bl/6xDBA/2)F₁ ozářené dávkou 16 a 18 Gy, které přežívají 24. tý-

den po ozáření, což je období charakteristické pro rozvoj RP pro tento kmen, pravděpodobně uhynou v pozdějším období.

Není přesně známo, který typ buněk v plicích je cílový z hlediska rozvoje RP a tudíž i dlouhodobého přežití myši s lokálním ozářením hrudníku. Řada prací však poukazuje především na poškození pneumocytů II. typu a endoteliálních buněk (11, 12). Z tohoto hlediska jsou zajímavé experimenty Travis a spol. (8, 9). Autoři (9) popsali ochranný efekt gamafosu proti rozvoji RP aplikovaného v dávce 400 mg/kg u myši po jednorázovém ozáření hrudníku. Aplikace této látky zvyšovala přežívání myši 30 týdnů po ozáření s DRF = 1,37.

Bylo také zjištěno (8), že gamafos chrání před poškozením pneumocytů II. typu a endoteliálních buněk s DRF = 1,2. Z uvedeného vyplývá fakt, že vedle poškození pneumocytů II. typu a endoteliálních buněk vedoucího k RP se nacházejí i jiné mechanismy důležité pro rozvoj RP.

Naše výsledky ukázaly, že u myši (C57Bl/6 x DBA/2)F₁ přežívajících 30. týden po lokálním ozáření hrudníku dávkami 16 a 18 Gy přetrvává exprese RP. Ovlivnění těchto změn u ozářených zvířat bude cílem dalšího pokračování naší práce.

Závěr

Práce přináší poznatek, že velikost exprese RP u ozářených jedinců lze rozdělit do dvou skupin. Procentuální zastoupení daných skupin je závislé na časovém intervalu, ve kterém byla zvířata histologicky vyšetřena, dávce lokálního ozáření plic ionizujícím zářením, kterou byli jedinci ozáření, a také na kmeni laboratorních myši.

Souhrn

Práce sleduje vývoj exprese radiační pneumonitidy u myši lokálně ozářených na oblast hrudníku absorbovanými dávkami 14, 16 a 18 Gy v časovém intervalu 18, 24 a 30 týdnů po ozáření histologicky vyšetřených. Radiační pneumonitida se objevila až po 24 a 30 týdnech od ozáření. Z výsledků vyplývá, že míra postižení plic radiační pneumonitidou stoupá s absorbovanou dávkou. Dále autoři uvádějí rozdělení ozářených zvířat na dvě skupiny podle velikosti exprese RP.

Literatura

1. COGGLE, JE. - LAMBERT, BE. - MOORES, SR.: Radiation effects in the lung. Environ. Health Perspectives, 1986, vol. 70, p. 261-291.
2. DOWN, JD. - NICHOLAS, D. - STEEL, GG.: Lung damage after hemithoracic irradiation: Dependence on mouse strain. Radiotherapy and Oncology, 1986, vol. 6, p. 43-50.
3. DOWN, JD. - STEEL, GG.: The expression of early and late damage after thoracic irradiation: A comparison between CBA and C57Bl mice. Radiat. Res., 1983, vol. 96, p. 603-610.

4. ÖSTERREICHER, J. - PETÝREK, P. - VÁVROVÁ, J.: Postradiační plicní změny: vývoj a diagnostika morfoloických změn. Voj. zdrav. Listy, 1998, roč. 67, č. 1/2, s. 31-33.
5. SIEMANN, DW. - HILL, RP. - PENNEY, DP.: Early and late pulmonary toxicity in mice evaluated 180 and 420 days following localized lung irradiation. Radiat. Res., 1982, vol. 89, p. 396-407.
6. SKOPEC, F.: Metoda pro ozařování oblasti hlavy u kryš. Sborník věd. prací VLVDÚ JEP Hradec Králové. Hradec Králové. VLVDÚ, 1987, sv. 101, s. 169-175.
7. TRAVIS, EL.: The sequence of histological changes in mouse lungs after single doses of X-rays. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1980, vol. 6, p. 345-347.
8. TRAVIS, EL. - NEWMAN, RA. - HELBING, BS.: WR-2721 modification of type II cell and endothelial cell function in mouse lung after single doses of radiation. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1987, vol. 13, p. 1355-1359.
9. TRAVIS, EL., et al.: WR - 2721 protection of pneumonitis and fibrosis in mouse lung after single doses of X rays. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1984, vol. 10, p. 243-251.
10. VÁVROVÁ, J. - PETÝREK, P.: Radiační poškození plic. Voj. zdrav. Listy, 1991, roč. 60, č. 1, s. 33-37.
11. WARD, WF., et al.: Split - dose sparing of gama - ray - induced pulmonary endothelial dysfunction in rats. Radiat. Res., 1988, vol. 114, p. 627-633.
12. WARD, WF., et al.: Radiation injury in rat lung. IV. Modification by D-penicillamine. Radiat. Res., 1984, vol. 98, p. 397-406.

Klíčová slova: Radiační pneumonitida; Histologie; Myš.

Do redakce došlo 17. 6. 1997