

## VLIV RTG ZÁŘENÍ NA PROLIFERAČNÍ AKTIVITU BUNĚK LINIE HL-60

<sup>1</sup>Npor. MUDr. Jan ÖSTERREICHER, <sup>2</sup>kpt. Michael RIEDEL, <sup>2</sup>plk. Dr.-med. Michael ABEND, <sup>1</sup>doc. MUDr. Pavel PETÝREK, CSc.

<sup>1</sup>Katedra vojenské radiobiologie Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové  
(rektor: plk. doc. MUDr. Svatopluk Býma, CSc.)

<sup>2</sup>Institut für Radiobiologie, Sanitätsakademie der Bundeswehr, München, Bundesrepublik Deutschland  
(vedoucí: plk. prof. Dr.-med. Dirk van Beuningen)

### Úvod

Buněčná linie HL-60 je v současné laboratorní praxi rutinně používanou kulturou pro pozorování efektu ionizujícího záření na celulární a subcelulární úrovni. Tato linie byla získána S. J. Collinsem leukoferetickou metodou od 36leté ženy s akutní promyelocytární leukémií.

Dominantní populací linie HL-60 jsou neutrofilní promyelocyty. Téměř 10 % buněk se spontánně diferencuje promyelocytární cestou. Jako médium je používáno R.P.M.I médium 1640 (80 %) ředěné fetálním bovinním sérem (20 %). Morfologicky se buňky linie HL-60 jeví jako lymfoblastoidní.

Při zkoumání vlivu ionizujícího záření na buňky linie HL-60 byla naměřena  $D_0$  (přežívání 37 % buněk celé populace) rovna  $0,67 \pm 0,09$  Gy (1). Při ozáření 5 Gy RTG záření pak přežívalo pouze asi 1 % buněk původně ozářené populace. Jedná se tedy o velmi radiosenzitivní linii.

Cílem této práce bylo prozkoumání, zda dlouhodobým pasážováním nedošlo ke změně proliferační aktivity a tím ke změně vlastností měřené buněčné linie.

### Materiál a metoda

Byly použity buňky linie HL-60 v koncentraci  $1 \times 10^5$  buněk/ml, tj.  $2,5 \times 10^6/25$  ml v R.P.M.I. médiu 1640 (firma Sigma). Dále byly tkáňové kultury o objemu 25 ml rozděleny do 6 skupin, z nichž každou reprezentovaly 3 tkáňové kultury. První skupina, kontrolní, nebyla ozářena. Ostatní skupiny tkáňových kultur byly ozářeny dávkou RTG záření (240 kV, 13 mA, s dávkovým příkonem 1 Gy/min) rentgenovým přístrojem (firma Seifert) v rozmezí 0,5-2,5 Gy, tj. 0,5 Gy, 1 Gy, 1,5 Gy, 2 Gy a 2,5 Gy. Následně v intervalech 24 hodin po ozáření byl stanovován počet buněk až do 120. hodiny po ozáření. Před měřením počtu buněk byly tkáňové kultury homogenizovány trojnásobným nasátím suspenze pomocí pipety. Měření počtu buněk bylo prováděno odběrem suspenze tkáňové kultury o objemu 0,5 ml, dále byl obsah vložen do centrifugační zkumavky, 2-3 sekundy protřepán v třepačce a poté bylo napipetováno množství 10  $\mu$ l homogenní tkáňové kultury do měřicí komůrky (firma Neubauer). U kaž-

dé láhve s tkáňovou kulturou byl počet buněk stanoven ve čtyřech úsecích, každý o objemu 0,1 mm<sup>3</sup>. Průměrný počet buněk v každém měřeném úseku byl extrapolován na objem 25 ml buněk.

K určení signifikantnosti rozdílů naměřených hodnot byl použit dvoustranný Studentův t-test s nerovností odchylek.

### Výsledky

V průběhu experimentu nedošlo ke kontaminaci žádné z vyšetřovaných tkáňových kultur. Za 24 hodin po ozáření nebyly zjištěny statisticky významné odlišnosti počtu buněk mezi ozářenými skupinami a kontrolní skupinou tkáňových kultur.

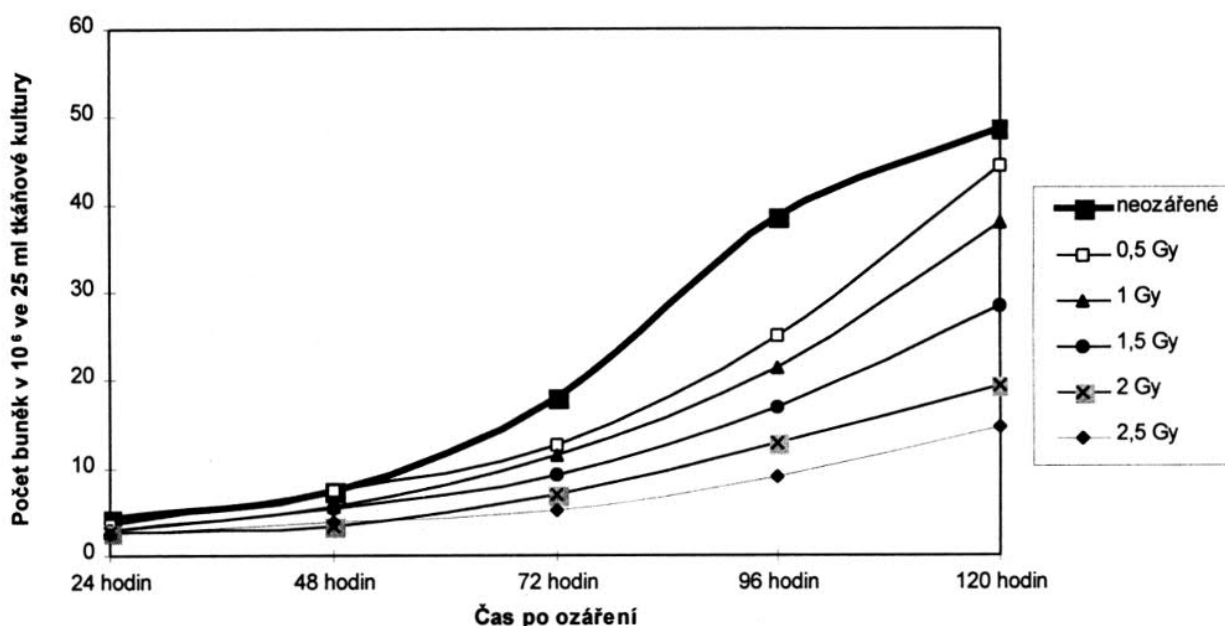
Za 48 hodin bylo pozorováno významně nižší množství buněk oproti kontrolní skupině u tkáňových kultur ozářených dávkou 1 a 1,5 Gy ( $p < 0,04$ ). Vysoce signifikantní pokles počtu buněk byl zaznamenán u skupin ozářených dávkou 2 a 2,5 Gy ( $p < 0,005$ ). Nebyla pozorována žádná významná odlišnost množství buněk kontrolní skupiny a buněk ozářených 0,5 Gy RTG záření.

Po 72 hodinách od ozáření bylo pozorováno statisticky významné snížení počtu buněk vůči neozářené skupině u tkáňových kultur ozářených dávkami 1 Gy ( $p < 0,02$ ) a 1,5 až 2,5 Gy ( $p < 0,005$ ). Rozdíl počtu buněk ozářených 0,5 Gy RTG zářením byl na hranici významnosti ( $p < 0,07$ ).

Za 96 hodin po ozáření byl zjištěn významně nižší počet buněk u všech ozářených skupin (0,5-2,5 Gy) vůči skupině neozářených kultur.

V posledním měření proliferační aktivity, tj. za 120 hodin po ozáření, byl zjištěn signifikantně nižší počet buněk oproti kontrolní skupině u tkáňových kultur ozářených dávkou 1 Gy ( $p < 0,05$ ) a dávkami v rozmezí 1,5-2,5 Gy ( $p < 0,001$ ). Rozdíl hodnot měřeného ukazatele mezi kontrolní skupinou a skupinou ozářenou dávkou 0,5 Gy byl na hranici významnosti ( $p < 0,06$ ).

Průměrné hodnoty počtu buněk ve sledovaných časových intervalech po ozáření jsou uvedeny v tabulce 1 a graficky znázorněny v grafu 1. Časy potřebné pro zdvojení populace buněk vyšetřovaných skupin linie HL-60 po jednotlivých dávkách záření jsou uvedeny v tabulce 2.



Graf 1 Vliv RTG záření na proliferační aktivitu buněk linie HL-60

Tabulka 1

Průměrný počet buněk ( $\times 10^5$ ) sledovaný po ozáření (v hodinách) ve 25 ml tkáňové kultury

|           | 24<br>hodin | 48<br>hodin | 72<br>hodin | 96<br>hodin | 120<br>hodin |
|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Neozářené | 4,19        | 7,42        | 18,00       | 38,63       | 48,79        |
| 0,5 Gy    | 3,63        | 7,35        | 12,67*      | 25,02***    | 44,33*       |
| 1 Gy      | 2,96        | 5,69**      | 11,48**     | 21,54***    | 38,00**      |
| 1,5 Gy    | 2,92        | 5,50**      | 9,19***     | 17,02***    | 28,42***     |
| 2 Gy      | 2,75        | 3,44***     | 6,98***     | 12,90***    | 19,40***     |
| 2,5 Gy    | 2,48        | 3,73***     | 5,15***     | 9,02***     | 14,73***     |

Rozdíl počtu buněk vůči kontrolní skupině: \* hraničně signifikantní rozdíl ( $p < 0,1$ ), \*\* signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ ), \*\*\* vysoce signifikantní rozdíl ( $p < 0,01$ )

Tabulka 2

Časy potřebné pro zdvojnásobení populace buněk

|                  | Neozářené | 0,5 Gy | 1 Gy | 1,5 Gy | 2 Gy | 2,5 Gy |
|------------------|-----------|--------|------|--------|------|--------|
| Čas (h)          | 24        | 30     | 34   | 48     | 72   | 108    |
| Abend et al. (1) | 24        | 29     | 36   | 41     | 88   | 136    |

## Diskuse

Z výsledků vyplývá, že pokles proliferace buněk linie HL-60 je přímo závislý na absorbované dávce RTG záření. Počáteční úbytek buněk ozářených dávkou 2,5 Gy pod hranici  $1 \times 10^5/\text{ml}$  lze vysvětlit úbytkem způsobeným rozvojem apoptózy, jejíž procen-

tuální výskyt u ozářených buněk této linie je okolo 5-15 % po ozáření dávkou 2,5 Gy. Z naměřených hodnot kontrolní skupiny lze usoudit, že časový interval 24 hodin přibližně odpovídá času potřebnému pro zdvojnásobení populace buněk linie HL-60. Avšak nárůst počtu buněk neozářené skupiny mezi 96 a 120 hodinami je pouze cca 23 %. To lze vysvětlit stabilizací populace buněčné linie v důsledku nedostatku média pro zdvojnásobení počtu buněk.

Schopnost proliferace po ozáření dávkou 0,5 Gy RTG záření nebyla v průběhu experimentu (kromě vyšetření za 96 hodin po ozáření) významně ovlivněna. Tento pokus sloužil především ke zjištění odlišnosti proliferační aktivity buněk linie HL-60 vůči výsledkům naměřeným před několika lety (1).

Při srovnání údajů těchto experimentů zjišťujeme, že proliferační aktivita nebyla výrazně odlišná. Naše výsledky uvádějí lehce rychlejší schopnost proliferovat u buněk linie HL-60 po ozáření dávkami 2 a 2,5 Gy.

Výsledky tohoto experimentu budou používány jako výchozí údaje pro další výzkumnou činnost při použití buněčné linie HL-60.

## Souhrn

Práce předkládá výsledky měření proliferační aktivity na buňkách promyelocytární linie HL-60 ozářených RTG zářením. Byla zjištěna statisticky signifikantní dávková závislost útlumu proliferační aktivity již za 48 hodin po ozáření dávkami 1 až 2,5 Gy, která byla pozorována až do konce experimentu. Dále nebyl pozorován významný vliv dlouhodobého pasážování na proliferační aktivitu neozářených buněk.

**Poděkování**

Autoři děkují vedení Sanitätsakademie der Bundeswehr v Mnichově a vedení Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně v Hradci Králové za umožnění studijní stáže npor. MUDr. Jana Österreichera v Institutu radiobiologie.

Poděkování rovněž patří nrtm. Wiebke Meynovi (MTA) za poskytnutou pomoc při realizaci experimentu.

**Literatura**

1. ABEND, M., et al.: Correlation of micronucleus and apoptosis assay with reproductive cell death. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1995, vol. 67, no. 3, p. 315-326.

Klíčová slova: Radiobiologie; HL-60; Proliferační aktivita.

Do redakce došlo 7. 9. 1998