

RADIAČNÍ ENTERITIDA: ČASOVÁ A DÁVKOVÁ ZÁVISLOST POKLESU STŘEVNÍCH KRYPT NA MODELU OZÁŘENÝCH POTKANŮ

¹Mjr. doc. MUDr. Jan ÖSTERREICHER, Ph.D., ^{1,2}MUDr. Daniel DRIÁK, ¹Šárka PRŮCHOVÁ, ¹por. Mgr. Zdena VILASOVÁ

¹Univerzita obrany, katedra radiobiologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové

²Gynekologicko-porodnická klinika 1. lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice Na Bulovce, Praha

Souhrn

Na modelu celotělově a jednorázově ozářených potkanů jsme měřili počet střevních krypt v zorném poli jako fundamentální biodozimetrický ukazatel, jenž bude porovnáván s ostatními biodozimetrickými markery. Byly vyšetřovány oblasti jejunu a příčného tračníku, mezi jejichž hodnotami nebyl zjištěn signifikantní rozdíl. Při vyšetření ozářeného jejunu podprahovými dávkami byl zjištěn úbytek počtu krypt již 3. den po ozáření dávkami od 5 Gy.

Klíčová slova: Radiační enteritida; Patogeneze; Počet krypt; Biodozimetrie.

Radiation-Induced Enteritis: Intestinal Crypt Decrease in a Model of Irradiated Rats Depending on Time and Dose

Summary

In our model of male Wistar rats irradiated all over their bodies by a single dose, we measured crypt survival as a fundamental biodosimetric marker which will be compared to other biodosimetric markers. We examined the jejunum and the colon of rats and found no significant differences, although marked crypt decrease was measured as early as the 3rd day after the irradiation with a dose of 5 Gy.

Key words: Radiation-induced enteritis; Patogenesis; Crypt survival; Biodosimetry.

Úvod

Gastrointestinální syndrom akutní nemoci z ozáření (ANO) je zcela letální klinicko-patologickou jednotkou a manifestuje se 5. až 8. den po jednorázovém ozáření na oblast krajiny břišní dávkou 8 Gy a vyšší (4). Jde o souhrn zánětlivě degenerativních procesů postihujících všechny úseky gastrointestinálního traktu (GIT). Vedoucími příznaky jsou masivní průjmy vedoucí k dehydrataci, oběhovému selhání, intoxikaci a septickému šoku (2, 8).

Patologickoanatomicky jde o enteritis necrohemorrhagica acuta, respektive duodenitis, jejunitis či ileitis (1, 2). Ačkoli stále platí názor, že subcelulární a celulární podstata patogeneze střevního syndromu ANO není známa, na základě mnoha prací se můžeme domnívat, že tento syndrom vzniká na podkladě insuficientní novotvorby enterocytů (3, 5, 11).

Je obecně přijímanou hypotézou, že nové enterocyty jsou tvořeny kmenovými buňkami ve střevních kryptách. Při *in vitro* experimentech byla zjištěna radiosenzitivita střevní linie s D0 cca 4 Gy, což

vysvětluje vyšší rezistenci, než je tomu například u kostní dřeně (10).

Morfologicky je již během prvních hodin po ozáření nadprahovými dávkami patrná rychle progredující pyknóza, karyolýza, karyorexe a extruze buněčných reziduí do lumina. Relativně vysoká mitotická aktivita ve střevních kryptách se rapidně snižuje a po 24 hodinách ustává úplně, zatímco deplece enterocytů na vrcholcích klků pokračuje (4).

Tým profesora Pottena (6, 7) publikoval, že počet střevních krypt v zorném poli, resp. na transversálním řezu, lze využít jako histologicky zjištělného hrubého biodozimetrického ukazatele, který vykazuje podobnou dynamiku jako klasický ukazatel přežívání ozářených jedinců, tj. je závislý na čase a absorbované dávce záření.

Proto jsme měření počtu střevních krypt v zorném poli použili jako výchozí na našem modelu celotělově ozářených potkanů dávkami 1–20 Gy. Dalším účelem tohoto měření je zjištění rozdílné radiosenzitivity tenkého a tlustého střeva.

Materiál a metoda

Pokusná zvířata a jejich ozařování

K experimentu byli použiti potkaní samci kmeny Wistar ve stáří 12–16 týdnů o hmotnosti 250 až 300 gramů. Všechna laboratorní zvířata byla krmena dietou DOS-2B a napájena vodovodní vodou ad libitum. Potkaní samci byli ozařeni pro zjišťování křivek přežití dávkami 1, 5, 10, 15, 20, 25 a 30 Gy, pro morfometrická a imunohistochemická vyšetření dávkami 1, 5, 10, 15, 20 Gy použitím kobaltového zdroje Chisotron Chirana ve vzdálenosti 1 m od zdroje dávkovým příkonem 1,44 Gy/min. Před ozařením byla navozena lehká narkóza roztokem složeným z 1 dílu Rometaru (Spofa, Praha), ze 3 dílů Narkamonu (Léčiva, Praha) a z 12 dílů fyziologického roztoku. Tento narkotizační roztok byl aplikován intramuskulárně v dávce 10 ml/kg.

Schéma experimentu

Potkaní ozařeni celotělově zářením γ dávkami 1 až 20 Gy byli rozděleni na 21 skupin po 10 jedincích (celkem 210 zvířat) podle výše absorbované dávky: 0, 1, 5, 10, 15, 20 Gy. Ozařená zvířata byla odebrána k histologickému vyšetření 24, 48, 72 a 96 hodin po ozaření, neozařeni potkaní byli vyšetřeni 72 hodin po klamném ozaření.

Histologické vyšetření

Po uplynutí daných časových intervalů byly laboratorní potkaní usmrceni cervikální dislokací. Při pitvě odebraná první klička jejunu za duodenálním ohbím byla fixována ve formolu, tkáňové partikule posléze zalaty do parafinu a nakrájeny pomocí mikrotomu (Meopta). Po natažení řezů na sklíčka byly preparáty histochemicky barveny hematoxylinem-eozinem (k měření morfometrických parametrů epitelu jejunu) a Gramovým barvením (k posouzení bakteriální infekce). Po obarvení byly preparáty odvodněny a zamontovány použitím kanadského balzámu a krycího sklíčka (9).

Měření počtu střevních krypt

Počet střevních krypt v zorném poli byl měřen u každého zvířete v jednom náhodně vybraném zorném poli o průměru 300 μm a stonásobném zvětšení použitím mikroskopu Olympus CX 30. Při měření byla linie krypt centrována do nejširšího úseku zorného pole.

Statistické hodnocení

K určení významnosti rozdílu dat byly získané údaje počítány testem podle Mann-Whitneyho. V tabulkách jsou uvedeny hodnoty průměrů jednotlivých skupin ± intervaly spolehlivosti na hladině 95% spolehlivosti, tj. dvojnásobek směrodatné odchylky průměru ($2 \times \text{S.E.M.}$). Hodnota korelačního koeficientu r byla získána využitím standardního testu programu Excel (Microsoft).

Výsledky

Úhyn 2 potkanů z 10 byl pozorován 3. den po ozaření dávkou 20 Gy. V průběhu 4. dne po ozaření dávkami 15 a 20 Gy uhynulo 9 potkanů z 10.

Měření počtu krypt v colon transversum

Ve srovnání s hodnotami kontrolních potkanů byl zjištěn signifikantní úbytek počtu krypt v zorném poli při vyšetření příčného tračníku zvířat 48 hodin po ozaření dávkou 20 Gy ($p = 0,008$) a 72 hodin po ozaření dávkami 15 a 20 Gy ($p \leq 0,01$; viz tab. 1).

Dva dny po ozaření dávkou 20 Gy byl počet krypt statisticky významně nižší než u zvířat ozařených dávkami 1, 5 a 10 Gy ($p \leq 0,014$). Také 72 hodin po celotělovém ozaření potkanů dávkami 15 a 20 Gy byly pozorovány statisticky významně nižší počty krypt v zorném poli než u zvířat ozařených dávkami 1, 5 a 10 Gy ($p \leq 0,01$). U zvířat ozařených dávkou 15 Gy byl naměřen statisticky významný úbytek počtu krypt mezi 72 hodinami po ozaření a časnějšími časovými intervaly ($p \leq 0,045$). U laboratorních potkanů ozařených dávkou 20 Gy byl patrný pokles počtu krypt u zvířat vyšetřených 48 a 72 hodin po ozaření vůči jedincům vyšetřených 24 hodin po ozaření ($p \leq 0,001$).

Měření počtu krypt v jejunu

Vůči hodnotám naměřeným u neozařených zvířat byl zjištěn u potkanů vyšetřených 24 hodin po ozaření dávkou 20 Gy, 48 hodin po ozaření dávkami od 10 Gy, 72 a 96 hodin po ozaření dávkami od 5 Gy signifikantní úbytek počtu krypt ($p \leq 0,031$; viz tab. 2). Mezi potkany vyšetřenými 24 hodin po ozaření dávkou 20 Gy byl naměřen statisticky významný pokles počtu krypt vůči zvířatům ozařených dávkami 10 a 15 Gy ($p < 0,05$). U potkanů vyšetřených 48 hodin po ozaření byly patrné významné rozdíly v počtu krypt mezi jedinci ozařenými dáv-

Tabulka 1

Průměrné hodnoty počtu krypt v colon transversum v zorném poli u ozářených potkanů ± 2 x S.E.M.

Doba po ozáření	0 Gy	1 Gy	5 Gy	10 Gy	15 Gy	20 Gy
24 hodin		$8,3 \pm 1,50$	$7,9 \pm 0,72$	$8,3 \pm 0,57$	$7,7 \pm 0,75$	$8,1 \pm 0,52$
48 hodin		$7,8 \pm 0,38$	$7,78 \pm 0,52$	$7,3 \pm 0,64$	$7 \pm 0,8$	$6 \pm 0,56^2$
72 hodin	$7,5 \pm 0,58$	$7,7 \pm 0,58$	$8,2 \pm 0,79$	$7,7 \pm 0,75$	$5,5 \pm 0,94^2$	$5,56 \pm 0,67^2$
96 hodin		$7,0 \pm 0,54$	$7,89 \pm 0,80$	$7,8 \pm 0,55$	přežilo 1 zvíře	přežilo 1 zvíře

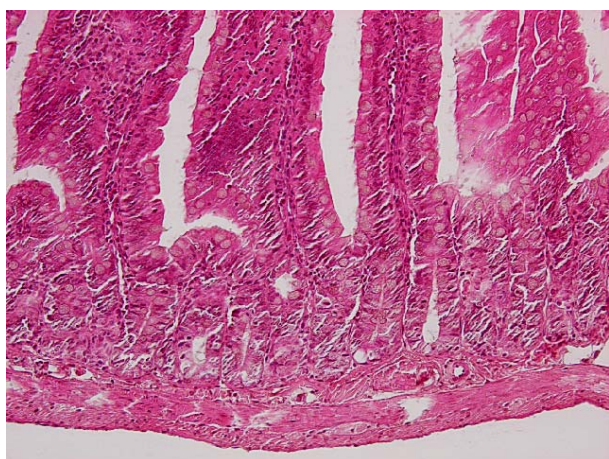
Pravděpodobnost rozdílů měřených hodnot vůči hodnotám neozařených kontrolních zvířat: $p \leq 0,05^1$; $p \leq 0,01^2$; $p \leq 0,001^3$

Tabulka 2

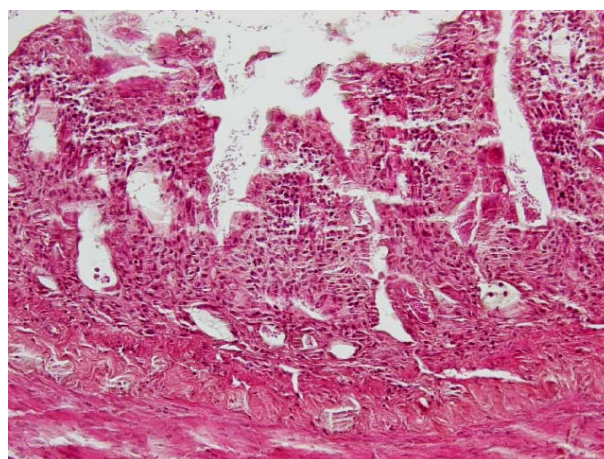
Průměrné hodnoty počtu krypt v jejunu v zorném poli u ozářených potkanů ± 2 x S.E.M.

Doba po ozáření	0 Gy	1 Gy	5 Gy	10 Gy	15 Gy	20 Gy
24 hodin		$7,9 \pm 0,77$	$8,1 \pm 0,52$	$8,3 \pm 0,64$	$8,6 \pm 0,64$	$7,4 \pm 0,42^1$
48 hodin		$8,7 \pm 0,94$	$8,2 \pm 0,47$	$7,4 \pm 0,58^1$	$6,8 \pm 0,55^2$	$6 \pm 0,89^2$
72 hodin	$8,6 \pm 0,64$	$7,7 \pm 0,57$	$7,3 \pm 0,57^1$	$6,9 \pm 0,72^2$	$5,2 \pm 0,68^3$	$4,9 \pm 0,66^3$
96 hodin		$7,7 \pm 0,40$	$7,4 \pm 0,51^1$	$5,67 \pm 0,77^3$	přežilo 1 zvíře	přežilo 1 zvíře

Pravděpodobnost rozdílů měřených hodnot vůči hodnotám neozařených kontrolních zvířat: $p < 0,05^1$; $p < 0,01^2$; $p < 0,001^3$



Obr. 1: U neozařeného potkana lze na řezu jejunu obarveného hematoxylinem-eozinem pozorovat při 200násobném zvětšení četné střevní krypty.



Obr. 2: U potkana vyšetřeného 3 dny po ozáření 20 Gy lze na řezu jejunu obarveného hematoxylinem-eozinem pozorovat při 200násobném zvětšení patrný významný úbytek střevních krypt. Na obrázku můžeme dále pozorovat poruchu epiteliální architektiky vedoucí k denudaci střevní sliznice.

kami 10 a 20 Gy ($p = 0,028$). Signifikantní rozdíly byly také naměřeny mezi potkany vyšetřenými 72 hodin po ozáření dávkou 10 Gy a dávkami vyššími ($p \leq 0,007$).

U ozářených zvířat byl v jednotlivých časových intervalech zjištěn postupný pokles počtu krypt, který byl významný mezi potkany ozářenými dávkou 10 Gy a vyšetřenými 24 a 48 hodin po ozáření vůči jedincům vyšetřeným 96 hodin po ozáření ($p \leq 0,006$). Dále byl pozorován statisticky významný pokles mezi všemi intervaly zvířat ozářených dávkou 15 Gy ($p \leq 0,006$). Mezi zvířaty vyšetřených 24 hodin po ozáření dávkou 20 Gy byly naměřeny významné rozdíly vůči potkanům vyšetřených 48 a 72 hodin po ozáření ($p \leq 0,012$).

Při srovnání hodnot počtu krypt v jejunu a v colon transversum nebyly mezi ozářenými zvířaty zjištěny statisticky významné rozdíly. Korelační koeficient r mezi hodnotami počtu krypt v jejunu a v colon transversum je roven 0,74, tj. naměřené hodnoty v obou lokalizacích jsou na sobě závislé.

Diskuse

Z hlediska zdravotního zabezpečení vojsk je detailní poznání patogenetických mechanismů a kauzálních terapeutických možností gastrointestinálního syndromu ANO stěžejní pro snížení zdravotnických ztrát a zvýšení bojeschopnosti vojáků. Civilním aspektem potlačení rozvoje střevního syndromu ANO je zvýšení toleranční dávky gastrointestinálního systému při radioterapii abdomino-pánevních a retroperitoneálních malignit, jejichž incidence v posledních dekádách vzrůstá.

Z našich výsledků na modelu jednorázově celotělově ozářených potkanů vyplývá, že v radiosenzitivě tenkého a tlustého střeva není statisticky významný rozdíl. Reakce obou střevních partií je podobná, ačkoli při měření počtu střevních krypt bylo možné od 3 dnů po ozáření pozorovat v jejunální oblasti statisticky významný úbytek střevních krypt v zorném poli již po ozáření dávkami od 5 Gy. To je významné z biodozimetrického hlediska, jelikož dávky menší než 8 Gy jsou považovány za podprahové. Dále jsme ověřili, že dynamika počtu střevních krypt je velmi podobná dynamice klonogení aktivity, ačkoli v rámci posuzování celého střevního kompartmentu se D0 nachází v letální oblasti časově-dávkového schématu.

V literárních zdrojích je popisována vrcholící deepitelizace střevní sliznice vrcholící 5–7 dní po

ozáření s následným funkčním selháním mikrobiální bariéry rezultující do peritonitidy (3, 4, 8). Na našem modelu ozářených potkanů jsou letální účinky patrné již 4 dny po ozáření dávkou 15 Gy. Můžeme se domnívat, že 5. až 7. den po ozáření by bylo možné pozorovat úhyn potkanů ozářených dávkou 10 Gy. Z toho vyplývá, že dynamika střevního syndromu ANO je u potkanů podobná jako u ozářených pacientů.

Závěrem lze uvést, že ukazatel počtu střevních krypt lze označit za fundamentální biodozimetrický ukazatel aplikovatelný jako základní marker u ozářených partií intestinálního traktu. Měřením počtu střevních krypt jsou zjistitelné signifikantní rozdíly i po subletálním ozáření a není významný rozdíl mezi výsledky měření v tenkém a tlustém střevě. V budoucnosti budou další perspektivní biodozimetrické ukazatele vztahovány k citlivosti právě počtu střevních krypt.

Literatura

1. BEDNÁŘ, B. aj. *Patologie*. Praha, Avicenum, 1982. 684 s.
2. BEDNÁŘ, B. aj. *Patologie II*. Praha, Avicenum, 1983. 583 s.
3. CLASSEN, J., et al. Radiation-induced gastrointestinal toxicity. *Strahlenther. Onkol.*, 1998, vol. 174 (Su. III), p. 82–84.
4. FAJARDO, LF. *Pathology of radiation injury*. New York, Masson Publishing, 1982. 286 p.
5. MacNAUGHTON, WK. Review article: new insights into the pathogenesis of radiation-induced intestinal dysfunction. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2000, vol. 14, p. 523–528.
6. POTTEN, CS. Radiation, the Ideal Cytotoxic Agent for Studying the Cell Biology of Tissues such as the Small Intestine. *Radiat. Res.*, 2004, vol. 161, p. 123–136.
7. ROBERTS, SA., et al. Intestinal crypt clonogens: a new interpretation of radiation survival curve shape and clonogenic cell number. *Cell Prolif.*, 2003, vol. 36, p. 215–231.
8. SHER, ME. – BAUER, J. Radiation-induced enteropathy. *Am. J. Gastroenterol.*, 1990, vol. 85, p. 121–128.
9. VACEK, Z. *Histologie a histologická technika II*. 1. vyd. Brno, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1996. 185 s.
10. VÁVROVÁ, J. – FILIP, S. Radiosenzitivita hematopoetického systému. Praha, Galén, 2002. 100 s.
11. ZORC-PLEŠKOVIČ, R., et al. Colon mucosal cells after high-dose fractional irradiation. *Fol. Biol.*, 2000, vol. 46, p. 43–48.

Korespondence: Mjr. doc. MUDr. Jan Österreicher, Ph.D.
Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: osterreicher@pmfhk.cz

Do redakce došlo 2. 11. 2004