

## Mikronukleusz gyakoriság kísérletes vizsgálata sugárhatással kombinált égési sérülésekben

Dr. Kerekes János állatorvos-főtörzsörmester, dr. Novák János orvos ezredes, az orvostudomány doktora, dr. Köteles György J.,\* az orvostudomány kandidátusa

**Kulcsszavak:** ionizáló sugárzás, kombinált égés

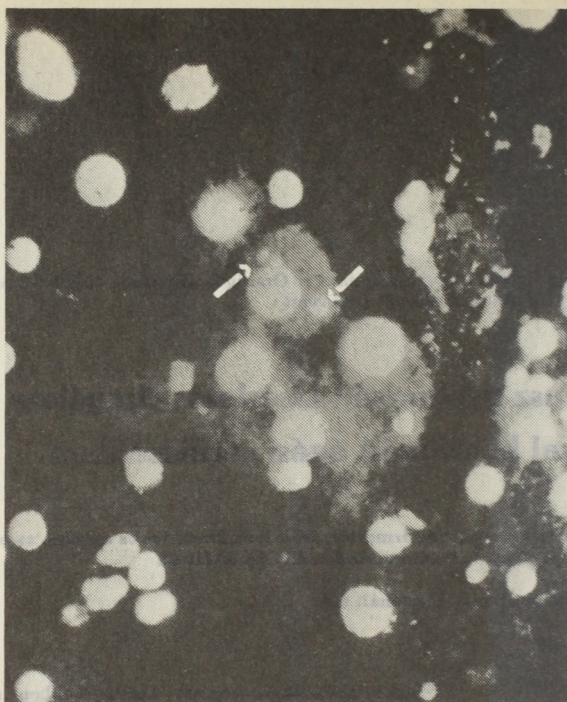
Érkezett: 1986. 05. 05.

Tengeri malacokon végzett kísérleteinkben megállapítottuk, hogy a perifériás limfocitákban akut sugárhatásra megjelenő mikronukleuszok dózis-hatás összefüggése lineáris-kvadratikus jellegű, továbbá, hogy sugársérüléssel kombinált égési trauma esetén a mikronukleusz gyakoriságot az égést követő patológiás folyamat nem befolyásolja. Ezért kombinált sérüléseknél a mikronukleusz kimutatási eljárás a sugárhatás megfelelő biológiai indikátora, s így használható diagnosztikai és differenciáldiagnosztikai eljárás.

Ionizáló sugárzások sejtgenetikai károsító hatása kromoszóma aberrációk kiváltásában is megnyilvánul. Ezért a kromoszóma aberrációs analízis alkalmas módszer a sugárhatás tényének bizonyítására, valamint a besugárzási dózis becslésére. Utóbbi azért vált lehetővé, mert az elváltozások, pl. az ún. dicentrikus, továbbá a gyűrű alakú változatok előfordulási gyakorisága arányos a besugárzási dózissal. Az eljárás azonban meglehetősen időigényes, és az értékelés nagy szakértelmet és tapasztalatot kíván. Egyszerűbb lehetőségnek látszik egy további kromoszóma aberráció fajta, az ún. mikronukleuszok vizsgálata.

A mikronukleusz olyan kromoszóma töredék vagy teljes kromoszóma, amely a sejt osztódása során egyik leánysejt magjába sem épül be, hanem az oszlási orsó sérülése miatt valamelyikőjük citoplazmájában jelenik meg önálló testként (7,12). A mikronukleuszok gyakoriságának vizsgálatát az utóbbi években néhány laboratórium — beleértve a miénket is — az emberi perifériás limfocitákon is végzi (1,2,3, 7,12). A mikronukleuszok megjelenését mutatja be az 1. sz. ábra, emberi limfocitákban. E szerzőkkel egyetértésben azt találtuk, hogy a mikronukleuszok megjelenésének gyakorisága a sugárzás dóziséval arányosan nő.

Jelen munkánkban ezért állatkísérletekben azt vizsgáltuk, hogy égéssel kombinált akut sugársérülésnél hogyan változik a mikronukleusz gyakoriság.



1. ábra. Mikronukleuszok 2 Gy röntgensugárzással *in vitro* kezelt emberi perifériás limfocitákban

### Anyagok és módszerek

Kísérleteinkhez 60 db kifejlett, 350–400 g súlyú, mindkét nembeli egészséges tengeri malacot használtunk fel. Az állatokból négy csoportot alakítottunk ki 50%-os ivararány megtartásával, nevezetesen

- az I. csoportban voltak a kezeltetlen kontroll állatok, n=10 db,
- a II. csoportban csak égési traumát szenvedett állatok, n=10 db,
- a III. csoport egyedeit 5 alcsoportba osztottuk, s az egyes alcsoportokat 0,5; 1; 2; 3 és 4 Gy dózisu  $^{60}\text{Co}$ -gamma sugárzással kezeltük, az egyes dózisoknál 4-4 állatból álló alcsoportokat képeztünk, összesen tehát 20 állatot sugárkezelünk,
- a IV. csoport a III. csoporthoz hasonlóan 5 alcsoportban az előzőekkel megegyező dózisu  $^{60}\text{Co}$ -gamma sugárzással kezelt állatoké, amelyek a besugárzást követő 30 percen belül a test háti felületén 10–12%-os kiterjedésű égési sebet kaptak.

Az égési felület nagyságát az  $F = \sqrt[3]{\text{testsúly}^2 \times K}$  képlet alapján számítottuk, ahol F a teljes bőrfelület nagysága, K pedig az állatfajra jellemző állandó, amely tengeri malacnál 8. Ennek alapján egy 400 g súlyú tengeri malac testfelülete 108 cm<sup>2</sup> (4,8).

Az égési trauma előidézése 7 mg/100 g testsúly dózisu, intraperitoneálisan adott Inaktin (Byk Bulden) narkózisban történt. Hőforrásként egy 4×3 (12 cm<sup>2</sup>) felületű alumínium lappal kiegészített, szabályozható előtétellenállással ellátott elektromos



forrasztópáka szolgált (14). A  $80 \pm 3$  °C felületi hőmérsékletű eszközt az előzetesen szőrtelenített háti felülethez érintettük úgy, hogy az csak saját súlyával (590 g) nehezedett az állatra. 70 másodperces expozíciót követően 10—12%-os, II—III. fokú égési sérülés alakult ki. Az elváltozás mélységét szövettani diagnózis is alátámasztotta. E szerint a bőrmetszetek háms felőli felszínén részben intra-, részben szubepiteliálisan vesicula képződés volt látható. A felszín nagyobb része hámfosztott volt, és csak a hámpapilla csúcsok, valamint a szőrtüszők maradványai voltak láthatók. Az irha csaknem egész vastagságban koagulációt mutató kollagénból, illetve kötőszövetből állt. A bőrízomzat mélységében az erekben vörös stasis volt. A diagnózis: III. fokú égés.

Az állatokat Gammatron—3  $^{60}\text{Co}$ -sugárforrással 0,3248 Gy/perc teljesítmény-nyel sugároztuk be.

A vérmintákat lítium-heparinos alvadásgátlás mellett szívpunkcióval vettük. A vérvétel a III. csoportban a besugárzást követő 30 percen belül, a II. és IV. csoportban az égési sérülést követő egy óra múlva történt.

A vérmintákat alfa-módosítású Eagle MEM (Flow Laboratories) tápfolyadékban inkubáltuk, amelyet 20% prekolosztrális borjúsavóval (Phylaxia) egészítettünk ki. A limfociták oszlásra készítése 1  $\mu\text{l}/\text{ml}$  phytohemagglutinin-P (Difco Laboratories) hozzáadásával történt. 10 ml tápfolyadékhoz  $1,5\text{--}2,0 \times 10^6$  mononukleáris sejtet tartalmazó teljes vért adtunk mintánként (5,15). Az inkubálást 37 °C-on, 5% széndioxidot tartalmazó légkörben végeztük, 48 órán át (11). A sejteket ezután 0,4%-os NaCl oldatban 5 percig hipotonizáltuk, majd ecetsav metanol 1:3 arányú keverékével 4 °C-on 10 percig fixáltuk (13). Háromszori metanol-ecetsavas átmosást követően a készítményt tárgylemezre szélesztettük.

A limfoblasztokat 0,05%-os acridin orange (Merck) fluorokróm festék oldattal festettük, ezután fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva a sejtmag és a DNS-t tartalmazó anyag sárgás-zöld, a citoplazma narancssárga színben jelenik meg. A mikronukleuszok előfordulási gyakoriságát egyedenként 3000 sejt vizsgálatával állapítottuk meg, és ezrelékben fejeztük ki. Csak azokat a sejteket vettük figyelembe, amelyek ép citoplazmájúak voltak, és amennyiben mikronukleuszt tartalmaztak, azok a sejtmagtól elkülönülten helyezkedtek el.

Az adatokat lineáris regressziós statisztikai módszerrel értékeltük. Szignifikancia vizsgálatot t-próbával végeztünk.

## Eredmények

A különböző módon kezelt állatcsoportokban talált mikronukleusz gyakorisági értékeket az 1. sz. táblázatban foglaltuk össze. A táblázatról leolvasható, hogy a kezletlen kontroll csoport és az égési sérülést szenvedett csoport értékei azonosak. Látható továbbá az is, hogy a sugárzással kezelt állatoknál a mikronukleuszok gyakorisága a sugárdózis növelésével arányosan emelkedett. Ezekkel az értékekkel azonos értékeket kaptunk a sugárzással kezelt és égési sérülést szenvedett csoportban is. Az adatok lineáris regressziós elemzése alapján azt találtuk, hogy az értékek egy lineáris-kvadratikus összefüggéshez illeszkednek legjobban, mind a III., mind a IV. csoportnál. Ezt az összefüggést tünteti fel a 2. sz. ábra. A lineáris-kvadratikus összefüggést kifejező egyenlet valószínűségi együtthatóiban is az tükröződik, hogy a két csoport között nincs különbség (2. sz. táblázat).

Fenti eredményeink alapján megállapítható, hogy az égési sérülést szenvedett kísérleti állatok mikronukleusz gyakorisága nem különbözik a kontrolloktól. Továb-

1. sz. táblázat. Mikronukleusz gyakoriság különböző módon kezelt tengeri malacok csoportjaiban

Csoport és kezelése	Az állatok száma	Mikronukleusz gyakoriság ezrelékben $\pm$ SD
I. Kezeletlen kontroll	10	3,79 $\pm$ 1,23
II. Égési sérülést szenvedett	10	3,86 $\pm$ 1,16
III. Sugársérülést szenvedett		
0,5 Gy	4	12,50 $\pm$ 3,56
1 Gy	4	16,12 $\pm$ 2,94
2 Gy	4	37,37 $\pm$ 8,34
3 Gy	4	89,67 $\pm$ 20,52
4 Gy	4	105,99 $\pm$ 13,21
IV. Sugársérülést, majd égési sérülést szenvedett		
0,5 Gy	4	16,37 $\pm$ 4,93
1 Gy	4	17,18 $\pm$ 3,67
2 Gy	4	42,50 $\pm$ 3,99
3 Gy	4	76,36 $\pm$ 10,97
4 Gy	4	115,35 $\pm$ 9,25

2. sz. táblázat. Ionizáló sugárzás okozta mikronukleusz megjelenés dózis-hatás összefüggését kifejező  $Y = c + \alpha D + \beta D^2$  egyenlet  $c$ ,  $\alpha$  és  $\beta$  értékei tengeri malac perifériás limfocitáira vonatkozóan

Állatcsoport	C	$\alpha$ $\times 10^{-3}$	$\beta$
60 Co-gamma sugárzással kezelt	3,89 $\pm$ 0,50	10,3 $\pm$ 2,5	4,1 $\pm$ 1,2
60 Co-gamma sugárzással kezelt, majd égési sérülést szenvedett	3,83 $\pm$ 0,50	13,8 $\pm$ 3,1	3,2 $\pm$ 1,3

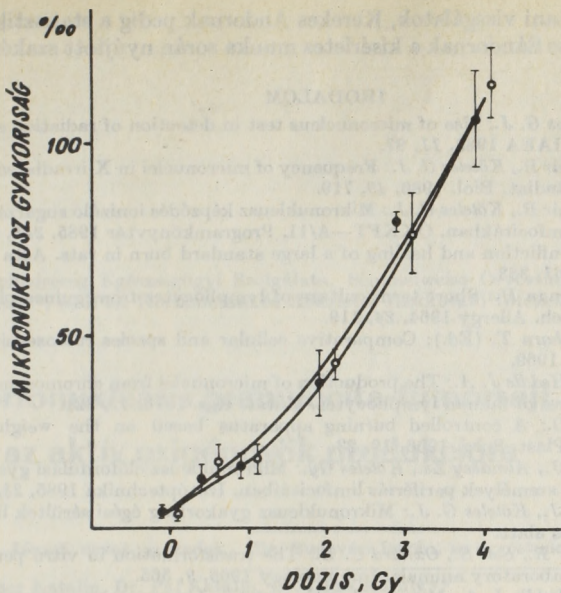
A két csoport adatai közötti értékek 95%-os szinten nem szignifikánsak.

bá kombinált sérülés esetén az ionizáló sugárzást követő égés állatkísérletben nem befolyásolja a sugárzás indukálta mikronukleusz gyakoriságot és annak dóziszfüggését. Kombinált sérüléseknél tehát a mikronukleusz gyakoriság a sugárterhelés mértékét jelzi.

### Megbeszélés

A sugárzással kombinált égési sérülések diagnosztikája számos problémát vet fel, a klinikai és laboratóriumi tünetek ugyanis átfedik egymást (16,17). Célkitűzésünk tehát az volt, hogy megvizsgáljuk: az újonnan bevezetett, még külföldön és saját laboratóriumunkban is tanulmányozás alatt levő módszer felhasználható-e kombinált sérülések esetén diagnosztikai és differenciáldiagnosztikai célokra. Korábban kimutattuk, hogy az égési sérüléssel járó patológiai folyamatok a sérültekben kimutatható





2. ábra. A sugárzással kezelt állatokban a mikronukleusz gyakoriság a sugárdózis növelésével arányosan emelkedik (● = csak  $^{60}\text{Co}$ -gamma sugárzással kezelt, illetve ○ = a besugárzás után mély égést is szenvedett csoportokban)

mikronukleusz gyakoriságot nem fokozzák, azaz a sérültek és a kontroll népesség adatai között nincs különbség, továbbá hogy az értékeket az égési sérülés mélysége sem befolyásolja (9,10).

Kísérleteinkhez tengeri malac látszott a legalkalmasabbnak, ugyanis a kisállatok közül ennek a félhalálos dózisa, valamint vérképe hasonlít leginkább az emberéhez (6). A módszer beállításában jelentkezett problémákat, a tengeri malac perifériás limfocitáinak tenyésztését *Aspegren és Rorsman* (5) eljárásának módosításával sikerült megoldani. Vizsgálatainkkal megerősítettük, hogy feltehetően a rövidebb sejtosztási ciklusidő miatt a 48 órás sejt tenyésztés az optimális, szemben az emberi limfocitáknál alkalmazott 72 órával. A mikronukleusz képződés dózis-hatás összefüggését az emberhez hasonlóan (1,2,3) lineáris-kvadratikusnak találtuk. Úgy gondoljuk, hogy ez az eljárás tengeri malacokon végzett egyéb sugárbiológiai kísérleteknél is jól felhasználható a sugárhatás biológiai indikátorául. A mikronukleusz kimutatás módszere ugyanis azért előnyösebb a klasszikus kromoszóma indikátor, a dicentrikus és gyűrű alakú változatok kimutatásánál, mert az értékelés nem igényel olyan nagyfokú szakértelmet és tapasztalatot, valamint gyorsabban végezhető. Feltehetően könnyebb lesz megoldani a minták értékelését automatikus számítógépes képanalízissel is.

### Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki dr. Sztanyik B. László főigazgató-főorvos, egyetemi tanárnak a munkához nyújtott támogatásáért, dr. Liszcai László orvos



ezredesnek a szövettani vizsgálatok, Kerekes Andornak pedig a statisztikai számítások elvégzéséért, Kiss Sándornak a kísérletes munka során nyújtott szakértő és lelkes segítségéért.

#### IRODALOM

1. *Almássy Zs., Köteles G. J.*: Use of micronucleus test in detection of radiation effect. Health Phys. Res. Abstr. IAEA 1983, 11, 97.
2. *Almássy Zs., Kanyár B., Köteles G. J.*: Frequency of micronuclei in X-irradiated human lymphocytes. Int. J. Radiat. Biol. 1986, 49, 719.
3. *Almássy Zs., Kanyár B., Köteles G. J.*: Mikronukleusz képződés ionizáló sugárzások hatására emberi perifériás limfocitákban. OKKFT—A/11. Programkönyvtár 1985, 243, 6.
4. *Arturson, G.*: The infliction and healing of a large standard burn in rats. Acta Path. Microbiol. Scand. 1964, 61, 353.
5. *Aspegren N., Rorsman H.*: Short term culture of lymphocytes from guinea-pigs allergic to tuberculin. Int. Arch. Allergy 1964, 24, 119.
6. *Bond V., P., Sugahara T.* (Ed.): Comparative cellular and species radiosensitivity. Igaku Shoin Ltd., Tokio, 1969.
7. *Countryman P. I., Heddle J. A.*: The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. Mutat. Res. 1976, 41, 321.
8. *Courtemanche A. D.*: A controlled burning apparatus based on the weight immersion principle. Brit. J. Plast. Surg. 1966, 19, 23.
9. *Kerekes J., Novák J., Almássy Zs., Köteles Gy.*: Mikronukleusz előfordulási gyakoriság égési sérülést szenvedett személyek perifériás limfocitáiban. Izotóptechnika 1985, 28, 262.
10. *Kerekes J., Novák J., Köteles G. J.*: Mikronukleusz gyakoriság égési sérültek limfocitáiban. Honvéddorvos közlés alatt.
11. *Knight S., Ling N. R., Sell S., Oxnard C. E.*: The transformation in vitro peripheral lymphocytes of some laboratory animals. Immunology 1965, 9, 565.
12. *Krepinsky A. B., Heddle J. A.*: Micronuclei as a rapid and inexpensive measure of radiation-induced chromosomal aberrations. In: Radiation Induced Chromosome Damage in Man (Eds. Ishiara and coworkers), Alan R. Liss Inc., New York, 1983, 93.
13. *Nichols W. W., Levan A.*: Chromosome preparations by the blood tissue culture technic in various laboratory animals. Blood 1962, 20, 106.
14. *Novák J.*: A bőr égési sérülésének pathomechanizmusa, morbiditása és prognózisa. Doktori értekezés, Budapest, 1982.
15. *Philips S. M., Zweiman B.*: Characteristics of the in vitro response of guinea pig blood lymphocytes to PJA and antigen. J. Immunology 1970, 105, 204.
16. *Valló J., Novák J.*: Gondolatok a sugársérüléssel szövődött égési problematikájához. Honvéddorvos 1968, 20, 163.
17. *Valló J., Novák J., Vér P.*: Égéssel szövődött sugársérülés korai hematológiai kórimézésének problémái. Honvéddorvos 1969, 21, 48.

C.S.M. J. Kerekes D.V.M. M.C., colonel J. Novák M.D.M.C., G.J. Köteles M.D.:

#### EXPERIMENTAL STUDY OF MICRONUCLEUS INCIDENCE IN BURNS COMBINED WITH RADIATION EFFECT

Based on experiments in guinea pigs, the authors have found that the dose-dependency of micronucleus incidence in peripheric lymphocytes on radiation effect has a linear-quadratic character and the burn disease developing after burns combined with radiation injury does not influence the incidence of micronuclei. Thus the micronucleus incidence seems to be a reliable biological indicator of radiation effect in combined injury and has a diagnostic and differential diagnostic value.

Главстаршина м/с Я. Керекеш, полковник м/с Я. Новак, Дь.Й. Кэтеш:

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЧАСТОТЫ МИКРОНУКЛЕУСА ПРИ КОМБИНИРОВАННЫХ ЛУЧЕВЫМИ ПОРАЖЕНИЯМИ ОЖОГАХ

В опытах на морских свинках было установлено, что появление микронуклеусов в периферических лимфоцитах под действием облучения показывает линейно-квадратическую зависимость от дозы, а при ожогах, комбинированных лучевым поражением, патологический процесс, возникающий после ожога, не влияет на частоту микронуклеуса. В силу этого, при комбинированных поражениях выявление микронуклеуса считается надежным биологическим индикатором лучевого воздействия и имеет большое значение в комплексе приемов диагностики и дифференциальной диагностики.