

VĚDECKÝ ČASOPIS



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

4

ROČNÍK 18 (XLVI)
PRAHA
DUBEN 1973
CENA 10 Kčs

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚĚLSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Rídí redakční rada

Prof. MVDr. Emanuel Král (předseda), prof. MVDr. Kolo-
man Bořa, DrSc., doc. MVDr. Jan Čarvaš, CSc., prof. MVDr.
Jaroslav Dražan, CSc., MVDr. Miroslav Dvořák, CSc., MVDr.
Miloš Halaša, CSc., prof. MVDr. Antonín Holub, DrSc., doc.
MVDr. Jozef Hrušovský, CSc., MVDr. Jaromír Lát, CSc.,
MVDr. Andrej Mačička, CSc., doc. MVDr. Ladislav Polák,
CSc., MVDr. Jiří Srna, prof. MVDr. Jaroslav Vrtiak, DrSc.

Vedoucí redaktorka ing. Jovanka Václavíčková

© Ústav vědeckotechnických informací, Praha 1973

■
Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje stu-
die, rozboru a vědecká pojednání o vyřešených úkolech vý-
zkumu z oboru veterinární medicíny. Vydává Ústav vědecko-
technických informací. Vychází měsíčně. Redakce: 120 56
Praha 2, Slezská 7, telefon 257541. Celoroční předplatné
Kčs 120,—.

■
Научный журнал VETERINÁRNÍ MEDICÍNA публикует обзо-
ры, анализы и научные статьи о разрешенных задачах по науч-
ному исследованию в области ветеринарии. Издает Институт
научно-технической информации. Выход в свет ежемесячно.
Редакция 120 56 Прага 2, Слезска 7.

■
The scientific journal VETERINÁRNÍ MEDICÍNA publishes
studies, analyses and scientific treatises about the solved
research tasks in the line of the veterinary medicine. Pu-
blished by the Institute of Scientific and Technical Informa-
tion. Issued monthly. Editorial office 120 56 Prague 2,
Slezská 7.

■
Die wissenschaftliche Zeitschrift VETERINÁRNÍ MEDICÍNA
veröffentlicht Studien, Analysen und wissenschaftliche Ab-
handlungen über die gelösten Forschungsaufgaben auf dem
Gebiete der Veterinärmedizin. Herausgegeben von Institut
für wissenschaftlich-technische Informationen. Erscheint mo-
natlich. Redaktion 120 56 Praha 2, Slezská 7.

■
Le journal scientifique VETERINÁRNÍ MEDICÍNA publie
les études, analyses et traités scientifiques concernant les
tâches de recherches résous dans le domaine de médecine
vétérinaire. Publie par l'Institut des Informations Scienti-
fiques et Techniques. Paraît une fois par mois. Rédaction
120 56 Prague 2, Slezská 7.

VLIV RADIOMIMETIK NA VYLUČOVÁNÍ PYRIMIDINOVÝCH DEOXYRIBOSIDŮ N-METYLNİKOTINAMIDU A N-MEYL-3-KARBOXAMID-4-PYRIDONU V MOČI KRYŠ

J. Hrušovský

Vojenský veterinární výzkumný ústav, Praha

HRUŠOVSKÝ J. *Vliv radiomimetik na vylučování pyrimidinových deoxyribosidů N-metylnikotinamidu a N-metyl-3-karboxamid-4-pyridonu v krvi kryš* Vet. Med. (Praha) 18 (4) : 205-212, 1973.

Hlavním vylučovacím produktem v moči kryš intoxikovaných S-yperitem je deoxycytidin. Zvýšení tohoto metabolitu je pozorováno již v prvních 24 hodinách po intoxikaci. Současně s deoxycytidinem se zvyšuje vylučování ostatních neutrálních pyrimidinů. Toto zvýšení v sumární hodnotě nepřesahuje dvojnásobek výchozích kontrolních hodnot. Intoxikace S-yperitem je charakterizována zvýšenou negativní dusíkovou bilancí, projevující se zvýšenou exkrecí řady dusíkatých látek do moče. Tak se zvyšuje vylučování N-metylnikotinamidu a N-metyl-3-karboxamid-4-pyridonu.

radiomimetika; otrava yperitem; enzymatická diagnostika

Charakteristickým časným projevem intoxikace některých radiomimetik typu S-yperitu je podobně jako po působení ionizujícího záření zvýšený katabolismus dusíku, projevující se zvýšeným vylučováním některých dusíkatých látek do moče intoxikovaných zvířat. Předpokládaným mechanismem působení alkylačních látek je primární inhibice syntézy nukleových kyselin, vedoucí k zástavě mitózy a zániku senzitivních buněk. Z tohoto hlediska je zvýšená negativní bilance vlastně výrazem destrukce mrtvých buněk, které jsou z organismu eliminovány.

Zůstává nyní otázkou, zda vylučované dusíkaté produkty jsou normálními finálními produkty biotransformace, nebo zda se za podmínek této specifické intoxikace vylučují látky, které by za fyziologických poměrů byly organismem utlizovány. Toto měřítko je vlastně otázkou specifického testu pro diagnostiku intoxikace také S-yperitem.

V této práci jsme vycházeli z výsledků naší předchozí práce (Hrušovský a kol. 1965), sledující významné zvýšení deoxyribosidů stanovitelných Disheho reakcí po intoxikaci S-yperitem patřícím mezi radiomimetika. Podle modelů popsaných v literatuře (Pařízek a kol. 1958) je hlavním vylučovacím produktem u ozářených kryš deoxycytidin. Účelem této práce bylo proto prošetřit relativní podíl deoxycytidinu na vylučování deoxyribosidů po intoxikaci S-yperitem a současně srovnat intenzitu vylučování některých biologicky důležitých dusíkatých komponent, které nesouvisí přímo se syntézou DNK, jako jsou např. biotransformační produkty pyridinových koenzymů.

MATERIÁL A METODY

K pokusům jsme použili krysy Wistar, samce z vlastního chovu. Zvířata byla krmena Larsenovou dietou a dostávala vodu *ad libitum*. K pokusům byla vybírána zvířata ve váze 180–200 g. 24 hodiny před intoxikací zvířata hladověla. Krysy byly chovány v celoskleněných metabolických klecích. Moč byla jímána do baněk s ob-

sahem 2 ml toluenu, k zabránění mikrobiální kontaminace. 24hodinová moč byla kvantitativně spláchnuta destilovanou vodou, doplněna *ad* 50 ml, přefiltrována a až do zpracování skladována v hluboko chladícím pultu při teplotě -30°C .

S-yperit byl aplikován v dávce 6,25 mg na 1 kg ž. v. podkožně.

DĚLENÍ METABOLITŮ Z MOČE NA IONEXOVÝCH KOLONÁCH

PŘÍPRAVA IONEXU

Dowex 1 X 8 (200–400 mesh) CH_3COO^- cyklus

750 ml ionexové suspenze se promyje na velké koloně 24 litry 2N NaOH rychlostí 500 ml za hodinu. Potom se kolona promyje 5 litry deionizované vody. Čerstvý anex se připravuje každý týden, starší ionexy v OH^- cyklu tmavnou. Do acetátového cyklu se převede ionex přímo na malé dělicí koloně promytím 100 ml 1 N CH_3COOH a 100 ml deionizované vody do neutrální reakce.

Dowex 50 X 8 (200 – 400 mesh) v H cyklu

750 ml ionexové suspenze se promyje na velké koloně postupně 25 litry 8 N HCl, dále 12 litry 4 N HCl a konečně 10 litry deionizované vody při rychlosti promývání asi 750 ml za hodinu.

Jedna pětina až jedna třetina 24hodinové moči byla vpravena na chromatografický systém skládající se ze dvou kolon vzájemně spojených. Hořejší kolona o světlosti 10 mm obsahovala 14 cm vysokou vrstvu Dowex 1 v acetátovém cyklu, dolejší kolona o stejné světlosti 7 cm vysokou vrstvu Dowex 50 v H^+ cyklu. Po zasáknutí vzorku moče byl celý systém promýván vodou až do vymizení absorpce eluátu při 260 nm, potom byl systém rozpojen a kolona Dowex 50 promyta 240 ml 1,75 N HCl. Promývána byla za mírného přetlaku (20 mm Hg) a průtoková rychlost byla upravena na 2 ml za 1 minutu. Byly jímány jednotlivé frakce po 10 ml a proměřena jejich absorpce v rozsahu 220 až 300 nm. Spektrofotometrická měření byla prováděna na spektrofotometru CF 4 Double Beam Optica s registračním zařízením.

Jednotlivé eluáty vykazující absorpční maxima byly spojeny, vodné eluáty odpařeny na rotační vakuové odparce, kyselé eluáty byly sušeny mrazovou sublimací. Jednotlivé metabolity byly identifikovány tenkovrstvou chromatografií s příslušnými referentními standardy.

TENKOVŘSTVÁ CHROMATOGRAFIE

Suspenze celulózy, 70 ml metylalkoholu a 5 ml vody byla homogenizována po dobu 1 minuty a nanášena na skleněné desky 20×20 cm a sušena při 60°C . Odparky vodného eluátu byly rozpuštěny v 1 ml vody, nanášeny v množství 20 μl na vrstvu a vyvíjeny v soustavě n-propanol: $\text{LO} \%$ NH_3 95 : 5 spolu se standardy thymidinu (Sigma), deoxyuridinu (Calbiochem), pseudouridinu (Calbiochem) a N-metyl-3-karboxamid-6pyridonu (Calbiochem). Odparky eluátu z frakce 1,75 N HCl byly rozpuštěny obdobným způsobem a nanášeny v téměř množství na vrstvu, která byla vyvíjena v soustavě n-butanol: NH_3 spolu se standardy deoxycytidinu (Light), N-metyl-nikotinamidu a N-metyl-3-karboxamid-4-pyridonu (získaný laskavostí prof. Wierlanda z Frankfurtu nad Mohanem, NSR).

Thymidin, deoxyuridin a pseudouridin byly stanoveny sumárně jako množství extinkčních jednotek vyloučených z kolony ve vodní frakci, množství deoxycytidinu bylo propočteno přímo z eluačního diagramu integrací peaku a podobně tak množství 4-pyridonu. N-metyl-nikotinamid byl stanoven fluorimetricky následujícím způsobem: 1 ml eluátu z Dowex 50 1,75 N HCl se smíchá s 0,2 ml metyl-etylketonu, přidá se 0,6 ml 3,5 N NaOH a vzorky se ponechají 5 minut při teplotě místnosti. Potom se přidá 8 ml 0,4 N HCl (pH ve všech vzorcích musí být nejméně 3, jinak nedochází ke vzniku fluorescence), konečně se všechny vzorky temperují 5 minut ve vroucí vodní lázni. Fluorescence byla měřena na fluorimetru Hilger (Hilger a Watts Ltd., Anglie). Excitace vlnovou délkou 365 nm, primární filtr Woods-glass H 566, neutrální filtr H 508, sekundární filtr Wratten 47 (H 600) a vestavěný filtr Wratten 2 B. Jako srovnávací roztok byl použit chinin sulfát v koncentraci 0,1 mg v 1 litru 0,1 N H_2SO_4 . Kalibrováno bylo na standard N-metylnikotinamidu-jodin (Sigma).

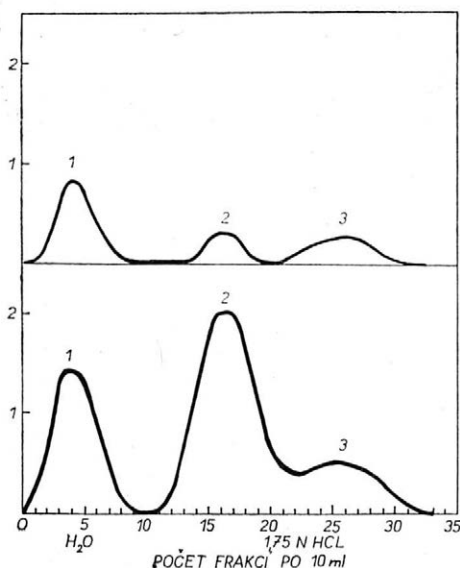
VÝSLEDKY A HODNOCENÍ

Způsobem popsaným v metodické části jsme stanovili eluční spektrum normální moče krys jako látek absorbujících v ultrafialové části spektra v rozmezí od 220 do 300 nm. Typické eluční spektrum je uvedeno na obr. 1. Jsou zde patrné tři frakce. Frakce 1 prochází na sloupci již při promývání vodou a má maximum cca 260 nm, frakce 2 byla eluována 1,75 N HCl a má absorpční maximum při 280 nm. K této frakci pak přisedá další vrchol s absorpčním maximumem při 240 nm.

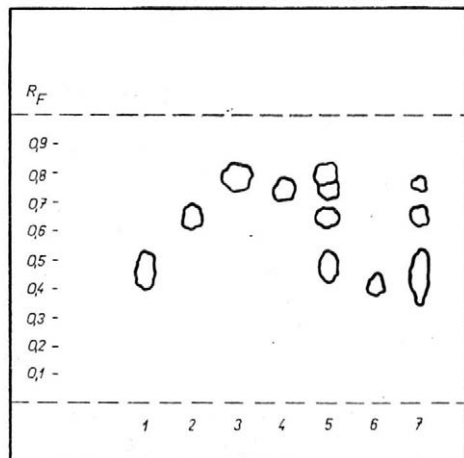
Frakce 1 není chromatograficky homogenní — zjistili jsme přítomnost nejméně tří frakcí. Chromatografií na tenké vrstvě byla dokázána přítomnost deosyridinu, pseudouridinu a thymidinu. Naproti tomu nebyla prokázána přítomnost N-metyl-3-karboxamid-6-pyridonu, ačkoliv je normálním finálním degradačním produktem pyridinových koenzymů.

Frakce 2 byla indentifikována jako deoxycytidin kontaminovaný stopou N-metylnikotinamidu. N-metylnikotinamid v této frakci byl stanoven fluorimetricky a jeho hodnota byla odečtena od sumární extinkční hodnoty frakce 2 při propočtu množství deoxycytidinu. Deoxycytidin byl prokázán tenkovrstvou chromatografií a spektrofotometricky.

Frakce 3 byla chromatograficky homogenní. Na vrstvě silně modře fluoreskovala v dlouhovlnném UV světle po předchozím ozáření krátkovlnným UV. V 0,1 N HCl měla maximum při 260 nm, ovšem v 1,75 N HCl vykazovala hypochromní posuv, rezultující za vzniku nového maxima při 240 nm (Chang a Johnson 1961).



1. Eluční spektrum moče rozdělené na sloupci Dowex 1 + Dowex 50: hornější diagram — normální krysí moč, dolější diagram — moč krysy intoxikované S-yperitem



2. Chromatografické dělení metabolitů získaných z vodného eluátu na tenké vrstvě

TLC celulóza MV 300 GF₂₅₄ (Machery, Nagel & Co.), rozměr 20 X 20 cm, vyvíjecí soustava n-propanol: 10% NH₃ 95:5, doba dělení 3 hodiny

1 - pseudouridin, 2 - deoxyuridin, 3 - N-metyl-3-karboxamid-6-pyridon, 4 - thymidin, 5 - směs 1, 2, 3, 4, 6 - normální moč, 7 - moč 24 hodiny po intoxikaci

Pro kvantitativní sledování vylučovaných metabolitů bylo nutno zjistit, zda uvedený ionexový systém v daném technickém uspořádání pokusu kvantitativně odděluje sledované metabolity. Proto jsme stanovili recovery test; výsledky jsou uvedeny na tab. I. Standardy pseudouridinu, thymidinu, deoxyuridinu a N-metyl-3-karboxamid-6-pyridonu jsou jako neutrální látky vymyty již vodou, deoxycytidin a N-metylnikotinamid jako silně bazické látky jsou eluovány ze sloupce 1,75 N HCl. Recovery pro N-metyl-3-karboxamid-4-pyridon nebylo stanoveno, protože jsme měli k dispozici velmi omezené množství standardní látky, dostačující pouze pro chromatografické standardy. Jak je patrné z údajů na tab. I, nepřesahuje rozdíl při eluci hodnotu 5 %; tuto hodnotu jsme považovali za dostatečně přesné kritérium pro kvantitativní eluci použitých ionexových systémů.

I. Eluční recovery test

Látka	Počet extinkčních jednotek		Recovery v %
	nanesených na sloupec	získaných ze sloupce	
Deoxycytidin	81,6	80,4	98,5
N-metyl-nikotinamid	31,3	29,8	95,2
N-metyl-3-karboxamid-6-pyridon	175,4	179,8	102,5
Pseudouridin	38,8	36,4	96,0
Deoxyuridin	149,0	140,0	98,0
Thymin	99,6	96,0	97,4

Normální krysy váhy 180 až 200 g vylučují v průměru 70 extinkčních jednotek frakce 1 za 24 hodiny. Množství vyloučených extinkčních jednotek dobře odpovídá hodnotám uváděným v literatuře (Froholm 1967). Frakce 1 je heterogenní a tenkovrstvá chromatografie (celulóza vyvíjená v soustavě propanol-čpavek) se osvědčila jako rychlá kvalitativní identifikace. Všechny v úvahu přicházející neutrální deoxypyrimidiny se dobře oddělují, jak je patrné z obr. 2. V normální moči je hlavní součástí pseudouridin a množství thymidinu a deoxyuridinu je při nánosu 20 μ l na vrstvu na hranici citlivosti. Po intoxikaci S-yperitem je ovšem zřetelné zvýšení deoxyuridinu a thymidinu, jak je patrné z obr. 2. Vzhledem k heterogenitě této frakce jsme změny po intoxikaci hodnotili kvantitativně jako změnu celkového počtu extinkčních jednotek eluovaných vodou ze sloupce, obsahující neutrální pyrimidiny.

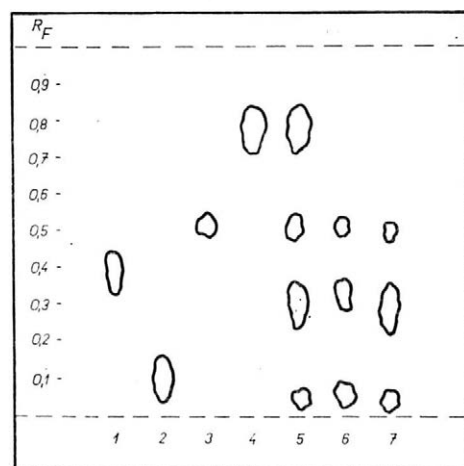
Frakce 2, eluovaná spolu s frakcí 3 chlorovodíkovou kyselinou normality 1,75, je frakcí deoxycytidinu. Normální krysy vylučují v průměru $441 \pm 151 \mu$ g deoxycytidinu v 24hodinové moči. Množství N-metyl-nikotinamidu, stanoveného fluorimetricky, činí v průměru $73 \pm 14 \mu$ g v 24hodinovém odběru moči. Hodnoty N-metyl-3-karboxamid-4-pyridonu odpovídají zhruba hodnotám deoxycytidinu a činí v průměru $436 \pm 68 \mu$ g za 24 hodiny. Všechny tyto metabolity lze dokázat tenkovrstvou chromatografií (celulóza v soustavě butanol-čpavek), jak je uvedeno na obr. 3.

Po intoxikaci S-yperitem se zvyšuje absolutní množství všech sledovaných metabolitů již v prvních 24 hodinách po intoxikaci. Zvýšení je patrné velmi výrazně již v elučním diagramu, který je uveden na obr. 1. Individuální rozdíly

II. Vliv intoxikace S-yperitem v dávce 6,25 mg na 1 kg živé váhy na vylučování některých metabolitů v moči krys

Metabolit	Hodnoty metabolitu v 24hodinové moči		
	kontroly	0—24 hodiny	24—48 hodin po intoxikaci
Deoxypyrimidiny v extinkčních jednotkách	52	140	46
	39	121	85
	97	117	44
	90	105	45
	67	119	41
	76	142	63
	54	108	72
	89	113	48
<i>X ± SD</i>	70,5 ± 22	120,6 ± 13	55,5 ± 16
Deoxycytidin v µg za 24 hodiny	630	1027	1186
	275	2764	1512
	314	4478	734
	290	4956	854
	630	2325	965
	480	4230	1230
	572	3823	693
	480	4735	945
<i>X ± SD</i>	441,4 ± 151	3542 ± 1410	1014 ± 270
N-metylnikotinamid v µg za 24 hodiny	80	111	96
	93	117	88
	85	110	76
	52	115	104
	83	100	99
	69	116	108
	58	109	100
	63	118	84
<i>X ± SD</i>	73 ± 14,5	112 ± 6	94,4 ± 11
N-metyl-3-karboxamid- 4-pyridon v µg za 24 hodiny	326	526	440
	396	628	496
	516	660	518
	480	513	540
	518	499	399
	446	696	462
	376	578	430
	428	590	560
<i>X ± SD</i>	436 ± 68	586 ± 71	480 ± 55

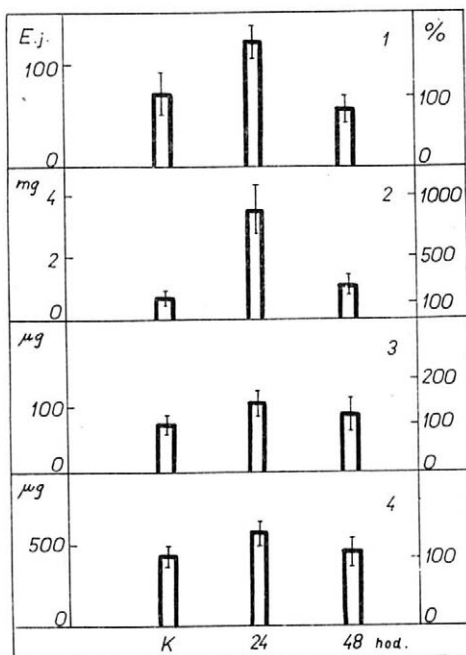
pro jednotlivé intoxikované krysy spolu s průměrnými hodnotami jsou uvedeny v tab. II. V prvních 24 hodinách se zvyšuje vylučování směsné frakce neutrálních deoxypyrimidinů (frakce 1) v průměru o 170 % a metyl-3-karboxamid-4-pyridonu o 130 % proti výchozí hodnotě kontrolních zvířat. Zvýšená exkrece těchto metabolitů je pouze přechodná; již v intervalu 24 až 48 hodin po intoxikaci se jejich stav zřetelně normalizuje. Časový průběh exkrece sledovaných metabolitů je přehledněji uveden na obr. 4.



3. Chromatografické dělení metabolitů získaných z 1,75 N HCl eluátu na tenké vrstvě

TLC celulóza MV 300 GF₂₅₄ (Machery, Nagel & Co.), rozměr 20 × 20 cm, vyvíjecí soustava — n-butanol — 3 % NH₃

1 - deoxycytidin, 2 - metylnikotinamid, 3 - metyl-3-karboxamid-6-pyridon, 4 - nikotinamid, 5 - směs 1, 2, 3, 4, 6 - normální moč (frakce 2 a 3), 7 - moč 24 hodiny po intoxikaci



4. Vliv intoxikace S-yperitem na vylučování některých metabolitů nukleových kyselin a pyridinových nukleotidů v moči krysy

1 - neutrální deoxypyrimidiny

2 - deoxycytidin

3 - N-metylnikotinamid

4 - N-metyl-3-karboxamid-4-pyridon

Hlavním vylučovacím produktem je deoxycytidin. Zvýšené vylučování je skoro řádové. Tak vysoké hodnoty nejsou pozorovány u ostatních pyrimidinů nebo degradačních produktů pyridinových koenzymů. Zvýšení Dishe-pozitivních látek po intoxikaci se týká proto především deoxycytidinu. Ovšem již normální krysy vylučují vyšší množství deoxycytidinu ve srovnání s ostatními pyrimidiny. Normální hodnoty thymidinu činí od 24 až 100 μg v 24hodinové moči (Berry a kol. 1966; Žarkov 1964; Mazurik 1965, 1966). Podobně nízké jsou hodnoty pro deoxyuridin, a to od 20 do 132 μg v 24hodinové moči (Rotherman a Schneider 1960; Mazurik 1965, 1966). Normální hodnoty exkrece pseudouridinu v krysí moči se podle autorů značně rozcházejí. Weissman a kol. (1962) uvádějí 2200 μg, Drahovský a kol. (1964) 530 μg a Froholm (1967) 1000 až 1500 μg v 24hodinovém množství moči. Zdá se proto, že deoxycytidin je alespoň u krysy skutečně finálním degradačním pro-

duktem, který není dále metabolizován na rozdíl od thymidinu a deoxyuridinu, které jsou intermediárními produkty biotransformace až na finální produkty kyseliny betaaminoizomásefnou nebo betaalanin. Degradací produkty pyridinových koenzymů se po intoxikaci rovněž zvyšují. Elevace ovšem nepřesahuje dvojnásobek výchozí hodnoty kontrol a odpovídá vcelku zvýšené negativní dusíkové bilanci pozorované jak po intoxikaci bialkylačními látkami, tak po působení ionizujícího záření.

Literatura

- BERRY H. K., SAENGER E. L., PERRY H., FRIEDMAN B., KEREIAKES J. G., SCHEEL C., 1963, Science 142 : 396.
 DRAHOVSKÝ D., WINKLER A., ŠKODA J., 1964, Increased Urinary Pseudouridine Excretion in Rats following Irradiation. Nature 201 : 411.
 FROHOLM L. O., 1967, Arpmidine excretion after irradiation in rats. Int. J. Radiat. Biol. 12 : 35-50.
 HRUŠOVSKÝ J., PROKŠOVÁ M., ZÍCHA B., KOVAŘÍK M., 1965, Sledování intenzity vylučování štěpů nukleových kyselin u krys po intoxikaci S-yperitem. Vojenské zdravotnické listy. Sborník 2 : 45.
 CHANG M. L. W., JOHNSON B. C., 1961, N¹-methyl-4-pyridone-5-carboxamide as a metabolite of nicotinic acid in man and monkey. J. biol. Chem. 236 : 2096-2098.
 MAZURIK V. K., 1965, K voprosu o narušení metabolizmu timidina i dezoksiuridina u krys pri oblučení. Bull. exp. biol. med. 59 : 59.
 MAZURIK V. K., 1966, Ekskrecia timidina, dezoksiuridina i betaaminoizomasefnej kyseliny u krys posle oblučení. Bull. exp. biol. med. 61 : 45.
 ROTHERMAN J., SCHNEIDER W. C., 1960, Deoxycytidine, deoxyuridine and 5-methoxycytidine in rat urine. Biochim. biophys. Acta 41 : 344.
 WEISSMAN S., EISEN A., LEWIS M., KARON M., 1962, Pseudouridine metabolism. Studies with isotopically labeled pseudouridine, J. Lab. clin. Med. 60 : 40.
 ZARKOV J. A., 1964, Metod opredelenia timidina v moče krys s pomoščju chromatografii na bumage i reakcii duže. Lat. dělo 10 : 296.

Došlo dne 22. 11. 1972

ГРУШОВСКИ Й. (Военный ветеринарный научно-исследовательский институт, Прага, Чехословакия). Влияние радиомиметики на выделение пиридиновых дезоксирибозидов N-метилникотинамида и N-метил-3-карбоксамид-4-пиридона в моче крыс. Vet. Med. (Praha) 18 (4) : 205-212, 1973.

Главный выделяемый продукт с мочей крыс, интоксцированных S-иперитом, — это дезоксицитидин. Его повышение наблюдается уже спустя 24 часа после интоксикации. Одновременно с дезоксицитидином растет выделение и остальных нейтральных пиримидинов. В своей сумме это повышение не превышает двукратное количество исходных контрольных величин. Интоксикация S-иперитом характеризуется повышенным отрицательным азотным балансом, проявляющимся увеличенной экскрецией ряда азотных веществ в моче. Таким образом растет выделение N-метилникотинамида и N-метил-3-карбоксамид-4-пиридона. радиомиметика; отравление иперитом; ферментная диагностика

HRUSOVSKY J. (Military Veterinary Research Institute, Praha Czechoslovakia). The Effect of Radiomimetics on the Excretion of Pyrimidine Deoxyribosides of N-methylnicotinamide and N-methyl-3-carboxamid-4-pyridone in Rat Urine. Vet. Med. (Praha) 18 (4) : 205-212, 1973.

Deoxycytidine is the main product excreted in the urine of rats intoxicated by S-yperite. The increase of this metabolite is apparent already in the first 24 hours after intoxication. The excretion of other neutral pyrimidines increases together with that of deoxycytidine. The sum of this increase does not exceed a double value

of the initial control values. The S-yperite intoxication is characterized by increased negative nitrogen balance, manifesting itself as increased excretion of a number of nitrogenous substances in urea. Thus the excretion of N-methylnicotinamide and N-methyl-3-carboxamid-4-pyridone is increased.

radiometrics; yperite intoxication; enzymatic diagnosis

HRUSOVSKÝ J. (Militär-Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Praha, Tschechoslowakei). *Einfluß von Radiomimetika auf die Ausscheidung von Pyrimidin-Desoxyribosiden des N-Methyl-nicotinamids und N-Methyl-3-carboxamid-4-pyridons im Urin von Ratten*. Vet. Med. (Praha) 18 (4) : 205-212.

Das Hauptausscheidungsprodukt im Urin der durch S-Yperit (Dichlordiäthylsulfid) intoxicierten Ratten ist Desoxyzitidin. Bei diesem Metabolit ist eine Erhöhung bereits in den ersten 24 Stunden nach der Intoxikation feststellbar. Gleichzeitig mit dem Desoxyzitidin steigt auch die Ausscheidung der anderen neutralen Pyrimidine. Diese Erhöhung übersteigt im Summarwert das Doppelte der Ausgangskontrollwerte nicht. Die Intoxikation durch S-Yperit ist durch eine erhöhte negative Stickstoffbilanz, die durch eine erhöhte Exkretion einer ganzen Reihe von stickstoffhaltigen Stoffen ins Urin zum Vorschein kommt, gekennzeichnet. Auf diese Weise erhöht sich die Absonderung von N-Methyl-nicotinamid und N-Methyl-3-carboxamid-4-pyridon.

Radiomimetika; S-Yperit-Vergiftung; enzymatische Diagnostik

Adresa autora:

Doc. MVDr. J. Hrušovský, CSc., Vojenský veterinární výzkumný ústav, 150 06 Praha

UŽITÍ SORBENTŮ PŘÍRODNÍHO PŮVODU K LÉČBĚ VNITŘNÍ KONTAMINACE RADIOCESIEM U PRASAT

F. Havlíček, J. Hrušovský

Vojenský veterinární výzkumný ústav, Praha

HAVLÍČEK F., HRUŠOVSKÝ J. *Užití sorbentů přírodního původu k léčbě vnitřní kontaminace radiocesiumem u prasat*. Vet. Med. (Praha) 18 (4): 213-218, 1973.

V pokusech na prasatech byl sledován dekontaminační efekt pemzového ryolitu při perorální či intratracheální kontaminaci. Nejvyššího efektu bylo dosaženo při preventivním podání či bezprostředně po kontaminaci. S ohledem na „enterální cyklus“ radiocesia je možno léčbu zahájit i v časovém odstupu od kontaminace. K praktickému použití je navrhováno opakované podání v dávkách 250 g a dále denně 100 g jako součást potravy. V pokusech nebyly pozorovány vedlejší nepříznivé vlivy na zdravotní stav pokusných zvířat.

vnitřní kontaminace; radiocesium; sorbent přírodního původu; terapie vnitřní kontaminace; prase

Na závažnost vnitřní kontaminace radiocesiumem u hospodářských zvířat bylo poukázáno v našem předchozím sdělení (Havlíček a kol. 1972). V tomto sdělení byly uvedeny výsledky, kterých bylo při použití perorálně podaných ferrokyanidů u prasat vnitřně kontaminovaných ^{134}Cs dosaženo.

Dalším typem prakticky využitelných dekontaminačních prostředků při vnitřní kontaminaci radiocesiumem jsou sorbenty přírodního původu. V této práci bylo užito sorbentu dostupného v dostatečném množství na území ČSSR a vyhovujícího požadavkům racionální terapie vnitřní kontaminace u hospodářských zvířat.

MATERIÁL A METODY

V principu byly provedeny tři druhy experimentů:

1. stanovení terapeuticky účinné dávky sorbentu,
2. časová závislost působení sorbentu,
3. vliv sorbentu na eliminaci intratracheálně podaného ^{134}Cs .

K pokusům bylo užito prasat — samců kastrátů českého bílého ušlechtilého plemene. Umístění zvířat v době pokusů, způsoby aplikace a množství kontaminantu, měření obsahu ^{134}Cs i způsob hodnocení výsledků jsou podrobně uvedeny v předchozím sdělení (Havlíček a kol. 1972).

Užitý sorbent přírodního původu — pemzový ryolit — je ve své podstatě aluminosilikát. Podle kvantitativního rozboru provedeného Ústředním ústavem geologickým v Praze měl toto složení:

Al_2O_3	12,6 %	CaO	2,3 %
SiO_2	75 %	Na_2O	0,75 %
Fe_2O_3	1,0 %	K_2O	2,0 %
MnO	0,06 %	TiO_2	0,1 %
H_2O do 800 °C	7,6 %	MgO	0,15 %

Sorpční kapacita stanovená Berákem (1969) činí 1,2 až 1,3 mval/g.

K pokusům byl používán pemzový ryolit o velikosti zrna do 0,1 mm v přírodním cyklu bez další chemické či fyzikálně chemické úpravy. Vzhledem k tomu, že bylo bráno v úvahu hledisko racionální terapie, nebyla dále dělána frakcionace podle velikosti zrna, i když bylo autorům známo, že sorpční vlastnosti na tomto faktoru silně závisí.

Pemzový ryolit v různých dávkách od 50 g do 500 g byl podáván zvířatům buď po promíšení s kašovitou potravou nebo gumovou sondou ve formě vodné suspenze. Vyjma nejvyšší dávky, kdy byla pozorována mírná obstipace, nebyly shledány vedlejší nepříznivé vlivy na zdravotní stav pokusných zvířat, ani na chuť přijímat potravu.

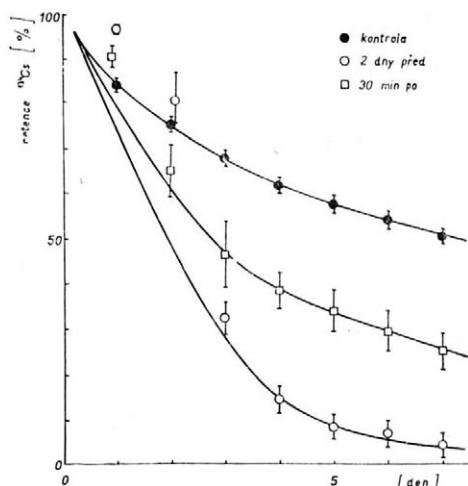
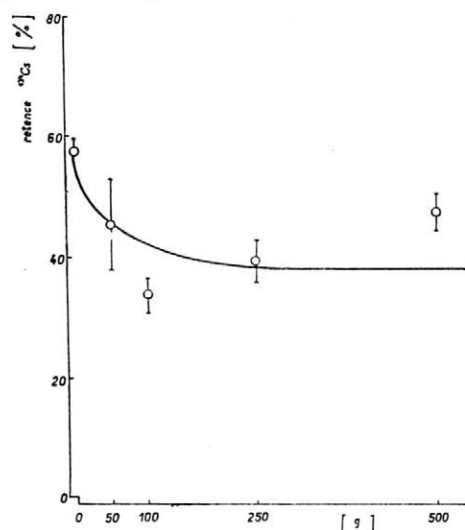
Dekontaminační efekt pemzového ryolitu byl hodnocen z výsledků exkreční analýzy. Hodnoty celotělové retence byly získány z exkrečních dat; při analýze výsledků bylo užito metod a vztahů, které uvádí Slouka (1962). Jednotlivé pokusy byly prováděny na dvoučlenných a čtyřčlenných skupinách prasat. Uváděny jsou aritmetické průměry hodnot a směrodatné odchylky, u dvoučlenných skupin pak aritmetické průměry a individuální hodnoty.

VÝSLEDKY

K stanovení optimální dávky pemzového ryolitu bylo užito celkem 10 prasat o váze 59,3 kg. Pemzový ryolit byl podáván jednorázově ve formě vodné suspenze žaludeční sondou v dávkách 50, 100, 250 a 500 g na zvíře 30 minut po perorální aplikaci ^{134}Cs . Po dobu pěti dnů byla sledována eliminace močí a trusem. Výsledky byly srovnány s kontrolní skupinou šesti prasat, kterým bylo podáno samotné ^{134}Cs (Havlíček a kol. 1968).

Stejně jako při použití ferrokyanidů způsobuje jakákoli dávka pemzového ryolitu snížení eliminace ^{134}Cs močí. Naproti tomu vzrůstá množství vyloučené trusem, které dosahuje za pět dnů 40–50 % (kontrolní skupina 12,5 %). Maximální množství radiocesia je trusem vyloučeno druhý a třetí den po kontaminaci.

Výsledné hodnoty celotělové retence ^{134}Cs po pěti dnech od kontaminace jsou uvedeny na obr. 1. Množství sorbentu rovné nule odpovídá kontrolní sku-



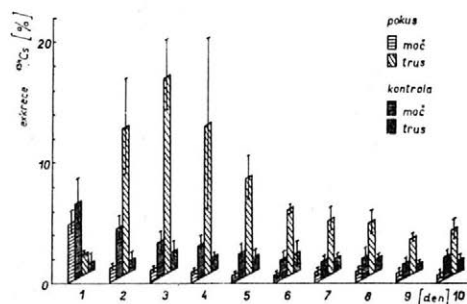
1. Dávková závislost působení pemzového ryolitu na eliminaci ^{134}Cs u prasat

2. Vliv časového faktoru na dekontaminační efekt pemzového ryolitu u prasat perorálně kontaminovaných ^{134}Cs

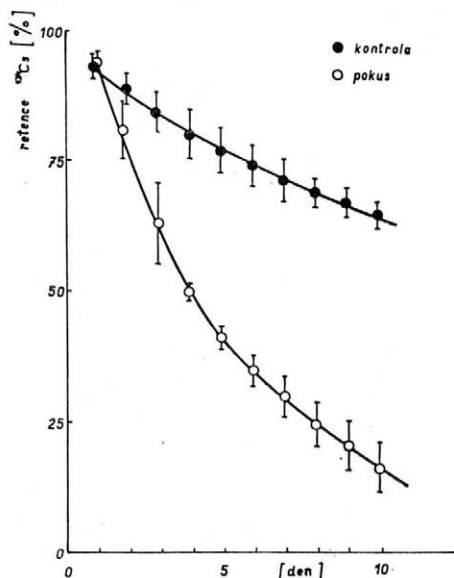
pině, podání 100 a 500 g (skupiny po 2 zvířatech), podání 50 a 250 g (skupiny po 3 prasatech). Dávková závislost je patrná u dvou nejnižších dávek. I přes značný rozptyl experimentálních hodnot a velmi aproximativní konstrukci křivky je zřejmé, že dávka 100 g na zvíře v této váhové kategorii je postačující.

Časová závislost působení pemzového ryolitu byla sledována na třech skupinách prasat o váze 53 kg, v počtech dvou (podání sorbentu 30 min. po kontaminaci) či tří kusů ve skupině. U všech skupin byl zkrmován pemzový ryolit v první dávce 250 g, pak 100 g denně. První dávka byla podána sondou, aby byl zajištěn přesný začátek zkrmování sorbentu, další pak byly smíchány s krmivem. Počátky zkrmování byly zvoleny 48 hodin před *p. o.* podáním ^{134}Cs , 30 minut a 24 hodiny po něm. Exkrece radiocesie byla sledována 7 dní od podání kontaminantu. Srovnání bylo provedeno s kontrolní skupinou z předchozí pokusné série.

Bez ohledu na časový interval zahájení léčby mění se charakter exkrece ^{134}Cs , klesá eliminace močí a zvyšuje se eliminace trusem. Jak ukazují výsledky celotělové retence ^{134}Cs (obr. 2), je podle očekávání maximální dekontaminační efekt při preventivním použití sorbentu či bezprostředně po kontaminaci.



3. Hodnoty denní exkrece intratracheálně aplikovaného ^{134}Cs u prasat



4. Celotělová retence intratracheálně podaného ^{134}Cs u prasat

Vliv pemzového ryolitu na eliminaci intratracheálně podaného ^{134}Cs byl sledován na dvou skupinách prasat — kontrolní (4 zvířata, váha 55 kg) a s podáním sorbentu (3 zvířata, váha 39 kg). Sorbent byl podán bezprostředně po kontaminaci žaludeční sondou v množství 250 g na zvíře, dále pak denně 100 g po promíchání s krmivem.

Hodnoty denní exkrece ^{134}Cs v procentech podaného množství ukazuje obr. 3. V průběhu 10denního intervalu dominuje u kontrolní skupiny eliminace radiocesie močí. I v tomto případě, kdy je vyloučena primární sorpce radiocesie následkem *p. o.* podání, převažuje u léčené skupiny eliminace trusem. Charakter

celotělové retence ukazuje pro 10denní pokusný interval obr. 4. Její průběh je možné pro kontrolní skupinu charakterizovat jednoduchou exponenciální funkcí s $T_b = 16$ dní, pro léčenou skupinu pak složenou exponenciální funkcí. Z konečných hodnot je zřejmý dekontaminační efekt pemzového ryolitu.

DISKUSE

Řada sorbentů přírodního původu velmi rozdílného chemického složení a fyzikálně chemických vlastností se vyznačuje vysokou afinitou k vazbě iontů Cs. Mechanismy zachytu se mohou značně lišit, obecně lze však říci, že převládá iontová výměna za méně pevně vázané kationty v důsledku přeměn či úprav minerálů a hornin. Soustavná pozornost sorbentům přírodního původu byla věnována v souvislosti s potřebou odstraňovat radioaktivní látky z odpadních vod a likvidovat kapalně radioaktivní odpady obecně.

Vzhledem k tomu, že se jedná o látky fyziologicky inertní, byly užity při léčbě vnitřní kontaminace. Použit byl především vermikulit a verxit s dekontaminačním efektem, který převyšoval dosud užívané prostředky specifické i nespecifické terapie (Catsch 1968).

V pokusech na krysách použil Mráz a kol. (1967) vermikulitu samotného či v kombinaci s přirozenými součástmi krmiva. Chemicky a mechanicky aktivovaný verxit bylo užito s vysokým dekontaminačním efektem u ovcí (Hansard 1964). Pro radiostroncium však byl tento sorbent neúčinný. U chronicky kontaminovaných koz prověřoval Hazzard (1969) účinnost verxitu na eliminaci radiocesie mlékem a dosáhl snížení na 1/6 při srovnání s kontrolní skupinou. Obdobné výsledky byly nalezeny i na kravách (Hazzard a kol. 1969). Jako optimální denní dávky je doporučeno 0,82 kg verxitu. Toto množství nepůsobí nepříznivě na minerální složku mléka.

Podobné závěry je možné utvořit i z experimentů na prasatech s použitím pemzového ryolitu. Tento sorbent je netoxický, prakticky užitečný a pro vysoký dekontaminační efekt vhodný pro podmínky racionální terapie vnitřní kontaminace radiocesiem u prasat.

Shodně se závěry předchozího sdělení (Havlíček a kol. 1972) byla potvrzena existence „enterálního cyklu“, a tím je vytvořena možnost zahájit léčbu bez ohledu na časový odstup od kontaminace a způsob vniknutí kontaminantu do organismu. Nejvyššího efektu je dosaženo při preventivním zkrmování sorbentu či bezprostředně po vniknutí kontaminantu do organismu.

Na základě dosažených výsledků lze doporučit jako optimální opakované podání pemzového ryolitu v první dávce 250 g a dále pak denně 100 g po smíchání s kašovitou potravou pro všechny váhové kategorie prasat.

Literatura

- BERÁK L., 1969, Sorpční vlastnosti devitrifikovaného pemzového ryolitu z Bartoševé Lehotky. ÚJV report.
- CATSCH A., 1968, Dekorporierung radioaktiver und stabiler Metallionen. K. Thiemig Verlag, München.
- HANSARD S. L., 1964, Effect of hydrobiotites upon strontium-89 and cesium-137 retention by ruminants. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 115 : 346-50.

- HAVLÍČEK F., KLEISNER I., DVOŘÁK P., POSPÍŠIL J., 1968, Beitrag zum Stoffwechsel von Cs¹³⁴ bei Nutztieren. I. Verteilung und Ausscheidung von Cs¹³⁴ bei Schweinen. Rad. biol. ther. 9 : 475-79.
- HAVLÍČEK F., HRUŠOVSKÝ J., 1973, Vliv ferrokyanidů na eliminaci radiocesie u prasat. Vet. Med. (Praha) 2 : 111-116.
- HAZZARD D. G., 1969, Percent cesium-134 and strontium-85 in milk, urine, and feces of goats on normal and verxite-containing diets. J. Dairy Sci. 52: 990-4.
- HAZZARD D. G., WITHROW T. J., BRUCKNER B. H., 1969, Verxite flakes *in vivo* binding of cesium-134 in cows. J. Dairy Sci. 52 : 995-997.
- MRAZ F. R., PATRICK H., 1957, Some factors influencing the excretory pattern of cesium-134 in rats. Arch. Biochem. Biophys. 71 : 121-5.
- SLOUKA V., 1962, Základy toxikologie radioaktivních látek. SZdN, Praha.

Došlo dne 22. 11. 1972

ГВЛИЧЕК Ф., ГРУШОВСКИ Й. (Военный ветеринарный научно-исследовательский институт, Прага, Чехословакия). Использование сорбентов естественного происхождения для лечения внутренней контаминации свиней радиоцезием. Vet. Med. (Praha) 18 (4) : 213-218, 1973.

В ходе опытов на свиньях изучали деконтаминационный эффект пемзового риолита при пероральной или интратрахеальной контаминации. Наибольший эффект получен при профилактическом введении или непосредственно после контаминации. Ввиду «энтерального цикла» радиоцезия, лечение можно начать и спустя некоторое время после контаминации. Для практического использования рекомендуется повторяющаяся дача в дозах по 250 г и, кроме того, 100 г в день в качестве составной части пищи. В ходе опытов не обнаружено никаких побочных влияний на состояние здоровья подопытных животных.

внутренняя контаминация; радиоцезий; сорбент естественного происхождения; терапия внутренней контаминации; свинья

HAVLÍČEK F., HRUŠOVSKÝ J. (Military Veterinary Research Institute, Praha, Czechoslovakia). *The Use of Sorbents of Natural Origin for the Internal Radiocesium Contamination Treatment in Pigs*. Vet. Med. (Praha) 18 (4) : 213-218, 1973.

Pigs were subject to trials undertaken to study the decontaminating effect of pumice rhyolite in peroral or intratracheal contamination. The highest effect was achieved in preventive or immediate post-contamination applications. The treatment may be started also some time after contamination, with due respect to the „enteral cycle“ of radiocesium. Repeated application in the doses of 250 g and further daily applications of 100 g as a part of feed are suggested for practical treatment. No unfavourable side effects on the health condition of the experimental animals were observed during the trials.

internal contamination; radiocesium; sorbent of natural origin; therapy of internal contamination; pig

HAVLÍČEK F., HRUŠOVSKÝ J. (Militär-Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Praha, Tschechoslowakei). *Anwendung von Sorbenten natürlicher Herkunft zur Therapie der Innenkontamination von Radiozäsium bei Schweinen*. Vet. Med. (Praha) 18 (4) : 213-218, 1973.

In Versuchen mit Schweinen wurde der Dekontaminationseffekt von Bimsstein-Rhyolit bei der peroralen oder intratrachealen Kontamination verfolgt. Der größte Effekt wurde bei präventiver oder unmittelbar nach der Kontamination erfolgter Applikation erzielt. Mit Rücksicht auf den „Enteral-Zyklus“ des Radiozäsiums kann

mit der Therapie auch erst in einem gewissen Zeitabstand von der Kontamination begonnen werden. Zur praktischen Anwendung wird eine wiederholte Verabreichung in Dosen von 250 g und weiter dann täglich 100 g als Beigabe zum Futter empfohlen. In den Versuchen wurden keine sekundären ungünstigen Einflüsse auf den Gesundheitszustand der Versuchstiere verzeichnet.

Innenkontaminierung; Radiozäsium; Sorbent natürlicher Herkunft; Therapie der Innenkontaminierung; Schwein

Adresa autorů:

Ing. F. Havlíček, CSc., doc. MVDr. J. Hrušovský, CSc., Vojenský veterinární výzkumný ústav, 150 06 Praha

VLIV NĚKTERÝCH FAKTORŮ NA ÚČINNOST FERROKYANIDŮ UŽITÝCH K ODSTRAŇOVÁNÍ RADIOCESIA Z ORGANISMU

F. Havlíček, J. Hrušovský

Vojenský veterinární výzkumný ústav, Praha

HAVLÍČEK F., HRUŠOVSKÝ J. *Vliv některých faktorů na účinnost ferrokyanidů užitých k odstraňování radiocesia z organismu.* Vet. Med. (Praha) 18 (4): 219-228, 1973).

V pokusech *in vitro* byl sledován u nerozpustných podvojných ferrokyanidů vliv pH a konkurenčních iontů (Na, K, Ca) na záchyt Cs. Ferrokyanidy byly dále testovány v pokusech na kryších, kde byly použity jako 1% přísada v dietě. Jejich dekontaminační efekt byl srovnáván s $K_4Fe(CN)_6$ při variabilním obsahu celulózy v dietě. S ohledem na dosažené výsledky je ferrokyanid draselný navrhován jako dekontaminační prostředek při vnitřní kontaminaci organismu radiocesiumem.

ferrokyanidy; radiocesium; terapie vnitřní kontaminace; krysa

Radiocesium, zejména ^{137}Cs , je z veterinárně hygienického hlediska hodnoceno jako jeden z nejzávažnějších radionuklidů štěpné směsi. Převažující depozice v měkkých tkáních (zejména v tkáni svalové) a značná eliminace mlékem vytvářejí potenciální předpoklad přenosu radioaktivity základními zdroji živočišných bílkovin k člověku.

K odstraňování radiocesia z organismu bylo úspěšně užito perorálně podaných rozpustných a nerozpustných ferrokyanidů. U podvojných nerozpustných ferrokyanidů je předpokládána především iontová výměna Cs za volnější vázané ionty alkalických prvků. U rozpustných ferrokyanidů (zejména draselného), u nichž se předpokládá tvorba účinné substance až v obsahu trávicího traktu s přítomnými kationty (Ca, Mg apod.), není vyloučena ani možnost spolustrhávání Cs.

Záchyt Cs na ferrokyanidech v chemických systémech byl podrobně studován Tananajevem a spolupracovníky (přehledně Havlíček a kol. 1969). Některé faktory, mnohdy působící negativně, se mohou právě uplatnit při použití ferrokyanidů *in vivo*. Žádný autor zabývající se odstraňováním radiocesia z organismu podrobněji tyto vlivy nesledoval. Výjimku tvoří práce Dvořáka (1970, 1971 a kol. 1971), kteří sledovali vliv podmínek přípravy berlínské modři na její dekontaminační efekt.

Snažili jsme se poukázat na některé vlivy přicházející v úvahu při použití ferrokyanidů při odstraňování radiocesia z organismu. Za velmi důležité se ukázaly zejména: vliv pH, koncentrace konkurenčních iontů, složení obsahu trávicího traktu a složení ferrokyanidů.

MATERIÁL A METODY

K přípravě nerozpustných ferrokyanidů, dále užitých v pokusech *in vitro* a *in vivo*, byly vzaty preparáty analytické čistoty. Jako výchozích substancí bylo užito $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ a síranů dusičnanů resp. chloridů dvoj- a trojmocných kationtů.

Srážení bylo provedeno za laboratorní teploty pozvolným slitím vodných roztoků o 0,01 M koncentraci, za důkladného míchání v molekulárním poměru reagujících

složek 1 : 1. Po minimálně 12hodinovém stání byly sraženiny dekantovány a centrifugací zbaveny matečného louhu. Dále byly sraženiny promývány přebytkem 0,01 M vodného roztoku KCl a opakovaně promývány destilovanou vodou do zmizení reakce na Cl^- . Sraženiny byly sušeny při teplotě nepřevyšující 60 °C a potom rozetřeny. K pokusům nebyly ferrokyanidy frakcionovány podle velikosti zrna, bylo užito zrnění do 0,1 mm.

Při zjišťování stechiometrického složení ferrokyanidů byly stanoveny všechny komponenty. $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ byl stanoven manganometricky (Čuta 1956) po odstranění hydroxidů vícemocných kationtů či přímou titrací vícerozpustných (Ca, Mg) ferrokyanidů. Vícemocné kationty byly stanoveny komplexometricky metodami, které v principu uvádí Příbil (1957). K stanovení draslíku bylo použito modifikované metody pro stanovení v moči (Hořejší a kol. 1953). Hydrátová voda byla stanovena modifikovanou metodou podle Tananajeva a kol. (1954). Složení jednotlivých ferrokyanidů je uvedeno v tab. I v mg na 100 mg ferrokyanidu a jejich stechiometrické složení při obsahu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} = 1$.

I. Složení užitých ferrokyanidů

	K		Me		$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$		H_2O		Molekulová váha	Σ
	A	B	A	B	A	B	A	B		
Mg	18,93	1,614	10,86	1,488	57,85	1	11,99	2,211	332,2	99,62
Ca	19,72	1,620	12,10	0,971	59,97	1	3,26	0,581	305,7	94,05
Zn	19,74	1,953	16,54	0,978	49,88	1	8,21	1,764	302,0	94,37
Cu	19,74	1,947	18,98	1,152	50,04	1	6,14	1,315	365,9	94,91
Ni	19,35	2,046	13,73	0,968	46,65	1	18,35	4,215	405,6	98,08
Co	16,68	2,036	15,62	1,265	40,42	1	27,62	7,322	478,9	100,39
Fe	7,24	0,772	14,10	1,053	46,25	1	30,72	7,121	410,1	98,31

Me — dvoj-, trojmocný kationt

A — mg komponenty na 100 mg ferrokyanidu

B — stechiometrické složení

Σ — součet nalezených množství ve 100 mg ferrokyanidu

Pokusy *in vivo* byly provedeny na kryších-samcích kmene Wistar, váhy 130 ± 8 g. Užito bylo 13 skupin kryš po 6 jedincích. Dva dny před intraperitoneálním podáním přibližně 5 μCi $^{134}\text{Cs}_2\text{CO}_3$ (vodný roztok beznosičového preparátu; 1 ml; pH = 6) bylo zahájeno zkrmováním diet s 1% přísadou ferrokyanidů, resp. s variabilním obsahem celulózy. Tyto diety (základem byla standardní dieta Velaz) byly zkrmovány v celém průběhu pokusu *ad libitum*.

Po dobu 10 dnů od podání ^{134}Cs byla u kryš sledována celotělová retence. K měření byly krysy jednotlivě vkládány do polystyrenových schránek, které byly vzdáleny 20 cm horizontálně od scintilačního NaJ (Ti)krystalu. Standardnost a reprodukovatelnost měření byly kontrolovány souběžným měřením fantomů.

Vzorky pokusů *in vitro* byly měřeny scintilační technikou s dutinovým NaJ (Ti) krystalem. Graficky a tabelárně jsou uvedeny aritmetické průměry skupin kryš či paralelních stanovení v pokusech *in vitro* se směrodatnými odchylkami.

VÝSLEDKY

VLIV pH NA IONTOVÉ VÝMĚNNÉ VLASTNOSTI FERROKYANIDŮ

Stanovení bylo provedeno ve statických podmínkách. K přesné navážce ferrokyanidu (10 mg) bylo přidáno trojnásobné stechiometrické množství $^{133}\text{CsCl}$, který byl označen beznosičovým ^{134}Cs ; 2,5 ml tohoto roztoku bylo po dobu

20 min třepáno s testovaným ferrokyanidem. Předběžné pokusy ukázaly, že tato doba je dostatečná k dosažení rovnovážného stavu iontů Cs mezi kapalnou a pevnou fází. Sraženina byla potom odstředěna a byl měřen obsah ^{134}Cs v části kapaliny. K eliminaci možné sorpce na skle byly výsledky srovnány se shodnými pokusy uskutečněnými pouze s roztokem obsahujícím $^{133}\text{Cs} + ^{134}\text{Cs}$.

Výměnná kapacita byla stanovena v závislosti na pH v oblasti od silně kyselé do mírně alkalické, tj. přibližně v oblasti pH trávicího traktu hospodářských zvířat. Hodnoty pH byly nastaveny koncentrovanými roztoky HCl resp. NaOH.

Výsledky sorpce Cs⁺ na ferrokyanidech jsou uvedeny v tab. II v mg zachyceného Cs na g ferrokyanidu, v počtu atomů Cs v molekule ferrokyanidu a konečně je vyjádřen stupeň výměny Cs za K původně přítomný v molekule ferrokyanidu.

II. Sorpce Cs na ferrokyanidech v závislosti na pH

pH		Ferrokyanid						
		Mg	Ca	Zn	Cu	Ni	Co	Fe
1	A	0	726,73	282,25	125,98	166,91	86,68	37,32
	B	0	1,67	0,64	0,35	0,51	0,31	0,16
	C	0	1,13	0,33	0,18	0,25	0,15	0,15
3	A	0	236,54	283,94	109,40	173,11	173,15	44,77
	B	0	0,54	0,64	0,30	0,53	0,61	0,14
	C	0	0,36	0,33	0,15	0,25	0,30	0,18
6	A	34,85	0	385,62	218,26	300,63	199,86	207,56
	B	0,09	0	0,88	0,60	0,92	0,72	0,64
	C	0,06	0	0,45	0,31	0,45	0,35	0,81
8	A	0	0	273,53	116,33	187,07	98,24	128,84
	B	0	0	0,62	0,32	0,57	0,35	0,40
	C	0	0	0,32	0,17	0,28	0,17	0,51

A – mg Cs na g ferrokyanidu

B – počet atomů Cs v molekule ferrokyanidu

C – stupeň výměny za K v molekule ferrokyanidu

Testované ferrokyanidy vykazují velmi rozdílnou výměnnou kapacitu a schopnost vázat Cs⁺. Vyjma ferrokyanidu Ca se projevuje pokles sorpce s poklesem či vzestupem hodnot pH od neutrální. Nízké hodnoty sorpce pro ferrokyanid Mg jsou dány obecně jeho relativně vyšší rozpustností. Je-li srovnáno zachycené množství Cs⁺ v pevné fázi s původním množstvím K v molekule ferrokyanidů, nebylo (s výjimkou ferrokyanidu Ca) pro pH = 1 dosaženo úplné iontové výměny.

VLIV pH A KONKURENČNÍCH IONTŮ NA ZÁCHYT Cs⁺ NA FERROKYANIDECH

Tyto experimenty měly s předchozí sérií shodné statické podmínky, užito bylo beznosičového ^{134}Cs . Podmínky byly voleny tak, aby se přiblížily poměrům v trávicím traktu hodnotami pH a přítomností konkurujících iontů Na, K a Ca.

III. Vliv pH a konkurenčních iontů na sorpci ^{134}Cs na ferrokyanidech

pH		Na		K		Ca	
		10	100	10	100	10	100
1	Ca	95,34	91,07	96,96	32,68	96,68	99,00
	Zn	97,32	89,62	86,00	31,13	98,53	98,51
	Co	99,60	99,66	99,31	92,80	98,98	99,43
	Fe	83,19	99,47	99,35	99,00	97,17	98,53
3	Ca	98,41	98,59	82,62	21,60	94,50	95,82
	Zn	98,60	92,65	83,85	33,60	97,91	97,77
	Co	99,36	99,32	98,30	89,20	98,97	99,25
	Fe	86,22	99,57	99,29	98,56	99,16	99,36
6	Ca	72,97	8,51	6,41	0	39,10	0
	Zn	95,93	85,31	80,60	24,07	98,42	98,36
	Co	99,52	99,44	99,03	99,16	99,59	99,73
	Fe	73,73	99,71	99,80	99,59	99,42	98,18
8	Ca	4,06	3,53	5,89	9,89	2,36	10,55
	Zn	97,36	83,53	78,85	35,97	97,42	97,20
	Co	98,17	97,87	92,67	77,85	99,24	99,30
	Fe	97,15	99,57	88,06	94,79	99,78	99,65

Konkurenční ionty byly přidány v množství 10 a 100násobném proti obsahu K v molekule užitých ferrokyanidů.

Výsledky experimentů jsou sumarizovány v tab. III pro čtyři vybrané ferrokyanidy pro pH = 1, 3, 6 a 8. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech původního množství ^{134}Cs , tedy množství zachyceného na ferrokyanidech. Vyjma ferrokyanidu Ca lze říci, že ionty Ca a Na velmi málo ovlivňují zachyt Cs na ferrokyanidech, zatímco vliv K, zejména ve vyšší koncentraci, je zřejmý.

ZÁCHYT Cs NA FERROKYANIDECH V PROSTŘEDÍ OBSAHU ZAŽÍVACÍHO TRAKTU

Pokusy byly provedeny se ^{134}Cs s nosičem na čtyřech nerozpustných ferrokyanidech v prostředí obsahu žaludku resp. tenkého střeva krys krmených standardní dietou Velaz. Metodicky bylo postupováno jako v předchozích případech, přidaná množství obsahu žaludku či tenkého střeva (pH = 2,5 resp. 8) obnášela 1000 ± 15 mg pro jeden pokus (uvedeny průměry ze 3 paralelních pokusů).

Výsledky v tab. IV ukazují, že z prostředí obsahu zažívacího traktu krys, proti čistě chemickému systému, stoupá sorbované množství Cs na ferrokyanidech. Obsah K v 10 mg ferrokyanidu (tab. I) činí pro ferrokyanid Ca 1,97 mg; Zn 1,97 mg; Co 1,67 mg; Fe 0,72 mg. Vyjma alkalického prostředí pro ferrokyanid Ca jsou hodnoty sorpce Cs srovnatelné či vyšší než obsah K v molekule ferrokyanidů.

IV. Sorbované množství Cs na ferrokyanidech z prostředí obsahu žrávaciho traktu kryš

CF	pH = 2,5		pH = 8	
	‰ ¹³³⁺¹³⁴ Cs	mg Cs	‰ ¹³³⁺¹³⁴ Cs	mg Cs
Ca	28,28	4,24	0,58	0,087
Zn	18,83	2,80	20,15	3,02
Co	7,09	1,06	7,40	1,11
Fe	7,15	1,07	12,53	1,86

SROVNÁNÍ ÚČINNOSTI FERROKYANIDŮ V POKUSECH *IN VIVO*

Pokusy byly dělány na osmi skupinách kryš krmených dietami s 1 % přídavkem ferrokyanidů (tab. V) a na skupině kontrolní, krmené standardní dietou Velaz. Výsledky měření celotělové retence byly matematicky zpracovány (Slovak 1962); v tab. V jsou uvedeny hodnoty koeficientů a_i a biologických poločasů T_{bi} .

Ve všech případech devíti pokusných skupin kryš charakterizuje celotělovou retenci ¹³⁴Cs složená exponenciální závislost. U kontrolní skupiny je 20 % podaného množství vyloučeno s poločasem 1 den a zbylé množství s $T_{b2} = 11,2$ dní. Zkrmoování ferrokyanidů má za následek především zvýšení množství ¹³⁴Cs vyloučené s kratším poločasem. Mimoto je redukován i T_{b2} na hodnoty 3,8, až 6,7 dní. I když při srovnání konečných hodnot retence se ukazují jako nejúčinnější ferrokyanidy Cu, Ni a Fe, leží tyto hodnoty v mezích statistické významnosti.

V. Výsledky matematické analýzy retenčních křivek ¹³⁴Cs u kryš o podání ferrokyanidu a diet s variabilním obsahem celulózy

Ferrokyanid	a_1	T_{b1}	a_2	T_{b2}
Kontrola	20	1,0	80	11,2
Mg	50	0,7	50	5,5
Zn	50	0,5	50	4,5
Fe	50	0,8	50	4,0
Co	50	0,7	50	4,3
Ca	50	0,5	50	4,4
Ni	50	0,5	50	3,8
Cu	50	0,9	50	4,0
K	50	0,7	50	6,7
A	15	0,6	85	22,4
B	20	0,7	80	5,3
C	15	0,9	85	20,9
D	50	0,6	50	5,0

VLIV CELULÓZY NA ÚČINNOST FERROKYANIDU DRASELNÉHO

Excepcionální fyzikálně chemické vlastnosti v řadě testovaných ferrokyanidů vykazuje $K_4Fe(Cn)_6$ tím, že je ve vodě velmi dobře rozpustný a disociovaný. Mimoto projevuje rozdílný dekontaminační efekt u zvířat s jednoduchým žalud-

kem ve srovnání s přezvýkavci. Důvod je možno hledat i v rozdílném obsahu celulózy v potravě i v obsahu zaživacích traktů.

Na čtyřech skupinách krys byl sledován vliv ferrokyanidu draselného na eliminaci ^{134}Cs při zkrmování diet s variabilním obsahem celulózy, jak je uvedeno níže:

- A. 1 kg kaseinu + 200 g glukózy + 200 g pšeničného škrobu;
- B. totéž jako u diety A s 15 g $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$;
- C. totéž jako u diety A s 300 g celulózy;
- D. totéž jako u diety C s 20 g $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$.

Uvedené součásti diet byly smíchány s potřebným množstvím horké vody a zkrmovány byly po vysušení při $t = 60^\circ\text{C}$. Ostatní experimentální podmínky byly shodné s předchozí pokusnou sérií. Výsledky matematické analýzy retenčních křivek jsou uvedeny v tab. V.

Z výsledků je zřejmé, že zkrmování diet bez obsahu celulózy (A) a se zvýšením obsahu celulózy (C), postrádajících některé esenciální složky potravy, negativně ovlivňují vylučování radiocesia z organismu. Přídavek ferrokyanidu draselného v dietě bez celulózy (B) zvyšuje poněkud eliminaci ^{134}Cs . U skupiny se zvýšeným obsahem celulózy (D) je dosaženo v hodnotách výsledné retence i v jejich průběhu shodných výsledků, jako v případě použije-li se nerozpustných ferrokyanidů.

DISKUSE

Nepříznivý vliv na dekontaminační účinky ferrokyanidů (vyjma ferrokyanidu Ca) má především zvýšení koncentrace H^+ v roztoku. I když Cs^+ vykazuje vysokou afinitu k vazbě na ferrokyanidy, nelze vyloučit při nízkých hodnotách pH konkurenční reakci. Výsledky sorpce byly počítány z rozdílu obsahu v kapalně fázi před stykem s fází pevnou a po něm. S ohledem na značnou tendenci k tvorbě koloidních roztoků zejména u ferrokyanidů Co, Fe a Cu je možné, že došlo v některých případech k současnému měření na sorbovaného a koloidně rozptýleného ferrokyanidu, což vedlo k nižšímu odhadu sorpce. Potvrzují to konečně i výsledky pokusů *in vivo*.

Nepříznivý vliv obsahu K v systému vyplývá z jeho postavení a vztahu k Cs v řadě afinity k ferrokyanidům pro alkalické kovy (T a n a n a j e v 1957). Tato skutečnost je podtržena i tím, že K^+ se objevily jako makrosložka proti mikrosložce Cs^+ .

Pokusy uskutečněné v prostředí obsahu zaživacího traktu ukazují, že vedle iontové výměny se pravděpodobně uplatňují i jiné mechanismy zachytu Cs^+ . Značný význam může mít především obsah celulózy, jak ukazují i pokusy *in vivo*.

Vlivem celulózy na sorpci Cs^+ na ferrokyanidy v chemických systémech se zabýval D v o ř á k (1963). Dokázal, že v některých případech u rozpustných ferrokyanidů je to dokonce podmínka zachytu Cs^+ . Tento jev je vysvětlován tvorbou asociátů s celulózou či tvorbou mikrokystalických částic. Na základě těchto pokusů lze tedy usoudit, že použití ferrokyanidu draselného je vázáno na zvýšený obsah celulózy v obsahu zaživacího traktu a že je prakticky využitelný především u přezvýkavců.

Srovnání účinnosti ferrokyanidů na kryších ukazuje, že jejich dekontaminační efekt není závislý na povaze vícemocného kationtu v molekule ferrokyanidu a že jejich účinek závisí spíše na podmínkách přípravy, které mají zajistit, aby byly připraveny substance schopné iontovou výměnou vázat Cs. Syntéza ferrokyanidů z $K_4Fe(CN)_6$ pak poskytuje produkty s minimální tendencí k vedlejším pochodům s konkurenčními ionty v obsahu zažívacího traktu.

Literatura

- ČUTA F., 1956, Analytická chemie odměrná. Nakl. ČSAV, Praha.
 DVORÁK P., 1963, Izučenie očistky sborných vod ot ^{137}Cs ferrocyanidnym metodom. Dipl. práce LTI im. Lensovéta, Leningrad.
 DVORÁK P., 1972, Hexacyanoferrate (II) als Thallium-Antidote. *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 20 : 1886-8.
 DVORÁK P., 1971, Bindung von Thallium (I) durch Hexacyanoferrate (II) Z. Naturforsch. 26b : 277-81.
 DVORÁK P., GÜNTHER M., ZORN U., CATSCH A., 1971, Metabolisches Verhalten von kolloidalem Ferrihexacyanoferrat (II). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 269 : 48-56.
 HAVLÍČEK F. a kol., 1969, Použití ferrokyanidů při léčbě vnitřní kontaminace hospodářských zvířat radiocesiumem. Dílčí záv. zpráva výzk. úkolu, VVVÚ Praha.
 HOŘEJŠÍ J., SLAVÍK K., 1953, Základy chemického vyšetřování v lékařství. SZdN, Praha.
 PŘIBIL R., 1962, Komplexony v chemické analýze. Nakl. ČSAV, Praha.
 SLOUKA V., 1962, Základy toxikologie radioaktivních látek. SZdN, Praha.
 TANANAJEV I. V., GLUSKOVA M. A., SEJFER G. B., 1954, Chimija ferrokianidov lantaan i ich priměnenije v analitičeskoj chimii. In: Chimija redkich elementov, sv.1., Izd-vo AN SSSR, Moskva: 58-86.
 TANANAJEV I. V., 1957, Novyje danyje o chimiji někotorych redkich elementov. *Izv. AN SSSR Otd. Chim. Nauk* 12 : 1421-8.

Došlo dne 22. 11. 1972

ГАВЛИЧЕК Ф., ГРУШОВСКИЙ И. (Военный ветеринарный научно-исследовательский институт, Прага, Чехословакия). Влияние некоторых факторов на действие ферроцианидов, используемых для удаления радиоцезия из организма. *Vet. Med. (Praha)* 18 (4) : 219-228, 1973.

V ходе опытов *in vitro* у нерастворимых бинарных ферроцианидов изучали влияние pH и конкурентных ионов (Na, K, Ca) на захват Cs^+ . Кроме того, ферроцианиды тестировали в опытах на крысах, применяя в форме 1% присадки в диете. Их деkontaminационный эффект сравнивали с $K_4Fe(CN)_6$ при изменчивом содержании клетчатки в диете. С учетом достигнутых результатов, ферроцианид калия рекомендуется в качестве деkontаминирующего средства при внутренней контаминации организма радиоцезием.

ферроцианиды; радиоцезий; терапия внутренней контаминации; крыса

HAVLÍČEK F., HRUŠOVSKÝ J. (Military Veterinary Research Institute, Praha Czechoslovakia). The Effect of Some Factors on the Effectivity of Cyanoferrates Used for the Removal of Radiocesium from the Organism. *Vet. Med. (Praha)* 18 (2) : 219-228, 1973.

Trials were undertaken *in vitro* to study insoluble binary cyanoferrates for the effect of pH and competitive ions (Na, K, Ca) on Cs^+ capture. Furthermore, cyanoferrates were tested in trials in rats where the compounds were used as supplements to diet. Their decontaminating effect was compared with that of $K_4Fe(CN)_6$ with varying content of cellulose in diet. On the basis of the results, potassium cyanoferrate is suggested as a decontaminant for the therapy of the internal radiocesium contamination of the organism.

cyanoferrates; radiocesium; therapy of internal contamination; rat

HAVLÍČEK F., HRUŠOVSKÝ J. (Militär-Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Praha, Tschechoslowakei). *Einfluß einiger Faktoren auf die Wirksamkeit von Zyanoferraten (II), die zur Elimination von Radiozäsium aus dem Organismus angewandt wurden.* Vet. Med. (Praha) 18 (4) : 219-228, 1973.

In Experimenten *in vitro* wurde bei den unlöslichen binären Zyanoferraten der Einfluß des pH und der Konkurrenz-Ionen (Na, K, Ca) auf den Auffang des Cs⁺ verfolgt. Zyanoferrate wurden ferner in Versuchen mit Ratten testiert, indem man sie als 1% Beigabe zur Diät verabreichte. Ihr Dekontaminationseffekt wurde mit dem K₄Fe(CN)₆ bei variablem Zellulosegehalt in der Diät verglichen. Im Hinblick auf die erzielten Resultate kann das Kalium-Zyanoferrat als Dekontaminationsmittel bei Innenkontaminierung des Organismus durch Radiozäsium empfohlen werden.

Zyanoferrate (II); Radiozäsium; Therapie der Innenkontaminierung; Ratte

Adresa autorů:

Ing. F. Havlíček, CSc., doc. MVDr. J. Hrušovský, CSc., Vojenský veterinární výzkumný ústav, 120 56 Praha

VLIV IONIZUJÍCÍHO ZÁŘENÍ NA NĚKTERÉ REGULAČNÍ MECHANISMY BUNĚČNÝCH REGENERAČNÍCH PROCESŮ

F. Lehký, B. Zícha

Vojenský veterinární výzkumný ústav, Praha

LEHKÝ F., ZÍCHA B. *Vliv ionizujícího záření na některé regulační mechanismy buněčných regeneračních procesů.* Vet. Med. (Praha) 18 (4) : 229-240, 1973.

V práci byly sledovány některé morfologické a biochemické změny jaderného materiálu radiosenzitivních buněk se synchronizovaným generačním cyklem jater krys celotělově ozářených rtg paprsky. Byly získány poznatky o vlivu ionizujícího záření na velikost jader, změny nukleolárního indexu a koeficientu, reciproční vztah mezi hladinou DNK a TBK pozitivních látek v průběhu anti-oxidační kapacity jaterní buňky a hladinou celkové RNK. Změny sledovaných buněčných struktur lze považovat za odraz poruch nukleolárního aparátu, který je závažným regulačním místem proliferačních vlastností buňky.

ionizující záření; regenerační procesy; regulační mechanismy

Podstatou regulací je nejenom přenos, zachování a zpracování informace, ale i zpětné ovlivnění řídicího systému. Toto zpětné ovlivnění — zpětná vazba — směřuje k likvidaci úchytky, ke které došlo ovlivněním řízené složky různými rušivými vlivy, v našem případě ionizujícím zářením.

Protože stěžejní otázkou úpravy poruchy vyvolané ozářením organismu je schopnost reparovat vzniklé poškození, jsou reparační a regenerační pochody ozářeného organismu, a především regulace těchto pochodů, z radiobiologického, ale i obecného hlediska prvotním problémem.

Současný stav našich poznatků biochemie buňky se koncentruje kolem syntézy DNK, RNK a bílkovin s cílem vytvořit kauzální vztahy mezi biochemií buňky, její funkcí a morfologií. Regenerující játra jsou z tohoto hlediska ideálním modelem pro sledování jejich vzájemných vztahů v časovém průběhu generačního cyklu, neboť po částečné hepatektomii (dále CHE) s odstraněním cca 70 % jaterní tkáně (Higgins, Anderson 1931) dostává jaterní tkáň charakter radiosenzitivní tkáně.

Od základní práce Eulera a Hevesyho (1942), kteří první prokázali inhibiční účinek záření na syntézu DNK, a od poznatků o nestejné radiosenzitivitě buňky během generačního cyklu, prokázané Howardovou a Pelcem (1953), byly rozpracovány v četných pracích základy pro posouzení radiosenzitivity buňky a objasněny mechanismy inhibující buněčnou proliferaci (Lehký, Hrušovský, Zícha 1971). Mnozí autoři prokázali, že jak buňky v interfázi, tak i buňky proliferující jsou poškozovány principiálně stejným způsobem. U neproliferující tkáně je tato porucha latentní a projevuje se až po vyprovokované proliferaci. Mechanismus spouštějící vlastní proliferaci buňky a mechanismus interakce ionizujícího záření na regeneraci není zatím znám.

Cílem práce bylo proto sledovat změny některých buněčných struktur odpovědných za regulační mechanismy v játrech ozářených krys.

MATERIÁL A METODY

K pokusům byly použity krysy — samci kmene Wistar, o váze 190 ± 10 g. Zvířata byla držena za standardních podmínek, pravidelně krmena peletovanou Larse-novou dietou a vodu měla ze skleněných napáječek *ad libitum*. Před zařazením do pokusů 24 hodiny hladověla.

Zvířata byla ozařována rtg přístrojem „MAKROFOS 250“ v rotujícím plexi-sklovém kotouči. Technická data ozařování: napětí 235 kV, 14 mA, příliv cca 11 R/min, filtr 0,5 mm Cu, 1,0 mm Al, OK 100 cm. Obdržené dávky byly kontrolovány dozimetrem SIEMENS podle hodnot těsně nad kotoučem.

Při vlastních pokusech byly používány letální dávky 1000 a 1400 R. Krysy exponované těmito dávkami hynuly během pěti až osmi dnů po expozici, po dávce 1400 R do tří maximálně čtyř dnů.

Částečná hepatektomie byla dělána standardní metodou Higginse a An-dersona (1931).

Zkoumání činnosti buněk statistickou velikostí jader — koryometrií — bylo hodnoceno metodou podle G ü t h e r a, jak ji uvádí Ř e ž á b e k (1953).

Mitotický index byl stanoven v obarvených řezech vzorků jater podle zjištění v 1000 buňkách a vyjádřen v relativních procentech.

K průzkumu nukleolů v jaterních buňkách bylo použito metody pro demon-straci nukleolárního aparátu v lymfocytech periferní krve (P o t m ě š i l, S m e t a n a, W i e n e r o v á 1967). Otisky nebo jemné roztěry jaterní tkáně na podložních sklech byly barveny podle metody M c I l v a i n e a, jak ji uvádějí B e r a n a P o s p í š i l (1967).

Při hodnocení byl stanoven nukleolární koeficient (G o n z a l e z - G u z m a n 1948) podle vzorce:

$$NC = \frac{\text{počet jadérek ve 100 buňkách}}{100}$$

Vzájemný poměr jader s jedním nukleonem a více jadérky byl vyjádřen nukleo-lárním indexem.

Reakce s TBK byla stanovena spektrofotometrem Optica při 532 nm v jaterním homogenátu.

Extrakci nukleových kyselin jsme dělali podle C e r r i o t i h o (1955), koncentraci celkových nukleotidů spektrofotometricky při 268,5 nm na standard adenosinu (MERCK) a deoxyadenosinu (BNC).

Koncentrace DNK byla stanovena difenylaminovým reagens podle B u r t o n a (1955).

VÝSLEDKY

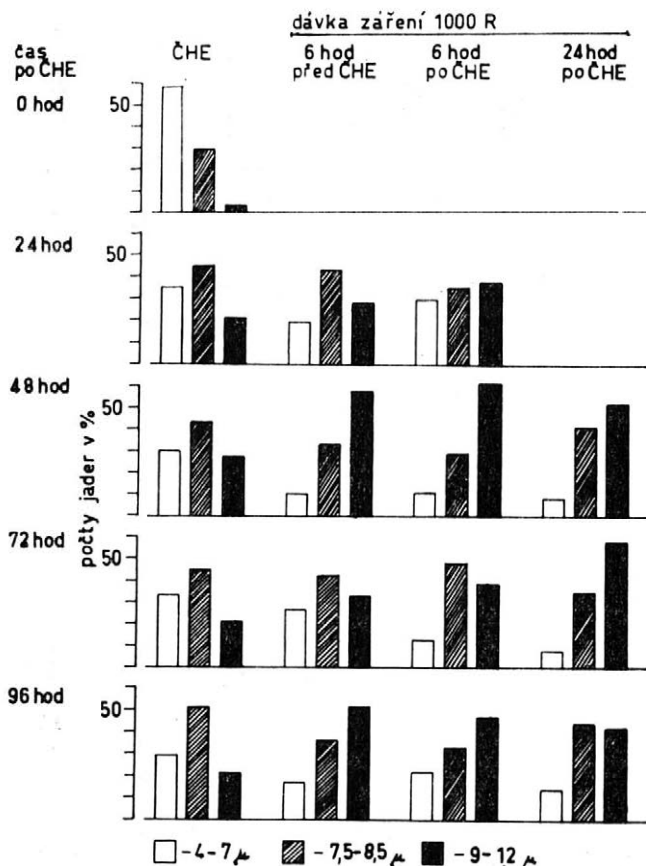
Karyometrické měření ukazuje na značné morfologické změny v jaterních buňkách krys, vyvolané jednorázovým celotělovým ozářením rtg paprsky (obr. 1).

Zatímco hepatocyty neoperovaných zvířat obsahují 65 % jader o průměru $4-7 \mu$, 32 % jader $7,5-8,5 \mu$ a jen 3 % buněk s jádry $9-12 \mu$ velikými, tato relativní četnost se po ČHE mění ve prospěch obrovských jader s maximem 24 hodiny po operaci. Celotělové ozáření zvyšuje četnost pyknotických jader s vrcholem v intervalu 48 hodin po ČHE, byla-li expozice rtg paprsky provedena šest hodin před nebo po částečném vytěti jater. Výsledky poukazují na rozdíly dělicích se jader v průběhu regeneračního procesu vyvolaného zářením.

Změny nukleolárního koeficientu a nukleolárního indexu v játrech hepatekto-movaných krys po expozici dávkou 1000 R, kterou zvířata obdržela v postope-rativním údobí v intervalu 6 hod. po operaci, ukazují obr. 2 a 3.

Použitá dávka záření způsobila silný pokles v intervalu 24 hodiny, který sice vyrovnává po mitotické fázi (30 hodin) před druhým maximem syntézy DNK, nedosahuje však výchozích hodnot a je podstatně nižší než nukleolární frekvence u skupiny s běžným průběhem regeneračního procesu.

1. Vliv celkového ozáření na velikost jader hepatocytů v různých časových intervalech po ČHE u kontrolních a ozářených krys

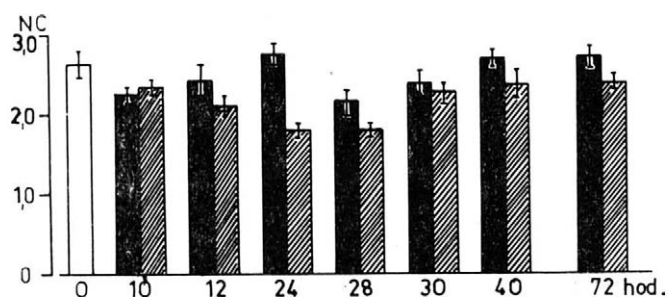


Menší pokles absolutního počtu hepatocytů s jedním jadérkem a výraznější pokles jader multinukleolárních se projevil zvýšením nukleolárního indexu. Změny nastoupily v intervalu 12 hodin a vyvrcholily 20 hodin po expozici uvedenou dávkou rtg paprsků.

Vliv ionizujícího záření na mitotický index regenerujících jaterních buněk v různých časových intervalech po ČHE uvádí tab. I.

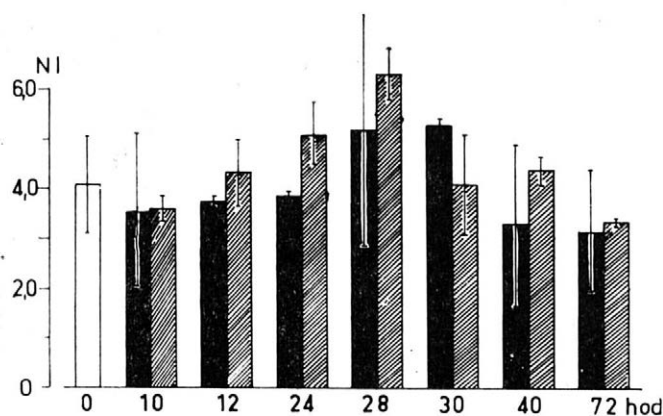
Částečné vytětí jater vyvolalo u sledovaných krys snížení téměř všech dalších sledovaných hodnot jaderných látek, které regulují životní procesy buňky. Celkové nukleové kyseliny a volné nukleotidy jsou trvale sníženy, hodnoty DNK nejprve klesají, aby se v maximu syntézy DNK, 24 hodiny po ČHE, přiblížily kontrolním hodnotám. Téměř reciproční charakter mají hodnoty reakce TBK.

Ozáření jak těsně před ČHE, tak ve sledovaných intervalech 6, 16 a 19 hodin po operaci vede ke zvýšení celkové hladiny nukleových kyselin a ke zvýšení nukleotidů rozpustných v kyselině. Naproti tomu se signifikantně snižuje od 24. hodiny po ČHE hladina kyseliny deoxyribonukleové (tab. II, III, IV, V). Z výsledků je patrné, že vliv ozáření se pojevuje podobně jako na mitózu i na syntézu kyseliny deoxyribonukleové, a to v interfázi buněčného cyklu či ve fázi G₁ a S₁ (tab. VI).



2. Hodnoty nukleolárního koeficientu v jaterních buňkách kryš po ČHE a celotělovém ozáření rtg paprsky dávkou 1000 R (6 hodin po ČHE)

□ - výchozí hodnoty před ČHE
 ■ - hodnoty v intervalech po ČHE
 ▨ - hodnoty v intervalech po ČHE a záření



3. Hodnoty nukleolárního indexu v jaterních buňkách kryš po ČHE a celotělovém ozáření rtg paprsky dávkou 1000 R (6 hodin po ČHE)

□ - kontrola ■ - po ČHE ▨ - po ČHE + ozáření

I. Vliv ionizujícího záření exponovaného v různých časových intervalech po ČHE na mitotický index regenerujících jaterních buněk

Hodin po ČHE	0	6	16	19	24	48
Kontrolní ČHE	0	0	0	11	23	41
1400 R bezprostředně před ČHE	0	0	0	1	0	5
1400 R 6 hodin po ČHE	0	0	0	0	0	0
1400 R 16 hodin po ČHE	0	0	0	—	0	0
1400 R 19 hodin po ČHE	0	0	0	11	—	17

II. Vliv ionizujícího záření exponovaného v různých časových intervalech po ČHE na obsah kyseliny deoxyribonukleové v regenerujících játrech

Kontrolní krysy ozářené celotělovou dávkou 1400 R	Doba po ozáření v hod.	Kyselina deoxyribonukleová		
		mg/g jater	n	P
	kontrola	3,21	8	—
	16	3,54	6	—
	19	3,05	8	—
	24	3,01	8	—
	48	1,85	8	0,001
Krysy s ČHE	Doba po ČHE v hod.	mg/g jater	n	P
Kontrolní krysy	kontrola	3,21	8	—
	16	2,41	8	0,001
	19	2,50	7	0,010
	24	3,02	7	—
	48	2,47	6	0,001
1400 R těsně před ČHE	kontrola	3,21	8	—
	16	2,47	6	—
	19	2,78	7	—
	24	1,99	6	0,001
	48	1,31	6	0,001
1400 R 6 hodin po ČHE	kontrola	3,21	8	—
	16	2,19	8	—
	19	1,68	8	0,001
	24	1,95	8	0,001
	48	1,69	7	0,001
1400 R 16 hodin po ČHE	kontrola	3,21	8	—
	16	—	—	—
	19	2,33	8	—
	24	1,90	7	0,001
	48	1,68	8	0,010
1400 R 19 hodin po ČHE	kontrola	3,21	8	—
	16	—	—	—
	19	—	—	—
	24	1,04	7	0,001
	48	1,66	8	0,001

n = počet zvířat ve skupině, P = pravděpodobnost nevýznamnosti v %

III. Vliv ionizujícího záření exponovaného v různých časových intervalech po ČHE na obsah celkových, v kyselině rozpustných nukleotidů v regenerujících játrech

Kontrolní krysy ozářené celotělovou dávkou 1400 R	Doba po ozáření v hod.	Celkové nukleotidy		
		mg/g jater	n	P
	kontrola	1,65	8	—
	16	1,36	6	0,010
	19	1,39	8	0,010
	24	1,65	8	—
	48	1,74	8	—
Krysy po ČHE	Doba po ČHE v hod.	mg/g jater	n	P
Kontrolní krysy po ČHE	kontrola	1,65	8	—
	16	1,21	6	0,001
	19	1,28	6	0,001
	24	1,16	6	0,001
	48	1,08	5	0,010
1400 R těsně před ČHE	kontrola	1,65	8	—
	16	1,73	6	0,001
	19	2,05	7	0,001
	24	1,48	6	0,010
	48	1,64	6	0,001
1400 R 6 hodin po ČHE	kontrola	1,65	8	—
	16	1,23	8	—
	19	1,86	8	0,001
	24	1,60	8	0,010
	48	1,46	6	—
1400 R 16 hodin po ČHE	kontrola	1,65	8	—
	16	—	—	—
	19	1,43	8	0,100
	24	1,52	7	0,001
	48	1,55	8	0,001
1400 R 19 hodin po ČHE	kontrola	1,65	8	—
	16	—	—	—
	19	—	—	—
	24	1,20	7	—
	48	1,13	8	—

n = počet zvířat ve skupině

P = pravděpodobnost nevýznamnosti

IV. Vliv ionizujícího záření exponovaného v různých časových intervalech po ČHE na obsah celkových nukleových kyselin v regenerujících játrech

Kontrolní krysy ozářené celotělovou dávkou 1400 R	Doba po ozáření v hod.	Celkové nukleové kyseliny		
		mg/g jater	n	P
	kontrola	12,40	6	—
	16	11,90	6	—
	19	10,40	8	0,050
	24	11,50	8	—
	48	7,75	7	0,010
Krysy po ČHE	Doba po ČHE v hod.	mg/g jater	n	P
Kontrolní krysy po ČHE	kontrola	12,40	6	—
	16	9,00	7	0,010
	19	9,61	7	0,050
	24	8,17	7	0,001
	48	7,87	6	0,001
1400 R těsně před ČHE	kontrola	12,40	6	—
	16	10,43	7	—
	19	11,07	7	—
	24	20,55	6	0,001
	48	10,11	6	0,001
1400 R 6 hodin po ČHE	kontrola	12,40	6	—
	16	9,87	8	—
	19	10,63	8	—
	24	11,08	7	0,001
	48	14,40	6	0,001
1400 R 16 hodin po ČHE	kontrola	12,40	6	—
	16	—	—	—
	19	9,96	8	—
	24	10,71	7	0,001
	48	10,30	8	0,001
1400 R 19 hodin po ČHE	kontrola	12,40	6	—
	16	—	—	—
	19	—	—	—
	24	9,35	7	—
	48	11,16	8	0,001

n = počet zvířat ve skupině

P = pravděpodobnost nevýznamnosti

DISKUSE

V práci jsme řešili některé otázky vlivu ionizujícího záření na mechanismy určující aktivitu buněčné proliferace.

V souhlasu s literárními údaji jsme pozorovali početní redukci nukleolárního aparátu a velikostní změny jader regenerujícího jaterního parenchymu krys po ČHE (Mironescu a Dragomir 1966, Lehký a Beran 1968), které se navíc prohlubovaly po celotělovém ozáření. Vycházeli jsme z předpokladu, že změny počtu jadérek či velikosti jádra jsou odrazem snížené látkové přeměny nukleových kyselin.

Jordan (1964), Kaufman a kol. (1968) poukázali na morfologické

V. Vliv ionizujícího záření exponovaného v různých časových intervalech po ČHE na obsah TBK v regenerujících játrech

Krysy po ČHE	Doba po ČHE v hod.	E/g jater	n	P
Kontrolní krysy	kontrola	952	8	—
	16	894	6	—
	19	778	8	—
	24	626	7	0,001
	48	697	7	0,001
1400 R těsně před ČHE	kontrola	952	8	—
	16	471	8	0,001
	19	692	7	—
	24	668	5	—
	48	631	6	—
1400 R 6 hodin po ČHE	kontrola	952	8	—
	16	719	8	0,010
	19	686	8	—
	24	675	8	—
	48	756	6	—
1400 R 16 hodin po ČHE	kontrola	952	8	—
	16	—	—	—
	19	533	8	0,050
	24	621,5	7	—
	48	570	8	0,050
1400 R 19 hodin po ČHE	kontrola	952	8	—
	16	—	—	—
	19	—	—	—
	24	1088	8	0,001
	48	781	7	—

n = počet zvířat ve skupině

P = pravděpodobnost významnosti

změny buněčného jádra, na zvýšení velikosti nukleolů a pokles jejich počtů 24 hodiny po ČHE a pokládají tyto nálezy za odraz zvýšené syntézy RNK.

Mironescu a Dragomir (1967) potvrdili autoradiografickou metodou zvýšený transport RNK z jáderka a jádra do cytoplazmy již v iniciálním stadiu regenerace.

Jestliže přijmeme teorii o regulativním významu jáderka pro životní funkce buňky, pak je vysvětlitelné i námi pozorované snížení hladiny DNK v postračném období regulačního procesu.

Četní autoři (Fitschen a Cohen 1960 aj.), kteří se podobnou otázkou zabývali, pozorovali v buňkách regenerujících jater početné anomálie mitózy a její zpoždění. Hovoří o tzv. „demaskování“ škodlivých účinků záření i při expozici před ČHE. Webber a Stich (1965) rozlišili v regenerujících játrech celotělově ozářených zvířat dvě rozdílné buněčné populace (jednu s nízkou intenzitou proliferace — polyploidní a aneuploidní buňky a druhou populaci vykazující zmnožení, jejíž buňky běžného tvaru jsou nositeli buněčné regenerace).

Snaha proliferujícího orgánu vytvářet „gigantická jádra“ byla námi pozorována u skupiny celotělově ozářených krys exponovaných na začátku G_1 fáze, u nichž dosáhl počet 61 % (obr. 1). Radiační inzult vystupňoval tyto změny v intervalu 48 hodin po ČHE, patrně jako odraz patologického podnětu, který organismus po letální dávce ionizujícího záření není schopen kompenzovat během jednoho generačního cyklu buňky.

Podobnými problémy se zabýval Chesin (1967) v kapitole o změnách rozměrů jader buněk při reparativní regeneraci. Poukazuje na skutečnost, že v tkáni, která má buňky různých objemových tříd, již vstup do předmitotické fáze dostatečného množství buněk může vyvolat jejich přechod do vyšších velikostních tříd. Autor uzavírá, že takové cytologické studie jsou plně využitelné i pro průkaz radiačních změn na buněčné úrovni v průběhu posttraumatické regenerace.

Pozorované zvýšení četnosti velikosti jader a změny nukleolárního aparátu po ozáření v regenerujících játrech ozářených krys jsme doplnili stanovením peroxidační aktivity hodnocené testem s kyselinou thiobarbiturovou. Oxidačním produktům nenasycených mastných kyselin je přisuzován toxický účinek na buňku a její proliferativní schopnosti (Šimek 1965). Naše experimentální zjištění stanovením přibližně recipročního poměru mezi obsahem TBK pozitivních látek a hladinou DNK v generačním cyklu buňky poukazuje na možné mechanismy chránící buňku v proliferativní fázi před toxickým působením peroxidačních látek. Nepodařilo se prokázat souvislost mezi inhibičním účinkem záření na mitózu, eventuálně syntézu DNK a peroxidaci.

Pozorované snížení hladiny DNK v regenerujících játrech v podmínkách celotělového ozáření je dostatečně známé. Překvapující bylo zvýšení hodnot ribonukleových kyselin. Zjištěné zvětšení jádra a korespondující zvýšený obsah RNK v játerní buňce po celotělovém ozáření mohou poukazovat na přímý kauzální vztah jako na odraz poruchy nukleolárního aparátu, který je závažným regulačním místem regeneračních pochodů buňky či syntézy této nukleové kyseliny (Zícha a kol. 1966).

Literatura

- BERAN M., POSPÍŠIL J., 1967, A Contribution to the Comparative Morphology of Nucleolar Apparatus of Lymphocytes in the Peripheral Blood of Man and Some Mammals. *Pol. Hematol.* 88 : 287-296.
- BURTON K., 1955, The Relation the Synthesis of Deoxyribonucleic Acid and the Synthesis of Protein in the Multiplication of Bacteriophage T 2. *Biochem. J.* 61 : 473-483.

VI. Vliv ionizujícího záření exponovaného v různých intervalech po ČHE na hodnotách jätrech kryš (mg/g jater)

	Před ČHE			Doba po částečné hepatektomii v hodinách		
				16		
	$\bar{X}$	n	P	$\bar{X}$	n	P
Kontrolní skupina	9,2	7	—	6,6	7	0,001
1400 R těsně před ČHE	9,2	7	—	8,0	7	0,001
1400 R 6 hodin po ČHE	9,2	7	—	7,7	8	0,010
1400 R 16 hodin po ČHE	9,2	7	—	—	—	—
1400 R 19 hodin po ČHE	9,2	7	—	—	—	—

$\bar{X}$ — průměrná hodnota

n — počet zvířat ve skupině

P — pravděpodobnost nevýznamnosti

Kontrolní skupina po ČHE hodnocena testem proti kontrolám, ozářené skupiny hodnoceny vždy ve stejných intervalech po ČHE

CERRIOTI G., 1955, Determination of Nucleic Acids in Animal Tissues. J. Biol. Chem. 214 : 59-70.

CHESIN J. E., 1967, Rozmery jader i funkcionalnoje sostojanie kletok. Medicina, Moskva : 95-103.

DIENSTBIER Z., BAKOS K., 1971, Nukleární medicína. AVICENUM — Zdrav. nakladatelství Praha : 60-62.

EULER H., HEVESY G., 1942, Wirkung der Röntgenstrahlen auf den Umsatz der Nucleinsäure im Jense-Sarkom. Kgl. Danske Videnskab. Biol. Med. 17 : 3-38.

GONZALES-GUZMAN J., 1948, Generalities of the Nucleolar content of some blood cells. Blood, 3 Suppl. 2 : 57-65.

FITSCHEN W., COHEN M., 1960, The unmasking by regeneration of latent indication effects in the rat livers. Brit. J. Radiol. 33 : 419-425.

HIGGINS G., ANDERSON R. M., 1931, Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following surgical removal. Arch. Path. 12 : 186-202.

HOWARD A., PELC S. R., 1953, Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. Heredity (Suppl.) 6 : 261-273.

JORDAN S. W., 1964, Electron microscopy of hepatic regeneration. Exp. molec. Path. 3 : 183-200.

KAUFMANN E., TRAUB A., TEITZ Y., 1968, Isolation of different-sized nucleoli from normal and regenerating rat liver. Exp. Cell. Res. 49 : 215-218.

LEHKÝ F., BERAN M., 1968, Vliv ionizujícího záření na morfologii nukleolárního aparátu v jaterních buňkách kryš po ČHE. Sborník vědecký prací Voj. vet. výzkumného ústavu, 5 : 101-107.

LEHKÝ F., HRUŠOVSKÝ J., ZÍCHA B., 1971, Regulační mechanismy regeneračních procesů a některé jejich poruchy. Supplement k číslu 7 Sborníku vědeckých prací Vojenského veterinárního výzkumného ústavu Praha, 226 str.

MIRONESCU S., DRAGOMIR C., 1966, Nucleolar Number variations in Rat Liver Cells after Partial Hepatectomy. Exp. Cell. Res. 43 : 217-220.

MIRONESCU S., DRAGOMIR C., 1967, Nucleolar behavior in regenerating liver of normal and whole-body-irradiated rats. Cancer Res. 27 : 1819-1830.

noty RNK stanovené jako rozdíl totálních nukleových kyselin a DNK v regeneruji-

Doba po částečné hepatektomii v hodinách								
19			24			48		
$\bar{X}$	<i>n</i>	<i>P</i>	$\bar{X}$	<i>n</i>	<i>P</i>	$\bar{X}$	<i>n</i>	<i>P</i>
7,1	6	0,001	5,1	7	0,001	5,4	6	0,000
8,3	7	0,001	18,0	6	0,001	8,8	6	0,001
8,9	8	0,001	9,0	7	0,001	12,7	6	0,001
7,6	8	0,050	8,8	7	0,001	8,6	8	0,001
—	—	—	9,3	7	0,001	9,4	8	0,001

POTMEŠIL M., SMETANA K., WIENEROVÁ E., 1967, Nucleolar coefficient of lymphocytes in the peripheral blood of patients with acute tonsillitis and infection hepatitis. *Fol. Hematol.* 88 : 273-286.

ŘEŘÁBEK J., 1953, Technika výzkumu živočišné buňky. Nakl. ČSAV : 184-187.

SIMEK J., 1965, Přehled změn jaterní tkáně za regenerace po částečné hepatektomii se zaměřením na změny biochemické a regulační vlivy. *Čs. fyziol.* 14 : 436-459.

WEBBER M. M., STICH H. F., 1965, Formation of cell colonies in X-irradiated regenerating livers of rats. *Canad. J. Biochem.* 43 : 817-828.

ZÍCHA B., DIENSTBIER Z., 1965, Regenerující játra jako model radiosenzitivní tkáně se synchronizovaným generačním cyklem. *Čs. fyziologie* 14 : 460-478.

ZÍCHA B., SIMEK J., LEJSEK K., BENEŠ J., POSPÍŠIL M., 1966, Vliv ionizujícího záření na hodnoty nukleových kyselin, bílkovin a mitotickou aktivitu v regenerujících játrech po částečné hepatektomii. *Sborník vědeckých prací LFKU v Hradci Králové*, 9 : 707-712.

Došlo dne 22. 11. 1972

ЛЕГКИ Ф., ЗИХА Б. (Военный ветеринарный научно-исследовательский институт, Прага, Чехословакия). Влияние ионизирующего облучения на некоторые регулировочные механизмы клеточных регенерационных процессов. *Vet. Med. (Praha)* 18 (4) : 229-240, 1973.

В ходе работы изучали некоторые морфологические и биохимические изменения ядерного материала радиочувствительных клеток с синхронизованным генерационным циклом печени крыс, облученных по всему телу ртг-лучами. Получены данные о влиянии ионизирующего облучения на размер ядер, изменения нуклеолярного индекса и коэффициента, реципрокное отношение между уровнем DNK и ТВК положительных веществ в процессе антиоксидационной емкости печеночной клетки и уровнем общей RNK. Изменения изучаемых клеточных структур можно считать отражением повреждений нуклеолярного аппарата, являющегося важным регулировочным местом пролиферационных свойств клетки.

ионизирующее облучение; регенерационные процессы; регулировочные механизмы

LEHKÝ F., ZÍCHA B. (Military Veterinary Research Institute, Praha, Czechoslovakia). The Effect of Ionizing Radiation on Some Regulatory Mechanisms of the Cellular Regeneration Processes. *Vet. Med. (Praha)* 18 (4) : 229-240, 1973.

The paper describes the study of some morphological and biochemical changes of the nuclear material of radiosensitive cells with the synchronized generation cycle of the liver of rats exposed to whole-body X-ray irradiation. Information was ob-

tained concerning the effect of ionizing radiation on the size of nuclei, changes of nuclear index and coefficient, reciprocal relation between the DNA and TBA levels of positive substances in the course of the antioxidation capacity of the liver cell and the total RNA level. The changes in the cellular structures under study can be considered as reflecting disorders in the nucleolar apparatus acting as an important regulatory site for the proliferating properties of the cell.

ionizing radiation; regeneration processes; regulatory mechanisms

LEHKÝ F., ZÍCHA B. (Militär-Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Praha, Tschechoslowakei). *Einfluß ionisierender Strahlung auf einige Regulationsmechanismen von Regenerationsprozessen in Zellen*. Vet. Med. (Praha) 18 (4) : 229-240, 1973.

In der vorliegenden Arbeit wurden einige morphologische und biochemische Veränderungen des Kernmaterials radiosensitiver Zellen mit synchronisiertem Generationszyklus aus der Leber von gesamtkörperlich durch Rtg-Strahlen bestrahlten Ratten verfolgt. Es wurden Erkenntnisse über die Zellkerngröße, die Veränderungen des Nukleolarindex und -koeffizienten, die Reziprozitätsbeziehung zwischen dem Niveau der DNS- und -TBS- (Thiobarbitursäure-) positiven Stoffe im Verlaufe der Antioxydationskapazität der Leberzelle und auf das Niveau der Gesamt-Ribonukleinsäure ermittelt. Die Veränderungen der verfolgten Zellstrukturen sind als Abspiegelung von Störungen des Nukleolarapparats, der eine wichtige Regulationsstelle der Proliferationseigenschaften der Zelle darstellt, anzusehen.

Ionisierende Strahlung; Regenerationsprozesse; Regulationsmechanismen

Adresa autorů:

MVDr. F. L e h k ý, CSc., MVDr. et RNDr. B. Z í c h a, CSč., Vojenský veterinární výzkumný ústav, 150 06 Praha

PROBLEMATIKA NĚKTERÝCH ENZYMATICKÝCH SYSTÉMŮ BIOSYNTÉZY DNA V OZÁŘENÉM ORGANISMU

J. Beneš, B. Zícha

Vojenský veterinární výzkumný ústav, Praha

BENEŠ J., ZÍCHA B. *Problematika některých enzymatických systémů biosyntézy DNA v ozářeném organismu*. Vet. Med. (Praha) 18 (4) : 241-249, 1973.

Na modelu regenerující relativně radiosenzitivní jaterní tkáně krys v podmínkách celotělové expozice supraletální dávkou 1400 R byla sledována aktivita thymidin (TdR) a deoxyuridin (UdR) kinázy v průběhu generačního cyklu jaterní buňky. Při použité expoziční dávce, exponované těsně před parciální hepatektomií (HE), je blokována zvýšená fosforylační schopnost, jakož i zvýšení hladin obou kináz, pozorované mezi 24. až 72. hodinou generačního cyklu u neo-ozářených jater. Podobně jako v případě TdR kinázy, je i hladina UdR kinázy v normální jaterní tkáni minimální na rozdíl od mitoticky aktivních tkání typu tenkého střeva nebo sleziny.

krysa; regenerující jaterní tkáň; ionizující záření; TdR kináza; UdR kináza; DNA

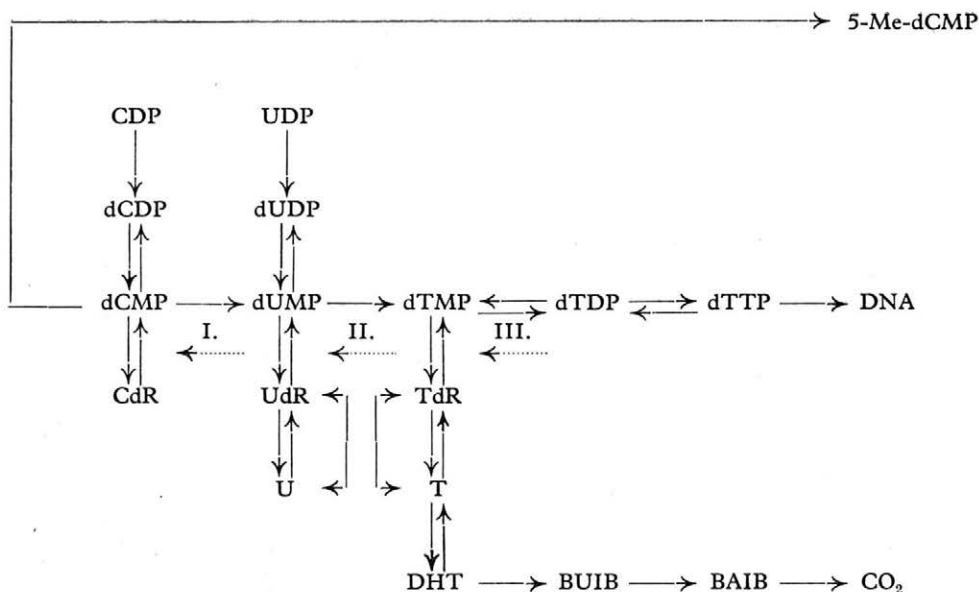
Regulace mechanismu biosyntézy DNA v podmínkách celotělové expozice X-paprsky je problém, v jehož řešení nebylo zdaleka řečeno poslední slovo. Nehledě totiž na kapacitu tkání syntetizovat nukleotidy *de novo*, buňky řady organismů mohou realizovat jejich syntézu z purinových resp. pyrimidinových bází, jakož i nukleosidů. Enzymy participující v tomto procesu (I, II, III na obr. 1) jsou klasifikovány jako součást tzv. „salvage“ systémů. Jejich přítomnost nebo naopak jejich absence zejména v rychle se dělících tkáních typu kostní dřeně, regenerujících jater, nádorových buněk, určuje citlivost nebo rezistenci k inhibici růstu různými purinovými resp. pyrimidinovými analogy.

Tato práce byla zaměřena na otázky významu a funkce thymidin kinázy (TdR kináza) ¹⁾ resp. deoxyuridin kinázy (UdR kináza) v podmínkách celotělové expozice makroorganismu (krysa) X-paprsky na modelu regenerující jaterní tkáně.

TdR kináza participuje v řadě regulačních mechanismů eukaryotických organismů. Jak bylo rovněž dokumentováno v řadě prací (Beneš a Zícha 1972, Fukui 1971), aktivita tohoto enzymu je markantně zvýšená v regenerující jaterní tkáni krys, dále v rapidně rostoucích hepatomech (Bresnick a kol. 1970), v řadě dalších blastomatózních tkání (Bresnick a Thompson 1965), v embryonální tkáni (Bresnick a kol. 1966, Klemperer a Haynes 1968), v reziduální ledvině po kontralaterální nefrektomii (Main a kol. 1962, Mayfield a kol. 1967).

Thymidin kináza, společně s deoxycytidin kinázou (CdR kináza) a deoxyuridin kinázou (III, I, II na obr. 1) jsou řazeny, jak již bylo v úvodu řečeno, k „salvage“ enzymům. Která z těchto nukleosid kináz je tedy skutečně primárně „salvage“

¹⁾ Seznam použitých zkratk je uveden v závěru práce



I. „Salvage“ systémy v syntéze DNA

- I. — CdR kináza
- II. — Udr kináza
- III. — Tdr kináza

enzymem? Zdá se to být CdR kináza. Savci mají signifikantní hodnoty CdR v krvi, v krysí krvi je např. tento deoxynukleosid přítomen v koncentraci 0,04 M. Na druhé straně hodnoty Tdr v krvi jsou velmi nízké a thymin je velmi zřídka využíván. Persistence CdR rezultuje zřejmě z neschopnosti pyrimidinových fosforyláz využít tohoto metabolitu. Většina buněk disponuje konstantně zásobenou CdR, jež může tak fungovat jako praekursor dTTP (ev. dCTP — viz obr. 1) prostřednictvím CdR nebo dCMP deaminázy. CdR, Udr nebo Tdr kináza jsou identifikovatelné pouze ve tkáňích mitoticky aktivních; poměr Tdr/CdR kináza, event. Udr/Tdr kináza je nicméně diferencovaný velmi různě. Maximální aktivita Tdr kinázy ve slezině (Durham a Ives 1969) je dosahována v okamžiku nejvyšší inkorporace ³H-Tdr do DNA. Je možné, že Tdr kináza není primárně „salvage“ enzymem, ale jiné mechanismy dovolují Tdr kináze účastnit se syntézy *de novo* dTTP. Tím není řečeno, že Tdr kináza nereutilizuje Tdr produkovaný degradací DNA uvnitř buňky nebo orgánu (Durham a Ives 1969).

Nejvyšší hodnoty CdR kinázy jsou nalézány v hematopoietických orgánech a derivovaných nádorech z těchto tkání. Možným kritériem podle Durhama a Ivese (1969) je posouzení aktivity kináz na základě tzv. indexu aktivity Tdr, CdR, Udr kinázy: mitotickému indexu. Index aktivity je zřetelně vyšší ve všech lymfoidních tkáních (CdR kináza), ve všech ostatních tkáních mitoticky aktivních (tenké střevo, játra po HE, Walkerův karcinosarkom 256) je index aktivity nízký. Pro CdR kinázu neplatí koincidence mezi proliferací a aktivitou, jako je tomu v případě Tdr kinázy.

Je notoricky známé, že ionizující záření interferuje se syntézou DNA. Bollum a Potter (1959) zjistili, že Tdr kináza a DNA polymeráza mají zvýšenou aktivitu v regenerující jaterní tkáni v intervalu odpovídajícímu zvýšené syntéze DNA. Ionizující záření v expoziční dávce 375, 750 resp. 1500 R 6 a 16 hodin po parciální hepatektomii snižuje aktivitu obou citovaných enzymů (Bollum a kol. 1960). Zatímco deprese v 6. hodině je podmíněna blokem „enzyme forming“ systému, změny v intervalu 16 hodin po expozici jsou podloženy přímým účinkem X-paprsků na Tdr kinázu nebo DNA polymerázu. Ozáření X-paprsky, aplikované krátce před nebo po parciální resekci jater v neozářených regenerujících játrech (Baugnet-Mahieu a kol. 1967). Celotělová expozice aplikovaná do 12 hodin po resekci laloků

rezultuje ve významné inhibici kináz (interval 24 hodiny). Podle Beltze (citace podle Baugnet-Mathieu a kol. 1967) expozice 1500 R 15 až 16 hodin po parciální hepatektomii snižuje aktivitu TdR kinázy na 10 až 15 % hodnot ve srovnání s kontrolními neozařenými hepatektomovanými krysami. Baugnet-Mathieu a kol. (1967) dokázali, že dávka 1000 R (17–18 hodin po HE) nemá účinek na aktivitu enzymu, zatímco 1500 R, exponovaných ve stejném čase, působí signifikantně pokles kinázových hodnot.

Myers (1962) pozoroval, že nesenzitivní enzymy jsou syntetizovány v cytoplasmě a jsou závislé na stabilizovaném messengeru RNA, který není ovlivněn nízkými dávkami X-paprsků. Na druhé straně radiosenzitivní enzymy — jako dCMP deamináza, jež jsou zřejmě syntetizovány v jádře a jsou závislé na produkci nestabilního messengeru RNA, jsou senzitivní k nízkým dávkám X-paprsků. Ačkoliv literatura popisuje existenci jak stabilního, tak nestabilního messengeru RNA, nejsou doposud známy okolnosti jejich relativní radiosenzitivity.

Vzhledem ke kusým informacím o Udr kináze považovali jsme za vhodné prošetřit její hladinu v normální aktivní tkáni mitoticky, jakož i v podmínkách expozice X-paprsky a srovnat ji s TdR kinázou, sledovanou za stejných podmínek.

MATERIÁL A METODY

Pokusy byly dělány na krysách kmene Wistar, samcích, o váze 140–180 g. Zvířata byla krmena peletovanou Larsenovou dietou, vody *ad libitum*, ustájení za standardních podmínek. 24 hodin před vlastním pokusem zvířata hladověla.

Ke srovnávacím pokusům bylo použito zlatých křečků (Velaz), vesměs samců.

Parciální hepatektomie s vytětím 2/3 jaterních laloků byla dělána metodou podle Higgins a Andersona (1931) v lehké éterové narkóze.

Ozařovali jsme celotělovou expoziční dávkou 1400 R, přístroj Makrophos 250, 235 kV, 14 mA, příliv 35 R/min.; po dobu ozařování byly krysy umístěny v polymetakrylátové schránce, zamezující jakýkoliv pohyb.

Zvířata byla usmrcována protětím krčních cév, orgány (játra, slezina, srdce, plíce, varlata, tenké střevo, mozek) byly vyjmuty a ihned ochlazeny a homogenizovány v mediu 0,25 M sacharóza, 0,02 Tris-HCl, pH 7,4, 14 mM MgCl₂ v poměru 1 : 5 ve skleněném homogenizátoru typu Potter-Elvehjem s teflonovým pístem (Kontes Glas Co., USA) resp. v nožovém homogenizátoru typu MSE (Anglie).

Homogenát, neustále uchovávaný v chladu, sloužil jako zdroj enzymu.

Pro vlastní stanovení TdR kinázy v ATP generating systému bylo použito metody popsané v naší dřívější práci (Beneš a Zícha 1972), ke stanovení Udr kinázy byl homogenát v ATP generating systému inkubován v Dubnoff-shakeru.

Složení inkubačního media:

0,1 ml ¹⁴C-Udr (specifická aktivita 44,0 mCi/mM, produkce ÚVVVR Praha; pro vlastní práci byl izotop ředěn na koncentraci 20,0 μCi/ml, z tohoto roztoku bráno 0,2 ml ¹⁴C-Udr + 0,5 ml Udr (Calbiochem. USA) (22,8 mg *ad* 100,0 ml *aqua dest.*) + 0,3 ml *aqua dest.*

0,1 ml Tris-HCl, pH 8,0, 25,0 μM

0,1 ml MgCl₂ + ATP (Biochemica Boehringer, NSR), 2,5 μM + 2,5 μM

0,2 ml surový homogenát sledované tkáně

0,05 ml NaF, 5,0 μM, jako inhibitor degradačně působících fosforyláz

Finální objem inkubované směsi 0,55 ml, délka inkubace 30 minut při 37 °C aerobně, 60 kvů/min.

Enzymatická reakce byla stopována deproteinací varem po dobu 2 minut, do povařeného roztoku přidány nosiče (ATP — Biochemica Boehringer, NSR, UdR — Calbiochem. USA, dUMP — Sigma, USA, vesměs v koncentracích 10,0 mg/ml, přidávaný objem na vzorek 0,05 ml).

Vzorky obohacené směsí nosičů byly centrifugovány na stolní centrifuze typu Media při 3500 rpm po dobu 10 minut. Supernatant byl dekantován a ihned mražen a v tomto stavu uchováván při minus 18 °C.

Supernatanty byly pak dále zpracovávány chromatograficky na tenké vrstvě MN-300 G celulózy (NSR), síla vrstvy 0,05 mm, nanášené množství pro vzorek 20,0 μ l, standardy (ATP, UdR, dUMP) v množství 5,0 μ l, vyvíjení tenké vrstvy prováděno v soustavě etanol-octan amonný, pH 7,5 (75 : 30), doba vyvíjení 2,5 hodiny; chromatogramy byly vyvolány pod UV světlem (Minerallight, USA), skvrny byly posléze vyškrabány a proměřeny na scintilačním přístroji typu Mark I. (Nuclear Chicago, USA) ve scintilačním mediu LDS 31 (Lachema), 10,0 ml na vzorek. Recovery aktivity v daném systému TLC = 75 — 90 %. K verifikaci recovery aktivity byla prováděna paralelně autoradiografie (Medix

I. Stanovení aktivity TdB kinázy v jaterní tkáni krys po partiální hepatektomii a expozici dávkou 1400 R v čase X O

Interval	μ Moly /mg proteinu/ 60°/37 °C $\pm$ S. D.	% fosforylovaného TdR $\pm$ S. D.	p	n
HE 18	216,7 $\pm$ 23,3	3,97 $\pm$ 0,39	—	6
XO HE 18	316,3 $\pm$ 74,1	7,67 $\pm$ 2,17	< 0,020	6
HE 20	217,6 $\pm$ 12,6	4,40 $\pm$ 0,24	—	6
XO HE 20	446,8 $\pm$ 62,8	6,42 $\pm$ 1,27	< 0,010	6
HE 22	299,9 $\pm$ 37,4	5,97 $\pm$ 0,17	—	6
XO HE 22	276,0 $\pm$ 21,7	4,32 $\pm$ 0,45	< 0,200	6
HE 24	592,0 $\pm$ 43,7	13,73 $\pm$ 1,90	—	6
XO HE 24	182,9 $\pm$ 6,3	3,90 $\pm$ 0,17	< 0,001	6
HE 26	1988,5 $\pm$ 72,2	25,90 $\pm$ 0,68	—	6
XO HE 26	156,7 $\pm$ 17,9	4,50 $\pm$ 0,18	< 0,001	6
HE 28	1414,6 $\pm$ 113,8	23,30 $\pm$ 1,70	—	6
XO HE 28	252,3 $\pm$ 10,2	4,00 $\pm$ 0,14	< 0,001	6
HE 30	1872,9 $\pm$ 176,7	33,47 $\pm$ 2,45	—	6
XO HE 30	186,3 $\pm$ 10,3	4,05 $\pm$ 0,14	< 0,001	6
HE 48	804,5 $\pm$ 15,7	13,80 $\pm$ 0,26	—	6
XO HE 48	664,3 $\pm$ 96,4	16,10 $\pm$ 2,07	< 0,020	6
HE 72	1208,0 $\pm$ 187,9	21,00 $\pm$ 1,88	—	6
XO HE 72	1067,8 $\pm$ 39,4	15,15 $\pm$ 1,60	< 0,050	6
Kontrola (hladovka 24 h)	49,05 $\pm$ 2,48	2,03 $\pm$ 0,12	—	12

n — počet použitých zvířat
 $\pm$ S. D. — standardní odchylka
p — pravděpodobnost nevýznamnosti

II. Stanovení aktivity UdR kinázy v jaterní tkáni krys po partiální hepatektomii a expozici dávkou 1400 v čase X O

Interval	μMoly /mg proteinu/ 60'/37 °C $\pm$ S. D.	% fosforylovaného UdR $\pm$ S. D.	<i>p</i>	<i>n</i>
HE 18	174,0 $\pm$ 19,2	5,4 $\pm$ 0,59	—	6
XO HE 18	160,1 $\pm$ 4,1	5,8 $\pm$ 0,13	—	6
HE 20	118,3 $\pm$ 14,8	3,8 $\pm$ 0,54	—	6
XO HE 20	62,7 $\pm$ 4,5	2,1 $\pm$ 0,12	< 0,010	6
HE 22	167,0 $\pm$ 18,4	3,2 $\pm$ 0,72	—	6
XO HE 22	79,5 $\pm$ 6,9	2,4 $\pm$ 0,22	< 0,001	6
HE 24	179,0 $\pm$ 3,8	6,4 $\pm$ 0,14	—	6
XO HE 24	66,8 $\pm$ 1,2	2,3 $\pm$ 0,10	< 0,001	6
HE 26	267,4 $\pm$ 4,6	6,6 $\pm$ 0,17	—	6
XO HE 26	51,9 $\pm$ 9,4	1,1 $\pm$ 0,20	< 0,001	6
HE 28	1145,5 $\pm$ 27,5	30,3 $\pm$ 0,60	—	6
XO HE 28	71,6 $\pm$ 6,4	1,5 $\pm$ 0,15	< 0,001	6
HE 30	439,6 $\pm$ 21,2	11,8 $\pm$ 1,10	—	6
XO HE 30	67,7 $\pm$ 12,5	0,9 $\pm$ 0,14	< 0,001	6
HE 48	1232,5 $\pm$ 16,7	33,3 $\pm$ 1,45	—	6
XO HE 48	370,0 $\pm$ 14,4	12,7 $\pm$ 0,30	< 0,001	6
HE 72	975,5 $\pm$ 9,2	35,9 $\pm$ 1,97	—	6
XO HE 72	341,7 $\pm$ 21,8	8,1 $\pm$ 0,51	< 0,001	6
Kontrola (hladovka 24 h)	180,5 $\pm$ 17,4	6,6 $\pm$ 0,66	—	12

n — počet použitých zvířat

$\pm$ S. D. — standardní odchylka

p — pravděpodobnost nevýznamnosti

Rapid R 2, 18 $\times$ 24 cm Foma, doba expozice 21 den, vyvolání rutinní metodou pro rtg filmy).

Aktivita UdR kinázy, stejně jako TdR kinázy byla vyjadřována v μMolech fosforylovaného UdR resp. TdR/hod./mg proteinu/37 °C, přičemž proteiny byly stanoveny rutinní metodou podle Lowryho a kol. (1951) s Folinovým reagens.

Výsledky byly statisticky hodnoceny *t*-testem podle Studenta.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Těžiště experimentů bylo ve sledování aktivity TdR resp. UdR kinázy v regenerující jaterní tkáni krys v podmínkách celotělové expozice X-paprsky v dávce 1400 R. Expozice byla prováděna těsně před parciálním vytětím jaterních laloků, v čase označeném v našem technickém uspořádání pokusu jako X 0. Dosažené výsledky jsou shrnuty v tab. I a II.

Aktivitu obou kináz jsme sledovali v rozpětí mezi 18. až 72. hodinou po HE, tedy koncem *G*₁ fáze generačního cyklu jaterní buňky, z hlediska použité

expoziční dávky ionizujícího záření představoval pak interval 72 hodiny prakticky praemortální stav (předpokládaná třídní gastrointestinální smrt).

Maximální fosforylační schopnost a nejvyšší hladina TdR kinázy byla zjištěna mezi 24. až 72. hodinou po HE, u Udr kinázy mezi 26. až 72. hodinou. Ionizující záření v expoziční dávce 1400 R snižuje aktivitu jak TdR, tak Udr kinázy, jakož i jejich fosforylační kapacitu v pozorovaných maximech (viz kontrolní hepatektomované krysy), přičemž blok je vesměs statisticky významný (tab. I a II).

Je tedy zřejmé, že ozáření X-paprsky snižuje aktivitu kináz. Nízká dávka (500 R) ji podle Baugnet-Mahieu (1967) snižuje progresivně v souvislosti s časem a zvýšením po HE, 1000 R 24 hod. resp. 96 hod. před HE inhibuje kinázovou aktivitu 24 hod. po HE. Čím větší je interval mezi HE a expozicí X-paprsky, tím je relativně menší inhibice kináz. Je tedy vysvětlením pro tento účinek existence repair systémů v systému uplatňujícím se při syntéze enzymů?

Jsou-li krysy ozářeny těsně před HE nebo v různých intervalech po HE, nemá radioprotektivum AET účinek na hladinu kináz (Baugnet-Mahieu a kol. 1967). U krys ozářených po HE je protektivní účinek AET překryt jeho větší toxicitou.

Naše práce potvrzuje výsledky Baugnet-Mahieu a kol. (1967) v otázce thymidin kinázy, navíc dokumentuje, že obecné závěry citované pro TdR kinázu a její aktivitu se zdají být platné i pro Udr kinázu.

Cabella a Altman (1971) sledovali aktivitu TdR kinázy na synchronizovaném modelu *Chlorelly pyrenoidosa*. Maximum aktivity v generačním cyklu *Chlorelly* je lokalizováno kolem 20. hodiny, tedy po DNA reduplikaci. Jak lze tedy hodnotit kontrolní funkci TdR kinázy v procesu DNA syntézy? Snad především buňky v procesu DNA reduplikace požadují dodatečný dTTP, jehož se jim dostává prostřednictvím preformovaného TdR a činnosti TdR kinázy. Tato interpretace je možná i z toho důvodu, že pod vlivem ozáření ^{60}Co dochází ještě k syntéze DNA (Cabella a Altman 1971), nicméně vzhledem k nedostatku dTTP nedochází k plnohodnotné reduplikaci DNA a není realizovatelné další, konečné buněčné dělení. Za jednu hodinu po expozici 15 až 35 Krad je pozorováno pouze malé snížení aktivity TdR kinázy, pokud je enzym sledován tři hodiny po ozáření, dochází k silnému bloku aktivity. Vysvětlení je možné tím způsobem, že dochází díky zvýšené aktivitě DNAázy po ozáření ke zvýšené nabídce TdR, a dTTP zpětně působí na aktivitu TdR kinázy (Cabella a Altman 1971). Zatím nelze na základě výsledků v normální regenerující jaterní tkáni, resp. z účinků X-paprsků na mitoticky aktivní tkáň, stanovit, je-li určitá analogie platná i pro Udr kinázu.

III. Fyziologické hodnoty TdR kinázy ve tkáních krysy a křečka (vesměs 24 hod. hladovka)

Tkáň		μMoly /mg proteinu/ $60/37^\circ\text{C} \pm \text{S. D.}$	% fosforylovaného TdR $\pm \text{S. D.}$	n
Krysa	játra	$49,05 \pm 2,485$	$2,03 \pm 0,32$	12
	slezina	$41,50 \pm 1,280$	$2,47 \pm 0,44$	6
	plice	$50,30 \pm 2,163$	$1,40 \pm 0,26$	6
	tenké střevo	$249,30 \pm 16,210$	$5,35 \pm 0,57$	6
Křeček	játra	$67,60 \pm 11,780$	$2,90 \pm 0,21$	8
	slezina	$181,50 \pm 11,900$	$6,30 \pm 0,65$	6
	plice	$52,70 \pm 3,460$	$2,30 \pm 0,22$	6
	tenké střevo	$143,00 \pm 2,050$	$4,50 \pm 0,39$	6

n — počet použitých zvířat
 $\pm \text{S. D.}$ — standardní odchylka

IV. Fyziologické hodnoty UdR kinázy ve tkáních krysy a křečka (vesměs 24 hod. hladovka)

Tkáň		μMoly /mg proteinu/ 60'/37 °C $\pm$ S. D.	% fosforylovaného UdR $\pm$ S. D.	n
Krysa	játra	180,5 $\pm$ 17,4	6,6 $\pm$ 0,66	6
	slezina	415,1 $\pm$ 48,7	14,9 $\pm$ 1,60	6
	plice	120,6 $\pm$ 27,5	3,2 $\pm$ 0,72	6
	mozek	115,4 $\pm$ 17,8	2,1 $\pm$ 0,28	6
	tenké střevo	282,9 $\pm$ 20,1	3,8 $\pm$ 0,38	6
	varlata	175,1 $\pm$ 8,1	3,3 $\pm$ 0,14	6
	srdce	129,5 $\pm$ 15,8	3,5 $\pm$ 0,21	6
	ledvina	96,5 $\pm$ 7,0	2,7 $\pm$ 0,13	6
Křeček	játra	114,4 $\pm$ 3,1	2,9 $\pm$ 0,14	6
	slezina	110,9 $\pm$ 3,0	2,6 $\pm$ 0,17	6
	plice	109,7 $\pm$ 8,2	1,9 $\pm$ 0,14	6
	mozek	105,6 $\pm$ 5,1	1,8 $\pm$ 0,12	6
	tenké střevo	168,4 $\pm$ 11,5	2,3 $\pm$ 0,17	6
	srdce	118,7 $\pm$ 9,2	2,9 $\pm$ 0,45	6
	ledviny	110,8 $\pm$ 5,2	2,3 $\pm$ 0,30	6

n — počet použitých zvířat
 $\pm$ S. D. — standardní odchylka

Jak je zřejmé z tab. III a IV, z ostatních sledovaných normálních tkání je nejvyšší aktivita TdR a UdR kinázy, stejně jako fosforylační kapacita, ve slezině a v tenkém střevě, což splňuje předpoklady těchto mitoticky aktivních tkání.

K vytvoření obrazu procesu uplatnění vazby salvage enzymů v procesu biosyntézy DNA bude nutně třeba spektrum rozšířit o hodnoty CdR kinázy za stejných technických podmínek uspořádání pokusu, stanovit pooly substrátů minimálně v játrech (resp. v regenerující jaterní tkáni), optimum by splňovalo paralelní sledování příslušných fosforyláz a tudíž degradace DNA molekuly.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

TdR kináza	— thymidin kináza
UdR kináza	— deoxyuridin kináza
CdR kináza	— deoxycytidin kináza
dTMP, dTDP, dTTP	— deoxythymidin-5'-mono (di, tri) fosfát
dUMP, dUDP, dUTP	— deoxyuridin-5'-mono (di tri) fosfát
dCMP, dCDP, dCTP	— deoxycytidin-5'-mono (di, tri) fosfát
5-Me-dCMP	— 5-metyl-deoxycytidin-monofosfát
U	— uracil
T	— thymin
DHT	— dihydrothymin
BUIB	— kyselina β -ureidomásečná
BAIB	— kyselina β -aminoisomásečná
DNA, RNA	— kyselina deoxyribonukleová, kyselina ribonukleová
ATP	— adenosin-5'-trifosfát
HE	— parciální hepatektomie
TLC	— tenkovrstvá chromatografie

Literatura

- BAUGNET-MAHIEU L., COUTIER R., SEMAL M., 1967, Effect of total body X-irradiation and AET on the activity of thymidine-phosphorylating kinases during liver regeneration. *Radiation Res.* 31 : 808-825.
- BENEŠ J., ZÍCHA B., 1972, Příspěvek k otázce stanovení a významu thymidin kinázy. Sborník vědeckých prací VVVÚ, Praha, v tisku.
- BOLLUM F. J., POTTER V. R., 1960, Nucleic acid metabolism in regenerating rat liver. IV. Soluble enzymes which convert thymidine to thymidine phosphates and DNA. *Cancer Res.* 20 : 561-566.
- BOLLUM F. J., ANDEREGG J. W., MC ELYA A. B., POTTER V. R., 1960, Nucleic acid metabolism in regenerating rat liver. VII. Effect of X-irradiation on enzymes of DNA synthesis. *Cancer Res.* 20 : 138-143.
- BRESNICK E., THOMPSON U. B., 1965, Properties of deoxythymidine kinase partially purified from animal tumors. *J. biol. Chem.* 240 : 3967-3974.
- BRESNICK E., THOMPSON U. B., LYMAN K., 1966, Aggregation of thymidine kinases in dilute solution : properties of aggregated and disaggregated forms. *Arch. Biochem.* 114 : 352-359.
- BRESNICK E., MAINIGI K. D., BUCCINO R., BURLESON S. S., 1970, Studies on deoxythymidine kinase of regenerating rat liver and *Escherichia coli*. *Cancer Res.* 30 : 2502-2506.
- CABELLA E., ALTMAN K., 1971, Bestimmung der Strahlenwirkung auf die Thymidinkinaseaktivität innerhalb eines Zellzyklus synchroner *Chlorella*. *Z. Naturforsch.* 26b : 141-143.
- DURHAM J. P., IVES D. H., 1969, Deoxycytidine kinase. I. Distribution in normal and neoplastic tissues and interrelationships of deoxycytidine and 1 D-arabinofuranosylcytosine phosphorylation. *Mol. Pharmacol.* 5 : 358-375.
- FUKUI N., 1971, Factors regulating thymidine kinase in regenerating liver. *J. Biochem.* Tokyo 69 : 1075-1081.
- HIGGINS G. M., ANDERSON R. M., 1931, Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver in the white rat following partial surgical removal. *A. M. A. Arch. Pathol.* 12 : 186-193.
- KLEMPERER H. G., HAYNES G. R., 1968, Thymidine kinase in rat liver during development. *Biochem. J.* 108 : 541-546.
- LOWRY O. H., ROSENBOUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193 : 265-271.
- MAIN R. K., COLE L. J., WALWICK E. R., 1962, Inhibition of thymidine-DNA polymerase activity in the kidney by X-irradiation before or after uninephrectomy. *Int. J. Radiat. Biol.* 7 : 847-851.
- MAYFIELD E. D., LIEBELT R. A., BRESNICK E., 1967, Activities of enzymes of deoxyribonucleic acid synthesis after unilateral nephrectomy. *Cancer Res.* 27 : 1652-1657.
- MEYERS E. D., 1962, Effects of X-irradiation on enzyme synthesis during liver regeneration. *Can. J. Biochem. Physiol.* 40 : 619-630.

Došlo dne 22. 11. 1972

БЕНЕШ Й., ЗИХА Б. (Военный ветеринарный научно-исследовательский институт, Прага, Чехословакия). Проблематика некоторых энзиматических систем биосинтеза DNA в облученном организме. *Vet. Med. (Praha)* 18 (5) : 241-249, 1973.

На модели регенерируемой, относительно радиочувствительной печеночной ткани крыс, при экспозиции всего тела супралетальной дозе 1400 Р изучали активность тимидина (TdR) и деоксиуридина (UdR) киназы в ходе генерационного цикла печеночной клетки. В условиях данной экспозиционной дозы, внесенной непосредственно перед проведением частичной гепатэктомии (HE), блокируются как повышенная фосфорилиционная способность, так и рост уровней обеих киназ, наблюдаемый между 24—72-м часами генерационного цикла у необлученной печени. Как и в случае TdR киназы, также уровень UdR киназы в нормальной печеночной ткани минимален, в отличие от митотически активных тканей типа тонкой кишки или селезенки.

крысы; регенерирующая печеночная ткань; ионизирующее облучение; TdR киназа; UdR киназа; DNA

BENEŠ J., ZÍCHA B. (Military Veterinary Research Institute, Praha, Czechoslovakia). *The Problems of Some Enzymatic Systems of DNA Biosynthesis in an Irradiated Organism*. Vet. Med. (Praha) 18 (4) : 241-249, 1973.

A model of a regenerating, relatively radiosensitive liver tissue of rats was used to study the activity of thymidine (TdR) and deoxyuridine (UdR) kinases in the course of the generation cycle of the liver cell under the conditions of a whole-body exposure to a supralethal dose of 1400 R. The radiation dose used to which the rats were exposed immediately before partial hepatectomy (HE), blocked the increased phosphorylation ability and increased levels of the two kinases, as observed between the 24th and 72nd hours of the generation cycle of unirradiated liver. Like TdR kinase, the level of UdR kinase is at minimum value in a normal liver tissue, as distinct from mitotically active tissues of the small-intestine or spleen type.

rat; regenerating liver tissue; ionizing radiation; TdR kinase; UdR kinase; DNA

BENEŠ J., ZÍCHA B. (Militär-Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Praha, Tschechoslowakei). *Zur Problematik einiger enzymatischer Systeme der DNS- Biosynthese im bestrahlten Organismus*. Vet. Med. (Praha) 18 (4) : 241-249, 1973.

Auf dem Model eines regenerierenden, relativ radiosensitiven Rattenlebergewebes unter Bedingungen einer gesamtkörperlicher Exposition durch eine supraletale Dosis von 1400 R, wurde die Aktivität der Thymidin (TdR)- und Desoxyuridin (UdR)-Kinase im Verlauf des Generationszyklus der Leberzelle verfolgt. Bei der angewendeten Expositionsdosis, die knapp vor der Durchführung einer partialen Hepatektomie exponiert wurde, ist die erhöhte Phosphorylierungsfähigkeit, ebenso wie die Niveau-erhöhung der beiden Kinasen, wie sie zwischen der 24.-72. Stunde des Generationszyklus an der nichtbestrahlten Leber beobachtet wurde, blockiert. Ähnlich wie bei der TdR-Kinase ist auch das Niveau der UdR-Kinase im normalen Lebergewebe minimal, zum Unterschied von dem mitotisch aktiven Gewebetypen des Dünndarms oder der Milz.

Ratte; regenerierendes Lebergewebe; ionisierende Strahlung; TdR-Kinase; UdR-Kinase; DNS

Adresa autorů:

MVDr. J. Beneš, CSc., MVDr. et RNDr. B. Zícha, CSc., Vojenský veterinární výzkumný ústav, 150 06 Praha

Kompéndium der Geflügelanatomie

E. Schwarze, L. Schröder

VEB G. Fischer Verlag, Jena, 1972. 279 strán, 110 obr. (autotypie, perokresby, mikrofotografie). Druhé, prepracované a rozšírené vydanie.

Publikácia je určená pre poslucháčov veterinárstva a pre odborníkov, ktorí sa zaoberajú hydinou. Kniha je súčasťou 6-dielnej veterinárnej anatomie „Kompéndium der Veterinäranatomie“.

Členením publikácie je systematicko-anatomické a zaoberá sa anatóniou kury, kačice, husy a holuba. Je škoda, že nebol do publikácie pojatý aj moriak, ktorý v novej technológii získava významnejšie postavenie. Text publikácie je štylizovaný tak, že sa u čitateľa predpokladajú základné znalosti anatónie domácich cicavcov.

Osteológia a syndesmológia je rozvedená na 55 stranách, poskytuje dostatočný prehľad o téme, je dobre dokumentovaná obrazmi. V terminologickej časti je tendencia priblížiť nomenklatúru vtákov cicavčej nomenklatúre, často i tam, kde sa nemôže jednať o homologické štruktúry.

Svalový systém je veľmi stručný (21 strán) a dokumentovaný iba dvomi ilustráciami. V terminologickej časti sa robí kompromis používaním dvojitej nomenklatúry. Ako hlavná sa používa terminológia mammalizovaná, často až násilne, v zátvorkách terminológia aviárna. Na ospravedlnenie autorov však treba dodať, že otázka aviárnej terminológie nie je ešte vyriešená.

Anatónii vnútorných orgánov je venovaných 100 strán, téma je spracovaná prehľadne a v rozsahu je dostačujúca pre študenta aj pre odborníka. Stať je dobre ilustrovaná. Pri pohlavných orgánoch je priložená aj schéma vtačieho vajca už tradične nesprávne zobrazená so žltkom v strede bielka. Žltok v každej polohe vajca vypláva na povrch bielka a preto by sa mal zobrazovať excentricky.

Cievky a nervový systém sú podané v rozsahu potrebnom pre experimentálnu manipuláciu s hydinou. Obr. 74 čitateľa trochu dezorientuje tým, že pri absencii aorty vzniká dojem, že je *a. brachiocephalica* hlavnou tepnou vznikajúcou z ľavej komory.

Stručne, ale výstižne sú uvedené aj ostatné systémy (zmyslový, kožný, endokrinný).

Druhé vydanie publikácie je rozšírené o kapitolu pojednávajúcu o zvláštnostiach embryonálneho vývinu vtákov. U kury sú uvedené charakteristiky vývoja podľa jednotlivých dní až do konca.

Celkove je možné publikáciu charakterizovať ako dobrú, jasne štylizovanú, primerane rozsiahlu a dobre dokumentovanú obrázkami. Aj formálna stránka typografická (najmä používanie kurzívy) sprehľadňuje prácu s knihou. Je škoda, že sa neprevzali princípy novej nomenklatúry (N. A. V.) dôslednejšie. Dá sa však očakávať, že i toto druhé vydanie bude pri súčasnom nedostatku anatónií hydiny rozpredané a autori budú mať možnosť ďalšieho zlepšovania publikácie.

Prof. MVDr. P. Popesko, DrSc.

BIOCHEMICKÁ DIAGNOSTIKA AKUTNÍ NEMOCI Z OZÁŘENÍ U PRASAT

B. Zícha, F. Lehký, P. Otoupal, J. Hrušovský

Vojenský veterinární výzkumný ústav, Praha

ZÍCHA B., LEHKÝ F., OTOUPAL P., HRUŠOVSKÝ J. *Biochemická diagnostika akutní nemoci z ozáření u prasat*. Vet. Med. (Praha) 18 (4): 251-258, 1973.

Byl vypracován biochemický indikátor postradiačního poškození, který zachytí zvýšené vylučování metabolitů nukleových kyselin v moči celotělově ozářených prasat v prvních 6 až 12 hodinách po expozici. Podstatou tohoto testu je stanovení deoxycytidinových látek testem s kyselinou thiobarbiturovou po předchozí izolaci metabolitu ionexovou chromatografií. Bylo zjištěno významné zvýšení exkrece deoxycytidinových látek, které je úměrné dávce záření a umožňuje rozdělení ozářených prasat na lehkou, střední a těžkou formu nemoci z ozáření.

akutní nemoc z ozáření; biochemické indikátory; diagnostika; deoxycytidinurie

Ve světovém měřítku jsou intenzivně studovány biologické indikátory, které vyhodnotí postiradiační poškození v celém průběhu nemoci z ozáření. Dosavadní trend proto směřuje spíše k vypracování vhodných testovacích souborů (Dienstbier, Zícha, Buřič 1970, Gerber 1966).

Problematika biochemických indikátorů je značně rozsáhlá. Ionizující záření má výrazný cytostatický a cytotoxický účinek. Dochází k destrukci radiosenzitivních buněk a tím i k zvýšenému odbourávání řady látek, což se projevuje ve zvýšeném vylučování různých katabolitů. Speciální postavení pak mají degradační produkty nukleových kyselin, a to zejména pyrimidinové řady.

Biochemické změny v ozářeném organismu jsou zjistitelné již v prvních hodinách po expozici, tj. již v prodromálním nebo latentním stadiu nemoci z ozáření. Je tedy reálné, že vhodně volený biochemický indikátor umožní rychlé posouzení závažnosti expozice a prognózu zasaženého organismu.

Pařízek, Arient, Dienstbier a Škoda (1958) prokázali zvýšené vylučování deoxycytidinu, úměrné dávce ozáření, u celotělově ozářených krys. Bližší průzkum ukázal na řádově odlišnou exkreci deoxycytidinu u jednotlivých druhů zvířat a člověka, který na rozdíl od krysy vylučuje pouze stopová množství deoxycytidinu. Jednalo se zřejmě o druhově odlišnou látkovou přeměnu deoxycytidinu a bližší průzkum také prokázal řádově odlišnou aktivitu deoxycytidin aminohydrolázy, která byla v prakticky recipročním poměru s exkrecí deoxycytidinu (Zícha, Buřič 1969, Zícha, Gerber, Deroo 1969). Tyto nálezy prokázaly, že deoxycytidin je vhodným indikátorem pouze u těch druhů, které mají nízkou aktivitu deaminujícího enzymu a kde tedy je tento metabolit prakticky finálním degradačním produktem. U prasat je aminohydroláza málo aktivní, a tím lze předpokládat vhodnost deoxycytidinurie jako testu postiradiačního poškození. Předmětem této práce bylo potvrzení tohoto předpokladu a vypracování vhodné analytické metody stanovení a izolace deoxycytidinu v moči ozářených prasat.

MATERIÁLA METODY

POKUSNÁ ZVÍRATA

K pokusům jsme použili 12 prasat (svinek), české bílé ušlechtilé plemeno. Zvířata byla ustájena v běžných podmínkách pro držení prasat a krmena standardním neměnným krmivem (šrot, krmná směs, brambory). Vodu dostávala *ad libitum*, 24 hodin před ozáření nebyla krmena.

Moč byla odebírána při spontánním močení, a to jednak před ozáření a dále v časech 0, 6, 12, 18, 24 a 48 hodin po expozici.

Zvířata byla ozářena celotělovou dávkou (gama paprsky Co^{60}) o expoziční rychlosti 13,5 R/min. Nehomogenita radiačního prostoru byla v toleranci $\pm 10\%$.

CHEMIKÁLIE

Použité chemikálie, pokud není v textu uvedeno jinak, měly vesměs čistotu *pro analysi*.

IZOLACE DEOXYCYTIDINU Z MOČE

Deoxycytidin byl izolován z moče ionexovou chromatografií. Systém sestával ze sloupce Dowex 1 v acetátovém cyklu (kolona Sephadex, průměr 15 mm, výška sloupce 15 cm), který byl spojen s další kolonou obsahující Dowex 50 v amonném cyklu (kolona Sephadex, 15 × 150 mm). Vzorek moče 10 mm byl navrstven na Dowex 1 a po zasáknutí promýván destilovanou vodou. Rychlost eluce 2 ml/min byla řízena peristaltickou pumpou (silikonová kapilára 1,8 × 2 mm, Vývojové dílny ČSAV, Praha). Byly jímány frakce po 5 ml a proměřena absorpce při 260 nm (spektrofotometr CF 4 DB OPTICA, Milano). Přibližně po získání 100 ml vodného eluátu za spektrofotometrické kontroly byl systém rozpojen a kolona Dowex 50 promyta 50 ml 0,5 N hydroxidu amonného. Amonná frakce obsahovala deoxycytidin. Alikvotní část amonného eluátu byla odpařena do sucha na rotační vakuové odparce (získané laskavosti vývojových dílen Ústavu makromolekulární chemie ČSAV, Praha) a doplněna na původní objem 0,005 N kyselinou chlorovodíkovou (pH = 2,3); roztok byl hydrolyzován po dobu 120 min. na vroucí vodní lázni.

KOLORIMETRICKÉ STANOVENÍ DEOXYCYTIDINU TESTEM S KYSELINOU THIOBARBITUROVOU

Potřeby: 0,005 N HCl *p. a.*,
0,025 N kyselina jodistá *p. a.* v 0,125 N H_2SO_4
2% arsenitan sodný *p. a.* v 0,5 N NaCl,
0,7% kyselina thiobarbiturová neutralizovaná 1 N NaOH.

Provedení reakce:

3,5 ml roztoku obsahujícího deoxycytidin, okyseleného na pH 2,3, se hydrolyzuje po dobu 120 minut na vroucí vodní lázni. Po ochlazení se přidá 0,5 ml roztoku kyseliny jodisté. Systém se ponechá po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Přebytek kyseliny jodisté se redukuje přidáním 1,0 ml roztoku arsenitanu sodného. Potom se přidají 2,0 ml kyseliny thiobarbiturové a roztok se zahřívá po dobu 20 minut na vroucí vodní lázni. Vytvořené trimethinové barvivo se po ochlazení proměří spektrofotometricky při 532 nm na standard deoxycytidinu.

STANOVENÍ KREATININU

Obsah kreatininu v moči byl stanoven kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí spektrofotometricky při 532 nm na standard kreatininu.

VÝSLEDKY

STANOVENÍ DEOXYCYTIDINU TESTEM S KYSELINOU THIOBARBITUROVOU

Metody kvantitativního stanovení deoxypyrimidinů jsou založeny buď na stanovení složky pyrimidinové nebo cukerné komponenty deoxyribózy. Pyrimidiny lze relativně jednoduše stanovit spektrofotometricky v UV oblasti, pokud jsou

tyto látky v definovaném stavu. Stanovení v moči by ovšem vyžadovalo předchozí vícenásobnou izolaci, časově náročnou a nepoužitelnou v sériovém měřítu. Navíc není tato metodika citlivější než rychlejší kolorimetrické metody. Srovnali jsme některé metodické postupy kvantitativního stanovení deoxycytidinu, jak jsou uvedeny v tab. I, a zvolili jsme jako nejvýhodnější test s kyselinou thiobarbiturovou, který pro stanovení deoxycytidinu použili Waravdekar a Saslaw (1959). Podstatou stanovení je kvantitativní oxidace volné 2-deoxyribózy kyselinou jodistou a kondenzace vzniklého malonylaldehydu s kyselinou thiobarbiturovou na trimetinové barvivo s charakteristickou absorbcí při 532 nm. Deoxycytidin ovšem nedává přímou reakci a vázanou deoxyribózu je nejprve nutno uvolnit z deoxyribosidu šetrnou hydrolýzou. Prošetřili jsme proto především vliv pH na tuto hydrolýzu, jak je uvedeno v tab. II. Optimální hodnota pH činila 2,3; při ní jsme dále stanovili minimální dobu hydrolýzy, jak je uvedeno na obr. 1. Pro další experiment jsme na základě těchto výsledků zvolili pH 2,3 a dobu hydrolýzy 120 minut, teplota vroucí vodní lázně.

Protože nebyly k dispozici údaje o fyziologických hodnotách deoxycytidinu v moči u prasat, stanovili jsme citlivost této metodiky a její reprodukovatelnost. Při použití 5cm kyvety byla hodnota $E_{532}^{5cm} = 0,040$ pro 1 μg CdR, při 1cm kyvetě $E_{532}^{1cm} = 0,080$ pro 1 μg CdR. Citlivost této metodiky lze dále zvýšit vytřepáním chromogenu do směsi izoamylalkoholu a koncentrované HCl (1 : 1). Svou citlivostí tedy předčí uvedená metoda spektrofotometrii v UV a přibližuje se citlivostí mikrobiologických metodik.

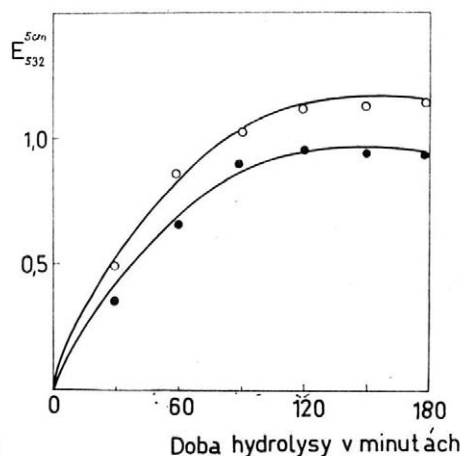
I. Citlivost metodik pro stanovení deoxyribosidů

Reakce	Citlivost 1 mumol	Slepá hodnota	Poznámka
Fotometrické	E_{1cm}	E_{1cm}	
difenylamin (Giles, Myers 1963)	0,014	0,010	předchozí hydrolýza pyrimidindeoxyribosidu
indol. HCl (Ceriotti 1952)	0,010	0,050	deoxycytidin v 0,008 N HCl 100 °C
kyselina thiobarbiturová (Saslaw, Waravdekar 1960)	0,137	0,015	thymidin a deoxyuridin po oxidaci bromem a následné hydrolýze dávají pouze 10% výtěžek ve srovnání s deoxycy- tidinem
Fluorometrické	dvojnásobná hodnota blanku		
kyselina diaminobenzoová (Kissane, Roberts 1958) 6-aminobenzaldehyd (Roberts, Friedkin 1958)			pouze thymidin
Mikrobiologické			
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0,9	0,250	reakce je stejně citlivá vůči všem deoxyribosidům a nevyžaduje hydrolýzu
<i>Lactobacillus Leichmanii</i>	1,8	0,250	reakce je stejně citlivá vůči všem deoxyribosidům a nevyžaduje hydrolýzu

II. Vliv různého pH na hydrolyzu deoxycytidinu

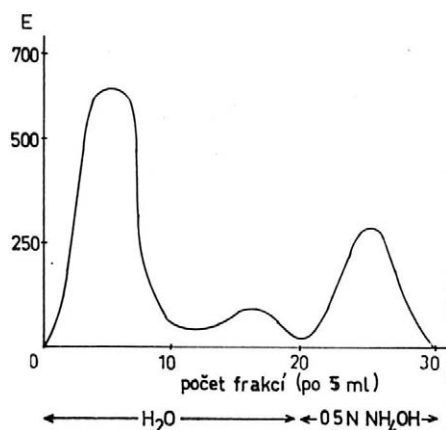
pH	E_{532}^{1cm} TBK chromogenu	
	deoxycytidin	deoxyribóza
1,0	0,230	0,213
1,5	0,642	0,602
2,0	0,930	0,964
2,3	0,945	1,060
2,5	0,940	1,060
3,0	0,920	1,100
3,5	0,673	1,109

Systém obsahující 0,01 μ mol deoxycytidinu nebo deoxyribózy byl hydrolyzován v zředěné HCl o uvedeném různém pH na vroucí vodní lázni po dobu 120 minut



1. Vliv různé doby hydrolyzy v prostředí 0,005 N kyseliny chlorovodíkové na reakci deoxyribózy s kyselinou thiobarbiturovou

○ — deoxyribóza
● — deoxycytidin



2. Eluční diagram UV pozitivních látek v moči vepře, rozdělené ionexovou chromatografií na sloupci Dowex 1 a Dowex 50 (provedení je uvedeno v metodické části)

IZOLACE DEOXYCYTIDINU Z MOČE

Dusíkaté látky vylučované močí představují velmi komplexní směs. Mnohé z nich mohou interferovat při kvantitativním stanovení, a proto také nelze reakci s kyselinou thiobarbiturovou provést přímo v odebrané moči. Prvním předpokladem tedy bylo vypracovat vhodný izolační postup. Na základě dřívějších výsledků při dělení biotransformačních produktů nukleových kyselin a pyrimidinových koenzymů (Beneš, Zícha 1969) jsme použili pro izolaci deoxycytidinu ionexovou chromatografii, jak je uvedeno v metodické části.

Nejprve jsme prošetřili výtěžnost uvedeného izolačního postupu. Deoxycytidin je vlivem přítomné aminové skupiny vázán na Dowex 50 a lze jej eluovat

0,5 N hydroxidem amonným. Na propojené sloupce Dowex 1 a Dowex 50 jsme nanесли 13,7 extinkčních jednotek deoxycytidinu; uvedenou technikou jsme stanovili spektrofotometricky množství deoxycytidinu získaného v čpavkovém eluátu, jak je patrné z následujícího přehledu:

Recovery deoxycytidinu

Systém: Dowex 1 X8 (200-400) acátový cyklus 15×150 mm.

Dowex 50 X8 (200-400) amonný cyklus 15×150 mm.

Na sloupec naněseno 13,7 ext. j.

Získáno 90 ml eluátu o extinkční hodnotě 0,165

$0,165 \times 90 = 14,8$ recovery 102 %.

Za stejných technických podmínek uspořádání pokusu jsme izolovali deoxycytidin z moče. Na spojené sloupce bylo navrstveno 10 ml moče, po zasáknutí eluováno 100 ml vody a po rozpojení sloupců dalšími 50 ml 0,5 N čpavku. Eluční diagram v UV světle (E-260) je uveden na obr. 2. Čpavková frakce vykazovala jeden vrchol, který při chromatografické kontrole nebyl homogenní. Eluát, zpracovaný postupem uvedeným v metodické části, byl pozitivní při testu s kyselinou thiobarbiturovou. Při chromatografické kontrole bylo maximum TBK pozitivních látek v místě se stejnou pohyblivostí jako standardní skvrna deoxycytidinu. Tím byla prokázána vhodnost uvedeného izolačního postupu pro kvantitativní separaci deoxycytidinu z moče.

VLIV IONIZUJÍCÍHO ZÁŘENÍ NA EXKRECI DEOXYCYTIDINU V MOČI CELOTĚLOVĚ OZÁŘENÝCH PRASAT

K pokusu jsme použili sviný o váze kolem 100 kg. Zvířata jsme rozdělili do tří skupin po čtyřech kusech a ozářili dávkami 200, 450 a 700 R. Dávka 200 R vyvolala u ozářených zvířat lehkou formu nemoci z ozáření. Klinicky byla tato forma málo výrazná, po celé sledované období 30 dnů od expozice zvířata přijímala potravu a nebyly pozorovány změny tělesné teploty (měřeno 3× denně). Drobné příznaky hemoragické diatézy, jako krváceniny na kůži břicha a na vnitřní ploše stehen, byly pozorovány až do 22. dne po expozici a vesměs vymizely do 30. dne.

Dávka 450 R vyvolala již střední, a v jednom případě těžkou formu nemoci z ozáření s letálním průběhem. Výrazné klinické změny, typické pro postiradiační akutní syndrom, byly charakterizovány rozvinutou hemoragickou diatézou s progresivní tendencí. Tyto změny klinického stavu jsme pozorovali od 14. dne po expozici.

U skupiny ozářené dávkou 700 R byla vesměs pozorována těžká forma onemocnění s letálním průběhem. Klinický obraz byl obdobný jako po dávce 450 R, ovšem manifestační příznaky byly zjištěny již od 7. dne po expozici.

U jednotlivých skupin ozářených zvířat jsme stanovili hladinu deoxycytidinu v moči v intervalech před ozářením a dále v čase ihned po ozáření a 6, 12, 18, 24 a 48 hodin po expozici. Výsledky uvedené v průměrné hodnotě s příslušnými krajními mezemi a procentuální změnou jsou uvedeny v tab. III. Jednotlivé vzorky moče se lišily podstatně barvou a specifickou váhou, což poukazovalo na odlišnou diurézu. Protože praktické provedení testu předpokládalo jednorázový odběr moči, vyjádřili jsme hodnoty deoxycytidinu na jednotkové množství kreatininu, a tím eliminovali faktor diurézy. Takto získané jednotkové množství deoxycytidinu bylo vyjádřeno jako poměr

$$\frac{\text{CdR v } \mu\text{g} \cdot 100}{\text{kreatinin v mg}}$$

Fyziologické hodnoty exkrece vyjádřené tímto poměrem činí v průměru u 12 prasat 54 (krajní meze 30–67). Po ozáření dávkami 700 a 450 R byla

III. Vliv celotělového ozáření na exkreci deoxycytidinových látek hodnocených testem s kyselinou thiobarbiturovou v moči prasat

Dávka v R	Doba po ozáření	Deoxycytidin v $\mu\text{g} \cdot 100$ kreatinin v mg		Zvýšení v %
		průměr	meze	
200	kontrola	55	30–56	100
	6 hodin	110	44–180	200
	12 hodin	85	55–157	154
	18 hodin	54	21–99	99
	24 hodin	85	21–107	154
	48 hodin	45	15–78	82
450	kontrola	51	42–66	100
	6 hodin	280	207–370	550
	12 hodin	209	159–260	410
	18 hodin	118	76–173	232
	24 hodin	150	80–190	292
	48 hodin	101	41–163	198
700	kontrola	56	48–67	100
	6 hodin	550	260–1270	980
	12 hodin	312	123–790	555
	18 hodin	194	81–507	345
	24 hodin	104	89–110	185
	48 hodin	114	89–147	202

ve všech případech pozorována zvýšená exkrece — krátkodobá s maximem mezi 6. až 12. hodinou po expozici. Po dávce 700 R je zvýšení kolem 6. hodiny cca 10násobné, po dávce 450 R cca třínásobné. Dávka 200 R vyvolala maximální zvýšení dvojnásobné.

DISKUSE

Deoxycytidin aminohydroláza hydrolyticky štěpí deoxycytidin na deoxyuridin, který je dále transformován až na beta-alanin a vylučován močí. Aktivita tohoto enzymu ve vepřových játrech je ve srovnání např. s játry člověka až 600× nižší (Zícha, Buřič 1969) a fyziologická exkrece CdR, zjištěná v této práci, je v recipročním poměru. Deoxycytidin je prakticky finálním degradačním produktem u prasat; tím byla také prokázána vhodnost deoxycytidinurie jako biologického indikátoru postiradiačního poškození.

Pro sériové provedení tohoto testu je důležité, že lze hodnotit jednorázový odběr moče a nepropočítávat exkrece na 24hodinový interval, jak je tomu v humánní klinické diagnostice nebo v experimentální práci na malých laboratorních zvířatech.

I když není přesně znám zdroj zvýšeného množství degradačních produktů nukleových kyselin vylučovaných do moče, předpokládá se, že se jedná nejspíše o degradační produkty mrtvých radiosenzitivních buněk a ne o poruchu vlastní syntézy DNK (Gerber, Remy-Defraigne 1969). Dynamika exkrece vykazuje časné maximum mezi 6. až 12. hodinou, které odpovídá degradaci nejcitlivějších buněk — lymfocytů. Tento nálezy je v korelaci se změnami v periferní krvi a patomorfologickými nálezy v lymfatických uzlinách a slezině. Pozo-

rované druhé nižší maximum by mohlo souviset s nástupem destrukce dalších radiosenzitivních tkání s delší dobou generačního cyklu například buněk epitelální výstelky tenkého střeva.

Vypracovaná metodika izolace a kvantitativního stanovení deoxycytidinových látek je dostatečně citlivá a prakticky proveditelná v normálně zařízené klinicko-biochemické laboratoři. Byla prokázána přibližná uměrnost mezi závažností postiradiačního poškození a zvýšenou exkrecí deoxycytidinu. Speciálně časově značně rozdílný nástup klinických projevů nemoci z ozáření u jednotlivých použitých dávek umožňuje rozdělení zasažených zvířat do tří skupin, vhodných zejména pro třídění jatečných zvířat.

Literatura

- BENEŠ J., ZÍCHA B., 1969, The effect of ionising radiation on the elimination of biotransformation products of pyridine coenzymes in rat urine. *Physiol. Bohemoslov.* 17 : 587-600.
- CERIOTTI G., 1952, A microchemical determination of DNA. *J. biol. Chem.* 198 : 297-299.
- DIENSTBIER Z., ZÍCHA B., BUŘIČ L., 1970, Nukleinsäuremetabolite in strahlenbiologischem Experiment und radiologischer Klinik. In: *Biochemisch nachweisbare Strahlenwirkungen und deren Beziehungen zur Strahlentherapie*, ed. G. B. Gerber, H. A. Lander, L. Rausch, CH. Streffer, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 25-39.
- GERBER G. B., 1971, Studies into mechanism of excess excretion of nucleic acid and nicotin-adenine-dinucleotide (NAD) metabolites after irradiation, In: *Biochemical indicators of radiation injury in man*, Proceeding of a scientific meeting Parisle Vesinet, 22-26 June 1970 jointly organized by IAEA and WHO, International Atomic Energy Agency, Vienna. 79-94.
- GERBER G. B., REMY-DEFRAIGNE J., 1969, Mechanism of deoxycytidinuria in irradiated mice and rats. *Rad. Res.* 40 : 105-111.
- GILES K. W., MYERS A., 1963, An improvement diphenylamine method for estimation of DNA. *Nature* 206 : 93.
- KISSANE J. M., ROBERTS E., 1958, The fluorometric measurement of DNA in animal tissues with special reference to the central nervous system. *J. Biol. Chem.* 233 : 184-188.
- PARÍZEK J., ARIENT M., DIENSTBIER Z., ŠKODA H., 1958, Deoxycytidine in urine as an indicator of changes after irradiation. *Nature* 182 : 721-722.
- ROBERTS D., FRIEDKIN M., 1958, The fluorometric determination of thymine in DNA and derivatives. *J. biol. Chem.* 233 : 483-487.
- SASLAW L. D., WARAVDEKAR V. S., 1960, Differential colometric analysis of some deoxyribosyl compounds. *Arch. Biochem.* 90 : 239-244.
- WARAVDEKAR V. S., SASLAW L. D., 1959, A sensitive colorimetric method for the estimation of 2-deoxy sugars with the use of the malonaldehyd-thiobarbituric acid reaction. *J. biol. Chem.* 234 : 1945-1950.
- ZÍCHA B., BUŘIČ L., 1969, Deoxycytidine and radiation response: Exceedingly high deoxycytidine aminohydrolase activity in human liver. *Science* 163 : 191.
- ZÍCHA B., GERBER G., DEROO J., 1969, Deoxycytidine aminohydrolase. *Experientia* 25 : 1039-1040.

Došlo dne 22. 11. 1972

ЗИХА Б., ЛЕГКИ Ф., ОТОУПАЛ П., ГРУШОВСКИ Й. (Военный ветеринарный научно-исследовательский институт, Прага, Чехословакия). О биохимической диагностике острой лучевой болезни у свиней. *Vet. Med. (Praha)* 18 (5) : 251-258, 1973.

Создан биохимический индикатор постиррадиационного повреждения, улавливающий повышенное выделение метаболитов нуклеиновых кислот в моче облученных по всему телу свиней в течение первых 6-12 час. после экспозиции. Сущностью теста является определение

деоксицитидиновых веществ вместе с тиобарбитуровой кислотой после предшествующей изоляции метаболита с помощью ионитной хроматографии. Установлено значительное повышение экскреции деоксицитидиновых веществ, которое пропорционально дозе облучения и позволяет разделить облученных свиней на легкую, среднюю и тяжелую формы лучевой болезни.

острая лучевая болезнь; биохимические индикаторы; диагностика; деоксицитидинурия

ZÍCHA B., LEHKÝ F., OTOPAL P., HRUŠOVSKÝ J. (Military Veterinary Research Institute, Praha, Czechoslovakia). *On the Biochemical Diagnosis of the Acute Irradiation Disease in Pigs*. Vet. Med. (Praha) 18 (4) : 251-258, 1973.

A biochemical indicator of postirradiation damage was developed; the indicator is capable of capturing increased separation of the metabolites of nucleic acids in the urine of whole-body-irradiated rats in the first 6—12 hours after exposure. The test is based on the determination of deoxycytidine compounds through a thiobarbituric-acid test after preceding isolation of the metabolite by ionex chromatography. The trial revealed significant excretion of deoxycytidine substances proportionate to the radiation dose, allowing for classifying the cases as light, medium and severe forms of irradiation disease.

acute irradiation disease; biochemical indicators; diagnostics; deoxycytidinuria

ZÍCHA B., LEHKÝ F., OTOPAL P., HRUŠOVSKÝ J. (Militär-Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Praha, Tschechoslowakei). *Zur biochemischen Diagnostik der akuten Strahlenkrankheit bei Schweinen*. Vet. Med. (Praha) 18 (4) : 251-258, 1973.

Es wurde biochemischer Indikator zur Bestimmung der Postirradiationsbeschädigungen erarbeitet. Dieser Indikator erfaßt die erhöhte Ausscheidung der Nukleinsäuren-metabolite im Urin der gesamtkörperlich bestrahlten Schweine 6 bis 12 Stunden nach der Exposition. Das Grundsätzliche an diesem Test ist die Bestimmung der Desoxyzytidinstoffe mittels eines Tests mit Thiobarbitursäure nach vorhergehender Isolation des Metabolits durch Ionenaustauschchromatographie. Eine signifikante Exkretionserhöhung der Desoxyzytidinstoffe, die der Bestrahlungsdosis entspricht und die eine Einteilung der bestrahlten Schweine auf die mit leichten, mittleren und schweren Formen der Strahlenkrankheit ermöglicht, konnte verzeichnet werden.

Akute Strahlenkrankheit; biochemische Indikatoren; Diagnostik; Desoxyzytidinurie

Adresa autorů:

MVDr. et RNDr. B. Zícha, CSc., MVDr. F. Lehký, CSc., MVDr. P. Otoupal, doc. MVDr. J. Hrušovský, CSc., Vojenský veterinární výzkumný ústav, 150 06 Praha

HEMATOLOGICKÉ ZMĚNY V PERIFERNÍ KRVÍ PŘI MODELOVÝCH NEKONTAKTNÍCH POPÁLENINÁCH U KRYŠ

J. Janeček, Z. Prouza, J. Moserová, V. Kalousová

Vojenský veterinární výzkumný ústav, Praha

Klinika plastické chirurgie LFHUK, Praha

Biofyzikální ústav UK, Praha

JANEČEK J., PROUZA Z., MOSEROVÁ J., KALOUSOVÁ V. *Hematologické změny v periferní krvi při modelových nekontaktních popáleninách u kryš.* Vet. Med. (Praha) 18 (4) : 259-268, 1973.

Speciální aparaturou byly vytvořeny místní modelové popáleniny u kryš se standardním charakterem. Při 1sec. expozici jde o popáleninu hlubokého 2. stupně na ploše cca 20 cm² (cca 5 % povrchu těla). Při 4sec. expozici, při téže postižené ploše povrchu těla, jde o hluboký 3. stupeň. Intenzita tepelného toku činila cca 20 cal/cm².sec. Byly sledovány kvantitativní a kvalitativní změny v periferní krvi. V červené krevní složce při 4sec. expozici jde — po počátečním lehkém zvýšení — o mírný pokles počtů erytrocytů v celém průběhu pozorování. Byly zachyceny nižší hodnoty leukocytů u obou exponovaných skupin kryš v celém průběhu sledování.

nekontaktní popáleniny; intenzita tepelného toku; periferní krevní obraz

Velkým podnětem pro zintenzivnění dalšího výzkumu popálenin je poznání účinku atomových a zvláště termonukleárních zbraní. Z násobily se nevidaným způsobem počty postižených. Uvádí se, že až 65—85 % všech případů při nukleárním výbuchu jsou termická poškození.

Proto snaha velké řady výzkumných a vědeckých pracovišť ve světě se zaměřuje na řešení otázek týkajících se patofyziologie a terapie termických poškození. Za tímto účelem je však nutné vytvářet na experimentálních zvířatech pokud možno standardní modelové popáleniny a ty pak z příslušných hledisek sledovat.

Naši snahou bylo vytvořit experimentální popáleniny nekontaktním způsobem, který by imitoval do jisté míry podmínky při nukleárním výbuchu, pokud se týče světelného a tepelného záření. Dále jsme se pokusili zachytit odezvu tohoto typu popálení v periferní krvi pokusných kryš. Je to jedno z velmi důležitých kritérií pro posouzení termického účinku na organismus, ať se již zjišťují krevní elementy po stránce kvantitativní či kvalitativní.

Předpokládá se, že především rozsáhlejší a hlubší popáleniny vyvolají určitou odezvu především v periferní krvi. Průvodním jevem je zde popáleninový šok, při jehož vzniku dochází záhy ke zmenšení objemu krve výstupem krevní plazmy z krevního řečiště (Böhler 1955; Tappeiner a Wittels 1959; Eufinger 1962; Arturson 1965).

Ztráta plazmy vede k zahuštění krve — hemokoncentraci, která může dosahovat značného stupně a může mít vážné důsledky hemodynamické (Kljačkin 1963). Význam hemokoncentrace po stránce klinické byl již znám dříve (Underhill a kol. 1923). Ta se pak vyjadřovala obsahem hemoglobinu periferní krve. Nyní se však jeví jako mnohem výhodnější stanovení hodnoty hematokritové (Tappeiner 1955; Hartenbach 1961). Obě hodnoty bývají zvýšené a jsou cenným

měřítkem pro závažnost popálení, ne vždy však musí být tyto vyšší hodnoty znamením špatné prognózy (Quinby a Cope 1952). Dále je možné při hemokoncentraci pozorovat zvýšený počet erytrocytů a leukocytů, jakož i snížený obsah vody krve, A/G kvocientu a celkové bílkoviny krve (Eufinger 1962).

V popálené oblasti však nedochází jen ke ztrátě vody, solí a bílkovin, ale také značnými extravazáty i velkých množství erytrocytů, až k 50 % (Salzberg a Evans 1950; Mc Laughlin a Neis 1952).

Baker a Valeriote (1966) uvádějí, že u popálených krys klesal počet erytrocytů k minimální hodnotě 14. den a pak opět klesl k 21. dni. Ve frekvenci distribuce erytrocytárních objemů nebyly změny.

Jako další příčina, jež se velmi významně podílí na šokovém účinku, je především zánik erytrocytů. Tento jev je závislý na hloubce a rozsahu popálení. Děje se to přímou lyzí tepelnou či změnou buněčné fragility, jež vede k zpomalené hemolýze (Wellers 1958).

Nepopálená část je tedy ochuzena o erytrocyty, což lze často přehlédnout, neboť je to maskováno hemokoncentrací v důsledku velké ztráty plazmy. Ihned po popálení propadá značná část erytrocytů časně hemolýze, která stoupá s rozsahem a trváním tepelného účinku (Hegemann 1955).

Je to především hemolýza, která se podílí nemalou měrou na vzniku anemie. Ta vzniká jednak bezprostředně po poškození, jednak později a trvá i několik týdnů. Lze ji zjistit většinou u případů s hlubokými popáleninami (3. stupeň). V ojedinělých případech překvapivě chybí během akutní fáze fatálních popálenin (Vaňásek a kol. 1962a). Může mít různý stupeň a při jejím vzniku spolupůsobí různé patogenní momenty. Vedle hemolýzy se uvažuje o skrytém ranném krvácení (extravazáty), o narušené utilizaci železa, destrukci erytrocytů, erytrofagocytóze, gastrointestinální absorpci, depresi kostní dřeně (Moore a kol. 1946; Netoušek 1962).

Erytrocyty vykazují po popálení rovněž určité morfologické změny. Jsou popisovány sféro- i mikrosférocyty, jakož i erytrocyty s pseudopodiformními výrůstky, jež se později odlučují jako kulovité či elipsovité útvary. Takovéto fragmentace lze pozorovat nejlépe na čerstvých nátěrech. U těžkých popálenin lze pozorovat v odebrané krvi až 70 % deformovaných erytrocytů (Braasch a Grössling 1966).

Ke změnám v bílé krevní složce je nutné poznamenat, že většina autorů zjistila krátce po popálení silnou leukocytózu (např. Brooks a kol. 1951; Vaňásek a kol. 1966b). Jde především o granulocytózu, resp. neutrofilii s četnými mladými formami. Maxima bývá dosaženo okolo 10. dne, tedy již ve stadiu popáleninové infekce. Shledáváme se tedy s leukocytózou vyjádřenou neutrofilii, aneozinofilii a lymfopenií (Sevitt 1951).

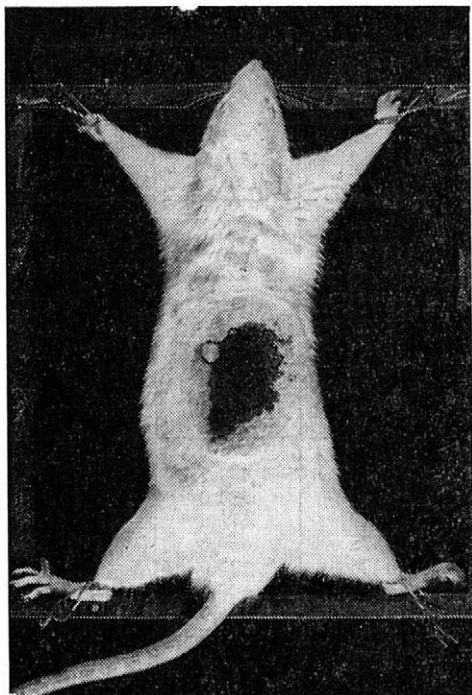
Baker a Valeriote (1966) naproti tomu uvádějí pokles leukocytů u popálených krys 4. den. Jinak 7. den počet vzrostl k 20 % přes kontrolní hodnotu. Pak nastal návrat ke kontrolní hodnotě 10. dne a zůstal tak po dobu trvání pokusu.

I když hodnoty při lehčích popáleninách vykazují velké rozdíly, lze přesto rozpoznat závislost leukocytózy na rozsahu popálení. Při těžkých popáleninách je posun doleva až k myelocytům. Neutrofilie má toxické granulace. Zvýšené vylučování glukokortikoidů vyvolává pokles počtu lymfocytů a eozinofilů. Eozinofily jsou tedy do jisté míry indikátorem zátěže (Doleček a kol. 1960). Zůstávají různě dlouhou dobu na nízkých nebo i na nulových hodnotách, a to i více týdnů. Jejich pozvolný vzestup bývá prognosticky příznivý, přesto však nelze jen ze samých eozinofilů usuzovat na závažnost stavu postiženého. Dlouho trvající aneozinofilie nebo pokles eozinofilů svědčí většinou pro nepříznivý průběh nebo vznik nějaké komplikace. V pozdějších stádiích mohou eozinofily stoupat nad normální hodnoty snad jako výraz alergické reakce na vlastní bílkoviny pozměněné popálením (Sevitt 1951; Allgöwer a Siegrist 1957; Vaňásek a kol. 1966b).

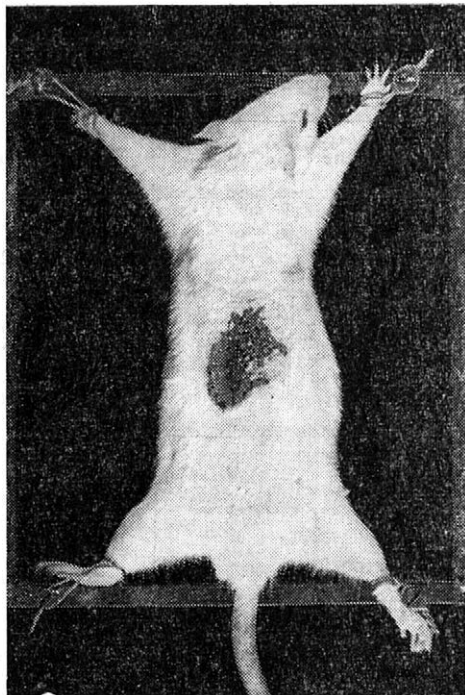
MATERIÁLA METODY

Bylo použito speciálního zařízení (Prouza a kol. 1967) k vyvolání experimentálních nekontaktních popálenin.

Pokusnými zvířaty byly krysy (samci) kmene Wistar, o průměrné váze 200–250 g, krmené standardní dietou.



1. Krysa fixovaná na speciálním kovovém rámečku, popálená 4sec. expozicí



2. Krysa fixovaná na speciálním kovovém rámečku, popálená 1sec. expozicí

Termické poškození bylo zvířatům přivozeno v éterovém obluzení na ostříhanou kůži centrálně v krajině zalopatkové, hřbetní a bederní. Při expozici byla zvířata fixována za končetiny na speciálních kovových rámečcích (obr. 1 a 2).

Expozice se dělaly na ploše 20 cm^2 (cca 5% povrchu těla) 4 sec. a 1 sec., což odpovídalo v prvním případě hlubokému třetímu stupni a v druhém případě hlubokému druhému stupni popálení. Intenzita tepelného toku činila cca $20\text{ cal/cm}^2\text{. sec.}$

Byl sledován celkový počet erytrocytů, retikulocytů a leukocytů, diferenciální rozpočet leukocytů a hematokrit. Vše jsme sledovali obvyklými hematologickými metodami.

Krev se v příslušných intervalech odebírala pipetami z mediálního očního koutku *in vivo* a po dekapitaci zvířat.

Ke statistickému hodnocení bylo použito Studentova *t*-testu.

VÝSLEDKY

V periferní krvi byl sledován:

a) Celkový počet erytrocytů:

U krys po 4sec. expozici začíná po 1 hodině významný vzestup, po 6 hodinách již pokles na hranicích statistické významnosti. Po opětovném vzestupu nastává nevýznamný pokles pod hodnoty kontrol, kde se udržuje po dobu celého pokusu až na vzestup 7. den.

U krys po 1sec. expozici jsou hodnoty v celém průběhu významně zvýšeny proti kontrolám (tab. I).

b) Celkový počet retikulocytů:

U krys po 4sec. expozici stojí za pozornost poněkud významnější vzestup 10. den a významný pokles 21. den.

I. Změny absolutních počtů erytrocytů

Skupina	N	T	$\bar{X}$ $\times 10^3$	SE $\times 10^3$	P
Nepopálené	6	0	5062	194,4	—
1sec. expozice	6	1 d 2 d 4 d 7 d 10 d 14 d 21 d 28 d	5543 6103 6390 6673 5865 6124 7468 6158	331,6 289,1 447,2 316,2 191,0 235,0 128,4 331,7	0,01 0,01 0,01 0,01 0,01 0,01 0,01 0,01
4sec. expozice	6	1 h 6 h 1 d 2 d 4 d 7 d 10 d 14 d 21 d 28 d	5848 5246 5667 4576 4726 6878 4760 4350 4811 4551	447,2 237,0 670,8 469,0 174,9 500,0 196,9 182,5 233,0 87,2	0,01 0,10 0,05 0,60 0,01 0,01 0,01 0,01 0,05 0,01

II. Změny absolutních počtů retikulocytů

Skupina	N	T	$\bar{X}$ $\times 10^3$	SE $\times 10^3$	P
Nepopálené	6	0	227	21,3	—
1sec. expozice	6	1 d 2 d 4 d 7 d 10 d 14 d 21 d 28 d	182 195 158 156 209 248 189 234	14,9 9,1 13,1 11,3 10,0 12,6 10,4 7,2	0,40 0,60 0,05 0,02 0,02 0,02 0,01 0,30
4sec. expozice	6	1 h 6 h 1 d 2 d 4 d 7 d 10 d 14 d 21 d 28 d	245 244 235 227 217 274 267 260 185 239	17,6 22,5 20,3 21,6 20,8 12,9 28,8 26,9 5,7 16,4	0,10 0,20 0,50 0,90 0,50 0,60 0,02 0,40 0,01 0,40

III. Změny absolutních hodnot hematokritu

Skupina	N	T	$\bar{X}$	SE	P
Nepopálené	6	0	49	0,90	—
1sec. expozice	6	1 d	53	1,90	0,01
		2 d	51	1,80	0,02
		4 d	53	0,65	0,01
		7 d	50	1,09	0,05
		10 d	52	1,40	0,01
		14 d	55	0,86	0,01
		21 d	51	2,06	0,05
		28 d	46	1,73	0,01
4sec. expozice	6	1 h	63	2,84	0,01
		6 h	64	1,11	0,01
		1 d	55	2,46	0,01
		2 d	51	2,15	0,05
		4 d	55	0,98	0,01
		7 d	61	1,18	0,01
		10 d	54	0,65	0,01
		14 d	43	1,05	0,01
		21 d	52	1,58	0,01
		28 d	51	2,33	0,05

IV. Změny absolutních počtů leukocytů

Skupina	N	T	$\bar{X}$	SE	P
Nepopálené	6	0	9645	233,8	—
1sec. expozice	6	1 d	8250	1095,4	0,01
		2 d	6800	268,3	0,01
		4 d	6937	500,1	0,01
		7 d	6550	265,9	0,01
		10 d	7233	316,3	0,01
		14 d	7328	400,1	0,01
		21 d	7016	119,0	0,01
		28 d	6909	435,8	0,01
4sec. expozice	6	1 h	6218	346,4	0,01
		6 h	5833	331,6	0,01
		1 d	7016	529,1	0,01
		2 d	6816	288,7	0,01
		4 d	6966	768,1	0,01
		7 d	6200	387,2	0,01
		10 d	7050	714,1	0,01
		14 d	7466	984,7	0,01
		21 d	7683	538,5	0,01
		28 d	8933	871,7	0,05

Skupina	N	T	$\bar{X}$	SE	P
Nepopálené	6	0	2180	244,9	—
1sec. expozice	6	1 d	1471	182,4	0,01
		2 d	1274	149,3	0,01
		4 d	1287	241,9	0,01
		7 d	1414	134,5	0,01
		10 d	1806	228,7	0,01
		14 d	1352	231,7	0,01
		21 d	1265	199,7	0,01
		28 d	1168	167,3	0,01
4sec. expozice	6	1 h	1779	192,6	0,01
		6 h	2039	245,1	0,20
		1 d	2764	204,7	0,01
		2 d	1977	331,4	0,20
		4 d	2277	360,0	0,60
		7 d	1511	360,0	0,01
		10 d	1551	346,5	0,01
		14 d	1315	187,0	0,01
		21 d	1219	126,4	0,01
		28 d	1866	194,4	0,01

U krys po 1sec. expozici je zaznamenán 4. a 7. den poněkud významnější pokles. 10. a 14. den lze spatřit vzestup s hodnotami významnými, aby 21. den byl významný pokles, téměř totožný se skupinou krys po 4sec. expozici (tab. II).

c) Hematokrit:

U krys po 4sec. expozici byly zejména v raném stadiu hodnoty zvýšené, aby pak nastal určitý pokles, který se ovšem vyjma 14. den udržuje stále nad úroveň kontrol.

U krys po 1sec. expozici jsou rozdíly od 1. dne pozorování proti kontrolám menší než u předešlé skupiny. Opět se zde projevuje tendence vyšších hodnot, s výjimkou 28. dne (tab. III).

d) Celkový počet leukocytů:

U obou skupin krys se hodnoty pohybují v celém průběhu na statisticky významně nižších hodnotách proti kontrolám (tab. IV).

e) Celkový počet neutrofilních granulocytů:

U obou skupin krys se pohybují hodnoty v celém průběhu na statisticky významně nižších hodnotách. Jen u skupiny s 4sec. expozicí jsou 2. a 4. den hodnoty v pásmu kontrol. 1. den jsou však statisticky významně zvýšené (tab. V):

f) Celkový počet eozinofilních granulocytů:

U krys po 4sec. expozici jde 1. a 7. den o významně nižší hodnoty, 10. den mírně nižší.

U krys po 1sec. expozici jsou to naopak 1., 4., 14. a 21. den hodnoty vesměs významně vyšší (tab. VI).

g) Celkový počet lymfocytů:

Hodnoty u obou skupin se pohybují na významně nižší úrovni, přičemž je možné pozorovat od 7. dne mírně stoupající trend, aby pak ve skupině po 4sec. expozici byla hodnota 28. den blízká hodnotám kontrolním (tab. VII).

VI. Změny absolutních počtů eozinofilních granulocytů

Skupina	N	T	$\bar{X}$	SE	P
Nepopálené	6	0	181	40,7	—
1sec. expozice	6	1 d 2 d 4 d 7 d 10 d 14 d 21 d 28 d	494 144 314 186 164 317 248 195	114,9 25,7 79,4 30,4 61,6 73,2 38,5 29,3	0,01 0,05 0,01 0,80 0,50 0,01 0,01 0,40
4sec. expozice	6	1 h 6 h 1 d 2 d 4 d 7 d 10 d 14 d 21 d 28 d	218 176 94 175 168 69 138 177 149 161	57,4 33,1 24,2 12,2 84,9 13,1 38,8 94,3 40,3 29,2	0,10 0,80 0,01 0,70 0,70 0,01 0,05 0,90 0,20 0,30

VII. Změny absolutních počtů lymfocytů

Skupina	N	T	$\bar{X}$	SE	P
Nepopálené	6	0	7222	275,9	—
1sec. expozice	6	1 d 2 d 4 d 7 d 10 d 14 d 21 d 28 d	6144 5351 5213 5071 5195 5548 5475 6045	793,6 261,2 139,0 244,3 243,1 286,9 289,0 469,1	0,01 0,01 0,01 0,01 0,01 0,01 0,01 0,01
4sec. expozice	6	1 h 6 h 1 d 2 d 4 d 7 d 10 d 14 d 21 d 28 d	3992 3542 4106 4587 4490 4597 5321 5759 6089 6988	205,9 263,0 142,6 165,2 655,8 110,4 388,0 943,1 547,2 888,3	0,01 0,01 0,01 0,01 0,01 0,01 0,01 0,01 0,01 0,50

a) Změny počtů erytrocytů a hodnot hematokritu:

V našich pokusech nacházíme hodnoty u obou skupin popálených krys (4sec. a 1sec. expozice) lehce zvýšené do 1. dne, což by mohlo nasvědčovat náznaku hemokoncentrace, která v plném rozsahu s těmito projevy může být u rozsáhlejších popálenin (Stucke 1954; Eufinger 1962). Ovšem v dalším průběhu se shledáváme s poklesem počtu erytrocytů u skupiny krys po 4sec. expozici (závažnější popálenina co do stupně), jenž až na výjimku 7. den trvá v průběhu celé pozorovací doby. To do jisté míry odpovídá poznatkům, které učinil Stucke (1954) u popálených psů, tj. náznak velmi mírné anemie a nerovnováhy mezi zráním a ztrátou erytrocytů (Baker a Valeriotte 1966). U skupiny krys po 1sec. expozici jsou hodnoty v celém dalším průběhu po ranných intervalech zvýšení. Vysvětlení spočívá pravděpodobně spíše v mírném povzbuzení erytropoezy. Nálezům i do jisté míry odpovídají zjišťované počty retikulocytů.

S morfologickými změnami erytrocytů, popisovanými některými autory, jsme se podle očekávání naprosto nesetkali.

b) Změny počtů leukocytů:

V literatuře se krátce po popálení uvádí silný vzestup počtu leukocytů, což má být reakce na popálení, s maximem 10. dne, což odpovídá reakci na infekci (Brooks a kol. 1951; Stucke 1954; Vaňásek a kol. 1966a). Baker a Valeriotte (1966) naproti tomu uvádějí pokles 4. dne; jinak hodnoty téměř odpovídají kontrolám.

V našich pokusech se v celkovém průběhu u obou skupin popálených krys na rozdíl od uváděných nálezů jeví počty na značně nižších hodnotách, které se navzájem lišily jen v raném stadiu a ke konci sledování. Do 7. dne byl zaznamenán pokles, potom poznenáhle vzestup hodnot. Ve vztahu ke kontrolám jde o výraznou leukopenii.

Pokud se týče jednotlivých složek bílého krevního obrazu, odpovídají změny v počtech lymfocytů svým průběhem změnám počtů leukocytů, což je u krys s ohledem na značný resp. převažující podíl lymfocytů v celkovém počtu leukocytů obvyklé. Je tedy námi nalezená leukopenie v podstatě především lymfopenií.

Reakci organismu na popálení (ranný vzestup) a reakci na eventuální infekci 7. až 10. den. (Baker a Valeriotte 1966; Vaňásek 1966) by spíše odpovídal v našich pokusech průběh změn počtu neutrofilních granulocytů, u nichž u krys po 4sec. expozici je zaznamenán počáteční zřetelný vzestup s vyrovnáním 2. a 4. den a pak pokles. Druhý vzestup 7. až 10. den je zaznamenán již méně zřetelně. U skupiny krys po 1sec. expozici se hodnoty neustále v celém průběhu pohybují pod úrovní kontrol, avšak i zde mezi 7. až 10. dnem je zaznamenán vzestup.

Oprávněně jsme nepočítali s nálezy toxických granulací v neutrofilních granulocytech.

Pokud se týká eozinofilů jakožto indikátoru zátěže (Doleček a kol. 1960), což je možné využít i k prognostickým účelům, nalézáme u krys po 4sec. expozici nižší hodnoty v podstatě jen 1. a 7. den.

Souhrnem lze říci, že hematologické změny v periferní krvi, a to zejména červený krevní obraz, mají své významné opodstatnění při hodnocení závažnosti popálení, při prognostických aspektech a také při eventuálních terapeutických zásazích.

Při námi voleném rozsahu nekontaktního experimentálního popálení u krysu jsme neočekávali výrazné změny, nicméně některé nálezy potvrzují, že i popálenina spíše místního charakteru může mít do jisté míry celkovou odezvu, v daném případě postižitelnou v některých hematologických nálezech.

Literatura

- ALLGÖWER M., SIEGRIST J., 1957, Verbrennungen — Pathophysiologie, Pathologie, Klinik, Therapie. Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer Verlag.
- ARTURSON G., 1965, Pathophysiology of acute plasma loss in burns. Proc. 10th Congr. Int. Soc. Blood Transf. Stockholm 1964.
- BAKER D. G., VALERIOTE F. A., 1966, Effect of thermal burn and x — irradiation on yearly mortality. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 121 : 1275.
- BÖHLER J., 1955, Die allgemeine und örtliche Behandlung schwerer Verbrennungen. Langenbecks Arch. klin. Chir. 282:116.
- BRAASCH D., GÖSSLING G., 1966 Erythrocytendeformierung und Quellung durch Plasmafaktoren nach schweren Verbrennungen. 289 : 1.
- BROOKS J. W., ROBINETT P. W., LARGEN T. L., EVANS E. I., 1951, A standard contact burn. Surg. Gynec. Obstetr. 93 : 543.
- DOLEČEK R., KALINA J., KLABUSSAY L., ŠTĚPÁNEK P., 1960, Reakce organismu po popálení a jeho léčba. Praha, SZdN.
- EUFINGER H., 1962, Shock und Kolaps. Langenbecks Arch. klin. Chir. 301 : 96.
- HARTENBACH W., 1961, Hormon-, Eiweiß- und Elektrolythaushalt bei schwersten Verbrennungen. Langenbecks Arch. klin. Chir. 297 : 49.
- HEGEMANN G., 1955, Die Behandlung der Verbrennungskrankheit. Langenbecks Arch. klin. Chir. 282 : 80.
- KLJACKIN L. M., 1963, Ožogovaja bolezn'. Leningrad, VMOLA.
- MCLAUGHLIN C. W., NEIS D. K., 1952, Recent advances in the management of burns. Am. J. Surg. 83 : 746.
- MOORE F. D., PEACKOCK W. C., BLAKELY E., COPE O., 1946, Anemia of thermal burns. Ann. Surg. 124 : 811.
- NETOUŠEK M., 1962, Klinická hematologie. Praha, SZdN.
- PROUZA Z., JANEČEK J., KALOUSOVÁ V., 1967, Zařízení k vyvolání experimentálních popálenin světelným a tepelným zářením. Sbor. věd. prací VVVÚ 3 : 160.
- QUINBY W. C., COPE C., 1952, Blood viscosity and the whole blood therapy of burns. Surgery, 32 : 316.
- SALZBERG A. M., EVANS E. I., 1950, Blood volumes in normal and burned dogs. A comparative study with radioactive phosphorus tagged red cells and T-1824 dye. Ann. Surg. 132 : 746.
- SEVITT S., 1951, Leucocyte changes in burns. Lancet 1 : 390.
- STUCKE K., 1954, Zum Pankreasfermentbehandlung schwerer Verbrennungen. Chirurg. 25 : 289.
- TAPPEINER J., WITTELS W., 1959, Pathophysiologische Grundlagen der modernen Verbrennungstherapie und ihre Ergebnisse. Wien. klin. Wschr. 71 : 942.
- UNDERHILL F. P., CARRINGTON G. L., KAPSINOW R., PACK G. T., 1923, Blood concentration changes in extensive superficial burns, their significance for systemic treatment. Archs intern. Med. 32 : 31.
- VAŇASEK J., MAZÁK J., MATĚJA F., 1966a, Příspěvek ke studiu erytrokinetiky, hemokoagulace a imunoelktroforetických změn při popáleninové nemoci a kombinovaném poškození ionizujícím zářením. Závěr. zpráva, VLVDÚ Hradec Králové.
- VAŇASEK J., MATĚJA F., MAZÁK J., 1962b, Popáleninová nemoc. Inf. zprav. OIS, 46.
- WELLERS S., 1958, Behandlung von schweren Verbrennungen. Münch. med. Wschr. 100 : 317.

Došlo dne 22. 11. 1972

ЯНЕЧЕК Й., ПРОУЗА З., МОЗЕРОВА Й. КАЛОУСОВА В. (Военный ветеринарный научно-исследовательский институт, Прага, Клиника пластической хирургии LFNUK, Прага, Чехословакия). Гематологические изменения периферийной крови при модельных неконтактных ожогах у крыс. Vet. Med. (Praha) 18 (4) : 259-268, 1973.

С помощью специальной аппаратуры были созданы местные модельные ожоги у крыс стандартного характера. При экспозиции 1 сек. образуются глубокие ожоги II степени на площади около 20 см² (около 5 % поверхности тела). При экспозиции 4 сек. на той же поврежденной площади тела образуется глубокая III степень. Интенсивность теплового потока составила около 20 кал/см². сек. Обнаружены качественные и количественные изменения периферийной крови. В красном компоненте крови при экспозиции 4 сек. после начального легкого повышения количество эритроцитов слабо понижается в течение всего хода наблюдений. Установлены малые значения лейкоцитов в обеих экспонированных группах крыс в течение всех наблюдений.

неконтактные ожоги; интенсивность теплового потока; картина периферийной крови

JANEČEK J., PROUZA Z., MOSEROVÁ J., KALOUSOVÁ V. (Military Veterinary Research Institute, Prague, Clinic of Plastic Surgery of the Medical Faculty of Hygiene of Charles University, Praha, Czechoslovakia). *Hematological Changes in Peripheral Blood in Model Non-Contact Burns in Rats*. Vet. Med. (Praha) 18 (4) : 259-268, 1973.

A special apparatus was employed to form model burns in standard-character rats. A one-second exposure causes burns of the deep 2nd degree in the area of about 20 cm² (about 5 % of body surface). A 4-second exposure burns the same body area, yet the burns are of the deep 3rd degree. The intensity of the heat flow was ca. 20 cal/cm².sec. Quantitative and qualitative changes in peripheral blood were followed up. As a result of the 4-second exposure, the red blood component shows — after initial small increase — a slight reduction of erythrocyte count throughout the study. Lower leucocyte values were observed in both exposed rat groups throughout the duration of the study.

non-contact burns; intensity of the heat flow; peripheral blood picture

JANEČEK J., PROUZA Z., MOSEROVÁ J., KALOUSOVÁ V. (Militär-Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Praha; Klinik für plastische Chirurgie der Medizinischen Fak. der Karls-Universität, Praha, Tschechoslowakei). *Hämatologische Veränderungen im peripheren Blut bei nichtkontakten Modellverbrennungen bei Ratten*. Vet. Med. (Praha) 18 (4) : 259-268, 1973.

Mittels einer speziellen Apparatur wurden bei Ratten örtliche Modellverbrennungen mit Standardcharakter hervorgerufen. Bei einer 1 Sek.-Exposition wurde eine Brandwunde tiefen 2. Grades auf der Fläche von etwa 20 cm² (ca 5 % der Körperoberfläche) verursacht. Bei einer 4 Sek.-Exposition mit derselben Größe der betroffenen Körperfläche, handelt es sich um einen tiefen 3. Grad. Die Intensität der Wärmestroms betrug ca 20 cal/cm²/sec. Man verfolgte die quantitativen und qualitativen Veränderungen im peripheren Blut. In der roten Blutkomponente erfolgte nach der 4 Sek.-Exposition nach einer anfänglichen leichten Zunahme eine mäßige Abnahme der Erythrozytenanzahl im ganzen Verlaufe der Beobachtung. Es wurden niedrige Leukozytenwerte bei beiden der Exposition unterworfenen Rattengruppen im ganzen Verlaufe der Beobachtungen erfaßt.

Nichtkontakte Verbrennungen; Intensität des Wärmestroms; peripheres Blutbild

Adresy autorů:

MVDr. J. Janeček, CSc., RNDr. V. Kalousová, Vojenský veterinární výzkumný ústav, 150 06 Praha, ing. Z. Prouza, Biofyzikální ústav UK, 120 00 Praha, MUDr. J. Moserová, Klinika plastické chirurgie LFH UK, 100 00, Praha

Hrušovský J.: Vliv radiomimetik na vylučování pyrimidinových deoxyribosidů N-metylnikotinamidu a N-metyl-3-karboxamid-4-pyridonu v moči krys	205
Havlíček F., Hrušovský J.: Užití sorbentů přírodního původu k léčbě vnitřní kontaminace radiocesiumem u prasat	213
Havlíček F., Hrušovský J.: Vliv některých faktorů na účinnost ferrokyanidů užitých k odstraňování radiocesiumu z organismu	219
Lehký F., Zícha B.: Vliv ionizujícího záření na některé regulační mechanismy buněčných regeneračních procesů	229
Beneš J., Zícha B.: Problematika některých enzymatických systémů biosyntézy DNA v ozářeném organismu	241
Zícha B., Lehký F., Otoupal P., Hrušovský J.: Biochemická diagnostika akutní nemoci z ozáření u prasat	251
Janeček J., Prouza Z., Moserová J., Kalousová V.: Hematologické změny v periferní krvi při modelových nekontaktních popáleninách u krys	259
RECENZE	
Popesko P.: E. Schwarze, L. Schröder — Kompendium der Geflügelanatomie	250

СОДЕРЖАНИЕ

Грушовски Й.: Влияние радиомиметики на выделение пиримидиновых дезоксирибозидов N-метилникотинамида и N-метил-3-карбоксамида-4-пиридола в моче крыс	211
Гавличек Ф., Грушовски Й.: Использование сорбентов естественного происхождения для лечения внутренней контаминации свиней радиоцезием	217
Гавличек Ф., Грушовски Й.: Влияние некоторых факторов на действие ферроцианидов, используемых для удаления радиоцезия из организма	227
Легки Ф., Зиха Б.: Влияние ионизирующего облучения на некоторые регуляторные механизмы клеточных регенерационных процессов	239
Бенеш И., Зиха Б.: Problematika некоторых энзиматических систем биосинтеза DNA в облученном организме	248
Зиха Б., Легки Ф., Отоупал П., Грушовски Й.: О биохимической диагностике острой лучевой болезни у свиней	257
Янечек Й., Проуза З., Мосерова Й., Калоусова В.: Гематологические изменения периферийной крови при модельных неконтактных ожогах у крыс	268

CONTENTS

Hrušovský J.: The Effect of Radiomimetics of the Excretion of Pyrimidine Deoxyribosides of N-methylnicotinamide and N-methyl-3-carboxamid-4-pyridone in Rat urine	211
Havlíček F., Hrušovský J.: The Use of Sorbents of Natural Origin for the Internal Radioesium Contamination Treatment in Pigs	217
Havlíček F., Hrušovský J.: The Effect of Some Factors on the Effectivity of Cyanoferrates Used for the Removal of Radioesium from the Organism	227
Lehký F., Zícha B.: The Effect of Ionizing Radiation on Some Regulatory Mechanisms of the Cellular Regeneration Processes	239
Beneš J., Zícha B.: The Problems of Some Enzymatic Systems of DNA Biosynthesis in an Irradiated Organism	249
Zícha B., Lehký F., Otoupal P., Hrušovský J.: On the Biochemical of the Acute Irradiation Disease in Pigs	258
Janeček J., Prouza Z., Moserová J., Kalousová V.: Hematological Changes in Peripheral Blood in Model Non-Contact Burns in Rats	268

INHALT

Hrušovský J.: Einfluß von Radiomimetika auf die Ausscheidung von Pyrimidin Desoxyribosiden des N-Methyl-nicotinamids und N-Methyl-3-carboxamid-4-pyridons im Urin von Ratten	212
Havlíček F., Hrušovský J.: Anwendung von Sorbenten natürlicher Herkunft zur Therapie der Innenkontamination von Radiozäsium bei Schweinen	218

Havlíček F., Hrušovský J.: Einfluß einiger Faktoren auf die Wirksamkeit von Zyanoferraten, die zur Elimination von Radiozäsium aus dem Organismus angewandt wird	228
Lehký F., Zícha B.: Einfluß ionisierender Strahlung auf einige Regulationsmechanismen von Regenerationsprozessen in Zellen	240
Beneš J., Zícha B.: Zur Problematik einiger enzymatischer Systeme der DNS- Biosynthese im bestrahlten Organismus	249
Zícha B., Lehký F., Otoupal P., Hrušovský J.: Zur biochemischen Diagnostik der akuten Strahlenkrankheit bei Schweinen	258
Janeček J., Prouza Z., Moserová J., Kalousová V.: Hämatologische Veränderung im peripheren Blut bei nichtkontakten Modellverbrennungen bei Ratten	268

TABLE DES MATIÈRES

Hrušovský J.: Influence des radiomimétiques sur la sécrétion des désoxyribosides pyridiques du N-méthylnicotinamide et de la N-méthyl-3-carboxamide -4-pyridone dans l'urine des rats (res. An/211, Al/212)	
Havlíček F., Hrušovský J.: Utilisation des sorbants d'origine naturelle au traitement de la contamination des porcs, due au césium radie-actif (res. An/217, Al/218)	
Havlíček F., Hrušovský J.: Influence de certains facteurs sur l'efficacité des ferrocyanures utilisés à l'élimination du césium radia-actif de l'organisme (res An/227, Al/228)	
Lehký F., Zícha B.: Influence de la radiation ionisante sur certains mécanismes de régulation des processus cellulaires régénérateurs (res. An/239, Al/240)	
Beneš J., Zícha B.: Problèmes de certains systèmes enzymatiques de la biosynthèse de DNA dans l'organisme irradié (res An, Al/249)	
Zícha B., Lehký F., Otoupal P., Hrušovský J.: Diagnostic biochimique de la maladie aiguë des porcs, due à l'irradiation (res. An, Al/258)	
Janeček J., Prouza Z., Moserová J., Kalousová V.: Modifications hématologiques dans le sang périphérique lors des brûlures modèles des rats, produites sans contact (res. An, Al/268)	