ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS OBJEVU K DIPLOMU ČÍS. 2

Přihlášeno 24 01 58 (PO 37-57)

Zveřejněno 13 09 58 (Nature, 1958, sv. 182 : 721)
08 08 58 (II. konference OSN o mírovém využití atomové energie v Ženevě)
30 09 58 (Mezinárodní biochemický kongres, Vídeň)

Uděleno 25 04 61

Vydáno 15 10 78

MDT 612.014.481

Autoři objevu: MUDr. JIŘÍ PAŘÍZEK, CSc., MUDr. MILOSLAV ARIENT, MUDr. ZDENĚK DIENSTBIER, CSc., a inž. JAN ŠKODA, CSc., všichni PRAHA

Název objevu: **Zvýšené vylučování sloučenin, obsahujících desoxyribosu, močí u krys po ozáření**

Předmět objevu: Zvýšené vylučování sloučenin obsahujících desoxyribosu, zejména desoxycytidinu, tj. látek, poskytujících positivní Dischego reakci, močí krys, ozářených ionizačním zářením v závislosti na dávce tohoto záření

Objev se týká vylučování látek, obsahujících desoxyribosu, močí po ozáření jako experimentálního podkladu pro detekci změn, vyvolaných v savčím organismu po ozáření X — nebo gama paprsky.

Detekce změn, vyvolaných v živém organismu ionisačním zářením in vivo a stanovení stupně jejich závažnosti se opírá v přítomné době především o vyšetření hematologická, postihující až poměrně rozvinutá stadia choroby z ozáření. Některé výzkumné práce se zabývaly zvýšeným vylučováním některých látek močí (např. aminokyselin, kyseliny močové, sloučenin síry apod.).

Pro diagnostické účely se jeví sledování vylučování všech těchto látek jako nevhodné, protože popisované změny jsou vysoce nespecifické a lze je vyvolat i jinými typy podnětu než ionisačním zářením. Intensivní výzkum účinku ionisačního záření na živé organismy zvláště v posledních letech ukázal, že ozáření organismů X a gama paprsky porušuje výrazně metabolismus desoxyribonukleových kyselin (DNK), a to jak ve smyslu zvýšeného rozpadu, tak i ve smyslu jejich porušené syntézy. Změny vyvolané takto v metabolismu DNK jsou poměrně vysoce specifické a jsou provázeny změnami v obsahu DNK a hromaděním jejich nižších štěpů ve tkáních.

Položili jsme si proto otázku, zda takto zjištěné poruchy v metabolismu DNK nevedou ke zvýšenému vylučování intermediárních metabolitů DNK močí ozářených zvířat a zda by této skutečnosti nebylo možno využít k detekci a kvantitativnímu odhadu stupně vyvolaných postiradiačních změn. Vzhledem k tomu, že na rozdíl od DNK podléhá metabolismus ribonukleových kyselin (RNK) mnohem většímu počtu vlivů, bylo nutno ke stanovení intermediárních metabolitů desoxyribonukleových kyselin přistoupit tak, aby neintereferovaly metabolity RNK. Intermediární metabolity DNK bylo tedy možno z tohoto hlediska sledovat dvojí cestou: stanovením thyminu a sloučenin s ním metabolicky spojených nebo pátráním po desoxyribose a jejich sloučeninách. Rozhodli jsme se sledovat vylučování intermediárních metabolitů DNK pomocí desoxyribosy. Z dosud popsaných postupů pro stanovení desoxyribosy jsme volili Dischehо reakci s cysteinem a kyselinou sírovou, která proti jiným chemickým metodám stanovení při poměrné citlivosti (na rozdíl např. od Dischehо reakce s difenylaminem) má tu výhodu, že postihuje nejenom purinové, ale i pyrimidinové sloučeniny desoxyribosy.

Na základě pokusů, uvedených níže, jsme dospěli ke zjištění zvýšeného vylučování sloučenin obsahujících desoxyribosu, zejména desoxycytidinu (tj. látek, poskytujících positivní Dischehо reakci s cysteinem a kyselinou sírovou), močí u krys ozářených ionisačním zářením v závislosti na dávce tohoto záření.

Uvedené zjištění tohoto nového teoretic-

kého poznatku má i určité výhledy praktického upotřebení. Jde především o pravděpodobnou možnost využít průkazu zvýšeného vylučování látek obsahujících desoxyribosu, především desoxycytidinu, močí u lidí vystavených ionisačnímu záření k časné diagnostice poškození organismu zářením. V pokusech na krysách se uvedené sledování ukázalo dostatečně specifické a citlivé pro tyto účely a umožnilo rovněž v určitém rozmezí kvantitativní stanovení stupně vyvolaných změn. Pro tyto praktické účely diagnostiky u lidí by bylo nutno ovšem potvrdit, že naše nálezy platí i pro lidský organismus. Provedení tohoto průkazu nebylo dosud možné především proto, že jsme neměli k disposici moč osob, vystavených dostatečně vysokým dávkám celotělového ozáření. Je pochopitelné, že experimentální vystavení lidí těmto dávkám je zcela vyloučeno.

Vedle významu aplikace základního zjištění v diagnostice u lidí lze bezesporu použít uvedeného sledování při experimentálním řešení aplikovaných radiobiologických problémů (jako je sledování účinku ochranných látek apod.).

Pokusy jsme prováděli na bílých krysách (kmene Wistar, chov Konárovice) o průměrné váze 250 — 320 g. Krysy byly chovány za standardních podmínek v klimatisovaném zvěřinci a krmeny základní dietou. Ozařování bylo prováděno na přístroji Siemens „Bombe" při 200 kV, 15 mA s filtrem 0,5 mm Cu a 1 mm Al ze vzdálenosti 40 cm bez tubusu, přívod 76 r/min. Kontrolní zvířata byla chována za stejných podmínek jako ozářená; vedle toho další skupiny byly podrobeny různým typům zátěže: použili jsme různého druhu traumatisace, např. frakturu obou zadních končetin, obstřiku obou zadních končetin třemi ml 10% formolu, traumatisace v Noble-Collipově bubnu po dobu 15 min. při rychlosti 45 ot./min., spáleniny rozžhaveným kovovým předmětem III. stupně v bederní krajině v rozsahu 4 × 7 centimetru (v etherové narkose). K odběru moči byla zvířata chována jednak ve skleněných metabolických klecích, umožňujících isolovaný odběr stolice a moči při volném pohybu zvířete, jednak v metabolických klecích za částečné fixace zvířete. Výsledky v obou typech metabolických klecí byly shodné.

Odebraná moč byla doplňována na konstantní objemy, filtrována papírovým filtrem a vzata k analyse. Při provádění Dischehо barevné reakce ve Stumpfově modifikaci (Chargaff E., Davidson J. N.: The Nucleic Acids 1, 291, Acad. Press 1955) jsme sledovali jednak spektrální charakter vznikajícího zabarvení, jednak extinkci při vlnové délce maxima absorpce, použili jsme jednak fotografie v UV světle, jednak detekce desoxyribosy a jejich sloučenin podle Buchanana (Nature 168, 1091, 1951). Byla zjištěna R_F chromatografovaných látek a provedena současná chromatografie refe-

renčních látek. Pro identifikaci byly sledované látky dále z chromatogramů eluovány pomocí 0,1 N—HCl a stanoveno jejich absorpční spektrum v UV oblasti.

Již prvé pokusy, které jsme provedli, ukázaly, že u všech zvířat ozářených dávkou 300 a 600 r, vedla iradiace zcela bez výjimky k positivitě reakce, odečítatelné již pouhým okem. Spektrálně jeví toto zabarvení ostré maximum při vlnové délce 490mμ, tedy maximum, jež přísluší zbarvení, jímž reaguje Dischego činidlo s desoxyribosou.

V moči kontrolních a traumatisovaných zvířat ke vzniku tohoto zabarvení nedošlo; toto pozorování pouhým okem zcela odpovídalo diferencím, zjištěným spektrálně. Identifikace pomocí chromatografie ukázala, že v moči ozářených zvířat se objevuje intensivní skvrna absorbující v UV oblasti a dávající červené zbarvení při Buchananově reakci. Pohyblivost látky, srovnání s referentním vzorkem a absorpční spektrum dovolují indentifikovat tuto látku jako **cytosindesoxyribosid.**

Předběžné výsledky dalších pokusů s použitím dávky záření ukazují, že v určitém rozmezí dávek platí přímá závislost mezi dávkou ionisačního záření a množstvím vyloučených positivních látek. Ukazuje se také, že časový průběh vylučování močí po iradiaci bude odlišný podle dávky záření. Obzvláště po nízkých dávkách jsme zachytili spíše protrahovaný průběh vylučování látek, dávajících positivní reakci. Lze očekávat, že v pokusech, které právě provádíme, bude možno prokázat positivitu reakce i po dávkách nižších než 100 r.

Experimentální ověření předpokladů, s nimiž jsme přistupovali ke studiu účinku ionisačního záření, vedlo tedy k objevu dosud neznámé skutečnosti: ionisační záření zvyšuje vylučování látek obsahujících desoxyribosu, především cytosindesoxyribosidu močí ozářených savců. Desoxyribosid druhé pyrimidinové složky DNK — thymidin — není v úměrně zvýšené míře ozářenými zvířaty vylučován. Je otázka, zda je tomu tak pro intensivnější rozpad thymidinu nebo i pro zástavu jeho syntézy.

Severografia, n. p., provozovna 32 Most