ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA

POPIS OBJEVU K DIPLOMU ČÍS. 4

Přihlášeno 12 06 59 (PO 39-59)

Zveřejněno 07 07 59 (Experientia, 1959, XV/12 : 479)
Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie, 1960, CXXVI, č. 3 — 4 : 315 až 320
Československá fysiologie, 1960, č. 9 : : 301 až 302
Pathologie-Biologie, 1960, 8, č. 11 — 12 : : 1193 až 1196
Pathologie-Biologie, 1961, 9, č. 21 — 22 : : 2083 až 2085
Pharmacotherapeutica, 1961 : 293 až 306
Physiologia Bohemoslovenica, 1961, 10, č. 2 : 197 až 201
Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie, 1962, CXL, č. 1 — 2 : 138 až 142

Vydáno 15 10 78

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

Uděleno 04 09 65

MDT 615.73

Autor objevu: MUDr. ANTONÍN SVATOŠ, PRAHA

Název objevu: **Objev urovillikininu, uroduokrininu a uroenterokrininu**

Předmět objevu: V moči lidí a zvířat se nalézá urovillikinin způsobující pohyb střevních klků, uroduokrinin vyvolávající sekreci Brunnerových žláz a uroenterokrinin způsobující sekreci chymu a enzymu chymu. Byly připraveny koncentráty těchto působků, které po nirožilním podání pokusným zvířatům nemění krevní tlak a působí jen na svůj cílový orgán.

Baylissův a Starlingův objev sekretinu (J. Physiol. **28**; 325, 1902) dal popud k vzniku skupiny hormonů, která je označena jako hormony trávícího traktu. Všechny tyto hormony mají společné, že se nalézají ve sliznici trávícího ústrojí, většinou v duodenu a ze sliznice se uvolňují vlivem sekretogenního podnětu, tj. za fysiologických podmínek některými složkami potravy. Po uvolnění ze sliznice putují krevní cestou k svému cílovému orgánu, na něhož specificky působí.

Greengard H. a spol. (Am. J. Physiol. **133**; 121, 1941) ukázal, že sekretin jest krví inaktivován asi enzymaticky sekretinasou. Rovněž ukázal v jiné práci (Greengard H. a spol. Am. J. Physiol. **134**; 245, 1941), že moč inaktivuje sekretin asi rovněž enzymaticky.

Po objevu enterogasrtonu (Kosaka T. a Lim R. K. S.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. **27**; 890, 1930), který tlumí aciditu a motilitu žaludku (Gray J. a spol.: Science 89, 489, 1939), zjistili, že rovněž moč má enterogastronový účinek. Močový koncentrát, který tlumil aciditu a motilitu žaludku a neměnil krevní tlak, označili názvem urogastron. Kromě těchto prací ukázal ještě Greengard, že krev inaktivuje cholecystokinin (Greengard H. a spol., Am. J. Physiol, **134**; 733 1941) a pankreozymin (Science **79**; 350, 1944).

Z literárních údajů bylo patrno, že na jedné straně sekretin je aktivován močí a na druhé straně, že enterogastron se pravděpodobně vylučuje do moči jako urogastron. O osudu ostatních hormonů v literatuře nebyla zmínka. Zjistil jsem, že moč má pankreozyminovou účinnost a močový koncentrát s touto účinností jsem označil názvem uropankreozymin (Svatoš A., Naturwissenschaften **45**; 523, 1958). Rovněž jsem prokázal, že moč má cholecystokininovou účinnost a močový koncentrát s touto účinností jsem označil názvem urocholecystokinin (Svatoš A., Science **129**; 567, 1959).

Rozhodl jsem se přezkoušet, zda moč má účinek i jiných hormonů trávícího ústrojí kromě těchto popsaných hormonů, nebo zda některé hormony jsou inaktivovány močí jako v případě sekretinu. V moči jsem zjistil dále účinek villikininový, duokrininový a enterokrininový.

Villikininový účinek moči

Kokas a Ludány (Arch. ges. Physiol. **225**; 421, 1930) ukázali, že motorická aktivita střevních klků je hormonálně ovládána látkou, která se nalézá ve sliznici dvanáctníku a uvolňuje se po vniknutí kyselé tráveniny ze žaludku do dvanáctníku.

Titraci konali na psech v chloralosové narkose. Po otevření dutiny břišní se příčně protne jejunum v rozsahu asi 15 cm proti úponu mesenteria. Rozpolcené jejunum se rozprostře na pevnou podložku a připevní skobičkami. Počet pohybů klků se pozoruje

během 1 minuty v zorném poli pomocí binokulární lupy. Zjistil jsem, že moč má villikininovou účinnost. Prof. Dr. Ludány, objevitel villikininu, potvrdil tento můj objev.

Močový faktor s villikininovou účinností se absorbuje na kyselinu benzoovou a dostává se do acetonové sraženiny v moči (1 díl moči, 3 díly acetonu). Je značně termostabilní. Močový faktor s villikininovou účinností, který neovlivňuje krevní tlak, označuji názvem urovillikinin.

Tabulka I

Látka	Dávka	Procento pohybu klků
Moč lidská	3 ml	100 %
Moč lidská	5 ml	220 %
Acetonová sraženina moči	10 mg	80 %
Acetonová sraženina moči	20 mg	180 %

Duokrininová účinnost moči

Sekrece Brunnerových žláz jest hormonálně ovládána duokrininem. (Grossman M. I. Physiol. Rev. 30, 33, 1950). Duokrinin sice nebyl isolován, ale na jeho existenci se usuzuje z toho, že hrubý sekretinový výtažek vyvolává sekreci Brunnerových žláz, ale vyčištěný sekretin tuto vlastnost nemá. Snažil jsem se zjistit, zda moč má duokrininovou účinnost. Účinnost byla stanovena na duodenu kočky in situ. Kočkám byla vstřikována moč zdravých lidí, normálních krys (moč krys odebrána 6 hodin po resekci duodena a moč krys odebrána 6 hodin po podání 1 ml 0,1 N HCl do duodena) a acetonová sraženina lidské moči.

K testu bylo užito koček bez rozdílu pohlaví po 24 hodinovém hladovění v chloralosové narkose. Dutina břišní byla otevřena ve střední čáře pod sternem, jaterní vývody a pylorus byly podvázány. Dvanáctník byl podélně rozpolcen v délce 7 cm proti úponu mesenteria. Vaterská papila byla obšita, aby bylo znemožněno odtékání sekretu do dvanáctníku. Pod Vaterskou papilou byla přiložena ligatura a druhá asi 6 cm aborálně od pravé. Okraje rozpolceného dvanáctníku byly připevněny stehy k přední stěně břišní. Do takto vzniklé dvanáctníkové nálevky byl vkládán předem odvážený zubní vatový tampon vždy na 10 minut. Potom byl tampon z nálevky vyňat a znovu zvážen. Z rozdílu váhy tamponu se usuzovalo na dvanáctníkovou sekreci. Moč nebo močový koncentrát byl podán nitrožilně vždy po dvou klidových hodnotách. Pro laboratorní účely byla definována jednotka duokrininové účinnosti jako množství látky, které po nitrožilním vstříknutí vyvolává zvýšení rozdílu váhy tamponu o 10 mg proti klidové sekreci.

Jeden ml moči zdravé osoby vyvolá zvýšení duodenální sekrece o 34 jednotek (prů-

měr asi 30 měření). Prokainisace (2% roztokem) dvanáctníkové sliznice 10 minut před nitrožilním vstříknutí moči ani nesnížila, ani neoddálila sekretorickou odpověď dvanáctníku. Rovněž oboustranná krční vagotomie nebo atropinisace kočky neovlivnila duodenální sekreci.

Nitrožilní vstříknutí 1 ml moči normální krysy vyvolalo zvýšení dvanáctníkové sekrece o 12 jednotek. Jeden ml moči krysy s resekuovaným dvanáctníkem způsobil zvýšení dvanáctníkové sekrece o 8,4 jednotek. Jeden ml moči krysy, které byl podán 1 ml 0,1 N HCl do dvanáctníku, vyvolal zvýšení duodenální sekrece o 16,6 jednotek (viz obr. č. 1).

Z močových koncentrátů stimulovala dvanáctníkovou sekreci purifikovaná sraženina moči. 100 mg sraženiny rozpuštěné ve fysiologickém roztoku o pH 3 zvýšilo dvanáctníkovou sekreci o 30 jednotek (viz obr. č. 2). Teprve 5minutový var způsobil vymizení duokrininové účinnosti koncentrátu.

Zjištění, že moč nebo močový koncentrát má stejnou duokrininovou účinnost na normálním testovacím objektu i na vagotomovaném nebo atropinisovaném zvířeti, svědčí pro hormonální charakter této účinnosti. Pokus s prokainisací dvanáctníkové sliznice rovněž podporuje tento závěr. Pokus s močí krysy s resekuovaným dvanáctníkem a s močí krysy, které byla podána sekretogenní látka do dvanáctníku, ukazuje na příbuzenský vztah mezi duokrininem a duokrininovou účinností moči.

Podařilo se připravit močový koncentrát (purifikovanou acetonovou sraženinu), který vyvolává dvanáctníkovou sekreci, neovlivňuje motilitu dvanáctníku, nemění krevní tlak a nemá účinky ostatních hormonů trávícího ústrojí. Tento koncentrát bude stručně nazýván názvem uroduokrinin.

Enterokrininová účinnost moči

Enterokrinin se nalézá ve sliznici tenkého střeva a nepatrně ve sliznici tlustého střeva. Vyvolává zvýšenou tvorbu střevního chymu a enzymu chymu. Jako sekretogenní látka působí zředěná kyselina solná (Nassed E. S.: Am. J. Physol. **121**, 481, 1938).

K biologické titraci se používá psů ve fenobarbitálové narkose. Po otevření dutiny břišní se do kličky jejuna zasune skleněná kanyla. 10 cm orálně od kanyly se stěna jejuna liguje, aby bylo zabráněno přítoku chymu z horních partií střeva. Chymus odtéká kanylou do kalibrované nádobky. Množství chymu se zjišťuje vždy v 15minutových intervalech před i po podání účinné látky. Stanovení enzymatické aktivity se provádí hned po ukončení pokusu. Jako substrátu se používá 20% roztoku chemicky čisté sacharosy ve fosfátovém ústojí pH 6,6. Substrát a vzorek se před smíšením vytemperují na teplotu 37,5 °C. Dva ml substrátu se smísí s roztokem obsahujícím enzymy. Po 20 minutách je reakce přerušena přidáním 3 ml 4% roztoku hydroxidu barnatého. Sražení proteinu se provede přidáním 4 ml 3% roztoku síranu zinečnatého, který byl standardisován vůči hydroxidu barnatému. Kontrola (slepé stanovení) se provede s povařenou zředěnou šťávou, čímž se vyloučí chyba způsobená redukujícími látkami přítomnými ve šťávě. Invertní cukr enzymaticky odštěpený se měří kolorimetricky metodou podle Nelsona (J. Biol. Chem. 153, 375, 1944).

Z grafu č. 3 a 4 je patrno, že lidská moč a dialysovaná meta-nolová sraženina moči má duokrininový účinek

Pankreozyminová účinnost moči

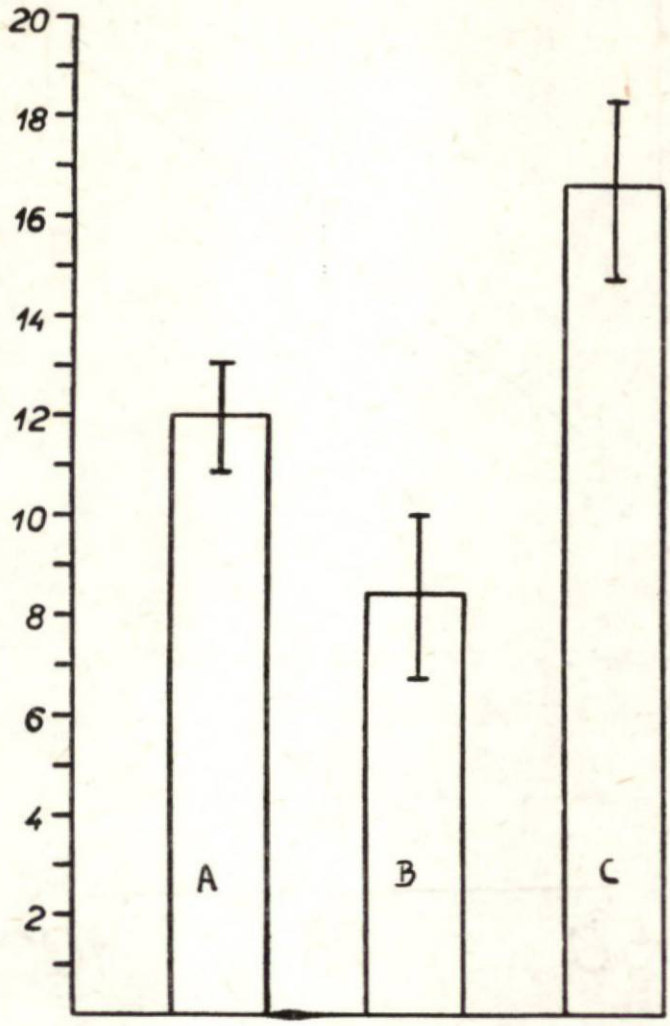
Moč má rovněž cholecystokininovou a pankreozyminovou účinnost. O přípravě uropankreozyminu byla podána patentová přihláška, a proto o ní nebude pojednáno na tomto místě.

Tabulka

Přítomnost močových působků ve sraženinách.

močový působek	sraženina	tlak krevní
uropankreozymin	louhu sodného močí	nemění
	acetonová sraženina moči	pokles
	filtrát aceton-moč sražený acetonem	pokles
urocholecystokinin	adsorbát na kys. benzoovou (etanol)	nemění
	etanolová sraženina moči	malý pokles
	metanolová sraženina moči	pokles
	acetonová sraženina moči	pokles
uroduokrinin	opakovaně acetonem sráž. moč. sraž.	nemění
	acetonová sraženina moči	pokles
	etanolová sraženina moči	malý pokles
	metanolová sraženina moči	pokles
urovillikinin	adsorbát na kys. benzoovou (aceton)	nemění
	acetonová sraženina moči	pokles
uroenterokrinin	dialysovaná metanolová sraženina moči	nemění

Lze předpokládat, že klinické využití bude mít uropankreozymin (je již klinicky zkoumán), urocholecystokinin a urovillikinin. Klinický přínos uroduokrininu a uroenterokrininu je zatím sporný.



Obr. č. 1

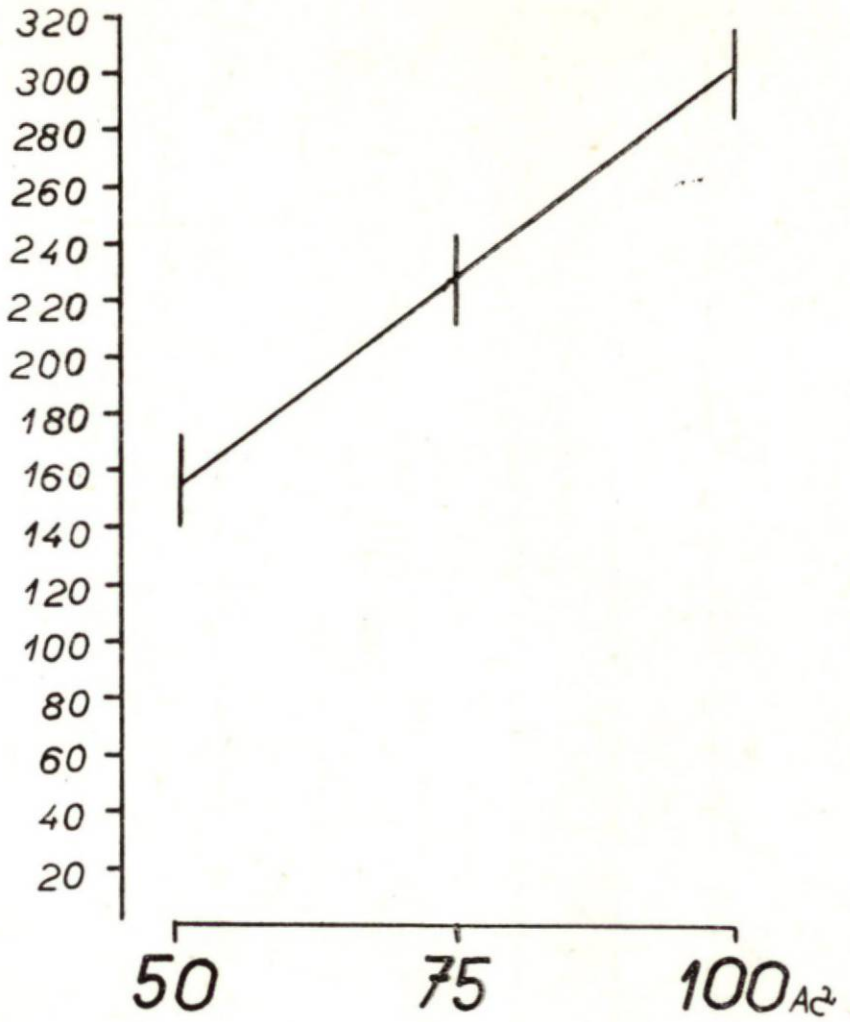
Stupnice na ose Y = kočičí jednotky uroduokrininu.

Sloupec A = koncentrace uroduokrininu v 1 ml normální moči krysy

Sloupec B = koncentrace uroduokrininu v 1 ml moči krysy po duodenektomii.

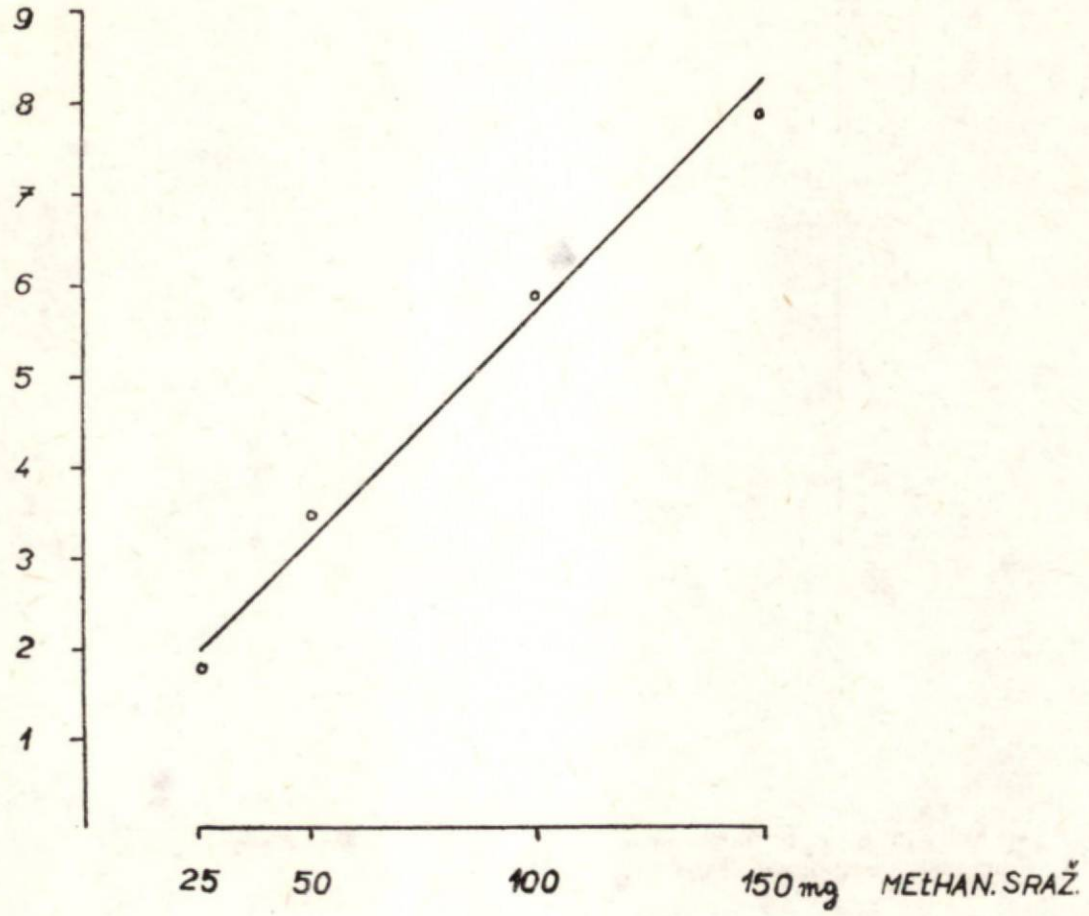
Sloupec C = koncentrace uroduokrininu v 1 ml moči krysy, které byla podána sekretogenní látka do duodena.

Z grafu je patrno, že je-li vyňat orgán vnitřní sekrece duokrininu, je koncentrace uroduokrininu v moči nižší než u kontrol. Naopak, je-li podána sekretogenní látka do duodena, je koncentrace uroduokrininu v moči vyšší než u kontrol.



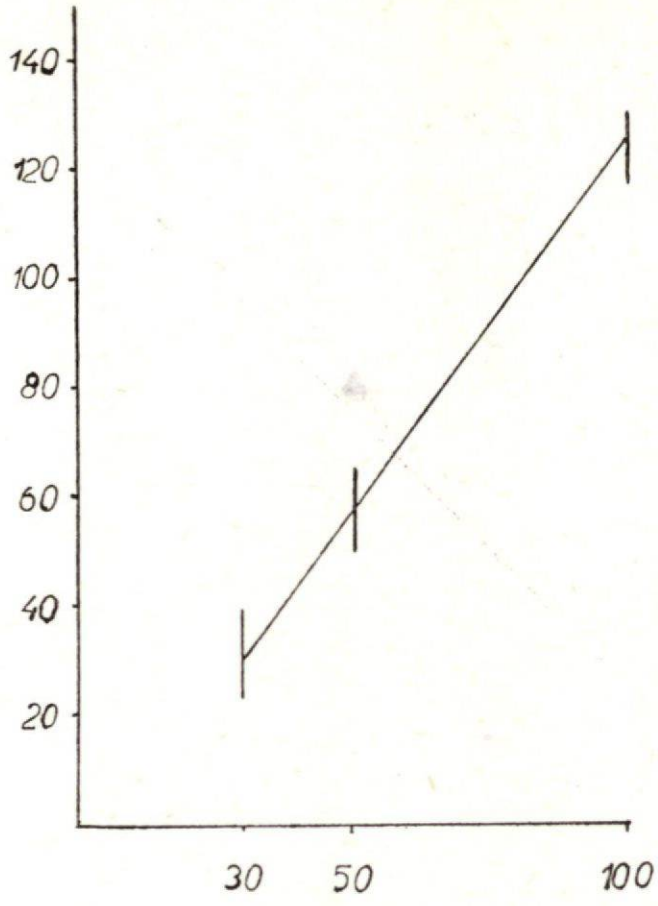
Obr. č. 2
Titrace uroduokrininu na dvanáctníku kočky in situ.

Osa X = množství purifikované acetonové sraženiny v moči (obsahuje uroduokrinin)
Osa Y = kočičí jednotky uroduokrininu



Obr. č. 3
Titrace uroenterokrininu na jejunální kličce psa in situ.

Osa X = množství methanolové sraženiny moči (obsahuje uroenterokrinin)
Osa Y = množství sucus entericus v ml.



Obr. č. 4
Enzymová aktivita uroenterokrininu.
Osa X = množství etanolové sraženiny.
Osa Y = sacharasová účinnost vyjádřena v %.

Severografia, n. p., provozovna 32, Most