P O P I S O B J E V U
K D I P L O M U Č. 62

Přihlášeno 24 03 86 PO 16-86

Právo přednosti od 31.12 78 pro bod 1
/Molec. Gen. Genet. 160, 1978,81/,
od 30 11 81 pro bod 2
/Biophys. J. 36, 1981, 429/,
od 31 12 84 pro bod 3
/Internat. J. Radiat. Biol. 45, 1984, 389/

Uděleno 05 12 91

MDT 576.8.097.3

Vydáno

Autoři objevu: SEDLIAKOVÁ MILENA doc. MUDr. DrSc., BRATISLAVA,
SLEZÁRIKOVÁ VIERA RNDr. CSc., BRATISLAVA,
MAŠEK FRANTIŠEK ing. CSc., BRATISLAVA,
BROZMANOVÁ JELA ing. CSc., BRATISLAVA,
KLEIBL KAROL ing. CSc., BRATISLAVA a
PIRŠEL MIROSLAV RNDr. CSc., BRATISLAVA

Název objevu: Indukovaná, účinná a presná oprava molekúl dezoxyribonukleovej kyseliny /DNK/ u modelových buniek Escherichia coli ožiarených ultrafialovým svetlom

Předmět objevu:

1. Jav spočívajúci v účinnej oprave molekul DNK u modelových buniek Escherichia coli ožiarených ultrafialovým svetlom, kde oprava vyžaduje bielkoviny indukované v poškodených bunkách, je neexcízna, avšak na rozdiel od SOS indukovanej opravy závisí na uvr génoch.
2. Jav podľa bodu 1 spočívajúci v tom, že špecifické poškodenie /pyrimidínový dimér/ sa modifikuje tak, že po replikácii nie je viac citlivé k endonukleáze z Micrococcus luteus.
3. Jav podľa bodu 1 a 2 spočívajúci v tom, že oprava na rozdiel od SOS indukovanej opravy je presná, takže nevedie k mutáciám.

Predmetom objavu je účinná a presná oprava molekúl dezoxyribonukleovej kyseliny u modelových buniek Escherichia coli kmeň B/r (ďalej E. coli B/r), ktorá vyžaduje bielkoviny indukované v poškodených bunkách (Molec. Gen. Genet. 160, 1978, 81). Špecifické poškodenie (pyrimidínový dimér) sa pri tom modifikuje tak, že po replikácii nie je viac citlivé k endonukleáze z Micrococcus luteus (Biophys. J. 36, 1981, 429). Na rozdiel od indukovanej SOS opravy, táto oprava nevedie k mutáciám a vyžaduje neporušené uvr (ultraviolet resistance) gény (Internat. J. Radiat. Biol. 45, 1984, 389).

Dedičný základ bunky, molekula dezoxyribonukleovej kyseliny (DNK), sa poškodzuje faktormi vonkajšieho prostredia, predovšetkým žiarením a chemickými mutagénmi. Bunka disponuje účinnými opravnými systémami, takže väčšina poškodení je následne opravená a štruktúra DNK uvedená do pôvodného stavu. No časť poškodení, ktoré alebo ostali neopravené, alebo boli opravené nepresne, vedie k zmenám jej štruktúry, mutáciám.

V roku 1964 bola objavená excízna oprava, ktorej podstatou je enzymatické vylúčenie a nahradenie poškodenej časti reťazca

/Setlow R. B., Carrier W. L.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51, 226 /1964//. Proces závisí na uvrA,B,C génoch. Považuje sa za presný, t.j. nevedie k mutáciám. Defektnosťou jedného z uvr génov bunky strácajú schopnosť odstraňovať poškodenia excíziou. Stanú sa citlivé na poškodenie a opravujú ho spôsobom, ktorý vedie k mutáciám. Pôvodne sa predpokladalo, že mutácie vznikajú pri rekombinačnej oprave, pri ktorej dochádza k výmene homológneho úseku sesterských reťazcov /Howard-Flanders P., Rupp W. D., Wilkins B. M., Cole R. S.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 195 /1968/; Witkin E. M.: Ann. Rev. Microbiol. 23, 487 /1969//.

V posledných rokoch sa zistilo, že zdrojom mutácií nie je rekombinačná oprava, ale proces dosiaľ nie presne definovaný, sprostredkovaný bielkovinami, indukovanými v poškodených bunkách. Tento proces dostal názov SOS oprava. Bol popísaný Radmanom /Radman M. v knihe: Molecular Mechanisms for Repair of DNA, part A. New York, Plenum Press 1975, 355-367/ a Witkinovou /Witkin E. M.: Bacteriol. Rev. 40, 869 /1976// ako indukovaný, závislý na rec-lex génoch, vysoko mutagénny, málo účinný, významný predovšetkým pre bunky, ktoré nevedia odstrániť poškodenia vyštiepením.

Podstatou objavu je jav spočívajúci v existencii účinnej a presnej opravy molekúl dezoxyribonukleovej kyseliny. Oprava vyžaduje bielkoviny, indukované v poškodenej bunke. Od SOS nepresnej indukovanej opravy, popísanej v rokoch 1972-1975, sa líši v týchto bodoch: je účinná; je presná; závisí nielen na rec-lex ale aj na uvr génoch. Je však neexcízna (nedochádza k vyštiepeniu poškodenia). Zistenie bolo urobené na modeli buniek

Escherichia coli.

Dôkazový materiál nadväzuje na nasledujúce zistenia: a/ excíznu opravu možno potlačiť bez vplyvu na prežitie buniek /Sedliaková M., Mašek F., Brozmanová J.: FEBS Letters 23, 325 /1972//; b/ poškodenia, ktoré ostávajú v bunkách uvr^+ genotypu, nie sú mutagénne /Balgavý P., Turek R.: Zeitschrift Naturforschung 30c, 406 /1975/; Slameňová D., Slezáriková V., Mašek F.: Studia biophys. 63, 83 /1977//; c/ uvr gény zabezpečujú vysoké prežitie buniek, bez ohľadu na to, či excízny mechanizmus je aktívny, alebo potlačený metabolickým zásahom /Sedliaková M., Brozmanová J., Slezáriková V., Mašek F., Fandlová E.: Neoplasma 22, 361 /1975/; Sedliaková M., Brozmanová J., Mašek F., Slezáriková V.: Photochem. Photobiol. 25, 259 /1977//.

Tu ~~predkladáme~~ sa predkladajú "in vivo" dôkazy o existencii neexcíznej opravy, ktorá závisí na uvr, rec a lex génoch; je indukovaná a takmer bezchybná.

1A. Dôkaz potreby indukovaných bielkovín pre obnovu akútne poškodených buniek divého typu.

Skutočnosť, že poškodené bunky potrebujú syntézu bielkovín k obnoveniu syntézy DNK, bola dávnejšie známa. Vysvetľovala sa potrebou konštitutívnych bielkovín pre iniciáciu nového cyklu replikácie DNK, čo bolo v súlade s predstavou, že v akútne poškodených bunkách sa replikácia obnoví zahájením replikačného cyklu /Billen D.: J. Bacteriol. 97, 1169 /1969//.

Cieľom prvej skupiny pokusov bolo overiť správnosť hore uvedenej predstavy. Za tým účelom sa bunky ožiarili dvomi dávkami,

pričom medzi prvou a druhou dávkou sa syntéza bielkovín umožnila, kým po druhej dávke sa inhibovala chloramfenikolom. Kontrolná vzorka sa ožiarila iba druhou dávkou a syntéza bielkovín ihneď inhibovala chloramfenikolom. Prvá dávka nevyvolávala hynutie buniek a označujeme ju ako indukčnú (IF), druhú väčšiu, ako letálnu (LF). Ak by bielkoviny potrebné pre obnovu boli konštitutívne, neboli by medzi kontrolnou a opakovane ožiarenou vzorkou rozdiely, lebo po každom ožiarení by sa vyžadovala ich syntéza pre iniciáciu ďalšieho cyklu. Ak by požadované bielkoviny boli indukované, prvá dávka by bunky zvýhodnila, lebo by boli zásobené bielkovinami syntetizovanými v intervale medzi prvou a druhou dávkou. Novum v našom modeli bolo, že bunky pred ožiarením prvou dávkou boli synchronizované vo fáze dokončených replikačných cyklov DNK, čím sa podstatne zvýšila ich rezistencia k žiareniu. To umožnilo použiť relatívne vysokú indukčnú dávku (30 J/m^2). Táto dávka mohla zabezpečiť indukciu aj u excidujúcich buniek a pritom neovplyvňovala ich životaschopnosť.

Obr. 1 udáva prežitie buniek ožiarených jednou dávkou (50 J/m^2), alebo dvomi dávkami (30 + 50 J/m^2), kultivovaných 0-120 minút s chloramfenikolom pred vysiatím na platne. Ako vidieť, životaschopnosť buniek ožiarených jednou dávkou (okrúhle symboly) výrazne poklesla po kultivácii s chloramfenikolom. Opačný efekt sa dostavil u buniek opakovane ožiarených (trojuholníkové symboly) /Sedliaková M., Slezáriková V.: Folia Microbiol. 22, 313 /1977//.

Obr. 2 udáva vplyv indukcie na celkovú syntézu DNK. Ako vidieť, v indukovaných bunkách (šrafované stĺpce) sa syntéza DNK

rozbehla i v prítomnosti inhibítora syntézy bielkovín, chloramfenikolu, kým v neindukovaných bunkách (plné stĺpce) vôbec nenaštartovala /tamtiež). Príčina tohto javu je zrejmá z obr. 3, z ktorého vidieť, že v indukovaných bunkách sa obnovila syntéza celistvých molekúl DNK normálnej veľkosti (plné symboly; šipky udávajú sedimentáciu celistvých molekúl), kým v neindukovaných bunkách pokusy o syntézu končili neúspešne /Sedliaková M., Slezáriková V.: Folia Microbiol. 22, 420 /1977//.

Obr. 4 udáva stabilitu ožiarenej DNK. Na ňom je znázornené, že v neindukovaných bunkách sa 70 % rodičovskej DNK počas 2 hodín kultivácie s chloramfenikolom rozpadlo (okrúhle symboly), kým v indukovaných bunkách (trojuholníkové symboly) bola rodičovská DNK stabilná /Sedliaková M., Slezáriková V., Mašek F., Brozmanová J.: Molec. Gen. Genet. 160, 81 /1978//.

Na obr. 5A,B sa porovnáva vplyv indukcie na prežitie poškodených buniek uvr^+ genotypu a buniek, ktoré schopnosť excidovať stratili v dôsledku defektu v uvr géne. Ako vidieť z obr. 5A, neindukované bunky uvr^+ genotypu (okrúhle symboly) výrazne hynuli, kým indukované bunky (trojuholníkové symboly) boli rezistentné. U buniek uvr^- genotypu bol efekt indukcie nepatrný (obr. 5B) /Sedliaková M., Slezáriková V., Piršel M.: Molec. Gen. Genet. 167, 209 /1978//. Že indukcia vyžaduje funkčné recA a lexA gény je zrejmé z obr. 5C,D. Z neho vidieť, že u buniek defektných v týchto génoch nemá indukcia žiadny alebo len nepatrný vplyv na ich prežitie.

Výsledky uvedené na obr. 1-5 prinášajú "in vivo" dôkazy o primárnom význame indukovaného procesu

pre obnovu DNK syntézy a prežitie akútne poškodených buniek schopných excíznej opravy.

1B. Dôkaz, že v indukovaných bunkách časť dimérov ostáva neexcidovaných. Tieto nie sú prenesené do dcérskych reťazcov. Ostávajú "in situ" a sú tolerované pri replikácii.

Z hore uvedených výsledkov vyplýva, že indukovaný proces sa v plnej miere prejaví v bunkách, ktoré majú intaktné uvr gény. O týchto génoch je známe, že kontrolujú prvý krok excízie, t.j. naštiepenie jednoduchého reťazca v blízkosti poškodenia. Cieľom ďalšej etapy bolo zistiť, ako tieto gény pôsobia v indukovaných bunkách.

Cooper a Hanawalt /Cooper P., Hanawalt P. C.: J. Mol. Biol. 67, 1 /1972// zistili, že medzery po vyštiepených dimérach sa vypĺňujú krátkymi a dlhými záplatami. Keďže dlhé záplaty vyžadujú účasť rec-lex génov, uvažovalo sa, že u excízie schopných buniek by sa indukcia mohla uplatňovať pri syntéze dlhých záplat, čo by umožnilo úplnejšiu elimináciu poškodení. Skoršie /Swenson P., Setlow R. B.: J. Mol. Biol. 15, 201 /1966// i súčasné údaje však dokazujú, že účinná excízia nevyžaduje "de novo" protein syntézu. Naviac, naše predošlé výsledky svedčili o tom, že v opakovane poškodených bunkách (kde prvé poškodenie mohlo navodiť indukciu) sa excidovalo podstatne menej dimérov ako v bunkách poškodených len raz.

Vplyv indukcie na aktivitu excíznej opravy je demonštrovaný na obr. 6. Ako vidieť, v bunkách raz poškodených a kultivovaných bez chloramfenikolu (okrúhle symboly) bola excízia úplná.

Avšak v bunkách ožiarených dvomi dávkami a kultivovaných bez chloramfenikolu (prázdne trojuholníky) bola excízia dimérov výrazne inhibovaná /Sedliaková M., Slezáriková V., Mašek F., Brozmanová J.: Molec. Gen. Genet. 160, 81 /1978//.

Z výsledkov uvedených na obr. 6 bolo možné dedukovať, že bielkoviny, indukované prvou dávkou, viedli po druhej dávke k obnoveniu DNK syntézy prv, ako sa poškodenia vyštiepili. Skôr ako sa vyvodil tento záver, bolo nutné podať rad pomerne zložitých dôkazov, ktoré vylučovali alternatívne možnosti, menovite:

a) dôkaz, že diméry nezostali vo frakcii mŕtvych buniek, ktoré po ožiarení nereplikovali molekulu DNK. K tomu bolo treba denzitne odlíšiť DNK syntetizovanú do ožiarenia (HH DNK) od DNK syntetizovanej po ožiarení (HL DNK), oba typy separovať gradientovou centrifugáciou a diméry v nich stanoviť osobitne. Separácia DNK je znázornená na obr. 8A dole. Udáva distribúciu DNK nereplikovanej (HH), raz replikovanej (HL) a opakovane replikovanej (LL). Oblasti gradientu HH a HL sa izolovali a stanovili sa v nich diméry. Obr. 7 udáva, aké percentá dimérov ostávali v DNK, ktorá nereplikovala (stĺpec II) a DNK raz replikovanej (stĺpec III). Ako vidieť, hladiny perzistujúcich dimérov v oboch typoch DNK boli podobné /Sedliaková M., Brozmanová J., Mašek F., Kleibl K.: Biophys. J. 36, 429 /1981//.

b) dôkaz, že diméry ostali "in situ" a neboli prenesené do dcérskej DNK ani selektívne (t.j. s malým počtom monomérov), ani neselektívne (t.j. s veľkým počtom monomérov). Dôkaz sa zakladá na princípe, že pri selektívnom prenose by po každej repli-

kácii hladina dimérov v pôvodnom rodičovskom reťazci poklesla, kým neselektívny prenos by sa prejavil vysokým obsahom rádioaktívne značenej rodičovskej DNK v dcérskych reťazcoch. Údajmi, uvedenými na obr. 7, sa vylúčila prvá možnosť. Údaje na obr. 8B vylúčili druhú možnosť /tamtiež/.

Výsledky dokumentované na obr. 6-8 prinášajú dôkaz, že v indukovaných bunkách divého typu sa uvádza do chodu neexcízny mechanizmus, ktorý im umožní tolerovať veľké počty poškodení.

2. Dôkaz, že endonukleáza z buniek Micrococcus luteus rozlišuje iba diméry v nereplikovanej DNK.

UV endonukleáza izolovaná z Micrococcus luteus (M. luteus) vie rozlíšiť pyrimidínový dimér v dvojreťazcovej molekule DNK a zaviesť zlom fosfodiesterovej kostry jednoduchého reťazca v mieste diméru. Tým DNK, obsahujúca diméry, spracovaná s endonukleázou a následne denaturovaná, sa rozpadne na úseky, ktorých dĺžka závisí na frekvencii výskytu dimérov. Na princípe dôkazu miest citlivých k endonukleáze sa zakladá jedna z metód stanovenia dimérov.

Ako vidieť z obr. 9A, DNK ožiarených buniek obsahovala bezprostredne po ožiarení veľký počet Es miest (miest citlivých k endonukleáze; šipka udáva polohu molekúl bez Es miest). Tento počet bol zhruba rovnaký vo vzorke ožiarenej jednou dávkou (prerušovaná čiara) i dvomi dávkami (okrúhle symboly). To dokazovalo, že enzým s rovnakou účinnosťou rozlišuje diméry v oboch typoch buniek. Rozdiely sa prejavili vo vzorkách odobratých 2 hodiny

po ožiarení. Ako vidieť na obr. 9B, Es miesta vymizli z DNK raz ožiarených buniek (prerušovaná čiara), kým DNK opakovane ožiarených buniek obsahovala 2 frakcie. Jednu bez Es miest, druhú s vysokým obsahom Es miest. Dcérska DNK (syntetizovaná po ožiarení) bola v oboch prípadoch bez Es miest (obr. 10) /tamtiež/.

Aby sa zistila povaha dvoch frakcií rodičovskej DNK, separovala sa DNK, ktorá po ožiarení ostala nereplikovaná (HH DNK) od DNK replikovanej (HL DNK). Z oblastí gradientu vyznačených na obr. 11A sa izolovala DNK a Es miesta sa v nej stanovili separátne. K časti replikovanej i nereplikovanej DNKsa pridala endonukleáza, druhá časť bola bez endonukleázy. Ako vidieť, z grafu 11B, nereplikovaná (HH) DNK obsahovala Es miesta, lebo pridaná endonukleáza (plné symboly) zaviedla zlomy do jej reťazcov. V replikovanej (HL) DNK sa prítomnosť zlomov nezaznamenala /tamtiež/.

Výsledky uvedené na obr. 9-11
prinášajú dôkaz, že v indukovaných bunkách schopných excízie sa diméry tolerované pri replikácii modifikujú tak, že nie sú viac substrátom pre UV endonukleázu z M. luteus.

3. Dôkaz, že uvr gény umožňujú tolerovať veľký počet dimérov nemutagénnym spôsobom.

Podľa všeobecne uznávanej predstavy, neexcidovaný dimér je mutagénnejší ako dimér excidovaný. Skutočnosť, že bunky schopné excízie opravia poškodenie takmer bezchybne, sa vysvetľuje účinnou elimináciou pomocou excízie. Avšak z dôkazového materiálu prezentovaného v tomto spise je zrejmé, že v opakovane poškode-

ných bunkách uvr^+ genotypu veľká časť dimérov ostáva nevyštiepených a toleruje sa pri replikácii.

Cieľom poslednej skupiny experimentov bolo zistiť, či diméry perzistované v bunkách uvr^+ genotypu sú rovnako mutagénne ako diméry perzistované v bunkách, ktoré stratili schopnosť excízie pre defektnosť uvr génov. Za tým účelom sa uvr^+ bunky ožiarili indukčnou dávkou a tým sa v nich inhiboval excízny mechanizmus. Bunky oboch typov (uvr^+ i uvr^-) sa potom ožiarili dávkami, po ktorých v nich perzistovalo rovnaké množstvo dimérov a stanovila sa frekvencie ich mutácií. (Frekvencia mutácií sú vyjadrené počtom mutácií na 10^7 prežívajúcich buniek.)

Z obr. 12-13 vidieť, že diméry perzistujúce v bunkách s defektným uvr génom podmienili podstatne vyšší výskyt mutácií (plné symboly) ako diméry perzistujúce v bunkách divého typu (prázdne symboly). To sa vzťahuje tak na supresorové (obr. 12) ako aj na pravé mutácie (obr. 13)/Piršel M., Bencová M., Mašek F., Sedliaková M.: Int. J. Radiat. Biol. 45, 389 /1984//. Že diméry sa v oboch typoch buniek tolerujú odlišným spôsobom, je vidieť z obr. 14 /tamtiež/, ktorý dokumentuje odlišné prežitie buniek uvr^+ (prázdne symboly) a uvr^- (plné symboly) genotypu, pri rovnakých počtoch perzistujúcich dimérov.

Výsledky uvedené na obr. 12-14
prinášajú dôkaz, že uvr gény indukovaných buniek zaisťujú presné tolerovanie neexcidovaných poškodení.

V predchádzajúcej časti sa prezentuje ucelený "in vivo" dôkaz neexcízneho spôsobu opravy molekúl DNK, v ktorom významnú úlohu hrajú uvr gény. O uvr génoch sa predpokladalo, že ich

jedinou funkciou je kontrola činnosti UV endonukleázy, ktorá zahajuje excíznu opravu naštiepením fosfodiesterovej kostry jednoduchého reťazca molekuly DNK. Uvedené výsledky dokazujú, že uvr gény majú najmenej dve alternatívne funkcie. Táto predstava bola prvý krát vyslovená v roku 1973 /Sedliaková M.: Studia biophys. 36/37, 59 /1973// a postupne experimentálne overovaná.

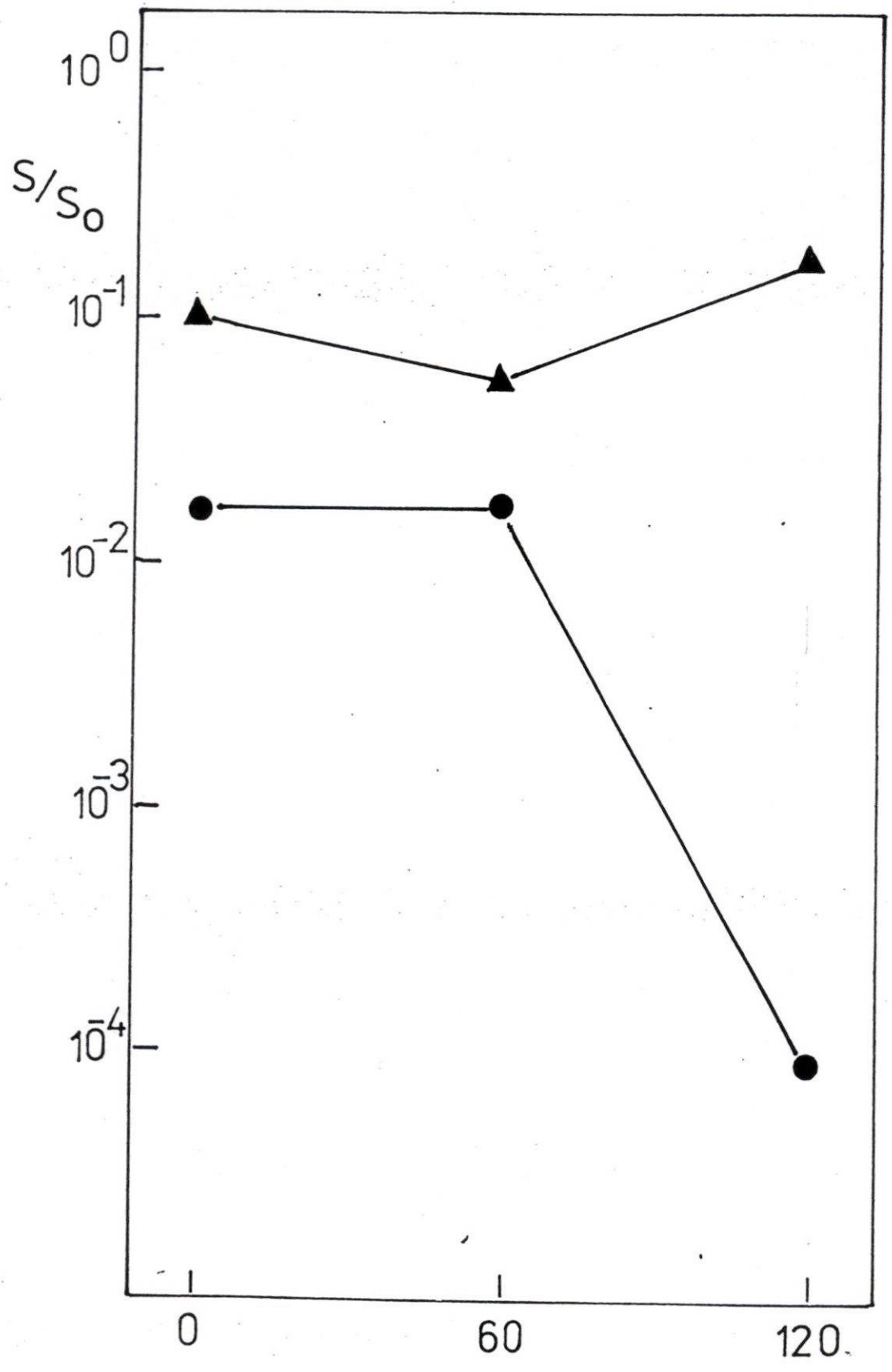
V posledných rokoch sa v iných laboratóriách získali dva dôležité poznatky, ktoré svedčia o zvláštnej regulácii uvr génov a o ich alternatívnej funkcii v indukovaných bunkách. Sú nasledovné:

a) Zistilo sa, že uvr gény majú dve formy vyjadrenia: konštitutívnu a indukovanú. U uvrA génu rozdiel medzi obomi formami je kvantitatívny. U uvrB génu je tento rozdiel kvalitatívny, lebo obsahuje rôzne indukovateľné promótory /Sancar A., Sancar G. B., Rupp W. D.: Nature 248, 96 /1982/; Sancar G. B., Sancat A., Little J. W., Rupp W. D.: Cell 28, 523 /1982//. Keďže excízna oprava nevyžaduje indukciu, indukované uvr gény by mohli zabezpečovať neexcíznu opravu, dôkaz existencie ktorej bol podaný v tomto spise.

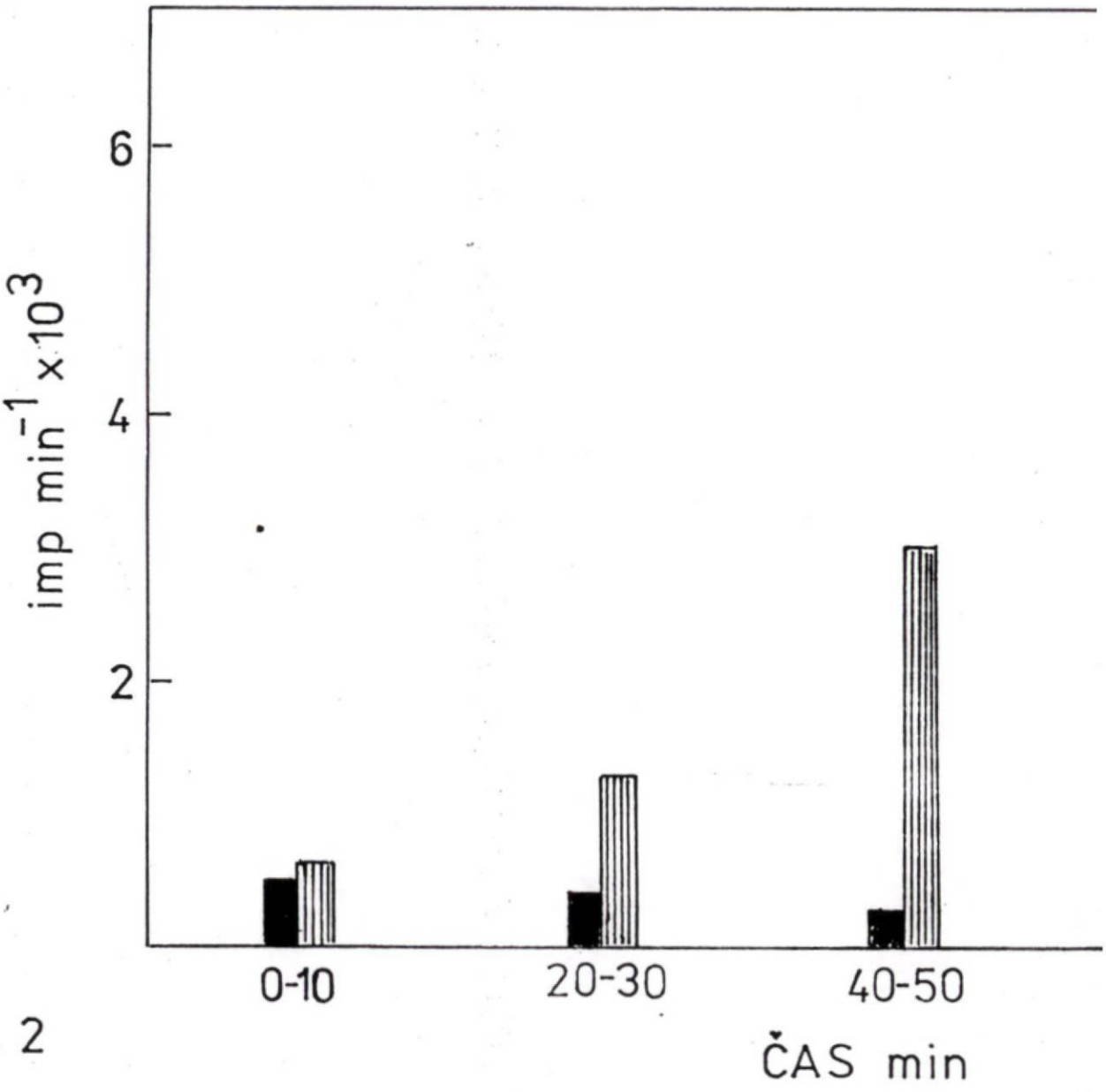
b) Zistilo sa, že naštiepenie reťazca pri zahájení excízie diméru môže prebiehať dvojstupňovo a to rozštiepením jednej z oboch N-glykozidických väzieb diméru a následným štiepením fosfodiesterovej väzby enzýmom, ktorý rozlíši apyrimidínové miesto. Bol vyslovený predpoklad, že uvoľnenie jednej bázy diméru by uľahčilo replikáciu poškodeného reťazca a mohlo by sprostredkovať (autormi objavu) ~~nami~~ popísaný neexcízny mechanizmus opravy /Friedberg E. C.: DNA Repair. New York, Freeman and co. 1985/.

Otázka, či indukované systémy (typu SOS opravy), ktoré sú v bunkách E. coli pod kontrolou lexA represoru, sa uplatňujú aj u vyšších organizmov, je vo svete predmetom intenzívnych výskumov. V súčasnosti sa nemožno vyjadriť o rozšírení týchto systémov v živej prírode. Avašk v E. coli sa tieto systémy uvádzajú do chodu nielen ultrafialovým ožiarením, ale takmer všetkými dosiaľ sledovanými genotoxickými faktormi fyzikálnej i chemickej povahy, čo svedčí o ich význame. Preto sa predmet objavu definoval ako jav odhalený na modeli buniek Escherichia coli ožiarených ultrafialovým svetlom.

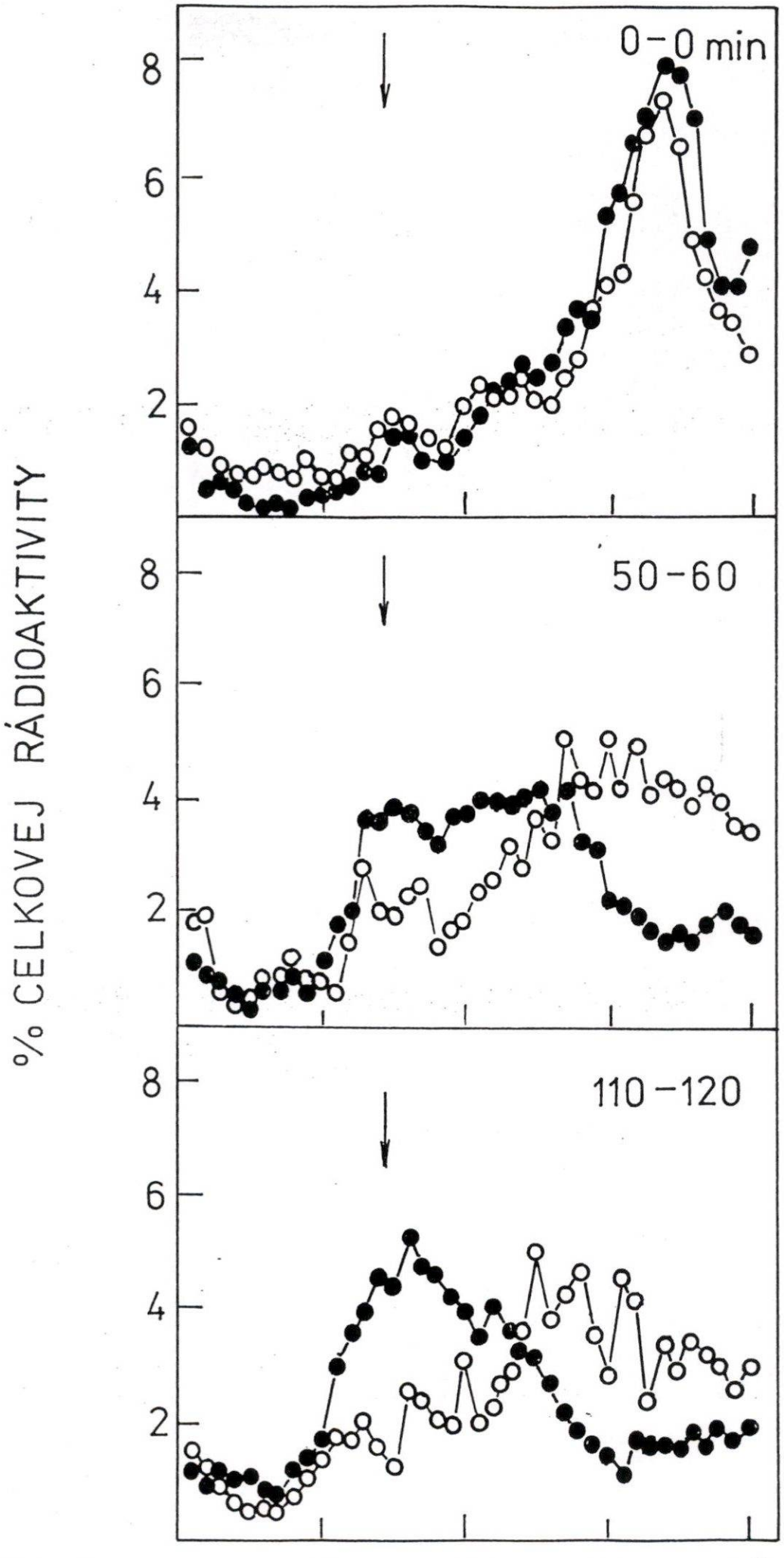
Zvyšujúca sa frekvencia výskytu mutácií v dedičnom základe somatických i zárodočných buniek je celosvetovým problémom. V súčasnosti je snaha riešiť ho obmedzovaním škodlivých faktorov v prostredí, predovšetkým v potravinách, v ovzduší, pôde a vodných zdrojoch. Perspektívne sa bude riešiť prenosom reparačných génov s cieľom zvýšiť na potrebnú úroveň reparačnú kapacitu organizmu, a tým aj jeho rezistenciu ku škodlivým faktorom. Poznatky o opravných systémoch a génoch, ktoré ich determinujú, majú preto dva základné spôsoby uplatnenia. Jednak umožňujú presnejšie určiť rizikovosť faktorov prostredia, jednak sú prípravou pre etapu, v ktorej sa oprava dedičného základu organizmu bude riešiť metódami génového inžinierstva.



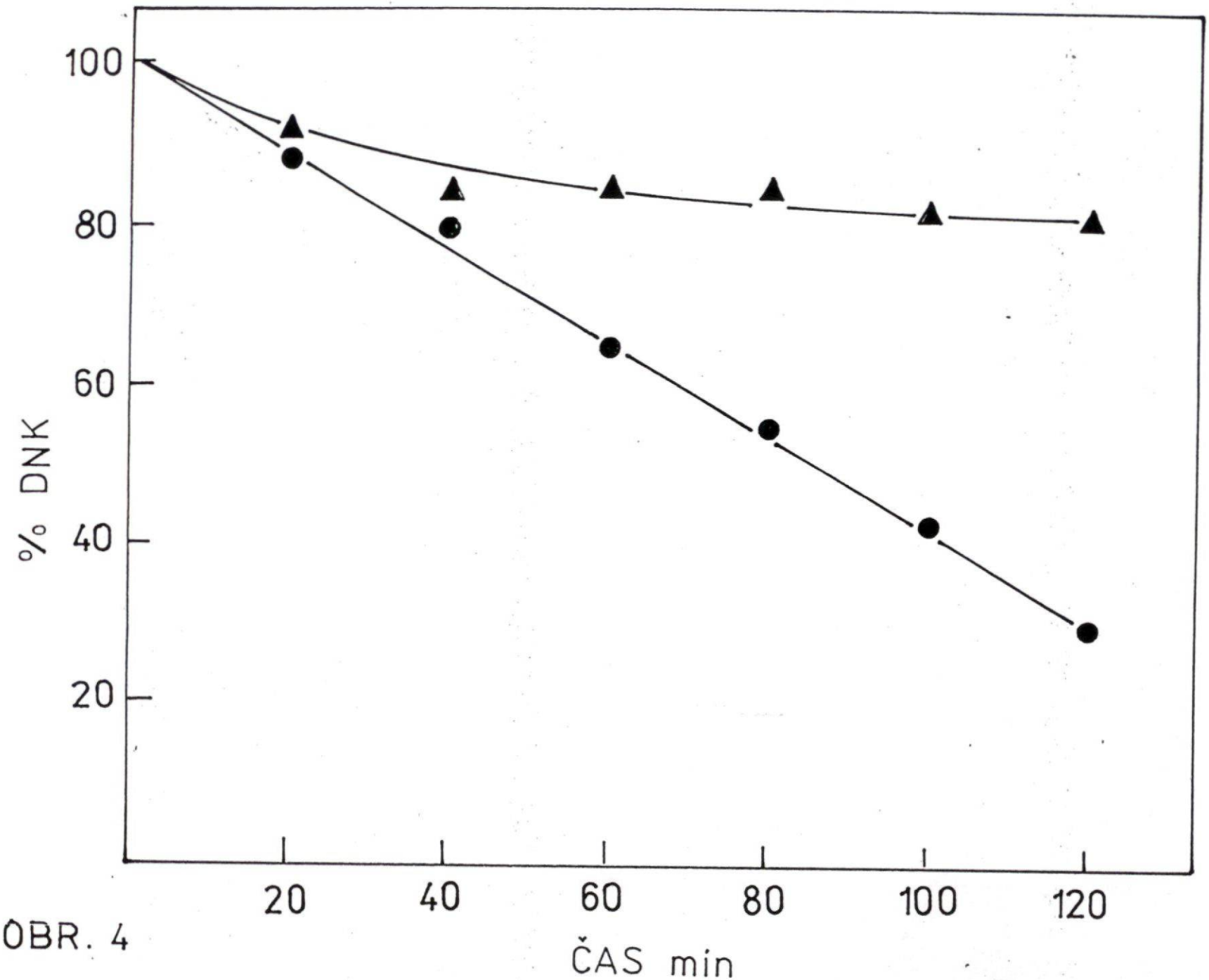
OBR. 1



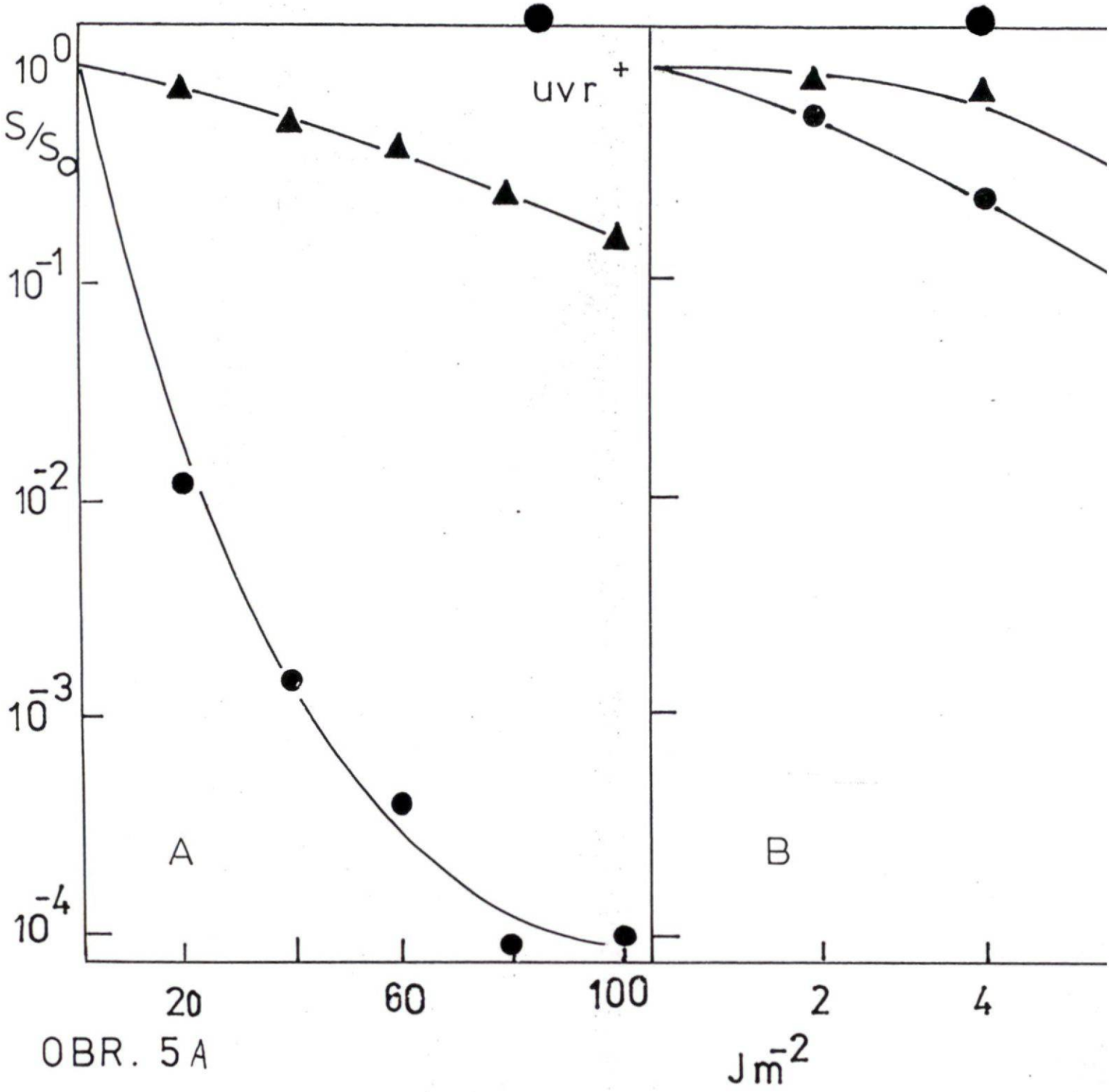
OBR. 2


0-0 min
50-60
110-120
8
6
4
2
% CELKOVEJ RÁDIOAKTIVITY
Dno
10
20
30
40
ČISLO FRAKCIE

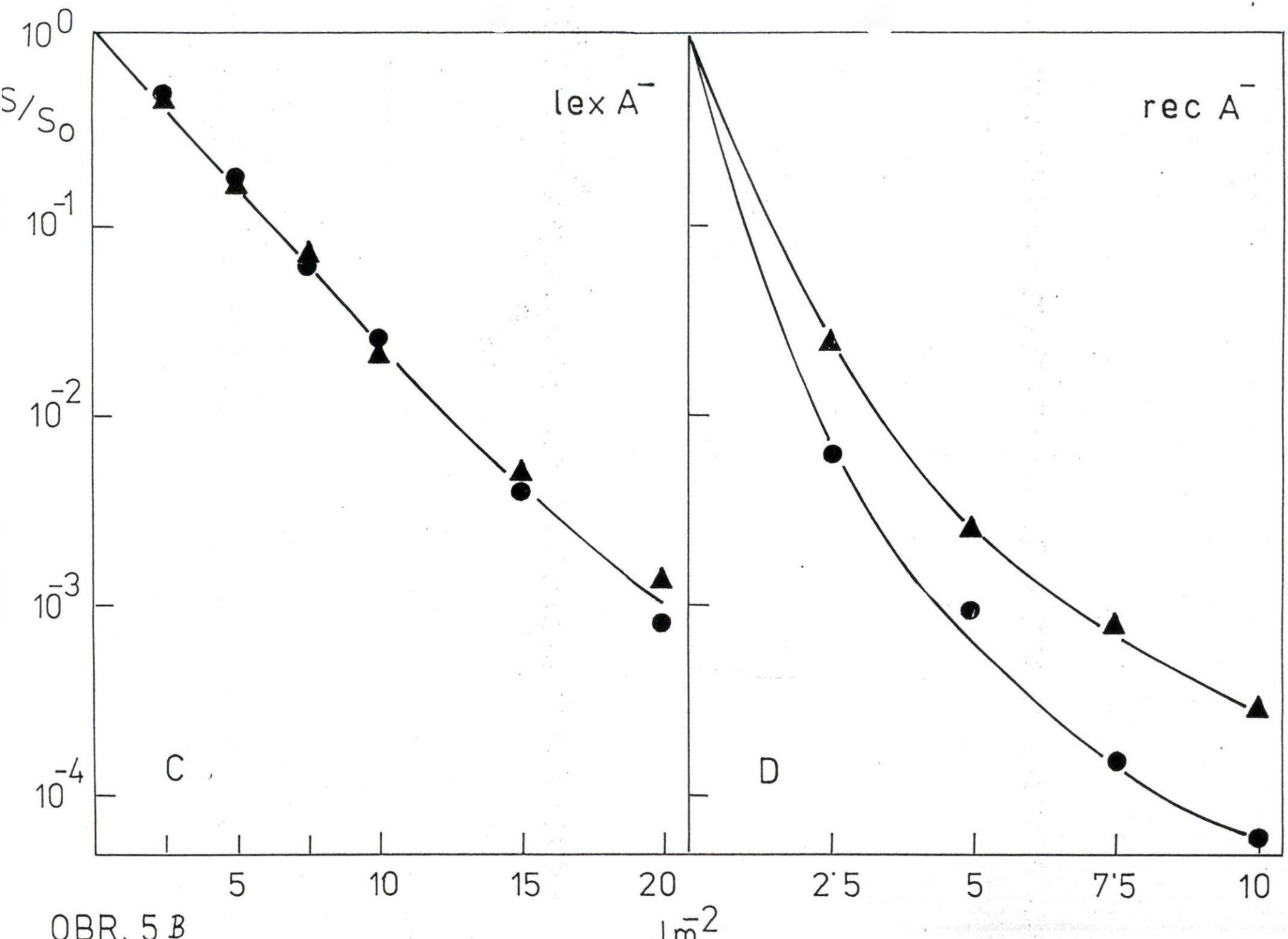
OBR. 3



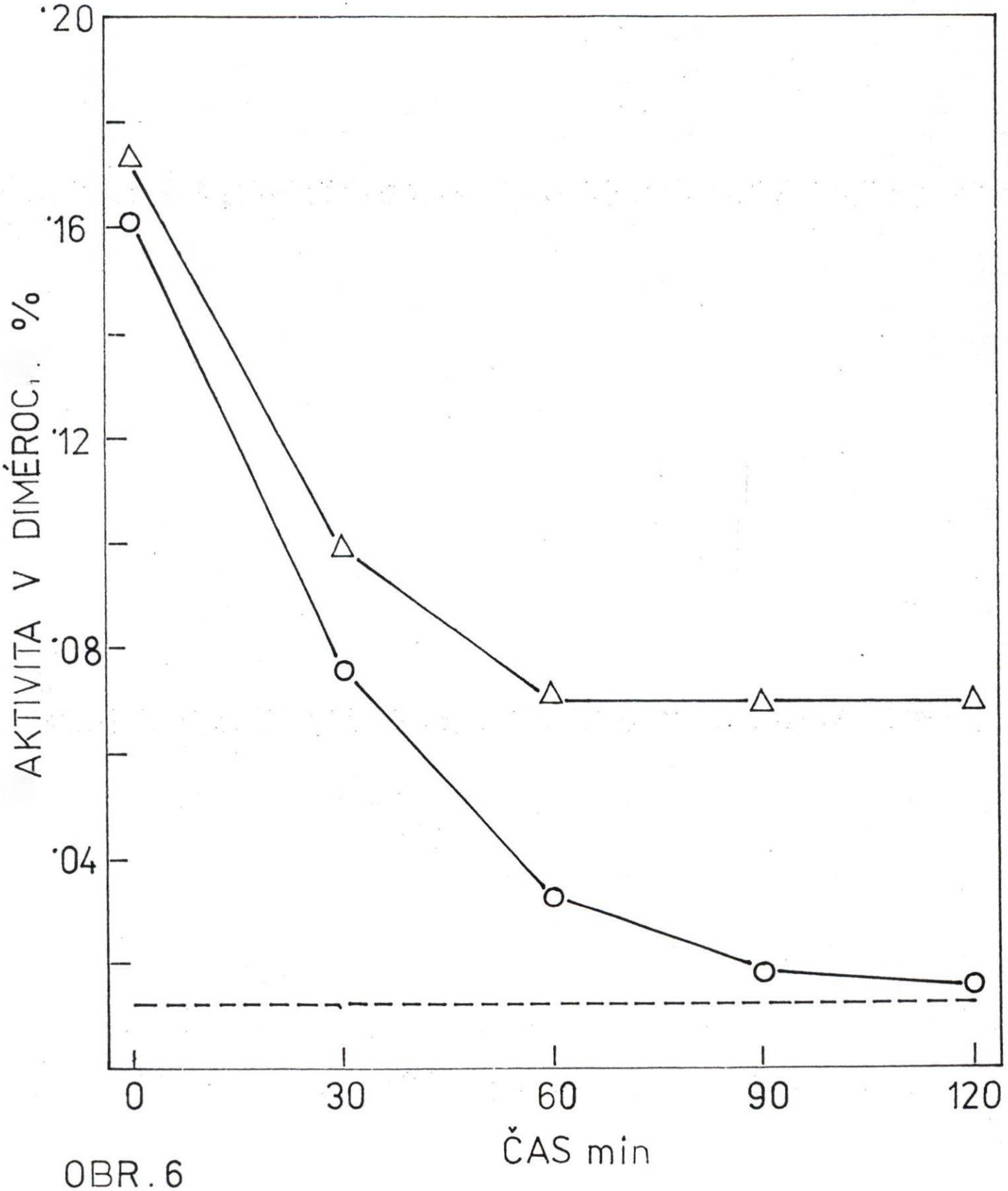
OBR. 4



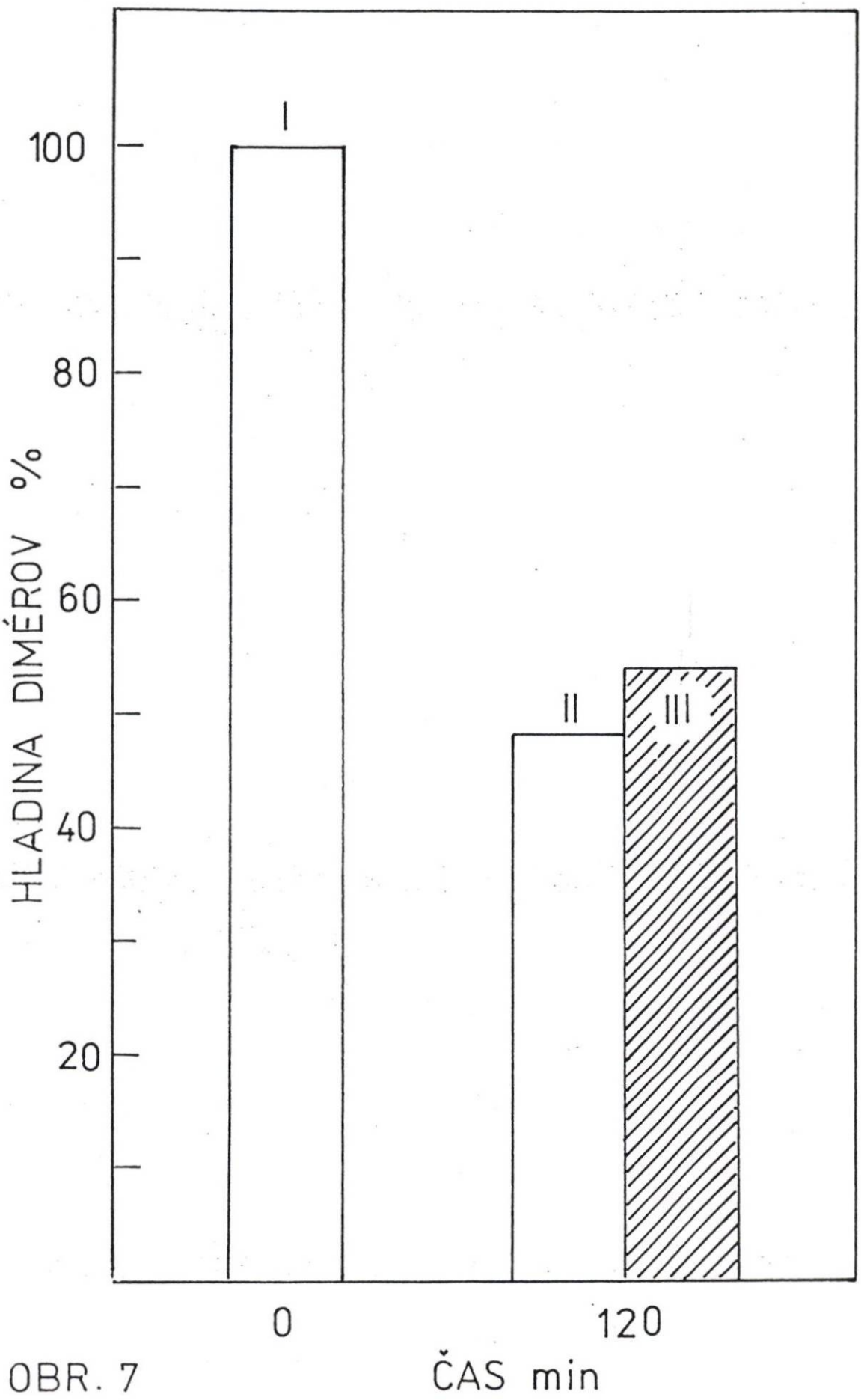
OBR. 5A



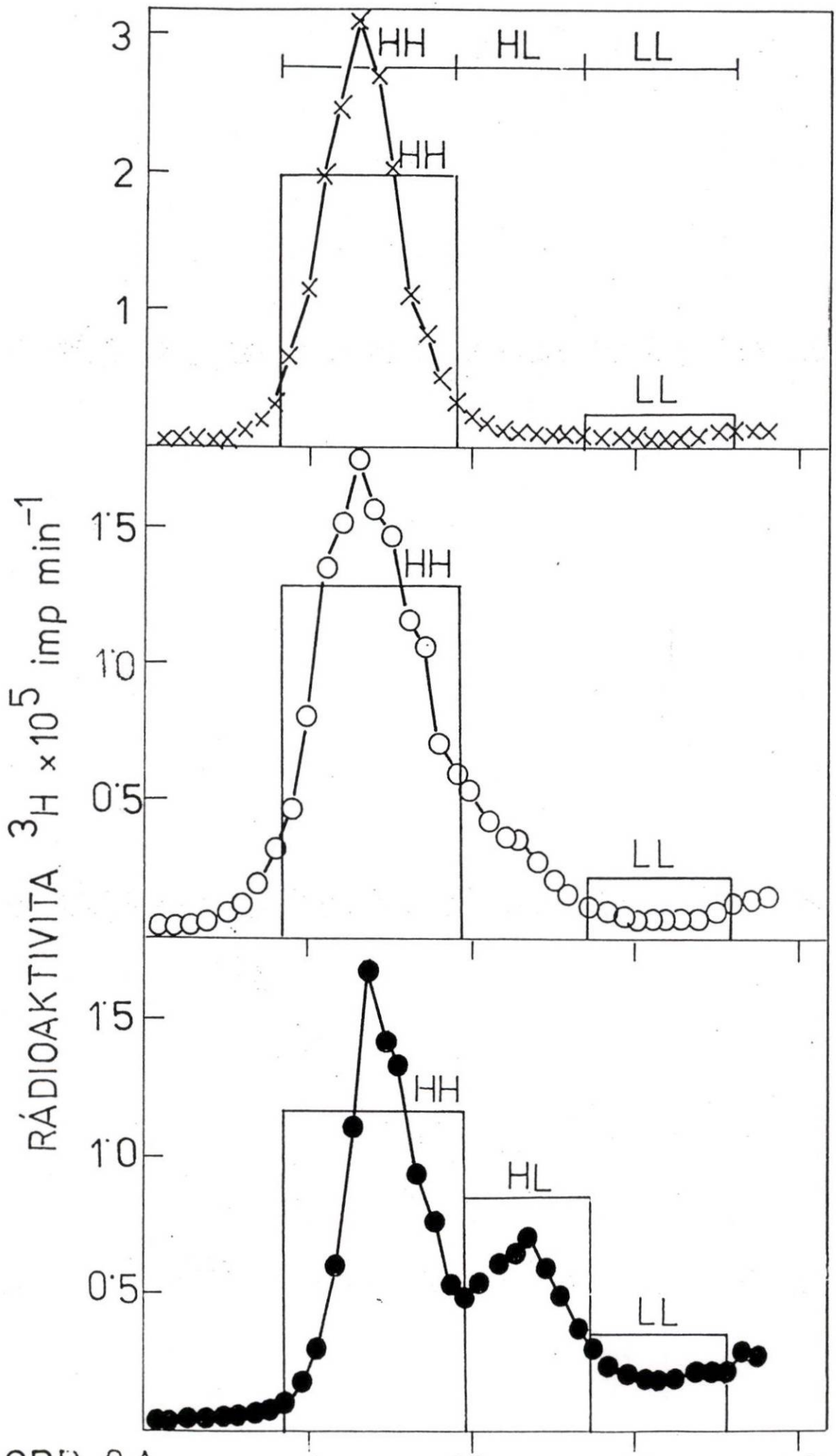
OBR. 5 *B*



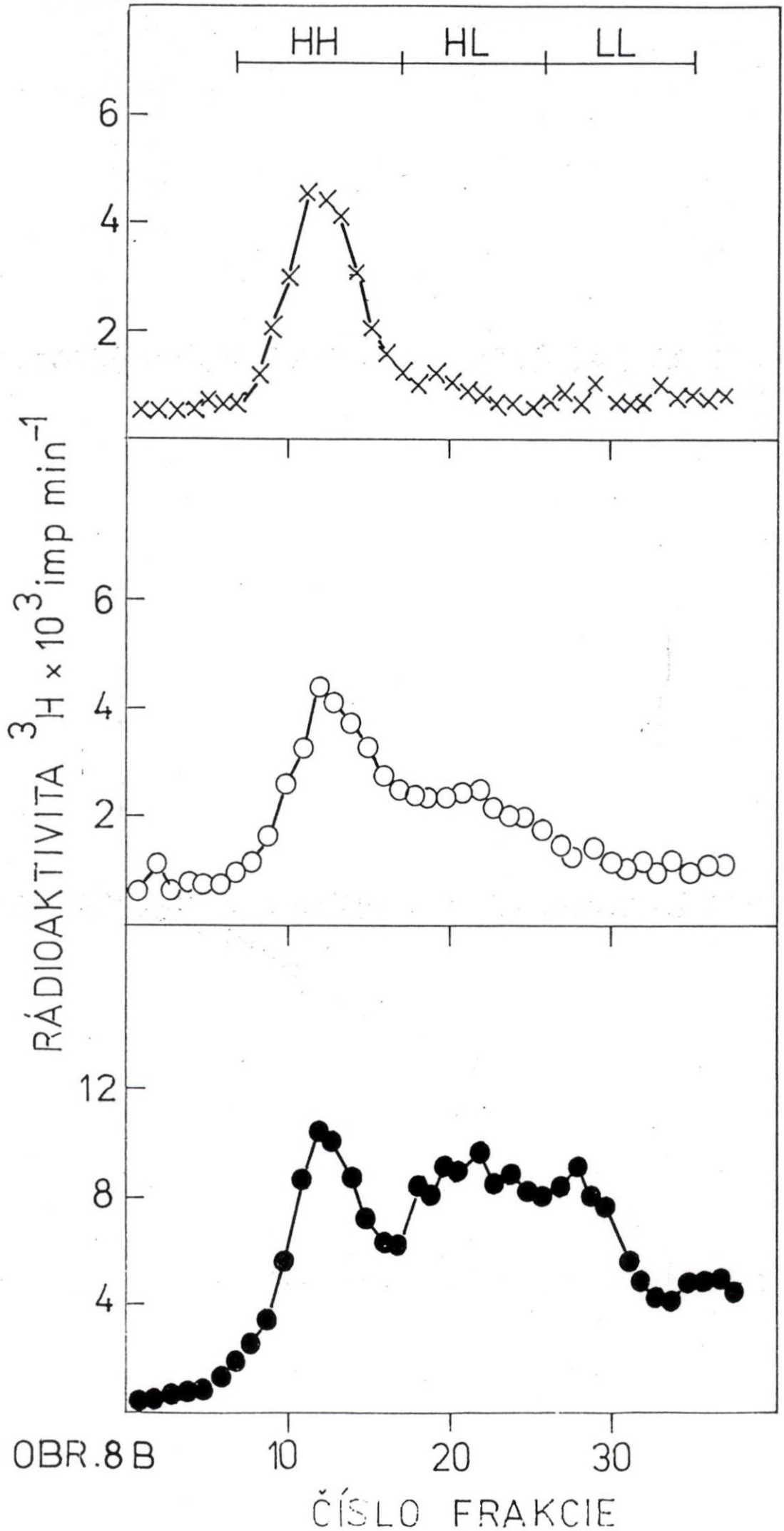
OBR. 6



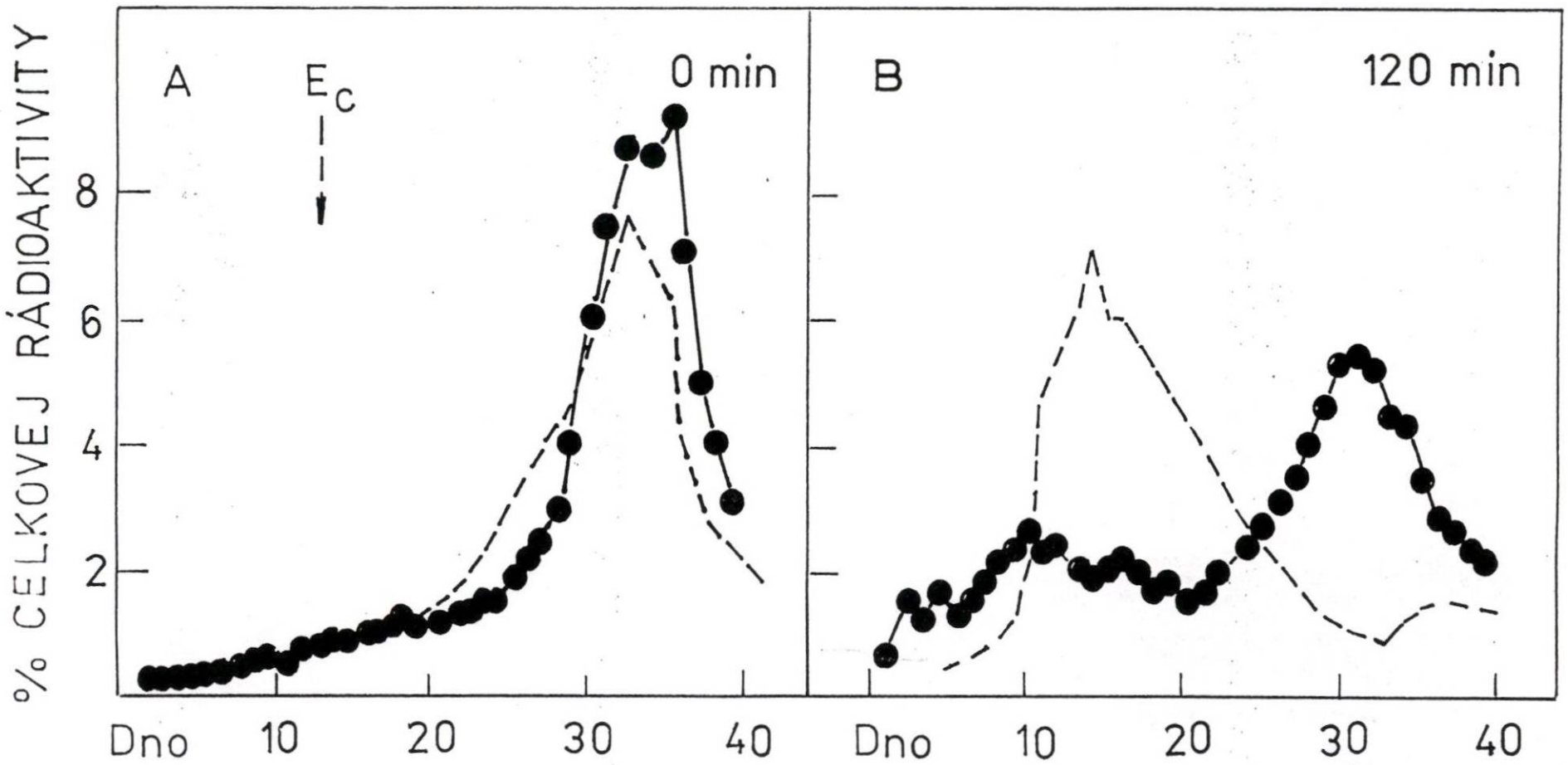
OBR. 7


HH
HL
LL
HH
LL
HH
LL
HH
HL
LL
3
2
1
1·5
1·0
0·5
1·5
1·0
0·5
RÁDIOAKTIVITA $^{3}H \times 10^{5}$ imp min^{-1}
10
20
30
40
ČÍSLO FRAKCIE

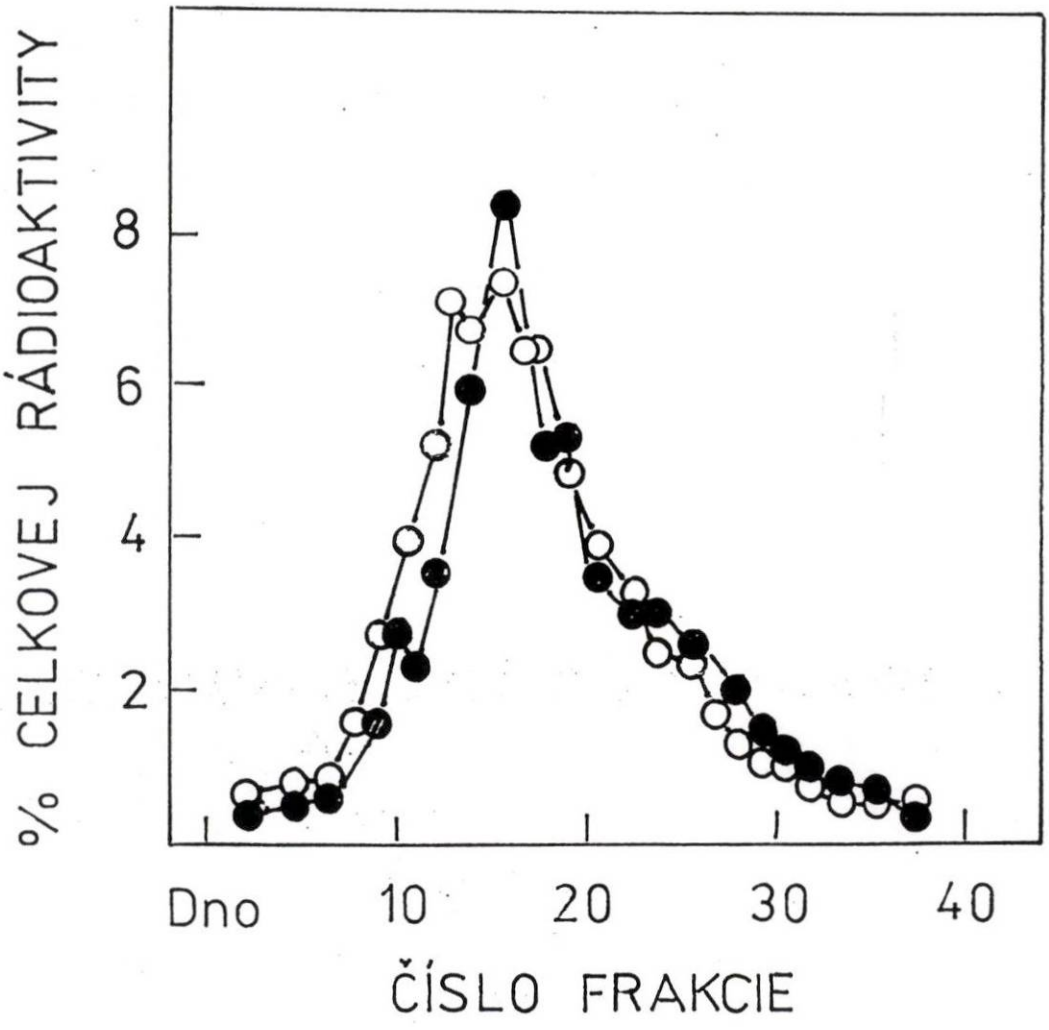
OBR. 8 A


HH
HL
LL
6
4
2
6
4
2
12
8
4
RÁDIOAKTIVITA $^{3}H \times 10^{3}$ imp min^{-1}
10
20
30
ČÍSLO FRAKCIE

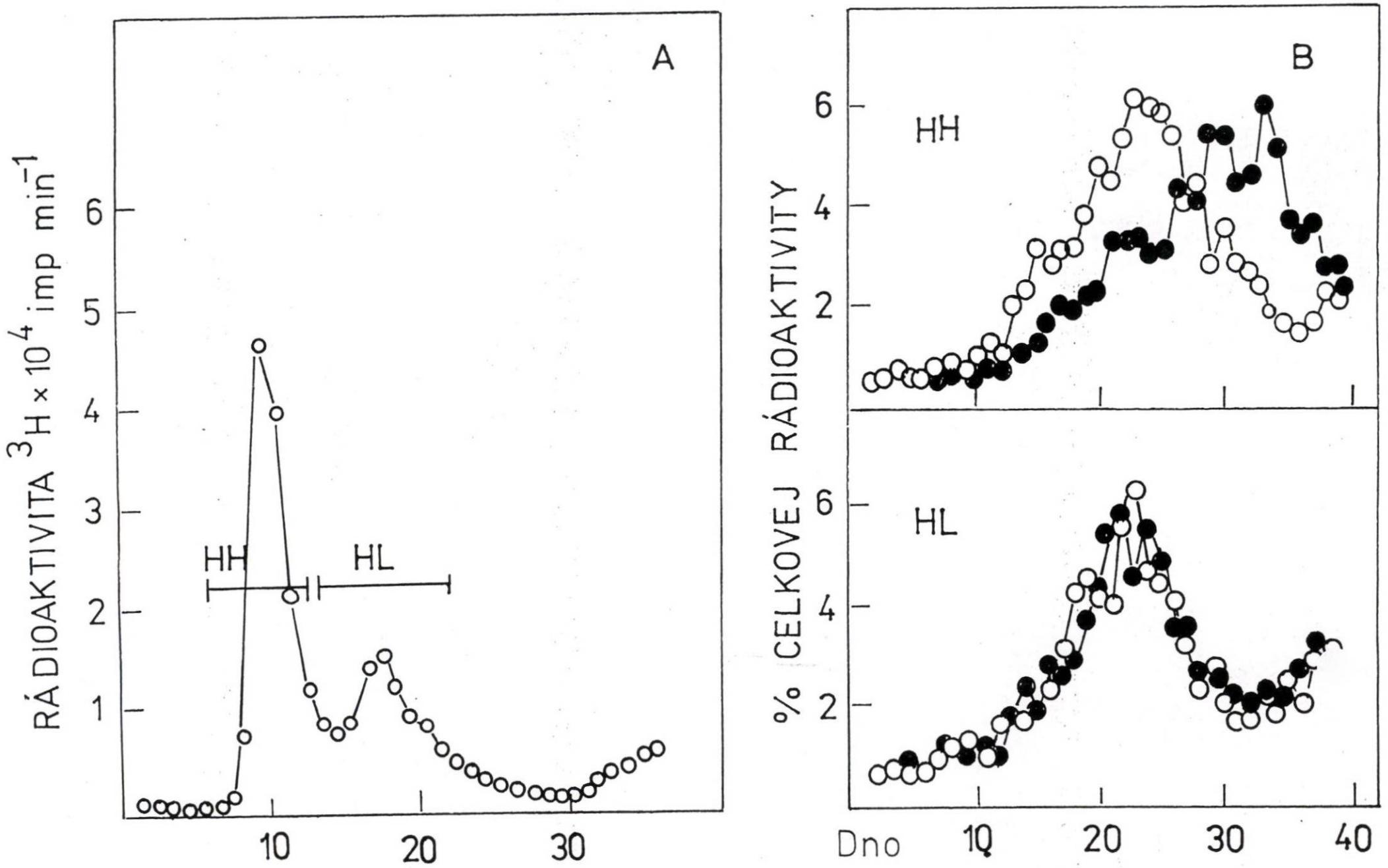
OBR.8 B


A
E_C
0 min
B
120 min
% CELKOVEJ RÁDIOAKTIVITY
2
4
6
8
Dno
10
20
30
40
Dno
10
20
30
40
ČÍSLO FRAKCIE

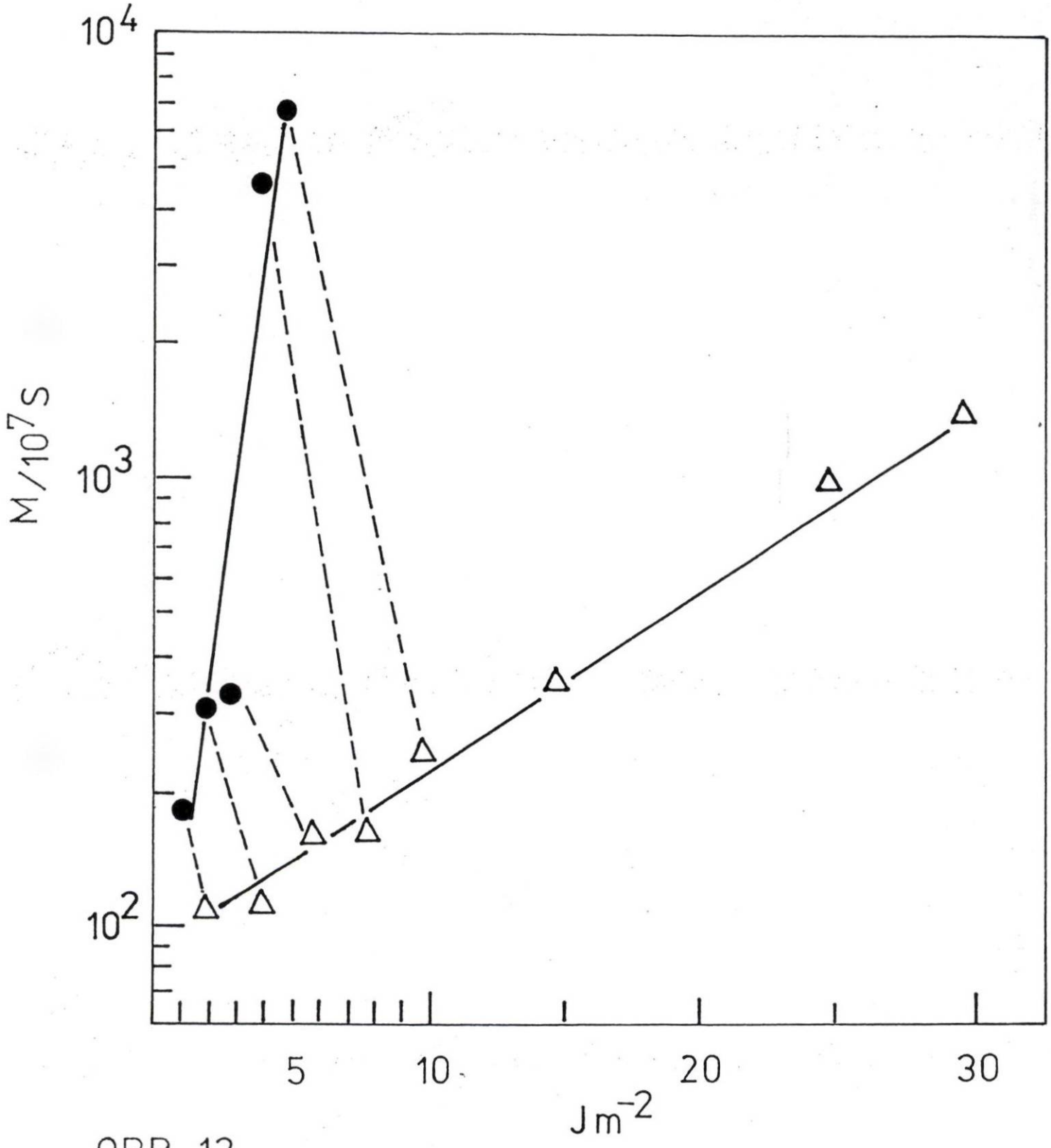
OBR. 9



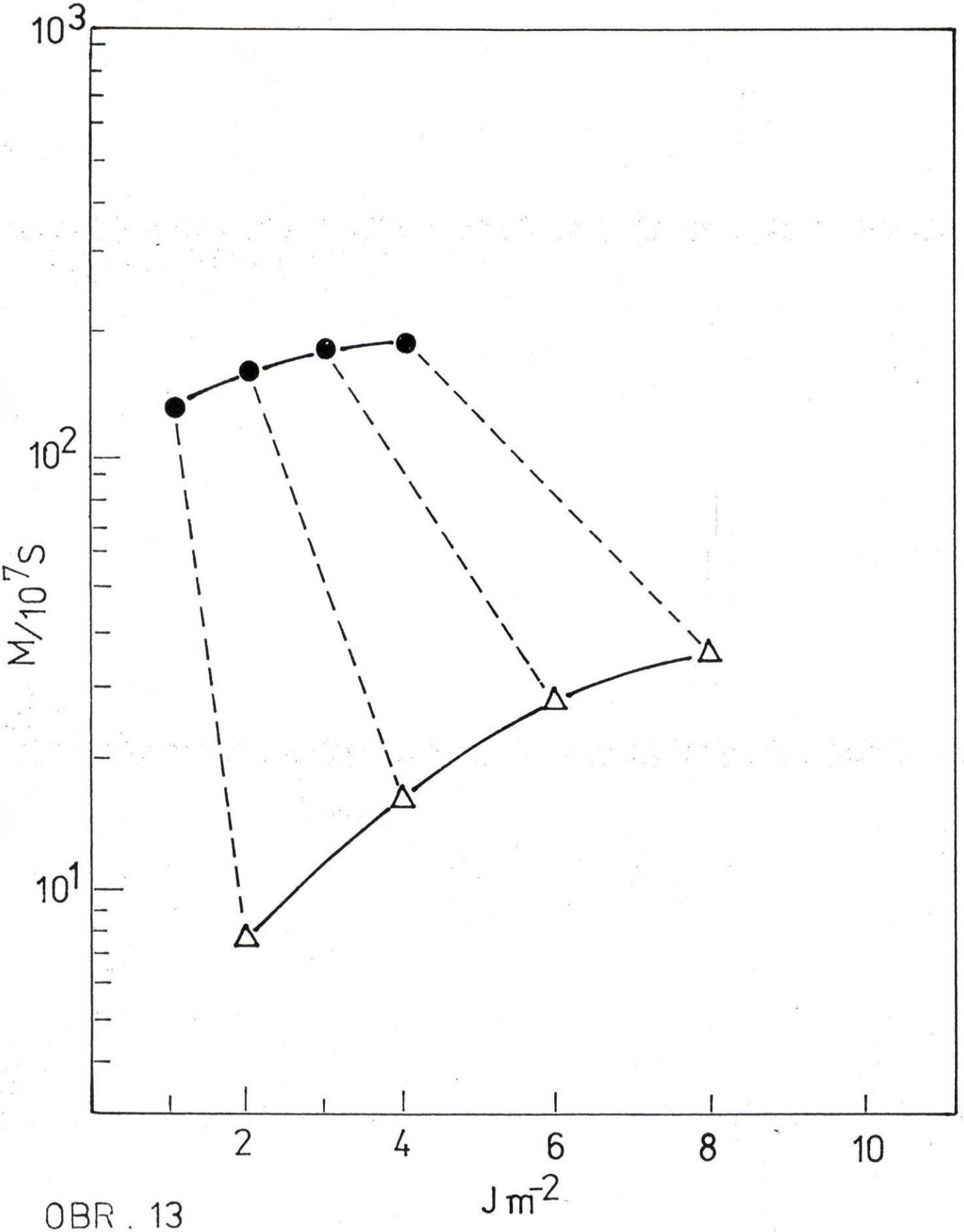
OBR. 10


A
B
RÁDIOAKTIVITA $^{3}H \times 10^{4}$ imp min^{-1}
% CELKOVEJ RÁDIOAKTIVITY
HH
HL
HH
HL
1
2
3
4
5
6
10
20
30
40
Dno
ČÍSLO FRAKCIE

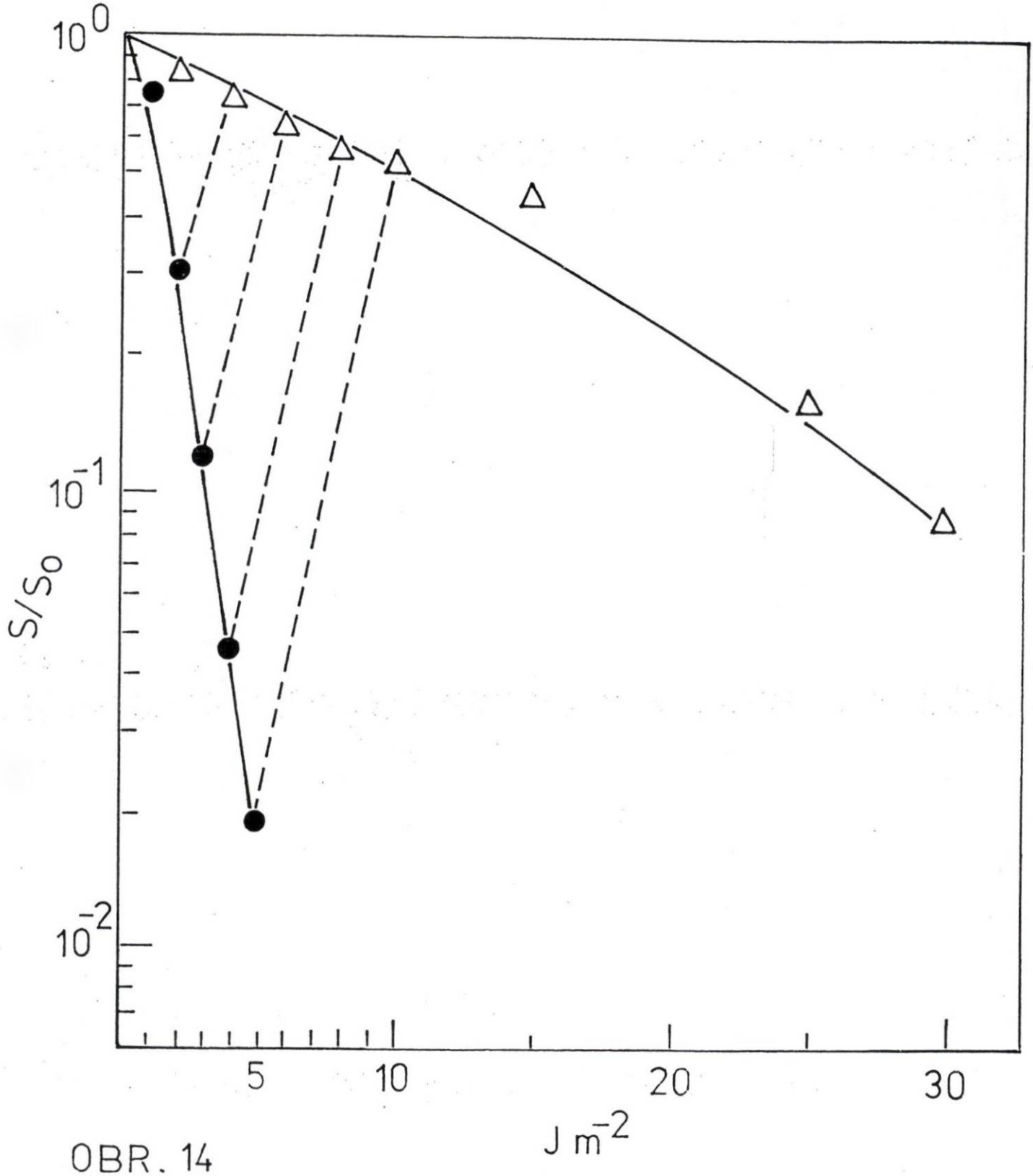
OBR. 11



OBR. 12



OBR. 13



OBR. 14