616—001.28:616.153[:577.158.7.024]]-092.9

ZMĚNY AKTIVITY KREVNÍ KATALASY U OZÁŘENÝCH ZVÍŘAT

Podplukovník MUDr. Josef ŠVEDA a podplukovník MUDr. Jan ZÁCHVĚJ

Věnováno k 60. narozeninám prof. MUDr. Sc. Dr. Jana Baštecképo, přednosty radiologické kliniky lékařské fakulty KU v Hradci Králové

Při plnění úkolů, jak zlepšit a rozšířit možnosti laboratorní diagnostiky nemoci z ozáření, rozhodli jsme se ověřit literární údaje o změnách aktivity krevní katalasy v krvi ozářených zvířat. Pro naše rozhodnutí použít této metody byla důležitá ta okolnost, že ionisující záření vyvolává ve vodním prostředí vznik peroxydu vodíku, který je pro organismus prudkým jedem. Katalasa rozkládá peroxyd vodíku, a tím zbavuje organismus této škodliviny.

Feinstein, Gladys a Catter (1) zjišťovali v r. 1954 vliv inhibice katalasy na toxicitu H_2O_2. Toxicita peroxydu vodíku silně vzrůstala po předběžné aplikaci inhibitorů katalasy. Rovněž předběžné ozáření zvyšuje letalitu po intraperitoneálně podaném H_2O_2. Lze to vysvětlit jako důsledek potenciace dvou škodlivých účinků, záření a peroxydu vodíku, nebo tím, že došlo ozářením organismu k poškození katalasy nebo k poruše její synthesy. Některé literární údaje o zvýšení aktivity krevní katalasy po ozáření dovolují však dělat opačné závěry, že ozáření vyvolává zvětšenou adaptační synthesu katalasy v důsledku zvýšení obsahu H_2O_2 v organismu.

Už první práce Goldsteina a Neworoschkina (2) z r. 1930 uvádí, že po lokálním ozáření dochází u lidí ke zvýšení aktivity katalasy. Tato změna však je závislá na ozařovaném orgánu. Největší zvýšení bylo zaznamenáno po ozáření lymfatického aparátu, štítné žlázy a míchy. Rovněž Forsberg, jak uvádí Euler (3), pozoroval po ozáření slabě vyznačené zvýšení katalasy in vivo.

Feinstein a Butler (4) – (1950) naopak zjistili, že aktivita katalasy u myší se značně snižuje do 24 hod. po celotělovém ozáření, vrací se k normálním hodnotám okolo 48 hod. a klesá konečně na velmi nízké hodnoty za 5 až 7 dnů. Japonští autoři rovněž pozorovali inaktivaci katalasy, a to u myší po injekci králičího séra odebraného 1. až 5. den po ozáření. Kuzin (5) považuje snížení aktivity katalasy za vhodný indikátor ozáření organismu a použil této metody k průkazu existence toxinů v krvi ozářených myší. Po převodu krve z ozářené myši do zdravé zjišťoval snížení aktivity katalasy pokusné myši. Uvádí snížení aktivity během prvních 6 dnů o 30 %.

Metodika

Katalasa byla stanovena podle Bacha titrací manganistanem draselným katalasou nerozloženého peroxydu vodíku.

Reagencie: 1% roztok H_2O_2
10% roztok H_2SO_4
0,1 n roztok $KMnO_4$

Roztok krve v poměru 1 : 1000 získán smíšením 20 ccm krve s 20 ml destilované vody. Z tohoto roztoku se odebere 1 ml, přidá se 2 ml 1% roztoku H_2O_2 a po 30 min. se přidá 3 ml 10% H_2SO_4. Poté se titruje 0,1 n roztokem $KMnO_4$ až do trvalého slabě růžového zbarvení. Množství použitého hypermanganu se odečte od množství hypermanganu použitého k titraci kontroly, která se získá stejným postupem, jen roztok krve se krátce povaří za účelem inaktivace

fermentu. K titraci kontroly se spotřebuje přibližně stejné množství hypermanganu jako při titraci 2 ml roztoku H_2O_2 + 3 ml H_2SO_4. Rozdíl se násobí 1,7; tím získáme katalasové číslo odpovídající množství rozloženého peroxydu vodíku v miligramech.

Předběžné pokusy

Abychom vybrali nejvhodnější druh pokusných zvířat, provedli jsme vyšetření katalasy u psů, králíků, krys, myší a opic. Získali jsme tyto průměrné hodnoty:

psi	0,9
myši	3,0
krysy	6,0
králíci	7,0
opice	15,5

Pro srovnání jsme vyšetřovali i lidskou krev a zjistili jsme průměrnou hodnotu 15,0. Tento nález je v souladu s údaji v literatuře (2). Psy jsme nepovažovali za vhodná zvířata pro nízké hodnoty aktivity katalasy a opice pro malý počet jedinců, které jsme měli k disposici. U jednotlivých druhů zvířat byl zaznamenán velký rozptyl získaných hodnot. Uvažovali jsme proto o chybách, které by mohly výsledky ovlivňovat. Prověřili jsme faktor teploty, světla a doby, po kterou reakce probíhala. Zajistili jsme přesný odběr krve a její ředění. Krev pokusných zvířat byla odebírána vždy ve stejnou denní dobu.

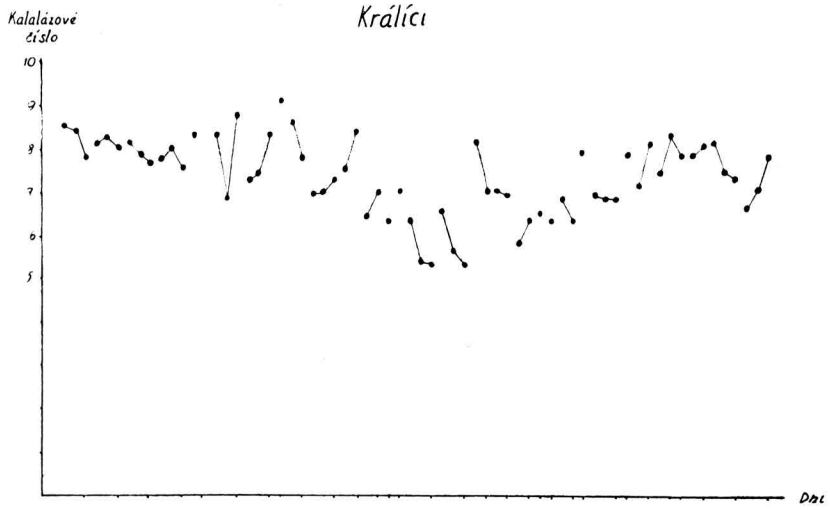
U 10 králíků byla prováděna vyšetření 3× denně v dvouhodinových intervalech a zjištěno značné kolísání hodnot, což je patrno z grafu č. 1.

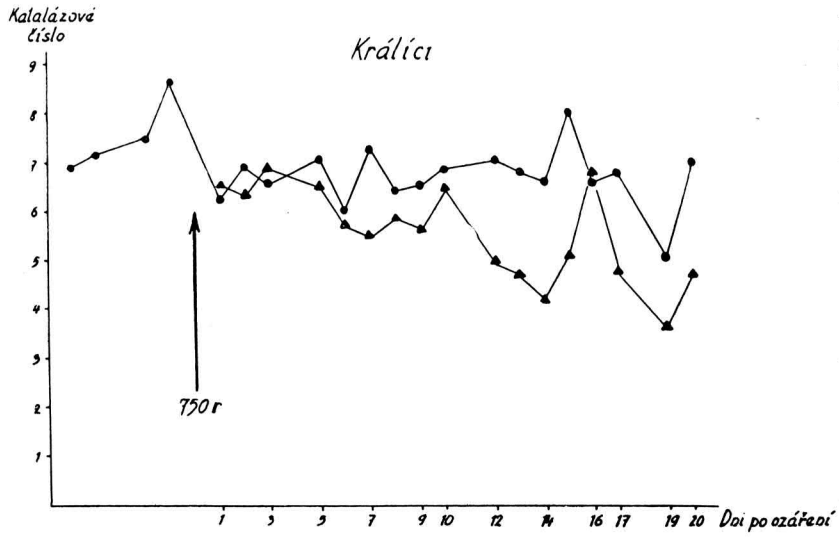
V grafu jsou uvedeny průměrné hodnoty aktivity katalasy u králíků. Mimo rozdíly hodnot získaných v 2hodinových intervalech jsou z grafu patrny i rozdíly hodnot v jednotlivých dnech, kdy můžeme odečíst maximální průměrné hodnoty 9 a minimální 5,5.

Vlastní pokusy

Myši byly ozařovány ve skupinách po 5, krysy ve skupinách po 3, králíci jednotlivě. Použito přístroje Super-Sanax. Dávka u myší a krys 600 r, u králíků 750 r při 180 kV, 15 mA, ohnisko 60 a 80 cm.

Celkem zpracováno 120 zvířat v 10členných skupinách. Z každé skupiny bylo 6 zvířat pokusných, 4 kontrolní. Hodnocení bylo prováděno v těchto 10členných skupinách a v grafech jsou uváděny průměrné hodnoty. Statistické zpracování bylo provedeno Studentovým T testem.





Graf 1

Myši (graf č. 2)

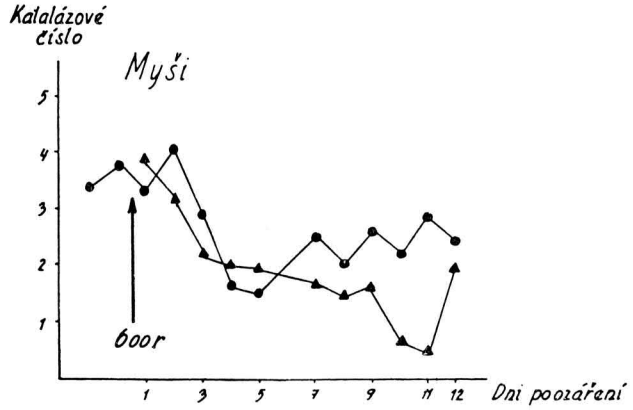
V grafu zpracovány výsledky ze dvou 10členných skupin. U kontrol byla zjištěna velká kolísání průměrných hodnot aktivity katalasy a k většímu poklesu došlo mezi 2. až 5. dnem. U pokusných zvířat došlo rovněž ke snížení hodnot, které sledují přibližně hodnoty kontrolní. Podstatné snížení hodnot u pokusných zvířat bylo zjištěno 10. až 11. den po ozáření, avšak statisticky významné jsou jen rozdíly hodnot z 11. dne.

Krysy (graf č. 3)

Křivka průměrných hodnot kontrolních u pokusných zvířat má u krys podobný průběh jako u myší. Rozdíly hodnot až do 9. dne nebyly statisticky významné. Teprve 10. den po ozáření je rozdíl statisticky významný pro P 0,05. Bylo to krátce před uhynutím zvířat.

Králíci (graf č. 1)

Křivka průměrných hodnot pokusných zvířat sleduje průběh křivky kontrol až do 10. dne, kdy se průměrné hodnoty pokusných zvířat snižují, ale nikdy v celém průběhu pokusu nebyly rozdíly statisticky významné. U ostatních skupin králíků probíhají křivky podobně a v žádném případě nebyla zjištěna statistická významnost rozdílů.



Graf 2



Graf 3

Diskuse

Literární údaje o aktivitě katalasy po ozáření můžeme rozdělit do dvou skupin. Do jedné skupiny patří údaje o zvýšení aktivity, do druhé skupiny údaje o snížení aktivity katalasy po ozáření. Práce Feinsteina a spol. nejvíce odpovídá skutečnému stavu. Tito autoři uvádějí snížení aktivity krátce po ozáření (24 hod.), poté vzestup k normálním hodnotám (48 hod.) a nový hluboký pokles za 5 až 7 dnů. Podobný fázový průběh jsme u jednotlivých zvířat často pozorovali i my, ale tato okolnost nevyniká v našem zpracování výsledků.

Na základě Kuzinovy práce jsme očekávali jednoznačný pokles aktivity katalasy, a proto jsme chtěli využít stanovení aktivity katalasy k diagnostickým účelům.

Už předběžné výsledky u neozářených zvířat vyvolaly v nás určitou pochybnost, která se v průběhu vlastních pokusů dále zvyšovala. Průměrné hodnoty jsou nepřesné pro velký rozptyl řad, z nichž byly získány. Snažili jsme se zjistit, jak rychle dochází ke změnám hodnot, a vyšetřování ve 2hodinových intervalech nás přesvědčilo o rychlých změnách hodnot aktivity katalasy. Nestálost hodnot je fysiologická a projevuje se to pak v širokém rozmezí normálních nálezů u zdravých zvířat. Balachovskij uvádí u králíků průměrné hodnoty s denním výkyvem ± 30 %. Balachovskij a Turbaba, kteří studovali vliv nervové soustavy a jejího podráždění na skladbu krve, uvádějí, že změny aktivity katalasy probíhají rychle. Rovněž častý odběr krve vyvolává kolísání hodnot aktivity fermentů. Vyšetření krve i v několikaminutových intervalech vykazuje rozdíly v nálezech katalasy.

Citlivost metody k rušivým vlivům a nepřesnosti v provádění titrace byly vyloučeny stanovením faktorů teploty, světla a doby od odebrání krve k jejímu zpracování a byl zajištěn vhodný peroxyd vodíku i šetrný odběr krve.

Jako výsledek zjištění byla brána hodnota katalasového čísla, která nerespektuje vztah katalasy k počtu erytrocytů. Avšak index katalasy, který získáme dělením katalasového čísla počtem erytrocytů v miliónech, se neprojevil v našich pokusech jako vhodnější a nezlepšil hodnocení výsledků.

Práce hodnocena z hlediska diagnostického využití této metody dala negativní výsledky, avšak ukázala nám, že vlastní zkušenosti při využívání literárních údajů jsou důležité a nutné.

Závěr

Některé literární údaje o změnách aktivity krevní katalasy po ozáření pokusných zvířat vybízely k využití těchto změn k diagnostickým účelům při akutní nemoci z ozáření. Nestálost hodnot u normálních zvířat, kolísání hodnot vyvolané nervovým podrážděním při odběru krve a poměrně malé změny aktivity katalasy, vyvolané ozářením, činí tuto metodu nevhodnou k diagnostice nemoci z ozáření.

Technická spolupráce:

Olga Pražáková a Hana Pauková

Písemnictví

1. *Fenstein, R. N., Catter, G. J., Hampton, M. M.:* Am. J. Physiol. 177, 156, 1954.

2. *Goldstein, M. J., Neworoschkin, J. P.:* Strahlentherapie, 36, 736, 1930.

3. *Euler, H. von, Hahn, L.:* Acta radiol., 27, 269, 1946.

4. *Feinstein, R. N., Butler, C. L., Hendley, D. D.:* Science, 111, 149, 1950.

5. *Kuzin, A. M., Artutjunova-Kalankarova, M. B.:* Doklady akademii nauk SSSR, Tom 105, No 6, 1955.