

612.014.469[:547.431.6]:612.35.015.2[:547.963.32].84

## VLIV S-YPERITU NA HLADINU KYSELINY DEOXYRIBONUKLEOVÉ, RIBONUKLEOVÉ A V KYSELINĚ ROZPUSTNÝCH NUKLEOTIDŮ V JÁTRECH INTOXIKOVANÝCH KRYS

Doc. MVDr. J. HRUŠOVSKÝ, CSc., MVDr. B. ZÍCHA, CSc., MVDr. J. BENEŠ  
Veterinární výzkumné středisko v Praze

Chemické sloučeniny — alkylační látky, ke kterým patří též S-yperit, jsou v poslední době intenzívně studovány. Vůči těmto látkám má význačnou afinitu celá řada biologicky důležitých substrátů. Speciální pozornost pak představují nukleové kyseliny vzhledem ke své centrální úloze při řízení látkové přeměny. Citlivost nukleových kyselin vůči alkylačním látkám a z ní vyplývající cytostatické, mutační a cytotoxické účinky jsou nyní obecně známy. I při značné afinitě biologických substrátů vůči alkylačním látkám se zdá, že řada biologických funkcí zůstává i po intoxikaci zachována a že intoxikovaný organismus je schopen tyto funkce i nadále regulovat kromě replikace buňky a syntézy kyseliny deoxyribonukleové (DNK). Zdá se proto, že diskrétní porucha v molekule DNK je teprve další metabolickou činností buňky jakoby zesilovačem potencována, až vede k zjistitelné funkční a morfologické změně. Inkorporační studie prokazují, že hladina DNK, ačkoliv je ve všech somatických buňkách téhož organismu prakticky stejná, liší se podstatně svou specifickou aktivitou pro jednotlivé tkáně a prekuzory. Senzitivní jsou především buňky s vysokou mitotickou aktivitou — velkou syntézou DNK. Na druhé straně bylo zajímavé, zda se projeví přímý účinek intoxikace na hladinu DNK i u buněk, které jsou převážně v interfázi, jako například v normálních játrech, a srovnat dále afinitu DNK a RNK vůči intoxikaci S-yperitem. Sledovali jsme proto hladinu DNK, RNK a rozpustných nukleotidů v játrech krys intoxikovaných S-yperitem, a to v různých časových intervalech po intoxikaci.

### Metodika

K pokusům jsme použili krys kmene Wistar. Zvířata byla krmena Larsenovou dietou a dostávala vodu ad libitum. Krysy byly intoxikovány S-yperitem v dávce 6,25 mg na 1 kg. ž. v. intraperitoneálně.

### Extrakce nukleových kyselin a nukleotidů

Krysy byly usmrceny dekapitací, ihned vyjmut vzorek jater a vychlazen v ledovém fyziologickém roztoku. Vzorek jaterní tkáně byl pak vysušen mezi dvěma filtračními papíry, ihned zvážen a navážka cca 150 mg ihned zpracována.

Extrakce nukleotidů a nukleových kyselin byla provedena metodou podle Cerriottiho (1). Odvážený roztok jaterní tkáně cca 150 mg byl 2× extrahován 10 ml éteru po dobu 15 minut za sou-

časného chlazení ledem a poté stejným způsobem 2× alkoholem. Supernatanty extraktů se zahodí. Zbytek tkáně byl opatrně vysušen fenem a v kyselinách rozpustné ribonukleotidy a deoxyribonukleotidy byly extrahovány 2× po 10 ml 2% ledově vychlazené kyseliny chloristé. V získaných extraktech bylo stanoveno množství ribonukleotidů a deoxyribonukleotidů. Zbytek tkáně byl dále extrahován 10% kyselinou chloristou při teplotě 70 °C po dobu 20 minut a v získaných extraktech pak stanovena kyselina deoxyribonukleová a ribonukleová (RNK).

### Stanovení kyseliny deoxyribonukleové

DNK byla stanovena difenylaminovým reagens v podstatě metodou podle Burtona (2).

Měřicí systém: 2 ml extraktu z jater + 4 ml difenylaminového reagens se temperuje při 30 °C po dobu 16 hodin a poté proměří při 600 nm. Koncentrace DNK se pak stanoví podle kalibrační křivky standardního roztoku DNK současně stanoveného pro každou pokusnou řadu.

Jako standard DNK (Fluka) byl připraven základní roztok 40 mg% rozpuštěný v 0,05 NaOH, dále smíchaný se stejným objemem 20% HClO<sub>4</sub> a zahříván při 70 °C po dobu 20 minut.

V kyselinách rozpustné deoxyribonukleotidy byly stanoveny stejným způsobem jako DNK a vyjádřeny v extinkčních jednotkách na 1 g vlhkých jater.

### Stanovení kyseliny ribonukleové a rozpustných ribonukleotidů

Kyselina ribonukleová a rozpustné ribonukleotidy byly stanoveny orcinolovým reagens podle Schneidera (3).

Měřicí systém: 2 ml chloristanového extraktu jater se smíchá s 2 ml orcinolového reagens, směs se zahřívá na vroucí vodní lázni 20 minut, ochladí a ihned proměří při 660 nm. Paralelně s jaterními extrakty se stanoví kalibrační křivka na standardní roztok RNK, a to do koncentrace 50 mg RNK na 1 ml.

Statistické hodnocení výsledků bylo provedeno t-testem.

Standardní roztok RNK se připraví stejným způsobem jako standard DNK.

### Výsledky a hodnocení

Vliv intoxikace S-yperitem v dávce 6,25 mg na 1 kg ž. v. byl sledován na skupinách krys, a

to 6, 12, 24, 48 a 72 hodin po aplikaci. Hladina kyseliny deoxyribonukleové se v prvních hodinách po intoxikaci signifikantně nemění, ale již 24 hodin po podání yperitu je pozorován významný pokles, který se v dalším časovém průběhu neustále zvětšuje. Hladiny DNK a vliv podání yperitu na DNK jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Vliv intoxikace S-yperitu na hladinu kyseliny deoxyribonukleové v krysích játrech (mg DNK na 1 g vlhkých jater)

Kontrola	S-yperit v dávce 6,26 mg/1 kg ž. v.					
	6 hod.	12 hod.	24 hod.	48 hod.	72 hod.	
5,08 ±0,26	5,02 ±0,24	4,79 ±0,28	4,71 ±0,16	4,55 ±0,23	4,06 ±0,42	x δ
8	7	8	8	8	8	n
—	0,8	1,7	5,9	6,4	15,1	t
—	—	—	0,01	0,01	0,01	P

x = střední hodnoty; δ = standardní odchylka; n = počet zvířat ve skupině; t = hodnota t-testu; P = pravděpodobnost významnosti v rel. %

Vliv S-yperitu na hladinu DNK a rozpustných deoxyribonukleotidů v krysích játrech

A = DNK v mg/g tkáně

B = deoxyribonukleotidy (vyjádřeno jako množství extinkčních jednotek difenylaminového chromogenu) v 1 g tkáně

Tabulka 2

Vliv intoxikace S-yperitem na hladinu kyseliny ribonukleové a v kyselinně rozpustných ribonukleotidů v krysích játrech

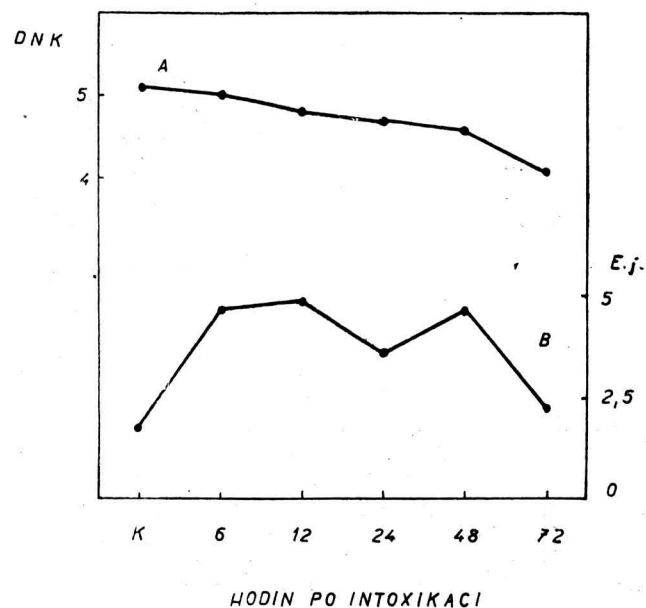
Kontrola	S-yperit v dávce 6,25 mg na 1 kg ž. v.					
	6 hod.	12 hod.	24 hod.	48 hod.	72 hod.	
(mg RNK na 1 g vlhkých jater)						
10,07	14,07	13,77	20,76	14,19	15,69	x
1,62	1,20	1,06	4,80	1,90	2,00	δ
8	8	7	7	7	8	n
—	21,3	12,5	29,6	14,5	18,1	t
—	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	P
(mg nukleotidů na 1 g vlhkých jater)						
4,71	5,30	5,92	7,56	5,58	6,73	x
0,32	0,15	0,26	0,37	0,29	0,31	δ
7	7	7	6	7	7	n
—	3,4	10,1	28,5	5,4	10,0	t
—	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	P

x = střední hodnoty; δ = standardní odchylka; n = počet zvířat ve skupině; t = hodnota t-testu; P = pravděpodobnost významnosti v rel. %

Naproti tomu jsme pozorovali zcela jiný obraz v hodnotách kyseliny ribonukleové. Na rozdíl od DNK je již v intervalu 6 hodin po intoxikaci pozorován statisticky významný vzestup kyseliny ribonukleové v játrech. Zvýšení dosahuje maxima 24 hodin po intoxikaci a hladina RNK zůstává ve všech sledovaných intervalech stále významně zvýšená. Paralelně s hodnotami RNK se zvyšují po intoxikaci S-yperitem také hladiny v kyselinně rozpustných ribonukleotidů, jak je patrné z tabulky 2.

Protože jaterní tkáň je mitoticky málo aktivní a procento buněk, ve kterých probíhá syntéza DNK, je velmi malé, nelze snížení hladiny DNK vysvětlit jako zástavu syntézy DNK, ale jako přímý vliv bialkylační látky na již vytvořenou DNK, která poté, jako metabolicky inaktivní, je organismem degradována. To by znamenalo, že s poklesem hladiny DNK by se mělo zvyšovat množství v kyselinně rozpustných deoxyribonukleotidů. Vzájemná závislost hladiny deoxyribonukleotidů a kyseliny deoxyribonukleové je uvedena na grafu 1. Z grafu je patrné, že pokles hladiny kyseliny deoxyribonukleové je doprovázen zvýšením hladiny deoxyribonukleotidů.

Graf 1



Zvýšení hladiny kyseliny ribonukleové pozorované v našem pokusu odpovídá nálezům Talageriho a spol. (4). I když ze stanovení hladiny RNK nelze říci, která složka ribonukleových kyselin je postižena — messenger, ribosomální RNK, nebo transfer RNK —, domníváme se, že zásadní rozdíl vlivu S-yperitu na DNK a RNK spočívá v tom, že cross-linking efekt bialkylačních látek, jako je S-yperit, se projevuje především u DNK, která vytváří spirálovou dvojitnici a neprojevuje se inhibičně, a RNK, která má jednoduchou spirálu.

Zvýšení deoxyribosidů dobře odpovídá zvýšení Dische-positivních látek v moči, jak jsme popsali dříve (5).

**Závěr**

Po intoxikaci S-yperitem klesá významně hladina DNK v játrech a současně se zvyšuje hladina deoxyribosidů.

Hladina RNK se naopak po intoxikaci významně zvyšuje.

Je vyslovena domněnka, že u buněk v inter-fázi, jako je jaterní tkáň, dochází k přímému cross-linking již vytvořené DNK, která je dále organismem štěpena, čemuž odpovídá zvýšení deoxyribosidů.

**Literatura**

1. Ceriotti, G.: Determination of nucleic acids in animal tissues. *J. biol. Chem.* 214, 1955, 1: 59—70.
2. Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62, 1956, 2: 315—323.
3. Schneider, W. C.: Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. In: *Methods of Enzymology*. Edit.: S. P. Colowick a N. O. Kaplan. New York, Academic Press 1957, s. 680—684.
4. Talageri, V. R., Samarth, K. D., Baxi, A. J.: *Proc. Ind. Acad. Sci.* 61, 1962: 259.
5. Hrušovský, J., Zícha, B., Prokšová, M.: Sledování intenzity vylučování D-látek u krys po yperitu. *Voj. zdrav. Listy* 1965, Sborník č. 2, s. 45—46.