

616-001.28-07-08-092.22:577.1

MOŽNOSTI VYUŽITÍ NĚKTERÝCH BIOCHEMICKÝCH INDIKÁTORŮ PŘI DIAGNOSTICE A POSOUZENÍ ÚČINNOSTI TERAPIE RADIAČNÍHO POŠKOZENÍ

RNDr. Jan ŠIMŠA, CSc., pplk. doc. MUDr. Pavel KUNA, CSc., RNDr. Miloš TICHÝ, CSc.,

plk. doc. MUDr. Pavel PETÝREK, CSc., plk. doc. MUDr. Milan DOSTÁL, CSc.

Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav JEP Hradec Králové

(náčelník: genmjr. prof. MUDr. Jaroslav Vaňásek, CSc.)

Věnováno k 65. výročí narození plk. prof. MUDr. Josefa Mráze, CSc.

1. Úvod a literární přehled

Možnostmi využití různých biochemických indikátorů pro stanovení diagnózy při nemoci z ozáření se zabývala v uplynulých asi 20 letech řada pracovníků.

Tento zájem byl vyvolán vzrůstajícím mírovým i vojenským využíváním jaderné energie a s tím související možnosti ozáření osob. Do určité míry se zde uplatnil i velký rozvoj, který biochemické vyšetřovací metody v uvedeném období prodělaly.

Vzhledem k rozsáhlosti příslušné literatury uvádíme pouze některé soubornější starší práce [1, 3, 7, 8]. Z novějších pak ty, které mají bližší vztah k námi sledované problematice.

Jelikož u různých zvířecích druhů jsou popisovány mnohdy značně odlišné biochemické projevy radiačního poškození, nepokoušíme se o interpretaci výsledků jednotlivých autorů a omezujeme se na stručný popis prací a získaných výsledků.

Podobný přístup jsme byli nuceni volit i v případě vlastních výsledků. V dané etapě práce nám šlo o posouzení vhodnosti či nevhodnosti různých biochemických vyšetření z hlediska použitelnosti pro cíle uvedené již v názvu této práce. Při výběru jednotlivých vyšetření jsme se orientovali na ta, která se v klinicko-biochemických laboratořích běžně provádějí.

I v rámci takto zúženého zaměření je pro nás prvořadou otázkou, které ze sledovaných ukazatelů nám mohou dát nějakou informaci ve smyslu shora uvedených kritérií (diagnóza, prognóza). Teprve na druhém místě stojí otázka, proč k těm či oněm změnám dochází. Odpovědi na ně většinou budou přesahovat možnosti našeho pracoviště a spadají spíše do kompetence specializovaných biochemických laboratoří. Je např. jistě velice zajímavé, proč u krys a králíků vede ozáření k poklesu aktivity alkalické fosfatázy (ALF) v séru, zatímco u psů nikoliv (viz dále). Nás by ovšem zajímalo, s jakým typem změn bychom se v obdobné situaci setkali u člověka. Zrovna v tomto směru nám však dostupná literatura neskýtá dostatek podkladů.

Je nutno alespoň rámcově vymezit kritéria, která by měl vhodný biochemický ukazatel radiačního poškození splňovat, jak je tato otázka rozebírána v práci Skalkovské [38]:

1. Citlivost v co největším rozsahu dávek ozáření;
2. Možnost stanovení v krvi, séru a moči;
3. Co největší specifická, hlavně s ohledem

na možná kombinovaná poškození (trauma, popálení apod.);

4. Pokud možno co nejmenší technická náročnost stanovení.

Je třeba říci, že biochemický indikátor radiačního poškození, který by splňoval všechna uvedená kritéria dosud nebyl nalezen a lze ztěžší předpokládat, že se tak stane v budoucnu. V této souvislosti by mohla vyvstát otázka, jaký smysl má tedy výzkum zaměřený na sledování biochemických změn po ozáření. Je ovšem třeba si uvědomit, že ani v běžné klinické praxi neposkytuje zpravidla provedení 1 či 2 biochemických vyšetření podklad pro dostatečně fundovanou diagnózu. K tomuto cíli je zpravidla nutné opakovaně provést více vyšetření, posoudit celkový klinický obraz apod. Podle druhu sledované látky je možno biochemická vyšetření po ozáření rozdělit zhruba na sledování:

- metabolitů
- enzymů
- tuků, cukrů
- bílkovin
- minerálů
- aminokyselin aj.

V nedávné době byly velké naděje kladeny na stanovení metabolitů nukleových kyselin (NK) v moči po ozáření. Jde o degradační produkty NK poškozených přímým účinkem záření pro citlivé (proliferující) buňky, hlavně lymfocyty. Byla pozorována poměrně dobrá korelace mezi exkrecí těchto látek do moči během prvních 24 hodin po ozáření a velikostí expozice. Výsledky se většinou opíraly o pokusy prováděné na krysách a myších. Při přechodu na větší zvířata (pes) se objevily metodické potíže, které spočívaly hlavně v tom, že exkrece uvedených metabolitů byla oproti krysám a myším podstatně nižší. Lze říci, že dodnes nedoznalo stanovení těchto látek širšího použití, mj. i pro jeho značnou metodickou komplikovanost a nutnost sběru moče prvních 24 h po ozáření. Na druhé straně jde ovšem o poměrně specifický ukazatel radiačního poškození. Podrobně se touto problematikou zabývá Fedorova aj. [6]. Vývoj moderních metod biochemické analýzy odstranil do značné míry pracnost dříve používaných postupů pro sledování metabolitů NK aj. Szabó aj. [39] popisují použití vysokotlaké kapalinové chromatografie pro separaci pseudouridinu a deoxycytidinu při jejich sledování v lidské moči. Obdobně Dudman aj. [4] popisují stanovení thymidinu, uridinu, deoxyuridinu, cytidinu/deoxycytidinu v plazmě tzv. RIA

metodou (radioimunologické stanovení). I když tyto metody představují podstatný pokrok, vyžadují na druhé straně použití relativně drahých aparatur s kvalifikovanou obsluhou.

Dalším metabolitem vyskytujícím se ve zvýšené míře v moči po ozáření je kreatin. Mechanismy vedoucí ke zvýšení jeho exkrece po ozáření jsou podrobně probírány v práci Thyagarjana aj. [46]. Je ovšem pravda, že nejde o ukazatel příliš specifický. Zvýšení kreatinurie, případně vzestup kreatinfosfokinázy v séru (CPK), je obecně pozorováno při různých svalových poškozeních, včetně dystrofických a nekrotických změn. Dombrowa aj. [5] popisuje stanovení aminokyseliny hydroxyprolinu v moči a séru pro obdobné účely. Nepozorovali však žádnou korelaci mezi hladinou hydroxyprolinu v moči a krvi a dávkou záření.

Minkova aj. [29] doporučuje stanovení nukleových kyselin v leukocytech periferní krve jako rychlý test pro časnou detekci poškození různých druhů ionizujícího záření. Korelace mezi sníženým obsahem NK a počtem leukocytů po ozáření nebyla pozorována.

Byla sledována ještě řada dalších metabolitů jak v moči tak v krvi, např. kyselina betaaminoizomáselná (BAIBA), např. v práci Smitha aj. [36], ale lze říci, že většinou tyto práce nepřesáhly rámec experimentů na zvířatech.

Pokud jde o stanovení různých enzymů, správněji jejich aktivit, byla jich v souvislosti s postiradiačními změnami zkoumána celá řada, viz např. citovanou práci Altmanovu [1] a sborník IAEA [3].

Poměrně značná pozornost byla věnována alkalické fosfatáze (ALF, ALP), laktodehydrogenáze (LDH) alfa-amyláze, aminotransferázám (AST, ALT) a proteázám. Změny aktivity sérové ALF a jejího jaterního a střevního izoenzymu u krys sledovali Štěpán a Jojková [43]. Po ozáření pozorovali pokles aktivity u všech 3 sledovaných komponent 2. den po expozici. Do expozice 500 R, tedy u krys, které přežily, došlo poté mezi 4. až 8. dnem k vzestupu na zhruba výchozí hodnoty. Po letální ozáření expozicí 800 R přetrvával pokles aktivity ALF až do uhynutí. Výsledky uvedených autorů jsou v dobré shodě s podstatně starší prací Gajewského aj. [9], kteří v intervalech 1., 2., 3., 4. a 5. den po expozicích 250, 500, 1000, 1500 R pozorovali velmi dobrou závislost mezi poklesem aktivity ALF a velikostí expozice. V podstatě k shodným závěrům dospěl ve své další práci Štěpán aj. [44]. Za zmínku stojí, že pro hodnocení výsledků použili autoři tzv. diskriminační analýzy, o níž bude zmínka ještě v závěru této práce. Poklesem aktivity střevního izoenzymu ALF se dále zabývali Highman a Hanks [12] po ozáření krys expozicí 800 R. Zjistili, že mu nelze zabránit ani stimulací střevní sliznice olivovým olejem, takže jde zřejmě o poruchu hlubšího rázu. Surinov [37] sledoval rovněž aktivitu ALF v mukóze tenkého střeva a její izoenzymové složení. V rozmezí 350 až 15 000 rad pozoroval výrazný pokles aktivity a přesuny v poměru

izoenzymů od expozice 1000 rad. Efekt lokálního ozáření jater na aktivitu ALF, LDH a katalázy v séru a v játrech sledoval Hashikawa-Itoh aj. [18]. Do expozice 500 rad nepozorovali změnu aktivity ALF v séru, výrazný pokles pozorovali po 5000 rad. Změny aktivity enzymu v jaterní tkáni měly vůči změnám v séru reciproký průběh. Jak je z uvedených údajů zřejmé, byly citované práce prováděny výhradně na krysách. Zajímavá je práce Jacobsona aj. [16], kteří sledovali aktivitu ALF v granulocytech u profesionálních pracovníků s ionizujícím zářením. Zpočátku předpokládali, že existuje závislost mezi touto hodnotou a obdrženou expozicí (0,01 až 3 rem/rok). Podrobnější matematická analýza však toto nepotvrdila.

Je pochopitelné, že výrazně depresivní efekt radiace na aktivitu sérové ALF, resp. jejich izoenzymů, vedl k pokusům zaměřeným na využití tohoto ukazatele pro sledování účinnosti radioprotektivních látek (RPL). Křížala aj. [27] pozorovali u krys ozářených celotělovou expozicí 650 R (^{60}Co) a chráněných cystaminem, případně mexaminem (i. p., i. m.), sice počáteční pokles aktivity ALF, avšak od 6. dne došlo k návratu k výchozím hodnotám. Pozorovaný pokles byl působen hlavně snížením aktivity kostního izoenzymu ALF. Tyto výsledky byly potvrzeny v další práci Křížaly aj. [23], kde mimo krys bylo k pokusům užito též králíků. U králíků byl stupeň dosažené radioprotekce hodnocen dle velikosti a trvání poklesu aktivity ALF podstatně nižší. Tento nálezn byl opět potvrzen v další práci uvedených autorů [24], samotné ozáření 8 Gy vedlo k rychlému poklesu aktivity ALF, trvajícímu po celou dobu sledování (do 21. dne). Aplikace 5-metoxytryptaminu i. p. a s. c. aplikace cystaminu měla na tento pokles pouze malý účinek. Neefektivnější byla pomalá infuze cystaminu. Zajímavé je, že samotná aplikace RPL látek (cystamin, AET, mexamin) vedla u krys k poklesu aktivity ALF [25]. Tento však byl pozorován pouze v prvních hodinách po parenterální aplikaci. Autoři jej vysvětlují alespoň zčásti přímým inhibičním účinkem uvedených substancí na ALF.

Z hlediska aproximace výsledků na velká laboratorní zvířata, případně na člověka, mají pokusy provedené na krysách a králících nevýhodu ve značných biologických odlišnostech hlodavců. Z tohoto hlediska je zajímavá práce Křížaly aj. [26], kdy byla ALF sledována u psů po celotělové expozici 3 Gy. U pouze ozářených zvířat byl 2. a 4. den pozorován mírný pokles aktivity celkové ALF a střevního izoenzymu. 8. a 15. den byly hodnoty prakticky normální. U kostního izoenzymu tento pokles přetrvával ještě 15. den.

U psů chráněných i. m. podáním cystaminu v kombinaci s mexaminem nebyl prakticky prokázán pozitivní efekt podání RPL, pokud hodnotíme přetrvávající pokles aktivity ALF jako negativní příznak. Pouze u kostního izoenzymu bylo pozorováno v intervalech 4. a 8. den po ozáření přechodné zvýšení aktivity. U celkové

ALF a střevního izoenzymu byly po ozáření ve všech případech nacházeny nižší hodnoty aktivity oproti hodnotám před ozářením. Je tedy pochybné, zda lze u psů pro hodnocení účinnosti RPL uplatňovat stejná kritéria jako u hlodavců, již z toho důvodu, že pokles aktivity ALF po samotném ozáření byl u psů podstatně menší, než uvedení autoři pozorovali u krys a králíků, což potvrzují i výsledky našich pokusů, jak bude dále uvedeno.

Dalším enzymem, poměrně intenzívně sledovaným v souvislosti s účinky ionizujícího záření, je dehydrogenáza kyseliny mléčné (laktodehydrogenáza, LDH). Takamori [48] pozoroval u subletálně ozářených myší v prvních 6 dnech pokles aktivity, později postupný návrat k normálu. Oproti tomu Thyagaraján aj. [47] pozorovali u krys po celotělovém ozáření X-paprsky vzestup aktivity celkové LDH v séru a ve tkáních, se současným vzestupem podílu 1. izoenzymu (srdečního), 5. izoenzymu (jaterní) zůstával relativně neovlivněn. Po lokálním ozáření hrudníku 1200 a 3000 rad ^{60}Co nepozoroval Vallo aj. [49] u krys změny v poměru jednotlivých izoenzymů LDH. Neumeister aj. [30] sledovali mimo jiné změny aktivity LDH v séru prasat po subletálním a letálním ozáření rtg paprsky. Letální expozice (680 R) vedla u všech zvířat k velkému zvýšení aktivity LDH během prvních 48 hodin po expozici. Podobné změny byly pozorovány i u malátdehydrogenázy (MDH). V již citované práci Hashikawa-Itoh aj. [13] byla u krys sledována aktivita LDH po expozicích 5500 a 5000 rad. Autoři uvádějí, že po všech expozicích byl ke 4. dni pozorován vzestup aktivity LDH v séru, následovaný 7. den poklesem. Průběh změn aktivity v játrech měl přibližně reciprokový charakter podobně jako u ALF. Poněkud zarážející je, že pokles aktivity LDH byl pozorován již po nízké expozici 5 rad. Vzhledem ke zmíněné reciprocitě mezi hladinami LDH v séru a v játrech lze předpokládat, že spíše než zvýšená tvorba LDH de novo se na vzestupu aktivity v séru podílela hlavně LDH uvolněná z jaterních buněk v důsledku hepatocelulárního poškození. Po expozici 5 rad lze toto ovšem těžko předpokládat. V této souvislosti bude vhodné uvést práci Paulíkové aj. [31], kde byl sledován účinek kontinuálního gamma-ozáření (^{60}Co 60 R/denně, 1500 R celková expozice), na aktivitu LDH a MDH (malátdehydrogenáza) v séru krys. U ozářených krys byl pozorován vzestup aktivity obou dehydrogenáz. Současně však bylo zjištěno, že v případě MDH a 1. izoenzymu LDH (srdeční), vyvolalo signifikantní vzestup aktivity prakticky stejný, jako byl nalezen u ozářených krys, pouze přemístění zvířat z ústavního vivária na pokusné pole s kobaltovým zářičem. Sami jsme pozorovali v některých případech podobný jev u aminotransferáz v pokusech na psech, kdy zvířata byla opakovaně ozářována expozicí 1 Gy. U kontrolní neozářené skupiny, se kterou bylo jinak manipulováno stejně jako s pokusnými (ozářovanými) psy, byly změny aktivity AST a ALT

značně podobné, docházelo k přechodnému vzestupu. Je proto nutné, zvláště při složitějších delších manipulacích spojených s ozářením pokusných zvířat, počítat alespoň v některých případech s nespecifickým působením různých stresových činitelů.

Pokud jde o změny aktivity LDH u ozářených lidí, popisují Rodé aj. [34] a Hortváth aj. [11] vzestup aktivity u terapeuticky ozařovaných pacientů se zhoubnými nádory, který šel na vrub 4. a 5. izoenzymu. Dle údajů autorů bylo v tomto směru nejúčinnější 200 kV rtg záření a záření ^{60}Co ve srovnání s X-paprsky o vysoké energii a elektrony (betatron). Toto pozorování odpovídá citovaným nálezům Neumaistera [30] u subletálně a letálně ozářených prasat a potvrzuje značné shody mezi člověkem a prasetem (anatomie, metabolismus, biochemické ukazatele).

Podobně Herrmann [10] popisuje po ozáření poloviny těla 5 až 8 Gy vzestup aktivity sérové LDH s maximem 3 hodiny po ozáření. Zde ovšem je nutno znovu připomenout možný vliv stresu při ozařování, zvláště, když autor současně pozoroval i vzestup aktivity AST (GOT). Velmi důležitou skupinou enzymů jsou proteázy, schopné štěpit amidové vazby v bílkovinných molekulách. Systematika a mechanismy působení jsou u této skupiny enzymů značně složité. Zdá se, že v rozvoji řady projevů nemoci z ozáření hrají značnou roli zejména intracelulární, resp. lysosomální, proteázy (katepsiny). Určitý přehled této problematiky lze najít v pracích Kocmierské-Grodzské [19, 20]. Stručně si lze mechanismus účinku představit tak, že přes kininogeny, kinin a katepsiny dochází k uvolnění farmakologicky vysoce aktivního bradykininu (poruchy permeability cév, edémy, hypertermie). Valet [50] sledoval proteázovou aktivitu cytoplazmy a buněčných organel krysí sleziny vůči bílkovinám v průběhu 1. dne po celotělovém ozáření expozicí 600 R. Šlo o otázku, zda snížení váhy sleziny pozorované po ozáření, lze vysvětlit zvýšenou aktivitou proteolytických enzymů, tedy odbouráním existující tkáně. Získané výsledky však tomuto předpokladu nenasvědčovaly.

Vzestup aktivity kalikreinu ve tkáni pankreatu celotělově (800 R) a frakcionovaně (5×150 R) ozářených krys popisuje Kocmierská-Grodzka a Radwan [22], současně pozorovali pokles amylázové aktivity. Podobnou problematiku v játrech ozářených krys sledovala již dříve opět Kocmierská-Grodzka a Gerber [21].

Z dalších prací týkajících se vlivu ozáření na aktivitu lysosomálních enzymů uvádíme ještě práci Vranovské aj. [51] a Snydera [35], ze kterých vyplývá, že aktivace a uvolnění lysosomálních hydroláz může být důležitým patologickým činitelem při rozvoji časně i pozdější fáze akutního radiačního syndromu.

Zajímavá je práce Mackowiaka a Sierakovského [28], ve které popisují příznivý účinek Dianabolu (Metadienonu) ve smyslu snížení postiradiační kininogenetické aktivity u krys.

Z dalších enzymů studovaných v souvislosti s poškozením organismu ionizujícím zářením lze uvést alfa-amylázu. Jurga aj. [15] popisují počáteční vzestup aktivity v krvi a ve slinách při terapeutickém ozařování hlavy. Tjurina a Semenova [45] pokládají vzestup aktivity alfa-amylázy v séru a moči za senzitivní test radiace poškození. Zjistily, že tento vzestup závisí hlavně na ozařování slinných žláz a uvádějí, že by mohl sloužit pro přesnější odhad dávkové zátěže hlavy.

Pokud jde o jiné enzymy, uvádíme ještě práci Altekara [2], který popisuje vzestup aktivity aldolázy v séru celotělově ozařených krys, pravděpodobně v důsledku jejího uvolnění ze svalových buněk. Kolotaj a Gabryelak [18] popisují vzestup aldolázové aktivity v erytrocytech ozařených telat.

Další součástí séra (plazmy), jejíž sledování by mohlo poskytnout informaci o poškození ionizujícím zářením, případně o jeho závažnosti, představují lipidy (triglyceridy, cholesterol, mastné kyseliny, beta-lipoprotein, fosfolipidy). U králíků sledovali vliv ozaření na jejich změny Koike a Koike [17], podobně u krys po protražovaném ozařování Praslička aj. [32].

Všeobecně lze říci, že po ozaření dochází zpravidla k vzestupu koncentrace uvedených složek s výjimkou fosfolipidů.

Poměrně značná pozornost byla v uplynulém období věnována postradiačním změnám sérových bílkovin. Touto problematikou jsme se zabývali i na našem pracovišti, přičemž byly sledovány jednak změny u krys, jednak též u lidí po terapeutickém ozařování. Výsledky jsou popsány v pracích Šimša aj. [40, 41, 42]. Obecně lze říci, že zejména po vyšších expozicích dochází ke snížení obsahu albuminu a imunoglobulinů a vzestupu obsahu tzv. „proteinů akutní fáze“ (haptoglobin, hemopexin, ceruloplasmin, alfa-2-globuliny aj.). Tyto změny však nejsou pro ozaření specifické a vzhledem ke zdoluhavosti a pracnosti stanovení může mít jejich sledování pouze doplňující význam. Určitý význam v prognostickém smyslu má časný pokles koncentrace albuminu, IgG a IgM, zejména při letálních ozaření. Z novějších prací lze uvést např. Chlebovského aj. [14], kteří po kontinuálním ozařování krys našli zhruba stejné změny, jak bylo shora uvedeno.

Pro úplnost uvádíme, že v rámci změn vyvolaných ozařením na biochemické úrovni bylo též prováděno stanovení některých stopových prvků. Quaipe a Ogborn [33] sledovali u psů hladiny plazmatického zinku (Zn) po různých expozicích záření ^{60}Co . Pozorovali prakticky vždy vzestup koncentrace, avšak mezi jeho velikostí a expozicí nebyla přímá závislost, i když po nejvyšší autory použité expozici 600 R, měl trvalejší charakter ve srovnání s nižšími expozicemi.

Woods aj. [53] sledovali obsah mědi, železa a zinku v plazmě králíků po expozici 1000 R (^{60}Co). Koncentrace mědi byla po ozaření výrazně vyšší. U železa a zinku došlo nejprve k po-

klesu a asi po 20 hodinách po ozaření k vzestupu koncentrace, výraznějšímu u železa. Paralelně s ozařeními zvířaty byly sledovány neozářené kontroly, aby bylo možno vyloučit vliv diurnálních variací v koncentraci jednotlivých prvků. Vzhledem k tomu, že v řadě případů jsou stopové prvky (např. právě Cu a Zn) součástí aktivních center různých enzymů, nelze těmto stanovením nepřiznat jistý význam. Ovšem vzhledem k metodické náročnosti, popřípadě nárokům na nákladné technické vybavení, jaké představuje např. atomový absorpční spektrofotometr, používaný pro tyto účely, sotva nabudou praktického významu.

2. Materiál a metodika

K pokusům, jejichž výsledky jsou zde prezentovány, bylo použito jednak psů beagle, jednak bastardů obého pohlaví a rozdílné hmotnosti.

Ozařování bylo prováděno multilaterálně ^{60}Co na zařízení Chisobox (Chirana). Celotělová dávka činila 3 Gy, dávkový příkon 0,95 až 0,91 Gy $\cdot$ min $^{-1}$. Cystamin byl podáván i. m. v dávce 50 mg $\cdot$ kg $^{-1}$, gamafos (WR 2721) v dávce 100 mg $\cdot$ kg $^{-1}$, rovněž i. m. Radioprotektiva byla aplikována 20 minut před započatím ozařování.

U léčených zvířat byla podávána antibiotika od 7. do 21. dne po ozaření. První týden byl podáván Oxymykoin 10 mg $\cdot$ kg $^{-1}$, druhý týden penicilin 20 000 j. $\cdot$ kg $^{-1}$ a streptomycin 20 mg $\cdot$ kg $^{-1}$. Pro biochemická vyšetření byla odebírána srážlivá krev z v. cephalica, ze které bylo sérum odděleno centrifugací. V pokusech, které jsou předmětem tohoto sdělení, byla prováděna následující biochemická vyšetření (stanovení): aspartátaminotransferáza (AST), alaninaminotransferáza (ALT), alfa-amyláza, laktátdehydrogenáza (LDH), alkalická fosfatáza (ALF), celková bílkovina, Na $^{+}$, K $^{+}$, celkové lipidy, betalipoproteiny, triglyceridy.

Pro stanovení jsme používali komerční soupravy příslušných reagentů fy Lachema (Bio-La-Testy). Sodík a draslík byly stanovovány plamenovou fotometrií v laboratoři II. interní kliniky v Hradci Králové. Vlastní měření byla prováděna na průtokovém fotometru Vitatron, popřípadě na spektrofotometru Perkin-Elmer.

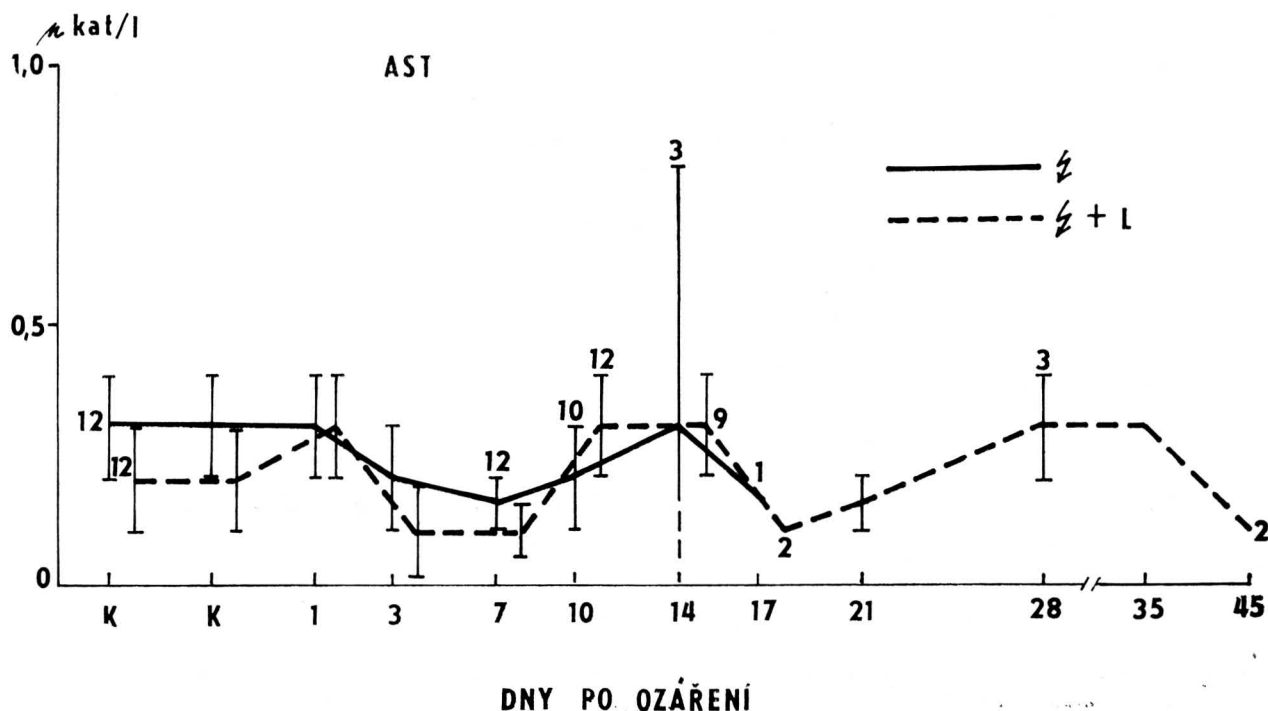
3. Výsledky a diskuse

Vzhledem k tomu, že nechceme neúměrně rozšiřovat rozsah tohoto sdělení, uvádíme ze souboru vyšetření, která jsme v popisovaných pokusech použili, výsledky pouze u některých. Byly vybrány jen ty ukazatele, o nichž se na základě dosavadních výsledků (podložených i některými pokusy v této práci neuvedenými) domníváme, že by jejich sledování mohlo mít určitý význam při posuzování závažnosti a prognózy radiace poškození. Rovněž pokud jde o srovnání účinků gamafosu a cystaminu, jsou většinou uvedeny výsledky získané s cystaminem, jelikož u gamafosu byly prakticky shodné.

Výběr biochemických ukazatelů sledovaných

v rámci této práce nelze pochopitelně pokládat za konečný. Pokud jde o některé další, např. kreatinin, sorbitdehydrogenáza, BUN apod., nemáme dosud dostatek experimentálních údajů pro zhodnocení jejich event. významu. Určitou výjimku představuje v tomto směru zařazení aspartátaminotransferázy (AST) do tohoto výběru (obr. 1). Učinili jsme tak proto, že zejména ve starší literatuře [1, 8] se uvádělo, že po

valo až do cca 7. dne po ozáření, daly by se tak vysvětlit výsledky Křížaly aj. [26] uvedené v předcházející kapitole. V podstatě jde o to, že pokles aktivity ALF, popřípadě jejich izoenzymů, pozorovaný uvedenými autory u psů chráněných RPL mohl být nespecifický. Na rozdíl od krys a králíků (hlodavců) ozáření zřejmě u psů nevede k výraznějšímu poklesu aktivit ALF. Proto také stěží lze dle velikosti tohoto poklesu



Obr. 1. Aktivita aspartátaminotransferázy (AST) v séru psů ozářených celotělovou expozicí 3 Gy (plná čára) a v séru psů, kteří po celotělovém ozáření 3 Gy byli léčeni antibiotiky (přerušovaná čára). K-hodnoty před ozářením. Počet přežívajících psů je uveden u jednotlivých intervalů.

ozáření dochází k jejímu vzestupu, případně, že by tento vzestup mohl být využit jako indikátor radiačního poškození.

Z našich výsledků je zřejmé, že alespoň u psů tomu tak není. Kromě toho, vzhledem ke skutečnosti, že vzestup aktivity aminotransferáz může být vyvolán řadou faktorů, včetně psychického stresu, nebylo by pro tento účel příliš vhodné. Na obr. 2 je znázorněn průběh změn aktivity alkalické fosfatázy u psů po celotělovém ozáření 3 Gy. Z grafu je zřejmé, že:

1. až do 7., resp. 10. dne nebyly pozorovány změny v aktivitě ALF;
2. zahájení antibiotické léčby od 7. dne po ozáření nemělo vliv na aktivitu ALF, ani na hybnutí, průběh změn je prakticky shodný se psy neléčenými;
3. od 7. až 10. dne byl pozorován prudký vzestup aktivity ALF trvající do uhynutí zvířat;
4. mezi oběma kontrolními vyšetřeními (interval 2 dny) byl pozorován poměrně výrazný pokles aktivity ALF, zřejmě v důsledku nespecifických stresových vlivů.

Vzhledem k tomu, že snížení aktivity ALF (ve většině případů statisticky významné) přetrvá-

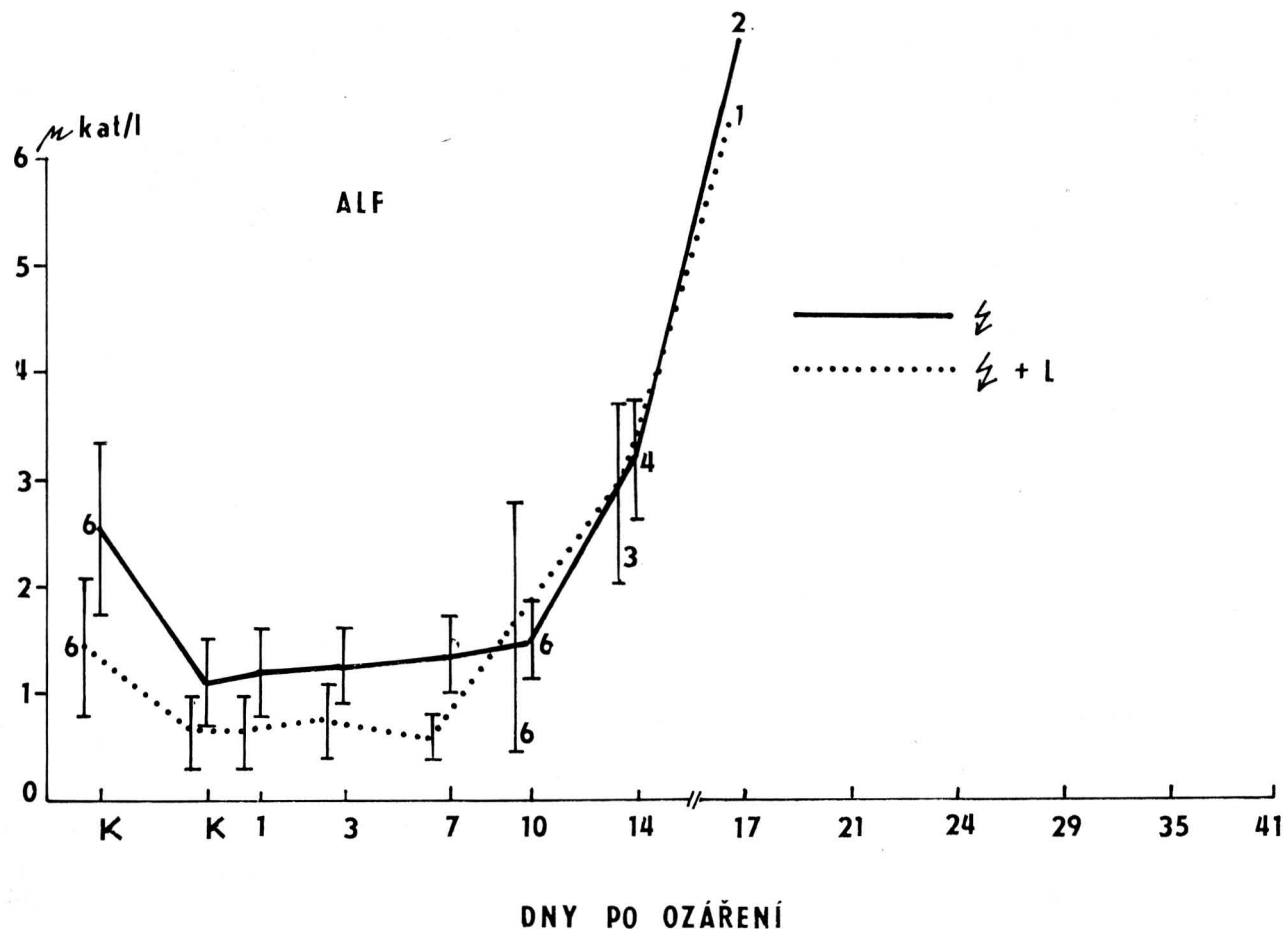
hodnotit účinnost RPL, což nakonec výsledky uvedených autorů potvrzují. Na druhé straně z obr. 3 lze soudit, že aplikace RPL (cystamin) se v období od 7. dne po ozáření příznivě projevila, pokud jde o snížení vzestupu aktivity ALF.

1. U chráněných a přežívajících psů nebyl až do 44. dne po ozáření pozorován vzestup aktivity ALF.

2. U uhynulých psů chráněných i. m. aplikací cystaminu před ozářením byl tento vzestup podstatně menší a méně strmý než u uhynulých a nechráněných psů. Prakticky shodné výsledky byly získány s gamafosem (WR-2721).

3. V případě přežívajících zvířat nelze ovšem s určitostí tvrdit, že k vzestupu aktivity ALF nedošlo v důsledku ochranného působení RPL. Svou roli zde mohli sehrát i individuální rozdíly mezi psy, pokud jde o citlivost vůči ionizujícímu záření. Lze říci, že od konce 1. týdne po expozici je vzestup aktivity ALF u psů negativním prognostickým příznakem.

Pokud jde o laktátdehydrogenázu, dochází u psů po ozáření k prudkému poklesu její aktivity (obr. 4 a 5). V intervalu od 7. do 14. dne,



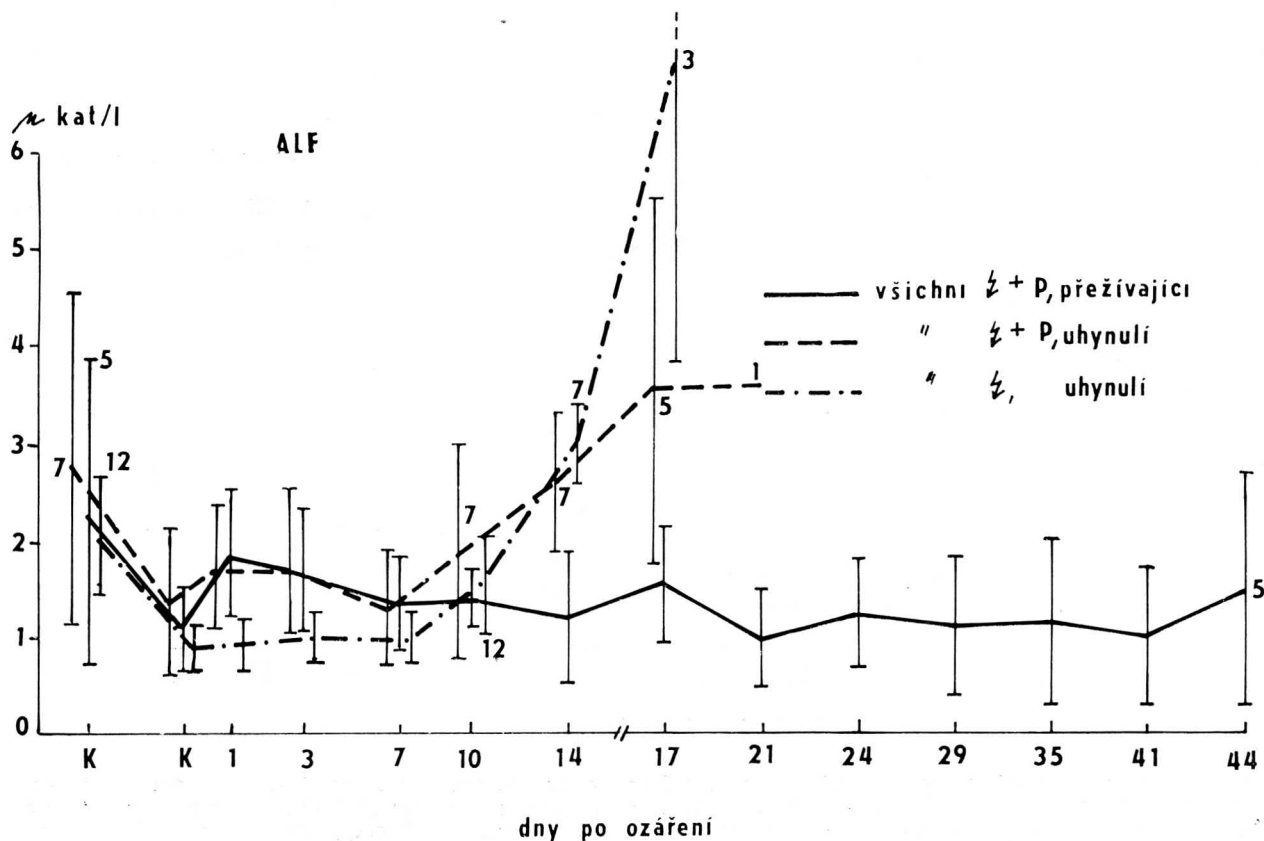
Obr. 2. Aktivita alkalické fosfatázy (ALP) v séru psů ozářených celotělovou expozicí 3 Gy (plná čára) a v séru psů, kteří byli po ozáření 3 Gy léčeni antibiotiky (tečkovaná čára). K-hodnoty před ozářením. Počet přežívajících psů je uveden u jednotlivých intervalů.

kdy léčené skupině byla podávána antibiotika, nebyl opět, podobně jako v případě ALP, pozorován výraznější rozdíl proti psům pouze ozářeným. Mezi oběma kontrolními odběry byl pozorován vzestup aktivity, patrně v důsledku působení stejných mechanismů jako v případě ALP. Sledovali jsme rovněž zastoupení jednotlivých izoenzymů LDH. Nejvýraznější změny byly pozorovány u 1. (srdečního) a 5. (jaterního) izoenzymu. Pro 1. izoenzym byl charakteristický pokles procentuálního zastoupení v období mezi 1. až 10. dnem po ozáření (období poklesu aktivity celkové LDH), u 5. izoenzymu byl v tomto období naopak pozorován vzestup. Tyto změny byly prakticky stejné u všech skupin psů. Na rozdíl od nechráněných psů je na obr. 5 patrný přechodný vzestup aktivity celkové LDH po aplikaci RPL [cystaminu]. Jedná se zřejmě o přechodné hepatotoxické působení cystaminu, pro které svědčí i vzestup aminotransferáz pozorovaný u těchto psů ve stejném údobí. Tyto otázky budou předmětem dalšího sdělení. Pro informaci lze uvést, že gamafos podobné změny nevyvolává.

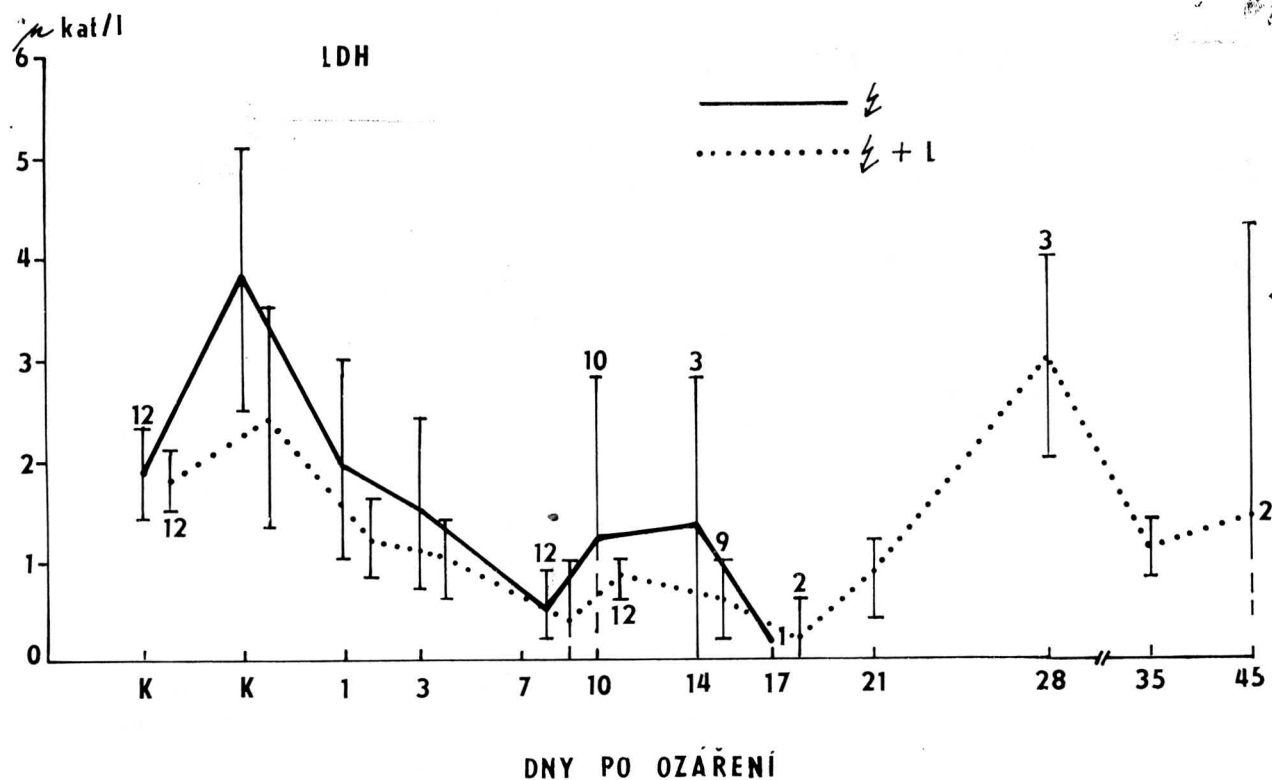
Na obr. 6 je znázorněn průběh aktivity alfa-amylázy u ozářených, resp. ozářených a později léčených psů (antibiotika). Podobně jako u alkalické fosfatázy lze i zde od 7. až 10. dne po

zorovat vzestup aktivity. Srovnáním s obr. 7 vidíme, že aplikace RPL cystaminu a gamafosu (WR-2721) tento do jisté míry příznivě ovlivnila, přičemž, jak jsme se již zmínili, nebyl mezi oběma látkami v tomto směru podstatný rozdíl. Podobně při srovnání aktivit alfa-amylázy u přežívajících chráněných psů se psy uhynulými, ať již chráněnými podáním RPL či nikoliv, je obraz prakticky stejný jako v případě alkalické fosfatázy. Je tedy alfa-amyláza u psů zhruba stejným prognostickým ukazatelem jako ALP.

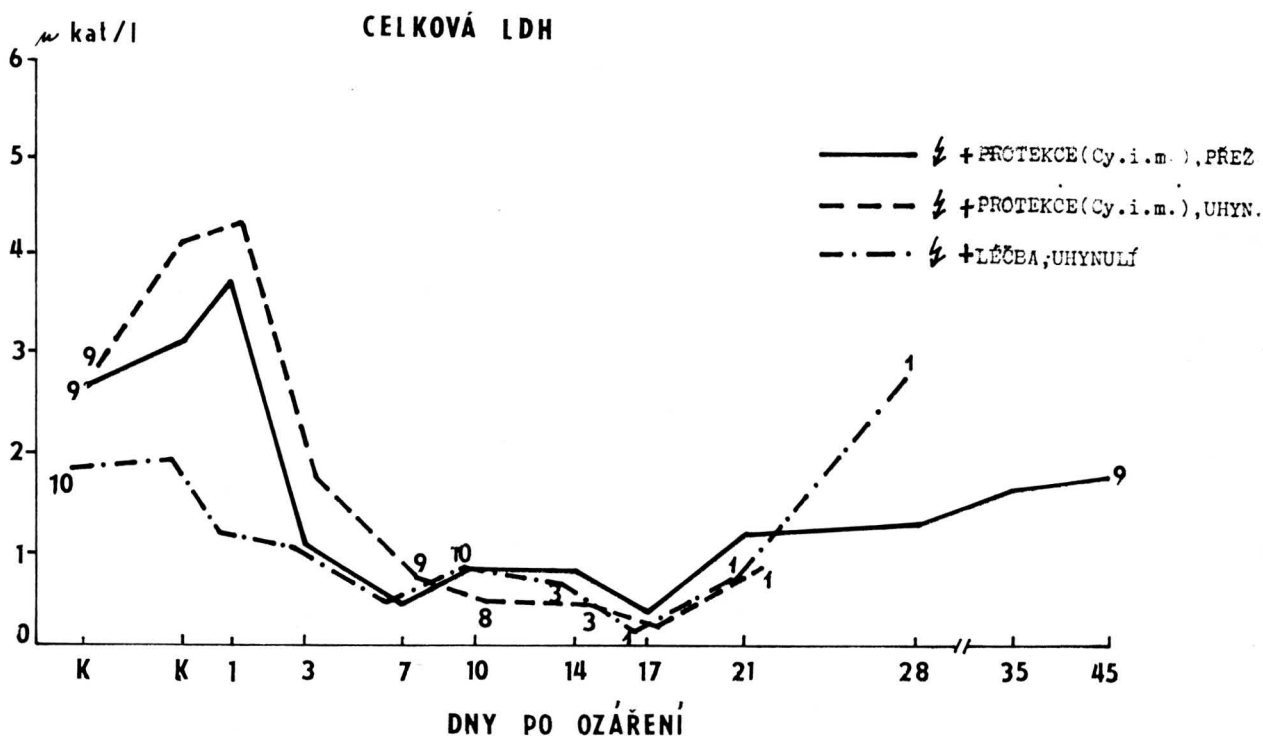
Na obr. 8 a 9 jsou znázorněny změny obsahu celkových lipidů v séru ozářených psů. Opět vidíme, že při srovnání psů jen ozářených a psů léčených od 7. dne antibiotiky není patrný žádný rozdíl. V obou případech dochází k postupnému zvyšování koncentrace tuků v séru. U obou skupin psů dochází k statisticky významnému vzestupu koncentrace tuků 1. den po ozáření. Při srovnání přežívajících a uhynulých psů (obr. 9) vidíme, že asi od 10. dne po ozáření byl zjišťován vyšší obsah tuků v séru psů, kteří potom uhynuli. Pokud jde o přechodný vzestup pozorovaný 1. den po ozáření, je tento zřejmě důsledkem zvýšení obsahu cholesterolu v tomto intervalu, protože ani u betalipoproteinu (obr. 10 a 11), ani u triglyceridů (neutrální tuky) podobný vzestup nebyl pozorován. U tri-



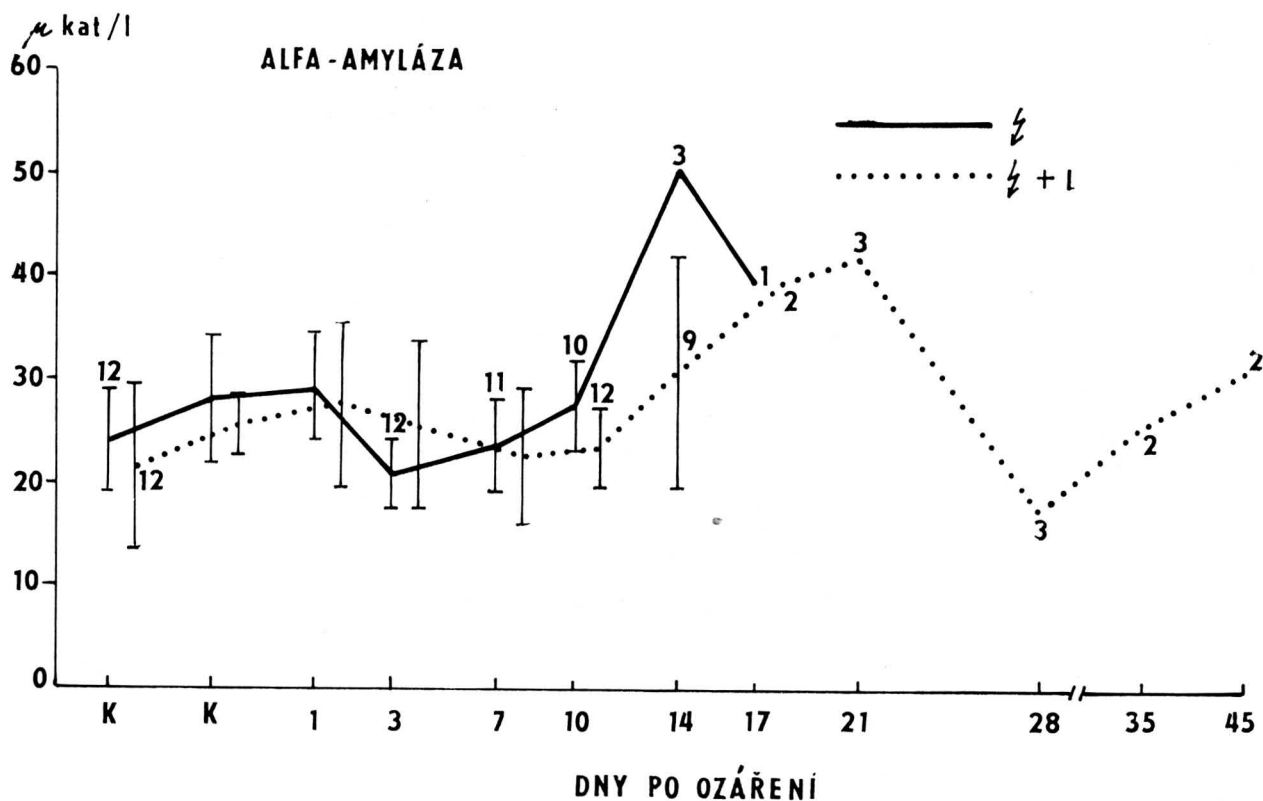
Obr. 3. Aktivita alkalické fosfatázy v séru psů ozářených celotělovou expozicí 3 Gy, chráněných i.m. aplikací cystaminu (plná čára), přeživajících do konce pokusu. Totéž u psů chráněných cystaminem, kteří uhynuli (tečkovaně), a aktivita alkalické fosfatázy v séru psů pouze ozářených 3 Gy, kteří do konce pokusu uhynuli (čerchovaně). K-hodnoty před ozářením. Počet přeživajících psů je uveden u jednotlivých intervalů.



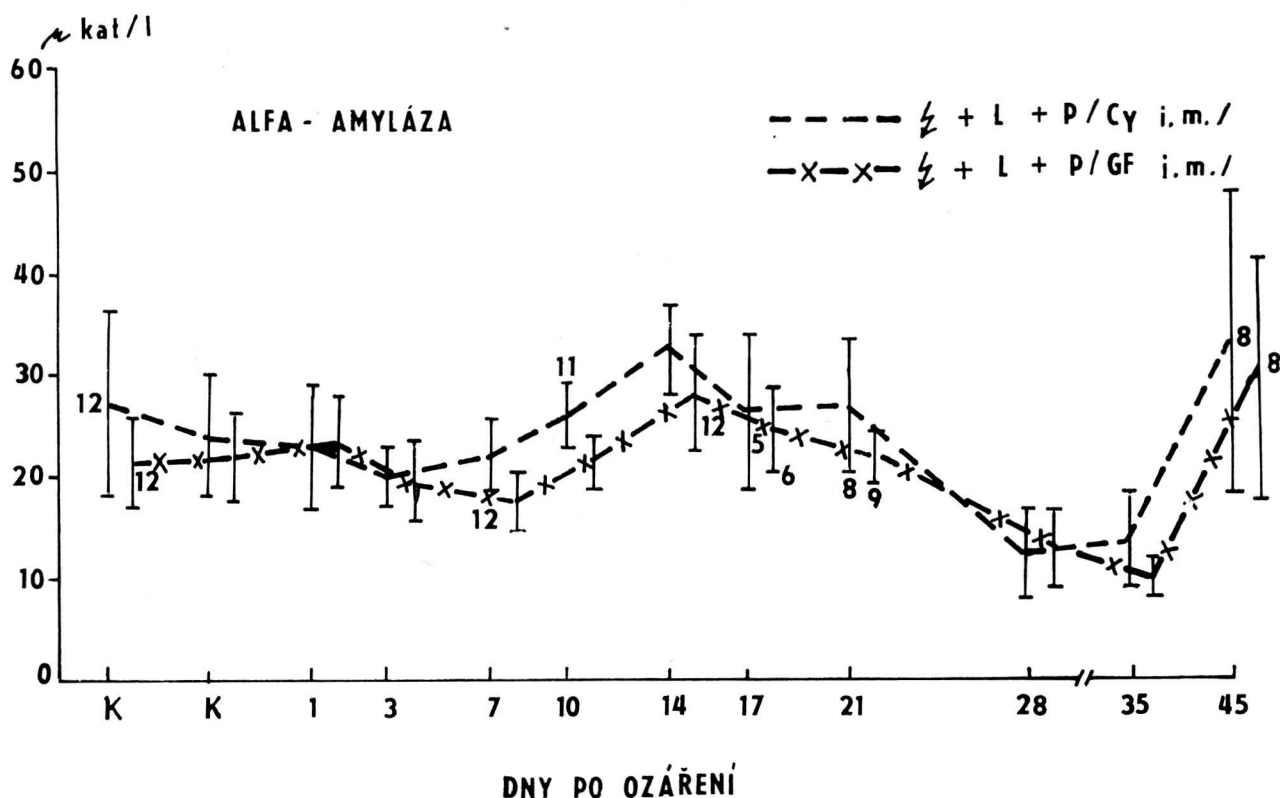
Obr. 4. Aktivita laktátdehydrogenázy (LDH) v séru psů ozářených celotělovou expozicí 3 Gy (plná čára) a v séru psů, kteří byli po ozáření 3 Gy léčeni antibiotiky (tečkovaně). K-hodnoty před ozářením. Počty přeživajících psů jsou uvedeny u jednotlivých intervalů.



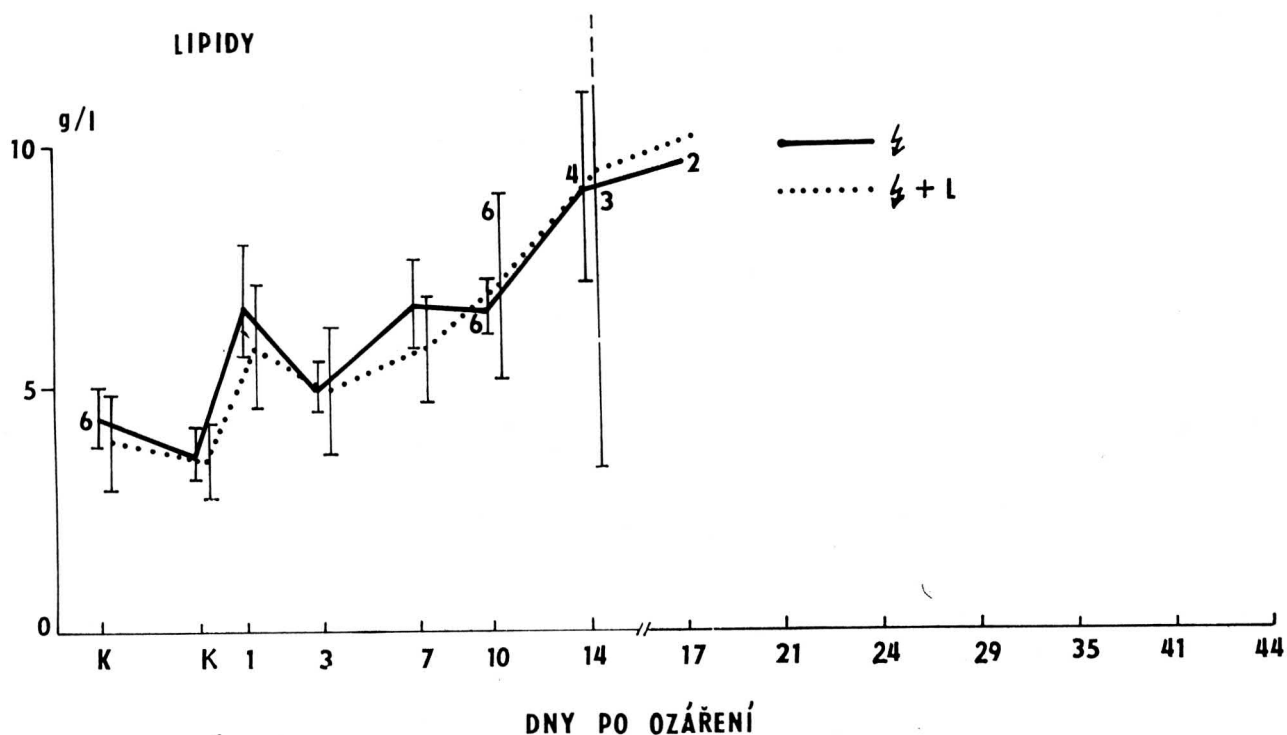
Obr. 5. Aktivita laktátdehydrogenázy (LDH) v séru psů celotělově ozářených expozicí 3 Gy, chráněných i.m. aplikací cystaminu, přežívajících do konce pokusu (plná čára) a v séru psů rovněž chráněných cystaminem i.m., kteří během pokusu uhynuli (přerušovaně), a v séru psů léčených po ozáření antibiotky, kteří uhynuli (čerchovaně). K-hodnoty před ozářením. Počty psů jsou uvedeny u jednotlivých intervalů.



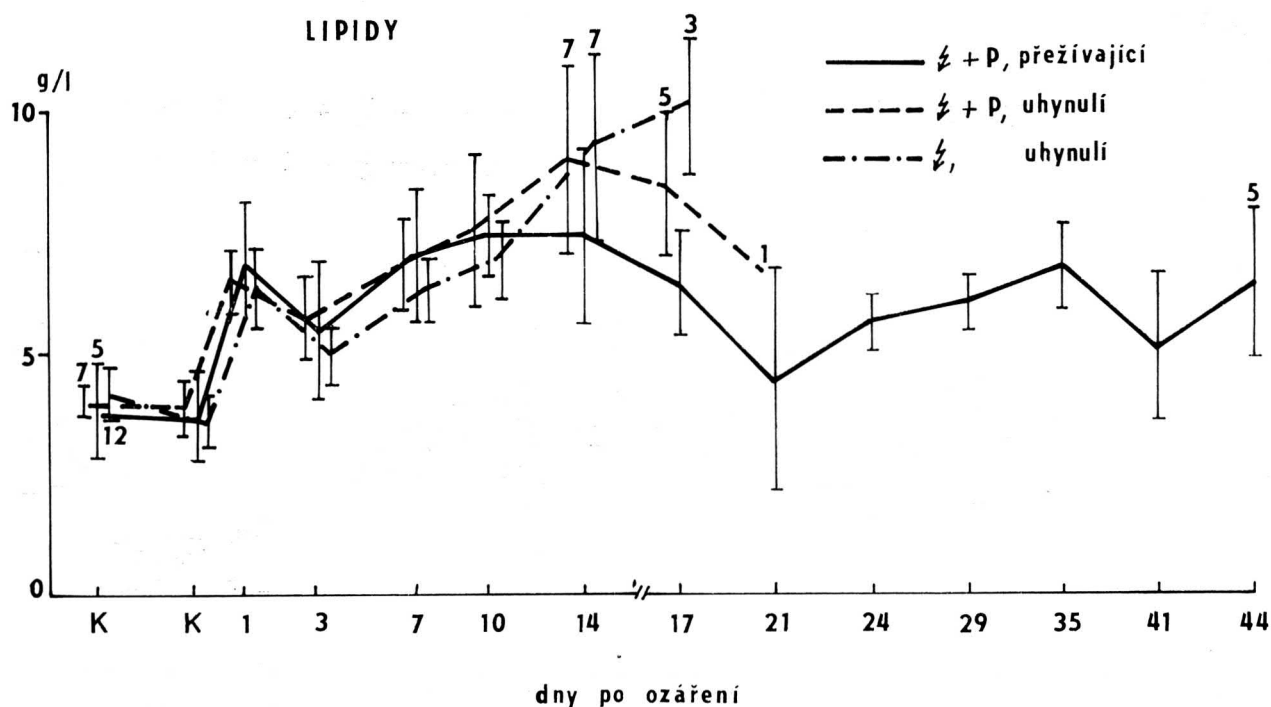
Obr. 6. Aktivita alfa-amyhlázy v séru psů ozářených celotělovou expozicí 3 Gy (plná čára) a v séru psů po ozáření 3 Gy léčených antibiotky (tečkovaně). K-hodnoty před ozářením. Počet psů je uveden u jednotlivých intervalů.



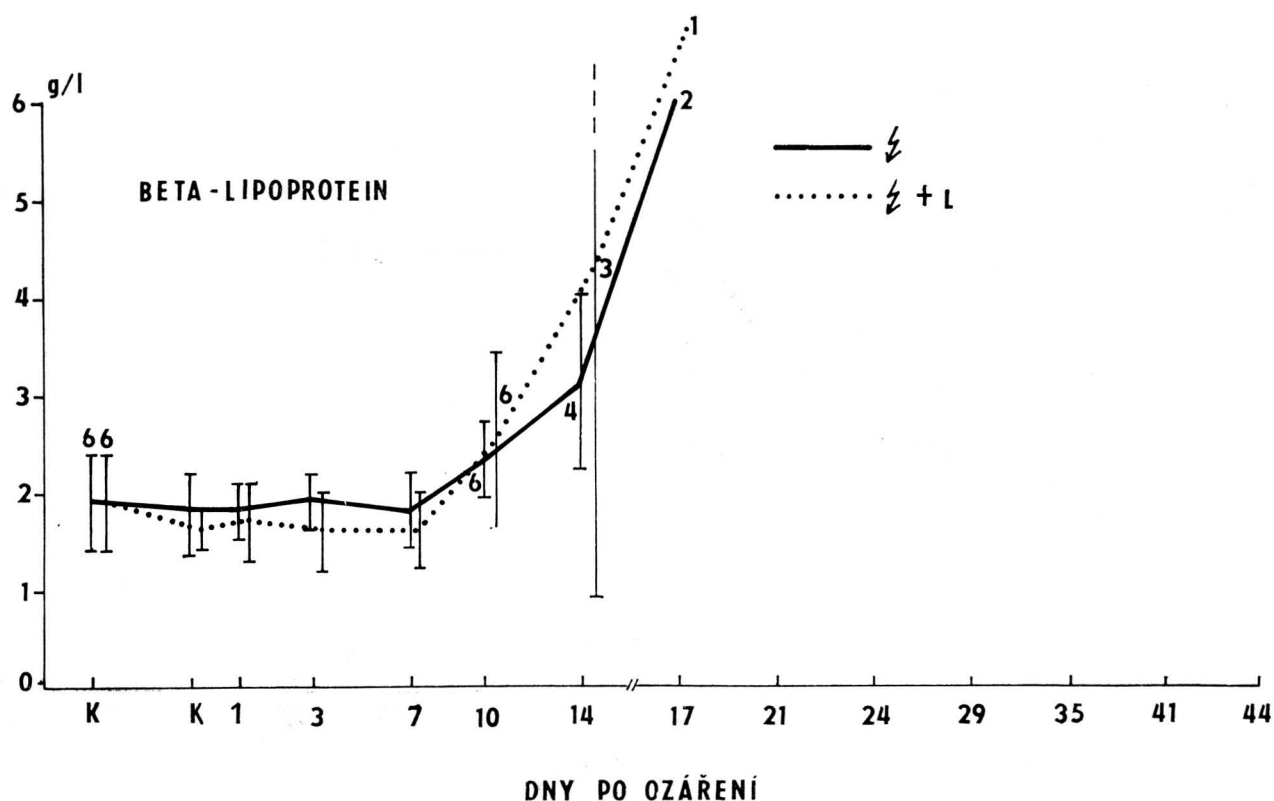
Obr. 7. Aktivita alfa-amyldázy v séru psů ozářených celotělovou expozicí 3 Gy, chráněných i. m. aplikací gamafosu (WR 2721, přerušovaná čára s křížky). Obě skupiny po ozáření léčeny podáváním antibiotik. K-hodnoty před ozářením. Počet přežívajících psů je uveden u jednotlivých intervalů.



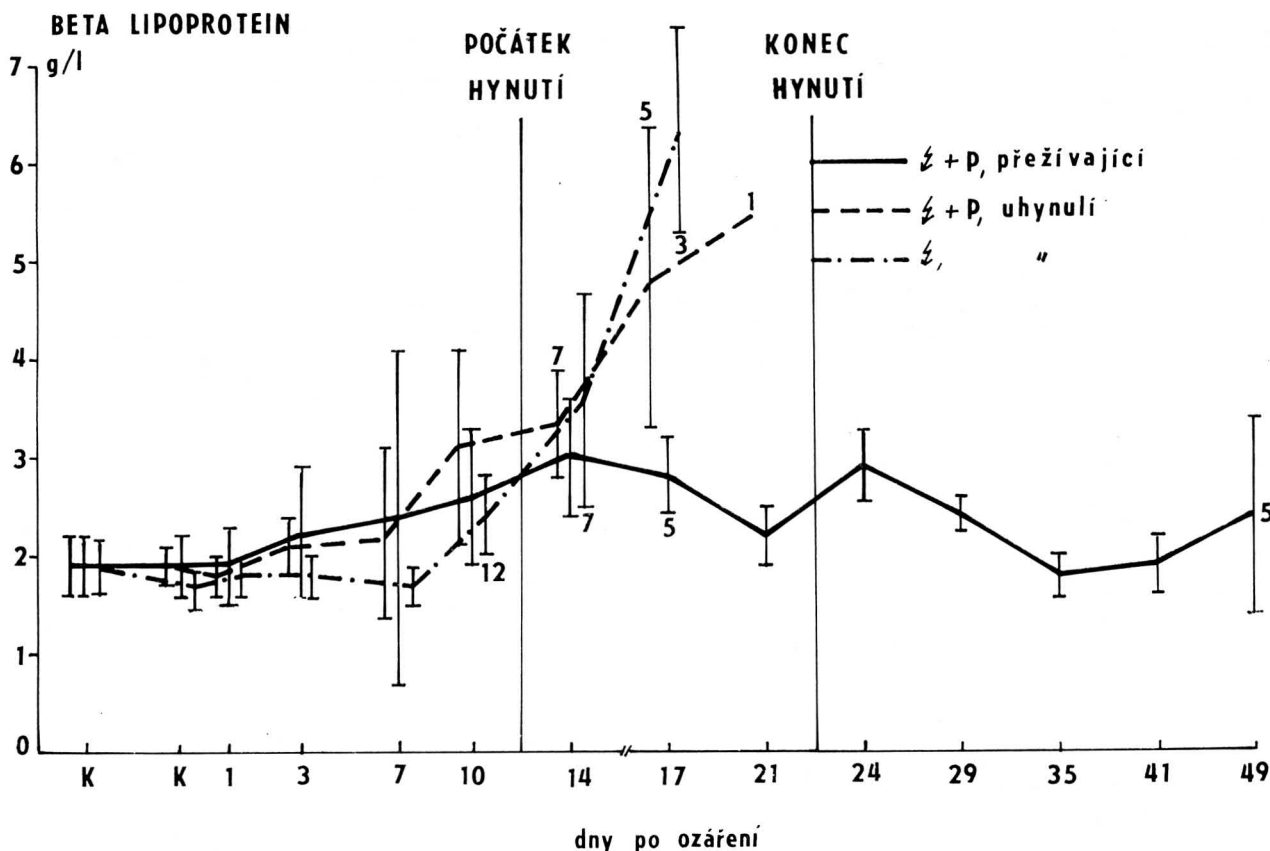
Obr. 8. Obsah celkových lipidů v séru psů ozářených celotělovou expozicí 3 Gy (plná čára) a v séru psů léčených po ozáření 3 Gy antibiotiky (tečkovaná). K-hodnoty před ozářením. Počet přežívajících psů je uveden u jednotlivých intervalů.



Obr. 9. Obsah celkových lipidů v séru psů ozářených celotělovou expozicí 3 Gy, chráněných i. m. aplikací cystaminu a přeživajících do konce pokusu (plná čára), v séru psů rovněž chráněných cystaminem i. m., kteří uhynuli (přerušovaně), a v séru psů pouze ozářených 3 Gy, kteří uhynuli (čerkovaně). K-hodnoty před ozářením. Počet přeživajících psů je uveden u jednotlivých intervalů.



Obr. 10. Obsah beta-lipoproteinu v séru psů ozářených celotělovou expozicí 3 Gy (plná čára) a v séru psů léčených po ozáření 3 Gy antibiotiky (tečkovaně). K-hodnoty před ozářením. Počet přeživajících zvířat je uveden u jednotlivých intervalů.



Obr. 11. Obsah beta-lipoproteinu v séru psů po celotělovém ozáření expozicí 3 Gy, chráněných i. m. aplikací cystaminu a do konce pokusu přeživajících (plná čára), dále v séru psů chráněných cystaminem i. m., kteří uhynuli (přerušovaná), a v séru pouze ozářených a uhynulých psů (čerkované). K-hodnoty před ozářením, počet přeživajících psů uveden u jednotlivých intervalů.

glyceridů byl pozorován pouze 10. den po ozáření menší vzestup koncentrace. Samotný cholesterol však nebyl v tomto pokuse sledován. Z výsledků jiných, zde neuváděných pokusů víme, že k jeho časnému vzestupu u psů po ozáření obvykle dochází. Vhodnější než stanovení celkových lipidů je zřejmě sledování jednotlivých komponent, hlavně betalipoproteinu a cholesterolu. U triglyceridů jsou změny méně výrazné a zpravidla zatíženy značnými rozptýly. Za úvahu by stálo též sledování obsahu volných mastných kyselin v séru (FFA, free fatty acids).

Shrňme-li dosud získané výsledky, musíme konstatovat, že z hlediska časné diagnostiky radiačního poškození nevyhovuje žádný z dosud sledovaných ukazatelů. Při jejich výběru jsme se orientovali na vyšetření, která jsou v nemocničních laboratořích víceméně běžně prováděna. U psů může určitou informaci v uvedeném směru poskytnout časný pokles aktivity laktátdehydrogenázy (LDH) a vzestup lipidů. Nicméně z prací uvedených v předchozí kapitole vyplývá, že u člověka je nutno počítat se vzestupem aktivity LDH po ozáření (11, 34), který asi bude méně signifikantní než pokles u psů.

V roce 1980 publikoval Wagner aj. (52) práci, ve které byl sledován ochranný efekt WR-2721 u ozářených psů. Autoři prováděli biochemická vyšetření v několika intervalech během prvních 24 hodin po ozáření. Analýzy byly pro-

váděny pomocí automatického analyzátoru, přičemž bylo sledováno 19 parametrů. Při zpracování výsledků pomocí počítače metodou tzv. diskriminační analýzy (podrobný postup není uveden) bylo možno pokusná zvířata rozdělit s 90% pravděpodobností na:

1. psy, kteří uhynou do 10. dne,
2. psy, kteří uhynou po 10. dni,
3. psy, kteří ozáření přežijí.

Dokonce i při zredukování počtu sledovaných ukazatelů na 7 (počet trombocytů, AST, cholinesteráza, kreatinin, bilirubin, cholesterol, kalcium), získali přibližně stejné výsledky. V práci je výslovně uvedeno, že při individuálním hodnocení jednotlivých ukazatelů nebylo možno dojít k použitelným závěrům. Vzhledem k tomu, že s použitím analyzátoru Hycel-1600 a za spolupráce s laboratoří lékařské kybernetiky VLVDÚ jsme schopni uvedený pokus rovněž provést, předpokládáme pro nejbližší dobu ověření výsledků získaných shora uvedenými autor-y v našich podmínkách.

4. Závěr

U psů celotělově ozářených expozicí 3 Gy byly sledovány v séru tyto biochemické ukazatele: aspartátaminotransferáza (AST), alaninaminotransferáza (ALT), alfa-amyláza, laktátdehydrogenáza (LDH), alkalická fosfatáza (ALP), celková bílkovina séra Na^+ , K^+ , celkové lipidy,

beta-lipoprotein, triglyceridy. Kromě vzestupu obsahu lipidů 1. den po ozáření a poklesu aktivity LDH mezi 1. až 7. dnem po ozáření nebyly v průběhu 1. týdne po expozici pozorovány výraznější změny sledovaných ukazatelů.

Od 7. až 10. dne po ozáření docházelo u psů, kteří v dalším údobí uhynuli, k výraznému vzestupu aktivity ALF, alfa-amylázy, obsahu celkových lipidů a beta-lipoproteinu v séru.

U psů, kterým byly před ozářením podány RPL cystamin a gamafos (WR-2721), byl tento vzestup zpravidla menší, i když později zvířata uhynula. U psů, kteří po aplikaci RPL přežili, k tomuto vzestupu buď nedošlo, nebo byl podstatně redukován. Tento náález patrně svědčí pro příznivý efekt podaných RPL na rozvoj postradiačních změn některých biochemických ukazatelů u ozářených psů a tedy snížené poškození organismu ionizujícím zářením. V tomto směru nebyl pozorován výraznější rozdíl mezi gamafosem a cystaminem (vyjma přechodný vzestup aktivity aminotransferáz) 1. den po ozáření, resp. aplikaci cystaminu.

Literatura

- Altman, K. I. - Gerber, G. B. - Okada, S.: Radiation Biochemistry. Vol. II: Tissues and body fluids. Acad. Press, New York-London, 1970, s. 1-317.
- Altekar, W., Indian J. Biochem. Biophys., 17, 1980, s. 263.
- Biochemical Indicators of Radiation Injury in Man. Procc. of Internat. Atomic Energy Agency, Vienna, 1971.
- Dudman, N. P. - Deveski, W. B. - Tattersall, M. H. N., Analytical Biochemistry, 115, 1981, s. 428.
- Dombrowa, B. - Stuck, H. - Wurst, F., Strahlentherapie, 157, 1981, s. 412.
- Fedorova, T. A. - Tereschenko, O. Ja. - Mazurik, V. K.: Nukleinovye kisloty i belki v organizme pri lučevom poraženiji. Moskva 1972.
- Gerber, G. B. - Decock, J. P., Acta Radiologica, 13, 1974, s. 556.
- Gubkova, A. K. - Sadčikova, E. N. - Orlanskaja, R. L., Med. Radiologija, 18, 1973, s. 52.
- Gajewski, A. K. - Raczynska-Gajewska, J. - Majle, T. - Krawczyński, J., Acta Physiologica Polonica, 19, 1968, s. 367.
- Herrmann, T., Radiobiol. Radiother., 21, 1980, s. 600.
- Horváth, M. - Rodé, J. L. - Kralovanszky, J. - Volant, M., Strahlentherapie, 156, 1980, s. 244.
- Highman, B. - Hanks, A. R., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 133, 1970, s. 1201.
- Hashikawa-Itoh, Y. - Aykagawa, Y. - Miata, N., ISSN 0301-0902, 8, 1980, s. 244.
- Chlebovský, O. - Praslička, M. - Chlebovská, K., Physiol. Bohemoslov., 30, 1981, s. 557.
- Jurga, L. - Moscovic, P. - Wagnerová, M. - Cholevova, Z. - Klíma, J. - Matula, P., Československá Radiologie, 31, 1977, s. 373.
- Jacobsohn, E. - Arndt, D. - Schuettmann, W. - Kono-patzky, H., Folia Hematol. (Leipzig), 103, 1976, s. 196.
- Koike, H. - Koike, N., Osaka City Med. J., 11, 1965, s. 175.
- Kolotaj, A. M. - Gabryelak, T., Z. Tierphysiol. Tier-naehr. Futtermittelkd., 45, 1981, s. 109.
- Koćmierska-Grodzka, D., Radiobiol. Radiother., 13, 1972, s. 443.
- Koćmierska-Grodzka, D., Radiobiol. Radiother., 13, 1972, s. 453.
- Koćmierska-Grodzka, D. - Gerber, G. B., Radiation Research, 44, 1970, s. 338.
- Koćmierska-Grodzka, D. - Radwan, J., Strahlentherapie, 150, 1975, s. 80.
- Křížala, J. - Stoklasová, A. - Ledvina, M.: Porovnání radioprotektivního účinku cystaminu a mexaminu u krys a králíků z hlediska změn aktivit alkalické fosfatázy krevního séra. In: Sborník věd. prací LF UK v Hradci Králové, 1978, s. 279.
- Křížala, J. - Stoklasová, A. - Ledvina, M., Radiobiol. Radiother., 20, 1979, s. 200.
- Křížala, J. - Stuchlíková, V. - Bělská, M. - Stoklasová, A. - Ledvina, M.: Vliv některých radioprotektiv na aktivitu isoenzymů alkalické fosfatázy krevního séra krys. In: Sborník věd. prací LF UK v Hradci Králové, 1979, s. 267.
- Křížala, J. - Kuna, P. - Stoklasová, A. - Ledvina, M. - Dostál, M., Strahlentherapie, 156, 1980, s. 365.
- Křížala, J. - Stoklasová, A. - Ledvina, M., Radiobiol. Radiother., 19, 1978, s. 176.
- Mackowiak, J. - Sierakowski, S., Strahlentherapie, 150, 1975, s. 154.
- Minkova, M. - Pantev, T. - Tenchova, V., Rentgenol. Radiol., 20, 1981, s. 53.
- Neumeister, K. - Melhorn, G. - Koch, F., SAAS-245, 1979, s. 79.
- Paulíková, E. - Ahlersová, E. - Ahlers, I. - Praslička, M., Biológia (Bratislava), 29, 1974, s. 701.
- Praslička, M. - Ahlers, I. - Sedláková, A., Radiobiologija, 20, 1980, s. 844.
- Quaife, M. A. - Ogborn, R. E., Pros. Soc. Exp. Biol. Med., 126, 1967, s. 377.
- Rodé, J. - Horváth, M. - Petrányi, J., Strahlentherapie, 154, 1978, s. 559.
- Snyder, S. L., Radiation Research, 69, 1977, s. 306.
- Smith, H. - Wallas, J. - Sturrock, M., Int. J. Rad. Biol., 11, 1966, s. 383.
- Surinov, B. P., Radiobiologija, 15, 1975, s. 599.
- Skalka, M., Čas. Lék. čes., 112, 1973, s. 950.
- Szabó, L. D. - Beněš, A. B. - Keresztes, P. - Ferenc, A. - Predmerzsky, T., Radiat. Environ. Biophys., 17, 1980, s. 301.
- Šimša, J. - Mráz, J., Radiobiol. Radiother., 15, 1974, s. 499.
- Šimša, J. - Mráz, J., Radiobiol. Radiother., 15, 1974, s. 509.
- Šimša, J. - Chvojka, Z. - Janoušek, Z. - Mráz, J., Radiobiol. Radiother., 14, 1973, s. 643.
- Štěpán, J. - Jojková, K.: Alkalické fosfatázy séra jako diagnostické kritérium při experimentální nemoci z ozáření. In: Sborník lékařský, 1976, s. 91.
- Štěpán, J. - Jojková, K. - Havránek, T., Radiation, Research, 70, 1977, s. 406.
- Tjurina, I. P. - Semenova, O. I., Radiobiol. Radiother., 20, 1979, s. 550.
- Thyagarajan, P. - Vakil, U. K. - Sreenivasan, A., Radiation Research, 70, 1977, s. 519.
- Thyagarajan, P. - Vakil, U. K. - Sreenivasan, A., Environ. Physiol. Biochem., 5, 1975, s. 283.
- Takamori, Y., Annu. Rep. Radiat. Cent. Osaka Prefect., 15, 1974, s. 96.
- Valle, C. - Munnich, A. - Pasquier, C. - Clamart, A., CRSSA-RA-1976, s. 45.
- Valet, G., Strahlentherapie, 150, 1975, s. 608.
- Vranovská, J. - Pospíšil, J. - Dienstbier, Z., Strahlentherapie, 153, 1977, s. 496.
- Wagner, M. - Sedlmeier, H. - Metzger, E. - Wustrow, Th. - Messerschmidt, O., Strahlentherapie, 156, 1980, s. 655.
- Woods, A. H. - O'Bar, P. R. - Waite, S. L., Int. J. Appl. Rad. Isotop., 21, 1970, s. 389.

Klíčová slova: Radiační poškození; Biochemické indikátory; Diagnostika; Terapie.