

615.732.8

VÝZNAM PARASYMPATICKÉ AKTIVACE V RADIOPROTEKTIVNÍM ÚČINKU CYSTAMINU

Plk. doc. MUDr. Pavel KUNA, CSc.

Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav JEP v Hradci Králové
(náčelník: genmjr. prof. MUDr. Jaroslav Vaňásek, CSc.)**Úvod**

Radioprotektivní látka cystamin má nepochybný ochranný účinek u malých laboratorních zvířat před smrtícím účinkem celotělového gama nebo rentgenového ozáření (1, 2, 8, 9, 34 a další). V případě jednorázového celotělového ozáření neutrony je radioprotektivní účinek cystaminu prokazatelně snížený (17). Ochranný efekt cystaminu byl prokázán i u celotělově gama ozářených králíků (14, 26) a psů (6, 11, 24, 25, 30, 33). Perorálně podaný cystamin v dávce 1,2 g 1 hodinu před lokálním ozářením měl významný ochranný účinek u ozařovaných onkologických nemocných (41, 42).

Cystamin a cysteamin jsou povoleny k humánnímu použití při radioterapii v řadě zemí. V Sovětském svazu je podáván cystamin dihydrochlorid v jednorázové perorální dávce 0,6 až 0,8 g (31). Mají k dispozici cystamin v tabletové formě po 0,2 nebo 0,4 g účinné látky. Podává se 1 hodinu před terapeutickým lokálním

ozářením s cílem snížit nežádoucí účinky radio-terapie. V souladu s menším krevním zásobením tumorů je jejich ochrana podstatně menší než okolní zdravé tkáně.

Opatrnost při podávání této látky je oprávněná. Jak experimentální výsledky, tak klinické zkušenosti upozorňují na některé nežádoucí vedlejší farmakologické účinky samotného cystaminu, které odstranit je cílem intenzivního radiobiologického výzkumu (15). Vůbec prvně byl cystamin farmakologicky studován jako hypotenzivum (36). Přesto, že je známa celá řada dílčích účinků cystaminu na nejrozličnějších úrovních živých organismů (1, 2, 7), byly shrnuty i v našem písemnictví (13), je mechanismus radioprotektivního účinku doposud nejasný.

Pro ochrannou účinnost je zcela nezbytná určitá koncentrační úroveň především v radiosenzitivních tkáních před zahájením ozařování (9). Přítomnost protektivní látky a jejích metabolitů ve tkáních nutně vede k vzájemným interakcím na membránových úrovních celulárních i sub-

celulárních, s receptory a nitrobenčnými organelami, což vede k ovlivnění řady metabolických a jiných biochemických pochodů. Bacq vytvořil teorii o biochemickém šoku jako možném mechanismu vzniku zvýšené radiorezistence savců [1, 4], Žerebčenko novější teorii receptorovou [43].

Po celou dobu výzkumu radioprotektivní účinnosti cystaminu byl posuzován význam jeho farmakologických účinků v mechanismu ochranného působení [3, 7, 35]. Některé farmakologické efekty naznačovaly, že se rozvíjejí po aktivaci parasympatického systému. Cholinomimetické účinky cystaminu byly prokázány na izolovaném střevu morčete [39]. Atropin snížil analgetický účinek cystaminu v pokusu na kryších [40]. Cystamin a cysteamin po parenterálním a intraduodenálním podání vyvolává výraznou hyperaciditu a slizniční ulcerace v gastrointestinálním traktu krys [10, 12, 29], které odstranily vagotomie nebo předchozí podání atropinu [10].

Na základě analýzy hemodynamických účinků cystaminu u králíků vysvětloval Mozzuchin [32] hypotenzi po cystaminu reflexními a humorálními mechanismy, z nichž rozhodující má útlum srdce po aktivaci vagu s následným podrážděním vazokonstriktorů, které vedou k postupné obnově výchozích hodnot arteriálního tlaku. V dřívějších vlastních pokusech jsme u králíků pozorovali v závislosti na jednorázové nitrožilní dávce cystaminu [33,5–134 mg . kg⁻¹] sinusovou bradykardii, komorové a nodální ektopické stahy až fibrilaci komor. Bradykardie, předsíňové bigeminie a komorové extrasystoly byly odpovědí srdeční excitability i u morčat na intraperitoneální podání cystaminu v dávkách 60,3 a 268 mg . kg⁻¹ [27].

Farmakologickou blokádu eferentního parasympatiku nebo oboustrannou vagotomií se nám podařilo snížit hloubku bradykardie po cystaminu [67 mg . kg⁻¹ i. v.] a zcela odstranit výskyt ektopických srdečních stahů [28]. Premedikace atropinem snížila radioprotektivní účinnost cystaminu na úrovni krvetvorných tkání [18] a přežití krys po celotělovém gama ozáření [16]. V pokusech na myších atropin sulfát podaný v dávce 5 mg . kg⁻¹ významně snížil radioprotektivní účinnost cystaminu v oblasti tenkého střeva, krvetvorby i při hodnocení třicetidenního přežití po celotělovém ozáření [19]. Poněvadž redukce radioprotektivního účinku cystaminu byla v některých ukazatelích jen nevýznamná, prověřili jsme v předkládaných pokusech modifikující účinek relativně vysoké dávky atropinu 20 mg . kg⁻¹, kterou použili Bajgar a spol. [5] s methoximem po otravě myši organofosfáty, na radioprotektivní účinnost cystaminu u těchto laboratorních zvířat.

Materiál a metodika

Pokusná zvířata. V pokusech jsme použili konvenční bílé myši neinbredního kmene H, obojího pohlaví, stáří 10–15 týdnů, dodávané

farmou Velaz Praha. Hodnoty tělesné hmotnosti myši nepřekročily 18 a 35 g. Myši jsme chovali v umělohmotových klecích po deseti a krmili peletovanou dietou DOS-2b z produkce Velaz a pitnou vodou bez omezení příjmu. V pokusech jsme spotřebovali celkem 880 myši.

Ozařování. Myši jsme ozařovali jednorázově celotělově ze vzdálenosti 100 cm od předpokládaného středu těla radiokobaltovým zdrojem gama záření Chisotron (Chirana). Roční období pokusu a dávkový příkon budou uvedeny u jednotlivých dílčích pokusů. Dávku záření vyjadřujeme v Gy. Měřili jsme ji ve volném prostoru v předpokládaném středu laboratorního zvířete pomocí klinického dozimetru RFT „Otto Schön“ čí. 27012 v rentgenech. Dávku v grayích jsme vypočítali podle doporučení ICRU Report 10 B (1964) podle vztahu 1 Gy = 95,7 R. Ve všech pokusech jsme ozařování zahájili za 7–10 minut po intraperitoneálním podání cystaminu nebo u kontrol fyziologického roztoku.

Akutní toxicitu cystaminu jsme stanovili probit-logaritmickou metodou vyjádřením letálních dávek a relativní toxicity podle Rotha [37]. Hybnutí zvířat jsme sledovali do 48 hodin po aplikaci cystaminu. Ke stanovení hodnot letálních dávek (LD) pro kombinaci fyziologického roztoku a cystaminu a pro kombinaci atropinu s cystaminem jsme použili vždy sedm skupin myši po deseti. Skupinám myších samic jsme podali fyziologický roztok v objemu 0,05 ml . 10 g⁻¹ nebo atropin sulfát v dávce 20 mg . kg⁻¹ a cystamin dihydrochlorid v dávkách cystaminové zásady od 160 do 250 mg . kg⁻¹. Interval mezi 1. a 2. intraperitoneální injekcí byl v tomto i v následujících pokusech vždy desetiminutový.

Buněčnost stěny tenkého střeva. Postradiační poškození tenkého střeva myši jsme hodnotili 3. den po celotělovém ozáření myších samců dávkou 10 Gy podle upravené metody Semenova a Altuchové [38]. Tenkým střevem označujeme 10 cm dlouhou kraniální část tenkého střeva měřenou od pyloru žaludku. Odebrané tenké střevo jsme podélně rozstříhli, omyli fyziologickým roztokem a v 0,5 ml 5% kyseliny octové homogenizovali v homogenizátoru M.S.E. (Anglie) čí. 7700 po dobu 3 minut. Po obarvení buněk v Türkově roztoku byla jádra střevních buněk počítána v Bürkerově komůrce stejným způsobem jako se počítají leukocyty. V tomto počtu buněk nejsou odlišeny buňky slizniční, svalové a serózní vrstvy. Buněčnost tenkého střeva vyjadřujeme v absolutním počtu jader všech buněk na 10 cm stěny střešní. 100 myších samců jsme rozdělili do 5 skupin po 20 kusech. Kontrolní skupina nebyla ozářena. Další čtyři skupiny myši jsme ozářili dávkou 10 Gy po podání dvou injekcí fyziologického roztoku, atropinu a fyziologického roztoku, fyziologického roztoku a cystaminu a atropinu a cystaminu.

Ukazatelé krvetvorby. Úroveň ochrany krvetvorné tkáně jsme hodnotili v kostní dřeni fe-

murů a ve slezině myších samců 8. den po celotělovém ozáření dávkou 8 Gy s dávkovým příkonem 0,699 Gy . min⁻¹. 100 myší jsme rozdělili do 4 skupin po 25 zvířatech. 1. skupině myší jsme před ozářením podali dvakrát fyziologický roztok, 2. skupině atropin a fyziologický roztok, 3. skupině fyziologický roztok a cystamin a myším 4. skupiny atropin a cystamin.

8. den po ozáření jsme myším intraperitoneálně podali ⁵⁹Fe citrát (Isocommerz, NDR) v 0,2 ml fyziologického roztoku o aktivitě 18,5 kBq (0,5 μ Ci) na myš. Za 4 hodiny jsme myši usmrtili vykrvácením. Odebrali jsme slezinu a femur. Slezinu jsme vložili na 24 hodin do fixačního roztoku Bouin-Dubosque-Brasil, jehož složení jsme uvedli v předchozím sdělení (21). V den odběru jsme ve zkumavce s fixačním roztokem změřili aktivitu radioželeza ve slezině a ve femuru pomocí automatického scintilačního počítáče Gamaszint BF 5300 (NSR). Aktivitu v těchto orgánech vyjadřujeme v procentech celkové aplikované radioaktivity. Po 24 hodinách fixace sleziny jsme na parietální straně sleziny počítali endogenní kolonie (CFUs). Sušinu sleziny jsme stanovili po 3 dnech sušení v termostatu při teplotě 105 °C. Relativní hmotnost sušiny sleziny vyjadřujeme v miligramech na 100 g tělesné hmotnosti myší.

Hodnocení přežití do 30. dne po celotělovém ozáření. Ve dvou pokusech na myších samicích jsme vyhodnotili vliv atropinu na radioprotektivní účinnost cystaminu podle kritéria přežití ozářených zvířat do 30. dne po expozici. V obou pokusech jsme myši rozdělili do čtyř skupin podle premedikace před ozářením jako v předchozím sledování modifikace cystaminové účinnosti atropinem na úrovni krvetvorby.

V prvním pokusu jsme 240 myších samic jednotlivých skupin ozářili v podskupinách po 9 až 10 myších dávkami od 4 do 11,5 Gy. V každé skupině jsme ozářili 6 podskupin zvířat. Dávkový příkon byl 0,733 Gy . min⁻¹.

V druhém pokusu na 300 myších samicích jsme vyzkoušeli vliv vysoké dávky atropinu na ochrannou účinnost cystaminu podaného v dávkách 150 a 175 mg . kg⁻¹. Myším ve srovnávaných skupinách jsme místo atropinu podávali fyziologický roztok. Každá skupina má 6 desetičlenných podskupin, které jsme ozářili dávkami od 5 do 14,5 Gy s dávkovým příkonem 0,721 Gy . min⁻¹. Na základě výsledků hynutí ozářených zvířat jsme vypočítali letální dávky a relativní účinnost ozáření probit-logaritmickou metodou (37).

Ve všech výše uvedených pokusech jsme podávali atropin sulfát (Spofa) v dávce 20 mg soli na 1 kg v objemovém množství 0,05 ml . 10 g⁻¹. Fyziologický roztok jsme aplikovali v témže objemu. Cystamin dihydrochlorid, syntetizovaný ing. Cyrilem Krajčovičem, CSc., jsme rozpouštěli v redestilované vodě pro injekce v den pokusu před jeho podáváním v konstantním objemu 0,05 ml . 10 g⁻¹. Všechny dávky cystaminové soli jsou přepočteny na jeho bázi a uváděny v mi-

ligramech na 1 kg tělesné hmotnosti myší. Použité roztoky jsme podávali v těchto pokusech výhradně intraperitoneálně.

Výsledky získané při analýze vlivu atropinu na cystaminové účinky z pokusů, které sledovaly změny střevní buněčnosti a změny v ukazatelích krvetvorby jsme hodnotili Studentovým *t*-testem pro párové a nepárové soubory pro *p* = 0,05 nebo méně. Typ Studentova *t*-testu byl určen předchozím vyhodnocením rozptylu hodnot Fischerovým *F*-testem podle programů pro počítač Hewlett-Packard 9830 A. V tabulkách a obrázcích jsou uváděny průměrné hodnoty s 95% intervaly spolehlivosti odhadu. Při dokumentaci výsledků jsme použili tyto zkratky aplikovaných látek: F = fyziologický roztok, A = atropin a C = cystamin.

Výsledky

Akutní toxicita. Relativně vysoká dávka atropinu sulfátu (20 mg . kg⁻¹) statisticky významně neovlivnila akutní toxicitu intraperitoneálně aplikovaného cystaminu, hodnocenou pomocí letálních dávek (tab. 1). Atropinová premedikace lehce zvýšila relativní toxicitu cystaminu na 103 (94—116) % ve srovnání s toxicitou cystaminu s předchozím podáním fyziologického roztoku.

Tab. 1

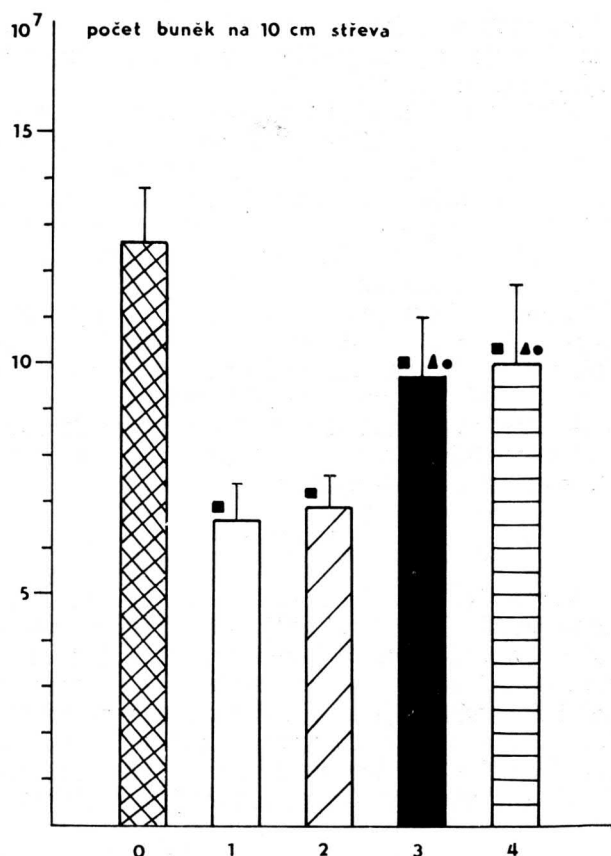
Vliv vysoké dávky atropinu (20 mg.kg⁻¹) na akutní toxicitu cystaminu i. p. u neozářených myších samic

Letální dávky	Dávky cystaminu dihydrochloridu v mg báze na 1 kg	
	Fyziol. r. + cystamin	Atropin + cystamin
LD _{50/48 h}	138 (95—157)	144 (104—162)
LD _{50/48 h}	192 (176—207)	188 (169—200)
LD _{95/48 h}	267 (237—372)	246 (226—302)

Buněčnost stěny tenkého střeva. Celotělová gama ozáření dávkou 10 Gy snížilo buněčnost střevní stěny přibližně na polovinu kontrolních hodnot u neozářených myší (obr. 1). Atropin samotný neměl žádný radioprotektivní účinek v oblasti tenkého střeva 3. den po expozici. Cystamin prokázal jednoznačně statisticky významný ochranný efekt, který nebyl ovlivněn předchozí aplikací vysoké dávky atropinu.

Z dvaceti ozářených myší nechráněných cystaminem přežili do 3. dne po expozici všechny myši, stejně jako myši neozářené. Úhyn 8 myší ze 20 ve skupině, které jsme podali fyziologický roztok a cystamin, a 2 myši ze 20 ve skupině, která obdržela atropin a cystamin (tab. 2), v průběhu prvních dvou dnů po ozáření, přičítáme toxickému účinku cystaminu a ne letálnímu účinku ozáření.

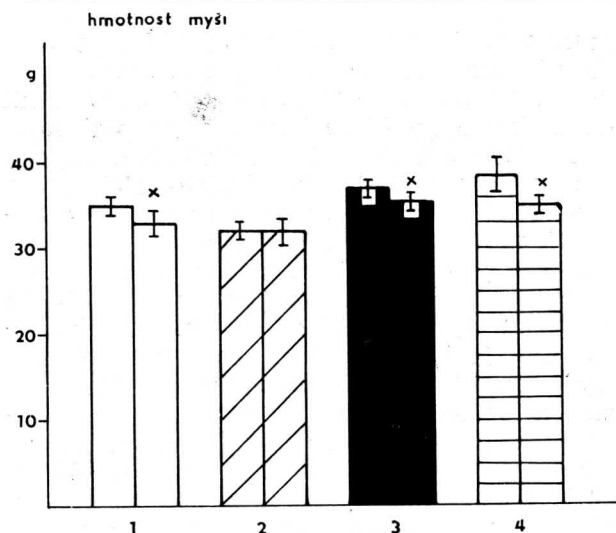
Ukazatelé krvetvorby. Po celotělovém ozáření myší dávkou 8 Gy uhynuly v průběhu osmi dnů



Obr. 1

Buněčnost tenkého střeva myši chráněných kombinací atropinu ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) s cystaminem ($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Buněčnost vyšetřena 3. den po celotělovém gama ozáření dávkou 10 Gy. Pokusné skupiny myši: 0 = neozářená; myši dalších skupin obdržely před ozářením: 1 = fyziologický roztok (f. r.) + f. r., 2 = atropin + f. r., 3 = f. r. + cystamin, 4 = atropin + cystamin. Označení statisticky významného rozdílu: čtvereček = srovnání s 0. skupinou; trojúhelník = srovnání s 1. skupinou; kolečko = srovnání s 2. skupinou.

3 myši ve 2. a ve 3. skupině, 4 myši ve 4. skupině. Žádná myš neuhynula v kontrolní skupině, která před ozářením dostala pouze 2 injek-



Obr. 2

Hmotnost myši (v gramech) před a 8. den po celotělovém gama ozáření dávkou 8 Gy. Označení skupin viz u obr. 1. Křížek označuje statisticky významný rozdíl od výchozí hodnoty hmotnosti myši před ozářením.

ce fyziologického roztoku. Hodnoty tělesné hmotnosti se upravily ve 2. skupině (obr. 2). Myšim této skupiny jsme před ozářením podali atropin a fyziologický roztok. Všechny ukazatele krvetvorby jak ve slezině, tak v kostní dřeni myši, vyšetřené 8. den po ozáření, byly vysoce statisticky významně chráněny antiradiační dávkou cystaminu bez ohledu na to, zda jsme myšim před cystaminem podali fyziologický roztok nebo atropin ve vysoké dávce (obr. 3). Atropin v kombinaci s fyziologickým roztokem byl opět bez jakéhokoli ochranného efektu. Redukce radioprotektivního účinku cystaminu v oblasti krvetvorných tkání atropinem, která je naprosto pravidelná u všech ukazatelů, však v žádném případě nedosáhla statistické významnosti.

Hodnocení přežití myši do 30. dne po celotělovém ozáření. Zvolený rozsah dávek celotělového gama ozáření ohraničený dávkou 11,5 Gy

Tab. 2

Hmotnost a hynutí myších samců chráněných kombinací atropinu ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) s cystaminem ($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) k 3. dni po ozáření dávkou 10 Gy

Skupina čis.	Applikace před ozářením	Hmotnost myši (g)		Počet uhynulých myši	
		0. den	3. den	počet	%
0	Neozářené myši	$38,2 \pm 1,6$	$37,0 \pm 1,4$	0	0
1	Fyziol. r. + fyziol. r.	$38,7 \pm 2,0$	$36,3 \pm 2,0$	0	0
2	Atropin + fyziol. r.	$36,8 \pm 2,0$	$x,y,a 32,2 \pm 2,0$	0	0
3	Fyziol. r. + cystamin	$y,a,b 34,4 \pm 1,2$	$x,y,a 31,9 \pm 1,1$	8	40
4	Atropin + cystamin	$a 36,6 \pm 1,9$	$x,y,c 34,7 \pm 1,6$	2	10

Poznámka: V každé skupině bylo před ozářením 20 myši.

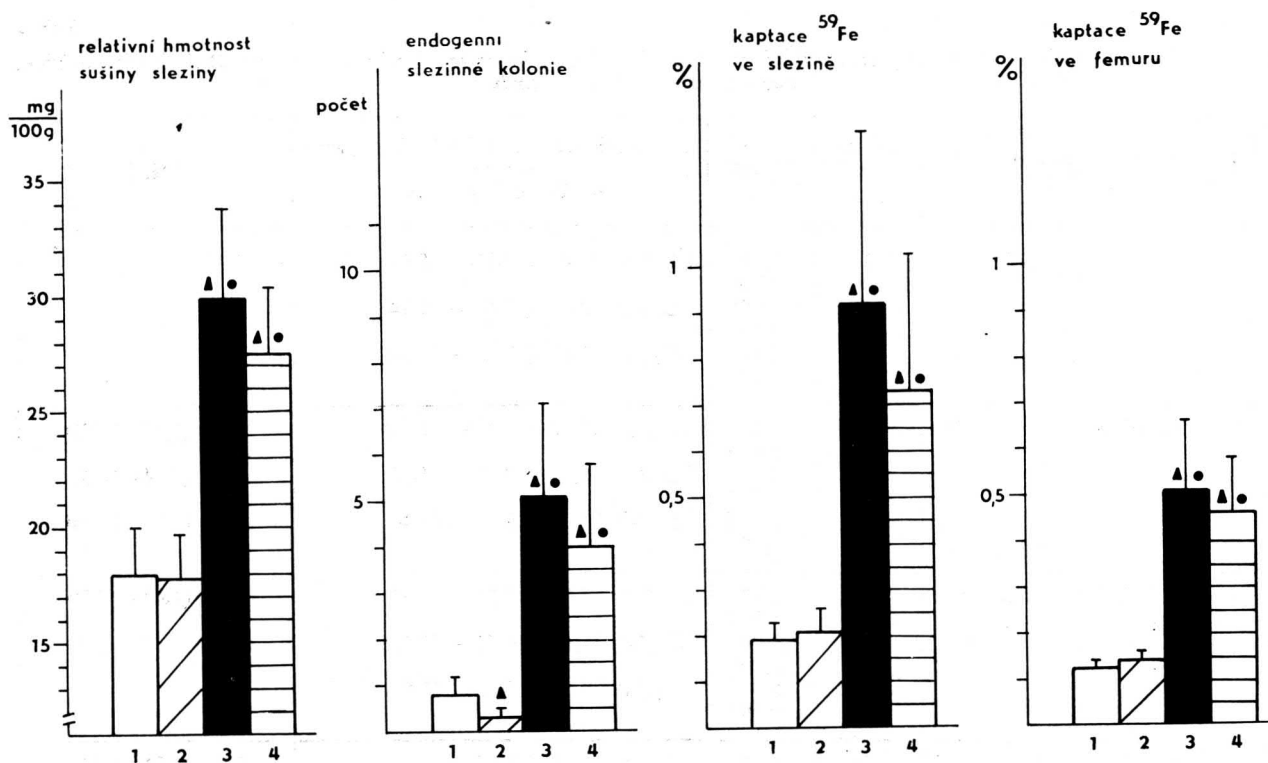
x = stat. významný rozdíl ve srovnání s hodnotou před ozářením (0. dne)

y = stat. významný rozdíl ve srovnání s hodnotou 0. skupiny

a = stat. významný rozdíl ve srovnání s hodnotou 1. skupiny

b = stat. významný rozdíl ve srovnání s hodnotou 2. skupiny

c = stat. významný rozdíl ve srovnání s hodnotou 3. skupiny



Obr. 3

Ukazatelé krvetvorby ve slezině a femuru myši 8. den po celotělovém ozáření dávkou 8 Gy. Označení skupin a statistické významnosti rozdílů jako u obr. 1.

Tab. 3

Vliv atropinu ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i. p.) na radioprotektivní účinnost cystaminu ($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i. p.) u myších samic. Období: leden—únor; dávkový příkon gama záření $0,737 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$. F = fyziol. r., A = atropin, C = cystamin

Skupina čís.	Aplikace	Dávka záření (Gy)	Hynutí	Ukazatelé radioprotektivního účinku – letální dávky v Gy	DRF
1	F + F	4 5 6 7 8 9	0/9 0/9 1/9 4/9 9/9 9/9	$\text{LD}_{5/30}$: 4,44 (3,52—5,31) $\text{LD}_{50/30}$: 6,79 (6,10—7,78) $\text{LD}_{95/30}$: 9,90 (8,43—14,25)	1,00
2	A + F	4 5 6 7 8 9	0/9 0/9 0/9 6/9 9/9 9/9	$\text{LD}_{5/30}$: 4,55 (3,48—5,20) $\text{LD}_{50/30}$: 6,49 (5,81—7,30) $\text{LD}_{95/30}$: 9,26 (8,05—12,35)	0,96 (0,81—1,12)
3	F + C	4 5,5 7 8,5 10 11,5	0/10 0/10 1/10 0/10 0/9 6/10	$\text{LD}_{5/30}$: 5,31 (1,53—7,03) $\text{LD}_{50/30}$: 13,78 (10,08—66,79) $\text{LD}_{95/30}$: 35,74 (18,40—2293,8)	1,65 (1,27—2,39)
4	A + C	4 5,5 7 10 11,5	0/10 0/10 0/10 1/10 4/10	$\text{LD}_{5/30}$: 5,47 (0,02—7,76) $\text{LD}_{50/30}$: 19,15 (11,75—208.10 ¹⁰) $\text{LD}_{95/30}$: 67,07 (23,25—14329E+26)	2,82 1,17 6,78

nebyl dostatečný k vyvolání 100% letality ke 30. dni po ozáření u skupin myši chráněných cystaminem (tab. 3). Atropin statisticky vý-

znamně neovlivnil smrtící účinek celotělového gama ozáření u myši, které dostaly před ozáření po atropinu buď fyziologický roztok, nebo

Tab. 4

Vliv atropinu ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ i. p.}$) na radioprotektivní účinnost cystaminu ($150 \text{ a } 175 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ i. p.}$) u myších samic. Období: březen–duben; dávkový příkon: $0,721 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$

Skupina čís.	Aplikace před ozáření a dávky látek v $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Dávka záření (Gy)	Hynutí	Ukazatelé účinku celotělového gama ozáření (letální dávky v Gy)	DRF
1	Fyziol. r. + fyziol. r.	5 6 7 8 9 10	0/10 0/10 4/10 9/10 9/10 10/10	$\text{LD}_{5/30}$: 5,34 (4,28— 5,97) $\text{LD}_{50/30}$: 7,14 (6,52— 7,74) $\text{LD}_{95/30}$: 9,55 (8,65— 11,52)	1,00
2	Fyziol. r. + cystamin 150	6 7,5 9 10,5 13 14,5	1/10 1/9 ! 2/10 0/9 ! 5/8 ! 6/10	$\text{LD}_{5/30}$: 5,87 (2,28— 7,63) $\text{LD}_{50/30}$: 13,12 (10,80— 21,75) $\text{LD}_{95/30}$: 29,34 (19,06—166,44)	1,84 (1,45—2,40) ^a 1,10 (0,74—1,65) 3,07 (1,31—7,62) ^a
3	Atropin 20 + cystamin 150	6 7,5 9 10,5 13 14,5	0/10 1/7 ! 1/10 2/10 5/9 ! 9/10	$\text{LD}_{5/30}$: 6,93 (4,50— 8,26) $\text{LD}_{50/30}$: 11,94 (10,41— 15,06) $\text{LD}_{95/30}$: 20,57 (15,03— 41,57)	1,66 (1,42—2,02) ^a
4	Fyziol. r. + cystamin 175	6 7,5 9 10,5 13 14,5	0/10 1/10 1/8 ! 0/7 ! 0/7 ! 7/9 !	$\text{LD}_{5/30}$: 6,83 (2,87— 8,61) $\text{LD}_{50/30}$: 14,25 (11,33— 33,26) $\text{LD}_{95/30}$: 29,77 (18,53—310,26)	1,83 (1,50—2,46) ^a
5	Atropin 20 + cystamin 175	6 7,5 9 10,5 13 14,5	0/9 ! 0/9 ! 0/7 ! 2/6 ! 3/8 ! 6/6 !	$\text{LD}_{5/30}$: 6,82 (3,28— 8,45) $\text{LD}_{50/30}$: 12,78 (10,61— 21,13) $\text{LD}_{95/30}$: 23,92 (16,60—109,35)	1,79 (1,35—2,44) ^a 1,28 (0,87—1,91) 2,51 (1,06—6,18) ^a

Poznámka: Vykřičník u poměru uhynulých k ozářeným myším označuje skupinu myší, ve které se do 48 h po podání cystaminu a ozáření vyskytovalo toxické hynutí myší.

cystamin. Přímky závislosti hynutí myší v probitech na dávce záření v logaritmické stupnici se významně neodchylovaly od rovnoběžnosti při srovnání výsledků 2. a 3. skupiny s 1. kontrolní skupinou myší, kterým jsme před ozářením podali pouze fyziologický roztok. Průběh přímek této závislosti 1. a 4. skupiny se významně odchyloval od rovnoběžnosti a nemůžeme proto charakterizovat radioprotektivní účinek kombinace jedinou hodnotou DRF, ale musíme tak učinit třemi odlišnými hodnotami DRF pro $\text{LD}_{5/30}$, $\text{LD}_{50/30}$ a $\text{LD}_{95/30}$, které vzhledem k nedostatečně velkým letálním dávkám radiace nemohou dosáhnout statisticky významné odlišnosti od nechráněných ozářených myší. Procentuální vyjádření hynutí však zcela jednoznačně potvrzuje vysoký antiradiační účinek cystaminu i v případě předcházející aplikace vysoké dávky atropinu.

Ve druhém pokusu tohoto typu jsme posunuli horní hranici dávky celotělového gama ozáření na 14,5 Gy, která usmrtila pouze 60 % cystaminem chráněných myší (tab. 4). Průběhy přímek

závislosti hynutí ozářených myší na dávce záření srovnávané mezi kontrolní nechráněnou skupinou myší se skupinami chráněnými před ozářením cystaminem se významně odchylovaly od rovnoběžnosti v případech 2. a 5. skupiny. U obou nevýznamně odlišné hodnoty DRF pro střední letální dávku jsou provázeny statisticky významnými hodnotami DRF pro ukazatele $\text{LD}_{5/30}$ a $\text{LD}_{95/30}$ (tab. 4).

Při srovnání antiradiační účinnosti cystaminových dávek 150 a 175 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, srovnání mezi 2. a 4. skupinou, účinnost letálního vlivu záření u myší chráněných cystaminem podaným v dávce 150 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, považovanou za 100 %, poklesla u myší chráněných vyšší dávkou cystaminu 175 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ nevýznamně na 89 (61—121) procent. Při ochraně cystaminem s atropinovou premedikací, srovnání 3. a 5. skupiny, poklesla účinnost záření na 96 (74—122) % se vzrůstem cystaminové dávky ze 150 na 175 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Atropinová premedikace nevýznamně zvýšila účinnost záření hodnocenou podle letality, u cystaminem (150 a 175 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) chráně-

ných myší na 102 (79–133) % a na 107 (79 až 151) %; jde o srovnání 2. a 3. skupiny a 4. a 5. skupiny. Vliv samotného atropinu, případně jeho kombinace s fyziologickým roztokem, na přežití celotělově ozářených myší nebyl v tomto pokusu testován.

Atropin v pokusech hodnotících přežívání myší do 30. dne po celotělovém gama ozáření vždy snížil radioprotektivní účinek cystaminu. Pokles ochrany však opět nedosáhl statistické významnosti.

Diskuse

Akutně toxické účinky intraperitoneálně podaného cystaminu zůstaly po předchozí aplikaci vysoké dávky atropinu sulfátu $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ u myší významně neovlivněny obdobně jako po premedikaci nižší atropinovou dávkou $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (19). Nevýznamné ovlivnění letálních dávek cystaminu u myší atropinovou premedikací různé dávkové úrovně vylučuje možnost významné účasti pocystaminové parasymptické aktivace v mechanismu toxického účinku protektoru u myší. Doposud časopisecky nezveřejněné výsledky o vlivu ochranné dávky cystaminu na kardiovaskulární systém myší ukázaly (20), že na rozdíl od jiných savců u myší po cystaminu vzrůstá arteriální tlak a srdeční frekvence. Ani při této farmakologické odpovědi myší na podání cystaminu nepřipadá v úvahu pocystaminová aktivace parasymptiku.

Při posuzování deprese buněčnosti tenkého střeva po jednorázovém celotělovém ozáření dávkou 10 Gy je zřejmé, že ani atropinová dávka $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ neměla žádný ochranný účinek v této oblasti stejně jako dříve použitá dávka atropinu $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (19). V obou pokusech měl cystamin jednoznačný, statisticky významný, ochranný efekt. Na rozdíl od atropinu podaného v dávce $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ atropin v dávce $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ nesnížil antiradiační účinek cystaminu v tenkém střevě. Podle zkušeností Semenova a Altuchové (38) je postradiační pokles buněčnosti tenkého střeva 2. až 3. den po ozáření vystřídán vzestupnou vlnou v počtu intestinálních buněk, která se v údobí reparace radiačního poškození několikrát rozkolísá směrem dolů a nahoru. Tak je možné, že při vyšetření buněčnosti tenkého střeva po ozáření v jediném časovém intervalu můžeme získat nejednotné, případně i rozporné výsledky, zvláště když se posuzuje vliv více faktorů na tohoto dynamicky se měnícího ukazatele radiačního poškození. Přesto jsme pravidelně zaznamenali 3. den po celotělovém ozáření dávkou 10 Gy vysoce významný pokles buněčnosti (19) nebo hmotnosti (21) tenkého střeva myší, který byl vždy signifikantně zmírněn profylaktickým podáním radioprotektivně účinné dávky cystaminu.

Vyšetření buněčnosti tenkého střeva u myší celotělově ozářených gama paprsky v dávce 10 Gy po předchozím podání relativně vysoké dávky atropinu a cystaminu nepřineslo důkaz o spoluúčasti pocystaminové aktivace vagu

v ochranném účinku cystaminu v oblasti tenkého střeva myší.

V průběhu sledování postradiačního přežití myší do 8. dne po gama ozáření celotělovou dávkou 8 Gy do doby vyšetření reparační úrovně radiačního poškození krvetvorby uhynuly 3 až 4 myši z 25 ve všech pokusných skupinách s výjimkou kontrolních myší, kterým jsme dvakrát injikovali jen fyziologický roztok. Toxický úhyn myší vyvolaný cystaminem v průběhu 48 hodin po jeho podání a následném ozáření vysvětluje snížení počtu zvířat ve 3. a 4. skupině. Úhyn 3 myší z 25 po ozáření s premedikací atropinem a fyziologickým roztokem (2. skupina) není stejně jako ve 3. a ve 4. skupině statisticky významné snížení počtu jedinců v pětadvacetičlenné skupině a považujeme jej proto za nahodilý.

Vyšetření ukazatelů krvetvorby ve slezině a v kostní dřeni ozářených myší po zvoleném osmidenním časovém intervalu jednoznačně potvrdilo vysoký ochranný efekt cystaminové antiradiační ochrany. Přestože atropin podaný v dávce $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ vždy o něco snížil ochrannou účinnost cystaminu, byl pokles vždy pouze nevýznamný, což opět je argumentem proti představě o významném podílu parasymptické stimulace v radioprotektivním účinku cystaminu u myší.

Ve dvou pokusných sériích, v nichž jsme hodnotili ochranný účinek cystaminu a jeho kombinace s atropinem podle přežití do 30. dne po ozáření myší, je průkaz ochranné účinnosti cystaminu zatížen relativně vysokým výskytem toxického hynutí myší i po dávce cystaminu $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, která byla v předchozích pokusech plně tolerována (19, 21, 22). Značný výskyt akutně toxického hynutí myší po podání cystaminu v dávce $175 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ nebyl předchozí aplikací vysoké atropinové dávky zmírněn. Hodnoty letálních dávek gama ozáření z první pokusné série jsou při profylaktickém podání cystaminu zatíženy nepřesností, protože nejvyšší použité celotělové dávky záření nevedly k stoprocentnímu uhynutí chráněných zvířat. Ani výsledky z druhé série experimentů na myších nepotvrdily statisticky významný pokles ochranné účinnosti cystaminu v případě atropinové premedikace, i když její pokles je po atropinu pravidelný.

Souhrn

Experimentální výsledky z těchto pokusů lze shrnout do těchto vývodů:

1. Atropin sulfát v dávce $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ podaný intraperitoneálně nemá žádný radioprotektivní účinek.

2. Atropin v uvedené dávce nemění akutní toxicitu intraperitoneálně podaného cystaminu.

3. Premedikace atropinem sulfátem ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i. p.) statisticky nevýznamně snižuje radioprotektivní účinnost cystaminu hydrochloridu (150 mg báze $\cdot \text{kg}^{-1}$) na úrovni postradiačního poškození krvetvorby a při hodnocení pře-

žití celotělově gama ozářených myší do 30. dne po expozici. Postradiační změny v buněčnosti tenkého střeva u cystaminem chráněných myší nebyly předchozí aplikací atropinu modifikovány.

Podle uvedených vývodů považujeme aktivaci parasimpatiku po cystaminu u myší za nepodstatnou pro navození stavu jejich zvýšené radiorezistence.

Literatura

- Bacq, Z. M.: Chemical Protection Against Ionizing Radiation. Springfield, C. C. Thomas 1965. 344 s.
- Bacq, Z. M.: Sulfur-containing Radioprotective Agents. Int. Encykl. of Pharmacol. and Ther. Section 79. Oxford, Pergamon Press 1975. 262 s.
- Bacq, Z. M. - Beaumariage, M. L. - Van Caneghem, P. - Ciccarone, P.: Importance for Radioprotective Effect in Mammals of Pharmacological and Biochemical Actions of Cysteamine and Related Substances. Ann. Ist. Super. Sanità, 1, 1965, s. 639–645.
- Bacq, Z. M. - Goutier, R.: Mechanism of Action of Sulfur-containing Radioprotectors. Recov. and Repair Mechan. in Radiobiol. Brookhaven Symp. in Biology, No. 20. NATO contract No. 161. Upton, New York, 1967, s. 241–262.
- Bajgar, J. - Patočka, J. - Jakl, A. - Hrdina, V.: Antidotal Therapy and Changes of Acetylcholinesterase Activity Following Isopryl Methylphosphonofluoridate Intoxication in Mice. Acta biol. med. germ., 34, 1975, s. 1049–1055.
- Butomo, N. V. - Kuzněcov, V. I.: Vlivání vnutřivního vvěděni cistamina i posledujuščego oblučeni na někotoryje gemodinamičeskije pokazateli. Tr. VMOLA im. S. M. Kirova, 130, 1961, s. 233–239.
- Cribon, C. O. - Rönnbäck, C.: Pharmacologic Effects of Radiation Protective Compounds Related to Their Protective Effect in Mice. Acta Radiol. Oncol., 18, 1979, s. 31–44.
- Dostál, M. a spol.: Ochranná účinnost cystaminu. [Závěrečná výzkumná zpráva Z-10-2.] Hradec Králové, VLVDÚ JEP 1967. 262 s.
- Dostál, M.: Současné názory na použití radioprotektivních látek. Čas. Lék. čes., 108, 1969, s. 397–403.
- Ishii, Y. - Fujii, Y. - Homma, M.: Gastric Acid Stimulating Action of Cysteamine in the Rat. Eur. J. Pharmacol., 36, 1976, s. 331–336.
- Kavukčjan, T. V. - Bogatyrev, A. V. - Sverdlov, A. G.: Mnohokrátne rentgenovskoje oblučeni sobak v uslovijach zaščity cistaminom. Radiobiologija, 14, 1974, s. 308–310.
- Kirkegaard, P. - Poulsen, S. S. - Halse, C. - Loud, F. B. - Olsen, S. - Christiansen, J.: The Effect of Cysteamine on the Brunner Gland Secretion in the Rat. Scand. J. Gastroenterol., 16, 1981, s. 93–95.
- Kuna, P.: Farmakologické účinky radioprotektivních látek cysteaminu, cystaminu a aminoethylisothiouronia. Čas. Lék. čes., 108, 1969, s. 404–412.
- Kuna, P.: Contribution to the Chemical Radioprotection in Rabbits. Stud. biophys., 30, 1972, s. 211–216.
- Kuna, P.: Pokusy o snížení toxické a zvýšení ochranné účinnosti chemických radioprotektivních látek. Voj. zdrav. Listy, 44, 1975, s. 71–77.
- Kuna, P.: Influence of Atropine on Cystamine Effects in Rats: Toxicity, Radioprotective Efficiency. Radiobiol. Radiother., 18, 1977, s. 717–724.
- Kuna, P.: Možnosti chemické radioprotekce v případě neutronového ozáření organismu. Voj. zdrav. Listy, 47, 1978, s. 237–244.
- Kuna, P.: Influence of Atropine on Cystamine Effects in Rats: Radioprotection of Hemopoietic Stem Cells in vivo. Radiobiol. Radiother., 19, 1978, s. 361–364.
- and Toxic Effects of Cystamine in Mice. Radiobiol. Radiother., 19, 1978, s. 593–598.
- Kuna, P.: Influence of Atropine on Radioprotective
- Kuna, P.: Snížení výskytu nežádoucích účinků cystaminu. [Habilitační práce.] Hradec Králové 1979. 208 stran. — VLVDÚ JEP.
- Kuna, P.: Vliv diazepamů na účinky cystaminu: toxicita a radioprotektivní účinnost. Voj. zdrav. Listy, 50, 1981, s. 23–31.
- Kuna, P.: Radioprotektivní účinnost po různých způsobech parenterálního podání cystaminu u myší a krys. In: Sborník věd. prací VLVDÚ JEP. 88. Hradec Králové, VLVDÚ JEP 1981, s. 3–23.
- Kuna, P.: Influence of Atropine on Cystamine Effects in Rats: Hemodynamics. Radiobiol. Radiother., 22, 1981, s. 219–224.
- Kuna, P. - Dostál, M. - Petýrek, P.: Vyživavost letátno oblučenných sobak v uslovijach chimičeskog radiozaščity i posledujuščej tērapiji. Vojenno-med. ž., 1982, č. 2, s. 68–69.
- Kuna, P. - Petýrek, P. - Dostál, M. - Šimša, J.: Srovnání radiozaštitního dějství gammafosa i cistaminu při ostrom lučevom poražení sobak. Radiobiologija (v tisku).
- Kuna, P. - Petýrek, P. - Jenšovský, V. - Melek, J.: Radioprotective Effect of WR-2721 in Rabbits: A Comparison with Cystamine. Radiobiol. Radiother., 22, 1981, s. 644–65.
- Kuna, P. - Vokrouhlický, L.: Vliv cystaminu na EKG. Voj. zdrav. Listy, 36, 1967, s. 199–201.
- Kuna, P. - Vokrouhlický, L.: Ovlivnění vzniku srdečních arytmií po cystaminu. Čs. fysiolog., 17, 1968, s. 195.
- Lichtenberger, L. M. - Szabo, S. - Trier, J. S.: Duodenal Ulcerogens, Cysteamine and Propionitrile, Stimulate Serum Gastrin Levels in the Rat. Gastroenterology, 73, 1977, s. 1305–1308.
- Machalova, O. K. - Mozžuchin, A. S. - Bertaš, V. I.: Vlivání cistamina na izměněni v běloj krvi u sobak posle rentgenovskogo oblučeni v subletalnoj doze. Radiobiologija, 6, 1966, s. 883–885.
- Maškovskij, M. D.: Lekarstvennyje sredstva. Moskva, Medicina, II. díl, 198 s.
- Mozžuchin, A. S.: Nėrvnorefleksnnyj komponent mehanizma gipotėnziji, vyzyvajemoj cistaminom i jėgo proizvodnymi. Tr. VMOLA im. S. M. Kirova, 141, 1962, s. 220–230.
- Mozžuchin, A. S. - Machalova, O. K. - Sokolova, E. N.: Vlivání cistamina na vyražennost pancitopeničeskogo sindroma ostrojo lučevoj boleznj u sobak. Radiobiologija, 5, 1965, s. 621–623.
- Mozžuchin, A. S. - Račinskij, F. Ju.: Chimičeskaja profilaktika radiacionnych poraženij. Moskva, Atomizdat 1979. 192 s.
- Robbe, Y.: Les radioprotecteurs chimiques. Radioprotection, 7, 1972, s. 229–251.
- Robbers, H.: Die pharmakologische Wirkung des Cystamins, einer blutdrucksenkenden Substanz. Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol., 185, 1937, s. 461–491.
- Roth, Z.: Grafická probitová metoda pro výpočet LD50 a relativní toxicity. Čs. fysiolog., 10, 1961, s. 408 až 422.
- Semenov, L. F. - Altuchova, L. N.: Izměněni količstva kletok tonkogo kišėčnika myšej pod vlijaniem različnych doz oblučeni. Radiobiologija, 15, 1975, s. 447–449.
- Semenov, L. F. - Strelkov, R. B. - Rešetnjak-Mojsejeva, V. I.: O vlijanii protivolučevych preparatov na myšečnuju aktivnost tonkogo kišėčnika. Farmakol. i toksikol., 28, 1965, s. 351–355.
- Strelkov, R. B.: K voprosu o vlijanii nėjrolitičeskich sredstv na aktivnost serusodėržaščich protivolučevych preparatov. Radiobiologija, 7, 1967, s. 931–940.
- Vladimirov, V. G. - Džarakjan, T. K. - Berlin, L. B. - Golubencev, D. A. - Smirnov, A. D.: Nėkotoryje prin-

- cipy ocenki effektivnosti radiozaščitnych - sredstv u čeloveka. Med. radiol., 19, 1971, č. 9, s. 54—60.
42. Vladimirov, V. G. - Pjatkovskaja, N. N.: Izučeniye radiozaščitnogo effekta cistamina po kritériju aberrantnyh mitozov v kostnom mozge pri obščem i městnom oblučeniji. Med. radiol., 19, 1971, č. 11, s. 3—6.
43. Žerebčenko, P. G.: Preděly chimičeskoj zaščity organizmov. In: P. G. Žerebčenko, A. V. Savič (ed.): Preděly modifizirujemosti lučevogo poraženija. Moskva, Atomizdat 1978, s. 130—156.
- Klíčová slova: Parasympatická aktivace; Cystamin.