

612.014.48:612.015.3

PŘÍSPĚVEK K ENERGETICKÉMU METABOLISMU V OZÁŘENÉM ORGANISMU

Blahoslav ZÍCHA, Veterinární výzkumné středisko, Praha

V průběhu nemoci z ozáření je pozorováno zvýšení a snížení aktivity u celé řady enzymatických systémů. Jak známo, je látkový a energetický metabolismus řízen regulačním mechanismem. V biologii si představujeme pod tímto pojmem regulaci nervovou a humorální. Při molekulárním působení pronikavého záření jsou však pravděpodobněji poškozeny regulační mechanismy na úrovni buňky a na úrovni submikroskopické struktury buňky. Pod regulačním mechanismem na úrovni buňky rozumíme mechanismus (HOLZER, 1959), který pomocí enzymově katalyzovaných reakcí určuje rychlost a směr látkové přeměny přímo v buňce. Tento regulační mechanismus se u vyšších organismů zásadně liší od neurohumorální regulace, ačkoli i ona ve svém konečném projevu spočívá v regulaci aktivity enzymově katalyzované reakce. Řídícími prostředky regulačního mechanismu na úrovni buňky jsou aktivace a inhibice enzymu a zvýšení a snížení enzymové koncentrace. Ovšem neméně důležité jsou ty regulační pochody, které vyvolávají změnu v rychlosti enzymově katalyzované reakce, aniž se přitom aktivita enzymu změnila. Uplatní se zde faktory: 1. nedostatek substrátu, 2. soutěživost několika enzymů o týž substrát nebo koenzym a 3. strukturální oddělenost enzymů, substrátů a koenzymů. Řešení tohoto problému by vyžadovalo v první řadě znát účinnou koncentraci metabolitu v buňce. To je ovšem velmi obtížné, protože neznáme metodu, kterou bychom změřili velikost účinného pracovního prostoru v buňce. Přímé metody nevedou k cíli, protože rozdělení není rovnoměrné. I když tedy neznáme aktuální koncentraci metabolitu v buňce, lze učinit určité závěry stanovením celkové koncentrace metabolitu. Přitom se uplatní především ty enzymově katalyzované reakce, jejichž rychlost je limitována. Takovým limitujícím faktorem mohou být jednak enzymy, jednak také koncentrace metabolitu a koenzymu. Tak koncentrace anorganického fosfátu a ADP je limitujícím faktorem pro intenzitu glykolýzy, podobně reoxydace TPNH je limitujícím faktorem pro tvorbu pentóz.

BACQ a ALEXANDER (1954) se zmiňují o možnostech poruchy strukturální vázanosti enzymů a jejich substrátů v ozářené buňce. Poruchou prostorového uspořádání enzymů, substrátů a koenzymů v buňce po ozáření (tato porucha by mohla být vyvolána již malou změnou koloidně osmotické rovnováhy submikroskopických bu-

něčných partikulí) by se dala vysvětlit pozorovaná zvýšení a snížení enzymatické aktivity v ozářeném organismu. Z tohoto hlediska není proto pravděpodobné poškození jednoho klíčového enzymu, jehož bloádou by se pak daly vysvětlit ostatní metabolické poruchy v ozářeném organismu.

Položme si otázku, který biochemický děj v organismu je in toto nejzákladnější. Takovým dějem mohou být mechanismy poskytující energii. Jsou jednak zdrojem bezprostřední energie, jednak nepostradatelné pro všechny endoergické reakce v organismu. Poruchou příkonu energie si lze vysvětlit řadu změn pozorovaných po ozáření, jako je porucha syntézy nukleových kyselin, bílkovin a ostatních biopolymérů. Navíc tato porucha není specifická, nemusí se týkat ostře vymezeného jednoho enzymatického systému, není vázána na jeden orgán a odpovídá celkovému difúznímu účinku pronikavého záření na organismus. Je proto velmi pravděpodobné, že primární účinek ionizujícího záření ovlivní regulační mechanismy na úrovni buňky. Protože účelem exoergických reakcí v organismu je získání energie, byly by změny v makroergických sloučeninách po ozáření výrazem celkové metabolické poruchy, ať již se primární poškození týkalo nějakého „rate limiting“ systému nebo strukturální uspořádanosti enzymů, metabolitů a koenzymů v buňce. Otázka zachycení primární chemické reakce v zasaženém organismu je tím složitější, že organismus pracuje pomocí zpětné vazby, která okamžitě kompenzuje vzniklé změny. Sledování energetického metabolismu po ozáření by naopak podchycovalo zpětnou vazbu a počítalo s ní a bylo by objektivním kritériem poruchy po ozáření.

Organismus jak známo využívá energii pomocí makroergických fosfátových vazeb. Tato energie se získává primárně jednak substrátovou fosforylací, jednak oxydační fosforylací. Stanovením poměru P/O nebo ekvivalentního poměru P/DPNH lze stanovit intenzitu oxydační fosforylace. Tento poměr činí 3 a poukazuje, že oxydační molekuly DPNH cestou flavincytochromového systému vznikají 3 makroergické fosfátové vazby.

V práci jsme se pokusili sledovat vliv celotělového ozáření na hodnoty ATP, ADP a AMP v ozářeném organismu. Úmyslně jsme zvolili tři druhy tkání lišících se metabolickou aktivitou a krev, sval a játra.

Materiál a metodika

Pokus byl proveden na bílých kryších kmene Wistar z vlastního chovu. Krysy byly krmeny Larsenovou dietou.

Technické podmínky ozáření: zdroj Rtg Meta, 180 kV, 10 mA, filtr 3 Al, příliv 15 r/min. Krysy byly ozářeny dávkou 800 r v rotující kleci s oddělenými boxy pro každou krysu. (Ozařování bylo umožněno laskavostí doc. dr. Z. Dienstbiera z Biofyzikálního ústavu lékařské fakulty KU).

ATP, ADP a AMP bylo stanoveno spráženými enzymatickými testy podle stechiometrické oxydace DPNH. Bylo použito testovacích souprav fy Biochimica Boehringer TC-J a TC-K. Spektrofotometr VSU 1 Zeiss, 366 mμ, kyveta 10 mm.

Výsledek a vyhodnocení

Pokus byl proveden na skupinách kryš ozářených dávkou 800 r. Hodnoty ATP, ADP a AMP byly stanoveny jednak na skupině kryš kontrolních, jednak na skupinách 24 hodin po ozáření, 5. den a 12. den po ozáření.

Vliv ionizujícího záření na hladinu ATP, ADP a AMP v krvi je uveden na tabulce číslo 1.

Tabulka 1

Koncentrace ATP, ADP a AMP v krvi kryš ozářených dávkou 800 r

	ATP v gamma/ 1 ml krve	ADP v gamma/ 1 ml krve	AMP v gamma/ 1 ml krve
kontrola	202 (19)x	57 (8)	14 (8)
24 h. po ozáření	170 (9)	50 (14)	12 (14)
5. den po ozáření	149 (9)**	52 (7)	15 (7)
12. den po ozáření	117 (9)**	52 (8)	13 (8)

x = číslo v závorce je počet zvířat ve skupině

** = statistická významnost P = 0,01

V krvi klesá průměrná hodnota ATP z 202 gamma již 24 hodin po ozáření na 170 gamma ATP/ml krve. Pokles se v časovém průběhu nemoci z ozáření prohlubuje a je statisticky významný 5. a 12. den po ozáření. Změny v ADP a AMP nejsou statisticky významné.

Na další skupině kryš jsme sledovali tytéž hodnoty ve svalové tkáni. Krysy byly usmrčeny dekapitací a stanoveny hodnoty ADP, ATP a AMP. Výsledky jsou v tabulce č. 2. Průměrná hodnota ATP v kryším normálním svalu činí 2292 gamma/g čerstvé tkáně. 24 hodin po ozáření se množství ATP významně snižuje na 1980 gamma/g tkáně, 5. a 12. den po expozici se sig-

nifikančně zvýšilo na 2490 gamma a 2656 gamma/g tkáně. Průměrná hodnota ADP v kryším svalu činí 986 gamma/g a zvyšuje se významně po ozáření na 1452 gamma, 5. den na 1440 a 12. den na 1465 gamma. Toto zvýšení je významné. Průměrná hodnota AMP činí 270 gamma/g a klesá po ozáření na 6 gamma a zůstává trvale snižena 5. a 12. den po ozáření.

Tabulka 2

Koncentrace ATP, ADP a AMP v svalstvu kryš ozářených dávkou 800 r

	ATP v gamma/ 1 g tkáně	ADP v gamma/ 1 g tkáně	AMP v gamma/ 1 g tkáně
kontrola	2292 (9)X	986 (4)	270 (4)
24 h. po ozáření	1980 (5)**	1452 (4)**	6 (4)*
5. den po ozáření	2490 (4)	1440 (4)**	77 (4)
12. den po ozáření	2656 (4)*	1465 (5)**	10 (5)*

X = číslo v závorce je počet zvířat ve skupině

* = statistická významnost P = 0,05

** = statistická významnost P = 0,01

Charakteristický je nález v jaterní tkáni. Průměrná hodnota ATP u kontrolních kryš klesá 24 hodin po ozáření z 408 gamma/g na 98 gamma/g. Pokles je statisticky významný. Pokles ATP přetrvává 5. den po ozáření (95 gamma) a zvyšuje se až v intervalu 12. den po expozici na 291 gamma/g. V hodnotách ADP na rozdíl od svalů je 24 hodin po ozáření pozorován pokles z průměrné hodnoty kontrol 425 gamma/g na 124 gamma/g. Hladina AMP se snižuje významně z hodnoty 623 gamma/g na 169 gamma/g. Výsledky jsou uvedeny v tabulce číslo 3.

Tabulka 3

Koncentrace ATP, ADP a AMP v játrech kryš ozářených dávkou 800 r

	ATP v gamma/ 1 g tkáně	ADP v gamma/ 1 g tkáně	AMP v gamma/ 1 g tkáně
kontrola	408 (9)X	425 (5)	623 (5)
24 h. po ozáření	98 (5)**	124 (5)**	169 (5)**
5. den po ozáření	95 (5)**	361 (5)	304 (5)*
12. den po ozáření	291 (5)*	388 (5)	386 (4)*

x = číslo v závorce je počet zvířat ve skupině

* = statistická významnost P = 0,05

** = statistická významnost P = 0,01

Obsah makroergických sloučenin v buňce je obecně měřítkem její vitality a snížení těchto látek po ozáření poukazuje na sníženou životnost ozářených tkání. Relativní pokles makroergických fosfátů se liší ve svém průběhu u krvin-
ky, svalů a jater a poukazuje tak nepřímě na různou radiosenzitivitu zasažených tkání. Tento odlišný pokles by se dal vysvětlit různou intenzitou energetického metabolismu a různým způsobem získání energie sledovaných orgánů. Savčí krvinka je vhodný model pro sledování metabolismu hlavně pro některá morfologická a biochemická zjednodušení, která ji odlišují od jaderných buněk. Kromě enukleace a ztráty substancie granulofilamentosae se liší zralý erytrocyt od jaderné buňky hluboce sníženou spotřebou kyslíku, ztrátou schopnosti vytvářet globin a nukleové kyseliny. Krvinky nemají mitochondrie a nedisponují proto systémem oxydujícím kyselinu pyrohroznovou. Proto jsou také energetické požadavky krvin-
ky malé. Krvinka získává potřebnou energii cestou anaerobní glykolýzy a hexosomonofosfátového šuntu. Hlavním úkolem krvin-
ky je krýt energetickou potřebu pro udržení osmotické rovnováhy a udržení v dostatečné koncentraci v redukováném stavu neustále se tvořící methaemoglobin. Tato redukce probíhá enzymaticky katalytickým účinkem methaemoglobin reduktázy, DPN a TPN závislé, přes flavinový systém (ALTMAN, 1954). Glykolytickým štěpením jedné molekuly glukózy získá krvinka 2 makroergické vazby ($4 - 2 = 2$; 2 vazby se spotřebují při substrátové fosforylaci). Aerobní oxydace je nepravděpodobná, protože kyselina pyrohroznová opouští volně difúzí krvinku, a tvořící se DPNH je intenzívně využíván k redukci methaemoglobinu. Krvinka tedy získává energii glykolýzou do stupně kyseliny pyrohroznové. Energie je pak soustředěna do vazeb typu ATP a podle vyššího obsahu 1,3-difosfoglycerové kyseliny v krvince nelze vyloučit i tento intermediát glykolýzy jako zásobní zdroj makroergických vazeb v krvince.

Pronikavé záření v uvedené dávce a technickým uspořádání pokusu ovlivnilo hodnoty makroergických fosfátů v krvince. Nejvyšší pokles je v hodnotách ATP. Ozářená krvinka pravděpodobně stačí ještě udržet svou funkci, uvážíme-li, že k udržení osmotického gradientu je zapotřebí 7 až 10 % celkové energie získané glykolýzou (VOKÁČ, 1960). Také stupeň methaemoglobinémie pozorovaný po ozáření není kritický (DOWBEN, WALKER, 1955). Další pokles v hodnotách ATP pozorovaný 5. a 12. den po ozáření poukazuje na blokádu reparačních pochodů v ozářené krvince. Hodnoty ADP a AMP se nesnižují signifikantně. Stacionární koncentrace ATP, ADP a AMP je ovšem výrazem dynamické rovnováhy všech endoergických a exoergických reakcí v buňce. Buňka reaguje na spotřebu ATP tím, že zvýšená koncentrace ADP a anorganického fosfátu stimuluje glykolytický stroj. Sníží-li se rozsah endoergických reakcí vyžadujících ATP, sníží se automaticky množství ADP a gly-

kolýza se zastaví ve stupni fosforylovaných produktů. Očekávali bychom proto při snížené koncentraci ATP zvýšení ADP při nepoškozené fosforylaci. Nastává tedy zřetelná, i když ne kritická porucha fosforylace nejspíše změnou regulačního mechanismu na úrovni buňky.

U jaterní a svalové tkáně, složené z jaderných buněk, jsou energetické pochody ve srovnání s krvinkou řádově intenzívnější. Jaderné buňky disponují enzymatickým oxydačním systémem lokalizovaným v mitochondriích. Probíhá zde na rozdíl od krvin-
ky aerobní glykolýza, která poskytuje do stupně kyseliny pyrohroznové 8 makroergických vazeb a dalších 15 vazeb oxydací kyseliny pyrohroznové v cyklu trikarbonových kyselin. Svalová tkáň se liší od jaterní po energetické stránce navíc tím, že obsahuje velkou zásobu makroergických fosfátů v kreatinfosfátu. Iniciální pokles ATP 24 hodin po ozáření je doprovázen současným zvýšením ADP. Počáteční pokles ATP by se dal vysvětlit zvýšením endoergických reakcí v ozářeném svalu, což odpovídá nálezům DOSEHO a spol. (1960), kteří pozorovali ve svalu ozářeném in vitro v první fázi zvýšení intenzity dýchání. Poškozenou glykolýzou se nevyužije ADP, které se proto hromadí. Totální pokles AMP lze také vysvětlit tak, že organismus se snaží vytvořit příznivější podmínky pro fosforylaci a katalytickým účinkem myokinázy vytváří se tak více ADP, aby stimuloval glykolýzu. Je ovšem i jiné vysvětlení, kdy regulační mechanismus na úrovni buňky defosforyluje AMP, aby vzniklý anorganický fosfát stimuloval glykolýzu. V této souvislosti je velmi zajímavý nález DOSEHO a DOSEOVÉ (1959), kteří zjistili restituci glykolýzy Ehrlichových ascitotvorních nádorových buněk ozářených dávkou 10 kr po přidání fosfátů. Souhrnně lze říci, že rovnovážný stav ATP, ADP a AMP v ozářeném svalu je porušen 24 hodin po ozáření. 5. den po expozici pozorujeme intenzívní reparační činnost, kdy hodnoty ATP a ADP jsou trvale zvýšené, koncentrace AMP však zůstává snížená. SAHASRABUDHE a spol. (1959) nepozorovali v ozářeném svalu krysu změnu v aktivitě ATP-kreatin transfosforylázy, proto by tato obecně zvrtná reakce mohla využít zásobu makroergických fosfátů v kreatinfosfátu a podnítit tak další zvýšenou tvorbu ATP pozorovanou 5. 12. den po ozáření. Je to pravděpodobně tím spíše, že játra, která mají řádově nižší obsah kreatinfosfátu, mají po ozáření trvale snížené hodnoty ATP ještě 12. den po ozáření.

Nejsilněji se projevuje vliv ionizujícího záření na makroergické fosfáty v játrech. Snížení je výraznější než u svalové tkáně a nedochází také k přechodnému zvýšení hodnot ADP jako u svalů. 5. den po ozáření nepozorujeme reparační pochody, naopak hodnoty ATP zůstávají trvale snížené a 12. den po ozáření ještě nedosahují normálních hodnot. Játra jsou ovšem nejdůležitějším orgánem pro syntézu v organismu. Intenzita metabolismu krvin-
ky, jater a svalů lépe vysvitne srovnáním spotřeby kyslíku a obsahu

Tabulka 4Obsah makroergických sloučenin v μMol . a spotřeba kyslíku krvinky, svalu a jater normální krysy

	ATP	ADP	AMP	kreatin-fosfát	kys. 1,3-di-fosfoglycerová	celkem (bez AMP)	Q_{O_2} **	množství makroergických vazeb na jednotku
krvinka	40	13	4	—	700	753	—0,65	15.600
sval	450	232	78	1600	140	2422	—2 až —3	870—1211
játra	80	100	180	90	110	470	—6 až —11	42—78

*) Podle F. G. Fischera a H. Dörfela: Nucleoside, Nukleotide, Nukleinsäuren und Nucleoproteide v Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. IV/2, Springer Verlag 1960.

**) Podle údajů W. S. Spector v Handbook of Biological Data, W. B. Saunders Com., Philadelphia 1956.

makroergických fosfátů, jak je uvedeno na tabulce č. 4. Z tabulky je zřejmé, že maximální spotřebu kyslíku mají játra; u nich také po ozáření pozorujeme největší pokles makroergických fosfátů. Spotřeba kyslíku u svalu je cca $3\times$ menší při přibližně $8\times$ větším obsahu makroergických fosfátů. Z toho vyplývá vyšší reparabilní schopnost svalu vzhledem k játrům a souhlasí s pozorovanými změnami po ozáření. Vyjádříme-li navíc množství makroergických fosfátů na jednotkovou spotřebu kyslíku, činí tento poměr pro krvinku 15 000, pro sval cca 1000 a pro játra cca 70 makroergických vazeb. Z toho lze usuzovat, že intenzita dýchání je radiosenzitivním faktorem, množství makroergických vazeb pak radioprotektivním faktorem při hodnocení biologického účinku ionizujícího záření na organismus. U svalu vysoký obsah kreatinfosfátu zvýší příkon ATP a přispěje tak k reparabilním pochodům, dříve než se upraví zářením poškozená glykolýza. U jaterní tkáně, která má vyšší spotřebu kyslíku a nižší obsah makroergických vazeb, je biologický účinek pronikavého záření výraznější a reparabilní pochody jsou proto obtížnější.

Závěr

Byl učiněn pokus srovnat vliv pronikavého záření na stacionární koncentraci makroergic-

kých fosfátů u tří druhů tkání lišících se intenzitou metabolismu, a to na krvince, svalu a játrech. Podle výsledků lze usuzovat, že vyšší koncentrace makroergických fosfátů přispívá k radiorezistenci sledované tkáně.

Vysvětlivky ke zkratkám v textu:

ADP = kyselina adenosin-5'-difosforečná, AMP = kyselina adenosin-5'-monofosforečná, ATP = kyselina adenosin-5'-trifosforečná, DPN = difosfopyridin nukleotid, DPNH = difosfopyridin nukleotid redukovaný, P/DPNH = poměr spotřeby fosforu a DPHN, P/O = poměr fosforu a kyslíku, TPN = trifosfopyridin nukleotid, TPNH = trifosfopyridin nukleotid redukovaný.

Písemnictví

- Altman K. I.: Biochim. Biophys. Acta, 15:155, 1954.
 Basq Z. M., Alexander P.: Fundamentals of Radiobiology. Butterworths' Scie, Publ., London 1955.
 Dose K., Bresciani F.: Biochem. Z., 331:172, 1959.
 Dose K., Dose U.: Biochem. Z. 332:214, 1959.
 Dowben R. M., Walker J. K.: Proc. Soc. Exo. Biol. Med. 90:398, 1955.
 Holzer H.: Carbohydrate Metabolism Annual Review of Biochemistry, 28:171, 1959.
 Sahasrabudhe M. B., Nerurkar M. K., Baxi A. J.: International J. of Radiation Biology, 1:52, 1959.
 Vokáč Z.: Čs. fyziologie, 9:129, 1960.