

615.7[547.431.6]-092.23:612.42

**ÚČINKY SUBLETÁLNÍCH DÁVEK YPERITU NA FUNKCI RES**

Marie KOUPILOVÁ

Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav Jana Ev. Purkyně, Hradec Králové

Cílem tohoto příspěvku bylo ověřit si, do jaké míry subletální dávky subkutánně a perorálně podaného  $\beta$ ,  $\beta'$ -di (chlor dietyl) sulfidu působí změny ve funkci RES, zdali fagocytózu stimulují nebo deprimují. Hlediskem pro vyjádření stimulace a deprese je fagocytární index K. Jsou mnohdy uváděna protichůdná sdělení o těchto látkách jednou v roli stimulatorů, podruhé depresorů. Zvrat stimulačního účinku

v depresorický bývá u těchto látek funkcí dávky a času (8).

Metody měření funkční aktivity RES způsobily velice významný kvalitativní obrat v experimentálním přístupu k problematice buněčné obrany organismu a umožňují vymezení látek jak se stimulačním, tak depresivním účinkem na RES.

Tato metodika byla zvolena pro sledování

vztahu mezi dávkou a biologickým účinkem yperitu. Zkoumaná noxa patří do skupiny zpu- chýřujících otravných látek, které pronikají do organismu všemi branami vstupu. Vyvolá- vají hrubé morfologické změny na místě kon- taktu s organismem a místní změny jsou velmi brzy překryty celkovými příznaky otravy. Prog- nóza otravy yperitem je velmi vážná. Nedo- jde-li ke smrti v akutním stadiu, vyvíjí se vlek- lý stav, který postupně vede k enormní ka- chektizaci, snížené odolnosti vůči banálním infekcím a častým komplikacím, které pak v dalším průběhu zkracují život. Velmi pestrý je nález v bílé krevní složce. Po počáteční krátké leukocytóze nastupuje rychle déle trva- jící leukopenie až agranulocytóza. Počet lym- focytů, stejně tak i monocytů, se po počáteč- ním poklesu relativně a u středních otrav i absolutně zvyšuje.

Velmi rychle a těžce je podle Needhamové et al. (3) poškozena dřeň. Makroskopicky je dřeň tuková, edematózní; mikroskopicky se nachází degenerace, pyknóza a vakuolizace zárodečných buněk granulocytů. V červené krevní složce se změny objevují až značně později. Jde o anémii, která vzhledem k po- škození dřene dlouho vzdoruje léčebnému úsilí.

Odolnost k sekundární infekci je snížena u všech forem zasažení yperitem. To se proje- vuje v komplikovaném průběhu lokálních změn, a to i po jejich zhojení. Například na kůži vidíme opakující se hnisavé záněty a po- dobně. Teplota je v celém průběhu otravy jen lehce zvýšena. Její náhlé zvýšení nad 38,5 °C znamená ve většině případů nástup sekundární infekce.

K úvahám o vlivu yperitu na retikuloendo- telové buňky jsme došli na podkladě skuteč- nosti, že toxické účinky yperitu jsou centro- vány do jádra buňky a spočívají v brzdění až narušování syntézy nukleových kyselin, které může probíhat trojí formou změn:

1. zabrzděním replikace DNK,
2. roztržením molekuly DNK,
3. zastavením replikace DNK nebo chybným párováním při replikaci (6), (7).

Zvláště silný vliv yperitu na buněčné dělení, na regeneraci, odhalil hlavní bod zásahu a sice biochemismus buněčného dělení.

Lze předpokládat, že u tkání s rychlou ob- měnou buněk, jako je RES, bude mít tento mechanismus odezvu.

#### Materiál a metodika

Sledování bylo prováděno na bílých krysích samcích o váze v rozmezí 110–160 g. Pro adaptaci na podmínky chovu v ústavním vivá- riu se nechávala zvířatům doba 24 hod. před započítáním pokusu a byla chována o vodě ad libitum.

Fagocytární schopnost intoxikovaného orga- nismu byla studována metodikou spočívající ve sledování rychlosti vylučování koloidních

částic uhlíku z krve, zavedenou již v roce 1951 Halpernem et al.

V první části pokusu byl jedné polovině zvířat s. c. aplikován yperit v olivovém oleji. Dávky podávané jednotlivým skupinám byly 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 a 2,5 mg/kg váhy (LD<sub>50</sub> pro s. c. podání yperitu je 3,0 mg/kg. Polovině zvířat byl s. c. aplikován olivový olej; tato zvířata tvořila kontrolní skupinu.

Vlastní sledování fagocytární schopnosti bylo prováděno po i. v. podání odměřeného množství tuše Pelikan (Günther Wagner, Ha- nover, C 11/1431 a). Pro odběry byly stanove- ny dny po předcházejících orientačních poku- sech tak, aby bylo možno zachytit změny ve funkci RES. Pozorování tedy bylo prováděno 4., 7., 10., 14., 18., 21., 28. a 32. den od podání yperitu. Vždy pěti pokusným a pěti kontrol- ním zvířatům byla i. v. aplikována ředěná tuš ve fyziologickém roztoku (16 mg uhlíku/100 g váhy). Klírens uhlíku byla sledována v časo- vých intervalech 5, 10, 15, 25, 35 a 45 minut. Krev byla odebírána z retroorbitálního venózního plexu v množství 0,025 ml do 3 ml 0,1% roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Vzorky byly měřeny na spek- trofotometru Coleman při vlnové délce 650 m, červeném filtru. Pokus při s. c. podání byl pro- veden s jedním opakováním.

Obdobným způsobem bylo prováděno sledo- vání funkce RES buněk po p. o. podání ype- ritu. Byly zvoleny dávky 0,1; 0,3; 0,5; 1,0 a 2,0 mg/kg váhy (LD<sub>50</sub> pro p. o. podání yperitu se pohybuje mezi 7,0–8,0 mg/kg). Také byl zvolen stejný počet zvířat do skupiny. Pokus byl proveden v 0., 4., 7., 10., 14., 18., 21., 28. a 32. den od podání yperitu. Klírens uhlíku byla sledována v časových intervalech 1, 5, 10, 15, 25, 35 a 45 minut.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno po- mocí srovnávání granulopeptických indexů K, počítaných ze vztahu

$$K = \frac{\log A - \log B}{b - a},$$

kde hodnota A představuje koncentraci uhlíku v krvi v čase *a*, tj. bližším vlastním injikováním, a hodnota B je koncentrace uhlíku v pozděj-ším čase *b*.

Vlastní statistické hodnocení bylo provede- no dvoufaktorovou analýzou variance. Grafy u pokusu při s. c. podání s ohledem na větší variabilitu hodnot byly upraveny metodou klouzavých průměrů.

#### Výsledky pokusů

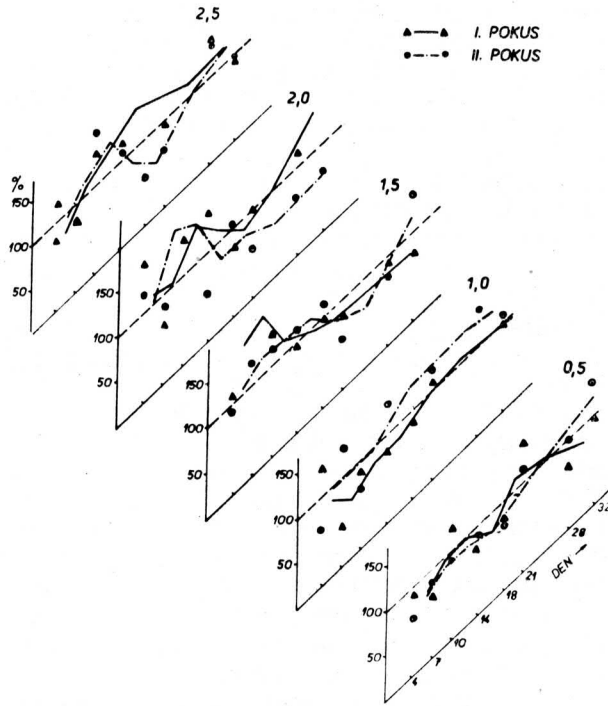
Podle postupu, uvedeného v metodické čás- ti, byla sledována klírens uhlíku v krvi po s. c. a p. o. otravách yperitem.

Na prvním grafu je vyjádřena závislost fa- gocytárního indexu K v procentech kontrol na čase v odběrových dnech při s. c. podání u prvního a druhého pokusu.

- Graf 1

Tabulka 2

Účinek s. c. podaného yperitu v dávkách 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 a 2,5 mg/kg na fagocytární aktivitu RES u krysy. (Na ose x jsou uvedeny dny odběrů, na ose y fagocytární indexy K v procentech kontrol prvního a druhého pokusu)



Je zřejmé, že u nižších dávek (0,5 a 1,0 mg/kg) je vylučování uhlíku z krve v prvních dnech po podání noxy pomalejší, zatímco v období latence se fagocytární schopnost retikuloendotelových buněk zvyšuje. Při působení dávky 1,5 mg/kg dochází k opačnému projevu. V prvních dnech je aktivita RES buněk zvýšena a s narůstajícím časem po podání yperitu se snižuje. Tato závislost je obdobná u vyšších dvou dávek (2,0 a 2,5 mg/kg).

Průběh časových závislostí u obou pokusů se zásadně neliší. Pouze maxima působení látky na RES nebyla u všech dávek ve sledované dny úplně shodná.

Výsledky dvoufaktorové analýzy rozptylu jsou uvedeny v tabulce 1 a 2.

Tabulka 1

Zdroj variability	SČ	sv	Podíl	F vy-počt.	P
Dávky	22 846,004	4	5 711,501	7,633	0,005
Dny	18 125,682	7	2 589,383	3,460	0,005
Interakce	157 865,708	28	5 638,061	7,535	0,005
Reziduální	119 727,833	160	748,299		
Celkový	318 565,227	199			

Analýza rozptylu stanovující změny v aktivitě buněk RES způsobené yperitem při s. c. podání u I. pokusu

Zdroj variability	SČ	sv	Podíl	F vy-počt.	P
Dávky	11 138,434	4	2 748,608	2,635	0,05
Dny	34 551,538	7	4 935,934	4,670	0,005
Interakce	202 996,105	28	7 249,861	6,360	0,005
Reziduální	162 756,208	154	1 056,858		
Celkový	411 442,285	193			

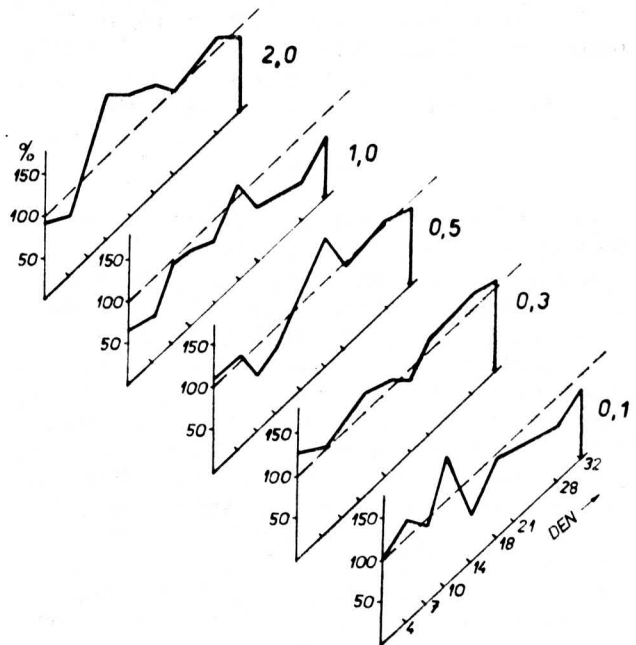
Analýza rozptylu stanovující změny v aktivitě buněk RES způsobené yperitem po s. c. podání u II. pokusu

Statisticky vysoce významné rozdíly se projevily mezi dávkami, dny a vzájemným působením těchto faktorů v prvním pokusu a ve dnech a vzájemném působení dávka — den ve druhém pokusu. Rozdíl mezi dávkami druhého pokusu byl zjištěn pouze na nižší hladině významnosti.

Graf 2 vyjadřuje závislost na čase během odběrů v procentech kontrol zachycených středními hodnotami fagocytárního indexu K při p. o. podání.

Graf 2

Účinek p. o. podaného yperitu v dávkách 0,1; 0,3; 0,5; 1,0 a 2,0 mg/kg na fagocytární aktivitu RES u krysy. (Na ose x jsou uvedeny dny odběrů, na ose y fagocytární indexy K v procentech kontrol)



U dávky 0,1 mg/kg pozorujeme v prvních čtrnácti dnech zrychlenou aktivitu RES buněk, v dalších dnech pak výrazné zpomalení. Po dávce 0,3 mg/kg je zřejmý celkově rychlejší průběh funkce. U následující dávky 0,5 mg/kg dochází k opačnému projevu, než tomu bylo při podání 0,1 mg/kg. Zprvu je aktivita deprimována a později, kolem osmnáctého dne, zase

stimulována. V ostatních pozorovacích dnech se hodnoty neliší od kontrolních. Časový průběh sledování při intoxikaci 1,0 mg/kg jednoznačně ukazuje výrazně zpomalenou aktivitu RES buněk. Při podání dávky 2,0 mg/kg můžeme hovořit o celkově zrychleném klírens asi od čtvrtého pozorovacího dne.

Tabulka 3

Zdroj variability	SČ	sv	Podíl	F vy-počet.	P
Dávky	47 180,140	4	11 795,035	14,126	0,005
Dny	26 870,739	8	3 358,842	4,023	0,005
Interakce	91 712,188	32	2 866,006	3,432	0,005
Reziduální	147 791 398	177	834,980		
Celkový	313 554,465	221			

Analýza rozptylu stanovující změny v aktivitě buněk RES způsobené yperitem po p. o. podání

Statisticky významné rozdíly se projeví mezi dávkami, dny i vzájemným působením těchto faktorů, viz tab. 3.

Výsledky pozorování RES funkce byly porovnávány s morfoloogickými nálezy a na jejich základě lze usuzovat, že bezprostředně po kontaktu noxy s tkání dochází ve sliznici u vyšších dávek ke změnám funkčního charakteru, vedoucím i k narušení nebo vyřazení funkcí obranných. Dále lze předpokládat, že patomorfoloogické změny, rozvíjející se v průběhu otravy, zvláště u vyšších dávek, právě tyto obranné funkce značně ovlivňují (9).

### Diskuse

Je známo, že yperit je počítán do skupiny biologických alkylačních činidel, což jsou sloučeniny, které se svým biologickým účinkem podobají účinkům ionizujícího záření. V celosvětovém měřítku je těmto látkám věnována stále velká pozornost, hlavně otázkám mechanismu jejich účinku. Benacerraf (1) uvádí, že ionizující záření vyvolává v organismu patofyziologické změny, které se také jako po yperitovém zasažení projevují mimo jiné poškozením imunitních mechanismů a zvýšením vnímavosti organismu k infekci. Tato zvýšená vnímavost k infekci je komplexní a zahrnuje řadu faktorů, jako je snížení počtu leukocytů a lymfocytů v periférii, útlum tvorby protilátek, poškození funkce fagocytů, zhoršenou schopnost sleziny a lymfatických uzlin zachycovat infekci.

Fagocytární schopnost RES se mění podle imunobiologického stavu organismu. Zhoršuje se při tělesné únavě, nedostatečné výživě a vlivem některých jedovatých látek.

V řadě literárních pramenů se uvádí, že výsledky pokusů jsou ovlivňovány volbou po hlaví pokusných zvířat. Na příklad Nicol et al.

(4) pozorovali, že RES aktivita se mění na základě fyziologické různosti v estrogenech. Estrogeny měly prokazatelně podněcující účinek, preparát od preparátu se lišící, jenž byl zvyšován gonadektomií. Zjistili, že již minimální dávka estrogenu, která vyvolá zvýšení klírens, je asi 100krát větší, než dávka postačující k vyvolání estru. Sledovali také vliv estrogenního cyklu na aktivitu RES, vliv těhotenství a vliv stavu po implantaci vaječnic. Vyšetřování pokusných zvířat a lidí potvrdila, že fyziologické kolísání hladiny estrogenů během estrálního cyklu a gravidity se odráží ve změně klírens RES. Tato zjištění vysvětlují nevhodnost použití samic pro tento druh pokusu. Ze stejných důvodů to nedoporučuje Perlick (5).

Průběh pokusu a jeho výsledky v obou opakováních při s. c. podání nebyly úplně shodné. Příčinou této skutečnosti je ovlivnění pokusu celou řadou faktorů. Pokusy byly dlouhodobé, probíhaly ve všech ročních obdobích. Působily zde vlivy zimy a naopak zase vyššího tepla. Mohla se zde projevit i neprokazatelná infekce, která nepříznivě ovlivní RES až po intoxikaci zvířete. Nelze vyloučit ani to, že se zde promítl vliv heterogenity pokusných zvířat.

Protože výsledky obou pokusů po s. c. podání byly homogenní, nejevilo se účelné opakování pokusu po p. o. podání.

I u nejnižších zvolených dávek se ještě projevila kolísavá odpověď ve smyslu deprese i stimulace. Podle histologických nálezů v gastrointestinálním traktu (9) je to způsobeno ložiskovým poškozením sliznice, která se vyskytuje při velmi nízkých dávkách, v tomto případě u dávky 0,1 mg/kg.

### Závěr

Touto prací bylo studováno ovlivnění aktivity RES buněk odstupňovanými dávkami yperitu subkutánně a perorálně podanými.

1. Po s. c. aplikovaných dávkách se stupeň aktivity měnil v závislosti na čase. Dávky yperitu 0,5 mg/kg a 1,0 mg/kg vykazovaly inhibiční vliv na začátku pokusu a stimulační v období latence. U dávek 1,5, 2,0 a 2,5 mg/kg byla zjištěna opačná závislost. V prvních dnech po podání noxy je RES stimulovaný a postupně dochází k inhibici.

2. Po p. o. podání se stupeň aktivity měnil v závislosti na čase obdobně jako u s. c. podání. Nízké dávky yperitu 0,1 a 0,3 mg/kg zrychlují aktivitu RES buněk, dávkou 0,5 mg/kg je aktivita částečně deprimována a později, kolem 18. dne, zase stimulována. V ostatních pozorovacích dnech se hodnoty neliší od kontrol. Časový průběh sledování při intoxikaci 1,0 mg/kg jednoznačně ukazuje výrazně zpomalenou aktivitu RES buněk. Při podání dávky 2,0 mg/kg dochází opět k obratu, tedy k celkovému zrychlení klírens.

3. Malé dávky yperitu způsobují harmonič-

tější odezvu organismu. Jednak aktivují fagocytární schopnost, neboli stimulují buňky k vyšší činnosti, a jednak, po delším působení, tyto funkce deprimují. Ovšem vyšší dávky nám některé fyziologické funkce organismu úplně naruší a na základě toho dochází ke značně neurovnané odpovědi.

### Souhrn

Tušovou klírensí byla sledována granulopetická aktivita retikuloendotelových buněk po subkutánním a perorálním podání subletálních dávek yperitu.

Byla studována závislost účinku na dávce. Výsledky ukázaly, že všechny zvolené dávky byly účinné na RES v různých časových obdobích s různou intenzitou. Nízké dávky aktivity retikuloendotelových buněk stimulují a v období latence deprimují. Vyšší dávky dávají neurovnané odpovědi.

### Literatura

1. Benacerraf, B.: Influence of irradiation on resistance to infection. *Bact. Rev.*, 24, 1960, s. 35—40.
2. Halpern, B. N., Biozzi, G., Mené, G. et Benacerraf, B.: Étude quantitative de l'activité granulopexique du système réticuloendothélial par l'injection intraveineuse d'encre de Chine chez les diverses espèces animales. I. *Ann. Inst. Pasteur.*, 80, 1951, s. 582—604.
3. Needhamová, D. M., Cohen, J. T., Barrett, A. M.: The mechanism of damage to the bone marrow in systemic poisoning with mustard gas. *Biochem. J.*, 41, 1947, s. 631—639.
4. Nicol, T. and Vernon-Roberts, B.: The influence of the estrus cycle, pregnancy and ovariectomy on RES activity. *J. Reticuloendotel. Soc.*, 2, 1965, s. 15—29.
5. Perlík, F.: Osobní sdělení, 1971.
6. Ross, W. C. J.: *Biological Alkylating Agents*. London, Butterworths 1962, s. 232.
7. Schmähel, D.: Entstehung, Wachstum und Chemotherapie maligner Tumoren. 2. vid. Aulendorf i. Württ. Editio Cantor KG 1970, s. 419.
8. Snell J. F.: The RES: I. Chemical methods of stimulation of the RES. *N. Y. Acad. Sci.*, 88, 1960, s. 56—60.
9. Urban, R.: Osobní sdělení, 1974.