

616-001.28-085.7-092.9:611-018.54:578.087.9

VLIV PARENTERÁLNĚ PODANÉHO CYSTAMINU A GAMAFOSU (WR-2721) NA NĚKTERÉ BIOCHEMICKÉ UKAZATELE V KREVNÍM SĚRU PSŮ

J. ŠIMŠA, M. TICHÝ, F. PODZIMEK, S. ŠPELDA, M. REŠL, P. KUNA
Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav JEP v Hradci Králové
(náčelník: genmjr. prof. MUDr. J. Vaňásek, CSc.)

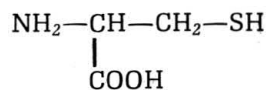
Úvod

Cystamin [2,2-dithiobis(ethylamin)] a gamafos [WR-2721, S-2-(3-aminopropylamino)-ethylthiofosforečná kyselina] patří do skupiny síru obsahujících radioprotektivních látek. Blíže příbuzný cystaminu je cysteamin [2-aminoethanthiol], případně též cystein [kyselina 2-amino-3-thiolpropionová] a cystin [dicystein].

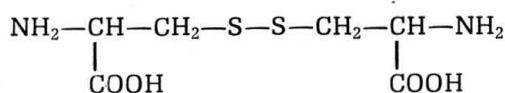
Pro lepší představu uvádíme chemické vzorce uvedených látek.

Vzhledem k tomu, že o prvních dvou látkách se uvažuje jako o radioprotektivech použitelných v indikovaných případech i u lidí, není zanedbatelná otázka jejich případných vedlejších účinků. Poměrně značná pozornost byla v minulosti věnována jejich hemodynamickým účinkům a snaze o odstranění křečí kosterního svalstva vyvolávaných cystaminem. Podrobnější informace o těchto účincích lze nalézt v práci Kuny a Vodičky (1973), Kuny (1975, 1981), Kuny aj. (1983), kde je též uvedena řada dalších prací zabývajících se těmito otázkami.

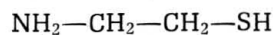
Poněkud menší pozornost byla věnována účinkům těchto látek na biochemické úrovni. V tomto směru lze uvést práci Arienta aj. (1969), v níž je popisován vzestup aminotransferáz u ozářených psů po aplikaci AET (aminoethylthiouronium). U krys sledovali účinek cysteaminu a 5-merkaptopyridoxinu na plaz-



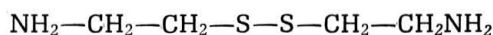
cystein



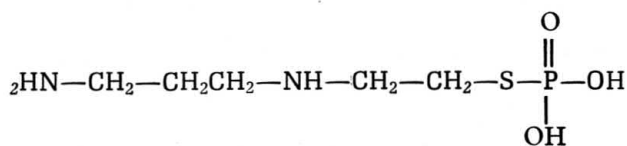
cystin [dicystein]



cysteamin



cystamin



gamafos [WR-2721]

matické enzymy Plomteaux aj. (1969). Pozorovali vzestup koncentrace laktodehydrogenázy (LDH), malátdehydrogenázy (MDH), glutamátdehydrogenázy (GLDH), aspartátaminotransfe-

rázy (AST, GOT) a beta-glukuronidázy současně s radioprotektivním efektem podaných látek.

Podání beta-merkaptioethanolu a 4-merkaptopyridoxinu tento efekt nevyvolalo, ale tyto látky také neměly u krysa žádný radioprotektivní efekt. Rovněž v našich pokusech s ozářenými psy jsme po aplikaci cystaminu pozorovali vzestup aminotransferáz AST a ALT, případně též alkalické fosfatázy (ALF), jak je uvedeno v práci Šimša a Tichý (1981), popř. v práci Šimša aj. (1983). Zajímavé je, že intravenózní podání cystaminu tyto efekty nevyvolávalo. Dalším z popisovaných účinků cystaminu je zvýšení obsahu glukózy a kyseliny mléčné v krvi. Podle Druyckaertse a Gillese (1971a) jde o výsledek zvýšené glykogenolýzy vyvolané aktivací jaterních a svalových fosforyláz. Podrobněji se touto problematikou autoři zabývají v další práci (1971b). Předpokládají, že k aktivaci fosforyláz dochází přes katecholaminy, uvolněné v důsledku hypotenze vyvolané cystaminem.

pil cystinózy) zabývají Avner aj. (1983). S tímto názorem však polemizují Gahl aj. (1983).

Z hlediska změn v obsahu lipidů, které jsme po cystaminu rovněž pozorovali, je dále zajímavá práce Fischera a Gahla (1982), kteří popisují příznivý efekt podávání cysteaminu u lidské hyperlipidémie typu III (apo E₂).

Materiál a metodika

K pokusu bylo použito tři psů-bíglů (samci) o hmotnosti 17,5; 18,5; 19,5 kg. Prvnímu byl podán gamafos v dávce 300 mg · kg⁻¹ intramuskulárně, druhý pes obdržel 50 mg · kg⁻¹ cystaminu base intravenózně a třetí 150 mg · kg⁻¹ cystaminu base intramuskulárně.

V intervalech 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h byly od zvířat odebírány vzorky krve z v. cephalica antebrachialis, ze kterých bylo odděleno sérum, kterého bylo použito pro biochemická vyšetření. Z enzymů byla stanovována aktivita aspartátaminotransferázy

	AST	ALT	ALF	CK	GGTP	LDH	MDH	SDH	alfa—A
Gamafos I. M.						+	+		++
Cystamin I. V.				++	++(+)	+	+		
Cystamin I. M.	+++	+++	++	+++		+++	+++	(+)	
Vzestup	100—200 % ++; 200—500 % ++; více jak 500 % +++								
Distribuce									
Kosterní svalstvo	+++	++		+++	?	+++	+++		
Játra	+++	+++	++		+++	+++	+++	++++	

Z hlediska případné hepatotoxicity cystaminu, o které uvažujeme v další části této práce, je zajímavé sdělení Strubeldta aj. (1974) o příznivém účinku cystaminu a cysteaminu podávaného i. p. myšim otráveným paraacetamolem (paraacetamidofenol) a práce DeFerreyry aj. (1979) popisující příznivý účinek těchto látek u krysa otrávených dimethylnitrosaminem, thioacetamidem a brombenzémem, kde zabráňovaly vzniku jaterní nekrózy. Při otravě allylalkoholem a aflatoxinem B₁ byly tyto látky neúčinné.

Autoři vysvětlují antitoxický účinek cystaminu a cysteaminu tak, že tyto látky mění charakter reakce jaterních buněk na podané hepatotoxiny. Z novějších prací se možnou hepatotoxicitou cysteaminu (podávaného při tera-

(AST), alaninaminotransferázy (ALT), alkalické fosfatázy (ALF), kreatinkinázy (CK), gama-glutamyltranspeptidázy (gama-GT, GGTP) na analyzátoru firmy ABBOTT, dále dehydrogenázu kyseliny mléčné (LDH), dehydrogenázu kys. jablečné (MDH), dehydrogenázu sorbitolu (SDH) a alfa-amylázu pomocí kitů firmy Lachema.

Dále byl na analyzátoru Abbot stanoven obsah celkové bílkoviny, albuminu, celkového bilirubinu, dusíku močoviny (BUN), kreatininu a glukózy. Koncentrace triglyceridů, celkových lipidů, celkového cholesterolu a vápníku byla stanovena opět pomocí kitů Lachema. Sodík a draslík byl stanoven plamenovou fotometrií na přístroji fy. Radiometr. U některých vzorků

s vysokou aktivitou LDH bylo provedeno stanovení izoenzymů LDH elektroforézou na acetylcelulóze v modifikaci podle Tichého a Zadáka (1973). Podobně byly v několika vzorcích stanoveny izoenzymy kreatinkinázy CK-MM, CK-MB a CK-BB, s využitím souprav fy. Sigma (USA).

K pokusům byl použit cystamin.2HCl a gamafos (base) československé provenience (viz práci Kuna aj., 1983). U cystaminu udáváme dávky přepočtené na obsah base.

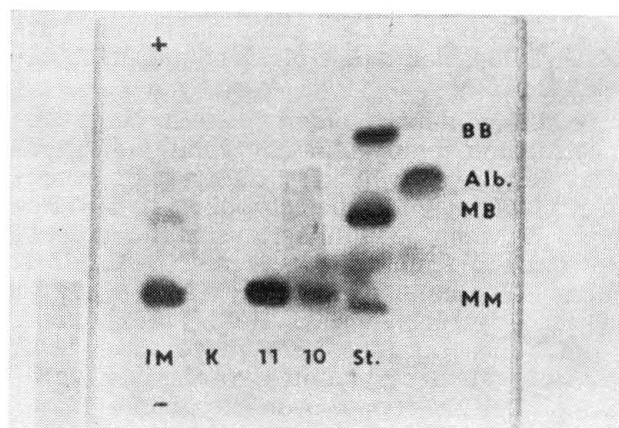
Výsledky jsou uvedeny v procentech kontroly, tedy hodnoty, nalezené u téhož psa před aplikací té které látky. Pro ilustraci jsou uvedeny u intervalu 0 (kontroly, 100%) v jednotlivých grafech příslušné hodnoty v absolutních jednotkách.

Výsledky a diskuse

Výsledky stanovení jednotlivých enzymatických aktivit jsou shrnuty v grafech 1–9. Pro větší názornost připojujeme následující tabulku:

Pokud jde o distribuci enzymů v kosterním svalstvu a játrech bylo totiž jedním z našich cílů v tomto pokuse zjednat jasno v otázce, zda vzestup aktivity aminotransferáz po i.m. podání cystaminu je vyvolán lokálními změnami svalové tkáně v okolí vpichu, nebo jeho toxickým (byť krátkodobým) působením na játra, popřípadě kombinací obou efektů. Vznik intersticiálního edému a později nekrotických změn byl po i.m. podání cystaminu psům a králíkům prokázán histologickými vyšetřeními, přičemž aplikace gamafosu vedla ke změnám podstatně menším a krátkodobějším (Rešl aj., 1983).

Námi pozorované změny enzymatických aktivit jsou celkem v souladu s uvedenými nálezy, pokud jde o zánětlivé a nekrotické změny vyvolané cystaminem i.m. Nasvědčuje tomu vzestup aktivit AST, ALT, CK, LDH, MDH (grafy 1, 2, 4, 6, 7), i když s výjimkou CK jsou všechny tyto enzymy, lépe řečeno jejich příslušné izoenzymy, přítomny též v játrech (Homolka, 1969). U kreatinkinázy (CK) jsme u některých vzorků po cystaminu i.m. provedli stanovení izoenzymů (obr. 1), kterým byla potvrzena přítomnost kosterně svalového izoenzymu CK-MM. V případě LDH je vzestup celkové aktivity po i.m. aplikaci cystaminu způsoben 5. izoenzymem (LDH₅), který je obsažen v kosterním svalstvu, ale též v játrech (Wilkinson, 1965). Obrovský vzestup aktivity CK, resp. jejího MM izoenzymu, je nutno ovšem jako projev zánětu a nekrózy svalu v okolí vpichu hodnotit s jistou opatrností. Po podání cystaminu docházelo u obou psů ke křečím kosterního svalstva, zejména po dávce 150 mg. kg⁻¹ i.m. (viz práci Kuny, 1981). Je proto možné, i když o zmíněném histologickém průkazu svalových lézí po cystaminu i.m. není pochyb, že velká část vzestupu aktivity CK-MM a LDH₅ mohla být způsobena



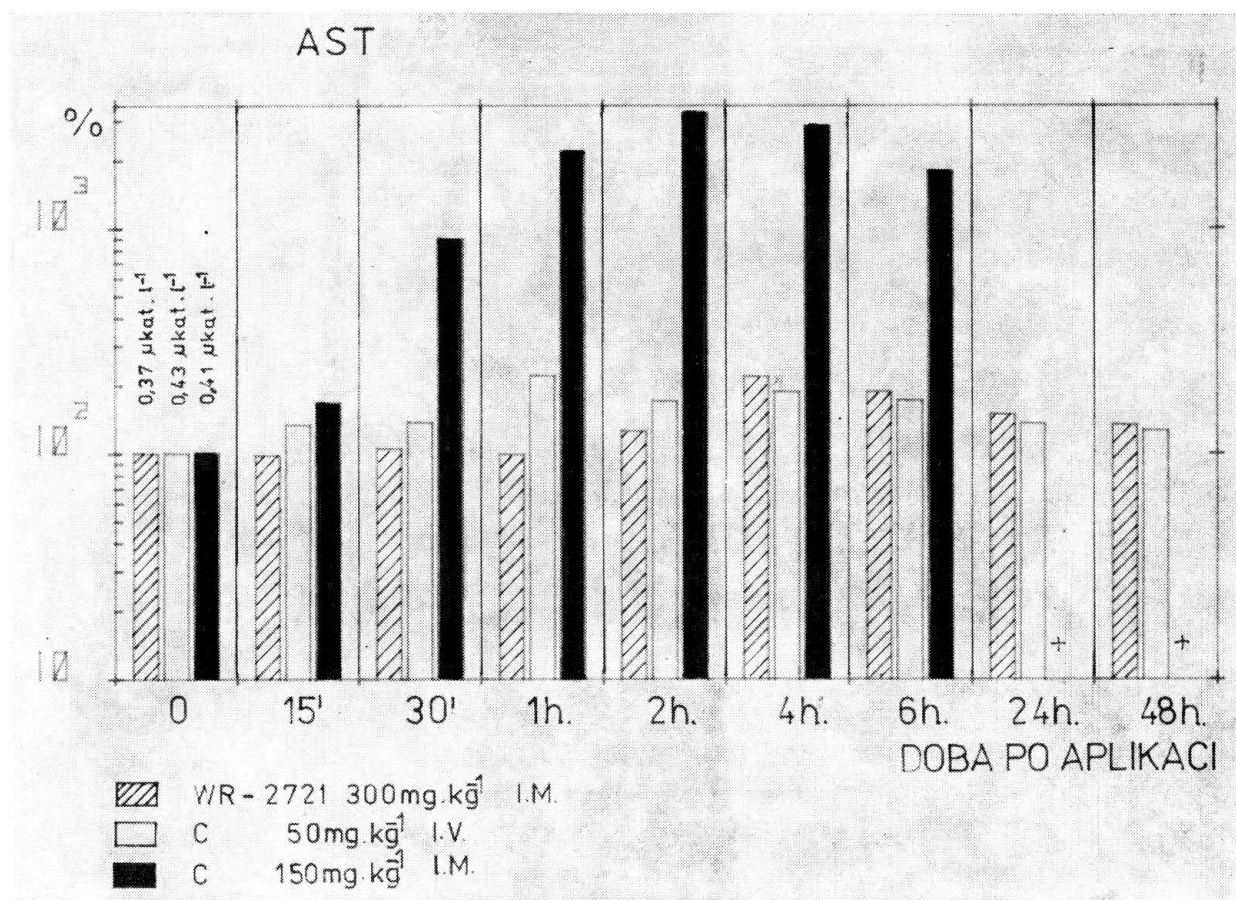
Obr. 1.

Elektroforetické dělení izoenzymů kreatinkinázy. Anoda nahoře. Starty zleva doprava: sérum pacienta s infarktem myokardu (IM), psí sérum před i.m. podáním cystaminu (K), psí sérum za 2 a 4 hodiny po i.m. podání cystaminu (11, 10), standard izoenzymů kreatinkinázy (St), zcela vpravo lidský albumin. Vpravo po straně označena poloha skvrn izoenzymů CK-MM, CK-MB, CK-BB a albuminu. U vzorku 10 a standardu nespecifické arteficiální zabarvení v blízkosti zóny CK-MM

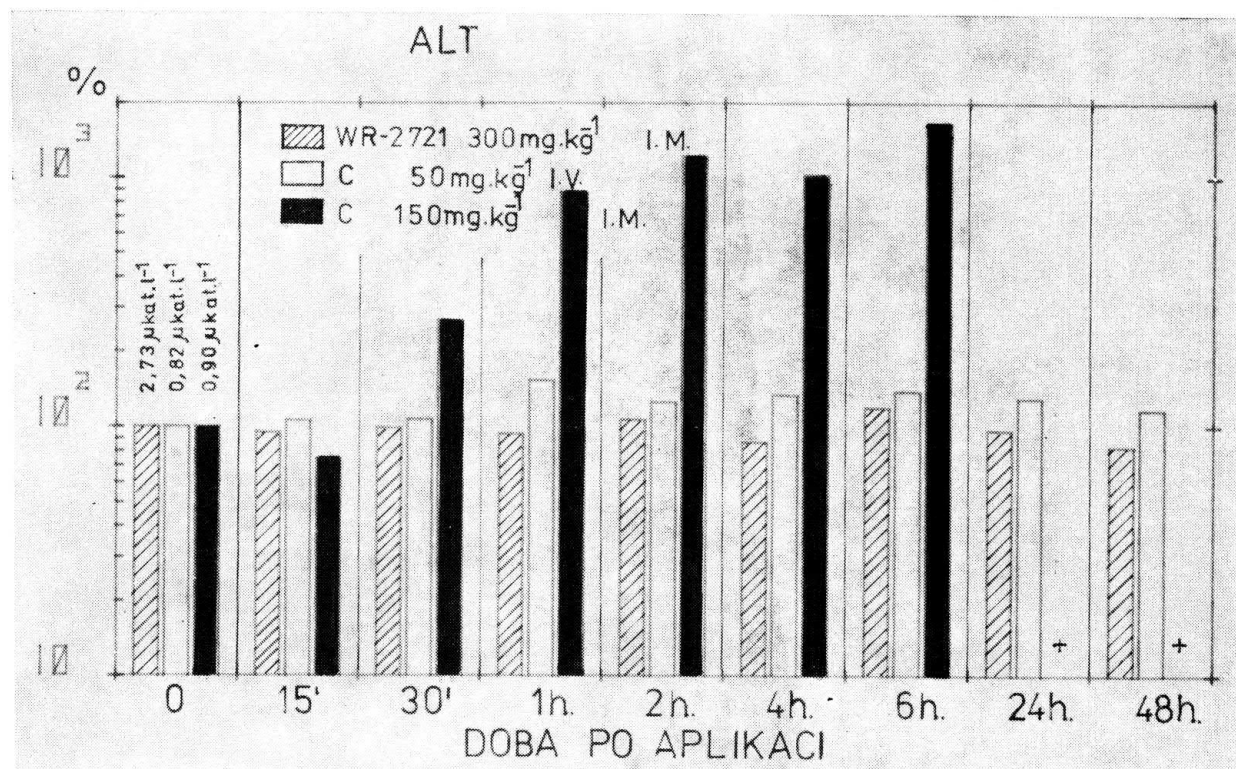
bená uvolněním z kosterních svalů během křečí. Pro přesnější informaci bude třeba provést tato enzymatická vyšetření ještě u psů premedikovaných před podáním cystaminu Diazepamem, jak je uváděno v již citované práci Kuny (1981). Pokud jde o poškození, nebo spíše přechodné zatížení jater, není možno jej na základě nálezů získaných po i.m. podání cystaminu vyloučit. Svědčí pro něj též vzestup aktivity ALF (graf 3) a SDH (graf 8), případně též zvýšené hodnoty celkového bilirubinu (graf 10). Jedná se však zřejmě o přechodné působení a změny jaterních funkcí jsou pravděpodobně ve vztahu k radioprotektivnímu účinku cystaminu, jak uvádí Plamteux aj. (1970). Zajímavé ovšem je, že i.v. aplikace cystaminu nevedla k výraznějším změnám v aktivitě aminotransferáz, zato však k vzestupu aktivity gamma-glutamyltranspeptidázy (GGTP) (graf 5), která je uváděna jako enzym značně specifický a citlivý pro toxické poškození (nebo zatížení) jater.

Pes, kterému bylo aplikováno 150 mg. kg⁻¹ cystaminu i.m., uhynul za 6 hodin po aplikaci. Játra a ledviny byly odebrány pro histologické vyšetření. Bylo zjištěno výrazné překrvení, zcela ojediněle minimální fokální nekrózy s granulocytární reakcí, zpravidla centrilobulárně lokalizované. Malokapénková steatóza, jen ložiskově na periférii lobulů. Nebyly nalezeny známky cholestázy, aktivace sinoendotelii či Kupferových buněk. Parenchym ledvin s přiměřeným mikroskopickým nálezem. Morfologický nálezní nesvědčí pro výraznější poškození hepatální nebo renální. Lze jej hodnotit jako nespecifické změny při terminální kardiální insuficienci.

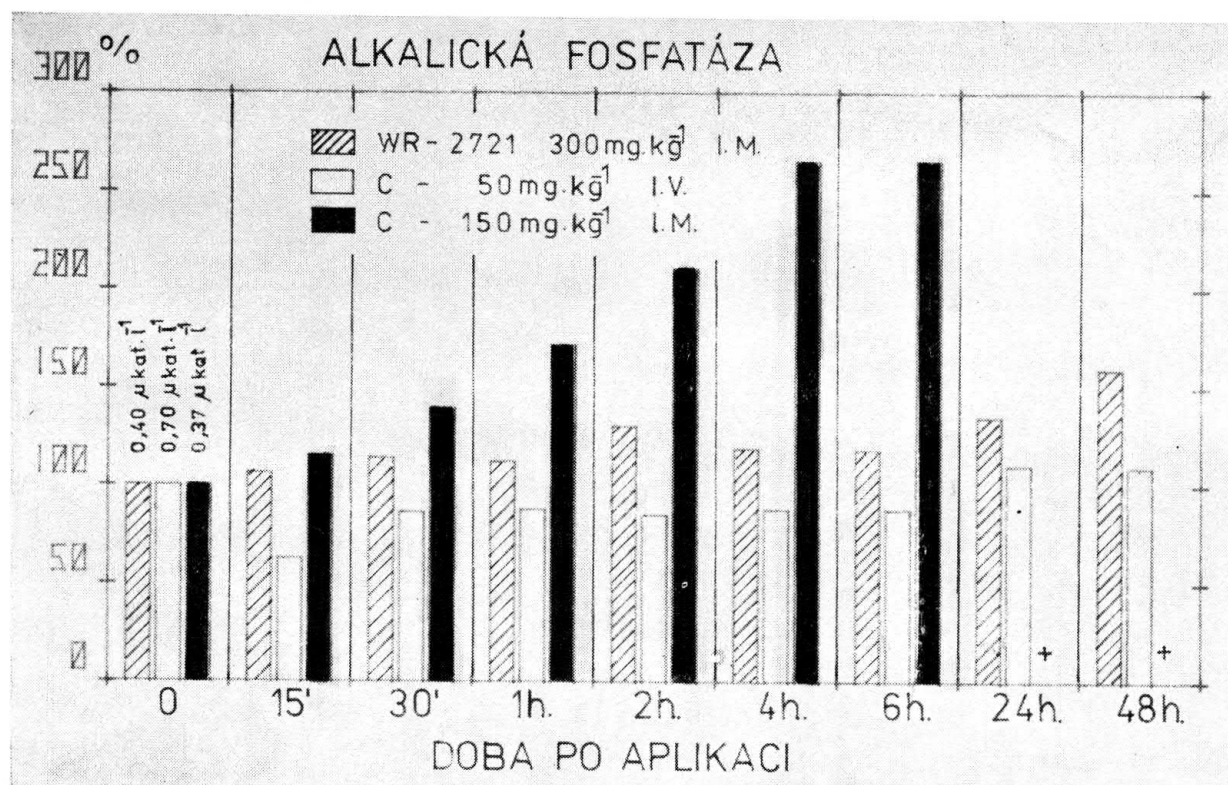
Jak je zřejmé z dříve uvedené tabulky, byly po i.m. aplikaci gamafosu pozorovány pouze



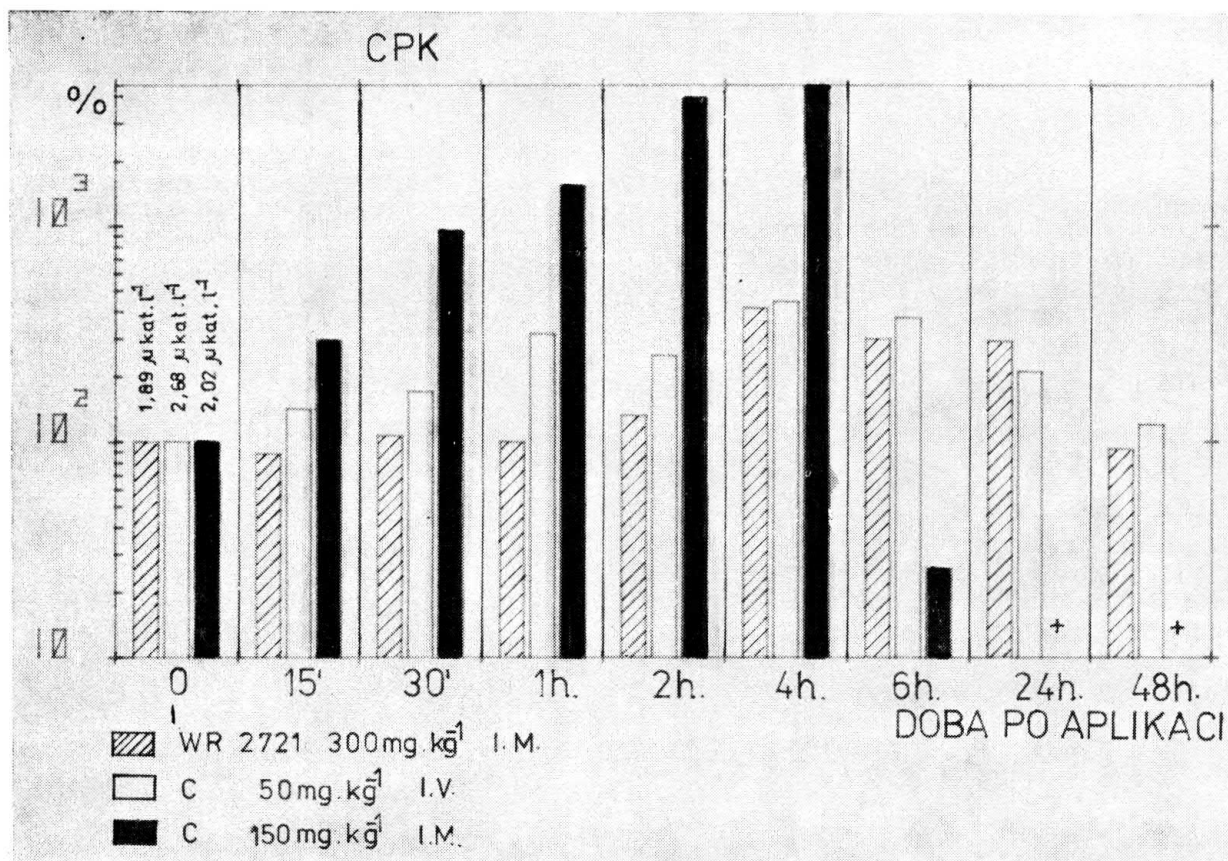
Graf 1. Změny aktivity aspartátaminotransferázy (AST, glutamát/oxalacelát transamináza, GOT)



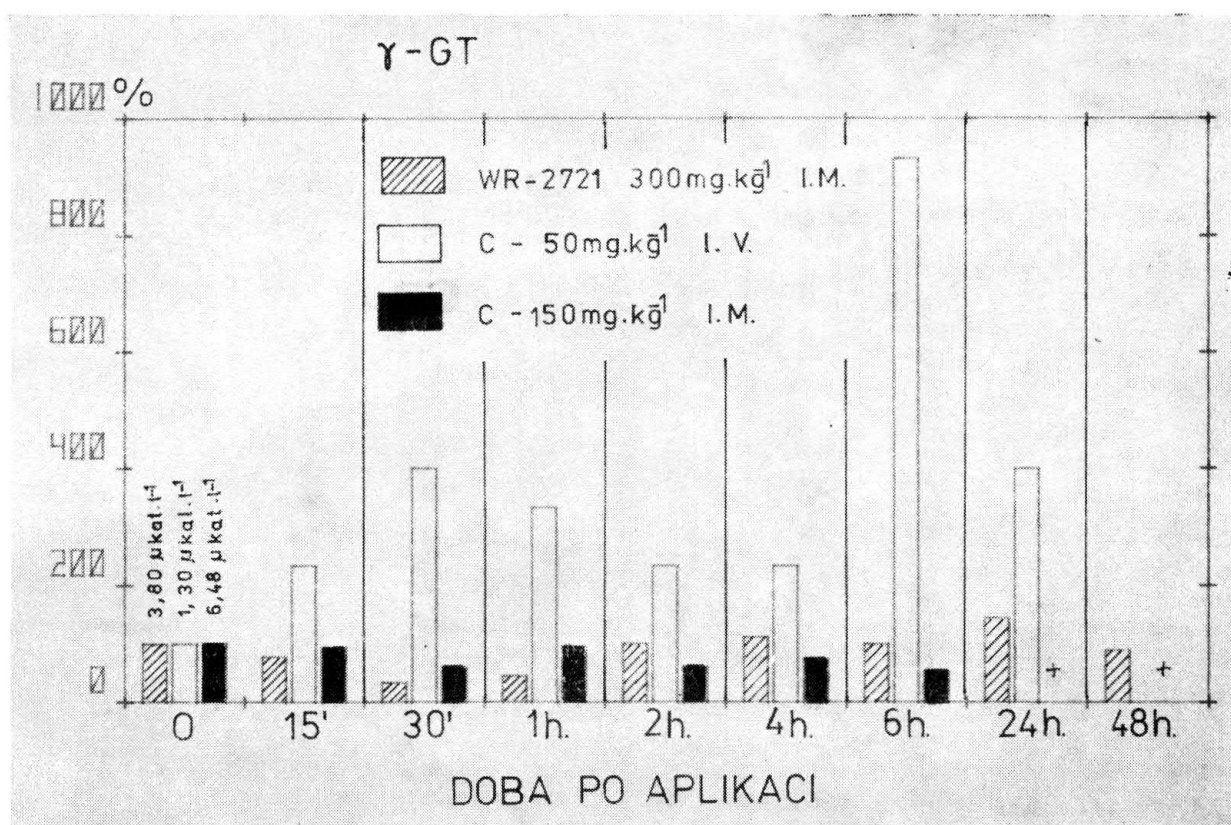
Graf 2. Změny aktivity alaninaminotransferázy (ALT, glutamát/pyruvát transamináza, GPT)



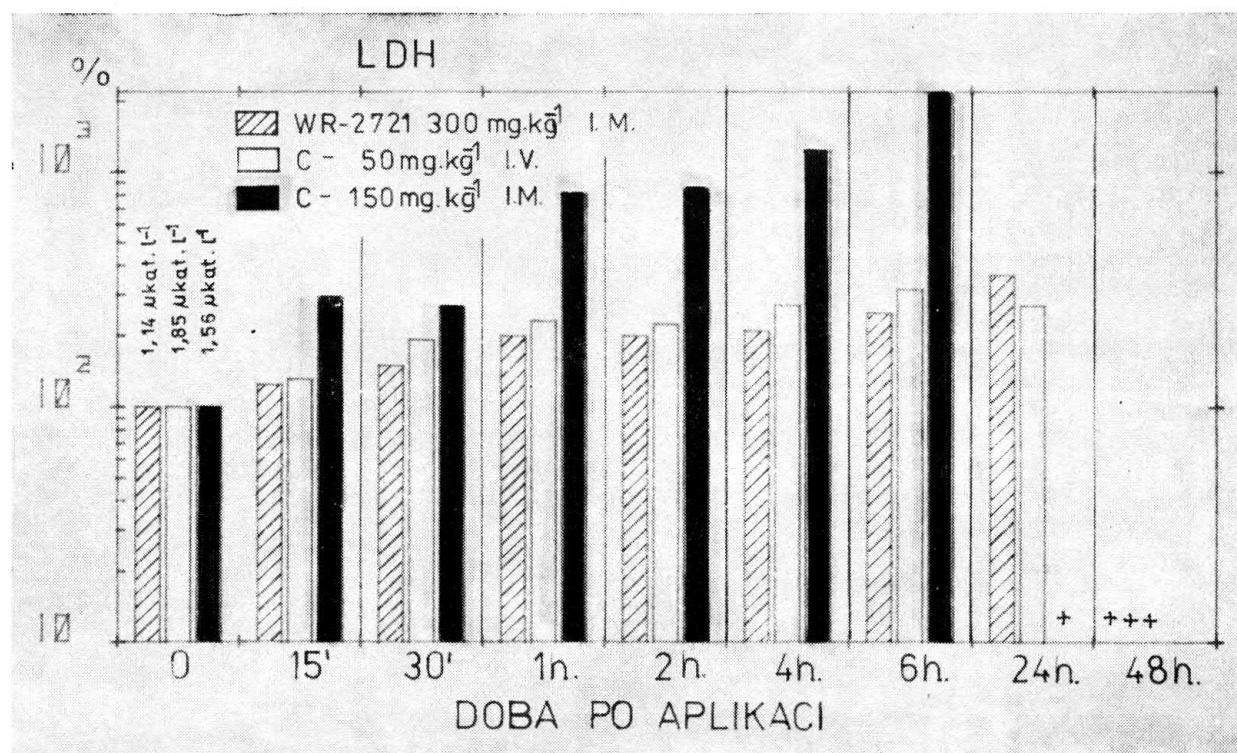
Graf 3. Změny aktivity alkalické fosfatázy (ALF)



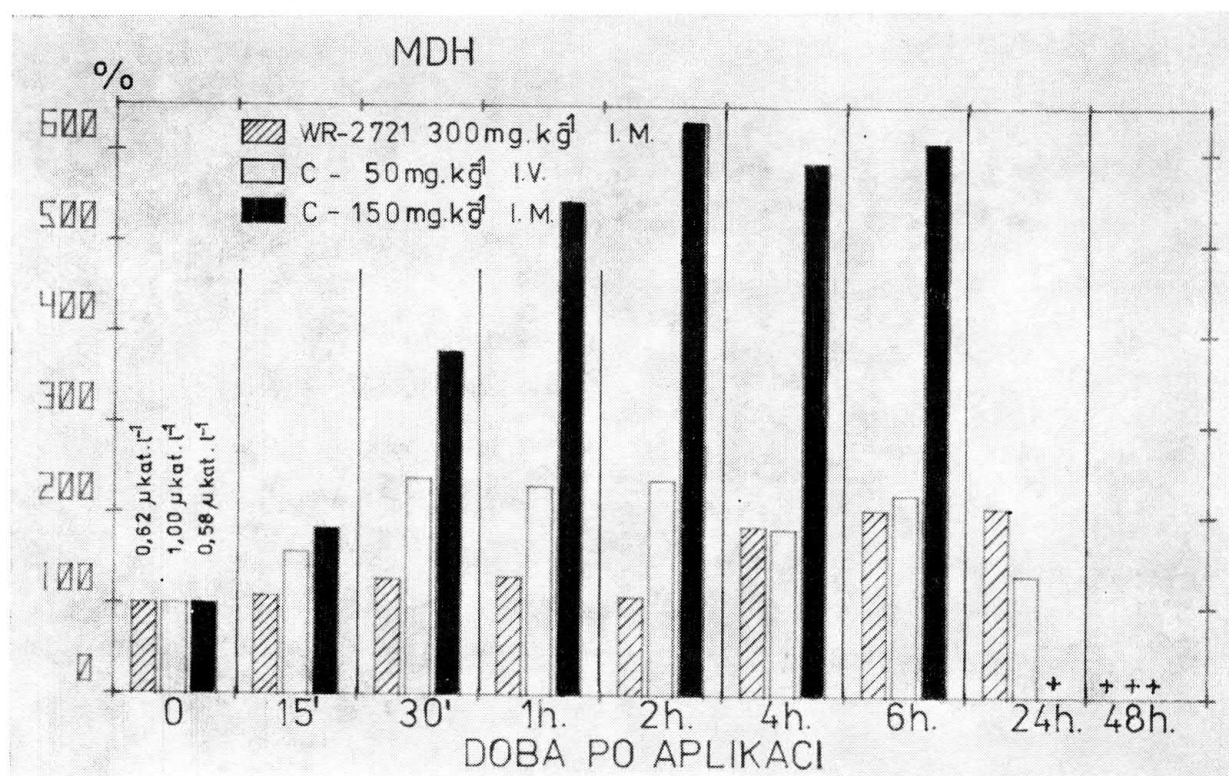
Graf 4. Změny aktivity kreatinkinázy (kreatinfosfokináza, CK, CPK)



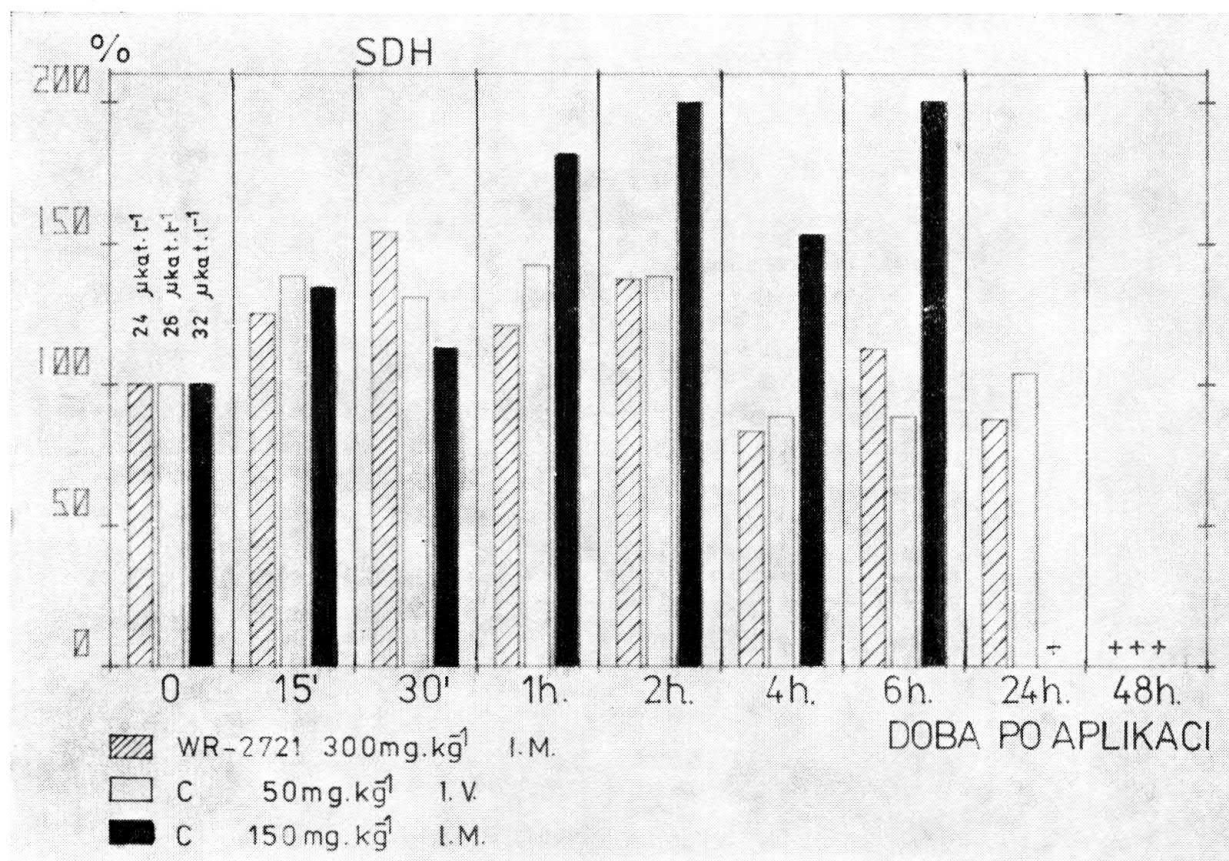
Graf 5. Změny aktivity gamaglutamyltransferázy (GT, GGTP)



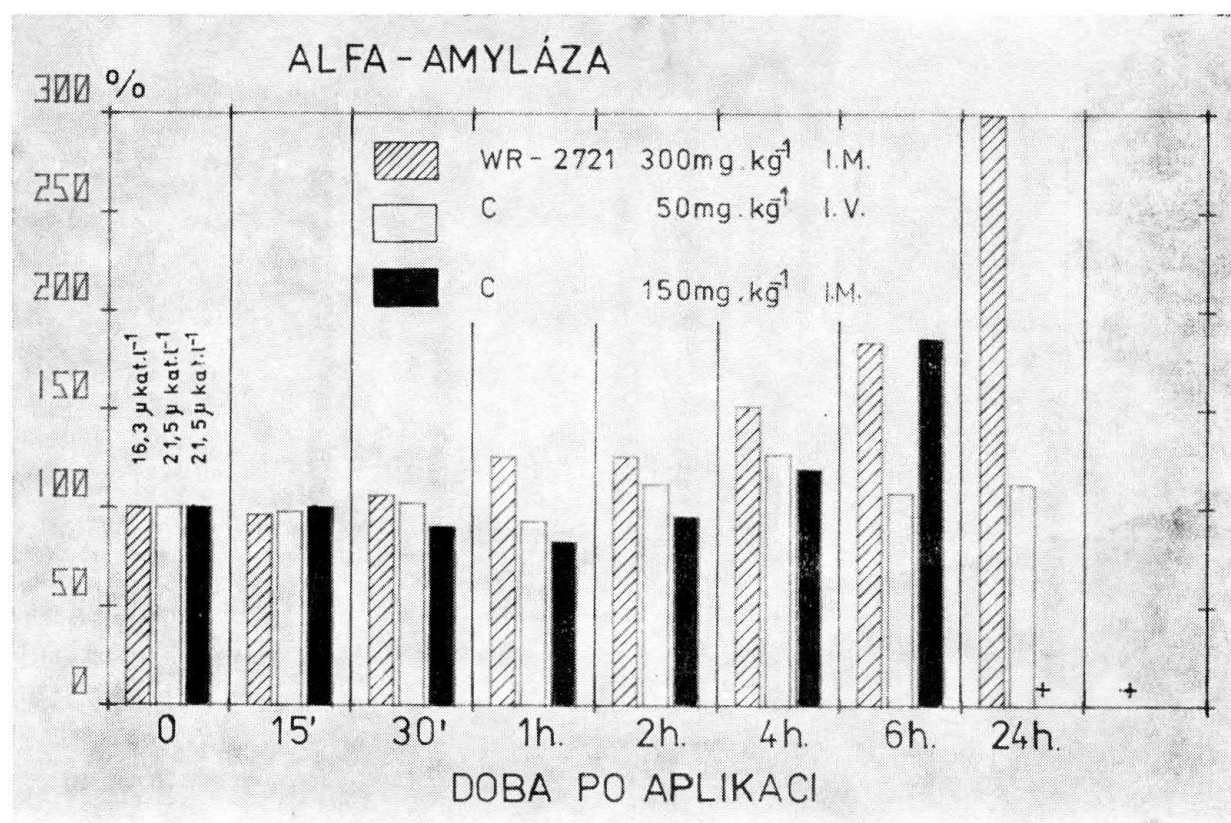
Graf 6. Změny aktivity dehydrogenázy kyseliny mléčné (laktátdehydrogenáza, LDH)



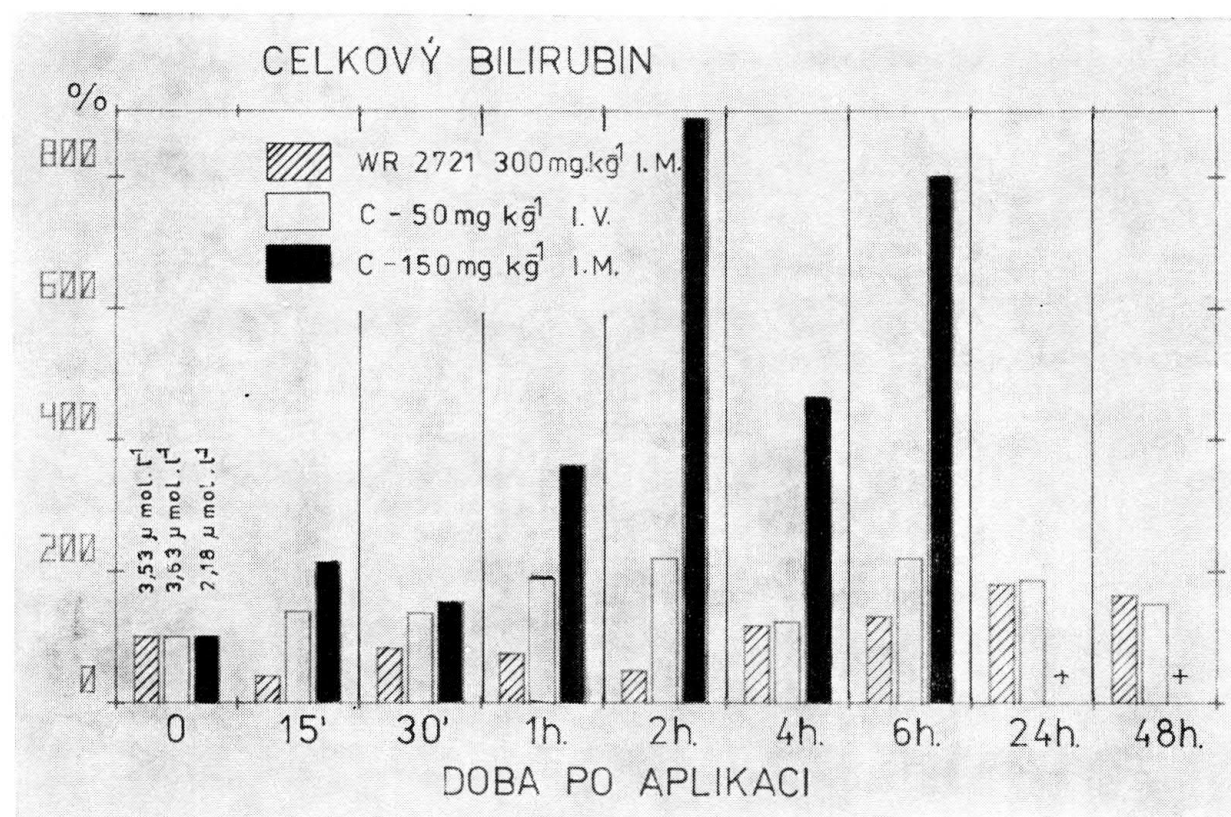
Graf 7. Změny aktivity dehydrogenázy kys. jablečné (malátdehydrogenáza, MDH)



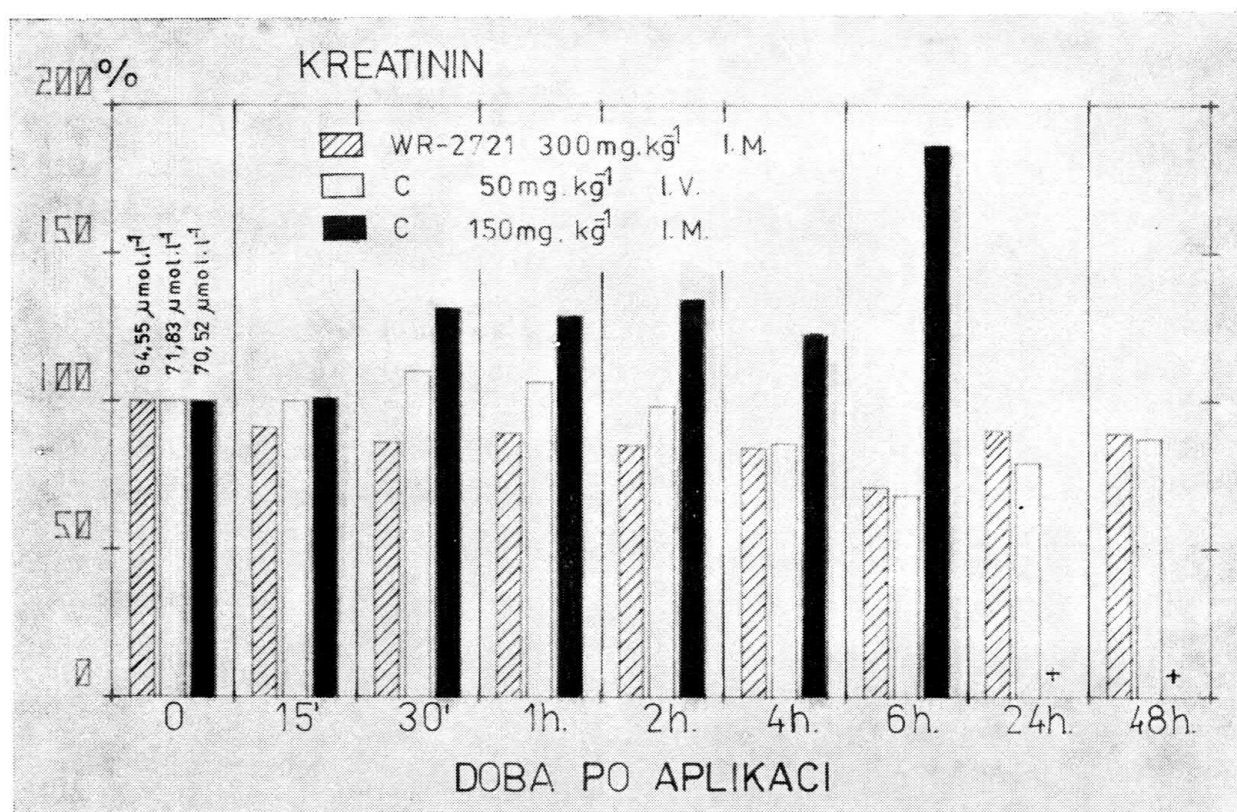
Graf 8. Změny aktivity dehydrogenázy sorbitolu (sorbitoldehydrogenáza/dehydrogenáza, SDH)



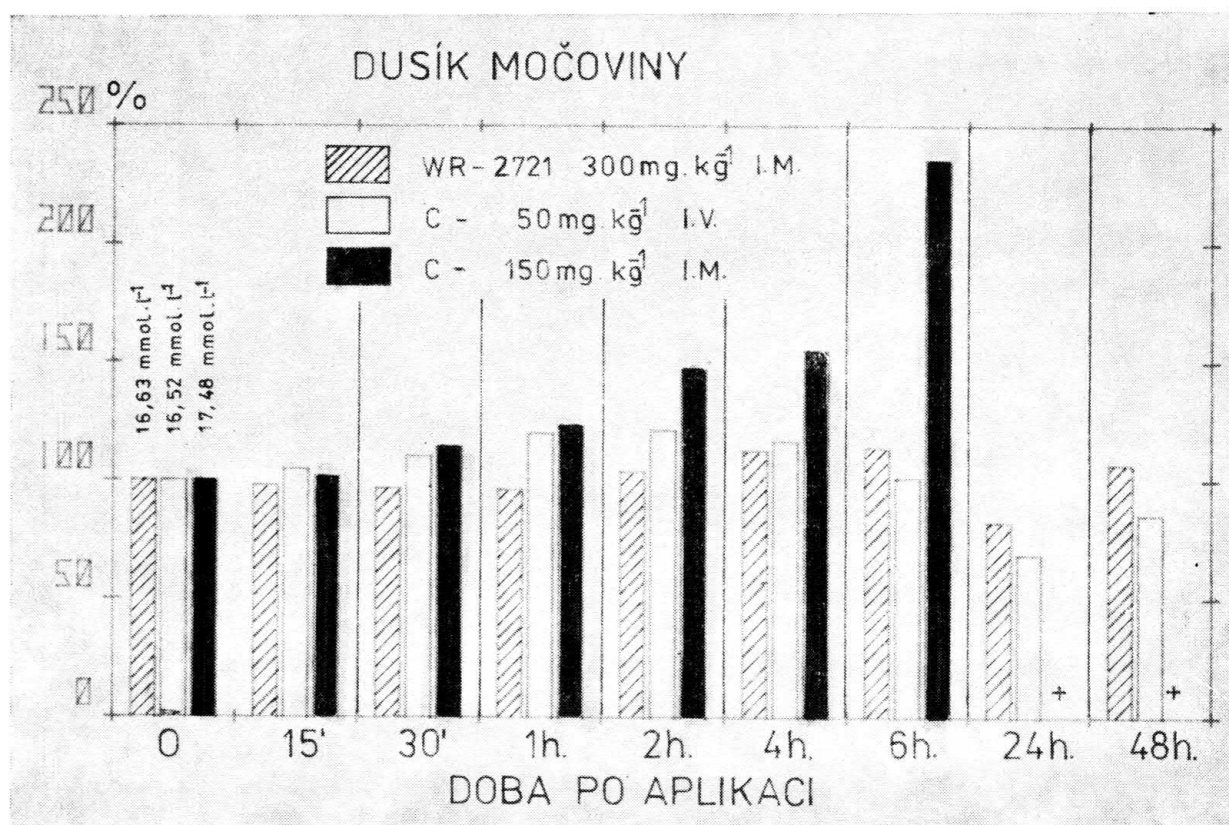
Graf 9. Změny aktivity alfa-amylázy



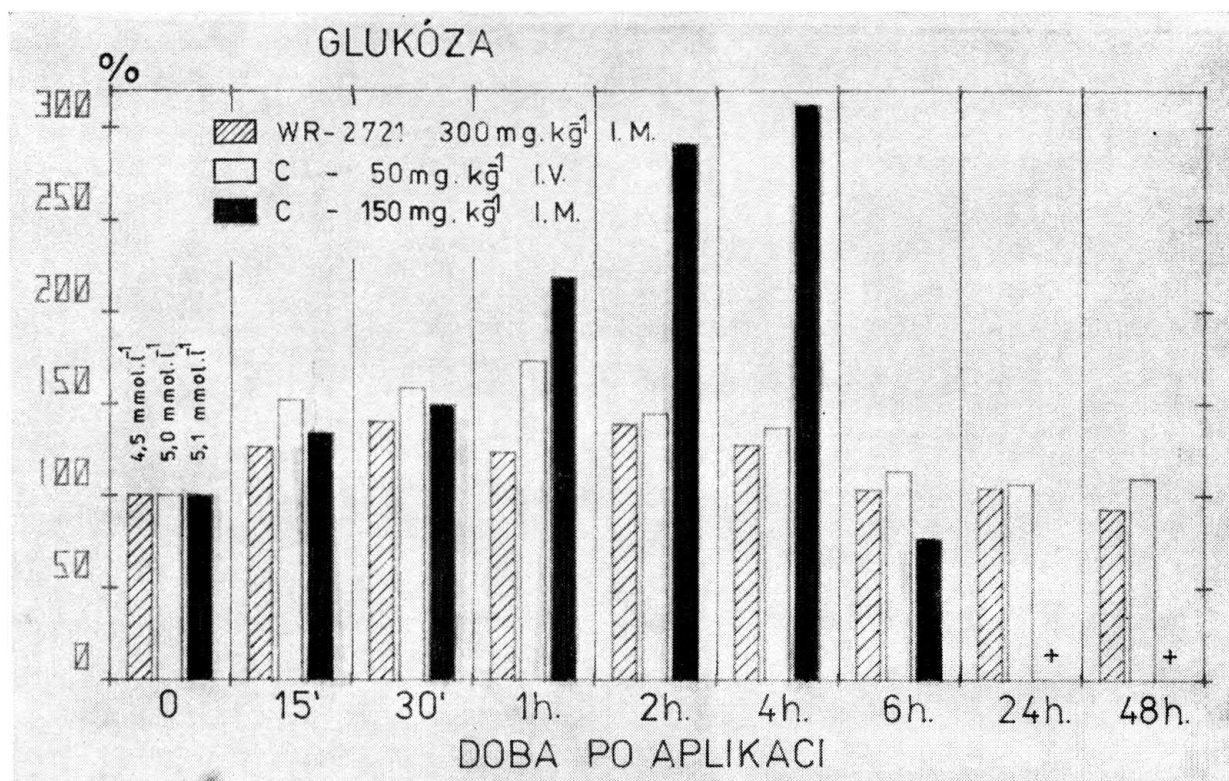
Graf 10. Změny koncentrace celkového bilirubinu



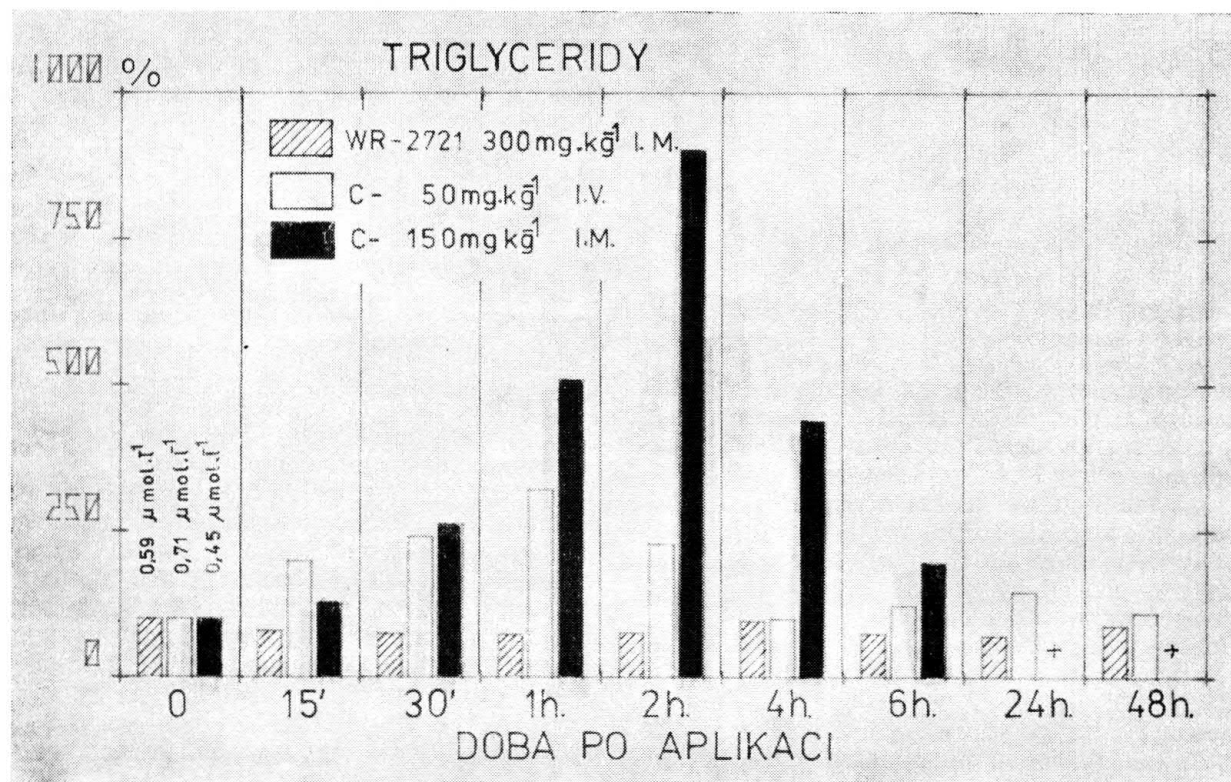
Graf 11. Změny koncentrace kreatininu



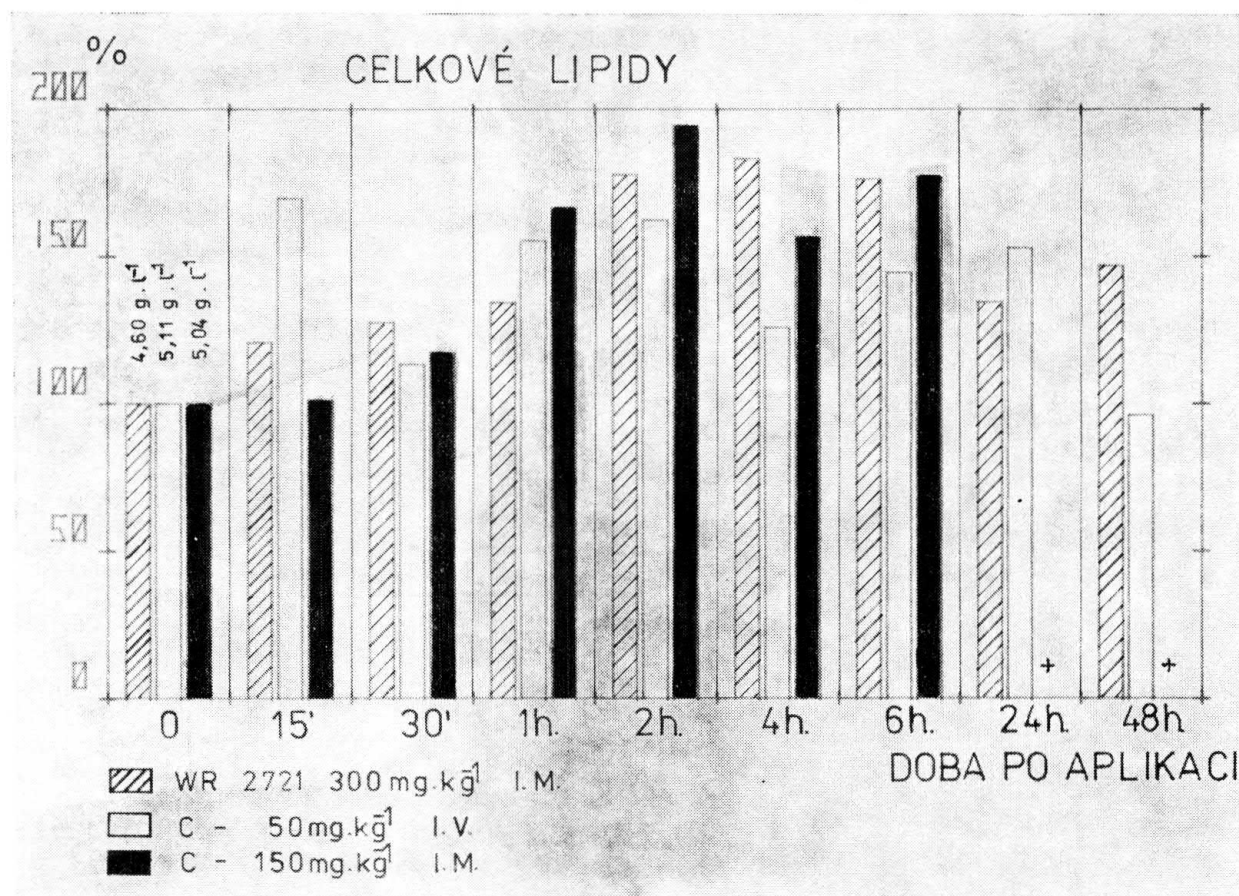
Graf 12. Změny koncentrace dusíku močoviny (BUN)



Graf 13. Změny koncentrace glukózy



Graf 14. Změny koncentrace triglyceridů (triacylglyceroly, neutrální tuky)



Graf 15. Změny koncentrace celkových lipidů

malé změny v enzymatické aktivitě séra (LDH, MDH), zajímavý je však vzestup aktivity alfa-amylázy, pozorovaný ve druhé polovině pokusu. Existují 2 izoenzymy alfa-amylázy — slinný (S) a pankreatický (P). Je tedy zatím otázkou, který z nich je příčinou pozorovaného vzestupu. Pravděpodobnější se zdá vzestup pankreatické složky.

Z ostatních, neenzymatických biochemických parametrů byly výraznější změny pozorovány pouze v koncentraci kreatininu, dusíku močovininy (BUN), glukózy, triglyceridů a celkových lipidů (grafy 10—15). U kreatininu je určitý vzestup po aplikaci cystaminu zřejmě vyvolán křečovou aktivitou kosterního svalstva pokusných zvířat. U dusíku močovininy je vzestup koncentrace zřejmě způsoben depresivním účinkem cystaminu na krevní oběh, případně narůstající srdeční insuficiencí u 3. psa. Je třeba uvést, že u intervalu 6 hodin jde o odběr post mortem, provedený punkcí srdce při otevřeném hrudníku.

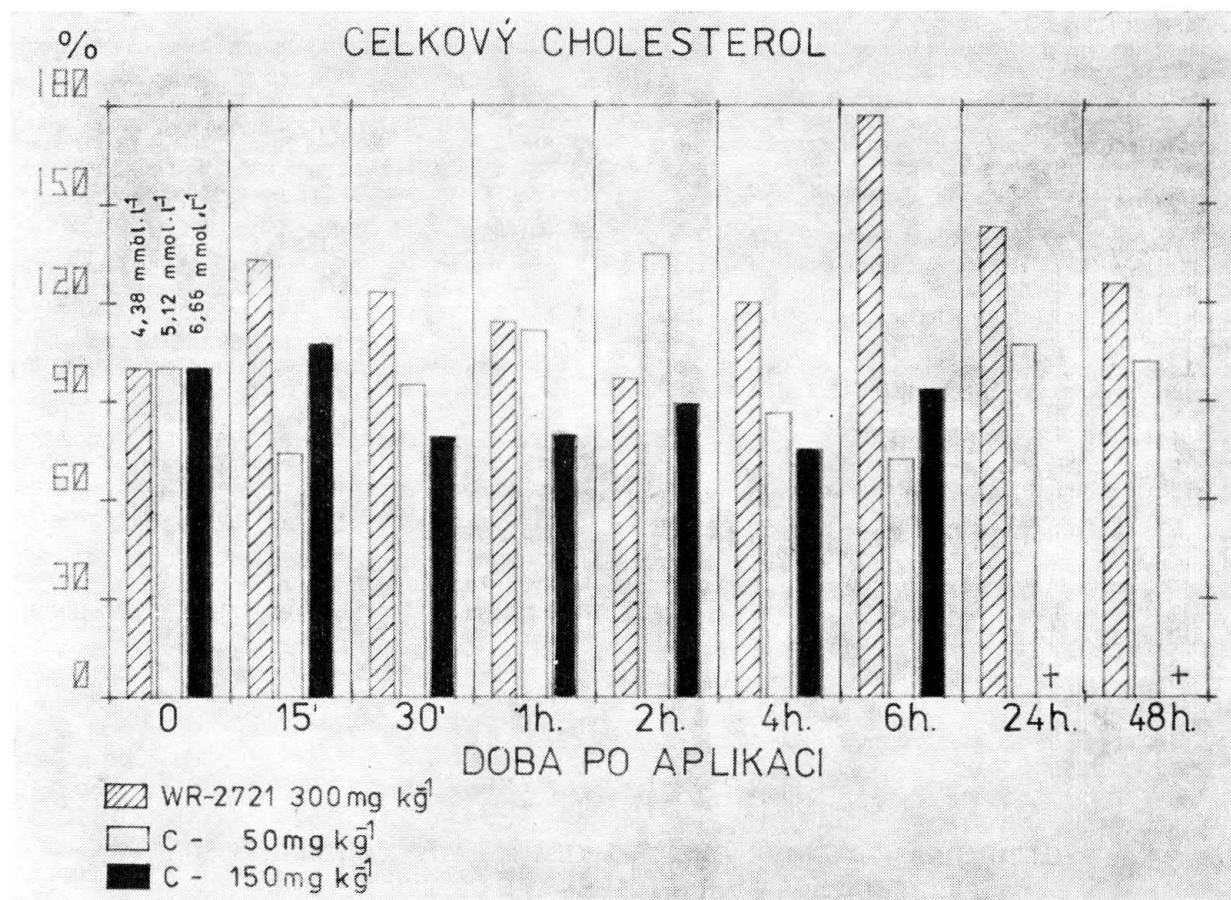
Vzestup koncentrace glukózy (graf 13) je v souladu s již uvedenými nálezy Duyckaertse (1971) u krys. Rozdíl ve velikosti vzestupu a posun maxima glykémie po i.v. a i.m. podání je zřejmě způsoben pomalejším vstřebáváním a odbouráváním i.m. podaného cystaminu. Pokud jde o vzestup obsahu triglyceridů, je situace vcelku obdobná jako u glukózy. Vzhledem

k jejich tvorbě v játrech (esterifikace glycerolu) je pravděpodobné, že jde o souvislost s aktivací glykogenolýzy. Pro zvýšenou esterifikaci glycerolu svědčí i určitý pokles koncentrace celkového cholesterolu (graf 16) po i.m. podání cystaminu. Co se týče vzestupu celkových lipidů, je z grafu 15 zřejmé, že k němu došlo jak po aplikaci gamafosu, tak cystaminu. Po i.m. podání obou látek jsou změny co do velikosti a dynamiky prakticky shodné. Vzhledem k tomu, že podání gamafosu nevedlo ke změně v obsahu triglyceridů a při srovnání změn v koncentraci celkových lipidů a cholesterolu je zřejmé, že spolu nekorelují, je pravděpodobné, že se na vzestupu celkových lipidů podílejí ještě další složky, patrně fosfatidy nebo neesterifikované mastné kyseliny.

Jak bylo již uvedeno v metodické části této práce, kromě biochemických parametrů dosud uvedených byly sledovány ještě některé další hodnoty. Jedná se o obsah celkové bílkoviny, albuminu, sodíku, draslíku a vápníku v séru. V těchto případech nebyly po aplikaci gamafosu a cystaminu pozorovány žádné výraznější změny koncentrace.

Závěr

Intramuskulární aplikace cystaminu vyvolává řadu změn biochemických ukazatelů při



Graf 16. Změny koncentrace celkového cholesterolu

srovnání s i. v. aplikací a s i. m. aplikací gama-fosu. Tyto změny se týkají hlavně enzymů a lipidů (+ glukóza). Jejich příčinou jsou po i. m. podání cystaminu hlavně zánětlivé a nekrotické změny v okolí vpichu. U cystaminu nelze vyloučit určité přechodné ovlivnění jaterních funkcí ve smyslu toxické zátěže. Po i. m. aplikaci gama-fosu byl pozorován pouze mírný vzestup aktivity LDH, MDH a alfa-amylázy, spolu s mírným vzestupem obsahu celkového cholesterolu. Vezmeme-li v úvahu též menší hemodynamické účinky gama-fosu (Kuna aj., 1983), jeví se tedy při stejné radioprotektivní účinnosti podání gama-fosu výhodnější než podání cystaminu.

Souhrn

V práci je srovnáván vliv intravenózní a intramuskulární aplikace cystaminu s intramuskulární aplikací WR-2721 (gamafos) u psů na biochemické parametry krevního séra. Byla sledována aktivita aspartát a alaninaminotransferázy, alkalické fosfatázy, kreatinkinázy, gamaglutamyltransferázy, laktodehydrogenázy, malátdehydrogenázy, sorbitoldehydrogenázy a alfa-amylázy. Dále byla sledována koncentrace celkové bílkoviny, albuminu, celkového bilirubinu, dusíku močoviny, kreatininu,

glukózy, triglyceridů, celkových lipidů, celkového cholesterolu a bilirubinu, vápníku, sodíku a draslíku.

Největší změny byly pozorovány po intramuskulární aplikaci cystaminu — vzestup většiny enzymatických aktivit, koncentrace lipidů a glukózy. Intravenózní podání mělo efekt podstatně menší. Nejmenší změny vyvolala intramuskulární aplikace WR-2721 (gamafos), kde byl pozorován pouze mírný vzestup aktivity laktodehydrogenázy, malátdehydrogenázy a alfa-amylázy. Je diskutována otázka možnosti přechodného toxického působení cystaminu na játra.

Literatura

1. ARIENT, M. - KOUŘÍLEK, K. - POSPÍŠIL, J. - DIENSTBIER, Z. - KYRAL, V.: Čas. Lék. českých, 108, 1969, s. 1470—1478.
2. AVNER, E. D. - ELLIS, D. - JAFFE, R.: Venooclusive disease of the liver associated with cystamine treatment of nephropathic cystinosis. J. Pediatr., 102, 1983, s. 793.
3. DUYCKAERTS, C.: Role des catécholamines dans l'hypoxie et l'hyperglycémie provoqués par l'injection de cystamine. Arch. Internat. Pharmacodyn. Ther., 191, 1971, č. 2, s. 400—404.
4. DUYCKAERTS, C. - GILLES, L.: Activation of glycogenolysis by cystamine. Abstr. 7thFEBS Meeting. Varna 1971. p. 218.

5. FISHER, E. A. - GAHL, W. A.: Cysteamine in treatment of type III hyperlipidemia. *Lancet*, Nov. 20, 1982, č. 8308, s. 1131—1132.
6. De FERREYRA, E. C. - DeFENOS, O. M. - BERNACCHI, A. S. - DeCASTRO, R. C. - CASTRO, J. A.: Therapeutic effectiveness of cystamine and cysteamine to reduce liver cell necrosis induced by several hepatotoxins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 48, 1979, s. 221 až 228.
7. GAHL, W. A. - SCHULMAN, J. D. - THOENE, J. G. - SCHNEIDER, J.: Hepatotoxicity of cysteamine? *J. Pediatr.*, 1983, Dec. 20, s. 1008—1009.
8. HOMOLKA, J.: Klinická biochemie. Indikace a interpretace u dospělých a dětí. Praha, SZN 1969. 434 s.
9. KUNA, P.: Acute cardiovascular response to radioprotective mixture of cystamine and 5-methoxytryptamine in rats. *Acta biol. med. germ.*, 34, 1975, s. 1843—1849.
10. KUNA, P.: Vliv diazepamu na účinky cystaminu: toxicita a radioprotektivní účinnost. *Voj. zdrav. Listy*, 50, 1981, č. 1, s. 23—31.
11. KUNA, P. - VODIČKA, I.: Blood flow and oxygen tension in the spleen of rats following cystamine, AET, serotonin and mexamine. *Acta biol. med. germ.*, 331, 1973, s. 893—896.
12. KUNA, P. - VOLENEC, K. - VODIČKA, I. - DOSTÁL, M.: Radioprotective and hemodynamic effects of WR-2721 and cystamine in rats: Time course studies. *Neoplasma*, 30, 1983, č. 3, s. 349—357.
13. PLANTEUX, G. - BEAMMARIAGE, M. L. - BACQ, Z. M. - HEUSGHEM, C.: Radioprotectors and plasma enzymes. *Radiat. Protect. Sensit., Proc. 2nd Internat. Symp. on Radiosens. and Radioprotect. Drugs. Roma 1969*. Ed. Taylor and Francis, London 1970, s. 433 až 437.
14. STRUBELT, O. - SIEGERS, C. P. - SCHÜTT, A.: The curative effects of cysteamine, cysteine and dithiocarb in experimental paraacetamol poisoning. *Arch. Toxicol.*, 33, 1974, s. 55—64.
15. ŠIMŠA, J. - TICHÝ, M.: Biochemické nálezy v séru psů po opakovaném celotělovém ozáření $4 \times 1 \text{ Gy} (^{60}\text{Co})$. In: *Sborník věd. prací VLVDÚ JEP, Hradec Králové*, 88, 1981, s. 61—81.
16. ŠIMŠA, J. - KUNA, P. - PETÝREK, P. - DOSTÁL, M.: Biochemické nálezy v krevním séru ozářených psů po aplikaci gamafosu a cystaminu. In: *Sborník souhrnů celost. radiobiol. konf., Deštné v O. h., 5.—9. 12. 1983*, s. 90.
17. WILKINSON, J. H.: *Isoenzymes*. Ed. E. and F. N. Spon, London 1965.
18. REŠL, M.: ZS úkolu VP-107-212-02, VLVDÚ JEP, Hradec Králové 1983, 180 s.