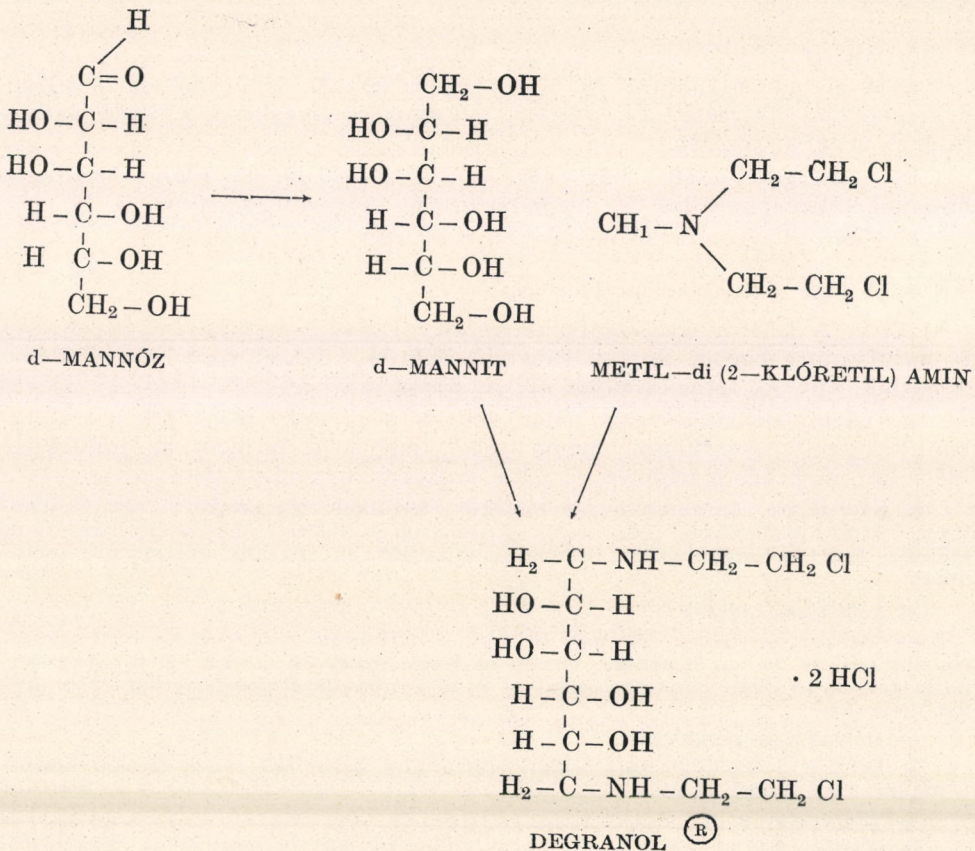


A vérsavó leucinaminopeptidáz-aktivitásának változása kísérletes sugárbetegségben és Degranol-mérgezésben

Írta: Dávid Gábor dr. orvosalezredes, az orvostudományok kandidátusa

A korszerű sugárbiológiai kutatásban nagy figyelmet szentelnek az enzimológiai vizsgálatoknak (2,13). Kiterjedten vizsgálják az ionizáló sugárzás enzimekre kifejtett hatását, mind in vitro rendszerekben, mind in vivo, a különböző szervekben, szövetekben, sejtekben. Hisztokémiai módszerekkel az enzimek szerveken, sejteken belüli lokalizációját, struktúrához kötöttségét lehet tanulmányozni.

Kísérletsorozatunkban vizsgálat tárgyává tettük patkányok vérsavójának leucinaminopeptidáz (a továbbiakban: SLAP) aktivitásának változását kísérletes sugárbetegségben. Ezenkívül, tekintettel arra, hogy közleményeink egy részében több adatot szolgáltatunk a nitrogénmustár radiomimetikus hatásához, illetve párhuzamot vontunk a sugárbetegségben lezajló és a nitrogénmustár mérgezésben végbemenő kórélettani folyamatok között, célszerűnek láttuk vizsgálatainkat kiegészíteni oly értelemben is, hogy elvégeztük a SLAP



1. sz. ábra

aktivitás változásának vizsgálatát Degranol mérgezésben. A Degranol[®] (Chinoin) vagy más néven, nemzetközi rövid megjelöléssel, Mannomustin(-e), 1,6-bisz-(béta-klóretilamino)-1,6-dezoxi-D-mannitdiklórhidrát tulajdonképpen nitrogénmustár származék. Szerkezete alapján úgy lehet felfogni, mint egy redukált cukor molekulát (mannit), melynek két végéhez hozzákötöttek egy-egy nitrogénmustár molekulát. Így a vegyület lényegében két funkcionális csoportot tartalmaz, tehát ún. bifunkcionális vegyület. (1. sz. ábra.)

Módszer

1. *Kísérleti állatok:* Kísérleteinkhez 160—180 g súlyú, Wistar eredetű, hím patkányokat használtunk.

2. Besugárzási, illetve mérgezési adatok:

a) Az alkalmazott sugárdózis 900 r volt. (Siemens-Stabilivolt készülék, 180 kV, 10 mA, 0,5 mm Cu szűrő, 50 cm fókusztávolság). Ez a sugáradag, az elvégzett előkísérletek szerint, az állatok 50⁰/₀-át 5 napon belül pusztította el — DL_{50/5d}.

b) A Degranol adagját is úgy választottuk meg, hogy szubkután adagolással a patkányok 50⁰/₀-át 5 napon belül pusztítsa el. Ez az adag patkánytörzsünkre nézve 95 mg/kg volt.

3. Kísérleti csoportok:

a) A besugárzás után 1—2—3 nap múlva 20—20, 5 nap múlva 25 állatot dekapitálással elvégeztettünk, vérüket felfogtuk és elvégeztük a SLAP aktivitásának meghatározását.

b) A mérgezés után 1—2—3 nap múlva 20—20, 3 nap múlva 30 állatot hasonlóképpen megöltünk és meghatároztuk a ferment aktivitást.

c) Kontroll gyanánt 20 egészséges, nem kezelt állat szolgált.

4. A LAP aktivitás meghatározása:

a) *Elve:* A LAP a szubsztrátként szereplő L-leucin- β -naftilamidot leucinra és naftilaminra bontja. A β -naftilamint Echtrót 3 GL-el vörös diazofestékké alakítjuk, ami jól fotometrálnak (2. sz. ábra).

Az enzim aktivitását úgy határozhatjuk meg, hogy megadjuk azt a μ g-ban kifejezett β -naftilamin mennyiséget, melyet a ferment az inkubációs idő alatt adott hőmérsékleten és pH-n szabaddá tesz (3,4,6,10).

b) *Kivitelezés:* Az eredetileg is többféle metodikai változat közül (3,6,10) lehetőségeinknek legmegfelelőbbet kellett kiválasztani, illetve több módosításra volt szükség. Ezért az alábbiakban részletesen közöljük az általunk alkalmazott metodikát.

a) Szükséges oldatok:

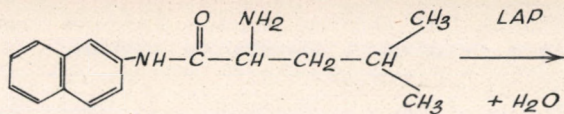
— Szubsztrát oldat: 20 mg L-leucin- β -naftilamid-hidrokloridot (Th. Schuchardt) oldunk 30 ml desztillált vízben és hozzáöntjük 70 ml 7,2 pH-jú Sörensen-pufferhez (m/15 dinátriumhidrofoszfát és m/15 káliumdihidrofoszfát oldat 72:28 arányú keveréke).

— 15 vol⁰/₀-os perklórsav.

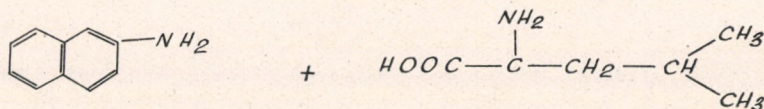
— Echtrót 3 GL (diazotált 3-klór-4-nitranilin) desztillált vízzel frissen készült 1 mg/ml töménységű oldata.

— Éteracetát p. a.

β) *Eljárás:* 0,4 ml vérsavóhoz 2,1 ml szubsztrát-oldatot mérünk. A reakcióelegyet 1 órán keresztül 37,5 \pm 0,1 C^o-on Höppler-féle ultratermosztát vízfürdőjében inkubáljuk. Egyidejűleg ugyanúgy vak oldatot is készítünk azzal a különbséggel,

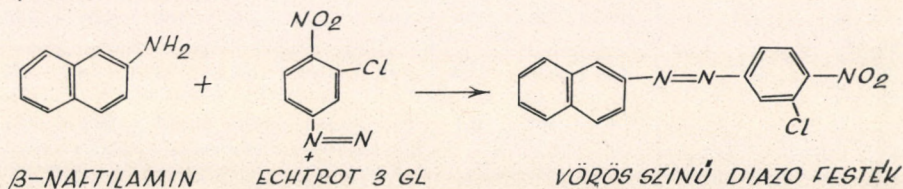


L-LEUCIN-β-NAFTILAMID



β-NAFTILAMIN

L-LEUCIN



β-NAFTILAMIN

ECHTROT 3 GL

VÖRÖS SZÍNŰ DIAZO FESTÉK

2. sz. ábra

hogy a szubsztrát bemérése után azonnal 2,5 ml perklórsav oldatot adunk az elegyhez és ezt is inkubáljuk. 1 óra elteltével az inkubációt befejezzük és a fermentműködést 2,5 ml perklórsav oldattal történő fehérjekicsapással megállítjuk. A csapadékot szűrővel vagy centrifugálással eltávolítjuk és a szüredékből, illetve a szupernatánsból 1 ml-t centrifugacsőbe pipetázunk, majd hozzáadunk 1 ml Echtrot 3 GL oldatot. Erélyes összerázás után 10 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk. 10 perc alatt kifejlődik a reakcióra jellemző piros szín. Hozzáadunk 5 ml éteracetátot és erélyes összerázás után a fázisok szétválasztása céljából 3 percig centrifugáljuk (3—4000 ford./perc). A keletkezett diazófesték az éteracetátos fázisba megy át, amit 10 mm rétegvastagságú küvetába pipetázunk és S=53-as szűrőn Pulfrich-féle Stufenfotométeren vak oldat ellenében fotometráljuk.

γ) Számítás: 96%-os alkoholban oldott 10—20—30 μg β-naftilamin oldattal hitelesítési görbét veszünk fel, azaz 0,20 mg/ml töménységű β-naftilamin oldatból 0,05—0,10—0,15 ml-t perklórsav oldattal 1 ml-re egészítünk ki, melyhez 1 ml Echtrot 3 GL oldatot adunk. A színkifejlődés után (10 perc) az előbbi módon a festékanyagot 5 ml éteracetáttal extraháljuk és centrifugálás után fotometráljuk. A kapott értékeket diagramban ábrázoljuk. A vizsgálatok során az extinkció értékekhez tartozó μg értékeket leolvastva, azt 12,5-el szorozzuk $\left(\frac{2,5 \cdot 2}{0,4} = 12,5\right)$, megkapjuk az ún. „LAP-egység/ml”-t.

Eredményeink és azok megbeszélése

Kísérleteink eredményeit az 1. sz. táblázat, illetve a 3. sz. ábra tünteti fel.

Az ábra szemléletesen mutatja, hogy a SLAP aktivitása *teljestest röntgenbesugárzás után* 24 óra múlva lényegesen csökken. Ez a csökkenés tovább folytatódik a 2. és a 3. napon is. Az 5. napon az állatok egy részében a ferment aktivitása olyan, mint a 3. napon, másik részében azonban igen alacsony szintre zuhan.

Degranol mérgezésben már 24 óra múlva a ferment aktivitása erősen csökken, alacsonyabb értéket mutat, mint röntgenbesugárzás után. Ez az aktivitáscsökkenés tovább folytatódik a 2. és 3. napon is, az 5. napon pedig már emelkedik és körülbelül a 2. napi értékkel azonos.

1. sz. táblázat: Patkányok vérsavójának LAP aktivitás változása kísérletes sugár-
betegségben, illetve Degranol mérgezésben. Matematikai értékelés

	Norm,	1 nap		2 nap		3 nap		5 nap		
		Rtg	Deg.	Rtg	Deg.	Rtg	Deg.	Rtg a	Rtg b	Deg.
n	20	20	20	20	20	20	30	18	7	20
\bar{x}	215	188	166	166	155	150	144	150	94	157
$\pm s$	± 12	± 19	± 11	± 14	± 9	± 15	± 13	± 16	± 6	± 20
$\bar{x} + s$	227	207	177	180	164	165	157	166	100	177
$\bar{x} - s$	203	169	155	152	146	135	131	134	88	137
P		<0,1	<<0,1	<<0,1	<<0,1	<<0,1	<<0,1	<<0,1	<<0,1	<<0,1

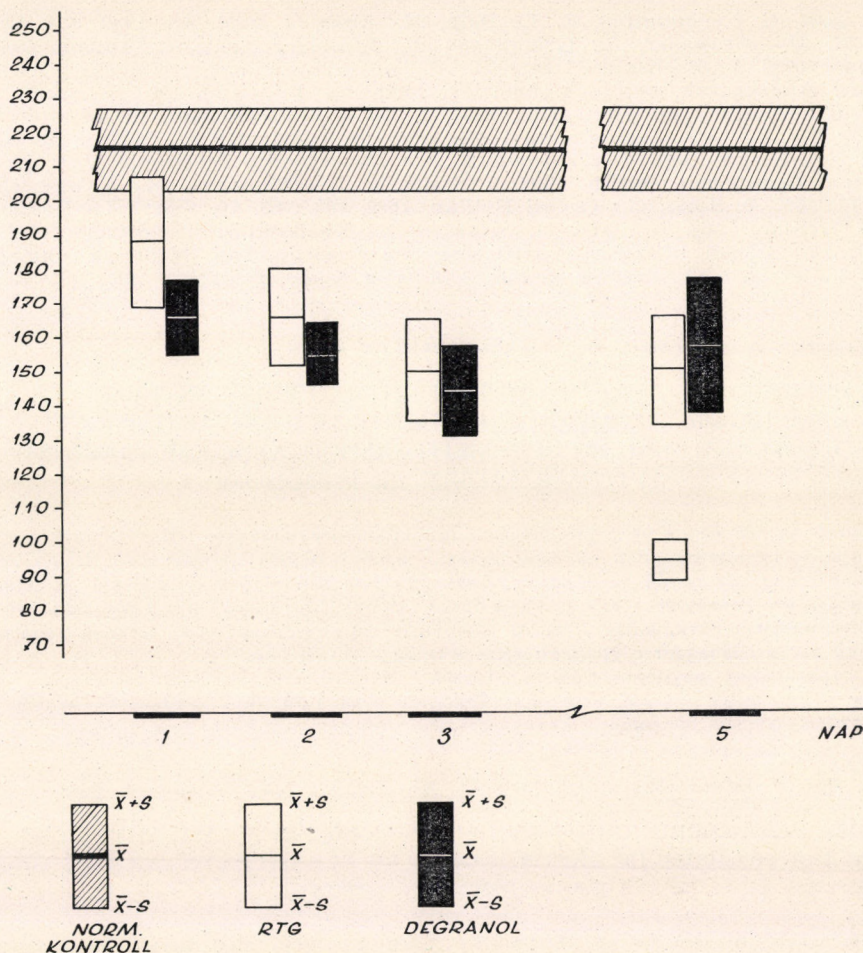
A LAP az exopeptidázok közé tartozó aminopeptidáz (tehát a N-terminális aminosavat lehasító ferment), mely a terminalis L-leucint hasítja le (7). Először a bélfalból izolálták (8). A ferment aktivitásnak zavarát belgyógyászati kórképekben, főleg májparenchima léziókban (9), egyes dermatológiai kórképekben (1) írták le. *Sztanyik* (11) és *Tanka* (12) kísérletes sugárbetegségben — főleg egereken végzett vizsgálataik alapján — a mi megfigyeléseinkhez lényegében hasonló eredményre jutott. Ők is a vérsavó LAP-aktivitásának csökkenését észlelték kísérletes sugárbetegségben. Hisztokémiai vizsgálatokkal pedig azt találták, hogy ezzel egyidőben az egyes szervekben a májban, de főleg a lépben, a ferment erősen felszaporodik. Ők ezt a felszaporodást, aktivitásfokozódást, a szervek homogenátumában is ki tudták mutatni. Saját vizsgálatainkban sem sugárbetegségben, sem Degranol-mérgezésben a zsigeri szervek (máj, lép, vese) homogenátumában fermentaktivitás-fokozódást nem találtunk. Ennek magyarázata lehet a kísérletre használt állatok közötti különbség (egér — patkány), vagy az alkalmazott sugáradag közötti eltérés.

Természetesen a hisztokémiai készítmények értékelése nehéz és nem mindig egyértelmű, mert inkább a vizsgáló szubjektív megítélésétől, mint objektív méréstől függ. Gondolni lehet a ferment szerven belüli eloszlásának, disztribúciójának változására. *Tanka* a besugárzott állat lépének centrum germinatívumai körül észlelte az enzim *nagymértékű* felszaporodását, míg az a normál kontroll állat szervében aránylag egyenletesen oszlik el.

Vizsgálataink során még egy figyelemre méltó észlelést tettünk. A sugárbeteg állatok egy hányadának SLAP-aktivitása az 5. napon jelentősen csökkent. Ezek az állatok klinikailag a súlyos sugárbetegség képét mutatták. Feltételezhető, hogy ezek az állatok még a további időszakban, egy-két nap múlva ugyancsak elpusztultak volna és a SLAP aktivitás csökkenése a halálos kimenetel előjele gyanánt fogható fel.

A LAP pontos szerepe az anyagcserében még napjainkban sem ismertes. Feltételezhető, hogy a ferment aktivitásának változása — jelen esetben csökkenése — a sugárbetegségben, illetve Degranol-mérgezésben keletkező fehérje-, illetve aminosavanyagcsere mélyreható zavarával áll összefüggésben (5).

EGYSÉG / ml.



3. sz. ábra: Az 1. sz. táblázat adatainak grafikus ábrázolása

ÖSSZEFOGLALÁS

Szerző patkányokon vizsgálta a vérsavó leucinaminopeptidáz (SLAP) aktivitásának változását kísérletes sugárbetegségben és Degranol-mérgezésben (DL_{50/5} nap). Megállapította, hogy a besugárzás után 24 óra múlva már csökken a ferment aktivitása és ez a csökkenés a további időszakban (2—3. nap) tovább folytatódik. Az 5. napon az állatok egy részének SLAP aktivitása igen alacsony szintre zuhan, míg másik részében a 3. napi szinttel azonos értéket mutat.

Degranol-mérgezésben 24 óra múlva a SLAP aktivitása kisebb, mint a sugárbeteg állatok SLAP aktivitása. A 2. és 3. napon is az aktivitás a sugárbetegségben észlelt alatt marad. Az 5. napon azonban már kissé emelkedő tendenciát mutat.

1. *Arst, H. E.—Manning, R. T.—Delp, M.*: Amer. J. med. Sci. 1959, 238, 598. 2. *Bacq, Z. M.—Alexander, P.*: Grundlagen der Strahlenbiologie, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1958. 3. „Boehringer” gyár „LAP-Test” c. kiadványa. 4. *Dévényi, T.—Gergely, J.*: Aminosavak, peptidek, fehérjék, Medicina, Budapest, 1963. 5. *Fiam, B.—Dávid, G.*: Haematologia Hungarica, 1963, 3, 209. 6. *Mattenheimer, H.*: Mikromethoden für das klinisch-chemische und biochemische Laboratorium, Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1961. 7. *Rapaport, S. M.*: Medizinische Biochemie VEB. Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1962. 8. *Smith, E. L.—Bergmann, M.*: J. biol. chem. 1944. 153, 627. 9. *Szász, G.*: Orvosi Hetilap, 1962, 103, 969. 10. *Szász, G.—Kozák, É.*: Orvosi Hetilap, 1962, 103, 971. 11. *Sztanyik, L.*: Kandidátusi disszertáció, 1966. 12. *Tanka, D.*: Szóbeli közlés. 13. *Várterész, V.*: Sugárbiológia, Medicina, Budapest, 1963. 14. *Zemplén, G.*: Szerves kémia, Akadémia Kiadó, Budapest, 1952.

Д-р Давид Г. подполковник мед. службы, кандидат мед. наук:

ИЗМЕНЕНИЕ ЛЕЙЦИНАМИНО-ПЕНТИДОЗНОЙ АКТИВНОСТИ
ИЗМЕНЕНИЕ ЛЕЙЦИНАМИНО-ПЕПТИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ
СЫВОРОТКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЛУЧЕВОЙ БОЛЕЗНИ
И ОТРАВЛЕНИЯХ ДЕГРАНОЛОМ

Автор исследовал в экспериментах лейцинамино-пептидазную (SLAP) активность у крыс при экспериментальной лучевой болезни и отравлениях дегранолом (ДЛ_{50/5} день). Установил, что спустя 24 часа после облучения уже наблюдается снижение активности фермента и это снижение в дальнейшем продолжается (2—3 дня). На 5-ый день лейцинаминопептидазная активность у части животных снижается на очень низкий уровень, а у другой части совпадает с уровнем выявленным на 3-ий день.

В отравлениях дегранолом спустя 24 часа лейцинаминопептидазная активность меньше чем у животных лучевой болезнью. На 2-ой и на 3-ий днях активность меньше чем у животных лучевой болезнью. Активность на 5-ый день начинает повышаться.

Dr. G. Dávid, Oberstl. d. Med. D., Kandidat d. Med. Wissenschaften:

DIE VERÄNDERUNGEN DER LEUZINAMINOPEPTIDASE-AKTIVITÄT
DES BLUTSERUMS IN EXPERIMENTALER STRAHLENKRANKHEIT UND
DEGRANOL-VERGIFTUNG

Verfasser untersuchte an Ratten die Veränderungen der Serum-Leuzinaminopeptidase-Aktivität (SLAP) in experimentaler Strahlenkrankheit und in Degranol-Vergiftung. Es bewies sich, dass die Fermentaktivität schon 24 Stunden nach der Bestrahlung abnimmt, die Verminderung setzt sich in den folgenden 2—3 Tagen fort. Am 5. Tage fällt die SLAP-Aktivität in einem Teil der Tiere beträchtlich ab, in den Übrigen gleicht es den am 3. Tage gefundenen Werten.

In einer Degranol-Vergiftung erreicht die SLAP-Aktivität in 24 Stunden einen niedrigeren Wert, wie in den strahlenkranken Tieren. Dasselbe kann man auch am 2. und 3. Tag beobachten. Am 5. Tage dagegen zeigt sich eine etwas zunehmende Tendenz.