

A PENTAGASZTRIN KATABOLIZMUS *IN VITRO* ÉS *IN VIVO* VIZSGÁLATA PATKÁNYBAN

VARGA LÁSZLÓ, az orvostudományok kandidátusa,
FODOR ELEONÓRA, HOLZINGER GÁBOR, NÉMETH JÓZSEF, BALÁSPIRI LAJOS,
a kémiai tudományok kandidátusa, PENKE BOTOND, a kémiai tudományok kandidátusa,
KOVÁCS LÍVIA, SZABÓ IMRE, ORMAI SÁNDOR, az orvostudományok kandidátusa
és VARRÓ VINCE, az orvostudományok doktora

Közlésre érkezett: 1981. XII. 27.

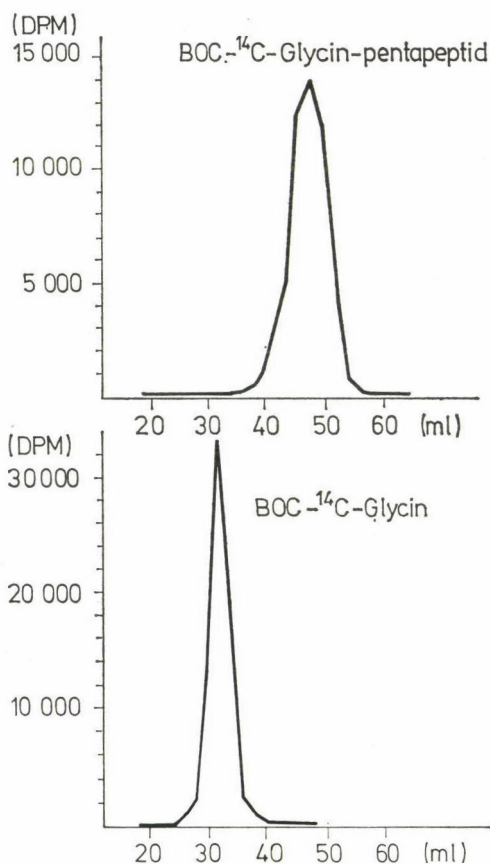
Korábbi közleményünkben (Varga és mtsai 1973) a BOC-¹⁴C-glicin-pentagasztrin (BOC-¹⁴C-GPG) *in vivo* metabolizmusával kapcsolatban beszámoltunk arról, hogy a védett peptidszarmazékot a patkánymáj jelentős mértékben (~70%-ban) kiválasztja az epével. A peptid egy része — miközben, áthalad a májsejteken — dezamidálódik. Hasonló eredményre jutott *Wyllie Stagg* és *Temperley* 1974-ben kutyában. Később ugyanennek a peptidnek az intravénás adása után az aortából vett vérmintákban olyan radioaktív hasadási terméket találtunk, amelyet a peptid BOC-¹⁴C-glicin fragmensével tudtunk azonosítani (Varga és mtsai 1978). Ez a vizsgálat azt bizonyítja, hogy a BOC-GPG *in vivo* metabolizmusa során nemcsak dezamidálódás, hanem peptidhidrolízis is létrejön. A radioaktív jelzés helyzetéből következik, hogy mi ebből a folyamatból a BOC-¹⁴C-glicin és a triptofán közötti peptidkötés-hasadást tudtuk regisztrálni.

A peptidfragmens keletkezésének a helyét keresve sikerült igazolnunk, hogy a májsejtek által kiválasztott, részben dezamidált BOC-¹⁴C-GPG a bélben hidrolizálódik. A lehasadó BOC-¹⁴C-glicin egy része a bélfalon át felszívódik és a szisztémás keringésbe jut. Ez a folyamat hosszabb ideig tart és valószínűleg nincs szerepe annak a BOC-¹⁴C-glicinnek a keletkezésében, amit a radioaktív BOC-GPG intravénás adása utáni percben az aortás vérben mérni lehet.

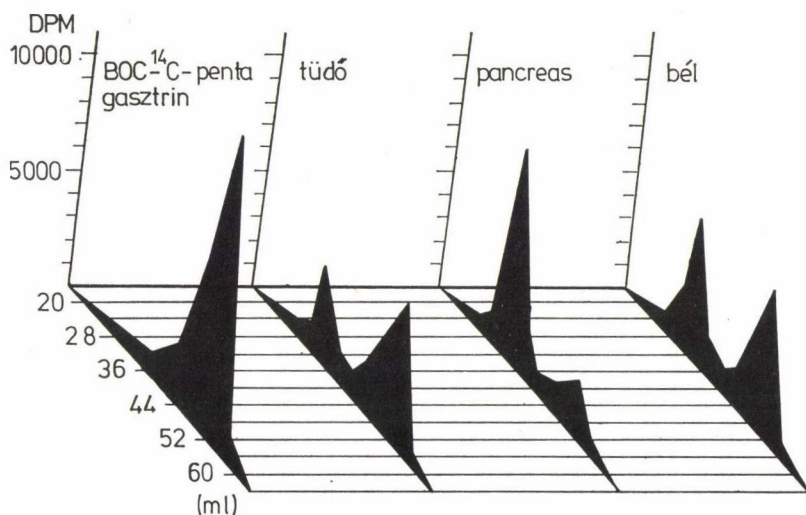
Fel kellett tételeznünk, hogy peptidhidrolízist eredményező enzimaktivitás nemcsak a béllumenben és/vagy a bélfalban, hanem más szervekben is létrejön és az első percben mérhető BOC-¹⁴C-glicin innen származik. Bemutatásra kerülő vizsgálatainkban a feltételezés bizonyítására, a különböző szervek peptidhidrolizáló enzimaktivitását tanulmányoztuk *in vitro* és *in vivo* körülmények között.

1. A peptidhidrolízis in vitro vizsgálata a szervhomogenizátumok citoszol frakciójával

A hidrolízis követésére a következő módszert alkalmaztuk: a jelzett pentagasztrin szubsztrátot (0,5 ml 50 mg/100 ml koncentrációjú, 16,65 MBq/mM fajlagos aktivitású BOC-¹⁴C-GPG) 0,5 ml szérummal, ill. különböző patkányszervek 10%-os homogenizátumából ultracentrifugás ülepítés után (100.000 g/h) nyert szupernatáns frakció 0,5 ml-jével inkubáltuk 37 °C-on 30 percig. A homogenizálás 0,9%-os NaCl-oldatban történt. Az inkubátumból 0,3 ml-t Sephadex G-25 fine oszlopon kromatografáltunk (oszlopmagasság 38 cm, átmérő 1,2 cm, $V_0 = 16,7$ ml, $V_t = 39,8$ ml $V_t/V_0 = 2,38$) 0,01 mólos foszfátpufferrel (pH 7,1). A kromatográfia során nyert frakciók radioaktivitását liquid scintillációs rendszerben mértük. Az eredményeket DPM értékben fejeztük ki. A hidrolízis mértékére a keletkező BOC-¹⁴C-glicin fragmens mennyiségé-



I. ábra. A BOC-¹⁴C-glicin-pentagasztrin és a BOC-¹⁴C-glicin radiókromatogramja



2. ábra. A BOC-¹⁴C-glicin-pentagasztrin radiókromatográfia tüdő-, pancreas- és bélszövet homogenizátum citoszol frakciójával történt inkubálás után

ből következtettünk. A vizsgálatok során a fehérjemeghatározás Lowry és mtsai (1951) módszerével történt.

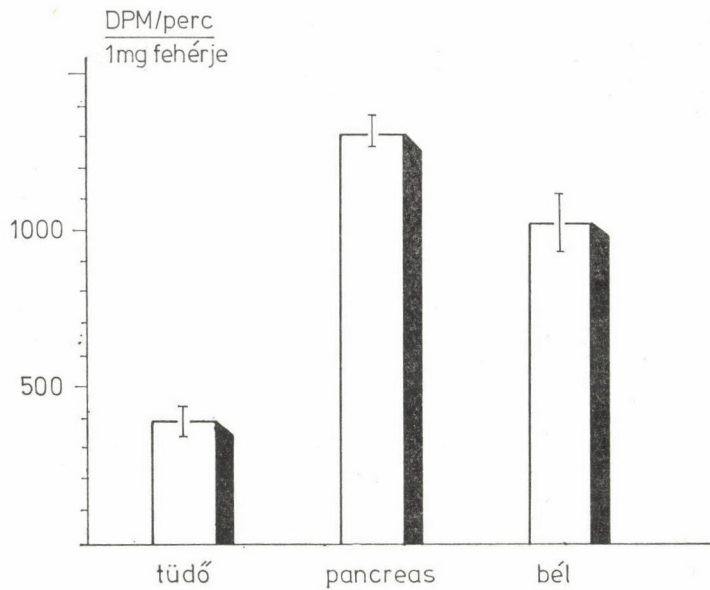
Rendszerünkben a BOC-¹⁴C-GPG a 40—52 ml közötti térfogatban, a BOC-¹⁴C-glicin pedig a 28—36 ml közötti térfogatban eluálódott. Így az inkubálás során keletkező BOC-¹⁴C-glicin fragmens jól elkülöníthető volt.

A szérum mintákkal történt inkubálás után a BOC-¹⁴C-glicin pentapeptid radiókromatográfias képe változatlan maradt. A szérumban tehát hidrolízist okozó enzimaktivitást nem találtunk. A vizsgált szervek közül a máj-, vese-, izom-homogenizátum citoszol frakciója enzimaktivitás szempontjából ugyancsak inaktívnak bizonyult. Peptidkötés bontást észleltünk viszont a pancreas-, vékonybél- és tüdőszövet-homogenizátummal történt inkubálás után. Minden szervvel négy alkalommal ismételtük az inkubálást. A homogenizátumok fehérjetartalmának ismeretében az enzimaktivásra az időegység alatt keletkezett BOC-glicin mennyiségéből következtettünk. Az enzimaktivitást 1 mg homogenizátum fehérjére számítottuk (DPM/min/1 mg fehérje).

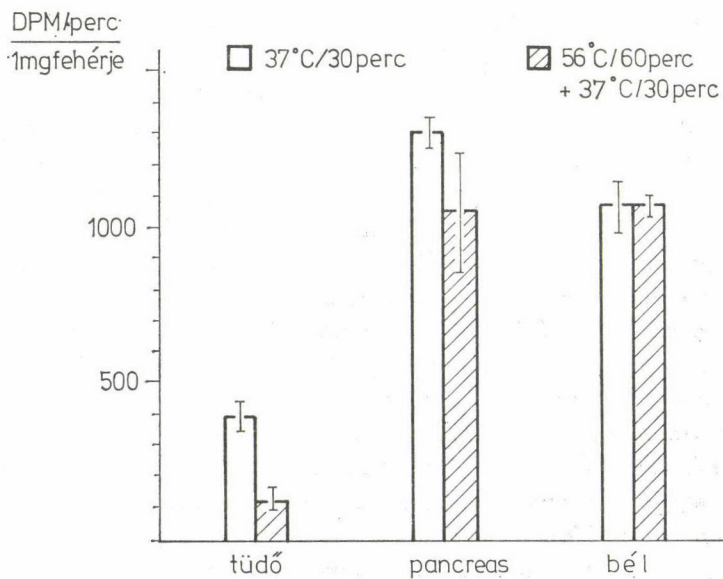
A pancreas-, vékonybél- és tüdőszövettel történt inkubálás után a peptidkötés hasadásának létrejöttét szemlélteti a második ábra.

A radiókromatogramokon jól látható, hogy a hidrolízis során keletkező radioaktív fragmens mennyiségének növekedésével párhuzamosan a kiindulási anyag mennyisége csökkent.

A vizsgált szervek peptidkötést bontó aktivitását oszlopdigramban ábrázoltuk. Kísérleti körülményeink között a legnagyobb enzimaktivitása a pancreas-szövetnek volt, ennél kisebb aktivitású volt a bél, még kisebb a tüdő.



3. ábra. A tüdő-, pancreas- és bélszövet homogenizátum citoszol frakciójának enzimaktivitása (DPM/perc/1 mg fehérje)



4. ábra. A tüdő-, pancreas- és bélszövet homogenizátum citoszol frakciójának enzimaktivitása hőkezelés után

I. táblázat

A bél-, tüdő-és pancreas-szövet enzimaktivitásának pH függése. A számok a keletkezett BOC-¹⁴C-glicin DPM értékeinek az átlagát és a szórást jelzik

pH	4	6	7,1	8	10	11	12	13
Bél DPM	205 ±15,34	854 ±17,55	1157 ±19,82	1078 ±110,1	1743 ±111	176 ±14,56	106 ±13,5	106 ±14,5
Tüdő DPM	233 ±14,95	304 ±15,65	976 ±110,12	328 ±16,5	200 ±15,12	—	—	—
Pancreas DPM	226 ±13,65	640 ±16,55	910 ±19,85	812 ±18,76	1679 ±111,5	403 ±15,5	316 ±14,15	240 ±13,5

n = 5; \bar{x} ; ± SD

A továbbiakban a szerv-homogenizátumok enzimaktivitásának hőérzékenységét vizsgáltuk. A szerv-homogenizátumok citoszol frakcióját egy óráig 56 °C-on tartottuk, ezt követően adtuk hozzá a 0,5 ml BOC-¹⁴C-GPG-t. Újabb 30 perces 37 °C-on történő inkubálás után megvizsgáltuk, hogy a hidrolízis milyen mértékben jön létre. Azt találtuk, hogy a hőkezelés a tüdőszövet enzimaktivitását jelentősen csökkentette, a pancreas- és a vékonybél-szövetét alig befolyásolta.

A következőkben az enzimműködés hidrogén ion koncentrációtól való függését vizsgáltuk. Az enzimaktivitás pH optimumának meghatározására Sørensen szerint készített 4, 6, 7,1, 8, 10, 11, 12 és 13-as pH-jú puffer oldatokat használtunk. A vizsgálatot 5 állat szerveinek citoszol frakciójával végeztük.

A tüdőszövet enzimaktivitásának maximumát pH 7,1-nél találtuk. A bél- és a pancreas-szövet enzimaktivitásának egyaránt két maximumát észleltük: az egyiket pH 7,1-nél, a másikat pH 10-nél. A 7,1-es és 8-as pH értékeknél mért enzimaktivitások között nincs feltűnő differencia. Ezért talán helyesebb két maximum tendenciáról beszélni. Ha a jelzett pentapeptidet pH 10-es pufferrel inkubáltuk szövet-homogenizátum nélkül, peptid-hidrolízis nem jött létre.

A peptid hidrolízis-gátlás vizsgálata

Az enzimműködés gátlását részben a kereskedelemben kapható ismert gátlószerekkel, részben különböző peptidszármazékokkal kíséreltük meg. Nem gátolta az enzimműködést 100—2000 µg/ml ml homogenizátum koncentrációjú szójabab tripszin (REANAL) inhibitor 100—1000 E/l ml homogenizátum tartalmú kallikrein-tripszin inhibitor (Gordox, Gedeon Richter Ltd, Budapest) és 100 µg/ml homogenizátum koncentrációjú SQ-20 jelzésű angiotenzináz gátló (Squibb Institute for Medical Research).

2. táblázat

Az 50%-os gátlást létrehozó EDTA koncentráció

	pH—7,1	pH—10
	EI ₅₀ EDTA	
Hasnyálmirigy	2×10^{-2} M	0
Bél	$3,2 \times 10^{-2}$ M	0
Tüdő	$7,5 \times 10^{-4}$ M	—

3. táblázat

A proteolitikus enzimaktivitás értékei a fenilmetil-szulfonilfluorid (PMSF) különböző koncentrációi mellett

Hasnyálmirigy, pH—7,1		Hasnyálmirigy, pH—10	
fenilmetil- szulfonil-fluorid, konc. mol	gátlás, %	fenilmetil- szulfonil-fluorid, konc. mól	gátlás, %
0	—	0	—
10^{-2}	38,5	10^{-2}	28,5
10^{-4}	36	10^{-4}	27
10^{-5}	26,5	10^{-5}	16
10^{-6}	10	10^{-6}	10
10^{-8}	—	10^{-8}	—

Enzimaktivitás gátlást kaptunk viszont EDTA-val, szerinproteáz gátló fenilmetil-szulfonilfluoriddal* (PMSF) és a szubsztrátként szolgáló peptid különböző fragmenseivel.

Az enzimaktivitás EDTA-val történő gátlását pH 7,1-nél és pH 10-nél 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} és 10^{-8} M koncentráció-tartományokban vizsgáltuk. Az eredményeket az 50%-os gátlást létrehozó EDTA koncentrációval adtuk meg.

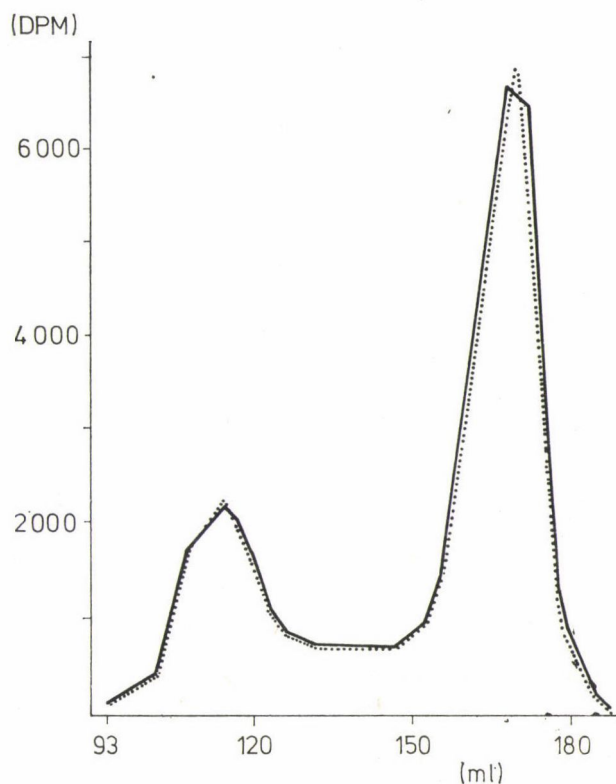
A táblázat adataiból látható, hogy pH 7,1-nél az 50%-os gátlást létrehozó EDTA koncentráció a hasnyálmirigy és a vékonybél esetében közel azonos, a tüdőben két nagyságrenddel kisebb. pH 10-nél az enzimaktivitás EDTA-val nem gátolható.

A szerin proteáz gátló PMSF (Gold 1965) csak a hasnyálmirigy proteolitikus enzimaktivitását gátolta, a bél és tüdő enzimaktivitását nem. Az enzimaktivitás gátlás 10^{-2} — 10^{-4} M közötti koncentráció-tartományban (telítési dózis) volt a legkifejezettebb, 10^{-5} M-nél már csökkent a gátlás. Figyelemre

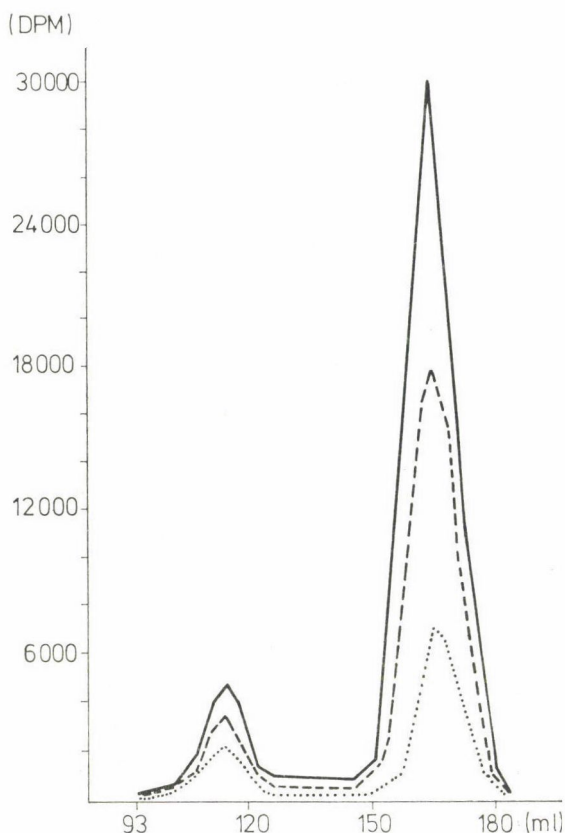
* Az anyagot Boross professzortól kaptuk (JATE Biokémiai Intézet), amiért ezúton is köszönetet mondunk.

méltó, hogy az aktivitás-gátlás mind a pH 7,1-nél, mind a pH 10-es tartományban kimutatható volt.

Az enzimekről további információ nyerhető, ha aktivitásukat a szubszt-rátként szolgáló peptid különböző fragmenseivel próbáljuk befolyásolni. Erre a célra 2 peptid fragmenst alkalmaztunk: H-Gly-Trp-OH és a H-Asp-PheNH₂ × AcOH dipeptideket. Két dipeptiddel megkíséreltük az enzimaktivitás befolyásolását neutrális és lúgos pH-nál egyaránt. Csak neutrális pH-nál sikerült enzimaktivitás csökkenést elérni. Az H-Asp-PheNH₂ × AcOH dipeptiddel csak a pancreas enzimaktivitása volt befolyásolható: 2,25/μM dipeptid koncentráció esetén 26%-os aktivitás csökkenést kaptunk. Jelentősebb csökkenést a H-Gly-Trp-OH dipeptiddel kaptunk: 2,8 μM dipeptid koncentrációval a tüdőszövetben levő enzimaktivitás 100%-osan gátolható. Ugyanaz a peptid koncentráció pancreas esetében 50%-os, a bélnél kb. 40%-os aktivitás csökkenést hozott létre. Tovább csökkentve a dipeptid koncentrációt azt találtuk, hogy még a 2,8 μM koncentráció 1/5-e is 100%-os enzimgátlást eredményez a tüdőben.



5. ábra. H-Gli-Trp-OH-val végzett előinkubálás hatása a tüdő citoszol frakciójának peptid hidrolizáló készségére. Folyamatos vonal = előinkubálás nélkül. Pontozott vonal = előinkubálás dipeptiddal



6. ábra. A szubsztrát koncentráció növelésének hatása a tüdőszövet citoszol frakciójának hidrolizáló aktivitására. Pontozott vonal = 50% gátlás. Szaggatott vonal = a szubsztrát mennyiség duplájára növelve. Folyamatos vonal = a szubsztrát mennyiség háromszorosra növelve

Ezt követően meghatároztuk az 50%-os gátlást adó dipeptid mennyiséget, ill. a dipeptid/BOC-GPG molarányt. Ezek a következők: $0,096 \mu\text{M}$, ill. 1,455.

A tüdőben levő endopeptidáz aktivitás gátlása mint modell alkalmasnak bizonyult arra is, hogy a gátlás körülményeit jobban megismerjük. Erre a célra nagyobb méretű Sephadex G-25 fine töltetű oszlopot készítettünk. Az oszlop méretei: hossza 78 cm, átmérője 1,4 cm, $V_0 = 56$ ml, $V_t = 114$ ml, $V_t/V_0 = 2,04$. A kromatográfia során 0,5 ml inkubátumot vittünk fel és 3 ml-es frakciókat gyűjtöttünk. Eluensként 0,01 M-os foszfát puffert használtunk. Az oszlopról a BOC-glicin fragmens a 108—122 ml között a BOC-GPG pedig 159—180 között eluálódott.

Először azt vizsgáltuk, hogy a dipeptid gátló hatása hogyan érvényesül. A citoszol frakciót először az 50%-os gátlást adó dipeptiddel inkubáltuk 30'-ig

37 °C-on. Ezt követően hozzáadtuk a szubsztrát BOC-¹⁴C-GPG-t. Újabb 30'-es inkubálás után az elegyet kromatografáltuk.

A dipeptiddel előinkubált citoszol frakció enzimaktivitása azonos volt az előinkubálás nélkül vizsgált enzim aktivitásával. Ez a vizsgálat amellet szól, hogy a dipeptid az előinkubálás során nem hidrolizál.

Ezután a szubsztrát védelem hatékonyságát tanulmányoztuk az inaktívációval szemben. Ezt úgy végeztük, hogy az 50%-os gátlást adó dipeptid koncentráció mellett a szubsztrát mennyiségét növeltük az eredeti duplájára és háromszorosára.

Azt találtuk, hogy a szubsztrát koncentráció növelésével a lehasadt BOC-¹⁴C-glicin mennyisége arányosan növekedett.

2. A peptidhidrolízis *in vitro* vizsgálata szervhomogenizátumok sejtfrakcióiban

Ahhoz, hogy a hidrolitikus enzimek sejten belüli lokalizációját tanulmányozhassuk, a hasnyálmirigy-, vékonybél- és tüdőszövet homogenizátumokat Janeczky Wac-601 típusú preparatív ultracentrifugával differenciáltuk. 10 percig centrifugáltuk 10 000 g-vel, amikor is a mag és a mitokondrium, 20 percig 22 000 g-vel, amikor a lizoszóma és egy órán át 100 000 g-vel, amikor a mikroszóma frakció ülepedett le. A 100 000 g-vel történt centrifugálás után nyert szupernatáns a citoszol frakció. A frakciók tisztaságát markerenzimek segítségével vizsgáltuk. Ezek közül a katepszin-D-t Barrett (1972) és mtsai, az 5'-nukleotidázt Song és mtsai (1967) és a glukóz-6-foszfátázt Kidwai és mtsai (1971) módszerével határoztuk meg.

A sejtfrakciók markerenzim aktivitás értékeit táblázatban tüntettük fel.

A táblázat adataiból látható, hogy a katepszin-D és az 5'-nukleotidáz aktivitási értékei a citoszol frakcióban a legkisebbek. Ez arra utal, hogy a citoszol frakció egyik szerv esetében sem szennyezett nagyobb mértékben lizoszómával és sejtmembránnal. A citoplazmális lokalizációjú glukóz-6-foszfátáz aktivitása viszont mindhárom szövethomogenizátumban a citoszol frakcióban volt a legmagasabb.

A sejtfrakciók hidrolitikus enzimaktivitását pH 7,1-nél és pH 10-nél határoztuk meg. A frakciókat az enzimaktivitás vizsgálata előtt 0,1%-os Triton-X-el tártuk fel.

A táblázatból látható, hogy mind a két pH-értéknél a citoszol frakcióban maximálisak az enzimaktivitási értékek, a többi frakcióban lényegesen alacsonyabbak. Itt kívánjuk megjegyezni, hogy a máj-és veseszövet homogenizátum 100 000 g-vel történő centrifugálása után a Triton-X-szel feltárt üledékben találtunk kismértékű enzimaktivitást. Ez azonban nem érte el a hasnyálmirigy, tüdő, ill. vékonybél homogenizátumok sejtfrakcióinak összaktivitás értékeit.

4. táblázat

A sejtfrakciók markerenzim aktivitás értékei

	Homogenizátum	Mag + mitochondrium	Lysosoma	Microsoma	Cytosol
<i>Hasnyálmirigy</i>					
Cathepsin D mEq Tyrosin (h/ml) 37 °C	24×10^{-4} $\pm 0,1 \times 10^{-4}$	$0,93 \times 10^{-4}$ $\pm 0,11 \times 10^{-4}$	$1,22 \times 10^{-4}$ $\pm 0,08 \times 10^{-4}$	$0,27 \times 10^{-4}$ $\pm 0,01 \times 10^{-4}$	$0,24 \times 10^{-4}$ $\pm 0,01 \times 10^{-4}$
5'-nucleotidáz μ M P/mg fehérje/h	7,3 $\pm 0,10$	1,00 $\pm 0,11$	3,19 $\pm 0,09$	2,93 $\pm 0,06$	0,18 $\pm 0,01$
Glucose 6 foszfatáz μ M P/mg fehérje/h	3,1 $\pm 0,1$	0,64 $\pm 0,01$	0,32 $\pm 0,02$	0,42 $\pm 0,01$	1,73 $\pm 0,08$
<i>Bél</i>					
Cathepsin D mEq Tyrosin (h/ml) 37 °C	$2,58 \times 10^{-4}$ $\pm 0,13 \times 10^{-4}$	$1,15 \times 10^{-4}$ $\pm 0,05 \times 10^{-4}$	$0,8 \times 10^{-4}$	$0,38 \times 10^{-4}$	$0,34 \times 10^{-4}$
5'-nucleotidáz μ M P/mg fehérje/h	2,83 $\pm 0,76$	7,1 $\pm 0,1$	2,6 $\pm 0,1$	15,22 $\pm 0,24$	0,27 $\pm 0,02$
Glucose 6-foszfatáz μ M P/mg fehérje/h	3,4 $\pm 0,1$	0,85 $\pm 0,13$	0,65 $\pm 0,05$	0,48 $\pm 0,03$	1,65 $\pm 0,05$
<i>Tüdő</i>					
Cathepsin D mEq Tyrosin (h/ml) 37 °C	$3,1 \times 10^{-4}$ $\pm 0,1 \times 10^{-4}$	$1,22 \times 10^{-4}$ $\pm 0,08 \times 10^{-4}$	$1,18 \times 10^{-4}$ $\pm 0,08 \times 10^{-4}$	$0,64 \times 10^{-4}$ $\pm 0,01 \times 10^{-4}$	$0,41 \times 10^{-4}$ $\pm 0,03 \times 10^{-4}$
5'-nucleotidáz μ M P/mg fehérje/h	11,0 $\pm 0,1$	2,1 $\pm 0,1$	1,48 $\pm 0,08$	7,7 $\pm 0,1$	0,34 $\pm 0,01$
Glucose 6-foszfatáz μ M P/mg fehérje/h	2,9 $\pm 0,1$	0,57 $\pm 0,01$	0,42 $\pm 0,01$	0,33 $\pm 0,01$	1,62 $\pm 0,08$

n = 5; \bar{x} ; \pm SD

5. táblázat

A sejtfrakciók hidrolitikus enzimaktivitás értékei pH 7,1-nél és pH 10-nél: DPM/perc/l mg fehérje egységben

	A sejtfrakciók hidrolitikus enzimaktivitás értékei pH 7,1-nél (dpm/perc/l mg fehérje)				
	Homogeni- zátum	Mag + mito- chondrium	Lysosoma	Microsoma	Cytosol
Hasnyálmirigy	2800 ± 221,6	494 ± 19,2	507 ± 24,3	500 ± 18,1	1292 ± 59,6
Bél	2630 ± 210,3	512 ± 14,3	512 ± 16,9	512 ± 16	1090 ± 54,3
Tüdő	1500 ± 68,9	278 ± 19,3	132 ± 10,3	305 ± 20,6	773 ± 30,5

	A sejtfrakciók hidrolitikus enzimaktivitás értékei pH 10-nél (dpm/perc/l mg fehérje)				
	Homogeni- zátum	Mag + mito- chondrium	Lysosoma	Microsoma	Cytosol
Hasnyálmirigy	3700 ± 429,3	804 ± 23,1	325 ± 182	735 ± 26,3	1836 ± 69,9
Bél	1927 ± 94,3	273 ± 13,1	150 ± 16,1	442 ± 22,3	962 ± 30,4

n = 5, \bar{x} , ± SD

3. A peptidhidrolízis *in vivo* vizsgálata

A továbbiakban olyan kísérleti körülményeket kellett keresnünk, amelyekben az *in vitro* vizsgálatokkor pozitívnak talált szervek *in vivo* enzimaktivitásáról számszerű adatokat nyerhetünk. Erre a célra megfelelőnek látszott pl. a patkány hasnyálmirigyének eltávolítása. A pancreasirtott patkányban a hasnyálmirigy peptidhidrolízist végző enzim működése kiesik és ennek következtében az egy perc alatt lehasadó és keringésben található BOC-glicin fragmens mennyiségének csökkennie kell. Valóban, ha az aortás vér szérumában található egy perc alatt lehasadt BOC-glicin radioaktivitását, amely az összaktivitásnak mintegy 27,5%-a, a műtét utánival hasonlítjuk össze, akkor azt láthatjuk, hogy a pancreas eltávolítása után ez csaknem felére csökkent (15,4%).

A bélfalban levő hidrolitikus enzimaktivitás *in vivo* vizsgálatát izoláltan nem tudtuk elvégezni. Ezért olyan kísérleti modellt dolgoztunk ki, amelyben a hasnyálmirigy és a bél hidrolitikus enzimaktivitását együttesen iktattuk ki. A vizsgálat menete a következő volt: a portális vénába kanült helyeztünk és a jelzett peptid vénás adásával egy időben a kanült megnyitottuk, így a portális vérrel együtt kiürült a bélben és a hasnyálmirigyben lehasadt BOC-glicin

fragmens is. Az aortás vérbe tehát csak olyan BOC-glicin fragmens kerülhetett, amely nem a portális vénás rendszerhez tartozó szervekben hasadt le. Ebben az esetben a szérum minta összradioaktivitásának a BOC-glicinre jutó hányada csak 10,6% volt.

A vizsgálatok eredményét oszlopdiagramon ábrázolva jól látható, hogy a két különböző típusú műtét hogyan csökkentette az *in vivo* létrejövő peptidhidrolízist.

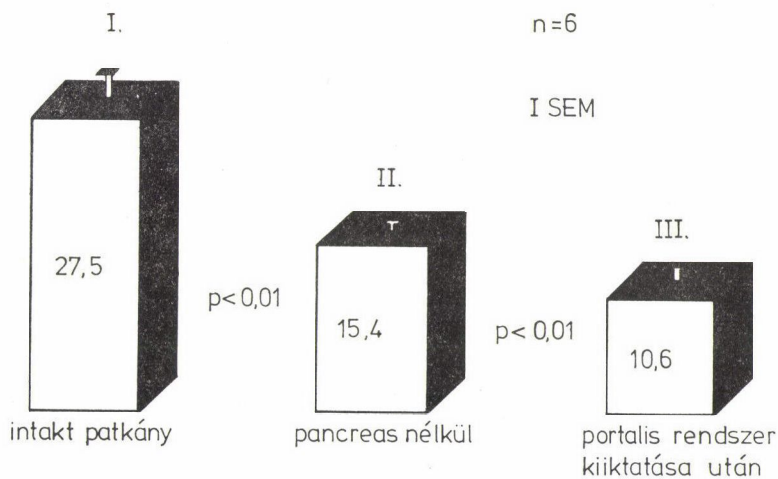
Az eddig bemutatott vizsgálatok indirekt bizonyítékot szolgáltatottak arra vonatkozóan, hogy a hasnyálmirigy- és a vékonybél-szövetben levő peptidázok *in vivo* is részt vesznek a pentagasztrin katabolizmusában. A tüdő vonatkozásában viszont direkt bizonyítékokat tudtunk nyerni a szervben *in vivo* körülmények között végbemenő peptidhidrolízisről. A vizsgálatokat úgy végeztük, hogy jelzett BOC-GPG-t adtunk patkányok jobb szívfelébe az ábrán látható módon (8. ábra) a vena jugularisba vezetett kanül segítségével. Ezzel egy időben elszorítottuk a vena cava inferiort és a hasi aortát. 10 másodperc múlva vért vettünk az arteria carotisból. Ily módon olyan vérmintákhoz jutottunk, amelyek a jelzett anyag beadását követően csak a tüdő keringésén jutottak keresztül. Ezekben a szérum mintákban a BOC-glicin fragmensre jutó radioaktivitás az össz radioaktivitásnak kb. 25%-át képezte. Ez más szóval annyit jelent, hogy miközben a peptid egyszer átjutott a tüdő keringésén, annak 25%-a katabolizálódott.

Megbeszélés

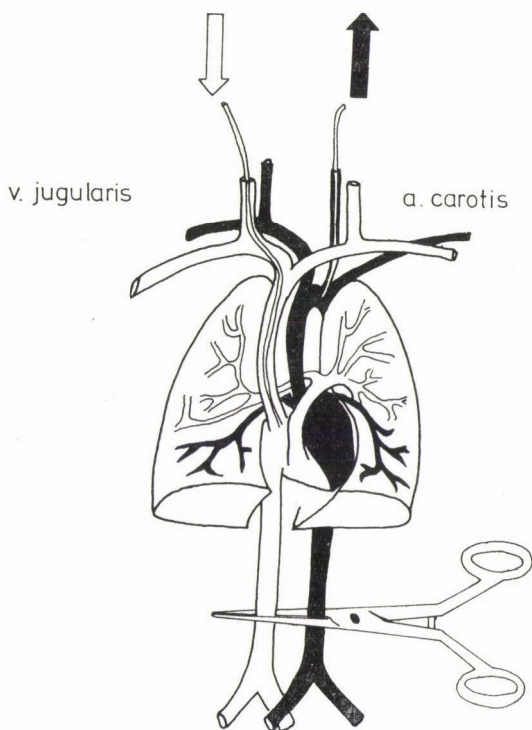
Eddigi vizsgálataink alapján azt mondhatjuk, hogy a BOC-GPG metabolizmusában a máj kiválasztó tevékenységén és a májban végbemenő dezamidálódáson kívül a tüdő-, vékonybél- és a pancreas-szövet endopeptidázéinak van kitüntetett szerepe. A hidrolitikus enzimaktivitás a sejt-frakcionálás adatait figyelembe véve, nagy valószínűséggel a citoplazmában elhelyezkedő, feltehetően oldott állapotban levő enzim, ill. enzimek működésével kapcsolatos.

A különböző koncentrációjú EDTA-val történő gátlhatóság eredményei arra utalnak, hogy a hasnyálmirigyben és bélben levő neutrális pH-nál ható endopeptidázok két nagyságrenddel nagyobb EDTA koncentrációval gátlhatók, mint a tüdőben levő enzim vagy enzimek. Ugyanakkor a hasnyálmirigyben és a vékonybélben levő lúgos peptidázok egyik EDTA-koncentrációval sem gátlhatók, ami annyit jelent, hogy ezeknek a peptidázoknak a működéséhez fém-ion nagy valószínűséggel nem szükséges.

A PMSF vizsgálata új adatokat szolgáltatott a hidrolitikus enzimek természetére vonatkozóan. Először is abból a tényből, hogy a tüdőben és a vékonybélben levő enzimaktivitás PMSF-fel nem volt gátlható, az következik, hogy ezekben a szervekben a hidrolízist végző enzimek nagy valószínűséggel nem szerinproteázok. A másik megfigyelésünk az volt, hogy míg a hasnyálmirigy



7. ábra. Az intakt, pancreasirtott és a portális rendszer kiiktatása utáni patkányok 1 perces szérumból mintáinak BOC-¹⁴C-glicin aktivitás %-a



8. ábra. A tüdőben végbemenő peptidhidrolízis *in vivo* vizsgálatára kidolgozott modell-kísérlet ábrája

homogenizátumban mind a két pH tartományban lehetett a proteolitikus enzimaktivitást PMSF-fel gátolni, addig a vékonybél homogenizátumban ez nem sikerült. Ez arra utal, hogy a hasnyálmirigy proteolitikus enzimeinek egy része kvalitatíve különbözik a vékonybélben levő enzimekétől. Végül a neutrális és lúgos közegben végzett vizsgálatok eredményeinek különbözősége abból eredhet, hogy a PMSF egy része lúgos közegben hidrolizál, és ezért lúgos közegben kisebb aktivitással rendelkezik (Gordon 1978).

A peptid fragmensekkel végzett vizsgálatok azon az elven alapulnak, hogy a BOC-GPG szubsztráthoz adott dipeptidok a hidrolízist végző endopeptidáz enzimaktivitás egy részét lekötik. Ha a hidrolízis a pentapeptid N- vagy C-terminális végén kezdődik, az enzimaktivitás az N-terminális vagy C-terminális dipeptiddel befolyásolható. Ez kétféleképpen lehetséges. Vagy úgy, hogy a peptidkötést hasító enzim egyformán szubsztrátnak tekinti a pentapeptidben levő és a szabad dipeptidet, vagy az enzim szubsztrát-kötődési helyét blokkolja. Ez utóbbi lehetőség látszik valószínűnek a tüdő endopeptidáz-aktivitásának a gátlásában. Ez esetben ugyanis a szubsztrátként használt pentagasztrin-származék N-terminális dipeptidje úgy gátol, hogy közben maga nem hidrolizál. A H-Gly-Trp-OH dipeptid gátló hatása egyébként a különböző szervek hidrolitikus aktivitásával szemben különböző mértékben érvényesült. 2,8 μM koncentráció mellett a pancreas hidrolitikus enzimaktivitása 50%-kal a vékonybélé 40%-kal, a tüdőé 100%-kal csökkent. Később bizonyítani tudtuk, hogy a tüdő vonatkozásában ennek a dipeptidkoncentrációnak még az 1/5-e is 100%-os gátló hatású. Ez a jelenség arra utal, hogy míg a hasnyálmirigyben és a vékonybélben nagyobb arányban találhatók egyéb, a glicil-triptofán-nal nem gátolható endopeptidázok (olyanok, amelyek a BOC-GPG-t hidrolizálni képesek), addig ez a tüdőben nem valószínű, vagy sokkal kisebb arányú lehet. A tüdő endopeptidáz-aktivitás gátlásának a mértéke a szubsztrát koncentráció növelésével csökkenthető. Ez amellet szól, hogy a dipeptid-gátlás reverzibilis.

A H-Asp-Phe-NH₂ × AcOH dipeptiddel kapott enzimaktivitás csökkenés értékelésekor fel kell tételeznünk azt, hogy a hasnyálmirigy szövetben olyan endopeptidáz aktivitással is számolni kell, amely neutrális közegben az aszparaginsav és fenilalaninamid közötti kötést hasítja.

Az *in vivo* katabolizmus vizsgálatra kidolgozott modell-kísérletekben sikerült bizonyítani, hogy mind a hasnyálmirigy-, mind a vékonybél-szövetben jelentős mértékű peptidhidrolízis van. A tüdő peptidhidrolizáló tevékenysége, figyelembe véve a patkány viszonylag gyors keringését, nagyobb mértékűnek látszik az előbbi két szervénél is. Ezért — annak ellenére, hogy a hasnyálmirigy és vékonybél vonatkozásában direkt mérésekkel nem rendelkezünk — megkockáztatjuk azt a feltételezést, hogy patkányban a pentagasztrin-katabolizmus fő szerve a tüdő. Ez az állítás látszólag ellentétben áll Stagg és mtsai (1971) és a mi korábbi (Varga és mtsai 1973) állásfoglalásunkkal. Ekkor ugyanis az idézett szerzőkkel egybehangzóan az volt a véleményünk, hogy a penta-

gasztrin metabolizmus fő szerve a máj. Ez abban az esetben, ha a kiválasztást mint metabolizmus utat fogjuk fel, továbbra is igaz. Viszont, ha a metabolizmus középpontjába a molekula katabolikus lebontását helyezzük, a máj szerepe elhanyagolhatónak látszik. Az irodalomban mindössze *Evans* és *mtsai* (1973) közleményében található olyan utalás, mely szerint *in vitro* körülmények között a máj is képes pentagasztrint katabolizálni. Az eltérő eredmény oka feltehetően a különböző inkubációs időben kereshető. A szerzők ugyanis két óráig inkubálták a pentagasztrint, mi fél óráig. Úgy gondoljuk azonban, hogy a mi vizsgálatinkban a viszonylag rövid inkubációs idő közelebb áll az *in vivo* körülmények között végbemenő katabolikus folyamatokhoz.

Összefoglalás

A BOC-¹⁴C-glicin pentagasztrin szövethomogenizátumok citoszol frakciójával történt inkubálása után hidrolizálódik. A hidrolízist okozó enzimaktivitás elsősorban a hasnyálmirigyben, a vékonybélben és a tüdőszövetben található. Nem található számottevő enzimaktivitás a máj-, vese- és izomszövetben. A tüdőben található enzimaktivitás hőkezelésre érzékeny, a hasnyálmirigy és a vékonybél enzimaktivitása hőkezelésre alig változik. A tüdőben levő enzimaktivitás pH optimuma 7,1, a hasnyálmirigyben és a vékonybélben levőé 7,1, ill. pH 10.

A peptidhidrolízis nem befolyásolható szójabab tripszin inhibitorral, kallikrein inhibitorral (Gordox) és az SQ-20 jelzésű angiotenzináz gátlóval.

EDTA-val mindhárom szerv enzimaktivitása befolyásolható. Az aktivitásgátlás csak neutrális közegben jön létre. A szerin proteáz gátló fenilmetil-szulfonilfluorid a hasnyálmirigyben található neutrális és lúgos közegben ható endopeptidázt gátolja. A pentapeptid felépítésében részt vevő N-terminális dipeptiddel a hasnyálmirigy- és vékonybél enzimaktivitása részlegesen, a tüdő enzimaktivitása teljesen gátolható. A C-terminális dipeptid a hasnyálmirigy-szövetben található endopeptidázok egy részét gátolja. A tüdőszövet endopeptidáz aktivitása az N-terminális dipeptiddel reverzibilisen gátolható.

IRODALOM

- Barrett, A. I.: *Lysosomes a Laboratory handbook* (Ed: J. T.) Dingle North-Holland Publishing Company Amsterdam Chapter 2. (1972).
- Evans, J. C. W., Reeder, D. D. és Thompson, J. C.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* **143**, 168 (1973).
- Gold, A. M.: *Biochemistry* **4**, 897 (1965).
- Gordon, T. J.: *Analytical Biochemistry* **86**, 574 (1978).
- Kidwai, A. M., Radcliffe, M. A. és Daniel, E. E.: *Biochimica et Biophysica Acta* **233**, 538 (1971).
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, E. A. L. és Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- Song, C. S. és Bodansky, O.: *The Journal of Biological Chemistry* **242**, 694 (1967).
- Stagg, G. H., Temperley, J. M. és Wyllie, J. H.: *Gut* **12**, 825.
- Varga, L., Náfrádi, J., Csernay, L., Balásperi, L., Penke, B. és Varró V.: *Orvostudomány* **24**, 13 (1973).
- Varga, L., Kovács, I., Penke, B., Balásperi, L., Pallai, P. és Varró, V.: *Orvostudomány* **29**, 107 (1978).