

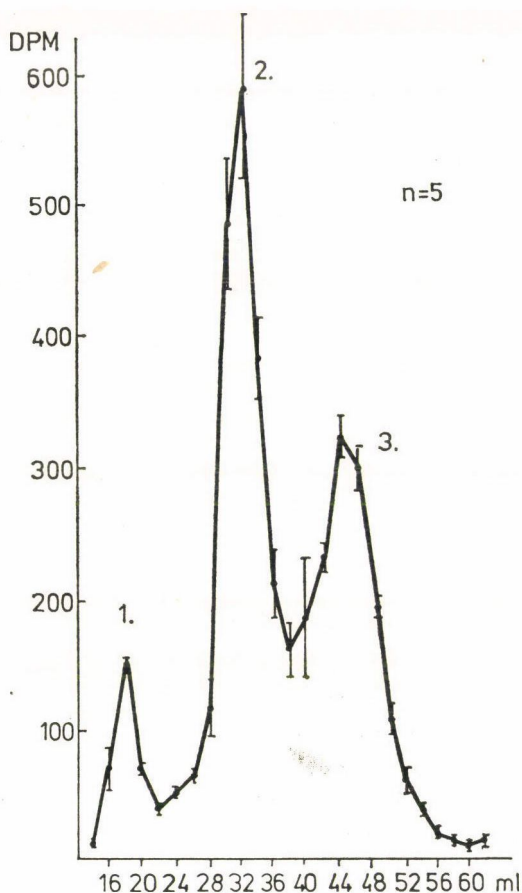
ÚJABB ADATOK A BOC-GLYCIN PENTAPEPTIDAMID (PENTAGASTRIN) IN VIVO METABOLIZMUSÁHOZ

VARGA LÁSZLÓ, az orvostudományok kandidátusa, KOVÁCS ISTVÁNNÉ, PENKE
BOTOND, a kémiai tudományok kandidátusa, BALÁSPÍRI LAJOS, a kémiai tudományok
kandidátusa, PALLAI PÉTER és VARRÓ VINCE, az orvostudományok doktora

Közlésre érkezett: 1977. X. 20.

Korábbi közleményünkben a kereskedelembe kapható szintetikus gastrin C-terminalis pentapeptidamidjának (a továbbiakban pentagastrin) in vivo metabolizmusával kapcsolatban részletesen beszámoltunk a máj kiválasztó tevékenységéről és arról, hogy a portális vagy systemás vénás keringésbe adott pentagastrin egy része a májsejteken történő áthaladása közben dezamidálódik (Varga és mtsai 1973). Más helyen olyan vizsgálatokat ismertettünk, amelyekben a radioaktív pentagastrin jelenlétét igazoltuk a máj- és vese-parenchyma sejtekben és a gyomornyálkahártya parietalis sejtjeiben (Várkonyi és mtsai 1976). A vénás keringésbe adott BOC-glycin-pentagastrin metabolizmusát a vérben és a vizeletben is vizsgáltuk. A jelzett pentagastrin vénás adása után nyert radioaktivitás eliminációs görbéjének lefutását összehasonlítva az immunreaktív módszerrel, ill. a biológiai aktivitás alapján nyert pentagastrin eliminációjával azt találtuk, hogy a pentagastrin injekció után 6 perccel a keringésben már biológiailag aktív, ill. immunreaktív pentagastrin nem található, ugyanakkor a radioaktivitás még jól mérhető (Náfrádi és mtsai 1976). Az immunreaktív úton, ill. biológiai aktivitás alapján mért pentagastrin elimináció tehát lényegesen gyorsabb, mint a radioaktivitása. A radioaktív szérum minták Sephadex-gél kromatográfiás vizsgálata során azt találtuk, hogy a szérumfehérjékkel kromatografálódó radioaktivitás mellett még két radioaktív csúcs eluálható. Ezek közül az egyik az eredeti jelzett pentagastrinnak felel meg, a másik egy ismeretlen metabolit (Varga 1976) (1. ábra).

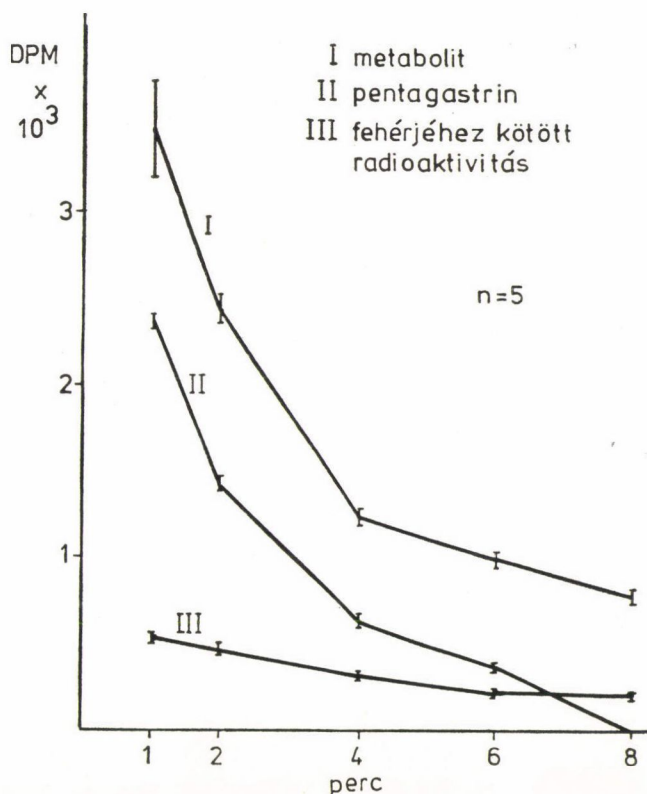
Ha a három radioaktív csúcs viselkedését az idő függvényében vizsgáljuk, akkor a következőket figyelhetjük meg: a szérumfehérjékhez tartozó, csaknem változatlan radioaktivitás a vizsgálat egész időtartama alatt (8 perc) kimutatható. Ez az aktivitás azonban az összradioaktivitáshoz viszonyítva jelentéktelen. Mind a pentagastrinhez, mind a metabolithoz tartozó radioaktivitás az idő függvényében csökken. 8 perccel a jelzett pentagastrin vénás adása után a szérum mintákban már csak a metabolithoz, ill. fehérjékhez kötött radioaktivitás észlelhető, a pentagastrinhez kötött radioaktivitás nem (2. ábra).



1. ábra. BOC-C¹⁴-glycin-pentagastrin vénás adása után (50 mcg/ml koncentrációjú, 7 mCi/mmol fajlagos aktivitású) egy perccel nyert szérumból minták Sephadex G-25 kromatográfiával nyert radiokromatogramja. Az egyes csúcs a szérumból fehérjékhez kötődő radioaktivitást tartalmazza, a kettes csúcs a metabolit, a harmadik csúcs a pentagastrin

A különböző úton (RIA, biológiai aktivitás, radioaktivitás) mért pentagastrin elimináció tehát közel azonos idő alatt jön létre. Ez azonban csak abban az esetben volt igazolható, ha a radioaktivitás mérés során a pentagastrinhez tartozó radioaktivitást külön vettük figyelembe. A 8 perc után nyert szérumból minták radioaktivitása tehát olyan metabolitból származik (a szérumból fehérjékhez kötött radioaktivitást nem számítva), amely tartalmazza a pentagastrin C¹⁴-glycin konstituensét, de felépítését tekintve az eredeti peptidtól lényegesen eltérő.

Bemutatásra kerülő vizsgálatainkban beszámolunk az ismeretlen jelzett peptid fragmentumok összetételéről és további sorsáról a szervezetben.



2. ábra. BOC-C¹⁴-glycin-pentagastrin vénás adása után (30 mcg/ml koncentrációjú, 7 mCi/mmol fajlagos aktivitású) 1, 2, 4, 6 és 8 perccel nyert szérumból minták radiokromatogramjának átlag értékei és az átlag szórása

Eredményeink

24 óra alatt gyűjtött vizelettel ürülő radioaktivitás vizsgálata

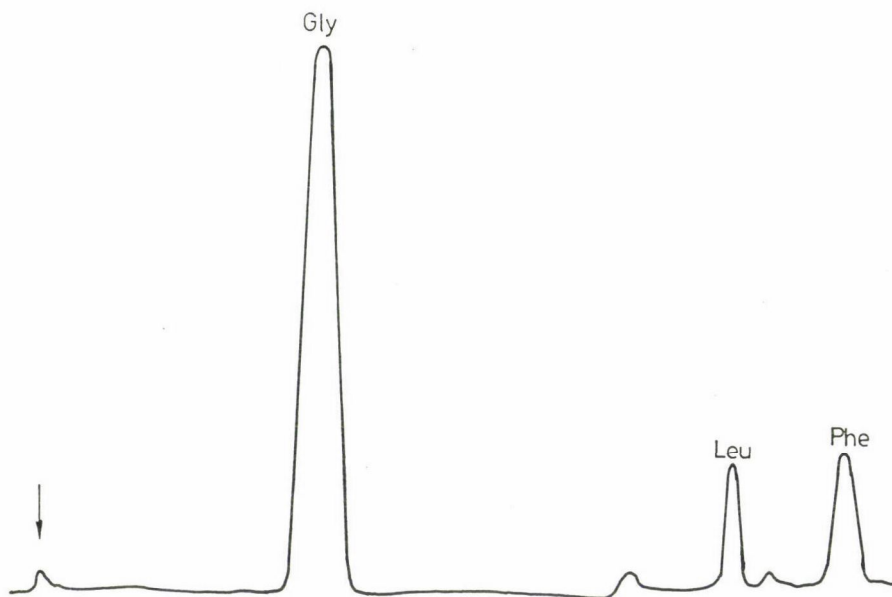
Megvizsgáltuk, hogy az egy alkalommal vénásan adott BOC-C¹⁴-glycin-pentagastrin összradioaktivitásának hány százaléka ürül a vizelettel 24 óra alatt.

A vizsgálat menete: 7, egyenként 250–300 g súlyú hím Wistar patkány-nak farokvénán keresztül 1 ml 500 mcg/ml koncentrációjú, 500 μ Ci/mmol fajlagos aktivitású BOC-C¹⁴-glycin-pentagastrint adtunk. Az állatokat vizelet-gyűjtésre alkalmas ketrecekben helyeztük el és vizeletüket 24 órán keresztül gyűjtöttük. 24 óra alatt a bevitt radioaktivitásnak átlag $73,2 \pm 6\%$ -a ürült ki. Miután bizonyítottuk, hogy a vizelettel ürülő radioaktivitásnak csupán elhanyagolható hányada (kb. 0,03%-a) származik az eredeti pentagastrinből (Varga 1976), nyilvánvaló, hogy a vizelet radioaktivitása gyakorlatilag a metabolitból adódik.

A radioaktív metabolit izolálása a vizeletből

200 db hím, 250—300 g súlyú Wistar törzsű patkánytól vizeletet gyűjtöttünk. A vizeletnyeréshez a hólyagot hasi metszésből megnyitottuk, és a hólyag felől az urethrán keresztül kanült vezettünk ki és azt rögzítettük. A vena jugularisba is kanült kötöttünk, és ezen keresztül óránként 0,4 ml 500 mcg/ml koncentrációjú, 500 μ Ci/mmol fajlagos aktivitású BOC- C^{14} -glycin-pentagastrint adtunk öt alkalommal, összesen 1 mg összdózisban. Az állatok megfelelő hidráltóságának biztosítása céljából ugyancsak a jugularis kanülon keresztül 15 percenként 2 ml fiziológiás sóit adtunk. Ily módon patkányonként átlag 8 ml vizelethez jutottunk. Összesen 1600 ml vizeletet nyertünk, amelyet több részletben kromatografáltunk.

400 ml radioaktív vizeletet vákuumban 1/10-re bepároltunk, és a párlatot Sephadex G-25-ös oszlopon kromatografáltuk 0,01 molos foszfátpufferrel. Az egyes frakciók radioaktivitását Packard liquid-scintillációs rendszerben mértük. Kromatografálás során egyetlen radioaktív csúcsot nyertünk. A csúchoz tartozó mintákat összeöntöttük és szárazra pároltuk. A száraz anyagot 5 ml vizes piridinacetát pufferben (piridin : jégecet : víz 20 : 6 : 11) oldottuk. A nem oldódó kristályokat kiszűrtük. Minthogy ez utóbbi rész az összaktivitásnak csupán 2%-át tartalmazta, a továbbiakban ezzel a résszel nem foglalkoztunk. A szűrletet etilacetáttal kb. 20%-osra hígítottuk. A hígítás során anyagunk két

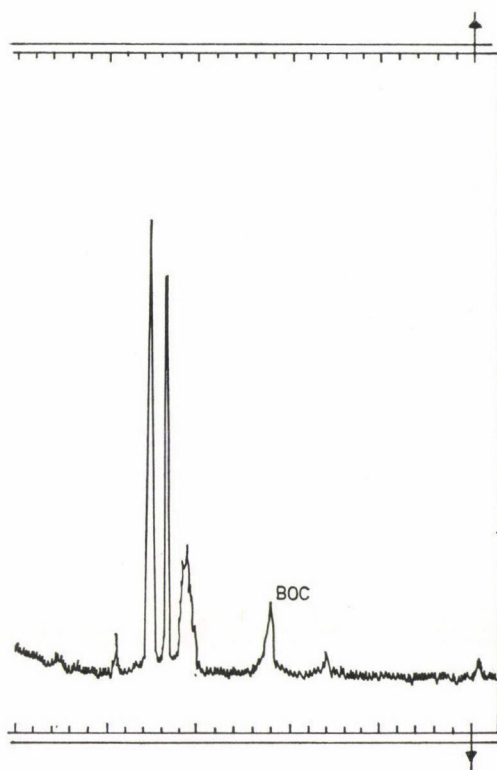


3. ábra. Vizeletből izolált tisztított radioaktív metabolit aminosav spektruma

fázisra vált szét; a felső (etilacetátos fázis) a radioaktivitás 88%-át tartalmazta, az alsó (vizes fázis) 10%-át.

A felső fázist quantitative szilikagél oszlopra vittük fel és 90% etilacetát — 10% vizes piridinacetát (összetételét lásd előbb) eleggyel eluáltuk. A kromatográfia során egyetlen radioaktív csúcsot kaptunk. A radioaktív csúcsához tartozó minták tisztaságát szilikagél vékonyréteg kromatográfiával ellenőriztük. A vékonyréteg lapokat Cl_2 -tolidin reagenssel hívtuk elő, a radioaktív folt helyét Packard Chromatogram Scanner-rel állapítottuk meg. A viszonylag tiszta frakciókat — amelyek a radioaktív metaboliton kívül legfeljebb igen kis mennyiségű ismeretlen szennyező anyagot tartalmaztak — összeöntöttük és újra kromatografáltuk.

Az ismételt kromatografálás után nyert radioaktív csúcs vékonyréteg kromatográfiás ellenőrzésekor csak radioaktív metabolitot találtunk, szennyeződés nélkül. A metabolit izolálása során a kiindulási anyag radioaktivitásának kb. 40%-át veszítettük el. A metabolit izolálására kidolgozott módszerünk tehát 60%-os hatásfokúnak mondható.



4. ábra. Vizeletből izolált tisztított radioaktív metabolit NMR spektruma

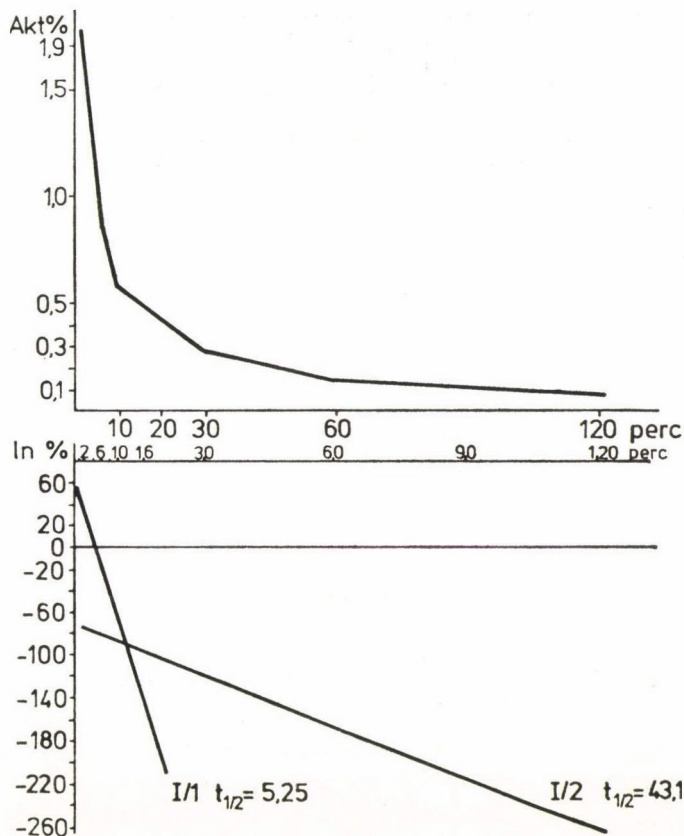
Ezt követően a tiszta metabolitot 6 N sósavval, ill. — az esetleg jelenlevő tryptophán megvédése céljából — merkaptotán-szulfonsavval hidrolizáltuk és a hidrolizátumokból aminosav analízist végeztünk. A hidrolizátumban mérhető mennyiségben csak glycint találtunk (3. ábra). Ekkor merült fel bennünk először, hogy a metabolit a pentagastrin BOC-glycin fragszékével lenne azonos. A feltételezés megerősítésére szilikagél vékonyréteg kromatográfiát végeztünk. Három különböző futtató elegyben (benzol : jégcet 7 : 1; etilacetát : vizes piridinacetát 9 : 1, ill. 8 : 2) párhuzamosan futtattuk a BOC-glycint és a metabolitot. Valamennyi esetben a két anyag R_f értékei a futtatószerék sorrendjében azonosak voltak ($R_f = 0,69$; $R_f = 0,65$; $R_f = 0,78$). Ezt követően a metabolitból NMR spektroszkópos vizsgálatot végeztünk és a metabolit spektrumát a BOC-glycinével összehasonlítva teljesen azonos képet kaptunk (4. ábra).

Mindebből következik, hogy a BOC-glycin-pentagastrin in vivo metabolizmusa során az N-terminalis BOC-glycin és az ezt követő tryptophan közti peptid kötés felhasad. A lehasadt BOC-glycin fragszék mint testidegen anyag a vízzel ürül ki.

BOC-C¹⁴-glycin farmakokinetikai vizsgálata

Ahhoz, hogy a BOC-glycin sorsát a szervezetben pontosan követhessük, olyan vizsgálatokat is végeztünk, amelyekben patkányok egy-egy csoportjának jelzett BOC-glycint adtunk vénásan és ezt követően vizsgáltuk a radioaktivitás megoszlását a testnedvekben és a szervekben.

A szérum radioaktivitás eliminációjának meghatározásához 200—250 g súlyú, hím Wistar törzsű patkányok vena femoralisába adtunk egy alkalommal 1 ml/250 g testsúly, 400 mcg/ml koncentrációjú, 168 μ Ci/mmol fajlagos aktivitású BOC-C¹⁴-glycint. Ezt követően 1, 2, 4, 6, 8, 10, 16, 30, 60 és 120 perc múlva 6—6 állatot elvéreztettünk. A szérumminták radioaktivitását Packard liquid-scintillációs rendszerben mértük. A beadott aktivitás 1 ml szérumra jutó százalékát az idő függvényében ábrázoltuk. Az eliminációs görbe két részre osztható, egy meredekebb és egy kevésbé meredek részre. A két szakaszra 1—1 regressziós egyenes illeszthető (5. ábra). A regressziós egyenesek meredeksége alapján számított felezési idő — a meredekebb szakasz esetén 5,25 perc — a kevésbé meredek szakasz esetén 43,1 perc. A BOC-C¹⁴-glycin-pentagastrin vénás adása után a fentiekkel azonos körülmények között nyert szérum radioaktivitás eliminációs görbéje három szakaszra osztható. Ezek közül az első és második szakaszra regressziós egyenes illeszthető, a harmadik szakasz az abszcisszával közel párhuzamos. Az első két szakasznak a regressziós egyenes meredeksége alapján számított felezési ideje 1,87 perc, ill. 9,16 perc (Varga 1976). A BOC-C¹⁴-glycin vénás adása után nyert szérum eliminációs görbét



5. ábra. BOC-C¹⁴-glycin-pentagastrin vénás adása után nyert radioaktivitás-eliminációs görbe, és az eliminációs görbe két szakaszára illesztett regressziós egyenes, ill. ezek meredeksége alapján számított felezési idő

összehasonlítva a BOC-C¹⁴-glycin-pentagastrin vénás adása után nyert görbével azt mondhatjuk, hogy az előbbi esetében a radioaktivitás eltűnése lassabb ütemű, és az eliminációs görbe lefutása jelentősen eltérő az utóbbitól. A különbség okára később visszatérünk.

A továbbiakban a máj BOC-glycin kiválasztó tevékenységét tanulmányoztuk. A vizsgálatokat 8 db 200–250 g súlyú hím Wistar patkányon végeztük. Egy-egy állatnak 1 ml 400 mcg/ml koncentrációjú, 168 μ Ci/mmol fajlagos aktivitású BOC-C¹⁴-glycint adtunk a portális vénába. Az állatok ductus choledochusába kanült vezetünk, és az anyag beadása után $4 \times 1/2$ ml epét gyűjtöttünk. Az epe frakciók radioaktivitását liquid-scintillációs rendszerben határoztuk meg. Az egyes minták radioaktivitását a beadott összradioaktivitás százalékában tüntettük fel (1. táblázat). Feltűnő, hogy az epével ürülő radioaktivitás csupán töredéke annak, mint amit a BOC-C¹⁴-glycin-pentagastrin portális adása után találtunk (Varga és mtsai 1973). A BOC-C¹⁴-glycin-penta-

I frakció 0,5ml	II frakció 0,5ml	III frakció 0,5ml	IV frakció 0,5ml	I-IV frakció összesen
0,8419 ± 0,05	0,2039 ± 0,02	0,1232 ± 0,017	0,0815 ± 0,009	1,204 ± 0,077

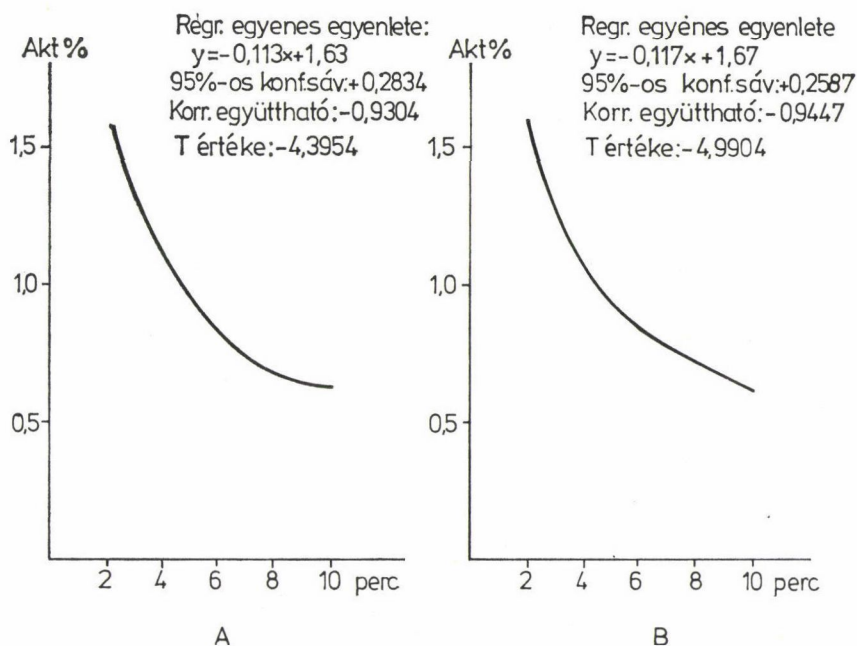
1. táblázat

BOC-C¹⁴-glycin portalis adása után 8 állatban nyert epefrakciók radioaktivitás százalékának átlag értékei és az átlag szórása

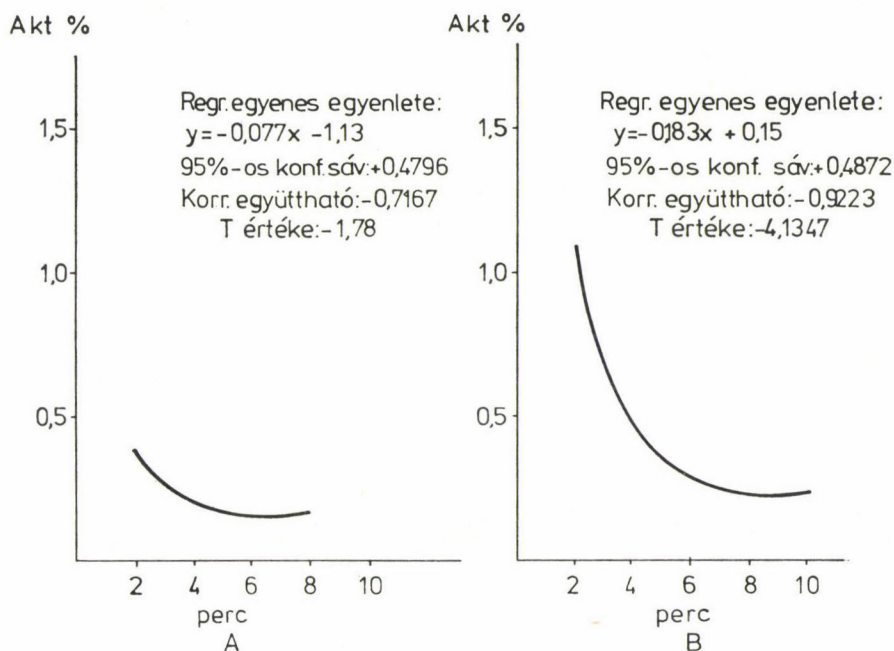
gastrin esetében a patkány szervezetébe kívülről bevitt peptid jelentős részét a máj viszonylag rövid idő alatt kiszűri a keringésből (Stagg és mtsai 1971 és Varga és mtsai 1973).

A BOC-C¹⁴-glycin esetében a májnak ez a tevékenysége feltételezésünk szerint nem érvényesül. A feltételezés bizonyítására a következő kísérleteket végeztük: 200—250 g súlyú, hím Wistar patkányok egy-egy csoportjának (30—30 állat) portálisan, ill. systemásan 1 ml/250 g testsúly 400 mcg/ml koncentrációjú, 168 μ Ci/mmol fajlagos aktivitású BOC-C¹⁴-glycint, ill. 0,5 ml/250 g testsúly 500 mcg/ml koncentrációjú 168 μ Ci/mmol fajlagos aktivitású BOC-C¹⁴-glycin-pentagastrint adtunk. Mind a négy csoportból 6—6 állatot elvéreztettünk a következő időpontokban: 2, 4, 6, 8, 10 perc. Az aortás vérből nyert szérum minták radioaktivitását liquid-scintillációs rendszerben határoztuk meg. Az egyes időpontokhoz tartozó radioaktivitás százalékokat (az összradioaktivitás 1 ml szérumra vonatkozó százalékát) koordináta rendszerben ábrázoltuk. A BOC-C¹⁴-glycin adása után, függetlenül attól, hogy portálisan vagy systemásan adtuk, azonos radioaktivitás százalék értékű és lefutású görbéket nyertünk. A két görbe, matematikai értékelés során is azonosnak mutatkozott (6. ábra). Ezzel szemben a BOC-C¹⁴-glycin-pentagastrin portális, ill. systemás vénás adása után egymástól jelentősen eltérő görbéket nyertünk (7. ábra). A különbség abból adódik, hogy a portálisan bevitt pentagastrin jelentős része nem jut be a systemás keringésbe, mivel azt a máj kiszűri. *A két anyag epével történő kiválasztásában mutatkozó különbség oka tehát az, hogy a BOC-glycin-pentagastrin esetében a máj szűrő tevékenysége érvényesül, a BOC-glycin esetében nem. Ez a körülmény magyarázza a két anyag szérumból történő eliminációjának különbözőségét is.* Feltételezhető ugyanis, hogy a BOC-glycin elimináció azért lassabb ütemű, mint a BOC-glycin-pentagastriné, mert abban a máj szűrő tevékenysége nem jut kifejezésre.

A BOC-glycin vizelettel történő kiválasztását 8 állatban egy alkalommal adott injekció után 24 órás gyűjtött vizeletből vizsgáltuk, azonos körülmények között, mint a BOC-glycin-pentagastrin esetében. 24 óra alatt a beadott radio-



6. ábra. BOC-C¹⁴-glycin portális (A) és systemás (B) vénás adása után 2, 4, 6, 8 és 10 perc múlva az aortából nyert szérum minták radioaktivitás százaléka



7. ábra. BOC-C¹⁴-glycin-pentagastrin portális (A) és systemás (B) vénás adása után 2, 4, 6, 8 és 10 perc múlva az aortából nyert szérum minták radioaktivitás százaléka

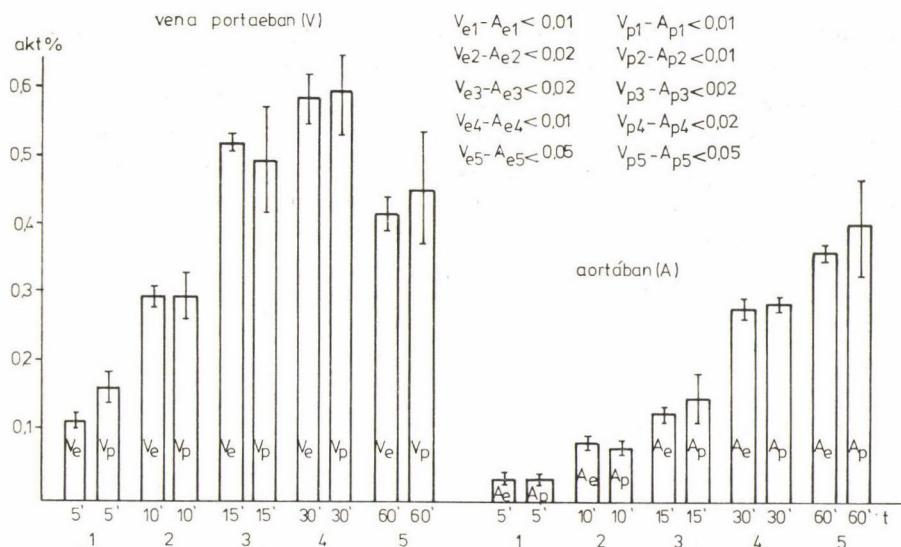
aktivitás $70 \pm 14\%$ -a ürült. Ez a mennyiség lényegében egyezik a BOC-glycin pentagastrin vénás adása után nyert 24 órás vizelet radioaktivitásával ($73 \pm 6\%$).

Az eddigi vizsgálatok alapján látszólag ellentmondás mutatkozik a BOC-glycin-pentagastrin, ill. a BOC-glycin májkiválasztása és a vizelettel történő radioaktivitás ürítése között. Abban az esetben ugyanis, ha az epével kiválasztott BOC-glycin-pentagastrin a béltartalommal kiürülne, úgy a pentagastrin adása után a vizelettel ürülő radioaktivitásnak kevesebbnek kellene lennie, mint a BOC-glycin adása után. Az előbbieket alapján feltételezhető, hogy az epével kiválasztott BOC- C^{14} -pentagastrin egy része, vagy annak radioaktív fragmense a bélen keresztül felszívódik és visszajut a systemás keringésbe. A feltételezés igazolására több kísérletet végeztünk.

Az első kísérletsorozatban hím Wistar patkányok egy csoportjának (20 állat) 0,4 ml 50 mcg/ml koncentrációjú, 7 mCi/mmol fajlagos aktivitású BOC- C^{14} -glycin-pentagastrint adtunk a portális vénába, és állatonként 0,7 ml radioaktív epét gyűjtöttünk. Az epe frakciókat összeöntöttük és a gyűjtött radioaktív epéből 0,4 ml-t (771600 dpm) 200—250 g súlyú, hím Wistar recipiens állatok jejunumába adtunk. Az intrajejunálisan kezelt állatok egy-egy csoportját (6—6 állat) 5, 10, 15, 30 és 60 perc múlva elvéreztettük, egyidejűleg a portális vénán és az aortán keresztül. Így minden időpontban állatonként két szérum mintát nyertünk. Ezek radioaktivitását liquid-scintillációs rendszerben mértük, és a beadott összradioaktivitás 1 ml szérumra jutó százalékában adtuk meg.

A másik kísérletben 0,5 ml 50 mcg/ml koncentrációjú 7 mCi/mmol fajlagos aktivitású BOC- C^{14} -glycin-pentagastrint adtunk intrajejunálisan szintén 200—250 g súlyú, hím Wistar patkányoknak. Ezt követően az előző kísérletben leírt módon és időpontban 6—6 állatot elvéreztettünk, és a szérum minták radioaktivitását meghatároztuk. A különböző időpontban, ill. különböző körülmények között nyert szérum minták radioaktivitás százalékát a könnyebb áttekinthetőség kedvéért oszlop-diagrammban egymás mellett ábrázoltuk (8. ábra). A diagrammból látható, hogy függetlenül attól, hogy radioaktív epét vagy BOC- C^{14} -glycin-pentagastrint adtunk jejunálisan, a radioaktivásban a mért periódusokban lényeges különbség nincsen, ennek megfelelően kb. azonos arányú a portális, ill. aortás vér radioaktivitás változása is: a portális vérben a radioaktivitás az 5, 10, 15 és 30 percben vett mintákban emelkedett, a 60 perces mintákban a 30 perces mintákhoz viszonyítva csökkent; az aortás szérum mintákban a radioaktivitás 60 percig folyamatosan emelkedett, azonban alacsonyabb volt, mint a portális szérum mintákban. A 60 perces aortás szérum minták radioaktivitás százaléka csaknem eléri a portális szérum minták radioaktivitás százalékát.

Ezek a vizsgálatok egyértelműen bizonyítják, hogy a BOC- C^{14} -glycin-pentagastrinnal a vékonybélbe került radioaktivitás egy része a bél falon át felszívódva



8. ábra. Szérum radioaktivitás százalék radioaktív epe, ill. jelzett pentagastrin intrajeunalis adása után. V = vena portaeból nyert szérum; A = aortából nyert szérum; e = radioaktív epe adás után; p = radioaktív pentagastrin adás után

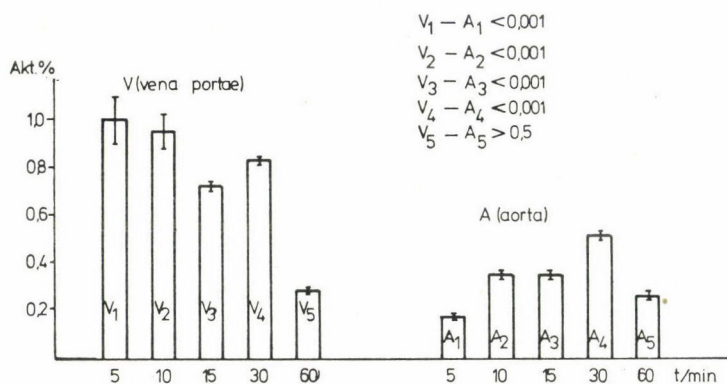
bekerül a portális keringésbe, és a májon áthaladva a systemás keringésbe jut. A kérdés az, hogy mi az a radioaktív anyag, ami a bélben keresztül felszívódik?

A kérdés megválaszolására két kísérletsorozatot végeztünk. Az egyikben 1 ml 50 mcg/ml koncentrációjú, 7 mCi/mmol fajlagos aktivitású BOC-C¹⁴-glycin-pentagastrint adtunk jejunálisan, és 2—2 állatot 15 és 30 perc múlva a portális vénán keresztül elvéreztettünk. 1 ml radioaktív szérumot Sephadex G-25-ös oszlopon kromatografáltuk, és a radiokromatogramot összehasonlítottuk a patkány systemás vénás keringésébe adott BOC-C¹⁴-glycin-pentagastrin adása után az aortából nyert szérum minta radiokromatogrammjával (1. ábra). Azt találtuk, hogy mind a 15 perces, mind a 30 perces portális szérum mintákban csak a BOC-glycinnek megfelelő csúcs kromatografálódott.

A második kísérletben 30 db. 180—220 g súlyú, hím Wistar patkánynak 1 ml 400 mcg/ml koncentrációjú, 168 μ Ci/mmol fajlagos aktivitású BOC-C¹⁴-glycint adtunk jejunálisan. Az állatok egy-egy csoportját (6—6 állat), 5, 10, 15, 30 és 60 perc múlva elvéreztettük az aortán és a portális vénán keresztül egyidejűleg. A szérum minták radioaktivitását liquid scintillációs rendszerben mértük, és a radioaktivitásokat a beadott összradioaktivitás 1 ml szérumra jutó százalékában adtuk meg. A különböző időpontokban nyert szérum minták radioaktivitás százalékát oszlop diagrammban ábrázoltuk (9. ábra). A diagrammból látható, hogy a 8-as ábrától eltérően a radioaktivitás már 5 perc múlva jelentős mennyiségben van jelen a portális vénában. A 10 perces mintákban azonos koncentrációban található, mint az 5 percesekben, a 15 és 30 perces

mintáké valamivel kevesebb, mint az előzőké. A 60 perces minták radioaktivitása már jelentősen csökkent. Az aortás szérumban minden időpontban alacsonyabb a radioaktivitás, mint a portalis vérből nyert mintákban, kivéve a 60 perces szérumokat, amelyek radioaktivitása azonos a portalis mintákéval.

Ezek a kísérletek amellet szólnak, hogy a bél falon át a portalis keringésbe jutó radioaktivitás túlnyomó többsége a BOC-glycin-pentagastrin BOC-glycin fragmensélől származik.



9. ábra. Szérumban radioaktivitás százalék BOC-C¹⁴-glycin intrajejunalis adása után, V = vena portae-ből nyert szérumban A = aortából nyert szérumban

A továbbiakban vizsgáltuk a radioaktivitás megoszlását a különböző szervekben. A BOC-C¹⁴-glycin-pentagastrin és a BOC-C¹⁴-glycin egyszeri vénás adása után meghatároztuk a májban, vesében, tüdőben, pancreasban, jejunumban és izomban levő radioaktivitást a beadást követő 1 perc, ill. 24 óra múlva. A vizsgálat céljára 200—250 g súlyú, hím Wistar patkányok farokvénájába 1 ml/250 g testsúly, 500 mcg/ml koncentrációjú, 500 μ Ci/ml fajlagos aktivitású BOC-C¹⁴-glycin-pentagastrint és 1 ml/250 g testsúly, 400 mcg/ml koncentrációjú, 168 μ Ci/mmol fajlagos aktivitású BOC-C¹⁴-glycint adtunk. 100 mg szövetet 1 ml Protosolban (NEN Boston) oldottunk, és a feloldott szervek aktivitását 10 ml Aquasol (NEN Boston) scintillációs coctailban liquid-scintillációs rendszerben mértük. A radioaktivitást a beadott aktivitás 100 mg szervre jutó százalékában fejeztük ki. Az eredményeket táblázatban foglaltuk össze. 1—1 szervre, ill. időpontra vonatkozó érték 5—5 állat adatainak átlagértékét és az átlag szórását tartalmazza (2. táblázat). Látható, hogy a radioaktivitás megoszlása a vizsgált szervekben jelentősen eltér attól függően, hogy a BOC-glycin-pentagastrint, vagy a BOC-glycint adtuk az állatoknak. Az előbbi esetben a legnagyobb aktivitás a májban található, ezt követi sorrendben a vese, a pancreas, a jejunum és a tüdő. A BOC-glycin esetében a sorrend vese, tüdő, máj, pancreas és jejunum. A kontrollszervként szereplő izomban mindkét

	BOC-C ¹⁴ -pentagastrin		BOC-C ¹⁴ -Gly-OH	
	1 perc	24 óra	1 perc	24 óra
máj	0,497 ± 0,047	0,030 ± 0,005	0,111 ± 0,01	0,016 ± 0,003
vese	0,251 ± 0,015	0,017 ± 0,004	1,516 ± 0,101	0,017 ± 0,003
tüdő	0,079 ± 0,027	0,018 ± 0,004	0,127 ± 0,013	0,014 ± 0,003
pancreas	0,165 ± 0,036	0,019 ± 0,004	0,109 ± 0,021	0,014 ± 0,002
jejunum	0,140 ± 0,047	0,023 ± 0,007	0,063 ± 0,003	0,017 ± 0,002
izom	0,031 ± 0,007	0,014 ± 0,002	0,041 ± 0,009	0,006 ± 0,0005

2. táblázat

Radioaktivitás megoszlása a szervekben BOC-C¹⁴-glycin és BOC-C¹⁴-glycin-pentagastrin vénás adása után egy perccel és 24 órával

esetben csak nyomokban találtunk radioaktivitást. A 24 órás szervmintákban, függetlenül attól, hogy a BOC-C¹⁴-glycin- pentagastrint, vagy BOC-C¹⁴-glycint adtunk, az 1 perces minták radioaktivitásának csak töredékét találtuk. A radioaktivitás megoszlás különbözőségének az oka minden valószínűséggel az, hogy a két anyag metabolizmusának útja egymástól eltérő. Míg a BOC-glycin-pentagastrin esetében a metabolizmus fő szerve a máj, addig a BOC-glycin esetében a vesé. Ez látható a két szerv radioaktivitásában mutatkozó különbségből is. A többi szerv radioaktivitás felvétele úgy alakult, hogy a pancreasban és a jejunumban a radioaktivitás a BOC-glycin-pentagastrin adása után nagyobb volt, mint a BOC-glycin adása után, a tüdőben viszont kevesebb.

Megbeszélés

A BOC-glycin-pentagastrin in vivo metabolizmusát vizsgálva újabb adatokat nyertünk anyagunk sorsáról az élő szervezetben. Vizsgálatainkat két tényező határozta meg. Az egyik az, hogy a peptid N-terminalis részén levő tercier butiloxicarbonil (BOC) védőcsoport a molekulát a szervezet számára idegenné teszi, a másik az, hogy anyagunk izotóp jelölése közvetlenül a védőcsoporthoz kapcsolt aminosavon, a glycinen történt. Minthogy a BOC-glycin

molekula az intermedier anyagcserében nem használható fel, várható, hogy a szervezet annak viszonylag gyors kiürítésére törekszik. Ez kétféleképpen történhet: vagy úgy, hogy a molekula együtt marad és a BOC-glycin rész a teljes pentagastrinnal együtt ürül ki, vagy úgy, hogy a BOC-glycin fragmens lehasad, és ebben a formában eliminálódik. *Vizsgálataink ez utóbbi lehetőséget támasztják alá.* A BOC-glycin fragmens két úton juthat a systemás keringésbe. Az egyik út az, hogy a szövetekben vagy a keringésben lejátszódó enzimtevékenység kapcsán a BOC-glycin fragmens közvetlenül a systemás keringésbe kerül, és onnan a vese választja ki a vizelettel. A másik út az, hogy az epével kiválasztott BOC-glycin-pentagastrinból a vékonybélben jön létre a BOC-glycin fragmens lehasadása, és ez a bélfalon keresztül felszívódva jut a portális- és a systemás keringésbe. Ez utóbbi esetben a BOC-glycin systemás keringésbe jutásának az a feltétele, hogy a portális vénán keresztül a májba került fragmenst a májsejtek ne válasszák ki az epével. Ez a feltétel vizsgálataink szerint jelentős mértékben teljesül.

24 óra alatt a vizelettel a BOC-glycin-pentagastrin adása esetében éppúgy, mint a BOC-glycin adásakor, a BOC-glycinnek mintegy 70%-a ürül ki. Kérdés az, hogy mi történik a maradék 30%-kal. A szervezetben levő radioaktivitás vizsgálata azt mutatta, hogy 24 órával a radioaktív BOC-pentagastrin, ill. BOC-glycin adása után a szervek radioaktivitása minimális volt, ami megerősíti azt a feltételezést, hogy a BOC-glycin fragmens nem vesz részt a szövetek intermedier anyagcseréjében. A széklettel ürülő BOC-glycin mennyiségét mi nem vizsgáltuk, feltételezhető azonban, hogy a bélben lehasadt BOC-glycin egy része ezen az úton távozik a szervezetből. A széklettel ürülő BOC-glycin mennyiségének pontosabb megállapításához valószínűleg hosszabb időre lenne szükség, ugyanis másutt ismertetett vizsgálataink szerint (Tichy és mtsai 1977) a végbél nyálkahártyán keresztül is történik BOC-glycin felszívódás, a jejunumhoz viszonyítva kisebb mértékben.

A radioaktív jelzés nyomon követése több hasznos adattal gazdagította ismereteinket a BOC-glycin-pentagastrin BOC-glycin fragmensével kapcsolatban, azonban nagyon kevés lehetőséget nyújtott arra, hogy a pentagastrin molekulát felépítő többi aminosav sorsáról tájékozódjunk. Erre legfeljebb a szervek radioaktivitás megoszlásából következtethetünk. Ha ugyanis egy szerv a BOC-C¹⁴-glycin-pentagastrin adása után több radioaktivitást vesz fel, mint a BOC-C¹⁴-glycin adása után, akkor ennek két oka lehet: vagy az, hogy az illető szerv a radioaktív peptid, ill. peptid fragmens eliminációjában vesz részt, vagy az, hogy a peptidet felépítő aminosavak egy részét az intermedier anyagcserében hasznosítani tudja. A vizsgált szervek közül a máj, pancreas és jejunum radioaktivitás felvétele volt nagyobb mértékű BOC-C¹⁴-glycin-pentagastrin adása után. A három szerv közül a máj és jejunum biztosan részt vesz a radioaktív peptid, ill. peptid fragmens eliminációjában. Egyedül a pancreas — mint jelentős fehérjeszintézissel bíró szerv — látszik alkalmasnak arra,

hogy a peptidet alkotó aminosavak egy részét az intermedier anyagcserében hasznosítsa.

A BOC-glycin-pentagastrin felépítésében résztvevő többi aminosav (Trp, Met, Asp, Phe-NH₂) sorsát csak ezek izotóppal történő jelölése után tanulmányozhatjuk megfelelő módon. Ilyen jellegű vizsgálatokat a jövőben tervezünk.

A BOC-pentagastrin szintetikus előállított oligopeptid, mely ugyan biológiailag teljesen azonos hatású a szervezet által termelt gastrin C-terminalis aktív csoportjával, de eredeti formájában a szervezetben nem található meg. Az a tény, hogy a gastrin hatás kiváltásához — elsősorban gazdasági megfontolásokból — világszerte a különböző gyárak által előállított BOC-pentagastrint használják, tette indokoltá, hogy nyomon kövessük e szer sorsát a szervezetben. A farmakológiai tisztázáson túlmenően célként lebegett szemünk előtt annak eldöntése is, vajon a védőcsoporttal ellátott gastrin pentapeptid a szervezetben ugyanúgy metabolizálódik-e, mint a természetes hormon végfragmense. Úgy érezzük, sikerült bizonyítanunk, hogy a BOC-pentagastrin metabolizmusának sajátos útja van, s ezért fenntartással kell fogadni minden olyan kísérleti eredményt, mely a szintetikus pentagastrin metabolizmusából a természetes hormonéra von le következtetést.

Összefoglalás

Szerzők a BOC-glycin-pentapeptidamid—(pentagastrin)—metabolizmusának további vizsgálata során a következőket állapították meg.

a) BOC-C¹⁴-glycin-pentagastrin venás adása után patkányban a beadást követő 8 perc múlva a pentagastrinhoz tartozó radioaktivitás már nem mutatható ki. A radioaktivitás a korábban már leírt inaktív metabolitból származik.

b) A vizelettel ürülő radioaktivitás ugyancsak ettől a metabolittól származik. A radioaktív metabolitot izolálva a vizeletből azt találták, hogy az a BOC-glycin-pentagastrin BOC-glycin fragmensével azonos.

c) BOC-C¹⁴-glycin fragmens esetében a máj korábban igazolt szelektív pentagastrin kiválasztó tevékenysége nem érvényesül.

d) Igazolható volt, hogy az epével a vékonybélbe kerülő BOC-C¹⁴ glycin-pentagastrinból származó radioaktivitás egy része a bélfalon áthaladva bekerül a portális, majd a systemás keringésbe. A továbbiakban azt is sikerült igazolni, hogy a bélfalon keresztüljutó radioaktivitás túlnyomó része már a pentagastrin BOC-C¹⁴-glycin fragmenséből származik.

e) Vizsgálataink végső konklúziója az, hogy az irodalomban a gastrin C-terminalis pentapeptidamidjának, amennyiben az N-terminalisan t-BOC-csoporttal acilezett, sajátos metabolikus útja van. Ezért fenntartással kell fogadni minden olyan kísérleti eredményt amely a gyári, szintetikus pentagastrin metabolizmusából a természetes hormonéra von le következtetést.

IRODALOM

- Náfrádi, J., Holzinger, G., Varga, L. és Varró, V.: Interrelation between gastrin and pentagastrin elimination and their secretory effectivity. in „Progress in Peptic Ulcer”, Parád-fürdő (Hungary) Eds: Gy. Mózsik and T. Jávorka Akadémiai Kiadó, Budapest 89, (1976).
- Stagg, B. H., Temperley, J. M. és Wyllie, J. H.: Gut **12**, 825 (1971).
- Tichy, B., Náfrádi, J., Varga, L. és Varró, V.: Acta Physiologica Hung. közlés alatt
- Varga, L.: Acta Physiologica Hung. **47**, 335 (1976).
- Varga, L., Náfrádi, J., Csernay, L., Baláspiri, L., Penke, B. és Varró, V.: Orvostudomány **24**, 13 (1973).
- Várkonyi, T., Varga, L., Náfrádi, J., Kozma, M., Kása, P. és Varró, V.: Kísérlet. Orvostud. **28**, 318 (1976).