

ANGIOTENSIN ELTŰNÉSE A PORTALIS KERINGÉSBŐL ALTATOTT PATKÁNYBAN

SONKODI SÁNDOR, TICHY BÉLA, VARGA LÁSZLÓ, az orvostudományok kandidátusa,
MEZŐ IMRE és TEPLÁN ISTVÁN, a kémiai tudományok kandidátusa

Közlésre érkezett: 1977. VII. 8.

Korábbi munkákból ismert, hogy az angiotensin intraarterialis (renalis és femoralis) és portalis vénás adásának kisebb pressor hatása van, mintha ugyanezt a dózist a systemás keringésbe adjuk [Biron és mtsai (1968), Chamberlain és mtsai (1966), Haas és mtsai (1968), Hodge és mtsai (1967), Regoli és Vane (1966)].

Jelen munkánkban a portalis vénába adott angiotensin csökkent pressor válaszána mechanizmusát vizsgáltuk altatott patkányokban.

Anyag és módszer

- Anyag:* 1. Szintetikus Asp¹-amid-Val⁵-angiotensin II (Hypertensin, CIBA)
2. Jelöletlen Asp¹-amid-Val⁵-angiotensin II és tríciummal jelzett Asp¹-amid-(Tyr-³H)⁴-Val⁵-angiotensin II
3. Szintetikus bradykinin (BRS 640, Sandoz)
4. Acetylcholin (Acecholin, Lemmate et Boinot)
5. Triton X-100 (SERVA)
6. Aquasol (NE 260, NEN)
7. Protosol (NEF-935, NEN)

Az inaktív és aktív angiotensin II szintézise: Mind a radioinaktív, mind a tríciummal jelzett Asp¹-amid-(Tyr-³H)⁴-Val⁵-angiotensin II-t, azonos reakcióschema alapján, a korábban közölt eljárásunktól [Mező és Teplán (1971)] kissé eltérő módon állítottuk elő.

A tríciummal jelzett L-tirozint a 3,5-dibróm-L-tirozin katalitikus tríciumozásával készítettük el, amelyet radioinaktív L-tirozinnal hígítottunk a sok lépéses peptidszintetikus munka számára kedvező fajlagos radioaktivitású (140 mCi/mmol) ³H-L-tirozinná. Ezt metanolban tionilklorid segítségével észterestítettük, és az így kapott ³H-L-tirozin-metilészterhez vegyes-savanhidrid módszerrel kapcsoltuk a Z-Arg(NO₂)-Val-OH-t, mivel Schwarz és Bumpus (1959) által publikált adatokkal szemben ez a módszer jobb termelést és könnyebben tisztítható védett tripeptidésztert biztosít. A védett tripeptidésztert

tetrahydrofuránban nátriumhidroxid oldattal hidrolizáltuk, és a Z-Arg(NO₂)-Val-(Tyr-³H)-OH tripeptidet a reakcióelegyből savanyítással nyertük ki. A benziloxi-karbonil (Z) védőcsoportot jégecetes brómhidrogénsavval távolítottuk el, és a nyers tripeptid hidrobromidot dimetilformamidos közegben trietilamin jelenlétében kapcsoltuk Z-Asn-ONp-vel az irodalomból ismert eljárásához [Walz és mtsai (1969)] hasonlóan. A védett N-terminalis tetrapeptidet (Z-Asn-Arg(NO₂)-Val-(Tyr-³H)-OH) vegyessavanhidrid módszerrel kapcsoltuk az N-terminális tetrapeptid tercier-butilészterhez (H-Val-His-Pro-Pre-Ot-Bu), melyet Schröder (1964) módszerével állítottunk elő. Ugyanis azt tapasztaltuk, hogy a tercier-butilészter mellett, hogy kitűnő védelmet biztosít, eltávolítása is sokkal előnyösebb, mint a korábban általunk használt metilészter védőcsoporté. A tercier-butilészter acidolízise után a védett oktapeptidet szilikagél oszlopkromatográfiával tisztítottuk. Az oktapeptidről a védőcsoportokat katalitikus hidrogénezéssel távolítottuk el. A nyers Asp¹-amid-(Tyr-³H)⁴-Val⁵-angiotensin II-t karboxi-metilcellulóz oszlopon ammónium-acetátos gradiens elucióval kromatografáltuk és az irodalmival megegyező fizikai-kémiai paraméterekkel rendelkező Asp¹-amid-(Tyr-³H)⁴-Val⁵-angiotensin II-höz jutottunk, melynek fajlagos radioaktivitása 120 mCi/mmol. Az így előállított tríciummal jelzett angiotensin számos biológiai vizsgálat céljára, különösen a szervezetben való eloszlás vizsgálatára jól használható, és tapasztalatunk szerint észrevehető radiolitikus bomlás nélkül kb. 2 évig tárolható.

Módszer

Kísérleteinkhez 220—300 g-os, hím Wistar törzsű patkányokat használtunk.

Az arteriás középnyomást 6 mg/100 g pentobarbitallal (Nembutal) altatott állatokban mértük. A jobb arteria carotisba kanült kötöttünk és ezt a Statham nyomásmérőfej és Hellige nyomásmérőrendszeren keresztül Hellige multiscrptorhoz kötöttük. Az anyagok beadásához a portalis véna egyik oldalágát és a penis vénát kanüláltuk meg.

Angiotensinase aktivitás meghatározásához a vért az aorta és a portalis véna egyidőben történt punkciójával vettük le éterrel altatott patkányokból. A plasma mintákat 10 és 30 percgig inkubáltuk standard angiotensin II-vel [Dauda (1968)], és azok presszor aktivitását laboratóriumunkból közölt módszer szerint biológiai titrálással határoztuk meg [Sonkodi és mtsai (1970)]. Az angiotensinase aktivitását az angiotensin presszor aktivitás csökkenése százalékában fejeztük ki.

A portalisan adott jelzett angiotensin epével történő kiválasztásának meghatározásához az epevezetékbe polietilén kanült vezetttünk. 30 perces periódusokban az epét két óráig gyűjtöttük és az egyes frakciók radioaktivitását

meghatároztuk. Ugyanezekben az állatokban kanült kötöttünk a hólyagba a jelzett anyag vizelettel történő kiválasztásának meghatározásához és az urethrát lekötöttük. A vizeletet 120 percig egy frakcióban gyűjtöttük. A kielégítő hidráltóság biztosítása érdekében az állatoknak a gyomrába 2 ml/100 g 5%-os dextroset adtunk a jelzett angiotensin II injekció adását megelőzően.

Az intraportalisan és systemás vénásan adott jelzett angiotensin aortába való megjelenését úgy vizsgáltuk, hogy a jelzett anyag beadása után a Record 1-es túvel megpungált aortából 5 mp-es frakciókat gyűjtöttünk 30 mp-ig. A vérmintákat 10 percig 2000 rpm-el centrifugáltuk, és az így nyert serumminták radioaktivitását meghatároztuk.

Az epe-, illetve serumminták radioaktivitásának meghatározásához azokból 0,1 ml-t vettünk, ezekhez 10 ml scintillációs koktélt adtunk. A koktél összetétele: egy rész Triton-X-100, két rész toluolban oldott PPO (2,5-Difenil-oxazol; 4g (1) és POPOP (1,4-Di-[2-(5-fenil)-oxazoil]-benzol); 0,05 g (1) volt. 24 órás inkubálás után Packard liquid-scintillációs műszerrel mértük a radioaktivitást.

Az intraportalisan és systemás vénába adott jelzett angiotensin II májfelvételének vizsgálatához 15 és 30 mp-el a beadás után éter altatásban kivettük az állatok máját, és a májszövet radioaktivitását mértük. 100 mg májszövetet 1 ml Protosolban 24 óráig szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd ehhez 10 ml Aquasol adtunk, és további 24 óráig inkubáltuk. A radioaktivitást ezúttal is Packard liquidscintillációs műszerrel mértük.

Az eredmények statisztikai értékelése a Student-féle „t” próbával történt. A számszerű adatokat az átlagok \pm standard hibájában (SE) fejeztük ki.

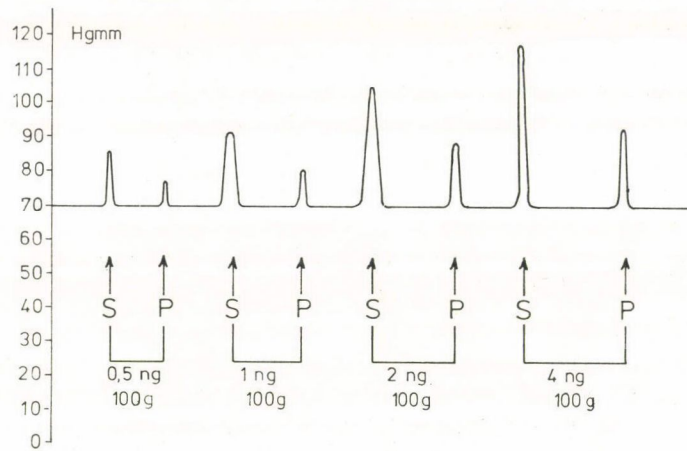
Eredmények:

Vérnyomásválasz:

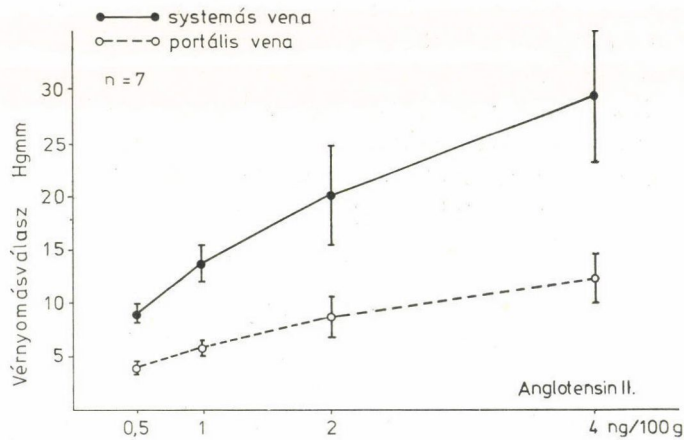
Az MTA Izotópiintézetében szintetizált, általunk használt angiotensin-II-t presszorválasz szempontjából a Hypertensinnel (CIBA) hasonlítottuk össze. Biológiai titrálással végzett vizsgálatainkkal azt találtuk, hogy az újonnan szintetizált jelölt és jelöletlen angiotensin II presszorválasza $97,2 \pm 6,6\%$ -a volt a hypertensinnek. A vena portaeba adott 0,5, 1,2 és 4 ng/100 g angiotensin II injekciók lényegesen kisebb presszorválaszt adnak, mint ugyanezen dózisok systemás vénába történt adása.

Az 1. ábra egy patkány presszorválaszait mutatja be a systemásan és portalisan különböző dózisokban adott angiotensin II injekciókra. A portalisan adott angiotensin II dózisokra kapott presszorválasz kb. fele volt a systemásan adottnak.

A 2. ábra hét, az előbbivel azonos módon vizsgált állat presszorválaszainak átlagát és szórását ábrázolja.



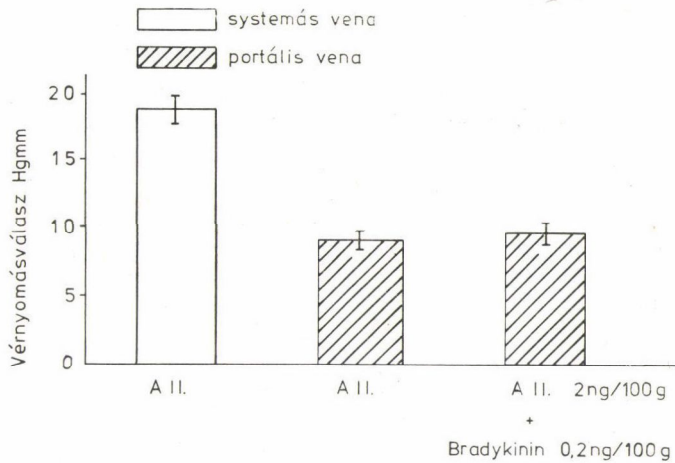
1. ábra. Különböző dózisu angiotensin II systemás és portális vénás adása után mért vérnyomásválaszok egy patkányban



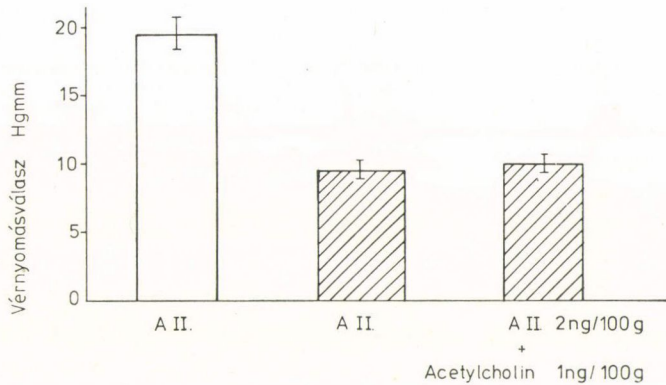
2. ábra. Különböző dózisu angiotensin II systemás és portális vénás adása utáni vérnyomásválaszok átlaga hét patkányban

Vasodilatátorok hatása a vérnyomásválaszra

A bradykinin hatását 11 állatban vizsgáltuk (3. ábra). 2 ng/100 g angiotensin II systemás vénásan adva $16,3 \pm 1,1$ Hgmm-es, míg portális vénás adás $8,6 \pm 0,9$ Hgmm-es átlag vérnyomásválaszt okozott. Ha az angiotensin II-t 0,2 ng/100 g dózisu bradykininnel együtt adtuk a portális vénába, ugyanolyan presszorválaszt kaptunk ($8,7 \pm 1,1$ Hgmm), mint amikor azonos dózisu angiotensin II-t bradykinin nélkül adtuk.



3. ábra. Angiotensin II systemás és portális vénás, valamint angiotensin II és bradykinin portális vénás adása után mért vérnyomásválaszok átlaga

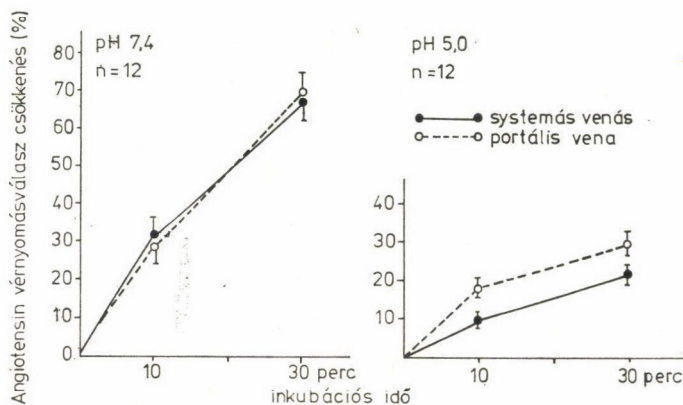


4. ábra. Angiotensin II systemás és portális vénás, valamint angiotensin II és acetylcholin portális vénás adása után mért vérnyomásválaszok átlaga

10 állatban vizsgáltuk az acetylcholin hatását (4. ábra). A 2 ng/100 g angiotensin systemás adására ezúttal $19,3 \pm 1,7$ Hgmm-es, portális vénás injekcióra $8,8 \pm 0,8$ Hgmm-es presszorválaszt kaptunk. Ha a portális vénásan adott angiotensin II-höz 1 ng/100 g acetylcholint adtunk, a presszorválasz lényegében nem változott ($9,0 \pm 0,9$ Hgmm). Sem a bradykinin, sem az acetylcholin említett dózisaik önmagukban említésre méltó vérnyomásválaszt nem okoztak. Ugyancsak nem befolyásolták az angiotensin II-vel együtt systemás vénásan adva a presszorválaszt. Az említett vasodilatátorok dózisának növelése már depresszorválaszt okozott rendszerint, és az angiotensin II-vel együtt adva a presszorválaszt csökkentette.

Angiotensinase aktivitás

Amint az az 5. ábrából kitűnik, a 12 patkány systemás és portalis keringéséből nyert vérmintáiban neutrális pH-nál nem találtunk szignifikáns különbséget sem a 10 perces (az aortában $33,3 \pm 4,1$, a vena portaeban $30,0 \pm 4,0\%$), sem a 30 perces inkubálással kapott (az aortában $67,7 \pm 3,7$ a vena portaeban $71,4 \pm 3,1\%$) angiotensinase aktivitás értékekben.



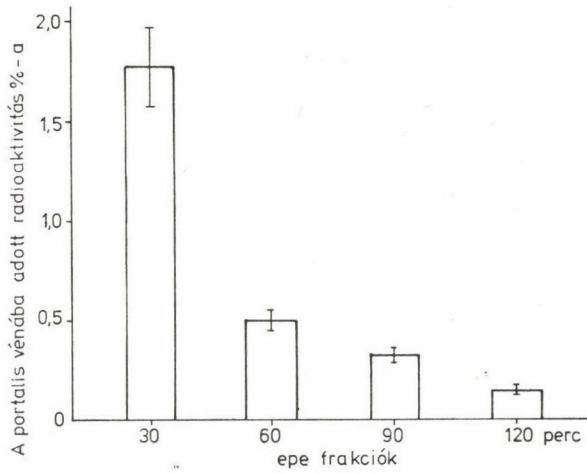
5. ábra. A portalis és systemás vér angiotensinase aktivitása százalékban kifejezve pH 5,1-es és pH 7,4-es közegben

Savanyú pH-nál (pH 5,1) már szignifikáns különbséget találtunk a két keringési terület között; míg az aortából nyert vérmintákhoz adott angiotensin II-ből 10 perces inkubálás után $9,1 \pm 1,2\%$ bomlott el, addig a portalis vénából vettből $16,7 \pm 1,6\%$ ($p < 0,001$). Ugyanezek az értékek 30 perces inkubálás után $22,9 \pm 1,9$, illetve $31,2 \pm 2,6\%$ voltak ($p < 0,02$).

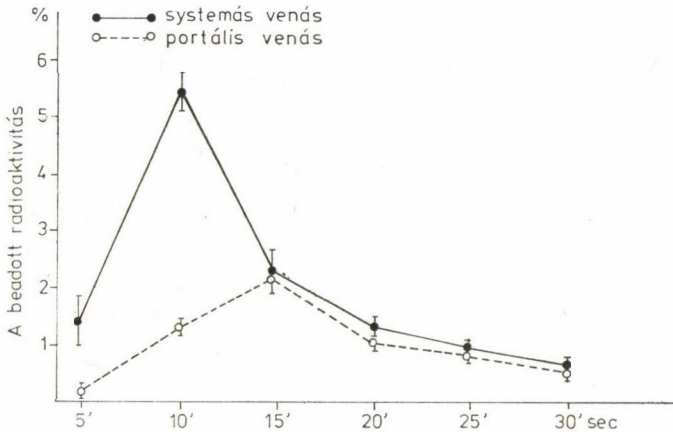
Az ábrákból azonban az is kitűnik, hogy az enzimkapacitás savanyú pH-n lényegesen kisebb volt, mint neutrálison.

Jelzett angiotensin II epével és vizelettel történő kiválasztása

Hat állatnak $10 \text{ ng}/100 \text{ g}$ ^3H -angiotensin II-t adtunk be a portalis keringésbe. Amint az a 6. ábrán látszik, az első 30 percen a beadott radioaktivitás mindössze $1,7 \pm 0,3\%$ -a ($226,6 \pm 35,9 \text{ dpm}$) ürült az epével, a további frakciókban pedig az ürülés szinte elhanyagolható. A kétórás gyűjtött vizeletben a beadott radioaktivitás $3,1 \pm 1,0\%$ -a ($563,1 \pm 196,8 \text{ dpm}$) volt kimutatható.



6. ábra. Jelzett angiotensin II portális adása után nyert 30 perces epeminták radioaktivitás százaléka



7. ábra. Jelzett angiotensin II systemás és portális vénás adása után aortából nyert szérumszámíték radioaktivitás százaléka

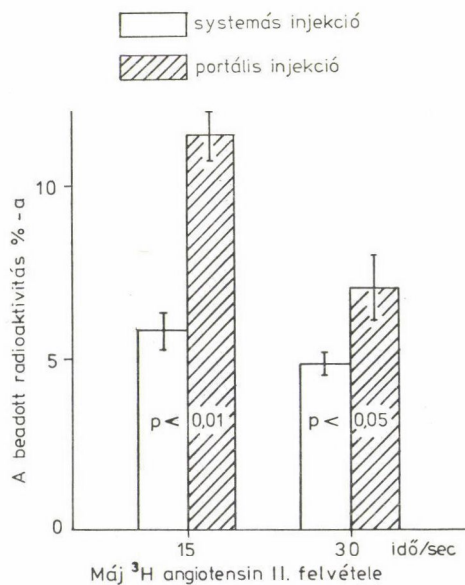
Jelzett angiotensin aortában való megjelenése

Attól függően, hogy a 10 ng/100 g ³H-angiotensin systemás (6 állat) vagy portális vénába (6 állat) adtuk, az aortából már az első 5 percben gyűjtött vérfrakciók radioaktivitásában jelentős különbséget észleltünk (7. ábra). Míg a systemás vénába adott radioaktivitás $1,5 \pm 0,4\%$ -át mértük az aortában, addig portális vénába adottnak $0,2 \pm 0,1\%$ -t ($p < 0,001$). A második és 10 mp közötti frakcióban a különbség tovább nőtt. A systemás vénába adott radioak-

tivitásnak ugyanis $5,5 \pm 0,3\%$ -át (ami ebben a csoportban a maximum volt), a portális vénába adottnak azonban csak az $1,3 \pm 0,1\%$ -t találtuk az aortában ($p < 0,001$). A harmadik 10 és 15 mp közötti frakcióban a systemás vénába adott radioaktivitás aortás vérben mért része jelentősen csökkent; $2,3 \pm 0,3\%$ volt. A portális vénába adott jelzett anyag aortában megjelent része ugyanakkor $2,1 \pm 0,1\%$ -ra emelkedett, és ezzel lényegében elérte a systemásan kezelt csoport ebben az időben mért értékét. A kétféleképpen kezelt csoportok aortában megjelent radioaktivitás átlaga a továbbiakban fokozatosan csökkent, de a két csoport között különbség nem volt kimutatható.

Jelzett angiotensin májfelvétele

Ezúttal is $10 \text{ ng}/100 \text{ }^3\text{H}$ -angiotensint adtunk a systemás vénába és a vena portaeba 10–10 altatott patkánynak. Mindkét csoportból az állatok felének (5–5 állat) 15 mp, a másik felének (szintén 5–5 állat) 30 mp múlva kivettük a máját és meghatároztuk azok radioaktivitását. A 15 mp-es kísérletnél a nedves májszövet 1 g-ja $11,6\%$ -át tartalmazta a beadott radioaktivitásnak akkor, ha azt a vena portaeba, és mindössze $5,7\%$ -át, ha a systemás vénába adtuk (8. ábra). A két csoport között a különbség jelentős ($p < 0,01$). A 30 mp múlva kivett májknál a portálisan kezelt csoportban jelentős aktivitáscsökkenés volt kimutatható, és a beadott aktivitásnak ezúttal $7,4\%$ -át mértük.



8. ábra. 15 és 30 másodperccel a jelzett angiotensin II systemás- és portális vénás adása után nyert májszövet radioaktivitás százaléka

A systemásan kezelt csoportban a csökkenés mértéke lényegesen kisebb volt, a megfelelő értékeket itt 4,9%-nak találtuk. A két csoport között a különbség már lényegesen csökkent, de még mindig szignifikáns volt ($p < 0,05$).

Megbeszélés

Jelen vizsgálatainkban magunk is kimutattuk patkányban azt a korábbi észlelést [Chamberlain és mtsai (1964), Hodge és mtsai (1967), Lary és Ledigham (1969)], miszerint az angiotensin II vena portaeba történő injiciálásával kisebb presszorválaszt kaptunk, mintha az anyagot a systemás vénás keringésbe adjuk. Haas és mtsai (1968, 1969, 1973) az angiotensin kutya végtagarteriájába való adásának csökkent presszorválasztát vizsgálták, és azt találták, hogy annak vasodilatátorokkal (bradykinin, acetylcholin, papaverin) való együttes adása a presszorválaszt növeli [Haas és mtsai (1969)]. Eredményeiket úgy magyarázták, hogy az angiotensin a végtagarteriálákban lokális vasokonstriktiót okoz, és ez megakadályozza annak systemás keringésbe jutását, és ez a vasokonstriktió védhető ki — az említett szerzők szerint — vasodilatátorokkal. Ehhez hasonlóan mi is vizsgáltuk a vasodilatátorok hatását Haas és mtsai által használttal nagyjából azonos dózisban, de védőhatást nem észleltünk. Kísérleteink során mi is azt a dózist kerestük, amelyik önmagában depresszorválaszt nem okoz, de az angiotensinnel együtt adva esetleg a presszorválaszt növeli. Mind a bradykinin, mind az acetylcholin dózisának növelése már depresszorválaszt okozott, és az angiotensinnel együtt adva a presszorválaszt inkább csökkentette. Ezek alapján azt kell feltételeznünk, hogy az angiotensin nem okoz a portalis rendszerben vasokonstriktiót, vagy ha igen, az vasodilatátorokkal nem védhető.

Haas és mtsai (1968, 1969, 1973) és a saját vizsgálatainkat egybevetve, nem látszik kétségesnek, hogy az angiotensin kisebb vérnyomásválasza, ill. nagyobb eltűnése a portalis keringésben más módon jön létre, mint a végtagarteriában.

Haas és mtsai említett munkája alapján a következő további lehetőségek merültek fel magyarázatként:

1. az arteriolák vasokonstriktiója, ez azonban az angiotensin portalis keringésbe való feckendezése esetén nem jön szóba,
2. gyors intravasalis enzimatis inaktiválás,
3. az angiotensin egy részének eltűnése a perivascularis térben permeabilitás-fokozódás útján, és végül
4. az angiotensin retenciója vagy inaktiválása.

ad 2. Vizsgáltuk az angiotensinase aktivitását neutrális és savanyú pH mellett. Neutrális pH-nál semmi különbséget nem észleltünk a két érterület aktivitása között. Savanyú pH-nál a vena portaeba nagyobb angiotensinase

aktivitást találtunk. Az enzimkapacitás, ill. enzimtikus bontás a vérben még neutrális pH-nál is túl kicsi ahhoz, hogy az említett jelenség okaként akárcsak részben is szóba jöjjön, savanyú pH-nál ez még lényegesen kisebb. Az egyébként már korábbi munkákból [Bakhle és mtsai (1969), Hodge és mtsai (1967)] is ismert, hogy szintetikus angiotensin inaktiválása a vérben relative lassú.

ad 3. Ki kellett zárunk azt a lehetőséget is, hogy az epével vagy vizelettel ürüljön nagyobb mennyiségű angiotensin. Az eredményeinkből úgy tűnik, hogy angiotensinvesztés mind a két helyen az időt figyelembe véve elhanyagolható.

ad 4. Ezek után a májban való retenció vagy inaktiválás kérdését kellett vizsgálnunk. Mindenekelőtt arra kívántunk választ kapni, hogy ha jelzett angiotensint adtunk a portalis, illetve systemás érterületre, abból mennyi jut az aortába. Mint eredményeinkből látszik, rövid időközökben vett aortás vérfrakciókban a radioaktivitás a vérnyomásválással arányosan alacsonyabb volt, ha az angiotensint a vena portaeba fecskendeztük. Ebből úgy tűnik, hogy a radioaktivitás, amelyet röviddel a beadás után az aortában mértünk, legalábbis túlnyomó részt presszor aktív, jelzett angiotensin.

Azt, hogy a máj valóban visszatartja az angiotensint, bizonyítja, hogy a jelzett származék beadása után 15 mp-cel a máj radioaktivitása lényegesen nagyobb volt akkor, ha az injekciót a vena portaeba adtuk. Ha az injekció után 30 mp-cel történt a vizsgálat, a portalis vénásan kezelt csoport májának radioaktivitása jelentősen csökkent, de még mindig szignifikánsan nagyobb volt, mint a systemás vénásan kezelt csoporté.

Ezen vizsgálatok alapján az is valószínűnek látszik, hogy a májból lassan ürül ki a radioaktív anyag, amely már valószínűen nem presszor aktív. Ez az észlelés egyébként a 3. kérdésseltevésünket is érinti, amennyiben a radioaktivitás csökkenés arra utal, hogy az anyag nem a perivascularis térben tűnik el. További vizsgálatok szükségesek annak kiderítésére, hogy az angiotensin májretenciója milyen mechanizmus útján jön létre.

Összefoglalás

A patkány vena portaeba fecskendezett angiotensin II presszoraktivitása kisebb volt, mint a systemás vénás keringésbe adotté. A presszorválasz-csökkenést a portalis keringésbe egyidejűleg bevitt vasodilatátorok (bradykinin, acetylcholin) nem befolyásolták. Jelzett angiotensin intraportalis adása után a máj a radioaktivitás jelentős részét visszatartotta, és csak töredékét választotta ki az epével. A portalis vérben mért angiotensinase aktivitás lényegében nem különbözött a systemás keringésben mért aktivitástól. A presszorválasz-csökkenés oka az volt, hogy a portalisán adott angiotensin II egy része nem jutott be a systemás keringésbe. További vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy a májban átmenetileg visszamaradt angiotensin II-vel mi történik.

IRODALOM

- Bakhle, A. S., Reynard, A. M. és Vane, J. R.: *Nature*, **222**, 956 (1969).
Biron, P., Meyer, P. és Panisset, J.: *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, **46**, 1975 (1968).
Chamberlain, M. J., Browse, N. L., Gipson, D. G. és Gleason, J. A.: *Brit. Med. J.*, **2**, 1507 (1964).
Dauda, G.: *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **34**, 37 (1968).
Haas, E., Goldblatt, H., Lewis, L. és Gipson, E. C.: *Am. J. Physiol.* **215**, 1420 (1968).
Haas, E., Goldblatt, H., Lewis, L. és Gipson, E. C.: *Am. J. Physiol.*, **217**, 981 (1969).
Haas, E., Goldblatt, H., Lewis, L. és Gipson, E. C.: *Labor. Invest.*, **28**, 1 (1973).
Hodge, R. L., Ng, K. K. F. és Vane, J. R.: *Nature*, **215**, 138 (1967).
Khairallah, P. A., Page, L. J., Bumpus, F. M. és Smeby, R. R.: *Science*, **139**, 523 (1962).
Leary, W. P. és Ledingham, J. G.: *Nature*, **222**, 959 (1969).
Mező, I. és Teplán I.: *Radioisotopy (Prague)*, **12**, 551 (1971).
Regoli, D. és Vane, J. R.: *J. Physiol. (Lond.)* **183**, 513 (1966).
Schröder, E.: *Liebigs Ann. Chem.* **680**, 132 (1964).
Schwarz, H. és Bumpus, F. M.: *Amer. Chem. Soc.*, **81**, 890 (1959).
Sunkodi, S., Joó, F. és Maurer, M.: *Brit. J. Exp. Path.* **51**, 448 (1970).
Walz, H., Bilk, L. és Reichwald, W.: *DDR. Pat.* 55334 (1969).