

A GASTRIN BIOLÓGIAILAG AKTÍV VÉGCSOPORTJÁNAK A GLYCIN-PENTAGASTRINNAK METABOLIZMUSÁRÓL

VARGA LÁSZLÓ, az orvostudományok kandidátusa, NÁFRÁDI JÓZSEF, CSERNAY LÁSZLÓ, az orvostudományok kandidátusa, BALÁSPIRI LAJOS, PENKE BOTOND és VARRÓ VINCE, az orvostudományok doktora

Közlésre érkezett: 1972. X. 27.

Bevezető

A gastrin izolálása és szintetikus úton történő előállítása új korszakot nyitott a gyomorsavsecretio e hormonalis stimulátorának kutatásában (Gregory és Tracy 1964, Gregory és mtsai 1964, Anderson és mtsai 1964). Megállapítást nyert, hogy az emberi antrum-mucosában két, közel azonos heptadecapeptid, a gastrin I és II található. A különbség a kettő között csupán annyi, hogy a gastrin II tyrosin komponensén egy sulphat-ester található; biológiai hatásuk azonban teljesen azonos. A többi emlősből izolálható gastrinok csupán 1–1 aminosav alkotórészben térnek el egymástól, biológiai hatásuk azonban szintén mindenben megegyező.

A peptidlánc két végén helyet foglaló csoportok közül az N-terminális aminosav, a pyroglutaminsav védi a molekulát az aminopeptidasék hatásától. Biológiai szempontból a legnagyobb jelentősége a C-terminalis tetra-, ill. pentapeptidnek van. Az itt helyet foglaló amidesoport védi a hormont a carboxypeptidasék hatásától, egyúttal azonban fontos élettani szerepe is van, hiszen a desamidálással nyerhető tetrapeptid-szabadsav biológiai szempontból teljesen inaktív.

Kísérletes és klinikai vizsgálatok szempontjából döntő felismerésnek tartható, hogy a C-terminalis tetrapeptid (Try-Met-Asp-Phe-NH₂) az eredeti heptadecapeptid élettani és gyógyszer-tani hatásáért — elsősorban a savsecretio területén — teljes mértékben felelős, s így mind a secretiós kísérletekben, mind a diagnosztikus vizsgálatokban helyettesíteni képes az eredeti polypeptidet. Ennek a felismerésnek eredményeként szintetizálták a pentagastrint, melyet először az Imperial Chemical Industry (Anglia) hozott kereskedelmi forgalomba. E szintetikus pentapeptid N-terminalis részén t-butyloxy-carbonyl (BOC) védőcsoportot tartalmaz, mely a molekula biológiai hatását érintetlenül hagyja.

A tetra- és pentapeptiddel nagyszámú vizsgálatot végeztek. Ezek a vizsgálatok elsősorban a gastrin savsecretiót előidéző hatásának közelebbi természetét kívánták tisztázni. A struktúra és funkció közötti kapcsolat analízise

során megállapították (Morley 1968), hogy a molekula funkcionális centruma az asparaginsav betacarboxyl csoportja. E csoport kicserélése más szubsztituenssel a biológiai hatás teljes elvesztését vonta maga után. Említettük, hogy a phenylalanin amidjának (Phe—NH₂) hasonló jelentősége van, míg a tryptophan, methionin és phenylalanin maradékoknál struktúridegen gyökökkel történő helyettesítés is véghezvihető anélkül, hogy ez a biológiai hatást lényegesen befolyásolná. Az N-terminális tridecapeptid (1—13) biológiai szerepe mindeddig ismeretlen; feltételezik, hogy in vivo védő- vagy/és transport funkciója van.

Alább ismertetendő kísérleteinkben a gastrin C-terminalis aktiv végcsoportjával kapcsolatban a következő kérdések vizsgálatát tűztük ki célul:

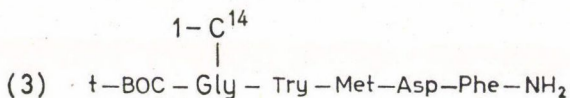
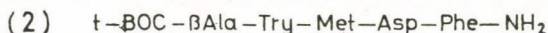
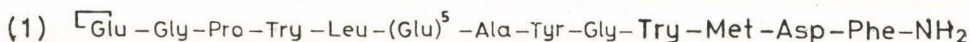
Szintetizálni kívántunk olyan, az eredeti molekula aminosav sequentiáit mindenben követő pentagastrint, melynek egyik aminosav alkotórésze C¹⁴ izotópot tartalmaz.

Adatokat kívántunk nyerni a bélcsatorna és a máj pentagastrint inaktiváló képességéről.

A máj pentagastrint kiválasztó és inaktiváló működését részletesebben kívántuk vizsgálni.

Módszerek

Kísérleteinkhez a gastrin C-terminalis pentapeptidjével mindenben megegyező szintetikus pentapeptid glycin carboxylesoportját C¹⁴ izotóppal jeleztük. Az N-terminalis részt az aminopeptidase hatásának kivédésére mi is butyloxycarbonyl (BOC) csoporttal védtük. Az általunk szintetizált penta-

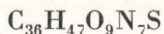


1. ábra. A szintetikus gastrin (1), a kereskedelmi pentagastrin (Peptavlon-Gastrodiagnost) (2) és az általunk szintetizált pentagastrin képlete (3)

gastrin a kereskedelemben kapható pentapeptidtől abban tér el, hogy az eredeti gastrinhoz hasonlóan glycint (és nem beta-alanint) tartalmaz ötödik aminosavként. Az irodalomban korábban J¹³¹ és J¹²⁵ izotóppal jelzett készítménnyel végzett vizsgálatok ismeretesek (Accary és mtsai 1970), mi az eredeti molekulán belül történő C¹⁴ izotópos jelölést választottuk (1. ábra). Ebben az esetben ugyanis in vivo vizsgálatok során nem fenyeget a jelölő izotóp esetleges lehasadásának a veszélye.

A szintetizált radioaktív pentapeptid a megkívtt azonosítási módszerekkel (vékonyréteg-kromatográfia, radiokromatográfia, infravörös spektroszkópia és elemi analízis) teljesen egységesnek bizonyult.

Az elemi analízis adatai:



E képlettel számolva: C: 57,3%, H: 6,3%, N: 13,0%. A talált értékek rendre 57,4%, 6,25%, ill. 12,95%, ez az anyag tökéletes kémiai tisztaságát jelzi. Az optikai forgatóképesség értéke $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = 29^\circ \pm 2^\circ$ (C = 1DMF). A fajlagos radioaktivitás 165,8 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$.

Állatkísérleteinket 250–380 g súlyú hím Wistar patkányokon végeztük. A savsecretio mérésére Ghosh és Schild (1958), illetve Lai (1964) által leírt gyomor perfusiós módszert használtuk Pissidis és Clark (1967) módosítása szerint. A módszer technikáját és teljesítő képességét korábbi munkánkban részletesen leírtuk (Varró és mtsai 1971). Jelen kísérleteinkben úgy jártunk el, hogy miután a bazális savsecretio állandó szintre állt be, az állatok penis venájába 0,20–0,25 $\mu\text{g}/100$ g testsúly pentagastrint (Peptavlon ICI) fecskendeztünk, hogy a patkányok savsecretiós képességét ellenőrizhessük. Egy-mást követően két ismert mennyiségű pentagastrin adagra (0,2 $\mu\text{g}/100$ g testsúly) létrejött savsecretiós válaszhoz hasonlítottuk a kísérletekben adott ismeretlen mennyiségű pentagastrin hatását. A savsecretiós vizsgálatokat semiquantitatív módon értékeltük, a bazális secretiós szint minimálisan 50–100% közötti növekedését tekintettük pozitív válaszként. Azokban az állatokban, amelyekben a májat ki akartuk iktatni a portalis keringésből, két műtétet végeztünk. Az első műtét alkalmával beszűkítettük a vena portae-t. Ezután négy-tizenkét hetet vártunk, hogy a porto-cavalis anastomosisok kialakulhassanak, majd a második műtét során lekötöttük a vena portae-t, s közvetlenül ezután végeztük vizsgálatainkat.

A jelzett pentagastrin intravénás adása után az epébe ürülő radioaktivitást is mértük. E célból a ductus choledochusba polietilén kanült kötöttünk be. Különös gondot fordítottunk arra, hogy tiszta, pancreasnedvtől mentes epét nyerjünk, és hogy a kanül vége az epeutak elágazása előtt helyezkedjék el.

A C^{14} -glycin-pentagastrin májban történő lebomlásának vizsgálatához a következő pentapeptideket szintetizáltuk:

1. BOC-Gly-Trp-Met-Ala-Phe-NH₂
2. BOC-Gly-Trp-Met-(0)-Asp-Phe-NH₂

A pentapeptidek tisztaságát elemi analízissel, infravörös és ultraibolya spektroszkópiával, valamint vékonyréteg-kromatográfiával ellenőriztük. A pentagastrin májban történő lebomlását radiokromatográfiás módszerrel

vizsgáltuk. A vékonyréteg-kromatográfiához „Kieselgel-HF” adsorbenst használtunk (250 μ rétegvastagság).

A következő solventek váltak be:

1. n-buthanol—víz—jégecet 4 : 1 : 1 (V/V)
2. sec-buthanol—3% NH_4OH 3 : 1 (V/V)
3. chloroform—methanol—jégecet 70 : 30 : 20 (V/V)

A vizsgált epéből 20–20 μl -t vittünk fel a startpontra, standard peptidekből 10 μg -t dimethylformamidban oldva. A radioaktív foltok helyének meghatározását a kromatográfia befejezése után Packard gyártmányú (Typ 7201) kromatogram-scanner-rel végeztük. A nem radioaktív termékek kimutatása egyrészt UV-fényabsorptiójuk alapján, másrészt chlor-tolidin reagens segítségével történt. A vizsgálat menete a következő: a megszáritott vékonyréteg-lapokat két percig chlorgáz hatásának tesszük ki, majd öt perc szellőzés után 0,5% tolidint és 0,2% káliumjodidot tartalmazó híg ecetsav oldattal (5%) lepermetezzük. Az amidkötést, vagy szabad aminosoportot tartalmazó vegyületek kékre színeződnek.

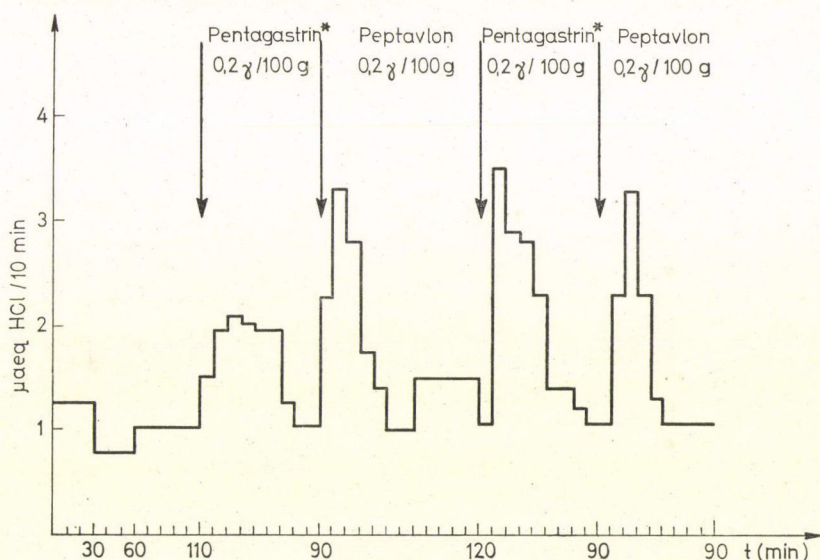
Az aminosavanalízis céljára szükséges ~ 1 mg anyagot preparatív vékonyréteg-kromatográfiával a következőképpen nyertük: 0,5 ml radioaktivitást tartalmazó patkányepét vittünk fel 1 mm vastag vékonyrétegre hosszú csík alakjában. Kromatográfia után (CHCl_3 —methanol—ecetsav 70 : 30 : 2) a radioaktív foltok helyét megállapítottuk. Az aktív foltokat tartalmazó silicagélt az üveglapról lekapartuk, majd az anyagokat az adsorbensről háromszori dimethylformamidos extrahálással leoldottuk. Az oldatot vákuumban bepároltuk, a kapott maradékot kristályosítással tisztítottuk. Az ily módon nyert anyagot használtuk a későbbiek során biológiai vizsgálatra és aminosav analízisre. Az aminosav analízis HD-1200 E típusú, cseh gyártmányú aminosav analízátorban történt. Az analizálásra kerülő anyagokat hidrolizáltuk. A hidrolízis menete: a vékonyréteg-kromatográfia során nyert kristályos anyagokból 0,5–1,0 mg-t 1 ml 6 N sósavval lezárt üvegcsőben hidrolizáltuk 24 órán át 110 °C-n. A kapott mintákat bepároltuk, majd a maradékot 0,5 ml pH 2,2 citrátpufferben feloldottuk, és az egész mennyiséget felvittük az analízátor ioncserélő oszlopára.

A jelzett pentapeptidamid desamidálása céljából patkánymáj microsomafrakciót izoláltunk a következőképpen: 2 g patkánymájat homogenizáltunk 4 ml 0,2 M Tris pufferben (pH 7,3), a homogenizátumot 20 percig 10 000-es fordulatszámmal centrifugáltuk, a supernatant 2 órán át 60 000 g-vel forgattuk ultracentrifugában (Typ: VAC-60 NDK). Mind az üledékkel, mind a második supernatanssal 500 gamma jelzett pentapeptidet inkubáltunk két órán át 37 °C-n. Az inkubálást a fentiekkel azonos körülmények között úgy is elvégeztük, hogy a patkánymájból nyert microsoma és supernatans frakciót

előzőleg két órán át forró vízben 100 °C-n tartottuk. Az inkubátumokból 40 μ l-t kromatografáltunk a korábban részletezett módon, és a kromatográfia befejezése után a lemezeket chromatogram-scanner-rel értékeltük.

Eredmények

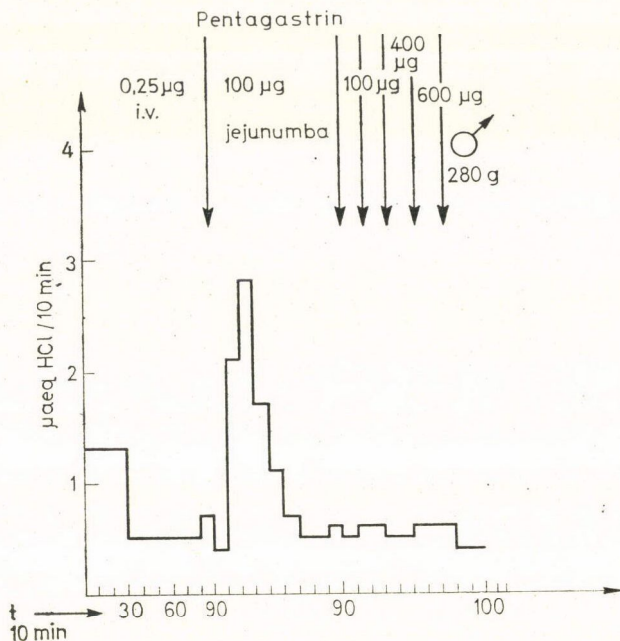
Az általunk szintetizált C^{14} izotóppal jelölt pentagastrin 8 patkányon ellenőrizve a vegyi azonosságon túlmenően a perfundált patkánygyomor savsecretióját illetően — az alkalmazott dózis esetében — azonos hatású volt, mint a referens anyagként használt kereskedelmi pentagastrin (Peptavlon ICI) (2. ábra).



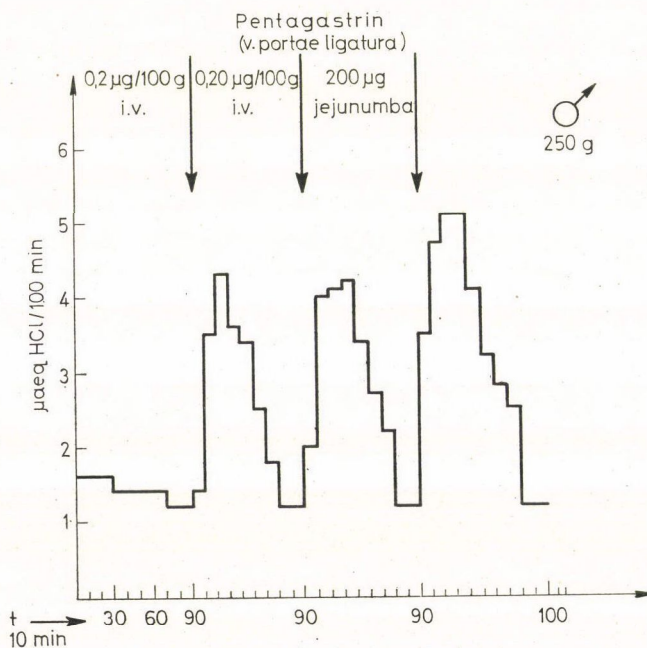
2. ábra. A Peptavlon (ICI) és az általunk szintetizált és C^{14} -gyel jelzett pentagastrin biológiai hatásának összehasonlítása Ghosh-Lai patkányon

Ha nem jelölt, hideg pentagastrint kb. 40–240 μ g/100 g testsúlyú dózisban patkány jejunumába szondán át bevittük (62 kísérlet, 26 állatban), egyetlen esetben sem tudtunk savsecretionövekedést kimutatni (3. ábra).

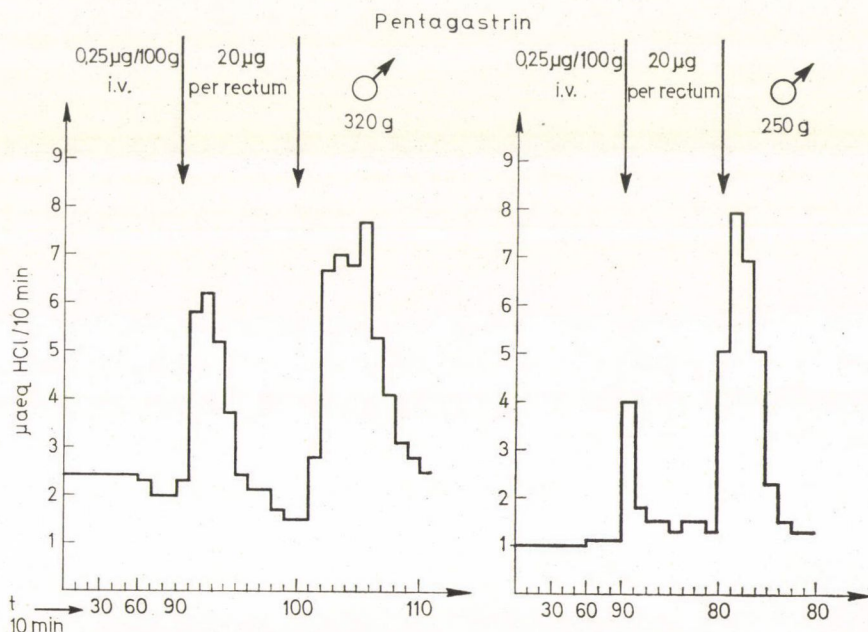
Annak érdekében, hogy a jejunalis mucosa pentagastrint absorbeáló képességét vizsgálni tudjuk, anélkül, hogy a máj hatásával számolnunk kellene, a korábbiakban említett módon 16 állatban lekötöttük a vena portae-t. Ezáltal a májat kiiktattuk a portalis felszívódás útjából. Ebben az esetben a jejunumba bejuttatott pentagastrin 200 μ g dosisban rendszeresen értékelhető sósavprodukción eredményezett. Kivételesen pozitív választ kaptunk 50 μ g adása után is (4. ábra).



3. ábra. Intraejunalisan növekvő adagban bejuttatott pentagastrin nem idéz elő savsecretiot



4. ábra. Vena portae lektés után a jejunumba juttatott 200 µg pentagastrin jól regisztrálható savi választ hoz létre



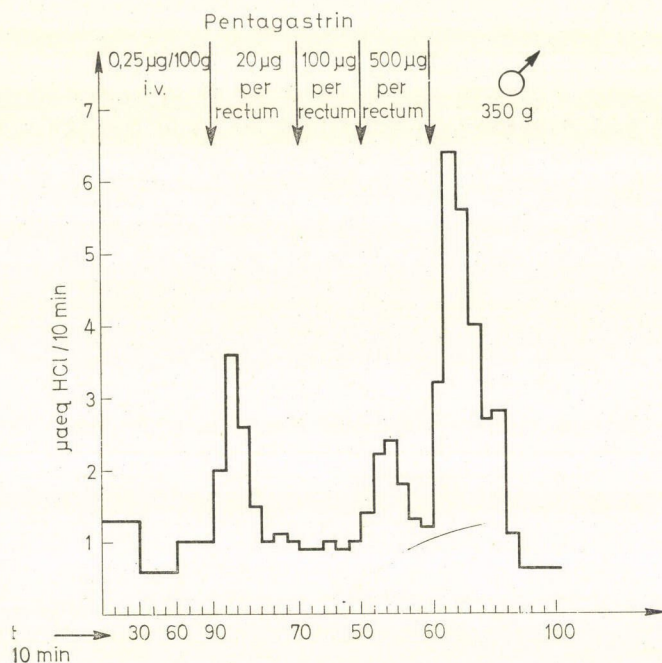
5. ábra. Intrarectalis adagolással $20 \mu\text{g}$ pentagastrin adaggal savrecretio fokozódást lehet elérni

A bélrendszer más pontjainak pentagastrin-áteresztő képességét vizsgálva 50 állatnak a végbelébe infundáltuk a pentagastrint. 17 esetben $20 \mu\text{g}$ dózissal pozitív savsecretiós választ kaptunk (5. ábra). 10 patkány csak nagyobb adagokra (100 – $500 \mu\text{g}$) reagált (6. ábra). 19 esetben csak $100 \mu\text{g}$ -ot, illetve ennél nagyobb adagot adtunk: minden esetben pozitív reakciót észleltünk. 4 állatban nem kaptunk savsecretiós választ, annak ellenére, hogy a pentagastrin intrarectalis adagját fokozatosan emeltük $20 \mu\text{g}$ – $500 \mu\text{g}$ -ra.

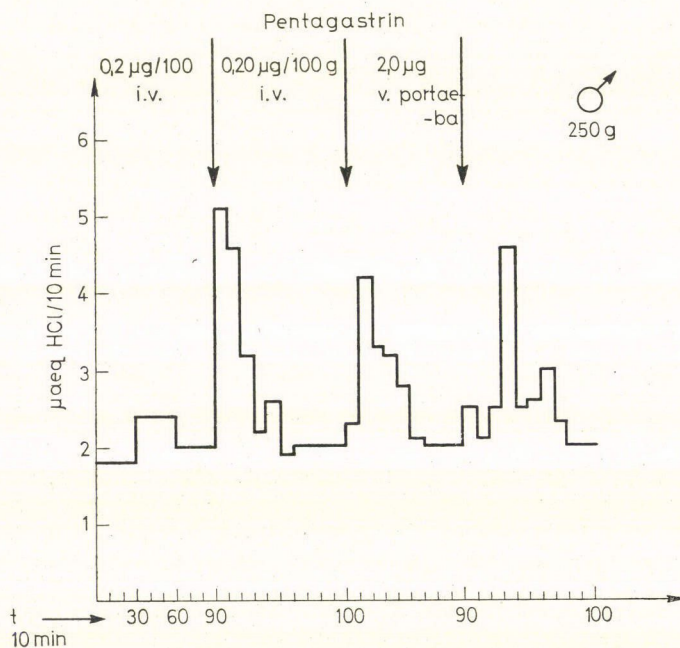
Ha az intravénás alap dózisnak ($0,20$ – $0,25 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ testsúly) megfelelő mennyiségét *intraportalisan* fecskendeztük be 15 állatnak, egyetlen esetben sem kaptunk savsecretiós választ. Ezzel szemben ha fokozatosan emeltük az adagot, $2 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ testsúly dózis esetében minden esetben pozitív reakciót kaptunk (7. ábra).

A pentagastrinnak a májban történő inaktivitását analizáló kísérleteinkben az általunk előállított C^{14} izotóppal jelzett pentagastrint használtuk.

Mindenekelőtt megállapítottuk, hogy a C^{14} izotóppal jelzett pentagastrin $100 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ testsúly dózisú intravénás injekciója után 2 perccel $0,5 \text{ ml}$ serumban a beadott aktivitás $0,75\%$ -a található, 10 perccel az injekció után már csak $0,18\%$ -a (8. ábra). A serumban mért radioaktivitás gyors csökkenése alapján a máj és vese pentagastrint kiválasztó tevékenységével foglalkoztunk.

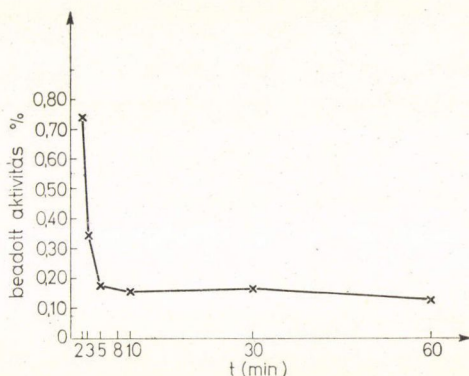


6. ábra. Egyes állatokban csak 100–500 µg pentagastrinnal tudtunk egyértelműen pozitív savi választ kapni.

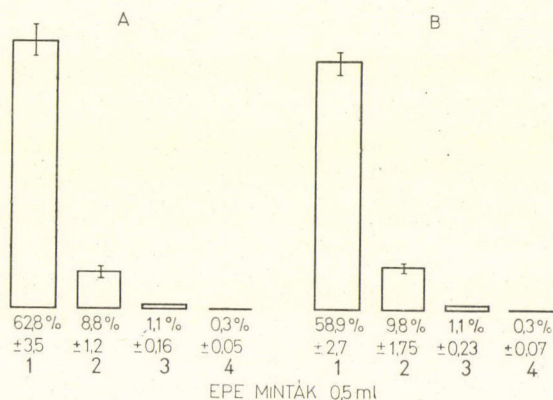


7. ábra. 2 µg pentagastrin intraportalis befecskendezése után az intravénás alapdózisnak megfelelő savi reakciót kaptunk

600 μg pentagastrin intraportalis és intravénás adása után 0,5 ml-es epefrakciókat gyűjtöttünk, és ezeknek a frakcióknak mértük a radioaktivitását. Kiderült, hogy a beadott aktivitás jelentős része jelenik meg az epében. A systemásan és portalisan bejuttatott pentagastrin között az epébe ürülő radioaktivitást illetően különbség nem volt kimutatható (9. ábra). Az egyes frakciókban mért radioaktivitást összehasonlítva kiderült, hogy az aktivitás legnagyobb része az első frakcióban ürült, ezt követően minden frakcióban kb. egy nagyságrenddel csökkent az aktivitás.



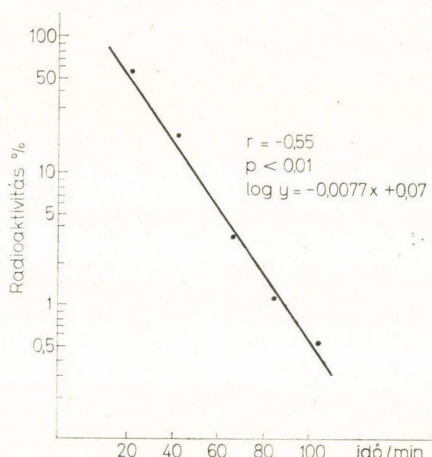
8. ábra. 100 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ testsúly dózisban adott, jelzett pentagastrin eliminációja a keringésből



9. ábra. 700 μg pentagastrin intraportalis (A = 17 állat) és intravénás (B = 11 állat) adása után 0,5 ml-es epemintákban mért radioaktivitás %-ának átlagai és szórásai

Ha az egyes epemintákat 20 percenként vettük, és az így nyert epemintákban mért aktivitás átlagát ábráztuk az idő függvényében, akkor exponenciális összefüggést kaptunk. (A pentagastrin injekciója ebben a kísérletben intraportalisan történt.) (10. ábra.) Ez az összefüggés arra utal, hogy a máj egy adott időpontban mindig az aktuális pentagastrin koncentráció azonos hányadát választja ki.

A vizeletbe a radioaktív anyag ürülése az epével összehasonlítva lényegesen kisebb arányban jött létre. 1000 μg jelzett pentagastrin intravenás adása után (penis vénába) 10 állatban mértük a vizeletben megjelölt radioaktivitást. A vizeletmintákat 4 órán át gyűjtöttük. Ez idő alatt a vizelettel ürített aktivitás a beadott aktivitás átlagosan 12%-ának felelt meg.



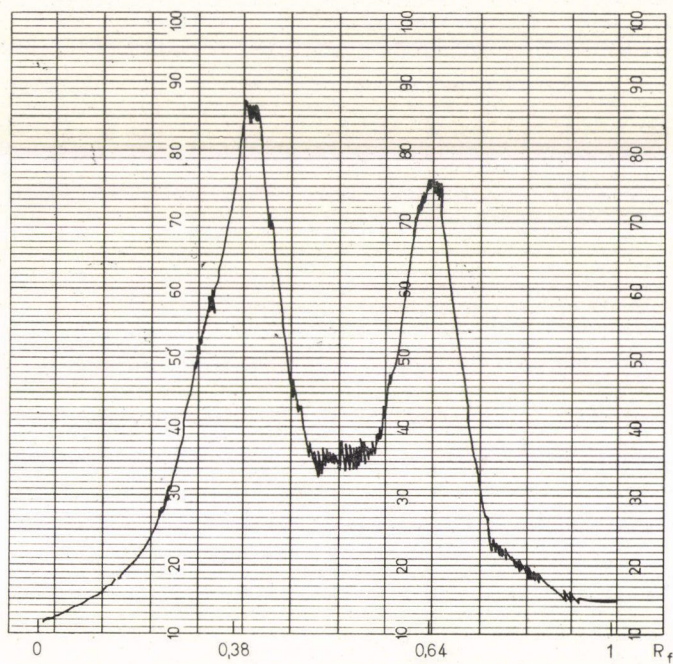
10. ábra. 600 μg pentagastrin intraportalis adása után (10 állat) 20 percenként gyűjtött epe-minták radioaktivitás %-ának átlagai semilogaritmikusan ábrázolva r = korrelációs együttható, $\log y$ = az egyenes egylete

Vizsgálataink alapján a máj a pentagastrin kiválasztásában jelentős szerepet tölt be, ezért az epével kiválasztott jelzett pentagastrin sajátosságait részletesen vizsgáltuk.

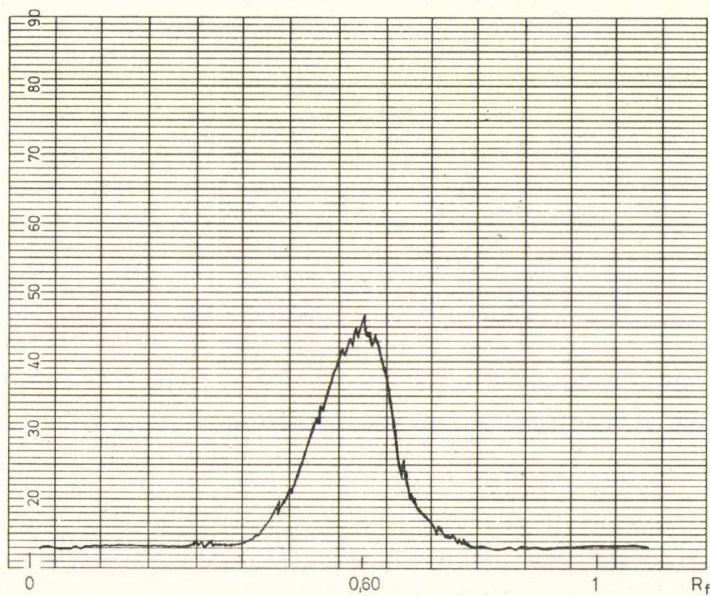
Radiokromatográfiás módszerrel jelzett pentagastrin adása után az epében két jól elkülönülő radioaktív anyagot tudtunk kimutatni (11. ábra). Az egyiket R_f értéke alapján ($\sim 0,6$) a pentagastrinnal tudtuk azonosítani (12. ábra), a másik egyelőre ismeretlen volt ($R_f \sim 0,4$).

Metodikai szempontból fontos volt annak igazolása, hogy ha jelzett pentagastrint a kromatográfiás elválasztás előtt in vitro patkányepével hoztuk össze, a scanogram nem változott. A kis R_f értékű folt megjelenése tehát kromatográfiás sóhibával nem magyarázható.

Mivel feltételeztük, hogy az ismeretlen radioaktív foltot adó metabolit a májban képződött a pentagastrinból, szerkezetének bizonyítására preparatív vékonyréteg-kromatográfiával nagyobb mennyiségű (0,8–1,0 mg) anyagot választottunk szét. A két különböző R_f értékű vegyületet izoláltuk, és hidrolízis után megvizsgáltuk aminosav összetételét. Az analízis alapján mindkét radioaktív anyag azonos aminosav összetételű volt (1. táblázat). Ez arra utal, hogy a pentagastrin a májban csak kis változást szenvedett, peptidkötés



11. ábra. Jelzett pentagastrin intraportalis adása után nyert epeminta radiokromatogramja



12. ábra. Jelzett pentagastrin radiokromatogramja

I. táblázat

Epéből nyert radioaktív anyagok aminosav analízise: mindkét anyag azonos aminosav összetételű

Aminosav analízis

Rf $\sim$ 0,6

Phe = 1,0 Asp = 0,95 Met = 1,02 Gly = 0,96

Rf $\sim$ 0,4

Phe = 1,0 Asp = 1,05 Met = 1,03 Gly = 1,02

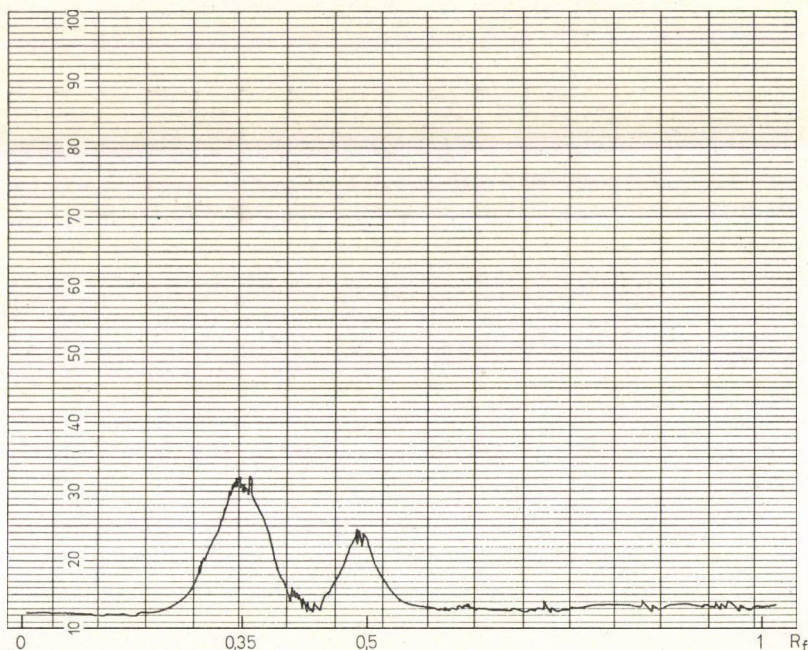
hasadás nem következett be. A májban található enzimek hatását és a molekula felépítését figyelembe véve a következő kémiai változások jöhetnek szóba, és a következő metabolitok képződésével kell számolnunk:

1. decarboxyleződés — az asparaginsav decarboxyleződése alaninná.
2. a tryptophan indolgyűrűjének hydroxyleződése alfa helyzetben.
3. microsomalis oxidáció — a *methionin* oxidálódása methioninsulfoxiddá a molekulán belül.

4. hidrolízis — a phenylalanin savamid csoportjának hidrolízise.

Az első és második reakció lehetőségét a szakirodalom ismeretében el kell vetnünk. Morley (1968) szerint a tryptophan molekulája széles határok között változtatható a biológiai aktivitás csökkenése nélkül. Alább ismertetésre kerülő vizsgálataink szerint viszont a kisebb Rf értékű anyag biológiailag hatástalan. Az ismeretlen anyag Rf értéke kizárja az első lehetőséget is. Kontroll futtatásnál az egyes számmal jelzett anyag Rf-je az általunk használt szolvens rendszerben megközelítőleg 0,85 volt. További vizsgálatokkal kizártuk a microsomalis oxidáció lehetőségét is. Methioninsulfoxid tartalmú peptidet szintetizáltunk, ennek Rf értéke: 0,55—0,66 közé esett, tehát biztosan más mint a $\sim$ 0,4 Rf értékű ismeretlen anyag.

Mind az irodalom, mind saját kísérleteink alapján a phenylalanin amid csoportjának hidrolízise látszott a legvalószínűbbnek. Ennek bizonyítására elő kellett volna állítani a négyes pontban említett pentapeptidet, hogy azt az ismeretlen ($\sim$ 0,4 Rf értékű) radioaktív anyaggal azonosítani tudjuk. A rendkívül fáradságos és hosszadalmas kémiai szintézisre nem gondolhattunk, ezért a már meglevő C^{14} izotóppal jelzett pentapeptid amid desamidálásával igyekeztünk előállítani a feltételezett metabolitot. Tiszta amidase hiányában a módszertani részben leírt eljárással nyert patkánymáj homogenizátum microsoma frakcióját (és az ún. supernatans frakciót) használtuk amidaseként. A jelölt pentagastrint microsoma frakcióval inkubálva, két egymástól jól elkülönülő radioaktív foltot kaptunk a scanogramon (13. ábra). Lényegében ugyanezt az eredményt kaptuk akkor is, ha az inkubálást a részecskementes supernatans frakcióval végeztük. Ezek egyike az Rf érték alapján azonosnak bizonyult a kiindulási pentapeptiddel, a másik anyag minden bizonnyal a négyes számú képlettel jellemzett desamidált pentapeptid, más szóval pentapeptidsav (Rf $\sim$ 0,4).



13. ábra. Amidase enzim tartalmú máj-microsoma frakcióval kezelt jelzett pentagastrin radiokromatogramja

A változás enzimatiskus jellegét támasztja alá, hogy a microsomalis frakció előzetes forralás után a jelzett pentagastrinnal inkubálva, azon strukturális változást nem idézett elő, a radiochromatográfiás kép az eredeti pentagastrinnal azonos maradt.

Az epében talált két radioaktív anyag arányát is meghatároztuk. E célból tíz állatnak adtunk intraportalisan 1000 μg jelzett pentagastrint. A jelzett pentagastrin injekció után nyert 0,5 ml-es epemintákból (ebben a kísérletben összesen 0,5 ml epét gyűjtöttünk állatonként) 20 μl -t kromatografáltunk, 20 μl -t pedig dimethylformamidban oldottunk. A kromatográfia után meghatároztuk a radioaktív foltok területét, majd ezeket lekapartuk az üveglapról és dimethylformamiddal extraháltuk az absorbens silicagélről. Ily módon a radioaktív anyagokat 60–70% között sikerült visszanyerni. A tíz esetben végzett vizsgálat során a $\sim 0,4$ Rf értékű anyag $10,8 \pm 6,1\%$ -ban, a $\sim 0,6$ Rf értékű anyag pedig $52,3 \pm 10,8\%$ -ban fordult elő.

Az epével ürülő radioaktív metabolit biológiai hatását is vizsgáltuk. E célból preparatív vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel nagyobb mennyiségű epét kromatografáltunk 1000 μg jelzett pentagastrin intraportalis adása után. A kromatográfiával szétválasztott és kristályosított radioaktív anyagokból, 1, ill. 1,4 $\mu\text{g}/100$ g testsúly dózisokat használtunk a sav-

II. táblázat

Epéből izolált pentagastrin és pentapeptidsav biológiai vizsgálata Ghosh-Lai patkányon

Gyomorsav szekréció változása $\mu\text{Eq}/\text{óra}$	Ghosh—Lai metodika periódusai					
	Állatok száma	Alap szekréció	Peptavlon 0,2 $\mu\text{g}/100$ g testsúly	Pentapeptid sav Rf: 0,4 1,0 $\mu\text{g}/100$ g testsúly	Pentapeptid Rf: 0,6 1,4 $\mu\text{g}/100$ g testsúly	Peotavlon 0,2 $\mu\text{g}/100$ g testsúly
	1	2,2	4,4	2,3	5,2	4,6
	2	4,8	12,4	5,2	15,3	15,1
	3	3,4	13,1	4,8	7,9	8,2
	4	17,7	27,7	17,7	26,9	24,9
Átlag		7,0	14,4	7,5	13,8	13,2
Növekedés %		100	220	107	197	188

secretiós vizsgálatokra. A Ghosh—Lai módszerrel mért savürítés eredményeit a 2. táblázaton tüntettük fel. Ezekből a vizsgálatokból kiderült, hogy a $\sim 0,6$ Rf értékű anyag biológiailag hatásos, a pentapeptidsav (Rf $\sim 0,4$) az általunk alkalmazott kísérleti körülmény között biológiailag hatástalan.

Megbeszélés

A biológiailag aktív peptideknek — és ilyen a gastrin is — a szervezetben történő inaktiválása elvileg háromféle úton történhet:

A serum, illetve szöveti fehérjékhez történő kötődéssel.

Kiválasztás útján.

Anyagcsere hatás révén.

Zollinger—Ellison syndromás betegek — akik mint ismeretes óriási mennyiségben termelnek gastrint — serumát és vizeletét vizsgálva Bonfils és mtsai (1970) a biológiailag hatékony anyagot elektroforetikus vizsgálattal a serum albuminnak megfelelő helyen találták. Ha J^{125} , vagy J^{131} izotóppal jelzett gastrint emberi serummal hoztak össze, a gastrin szintén az albumin-zónában volt kimutatható (Accary és mtsai 1970). Seelig (1972) trichloreccet-savas kicsapás után a gastrin nagy részét szintén az albumin mellett találta meg. Vizsgálatai mellett szólnak, hogy legfeljebb nagyon gyenge kötődésről van szó, mert egyszerű eszközökkel (Sephadex G-25 kromatográfia, nagy feszültségű elektroforézis), sőt McGuigan (1970) szerint, dialízissel a gastrin az albumintól jól elválasztható. A kérdést az teszi bonyolulttá, hogy a serumban a gastrin két formában fordul elő: egyrészt mint szabad heptadecapeptid, másrészt mint nagymolekulájú gastrinpeptid. Ez utóbbinak molekulásúlya 7000 körül van, míg a heptadecapeptidé 2100—2200. E kétféle gastrin elkülönítése a serumban kromatográfiás módszerrel eddig nem sikerült; trypsin kezeléssel azonban a nagymolekulájú gastrinból a heptadecapeptid szabaddá

tehető. Pathologiai szempontból érdekes, hogy Zollinger—Ellison szindrómában, anaemia perniciosában s általában a hypergastrinaemiás állapotokban elsősorban a szabad gastrin felszaporodása észlelhető.

Vizsgálataink arra egyértelműen választ adtak, hogy függetlenül a fehérjéhez való kötődés arányától és kémiai természetétől — a pentagastrin a keringésből nagyon gyorsan eltűnik. A pentagastrin felezési ideje a serumban rövid, jóval kisebb mint a gastriné. Ez a rövid felezési idő önmagában ellene szól valamelyik fehérje-frakcióhoz való szoros kötődés feltételezésének, amellyel felkelti az érdeklődést a pentagastrin elimináció, illetve lebomlás mechanizmusait illetően.

A pentagastrin keringésből való gyors eltűnése és rövid hatástartama felveti a kérdést, hogy az elimináció vagy a metabolizmus fokozott üteme, esetleg mindkettő együtt felelős az észleltekért. Egyúttal az is választ kíván, hogy az inaktíválódásért elsősorban melyik szerv, illetve szervek felelősek.

Vizsgálataink szerint patkányban a pentagastrin fő kiválasztó szerve a máj. Függetlenül attól, hogy intravénásan vagy intraportalisan juttatjuk be a jelzett pentagastrint, a beadott mennyiség kb. 70%-a megjelenik az epében. A máj kiválasztó tevékenysége jelentős, hiszen a beadott nagy mennyiség túlnyomó része (kb. 60%-a) az első epefrakcióban volt fellelhető. Ha az eliminációt az idő függvényében vizsgáltuk, a kiválasztott aktivitás mintegy fele az első 20 percben megjelent az epében. Ugyanakkor vizelettel négy óra alatt a beadott aktivitásnak csak kb. 12%-a ürült ki.

Eredményeink lényegében megegyeznek Stagg és mtsai (1971) észlelésével, akik kutyában ugyancsak hasonló arányban (kb. 50%) észlelték a pentagastrin májon keresztül történő ürülését. Ezek az adatok azt bizonyítják, hogy legalábbis kutyában és patkányban a pentagastrin elimináció legfontosabb útja a májon keresztül vezet. Emberen mind ez ideig technikai nehézségek folytán hasonló vizsgálatokat nem végeztek. Stagg és mtsai (1971) tájékoztató jellegű adatai amellett szólnak, hogy emberi epében a pentagastrin biológiailag aktív formában megjelenik.

Kísérleteinkkel kapcsolatban felmerülhet az az aggály, hogy túlságosan nagy dózissal dolgoztunk. Méréstechnikai szempontokon kívül tettük ezt azért is, hogy meggyőződhessünk a patkánymáj pentagastrin eliminációs képességének nagyságáról. Látható volt, hogy a patkánymáj eliminációs képességét a beadott nagy adag pentagastrin egyáltalában nem merítette ki. Egyébként Stagg és mtsai (1971) kutyán jóval kisebb adagokkal teljesen hasonló eredményekhez jutottak.

Külön problémát jelent, hogy vajon a teljes gastrin molekula hasonló módon és ütemben választódik-e ki az epében. *Nem ismerünk olyan kísérletet az irodalomban, amelynek során bármilyen módon bejuttatott gastrin mennyiségét mérték volna az epében.* Indirekt adatok azonban amellett szólnak, hogy a teljes gastrin molekula biliaris eliminációja lényegesen eltér a pentagastrinétól.

tól. Így Gillespie és Grossman (1962) nem tisztított gastrin extraktummal, majd Lick és mtsai (1967) Gastrin—Leo készítménnyel intraportalis adagolás után nem láttak lényeges savstimulációs képesség-csökkenést az intravénás adagolással szemben. Bár velük szemben mások (Thompson és mtsai 1969, Beger és mtsai 1970) intraportalis adagolás esetén bizonyos fokú (20—40%-os) aktivitáscsökkenést észleltek, ennek ellenére feltételezhető, hogy elsősorban enzimatis inaktiválódás és nem az elimináció játszott ebben döntő szerepet.

Minthogy a gastrin és a pentagastrin biológiailag aktív végcsoportja azonos, elképzelhető, hogy az 1—13 aminosav sequentiájú peptidrész védőszerepet tölt be, megakadályozza a májban a gastrin lebomlását és eliminációját. Feltételezhető, hogy a teljes gastrin molekula nagyságánál fogva nem tud behatolni a hepatocytákba, míg a pentagastrin számára a passage, s ennek révén a biliaris excretio lehetősége megvan.

Érdekes, hogy a gastrinnal és pentagastrinnal végzett eddigi vizsgálatok, a máj szerepét illetően, a szerv inaktiváló funkciójával foglalkoztak; a biliaris kiválasztás kérdésével Stagg és munkacsoportján kívül más nem foglalkozott.

A gastrin anyagcseréjét illetően meglehetősen ellentmondó adatokat találtunk az irodalomban. Egyesek szerint a máj nem inaktiválja sem az endogén, sem az exogén gastrint (Gillespie és Grossman 1964, Lick és mtsai 1967), mások szintetikus humángastrin (Thompson és mtsai 1969), tiszta sertésgastrin (Beger és mtsai 1970) részleges inaktiválódását észlelték a májpassage során. E kísérlettel kapcsolatban azonban bizonyos methodikai megjegyzések elengedhetetlenek. Így endogen gastrin esetében nem tudni, hogy a serumban milyen arányban fordul elő a Berson és Yalow (1970) által leírt nagymolekulájú gastrin a heptadecapeptid mellett; az előbbinek máj metabolizmusa biztosan más mint a heptadecapeptidé. Másrészt a gastrin diffúziós koefficiensén kívül tekintetbe kell venni az intrahepaticus gastrinszintet, az átáramoltatott májrészlet abszolút mennyiségét és a véráramlás sebességét is.

In vitro kísérletekben a máj amidase aktivitása a gastrin inaktiválását olyan intenzíven tudja elvégezni, hogy elméleti számítások szerint ennek az enzimaktivitásnak elegendőnek kellene lennie még a Zollinger—Ellison syndromában észlelt maximális gastrinszint normalizálásához is (Seelig 1972). Az mindenesetre kétségtelen, hogy a májsejtek — főleg microsomalis frakciója — tartalmaz olyan amidase enzimet, mely a gastrin C-terminális végcsoportján a Phe—NH₂-t ammonia felszabadulás mellett inaktív tetrapeptid szabad savra képes degradálni; az ép májban azonban az intracellularis amidase valószínűleg membran faktorok következtében, nem tud olyan mértékben aktiválódni, mint in vitro körülmények között. Kvantitatíve és kvalitatíve hasonló gastrinbontó hatású a veseszövet homogenizátuma is, míg a serum és izomzat enzimatis bontóképességének élettani körülmények között jelentős szerepe nincsen (Seelig 1972). A tüdő gastrinbontó hatása kísérletesen kizárható volt (Lear és mtsai 1969).

A vesében ezenkívül olyan enzimatis aktivitás található, mely a BOC-tetrapeptid-amid esetében a methionin és asparaginsav közötti peptidkötést képes hidrolizálni. Feltételezik, hogy a vesében a második enzim aktivitásának in vivo körülmények között is komoly szerepe van.

Ami a pentagastrint illeti, az N-terminalis végén levő BOC-védőcsoport folytán egyedül a C-terminalis végén jöhet létre bontás — a Phe—NH₂ csoportban. Kísérleteinkben megállapítottuk, hogy jelzett pentagastrin intraportalis adása után az epében vékonyréteg-kromatográfiával jól elválasztható két radioaktív termék jelenik meg. Ezek közül az egyiket az eredeti jelzett pentagastrinnal azonosítottuk, a másik, vizsgálataink alapján pentapeptid szabadsavnak felel meg. A pentapeptid szabadsav megjelenése amidase enzim-hatás következménye. Erre utal, hogy ugyanezt a metabolitot in vitro sikerült reprodukálni patkánymájából izolált — amidase enzim aktivitású — microsoma frakció segítségével, továbbá, hogy az epéből izolált metabolit — pentapeptid szabadsav — biológiailag hatástalan volt.

Hasonló amidase aktivitást észlelt máj és vese homogenizátummal gastrin, penta- illetve tetrapeptid esetében Seelig (1972) és Laster és Walsh (1968). Kísérleteink alapvetően abban különböznek a fenti szerzők munkáitól, hogy mi nemcsak májhomogenizátummal, illetve májhomogenizátumból nyert microsoma és supernatans frakció segítségével, hanem in vivo májműködés során is kimutattuk az amidase enzim hatását a pentagastrin inaktiválásában.

Érdekes megemlíteni, hogy Temperley és mtsai (1971) adatai szerint kutyában a szintetikus humán gastrin a májban nem inaktiválódott, de a bélben történő átáramlás során igen.

Saját kísérleteink tanúsága szerint pentagastrin óriási mennyisége (>1400 µg) is hatástalan, ha a jejunumba juttatjuk. Ebben az esetben ugyanis a bélnyálkahártyán kívül a májon is keresztül kell jutnia ahhoz, hogy a patkánygyomor fundusi mirigyeit stimulálni tudja. Ha azonban a májat kiiktatjuk a bél felől jövő véráramból, akkor a béllumenbe juttatott pentagastrinnak kb. 0,5–1,0%-a aktív formában jut a fundusi mirigyekhez. Érdekes módon a rectum nyálkahártyájának pentagastrin áteresztő képessége nagyobb mint a jejunumé. Intrarectalisán adott pentagastrin 1–2%-a jutott — számításaink szerint — aktív formában a keringésbe. Az intrarectalis alkalmazás esetében úgy gondoljuk szerepet játszik az a tényező, hogy a végbél alsó részéből felszívódó anyagok a portalis rendszer megkerülésével jutnak a systemás keringésbe, emellett azonban — a vena portae lekötéses kísérletek tanúsága szerint — úgy látszik a két bélszakasz peptidbontó és felszívó képessége közötti különbség is számba jöhet.

In vivo kísérleteinkben az intraportalisan adott pentagastrin már három-négyszeres mennyiségben azonos biológiai (secretiós) választ adott, mint az intravénásan bejuttatott kontroll dózis. Ebből arra következtettünk, hogy — kísérleti körülményeink között patkányban — az intraportalisan adott

pentagastrin 25–30%-a jutott át a májon. Nagyobb adagok esetében természetesen ez az arány lényegesen változhat.

Hangsúlyozni szeretnénk, hogy vizsgálatainkban a pentagastrint nagy pharmacologiai adagokban alkalmaztuk, másrészt tisztában vagyunk vele, hogy a pentagastrinnal elért eredmények — mint arra ismételtén rámutatunk — nem alkalmazhatók minden további nélkül az endogen gastrinra.

Két szempont azonban úgy gondoljuk mégis indokolja a pentagastrin anyagcserével kapcsolatos vizsgálatainkat:

a) A savsecretio szempontjából a C-terminalis végcsoport jelenléte alapvetően fontos a gastrin hatásmechanizmusában. Minden olyan vizsgálat, mely adatot szolgáltat ennek az oligopeptidnek eliminációjáról, metabolizmusáról és inaktiválásáról — mutatis mutandis — hozzájárul a gastrin hatásmechanizmusának tisztázásához is.

b) A szintetikus gastrint nehéz előállíthatósága és költséges volta miatt előreláthatóan hosszú ideig nem fogják használni a klinikai gyakorlatban savsecretiós stimulánsként, a pentagastrin viszont máris kezdi kiszorítani az összes eddig használatos savserkentőket (histamin, Histalog). A jövőben tehát előreláthatóan mind gyakrabban fogjuk a pentagastrin készítményeket használni az emberi gyomorsecretiós vizsgálatokban, így indokolt, hogy e vegyület szervezeten belüli sorsáról minél pontosabb adataink legyenek.

Következtetések

1. A pentagastrin metabolizmusának vizsgálatára legalkalmasabb olyan radioaktív jelzésű pentapeptid, mely

a) a gastrin C-terminalis végcsoportjának eredeti aminosav sequentiáit tartalmazza,

b) radioaktív jelölése az alkotó aminosavak egyikének molekulájában történik,

c) melynek N-terminalis részét védőcsoporttal blokkoljuk.

Az általunk szintetizált 1-C¹⁴ glycín pentagastrin a fenti feltételeknek mindenben megfelel; biológiai hatást illetően egyenértékű az általánosan használt pentagastrin készítményekkel (Peptavlon, ICI).

2. A gastrointestinalis traktus különböző részei különböző mértékben képesek a beadott pentagastrint inaktiválni. Patkányban megállapítottuk, hogy a jejunum, rectum és a máj egyaránt inaktiválja a transzportált pentagastrint.

A rectum nyálkahártyáján relatíve több pentagastrin képes átjutni aktív formában, mint a jejunumon. Még ez utóbbi esetben is a beadott pentagastrin kis része aktív formában juthat a keringésbe, ha előzőleg a májat a felszívódás útjából kizárjuk. Intraportalis adás esetén a máj a beadott pentagastrin 66–75%-át kiválasztja.

3. A pentagastrin eliminációja a keringésből rendkívül gyors. Számításaink szerint a jelzett pentagastrin intravénás adása után 10 perccel a vér-savóban mért radioaktivitás a két perces érték negyedére csökken.

4. A jelzett pentagastrin — függetlenül attól, hogy közvetlenül a vena portaeba, vagy intravénásan adagoltuk — az epével kerül kiválasztásra. Két óra alatt a beadott aktivitás kb. 70%-ban kimutatható az epében. Az elimináció üteme meglehetősen gyors, a radioaktivitás mintegy fele az első 20 perces epefrakcióban kimutatható. Ugyanakkor a vizelettel — 4 óra alatt — csak mintegy 12%-a ürült ki a beadott aktivitásnak. Ez a tény azt mutatja, hogy a pentagastrin legfontosabb kiválasztó szerve patkányban a máj, egy-szersmind aláhúzza annak fontosságát, hogy a pentagastrin rövid hatástar-tamában és a keringésből való gyors eltűnésében az irodalomban eddig első-sorban hangsúlyozott inaktiválási mechanizmusokon kívül, az epével történő kiválasztásnak fontos szerepet kell tulajdonítanunk.

5. Radiokromatográfiás analízissel az epében jelzett pentagastrin adása után két jól elkülöníthető anyagot találtunk: ezek közül az egyik az eredeti jelzett pentagastrin molekulával azonos, a másiktól megállapítottuk, hogy a C-terminalison levő Phe-NH_2 csoport desamidálása során keletkező pentapeptid szabadsavval azonos. A radioaktív pentagastrin és a pentapeptid szabadsav aránya az epében $\sim 5 : 1$.

6. Májhomogenizátum microsomalis frakciójával (és az ún. részecske-mentes supernatáns frakcióval) ugyanezt az elváltozást tudtuk létrehozni a pentagastrinon; ha azonban e frakciókat az inkubálás előtt felforraltuk, a desa-midálás nem jött létre. Tiszta amidase enzim hiányában így indirekt úton bizonyítottuk, hogy a májpassage során észlelt változások a molekula C-ter-minalis végén elhelyezkedő Phe-NH_2 végcsoport intrahepaticus desamidá-lásával kapcsolatosak.

7. A jelzett pentagastrin adása után nyert epéből mind a pentagastrint, mind a pentapeptid szabadsavat izoláltuk, és megállapítottuk, hogy azonos dózisban adva a pentapeptid biológiailag hatásos (savsecretiót növelő hatása van), a pentapeptid szabadsav hatástalan.

8. Vizsgálataink adatot szolgáltatottak a gastrin secretiós hatásban kulcsszerepet játszó aktív C-terminális végcsoport patkányban történő kivá-lasztási és metabolikus mechanizmusait illetően. Minthogy a pentagastrin a mindennapos klinikai gyakorlatban is egyre nagyobb szerepet játszik, vizs-gálataink e vegyület pharmacologiai megismerését is szolgálják.

ÖSSZEFOGLALÁS

Szerzők a gastrin biológiailag aktív C-terminalis végcsoportjának, a pentagastrinnak anyagcseréjét vizsgálták patkányban. Kísérleteikhez a penta-peptid glycín konstituensén C^{14} -gyel jelzett, saját maguk által szintetizált anya-

got használtak. Megállapították, hogy a pentagastrin legfontosabb kiválasztó szerve a máj. Az epével kiválasztott pentagastrin egy része változatlan formában ürül, másik része a májban amidase enzim hatására, biológiailag inaktív pentapeptid szabad savvá alakul.

IRODALOM

- Accary, J. P., Sizonenko, P. Z., Dubrasquet, M. és Bonfils, S.: C. R. Soc. Biol. **163**, 2538 (1970).
 Anderson J. C., Barton, M. A., Gregory, R. A., Hardy, P. M., Kenner, G. W., MacLeod, J. K., Preston, J. és Sheppard, R. C.: Nature **204**, 933 (1964).
 Beger, H. G., Witte, C., Meves, M. és Kraas, E.: The effect of liver on the gastric secretion stimulated by pentagastrin and gastrin II. 2nd Symposium of the European Gastro Club Erlangen (1970).
 Bonfils, S., Vâtier, J. és Accary, J. P.: Bioassay for gastrin (P. S. U.) and its theoretical and clinical significance. In: „Origin, Chemistry, Physiology and Pathophysiology of the Gastrointestinal Hormones” (Ed: W. Creuzfeldt, Schattauer), Stuttgart (1970).
 Ghosh, M. N. és Schild, H. O.: Brit. J. Pharmacol. **13**, 54 (1958).
 Gillespie, I. E. és Grossman, M. I.: Gastroenterology **43**, 189 (1962).
 Gregory, R. A. és Tracy, H. J.: Gut **5**, 103 (1964).
 Gregory, R., Hardy, P. M., Jones, D. S., Kenner, G. W. és Sheppard, R. C. Nature **204**, 931 (1964).
 Lai, K. S.: Gut **5**, 327 (1964).
 Laster, L. és Walsh, J. H.: Fed. Proc. **27**, 1328 (1968).
 Lear, J., Kohatsu, S. és Oberhelman, H. A.: Amer. J. Dig. Dis. **14**, 870 (1969).
 Lick, R. F., Welsch, K. H., Kart, W., Bröckner, W., Balser, D. és Gürtner, Th.: Z. Gastroent. **5**, 7 (1967).
 Morley, J. S.: Fed. Proc. **27**, 1314 (1968).
 Pissidis, G. A. és Clark, C. G.: Gut **8**, 196 (1967).
 Seelig, H. P.: Gastrin, Inaktivierung und Abbau. Thieme Verlag, Stuttgart (1972).
 Stagg, B. H., Temperley, J. M. és Wyllie, J. H.: Gut **12**, 825 (1971).
 Temperley, J. M., Stagg, B. H. és Wyllie, J. H.: Gut **12**, 3723 (1971).
 Thompson, J. C., Reeder, D. D., Davidson, W. D., Charters, A. C., Brückner, W. L., Lemmi, C. A. E., és Miller J. H.: Ann. Surg. **170**, 493 (1969).
 Varró, V., Kiss, J., és Mignon, M.: Biol. Gastroent. **2**, 169 (1971).
 Yalow, R. S., és Berson, S. A.: Gastroenterology **58**, 609 (1970).

Ezúton kívánunk köszönetet mondani Szirányi Katalinnak, Gervain Juditnak és Ferenczi Richárdnak a vizsgálatok során nyújtott értékes technikai segítségért.