

Röntgensugárzás hatása szérumfehérjékre

I. In vitro besugárzott szérumfehérjék változása.

Írta: **Vincze András** t. mérnökörnagy, **Binder Gyula** t. mérnökfőhadnagy,
dr. **Tanka Dezső** t. orvosfőhadnagy.

A különböző fehérjék ionizáló sugárzásra bekövetkező változásaival régen foglalkoznak. Már 1930 körül több szerző megfigyelte a besugárzott fehérjék denaturálódását, abszorpciós spektrumuk és szedimentációs konstansuk megváltozását, viszkozitásuk csökkenését és koagulumok képződését.^{1 2 3}

A besugárzott fehérjék megváltozásának hatásmechanizmusa szempontjából két szélső esetet lehet megkülönböztetni: a kis dózissal besugárzott híg fehérjeoldatok és a nagy dózissal besugárzott, illetve nagyobb koncentrációjú fehérjeoldatok esetét.

*Barron*⁴ szerint híg vizes oldatokban és kis dózisok esetén a sugárzás hatása indirekt, azaz a fő hatást a vízből képződött oxidatív ágensek fejtik ki, melyek az SH- és OH- (és talán az NH₂-) csoportok polimerizációval egybekötött oxidációját eredményezik.

Nagy dózisoknál vagy koncentráltabb fehérjeoldatoknál az indirekt hatás mellett az ionizáló részecskék és a fehérjemolekulák közötti direkt hatások lépnek előtérbe, melyek *Barron* szerint a hidrogénkötések és oldalláncok szétszakadását, denaturálódását és a molekula szétlazulását idézik elő, melyek a fehérje kicsapódásával járnak együtt.

Jelen cikkünk a kis dózissal besugárzott natív szérumok, azaz az első csoporthoz tartozó mechanizmus szerinti változás típusal foglalkozik, de részben a teljesség kedvéért, részben mivel — ha elhanyagolható kis mértékben is — a direkt sugárhatás a kis dózissal besugárzott híg oldatokban is fellép, a nagyobb dózisok hatására, illetve nagyobb koncentrációjú oldatokban fellépő változásokról is rövid irodalmi áttekintést adunk.

Nagy dózisok hatására nagy koncentrációjú fehérjeoldatokban bekövetkező változások szélső esetei a gyapjú- és selyemszálon végzett kísérletek. *Astbury* és *Woods*⁵ azt találták, hogy sugárzás hatására a gyapjúsálak fizikai tulajdonságai megváltoznak, a szuperkontrakciók száma megnő. Az elváltozás *Alexander* és *Hudson*⁶ szerint vagy a peptidkötések, vagy a diszulfidkötések elszakadásával magyarázható. Általában elfogadott, hogy a sugárzással szemben a diszulfidkötések igen rezisztensek, s így valószínű, hogy a szakadás a peptidkötések között jön létre. Ezt látszanak bizonyítani *Alexander* és *Charlesby*⁷ selyemszálon végzett kísérletei is. A selyemszálak nem tartalmaznak diszulfidkötéseket, azonban a sugárzásra bekövetkező fiziko-kémiai változások sokkal kifejezettebbek, mint a gyapjúszálon. Ez a kísérlet bizonyíték arra nézve, hogy a sugárzás hatására bizonyos körülmények között a peptidkötések szakadnak szét.

Svedberg és *Brohult*^{8 9} alfa részecskékkel oldatban besugárzott hemocianin molekulák tördelődését észlelte. Ez a tördelődés nagyjában ugyanúgy folyt le, mintha az anyagot hidrogén kötést szakító reagenssel (karbamiddal) kezelték volna, ti. az anyag molekulái először kettő, majd végül nyolc részre szakadtak. A különbség az, hogy míg a karbamiddal kezelt molekulák teljesen restituálódnak

tudtak, addig a besugárzott molekulák úgylátszik kémiai is módosultak, mert restituálódásra képtelenek voltak. Ezt az elváltozást a szerzők a sugárzás direkt hatásának tulajdonítják, mivel ez $+20\text{ C}^\circ$ -on és -180 C° -on egyformán bekövetkezett. Megállapították, hogy egy alfa részecske egy molekulát károsít és a további reakció molekulán belüli energia átvitelével megy végbe.

Nagyobb dózissal besugárzott, de hígabb fehérjeoldatok esetén a direkt hatás mellett az indirekt hatások is számottevők. 50—60 000 r dózis hatására *M. N. Meisel*¹⁰ a besugárzott élesztősejtek protoplaszt fehérjéinél a szabad amino- és SH-csoportok számának tetemes megnövekedését észlelte.

William és munkatársai¹¹ 20 000—1 500 000 r-el besugárzott kristályos bovin-szérum albuminjének prolimerizálódását és bifenil-típusú kötések kialakulását észlelték. *Kepp* és *Mitchel*¹² 100 000 r-rel besugárzott 1,5—2%-os szérum protein-oldatban a béta-globulin csökkenését és az alfa-globulin relatív emelkedését figyelték meg. Ugyancsak a két utóbbi szerző a besugárzott globulin-oldatoknál a negatív töltésű csoportok csökkenését észlelte.

*Barron*³ vizsgálatai szerint a sugárzás hatására fellépő változások igen hőérékenyek. 71 000 r-rel 10 C° -on besugárzott fehérjeoldatok már megzavarosodtak, míg ugyanezt a jelenséget 3 C° -on nem észlelte. Ha azonban ezt a tiszta oldatot 27 C° -ra vitte, ebben is kicsapódás lépett fel.

M. Sz. Volkova és *A. G. Paszünszkij*¹³ kísérletei szerint a sugárzás hatására a fehérje-molekulában nem 1—2 kötésre korlátozódó kémiai változások jönnek létre, hanem a denaturáció általános mechanizmusának megfelelően a gyenge intramolekuláris kötések szakadnak szét és csoportosulnak át. Kísérleteik szerint az alfa-sugárral besugárzott 2%-os emberi szérum albumin oldatban legfeljebb 3—4 peptid kötés szakadhat szét, mivel az aminonitrogén értéke ezen dóziséig a kísérleti hibákon belül változatlan. Ha figyelembe vesszük a fehérjék globuláris strukturáját, akkor ennek a pár peptid kötésnek az elszakadása még nem okozhat komoly strukturális változást a molekulában.

Kis dózisok hatására a fehérjékben csak az indirekt hatások dominálnak és csak finom módszerekkel kimutatható igen kis változások következnek be. *Barron*³ már 100 r hatására is elváltozást talált a fehérje oldatok UV spektrumában. Ez a változás savanyú oldatban csökkent és teljesen eltűnt, ha az oldatokat oxigénmentes közegben sugározták be.

Pavlovskaja, *Volkova* és *Paszünszkij* a besugárzott szérum albumin S^{35} -tel jelzett metionin megkötő képességének megváltozását figyelték meg. Ez a megváltozás már néhány 100 r-es dózis hatására is bekövetkezett, különösen hígabb (2%-os) fehérjeoldatok esetén. Az észlelt jelenséget a szerzők azzal magyarázzák, hogy a besugárzott fehérjék denaturálódása folytán a fehérjék abszorpciós képessége fokozódik. Az abszorpciós képesség fokozódását azzal magyarázzák, hogy a besugárzott fehérjékben új, aktív kémiai csoportok szabadulnak fel.^{14, 15}

Saját, már közölt vizsgálataink¹⁶ azt mutatják, hogy bizonyos szérumok réz-ion-megkötőképessége viszonylag kis dózissal való besugárzás esetén közvetlenül a sugárzás után szignifikánsan megnő.

A fehérjék sugárreakciója szempontjából nemcsak a szérum-, vagy tojásfehérjéket vizsgálták, hanem az enzim-fehérjéket is. Ezek a vizsgálatok abból a szempontból is érdekesek, hogy így nemcsak a fehérjék kémiai strukturális változásáról kapunk képet, hanem ezen változások következtében fellépő funkcionális változásokról is, melyeket mint az enzimtevékenység változását jól lehet regisztrálni. Az ilyen irányú kísérletek száma igen nagy. Nem célunk ebben a közleményünkben az irodalom ezen részével is részleteiben foglalkozni.

Csak annyit kívánunk megjegyezni, hogy sugárzás hatására főleg az SH-enzimek inaktíválódnak és ez az inaktíválás a dózistól függően reverzibilis vagy irreverzibilis lehet.

Mi a szérumot választottuk ki kísérleteink tárgyául, Elsősorban azért, mivel a kapcsolatos in vivo-változások az irodalomból és saját előző kísérleteinkből már ismeretesek voltak számunkra, ami megfelelő összehasonlító alapot adott az in vitro elvégzendő kísérletek számára.

Minthogy a szervezet fehérjeiben in vivo lejátszódó változások igen jellemzőek a sugárbetegségekre, úgy véltük, hogy az in vitro elvégzett vizsgálatok még közelebb segítenek a szérumfehérjékben lejátszódó in vivo sugárkémiai változások hatásmechanizmusának felderítéséhez.

Vizsgálni kívántuk a normálszérum réz-ion-megkötőképességének változását besugárzás és az ezt követő inkubálás hatására.

Módszer.

Vizsgálatainkhoz minden esetben natív emberi szérumot használtunk. A szérumokat 6000 r-el és ennél kisebb dózissal Stabilivolt mélyterápiás röntgenkészülékkel sugároztuk be. (180 kV, 15 mA, 0,5 Cu, fókusztáv. 19,5 cm, légdózis 320 r/perc.) A besugárzásokat minden esetben azonos edényben végeztük. Az edény átmérője 3 cm, a folyadékréteg vastagsága 0,5 cm volt. A dózis meghatározását azonos edényben, azonos folyadékmennyiséggel, ferroamonszulfátos doziméterrel végeztük. ($g = 15,5$)

A biuret-meghatározásokat a Gleiss és Hinsberg¹⁷ által leírt és Weichselbaum által módosított módszerrel végeztük. Az így kivitelezett módosított biuret-reakció pontosságát A. G. Gornal és társai¹⁸ vizsgálták. Azt találták, hogy azonos szérián összehasonlítva, a módosított biuret-reakcióval nyert összfehérje-érték és a Kjehldahl-nitrogén alapon számított összfehérje-érték közötti különbségek 0,1 mg % fehérjén belül vannak. Ennek alapján a módszert vizsgálatainkhoz megfelelő pontosságúnak találtuk.

A biuret-meghatározásokat a besugárzás előtt és után végeztük el. Ezután a besugárzott szérumot, valamint a be nem sugárzott kontrollt 37 C°-ú termosztátban steril körülmények között inkubáltuk és a szérumok biuret-értékét 24, illetve 48 óra múlva ismét meghatároztuk.

Vizsgálati eredmények:

A besugárzott és kontroll szérumok extinkció-értékeit az 1. sz. táblázat. a változások százalékos összehasonlító grafikonját az 1. sz. ábra szemlélteti.

1. sz. táblázat.

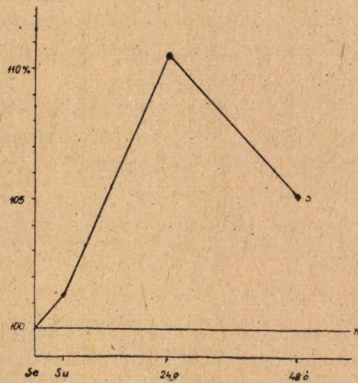
	Alap- érték	1 óra	24 óra	48 óra		Alap- érték	SU (1 ó)	24 ó	48 ó
Kontroll	0,349	0,349	0,349	0,362	Sugárzott	0,349	0,350	0,363	0,372
	0,331	0,331	0,332	0,344		0,331	0,331	0,336	0,366
	0,352	0,352	0,331	0,325		0,352	0,351	0,424	0,368
	0,272	0,272	0,336	0,336		0,272	0,338	0,333	0,310
	0,316	0,316	0,319	0,325		0,316	0,316	0,336	0,352
	0,324	0,324	0,334	0,344		0,324	0,324	0,359	0,374
	0,312	0,312	0,327	0,338		0,312	0,323	0,358	0,350
	0,314	0,314	0,324	0,339		0,314	0,312	0,358	0,298
	0,314	0,314	0,324	0,339		0,314	0,305	0,362	0,361
	0,286	0,286	0,329	0,339		0,286	0,288	0,364	0,404

Az ábrából jó látható, hogy a besugárzott szérum réz-ion-megkötőképessége a besugárzás után intenzív változást mutat.

A görbe két részre osztható:

1. a közvetlenül a sugárzás után bekövetkező változásra;
2. az inkubáció alatt bekövetkező változásra.

Ha az egyes szérumok viselkedését vizsgáljuk, azt találjuk, hogy a szérumok egy részének réz-megkötőképessége a sugárzás után közvetlenül semmi-féle, másik része igen tetemes változást mutat.



1. ábra.

Az utóbbi emelkedés, mint ahogy arról a Katonaorvosi Szemlében beszámoltunk¹⁶ a neoplazmás megbetegedésben szenvedő betegekre igen erősen szignifikáns, egészséges egyéneknél azonban ritkábban fordul elő. Minthogy ezen kezdeti, közvetlen a sugárzás hatására beálló biuret szint változás az általunk megvizsgált 9 db gyermekvér közül 7 esetben ugyancsak fellépett, lehetséges, hogy ez a jelenség az osztódásban lévő szövetekkel bíró egyénekre általánosan jellemző.

A közvetlen sugárzás után bekövetkező változások sugárérzékenységeinek meghatározása céljából kísérleteket folytattunk a változás szempontjából jellemző rákos szérumokkal. A dózis és az extinkció változások közötti összefüggést a 2. sz. táblázat szemlélteti.

2. sz. táblázat

Szám	SE	500 r	1000 r	3000 r	6000 r
1.	0,324	0,324	0,333		0,352
2.	0,345	0,347	0,356		0,363
3.	0,357	0,356	0,355		0,362
4.	0,342	0,345	0,345		0,364
5.	0,326			0,352	0,352
6.	0,349			0,349	0,349
7.	0,302			0,317	0,318
8.	0,342			0,357	0,357

Amint a táblázatból látható az alsó dózishatár, melynél a kapott extinkció változások kísérletünk szempontjából még értékelhető eredményt adnak, 3000 r vagy 3000 és 1000 r közé esik.

A közvetlenül a sugárzás után bekövetkező változások pontosabb felderítése céljából még egy kísérletsorozatot indítottunk el rákos szérumokkal.

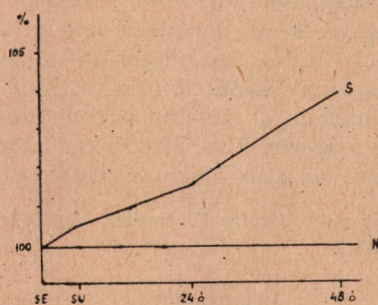
Ennek keretében a rákos szérumokat a besugárzás után 37 C°-on inkubáltuk és azt tapasztaltuk, hogy azok a szérumok, amelyek közvetlenül a besugárzás után nagy változást mutatnak, a további inkubáció alatt már alig változnak.

Vizsgáltuk, hogy a szérum kezelés nélkül, szobahőfokon állva mutat-e változást. Értékelhető változást még 5 órai állás után sem tapasztaltunk.

A normál szérumokon az inkubálás alatt bekövetkező elváltozásokat vizsgálva azt látjuk, hogy a szérum réz megkötőképessége sugárzás után átlagosan 1—2 napig emelkedést, ezután pedig csökkenést mutat. Különbséget észleltünk az egyes és kevert szérumok viselkedésében. A kevert szérumokban a bekövetkező változás nagyobb, mint az egyes szérumoknál, azonban a görbe már 24 óra után csökkenést mutat, szemben az egyes szérumokkal, ahol ezt a csökkenést még 48 óra után sem tapasztaltuk. A 3—4, sőt egyes esetekben már a második napon koagulomok is jelennek meg az oldatban pelyhes csapadék formájában.

Az inkubációs időszakban bekövetkező változások alsó sugárérzékenységi határát 600 r-nek találtuk. Ezen kísérletsorozatunk eredményét az alábbi táblázat és diagram szemlélteti. A diagram az extinkciós változások százalékos különbségét mutatja.

	Alap- érték	1 óra	24 óra	48 óra		Alap- érték	SU (1 óra)	24 óra	48 óra
Kontroll	0,339	0,339	0,333	0,352	Sugárzott	0,339	0,340	0,342	0,358
	0,308	0,308	0,307	0,309		0,308	0,307	0,307	0,329
	0,320	0,320	0,325	0,340		0,320	0,320	0,341	0,357
	0,311	0,311	0,353	0,319		0,311	0,312	0,314	0,322
	0,305	0,305	0,308	0,332		0,305	0,309	0,310	0,333
	0,317	0,317	0,318	0,318		0,317	0,317	0,319	0,337
	0,323	0,323	0,324	0,332		0,323	0,324	0,324	0,339
	0,290	0,290	0,294	0,302		0,290	0,290	0,296	0,306
	0,301	0,301	0,302	0,312		0,301	0,301	0,322	0,332
	0,288	0,288	0,312	0,318		0,288	0,288	0,341	0,356
	0,311	0,311	0,320	0,332		0,311	0,312	0,325	0,337
	0,296	0,296	0,304	0,317		0,296	0,297	0,309	0,330
	0,334	0,334	0,355	0,355		0,334	0,337	0,363	0,372



2. ábra.

Az eredmények megbeszélése.

A fenti eredményekből láttuk, hogy a besugárzott szérumok réz ion megkötőképessége a besugárzás után intenzív változást mutat. Minthogy a biuret reagenssel meghatározott értékek a fehérje felületén lévő CO—NH csoportok

számával arányosak, ezeket a változásokat a biuret reagens számára hozzáférhető peptid kötések számának megváltozásával kell magyarázni. Újabb reakcióképes peptid-csoportok viszont csakis a globuláris fehérjemolekulák szétnyílása folytán kerülhetnek a molekula felületére. Adott kezdeti fehérje-mennyiséget tartalmazó rendszer biuret-szintjének növekedése tehát a fehérjeláncok szétnyílásával egyértelmű.

Vitatott kérdés az irodalomban, hogy vajon a sugárzás okozta fehérje-változások denaturációnak minősíthetők-e. *Neurath*¹⁹ szerint a denaturáció inkább fizikai, vagy intramolekuláris újraelrendeződés, mint a natív fehérje strukturális kémiai megváltozása. A denaturáció a specifikus térbeli struktúra elváltozásához vezet, az elsődleges kovalens kötések hidrolizise nélkül. A denaturáció a fehérje szerkezetének nem enzimátikus módosulása. Azzal a megkövetéssel, hogy a denaturáció nem enzimátikus hidrolízis folytán következik be, a szerző azt fejezi ki, hogy ki van zárva a peptid-kötések hidrolizise.

A denaturáció kritériumai *Neurath* szerint a következők:

1. Oldhatóság csökkenése.
2. Biológiai aktivitás megváltozása.
3. A csoportok reaktivitásának megnövekedése.
4. A molekula nagyságának vagy alakjának a megváltozása.
5. A molekula enzim hasíthatóságának a megnövekedése.
6. Az abszorpciós spektrum megváltozása.
7. Az elektroforetikus mobilitás megváltozása.
8. Az izoelektromos pont megváltozása.
9. A kristályosodóképesség elmaradása.

Az irodalomban felsorolt elváltozások, valamint a fentiekben leírt saját kísérleteink alapján tehát a fehérjék sugárzás hatására bekövetkező változásait denaturációnak kell minősítenünk. E témával kapcsolatos további vizsgálatainkról következő közleményünkben számolunk be.

Összefoglalás:

A szérumfehérjek réz-megkötőképessége viszonylag kis röntgendózisok hatására jól értékelhető növekedést mutat. Minthogy a réz-megkötőképesség, azaz a biuret-reagenssel meghatározott érték a fehérje felületén lévő CO—NH csoportok számával arányos, ezeket a változásokat a réz-ionok számára hozzáférhető peptid-kötések számának megváltozásával kell magyarázni. Újabb reakcióképes peptidcsoportok viszont csakis a globuláris fehérjemolekulák szétnyílása folytán kerülhetnek a molekula felületére. Adott kezdeti fehérje-mennyiséget tartalmazó rendszer réz-megkötőképességének növekedése tehát a fehérjeláncok szétnyílásával, azaz denaturációval egyértelmű.

Köszönetünket fejezzük ki *Straub F. Brunó* akadémikusnak a munkánkban nyújtott értékes támogatásért.

IRODALOM:

1. *Spiegel—Adolf—M. O. Krumpel*: *Biochem. Z.* 190, 28—41. (1927). — 2. *Sanigar, E. B., L. E. Krijci, E. V. Kraemer*: *Biochem. J.* 33. 1. (1939). — 3. *E. S. G. Barron*: Symposium on Radiobiology, 232 old. (1950). — 4. *E. S. G. Barron*: *Radiation Biology I.* 284—286. old. (1954). — 5. *Astbury, W. T., Woods, J. J.*: *Phil. Trans.* 232 A. 333 (1953). — 6. *Alexander, P., Hudson, R. F.*: *Wool, its chemistry and physics* Chapman and Hall, London, 68. old. (1954). — 7. *Alexander P., Charlesby, A.*: Nem közölt munka. *Bacq, Alexander*: *Fundamentals of radiobiology* (Buterworth sci. Publ. [1955]) — 8. *Svedberg, T., Brohult, S.*: *Nature*, 173, 578 (1954). — 9. *Brohult, S.*

Nova Acta Soc. Sci. upsala. 12. No. 4. (1940). — 10. M. N. Meisel: Gyejsztvija oblučenija na organizm. (78—112. old.) Genfi nemzetközi atomkonferencia. 1955. Szovjet Akadémia kiadása. — 11. William, Mitchel: Callman: Arch. Biochem. a. Biophysic, 39. 1. 232—233. (1952). — 12. R. K. Kepp., K. F. Michel: Strahlenther. 92. 416—422. (1953.) — 13. M. Sz. Volkova, A. G. Paszünszkij: Biochimije, 20, 4, 470—478. (1955). — 14. A. G. Paszünszkij, M. Sz. Volkova, V. P. Blohina: DAN. SZSZSZR. 1955. 101. 2. 317—320. — 15. T. E. Pavlovszkája, M. Sz. Volkova, A. G. Paszünszkij: DAN. SZSZSZR. 101. 4. 723—726. (1955). — 16. Vincze A., Binder Gy., Tanka D.: Katonaorvosi Szemle, 7. 12. (1955). — 17. Gleiss, Hinsberg: Z. ges. exp. Med. 116, 599. (1950). — 18. A. G. Cornal, Bardwill, David: J. Biol. Chem. 177. 751. (1949). — 19. H. Neurath, K. Baley: The proteins I. 812—813. old. Academic Press (1953).

Инженер-майор А. Винце, инженер-старший лейтенант Д. Биндер, старший лейтенант мед. службы д-р Д. Танка:

ВЛИЯНИЕ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ НА БЕЛКИ СЫВОРОТКИ

I.

Изменения *in vitro* облученных белков сыворотки.

Связываемость Си-ионов белками сыворотки увеличиваются при облучении сравнительно малыми рентгеновскими дозами. Ввиду того, что связываемость Си-ионов, т. е. показатели установленные реагентом „биурет“ пропорционален числом групп CONH — на поверхности белков, эти изменения объясняются изменением числа пептидных связей связывающих себя Си-ионов. Новые реактивные пептидные группы одновременно попадают только на поверхность молекул при распаде глобулярных белковых молекул. Таким образом увеличение связываемости Си-ионов при определенном начальном количестве белков в одной системе объясняется только с открытием, т. е. денатурированием белковых цепей.

*Dr. A. Vincze, Ing. Major in Res. — Gy. Binder, Ing. Oberleutn. in Res.
Dr. D. Tanka, Oberleutn. d. San. in Res.*

DIE WIRKUNG DER RÖNTGENBESTRAHLUNG AUF DAS SERUMEIWEISSBILD

I. Die Veränderungen der *in vitro* bestrahlten Serumproteine

Zusammenfassung: Die Kupferbindungskraft der Serumproteine weist nach der Einwirkung verhältnismässig kleiner Strahlendosen eine deutliche Steigerung auf. Da die Kupferbindungskraft, die durch den Biuret-Reagens definierbar ist, von der Zahl der an der Oberfläche des Eiweissmoleküls haftenden CO-NH-Gruppen abhängig ist, kann ihre Änderung durch die Schwankungen der für die Kupferionen zugänglichen Zahl der Peptidbindungen erklärt werden. Neue, reaktionsfähige Peptidgruppen können an die Oberfläche des Moleküls nur durch die Öffnung der globularen Eiweissmoleküle gelangen. Die Steigerung der Kupferbindungskraft von Systemen, die bestimmte anfängliche Eiweissmengen enthalten, ist demgemäss mit der Öffnung der Eiweissketten, d. h. mit der Denaturierung gleichbedeutend.