

Röntgensugárzás hatása szérumfehérjékre

II. Proteolitikus enzimhatás szerepe az in vitro besugárzott szérumfehérjékben fellépő változásoknál.

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

Mint előző cikkünkben erről beszámoltunk, a besugárzott szérum réz ion megkötőképessége a besugárzás után intenzív változást mutat és ez a változás a fehérje láncok szétnyílásával, denaturációval függ össze.

Kis dózisok esetén híg vizes fehérje oldatokban beálló változások döntően csak a vízből képződött oxidáló gyökök (OH és HO₂), valamint gerjesztett vízmolekulák és a fehérje molekulák közötti reakciók eredményei. Ezek a reakciók azonban önmagukban csak részben magyarázzák meg a fehérjékben később fokozatosan bekövetkező nagyobb elváltozásokat.

Egyéb helyen közlendő vizsgálataink szerint — mint ahogy arról az 1956-os fehérje-szerkezeti ankéton röviden beszámoltunk — az elnyelt sugár-energiák kisebbek annál, hogy abból levezethessük az általunk 37° C-on inkubált besugárzott szérumoknál észlelt elváltozásokat. Ezért az irodalomban leírt és saját in vivo kísérleteink¹ kiértékelése jogossá látszottak tenni a szervezetben fokozatosan kifejlődő, sugárzás okozta elváltozásokkal kapcsolatban azt az elképzelést, hogy a sugárzás alatt a hidrogén hidaknál és egyéb helyeken bekövetkező oxidáció csak részben jelenti a globuláris és fibrilláris fehérje molekulák azonnali mélyreható megváltozását, nagyobb részt azonban csak azt eredményezi, hogy a fehérje láncok közötti kötések fellazulnak és ezért jobban ki vannak téve hidrolitikus, illetve enzimhatásnak.

Hasonló jelenségeket figyeltek meg a besugárzott ribonukleinsavak sugárzás utáni viszkozitás változásával kapcsolatban is.² A besugárzott ribonukleinsavak láncainak nagyrésze ugyanis szintén nem szakad szét azonnal a besugárzás után. Az oxidatív gyökök behatása azonban olyan oxidált termékhez vezet, mely fokozottabban van kitéve hidrolízisnek. Nukleinsavak esetén ezt a feltételezést alátámasztja az is, hogy a sugárzás után fokozatosan kifejlődő viszkozitás csökkenés, illetve az ezzel párhuzamosan felszabaduló foszfát mennyisége nagy dózisok esetén még 15-szöröse is lehet a közvetlen a sugárzás alatt bekövetkező hasonló változásoknak.

Fehérjék esetén a hidrogén hidak szétszakadása szükségképpen fokozza a fehérje molekula enzim hasíthatóságát is, mivel a fibrillumok közötti kötések szétnyílása következtében az enzim molekulák által megtámadható csoportok száma megnő. Az oxidáló ágensek megkötődése, illetve a sugárzás megszűnése után a peptid lánc a szénatomok körüli szabad lengés és a különféle csoportok között fellépő vonzóerők hatására újból össze is kapcsolódhat, de másképpen, mint az eredeti állapotban volt. Így megváltozik a fehérje molekula felülete, ami az enzim hasíthatóság megváltozását is maga után vonja.

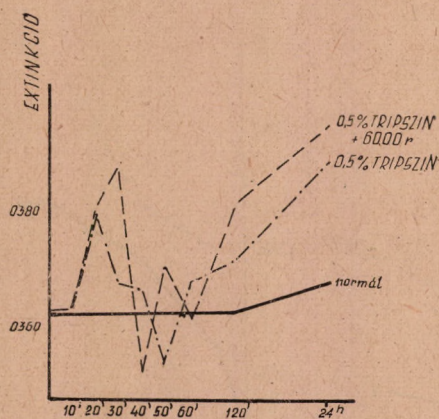
Ugyanakkor azonban éppen az elnyelt sugárenergia kicsinysége és a fehérjékben beálló változások nagysága közötti ellentét megmagyarázásánál tekintetbe kell venni azt a sugárzás kémiából jól ismert tényét is, hogy különböző vegyületeknek a vízből képződött oxidáns gyökökkel szembeni reakció kész-

sege nem azonos. Ha ezen sugárérzékenyebb molekulák károsodása enzimatiskus hatású vegyületek felszabadulásához vagy képződéséhez vezet, úgy ez a tény a fehérje oldatokban fellépő sugárzás okozta változások önmagában is magyarázatul szolgálhat. *Löwenthal és Edenstein*³ le is írják, hogy a besugárzás után az egész autolitikus ferment rendszer aktivitása megnő. *Rév és Unger*⁴ ugyancsak leírják a foszfatáz, különösen az alkálikus foszfatáz sugárzás utáni aktivitásának megnövekedését. *N. N. Sziszokjan*⁵ az élesztő fermentjeinek sugárérzékenységét vizsgálta és az 1955-ös genfi atomkonferencián beszámolt arról, hogy az invertáz és a foszfoglükomutáz közvetlenül a sugárzás után igen nagy mértékben aktiválódik.

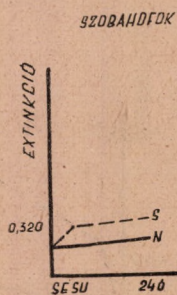
A szérum proteolitikus aktivitásának megnövekedését ezek alapján például úgy képzelhetjük el, hogy az alfa—2 frakcióban jelenlevő antifibrinolizin, vagy az alfa—1 frakcióban jelenlevő antitripszin nagyon sugárérzékeny, ezért elsősorban ezek vagy valamelyik ezek közül károsodik és inhibáló hatásuk megszűnése vezet a proteolitikus aktivitás megnövekedéséhez. Ezt alátámasztja az a tény, hogy *Kocholaty és Jensen*⁶ és velük egyidőben magyar szerzők, *Kovács, Geszti és Előd*⁷ is észlelték az antifibrinolizin titer sugárzás okozta csökkenését. Utóbbiak in vivo besugárzott nyulakon már 300—400 r hatására is kifejezett fibrinolízis növekedést észlelték és a jelenséget in vitro is reprodukálni tudták.

Ehhez hozzátehetjük, hogy a fehérjebontó enzimek víz, illetve puffer oldatban besugározva elég sugárrezisztenseknek mondhatók. Így a pepszin aktivitása *Sziszokjan*⁵ szerint 95%-ról mindössze 63%-ra esik le 125.000 r hatására, és a tripszin is csak nagyobb r dózisok hatására inaktiválódik. *Dale*⁸ szerint a kristályos karboxipeptidáz híg vizes oldatában, ha a sugárzás az enzimet szubsztrátumához kötve éri, ugyancsak sugárrezisztensnek bizonyult.

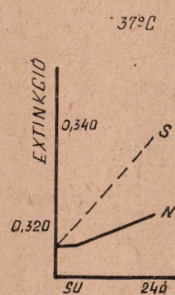
Annak bizonyítására, hogy a szérum fehérjék réz ion megkötőképessége proteolitikus enzim hatására megnő, normál és besugárzott emberi szérumhoz 0,5% tripszint (Merck) adtunk. A réz ion megkötőképesség, amint az az alábbi ábrán látható, mindkét esetben erőteljes kezdeti ingadozás után nagymértékben emelkedik.



1. ábra.



2/a. sz. ábra.



2/b. sz. ábra.

A szérumfehérjékben sugárzás hatására bekövetkező változások oka feltehetően abban kereshető, hogy:

1. a besugárzott szérumfehérjékben a hidrogén hidaknál és egyéb helyeken történő oxidációk következtében a fehérje láncok közötti kötések felszakadnak;

2. a besugárzott szérumfehérjék az enzimatis lebonatásnak vagy spontán kémiai hidrolízisnek jobban ki vannak téve;

3. a szérum enzimatis aktivitása sugárzás következtében feltehetően fokozódik.

Jelen cikkünkben leírt vizsgálatainkkal a besugárzott szérumfehérjék általunk már közölt változásainál fellépő folyamatok tisztázásához igyekeztünk közelebb jutni.

Módszer.

A röntgen besugárzásnál és a biuret vizsgálatoknál előző cikkünkben leírt módszert alkalmaztuk.

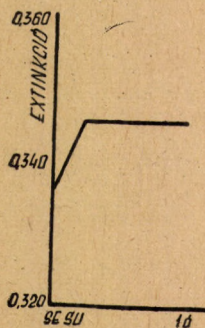
Az elektronokkal való besugárzást a KFKI Van de Graaf generátorával végeztük 700 Kv és 2000 rep/sec adagteljesítménnyel, 0,5 ml szérummal, 3 mm folyadék réteg vastagság mellett. A sugárdózis nagysága kb. 6000 r volt.

Eredmények.

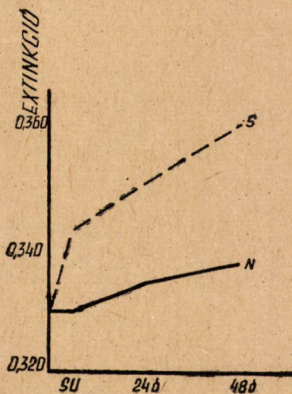
1. A besugárzott natur szérumok a besugárzás után 24 órán át szobahőfokon, illetve 37° C-on tartva az alábbi átlaggörbét adták:

Mint az a 2/a ábrából látható, a sugárzott és a nem sugárzott szérum réz ion megkötőképessége szobahőfokon a sugárzott szérum közvetlen sugárzás utáni réz ion megkötőképesség növekedésétől eltekintve közel azonos. 37° C-on (2/b ábra), mindkét görbe fokozottabb réz ion megkötőképességet mutat.

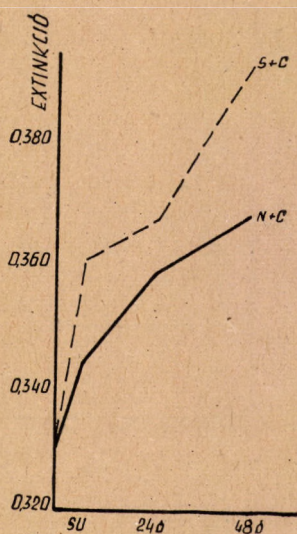
2. Mivel a sugárzás utáni (az ábrákon SU-val jelzett pontok) méréseket általában a sugárzás megkezdése után kb. 1 órával végeztük, (6000 r-t röntgenkészülékünk 18 perc 45 mp alatt adott le, a biuret reagenst kb. a 30. percben adtuk a szérumhoz), feltehető volt, hogy ez alatt az idő alatt enzimatis hatások is felléptek. Annak felderítésére, hogy a változás mennyiben lehetett, illetve



3. ábra.



4/a. sz. ábra.



4/b. sz. ábra.

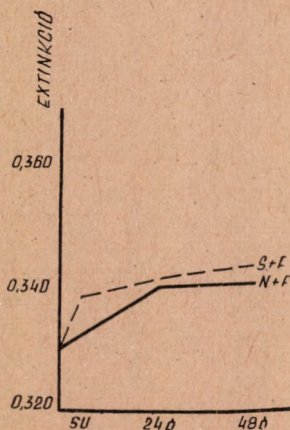
mennyiben nem lehetett enzimátikus, nagy adagteljesítményű (2000 rep/sec) Van de Graaf generátorral sugároztuk be a szérumot. A besugárzás ebben az esetben mindössze 3 mp-ig tartott és a 10. mp-ben már hozzáadtuk a szérumhoz a biuret reagenst. Ily módon a 3. sz. görbét kaptuk.

Mint láthatjuk, a sugárzás után bekövetkező réz ion megkötőképesség növekedés nagyrésze már a sugárzás pillanatában bekövetkezik, tehát ez semmi esetre sem enzimátikus folyamat.

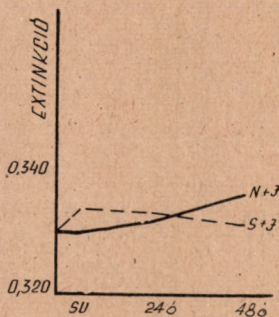
3. A sugárzás hatására 37° C-on bekövetkező inkubációs változások enzimátikus jellegének tisztázására a szérumhoz 0,5% ciszteint adtunk. A 4/a ábra a cisztein nélküli, a 4/b ábra a ciszteint is tartalmazó szérumok réz ion megkötőképességét mutatják.

Miután kíváncsiak voltunk arra, hogy nem emeli-e meg a cisztein hozzáadása sugárzás nélkül is a szérum réz ion megkötőképességét, a sugárzatlan szérumhoz is 0,5% ciszteint adtunk. Mint a 4/b ábrán látható, a cisztein sugárzás nélkül is megnöveli a szérumfehérjék réz ion megkötőképességét.

4. A feltételezett enzimhatás gátlására a szérumokhoz $3 \cdot 10^{-4}$ M koncentrációban nátriumfluoridot, illetve monojódecetsavat adtunk. Ezen kísérlet eredményeit az 5/a és 5/b ábrák szemléltetik.



5/a. sz. ábra.



5/b. sz. ábra.

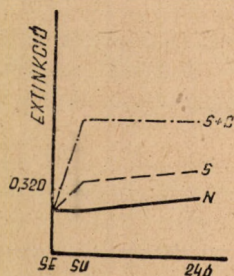
Láthatjuk, hogy a nátrium fluorid nagymértékben, a monojódecetsav pedig gyakorlatilag teljesen kivédte a sugárzás hatását, kivéve a sugárzás után közvetlenül bekövetkező változások egy részét, melyekről a 2. pontban megállapítottuk, hogy nagyrészt nem is lehetnek enzimátikus változások. Az, hogy a nátrium-fluorid és a monojódecetsav a közvetlen sugárzás utáni változásokat nem tudja kivédeni, ezt a megállapításunkat csak alátámasztja.

5. A közvetlen sugárzás utáni változásokat közelebbről vizsgálva azt látjuk, hogy a cisztein szobahőfokon is megemeli a szérum sugárzás utáni réz ion megkötőképességét (6/a ábra). Mint a 6/b ábra mutatja, a cisztein ezen hatása a sugárzatlan szérumnál is megvan.

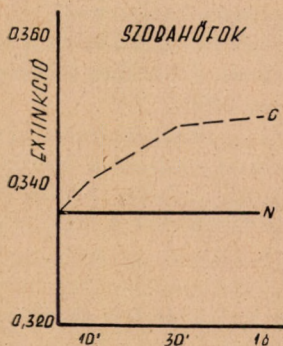
6. A cisztein 6/a és 6/b ábrán látható hatása nem enzim aktivációs alapon történik, ugyanis akkor is bekövetkezik, ha a ciszteint is tartalmazó szérumhoz

enzim inhibitoráló nátriumfluoridot vagy monojódecetsavat adunk. Ezeket a kísérleteket a 7/a és 7/b ábrán láthatjuk.

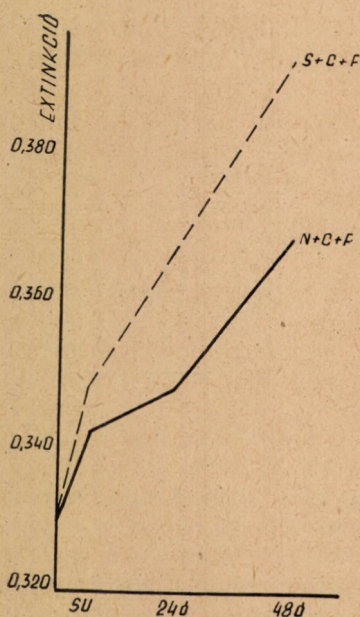
A nátriumfluoridot és a monojódecetsavat itt is $3 \cdot 10^{-4}$ M mennyiségben adtuk a 0,5% ciszteint tartalmazó szérumokhoz. A 7/b ábrát 4/b ábrával összehasonlítva láthatjuk, a monojódecetsav practice kivédte a cisztein inkubáció



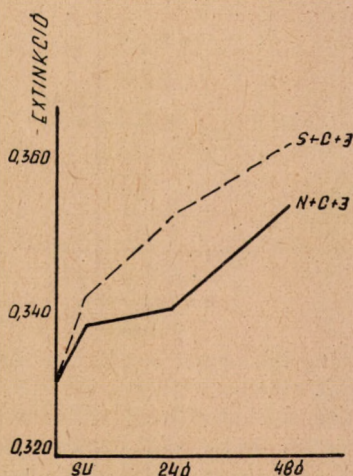
SZODAHŐFOK
6/a. sz. ábra.



6/b. sz. ábra.



7/a. sz. ábra.



7/b. sz. ábra.

alatt bekövetkező enzim aktiváló hatását. Ez a kísérlet egyben választ ad a cisztein és a nátriumfluorid, illetve a monojódecetsav között az inkubációs szakaszban fennálló viszonyra is. Úgy látszik, a cisztein a proteolizáló enzim ugyanazon csoportját aktiválja, mint amelyet a monojódecetsav inhibitoráló. Külön ki kell emelni, hogy a monojódecetsav ezt az erélyes inhibitoráló hatását a 0,5%-ban,

azaz 4.10^{-2} M koncentrációban jelenlevő ciszteinnel szemben mindössze 3.10^{-4} M koncentrációban fejti ki. Ezzel szemben a nátriumfluorid gyakorlatilag nem tudja a cisztein enzim aktiváló hatását befolyásolni, (4/b és 7/a ábra) jóllehet cisztein távollétében eredményesen csökkentette a sugárhatásra bekövetkező réz ion megkötőképesség növekedést.

Megvitatás.

I. A sugárzás után közvetlenül mért változások nem enzimatiszus változások, mivel:

1. 10 mp-en belül teljesen lejátszódnak;
2. enzim inhibitorokkal nem szüntethetők meg.

Ezek a változások a fehérje láncok közötti hidak szétoxidálódásának és a láncok ezt követő szétnyílásának eredményei. A láncok ezen szétnyílását a cisztein azzal segíti elő, hogy a kezdődő lánc szétnyílás folytán a molekula felszínére kerülő aktív SH csoportokba velük S—S kötést képezve beköt. Ezzel szétfeszített állapotban rögzíti a szétnyíló láncot, és annak újra összezáródását megakadályozza, sőt ez a szétfeszített állapot további lánc szétlazulások forrása lehet.

A cisztein ezen hatása szorosan összefügg a *Paszünszkij*⁹ által észlelt jelenléttel. *Paszünszkij* S³⁵-tel jelzett metionint adott a sugárzás előtt a szérumhoz és azt észlelte, hogy a sugárzás után már 400 r dózis esetén is észrevehetően több metionin kötődött meg a fehérjékhez, mint sugárzás nélkül. A metionin ezen sugárzás utáni fokozottabb megkötődése cisztein jelenlétében csökken, mivel ebben az esetben a cisztein kötődik meg a fehérjék sugárzás hatására felszabaduló aktív csoportjain.

II. A sugárzás után csak 37° C-on bekövetkező inkubációs változások enzimatiszus jellegű proteolitikus változások, mivel:

1. szobahőfokon nem következnek be;
2. cisztein hozzáadásával növelhetők;
3. enzim inhibitorokkal csökkenthetők.

Az észlelt elváltozásokkal kapcsolatban figyelemreméltónak tartjuk, hogy az általunk vizsgált 0,5% cisztein (4.10^{-2} M) minden esetben nem hogy csökkentette volna, hanem megemelte a sugárzás réz ion megkötőképességét emelő hatását. Ezzel kapcsolatban kísérleteket végeztünk és azt találtuk, hogy a cisztein csak bizonyos koncentráció (kb. 5.10^{-3} M) alatt fejti ki védőhatását, növelve a koncentrációt 10^{-2} M fölé, nemhogy csökkentené, hanem emeli a sugárzás hatását. Ezen eredményeinkről külön cikkben számolunk be. Hasonló adatokat közöl a ciszteinre K. *Flemming*¹⁰ is, röntgenhemolizis vizsgálataival kapcsolatban.

Hogy az I—II. alatt leírt változások a fehérjék egyes frakcióin milyen mértékben játszódnak le, valamint, hogy az enzimatiszus hatásokért felelős enzim vagy enzimek melyik fehérje frakcióhoz tartoznak, további kutatás tárgyát képezik.

Összefoglalás:

Megállapítottuk, hogy a kis dózissal (max. 10.000 r) besugárzott szérumokban közvetlenül a sugárzás után fellépő réz ion megkötőképesség növekedés annak következménye, hogy a sugárzás hatására a vízből képződött oxidáns gyökök a fehérje láncok közötti összetartó erőket csökkentik és lehetővé teszik,

hogy új aktív csoportok kerülhessenek a fehérje molekula felületére. A sugárzásnak ez a hatása ciszteinnel növelhető.

Megállapítottuk továbbá, hogy a besugárzott szérumokban 37° C-on történő inkubálás hatására bekövetkező változások feltehetően enzimatiskus jellegűek, mivel ciszteinnel aktiválhatók, nátriumfluoriddal és monojódecetsavval inhibíthatók.

Köszönetünket fejezzük ki *Straub F. Bruno* akadémikusnak a munkánkban nyújtott értékes támogatásáért.

IRODALOM:

1. *Vincze*: Katonaorvosi Szemle, 9. 921. (1955) — 2. *Scholes és Weiss*: Nature, 17, 920—923. (1953) — 3. *Löwenthal és Edenstein*: Fermente, Hormone und Vitamine, 31. (1908) — 4. *Rév és Unger*: Kísérletes Orvostudomány, 3, 6 (1951), 4, 6 (1952), 6, 1, 27 (1954). — 5. *N. M. Sztzokjan*: Gyejtsztvije oblucsénia na organizm. 137—157 AN SZSZSZR, Moszkva, 1955. — 6. *Kocholaty és Jensen*: Proc. Soc. Exp. Biol. Med 80, 36, 1952. — 7. *Kovács, Geszti, Előd*: Honvéderorvos, 9, 859—865. (1952). — 8. *Dale*: Biochem. Journ. 36, 80. (1942). — 9. *A. G. Pasziünszkij, M. Sz. Volkova és V. P. Blohina*: DAN. 101, 2, 317—320. (1955). — 10. *K. Flemming*: Naturwissenschaften 43, 87—88. (1956).

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

ВЛИЯНИЕ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ НА БЕЛКИ СЫВОРОТКИ

2.

Роль протеолитических энзимовых эффектов при изменении белков сыворотки после их облучения *in vitro*

Авторами устанавливается, что увеличение связываемости Си-ионов в сыворотках после облучения малыми дозами (макс. 10.000 г), является следствием того, что окислительные радикалы, освобождающиеся из воды под влиянием облучения уменьшают связывающие силы между белковыми цепями и обеспечивают возможность связыванию новых активных групп на поверхности белковых молекул. Настоящее влияние облучения увеличивается цистеином.

Устанавливалось далее, что изменения в облученных сыворотках под влиянием их хранения при 37° C-ов являются энзиматическими, они активизируются цистеином и ингибируются флюоридом натрия и монойодовой уксусной кислотой.

*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

II. *Über den Einfluss der proteolytischen Enzyme auf die Veränderungen der in vitro bestrahlten Serumproteine*

Verff. stellten fest, dass in den mit kleinen Dosen (maximal 10 000 r) bestrahlten Seren unmittelbar nach der Einwirkung zu beobachtende Steigerung der Kupferbindungsfähigkeit dadurch zu erklären ist, dass die infolge der Bestrahlung aus dem Wasser entstehenden oxydierenden Radikale auf die zusammenhaltenden Kräfte in den Eiweissketten lähmend wirken und ermöglichen, dass neuere aktive Gruppen auf die Oberfläche des Eiweissmoleküls gelangen. Diese Strahlenwirkung kann durch Cystein gesteigert werden.

Sie stellten weiter fest, dass die in den bestrahlten Seren nach einer Inkubation bei 37° C auftretenden Veränderungen enzymartigen Charakter tragen und durch Cystein aktiviert, bzw. durch Natriumfluorid und Monojodessigsäure inhibiert werden können.