

A váz- és szívizom adenozeindeamináz-aktivitásának változása kísérletes organofoszfát-mérgezésben

Néhány évvel ezelőtt megjelent közleményünkben (1) részletesen beszámoltunk a váz- és szívizomzat dimetilaminociánfoszforsavetilészter-mérgezés hatására bekövetkező adenozeintrifoszfát-tartalmának változásáról. Megállapítottuk, hogy míg a vázizomzat adenozeintrifoszfát-tartalma a mérgezés hatására szignifikánsan csökken, a szívizomzaté ugyanakkor szignifikánsan növekszik. Említett közleményünkben azonban nemcsak ennek a nagyenergiájú foszfagénnek a vizsgálatával foglalkoztunk, hanem tanulmányoztuk a mérgezés következtében fellépő EKG-, vérnyomásváltozásokat is, és hisztológiai bizonyítékát szolgáltattuk a szívizomzatban létrejövő mikrotrombusok, véresek keletkezésének. Az utóbbi évek elméleti biokémiai, izomélettani és klinikai enzimológiai kutatásai élénk figyelmet szentelnek az adenozeindeamináz-aktivitás jelentőségének. Ezen a területen jelentős munkát végeztek magyar kutatók (*Straub és m.társai*, 2,3). Tekintve, hogy az adenozeindeamináz-aktivitás meghatározásának metodikája is lényegesen egyszerűsödött és klinikai kémiai diagnosztikai módszernek is ajánlják (4,5), célszerűnek véltük régebbi kísérleteink továbbfolytatását. Mostani kísérletsorozatunkban megvizsgáltuk, hogy metilfluorfoszfonsavizopropilészter-mérgezés után a váz- és szívizomzat adenozeindeamináz-aktivitása hogyan változik meg.

Kísérleteinkhez 60 db 180—200 g súlyú Wistar eredetű nőstény patkányt használtunk.

a) 30 patkányt dekapitálással elvéreztettünk, azonnal felboncolva őket, a mellkasból a szívet kivettük, üregeiből a vér maradékát kimostuk, szűrőpapírral megtörülgetve a nedves szövet centigramm-pontossággal lemértük, tengeri homokkal dörzsmozsárban homogenizáltuk és tízszeres térfogatmennyiségre (w/v arány) fiziológiás sóoldattal felhígítottuk. Ezzel a művelettel egyidőben a comb dorzális felszínén a bőrt felvágva a comb izomzatából, minden egyes állat azonos izomcsoportjaiból összesen 1,00—1,00 g-os darabokat vettünk ki, ugyancsak tengeri homokkal homogenizáltuk és fiziológiás sóoldattal tízszeres térfogatmennyiségre kiegészítettük. Öt percnyi ülepedési idő után a szupernatánsból végeztük a kémiai meghatározást.

Ezek az állatok képezték a normál kontroll-csoportot.

b) *A mérgezett állatok csoportja* ugyancsak 30 tagból állott. 0,1 ml Sarint 9,9 ml alkoholban oldottunk, majd ebből az alkoholos törzsoldatból desztillált vízzel 10 μ g/ml végkoncentrációjú oldatot készítettünk, a mérgezést ezzel az oldattal végeztük, úgyhogy 50 μ g/kg dózisnak megfelelő mennyiséget (0,5 ml/100 g testsúly) adunk az állatoknak intraperitoneálisan. Ezt az adagot 5—8 percenként addig ismételtük, míg heves, az egész testre kiterjedő tonikoklonikus görcsrohamok fel nem léptek. Négy-öt ízben adott injekció (200—250 μ g/kg összdózis) után heves görcsök közepette, a klinikai halál beállta előtt, dekapitáltuk az állatokat, vérüket, amennyire csak lehetett, kifolyat-

tuk. A továbbiakban a szív és vázizomzat kivételét és feldolgozását illetően ugyanúgy jártunk el, mint az előbb, a normál kontroll csoport állatai esetében.

c) Kémiai meghatározás

α Elve: Az adenozinból az adenozindeamináz hatására irreverzibilisen inozin lesz, miközben ammónia szabadul fel. A felszabaduló ammónia mennyiségét meghatározva (4,7.) következtethetünk a ferment aktivitására (lásd: 3. sz. ábra).

β . Szükséges oldatok.

1. Szubsztrát-oldat: 20 mg adenoztint (Adenosine „Reanal”) oldunk 100 ml 0,2 mol/l 6,8 pH-jú foszfátpufferben (káliumdihidrogénfoszfát és nátriumhidrogénfoszfát). Frissen készítendő!

2. Fenol-reagens: 5 ml fenolhoz (Phenolum liquidum) 100 desztillált vizet adunk, ebben 25 mg nitropusszidnátriumot oldunk és 200 ml-re egészítjük ki desztillált vízzel. Lehetőleg frissen készítendő!

3. Hipoklorit-reagens: 18 g nátrium hidroxidot 150 ml desztillált vízben oldunk és hozzáadunk 2 ml hipoklorit-oldatot („Hypo”) és desztillált vízzel 200 ml-re ki egészítjük. Frissen készítendő!

4. Standard törzs-oldat: 472 mg p. a. minőségű ammóniumsulfátot 10 ml desztillált vízben oldunk. Ez az oldat jól tárolható. A meghatározáshoz frissen készített 1:100 arányú hígítást használunk. Ennek az oldatnak 1 ml-e felel meg 10 μ g ammónia-nitrogénnek.

Megjegyzés: valamennyi oldat készítéséhez és a továbbiakban a reakciókhoz is inocerélo gyantán átszűrt, majd üvegrendszerből kétszer frissen desztillált vizet használtunk.

γ . Kivitelezés:

Négy csöbe 0,5—0,5 ml szubsztrát-oldatot mérünk. Az 1. és 2. cső a vizsgálathoz, a 3. és 4. cső a vak-érték meghatározásához szükséges. Az 1. és 2. csőhöz a vizsgálandó szervhomogenizátumból 0,1 ml-t adunk és mind a 4 csövet egy óra időtartamra 37 C° (\pm 0,1 °) hőmérsékletű vízfürdőbe tesszük. Egy óra elteltével valamennyi csőhöz 2,0 ml fenolreagenst adunk, a 3. és 4. csöbe ezenkívül 0,1 ml desztillált vizet mérünk. Ezután valamennyihez 2,0 ml hipoklorit-reagenst pipettázunk és a csöveket 20 percre 37 C°-os vízfürdőbe helyezzük, majd lehűtjük. A mérést Pulfrich-féle Stufenfotométerrel végezzük, 1 cm rétegvastagságú kuvettát és S—57-es színszűrőt használva, víz-vak ellenében.

δ . Számítás:

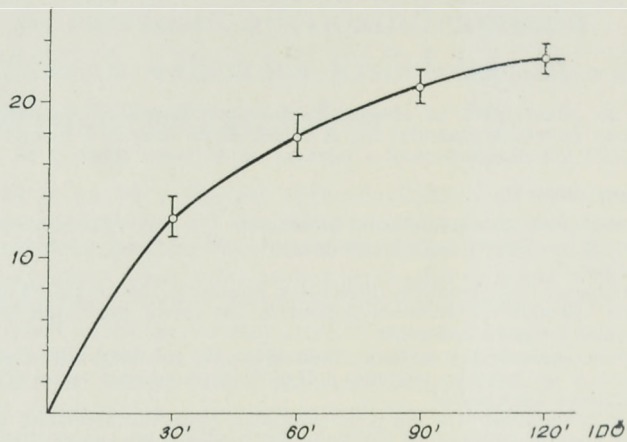
Adenozindeamináz-aktivitás: E vizsg. — E vak \cdot f. 0,57 = ... IU. A f (faktor) értékének meghatározása a következőképpen történik: 3 csöbe 0,05 ml 1:100 hígítású ammóniumsulfát standard-oldat, 3 csöbe pedig ugyanennyi desztillált víz (reagens-vak) kerül a szervhomogenizátum helyett. A reakciót elvégezve az inkubálás (20 perces) és lehűtés után víz ellenében 1 cm-es rétegvastagságú kuvettában S—57 szűrőn fotometráljuk.

$$f = \frac{\text{Standard koncentráció}}{E_{\text{standard}} - E_{\text{reagensvak}}}$$

Tekintve, hogy a szokásos metodikától két helyen térünk el, a nyert értékek esetében még egy szorzószámot kellene alkalmaznunk. Nevezetesen: 1. a vizsgálandó szerv tízszeres hígítását (homogenizátumát) használtuk; 2. nem 0,05 ml, hanem 0,1 ml aktivitását határoztuk meg, logikus lenne, hogy a nyert értéket 5-tel szorozzuk. Ettől jelen esetben mégis eltekinthetünk, mert összehasonlító vizsgálatokat végeztünk, relatív értékekkel dolgoztunk. Csupán az ábrákon tüntettük fel, hogy a kapott értékek az IU-érték 0,2-szerese, az az egyötöde — elvben!).

d) A vizsgálatsorozat megkezdése előtt fermentkinetikai vizsgálatokat végeztünk. 5 patkányból 5 g izmot vettünk ki és a leírt metodikának megfelelően — de ötszörös mennyiségű szubsztrátot és homogenizátumot inkubálva

$1U \cdot g^{-1} \cdot 0,2$



1. sz. ábra: Az adozindeamináz aktivitása az idő függvényében

30—60—90—120 perc múlva az inkubátumból alikvotokat vettünk ki és elvégeztük a reakciót. Eredményeinket az 1. sz. ábra tünteti fel. A kapott görbe lényegében megfelel a monomolekuláris enzimreakciók szokásos görbepéldájának (7).

Eredményeink és azok megbeszélése

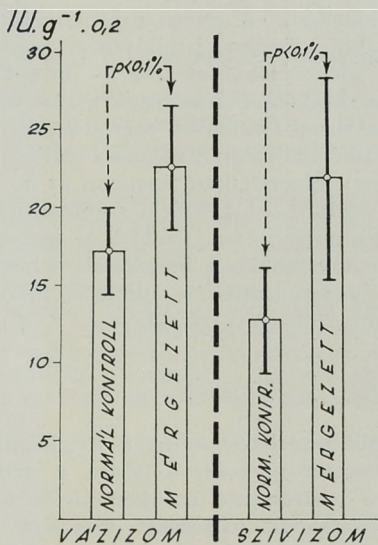
Vizsgálataink eredményeit az 1. sz. táblázaton, illetve a 2. sz. ábrán tüntetjük fel. Mint az ábrából is jól látható, a mérgezés hatására mind a vázizomzat, mind a szívizomzat adozindeamináz-aktivitása jelentősen megnő. Ennek a növekedésnek a magyarázatára több hipotézis állítható fel. Tény, hogy

1. sz. táblázat

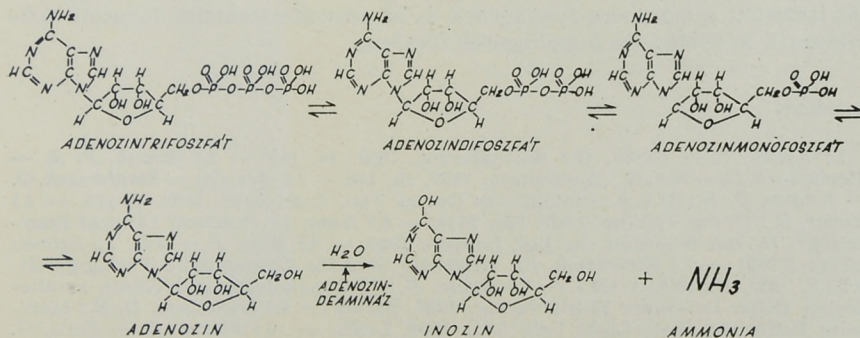
Biometriai jellemzők	Vázizom		Szívizom	
	norm. kontroll	mérgezett	norm. kontroll	mérgezett
n	30	30	30	30
\bar{x}	17,22	22,60	12,85	21,97
$\pm s$	$\pm 2,89$	$\pm 4,11$	$\pm 3,48$	$\pm 6,63$
$\bar{x} + s$	20,11	26,71	16,33	28,60
$\bar{x} - s$	14,33	18,42	9,37	15,34
p	p < 0,1%		p < 0,1%	

A váz- és szívizomzat adozindeamináz aktivitásának változása metilfluor-foszonsav-izopropilészter-mérgezésben

a bevezető részben idézett közleményünk (1) megírásakor nehezen találhatunk magyarázatot olyan ellentétes folyamat indokolására, mint amilyent ott volt alkalmunk észlelni — azaz a vázizomzat csökkent adenzintrifoszfát-tartalmával szemben a szívizomzaté emelkedett a mérgezés hatására. Már akkor megállapítottuk, hogy az organofoszfát-mérgezések során a szervezet biokémiai folyamataiban több, mélyreható változás történik, és a klasszikus szemlélet, a kolinszteráz-bénító hatás, bizonyos fogig revizióra szorul. Habár a kórfolyamat középpontjában tagadhatatlanul a kolinszteráz-inhibitor hatás áll, még egyéb tényezők is befolyásolják a patológiai folyamatot. Jelen esetben az adenzindeamináz aktivitásának változását, növekedését mutatuk ki. Hogy ez a jelenség a mérgezési kórfolyamat során hogyan kapcsolódik a szervezet, nevezetesen az izomzat és szívizomzat energetikai folyama-



2. sz. ábra: Az 1. sz. táblázat adatainak grafikus ábrázolása



3. sz. ábra: Az ATP-ADP-AMP-Adenozin-Inozin lánc

tába, nem lehet világosan tudni. *Rigó és mtsai* (6) kimutatták, hogy kardio-vazopatógén diéta hatására a szívizomzatban infarktuskok keletkeznek, az infarktus közvetlen környékén az adenzin trifoszfát-tartalom csökken, de a távolabbi areában erősen fokozódik. Ennek a megfigyelésnek az ismeretében előző észlelésünkre, a szívizomzat adenzin trifoszfát-tartalmának növekedésére bizonyos fokig magyarázatot kapunk. Feltételezhető, hogy a biokémiai meghatározás során ezt az abszolút mennyiségi változást észleltük. Az adenzindeamináz változásának — növekedésének — magyarázata az előbbiekből részben következik. Ez az a ferment, amelynek hatására az adenzinből, ammónia felszabadulása mellett, irreverzibilisen inozin lesz (3. sz. ábra). A vázizomzatban a nagyfokú, sok energiát igénylő izommunka miatt az elbomló adenzin trifoszfát — difoszfát — monofoszfát — adenzin-lánc feltartóztathatatlanul tovább halad az inozin irányában, az adenzindeamináz aktivitása szükségszerűen növekszik. A szívizomzatban részben ellentétes folyamat zajlik le — legalábbis részben, a mikroinfarktuskóktól távolabbi területen az adenzinből — adenzin monofoszfát — difoszfát — trifoszfát keletkezik, de az infarktus közvetlen környezetében a vázizomzathoz hasonló energiát igénylő, a makroerg fosztagént degradáló folyamat megy végbe és ennek a jelenségnek biokémiai megnyilvánulását látjuk az emelkedett adenzindeamináz-aktivitásban. Elgondolható azonban az is, hogy az észlelt jelenség a szívizomzatban lezajló, a lokalizáció szempontjából is ellentétes biokémiai folyamatok megnyilvánulása. Ezekből a teoretikus alapokból kiindulva érdemes lenne a továbbiakban biokémiai és hisztokémiai módszerekkel vizsgálni a szív- és vázizomzatban a különböző foszfatázok és foszfokinázok viselkedését organofoszfát-mérgezésekben.

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerző egy régebbi kísérletsorozatában megállapította, hogy *dimetilaminociánfoszforsavetilésztér-mérgezés* hatására a szív adenzin trifoszfát-tartalma növekszik, a vázizomzaté csökken. Jelen kísérletsorozatában az adenzindeamináz aktivitásának változását vizsgálta *metilfluorfoszforsav-izopropilésztér-mérgezésben*. Megállapította, hogy a ferment aktivitása mind a szív, mind a vázizomzatban a mérgezés hatására szignifikánsan növekszik. A régebbi és jelen kísérletsorozat közötti összefüggést vizsgálva elgondolását ismerteti a makroerg fosztagének és az adenzindeamináz fokozott aktivitásának feltételezhető összefüggését illetően.

Irodalom

- 1.) Kenéz, I. — Dávid, G.: *Honvédervos*, 1962. 14, 155. — 2.) Straub, F. B. — Stephaneck, O. — Acs, G.: *Biokhímia*, 1957, 22, 118. — 3.) Acs, Gy. — Stephaneck, O. — Straub, F. B.: *M.T.A. Biológiai és Orvosi Tud. Oszt. Közl.* 1958. 8, 118. — 4.) Hevér, Ö.: *Orvosi Hetilap*, 1967. 108, 2034. — 5.) King, J.: *Practical Clinical Enzymology*, D. van Nostrand Co. Ltd, London, 1965. — 6.) Rigó, J. — Sós, J.: *Szöbéli közlés* (1968) — 7.) Richterich, R.: *Klinische Chemie*, Akademische Verlagsgesellschaft, 1965, Frankfurt (M.) — 8.) Städe, K.: *Pharmakologie und Klinik synthetischer Gifte*, Deutscher Militärverlag, 1964, Berlin. — 9.) Nicholson, D. E.: *Metabolic Pathways*, Koch-Light Lab. Ltd., 1966, Leds. — 10.) Marré, E. — Forti, G. — Cocucci, S. — Ferrini, B. — Elviri, B. — Michal, G.: *Biochemical Pathways*, Bohringer Soehne GMBH, Mannheim. 1965.

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ АДЕНОЗИНДЕАМИНАЗЫ В СКЕЛЕТНОЙ И СЕРДЕЧНОЙ МУСКУЛАТУРЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТРАВЛЕНИИ ФОВ

В прежней серии опытов автор установил, что при отравлении Диметиламиноциано-фосфоркислотный-этилэстерон содержание аденозинтрифосфата в сердечной мускулатуре увеличивается, а в скелетной мускулатуре — уменьшается. В настоящей серии опытов автор исследовал изменение активности аденозиндеаминазы при отравлении Метилфлуорфосфонкислотный-изопропилэстером. Он установил, что активность фермента при отравлении увеличивается и в сердечной и в скелетной мускулатуре. Сопоставляя раннюю и настоящую серию опытов автор излагает свои соображения о возможной связи макроэргических фосфагенов и усиленной активности аденозиндеаминазы.

Dr. G. Dávid, Oberstl. d. Med. D., Kandidat d. Med. Wissensch.:

VERÄNDERUNGEN DER ADENOSINDEAMINASE-AKTIVITÄT DES SKELETTMUSKELS UND HERZMUSKELS IN EXPERIMENTELLER ORGANOPHOSPHAT-VERGIFTUNG

In einer früheren Versuchsreihe stellte Verfasser fest, dass nach einer Dimethylaminocyan phosphorsäureäthylester-Vergiftung erhöht sich der Adenosinphosphat-Gehalt im Herzen, sinkt dagegen im Skelettmuskel. In der vorliegenden Versuchsreihe untersuchte er die Veränderungen der Adenosindeaminase-Aktivität in methylfluorphosphorsäureisopropylester-Vergiftung. Es liess sich festlegen, dass unter der Einwirkung der Vergiftung erhöht sich signifikant die Fermentaktivität sowohl im Herzmuskel als auch im Skelettmuskel. Anhand der Analyse von Korrelation zwischen der früheren und gegenwärtigen Versuchsreihe erörtert Verfasser seine Überlegungen in Bezug auf die vermutlichen Zusammenhänge der makroergischen Phosphagenen und die erhöhte Adenosindeaminase-Aktivität.