

Dr. Bodó Katalin, dr. Rónai Éva, dr. Horváth Győző orvos őrnagy

Thrombocyta MAO aktivitásának vizsgálata sugárvédő vegyületek és besugárzás mellett

Érkezett: 1987. 10. 01.

Kulcsszavak: thrombocyta, MAO, AET, WR 2721, besugárzás

A szerzők két sugárvédő vegyület, az AET, illetve a WR 2721 nyúl thrombocyta MAO aktivitására gyakorolt hatását vizsgálták in vitro. Megállapították, hogy míg az AET koncentráció-függően gátolta az enzim aktivitását, addig a WR 2721-nek nem volt ilyen jellegű hatása.

További munkájuk során megállapították, hogy a WR 2721 intraperitoneális adása után a korai időpontokban csökkent a nyúl thrombocyta MAO aktivitása. Meghatározták azt is, hogy a vegyület tovább fokozta az ionizáló sugárzás letális dózisa okozta enzimaktivitás-csökkenést.

Ismeretes, hogy a vérlemezke monoaminoxidáz (MAO; E.C.1.4.3.4) aktivitása jó információt nyújt a központi idegrendszer aktuális monoaminerg aktivitásáról (1,2,3,4). A thrombocyta MAO-jának ezt a tulajdonságát kihasználva a humán orvosi gyakorlatban, elsősorban bizonyos pszichés eredetű kórképek diagnosztizálása során meghatározzák az enzim aktivitását is.

Számos központi idegrendszeri hatással rendelkező szerről ismert, hogy megváltoztatja a thrombocyta MAO aktivitását (5,6,7,8). Nem találtunk adatokat arra vonatkozóan, hogy bizonyos centrális hatásokkal is rendelkező sugárvédő vegyületek megváltoztatják-e a vérlemezke MAO aktivitását. Továbbá nem ismeretes az sem, hogy az ionizáló sugárzás letális dózisa, mely szintén okoz centrális tüneteket is (pl. adynamia, emesis stb.) befolyásolja-e az enzim aktivitását.

Ezért vizsgáltuk, hogy a nyúl thrombocytához in vitro hozzáadott két ismert sugárvédő vegyület, nevezetesen az AET (S²-aminoethyl-isothiuronium Br HBr), illetve a WR 2721 [S-2(3-aminopropyl-aminoethyl) tiofoszfát] miként befolyásolja az enzim aktivitását.

További munkánk során meghatároztuk azt is, hogy letális dózisu egésztest-besugárzás után a WR 2721-gyel történt ip. kezelés, illetve a kettő együttesen miként befolyásolja a nyúl thrombocyta MAO aktivitását.

Anyag és módszer

Mivel az irodalomban a thrombocytából történő enzimaktivitás-mérésre leírt módszerek (9, 10, 11) csak humán vérlemezke MAO meghatározására vonatkoztak, azok alapján magunk dolgoztunk ki olyan eljárást, mellyel nyúl thrombocyta MAO aktivitását megbízhatóan mérni lehet.

Kísérleteink során 30 db 2,5–3,0 kg súlyú hím magyar vadas nyulat (LATI, Gödöllő) használtunk fel. Szívpunkcióval nyert vérből 15 percig 1000 g-vel történt centrifugálás után thrombocytában dús plazmát (*platelet rich plasma*, PRP) nyertünk.

2-2 ml PRP-t tovább centrifugáltunk 15 percig 2400 g-n, majd a felülészót elöntöttük. A kiülepedett thrombocytákat újra szuszpendáltuk 0,3 M Mannit-oldatban, majd az enzimaktivitás meghatározásáig -20°C -on tároltuk azt. 24 óra múlva a thrombocytákat szobahőmérsékleten hagytuk felolvadni, majd ezután történt az enzim aktivitásának meghatározása.

A mérés menete a következő volt: 0,5 ml thrombocyta szuszpenziót 0,7 ml 0,2 M TRIS pufferben ($\text{pH} = 7,4$) inkubáltuk növekvő koncentrációjú (35 nM–1400 nM) kinuraminnal [Kynuramine; (3-/2-Aminophenyl/-3-oxopropanamine) SIGMA]. 120 perces 37°C -on történt inkubálás után 0,6 M perklórsavval állítottuk le az oxidációt. Ezt követően 10 percig 2400 g-vel centrifugáltuk az oldatokat. A felülészó 1 ml-ét 3 ml 1N NaOH-ba tettük. A kinuraminból a MAO által oxidált 4-hidrokinolin (4HQ) koncentrációját PERKIN—ELMER MPF 44B spektrofluoriméteren mértük, 315 nm gerjesztési hullámhossznál. Az emissziós hullámhossz 385 nm volt. Az enzimaktivitás meghatározásához szükséges fehérjetartalom mérését biuret reakcióval végeztük el. Az enzimaktivitás mértékét a képződött 4HQ nM·mg protein⁻¹·min⁻¹ formában fejeztük ki.

Lineweaver—Burk-diagram alapján határoztuk meg a Michaelis—Menten-konstanst, a K_M -értéket, azaz azt az optimális kinuramin koncentrációt, mellyel thrombocytából a MAO aktivitását mérni lehet (1. sz. ábra). Ez az érték $6 \cdot 10^{-8}$ M-nak adódott, így a további mérések során ezzel a szubsztrát koncentrációval dolgoztunk.

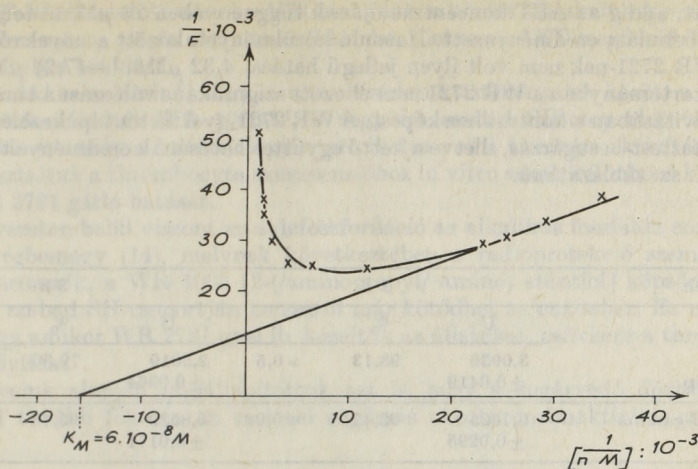
A megfelelő módszerrel a következőket vizsgáltuk:

1. AET és WR 2721 hatása a nyúl thrombocyta MAO aktivitására in vitro;
2. 300 mg/kg WR 2721 ip. adása 6,0 Gy egésztest-besugárzás, valamint a kettő együttes hatása a nyúl thrombocyta MAO aktivitására.

Az in vitro mérések során a thrombocyta szuszpenzióhoz adtuk az AET-t 2,5 $\mu\text{M}/\text{ml}$ —20 $\mu\text{M}/\text{ml}$, illetve a WR 2721-t 4,32 $\mu\text{M}/\text{ml}$ —17,24 $\mu\text{M}/\text{ml}$ koncentrációban.

300 mg/kg WR 2721-gyel történt ip. kezelés után 1 óra és 3 óra múlva szívpunkcióval vért vettünk, izoláltuk a thrombocytákat és mértük a MAO aktivitásukat. 6,0 Gy ^{60}Co -gamma egésztest-besugárzás után szintén 1 órával és 3 órával történtek az enzimaktivitás-mérések.

A besugárzást az OSSKI Gammatron (Siemens) készülékével végeztük, a dózisteljesítmény 0,1175 Gy/perc volt. 300 mg/kg WR 2721 ip. adása után 30 perccel történt 6,0 Gy egésztest-besugárzást követően szintén a fentemlített időpontokban vett vérből határoztuk meg a thrombocyta MAO aktivitását. A meghatározásokat önkontrollal végeztük, azaz a különböző kezeléseket megelőzően 1 héttel a nyulattól szívpunkcióval vett vérből meghatároztuk a thrombocyta MAO aktivitásának normál értékét, majd különböző kezelés okozta változásokat ennek %-ában fejeztük ki.

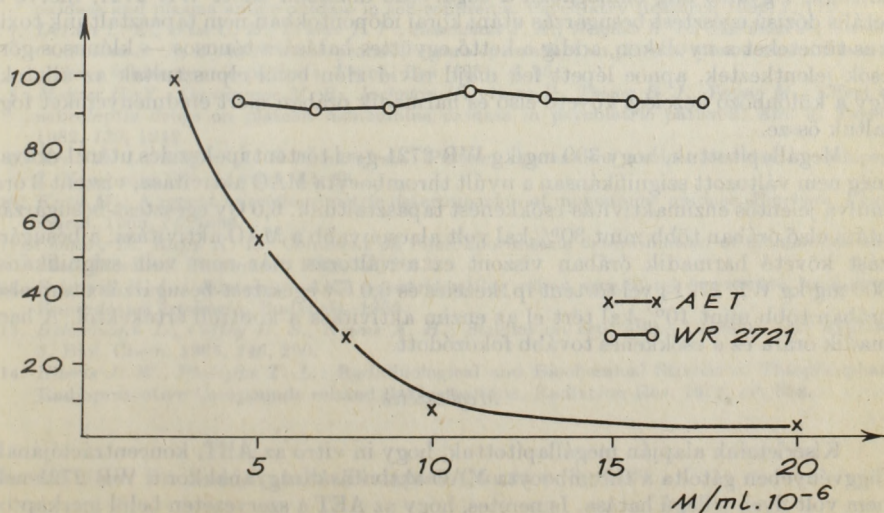


1. ábra: Michaelis—Menten konstans (K_M) meghatározása Lineweaver—Burk-diagram alapján

Elvégeztük a mérési eredmények statisztikai értékelését is, Student's-féle kétmintás t-próba alapján számoltuk a kontrolltól való eltérések szignifikanciáját.

Eredmények

A thrombocyta szuszpenzióhoz in vitro hozzáadott különböző koncentrációjú AET, illetve a WR 2721 okozta enzimaktivitás változásokat a 2. sz. ábrán tüntettük fel. Megállapítottuk, hogy míg $2,5 \mu\text{M/ml}$ AET egyáltalán nem befolyásolta a MAO



2. ábra: Különböző koncentrációjú AET, ill. WR 2721 hatása a nyúl thrombocyta MAO aktivitására in vitro, a kontroll %-ában kifejezve

aktivitását, addig az AET koncentrációjának függvényében 20 $\mu\text{M}/\text{ml}$ teljes enzimaktivitás-bénulást eredményezett. Hasonló körülmények között a növekvő koncentrációjú WR 2721-nek nem volt ilyen jellegű hatása. 4,32 $\mu\text{M}/\text{ml}$ –17,24 $\mu\text{M}/\text{ml}$ koncentrációtartományban a WR 2721 nem okozott szignifikáns változást a thrombocytá MAO aktivitásában a kontrollhoz képest. A WR 2721-gyel történt ip. kezelés, a letális dózisu egésztest-besugárzás, illetve a kettő együttes hatásának eredményeit foglaltuk össze az I. sz. táblázatban.

1. táblázat

Kezelések	1 h			3 h		
	U	%	p	U	%	p
300 mg/kg WR 2721 ip.	3,0936 $\pm 0,0419$	98,13	>0,5	2,5019 $\pm 0,0364$	79,36	<0,01
6,0 Gy ^{60}Co -gamma besugárzás	0,7025 $\pm 0,0295$	62,47	<0,001	0,8532 $\pm 0,0171$	93,46	>0,5
300 mg/kg WR 2721 után 20'-cel 6,0 Gy ^{60}Co -gamma besugárzás	2,7547 $\pm 0,0136$	88,24	<0,1	2,4200 $\pm 0,0410$	76,76	<0,01

Megjegyzés: Az enzimaktivitás-értékek (U) a MAO által oxidált $4\text{HQ} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1} \pm \text{S.E.}$

I. táblázat: Nyúl thrombocytá MAO aktivitás változása különböző kezelést követően az idő függvényében

Az eredmények értékelése előtt el kell mondanunk, hogy 300 mg/kg WR 2721 ip. adása, majd az ezt követő 6,0 Gy egésztest-besugárzás után érdekes dolgot tapasztaltunk. Ugyanis míg önmagában a sugárvédő dózisban adott WR 2721, illetve a letális dózisu egésztest besugárzás utáni korai időpontokban nem tapasztaltunk toxikus tüneteket a nyulakon, addig a kettő együttes hatására tónusos – klónusos görcsök jelentkeztek, apnoe lépett fel, majd rövid időn belül elpusztultak az állatok. Így a különböző kezelést követő első és harmadik órában mért eredményeinket foglaltuk össze.

Megállapítottuk, hogy 300 mg/kg WR 2721-gyel történt ip. kezelés után 1 órával még nem változott szignifikánsan a nyúl thrombocytá MAO aktivitása, viszont 3 óra múlva jelentős enzimaktivitás-csökkenést tapasztaltunk. 6,0 Gy egésztest-besugárzás utáni első órában több mint 30%-kal volt alacsonyabb a MAO aktivitása, a besugárzás követő harmadik órában viszont ez a változás már nem volt szignifikáns. 300 mg/kg WR 2721-gyel történt ip. kezelés és 6,0 Gy egésztest-besugárzás utáni első órában több mint 10%-kal tért el az enzim aktivitása a kontroll értékektől. A harmadik órára ez a csökkenés tovább fokozódott.

Megbeszélés

Kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy in vitro az AET, koncentrációjának függvényében gátolta a thrombocytá MAO aktivitását, ugyanakkor a WR 2721-nek nem volt ilyen jellegű hatása. Ismeretes, hogy az AET a szervezetben belül merkaptotetilguanidinné (MEG) alakul, mely szabad SH-csoportot tartalmaz (12). Ismert az is, hogy a MAO viszonylag nagy számban tartalmaz SH-csoportot, molekulánként 7–

8-at (13). Feltételezésünk szerint a MEG és az enzim között kialakult vegyes diszulfidkötés eredményezte ezt az aktivitáscsökkenést, illetve az AET megfelelő koncentrációjánál a teljes bénulást.

Ugyanakkor valószínű, hogy in vitro kísérleti körülményeink között a WR 2721 nem defoszforilálódott WR 1065-té, a vegyület szabad SH-csoportot tartalmazó származékává, amely a fentiek alapján gátolhatta volna az enzim aktivitását. Ezért nem tapasztaltuk a thrombocytá szuszpenzióhoz in vitro adott különböző koncentrációjú WR 2721 gátló hatását.

Szervezetben belül viszont ez a defoszforiláció az alkalikus foszfatáz enzim segítségével végbemegy (14), melynek következtében a radioprotekció szempontjából fontos származék, a WR 1065 [2-(/aminopropyl/ amino) etántiol] képződik. Így a molekula szabad SH-csoportján keresztül már kötődhet az enzimhez. Ez magyarázhatja, hogy amikor WR 2721-gyel ip. kezeltük az állatokat, csökkent a thrombocytá MAO aktivitása.

Méréseink alapján megállapítottuk azt is, hogy a sugárvédő dózisban adott WR 2721 tovább fokozta az ionizáló sugárzás okozta enzimaktivitás-csökkenést.

IRODALOM

1. *Murphy D. L., Wyatt R. J.*: Reduced platelet monoamine oxidase activity in chronic schizophrenia. *Nature* 1972, 233, 225.
2. *Sullivan J. L., Maltzie A. és munkatársai*: Platelet monoamine oxidase predicts response to lithium in manic depressive illness. *Lancet* 1977/II, 1325.
3. *Abon-Saleh M. T.*: Platelet MAO, personality and response to lithium prophylation. *J. Affective Disorders* 1983, 5, 55.
4. *Veswanathan P. N. és munkatársai*: Platelet Monoamine Oxidase Activity in Chronic Schizophrenia. *Ind. J. Med. Res.* 1987, 86, 79.
5. *Brown J. B.*: Platelet MAO and alcoholism. *Am. J. Psych.* 1977, 134, 206.
6. *Baron M., Gruen R., Levitt M., Kane J.*: Neuroleptic drug effect on platelet monoamine oxidase and plasma amine oxidase in schizophrenia. *Psychiatry Research* 1982, 7, 179.
7. *DeLisi L. E., Wise C. D., Bridge T. P., Rosenblatt J. E., Wagner R. L., Morihisa J., Karson C., Potkin S. G., Wyatt R. J.*: A probable neuroleptic effect on platelet monoamine oxidase in chronic schizophrenic patients. *Psych. Res.* 1981, 4, 95.
8. *Meltzer H. Y., Duncavage M. B., Jackman H., Arora R., Tricon B. J., Young M.*: Effect of neuroleptic drugs on platelet monoamine oxidase in psychiatric patients. *Am. J. Psych.* 1982, 139, 1242.
9. *Kruk Z. L., Moffett A. és munkatársai*: Platelet monoamine oxidase activity in epilepsy. *J. Neurosurg. Psych.* 1980, 43, 68.
10. *Krajl M.*: A repeat microfluorimetric determination of monoamine oxidase. *Biochem. Pharmacol.* 1965, 14, 1684.
11. *Century B., Rupp K. L.*: Comment on microfluorimetric determination of monoamine oxidase. *Biochem. Pharmacol.* 1968, 17, 2013.
12. *Sztanyik B. L.*: Adatok az AET és szerkezetileg rokon vegyületek sugárvédő hatásához. Kandidátusi értekezés, Budapest, 1965.
13. *Hellermann L., Coffey D. S., Neims A. H.*: Studies on crystalline D-amino acid oxidase. *J. Biol. Chem.* 1965, 240, 290.
14. *Harris J. W., Philipps T. L.*: Radiobiological and Biochemical Studies of Thiophosphate Radioprotective Compounds related to Cysteamine. *Radiation Res.* 1971, 40, 362.

Szerző címe: Dr. Bodó Katalin, Budapest, Csorna u. 3., 1124.

K. Bodó, É. Rónai, Maj. Gy. Horváth M.D.M.C.

STUDIES ON CHANGES OF MAO ACTIVITY OF THROMBOCYTES UNDER THE EFFECT OF RADIOPROTECTORS AND IRRADIATION

The effect of two radioprotectors—AET and WR 2721—on MAO activity of thrombocytes in rabbits was investigated *in vitro*. It has been found that AET has a concentration-dependent inhibitory effect on enzyme activity, while WR 2721 has no similar effect.

Further experiments have shown that shortly after intraperitoneal administration of WR 2721 a decreased MAO activity of thrombocytes is present. Moreover, this radioprotector provokes further decrease of enzyme activity diminished by lethal dose of ionizing radiation.

К. Бодо, Э. Ронаи, майор м/с Дв. Хорват:

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ MAO АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАДИОПРОТЕКТОРОВ И ОБЛУЧЕНИЯ

Авторы исследовали в опытах *in vitro*, как изменяется MAO активность тромбоцитов кролика под действием АЭТ и WR 2721. Было установлено, что АЭТ ингибирует активность энзима в зависимости от концентрации, а WR 2721 такого действия не имеет.

Дальнейшие опыты показали, что в ранние сроки после внутрибрюшинного введения WR 2721 возникает снижение MAO активности тромбоцитов кролика. Было выявлено и то, что соединение усугубляет снижение активности энзима, вызванное смертельной дозой ионизирующей радиации.