

E G Y E T E M I D O K T O R I É R T E K E Z É S

SZEKVENCIA-SPECIFIKUS GASZTRIN RADIOIMMUNOASSAY-K
KIDOLGOZÁSA

I r t a :

Németh József

Készült:

a SZOTE I. sz. Belgyógyászati Klinikáján

SZEGED, 1983.

T A R T A L O M

	Old.
1. BEVEZETÉS	1.
2. ALAPVETŐ ISMERETEK A RADIOIMMUNOASSAY-HEZ	3.
2.1. A radioimmun-analitika /RIA/ alapelve	3.
2.2. A RIA alapmodellje	3.
2.3. A RIA elmélete	4.
2.4. A radioimmun-analitikai mérés	8.
2.5. Az antigén fogalma	9.
2.6. Az ellenanyag fogalma	10.
2.6.1. Antitestek előállítása	11.
2.6.2. Az antiszérum tulajdonságai	11.
2.6.2.1. Titer	12.
2.6.2.2. Affinitás	12.
2.6.2.3. Specificitás	13.
2.7. Radioaktív antigének	14.
2.7.1. ^3H és ^{14}C izotóppal jelzett antigének	14.
2.7.2. ^{125}I és ^{131}I izotóppal jelölt antigének	14.
2.8. A kötött és szabad antigének elválasztása	16.
2.9. A RIA meghatározás minőségének ellenőrzése	17.
2.9.1. Reprodukálhatóság	18.
2.9.2. Pontosság	18.
2.9.3. Precizitás	18.
2.9.3.1. Belső és külső variációs együttható meghatározása	19.
2.10. A radioimmunoassay jövője	20.
3. RADIOAKTÍV JÓD IZOTÓPPAL JELZETT ANTIGÉNEK TISZTÍTÁSA	22.
3.1. Az elektroforézis fogalma	22.



3.1.1. A poliakrilamid-gél elektroforézis alapjai	23.
4. A GASZTRIN	25.
4.1. A gasztrin biokémiája	25.
5. KISÉRLETI ANYAGOK	28.
6. SZEKVENCIA-SPECIFIKUS GASZTRIN RADIOIMMUNOASSAY-k KIDOLGOZÁSA	31.
6.1. Gasztrin antigének készítése	31.
6.2. Gasztrin antiszérumok előállítása	33.
6.3. Az antiszérumok tulajdonságainak vizsgálata	34.
6.3.1. Titer	34.
6.3.2. Affinitási konstansok	36.
6.3.3. Szekvensspecifitás vizsgálata	38.
6.3.4. Immunspezifitás vizsgálata	41.
6.4. Inkubáció optimális idejének a meghatározása	43.
6.5. Gasztrin jelölése ^{125}I izotóppal	45.
6.6. ^{125}I izotóppal jelzett gasztrin tisztítása poli- akrilamid-gél elektroforézissel	46.
6.7. Gasztrin standard	48.
6.8. A radioimmunoassay-k menete	48.
6.9. A belső és külső variációs együtthatók meghatározása	50.
7. AZ EMBERI TÚDŐ SZEREPE AZ ENDOGÉN GASZTRIN METABOLIZMUSÁBAN	56.
8. ÖSSZEFOGLALÁS	64.
I R O D A L O M	67.

1. BEVEZETÉS

A SZOTE I. sz. Belgyógyászati Klinikáján működő gyomor-, bélbetegségekkel foglalkozó osztály és laboratórium fejlesztési programján belül lehetőségem nyílt arra, hogy a gyomor sósavtermelését szabályozó hormonnal, a gasztrinnal foglalkozhassam. A szérumban gasztrin szint ismerete a klinikai gyakorlatban elsősorban az ún. Zollinger-Ellison szindróma kórismézésében jelentős. A betegség létrejöttében ugyanis a gasztrint termelő sejtek tumoros burjánzása vezet egyrészt a magas szérumban gasztrin koncentráció létrejöttéhez, másrészt a gyomor fokozott sósavtermeléséhez. Ez utóbbi következtében sokszor a betegek életét veszélyeztető többszörös fekélyképződés következhet be. A betegség természetéből következik, hogy gyógyítása csak műtéttel történhet. A műtéti indikáció felállítást és a műtéti megoldás kiválasztását, a többirányú laboratóriumi vizsgálat keretében végzett szérumban gasztrin szint eredménye határozza meg. A többi hormon méréséhez hasonlóan, a gasztrin meghatározása is radioimmunoassay-vel történik. McGuigan /1968/, majd Yalow és Berson /1970/ számoltak be elsőként gasztrin ellen termelt antitestek előállításáról, ill. gasztrin radioimmunoassay-ről. Azóta rutin laboratóriumi vizsgálatokra alkalmas gasztrin RIA kit a kereskedelemben már több változatban kapható /CIS, SQUIBB stb./. Kezdetben a klinikán is kiteket alkalmaztunk a szérumban gasztrin koncentrációjának a mérésére, de az egyre gyakoribb igény és a devizát igénylő költséges beszerzés miatt, gasztrin RIA beállítására

vállalkoztunk. Sikeres kísérleteink eredményeként rutin laboratóriumi mérésekre alkalmas gasztrin radioimmunoassay-t fejlesztettünk ki /Remák és mtsai, 1980/. A RIA-hoz felhasznált ellenanyagunk - mint vizsgálatainkból kiderült - a gasztrin /1-17/ molekula C-terminális szekvenciáját érzékeli. Ezt követően olyan gasztrin RIA beállítását tűztük ki célul, amelyben a felhasznált antiszérum a gasztrin /1-17/ molekula N-terminális végét méri. Ezen két RIA együttes alkalmazása rendkívül elősegíti magának a 17 aminosavból álló gasztrinnek a kutatását, a klinikai vizsgálatokon kívül metabolizálódásának vizsgálatát is. A gasztrin N-terminális szekvenciájára érzékeny ellenanyagu gasztrin RIA beállítását is sikerült megvalósítanunk /Németh és mtsai, 1982/. Doktori értekezésem első részében ezen két gasztrin radioimmunoassay beállítását ismertetem. Párhuzamosan mutatom be a megvalósítás egymást követő lépéseit, így összehasonlításuk is könnyebb. Értekezésem befejező részében az emberi tüdő in vivo gasztrint metabolizáló képességének vizsgálatával foglalkozom. Ezen vizsgálatok során mindkét gasztrin RIA-t felhasználtuk és segítségükkel kimutattuk, hogy a gasztrin enzimatis lebontása az emberi tüdőben a molekula C-terminális szekvenciáját nagyobb mértékben érinti, mint az N-terminálisat /Remák és mtsai, 1983/.

Munkánk fontosságát és eredményességét a kért és elvégzett vizsgálatok nagy száma bizonyítja. Évente kb. 500 szérum gasztrin koncentráció meghatározást végzünk. A kísérleti céllal történő vizsgálatok száma még ennél is nagyobb, kb. 700.

2. ALAPVETŐ ISMERETEK A RADIOIMMUNOASSAY-HEZ

A hormonok testnedvekben előforduló koncentrációinak meghatározására először Berson és Yalow /1959/, majd Ekins /1960/ alkalmazott új analitikai eljárást. A "fehérjéhez kötődés" elvén a plazma inzulin, ill. tiroxin koncentrációját határozták meg.

2.1. A radioimmun-analitika /RIA/ alapelve

Minden RIA lényege az antigén-antitest közötti immun-kémiai reakció, amelynek során a vizsgált antigén izotóppal jelölt és jelöletlen formája vetélkedik az antitest kötési helyeiért. A RIA hasznosítja az antigén-antitest reakciók rendkívüli specifikusságát és az izotóp méréstechnika nagy érzékenységét.

2.2. A RIA alapmodellje

Bliss /1967/ ideális RIA esetén nyolc kritérium /F-1-8/ teljesülését tételezi fel:

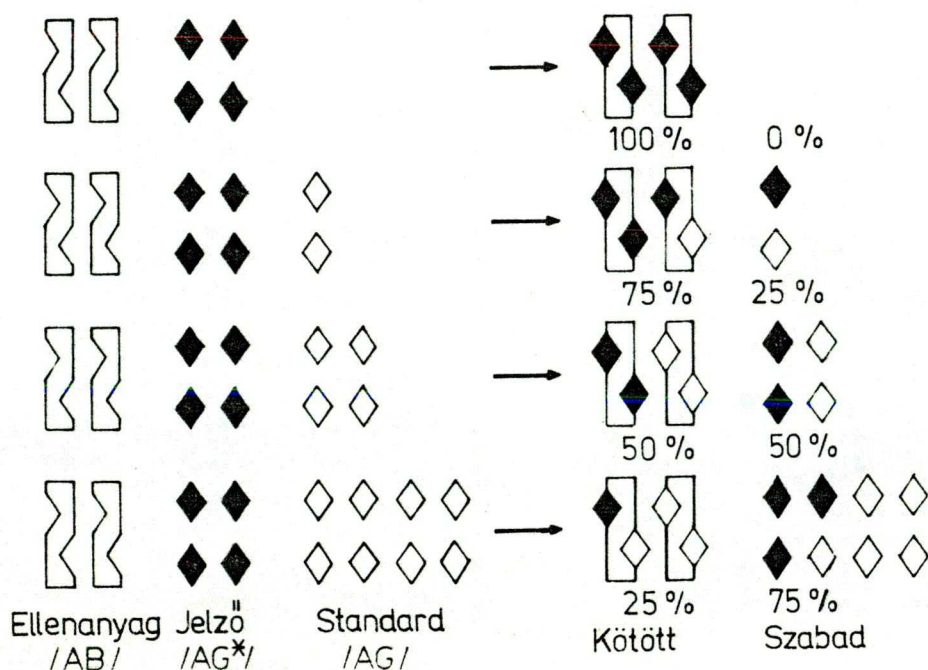
- F-1: az antigént egyneműnek, kémiaailag egy fajtának tekintjük;
- F-2: az antitestet szintén egyneműnek, kémiaailag egy fajtának tekintjük /monoklonális ellenanyag/;
- F-3: a reakció során egy antigén molekula egy antitest molekulával lép reakcióba, más kombináció nem fordulhat elő;



- F-4: az antigén-antitest reakciót elsősorban a tömeghatás törvényével, másodsorban a kémiai kinetikával magyarázzuk;
- F-5: a radioaktív jelzett és jelöletlen "hideg" antigénnek ugyanazok a fizikai és kémiai sajátságai;
- F-6: az antigén és antitest mindaddig reakcióban van, amíg el nem éri a reakció az egyensúly állapotát;
- F-7: a jelzett és jelöletlen antigén kötött és szabad formái szétválaszthatók a beállt egyensúlyi állapot megzavarása nélkül;
- F-8: a kötött és a szabad antigén aránya, vagy a kötött és az összes antigén aránya meghatározható.

2.3. A RIA elmélete

Az antigén-antitest reakciót, a radioimmun telítési analízis elvét az 1. ábra szemlélteti.

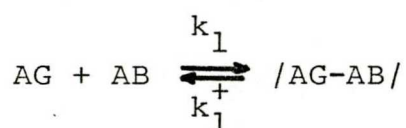


1. ábra: A radioimmun-analízis telítési elve

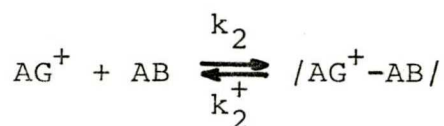
A hideg antigén kompetitive gátolja a jelölt antigén antitesthez való kötődését.

A Bliss által megfogalmazott nyolc feltételt és a tömeghatás törvényét felhasználva Feldmann és mtsai [1971] a RIA rendszert a következő módon írták le:

T-1:



T-2:



ahol $/AG/$ a jelöletlen antigén, $/AG^+/$ a jelzett antigén, $/AB/$ az antitest, $/AG-AB/$ és $/AG^+-AB/$ a jelöletlen és jelzett antigén és az antitest kötött formáinak koncentrációja; a $/k_1/$ és $k_2/$ az asszociációs együtthatók, a $/k_1^+/$ és $/k_2^+/$ a disszociációs együtthatók.

Egyensúlyi állapotnál a tömeghatás törvénye alapján:

T-3:

$$K = \frac{k_1}{k_1^+} = \frac{/AG-AB/}{AG \cdot AB}$$

T-4:

$$K^+ = \frac{k_2}{k_2^+} = \frac{/AG^+-AB/}{AG^+ \cdot AB}$$

A $/K/-t$ és $/K^+/-ot$ affinitási konstansoknak nevezzük, az antitestek reakcióképességét jellemzi. F-6 feltétel alapján egyensúlyi állapotban $K=K^+$.

A jelzett és jelöletlen antigének kötött és szabad formáinak arányát $/R^+ /$ és $/R /$ a következő összefüggések írják le:

$$T-5: \quad R^+ = \frac{/AG^+ - AB/}{AG^+}$$

$$R = \frac{/AG - AB/}{AG}$$

Egyensúlyi állapotban $/F-6/ \quad R=R^+$.

A kötött antigén $/B /$, a szabad antigén $/F /$ és az összes antigén $/T /$ koncentrációja:

T-6:

$$B = /AG - AB/ + /AG^+ - AB/$$

$$F = AG + AG^+$$

$$T = B + F$$

Definiáljuk még a jelöletlen antigén $/p /$, a jelzett antigén $/p^+ /$ és az antitest $/q /$ teljes koncentrációját:

T-7:

$$p = AG + /AG - AB/$$

$$p^+ = AG^+ + /AG^+ - AB/$$

$$q = AB + /AG - AB/ + /AG^+ - AB/$$

Ezen összefüggések alapján a kötött és az összes antigén arányát B/T a következő összefüggés írja le:

T-8:

$$\frac{B}{T} = \frac{R}{1+R}$$

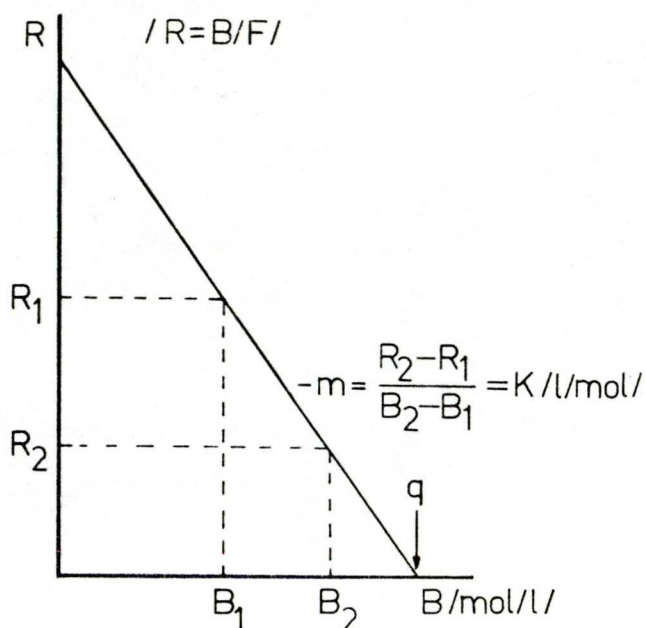
Egyensúlyi állapotban a T-3 - T-8 feltételek alapján az antigén kötött és szabad formáinak aránya R és a kötött antigén teljes koncentrációja B között fennálló összefüggés:

T-9:

$$R = K \cdot /q-B/$$

Ez a lineáris összefüggés az irodalomban Scatchard-függvényként vált ismertté /1949/. A gyakorlati RIA-ban Berson és Yalow /1959/ alkalmazta először. A T-9 összefüggés a RIA-ban teljesen jellemzi a dózis-válasz közötti kapcsolatot és gondoskodik a kötött és szabad arány R válasz változóként való alkalmazásáról. Ennek alapján becsülhetjük a K affinitási konstans értékét, valamint az antitest kötőhelyek teljes koncentrációját q .

Különböző kötött hormonkoncentrációknál megmérve a kötött és szabad részek arányát $R = B/F$ -függő változó és a kötött hormonkoncentráció B -független változó függvényében ábrázolva egy egyenest kapunk, amelyre az $R = K \cdot /q-B/$ függvény illeszthető /2. ábra/.



2. ábra: Scatchard-függvény

Az egyenes meredeksége $-K/-t$, metszéspontja az x -tengelyen $q/-t$ adja.

2.4. A radioimmun-analitikai mérés

Mérési rendszerben a jelöletlen antigént ismert koncentrációju standard oldat, vagy a meghatározandó ismeretlen koncentrációju minta képviseli. Az egyensúly beállításához szükséges inkubálás után, megfelelő módszerrel szétválasztjuk az antitestekhez kötődött és szabadon maradó hormonfrakciókat. Az ismeretlen antigén koncentrációt ugy határozzuk meg, hogy az általa létrehozott gátlás mértékét összehasonlítjuk az ugyan-

olyan anyaggal készült kalibrációs görbe pontjainak gátlási százalékaival.

A különféle RIA metodikáknál a telítési analízis kivitelezésének két formája terjedt el /Zettner, 1973; 1974/.

a, Egyensúlyi módszer: a jelölt és jelöletlen antigén egy inkubációs lépésben reagál az antitesttel és az egyensúly beállta után történik a kötött és szabad frakciók szétválasztása.

b, Lépcsőzetes telítési módszer: az első inkubációs periódusban a hideg antigén megkötődik az antitesteken, majd ezt követően második lépésként adják hozzá a jelölt antigént. Az állandó kicserélődés /asszociáció, disszociáció/ következtében beáll az egyensúly, azaz ugyanolyan arányban kötődik meg az antitesten a jelölt és hideg antigén, mint amilyen arányban a rendszerben jelen vannak.

RIA mérési módszer kifejlesztéséhez szükség van tiszta antigénre, ugyanezen antigénnek izotóppal jelölt formájára, specifikus antiszérumra, valamint alkalmas eljárásra a kötött és szabad hormonfrakció szétválasztására. Módszertől függően mérhető az antitestekhez kötött, ill. szabadon maradó jelölt antigén radioaktivitása.

2.5. Az antigén fogalma

Antigénnek nevezzük azokat az anyagokat /kis és nagy molekulasúlyú polipeptidek, fehérjék, szteroidok, gyógyszerek



stb./, amelyek a gerincesek szervezetében immunválaszt indítanak el, aminek eredményeként az antigénnel specifikusan reagáló ellenanyag termelődés, vagy immunsejtek képződése indul meg.

Az antigén két legfontosabb tulajdonsága az immunogenitás és a specificitás. Az immunogenitás az a képessége, hogy a szervezetben immunválaszt idéz elő. Az antigén specificitásán a hatására képződött ellenanyaghoz vagy immunsejtekhez való specifikus kötődési képességét értjük. Mindkét tulajdonsággal rendelkező antigént komplett antigénnek nevezzük. Egyes antigének önállóan nem immunogének, erre csak hordozó fehérjéhez kapcsoltnak képesek. A gyakorlatban jól bevált hordozó fehérjék a szarvasmarha, az emberi és a nyul szérumbalbuminok, a thyreoglobulin és különböző puhatestűek fehérjéi. Ezen inkomplett antigéneket hapténeknek nevezzük. A haptének általában kis molekulásulú anyagok, amelyek az ellenanyaggal a hordozó fehérje nélkül is reagálnak, tehát antigén specificitással rendelkeznek. Ilyen antigén a gasztrin is. Niswender és Midgley /1970/ szerint a fehérje hordozóra kapcsolt haptének száma nagymértékben befolyásolja az antigénnel szemben termelt ellenanyag mennyiségét.

2.6. Az ellenanyag fogalma

Ellenanyagnak, vagy antitesteknek mondjuk azokat a szérumban található immunglobulinokat, amelyek az antigén hatására képződnek és a termelésüket kiváltó antigénnel specifi-

kusan reagálnak. Az ellenanyag antigénkötő helyei révén kötődik mind in vivo, mind in vitro az antigén domináns csoportjához. Az ellenanyagok öt immunglobulin osztályba sorolhatók: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Legfontosabb közülük az IgG, amely a szérum immunglobulin frakció mintegy 80 %-át alkotja. Szerkezete ismert, molsúlya kb. 160 000. Az IgG immunglobulinok két specifikus kötési hellyel rendelkeznek, mindkettő a molekula N-terminális régiójában található.

2.6.1. Antitestek előállítása

Antitestek előállítása immunizálás útján történik. Immunizálás során jó immunválaszt adó állatokba /nyul, birka, kecske/ juttatják az antigént /subcutan, intraperitoneálisan stb./ és a képződött antitesteket tartalmazó antiszérumot használják fel a RIA-hoz. Mivel az antigén immunogenitását befolyásolja, hogy a szervezetben mennyi ideig tudja hatását kifejteni, emiatt az antigént adjuvánsokban oldva adják az állatoknak. Így az immunválaszra serkentő hatás hosszú ideig fenntartható. Az antiszérumok tulajdonságait számos tényező befolyásolja: az antigén természete, a felhasznált állat, az immunizálás módja és ideje, adjuvánsok adása stb.

2.6.2. Az antiszérum tulajdonságai

Az antiszérum a RIA egyik legfontosabb alkotórésze. Titere, specificitása és affinitása a módszer érzékenységén,

specificitásán kívül annak alkalmazhatóságát is meghatározza.

2.6.2.1. Titer

A titer, az antiszérumnak az inkubációs végtérfogatra vonatkoztatott azon higitása, amely hideg antigén távollétében az adott jelölt antigén 50 %-át megköti. Az antiszérum titere nem befolyásolja közvetlenül a módszer alkalmazhatóságát, azonban nagyobb titerű antiszérum használata előnyösebb /Abraham, 1975/.

2.6.2.2. Affinitás

Az antiszérumnak az antigénhez való reakcióképességét az affinitási konstanssal /K/ jellemezhetjük, ami tulajdonképpen nem más, mint a 2.3. fejezetben felírt T-1 jelzésű egyenlet egyensúlyi állandója /T-3/. Meghatározása az 2.3. fejezetben leírt módon Scatchard-függvény segítségével történik. Az affinitási konstans ismeretében meg lehet határozni a RIA várható érzékenységét /Berson és Yalow, 1968/.

$$S_{/AG \rightarrow O/} = 0.1 \cdot K^{-1} \text{ /mol/l/}$$

A megfigyelések szerint /Abraham, 1975/ minél nagyobb az antiszérum affinitási konstansa, annál érzékenyebb a módszer és alacsonyabbak a nem specifikus hatások.

2.6.2.3. Specificitás

Az antitestek specificitását az antigén azon molekulaszerkezete határozza meg, amely az antigén immunogenitásáért felelős. Mivel az antitestek az antigén molekula különböző részeivel szemben termelődhetnek, így többféle antitest lehet egyidejűleg jelen. Az antiszérum specificitását ezek eredője adja. A specificitás kérdése különösen akkor fontos, ha a rendszerben a meghatározandó antigénhez hasonló szerkezetű anyagok is jelen vannak.

Az antiszérum specificitását keresztreakciókkal jellemezzük. Ekkor az antigénnel rokon szerkezetű vegyületnek az antitesthez való kötődését határozzuk meg. A keresztreakciók meghatározásánál a mérni kívánt antigénnel $/S/$ és annak radioaktív formájával $/S^+/$ készült kalibrációs görbét hasonlítjuk össze a rokon szerkezetű vegyület $/Z/$, ugyanazon antiszérummal és $/S^+/$ -tel felvett kalibrációs görbéjével. Számítására az 50 %-os kiszorításos módszer [Abraham, 1969] a leghasználatosabb.

A kalibrációs görbéről leolvassuk $/Z/$ -nek azt a moláris koncentrációját $/Z_{50}/$, amely 50 %-át szorítja ki $/S^+/$ -nek és ezt $/S_{50}/$ -nel hasonlítjuk össze.

$$\text{Keresztreakció} = \frac{S_{50}}{Z_{50}} \cdot 100 \quad \text{/\%}/$$

Az antiszérum specificitását, ill. használhatóságát nagymértékben befolyásolják a biológiai mintákban jelenlévő, keresztreakciót adó anyagok mennyiségi viszonyai.

2.7. Radioaktiv antigének

Radioimmunoassay-hez a mérni kívánt antigén radioaktív izotóppal jelzett formája is szükséges. Jelzésre négy radioaktív izotópot használnak: ^{131}I , ^{125}I , ^3H és ^{14}C .

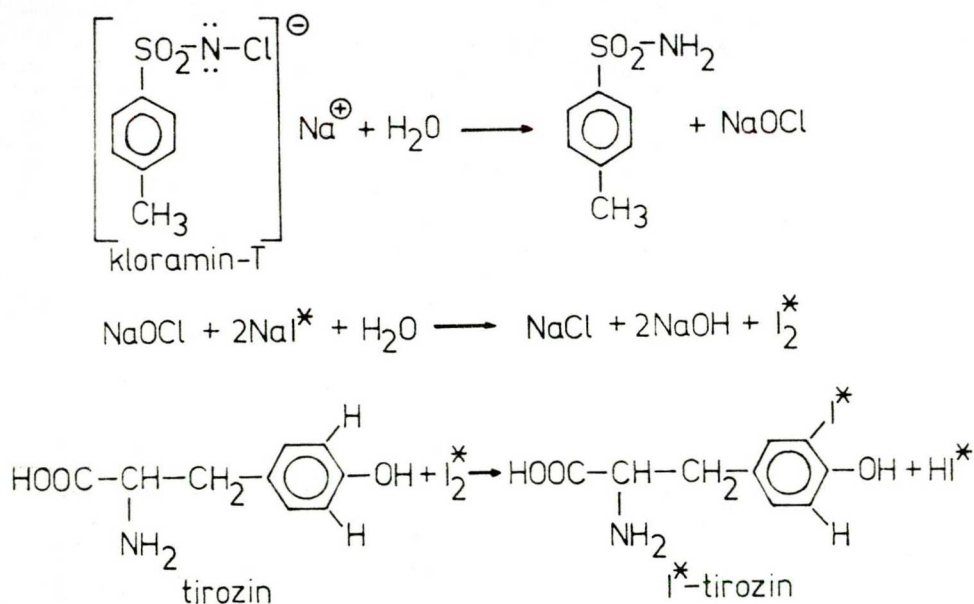
2.7.1. ^3H és ^{14}C izotóppal jelzett antigének

A ^3H és ^{14}C izotópokat általában szteroid hormonok jelzésére használják. Ezen radioaktív atomoknak a molekulákba történő beépítését megfelelő sugárvédelmi előírású kémiai laboratóriumokban végzik. ^3H és ^{14}C izotóppal történő jelöléssel viszonylag alacsony fajlagos aktivitású termékek nyerhetők. Mivel ezen izotópok felezési ideje hosszú (^3H : 12.26 év, ^{14}C : 5760 év/, így aktivitásuk a felhasználás ideje alatt alig változik. Az autoradiolízis következtében létrejövő károsodás miatt, a jelzett hormon hosszabb ideig /6 hónap/ történő tárolásakor a felhasználás előtt tisztítani kell. A ^3H és ^{14}C jelzett antigének felhasználásának igen nagy hátránya, hogy liquidszcintillációs mérőberendezést és szcintillációs oldatokat igényel, amelyek a méréstechnikát nagyon megdrágítják.

2.7.2. ^{125}I és ^{131}I izotóppal jelölt antigének

Jód izotópokkal való jelzés főleg fehérje és polipeptid természetű antigének esetében használható, mivel könnyen szubsztituálódnak a fehérje vagy polipeptid lánc tirozin, hisztidin

csoportjaira. Szteroidok esetében tirozin-metilészter, hisztamin vagy tiramin oldallánc szükséges a sikeres jelöléshez. A Greenwood és mtsai /1963/ által kidolgozott kloramin-T oxidációs reakció a leghasználatosabb jelölési eljárás. A módszer lényege, hogy az antigén tirozin molekuláiba olyan jódt atomot viszünk be, amit radioaktív NaI^+ -ből "in statu nascendi" oxidációval állítunk elő /3. ábra/.



3. ábra: Jódózás kloramin-T módszerrel

Más jelölési eljárások is ismertek. Marchalonis /1969/ lactoperoxidáz enzimet használt az oxidációhoz. Fraker és Speck /1978/ a "Iodogen"-t /1,3,4,6-tetrachloro-3 α , 6 α -diphenyl glycoluril/ használta oxidálószerként és segítségével nyul IgG-t és csirke lizozimot jelölt. Salacinski és munkatársai /1981/ 23 fehérje, ill. polipeptid "Iodogen"-es jelölését végezték el. Jódózott termékeiket összehasonlítva a más eljárás-



sal készült jódozott termékekkel azt találták, hogy a "Iodogen"-es eljárás sokkal kiméletesebb, az antigén kevésbé károsodik; ugyanakkor az antigénbe beépülő jód atomok száma csökken, így a termékek specifikus aktivitása alacsonyabb.

A 3. ábra reakcióegyenletéből látható, hogy melléktermékként radioaktív HI^+ is keletkezik, ill. az oxidáció következtében a jelölt antigén egy részének roncsolódása is bekövetkezhet. Emiatt a felhasználáshoz a jelölést követően az antigéneket tisztítani kell.

A gamma sugárzó izotópokkal ^{125}I , ^{131}I / történő jelölés előnye, hogy a jelölési reakció - ha a sugárvédelmi előírások adottak -, akár diagnosztikai laboratóriumban is elvégezhető. Továbbá előny a gamma sugárzás könnyű mérés lehetősége. Hátrány viszont, hogy ezen izotópok felezési ideje viszonylag rövid ^{125}I : 60.1 nap, ^{131}I : 8.06 nap/. RIA-hoz a ^{125}I izotóppal történő jelzés az alkalmasabb, ekkor 1.5-2 havonta kell ismételni a jelölést.

2.8. A kötött és szabad antigének elválasztása

Az inkubációs folyamatot követően - amelyet megfelelő hőmérsékleten adott ideig végzünk -, az antitesthez kötött és szabad antigéneket különválasztjuk. A nagyszámu szeparációs eljárás 3 csoportra bontható:

a, A szabad antigén elkülönítése szilikáthoz, talkumhoz, florizilhez, dextránnal bevont csontszénhez, cellulózporhoz való adszorpcióval;

b, az antitestekhez kötött antigén izolálása:

/szerves oldószeres-, polietilén-glikolos kicsapás, második antitest hozzáadása, szilárd fázisu antitest módszer/;

c, a kötött és szabad antigének differenciál vándoroltatása /gélkromatográfia, elektroforezis/. A leggyakrabban használatos módszerek: dextránnal bevont csontszenes elválasztás, polietilén-glikolos kicsapás, kettős antitest módszer. Ujabban a szilárd fázishoz kötött antitest alkalmazása van elterjedőben, mert a felületén lejátszódó reakció egyben az elválasztást is magába foglalja.

Az elválasztást követően a ^3H és ^{14}C jelzett antigének esetében általában a fehérje-kötésben maradt antigén radioaktivitását mérjük, míg jóddal jelzett antigének esetében lehetőség van akár a kötött, akár a szabad frakciók radioaktivitásának meghatározására.

2.9. A RIA meghatározás minőségének ellenőrzése

A RIA metodikákban előforduló hibákat minőségi ellenőrzéssel deríthetjük ki, így lehetővé válik azok megszüntetése. Használatos alapfogalmak: reprodukálhatóság, pontosság, precizitás.

2.9.1. Reprodukálhatóság

Reprodukálhatóságon azt értjük, hogy a mintát ismételt vizsgálatok során mérve annak hormontartalmára tett becslésünk eredménye mindig ugyanaz a mérőszám. Ez pipettázási-, hígítási-, aktivitás mérési hibák miatt szinte alig teljesül.

2.9.2. Pontosság

A mérés pontosságán azt értjük, hogy a mért értékek átlaga a minta valódi hormontartalmától milyen mértékben tér el.

2.9.3. Precizitás

A mérés precizitása a mérési eredmények szórásával van összefüggésben. A precizitást a variációs együtthatóval $[CV]$ jellemezzük. Számítása - ugyanazon minta többszöri párhuzamos mérésével - az alábbi képlettel történik:

$$CV = 100 \cdot \frac{SD}{\bar{X}} \quad \text{[\%]}$$

Az egyenletben szereplő $\bar{X}$ a minta mérési eredményeinek átlaga az $[SD]$ pedig a szórása. Minél kisebb az értéke, annál megbízhatóbb a minta hormontartalmára tett becslésünk.

2.9.3.1. Belső és külső variációs együttható meghatározása

A belső és külső variációs együttható a vizsgálat precizitásáról informál. Ezen együttható meghatározásához ismert hormontartalmu ellenőrző mintákat használunk. Célszerű ezeket úgy megválasztani, hogy hormontartalmuk a méréstartomány különböző részére essen /pl. egy alacsony, egy közepes és egy magas koncentrációju ellenőrző minta hormontartalmát határozzuk meg párhuzamosan a méréssorozatokban/.

a, Egy-egy méréssorozatban, az ellenőrző mintákhoz tartozó variációs együtthatók átlaga a vizsgálat belső variációs együtthatója /B-CV/.

A belső variációs együtthatót /B-CV/ a különböző dózisszintek variációs együtthatói súlyozott számtani átlaga alapján számítjuk:

$$B-CV = \frac{\sum n_i \cdot CV_i}{\sum n_i} \quad \text{/\%}/$$

Az egyenletben szereplő /CV_i/ az "i"-edik minta variációs együtthatója, /n_i/ a meghatározások száma.

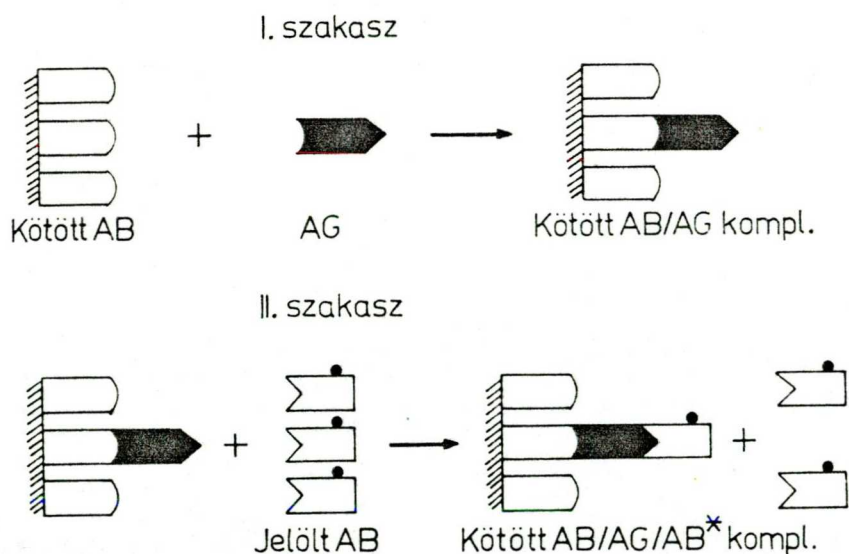
b, A külső variációs együttható /K-CV/ az ellenőrző minták vizsgálatok közötti variációs együtthatóinak átlaga. Számértékét az ellenőrző mintákhoz tartozó, különböző méréssorozatokban mért átlagok alapján számított variációs együtthatók átlaga képezi. Kiszámítása az alábbi képlet alapján történik:

$$K-CV = \frac{\sum n_i \cdot CV_{xy}^i}{\sum n_i} \quad \text{/\%/}$$

$/CV_{xy}^i/$ az "i"-edik mintának az x és y méréssorozat alapján meghatározott variációs együtthatója, $/n_i/$ a meghatározások száma.

2.10. A radioimmunoassay jövője

A radioimmun-analitikai eljárások további tökéletesítéséhez szilárd fázishoz kapcsolt monoklonális antitestek alkalmazása szükséges. Ezzel növelhető az assay specifikussága és leegyszerűsödik az antigén-antitest kötésben lévő, ill. szabadon maradó hormonfrakciók szétválasztása. A közeljövő ún. "szendvics" technikájú radioimmunoassay-jének az elvét a 4. ábrán mutatjuk be.



4. ábra: "Szendvics" technikájú radioimmunoassay

Ezen RIA meghatározáshoz két, az antigén molekula más-más szekvenciájával szemben képződött monoklonális ellenanyag szükséges. Amíg az egyik ellenanyag szilárd hordozóhoz kapcsoltn van jelen a rendszerben, addig a másik radioaktív formában jelzőként szerepel. A RIA meghatározás két szakaszból áll. Az első inkubációs lépésben a feleslegben lévő, szilárd hordozóhoz kötött antitesthez hozzákapcsolódik a mérni kívánt antigén; a második szakaszban a feleslegben lévő, radioaktív izotóppal jelzett antitest kapcsolódik a már kötésben lévő antigénhez.

A hagyományos - oldott állapotú antigén-antitest komplex képződésen alapuló - radioimmunoassay-vel szemben ezen RIA technika előnyei:

- a két eltérő szekvenciaérzékenységű monoklonális ellenanyag együttes alkalmazása biztosítja a meghatározás antigénspecifikusságát;
- a szilárd fázisu technika a kötött és szabadon maradó hormonfrakciók egyszerű elválasztását teszi lehetővé;
- megszűnnek az antigén radioaktív izotóppal történő jelölésének nehézségei.

3. RADIOAKTIV JÓD IZOTÓPPAL JELZETT ANTIGÉNEK TISZTÍTÁSA

A 2.7.2. fejezetben ismertetett okok miatt, a jódozási reakciót követően a jelölt antigént tisztítani kell. A leggyakrabban alkalmazott eljárások: gélszűrés, dialízis, ioncserélő kromatográfia, poliakrilamid-gél elektroforézis. Ezek közül az egyik leghatásosabb eljárás a poliakrilamid-gél elektroforézis.

3.1. Az elektroforézis fogalma

Az elektroforézis az un. elektrokinetikai jelenségek közé tartozik. Ekkor a folyadék fázisban szétoszlatott, elektromos kettősréteggel rendelkező részecskék vándorolnak elektromos erőterben a felületi töltésükkel ellentétes pólus felé. A részecskék vándorlási sebességét főképpen töltésük és az elektromos erőter szabja meg, de függ a közeg anyagi minőségétől is. A vándorlási sebességet leíró összefüggés:

$$u = \frac{\xi \cdot \epsilon \cdot H}{6 \cdot \pi \cdot \eta}$$

ahol ξ a vándorló részecskék elektrokinetikai potenciálja, ϵ a közeg dielektromos állandója, H az alkalmazott térerősség, η a közeg belső surlódása. Az elektroforetikus elválasztási folyamat alapja, hogy a szeparálandó komponensek elektromos erőterben különböző sebességgel vándorolnak.

2.5-35 % között változtatva, a pórusméret 2.5-0.8 nm, az átszűrődő egységek molekulásulya pedig 2×10^6 - 2×10^3 között változik.

A poliakrilamid-gél legszembetűnőbb előnye más gélangyagokkal szemben a nagy felbontási képesség, amely egyrészt a pórusméret változtatásával, másrészt az elválasztandó komponensek eltérő töltésnagyságával magyarázható. Wright és mtsai /1966/ vérplazmából un. "differenciál" módszerrel kb. 50 szérumfehérjét tudtak kimutatni.

Poliakrilamid-gél készítéséhez az akrilamid monomeren és az N,N'-metilén-bisz-akrilamidon kívül más anyagok is szükségesek. Megfelelő összetételű pufferoldatokban történik a monomer oldása, a polimerizáció folyamatához pedig katalizátorokat használnak, amelyek megindítják és gyorsítják a térhálósodást. Leggyakrabban használatos katalizátorok:

- 3-dimetil-amino-propionitril,
- ammónium-perszulfát / $\text{NH}_4/2\text{S}_2\text{O}_8/$,
- N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin /TEMED/.

A katalizátorok mennyiségének megválasztásánál ügyelni kell arra, hogy a gélképződés 15-30 perc alatt befejeződjék. UV-fénnyel történő megvilágítás ugyancsak elősegíti a térhálósodási folyamatot.

A gélképzési műveletet úgy kell végezni, hogy a gél megszilárdulása már formába öntött állapotban történjék meg.

4. A GASZTRIN

A magasabb rendű szervezetek életműködésének szabályozásában nagyon fontos szerepet töltenek be a peptidhormonok. A gyomor-bél rendszer egyik peptidhormonja a gasztrin. Gyomorsav termelést fokozó hatása alapján Komarov /1938/ gondolt először hormon-szerű anyag létezésére a macska antrum-nyálkahártyájában. Az 1950-es évek végéig e hormon számos élettani hatását felderítették, de a kémiai sajátságai közül csak azt ismerték, hogy polipeptid. Kémiai tulajdonságainak kutatásával elsőként Gregory és Tracy kezdett foglalkozni.

4.1. A gasztrin biokémiája

Gregory és Tracy az 1960-as évek elején a gasztrin izolálására és szerkezetének felderítésére vállalkozott. Sertés antrum-nyálkahártyából két azonos aminosav összetételű, biológiailag aktív peptidfrakciót izoláltak oszlopkromatográfiával /1964/. A sertés gasztrin I és II-nek elnevezett peptidfrakció egyaránt 17 aminosavból áll, viszont a II-es jelzésűben a 12-es helyzetű tirozin fenolos hidroxilcsoportja szulfátészterként van jelen. Ez a magyarázata eltérő kromatográfiás viselkedésüknek és okozza a sertés gasztrin II savanyubb jellegét. Az emberi gasztrin izolálását ugyancsak Gregory és mtsai végezték el /1966/. A szerkezetfelderítés során kiderült, hogy az emberi és sertés gasztrin között egyetlen különbség található csak, mégpedig az 5-ös helyzetű aminosav sertésnél L-metionin, az embernél L-leucin. Az emberi gasztrin /1-17/ szerkezete:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
PGlu-Gly-**Pro**-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-

12 13 14 15 16 17
-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

A későbbiek során elvégezték a kutya, macska, juh és szarvasmarha gasztrin izolálását és szerkezet felderítését is.

Ezek alapján bizonyossá vált, hogy emlősökben a gasztrin heptadekapeptid-amid /G-17/ két formában - szulfátésztert nem tartalmazó, ill. tartalmazó - található, de az I és II jelzésű hormonok aránya fajonként eltérő. A másik sajátosság, hogy minden fajspecifikus G-17 esetében közös az aminovégi /N-terminális/ tetrapeptid, a 6-os, 7-es és 9-es helyzetű L-glutaminsav egység, valamint a karboxilvégi /C-terminális/ Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ szekvencia. Ezen eltérések csupán egyetlen pontmutációra vezethetők vissza.

A fajspecifikus gasztrinok szerkezet felderítése enzimes emésztés, a töredék peptidek elektroforetikus vizsgálata és aminosav-analizise, valamint tömegspektrográfia segítségével történt. Végül a felderített szerkezetet szintézissel igazolták.

A sertés gasztrin szintézisével egyidőben Tracy és Gregory /1964/ meghatározták a hormon aktív centrumát is. A C-terminális tetrapeptid-amid rendelkezik a természetes hormon összes ismert hatásával, bár hatáserevése annak kb. csak 10 %-a. Morley vizsgálatai szerint /1968/ a tetrapeptid szekvencia aminovég felé történő hosszabbításával a biológiai hatás fokozatosan közelít a teljes polipeptid hormonéhoz. A gasztrinmolekula aminovégi része élettani körülmények között valószínűleg védőfeladatot tölt be.

Az elválasztási műveletek tökéletesedésével egyre több peptidhormonról vált ismertté hogy heterogén, azaz különböző nagyságu molekuláris formái vannak jelen a keringésben és ezek biológiai hatása is eltérő lehet.

A gasztrin esetében Rehfeld /1975/ 20 biológiailag aktív és kettő inaktív típust tételezett fel. Ezen típusokat a következő csoportokba sorolhatjuk:

Komponens I: - kémiaailag pontosan még nincs tisztázva,
kb. 45 aminosavból áll

Ms: kb. 10000

Komponens II: - Gasztrin 34 = G-34 = big gasztrin

Ms: 3870

Komponens III:- Gasztrin 17 = G-17 = little gasztrin

Ms: 2100

Komponens IV: - Gasztrin 13 = G-13 = minigasztrin

Ms: 1700

A komponens II, III és IV szulfatált és nem szulfatált formában is megtalálható a szervezetben. Élettanilag a II és III komponens a legfontosabb. Leggyakrabban egymás mellett találhatók a keringésben és a megfelelő szervekben, viselkedésük, mennyiségi jelenlétük révén egymást kiegészítik.

Az egyes komponensek biológiai hatása eltérő. Walsh és mtsai /1974/ kutyakisérletek alapján azt találták, hogy ha a G-17 gyomorsav kiválasztó hatását 100 %-nak tekintik, akkor a G-45 1 %-nyi, a G-34 20 %-nyi, a G-13 50 %-nyi savstimuláló hatása. Egyes szerzők /Yalow és Berson 1972, Rehfeld 1974, Dockray 1975/ az ún. big big gasztrin létezését is bizonyították. Ennek molekulásulya 20000-nél nagyobb.

5. KISÉRLETI ANYAGOK

A bevezetőben említett két szekvenciaspecifikus gasztrin radioimmunoassay kidolgozásánál felhasznált anyagokat az alkalmazás módja szerint csoportosítva mutatjuk be.

I. Az antigének készítéséhez felhasznált haptének:

1. A Wünsch és munkacsoportja /Max Planck Institut, München/ által szintetizált /Wünsch 1972/a; 1972/b; 1972/c/ 15-Leu humán gasztrin I /1-17/:

PGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-
-Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂

2. A SZOTE Orvosvegytani Intézetének munkatársai készítette humán gasztrin I N-terminális /1-13/ fragmense:

PGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly

II. A szekvenciaspecifitási vizsgálatoknál alkalmazott anyagok:

1. PGlu-Gly-Pro-Trp-Leu
2. Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly
3. Ala-Tyr-Gly
4. Gly-Trp
5. Trp-Leu
6. Trp-Met-Asp-Phe-NH₂
7. Leu-Asp-Phe-NH₂
8. Asp-Phe-NH₂
9. CCK-8
10. CCK-33
11. BOC- β -Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ /Acignost/

A II. 1-8 peptidfragmenseket, továbbá a CCK-oktapeptidet a SZOTE Orvosvegytani Intézet munkatársai készítették.

/A CCK-oktapeptid szintézise szabadalmi eljárás alatt van./
A 99 %-os tisztaságu CCK-33-at V. Mutt professzortól /Karlinska Institut, Stockholm/ kaptuk ajándékba. Az "Acignost" pentagasztrint a VEB Berlin-Chemie gyártotta.

III. A gasztrin radioimmunoassay-k beállításához felhasznált puffer-oldatok:

1. Gasztrin RIA I assay-puffer: 0.02 M-os, pH=8.4 veronálpuffer. Készítése: 1.050 g Barbitursavat és 2.950 g Na-dietil-barbiturátot oldottunk kétszer desztillált vízben és kiegészítettük 1000 ml-re.

2. Gasztrin RIA II assay-puffer: 0.04 M-os, pH=8.4 veronálpuffer. Készítése: 1.050 g Barbitursavat és 2.950 g Na-dietil-barbiturátot oldottunk kétszer desztillált vízben és kiegészítettük 500 ml-re.

3. A gélkromatográfiához használt 0.1 M-os, pH=7.4 foszfátpuffer készítése: 13.883 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -t és 3.036 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -t oldottunk kétszer desztillált vízben és kiegészítettük 1000 ml-re.

4. A jelölési reakciónál alkalmazott 0.25 M-os, pH=7.4 foszfátpuffer készítése: 34.708 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -t és 7.589 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -t oldottunk kétszer desztillált vízben és kiegészítettük 1000 ml-re.

5. A poliakrilamid-gél elektroforézisnél alkalmazott tris-ecetsav törzspuffer készítése: 48.44 g Tris-/hidroxi-metil/-

amino metánt és 4 g Na-lauril-szulfátot oldottunk 800 ml kétszer desztillált vízben. Ezt követően 12 ml jégecetet mérünk az oldathoz, majd kétszer desztillált vízzel 1000 ml-re egészítettük ki.

A puffer-oldatok készítéséhez felhasznált valamennyi vegyszer Reanal készítmény volt.

6. SZEKVENCIA-SPECIFIKUS GASZTRIN RADIOIMMUNOASSAY-k KIDOLGOZÁSA

Laboratóriumunkban a gasztrin mérésére két radioimmunoassay-t állítottunk be. Kronológiai sorrendben, a gasztrin heptadekapeptid C-terminális szekvenciáját érzékelő ellenanyagunk felhasználásával a gasztrin RIA I-et, a molekula N-terminális végét érzékelő ellenanyagunkkal a gasztrin RIA II-t. A könnyebb áttekinthetőség és összehasonlíthatóság céljából a két RIA beállításának egymást követő lépéseit párhuzamosan mutatjuk be.

6.1. Gasztrin antigének készítése

I. A gasztrin RIA I beállításánál a 15-Leu humán gasztrin I /1-17/-et /5. fejezet I.1./ használtuk fel mint haptént. A gasztrint bovin szérum albuminhoz /BSA/ kapcsoltuk aktiv-észter technikával.

10 mg BSA-t /SIGMA/ 1.0 ml kétszer desztillált víz és dimetilformamid /DMF/ 1:1 arányu keverékében; 7.2 mg gasztrint pedig 0.5 ml dioxán és 1.2 ml DMF keverékében oldottuk fel. A gasztrin oldathoz cseppenként 27 μ l trietilamint adtunk, majd az oldatot 0 °C-ra hűtöttük. Lehűlés után a gasztrinoldathoz 13 μ l 10 %-os klórszénsav izobutilésztert adagoltunk cseppenként. A reakcióelegyet 0 °C-on 3 percig kevertük. Ez alatt aktiválódtak a gasztrin szabad karboxil-csoportjai. Az aktivált gasztrinoldathoz állandó keverés közben cseppenként hozzáadtuk



a közben 0°C -ra hűtött BSA oldatot. A reakció lejátszódását buborékképződés formájában széndioxid felszabadulása jelezte. A 120 perces reakcióidő alatt a pH-t 0.01 M-os NaOH-dal 7.0-en tartottuk.

A kapcsolás után a gasztrin-BSA antigént 6 órán át desztillált vízzel szemben 4°C -on dializáltuk, majd liofilizáltuk.

Aminosav-analizissel vizsgálva, az antigénen belül a gasztrin-BSA molaránya 12:1 volt.

II. A gasztrin RIA II-nél hapténként a humán gasztrin I N-terminális /1-13/ fragmense /5. fejezet I.2./ szerepelt, amelyet sertés thyreoglobulinhoz /Koch-Light Laboratories Ltd/ kapcsoltunk.

A kapcsolás ún. vegyes anhidrides peptidkapcsolási technikával történt: 9.1 mg tercier butiléterrel részlegesen védett gasztrin N-terminális /1-13/ fragmenst oldottunk 1.2 ml BMF és 0.5 ml dioxán keverékében; 20 mg sertés thyreoglobulint pedig 0.6 ml fiziológiás sóoldatban. Az oldatokat 0°C -ra hűtöttük. Az N-terminális gasztrin fragmens oldatához cseppenként összesen 42 μl N-metil-morfolint, majd 22.4 μl klórszénsav izobutilésztert adtunk. 3 perces aktiválás után, folyamatos keverés közben a hűtött thyreoglobulin oldatot a keverékhez csepegtettük. A reakcióelegyet 2 órán át 0°C -on folyamatosan tovább kevertük, eközben 0.01 M-os NaOH hozzáadásával a pH-t 7.0-n tartottuk. A következő lépésben a reakcióelegyet desztillált vízzel szemben 30 percig, majd fiziológiás sóoldattal szemben 24 órán át dializáltuk. A védőcsoportok eltávolítását a szokásos módon sósav/jégecet-tel végeztük. Ez a művelet 60 percig tartott.

Ezt követően az elegy pH-ját 2 M-os NaOH-dal semlegesre állítottuk be, majd az anyagot 4 °C-on fiziológiás sóoldattal mostuk és centrifugáltuk. Többszöri ismételt mosás és centrifugálás után az antigént liofilizáltuk.

Aminosav-analizissel vizsgálva, az antigénen belül a gasztrin fragmens-thyreoglobulin molarány 32:1 volt.

A kapcsolás előzménye, hogy a tercier butiléteres védelem a tridekapeptid C-terminális glicinjének karboxil-csoportjára nem terjedt ki. Ennek köszönhető, hogy a tridekapeptid a C-terminális glicinen keresztül tudott a thyreoglobulinhoz kapcsolódni.

6.2. Gasztrin antiszérumok előállítása

Az immunizálás gyakorlati kivitelezése az immunválasz ellenőrzése, az antiszérum tárolása mindkét radioimmunoassay kidolgozásánál gyakorlatilag azonos volt. Gasztrin /1-17/-BSA antigénnel, ill. gasztrin N-terminális /1-13/-thyreoglobulin antigénnel, 3-3 vegyes törzsű him nyulat immunizáltunk. Az állatok egy hónapos időközönként 1-1 ml komplett Freund adjuváns /Bacto/ és steril fiziológiás só 1:1 arányu emulziójában oldott, 1-1 mg antigént kaptak 15-20 helyre elosztatva szubkután a hát bőre alá. Az immunválaszt a második oltást követően ¹²⁵I izotóppal jelölt 15-Leu humán gasztrin I /1-17/ /6. 5-6. fejezet/ segítségével ellenőriztük. Mindkét antigén esetében csak egy-egy nyulnál találtuk kielégítőnek az antitestek termelődését. A hatodik immunizálás után ezen állatokat az arteria carotison

át elvéreztettük. Az immunsavót 5 %-os humán szérum albuminnal /HUMAN/ huszszorosra higitottuk és aliquotokban liofilizálva -20°C -on tároltuk.

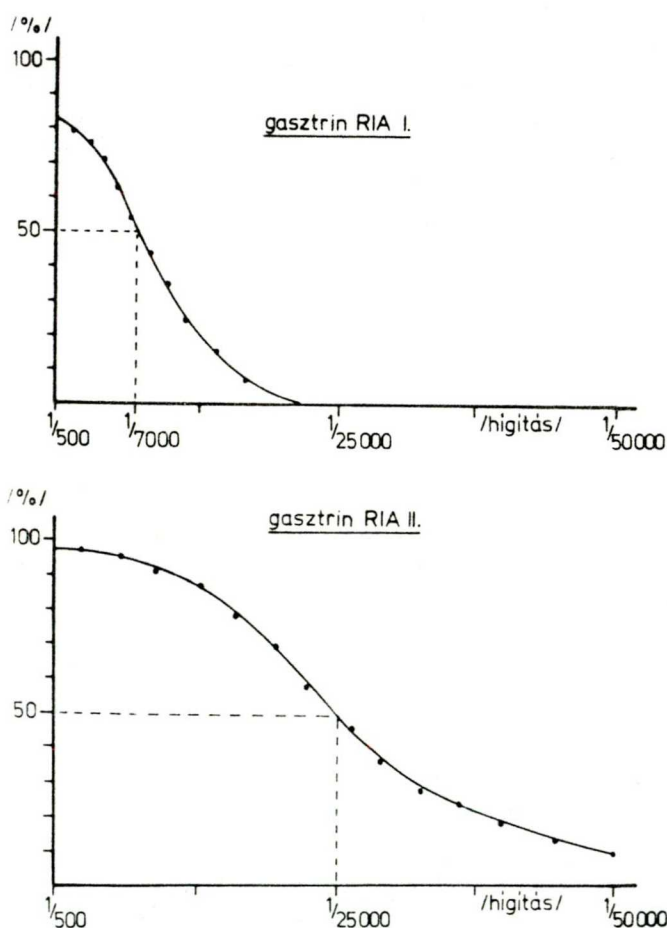
6.3. Az antiszérumok tulajdonságainak vizsgálata

A két gasztrin RIA-hoz felhasznált antiszérumok jellemzéséhez meghatároztuk azok titerét, affinitási konstansuk értékét, valamint specificitásukat.

6.3.1. Titer

A két antiszérum titerének meghatározása azonos módon történt. Mindkét antiszérumból assay-pufferek /5. fejezet III.1-2./ alkalmazásával higitási sort készítettünk 1:50-1:5000-ig. Ezt követően polisztirol RIA csövekbe/Gamma Müvek/ 0.8 ml assay-puffert, duplikációban 0.1 ml különböző higitásu antiszérumot, majd 0.1 ml térfogatban kb. 5000 cmp beütésszámu ^{125}I izotóppal jelölt G-17-et mértünk be. Az inkubációs végtérfogat így 1 ml volt. Az összekeverés után az antigén-antitest kötődési reakció lejátszódásához a mintákat 4°C -on 48 óráig inkubáltuk. Az ellenanyaghoz kötődött és szabadon maradó hormonfrakciókat dextránnal bevont csontszénnel szétválasztottuk, majd a szénen adszorbeálódott szabad hormonfrakciók aktivitását megmértük /6.8. fejezet/. A mért aktivitási értékek, valamint a csövekbe bevitt összaktivitás ismeretében - a nem fajlagos kötődést figyelembe véve -, kiszámítottuk az antiszérumok különböző higitásai-

hoz tartozó kötési százalékokat. /Antiszerumot nem tartalmazó minták esetében, az adszorpciós elválasztás után a felüluszókban található aktivitási értékeket jelöljük a "nem fajlagos kötődés" kifejezéssel./ Ezen értékeket a higitások függvényében ábrázolva ún. antiszerum higitási görbéket kaptunk /6. ábra/.



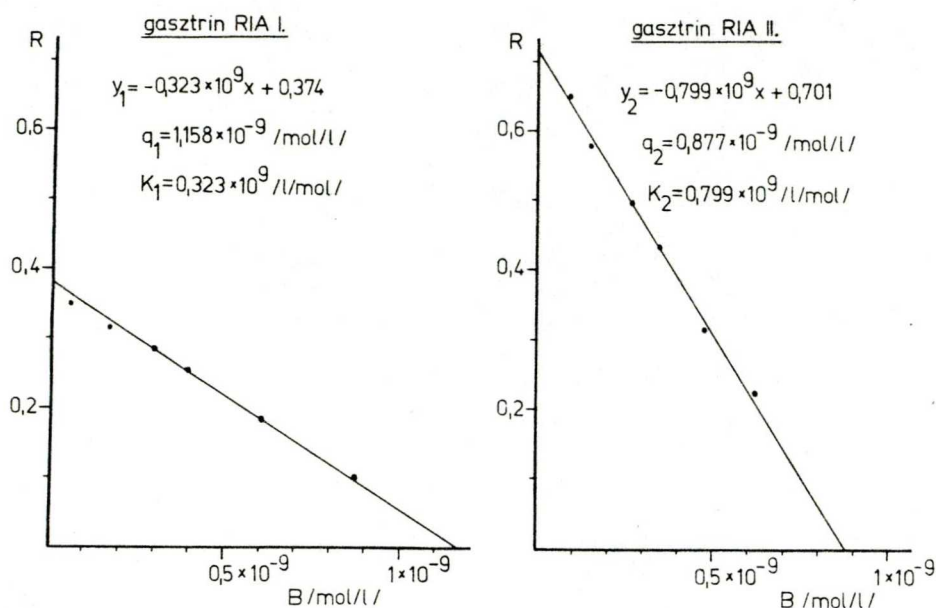
6. ábra: Gasztrin antiszerumok higitási görbéi

Az S alakú görbék lefutásából megállapítható, hogy a gasztrin RIA I-nél használt ellenanyagunk az 1:7000, a gasztrin RIA II-

nél használt pedig az 1:25000 végső higitás esetében köti meg az inkubációs elegybe bemért jelölt gasztrin 50 %-át. Így antiszérumaink titerei az 1:7000-es, ill. 1:25000-es higitás. Vizsgálataink további részében ezen antiszérum-higitásokkal dolgoztunk.

6.3.2. Affinitási konstansok

A két gasztrin radioimmunoassay-hez felhasznált antiszérumaink affinitási konstansát a Scatchard-függvény segítségével határoztuk meg /2.3. fejezet/. A RIA csövekbe az assay-puffereket, a titernek megfelelő higitásu antiszérumokat és növekvő radioaktivitású /2500-50000 cpm/ ^{125}I izotóppal jelzett G-17-et adtunk. A 4°C -on, 48 óráig történő inkubálást követően szétválasztottuk az antiszérumhoz kötődött és szabadon maradó jelzett gasztrint. A minták radioaktivitás mérését követően - a nem fajlagos kötődést figyelembe véve - kiszámítottuk az egyes csövek szabadon maradó, ill. az ellenanyaghoz kötődött G-17 tartalmát pg-ban. /A cpm-ben mért radioaktivitási értékeknek pg-ban kifejezett gasztrin mennyiséggé történő átszámításához - Bliss 5. kritériumának /2.2. fejezet/ érvényesülését feltételezve - a mérési sorozatokhoz tartozó kalibrációs görbéket /6.8. fejezet/ használtuk fel./ A Scatchard-görbék felvételéhez az egyes csövekhez tartozó kötött és szabad gasztrin hányadosát ábrázoltuk a kötött gasztrin inkubációs térfogatra vonatkoztatott, mol/l-ben kifejezett koncentrációjával szemben /7. ábra/.



7. ábra: Scatchard-függvények

Az ábrán látható egyenesek segítségével meghatároztuk antiszérumaink affinitási konstans értékeit $[K_1, K_2]$, valamint az antitestek titernek megfelelő hígításához tartozó teljes koncentrációit $[q_1, q_2]$. Gasztrin RIA I módszerünk esetében felhasznált ellenanyagunk affinitási konstansa:

$K_1 = 0.323 \cdot 10^9 \text{ l/mol}$; a titernek megfelelő $[1:7000]$ hígítás esetében az antitestek teljes koncentrációja: $q_1 = 1.158 \cdot 10^{-9} \text{ mol/l}$.

Gasztrin RIA II-nél alkalmazott ellenanyagunk hasonló adatai:

$K_2 = 0.799 \cdot 10^9 \text{ l/mol}$; $q_2 = 0.877 \cdot 10^{-9} \text{ mol/l}$. A gasztrin RIA I

K_1 konstans és a gasztrin RIA II K_2 konstans értékei egyértelműen mutatják az affinitásban meglévő különbségeket, amely

$K_2 > K_1$.

6.3.3. Szekvenciaspecificitás vizsgálata

Antiszerumaink szekvencia érzékenységét keresztreakciók segítségével határoztuk meg. A titernek megfelelő hígításu antiszerumok, ^{125}I izotóppal jelzett G-17 és hideg /standard/ G-17 /6.7. fejezet/ segítségével kalibrációs görbét készítettünk, majd ezt összehasonlítottuk az ugyanazon méréssorozatba bemért, vizsgálni kívánt peptidek segítségével felvett kalibrációs görbékkel.

A vizsgálat kivitelezéséhez a RIA csövekbe az assay-puffereket, az 1:700-as, ill. 1:2500-as hígításu antiszerumok 0.1 ml-ét, a ^{125}I izotóppal jelzett G-17 0.1 ml-ét /kb. 5000 cpm/ és a standard G-17, vagy a minták különböző koncentrációju sorozataiból 0.1 ml-t mértünk be. A kalibrációs görbe felvételéhez használt standard G-17 koncentrációja 0.015-0.952 pM/ml között, a vizsgálni kívánt peptideké 0.015-95.2 pM/ml között változott. Az inkubálást, csontszénese elválasztást és aktivitás mérést követően - a nem fajlagos kötődést figyelembe véve -, meghatároztuk az ellenanyaghoz kötődött aktivitási értékeket, majd ezeket a teljes kötőkapacitás százalékában fejeztük ki. /A teljes kötőkapacitást úgy kapjuk, hogy az inkubátumokba standard G-17 nincs bemérve./ A kapott kötési százalékokat a standard G-17, ill. a különböző peptidek koncentrációinak függvényében ábrázolva nyertük azokat a kalibrációs görbéket, amelyek segítségével - Abraham módszerét /2.6.2.3. fejezet/ követve - a gasztrin /1-17/-hez viszonyított 50 %-os kötésgátlást adó

molarányokat meghatároztuk.

Mindkét antiszérumunknak a gasztrin /1-17/-et felépítő különböző peptidfragmensekkel, pentagasztrinnal, koleciszto-kininrel /CCK-33/ és koleciszto-kinin oktapeptiddel /CCK-8/ szembeni érzékenységet vizsgáltuk /5. fejezet II. 1-11/. Eredményeinket az I. és II. táblázatban foglaltuk össze.

I. Táblázat: Gasztrin RIA I keresztreakciói

Vizsgált anyagok	G-17-hez viszonyított 50 % kötőgátlást adó molarányok
15-Leu humán gasztrin I/1-17/	1.000
BOC- β -Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ /Acignost/ Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ Leu-Asp-Phe-NH ₂ Asp-Phe-NH ₂	0.934 0.474 0.008 0.000
PGlu-Gly-Pro-Trp-Leu	0.000
Glu ₅ -Ala-Tyr-Gly Ala-Tyr-Gly Gly-Trp Trp-Leu	0.000 0.000 0.000 0.000
CCK-33	0.055
CCK-8	0.024

II. Táblázat: Gasztrin RIA II. keresztreakciói

Vizsgált anyagok	G-17-hez viszonyított 50 % kötőgátlást adó molarányok
15-Leu humán gasztrin 11-17/	1.000
PGlu-Gly-Pro-Trp-Leu	0.634
Glu ₅ -Ala-Tyr-Gly	0.000
Ala-Tyr-Gly	0.000
BOC-β-Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ /Acignost/	0.000
CCK-33	0.000
CCK-8	0.000

Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a gasztrin RIA I beállításánál felhasznált ellenanyagunk a G-17 molekula C-terminális végére érzékeny, mégpedig a gasztrin /13-16/ /Gly-Trp-Met/Leu/-Asp/ szekvenciáját ismeri fel, amely egyben a gasztrin molekula biológiailag aktív centruma is. Ennek következtében a diagnosztikai célból forgalomba hozott pentagasztrint /Acignost/ több mint 90 %-os hatásfokkal tudja mérni, mérsékelt keresztreakciót ad a CCK-33-mal és a CCK-8-cal, ellenben nem érzékeli a gasztrin N-terminális /1-12/ aminosav szekvenciát. A gasztrin RIA II-nél alkalmazott ellenanyagunk viszont a G-17 molekula N-terminális végére érzékeny. Ellenanyagunk a gasztrin N-terminális /1-5/ szekvenciájához /PGlu-Gly-Pro-Trp-Leu/ kötődik. A gasztrin N-terminális /1-5/ aminosav szek-

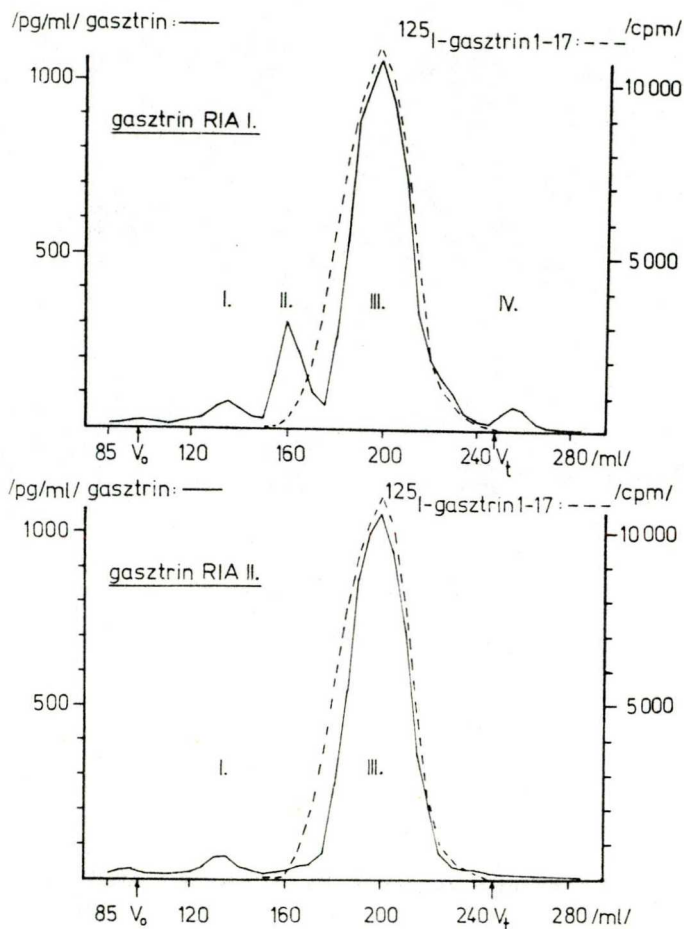
venciára érzékeny ellenanyag létrejöttében valószínűleg szerepet játszott az a körülmény, hogy az antigén készítés során a gasztrin /1-13/ fragmenst a 13-as helyzetű glicinen keresztül kapcsoltuk a thyreoglobulinhoz.

6.3.4. Immunspezifitás vizsgálata

Munkánk ezen részében ellenanyagainknak az emberi szervezetben megtalálható különböző molekulasúlyú gasztrinszármazékokkal /4.1. fejezet/ szembeni érzékenységét vizsgáltuk.

Műtéti uton eltávolított humán antrum nyálkahártyából 3 g-ot apróra daraboltunk és 10 ml fiziológiás sóoldatban 20 percen keresztül vízfürdőn 100 °C-on forraltuk. Ezt követően homogenizáltuk, majd Vac 601 típusú Janetzky ultracentrifugával 100000 g-vel 60 percig centrifugáltuk. A szupernatáns 2 ml-ét 15x1500 mm-es Sephadex G-50 superfine /Pharmacia/ oszlopon, 0.1 M-os pH=7.4 foszfátpufferrel /5. fejezet III.3./ 30 ml/óra átfolyási sebességgel kromatografáltuk és 5 ml-es frakciókat gyűjtöttünk. Oszlopunk kromatográfiás jellemzői: $V_0=92.5$ ml, $V_t=248.5$ ml. A frakciókban lévő immunreaktív gasztrinszármazékok koncentrációját párhuzamosan mindkét szekvenciaspecifikus radioimmunoassay-vel meghatároztuk. /A radioimmunoassay-k menete 6.8. fejezet./ Az egyes frakciókban található immunreaktív gasztrin koncentrációkat az eluáló folyadék mennyiségének függvényében mutatjuk be /8. ábra/. Az ábrán feltüntettük a ^{125}I izotóppal jelzett G-17 eluálódását is.

Ezt az anyagot azonosítási célból vittük fel az oszlopra.



8. ábra: Humán antrum homogenizátum Sephadex G-50 superfine frakciói

A 15-Leu humán gasztrin I/1-17/ ellenanyaggal végzett méréssel /gasztrin RIA I/ mind a négy /I-IV/ irodalomban közölt /4.1. fejezet/ gasztrinszármazékot azonosítani tudtuk. A humán gasztrin I N-terminális /1-13/ ellenanyag /gasztrin RIA II/ a II és IV komponenseket /big gasztrin és a gasztrin /1-17/-nél kisebb molekulásulyu fragmensek/ nem mérte.

Tekintettel arra, hogy a gasztrin I komponens az emberi keringésben csak minimális mennyiségben található, így a gasztrin RIA II-nél használt ellenanyagunk gasztrin /1-17/ vagy little gasztrin specifikusnak tekinthető.

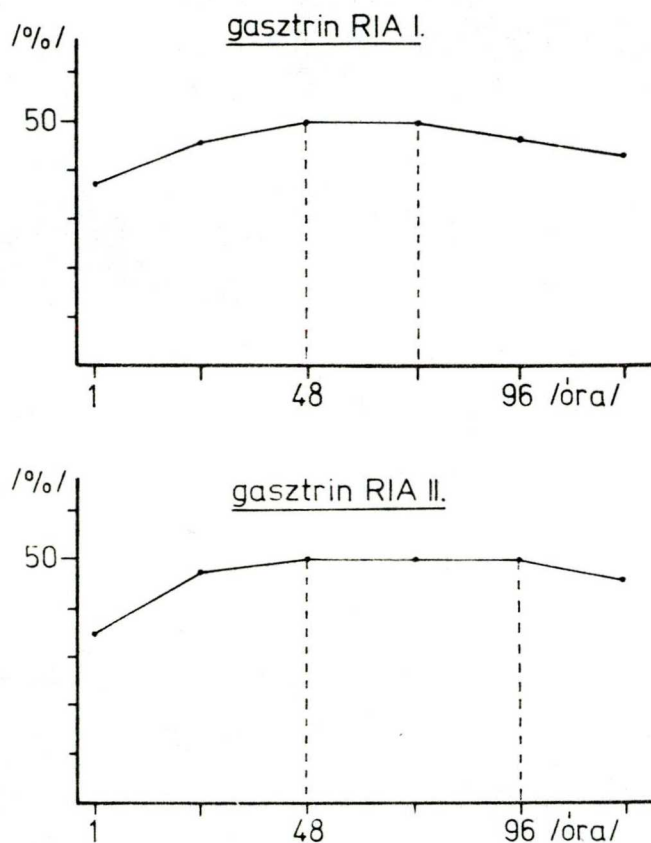
6.4. Inkubáció optimális idejének a meghatározása

Az antigén-antitest közötti kötődési reakció lejátszódása, az egyensúly beállása adott hőmérsékleten, megfelelő időtartamu inkubálás során következik be. A radioimmunoassay-knél alkalmazott inkubációs hőmérséklet általában 4°C , az inkubáció időtartama pedig minden egyes RIA-nál eltérő. Optimális idejű inkubáció során, az antigén-antitest közötti kötődési reakció lejátszódása az antigén molekula, ill. az antitest károsodása nélkül következik be. Mivel általában az inkubáció a legidőigényesebb lépés a RIA metodikákban, így ismerete a RIA meghatározás időszükségletére is felvilágosítást nyújt.

Az inkubáció optimális idejének a meghatározásánál a RIA csövekbe az assay-puffereken kívül az 1:700-as, ill. 1:2500-as higitásu antiszérumok 0.1 ml-ét, továbbá 0.1 ml ^{125}I izotóppal jelzett G-17-et /kb. 5000 cpm/ mértünk be. Az összekeverést követően a mintákat 4°C -on inkubáltuk és 1-120 óra között vizsgáltuk az antigén-antitest közötti kötődést. A csontszerves elválasztást és aktivitás mérést követően - a nem fajlagos kötődést figyelembe véve -, meghatároztuk az ellenanyaghoz kötődött aktivitási értékeket. Ezt követően, a bemért



összaktivitás ismeretében kiszámítottuk a különböző inkubációs időpontokhoz tartozó kötési százalékokat, majd eredményeinket az inkubálás idejének függvényében ábrázoltuk /9. ábra/.



9. ábra: Az inkubálás optimális időtartama

A görbék lefutásából megállapítható, hogy mindkét gasastrin RIA esetében az összemérést követően 48 óra múlva lesz maximális a kötődés. A plato elérése után - a jelölt antigén molekula vagy az antitest károsodása miatt - a kötődés ismét csökken. A plato a gasastrin RIA I esetében 48-72 óra között, a gasastrin RIA II esetében pedig 48-96 óra között

található. Ebben az időintervallumban kell a kötött és szabad hormonfrakciókat szétválasztani. Mi hagyományosan 48 órai inkubálást követően választjuk szét az antiszérumhoz kötődött és szabadon maradó hormonfrakciókat, emiatt RIA meghatározásaink két napot vesznek igénybe.

6.5. Gasztrin jelölése ^{125}I izotóppal

Mindkét radioimmunoassay-hez jelzőként a Wünsch és munkacsoportja által szintetizált 15-Leu humán gasztrin I /1-17/-nek /5. fejezet I.1./ ^{125}I izotóppal jelzett formáját használtuk fel. A gasztrin ^{125}I jelölése a Hunter és Greenwood által leírt /2.7.2. fejezet/ kloramin-T eljárással történt. Jelöléshez az MTA Izotóp Intézete által forgalmazott $\text{Na } ^{125}\text{I}$ -ot alkalmaztuk.

A reakciócsőbe folyamatosan bemértünk:

- a/ 3.7×10^7 becquerel/ ~ 4.0 μl /hordozómentes $\text{Na } ^{125}\text{I}$ -ot,
- b/ 1 μg /10 μl 0.25 M-os, pH=7.4 foszfátpufferben /5. fejezet III.4./ oldott gasztrin I /1-17/-et,
- c/ 10 μg /10 μl 0.25 M-os, pH=7.4 foszfátpufferben oldott kloramin-T-t /Reanal/.

A reakcióelegyet 20 másodpercig kevertük, majd hozzáadtunk

- d/ 20 μg /10 μl 0.25 M-os, pH=7.4 foszfátpufferben oldott Na-metabiszulfidot / $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ - N.V. Organon - OSS/ a reakció leállításához. Végül a reakcióelegyhez hozzámértünk:

- e/ 50 μl humán szérumot.

A jelölési reakciót követően a terméket a 2.7.2. fejezetben

leirt okok miatt tisztítani kell. Sikertelennek bizonyultak tisztítási próbálkozásaink Sephadex G-10 /Pharmacia/ gélkromatográfiával, ill. ennek AG 11A8 /Bio-Rad/ bifunkciós ioncserélő gyantával való kombinálása esetében is. A tisztítási művelet végül poliakrilamid-gél elektroforézissel sikerült.

6.6. ^{125}I izotóppal jelzett gasztrin tisztítása poliakrilamid-gél elektroforézissel

A tisztítási művelethez 15 %-os poliakrilamid-gélt alkalmaztunk. A gél alapanyaga, az akrilamid monomert és az N,N'-metilén-bisz-akrilamid térhálósítót /3.1. fejezet/ egyaránt tartalmazó Cyanogum 41 /SERVA/ volt.

A 15 %-os poliakrilamid-gél készítéséhez főzőpohárba bemértünk: 20 ml 40 %-os Cyanogum 41 oldatot, 15.5 ml kétszer desztillált vizet, 15.5 ml Tris-ecetsav törzspuffert /5. fejezet III.5./, 0.6 ml 3-dimetil-amino-propionitrilt /Fluka/ és 0.6 ml 10 %-os frissen készített ammónium-perszulfát $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8 - \text{Reanal}]$ oldatot. A gyors összekeverést követően a gél reakcióelegyét vízszintező asztalkán elhelyezett műanyag cellába öntöttük, amelynek egyik végébe plexiből készült, ritka fogazatu fésűszerű tárgyat helyeztünk el. A még folyékony reakcióelegy 0.5 cm vastagon egyenletesen szétterült a cellában, majd 4-5 perc múlva lejártszódott a polimerizáció folyamata. Ekkor a megszilárdult gélből eltávolítva a fésűszerű tárgyat a jelzőfestéknek /Bromfenolkék - Reanal/ és a jelölt gasztrinnak a gélbe vitelét szolgáló apró lyukak maradnak vissza. Az anyagfelvitelt követően az elektroforézist GELMAN gyártmányú futtatókádban 4°C -on végez-

tük. Futtatáshoz a Tris-ecetsav törzspuffer kétszer desztillált vízzel 1:4-re hígított oldatát használtuk. A 24 mA-rel történő, 8-10 órás elektroforézist követően a bróm-fenolkék front a felvitel helyétől 6-8 cm-re távolodott el. Ezután a ^{125}I izotóppal jelölt gasztrin vonalában egy kb. 1.5 cm vastag gélcst kivágtunk, majd ezt 0.5 cm-enként feldaraboltuk. Az egyes gélkockák aktivitását lemértük, majd a legnagyobb aktivitású gélkockákat $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on megfagyasztottuk. /A legnagyobb aktivitást a jelzőfesték vonalában találtuk./ A fagyasztás során a gél rugalmas szerkezete olyan mértékben károsodik, hogy ezt követően 0.5 % humán szérum albumint /HUMAN/ tartalmazó 0.02 M-os, $\text{pH}=8.4$ veronálpuffer /5. fejezet III.1./ 4 ml-ében végzett óvatos nyomkodással a gélből könnyen eluálódik a jelölt gasztrin. Az aktivitás mérést és a ^{125}I izotóppal jelölt gasztrin I /1-17/ immunreaktivitásának az ellenőrzését követően, a jelölt anyagot aliquotokba szétampulláztuk és $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on lefagyasztva tároltuk.

A jelöléstől számított 30-35 napig a ^{125}I izotóppal jelölt gasztrin jól felhasználható a RIA-khoz, ezt követően azonban a nem fajlagos kötődés ugrásszerűen emelkedni kezd. Emiatt a további felhasználás előtt Sephadex G-10-en végrehajtott gélkromatográfiás tisztítás szükséges, ill. új jelölést kell készíteni.

6.7. Gasztrin standard

Mindkét gasztrin radioimmunoassay-hez a Wünsch professzortól ajándékba kapott 15-Leu humán gasztrin I /1-17/-et /5. fejezet I.1./ használtuk fel.

A humán gasztrin I /1-17/-et 0.5 % humán szérum albumint tartalmazó 0.02 M-os, pH=8.4 veronálpufferben oldottuk és 10 ng/100 μ l-enként aliquotokban liofilizálva -20 °C-on tároltuk. A RIA mérésekhez előbb egy-egy ampullát 5 ml assay-pufferben oldottunk - kiindulási koncentrációnk 2000 pg/ml - majd ebből a kalibrációs görbék felvételéhez felező hígítással 1000-500-250-125-62.5-31.25 pg/ml koncentrációju oldatokat készítettünk.

A standard G-17 biológiai aktivitását negyedévenként konduktometriás bioassay-vel /Holzinger és mtsai, 1979/ ellenőriztük.

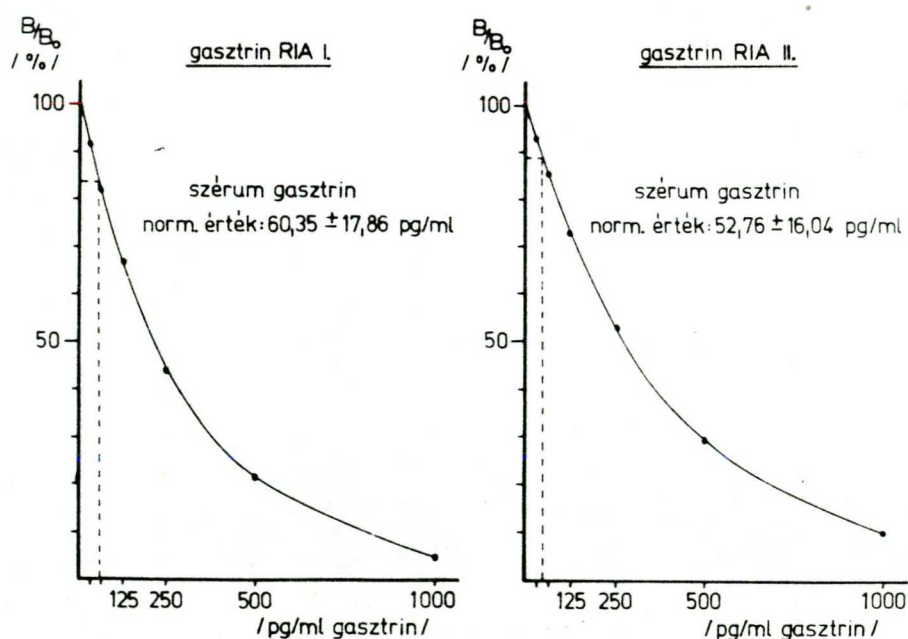
6.8. A radioimmunoassay-k menete

A polisztirol RIA csövekbe duplikációban az alábbi inkubációs elegyet mértük be:

- 1.0 ml 0.02 M-os pH=8.4, ill. 0.04 M-os pH=8.4 veronálpuffer;
- 0.1 ml 700x-ra, ill. 2500x-ra higitott antiszérum;
- 0.1 ml gasztrin standard /6.7. fejezet/, ill. mérni kívánt minta;
- 0.1 ml 125 I izotóppal jelölt G-17 /kb. 5000 cpm/.



A mintákat az összekeverést követően 4°C -on 48 óráig inkubáltuk. Ezután a szérumfehérjéket nem tartalmazó csövekbe 0.1 ml Komplement savót /HUMAN/ mértünk. Az ellenanyag által kötött és szabadon maradó hormonfrakciók elválasztására csövenként, 0.5 ml assay-pufferben szuszpendált 10 mg aktív szenet /Norit A-SERVA/ és 1.0 mg Dextrán T-70-et /Pharmacia/ mértünk be. A csöveket 20 percig 4°C -on 3000 rpm-en centrifugáltuk és a felülusztót leöntöttük. A szénhez kötődött szabad hormonfrakciók radioaktivitását Gamma NK 350/B spektrométeren mértük. Az ellenanyaghoz kötött radioaktivitás értékét a csövekbe bevitt összradioaktivitás ismeretében számítottuk ki. Az egyes csövek aktivitását a teljes kötőkapacitás százalékában fejeztük ki, a nem fajlagos kötődés értékének levonása után. A kapott értékeket a standard gasztrin koncentráció függvényében ábrázolva radioimmunoassay mérésre alkalmas kalibrációs görbéket kaptunk /10. ábra/.



10. ábra: Gasztrin RIA kalibrációs görbék

Radioimmunoassay módszereink alsó méréshatára 5-10 pg/ml gasztrin.

Mindkét gasztrin radioimmunoassay-vel párhuzamosan meghatároztuk 20 egészséges egyén éhgyomri szérum gasztrin koncentrációját. Eredményeinket matematikailag értékelve, a két gasztrin RIA-val meghatározott szérum gasztrin koncentrációk között szignifikáns eltérést találtunk [$p < 0.01$]. A 15 Leu-humán gasztrin I /1-17/ ellenanyaggal mért értékek átlaga 60.35 ± 17.86 pg/ml, a gasztrin I N-terminális /1-13/ ellenanyaggal mértéké pedig 52.76 ± 16.04 pg/ml volt.

6.9. A belső és külső variációs együtthatók meghatározása

Gasztrin radioimmunoassay módszereink precizitásáról a belső és külső variációs együtthatók nyújtanak információt. Meghatározásukhoz mindkét RIA esetében négy-négy, a méréstartomány különböző szakaszára eső gasztrintartalmu ellenőrző mintákat alkalmaztunk. A belső és külső variációs együtthatókat a mintáknak nyolc sorozatban párhuzamosan mért értékei alapján számítottuk ki.

I. Gasztrin RIA I esetében négy szérummintát használtunk a vizsgálatoknál. Ezek hormontartalma a normál, a normál felső határa, közepes és magas tartományba esett. Mérés eredményeinket a III. táblázatban foglaltuk össze.

III. Táblázat: Az ellenőrző minták méréseredményei

	Gasztrín koncentráció /pg/ml/							
	1. minta		2. minta		3. minta		4. minta	
1.	57	68	108	104	187	200	570	625
2.	52	50	108	105	192	199	625	635
3.	65	60	105	99	169	198	455	470
4.	56	54	87	95	169	177	510	625
5.	47	45	83	80	192	200	480	440
6.	47	46	101	109	172	168	535	465
7.	63	58	99	94	183	210	455	475
8.	53	48	92	100	171	182	470	530

A minták vizsgálatonként mért gasztrintartalmát felhasználva, a $CV = 100 \cdot \frac{SD}{\bar{X}}$ /%/ képlet segítségével /2.9.3. fejezet/ kiszámítottuk a belső variációs együtthatókat. Eredményeink a IV. táblázatban találhatók.

Nyolc vizsgálat alapján gasztrín RIA I módszerünk átlagos belső variációs együtthatója: $\overline{B-CV} = 5.52 \%$. A mintánkénti átlagos belső variációs együtthatók értékéből megállapítható, hogy párhuzamos mérési eredményeink szórása a méréstartomány középső részén a legkisebb.

A minták átlagának vizsgálatok közötti összehasonlításával számolt külső variációs együtthatók az V. táblázatban láthatók.

IV. Táblázat: Belső variációs együtthatók

	1. minta		2. minta		3. minta		4. minta	
	átlag	CV	átlag	CV	átlag	CV	átlag	CV
1.	62.5	12.45	106.0	2.67	193.5	4.75	597.5	6.51
2.	51.0	2.77	106.5	1.99	195.5	2.53	630.0	1.12
3.	62.5	5.66	102.0	4.16	183.5	11.17	462.5	2.29
4.	55.0	2.57	91.0	6.22	173.0	3.27	567.5	14.33
5.	46.0	3.07	81.5	2.60	196.0	2.89	460.0	6.15
6.	51.5	12.36	105.0	5.39	170.0	1.66	500.0	9.90
7.	60.5	5.84	96.5	3.66	196.5	9.72	465.0	3.04
8.	50.5	7.00	96.0	5.89	176.5	4.41	500.0	8.49
CV átlag:	6.47		4.07		5.05		6.48	

V. Táblázat: Külső variációs együtthatók

	1. minta		2. minta		3. minta		4. minta	
	átlag	CV	átlag	CV	átlag	CV	átlag	CV
1.	56.75	14.33	106.25	0.33	194.50	0.73	613.75	3.74
2.	56.75	14.33	104.25	3.05	189.50	4.48	546.25	21.68
3.	58.75	9.03	96.50	8.06	178.25	4.17	515.00	14.42
4.	50.50	12.60	86.25	7.79	184.50	8.81	513.75	14.80
5.	48.75	7.98	93.25	17.82	183.00	10.05	480.00	5.89
6.	56.00	11.36	100.75	5.97	183.25	10.23	482.50	5.13
7.	55.50	12.74	96.25	0.37	186.50	7.58	482.50	5.13
8.	56.50	15.02	101.00	7.00	185.00	6.50	548.75	12.56
CV átlag:	12.17		6.30		6.57		10.42	

Ellenőrző vizsgálataink alapján a gasztrin RIA I átlagos külső variációs együtthatója: $\overline{K-CV}=8.87\%$. A vizsgálatok közötti méréseredmények szórása - a vizsgálaton belüli méréseredményekhez hasonlóan - a méréstartomány közepén a legkisebb.

A rutin laboratóriumi szérum gasztrin szint meghatározáshoz használt gasztrin RIA I módszerünk átlagos belső és külső variációs együtthatóját összehasonlítva a nemzetközileg elfogadott CIS kit hasonló adataival $\overline{B-CV}=4.67\%$, $\overline{K-CV}=8.60\%$ megállapíthatjuk, hogy módszerünk precizitása jól megfelel a RIA meghatározás kívánalmainak.

II. Gasztrin RIA II esetében alkalmazott ellenanyagunk - miként a 6.3.4. fejezetben láttuk - gyakorlatilag little gasztrin /G-17/ specifikusnak tekinthető. Emiatt a gasztrin RIA I variációs együtthatói meghatározásához felhasznált szérumminták alkalmatlannak bizonyultak gasztrin RIA II esetében. /A 2-es, 3-as és 4-es szérumminta gasztrin koncentrációja közel azonosnak adódott./ Így a standardként használt 15-Leu humán gasztrin I /1-17/ négy különböző koncentrációju oldatát használtuk fel ellenőrző mintaként. Mérési eredményeinket a VI. táblázatban foglaltuk össze.

A minták mérési eredményeit felhasználva kiszámoltuk a belső variációs együtthatókat /VII. táblázat/.

VI. Táblázat: Az ellenőrző minták méréseredményei

	Gasztrin koncentráció /pg/ml/							
	1. minta		2. minta		3. minta		4. minta	
1.	53	41	93	82	200	185	425	500
2.	45	52	89	92	181	175	445	490
3.	41	44	99	85	180	185	520	535
4.	38	43	98	81	198	176	515	460
5.	50	56	88	107	200	186	470	435
6.	56	62	98	104	206	195	540	475
7.	60	53	89	94	217	193	435	530
8.	43	45	103	92	186	202	510	545

VII. Táblázat: Belső variációs együtthatók

	1. minta		2. minta		3. minta		4. minta	
	átlag	CV	átlag	CV	átlag	CV	átlag	CV
1.	47.00	18.05	87.50	8.89	192.50	5.51	462.50	11.47
2.	48.50	10.21	90.50	2.34	178.00	2.38	467.50	6.81
3.	42.50	4.99	92.00	10.76	182.50	1.94	527.50	2.01
4.	40.50	8.73	89.50	13.43	187.00	8.32	487.50	7.98
5.	53.00	8.00	97.50	13.78	193.00	5.13	452.50	5.47
6.	59.00	7.19	101.00	4.20	200.50	3.88	507.50	9.06
7.	56.50	8.76	91.50	3.86	205.00	8.28	482.50	13.92
8.	44.00	3.21	97.50	7.98	194.00	5.83	527.50	4.69
CV átlag:	8.64		8.16		5.16		7.68	

Nyolc vizsgálat alapján a gasztrin RIA II átlagos belső variációs együtthatója: $\overline{B-CV}=7.41\%$.

A külső variációs együtthatók a VIII. táblázatban találhatók.

VIII. Táblázat: Külső variációs együtthatók

	1. minta		2. minta		3. minta		4. minta	
	átlag	CV	átlag	CV	átlag	CV	átlag	CV
1.	47.75	2.22	89.00	2.38	185.25	5.53	465.0	0.67
2.	45.50	9.32	91.25	1.16	180.25	1.77	497.5	8.53
3.	41.50	3.41	90.75	1.95	184.75	1.72	507.5	5.57
4.	46.75	18.91	93.50	6.05	190.00	2.23	470.0	5.27
5.	56.00	7.58	99.25	2.49	196.75	2.70	480.0	8.10
6.	57.75	3.06	96.25	6.98	202.75	1.57	495.0	3.57
7.	50.25	17.59	94.50	4.49	199.50	3.90	505.0	6.30
8.	45.50	4.66	92.50	7.64	193.25	0.55	495.0	9.29
CV átlag:	8.34		4.14		2.50		5.92	

Az elvégzett vizsgálatok alapján számolt átlagos külső variációs együttható gasztrin RIA II esetében: $\overline{K-CV}=5,23\%$.

A gasztrin metabolizmus kutatás céljára alkalmazott gasztrin RIA II módszerüknél a vizsgálaton belüli, ill. az egyes vizsgálatok közötti méréseredmények szórása a méréstartomány középső szakaszára eső G-17 koncentrációk esetében a legkisebb.



7. AZ EMBERI TÜDŐ SZEREPE AZ ENDOGÉN GASZTRIN METABOLIZMUSÁBAN

A két gasztrin radioimmunoassay módszerünk együttes alkalmazásának példájaként az emberi tüdő gasztrint bontó képességével kapcsolatos vizsgálatainkat ismertetem. Az endogén gasztrin metabolizmusában a tüdő szerepére vonatkozóan ellentmondó irodalmi adatokat találtunk. Petersen és mtsai /1981/ vizsgálataik alapján arra a megállapításra jutottak, hogy emberben az endogén gasztrin degradáció nem koncentrálódik egyik szervre sem, hanem valamennyi szerv ilyen irányú tevékenységének eredményeként jön létre. Korábban kutyakisérletek alapján Thompson és mtsai /1979/ hasonló megállapításra jutottak. Ezzel szemben Korman és mtsai /1973/ kutya- és juhkisérletek eredményeként a tüdő szerepét hangsúlyozták az exogén gasztrin metabolizmusában. Munkacsoportunk /Varga és mtsai, 1982/ a patkánytüdő jelentős mértékű in vivo pentagasztrin katabolizáló képességéről számolt be. A rendelkezésünkre álló két szekvenciaspecifikus gasztrin RIA segítségével megkíséreltük ezen ellentmondó adatok tisztázását.

Az endogén gasztrin metabolizmus vizsgálathoz a vérmin-tákat a SZOTE Önálló Szívsebészeti Osztály Haemodinamikai Laboratóriumában diagnosztikus céllal végzett szívkatóteres vizsgálatok során nyertük. Csak olyan egyének vérmintáit vizsgáltuk, akikben máj- és vesebetegség, jobb és bal szívfél közötti shunt, továbbá vitium fennállása kizárható volt. A vérvétel a jobb és bal kamrából, a vena cava superiorból,

a vena cava inferiorból és a vena renalisból történt. A különböző érterületek vérének gasztrin koncentráció meghatározását gasztrin RIA I módszerünkkel végeztük. A RIA meghatározásnál felhasznált ellenanyagunk a gasztrin C-terminális /Gly-Trp-Met/Leu/-Asp/ tetrapeptid aminosav szekvenciára érzékeny /6.3.3. fejezet/ és az emberi keringésben található valamennyi gasztrinszármazékot méri /6.3.4. fejezet/. A mérési eredmények matematikai értékelése a Student-féle két mintás T próbával történt a SZOTE Számítástechnikai Központjában. A különböző érterületek vérében mért gasztrin koncentrációk átlagát és a szórást, továbbá a T próba eredményét a IX. táblázatban foglaltuk össze.

IX. Táblázat: A különböző érterületek vérének gasztrin koncentrációja

	Gasztrin konc. / $\bar{X} \pm SD$ /	Esetszám
	/pg/ml/	/n/
1. bal kamra	66.89 $\pm$ 41.48	36
2. jobb kamra	90.50 $\pm$ 44.99	36
3. vena cava inferior	142.20 $\pm$ 57.89	10
4. vena cava superior	75.60 $\pm$ 44.37	10
5. vena renalis	56.70 $\pm$ 26.26	10
1. - 2.: p < 0.01	1. - 4.: p > 0.05	
1. - 3.: p < 0.001	1. - 5.: p > 0.05	

A legnagyobb gasztrin koncentrációt a vena cava inferiorban találtuk. A vena cava inferior gasztrin tartalma több mint kétszerese a bal kamráénak. A különbség matematikailag is értékelhető $/p < 0.001/$. Jelentős különbséget találtunk a jobb és bal kamra vérének gasztrin koncentrációja között is. A jobb kamra vérében mért gasztrin koncentráció szignifikánsan nagyobb volt a bal kamráénál $/p < 0.01/$. A vena cava superior és a vena renalis vérében mért gasztrin koncentráció nem különbözött számottevően a bal kamrából vett vérminták gasztrin tartalmától.

A tüdőben folyó gasztrin katabolizmus részletesebb megismerése céljából, a jobb és bal szívfélből vett vérminták egy részének immunreaktív gasztrin koncentrációját gasztrin RIA II módszerünkkel is meghatároztuk. A gasztrin RIA II ellenanyaga a 17 aminosavból álló gasztrinnek az N-terminális $/1-5/$ $/P\text{Glu-Gly-Pro-Trp-Leu}/$ szekvenciájára érzékeny $/6.3.3.$ fejezet/, immun-specifitási vizsgálataink alapján $/6.3.4.$ fejezet/ pedig G-17, vagy little gasztrin specifikusnak tekinthető. A két különböző szekvencia-specifikus radioimmunoassay-vel a jobb és bal kamrában mért gasztrin koncentrációk átlagát és a szórást, valamint a T-próba eredményét a X. táblázatban tüntettük fel.

A táblázatban feltüntetett adatokból látható, hogy az N-terminális szekvencia-specifikus RIA-val $/\text{gasztrin RIA II}/$ mind a bal, mind a jobb kamra vérében kisebb gasztrin koncentrációt mértünk, mint a C-terminális szekvencia érzékenységgű RIA-val $/\text{gasztrin RIA I}/$. A különbségek matematikailag is ér-

tékelhetőek. /Mindkét esetben $p < 0.01$ /. Látható továbbá, hogy a jobb és bal kamra közötti gasztrin koncentráció különbség mindkét RIA-nál szignifikánsan eltér /gasztrin RIA I: $p < 0.01$, gasztrin RIA II: $p < 0.05$ /.

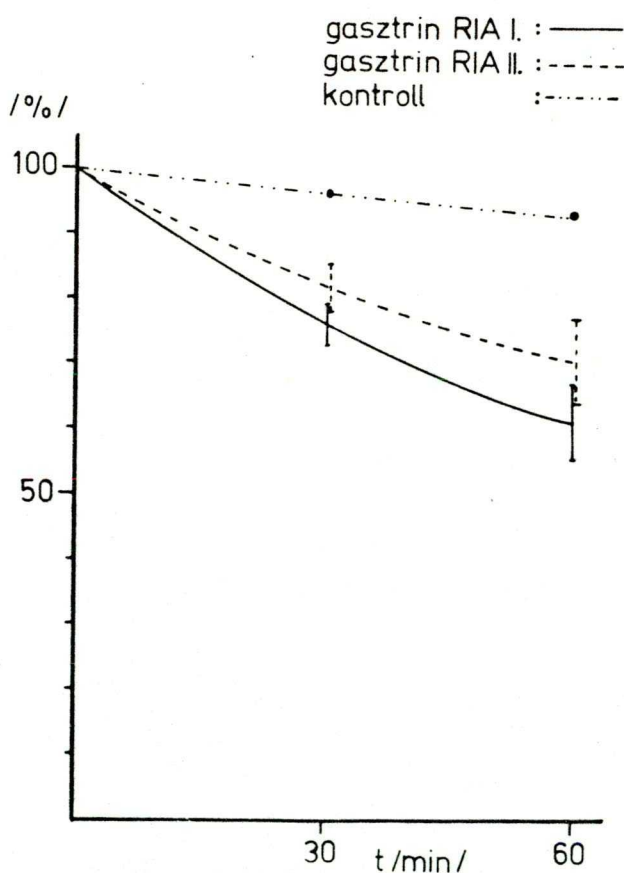
X. Táblázat: A bal és jobb kamra vérének gasztrin koncentrációja

		Gasztrin konc. $\bar{X} \pm SD$ /pg/ml/	Esetszám /n/
RIA I	1. bal kamra	73.37 $\pm$ 40.63	19
	2. jobb kamra	93.42 $\pm$ 45.28	19
RIA II	3. bal kamra	57.26 $\pm$ 25.09	19
	4. jobb kamra	69.47 $\pm$ 38.48	19
1. - 3.: $p < 0.01$		1. - 2.: $p < 0.01$	
2. - 4.: $p < 0.01$		3. - 4.: $p < 0.05$	

Annak megítélésére, hogy a két különböző szekvencia-specifikus gasztrin ellenanyag valóban különböző mértékben méri-e a tüdőben folyó gasztrin katabolizmust, in vitro körülmények között is megmértük a tüdő szintetikus human gasztrint bontó aktivitását.

Az in vitro gasztrin metabolizmus vizsgálatához öt tüdő tumoros beteg műtéte során nyert ép tüdőszövetet használtunk. A szövetmintákból fiziológiás só oldattal 10 %-os homogenizátumokat készítettünk. A homogenizátumokat Vac 601 típusu

Janetzky ultracentrifugával egy órán keresztül 100000 g-vel centrifugáltuk. A felüluszó 1 ml-éhez 4 ml fiziológiás sóban oldott 2.5 ng 15-Leu szintetikus humán gasztrin I /1-17/-et /5. fejezet I.1./ adtunk. A keveréket 37 °C-on inkubáltuk és az inkubátum gasztrin koncentrációját 0, 30 és 60 perc múlva meghatároztuk. Kontrollként olyan inkubációs keveréket is készítettünk, amelyben a tüdő homogenizátum citoszol frakcióját a gasztrin hozzáadása előtt 15 percig forraltuk. Az inkubációs keverék gasztrin koncentrációjának változását a 11. ábrán mutatjuk be.



11. ábra: Az inkubációs keverék gasztrin koncentrációjának változása

Az emberi tüdő citoszol frakciójával inkubált szintetikus humán gasztrin koncentráció csökkenése mindkét RIA-val mérhető volt. A C-terminális szekvencia-specifikus RIA-val /gasztrin RIA I/ mérve az inkubációs keverék kiindulási gasztrin koncentrációja egy óra alatt átlagban 38.72 ± 6.14 %-kal csökkent. Ugyanezekből a mintákból N-terminális szekvencia érzékenységgű RIA-val mérve /gasztrin RIA II/ az immunreaktív gasztrin koncentráció csökkenése 29.88 ± 6.62 % volt. A kontroll mintákban értékelhető immunreaktív gasztrin koncentráció csökkenést nem tapasztaltunk.

Mérési eredményeink értékelése

Gasztrin RIA I módszerünk alkalmazásával jelentős különbséget észleltünk a vena cava inferior és a bal kamra immunreaktív gasztrin koncentrációja között. Állatkísérleti adatok bizonyítják, hogy a vena cava inferior magasabb gasztrin koncentrációja a gasztrin képződésével és transzportjával függ össze /Thompson és mtsai, 1973; Clendinnen és mtsai, 1973/. A jobb és bal kamra vérében mért gasztrin koncentráció különbség amellet szól, hogy a tüdőben a gasztrin egy része /kb. 26 %/ katabolizálódik. Ugyanez a jelenség a fej és felső végtag területén, ill. a vesében nem jött létre. Ha e két utóbbi érterületet kontrollnak tekintjük, akkor még határozottabban állithatjuk, hogy a tüdőben az endogén gasztrin katabolizálódik.

Az emberi tüdő endogén gasztrint bontó képességének vizsgálatánál gasztrin RIA II módszerünk lehetővé tette, hogy az emberi keringésben található little gasztrin koncentráció változását is vizsgálni tudjuk. Gasztrin RIA II módszerünkkel - az immun-specifitási vizsgálat /6.3.4. fejezet/ eredményéből adódóan - mind a jobb, mind a bal szívfélben alacsonyabb gasztrin koncentrációt mértünk, mint gasztrin RIA I-gyel. A C- és N-terminális szekvencia-specifikus RIA-val a bal és jobb kamrában mért gasztrin koncentráció különbség azt bizonyítja, hogy a tüdőben folyó katabolizmus a little gasztrin molekulának mind az N-, mind a C-terminális részét érinti.

Az in vitro vizsgálatok is a tüdőszövet little gasztrint katabolizáló képességét bizonyították. A két különböző szekvencia-specifikus RIA-val végzett mérés arra utal, hogy a 17 aminosavból álló szintetikus humán gasztrin C-terminális része gyorsabban bomlik le, mint az N-terminális rész.

Vizsgálataink alapján valószínűnek látszik, hogy a tüdőszövetben lévő proteolitikus enzimek emberben is szerepet játszanak az endogén gasztrin lebontásában. Ez az észlelésünk látszólag ellentétben áll Petersen és mtsai eredményeivel. Az eltérés oka feltehetően az, hogy a skandináv munkacsoport által használt gasztrin ellenanyag /Rehfeld, 1972/ a mi ellenanyagainktól eltérő szekvencia-specifitással rendelkezett. Ez a 2604-es jelzésű ellenanyag nagy valószínűséggel a 13-as helyzetű glicint, a 12-es helyzetű tirozint és a tirozin előtt lévő aminosav szekvenciát ismeri fel. /A szerzők

peptidfragmensekkel nem határozták meg ellenanyaguk pontos szekvencia-érzékenységét, de ellenanyaguknak a pentagasztrinnal és a CCK-oktapeptiddel kimért keresztreakciója alapján behatárolható az az aminosav szekvencia, amelyet az ellenanyag érzékel./ A két munkacsoport eltérő vizsgálati eredményének az lehet a magyarázata, hogy a skandináv munkacsoport által használt ellenanyag a gasztrin molekula C- és N-terminális végén létrejövő szerkezeti változásokat nem érzékeli.

Az általunk kidolgozott radioimmunoassay eljárásokkal végzett mérések alapján bizonyítottnak látjuk, hogy az emberi tüdő mind a 17 aminosavból álló gasztrinnak, mind az ettől nagyobb molekulasúlyú gasztrinszármazékoknak a katabolizmusában aktív szerepet játszik. Ezek az eredmények az irodalomban először hívják fel a figyelmet a tüdőszövetnek erre a fontos anyagcsere működésére.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A SZOTE I. sz. Belgyógyászati Klinikáján a gasztrin mérésére két radioimmunoassay-t dolgoztunk ki. Kronológiai sorrendben a gasztrin RIA I-et, majd a gasztrin RIA II-t. Doktori értekezésemben a radioimmunoassay-k beállítását ismerttettem, majd közös felhasználásuk példájaként az emberi tüdő endogén gasztrint katabolizáló képességének vizsgálatát mutattam be.

1. Gasztrin RIA I

Antigén készítéshez a szintetikus 15-Leu humán gasztrin I /1-17/-et bovin szérum albuminhoz kapcsoltuk. Az antigénnel nyulakat immunizáltunk, ily módon radioimmunoassay-hez alkalmas ellenanyagot nyertünk. Az ellenanyagot tartalmazó antiszérum tulajdonságai:

- a, titer: 50 %-os kötés az 1:7000-es higitásnál;
- b, affinitási konstans: $K_1 = 0.323 \cdot 10^9$ / l/mol /;
- c, antitestek koncentrációja: $q_1 = 1.158 \cdot 10^{-9}$ / mol/l /;
- d, szekvencia-specifititás: a gasztrin C-terminális
/Gly-Trp-Met/Leu/-Asp/ tetrapeptid szekvenciája;
- e, immun-specifititás: az emberi keringésben található
valamennyi gasztrinszármazékot érzékeli.

A radioimmunoassay-hez jelzőként a szintetikus 15-Leu humán gasztrin I /1-17/ ^{125}I izotóppal jelölt formáját használtuk fel. A jelölés kloramin-T oxidációs eljárással történt. A jelölt gasztrin tisztítását poliakrilamid-gél elektroforézis-

sel végeztük. A 15-Leu human gasztrin I /1-17/-nek standardként való alkalmazásával RIA meghatározáshoz alkalmas kalibrációs görbéket nyertünk. Az ellenanyaghoz kötődött és szabadon maradó hormonfrakciók szétválasztásához - a 4 °C-on, 48 óráig történő inkubálást követően - dextránnal bevont csontszenet alkalmaztunk. Módszerünk alsó méréshatára: 5-10 pg/ml gasztrin. A humán vizsgálatok esetén husz egészséges egyén éhgyomri szérum gasztrin koncentrációjának átlaga: 60.35 ± 17.86 pg/ml. Gasztrin RIA I módszerünk nyolc vizsgálat alapján számított átlagos belső és külső variációs együtthatója:

$$\overline{B-CV}=5.52 \%, \quad \overline{K-CV}=8.87 \%.$$

2. Gasztrin RIA II

A sertés thyreoglobulinhoz kapcsolt humán gasztrin I /1-13/ tridekapeptid antigénnel nyulakat immunizálva radioimmunoassay-hez alkalmas ellenanyagot nyertünk. Antiszérumunk tulajdonságai:

- a, titer: 50 %-os kötés az 1:25000-es higitásnál;
- b, affinitási konstans: $K_2=0.799 \cdot 10^9$ / 1/mol /;
- c, antitestek koncentrációja: $q_2=0.877 \cdot 10^{-9}$ / mol/l /;
- d, szekvencia-specificitás: a gasztrin N-terminális
/PGlu-Gly-Pro-Trp-Leu/ pentapeptid szekvenciája;
- e, immun-specificitás: gyakorlatilag little gasztrin
specifikusnak tekinthető.

Gasztrin RIA II módszerünknel felhasznált gasztrin standard, jelölt gasztrin, inkubáció és csontszemes elválasztás



azonos a gasztrin RIA I-nél alkalmazottakkal. Méréshatár: 5-10 pg/ml gasztrin /1-17/. A gasztrin RIA I-gyel is mért 20 éhgyomri szérum gasztrin koncentrációjának átlaga gasztrin RIA II esetében: 52.76 ± 16.04 pg/ml. Nyolc vizsgálat alapján a gasztrin RIA II átlagos belső és külső variációs együtthatója: $\overline{B-CV}=7.41\%$, $\overline{K-CV}=5.23\%$.

3. Az emberi tüdő szerepe az endogén gasztrin metabolizmusában

Gasztrin RIA I módszerünkkel a jobb és bal szívfél, a vena cava superior, a vena cava inferior és vena renalis gasztrin koncentrációját mértük meg. A legnagyobb gasztrin koncentrációt a vena cava inferiorban találtuk. Jelentős különbséget észleltünk a jobb és bal szívfél gasztrin koncentrációja között. A bal kamra, vena cava superior és vena renalis gasztrin koncentrációja a mérési hibahatáron belül megegyezett. A gasztrin C-terminális szekvenciájára érzékeny ellenanyag mellett /gasztrin RIA I/, az N-terminális szekvenciát érzékelő ellenanyaggal /gasztrin RIA II/ is vizsgáltuk a tüdőben folyó gasztrin katabolizmust. Megállapítottuk, hogy a tüdő gasztrint bontó tevékenysége a little gasztrinnek mind a C-, mind az N-terminális végét érinti. In vitro körülmények között, a tüdőszövetből nyert citoszol frakció gyorsabban katabolizálja a 17 aminosavból álló gasztrin molekula C-terminális részét, mint az N-terminálisat.

I R O D A L O M

1. Abraham, G.E.:
J. Clin. Endocrinol., 29, 866 /1969/
2. Abraham, G.E.:
J. Steroid Biochem., 6, 261 /1975/
3. Berson, S.A., Yalow, R.S.:
J. Clin. Invest., 38, 1966 /1959/
4. Berson, S.A., Yalow, R.S.:
Clin. Chim. Acta, 22, 51 /1968/
5. Bliss, C.:
Statistics in biology, McGraw-Hill, New York /1967/
6. Clendinnen, B.G., Reeder, D.D., Thompson, J.C.:
Gut, 14, 30 /1973/
7. Dockray, G.J., Debas, H.I., Walsh, J.H., Grossman, M.I.:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 149, 550 /1975/
8. Ekins, R.P.:
Clin. Chim. Acta, 5, 453 /1960/
9. Feldman, H., Rodbard, D.:
Mathematical theory of radioimmunoassay, Lippincott,
Philadelphia /1971/
10. Fraker, P.J., Speck, J.C.:
Biochem. Biophys. Res. Commun., 80, 849 /1978/
11. Greenwood, F.C., Hunter, W.M., Glover, J.S.:
Biochem. J., 89, 114 /1963/
12. Gregory, R.A., Tracy, H.J.:
Gut, 5, 103 /1964/

13. Gregory, R.A., Tracy, H.J., Grossman, M.I.:
Nature, 209, 583 /1966/
14. Holzinger, G., Náfrádi, J., Varró, V.:
Kísérletes Orvostudomány, 31, 590 /1979/
15. Komarov, S.A.:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 38, 514 /1938/
16. Korman, M.G., Hansky, J., Ritchie, B.C., Watts, J.,
McMaloney, J.E.:
AJEBAK, 51, 679 /1973/
17. Marchalonis, J.J.:
Biochem. J., 113, 299 /1969/
18. McGuigan, J.E.:
Gastroenterology, 54, 1005 /1968/
19. Morley, J.S.:
Proc. Roy. Soc. B., 170, 97 /1968/
20. Németh, J., Remák, G., Kovács, L., Baláspiri, L.,
Varga, L.:
Izotóptechnika, 25, 288 /1982/
21. Niswender, G.D., Midgley, A.R.:
Immunologic methods in steroid determination,
Appleton-Century-Crofts, New York /1970/
22. Petersen, B., Henriksen, J.H., Rehfeld, J.F.,
Christiansen, J.:
Scand. J. Gastroent., 16, 727 /1981/
23. Raymond, S.A.:
Ann. of N. Y. Acad. of Sci., 121, 350 /1964/
24. Rehfeld, J.F., Stadil, F.J., Malstrom, J., Miyata, M.:
Gastrointestinal hormones, Ed. J. C. Thomson Univ.
Texas Press, Austin and London /1975/

25. Rehfeld, J.F., Stadil, F., Rubin, B.:
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 30, 221 /1972/
26. Rehfeld, J.F., Stadil, F.J., Vinkelsoe, J.:
Gut, 15, 102 /1974/
27. Remák, G., Gaál, T., Németh, J., Varga, L.:
Orvosi Hetilap, /1983/
/közlés alatt/
28. Remák, G., Penke, B., Németh, J., Baláspiri, L., Kovács, L.,
Varga, L.:
Izotóptechnika, 23, 266 /1980/
29. Richards, E.G., Coll, A., Gratzer, W.B.:
Anal. Biochem., 12, 452 /1965/
30. Salacinski, P.R.P., McLean, C., Sykes, J.E.C.,
Clement-Jones, V.V., Lowry, P.J.:
Analytical Biochemistry, 117, 136 /1981/
31. Scatchard, G.:
Ann. New York Acad. Sci., 51, 660 /1949/
32. Thompson, J.C., Llanos, R.K., Teichman, A.,
Schafmayer, A., Rayford, P.L.:
World J. Surg., 3, 469 /1979/
33. Thompson, J.C., Reeder, D.D., Davidson, W.D.,
Jacobson, B.M., Clendinnen, B.G.:
Nobel Symposium 16, Frontiers in Gastrointestinal
Hormone Research, Ed. Sven Andersson,
Almquist and Wiskell, Stockholm /1973/

34. Varga, L., Fodor, E., Holzinger, G., Németh, J.,
Balásperi, L., Penke, B., Kovács, L., Szabó, I., Ormai, S.,
Varró, V.:
Orvostudomány, 33, 25 /1982/
35. Walsh, J.H., Debas, H.T., Grossman, M.I.:
J. Clin. Invest., 54, 686 /1974/
36. Wright, G.L., Mallmann, W.L.:
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 123, 22 /1966/
37. Wünsch, E., Deimer, K.H.:
Z. Physiol. Chem., 353, 1246 /1972a/
38. Wünsch, E., Deimer, K.H.:
Z. Physiol. Chem., 353, 1255 /1972b/
39. Wünsch, E., Deimer, K.H.:
Z. Physiol. Chem., 353, 1716 /1972c/
40. Yalow, R.S., Berson, S.A.:
Gastroenterology, 58, 1 /1970/
41. Yalow, R.S., Berson, S.A.:
Biochem. Biophys. Res. Commun., 48, 391 /1972/
42. Zettner, A.:
Clin. Chem., 19, 699 /1973/
43. Zettner, A., Duly, P.E.:
Clin. Chem., 20, 5 /1974/

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Megköszönöm Dr. Varró Vince egyetemi tanárnak, a SZOTE I. sz. Belgyógyászati Klinika igazgatójának, hogy a klinikán folyó kutatómunka keretében doktori értekezésem elkészítéséhez szükséges feltételeket biztosította és munkámat támogatta.

Ezuton is szeretném megköszönni Dr. Varga László egyetemi docensnek, hogy a vezetése alá tartozó munkacsoport tagjaként három éven keresztül irányította tudományos tevékenységemet és elsajátíthattam a kutatómunka végzéshez szükséges alapvető ismereteket. Továbbá megköszönöm disszertációm megírásához nyújtott értékes tanácsait.

Köszönettel tartozom Dr. Remák Géza tanársegédnek. Közös munkánk eredményeként készíthettem el doktori értekezésemet, melynek megírását hasznos tanácsaival segítette.

Megköszönöm a SZOTE Orvosvegytani Intézet dolgozóinak: Dr. Baláspiri Lajos, Dr. Penke Botond egyetemi docenseknek, valamint a vezetésük alá tartozó munkacsoportok tagjainak munkájukat.

Végül köszönetemet fejezem ki minden munkatársamnak, akik valamilyen formában doktori értekezésem elkészítését segítették.

