

A HISZTAMIN RADIOENZIMATIKUS
MEGHATÁROZÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ
TÉNYEZŐK VIZSGÁLATA

D O K T O R I D I S S Z E R T Á C I Ó

NAGY ÁGNES
okleveles vegyész

SZEGEDI ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
KISÉRLETES SEBÉSZETI INTÉZET
Szeged, 1983.



Köszönetet mondok Dr. Petri Gábor egyetemi tanárnak, hogy az általa vezetett intézetben lehetővé tette számomra a téma kidolgozását.

Külön mondok köszönetet Dr. Nagy Sándor egyetemi docensnek, Dr. Tárnoky Klára és Dr. Szabó Imre egyetemi adjunktusoknak és Dr. Adamicza Ágnes egyetemi tanársegédnek munkám során nyújtott elméleti és gyakorlati tanácsaikért, és az állatkísérletek megvalósításáért.



TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	1
IRODAIMI ÁTTEKINTÉS	3
I. A HISZTAMIN SZEREPE FIZIOLÓGIÁS ÉS PATOFIGIOLÓGIÁS FOLYAMATOKBAN	3
1. A hisztamin felfedezése és izolálása	3
2. A hisztamin farmakológiai hatásai	5
3. Hisztamin receptorok: H_1 és H_2 receptor agonisták és antagonisták	7
4. A hisztamin raktározásának formái a szervezetben	8
II. A HISZTAMIN RADIOENZIMATIKUS MEGHATÁROZÁSA	10
1. A hisztamin szintek mérésére kidolgozott módszerek összehasonlítása	10
2. A radioenzimatus hisztamin meghatározás alapjai	14
3. A hisztamin-N-metiltranszferáz enzim tulaj- donságai és izolálásának lehetőségei	19
4. Részlegesen módosított radioenzimatus hisztamin-metodikák	21
MÉRÉSI MÓDSZEREK	33
I. A PLAZMA ÉS SZÖVETI RADIOENZIMATIKUS HISZTAMIN MEGHATÁROZÁS KIVITELEZÉSE	33
1. A hisztamin-N-metiltranszferáz enzim preparálása	33
2. A standard-, vér- és szövetminták előkészítése a vizsgálathoz	35
3. Inkubációs folyamat	37
4. A jelölt metilhisztamin extrahálása és liquid-scintillációs mérése	39
II. A PLAZMA-HEMOGLOBIN SPEKTROFOTOMETRIÁS MÉRÉSE ..	42
III. OLDOTT FEHÉRJE-MEGHATÁROZÁS LOWRY MÓDSZERÉVEL ..	45

FELHASZNÁLT KÉMIAI ANYAGOK	46
MÉRÉSI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKEKELÉSÜK	47
I. A HISZTAMIN RADIOENZIMATIKUS MEGHATÁROZÁSÁNAK VIZSGÁLT PARAMÉTEREI	48
1. Az izolált enzimmel folytatott vizsgálatok eredményei	48
2. A pufferkoncentráció csökkenésének hatása a mérés pontosságára	54
3. Különböző pH-értékeken végbemenő enzimkémiai reakció eredményessége	59
4. Különböző minőségű és összetételű pufferek alkalmazása	62
5. Az enzimkémiai reakció hatásfokának függése az inkubálás idejétől	64
6. A reakcióelegybe bevitt inaktív hordozó metilhisztamin hatása	68
7. A vak értékek csökkenésére irányuló kísérletek	72
8. A kloroformos extrahálás idejétől való függés vizsgálata	75
9. Egyéb szerves extrahálószer alkalmazásának lehetősége	82
10. Szövetminták előkezelésére vonatkozó tapasztalataink	86
II. A PLAZMA-HEMOGLOBIN MEGHATÁROZÁSOK EREDMÉNYEI..	90
III. A FEHÉRJE-MEGHATÁROZÁSOK EREDMÉNYEI	93
ÖSSZEFOGLALÁS	95
FELHASZNÁLT IRODALOM	99

B E V E Z E T É S

A hisztamin egyike az emberi és az állati szervezet szöveteiben és a vérben lévő azon biogén anyagoknak, amelyek felszabadulva nagy szerepet játszanak különböző gyulladásos, allergiás és shockos folyamatokban.

Jelentőségének felfedezése óta számos metodikai próbálkozás történt arra vonatkozóan, hogy a különböző fiziológiai folyamatokban bekövetkező mennyiségi és minőségi változását ekzakt módon, pontosan tudják meghatározni.

A kezdetben alkalmazott biológiai és fluorimetriás módszerek azonban nem voltak alkalmasak arra, hogy a hisztamin szintek növekedését vagy csökkenését kellő érzékenységgel kövessék.

Az utóbbi évtizedben kidolgozott radioenzimatis hisztamin meghatározás az eddigieknél érzékenyebb mérést tesz lehetővé, s emiatt rövid idő alatt tért hódított az előző metodikákkal szemben.

A folyamat lényege, hogy a vérben és a szövetekben lévő hisztamint a patkány-veséből izolált hisztamin-N-metiltranszferáz enzim stabil metabolittá, metilhisztaminná alakítja aktiv metilcsoportot tartalmazó S-adenozil-L-metionin /SAM/ jelenlétében. Az aktiv metilcsoportba bevitt trícium segítségével az enzímekémi reakció végbemenetele liquidscintillációs méréssel nyomon követhető. A reakció in vitro körülmények között történő kivitelezése bonyolult, hosszadalmas metodikát igényel, amelyet számos, a folyamatban szerepet játszó tényező befolyásol.

Munkánk során célunk volt azon determináló rész-folyamatoknak, reakciókörülményeknek a vizsgálata, amelyek döntő jelentőségűek, illetve meghatározó jellegűek a kapott eredmények pontosságában és realitásában.

Ennek eldöntése végett tanulmányoztuk az enzimkémiai reakció inkubálásának, a képződött aktív metilhisztamin extrahálásának és liquid-scintillációs mérésének paramétereit.

A meghatározást kutyákon végzett állatkísérletek során vett vér- és különböző szövetmintákból végeztük. Vérminták esetében mértük a teljes vérben, illetve a plazmában lévő hisztamin-koncentrációt.

Célunk volt továbbá annak vizsgálata, hogy az állatokon létrehozott hemorrhagiás shockos folyamatban a kapott eredmények hogyan módosulnak a kísérlet során fellépő különféle tényezők hatására.

Ehhez méréseinket a hisztamin-koncentrációt befolyásoló hemolízis okozta plazma-hemoglobin meghatározásával; illetve szövetek esetében fehérje-koncentráció méréssel egészítettük ki.

Eredményeink alapján a radioenzimatikus hisztamin meghatározásban döntő szerepet játszó paramétereket úgy választottuk meg, hogy a továbbiakban sorozatosan végzett kísérleti munkákban a módszer alkalmas, érzékeny és reprodukálható legyen.

I R O D A L M I Á T T E K I N T É S

I. A HISZTAMIN SZEREPE FIZIOLÓGIAI ÉS PATOFIGIOLÓGIAI FOLYAMATOKBAN

1. A hisztamin felfedezése és izolálása

A hisztamin, amely egyike volt az élő szervezetből elsőként meghatározott vazóaktív anyagoknak, jelen van mind emberi, mind pedig a különböző állati szövetekben és a vérben.

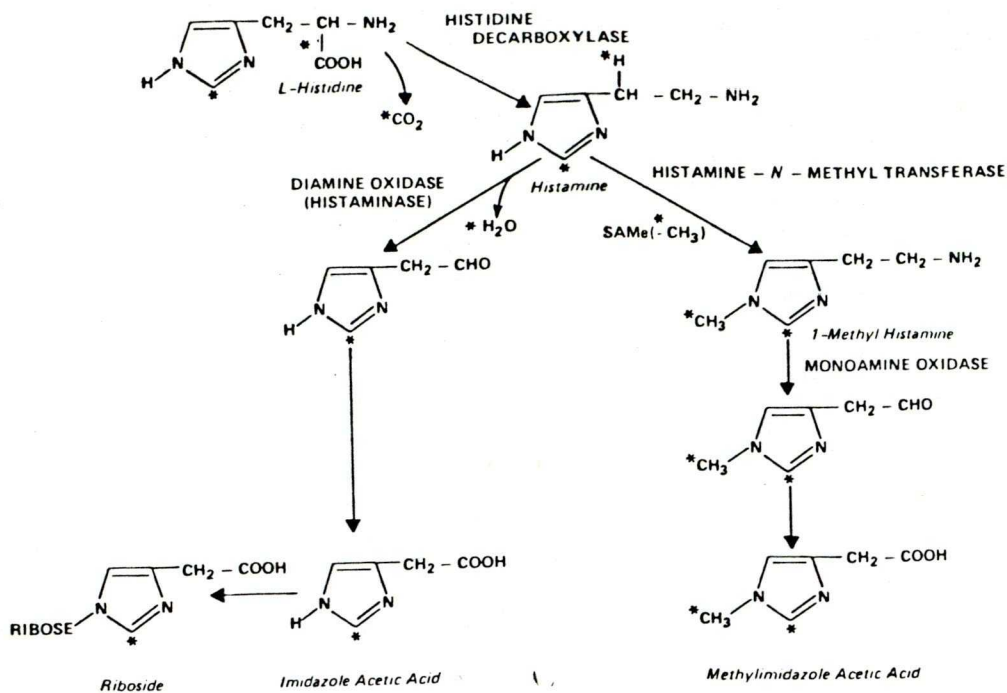
Kémiailag 1907-ben szintetizálták, még mielőtt jelenlétét a szövetekben ismerték volna. 1910-ben írták le a hisztidin dekarboxilációjával, baktériumok hatására létrejött képződését /28/.

Biológiai aktivitásának meghatározása után Dale és munkatársai közel 20 évre kiterjedő kutatómunkájuk során, hamarosan megállapították, hogy a hisztamin bizonyos farmakológiai hatásokkal bír. Már akkor ismeretes volt, hogy számos szöveti extraktum vazodilatációs aktivitással rendelkezik /29,30/, amit Popielski úgy vélt, hogy ez az aktivitás egy egyszerű anyagnak köszönhető, melynek ő a "vasodilatin" nevet adta.

1927-ben kristályos pikrát-formában izolálták ökör tüdejéből és májából /20/, illetve a későbbi adatok szerint izomból és lépéből /28,77/.

Meanwhile, Lewis /46/, bizonyították be, hogy az az anyag, amelyet "H-substance" névvel azonosítottak, tulajdonságaiban a hisztaminnal megegyező, és ugyanezen anyag szabadul fel a bőr sejtjeiből gyulladásos folyamat és antigén-antitest kölcsönhatás során.

Hamarosan leírták a hisztaminnak az emberi és állati szervezetben végbemenő szintézisét és katabolizmusát, melyet az első ábrán szemléltetünk.



1. ábra

A hisztamin szervezetben végbemenő szintézisének és katabolizmusának részfolyamatai

A hisztamin az L-hisztidin dekarboxileződése révén a hisztidin-dekarboxiláz enzim hatására keletkezik olyan folyamatban, melyet a piridoxál-foszfát koenzim katalizál. Emlősökben a képződött hisztamin két úton metabolizálódik:

1. A diamin-oxidáz /DAO, hisztamináz/ enzim hatására imidazol-ecetsav jön létre, mely ribózhhoz kötve ribozitként stabilizálódik.
2. A hisztamin-N-metiltranszferáz /HNMT/ enzim aktiv metil donort tartalmazó S-adenozil-metionin jelenlétében először 1-metilhisztaminná alakítja; majd a monoamin-oxidáz enzim segítségével végbemenő második lépés végtermékként metilimidazol-ecetsavat eredményez.

A két különböző irányú folyamat az egyes szervezetekben eltérő fontosságú /21/. Patkányban a fő út a hisztamináz enzim hatására végbemenő metabolizmus; emberben, macskában és kutyában az N-metiláció dominál; míg nyúlban, tengerimalacban a két katabolikus lépés azonos mértékben játszódik le.

A korai felfedezések ellenére is csak az utóbbi évtizedben sikerült tisztázni a hisztamin szerepét a különféle szervezetekben. A legújabb metodikák alapján, amelyekkel a hisztamin mennyiségi változása már kellő érzékenységgel detektálható, lehetőség nyílt arra, hogy információkat szerezzünk a hisztamin felszabadulással járó folyamatokról, a hisztamin receptorokról. Az újabb és újabb specifikus agonisták és antagonisták felfedezése módot ad arra, hogy a végbemenő fiziológiás és patofiziológiás folyamatok mechanizmusa részleteiben is ismertté váljék.

2. A hisztamin farmakológiai hatásai

A hisztamin izolálása és biológiai aktivitásának meghatározása után a következő években az egyes kutatócsoportok számos alapvető farmakológiai hatását irták le /29,30/. Felismerték, hogy emlősökben a hisztamin sock-szerű tüneteket okoz, bár a hatások az egyes fajoktól függő módon érvényesülnek. Tengerimalacban, amely hisztaminra igen érzékenyen reagál, jelentős bronchokonstriktiót okoz; más speciesekben a vasculáris hatás dominál.

A hisztamin számos emlősben kontrahálja a véredényeket és az arteriolákat; ugyanakkor a perifériás szervek kapillárisait dilatálja; mely a szisztémás vérnyomás megváltozását eredményezi. Azonban a nagy erekre kifejtett szűkítő hatását sem tudták minden fajnál megfigyelni. Patkányban és nyúlban a kontrakció igen nagy mértékű, macskában kevésbé jelentkezik,

míg kutyában, majomban és emberben ezzel ellentétes hatást, vagyis dilatációt okoz /1/.

Ezen potenciális vazodilatációs hatás felvetette a hisztamin lehetséges szerepét a mikrocirkulációs rendszerben. Dale és Laidlaw már 1919-ben megfigyelték, hogy a hisztamin nagy dózisának beadása következtében a vérplazmának a kapilláris epitheliumba való nagyfokú kiáramlása történik meg, ami ödémát, hemokoncentrációt, megnövekedett vérviszkozitást és jelentős testhőmérséklet csökkenést okoz /30/.

Schayer /71/ szerint ezen "indukált hisztaminnak" a mikrocirkulációban szabályozó szerepe van. Ugyanis a kis erek endothel sejtjeiben a hisztamin folyamatosan szintetizálódik, s a lokálisan felhalmozott hisztamin relaxálja a terminális arteriolákban lévő simaizmot, a prekapilláris sphinktereket, így fokozza a vasculáris permeabilitást /70/. Ugyancsak Schayer mutatott rá arra, hogy gyulladásos, infekció, endotoxin, tehát hiperszenzitív reakciók esetében a szövetekben megnő a hisztidin-dekarboxiláz enzim-aktivitás, ami fokozott hisztamin szintézist indukál.

Hasonló tüneteket észleltek gyulladásos folyamatokban, s tudva azt, hogy a hisztamin számos szövetben fordul elő a szervezetben, feltételezték jelenlétét és lehetséges szerepét ezen reakciókban is.

Az irodalmi adatok szerint a gyulladásos folyamatokban még számos olyan anyag szabadul fel, amely más-más módon és mértékben, de befolyásolja a reakció kimenetelét. Ide sorolhatók a serotonin /5-hidroxitriptamin/, vazóaktív polipeptidok /kallidin, kallikrein, bradykinin/ és a prostaglandinok, amelyek a hisztaminhoz hasonlóan ödéma-indukáló ágensek. A jelenleg széles körben alkalmazott érzékeny radiokémiai technikát felhasználva követni tudjuk a hisztamin időbeli felszabadulását a gyulladásos és shockos folyamatokban /39/. Ezek a kutatások rámutattak arra, hogy szoros összefüggés van a szövetekbe és a vérbe jutó hisztamin szintje és az ödéma mértéke között; a hisztamin ugyanis megnövekedett

mennyiségben van jelen az intersticiális-folyadékban, a legtöbb kötőszövetben, s felszabadulása után a hiszósejtekből /mast cell/ szabadon diffundál a közeli kapillárisokba, vazodilatációt és fokozott permeabilitást okozva.

A hisztamin farmakológiai hatásai közül csak a vizsgálódásunk szempontjából legfontosabbakat emeltük ki. Emellett jelentős befolyásoló szerepe van az idegrendszerben, mint mediátor anyag; a különféle immunreakciókban; a gyomorsav-szekrécióban; s nem utolsó sorban számos megbetegedésben /mastocitózis, basophil leukémia, urticaria/.

3. Hisztamin receptorok: H_1 és H_2 receptor agonisták és antagonisták

1937-ben Bovet és Straub megállapították, hogy a különféle terciér diaminok antihisztamin aktivitást mutatnak. Ezen anyagok egy része /fenbenzamin, pirilamin-maleát/ toxikusnak bizonyult, míg mások alkalmasak voltak a klinikumban való használatra.

Azokat a vegyületeket, amelyek a hisztamin hatását fokozták agonistáknak, amelyek gátolták antagonistáknak nevezték el. A sorozatosan felfedezett ágensekről megállapították, hogy nem blokkolják a hisztamin minden hatását az egyes allergiás, shockos és gyulladásos folyamatokban, továbbá úgy, mint a hisztamin hatások, fajtól függően érvényesülnek.

Az egyes speciosekből izolált in vitro végzett szöveti vizsgálatok rámutattak az egyes szövetekben lévő specifikus receptorok jelenlétére, melyeket az egyes vegyületek hatása alapján H_1 -ill. H_2 -receptornak nevezték. A kétfajta receptor az egyes preparátumokban eltérő számban volt jelen. A H_1 -receptorok elsősorban a simaizmokban és a nagy-erekben fordulnak elő, ahol stimulációjuk kontrakciót vagy konstrikciót okoz.

Ugyancsak előfordulnak a kis-erekben is, ahol - a H_2 -receptorokkal együtt - hatásuk vazodilatációban és megnövekedett vasculáris permeabilitásban mutatkozik meg, mely H_1 -antagonistákkal blokkolható.

Találhatók H_2 -receptorok a simaizomban is, és stimulációjuk a szöveti preparátumokban relaxációt, dilatációt, illetve a perfundált készítményeken depresszor hatást eredményez. Számos más helyen, mint például a gyomormukozában, szivizomban, bazofilokban kimutathatók.

A hisztamin hatások mechanizmusának felderítése rávilágított arra, hogy más-más folyamatok játszódnak le a H_1 - és a H_2 -receptorokon, melynek lépéseit a szervezetben és a lokálisan jelenlévő anyagok befolyásolják /41,81/. Az utóbbi évtizedben a különféle antagonisták és agonisták egyre több fajtáját fedezték fel, izolálták és alkalmazták a klinikumban. A kísérletek bebizonyították, hogy a két receptoron specifikusan ható anyagok kémiai szerkezetükben alapvetően különböznek /19/, s ez az ismeret lehetővé teszi az újabb és újabb ágensek előállítását és azt, hogy az agonisták és antagonisták receptorokon végmenő folyamat-mechanizmusának megértéséhez közelebb jussunk /7,13,14,24,33/.

4. A hisztamin raktározásának formái a szervezetben

A hisztamin az emlősök szervezetében az egyes szövetekben kisebb-nagyobb mennyiségben található, az adott szövet minőségétől és funkciójától függően. Lokális szintézise, felhalmozódása és metabolizációja megszabja az úgynevezett hisztamin-paolok jelenlétét. A leggyakrabban és legnagyobb mennyiségben a következő sejtekben és szövetekben fordul elő:

1. Masztociták

A masztocitákból meghatározott első kémiai anyag a heparin volt, amelyet mint antikoagulánst, kutya májából izolálták. A további vizsgálatok során számos tény mutatott arra, hogy a heparin mellett a hisztamin is jelen van a hizósejtekben /mast cell/, hiszen ahhoz hasonlóan felszabadult shockos és anafilaktikus folyamatokban.

Ma már bizonyított, hogy a masztociták hisztamin tartalma akár az 1 mg/g szöveti koncentrációt is meghaladhatja. Ennek a magas hisztamin szintnek igen nagy jelentősége van azokban a fiziológiás és patofiziológiás folyamatokban, amelyek során a hisztamin a hizósejtekből felszabadulva /32,68/, s a véráramba kerülve a szisztémás keringést jelentősen befolyásolja.

Néhány állat /patkány, egér/ peritoniális masztocitáiból a fenti két anyagon kívül serotonin és dopamint is sikert kímutatni.

2. Bazofil sejtek

A hisztamin meghatározására vonatkozó biológiai módszerek felfedezése során azt találták, hogy a vér alacsony, de viszonylag állandó koncentrációban hisztamint is tartalmaz /62/, mégpedig 1...12 pg/bazofil sejt tartományban, ami a keringő vér mennyiségére átszámolva tetemes hisztamin szintet /180 µg/ eredményez. Mégis valószínűtlennek tűnik, hogy a bazofilok jelentős szerepet játszanának az anafilaktikus reakciókban, ugyanis a hisztamin-felszabadulás döntően a szövetekből történik, ami vasculáris kollapszust okoz /15,64,76,80/.

3. "Non-mast cell" hisztamin

Számos szöveti preparátum esetén szoros korreláció áll fenn a hisztamin szint és a masztociták száma között; azonban találtak szöveteket, ahol a hisztamin magas koncentrációban, míg a hizósejtek kis számban fordulnak elő, mint például az agyban.

Specifikus hisztokémiai ismeretek hiányában a hisztamin-pullok ilyen jellegű lokalizációja és forrása ismeretlen; ugyanakkor a felszabadítására vonatkozó kísérletek során kitűnt, hogy relative gyorsan kiürül a sejtekből, szemben a masztocitákéval.

4. Naszcentsz-hisztamin

Számos szerző feltételezi, hogy fiziológiai szempontból fontos a masztocitákon kívül létező ugynevezett naszcensz- vagy indukált-hisztamin jelenléte. Tapasztalataikat úgy értelmezik, hogy bizonyos kísérletekben a szöveti hisztidindekarboxiláz enzim aktivitásának, ezáltal a hisztamin képződésének mértéke meghaladja a szöveti hisztamin szintet. Ujszerű értelmezésük az enzim-aktivitás mértékét mint döntő szabályozó faktort állítja előtérbe, illetve azt, hogy a képződött hisztamin nem halmozódik fel a sejtekben, hanem szabadon diffundál a keringésbe.

II. A HISZTAMIN RADIOENZIMATIKUS MEGHATÁROZÁSA

1. A hisztamin szintek mérésére kidolgozott módszerek összehasonlítása

A hisztamin farmakológiai hatásainak egyre szélesebb körű megismerésével felmerült az igény az emberi és az állati szervezetekben ténylegesen meglévő és a gyulladásos, hiperszenzitív és shockos folyamatok során felszabaduló, ezáltal a keringésbe jutó hisztamin szintek mérésére.

A H_1 - és H_2 - receptorokkal, a hisztamin antagonistákkal és agonistákkal folytatott in vitro és in vivo kísérletek rámutattak a hisztamin patofiziológiás körülmények között kifejtett szerepére. A gyógyító klinikai beavatkozás szükségessége egyre sürgetőbbé tette olyan meghatározási formák kidolgozását, amellyel a szervezet szöveteiből, a vérből és a vizeletből a hisztamin és annak mennyiségi változásai kellő érzékenységgel detektálhatók.

Az eddig alkalmazott módszerek kémiai szempontból 3 fő-csoportba oszthatók:

1. biológiai
2. fluorimetriás
3. radioenzimatikus

Mint ismeretes, a hisztamin az egyes szövetekben igen széles koncentrációtartományban / $0,1...20 \mu\text{g/g}$ / található, sőt letális mennyiségben lehet jelen néhány olyan szervben, melyek hatásával szemben a legérzékenyebbek, úgymint a légutak, a vérerek és a szív.

Normál körülmények között a plazmában lévő hisztamin szint meglehetősen alacsony - kisebb mint 10 nmol/l -, illetve a keringésbe jutó exogén és endogén hisztamin gyorsan kiürül vagy metabolizálódik.

A fentiek értelmében nyilvánvaló, hogy a plazmánál nagyságrenddel több hisztamint tartalmazó szövetekből mennyisége kevésbé érzékeny módszerekkel is meghatározható, míg a plazmában és a szérumban lévő koncentrációjának mérése sokkal finomabb és specifikusabb módszert igényel.

A különböző biológiai és kémiai eljárásokat humán vérre, plazmára és vizeletre kapott szinteket az 1.táblázat foglalja össze, melynek meghatározásai közül több mint 20 éven keresztül csak a biológiai-assay módszerét alkalmazták, azonban ez nem volt elég szenzitív a plazmában lévő hisztamin szint mérésére, csak akkor, ha valamilyen extrakciós vagy purifikációs lépést is beiktattak.

Shore és munkatársai /72/ által 1959-ben kidolgozott, a hisztaminnak az O-ftthalaldehid hatására keletkező fluoreszcens termékeinek mérésén alapuló fluorimetriás módszer volt az első megbízható kémiai metodika szöveti hisztamin meghatározására, azonban kellő érzékenység és specificitás hiányában nem volt alkalmas plazma és vizelet mérésére.

1. táblázat

Különböző eljárásokkal meghatározott normál egyedek
plazma, vér és vizelet hisztamin szintjei

IRODALOM	MÓDSZER	EGYED- SZÁM	SZINT	HISZTAMIN TARTOMÁNY
PLAZMA				nmol/l
Barsoum, Smirk/1936/	bioassay	21	54	27-108
Anrep /1944/	bioassay	7	54	18-100
Adam /1957/	bioassay/oszlop	7	9	-
Noah, Brand /1961/	fluorimetriás	34	27	9-81
Beall /1963/	fluorimetriás	15	54	27-90
Thompson, Walton/1964/	fluorimetriás	16	72	-
Garden /1966/	fluorimetriás	47	45	36-54
Graham /1968/	fluorimetriás/ oszlop	46	5,4	0,9-12,6
Miller /1970/	enzimatis	11	5,4	3,6-9,0
Lorenz /1972/	fluorimetriás/ oszlop	10	6,3	0,9-12,6
Bruce /1976/	enzimatis	10	4,5	0,9-10,8
Lorenz, Doenicke/1978/	fluorimetriás/ oszlop	40	2,7	0,0-8,1
Shaff, Beaven /1979/	enzimatis	19	5,4	1,8-12,6
Bruce /1979/	enzimatis	25	5,4	-
Almeida /1980/	enzimatis	8	5,4	-
Moss /1981/	enzimatis/TLC	21	9,0	-
VÉR				nmol/l
Haworth, McDonald/1937/	bioassay	103	360	162-702
Rose, Browne /1940/	bioassay	50	360	225-720
Valentine /1950/	bioassay	33	720	315-1260
Zachariae /1963/	fluorimetriás	32	900	360-1260
Gilbert /1966/	fluorimetriás	67	360	90-900
Horakova /1977/	enzimatis	11	504	99-945
Shaff, Beaven /1979/	enzimatis	17	504	-
Bruce /1979/	enzimatis	24	531	-
VIZELET				nmol/24 h
Mitchell, Ode /1954/	bioassay	5	-	63-189
Duner, Pernow /1956/	bioassay/oszlop	17	108	63-180
Duner /1961/ -	bioassay/oszlop	4	108	54-171
Granerus /1968/	bioassay/oszlop	20	207	54-414
Oates /1962/	fluorimetriás/ oszlop	24	405	135-810
Beall /1965/	fluorimetriás	10	414	-
Gilbert /1966/	fluorimetriás/ oszlop	19	378	162-603
Beaven /1972/	enzimatis	16	144	45-828
Horakova /1977/	enzimatis	31	171	45-378
Bruce /1979/	enzimatis	23	225	-
Myers /1981/	fluorimetriás/ oszlop	41	126	0-270

Graham által bevezetett /37/ és Lorenz /44/ által továbbfejlesztett oszlopkromatográfiás, illetve Davis és Skofitsch /73/ által kidolgozott magasnyomású folyadékkromatográfiás tisztítási lépés beiktatásával a fenti nehézségek kiküszöbölhetők.

1974-ben Siraganian megalapozta az automatizált fluorimetriás módszert, amely nagyszámú minta sorozatos mérésére alkalmazható, emiatt számos laboratóriumban elterjedt a hisztamin-felszabadulás in vitro vizsgálatára.

A fent leírt módszerek megfelelő érzékenység hiányában irreálisan magas plazma-hisztamin értékeket eredményeztek.

A meghatározási módszerek harmadik kategóriája Snyder által 1966-ban megalapozott, és többek által továbbfejlesztett radioenzimatikus mérés.

Az 1. táblázat különböző módszerekkel összehasonlított adatait nézve kitűnik, hogy plazma esetében a módosítások, finomítások nélkül alkalmazott biológiai és fluorimetriás meghatározásokkal kapott koncentrációtartomány 1...12 ng/ml, vagyis 9...10⁸ nmol/l. Ahogyan a hisztamin-assay érzékenysége nőtt, úgy csökkentek a kapott értékek; s a normál plazmára megállapított hisztamin szintek 1,8...12,6 nmol/l koncentráció-értékek között változnak.

A vizelet hisztamin-extrációjára a biológiai és radioenzimatikus metodikákkal átlagosan közel azonos, 10⁸...171 nmol/24 h átlagérték adódik, azonban a koncentrációtartomány az utóbbi módszer esetében valamivel szélesebb. További vizsgálatok megállapították, hogy a vizelettel kiürült napi hisztamin mennyiség viszonylag független a nemtől és a volumentől, és konstans érték.

Külön táblázatban /2. táblázat/ foglaljuk össze Shaff és Beaven /1979/ és Horakova /1977/ által radioenzimatikus meghatározással kapott hisztamin szinteket humán vérre és vizeletre vonatkozóan.

2. táblázat

Radioenzimatikus módszerrel meghatározott hisztamin
szintek humán vérre, plazmára és vizeletre

MINTA	EGYEDSZÁM	HISZTAMIN / nmol/l /
teljes vér	17	504 $\pm$ 72
plazma	19	5,4 $\pm$ 0,9
szérum	13	9,0 $\pm$ 2,7
vizelet	22	144 $\pm$ 126

2. A radioenzimatikus hisztamin meghatározás alapjai

Az 1966-ban Snyder által kidolgozott enzimatisz izotópos hisztamin meghatározás az izotóp higitásos analízis módszerén alapul, s az utóbbi két évtizedben számos más szerző által továbbfejlesztve és módosítva tért hódított az előző metodikákkal szemben, mivel érzékenysége, specificitása és precizitása meghaladja azokét.

A hisztamin metilációján alapuló radioenzimatikus módszer bizonyos átalakításokkal hisztidin-mérésre, a szövetekben lévő hisztidin-dekarboxiláz és hisztamin-N-metiltranszferáz enzim meghatározására is alkalmas /22/.

2/1. Az izotóp higitásos módszer alapjai

Az izotóp derivációs analízis azon eljárások egyike, amelyek az izotóp higitás analízisén alapulnak. A módszer lényege, hogy a vizsgált komponenst valamilyen izotóppal jelölt ágens jelenlétében radioaktív szubsztráttá alakítjuk.

A folyamat lejátszódhat kémiai, vagy mint a hisztamin esetében, enzimatis reakcióval. A továbbiakban a keletkezett terméket izoláljuk a reakcióközeg többi komponensétől, valamely alkalmas technikával - pl. kristályosítással, kromatografálással, oldószeres extrakcióval -, majd radioaktivitását megfelelő módon mérjük.

A továbbiakban a radioenzimatis módszernek két típusát tárgyaljuk:

1. Dupla-izotópos módszer, amelyben általában ^{14}C és ^3H izotópot használunk egymás mellett.
2. Egyszerű-izotópos módszer, amelyben csak egyféle izotópot - szokásosan ^3H - at - alkalmazunk.

A módszer előnye a fluorimetriás és biológiai metodikákkal szemben:

1. A nem-radiokémiai módszerek esetében a meghatározandó vegyület izolálása és szeparálása nehézségekbe ütközött, hiszen vele együtt olyan anyagok is bekerültek a mérendő mintába, amelyek nagymértékben zavarták a meghatározást.
2. Izotóp-assay esetében az alkalmazott jelölt reagens specifikusan csak az adott vegyülethez kötődik, s ha több szubsztrátum képződik, akkor is könnyen szétválaszthatók a közeg kémiai jellemzőit változtatva.
3. A kémiai vagy enzimreakció során a képződött jelölt anyag ugyanazon vegyületét mint hordozót /carrier/ a reakcióelegyhez adva; az elválasztási lépés során számottevően javul a hatásfok, illetve lehetőség nyílik arra, hogy akár makro-organikus termékeket is percek alatt elkülönítsünk valamely reakciótérből.

2/2. Az enzimatisz izotóp higitásos módszer

A Snyder által 1966-ban megalapozott, és Beaven /22/ által részleteiben kidolgozott enzim-assay azon a tényen alapul, hogy számos biogén amin metabolizálódása döntő módon az aromás hidroxil- vagy az oldallánc amino-csoportjának metilációjával megy végbe, amelyet az S-adenozil-L-metionin /SAM/ mint metil donor katalizál. ^{14}C vagy ^3H metilcsoportot tartalmazó SAM jelenlétében, alkalmas enzim hatására az aminok jelölt metilált metabolittá alakulnak. Amennyiben csak egy amin konvertálódik, mint a hisztamin és serotonin esetében; úgy egyetlen szimpla extrakciós lépés elegendő ahhoz, hogy a keletkezett metabolitot a kémiai közeg további anyagaitól elválasszuk. Az enzimatisz reakció két módon kivitelezhető:

Ha ^{14}C -vel jelölt SAM / ^{14}C -SAM/ vesz részt a reakcióban mint metil donor, úgy szükséges ugyanazon amin adott triciált mennyiségének, mint a reakció kvantitatív végbemenetelét, s a visszanyerés százalékat jelző anyagnak /tracer/ a hozzáadása. Ezt a módszert nevezi az irodalom dupla izotópos metodikának, szemben a triciummal jelzett aktív metilcsoportot tartalmazó ^3H -SAM-mal végbemenő enzimreakcióval, amire az egy izotópos meghatározás elnevezés terjedt el.

A ^3H -SAM száz-, illetve ezerszer nagyobb specifikus aktivitással rendelkezik, mint az ^{14}C -SAM, emiatt vele sokkal inkább érzékeny reakció kivitelezhető.

Az Amersam/Searel Corporation vagy a New England Nuclear Corporation-Boston társaságok által forgalmazott jelölt SAM specifikus aktivitási értékei:

$$^{14}\text{C-SAM} : 1,45 \dots 1,85 \cdot 10^9 \text{ Bq/mmol}$$

$$^3\text{H-SAM} : 1,85 \dots 18,5 \cdot 10^{10} \text{ Bq/mmol}$$

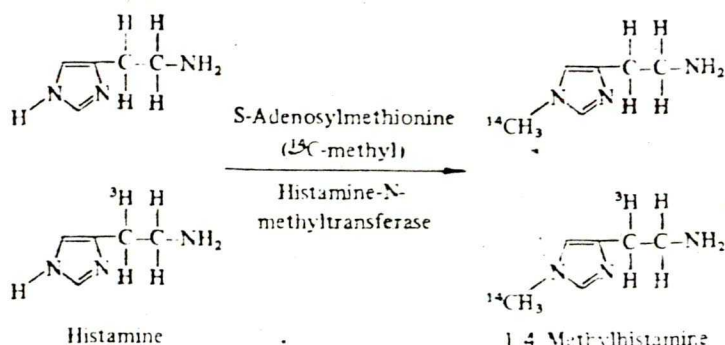
Míg általánosságban a ^{14}C izotóppal csak nanogramm, addig a ^3H izotóppal pikogramm nagyságrendben mérhetünk.

Más előnye az egy-izotópos eljárásnak, hogy különféle mikro-módszerek megvalósítására is alkalmas, különösen szövetminták esetén /16,22,74,76,78/. Hátránya viszont, hogy a tríciummal jelölt szubsztrát alkalmazása inkább magával vonja a precizitás csökkenését, mint a ^{14}C izotóp.

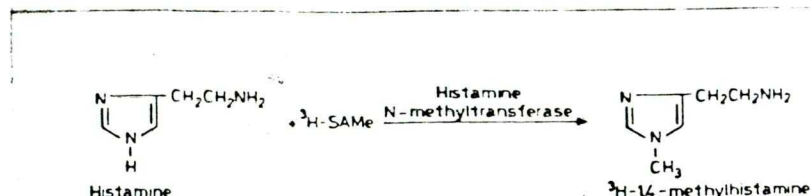
2/3. A kétféle izotópos eljárás összehasonlítása

A dupla-izotópos módszer esetében az inkubálást, ami a metiláció végbemenetelét eredményezi, ^{14}C -SAM jelenlétében végezzük, s belső standardként az oldalláncon ^3H -mal jelölt béta- ^3H -hisztamint adunk a rendszerhez.

A hisztamin a következő reakciónak megfelelően konvertálódik 1,4-metilhisztaminná /2. ábra/:



A szimpla-izotópos technika alkalmazásakor tríciummal jelölt SAM szerepel mint metil donor, s belső standardot a visszanyerésre nem alkalmazunk. A kémiai reakció ugyanazon elv alapján játszódik le /3. ábra/:



Az előző részben utaltunk az egy-izotópos technika előnyeire, amit a különböző módon kivitelezett laboratóriumi eljárások is igazoltak. Ha még ehhez hozzávesszük a ^3H , ^{14}C izotópok előállítási és megvásárlási költsége közötti különbséget, gazdasági szempontok és gyakorlati okok miatt is egyértelműen a tríciumra esik a választás. Bár a továbbiakban a radioenzimatikus meghatározás lépéseire és anyagainra részletesen kitérünk, mégis összehasonlítás céljából a következő táblázatban foglaljuk össze a Beaven /22/ által továbbfejlesztett és közölt kétféle izotópos eljárásra vonatkozó adatokat /3. táblázat/.

3. táblázat

A kétféle izotópos módszer anyagszükséglete és lépései

REAGENSEK, LÉPÉSEK MEGNEVEZÉSE	M Ó D S Z E R	
	DUPLA-IZOTÓPOS	EGY-IZOTÓPOS
	Reagensek térfogata / μl /	
1. Standard v. minta	50	10 /v.5/
/szövet, plazma, vér/		
2. Béta- ^3H -hisztamin 1 $\mu\text{Ci/ml}$	10	-
3. Na-foszfát puffer	300	20
0,1 mol/l; pH=7,9		
4. ^{14}C -, v. ^3H -SAM	100	10
enzimkeverék		

Inkubálás: 90 perc, 303 K		
5. Hordozó metilhisztamin	200	200
6. NaOH , 10 mol/l	200	200
7. Kloroform	4000	4000

Vortexezés, centrifugálás		
8. NaOH , 3,3 mol/l	1000	1000

Vortexezés, centrifugálás		
3 ml kloroformos fázis elpárologtatása		
Scintillációs koktélban való felvétel		
<u>Liquid-scintillációs mérés</u>		

3. A hisztamin-N-metiltranszferáz enzim tulajdonságai és izolálásának lehetőségei

A hisztamin-meghatározáshoz nélkülözhetetlen enzim preparálására eddig az irodalomban két alapvető módszert tartanak számon. Az egyik eljárás szerint tengerimalac agyból, míg a másik szerint patkány veséből izolálják. Mindkét folyamat ugyanazokkal a lépésekkel valósítható meg, melyeket az alábbiakban foglalhatunk össze:

1. Homogenizálás, s az ezt követő ultracentrifugálás
2. A fehérjék szaturálása kétszeri $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -os kezeléssel
3. Ismételt dializálás utáni centrifugálás

Brown és munkatársai /17/ kísérleteket folytattak különböző emlőszállatok egyes szerveiben jelenlévő enzim mennyiségének vizsgálatára és tulajdonságainak megállapítására. A preparált enzim kvantitatív meghatározását radioenzimatikus hisztamin mérésre vezették vissza, amelyben metil donorként ^{14}C -SAM-ot alkalmaztak. Az egyes speciemek különböző szöveteire kapott eredményeket a 4. táblázat szemlélteti, amelyben az értékeket a tengerimalac agyból preparált legaktívabb enzimre vonatkoztatták, ami 200 mg szövetből 1 óra alatt 30 μmol metilhisztamint állít elő $\approx 100\%$.

A táblázatból kitűnik, hogy az enzim átlagosan a tengerimalac szerveiben fordul elő a legnagyobb mértékben, ami magyarázata lehet ezen faj jellemző hisztamin-érzékenysége-nek.

A további vizsgálatok alapján megállapították, hogy jóllehet az egyes fajok néhány szerve magas enzimaktivitást mutat, mégsem képes a hisztamin koncentrációjának kvantitatív meghatározására, vagy pedig a vizsgált kofaktorok ATP , MgCl_2 , glutation/ szintetizálására.

4. táblázat

Különböző fajok szöveteire kapott enzim-aktivitás értékek
HISZTAMIN-N-METILTRANSZFERÁZ

SZERVEK	PATKÁNY	Á L L A T O K			NYUL	EGÉR
		TENGERIMALAC	MACSKA			
máj	0	21	56		62	47
vese	46	63	m ⁺		55	73
ileum	29	74	m		13	
tüdő	0	85	64		40	69
szív	m	50	49		32	36
stomach	0	92	65		60	44
izom	m	46	15		25	25
bőr	m	79	35		60	
lép	0	78	56		29	23
pankreas			89			
trachea			66			
teljes agy	22	100				62

+ - minimális /kisebb mint 5 %/

A hisztamin laboratórium meghatározásának kezdetén más szerzők /18,22,76/ is tengerimalac agyból szintetizálták a hisztamin-N-metiltranszferázt mindaddig, amíg 1978-ban Shaff és Beaven /69/ kísérleteikkel bebizonyították, hogy a patkány veséből nyert enzim nemcsak sokkal specifikusabb mint a tengerimalacé, hanem vele a hisztamin radioenzimatikus mérések érzékenysége jelentősen növelhető. Megállapították, hogy az ugyancsak $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -tal részlegesen tisztított vese-enzim 20...50-szer aktívabb, mint az agyból előállított; ugyanakkor zavaró anyagokat nem tartalmaz, s vele az izotópos hisztamin mérés vak értéke /blank/ lényegesen lecsökken. Ugyanakkor a két enzim hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, ugyanazon fizikai és kémiai lépések szükségesek az előállításához, azonban az agyból történő izolálás mennyiségileg jóval több anyagot igényel, így kivitelezése nehézkes, hosszadalmas.



Az enzimek izolálására és vizsgált tulajdonságaira vonatkozó néhány adatot az 5. táblázatban tüntettük fel.

5. táblázat

A két enzim előállítására és néhány tulajdonságára vonatkozó értékek összehasonlítása

	P R E P A R Á T U M	
	TENGERIMALAC AGY	PATKÁNY VESE
A szükséges állatok /db/	500	6
A szövet tömege /g/	1500	16
A preparátum végső térfogata /ml/	820	14
Proteinkoncentráció /mg/ml/	11	22
Specifikus aktivitás /U/mg protein/	2,1	46
Optimális térfogat a vizsgálathoz /μl/	50	1
Stabilitás /hónap/	—	
- fagyasztva /-20°C/	18	12
- liofilizálva /-20°C/	12	3
Vizsgálatok száma	16 400	14 000

4. Részlegesen módosított radioenzimatikus
hisztamin-metodikák

Az előzőekben részletesen ismertettük az utóbbi évtizedben megalapozott és kidolgozott radioenzimatikus hisztamin meghatározás kémiai folyamatait, összefüggéseit, illetve az N-metiltranszferáz enzimre vonatkozó adatainkat. A módszer megismerése, kipróbálása, kutatási és rutinmunkában való alkalmazása során számos kutatócsoport módosította az egyes metodikai lépéseket anélkül, hogy a folyamat alapjain és lényegén változtatott volna. Beaven /18/ 1972-ben megfogalmazta a ^{14}C és ^3H izotópokkal kivitelezhető dupla- és egy-izotópos eljárások legfőbb összefüggéseit, alkalmazta a mérési módszert szövet, plazma és vizelet esetében.

Az általa standardizált egyes fizikai, kémiai lépések végbemenetelésének vizsgálata, a reakciókörülményektől függő tanulmányozása másokat is foglalkoztatott; így születtek meg az olyan elgondolások, amelyeknek gyakorlati megvalósításával a kivitelezés egyszerűbbé, zavaró körülményektől mentessé, az eredmény pedig reprodukálhatóbbá válik.

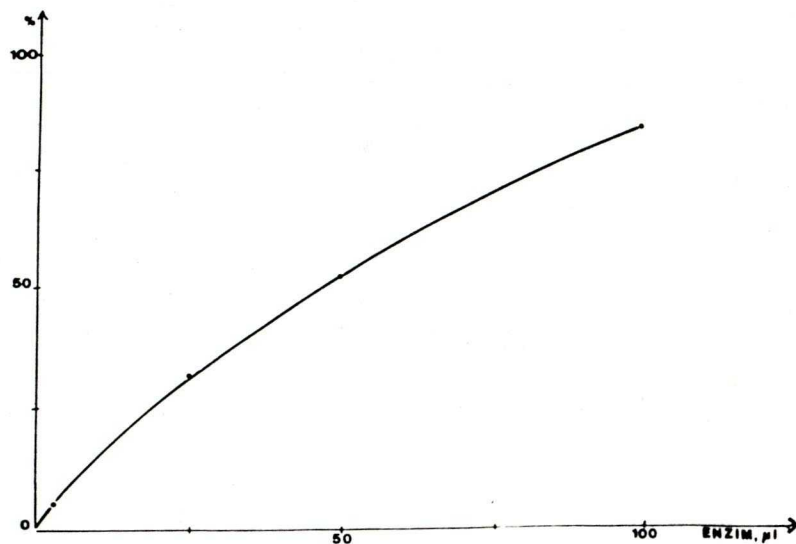
A folyamat lényege tehát, hogy a vizsgálandó mintában lévő hisztamin 310 K-en végbemenő enzimkémiai reakcióban a hisztamin-N-metiltranszferáz enzim hatására, aktiv metilcsoportjába izotópot bevitt S-adenozil-L-metionin jelenlétében jelölt metilhisztaminná alakul. Ez a közegtől alkalmas extraháló szerrel elválasztható s a reakcióban keletkező termék koncentrációjának változása folyadék-scintillációs méréssel követhető.

A továbbiakban irodalmi adatok alapján azokat a megfigyeléseket, eredményeket tekintjük át, amelyek a meghatározás folyamatából csak egy-egy részt foglalnak magukba, úgy-mint:

1. enzim-mennyiség
2. inkubálási idő
3. pufferkoncentráció
4. puffer-minőség
5. hordozó metilhisztamin
6. üvegfelület adszorpció hatása
7. extraháló oldószerek

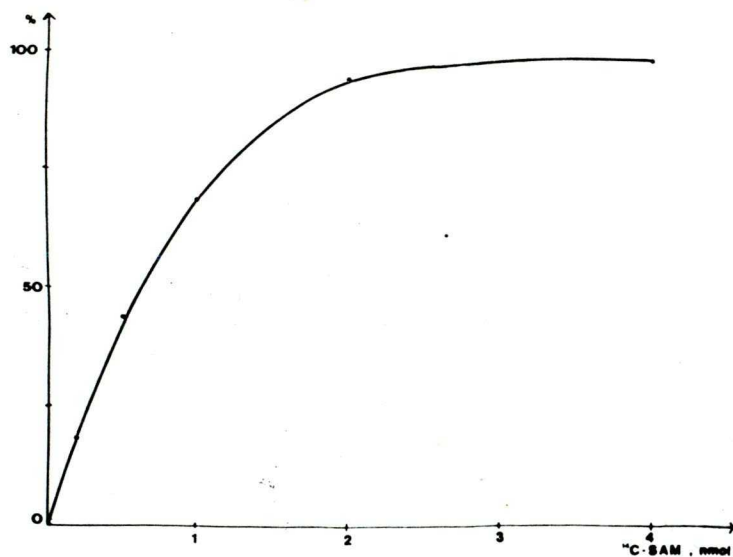
Beaven /18/ 1972-ben közölt dupla-izotópos módszert leíró részletes metodikai cikkében foglalkozik a tengerimalac-agyból kivont enzim mennyiségének az inkubálási folyamat eredményességét befolyásoló hatásával /4. ábra/; az aktiv metil donorttartalmazó ^{14}C -SAM mennyiségétől /5. ábra/; és az inkubálási időtől /6. ábra/ függően végbemenő enzimkémiai reakció termékének százalékos alakulásával.

Kísérletei alapján optimálisnak tekinti a 100 μ l enzim, 1 μ l /2 nmol/ 14 C-SAM jelenlétében 310 K fokos vízfürdőben 90 percig tartó inkubálást, melynek során a hisztamin több mint 95 %-a metilhisztaminná alakul, amit béta- 3 H-hisztamin hozzáadásával bizonyítottak /ld. 11.táblázat/.



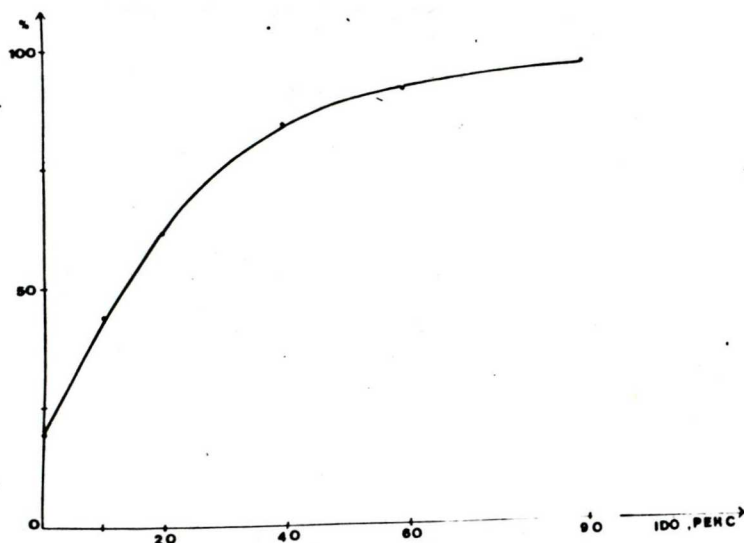
4. ábra

Az aktiv metilhisztamin képződési százaléka az enzim mennyiségétől függően



5. ábra

A 14 C-SAM mennyiségének hatása a képződő metilhisztamin mennyiségére



6. ábra

Az enzimekémiai reakció inkubálási időtől függő
végbemenetele

Az inkubálást követő kloroformos extrahálás során a legnagyobb a valószínűsége annak, hogy olyan anyagok is az extraktumba kerüljenek, amelyek zavarják, esetleg meggátolják a metilhisztamin kvantitatív kinyerését, illetve nagymértékben megnövelik a vizsgálat vak-/blank/ értékét.

A blank-mintára a reakcióközeg többi komponensét változatlanul hagyva, pufferrel játszadjuk le a további lépéseket. A vakra kapott beütésszám nagysága indikátora a reakció specificitásának, a zavaró, s az aktivitást növelő anyagok jelenlétének vagy hiányának.

Beaven szerint az általuk kezdetben kapott magas beütésszámok oka alapvetően két interferáló komponens volt. Az egyik a ^{14}C -metionin, amelynek extrahálódása a vizes fázisba, az elválasztás előtt adott igen magas lugkoncentrációval /10 mol/l/ viasszaszorítható.

A másik zavaró radioaktív anyag - amely részben az inkubálás során, részben pedig akkor keletkezik, ha NaOH -dal állítjuk le a reakciót -; nem-ionos, és széles pH-tartományban ugyanolyan megoszlási koeficienciával bír a vizes és a kloroformos fázis között / 63:37 arányban /, mint a metilhisztamin.

Ha a reakció leállítását - még a NaOH-dal való kezelés előtt - perklórsavval végezzük, s a továbbiakban a fent leírt extrakciót alkalmazzuk; a blank-értékek tizedrészre csökkenthetők.

Az extrahálás ^{14}C -metilhisztaminnal történő vizsgálata rávilágított továbbá arra is, hogy az extraktumba jutó metilhisztamin nem-kvantitatív módon 10...40 % -os kinyeréssel reprodukálható, ami miatt nem kapunk lineáris összefüggést az inkubálás során képződött, és az ily módon visszanyert termék mennyisége között.

A 6. táblázat adataiból kitűnik, hogy ezen anomália oka az, hogy a metilhisztamin adszorbeálódik az üveg falához, ami $100\text{ }\mu\text{g /c} = 10\text{ nmol/l}$ / jelöletlen hordozó metilhisztaminnak az inkubálás helyén történő hozzáadásával kiküszöbölhető.

6. táblázat

A ^{14}C -metilhisztamin extrakciója a hordozó metilhisztamin nélkül és azzal együtt

	^{14}C - METILHISZTAMIN AKTIVITÁS ⁺ /nCi/500nmol/		
	Vizes fázis	Kloroformos fázis	Üveghez adszorbeált
Hordozó nélkül	6,0	7,1	6,9
Hordozóval	7,0	13,1	0,0

+ Az elegy 2 nCi/50 pmol ^{14}C - metilhisztamint, 50 μl enzimet, 0,2 ml pH = 7,9 0,1 mol/l foszfát puffert, 1,8 ml 3,3 mol/l NaOH -ot és 6 ml kloroformot tartalmaz.

A kloroformos - vizes fázis arányát legalább 4 : 1 arányban beállítva, s hordozó metilhisztamint adva a rendszerhez; átlagosan 50...55 % -os hatásfok érhető el az elválasztás során.

Murran /52/ is foglalkozott a hisztamin üveghez való adszorpciójával, és az emiatt fellépő anomáliákkal. 1982-ben megjelent cikke ezen a téren a legújabb irodalmi adatokat tartalmazza üveg és polipropilén csövek használatáról /7. táblázat/.

Különböző mennyiségű / 0...6 mmol/l / hordozó metilhisztamint tartalmazó üvegcsőben /7. ábra/ vizsgálta az adott mennyiségben bevitt, ^{14}C -hisztamin / 240 nmol/l; 59,7 mCi/mmol / metanolos oldatában bekövetkező aktivitáscsökkenés 293 K -en 24 órás intervallumban.

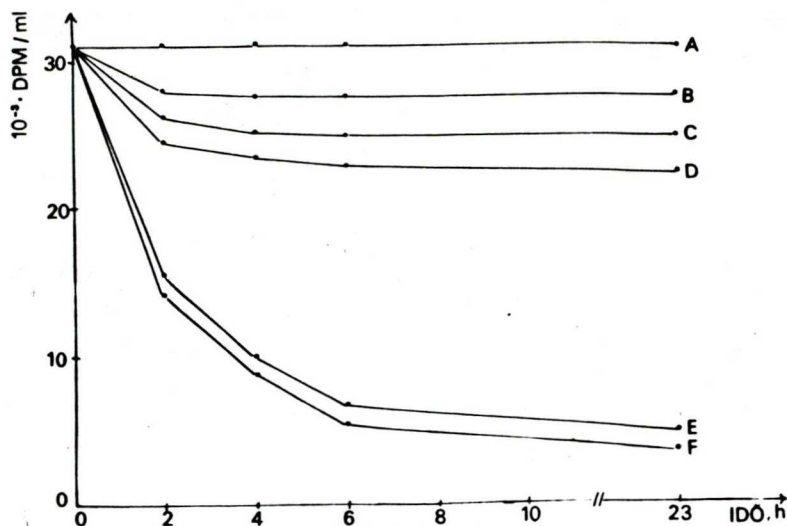
7. táblázat

^{14}C -hisztamin oldatának különböző felületeken bekövetkező aktivitásbeli változása

FELÜLET MINŐSÉGE	Á	L	L	Á	S	I	D	Ö	/h/ 23	
	0		2		4		6			
üveg	28 321	14 621		7 786		5 883		2 591		DPM
polipropilén	28 164	28 516		28 479		28 069		28 158		

Az adatok egyértelműen magyarázzák a polipropilén csövek előnyét és a hozzáadott hordozó mennyiségének fontosságát a metodika kivitelezésében. Mivel a hisztamin pontosabban az enzimekémiai reakcióban keletkező metilhisztamin folyadékscintillációs mérése általában üvegedényben történik, ott is számolnunk kell az adszorpció bekövetkezésével, ezáltal a radioaktivitás részleges elvesztésével.

Szolubilizáló ágensek /pl. etilén-glikol-monometil-éter/ segítségével ez az anomália kiküszöbölhető /22/.



Hordozó metil-
hisztamin
koncentrációk:
1000 /A/, 600
/B/, 400 /C/,
100 /D/, 50 /E/,
0 /F/ ng/ml

7. ábra

Jelölt hisztamin különböző mennyiségének hatása
az üvegfelülethez történő adszorpcióra

Beaven /22/ a dupla és az egyszerű izotópos módszer részletes tárgyalásán és összehasonlításán túl, felveti a belső standardok alkalmazásának kérdését, s megállapítja, hogy a forgalomban lévő gyűrűn jelölt ^3H -hisztamin vegyületek mind 2-, mind 4- ^3H -hisztamint tartalmaznak, melyek eltérő módon metilálódhatnak, mégpedig az előbbi sokkal gyorsabban, míg az utóbbi sokkal lassabban mint a jelöletlen hisztamin, így a kvantitatív visszanyerés bizonytalan. További probléma, hogy a 2- ^3H -hisztaminból jóval rövidebb idő alatt "kiürül" a trícium /4...5 hónap/, ami a 4-izomer koncentrációjának relatív megnövekedését, ugyanakkor a rendszerben triciált víz megjelenését eredményezi, ez pedig főleg a vak-értékek irreális növekedésében nyilvánul meg. Mindezen anomáliák megszüntethetők, ha belső standardként oldalláncon jelölt ^3H -hisztamint alkalmaznak, ami a jelöletlen vegyülettel analóg módon metilálódik.

Az előzőekben említett triciált víz jelenlétével nemcsak a fenti okok miatt kell számolnunk, hanem ^3H -SAM esetében is, ugyanis a SAM tisztasága és stabilitása döntő faktor a meghatározásban. Bomlása a vak-érték jelentős megnövekedését okozza, mivel a triciált vízből a ^3H az extrahálás során akadálytalanul átjut a kloroformos fázisba.

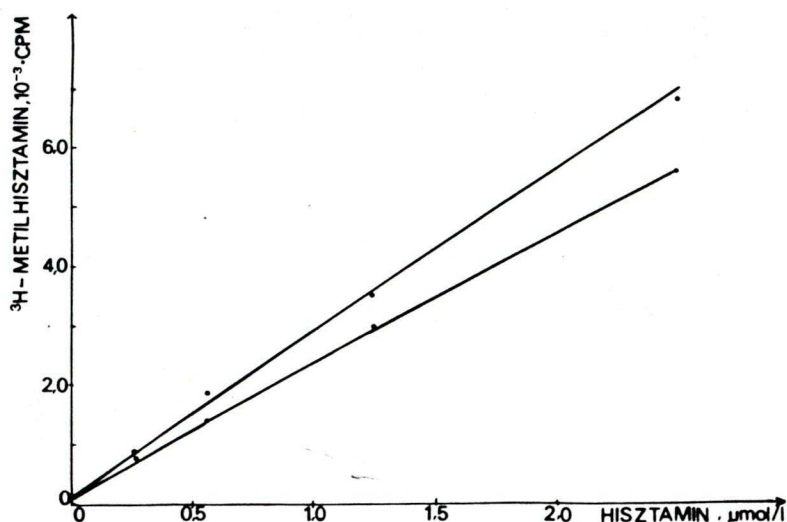
Subramanian /74/ kidolgozott mikromódszerében lényegesen lecsökkentette az inkubálási időt, mégpedig az addig szokásos 90 percről 15 percre. Kísérletei szerint ilyen rövid reakcióidő is elegendő ahhoz, hogy a bevitt mintákban az enzimkémiai reakció kvantitatív módon, kellő eredményességgel lejátszódjon. Adatai ellentétben állnak előző irodalmi adatokkal, amelyekben bebizonyították /18,22/, hogy 90...95 %-os átalakulás csak 90 perc múlva érhető el.

Shaff és Beaven /69/ által ismertett új enzimpreparátum, melyet patkány veséből állítottak elő, néhány módosítást hozott a további munkában. Az enzim előnyeit a tengerimalac agyából preparáltéval szemben az előzőekben már ismertettük. Hasznos tulajdonságaival szemben a hisztamin kutatással foglalkozók többsége áttért eme preparátum használatára, amellyel a detektálható legkisebb hisztamin koncentráció a dupla-izotópos módszer esetében 20 pg, míg az egy-izotópos módszerrel 5 pg.

Az utóbbi néhány évben elterjedtek az úgynevezett mikro-assay módszerek, melyek jelentősen lecsökkentik a bemért minták és reagensek térfogatát, s különösen a kloroform mennyiségének nagyfokú redukálása megkönnyíti az extrahálási lépés kivitelezését.

Taylor /76/ 1980-ban írta le az általa ^3H -SAM és agyból preparált enzim felhasználásával kidolgozott egyik mikro-meghatározást. Többek között vizsgálta a pufferkoncentráció minőségének hatását az enzimkémiai reakció végbemenetelére, mégpedig 0,05 mol/l koncentrációjú 0,01 g/cm³ triton X-100-at tartalmazó foszfát puffer, illetve tris-bovin szérum albumin 0,025 mol/l koncentrációjú puffer esetében.

Ugyanazon standard mintákat a két különböző pufferközegben reagáltatva azt találta, hogy foszfát puffer esetében következetesen magasabb beütésszámok adódnak, amint azt a 8. ábra szemlélteti.



8. ábra

Foszfát /●/ és tris-albumin pufferben /○/ kapott beütésszámok a hisztamin koncentráció függvényében.

Alkalmazott mikromódszerükkel 25 nmol/l alatti koncentráció értékek nem voltak kimutathatók, ugyanis ezen mikro-assay inkább nagyobb hisztamin szintet tartalmazó minták esetén ad reális eredményt; míg plazmára vagy szérumra kevésbé megbízható.

McDonald /31/ és munkatársai a pufferközeg koncentrációjára vonatkozóan végeztek kutatásokat, egy-izotópos módszert alkalmazva; s megállapították, hogy a kloroform elpárolgotatása után a scintillációs koktélban felvett mintákra kapott beütésszámok nagymértékben függnék a puffer molaritásától. Mégpedig a foszfát puffer koncentrációjának növelése az aktivitások csökkenését vonja maga után /8. táblázat/,

amit ők azzal magyaráznak, hogy a közeg töménységének növekedése gátló hatással van az enzimaktivitásra.

8. táblázat

A beütésszámok változása a puffer-koncentrációval
adott hisztamin koncentráció esetén

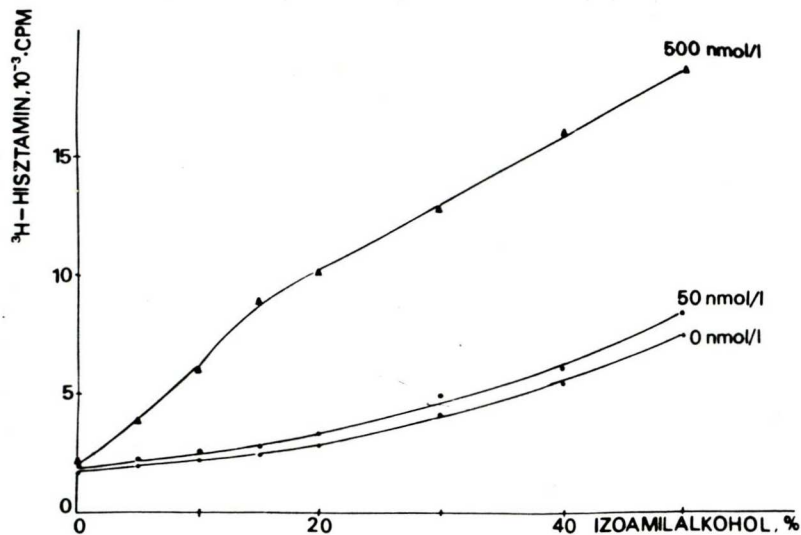
PUFFERKONCENTRÁCIÓ / mol/l /	BEÜTÉSSZÁM /CPM/
0,1	3 700
0,05	6 100
0,01	10 600

A legujabban kifejlesztett módszerek közé tartozik Beaven /16/ 1982-ben megjelent mikromódszere, amelyben lényeges változtatásokat közöl az extrakcióra vonatkozóan, illetve egy-lépéses extrahálást valósít meg, amellyel 55...2 750 mmol/l koncentrációtartományban kapott lineáris összefüggést. Az egy-izotópos módszerének lényege röviden a következő: az inkubációs folyamat az előző metodikákkal azonos, azonban az elválasztást nem kloroformban, hanem toluol-izoamilalkohol elegyében végzi. Innen, a centrifugálást követően két további megvalósítás lehetséges:

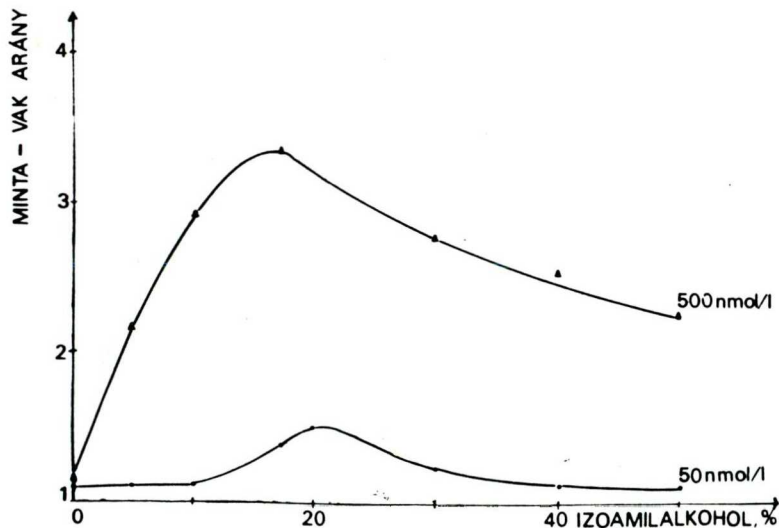
1. A szerves fázisból adott térfogatot /300 µl/ közvetlenül a scintillációs koktélba mérünk.
2. A szerves fázist lefuvatjuk, a kinyert jelölt metil-hisztamint 20 µl 10 mol/l NaOH hozzáadása után visszaoldjuk 0,01 mol/l HCl -ban, 60 µl, s ugyanolyan összetételű eleggyel re-inkubáljuk. A továbbiakban az 1. pontban leírtak szerint járunk el.

A szerzők szerint ez a második re-inkubálás pótolja a többiek által bevezetett vékonyréteg kromatográfiás lépést, melynek hátránya, hogy a jelölt metilhisztamin elválasztása és kvantitatív visszanyerése ezen tisztítási mód alkalmazásával csak tökéletes technikával lehetséges.

A módszer kidolgozásakor céljuk volt olyan extraháló oldószerek megválasztása, amelyek a scintillációs koktélaban – a kloroformmal ellentétben – nem okoznak quench-hatást, illetve amelyekkel a vak-értékek a minimálisra csökkenthetők. Legalkalmasabbnak a toluol-izoamilalkohol 80:20 arányú elegye bizonyult, amelynél a különböző hisztamin mennyiséget tartalmazó mintákra és a vakra kapott beütésszámok hányadosára a legnagyobb különbség érhető el /9. ábra/.



9/a



9/b

9. ábra

A ^3H -extraktumok aktivitásai /9a/ és a vakértékeivel osztott arányok /9b/ különböző izoamilalkoholt tartalmazó extraháló elegyek esetében

További vizsgálódásunk szempontjából igen hasznos információkat szolgáltat Beaven /16/ a különböző vérerekben lévő eltérő hisztamin koncentrációkról, és a hisztamin kiürülések /clearance/ százalékos változásáról. Eredményei azt mutatják, hogy az egyes vénákban a hisztamin szint lényegesen alatta marad az artériákban mért értékeknek, amelyek a keringésben valóban jelen lévő hisztamin szintet reprezentálják. Egyes szervekben ugyanis /vese, máj, gyomor/ a hisztamin kiürül a szervezetből, így ezen szervek vénáiból vett vérmintákra irreálisan alacsony érték adódik /9. táblázat/.

9. táblázat

Különböző erek vérmintáiból mért hisztamin szintek és clearance értékek kutyaiban normál állapotban, illetve 15 perces, 160 µg/kg.perc hisztamin infúzió után

M I N T A	H I S Z T A M I N /nmol/l/		
	CLEARANCE/%/	KONTROLL	INFÚZIÓ UTÁN
ARTÉRIÁS plazma			
jobb pitvar	-	27	350
artéria carotis	-	5,0	410
VÉNÁS plazma			
véna femorális	99,5	<2,0	2,0
véna renális	90	25	40
véna mesenterica	78	6,0	90
véna gastrica	71	2,0	120
véna portális	-	5,0	170
véna hepatica	65	7,0	60
véna juguláris	39	3,0	250

10. táblázat

A különböző szerzők által megvalósított radioenzimatikus hisztamin meghatározás
anyagszükséglete és metodikai lépései

	Taylor /1971/ D+	Taylor /1972/ S++	Kobayas. /1972/ S	Miller /1970/ D	Subraman. /1978/ S	Beaven , Shaff /1978/ D S	Taylor /1980/ S
MINTAELOKÉSZÍTÉS	2-10x ^{tf.}	5-20x	20x	plazma	10x	10x	
foszfát puffer	0,05M	0,01 M	0,05 M	extr.	0,1 M	0,1 M	-
a szövethez	pH 7,9	pH 7,9	pH 7,2		pH 7,9	pH 7,9	

INKUBÁLÁS /310 K/							
1.minta / μ l/	50-100	1-20	100	800	20-300	20-100	10
2. ³ H-hisztamin/ μ l/	25 16nCi	-	-	25 50nCi	-	10 10nCi	-
3. SAM/ ¹⁴ C v. ³ H/ / μ l/	25 200nCi; 5nmol	5 312nCi; 780pmol	100 250nCi; 650pmol	50 40nCi; 550pmol	1,0 50nCi; 2,9nmol	1,0 54mCi; 1mmol	1,0 500mCi; 1mmol
4.Enzim / μ l/	25	5	100	100	30	1	1
5.Foszfát puffer / μ l/	to 200 0,05 M pH 7,9	+++to 30 0,05 M pH 7,9	to 500 0,05 M pH 7,2	-	-	pH 7,9 to 400 0,1 M	to 40 0,1 M pH 7,9
6. Inkubálás/perc/	90	90	90		15	90	90

+ Dupla-izotópos módszer /D/

++ Egy-izotópos módszer /S/

+++ ul össztérfogatig /to/



10. táblázat - folytatás

	Taylor /1972/ D	Taylor /1972/ S	Kobayas. /1972/ S	Miller /1970/ D	Subraman. /1978/ S	Beaven, Shaff /1978/ D S	Taylor /1980/ S
EXTRAHÁLÁS							
1. NaOH / μ l/	500 1mol/l	5 1mol/l	200 2mol/l	1000 1mol/l	100 1mol/l	200 10mol/l	10 1mol/l
2. Kloroform / μ l/	6000	250	6000	8000	1000	3000	250
3. NaOH-mosás / μ l/	2000 1mol/l	100 1mol/l	2000 2mol/l	1600 1mol/l	200 1mol/l	500 3,3mol/l	100 1mol/l

Az eddigiek során röviden áttekintettük a módosított radioenzimátikus hisztamin meghatározásokat, különös tekintettel azokra a kutatásokra, amelyek az egyes paramétereknek a reakcióban kimutatóott szerepére vonatkoznak. Az egyes szerzők által kivitelezett folyamatok legfontosabb összetevőit és lépéseit az előző oldalakon lévő 10. táblázatban foglaltuk össze.

M É R É S I M Ó D S Z E R E K

Az előzőekben tárgyalt irodalmi adatok ismeretében a továbbiakban részletesen bemutatjuk azon folyamatok metodikai lépéseit, amelyeket kísérleti munkánk kivitelezése során alkalmaztunk, nevezetesen:

- I. Egy-izotópos radioenzimátikus hisztamin meghatározás plazma és szövetmintákból
- II. Plazma-hemoglobin mérés
- III. Fehérje-koncentráció meghatározás

I. PLAZMA ÉS SZÖVETI RADIOENZIMATIKUS HISZTAMIN MEGHATÁROZÁS KIVITELEZÉSE

1. A hisztamin-N-metiltranszferáz enzim preparálása

A tengerimalac agyából és a patkány-veséből kivont enzimpreparátumokra vonatkozó részletesen ismerttetett irodalmi adatok és eredmények alapján /17,22,67/ kísérleteinkhez a hisztamin-N-metiltranszferáz enzimet patkány veséjéből izoláltuk.

6 darab 180...220 g-os himpatkányt dekapitáltunk, a veséket kivettük, térfogatukat fiziológiás sóoldatban mértük; majd kilencszeres mennyiségű jéghideg 0,25 mol/l koncentrációju szaharózban homogenizáltuk.

A durva partikulumokat Janetzky VAC-601 típusu ultracentrifugával 277 K-en 40 000 g-vel 60 percig tartó ultracentrifugálással távolítottuk el.

A felülúszóhoz a protein-frakció 45 %-os precipitálása céljából ml-ként 0,258 g $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -ot adagoltunk, állandó mágneses keverés mellett 10 perc alatt; majd a só teljes feloldódásáig kevertettük a rendszert. 277 K-en 1 órai állás után Janetzky K-23 centrifugán 2 000 g-vel 20 percig 277 K-en centrifugáltuk. 70 %-os fehérje-szaturációt valószínűsítettünk meg további $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -os kezeléssel úgy, hogy a minta felülúszójához ml-ként 0,156 g sót adagoltunk a fent leírtak szerint. Ujabb, 1 órai 277 K-en való állást követő centrifugálás - 2 000 g, 20 perc 277 K - után a felülúszót eldobtuk, s a továbbiakban a precipitátumot használtuk fel.

A közel 3 g kinyert extraktumot 3-szoros mennyiségű 7,4 pH-ju 0,1 mol/l koncentrációju Na-foszfát pufferben szuszpendáltuk, s dializáltuk 2 liter pH= 7,4 0,01 mol/l töménységű pufferrel szemben. A dializáló oldatot háromszor cseréltük, minden lépés időtartama 8 óra volt.

A végső preparátum térfogat 14...16 ml-nek adódott, amelynek felülúszóját Janetzky K-23-mal történő centrifugálás után - 4 000 g, 20 perc 277 K - ampulláztuk 400 μ l-es részletekben, és felhasználásig 253 K-en tároltuk.

Az enzimpreparátum fehérje-koncentrációját Lowry /45/ módszerével /lsd. később/ végeztük el.

A radioenzimatikus reakcióban optimálisan szükséges mennyiségű enzim megállapításához kalibrálást végeztünk,

melynek során a következő higitatlan és 7,9 pH értékű 0,1 mol/l foszfát pufferrel higitott térfogatokat vittük be a reakcióelegybe:

higitatlan enzimből: 10; 15; 20 µl/minta
higitás mértéke : 2x; 5x; 10x; 20x; 25x; 50x
/bevitt térfogat: 10 µl/minta /

A vak értékekre és a standard sorozatba kapott beütésszámok alakulását az enzimkoncentráció függvényében a következő részben ismertetjük.

2. A standard-, vér- és szövetminták előkészítése a vizsgálathoz

A kalibrációs görbék felvételéhez a különböző koncentrációjú hisztamin standardokat hisztamin-dihidrokloridból mértük be. 0,01 mol/l HCl-val 10 mmol/l koncentrációju törzsoldatot készítettünk, amit ampullázva 253 K-en tároltunk. Közvetlen használat előtt ebből ugyancsak 0,01 mol/l sósavval higitási sort állítottunk elő 1...2 000 nmol/l koncentráció-tartományban úgy, hogy a minták koncentrációja 1,0; 5,0; 10; 50; 100; 500; 1000 és 2000 nmol/l érték legyen.

A biológiai meghatározásokat éber és 30 mg/kg Na-pentobarbitállal /Nembutal/ altatott kutyákon létrehozott hemorrhagiás-shockos folyamat során vett vér- és különböző szövetmintákból végeztük.

Vérminták esetében az előbbiekben ismertetett artéria és véna eltérő hisztamin koncentrációira vonatkozó irodalmi adatok /16/, és saját laboratóriumunkban tapasztalt korábbi eredmények alapján altatott kutyáktól az artéria femoralisból, éber állatoktól az artéria carotisból vettük a testsúly-kilogrammonként 750 NE heparint mint antikoagulánst tartalmazó vérmintákat.

A teljes vért a plazma kinyeréséhez Janetzky K-23 típusu centrifugán 277 K-en 10 percig 2 000 g-vel centrifugáltuk. Mind a centrifugálást, mind pedig a plazma 253 K-en történő tárolását a hisztamin bizonyított üveghez való adszorbcioja miatt /18,52/ polipropilén csőben végeztük.

A szöveteket a kísérletsorozat végén az állatok fölös mennyiségű altatóval történő leölése után azonnal kivettük, jéghideg fiziológiás sóoldattal mostuk, majd szárazjégre téve hűtöttük. Hisztamin meghatározást a következő szövetekből végeztünk:

sorozatos mérésekkel: vázizom; lép; máj; tüdő; bal-pitvar; balkamra

egyedi mérésekkel : mellékvese; vese-velőállomány; vese-kéregállomány; pankreas; artéria; jejunum; ileum

A vizsgálathoz mértük a szövetminták tömegét, majd 9-szeres mennyiségű 7,9 pH-ju foszfát pufferben homogenizáltuk. Legalább egy éjszakán állni hagytuk a hisztamin teljes kioldódásához /18/. Felhasználás előtt Janetzky K-23 centrifugával 277 K-en 2 000 g-vel 15 percig centrifugáltuk, s a felülúszóból hisztamin és Lowry-féle fehérje-meghatározást végeztünk.

Annak eldöntésére, hogy különböznek-e és milyen mértékben a kapott hisztamin szintek a g-szövetre vagy g-fehérjére vonatkoztatva; mind a tömeg-, mind pedig a fehérje-mérést elvégeztük ugyanazon szövetminta esetén.

Elterő irodalmi adatok állnak rendelkezésünkre a reakcióelegybe való bemérés előtti szövet-előkészítésekről. Egyes szerzők /16,22,76/ szerint a homogenizátum további előkezelés nélkül, közvetlenül bevihető a rendszerbe; míg mások /18,31,74/ szerint 10 perces 363 K-es vízfürdő szükséges az endogén SAM eltávolítására, illetve deproteinizálásra; s a forralás után centrifugált minta felülúszója alkalmazható hisztamin-mérésre.

Az előkezelt és kezeletlen minták hisztamin szintje között adódó különbség megállapítására mind a homogenizátum, mind a fehérje-mentesített felülúszót feldolgoztuk.

Minden esetben 20 μ l mintát reagáltattunk. Olyan szöveteken, amelyek hisztamin tartalma 40...50 nmol/l vagy ennél nagyobb volt, 0,1 mol/l pH = 7,9 foszfát pufferrel 5- vagy 10-szeresen hígított anyagból mértünk be 20 μ l-t.

Ehhez kapcsolódóan vizsgáltuk, hogyan változik a kapott hisztamin szint a hígítás mértékével; hol az enzim és a ^3H -SAM mennyisége által megszabott mérhető felső koncentráció-határ.

3. Inkubációs folyamat

Az irodalomban közölt, részlegesen módosított különféle mikromódszerek érzékenységük miatt nem alkalmasak a plazma vagy a szérumban lévő igen alacsony hisztamin koncentráció mérésére.

Mivel munkánkban döntő fontosságu volt az állatkísérletek során vett vérmintákban bekövetkező hisztamin szintek mennyiségi változásának követése, emiatt az ismert metodikák közül olyat kellett választani, amellyel kellő pontossággal meghatározhatók a plazmában beálló csekély koncentráció-változások is.

Emiatt Beaven /22/ által 1972-ben részletesen kidolgozott és leírt izotópos eljárások közül az egy-izotópos ^3H -SAM alkalmazásával kivitelezett metodikát vettük alapul, s ehhez kapcsolódóan vizsgáltuk az enzimkémiai reakció kimenetelét befolyásoló tényezőket; majd eredményeink alapján módosítottuk úgy, hogy sorozatosan végzett kísérleti munkánkban érzékeny és reprodukálható módszerré váljon.

A meghatározást 15 ml-es kónuszos polipropilén csőben végeztük. A csöveket jégbe állítottuk, és a következő reagenseket mértük bele:

1. 20 μ l standard, plazma vagy szöveti homogenizátum, illetve a vak mintához 20 μ l 0,1 mol/l pH = 7,9 foszfát puffer
2. 10 μ l, az előzetes vizsgálatok alapján optimálisnak talált 10-szeresen hígított enzim
3. 1,0 μ l ^3H -S-adenozil-L-metionin $5,55 \cdot 10^{11}$ Bq/mmol
4. 50 μ l 0,1 mol/l 7,9 pH-ju foszfát puffer

A rendelkezésünkre álló ^3H -SAM -ot a bemérés előtt, a vak értékek csökkentése céljából tisztítottuk az alábbi módon:

Az össz-minta számba bemért 1 μ l/minta, kénsavban oldott aktiv SAM-ról a folyadék-fázist N_2 - áramban lefuvattuk, majd legfeljebb a kiindulási izotóp térfogatával azonos mennyiségű desztillált vízzel kétszer ismételtén mostuk. Ezen beavatkozás célja, hogy a SAM bomlása miatt a folyadék-fázisba triciált víz formájában bekerült tríciumot a rendszerből eltávolítsa; illetve a kénsavban oldott izotóp erősen savas kémhatását megszüntesse.

A ^3H -SAM fent leírt előzetes kezelésével a vak értékeire adódó aktivitásokat jelentős mértékben sikerült visszaszorítani.

A bemérés után a 80 μ l össztérfogatu csöveket vortexeztük, majd 310 K-en 90 percig inkubáltuk. Az inkubálás végén 50 μ l, 0,8 mol/l HClO_4 - ban oldott 4,5 mmol/l koncentrációju jelöletlen hordozó metilhisztamint adtunk a rendszerhez.

Amennyiben a meghatározás következő lépéseit folyamatosan nem végeztük el, úgy ebben a stádiumban további beavatkozásig lehetőség nyílt a minták 253 K-en történő tárolására.

Az előbbieken ismertetett inkubációs elegy már azokat az adatokat tükrözte, amelyeket kísérleteink során legalkalmasabbnak véltünk a reakció kvantitatív lejátszódásához.

Ezzel kapcsolatosan az alábbi paramétereket vizsgáltuk:

1. Az enzim mennyiségének hatását a reakció kimenetelére
2. A közegben lévő Na-foszfát puffer koncentrációját 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} mol/l értéknek választva, illetve helyette ugyanolyan mennyiségű fiziológias sóoldatot vagy desztillált vizet hozzáadva figyeltük a reakció hatásfokának alakulását.
3. Vizsgáltuk az aktivitások változását a 0,1 mol/l koncentrációju foszfát puffer különböző pH értékein: 7,0; 7,3; 7,6; 7,9; 8,2
4. Összehasonlítottuk a 0,1 mol/l pH = 7,9 foszfát és 0,025 mol/l pH = 7,4 tris-albumin pufferes közegben kivitelezett reakció eredményességét
5. Tanulmányoztuk az enzimkémiai folyamat lejátszódásának hatásfokát növekvő inkubálási időknél: 0; 15; 30; 60; 90 perc
6. Változtattuk az inkubálás végén hozzáadott 4,5 mmol/l inaktív hordozó metilhisztaminnak a reakcióelegybe bevitt mennyiségét : 0; 25; 50; 75; 100 μ l/cső
7. Végül összefoglaljuk a fenti tényezőknek a vak értékekre kifejtett hatását, és bemutatjuk a blank aktivitásának alakulását 100...100 μ l 0,4; 1,0; 2,0; 4,0; 7,0 mol/l perklórsavnak az inkubálást követő hozzáadásakor; és foglalkozunk a vak minták különféle előkezelésének lehetőségeivel.

4. A jelölt metilhisztamin extrahálása és liquid-scintillációs mérése

Az irodalomban az aktív metilhisztamin kinyerésére elfogadott általános lépés a kloroformmal történő extrakció.

Az egyes szerzők által megadott szükséges és elegendő kloroform mennyiség igen széles tartományt foglal magában /ld. 10. táblázat/ attól függően, mekkora a hisztamin szint a mérendő mintában.

Ismert, hogy az inkubálás során képződött metilhisztamin erősen lugos közegben kb. 50...55 % -os megoszlást mutat a kloroformos és vizes fázis között/18/. Mint már említettük, a lugos közeg egyrészt elősegíti a szerves fázisba való átjutást, másrészt viszont megakadályozza egyéb komponensek extrakcióját.

Mivel irodalmi adatok alapján /16,74,76/ a különböző módon megvalósított mikromódszerek inkább szövet, mint plazma mérésére alkalmasak; emiatt az extrahálási műveletnél is Beaven /22/ által leírtak szerint jártunk el.

A keletkezett jelölt és hozzáadott inaktív metilhisztamint tartalmazó reakcióelegyhez NaCl-dal telített 400 μ l 5 mol/l NaOH-ot és 4 ml kloroformot adtunk. A csöveket zártuk, és 2 percig vortexeztük, majd Janetzky centrifugán 277 K-en 1 500 g-vel 10 percig centrifugáltuk. A vizes fázis leszívása után a továbbiakban NaCl-dal telített 3,3 mol/l NaOH-dal mostuk, s a fentieknek megfelelően újból centrifugáltuk.

A szervetlen fázis teljes eltávolítása után a szerves fázisból 3 ml-t Packard folyadék-scintillációs küvettába mérünk be, s a kloroformot szobahőmérsékleten lefuvattuk, mégpedig kétféle módon:

Az irodalomban közöltek szerint az elpárologtatás mind N_2 -, mind levegő-áramban lehetséges. Kísérleteink során mindkét módszert kipróbáltuk, s a kapott eredményeket egymással összehasonlítva értékeltük.

A kloroform evaporálása után a maradékot először 0,5 ml szolubilizálószerben /Celloszolv/ visszaoldottuk, majd scintillációs koktélnként 9,6 ml toluolt és 400 μ l liquifluort adtunk hozzá.

Az utóbbi scintillátor anyag összetétele a következő volt:

1,25 g 1,4-di-/2/5-fenil-1-oxazolil-benzol /POPOP/ és
100 g 2,5-difeniloxazol /PPO/ 1 l toluolban oldva.

Ezek után mértük a minták aktivitásait Beckman folyadék-scintillációs berendezésben 298 K-en 10 perces mérésidővel. A CPM-ben /counts per minute/értékeket a mérőberendezés hatásfok-görbéjének ismeretében DPM-re /disintegrations per minute/számoltuk át, s minden minta esetében a vak beütésszámával korrigáltuk.

A plazma és szövetpreparátumok hisztamin szintjét ugyanolyan körülmények között kezelt standardok DPM-értékei alapján számítógépes program segítségével számoltuk.

Az extrahálás és mérés során a következő tényezőket vizsgáltuk:

1. Az extrahálási időtől való függést tanulmányoztuk oly módon, hogy a mintákat 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 percig vortexeztük.
2. A kloroform mennyiségét változtatva - 2 és 4 ml - néztük az aktivitások változását ugyanazon minták esetében.
3. Az extrahálási viszonyokat azzal is módosítottuk, hogy kloroform helyett más szerves oldószert használtunk: toluol, 5 és 10 ml
toluol-izoamilalkohol, 4:1 elegye, 5 és 10 ml.
4. A celloszolv elsődlegesen kifejtett szolubilizáló-, és másodlagos quench-hatása miatt változtattuk a folyadék-szintillációs koktélba bemért mennyiségét 0,0; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,75; 2,0 ml/10 ml koktél értékeket választva.
5. Különböző minőségű mérőküvetekben - üveg, műanyag - visszaoldott ugyanazon mintákra kapott aktivitásokat hasonlítottuk össze.

Ezzel röviden áttekintettük az általunk megvalósított, hisztamin radioenzimatikus meghatározásának lépéseit; ismertettük azokat a tényezőket, amelyeket részben irodalmi adatok, részben pedig saját laboratóriumi tapasztalataink alapján szükségesnek tartottunk behatóbban tanulmányozni annak érdekében, hogy az enzinkémiai folyamat paramétereit részleteiben is megismerjük.

II. A PLAZMA-HEMOGLOBIN SPEKTROFOTOMETRIÁS MÉRÉSE

Állatkísérletek során vett vérmintáknál azt tapasztaltuk, hogy a hemorrhagiás shock különböző szakaszaiban, különösen a shock késői stádiumában vett vérminták kisebb-nagyobb mértékben hemolizáltak, ami a plazmában lévő hemoglobin szint megnövekedését okozza.

A hemolizis oka a vér vörösvér-testjeinek mechanikai, kémiai és energetikai okok miatt bekövetkező roncsolódása és szétesése.

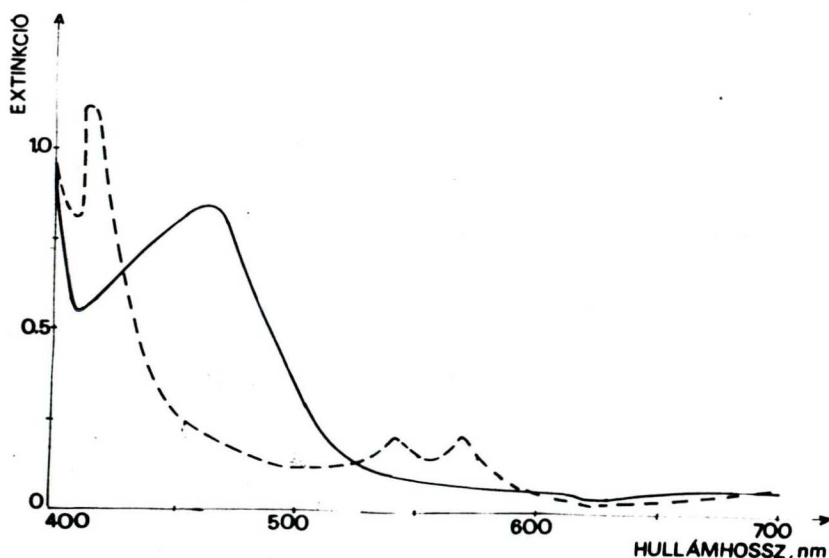
Annak eldöntése végett, hogy vörösvértestek hemolizise befolyásolja-e a plazmában mért hisztamin szinteket, ugyanazon vérmintából hisztamin és plazma-hemoglobin mérést is megvalósítottunk. A hemolizist mesterséges uton kétféle módon idéztük elő:

1. A heparinnal levett vérmintát roncsolásos kezelésnek vetettük alá olymódon, hogy hőmérsékletét - 253 K és 298 K között - többször ismételt fagyasztás-olvasztással változtattuk, aminek következtében a vörösvértestek nagyfoku degenerációja következett be. Az így kezelt vérmintát Janetzky K-23 centrifugával 2 000 g-vel 10 percig 277 K-en centrifugáltuk. A nagymértékben hemolizált felülúszó plazmából desztillált vízzel higitási sort készítettünk. Kontrollként a kiindulási vérminta 2 000 g-vel 10 percig 277 K-en történő centrifugálással kapott plazmáját használtuk mind hisztamin, mint hemoglobin mérésére.

2. A kutyából vett teljes vért kontrollként ugyanolyan mennyiségű fiziológias sóoldatban, illetve hemolizátumként az előbbivel azonos térfogatu desztillált vízbe mértük be, s ilymódon két higitási sorozatot kaptunk. A hemolizált vérminták plazma-hemoglobin és hisztamin értékeit a fiziológias sóoldatban lévő kontrollhoz viszonyítottuk. Összehasonlítottuk továbbá a mérés előtt 2 000 g-vel 10 percig centrifugált és centrifugálatlan mintákra kapott hisztamin és hemoglobin értékeket.

A hisztamint az előzőekben részletesen ismertetett radioenzimatikus, a plazma-hemoglobint pedig Martinek /51/ által 1956-ban leirt spektrofotometriás módszerrel mértük.

Az eljárás lényege, hogy a plazma-hemoglobin kis mennyisége is meghatározható az oxihemoglobin abszorpciójának mérésére visszavezetve; azonban számolni, illetve korrigálni kell a bilirubin ugyanolyan hullámhossz-tartományban mutatott fényelnyelésével. A két hullámhossz abszorbanciájának mértékét a hullámhossz függvényében a 10. ábrán tüntettük fel.



10. ábra

Az oxihemoglobin /---/ és a bilirubin /—/ abszorpciós görbéje 400...700 nm hullámhossz-tartományban

A spektrofotometriás meghatározás magában foglalja egyrészt az oxihemoglobin 412...415 nm -en mutatott maximális abszorpciójának mérését, másrészt a bilirubin addíciójának kiszűrését annak ismeretében, hogy a bilirubin által ilyen hullámhosszon okozott abszorbancia a 455...457 nm értéknek vett maximális abszorpciójának 80 %-át teszi ki. Tehát ezen két /412 és 457 nm/ hullámhosszon mért extinkcióból a plazma-hemoglobin az alábbi módon számítható:

$$E_{412} - /0,8 \times E_{457}/ \times F = c_{Hgb} / \text{mg/ml}/$$

ahol: E - a mért extinkció

F - a készüléktől függő, előzetesen megállapított szorzófaktor, ami ismert totál -hemoglobint tartalmazó, különböző mértékben hígított vérmintákból mérhető, s a következő képlettel számítható:

$$F = \frac{c_{Hgb}}{E_{415} - /0,8 \times E_{457}/}$$

A mérést Opton PMQ - II típusu spektrofotométeren 1 cm-es küvettában valósítottuk meg oly módon, hogy 0,3 ml plazmát vagy hígított hemolizátumot 3,0 ml fiziológiás sóoldatba mértünk; legalább fél percig vortexeztük a hemoglobin teljes oxigenizálódásához. 30 perc állás után fiziológiás sóval szemben mértük az extinkciókat 415 és 455 nm-en, a hemoglobin koncentrációt pedig a fenti képletek alapján számoltuk.

3. Oldott fehérje-meghatározás Lowry módszerével

Mint már említettük, szöveti preparátumok esetében a hisztamin koncentráció számolását mind g-szövetre, mind pedig g-fehérjére elvégeztük.

Az egységnyi proteinre viszonyított hisztamin mennyiség megállapításához szükséges volt a 7,9 pH-ju 0,1 mol/l foszfát pufferben homogenizált és a durva partikulumoktól centrifugálással mentesített felülszó fehérje-koncentrációjának ismerete, amelyet spektrofotometriás mérésre vezetünk vissza.

A folyamat, amelyet Lowry /45/ 1951-ben dolgozott ki, tulajdonképpen a tirozin Folin reagenssel kiváltott színreakcióján alapul, ami a fehérjék lugos közegű hidrolízise után játszódik le.

A meghatározáshoz 0,5 ml homogenizátum-felülúszóból indulunk ki; ehhez 3 ml reagenst adunk, melyet a következőképpen készítünk:

100 ml 0,1 mol/l nátriumhidroxidban oldott 2 g/100 cm^3 Na_2CO_3 -hoz hozzáadunk 1 ml 1 g/100 cm^3 CuSO_4 -ot és 1 ml 2 g/100 cm^3 K-Na-tartarátot. Az így előállított oldatot összekeverés után azonnal, de legfeljebb 24 órai állásideig használhatjuk fel.

A két komponensű összemért rendszert szobahőmérsékleten

10 percig állni hagyjuk, majd 0,5 ml kétszeresen hígított Folin reagenst mérünk bele. Ujabb, 30 percig tartó állás után 750 nm-es hullámhosszon mérjük a minták extinkcióját Opton PMQ II spektrofotométeren; s a bovine-serum albumin standard fehérje-koncentrációjára számolunk.

FELHASZNÁLT KÉMIAI ANYAGOK

1. Hisztamin meghatározás

1. ^3H -S-adenozil-L-metionin
specifikus aktivitás : $5,55 \cdot 10^{11} \text{Bq/mmol}$
/Amersham UK International Corporation/
2. Hisztamin-dihidroklorid /Merck/
3. Metilhisztamin; 1-metil-4-/2-aminoetil/-imidazol-
hidroklorid /Serva/
4. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ /Reanal/
5. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ /Reanal/
6. Perklórsav /Reanal/
7. NaOH /Reanal/
8. HCl /Reanal/
9. Kloroform /Reanal/
10. Toluol /Reanal/
11. Celloszolv /Loba Chemie/
12. Izoamilalkohol /Reanal/
13. Tris-/hidroxi-metil/-amino-metán /Reanal/
14. PPO; 2,5-difeniloxazol /Reanal/
15. POPOP; 1,4-di-/2/5-fenil-1-oxazolil-benzol /Reanal/

2. Plazma-hemoglobin meghatározás

1. NaCl /Reanal/

3. Fehérje meghatározás

1. NaOH /Reanal/
2. Na_2CO_3 /Reanal/
3. K-Na-tartarát /Reanal/
4. CuSO_4 /Reanal/
5. Folin Ciocalteu phenolreagens /Merck/
6. Bovine-serum albumin /Reanal/

MÉRÉSI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Az előző fejezetben részletesen áttekintettük a kísérletsorozatunkban alkalmazott metodikákat, azok részfolyamatainak lépéseit, amelyekkel a mérendő plazma- és szövetminták hisztamin szintjeit; csak szövetek esetében a protein-koncentrációt és csak plazmára a hemoglobin értékeket meghatároztuk.

Ismertettük továbbá azokat a paramétereket, amelyekkel, vizsgálódásunk szempontjából legfontosabbaknak tartva őket; részletesen foglalkoztunk.

Az alábbiakban bemutatjuk azokat az eredményeket, amelyeket a hisztamin radioenzimatikus meghatározásának, illetve a hozzá szorosan kapcsolódó fenti módszerek kivitelezése során kaptunk; s összehasonlítjuk az irodalomban közölt hasonló vizsgálatok adataival.

Az inkubálás, az extrahálás és a liquid-scintillációs mérés kapcsán tanulmányozott és változtatott tényezők vizsgálatát 0...2 000 nmol/l koncentráció-tartományt átfogó hisztamin standard sorozattal valósítottuk meg oly módon, hogy Beaven 22/ által kidolgozott és ismertetett mennyiségeket, koncentrációkat vettük alapul /lsd. 10. táblázat/, amelyekből csak a vizsgált paraméter értékeit módosítottuk adott tartományon belül; az összes többi tényezőt változatlanul hagyva.

Az ily módon - átlagosan 3...5 ismételt méréssorozat alapján optimálisnak talált, részleteiben módosított metodikával valósítottuk meg helyi laboratóriumi körülmények között vér- és szövetminták sorozatos mérését.

Tulajdonképpen a radioenzimatikus módszert plazma hisztamin szintek meghatározására vezettük be; szövetekre csak a későbbi kutatások során alkalmaztuk; ami a reakció kivitelezésében nem, csak a szövetek szükséges előkezelésében vetett fel új problémákat, amit a fejezet végén ismertetünk.

I. A HISZTAMIN RADIOENZIMATIKUS MEGHATÁROZÁSÁNAK VIZSGÁLT PARAMÉTEREI

1. Az izolált enzimmel folytatott vizsgálatok eredményei

A patkány veséből - a metodikai részben ismertetett eljárás szerint - általunk izolált enzim Lowry /45/ módszerével meghatározott fehérje tartalma átlagosan 10,4 mg/ml volt; szemben a Shaff és Beaven /69/ által ugyanilyen módszerrel előállított preparátum 22 mg/ml -es protein-koncentrációjával /ld. 5. táblázat/.

Az eltérés feltehetően az állatok korával, súlyával, fajtájával; illetőleg a kivitelezés során alapvetően fontos homogenizálás hatásfokával értelmezhető.

Fenti okok miatt a szerzők szerint az egy izotópos eljárás enzimkémiai reakciójára optimálisnak talált 50-szeresen hígított enzim méréseink során hatástalannak bizonyult /12. ábra/.

A preparált enzim azon mennyiségének megállapítására, amellyel a vak értékek még nem növekednek meg jelentősen, de már a legnagyobb koncentrációju mintákra is kellő hatásokkal lejátszódik a reakció az inkubálás időtartama alatt; vizsgálatunkhoz minden esetben 10-10 μ l végső térfogatú enzimet mértünk be hígítatlan, illetve különböző mértékben hígított formában.

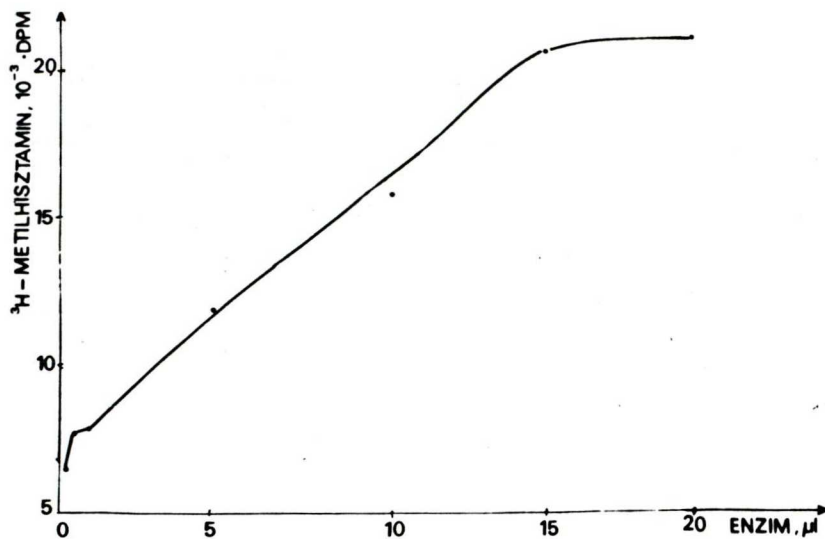
A mérések eredményeit, az egyes enzim mennyiségekkel kapott aktivitásokat /DPM/ a 11. táblázatban tüntetjük fel.

Külön táblázatban /12. táblázat/ szemléltetjük a kalibrációs tartomány felső határán, a 2 000 nmol/l koncentrációju hisztamin-standardra kapott aktivitások változását, későbbiekben preparált enzimmel kivitelezve.

11. táblázat

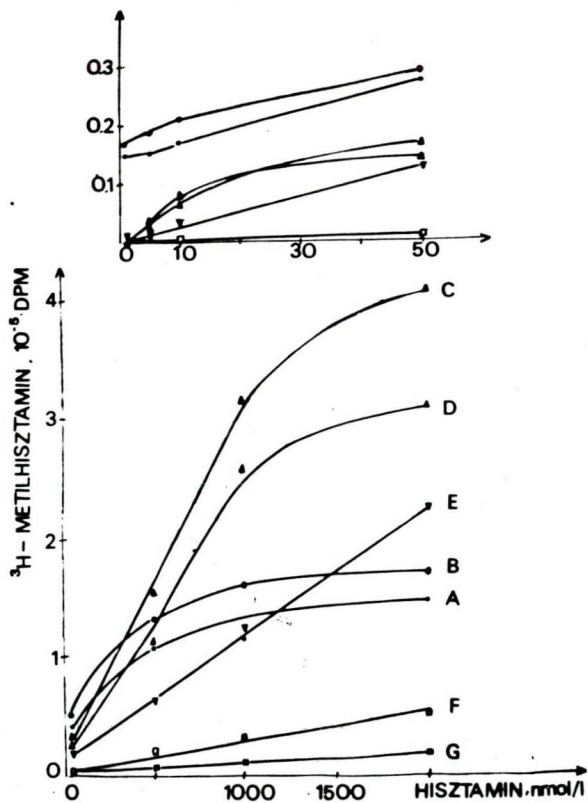
Az aktivitásértékek alakulása a patkányveséből izolált enzim mennyiségének változása következtében 0...2 000 nmol/l hisztamin koncentráció-tartományban

HISZTAMIN /nmol/l/	A B S Z O L U T			B E Ű T É S S Z Á M		/DPM/	
	E N Z I M M E N N Y I S É G						
	h i g i t a t l a n /µl/			h i g i t o t t / 10 µl/minta/			
	20	15	10	2x	10x	20x	25x
0,0	21 006	20 595	15 186	12 053	7 771	7 659	6 481
1,0	17 484	14 996	3 005	-	610	-	-
5,0	18 784	15 596	4 233	3 427	1 864	-	-
10	21 112	17 035	6 512	7 830	3 295	425	-
50	29 425	28 922	16 493	14 042	12 575	1 128	-
100	51 438	42 568	36 493	29 577	21 603	2 684	2 540
500	132 078	110 641	155 309	103 333	62 901	18 005	5 936
1000	161 429	111 665	316 627	252 277	123 779	31 170	11 689
2000	171 721	146 644	409 690	308 759	226 365	50 383	18 179



11. ábra

A vak értékek növekedése az enzim mennyiségének függvényében



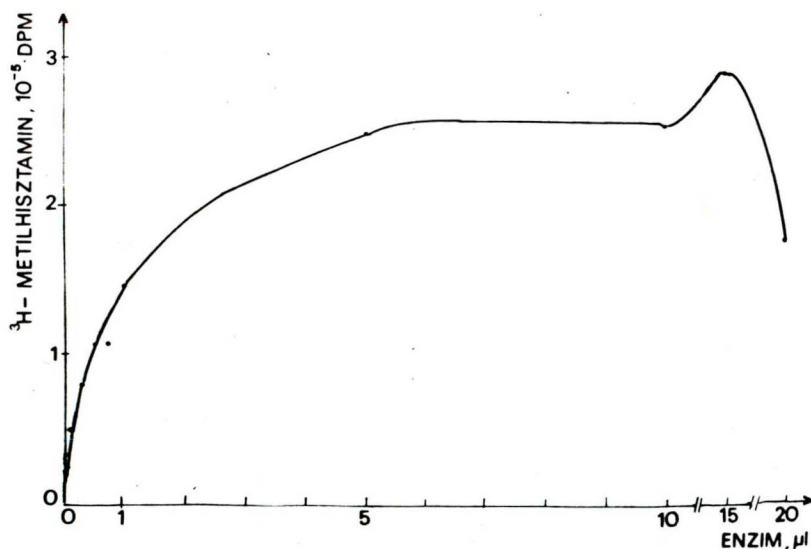
12. ábra

A standard minták DPM értékei különböző enzim-mennyiségeknél
20 μl /A/; 15 μl /B/;
10 μl /C/; 2x /D/;
10x /E/; 20x /F/;
25x /G/ higitott enzim

12. táblázat

A DPM értékek változása $2 \cdot 10^3$ mol/l hisztamin koncentráció-
nál különböző enzim mennyiség hatására

E N Z I M	A K T I V I T Á S /DPM/	
	M I N T A	B L A N K
Higitatlan / μ l/	—	—
20	178 026	20 817
15	293 291	15 365
10	256 560	16 560
Higitott /bemérés:10 μ l/		
2x	250 313	19 109
10x	146 510	5 975
15x	105 820	6 110
20x	107 402	4 619
25x	77 424	4 613
30x	51 606	4 400
50x	27 406	4 087



13. ábra

A DPM értékek változása az enzim-mennyiség függvényében
adott $2 \cdot 10^3$ mol/l/ hisztamin koncentrációnál

Az adatok közül külön értékeljük a változó enzim-mennyiségekkel kapott vak értékek és a standard sorozat értékeinek alakulását.

A rendszer enzimkoncentrációját növelve higitatlan enzimmel /10, 15, 20 μ l / extrém módon megnő a blank értéke /11. ábra/, ami jelentősen lecsökkenti az érzékenységet, ugyanis a standardok esetében igen alacsony /1...10 nmol/l/ tartományban irreálisan magas beütésszámok adódnak; míg nagy/1000...2000 nmol/l / hisztamin koncentrációknál az enzim fölös mennyisége nem elősegíti, hanem gátolja az enzímikémiai reakció lejátszódását, ami vagy telítési görbét eredményez,/12. ábra/; vagy mint a 12. táblázat ábrázolt adatai mutatják, maximum után csökkenés következik be az aktivitásokban /13. ábra/.

Irodalmi adatok szerint /18,22/ a blank minták aktivitásának tetemes megnövekedését okozhatják, többek között, a reakciótérbe bevitt, és a ^3H -SAM /111. dupla-izotópos módszernél ^{14}C -SAM is/ jelenlétében fokozottan aktiválódott enzim el nem reagált mennyiségének a fölös SAM-mal alkotott termékei, amelyek a jelölt metilhisztaminnal együtt akadálytalanul jutnak át az extrahálás folyamán a kloroformos fázisba.

Ezt bizonyítja az is, hogy tapasztalataink szerint az ilyen térfogatu enzimet tartalmazó mintákról a kloroform evaporálása után, az edény falán csapadékos kiválás marad vissza, ami a beütésszámok nem-lineáris alakítása mellett - mint a koktélban lévő idegen fázis - még a liquid-scintillációs mérés pontosságát is csökkenti.

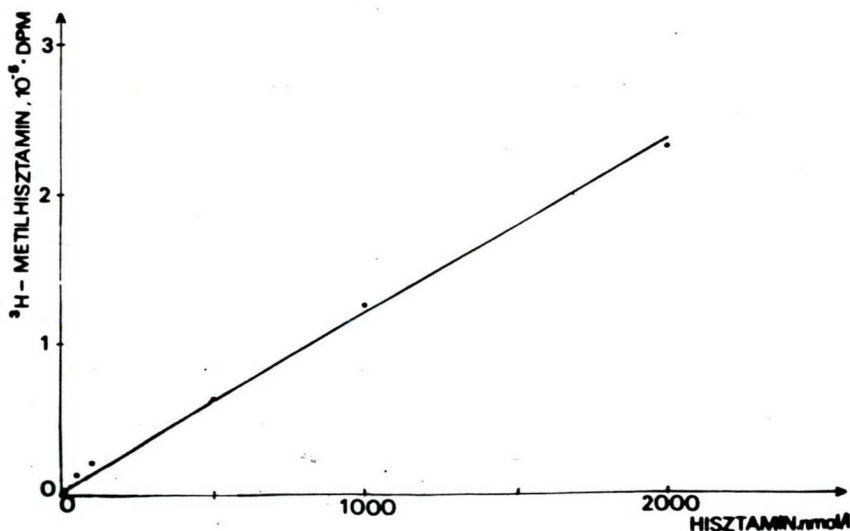
A 10 μ l higitatlan, illetve a különböző foku higitott enzimmel lejátszatott reakcióban, az eredmények szerint, a fent részletezett zavaró effektusok egyre kevésbé érvényesülnek, amit a vak értékek lényeges csökkenése, és az egyre nagyobb koncentráció-tartományban érvényesülő linearitás jelez.

Ugyanakkor 20-szoros és ennél nagyobb higitás már az enzim mennyiségét annyira lecsökkenti, hogy az aktivitások lényeg-

gesen viisszaszorulnak, ugyanakkor a vak értékek csak minimálisan változnak, ami azt eredményezi, hogy 1...50 nmol/l koncentráció tartományban nem lehetséges a hisztamin szintek kimutatása, mivel a standardokra kapott DPM értékek beleesnek a vakra kapott szórás tartományába. Magas koncentrációknál pedig az enzim mennyisége nem elegendő a reakció kvantitatív lejátszódásához.

Legalkalmasabbnak a 10-szeresen higitott preparátum bizonyult, ugyanis ekkor a reakcióelegy 1 μ l enzimet tartalmaz mintánként, ami megegyezik Shaff és Beaven /69/ által optimálisnak talált bemért mennyiséggel.

Bár ezen enzim-koncentrációnál a vizsgált koncentráció-tartomány felső határának környezetében a standardok aktivitásának értékei alatta maradnak a több enzimet tartalmazó minták értékeinek; mégis ezt a higitást kell ideálisnak tekintenünk, mert mind alacsony, mind pedig magas hisztamin szintek kimutatására alkalmas, linearitást mutat; ami a számolást nagymértékben megkönnyíti /14. ábra/.



14. ábra

A patkány veséből izolált, 10-szeresen higitott enzim jelenlétében felvett kalibrációs görbe



Másrészt pedig - mint már említettük -, a vak értékek növekedésének lehetséges okait vizsgálva, nem szükségszerűen reálisak a higitatlan enzim 10, 15, 20 μ l-nek jelenlétében kapott lényegesen nagyobb beütésszámok, ugyanis a reakcióterben lévő, részben az enzimmel, részben pedig a későbbiekben a plazma -, illetve szövetmintákkal bevitt igen magas fehérjemennyiség számos keresztreakciót adhat, ami részlegesen megakadályozhatja a hisztamin kvantitatív metilálódását.

2. A pufferkoncentráció csökkenésének hatása a mérés pontosságára

Mint minden enzimkémiai reakció, úgy a hisztamin metilálásának folyamata is igen szigorúan függ attól, hogy milyen közegben, milyen pH-n játszódik le, s milyen erős a pufferközeg stabilizáló hatása a reakcióelegyben. Ennek kapcsán először a pufferkoncentráció változtatásának hatását tekintjük át.

A hisztamin radioenzimatikus meghatározása során a kutatók nagyobb része a Na-foszfát pufferes közeget választja, mégpedig a puffer koncentrációját 0,1 mol/l értéknek véve.

McDonald /31/ folytatott vizsgálatokat arra vonatkozóan, hogyan változnak az aktivitások, ha ugyanazon mintát csökkenő pufferoltságú közegben reagáltatjuk; mégpedig a 7,9 pH-jú foszfát puffer töménységét 0,1; 0,05; 0,01 mol/l értéknek véve.

Eredményei szerint a koncentráció csökkenésével jelentősen megnő a mintára kapott beütésszám /lsd. 8.táblázat/, amit ő az enzimaktivitás fokozódásával értelmez.

Nem részletezi viszont, vajon a vak értékek hogyan alakulnak ilyen beavatkozás következtében.

Ennek eldöntése, illetve eredményeinek reprodukálása végett olyan kísérleteket folytattunk, amelyekben a pH 7,9 foszfát puffer koncentrációját 0,1; 0,01; 0,001 mol/l értéknek vettük, és lejátszottuk a reakciót pufferolatlan desztillált vizes közegben és fiziológiás sóoldatban is. Eredményeink - amelyeket a 13. táblázat foglal össze - megegyeznek McDonald adataival. Valóban, ahogyan csökken a puffer koncentrációja, úgy nő az aktivitások értéke adott hisztamin standard esetében; de csak egy bizonyos koncentrációig; attól kezdve alatta marad az erősebben pufferolt közeg értékeinek /15. ábra/. Ez a határ a mi körülményeink között 100 nmol/l hisztamin értéknek adódott, ahol a beütésszámok szinte teljesen megegyeznek:

0,1	mol/l foszfát pufferrel	: 68 797 DPM
0,01	mol/l foszfát pufferrel	: 68 037 DPM
0,001	mol/l foszfát pufferrel	: 67 401 DPM

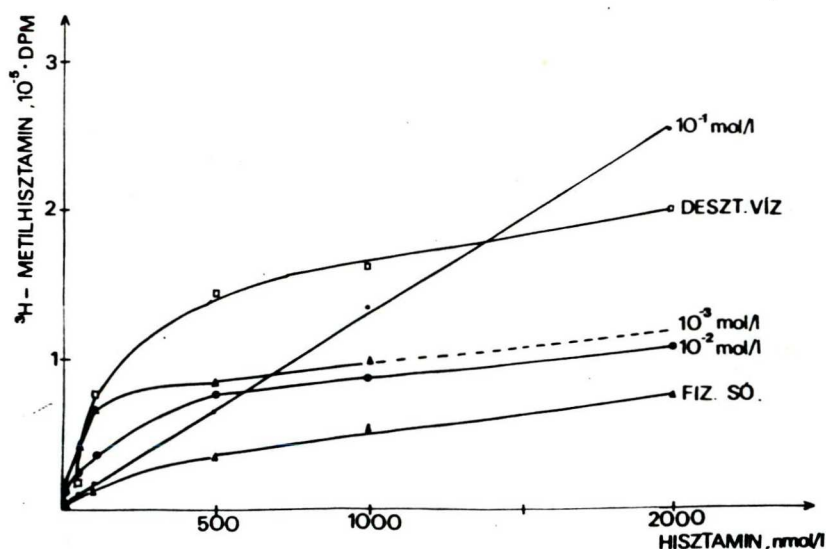
E fölötti tartományban viszont 0,01 és 0,001 mol/l puffer koncentrációnál már nem elegendő a közeg stabilizáló hatása a hisztamint tartalmazó rendszerek standard körülmények között történő tartásához /16. ábra/.

13. táblázat

A Na-foszfát puffer / pH = 7,9 / koncentrációjának hatása az enzimkémiai reakció lejátszódására

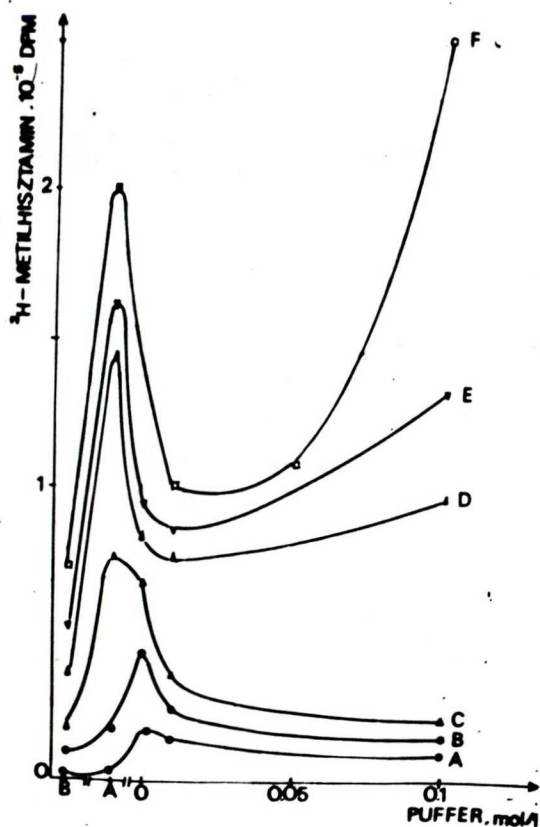
HISZTAMIN / nmol/l /	R E A K C I Ó K Ö Z E G				
	PUFFER	/nmol/l/			DESZT. VIZ
	0,1	0,01	0,001	FIZ.SÓ	
0,0	7 432"	13 753	14 398	15 572	19 178
1,0	1 220	3 492	1 006	-	-
5,0	2 459	7 789	6 021	-	-
10	9 362	13 955	16 724	1 887	-
50	14 459	24 387	43 310	10 610	18 132
100	20 797	35 957	67 410	16 911	76 597
500	96 325	76 278	83 627	36 129	114 576
1000	132 254	85 003	94 069	52 722	160 918
2000	253 428	108 622	-	72 593	201 534

" DPM értékek



15. ábra

Az aktivitás értékek változása a hisztamin koncentráció függvényében különböző minőségű pufferközegben



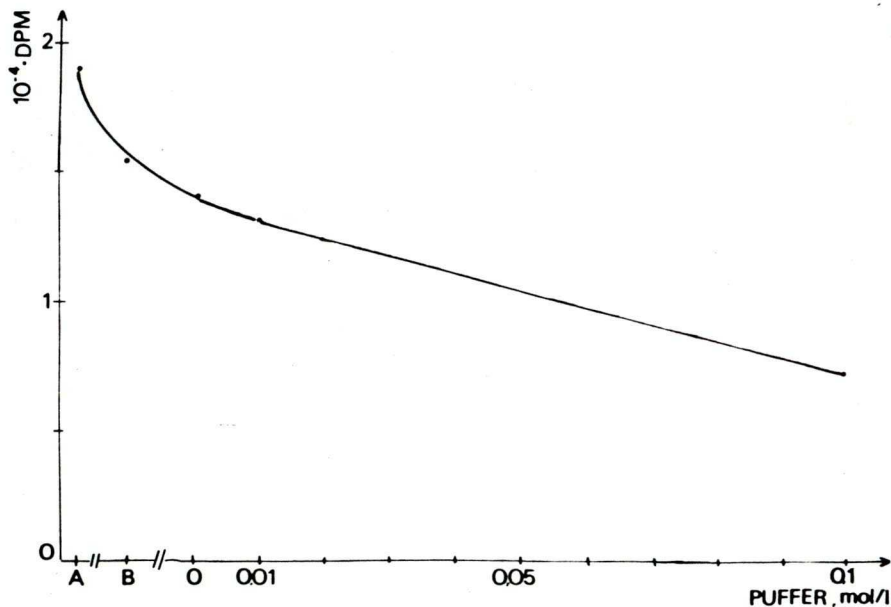
16. ábra

Az aktivitások alakulása különböző kémiai közegben
 hisztamin: 10 /A/;
 50 /B/; 100 /C/;
 500 /D/; 1000 /E/;
 2000 /F/ nmol/l

Fiziológiás só és desztillált víz esetén alacsony, 1...10 nmol/l hisztamin értékeknél egyáltalán nem tudtunk változást kimutatni, ugyanis puffer nélkül a módszer szenzitivitása jelentősen lecsökken.

A fiziológiás sóval végbemenő reakció aktivitásai végig alatta maradnak bármely más közegű, ugyanolyan hisztamin koncentrációra kapott beütésszámoknak; míg desztillált vízben a detektálás alsó határa / 50 nmol/l / fölötti mintákra ugrásszerűen megnövekedett, irreálisan magas aktivitásokat kapunk, aminek nyilvánvaló oka, hogy a rendszer az enzím-kémiai reakció kvantitatív lejátszódása szempontjából teljes mértékben instabil; sőt ezzel magyarázható a 0,1 mol/l foszfát puffernél kevesebb puffert tartalmazó reakcióelegyek részlegesen megnövekedett aktivitás értéke is.

Számottevően módosulnak a közeg ionerőssége változásának hatására a blank értékek is, mégpedig a pufferkoncentráció csökkenésével két-, sőt háromszorosára emelkednek /17.ábra/. Ez szintén arra utal, hogy kevésbé vagy egyáltalán nem puffertolt közegben a reakció lejátszódásában olyan zavaró, gátló tényezők és anyagok jutnak előtérbe, amelyek jelentősen lecsökkentik az inkubálási folyamat és az extrakció eredményességét.



17. ábra

A blank minták aktivitásainak változása a pufferközeg minőségétől függően; desztillált víz /A/, fiziológiás só /B/, foszfát puffer 0,1 , 0,01 , 0,001 mol/l

3. Különböző pH - értékeken végbemenő enzimkémiai reakció eredményessége

Nemcsak a puffer koncentrációja, hanem az optimális pH értékének eltolódása is oka lehet annak, hogy az enzimkémiai reakció nem a kívánt mértékben és módon játszódik le.

Irodalmi adatok szerint /16, 18, 22, 78/, a foszfát puffer optimális pH-ját a reakció kimenetele szempontjából 7,9 értéknek tekintik, azonban egyes szerzők /76/ véleménye, hogy 7,4 pH-ju pufferközegben is ugyanolyan eredményességgel megy végbe a hisztamin metilálódása.

Kísérleteink során az in vitro biológiai folyamatokra nézve igen széles, 7,0...8,2 pH-tartományban végeztük el a méréseket, mégpedig a 0,1 mol/l koncentrációju puffer pH-értékeit 7,0; 7,3; 7,6; 7,9; 8,2 értéknek vettük. Eredményeink alapján, különösen csökkenő pH-értékekre, a vak mintákra kapott aktivitások ugrásszerű emelkedése jelzi a termékek minőségi megváltozását és mennyiségi eltolódását az enzimkémiai reakcióban:

pH-értékek	:	8,2	7,9	7,6	7,3	7,0
DPM	:	6 585	4 638	12 377	13 764	19 267

A számadatok szerint, illetve grafikus ábrázolás alapján /18. ábra/ nyilvánvaló, hogy legelőnyösebb a 7,9 pH-n kivitelezett reakció; ami nemcsak a vak, hanem az egyes mintákra kapott aktivitásokból is kitűnik.

7,6...8,2 pH-tartományban a standardok beütésszámai a vizsgált koncentráció-tartomány felső határáig igen jó egyezést mutatnak /19. ábra/, a vak értékeitől eltekintve; míg az alacsonyabb / pH = 7,0; 7,3 / pH-kon a vakra kapott DPM további növekedése mellett megszűnik a hisztamin kvantitatív kinyerése, illetve csak 1000 nmol/l és annál magasabb koncentrációknál közelíti meg az előző mintákat, de azok értéke alatt marad.

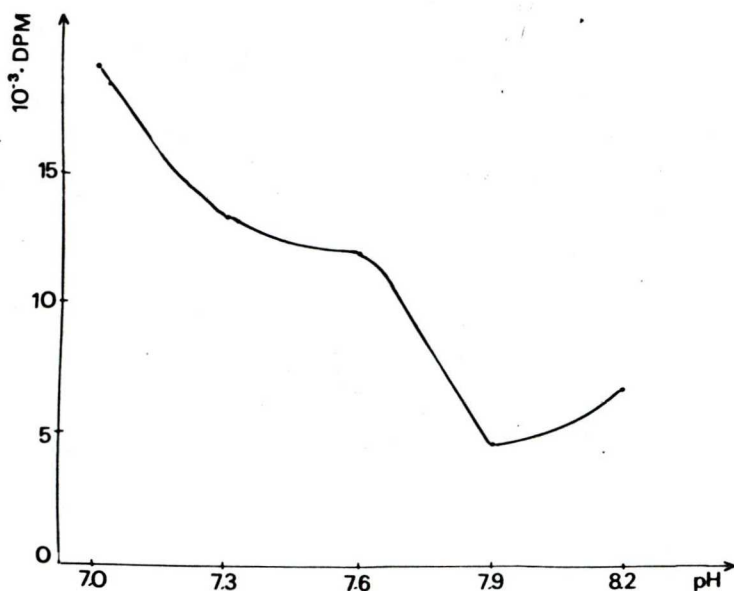
Ugyanakkor közel 50 nmol/l koncentrációig nem-specifikusan megy végbe az enzimkémiai reakció /14.táblázat/.

A pH=7,0 értéken lejátszódó folyamatra is hasonló jellemzők érvényesek alacsony hisztamin szinteknél; ugyanakkor magas koncentrációknál az aktivitások jóval a reális szint fölé ugranak; ami a reakcióelegyben lévő anyagok nyilvánvalóan más kémiai termékeinek megjelenésére utal.

14. táblázat

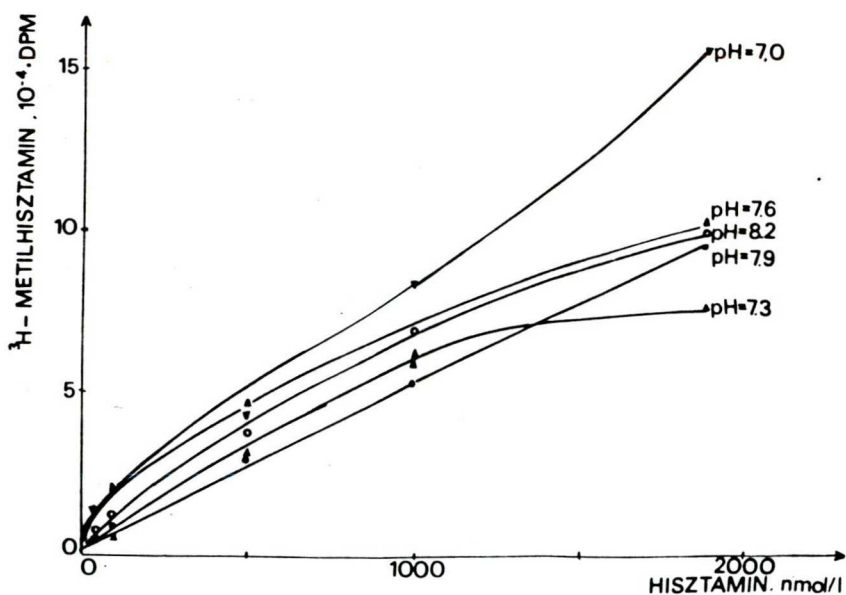
A 0,1 mol/l koncentrációju foszfát puffer
pH-változásának hatása a reakció kimenetelére

HISZTAMIN / nmol/l /	A K T I V I T Á S O K /DPM/				
	pH- é r t é k e k				
	8,2	7,9	7,6	7,3	7,0
0,0	6 585	4 638	12 377	13 764	19 267
1,0	2 367	1 524	3 918	3 362	4 888
5,0	6 973	3 761	6 782	4 150	5 547
10	6 722	5 505	4 565	6 411	6 138
50	7 412	7 997	6 524	5 216	12 111
100	11 659	9 877	20 802	10 549	17 331
500	36 595	29 253	46 491	29 186	43 939
1000	67 914	52 241	58 884	60 945	83 633
2000	100 315	94 889	101 019	76 147	157 315



18. ábra

A vak értékek változása a pH -függvényében



19. ábra

A 0,1 mol/l foszfát puffer különböző pH-értékein
kivitelezett enzímekémi reakció kalibrációs
görbéi

4. Különböző minőségű és összetételű pufferek alkalmazása az enzimkémiai reakcióban

A pufferközegre vonatkozó adatok és eredmények közül eddig a koncentráció és pH-kérdését érintettük.

A foszfát pufferen kívül Taylor /76/ és munkatársai vizsgáltak más közegben, konkrétan tris-albumin közegben lejátszódó hisztamin metilálási reakciót.

Kísérleteik során alkalmazott pufferek adatai:

<u>puffer</u>	<u>pH-érték</u>	<u>koncentráció</u> <u>/ mol/l /</u>
Na-foszfát	7,9	0,1
tris-albumin	7,4	0,025

Emellett a tris-albumin puffer tartalmazott még 0,12 mol/l NaCl-, 0,005 mol/l KCl-, $6 \cdot 10^{-4}$ mol/l $MgCl_2$ -ot és Bovine-serum albumint 0,30mg/100 ml koncentrációban.

Az irodalmi részben bemutattuk a két pufferrel kivitelezett reakció összehasonlító ábráját /8. ábra/, amelyen látható, hogy alacsony hisztamin szinteknél nincs; de magas koncentrációknál már lényeges aktivitásbeli különbség van a két közeg között a foszfát puffer javára.

Ez a puffer pH-ra vonatkozó vizsgálataink alapján nemcsak a puffer minőségével, hanem 7,4 pH-értékével is értelmezhető /ld. 14.táblázat/.

Az általuk leírt /76/ tris-puffert komponenseiből összeállítottuk, s a méréseket paralell módon valósítottuk meg úgy, hogy ugyanazon koncentrációjú standardokat reagáltattunk a két eltérő minőségű közegben.

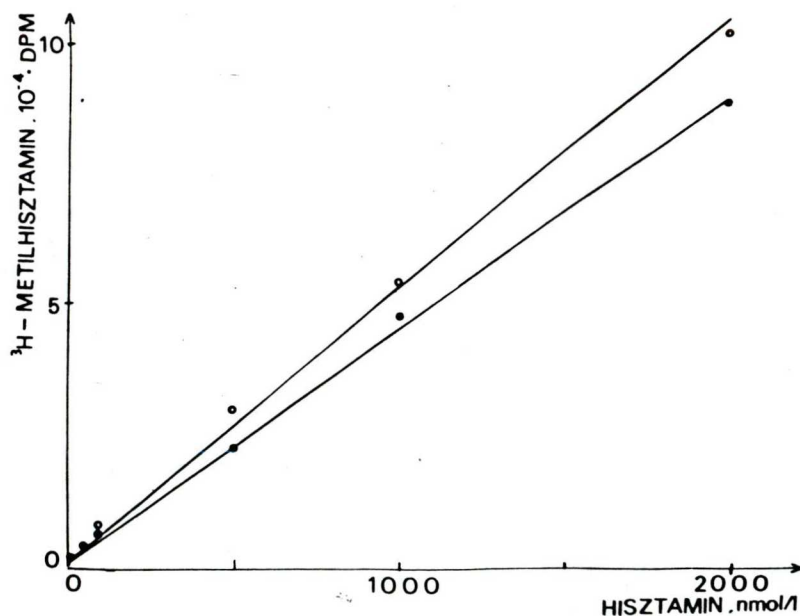
A kapott eredmények /15.táblázat és 20. ábra/ meg-egyeznek fenti szerzők adataival, vagyis a foszfát puffer reakcióközegű enzimkémiai folyamat termékeinek aktivitásai átlagosan nagyobbak az egész koncentráció-tartományban; emellett a vak mintára kapott érték pedig jóval alacsonyabb, mint tris-albumin puffer esetén.



15. táblázat

Foszfát pufferben / 0,1 mol/l, pH= 7,9 / és tris-albumin pufferben / 0,025 mol/l, pH=7,4 / végbemenő enzimkémiai reakciók közti különbségek

HISZTAMIN / nmol/l /	A K T I V I T Á S O K /DPM/	
	FOSZFÁT PUFFER	TRIS PUFFER
0,0	6 385	8 896
1,0	1 542	1 741
5,0	2 582	3 089
10	3 409	3 959
50	6 025	6 234
100	12 293	11 292
500	36 769	25 666
1000	55 607	48 734
2000	105 747	92 717



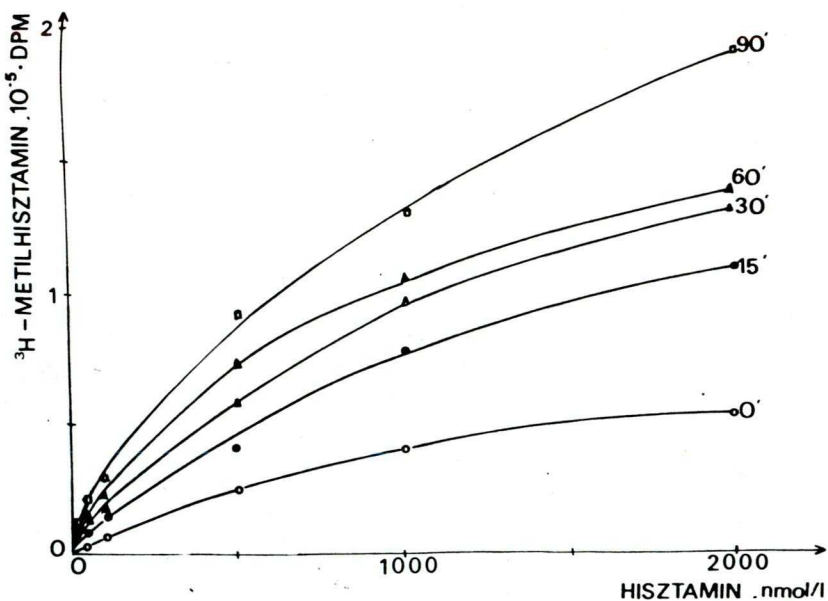
20. ábra

Különböző pufferközegben kivitelezett enzimkémiai reakció DPM értékei ; foszfát puffer /O/, tris-albumin puffer /●/

16. táblázat

Az enzimekémiai reakcióban keletkezett aktív metil-hisztamin DPM értékeinek változása az inkubálás időtartamával

HISZTAMIN / nmol/l/	A K T I V I T Á S /DPM/				
	INKUBÁLÁS IDŐTARTAMA /perc/				
	0	15	30	60	90
0,0	4 429	5 366	5 755	6 856	7 882
1,0	697	2 331	3 163	4 098	4 499
5,0	852	3 815	4 678	5 030	5 919
10	2 098	4 360	6 594	7 768	10 939
50	3 068	11 483	12 730	13 709	17 057
100	6 229	18 571	18 049	20 868	29 914
500	25 687	32 645	55 141	71 345	91 044
1000	40 860	78 086	95 405	105 212	128 356
2000	48 521	109 848	131 196	138 961	190 611

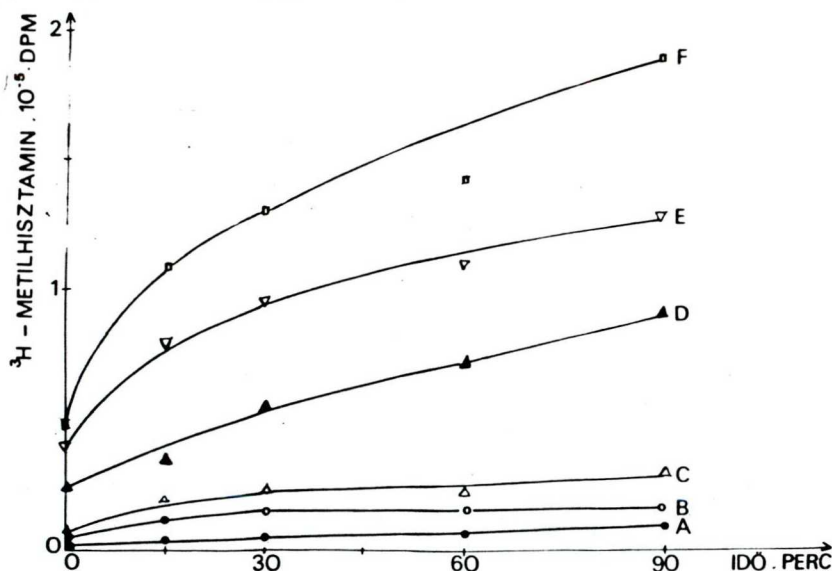


21. ábra

Az aktivitás értékek változása a hisztamin koncentráció függvényében konstans inkubálási /310 K/ időknél

60 perces reakcióidő alatt a kiindulási hisztamin mennyiségnek már mintegy 80 %-a metilhisztaminná alakul. Ez alapján érthetővé válik, hogy néhány szerző /76, 78/ megelégszik 310 K-en 60 percig tartó inkubálással; sőt Subramanian /74/ csak 15 perces reakcióidővel dolgozik, ami pedig csak átlagosan 55 %-os konvertálódást eredményez. A kutatók többsége azonban a 90 perces metilálás mellett döntött, mely idő alatt az enzimekémiai folyamat szinte teljes mértékben lejátsszódik.

A 21. és 22. ábrán szemléltetjük az aktivitások változását konstans időtartamoknál a hisztamin koncentráció; illetve adott hisztamin értékeknél az idő függvényében. Mindkét görbe telítési jellegű, ami megegyezik Beaven /18/ által leírtakkal; másrészt bizonyítékkul szolgál arra, hogy a hisztamin enzimekémiai reakciója, melynek során metilhisztaminná alakul át, a reakcióidő növekedésével egyre csökkenő reakciósebességgel éri el a végső, szinte egyensúlyi átalakulási százaléknak tekinthető termék-koncentrációt.



22. ábra

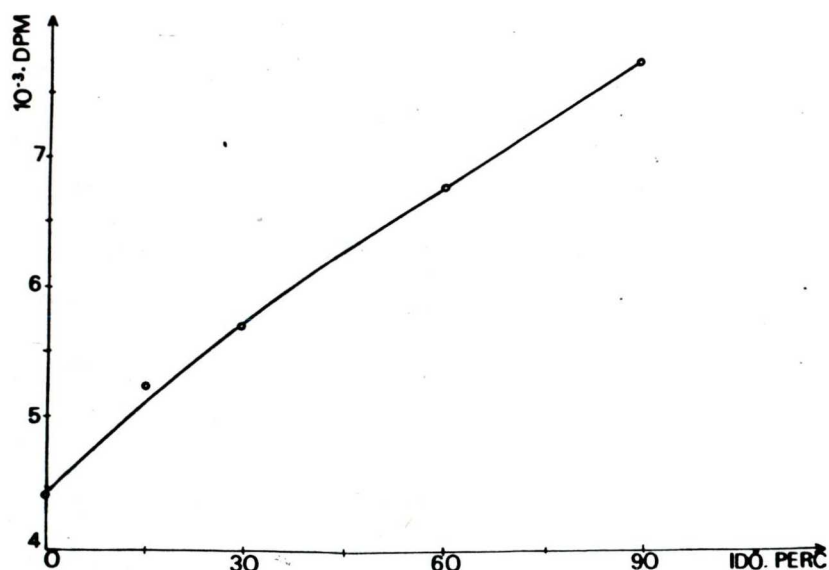
A DPM értékek növekedése az inkubálás időtartamával konstans hisztamin koncentrációknál ; 10 /A/, 50 /B/, 100 /C/, 500 /D/ 1000 /E/, 2000 /F/ nmol/l

Nemcsak a standard, hanem a vak minták aktivitás-növekedésének görbéje is hasonló lefutást mutat /23. ábra/; és a 90 perces inkubálási időnél kapott érték /7880 DPM/ százalékában kifejezve az alábbi eloszlást mutatja:

Idő /perc/	:	0	15	30	60	90
Aktivitás /DPM/	:	4 429	5 366	5 755	6 856	7 882
Átalakulás/%/	:	56	68	73	87	100

A minták 0 perces reakcióidejéhez tartozó átlagos 21,6 %-os hisztamin átalakulás a blank értékekre több mint 50 %, s az idő függvényében éppen emiatt lényegesen kisebb mértékben emelkedik.

A növekedés oka, irodalmi adatok szerint /18,22,31/, hogy a reakcióelegyben lévő, általában fehérje természetű anyagok a főlős mennyiségű ^3H -SAM-mal olyan jelölt reakcióterméket alkotnak, amely az extrahált szerves fázisba jutva az aktivitást kisebb-nagyobb mértékben megnöveli.



23. ábra

A blank minta aktivitás értékeinek változása a reakcióidő függvényében

6. A reakcióelegybe bevitt inaktív hordozó metilhisztamin hatása

Beaven /18/ és Murray /52/ részletesen elemzik az inkubálás végén a reakciótérbe bevitt inaktív hordozó metilhisztamin szükségességét, mely kétféle módon segíti elő az aktív metilhisztamin kvantitatív kinyerésének további lépéseit.

Egyrészt - főlős mennyiségben lévén - megkönnyíti a kloroformos fázisba történő extrahálás lehetséges maximális hatásfokának elérését; másrészt pedig megakadályozza a jelölt metilhisztamin üvegfelülethez való adszorpcióját. Ez utóbbival munkánk során nem kellett számolnunk, mivel a kísérleteket polipropilén csövekben végeztük, amelynek felületén adszorpció nem jön létre.

Az egész metodika folyamán egyetlen üvegfelülettel érintkezik az anyagunk, mégpedig a liquid-scintillációs méréshez használt küvettában. Az erre vonatkozó kísérleteinket a későbbiekben ismertetjük.

Térjünk vissza a carrier-ként hozzáadott inaktív metilhisztamin fontosságára. Kísérletsorozatunkban ugyanolyan reakciókörülményeknek kitett mintákhoz az inkubálás végén különböző mennyiségben bevitt hordozóval kapott eredményeket a 17. táblázatban foglaljuk össze, melynek adatai alapján megállapíthatjuk, hogy alacsony hisztamin koncentráció-tartományban / 1...5 nmol/l / sem a túl kis /0...25 µl/, sem a túl nagy /100 µl/ térfogatú hordozó metilhisztamin nem hatásos, ugyanis első esetben nincs elegendő mennyiségben jelen az aktív metilhisztamin extrahálásának elősegítéséhez, míg az utóbbi esetben az optimális fölöött lévő mennyisége viasszaszorítja a kis koncentrációjú minták aktív termékének kinyerését.

A vizsgált hisztamin tartomány további standardjaira kapott aktivitásokat szemlélve, a következő megállapításokat tehetjük:

Inaktív metilhisztamin nélkül és 25 µl hordozó hatására, ugyanazon minták beütésszámai 5...10 nmol/l hisztamin koncentráció-tartományban nem-lineáris módon változnak; ez alatti hisztamin értékek pedig egyáltalán nem mutathatók ki.

Magasabb koncentrációjú standardokra a metilhisztaminnal nem kezelt minták aktivitásai átlagosan kisebbek a hordozót tartalmazókéknál; a koncentráció-tartomány felső határánál pedig ugyanugy nem érvényesül a linearitás, mint alacsony hisztamin szinteknél.

25 µl inaktív hordozó jelenlétében közepes értékeknél a nagyobb mennyiségben /50, 75 µl/ hozzáadott mintákéval közel azonos DPM értékeket kapunk, azonban 500 nmol/l fölötti hisztamin szintekre a hordozó mennyisége nem elegendő /24. ábra/.

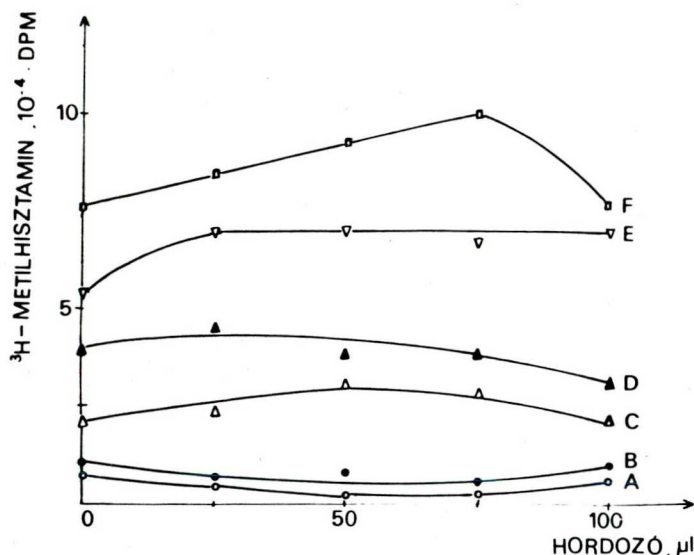
Optimálisnak tekinthető az 50 és 75 µl -ben bevitt metilhisztamin tartalom /17. táblázat/, ugyanis a két sorozat értékei nem különböznek számottevően egymástól, és a magas hisztamin szinteknél is lineáris összefüggést adnak.

További munkánkban az 50 µl térfogatot választottuk, amivel már kellő mértékben biztosított az aktív termék kinyerése; ugyanakkor a vak értéke szignifikánsan alacsonyabb a többi esethez képest:

Hordozó /µl/	:	0	25	50	75	100
Aktivitás /DPM/	:	13 666	7 130	6 268	11 764	14 985

A vak értékek ilyen jellegű változása nemcsak a hordozó jelenlétére vagy hiányára vezethető vissza /24. ábra/, hanem oka lehet a 0,8 mol/l HClO_4 -ben oldott hordozó savas közegének hatása is.

Irodalmi adatok szerint [18, 22] a perklórsavval leállított reakció megakadályozza az inkubálás során képződő azon nem-ionos, nem-illékony radioaktív anyagnak a kloroformos fázisba jutását, amely a metilhisztaminhoz hasonló megoszlási faktort mutat a két /vizes- szerves/ fázis között; és amely jelentősen megnöveli a vak értékét. Tulajdonképpen mi összevontuk a két bevitt reagenst, ugyanis az inkubálás végén az 5 mol/l NaOH hozzáadása előtt, a reakciótérbe adagolt hordozó metilhisztamin egyrészt előnyösen befolyásolja az extrahálás kimenetelét, másrészt pedig egyuttal biztosítja az inkubálás perklórsavval történő leállítását. Ennek hiányával magyarázható a hordozót nem tartalmazó sorozat igen magas blank értéke.



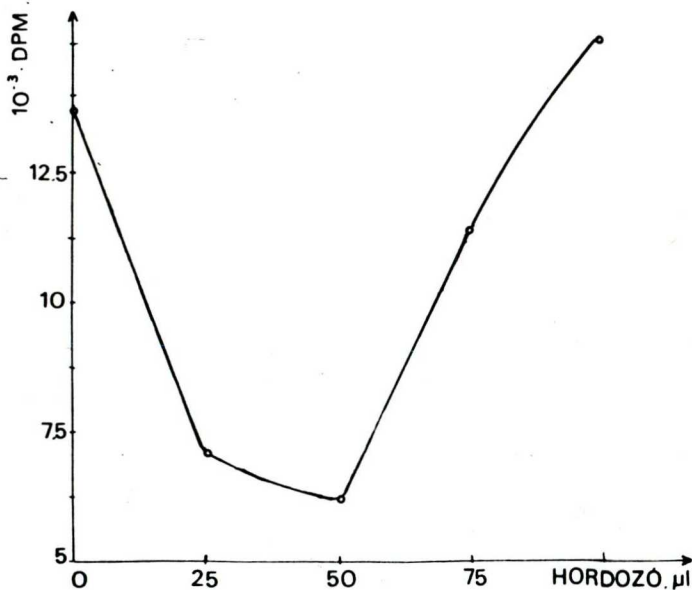
24. ábra

A DPM értékek alakulása különböző inaktív hordozó-mennyiség függvényében konstans histamin szinteknél; 10 /A/, 50 /B/, 100 /C/, 500 /D/, 1000 /E/, 2000 /F/ nmol/l hisztamin koncentráció

17. táblázat

Különböző hordozó metilhisztamin térfogatot tartalmazó reakció-elegyekkel kapott aktivitás értékek

HISZTAMIN	A K T I V I T Á S				/DPM/
/nmol/l/	INAKTIV		METILHISZTAMIN		/μl/
	0	25	50	75	100
0,0	13 666	7 130	6 268	11 764	14 985
1,0	-	-	1 961	2 156	-
5,0	-	5 401	2 459	3 226	6 972
10	10 308	7 286	6 362	6 377	9 968
50	22 239	22 803	29 539	27 435	22 854
100	40 128	44 283	35 323	36 009	32 184
500	54 484	69 507	69 813	66 614	70 545
1000	75 094	84 045	93 703	101 480	79 071



25. ábra

A vak értékek változása az inaktív hordozó metilhisztamin térfogatának függvényében



7. A vak értékek csökkentésére irányuló kísérletek

Az előző hat pontban áttekintettük azokkal a paraméterekkel folytatott vizsgálatainkat, amelyeket fontosnak tartottunk a reakcióelegy 310 K-en történő inkubálás hatásfokának, illetve az enzimkéimiai reakció kvantitatív végbemenetelének szempontjából.

Minden részletnél kitértünk a vizsgált tényezőnek a vak értékek alakulására kifejtett hatására; és nemcsak a standard sorozatra kapott eredményeket, hanem a blank mintára adódó aktivitásokat is ugyanolyan jelentőségűnek tekintettük az optimális mennyiség, idő, ... megállapításához /ld. 11,17,18,23,25. ábra/.

Fentieken kívül az alábbiakban bemutatunk még néhány olyan egyedi mérést, illetve méréssorozatot, amelyek kifejezetten ennek tanulmányozására szolgálnak.

Kísérleteink egy részében az inkubálás befejezése után, az inaktív hordozó metilhisztamin hozzáadása előtt, a blank és a 2500 nmol/l hisztamin koncentrációjú mintákat 100...100 µl különböző koncentrációjú perklórsavval kezeltük.

Tapasztalataink szerint a vak értékek ennek hatására nem változtak szignifikánsan, ugyanakkor a hisztamin standardra növekvő savkoncentrációval, egyébként azonos körülményeknek alávetett minták beütésszáma a kezeletlenhez képest mintegy a felére csökkent. Ugyanis a reakcióelegy kémhatásának fokozatos eltolódását a savas pH-értékek felé a szintén perklórsavban oldott hordozó metilhisztamin még inkább fokozza, amit a következő metodikai lépést jelentő 5 mol/l NaOH-os kezelés csak kisebb-nagyobb mértékben tud kompenzálni.

Feltehetően ez okozza az aktivitás értékek ilyen jelentős csökkenését, ugyanis a hisztamin a vizes fázisból kvantitatív módon csak lúgos közegben extrahálódik a szerves fázisba.

18. táblázat

A vak értékek és adott koncentrációjú /2 500 nmol/l/ hisztamin aktivitás értékeinek megváltozása az inkubálást követő perklórsavas kezelés hatására

HClO ₄ /mol/l/	A K T I V I T Á S /DPM/	
	VAK MINTA	HISZTAMIN STANDARD
0,0	5 233	212 976
0,4	6 072	126 321
1,0	5 622	198 835
2,0	5 975	177 611
4,0	5 644	154 953
7,0	5 324	105 354

A következőkben különféleképpen előkezelt vak mintákkal próbálkoztunk, mégpedig: enzim nélküli vak; reagensvak; fordított vak, ami az előbbitől annyiban különbözik, hogy az inkubálás végén 20 µl vizsgálandó mintát adunk a vakhoz, s a reakciót azonnal leállítjuk.

Ezen kívül inaktivált enzimet vagy plazmát, és inaktivált enzimet és plazmát tartalmazó vak mintákat is reagáltattunk. Az inaktiválás 333...343 K-en 5 percig tartó vízfürdőt jelentett.

A mérések eredményeit a 19. táblázat tartalmazza. Az adatok azt mutatják, hogy a reagens-és fordított-vak között nincs különbség. Érthető módon az enzim nélküli mintára az aktivitás lecsökken - esetünkben kb. 50 %-kal -, ami arra utal, hogy a blank beütésszámának körülbelül a fele az enzim komponenseiből; míg másik fele az aktiv metil donort tartalmazó ³H-SAM-ból tevődik össze.

Említésre méltó, hogy az inaktivált, egyuttal deproteinizált enzim - ^3H -SAM keverékével lefolytatott reakcióban lényeges emelkedés /10 344 DPM/ tapasztalható. Ugyanerre a szintre ugrik meg az aktivitás /9 292 DPM/, ha emellett még az enzimreakció végén hozzáadott plazmai is inaktivált. A bekövetkező növekedést mégsem a plazma okozza - hanem az enzim - SAM inaktiválódás -, ugyanis kezeletlen enzimet és inaktivált plazmát tartalmazó vak mintákra a reagens-vakkal megegyező aktivitások adódnak.

19. táblázat
Különböző összetételű blank minták aktivitásának
összehasonlítása

M I N T A	AKTIVITÁS /DPM/
Reagens-vak	7 816
Fordított-vak	7 808
Enzim nélküli vak	3 331
Inaktivált plazmával	7 828
Inaktivált enzimmel	10 344
Inaktivált enzimmel és plazmával	9 292

Röviden összefoglalva az eddigieket, megállapíthatjuk, hogy a hisztamin enzimekémiai reakciójában szerepet játszó komponensek optimális megválasztása mellett igen fontos a vak értékek minimalizálása, ugyanis ez nagymértékben növeli a módszer érzékenységét, ugyanakkor a zavaró effektusok megszüntetése nagymértékben lecsökkenti a kimutatható hisztamin szint alsó határát, ami főleg vérminták esetében rendkívül fontos a reális és meglehetősen alacsony hisztamin tartalom megállapításához.

8. A kloroformos extrahálás idejétől való függés vizsgálata

Az inkubálást követő, nem kevésbé fontos metodikai lépés az enzimekémiai reakcióban keletkezett aktív termék kinyerése, amihez az irodalmi adatokat követve /22/, extrahálószerként 4 ml kloroformot választottunk.

Viszont nem állnak rendelkezésünkre eredmények arról, vajon az extrahálási idő befolyásolja-e és milyen módon a szerves fázisba jutott termék mennyiségét; ezért kísérleteinkben ugyanazon standard sorozatot különböző ideig vortexeztük /0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 percig/, ahol a 0 perc csak kézi rázást jelent.

A folyadék scintillációs mérések eredményeit egymással összehasonlítva 20. táblázatunkban foglaljuk össze.

Alacsony, 1...10 nmol/l hisztamin koncentrációknál már a rövid /0; 0,5; 1,0 perc/ extrahálási idő is elegendő ahhoz, hogy az aktív metilált termék az extrahálási faktornak megfelelő megoszlást mutasson a két fázis között; míg ennél magasabb hisztamin szinteknél legalább 2,0 perces vortexezésre van szükség ahhoz, hogy a metil-hisztamint kvantitatív mennyiségben kinyerjük.

20. táblázat

A vortexezés időtartamának hatása a kloroformos
fázisba extrahált metilhisztaminra

HISZTAMIN / nmol/l/	A K T I V I T Á S /DPM/					
	EXTRAHÁLÁSI IDŐ /perc/					
	0	0,5	1,0	2,0	3,0	5,0
5,0	1 496	2 338	1 040	2 070	2 130	4 226
10	5 120	2 507	2 056	3 168	2 576	13 278
50	10 716	9 479	8 580	12 884	21 136	18 594
100	13 579	15 569	12 914	32 885	32 523	20 557
500	52 503	53 997	51 476	70 628	95 737	88 107
1000	71 212	76 985	72 428	85 756	117 433	113 911
2000	97 407	99 887	106 545	114 850	143 441	130 627

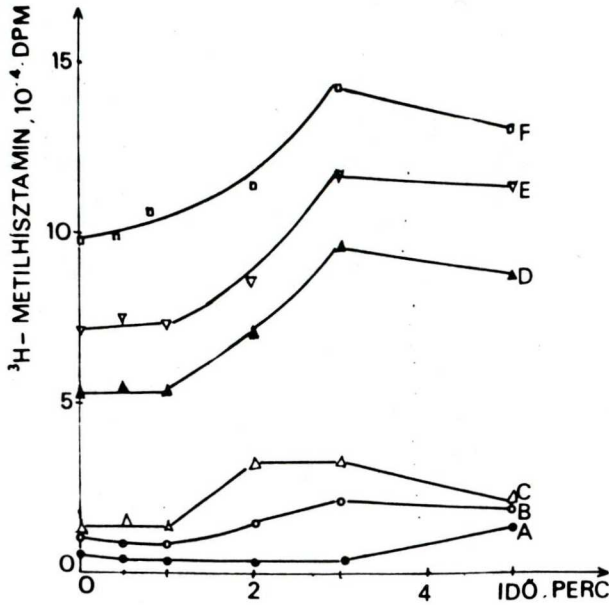
Ezen minták mindegyike tartalmazott inaktív hordozó metilhisztamint, ami irodalmi adatok /18,52/ és saját tapasztalataink alapján is megkönnyíti a kloroformos fázisba való átjutást.

Érdekes, hogy az 5 perces extrahálási idő magasabb hisztamin szinteknél / 1000...2000 nmol/l / visszaszorítja az aktív termék kinyerését, vagyis ebben a tartományban az idő függvényében ábrázolt beütésszámokra - adott hisztamin koncentrációknál - lefelé hajló görbét kapunk /26.ábra/.

A 27. ábrán feltüntetett aktivitások hisztamin-függése alapján a 2 perces extrahálási időt választottuk további kísérleteinkhez, amelynél már a vizsgált koncentráció-tartomány felső határán is megfelelő beütésszámokat kapunk; és kivitelezés szempontjából is viszonylag könnyen megoldható.

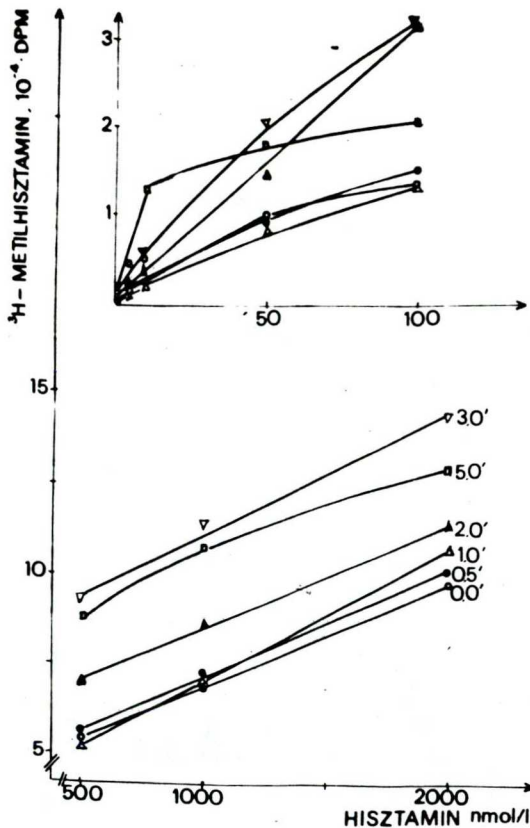
26. ábra

A DPM értékek alakulása az extrahálási idő függvényében; 10 /A/, 50 /B/, 100 /C/, 500 /D/, 1000 /E/, 2000 /F/ nmol/l hisztamin koncentrációnál



27. ábra

A DPM értékek alakulása a hisztamin koncentráció függvényében adott extrahálási időnél



Az optimális extrahálási idő megállapításakor itt sem hanyagolható el a vak értékek változásának figyelembevétele. Bár nagy különbség az egyes számadatok között nincs, kivéve az 5 perces időtartamot /21. táblázat/, ahol az előbbiekhöz képest szignifikáns emelkedés mutatható ki.

21. táblázat

A vak minták beütésszámainak változása az extrahálás időtartamával

HISZTAMIN /nmol/l/	A K T I V I T Á S					/DPM/
	E X T R A H Á L Á S I		I D Ő		/perc/	
	0	0,5	1,0	2,0	3,0	5,0
0,0	10 612	9 572	10 405	9 361	12 039	16 971

A blank minták közel azonos aktivitás értéke arra utal, hogy a zavaró anyagok átjutása a szerves fázisba pillanatok alatt lejátszódik, amit az aktív metilhisztamin növekvő mennyiségének extrahálódása sem szorít vissza.

Ezzel kapcsolatosan próbálkoztunk előzetesen vízzel telített kloroform - mint extrahálószer - használatával. Fizikai-kémiai adatok szerint a kloroform vízzel való elegyedése $0,5507 \text{ cm}^3 / 100 \text{ cm}^3$ viz. Mivel extrahálásunk körülményei között a szerves-vizes fázis aránya 8:1, ami irodalmi eredmények /18/ alapján optimális arány a termék kinyerése szempontjából.

Mégis számolnunk kell azzal, hogy a vizes fázis kisebb-nagyobb térfogata telíti a kloroformos fázist, és az inkubálás során keletkezett aktív és inaktív anyagok is így módon a szerves fázisba jutnak, s onnan centrifugálással sem távolíthatók el.

Ez részben magyarázata lehet a hosszú, ötperces extrahálási időre magas hisztamin szinteknél kapott csökkenő beütésszámoknak is. Erre vonatkozó kísérleteink során azonban szignifikáns különbséget a vizet tartalmazó és vízmentes kloroform között kimutatni nem tudtunk.

Mivel az extrahálást követő lépés a kloroform adott térfogatának /3 ml/ levegőáramban történő lefuvatása, ami ilyen nagymennyiségű szerves anyag esetén rendkívül időigényes; megpróbáltuk az extrahálószernek felére csökkenteni. Azonban azt tapasztaltuk, hogy ez a térfogat nem elegendő az aktív metilhisztamin kinyerésére, ugyanis következetesen alacsonyabb aktivitás értékeket kaptunk, az érzékenység pedig lecsökkent. Erre vonatkozó eredményeinket a 22. táblázatban és 28. ábrán mutatjuk be.

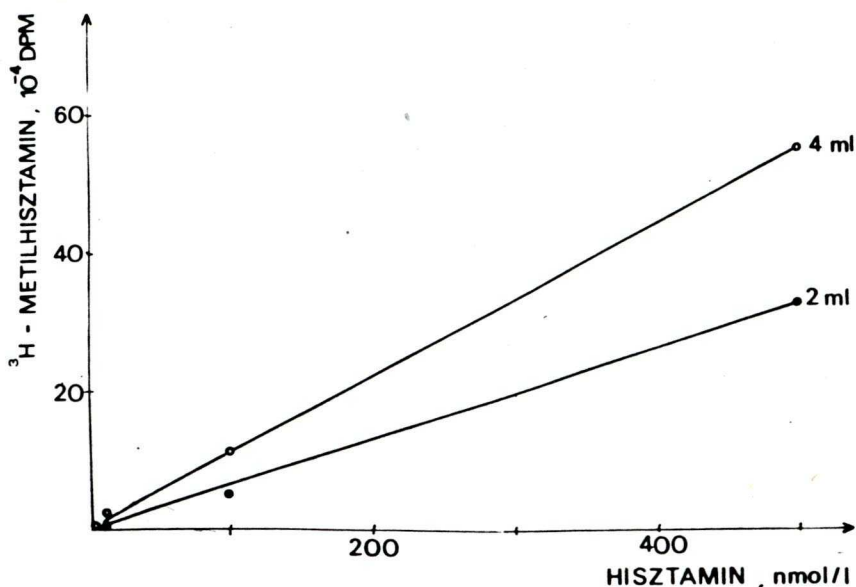
22. táblázat

A kloroform mennyiségének hatása az extrahált aktív termék beütésszámainak változására

HISZTAMIN /nmol/l/	A K T I V I T Á S		/DPM/ /ml/
	K	L O R O F O R M	
	4,0	2,0	
0,0	7 386	9 406	
1,0	1 142	-	
10	3 409	1 955	
100	10 903	4 508	
500	55 862	33 975	

28. ábra

Különböző térfogatu kloroformmal extrahált minták
aktivitásának változása



Már érintőlegesen utaltunk a szerves fázisba került aktiv termék további kezelésére, vagyis a nátrium-hidroxid-dal történő kétszeri mosás és centrifugálás után a 3 ml kloroform lefuvatására. Erre azért van szükség, mert ezen anyag a folyadék-szcintillációs mérésnél már kis mennyiségben is quench-hatást fejt ki, és emiatt az aktivitások igen rossz hatásfokkal vagy egyáltalán nem detektálhatók. Azonban az evaporálás hosszadalmas és nehézkes művelet; illetve számolnunk kell azzal, hogy ebben a lépésben az aktivitások egy része elvész, amit azonban hordozó metilhisztamin hozzáadásával és kb. csak 10...15 percig tartó kloroform lefuvatással szinte teljes mértékben megakadályozhatunk.

A rendelkezésünkre álló irodalmak szerzőinek egy része ezt a műveletet indifferens N_2 -gázzal, más része pedig levegőárammal végzi.



Mivel laboratóriumunkban a nitrogéngáz csak palackokban állt rendelkezésünkre, az egyre növekvő számú minta pedig jelentős mennyiségű nitrogént igényelt; próbálkoztunk a levegővel való elpárologtatással, amit egyszerűen hajszáritó hideg légáramával valósítottunk meg elszívó fülke alatt. Azt tapasztaltuk, hogy a két megvalósítás között lényeges eltérés nincs /23. táblázat/. Így a továbbiakban a kényelmesebben és főleg gyorsabban kivitelezhető levegőárammal történő kloroform-evaporálás mellett döntöttünk.

23. táblázat

A nitrogén- és levegőárammal elpárologtatott minták aktivitás értékeinek összehasonlítása

HISZTAMIN /nmol/l/	N I T R O G É N	L E V E G Ő
5,0	2 411 ^x	4 597
10,0	4 053	8 152
50	10 237	15 506
100	24 693	22 979
500	72 970	71 860
1000	76 771	78 735
2000	128 366	126 496

x DPM értékek

9. Egyéb szerves extrahálószeres alkalmazásának lehetősége

Az extrahálást követő kloroform elpárologtatás esetleges kiküszöbölése céljából, megpróbáltunk más lehetséges, és a kloroformhoz hasonlóan hatásos oldószert keresni az aktív termék kinyeréséhez.

A legkézenfekvőbb lett volna a liquid-stintillációs koktél toluol-alapanyagának alkalmazása, hiszen ebben az esetben az extrahált minta minden egyéb beavatkozás nélkül közvetlenül mérhető lett volna. Azonban a toluol nagy - 5 és 10 ml - térfogata sem volt megfelelő erre a célra, vele ugyanis a vak értékek és a hisztamin standardokra kapott beütésszámok szinte megegyezőek voltak, ami arra enged következtetni, hogy az aktív metilhisztamin egyáltalán nem, vagy csak igen kis koncentrációban kerül át a szerves fázisba. Helyette döntően a beütésszámot megnövelő szennyező aktív termékek extrahálódnak.

Beaven /16/ 1982-ben közölt egyik legújabb mikromódszernek tekinthető eljárása során - amivel az irodalmi részben részletesen foglalkoztunk - 500 µl 1:4 arányú izoamilalkohol-toluol elegyet ajánl extrahálószerként.

Mivel módszere mikroméreteken kivitelezve főleg a nagyobb hisztamin-tartományokban reprodukálható; ezért növeltük a szerves fázis mennyiségét - a csak toluolhoz hasonlóan - 5 ill. 10 ml-re úgy, hogy a rendszerben a két komponens aránya az általa leírt optimális százaléku legyen /20:80/.

Azonban a fenti változtatás ellenére sem kaptunk mintáinkra kielégítő eredményt. Ugyanis nemcsak a blank-ra kapott aktivitások ugrottak meg számottevően, hanem a standardsorozatra kapott értékek is, mégpedig a hisztamin koncentrációjától függetlenül szinte azonosak voltak 5 ml extraháló elegy hatására; sőt a magasabb koncentráció felé haladva lecsökkent 10 ml szerves közegű kezelésre:

Hisztamin : 0 10 50 100 500 1000
/nmol/l/

Beütésszám: 19 833 67 201 60 605 25 941 16 123 11 227
/CPM/

Hasonló tapasztalatokat szereztünk a leírt mikromódszer kipróbálása során is, ami az általunk kivitelezett metodikához képest csak az extrahálás lépésétől kezdve jelent különbséget. Azonban az izoamilalkohol-toluol elegyének 500 μ l-vel sem az egyszeri, sem pedig az ismételt extrahálás nem vezetett eredményre; mindkét esetben a magas vak értékeken túl a különböző mintákra adódó aktivitás értékekben semmilyen tendencia nem volt megfigyelhető.

10. Az aktiv termék folyadék-scintillációs mérése

A kloroform lefúvatását a küvettában szárazon maradt és a scintillációs koktéltban visszaoldott termék aktivitásának mérése követte.

Kezdetben ezzel kapcsolatosan problémáink voltak, ugyanis az üveg falához részben adszorbeállódott anyagot a toluol nem volt képes ekvivalens mennyiségben oldani, így az aktivitás értékei nem mutattak linearitást a teljes koncentráció-tartományban.

Ezen zavaró effektus kiküszöbölésére először a szolubilizáló hatással bíró celloszolvból visszaoldottuk a maradékot, majd ezt követően vettük fel a scintillációs koktéltban.

Ebben az esetben is meg kellett határoznunk celloszolvra nézve az optimális mennyiséget; mivel ezen anyag nemcsak szolubilizál; hanem erős quench-hatást is kifejt, ami a β -sugárzás detektálásának hatásfokát, ezzel a mérés pontosságát erősen lecsökkenti /24.táblázat és 29. ábra/.

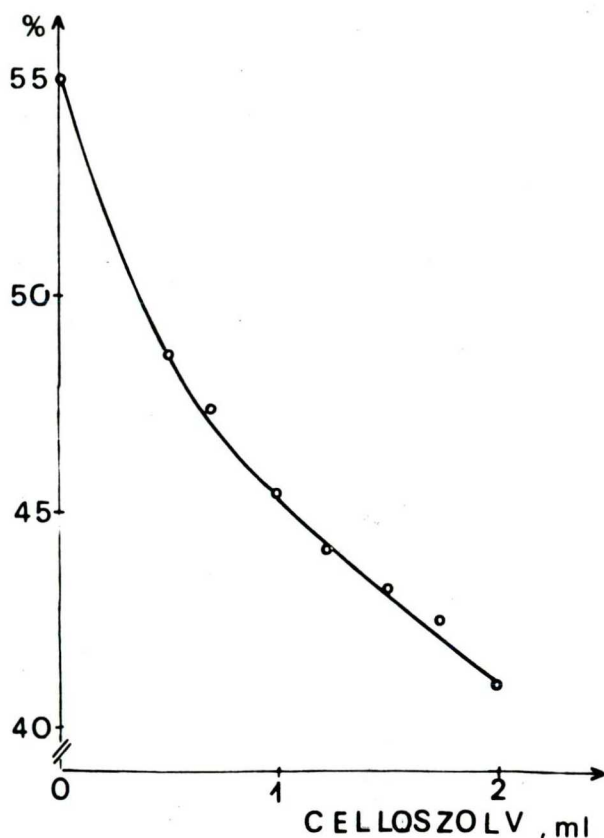
24. táblázat

A folyadék-scintillációs mérés hatásfokának változása
növekvő szolubilizálószer /celloszolv/ hatására

HATÁSFOK: /%/	0,0	0,5	0,75	1,0	1,25	1,5	2,0
TÉRFOGAT: /ml/	55,0	48,6	47,3	45,5	44,1	43,2	40,9

A kísérletek során úgy tapasztaltuk, hogy már 0,5 ml celloszolv hozzáadása elegendő ahhoz, hogy a legnagyobb mennyiségű aktív terméket is szolubilizálja, ugyanakkor vele kb. 50 %-os mérési hatásfok érhető el; így ezt vettük kísérleti munkánkban optimális térfogatnak.

Összehasonlításképpen a 25. táblázatban bemutatjuk a szolubilizáló ágenst nem, illetve optimális mennyiségben tartalmazó standardok aktivitásai közötti különbséget, ami szemléletesen bizonyítja a celloszolv pozitív hatását.



29. ábra

A folyadék-scintillációs mérés hatásfokának változása a celloszolv térfogatának függvényében

25. táblázat

A standard mintákra kapott aktivitások celloszolvnélkül, illetve 500µl celloszolvn hozzáadásakor

HISZTAMIN	A K T I V I T Á S		/DPM/
/nmol/l/	C E L L O S Z O L V	T É R F O G A T A	/ml/
	0,0	0,5	
0,0	5 013	6 028	
10	7 271	5 738	
50	11 541	14 447	
100	13 820	37 933	
500	35 907	55 434	
1000	97 263	115 424	
2000	110 007	150 220	

Nem lenne szükség szolubilizálószerre, s az üvegfelületen bekövetkező esetleges adszorpció is teljes mértékben kiküszöbölhető lenne; ha a méréshez alkalmas műanyag-küvetta állna rendelkezésünkre. Éppen ezért ugyanazon sorozatunkat mind üveg-, mind pedig műanyag-küvetttában visszoldva lemértük, s azt tapasztaltuk, hogy a minták aktivitásában számottevő eltérés nincs.

Azonban a műanyag-küvetta hátránya, hogy csak egyszeri használatra alkalmas, ugyanis a dekontamináló mosogatás után is tetemes aktivitás mutatható ki benne.

Amíg a csak koktélt tartalmazó használt üveg-küvetta beütésszámai - átlagosan 30...50 CPM - alig haladják meg a háttér értékét /20 CPM/; addig a mosogatott műanyag-küvetttában ezres nagyságrendű beütésszámok maradnak.

11. Szövetminták előkezelésére vonatkozó
tapasztalataink

Mint már utaltunk rá, szöveti homogenizátumok a plazmához képest sem ujat, sem pedig nehézséget nem jelentettek a mérés tekintetében; csupán azt kellett eldöntenünk, vajon az egyes szerzők által leírt /18,31,74/ bemérés előtti 33 K-en 5...10 percig tartó vízfürdön való kezelést közbeiktatjuk-e, vagy pedig a homogenizátum felülszójából közvetlenül viszünk be 20 µl térfogatot a reakcióelegybe.

Emiatt az általunk vizsgált szövetek mind előkezelt, mind pedig kezeletlen formájával lejátszattuk az enzimkémiai reakciót, melynek eredményeit a 26. táblázat mutatja. Plazmára vonatkozóan vannak tapasztalataink arról, hogy az ilyen jellegű deproteinizálás ugyanazon minta aktivitását közel tizedrészére lecsökkenti:

normál plazma	8 100 DPM
fehérjementesített plazma	704 DPM

Szövetek esetében is - ugyanúgy mint plazmára - lecsökken az aktivitás előzetes deproteinizálás hatására, s emiatt a mintákat a továbbiakban fehérjementesítés nélkül, csak homogenizálás és centrifugálás után reagáltattuk.

A 26. táblázat adataiból kitűnik, hogy a kétféle módon előkészített minták közül csak a sziv, mellékvese, pankreas mintáinál olyan különbség a két eljárás között, ami a deproteinizált bemérésekre magasabb hisztamin koncentrációt eredményez, mint a nem-előkezeltre.

26. táblázat

Ugyanazon szövetminták hisztamin szintjei homogenizálás,
illetve homogenizálás és deproteinizálás után

M I N T A	H I S Z T A M I N /nmol/g/	
	HOMOGENIZÁLT	DEPROTEINIZÁLT
máj	57,74	45,14
szív	17,64	27,26
ileum	4,24	2,41
jejunum	4,33	1,33
tüdő	57,47	17,44
mellékvese	4,96	9,68
vese-kéregállomány	5,70	2,56
vese-velőállomány	10,19	3,63
lép	4,72	1,62
izom	6,06	-
pankreas	8,95	16,11

Szövetekkel kapcsolatosan még egy lényeges metodikai változásról, mégpedig Taylor /78/ által kidolgozott mikromódszer /ld.10.táblázat/ próbaméréseinek eredményeiről kell beszámolnunk. Ez, az alapjaiban is szövetekre leírt mikromódszer a következő módosításokat jelenti:

- 1./Az inkubálás végén nem adunk perklórsavban oldott inaktív hordozó metilhisztamint a rendszerbe, hanem csak 2,4 mol/l perklórsavat, ami a reakció leállítására szolgál.
- 2./Az extraháló kloroform mennyiségét 400 µl térfogatra csökkentjük, amiből 200 µl-t viszünk át a mérőküvet-tába.

Ugyanazon standard-és szövetmintákkal párhuzamosan kiviteleztek az általunk addig alkalmazott és Taylor módszerét. A folyadék-scintillációs méréssel kapott eredményeket a számított hisztamin koncentrációkra vonatkozóan a 27. táblázat és a 30. ábra oszlopdiagramjai mutatják.

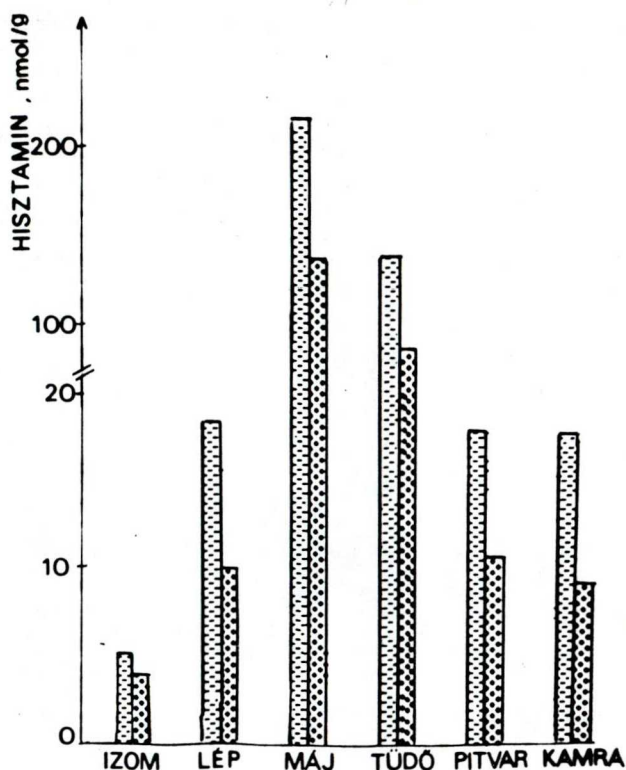
A mikromódszerrel adódó átlagosan 40 %-kal kisebb hisztamin szinteket okozhatja mind a hordozó metilhisztamin hiánya, mind pedig a tizedrészére csökkentett kloroform-térfogat. Mindamellett ezen módszer továbbfejlesztett változata alkalmas lenne szöveti hisztamin tartalmak meghatározására, mivel lényegesen rövidebb idő alatt, kényelmesebben és kevesebb munkaráfordítással kivitelezhető.

Mérési tapasztalataink alapján megállapíthatjuk, hogy ezen mikromódszer a plazmában lévő igen kis koncentrációk kimutatására nem alkalmazható.

27. táblázat

Beaven és Taylor módszerével meghatározott hisztamin szintek különböző szövetmintákra

MINTA	H I S Z T A M I N /nmol/g/	
	BEAVEN	TAYLOR
izom	5,05	3,80
lép	18,47	9,95
máj	218,93	137,59
tüdő	139,74	84,99
pitvar	10,81	6,27
kamra	17,68	9,06



30. ábra

/---/Beaven és Taylor/.../
módszerével kapott
hisztamin szintek
különböző szövet-
mintákra

Ezzel röviden áttekintettük a hisztamin radioenzimatis módszerének tanulmányozása és laboratóriumunkban történő bevezetése során azon vizsgált paraméterekkel kapott eredményeinket, amelyek lényeges hatással vannak az inkubálás, az extrahálás és a folyadék-scintillációs mérés pontosságára.

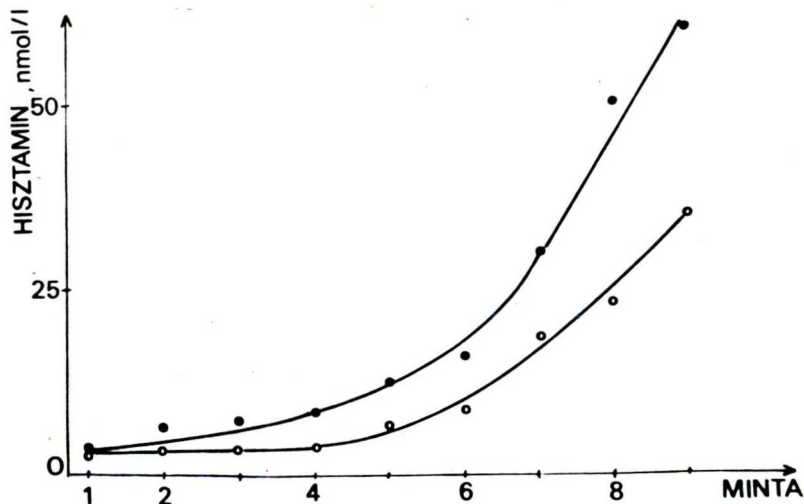
A továbbiakban a munkánk során alkalmazott egyéb, de a hisztamin koncentrációkkal valamilyen módon kapcsolatos mérésekkel kapott eredményeket szeretnénk röviden összefoglalni.

II. A PLAZMA-HEMOGLOBIN MEGHATÁROZÁSOK EREDMÉNYEI

A kutyákon létrehozott hemorrhagiás shockos folyamatban, különösen az shock késői szakaszában, a vérmintákban kisebb-nagyobb fokú hemolízis volt megfigyelhető.

A 4 kPa-ra levéreztetett altatott állatok közül a kísérlet közben vagy kevéssel utána exitált állatoknál ez nagyobb; míg a túlélőknél kisebb mértékben jelentkezett.

A spektrofotometriás plazma-hemoglobin meghatározással a két csoportra kapott eredményeket a 31. ábra szemlélteti, ahol a mintákat a shock különböző stádiumában vettük le. Az exitált állatok magasabb plazma-hemoglobin értékei, amelyek a keringésben in vivo körülmények között beálló zavarokra is utalnak, indikátorai lehetnek a shock súlyosságának.



31. ábra

Exitált /●/ és 48 órán át túlélő /○/ állatok plazma-hemoglobin értékei a shock különböző szakaszában



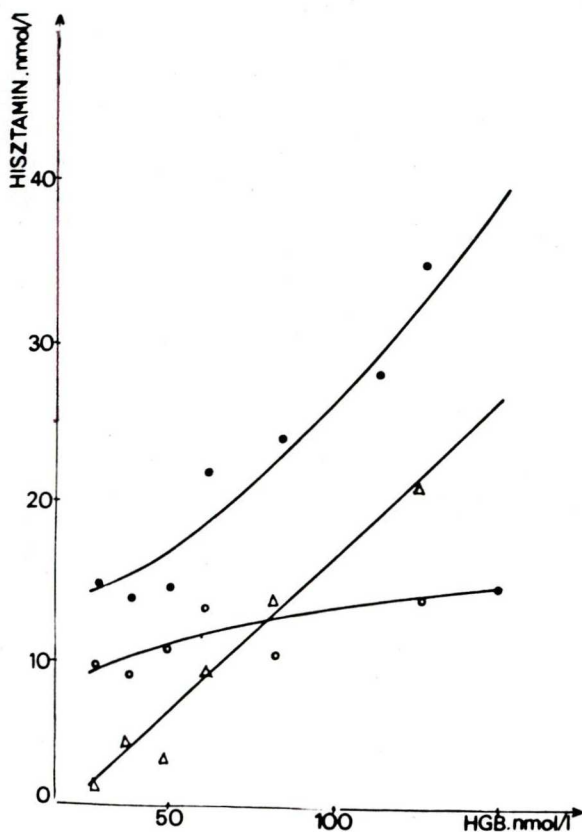
Bizonyított, hogy a teljes vér a plazmánál nagyságrendekkel több hisztamint tartalmaz, ami a legújabb irodalmi adatok szerint átlagosan 504 ± 72 nmol/l /16, és 2. táblázat/. Totál vér mérésekor mi átlagosan 216 nmol/l hisztamin értéket tudtunk kimutatni.

Célunk volt a vörösvértestek roncsolódása és szétesése miatt hemolizált vérmintákban lévő plazma-hemoglobin és hisztamin koncentráció viszonyának megállapítása; és annak eldöntése, hogy a shock folyamata miatt a keringésben beállott természetes eredetű hemolizis hogyan befolyásolja az állatkísérletek során vett vérmintákból meghatározott hisztamin szinteket.

Az in vitro módon létrehozott hemolizátumokból párhuzamosan megvalósított spektrofotometriás hemoglobin és radioenzimatikus hisztamin meghatározás eredményeit ugyanazon vérminta hemolizálatlan plazmájához viszonyítottuk.

Vizsgálatainkhoz a koncentrációváltozások minél pontosabb követése végett olyan shockos kutyától vett vér- illetve plazmával dolgoztunk, amelyben a hisztamin kiindulási koncentrációja meglehetősen magas volt, átlagosan 29,3 nmol/l ; így a sorozatban a legnagyobb foku higitásnál is detektálható hisztamin szintet kaptunk.

A 32. ábrán feltüntetett mérések eredményei alapján elmondhatjuk, hogy az in vitro körülmények között létrehozott hemolizis magas plazma-hemoglobin koncentrációknál sem okoz jelentős hisztamin növekedést, sőt a görbék azt jelzik, hogy a desztillált vizes hemolizis nem növeli, hanem éppen csökkenti a plazma-hisztamin mért értékét, vagyis a kapott koncentrációkkal a keringésben reálisan meglévő hisztamin tartalmat alulbecsüljük.



32. ábra

A hisztamin értékek változása a plazma-hemoglobin /HGB/ koncentrációjának függvényében; fiziológias só /●/, desztillált víz /○/, a két érték különbsége /Δ/

A fiziológias sóval és desztillált vízzel hígított teljes vérminták mért hisztamin tartalmának különbsége egyenessel ábrázolható, melynek pontjai a hígítás mértékének növekedtével lineárisan csökkennek.

A másik módon - tehát többszöri olvasztás-fagyasztással roncsolásnak kitett teljes vér - hemolizált mintákra a 32. ábrán a desztillált vízzel kezelttel azonos lefutású görbét kaptunk.

III. A FEHÉRJE-MEGHATÁROZÁSOK EREDMÉNYEI

Mint az előző fejezetben szó volt róla, a Lowry /45/ által kidolgozott spektrofotometriás proteinkoncentráció meghatározást kísérletsorozatunkban két alkalommal használtuk. Egyrészt az izolált hisztamin-N-metiltranszferáz enzim fehérjemennyiségének mérésére; másrészt pedig összehasonlítottuk a szöveti hisztamin szinteket egységnyi tömegre, illetve egységnyi fehérjére vonatkoztatva. A sorozatos méréseket az állatkísérletek során vett vázizom, lép, máj, tüdő, balpitvar és balkamra minták esetén végeztük el, mivel azt tapasztaltuk, hogy az eltérő minőségű szövetek eltérő hatásfokkal homogenizálhatók. Ugyanis a rostosabb anyagok /izom, pitvar, kamra/ sejtjei a "puhább", főleg kötőszöveti állományú mintákhoz képest kevésbé roncsolódnak, aminek következménye, hogy belőlük a hisztamin sem szabadítható fel teljes mértékben; ez pedig a mért koncentrációkban a valóban meglévőkhöz viszonyítva kisebb szintet jelent.

Az egyes szövetmintákra meghatározott fehérje-koncentrációkat a 28., a kétféle módon számolt eredményeket pedig a 29. táblázatban tüntettük fel.

Tíz állat esetében végeztünk paralell tömeg és fehérje-koncentráció meghatározást minden szövetmintára. Az eredmények előzetes elképzeléseinket igazolták, ugyanis a könnyen homogenizálható lép, máj, eredményei igen jó egyezést mutatnak, míg a többi esetben a g-szövetre vonatkoztatott hisztamin érték átlagosan 30...50 %-kal alatta marad a g-fehérjére kapott szinteknek, ami a visszamaradó partikulumokban lévő fel nem tárt hisztamin-mennyiségből adódik.

28. táblázat

A vizsgált szövetminták átlagos fehérje-koncentrációi

M I N T A	F E H É R J E / g/l /
Izom	5,30
Lép	12,50
Máj	9,90
Tüdő	6,50
Pitvar	4,85
Kamra	5,31

29. táblázat

Szöveti hisztamin értékek egységnyi tömegre és egységnyi
fehérjére számolva

M I N T A	H I S Z T A M I N nmol/g szövet	S Z I N T nmol/g fehérje
Izom	5,66	11,34
Lép	10,53	12,67
Máj	131,62	127,19
Tüdő	71,28	113,43
Pitvar	16,83	32,88
Kamra	15,47	29,23

Eredményeink megadásában az egységnyi tömegre vonatkoztatott adatokat választjuk a szövetmeghatározásokkal foglalkozó irodalmi eredményekkel való összehasonlíthatóság miatt; ugyanis a szerzők többsége általában g-szövetre számítva közli eredményeit.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során kísérleteket folytattunk a több mint tíz évvel ezelőtt kidolgozott, és azóta számos szerző által /16,18,22,31,69,74,76,78/ részleteiben módosított radioenzimatikus hisztamin meghatározás laboratóriumunkban való bevezetésére; olyan módszer megvalósítására, amely kísérleti munkánk során sorozatos plazma- és szövetminták mérésére alkalmas.

Ennek kapcsán irodalmi, történeti áttekintést adtunk a hisztamin felfedezéséről és izolálásáról /20,28,29,30,77/; ismertettük a hisztaminnak az emberi és állati szervezetben in vivo módon végbemenő keletkezését és metabolizálódásának lépéseit /19,26,36,38/.

Részletesen foglalkoztunk a két különböző típusu - H_1 és H_2 - receptoron /10,55,56/ ható hisztamin farmakológiai hatásaival, különös tekintettel azokra a folyamatokra, amelyek további, hemorrhagiás shockos állatkísérleteinkben fontos szerepet játszhatnak /6,25,40,63,79/.

Rávilágítottunk a hisztaminnak a különféle gyulladásos, allergiás, hiperszenzitív reakciókban kifejtett hatásaira /8,58/; a hisztamin különböző sejtekből és szövetekből történő felszabadulásának, ezáltal a keringésbe való bejutásának /23,53,65/ következményeire.

Utaltunk a klinikumban való fontosságára /34,42,47/, azokra az in vivo és in vitro körülmények közötti kutatásokra, amelyeknek célja, hogy a hisztaminnak a szervezetben olykor letális szintre megnövekedett mennyiségét alkalmas, receptorokon ható H_1 és H_2 antagonistákkal /11,41,68,81/ blokkolni tudják.

Éppen a hisztamin számos patofiziológias folyamatban betöltött fontos szerepe miatt merült fel az igény a vérből, vizeletből és szövetekből történő kvantitatív meghatározására.

Az irodalmi részben alapjaiban áttekintettük az erre vonatkozó metodikai módszereket; elemeztük a kezdetben egyedülálló bioassay, a később kidolgozott fluorimetriás /43,44,72/ és számos más próbálkozás /35,73/ előnyeit és hátrányait a kvalitatív és kvantitatív meghatározások pontosságára és szenzitivitására; összehasonlításképpen a legújabb és jelenleg legérzékenyebb radioenzimatikus hisztamin kimutatással, amely rövid idő alatt tért hódított az előző metodikákkal szemben.

Specifikus enzimekémiai reakción - a hisztamin adott körülmények között végbemenő metilálódásán - alapuló módszer in vitro körülmények közötti megvalósítása lényegesen kisebb hisztamin szintek kimutatását teszi lehetővé, így alkalmassá vált arra, hogy az emberi és állati szervezet bármely minőségű anyagából /vér, vizelet, szövetek/ a hisztamin koncentrációt és annak bekövetkező mennyiségi változását követni tudjuk; így lehetőséget nyújt az egyes patofiziológias folyamatok részleteinek megismerésére, és a szükséges gyógyító klinikai beavatkozásra.

Célunk volt ezen módszer paramétereinek, részfolyamatainak részletes tanulmányozásával olyan kivitelezést megvalósítani, amely alkalmas, érzékeny és reprodukálható sorozatos kísérleti munkánk vér- és szövetmintáinak mérésére.

A hosszadalmas, bonyolult metodikájú radioenzimatikus hisztamin mérés három fő fizikai, kémiai lépésének,

úgy mint a metilhisztamin képződését eredményező inkubálási folyamatnak; az aktív termék szerves fázisba való extrahálásának és liquid-scintillációs mérésének /61/ azon kémiai anyagmennyiségeit, fizikai-kémiai paramétereit vizsgáltuk, amelyeket legfontosabbnak véltünk a reakció eredményességének, kellő hatásfokkal történő lejátszódásának és kvantitatív termékképződésének szempontjából.

Ezek közül - az inkubálás során - döntő jelentőségűnek találtuk a hisztamin-N-metiltranszferáz enzim és az aktív metil donort tartalmazó ^3H -S-adenozil-L-metionin optimális mennyiségének; továbbá a kémiai reakció lejátszódását biztosító inkubálás időtartamának; és az aktív metilhisztamin extrahálását elősegítő és üvegfelületen bekövetkező adszorpcióját gátló inaktív hordozó metilhisztamin hozzáadott térfogatának megválasztását.

A fizikai-kémiai tényezők optimális mennyiségének, konstans és ideális reakciókörülményeknek a megteremtése elősegíti a módszer érzékenységét jelentősen meghatározó vak /blank/ értékek minimalizálását is, aminek hatására a kimutatható legkisebb hisztamin koncentráció 1...5 nmol/l értékre csökkenthető.

A szerves fázisú /kloroform/ extrahálási műveletnél igen lényeges az extraháló közeg azon mennyiségének biztosítása amellyel a metilhisztaminnak a vizes-szerves fázis közötti maximális megoszlási hányadosa /18/ biztosítható, ez ugyanis a termék átlagosan 50...55 %-os kinyerését eredményezi, optimális extrahálási idő mellett.

Az aktív termék liquid-scintillációs méréséhez nem elhanyagolható a koktélba bevitt szolubilizálószer jelentősége, amely biztosítja a homogén fázis kialakítását, ugyanakkor meggátolja a metilhisztamin üveghez való adszorpcióját is, amely egyébként a radioaktivitás egy részének elvesztését okozza.



A mérés során figyelemmel kell lennünk a kellő hatásfoku detektálásra, a quench-hatások kiküszöbölésére, amit okozhat - többek között - a szolubilizáló ágens túl nagy mennyiségének jelenléte a rendszerben.

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy a radioenzimatisztikus hisztamin meghatározás módszerének kidolgozására és laboratóriumi körülmények között történő beállítására vonatkozó vizsgálatainkkal; az egyes paraméterek, fizikai-kémiai és reakciókinetikai tényezők optimális megválasztásával sikerült olyan standard reakciókörülményeket teremtenünk, amelyek között kutyaon végzett állatkísérleteink során vett vér- és szövetminták mérése reprodukálható és reális értékeket eredményez.

F E L H A S Z N Á L T I R O D A L O M

1. B.M. Altura, A.S. McGill: Recent developments of the histamine problem; Handbook Exp. Pharmacol. 18:2-39, 1978.
2. B.M. Altura: RES system function and histamine release in shock and trauma: Relationship to microcirculation; Klin. Wochensh. 60:882-890, 1982.
3. J. Axelrod, F. Hirata: Phospholipid metylation and the receptor-induced release of histamine from cells; TIPS. 3:156-158, 1982.
4. A.P. Almeida, W. Flye, D. Deveraox, Z. Horakova, M.A. Beaven: Distribution of histamine and histaminase in blood of various species; Comp. Biochem. Physiol. 67:187-190, 1980.
5. P.C. Atkins, M. Valenzano, B. Zweiman: Plasma-concentration of histamine measured by radioensimatic assay - Effects of histaminase incubations; J. Aller. Clin. 69:39-45, 1982.
6. B.M. Altura: Pharmacology of venules: Some current and clinical potential; J. Cardiovasc. Pharmacol. 3:1413-1428, 1981.
7. A.A. Algieri, G.M. Luke, et al: 1,2,5-thiadiazole 1-oxide and 1,1-dioxide derivatives. A new class of potent histamine H₂-receptor antagonists; J. Med. Chem. 25:210-212, 1982.
8. B.M. Altura, S. Halevy: Beneficial and detrimental actions of histamine H₂-receptor antagonists in circulatory shock; Proc. Natl. Acad. Sci. 75:2941-2944, 1978.
9. M.J. Brown, R. Causon, T.H. Lee: A novel double-isotope technique for the enzymatic assay of plasma histamine; Application to estimation in asthmatics; J. Aller. Cl. 69:20-24, 1982.

10. M.R. Bristow, R. Ginsburg, D.C. Harison: Histamine and the human heart: The other receptor system; *Am.J.Cardi.* 49:249-251, 1982.
11. M.A. Beaven: Histamine II.; *New E. Med.* 29:320-325, 1976.
12. P.J. Barnes, P.W. Ind, M.J. Brown: Plasma histamine and catecholamine in stable asthmatic subjects; *Clin. Sci.* 62:661-665, 1982.
13. L.A. Barker, L.B. Hough: Histamine H₂-receptor antagonism by propantheline and derivatives; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219/2/:453-458, 1981.
14. G. Bertaccini, G. Coruzzi: Effect of some new Histamine H₂-receptor antagonists on the guinea-pig papillary muscle; *Naynyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 317: 225-227, 1981.
15. M. Barazarte, MC.Conroy, A.L. de Weck: Evaluation of ³H-histamine incorporation into human peripheral leukocytes; *Aller.* 37:365-371, 1981.
16. M.A. Beaven, A. Robinsonwhite, N.B. Roderick, G.L. Kauffman: The demonstration of histamin release in clinical conditions: A review of past and present assay procedures; *Klin. Wochensch.* 60:873-881, 1982.
17. D.D. Brown, R. Tomchick, J. Axelrod: The distribution and properties of a histamine-methylating enzyme; *J. Biol. Chem.* 234:2948-2950, 1959.
18. M.A. Beaven, S. Jakobsen, Z. Horakova: Modifocation of the enzymatic isotopic assay of histamine and its application to measurement of histamine in tissues, serum and urine; *Clin. Chim. Acta* 37:91-103, 1972.
19. M.A. Beaven: Histamine: Its role in physiological and pathological processes; *Monographs in Allergy*, 1978.

20. C.H. Best, H.H. Dale, H.W. Dudley, W.V. Thorpe: The nature of the vasodilator constituents of certain tissue extracts; J. Physiol. Lond. 62:397-417, 1927.
21. M.A. Beaven: Histamine I.; New E. J. Med. 294:30-36, 1976.
22. M.A. Beaven, Z. Horakova: The enzymatic assay of histamine; Handbbok Exp. Pharmacol. 18:151-173, 1978.
23. R. Carraway, D.E. Cochrane, J.B. Lansman, S.E. Leeman, B.M. Paterson, H.J. Welch: Neurotensin stimulates exocytotic histamine secretion from trat mast cells and elevates plasma histamine levels; J. Physiol. 323: 403-414, 1982.
24. M.J. Daly, J.M. Humphray, R. Stables: Some in vitro and in vivo actions of the new histamine H₂-receptor antagonists, Ranitidine; Br. J. Pharmacol. 72:49-54, 1981.
25. R.E. Drake, J.C. Gabel: Effect of histamine and alloxane on canine pulmonary vascular permeability; Am. J. Physiol. 239:H96-H100, 1980.
26. C. Dent, F. Nilam, I.R. Smith: Sidechain-modified histamine analogues as substrates for histamine N-methyltransferase; Biochem. Pharmacol. 31:2297-2300, 1982.
27. A. Doenicke, W. Lorenz: Histamine release in anaesthesia and surgery; Klin. Wochensch. 60:1039-1045, 1982.
28. H.H. Dale; Some chemical factors in the control of the circulation; Lancet i:1179-1233, 1929.
29. H.H. Dale, P.P. Laidlaw: The physiological action of béta-imidazolyl-ethylamine; J. Physiol. Lond. 41: 318-344, 1910.
30. H.H. Dale, P.P. Laidlaw: Further observation on the action of beta-imidazolyl-ethylamine; J. Physiol. Lond. 43:182-195, 1911.

31. Mc.Donald, Mezei and Mezei: Effect of wallerian degeneration on histamine-concentration of peripheral nerve; J. Neurochem. 36:9-16, 1981.
32. M. Ennis, F.L. Pearce, P.M. Weston: Some studies on the release of histamine from mast cells stimulated with polylysine; Br. J. Pharmac. 70:329-334, 1980.
33. J.C. Emmett, G.J. Durant, C.R. Ganellin, A.M. Moe, J.L. Turner: Potential histamine H₂-receptor antagonists. 4. Benzylhistamines; J. Med. Chem. 25:1168-1174, 1982.
34. P.M. Ertama: Histamine liberation in surgical patients following administration of neuromuscular blocking drugs; Ann. Clin. Res. 14:15-26, 1982.
35. M. Friedman, A.T. Noma: Histamine analysis on a single column amino acid analyzer; J. Chromat. 219:343-348, 1981.
36. D. W. Fitzpatrick, H. Fisher: Histamine synthesis, imidazole dipeptides and wound healing; Surgery 97:430-434, 1982.
37. H. Graham, J.A.D. Scarpellini, B.P. Hubka, O.H. Lowry: Measurement and normal range of free histamine in human blood plasma; Biochem. Pharmacol. 17:2271-2280, 1968.
38. L.B. Hough, J.K. Khandelwal, T.W. Mittag: Alpha-methyl-histamine methylation by histamine N-methyltransferase; Agent Actio. 11:425-428, 1981.
39. Z. Horakova, M.A. Beaven: Time-course of histamine release from rat paw after termal injury; E. J. Pharmacol. 27:305-312, 1974.
40. D. Jack; Cardiac effects of histamine; Lancet 25:59, 1982.
41. M. Kaliner, R. Sigler, R. Summers, J.H. Shelhamer: Effects of infused histamin:Analysis of the effects of H₁- and H₂-receptor antagonists on cardiovascular and pulmonary responses ; J.Aller.Clin.I.68:365-371, 1981.

42. K. Kubo, M. Oka, R. Frey: Decrease of basal histamine levels by application of atropine in men; *Anaesth.* 31: 172-173, 1981.
43. L.N. Korobova, A.A. Khodakova, M.L. Frenkel: Colorimetric determination of histamine in the blood and tissues; *Lab. Delo* 4:199-202, 1982.
44. W. Lorenz, H.R. Reimann, H. Barth, J. Kusche: A sensitive and specific method for determination of histamine in human whole blood and plasma; *Hoppe-Seyer's Z. Physiol. Chem.* 353:911-920, 1979.
45. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent; *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
46. T. Lewis: The blood vessels of the human skin and their responses; Shaw and Sons, Lond, 1927.
47. O. Löwhagen, G. Granerus, H. Wetterquist: Studies on histamine metabolism in allergen induced asthma; *Aller.* 35:521-529, 1980.
48. W. Schumer, R. Sperling: Shock and its effect on the cell; William Schumer M.D., Chicago, 1967.
49. P.M. Laduron, P.R.M. Janssen, W. Gommeran, J.E. Leysen: Invitro and in vivo binding characteristics of a new long-acting histamine H₂ antagonists, Astemizole; *Mol. Pharmacol.* 21:294-300, 1981.
50. G. Majno, M. Leventhal: Endothelial contraction induced by histamine-type mediators. An electron microscopic study; *J. Cell. Biol.* 42:647-672, 1969.
51. R.G. Martinek: A simple spectrophotometric method for quantitating hemoglobin in serum or plasma; *J. Am. Med. Technol.* 28:60-66, 1966.
52. J. Murray, A.S. McGill: Affect of adsorption of histamine to glass surfaces on its estimation; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 65:71-75, 1982.

53. C.D. May, L. Remigio: Observation on high spontaneous release of histamine from leukocytes in vitro; Clin. Aller. 12:229-241, 1982.
54. H. Malling, P.S. Skov, H. Permin, S. Norn, B. Weeke: Basophil histamine release and humoral changes during immunotherapy; Aller. 37:187-190, 1982.
55. J.R. Myers: Histamine receptors in the lung; Chest 82, 1982.
56. K.B. Mirbahar, P. Eyre: Occurrence of inhibitory histamine H₂-receptors in bovine pulmonary arteries; E. J. Pharmacol. 77:331-334, 1982.
57. G.L. Moore, M.E. Ledford, A.M. Meydith: A micromodification of the drabkin hemoglobin assay for measurement plasma hemoglobin assay in the range 5 to 2000 mg/dl; Biochem. Med. 26:167-173, 1981.
58. K. Markley, Z. Horakova, E.T. Smallman, M.A. Beaven: The role of histamine in burn, tourniquet and endotoxin shock in mice; E. J. Pharmacol. 33:255-265, 1975.
59. J.J. Mazza, P.F. Gatlin, J.J. Marx: Inhibition of platelet aggregation with histamine; Am. J. Hematol. 8: 257-263, 1980.
60. S. Norm, P.S. Skov, K.W. Hausen, R. Kleysner, A. Geisker: Possible regulatory role of histamine in human blood platelet function examined by thrombin-induced serotonin release; Acta Pharmacol. Toxicol. 51:233-236, 1982.
61. C.T. Peng: Sample preparation in liquid-scintillation counting; Review 17, Radiochem. Ctr. Amersham, 1977.
62. J.R. Porter, R.G. Mitchell: Distribution of histamine in human blood; Physiol. Rev. 52:361-381, 1972.

63. R.J. Porcelli, D.F. Ventura, W.A. Mahoney, E.H. Bergofsky: Role of histamine in regulating pulmonary vascular tone and reactivity; J.Appl. Physiol. 51: 1320-1325, 1981.
64. M. Radermecker, M.P. Maldayne, M. GustinI: Increased complement-mediated leukocytic histamine release in atopics; Int. Archs. Aller. Appl. Immunol. 68:365-370, 1982.
65. C.E. Rosow, J. Moss, D.M. Philbin, J.J. Savarese: Histamine release during morphine and fentanyl anesthesia; Anesth. 56:93-96, 1982.
66. A Robinsonwhite, M.A. Beaven: Presence of histamine and histamine metabolizing enzyme in rat and guinea-pig micro-vascular endothelial-cells; J. Pharm. Exp. 223:440-445, 1982.
67. B.V. Robinson: Histamine receptor agonists and antagonists on granulocyte adherence; J. Pharm. Pharmacol. 34:458-461, 1982.
68. T.J. Riding: A species comparison of the histamine H₂-receptor on mast cell and basophils; Agent. Actio. 12: 263-267, 1982.
69. R.E. Shaff, M.A. Beaven: Increased sensitivity of the enzymatic isotopic assay of histamine: Measurement in plasma and serum; Anal. Biochem. 94:425-430, 1979.
70. M.R. Silva: Action of histamine upon the circulatory apparatus, Handbook Exp. Pharmacol. 18:238-293, 1978.
71. W.Schayer: Catabolism of histamine in vivo; Handbook Exp. Pharmacol. 18:672-683, 1978.
72. B.A. Shore, A. Burkhalter, V.H. Cohn: A method for the fluorometric assay of histamine in tissues; J. Pharmacol. Exp. Ther. 127:181-186, 1959.

73. G. Skofitsch, A. Saria, P. Holzer, F. Lembeck: Histamine in tissues: Determination by high performance liquid chromatography after condensation with o-phthalaldehyde; J. Chromat. 226:53-59, 1981.
74. N. Subramanian, P. Mitznegg, W. Domschke: A rapid and sensitive enzymatic isotopic method for routine assay of histamine in blood, plasma and kiopsy-tissue: Re-evaluation; Acta Hepato-Gastroenter. 25:456-458, 1978.
75. R. Tung, L.M. Lichtenstein: Invitro histamine release from basophils of asthmatic and atopic individuals in D₂O; J. Immunol. 128:2067-2072, 1980.
76. K.M. Taylor, S. Krilis, B.A. Baldo: An enzymatic-isotopic microassay for measuring allergic release of histamine from blood and mast cells in vitro; Int. Archs. Aller. Appl. Immunol. 61:19-27, 1980.
77. W.V. Thorpe: Vasodilator constituents of tissue extracts: isolation of histamine from muscle; Biochem. J. 22:94-101, 1928.
78. K.M. Taylor, S.H. Snyder: Isotopic microassay of histamine, histidine and histamine-methyltransferase in brain tissue; J. Neurochem. 19:1343-1358, 1972.
79. C.Y. Wang, R.J. Korthnis, J.B. Scott: Transient effects of histamine on microvascular fluid movement; Microvas. Res. 23:316-328, 1982.
80. R.J. Wojner, T. Hearn, S. Starkweather; Augmentation of allergic histamine release from human blood leukocytes by non-steroidal antiinflammatory-analgesic agents; J. Aller. Clin. Immunol. 66:37-45, 1980.
81. J.M. Young: Neurochemical and neuropharmacological aspects of histamine receptors; Neurochem. Int. 4: 97-99, 1982.

