

616-009.93:612.12:577.15:547.565.2:612

DOPAMÍN- β — HYDROXYLÁZA V PLAZME AKO INDIKÁTOR SYMPATICKEJ AKTIVITY U LUDÍ

RNDr. Richard KVETŇANSKÝ, CSc.,

pplk. MUDr. Pavol VENCEL,

Ing. Pavol BLAŽÍČEK, Ing. Ladislav TORDA,

mjr. MUDr. Ľuboš VRAŽDA, MUDr. Ladislav MIKULAJ, CSc.,

Ústav experimentálnej endokrinológie SAV v Bratislave
(riaditeľ MUDr. Ladislav Macho, CSc.)Interné oddelenie vojenskej nemocnice v Bratislave
(náčelník: plk. MUDr. Ján Langoš)

Venované k päťdesiatinám plk. MUDr. J. Langošovi

Iba nedávno sa dokázalo, že dreň nadobličiek, ako aj periférne sympatické nervy vyplávajú spolu s katecholamínmi (CA) aj špecifické bielkoviny (Smith, 1971). Jednou z týchto bielkovín je enzým dopamín- β -hydroxyláza (DBH), ktorý v procese syntézy katecholamínov katalyzuje premenu dopamínu na noradrenalín (Kaufman a Friedman, 1965). DBH je v sympatických nervoch cicavcov lokalizovaná v synaptických vezikuloch (Potter a Axelrod, 1963), z ktorých sa po nervovej stimulácii uvoľňuje procesom exocytózy do cirkulácie (Weinshilboum a Axelrod, 1971a; Weinshilboum a spol., 1971). Po chemickej sympatektómii podaním 6-hydroxydopamínu sa hladina DBH v krvi zvierat podstatne znižuje (Weinshilboum a Axelrod, 1971b). Aktivita enzýmu DBH bola dokázaná aj v krvi ľudí, a to v podstatne vyšších koncentráciách ako u iných species (Weinshil-

boum a Axelrod, 1971a; Goldstein a spol., 1971; Geffen a spol., 1973). Poločas vymiznutia DBH z cirkulácie je podstatne dlhší ako u katecholamínov (Rush a Geffen, 1972; Planz a Palm, 1973), čo je jedným z dôvodov, že sa uvažuje o meraní DBH v plazme, ako o vhodnom intexu sympatickej aktivity.

Cieľom tejto práce bolo prispieť k objasneniu uvedenej otázky sledovaním aktivity dopamín- β -hydroxylázy v plazme parašutistov po zoskoku z lietadla, kedy dochádza k výraznej stimulácii sympatického nervového systému.

Materiál a metodika

Sledovali sme 22členný súbor výsadkárov, ktorí absolvovali svoj prvý zoskok z lietadla (600 m výška). Priemerný vek výsadkárov bol 18 rokov. Počas pokusu boli všetci zúčastnení

spoločne ubytovaní a stravovaní. Pokus bol začlenený do ich bežného denného programu a rozdelili sme ho na dva dni: a) V kontrolný deň, kedy boli výsadkári v klude, sme zbierali trojhodinovú frakciu moča (8–11 hod). Po vymočení sme im odobrali punkciou kubitálnej vény krv do heparinizovanej striekačky. b) V pokusný deň výsadkári absolvovali v časovom intervale 8–11 hod. zoskok a krv sme im odobrali ihneď po dopade na zem, resp. 30, 60, 90 minút neskôr. Moč sa zbieral v priebehu troch hodín po zoskoku.

Krv sme ihneď centrifugovali a získanú plazmu zmrazili pri -18°C . Aktivitu DBH v plazme sme merali rádioizotopovou enzýmatickou metódou podľa Weinshilbouma a Axelroda (1971a). Moč sme zbierali do polyetylénových fliaš a po zmeraní objemu sme časť okyslili na pH 3 kyselinou octovou a zmrazili až do vyšetrenia. V moči sme merali adrenalín (ADR) a noradrenalín (NA) modifikovanou spektrofotometrickou metódou podľa Eulera a Lishajka (1961).

Výsledky udávame ako priemery $\pm$ stredná chyba priemeru ($\pm$ SE). Štatistickú významnosť sme počítali podľa Studentovho t-testu.

Výsledky

Aktivita dopamín- β -hydroxylázy v plazme parašutistov po prvom zoskoku. Ako vidieť z tabuľky, aktivita DBH sa podstatne zvýšila v plazme parašutistov odobratej ihneď po dopade na zem ($p < 0,001$). Tridsať minút po zoskoku sa aktivita DBH v plazme opäť významne znížila voči hladinám ihneď po zoskoku, a to na hodnoty, ktoré už nie sú významne zmenené voči kontrolným. Na týchto hodnotách potom DBH pretrváva prakticky v celom sledovanom období až do 90. minúty po zoskoku.

Exkrécia katecholamínov močom u parašutistov po prvom zoskoku. Z tabuľky 2 vyplýva, že exkrécia adrenalínu v trojhodinovej frakcii moča sa zvyšuje po zoskoku asi dvojnásobne ($p < 0,001$). Aj noradrenalín, ktorého kontrolná exkrécia je asi trojnásobne vyššia ako u adrenalínu, je po zoskoku temer dvojnásobne zvýšený voči kontrolným hodnotám ($p < 0,001$).

Diskusia

Od roku 1971, kedy sa dokázala aktivita dopamín- β -hydroxylázy v plazme (Weinshilboum a Axelrod, 1971a), sa stále viac množia dôkazy v prospech názoru, že sekrécia katecholamínov sa deje procesom exocytózy (Axelrod, 1972). Dokázalo sa, že katecholamíny sa po podráždení sympatického nervového systému uvoľňujú v stechiometrických pomeroch spolu s katecholamíny syntetizujúcim enzýmom DBH, a to jednak z drene nadobličiek (Viveros a spol., 1968), ako aj zo sympatických nervových zakončení (Gewirtz a Kopin, 1970; Smith, 1971). V tejto predstave sú však ešte určité nejasnosti, ako napr. fakt, že sekrécia katecholamínov

po nervovom podráždení sa uskutoční počas 1 až 2 sekúnd, čo nemožno vysvetliť exocytózou. Rahwan a spol. (1973) na podklade morfológických štúdií uvádzajú, že uvoľňovanie katecholamínov z drene nadobličiek sa môže diať cez sekrečné mikrotubuly a nie procesom exocytózy. Na druhej strane však bolo publikovaných množstvo prác, ktoré po rôznych fyziologických stimuláciách sympatického nervového systému — po vystavení zvierat, resp. ľudí stresu — dokázali zvýšenie DBH v plazme, resp. sére. Imobilizačný stres zvyšuje aktivitu DBH v sére potkanov (Weinshilboum a spol. 1971) spolu s poklesom katecholamínov v nadobličkách a ich výstupom v krvi (Kvetňanský, 1973) a v moči (Kvetňanský a Mikulaj, 1970). Aj akútna a chronická záťaž plávaním zvyšuje DBH v krvi (Roffman a spol., 1973). Wooten a Cardon (1973) dokázali, že chlad aj cvičenie vyvoláva malé, ale signifikantné zvýšenie DBH v plazme ľudí. Zmena polohy však neovplyvnila hladiny DBH. Podchladenie organizmu pri 10°C na 30 min., ako aj 20minútové cvičenie pri teplote 40°C , významne zvýšilo DBH v plazme ľudí (Frewin a spol., 1973). Freedman a spol. (1973) pozorovali po chladovom teste výstup aktivity DBH v sére u časti experimentálnych osôb, avšak meraním množstva celkovej imunoreaktívnej bielkoviny DBH zistili výstup u všetkých individuí. Maximálna práca na bicyklovom ergometri (100–250 wattov; 6–10 min.) zvýšila asi o 25 % aktivitu DBH v plazme (Planz a Palm, 1973), ale aj submaximálna práca mala podobný efekt (Kvetňanský a Balážov-jech, nepublikované výsledky). Horwitz a spol. (1973) opísali tiež zvýšenie DBH v sére ľudí vystavených intenzívnej bicyklovej záťaži. Na druhej strane Wetterberg a spol. (1972) po 20min. submaximálnej ergometrickej práci ani po elektrošoku zvýšenie aktivity DBH v plazme ľudí nezistili.

V tejto práci sme si ako model pre štúdium sekrecie DBH zvolili zoskok padákom z lietadla, pretože táto situácia predstavuje veľmi intenzívny stres, a to aj u skúsených parašutistov, pretože zoskok vždy predstavuje určité riziko. Pri zoskoku dochádza k silnej aktivácii sympatického nervového systému, čo sa odrazí vo vysoko zvýšených hodnotách adrenalínu aj noradrenalínu v moči parašutistov (Bloom a spol., 1963; Euler, 1964; Langoš a spol., 1972). Naše výsledky, čo do exkrécie katecholamínov (tabuľka 2) súhlasia s údajmi Blooma a spol. (1963). Aj aktivita DBH v plazme parašutistov ihneď po zoskoku je významne zvýšená (tabuľka 1), čo súhlasí s uvedenými výstupmi DBH po rôznych záťažach. Keďže cirkulujúca DBH pochádza hlavne zo sympatických nervových zakončení (Weinshilboum a spol., 1971; Weinshilboum a Axelrod, 1971b) a množstvo noradrenalínu v moči je tiež odrazom hlavne aktivity sympatických nervových zakončení, je pozitívna korelácia týchto dvoch indikátorov, dokázaná v našich pokusoch, ďalším potvrdením, že aktivita DBH v krvi je vhodným indiká-

Tabuľka 1

Vplyv zoskoku z lietadla na aktivitu enzýmu dopamín- β -hydroxylázy v plazme parašutistov

	Kontrola	Časový interval po zoskoku			
		ihneď	30 min.	60 min.	90 min.
Aktivita dopamín- β -hydroxylázy A n moly/1 ml/min.	1,65 $\pm 0,42$	5,43 $\pm 0,55$	2,98 $\pm 0,52$	2,67 $\pm 0,45$	3,18 $\pm 0,71$
n	14	17	17	17	16
p B	—	<0,001	NS	NS	NS

A Aktivita DHB je vyjadrená v nanomoloch substrátu (oktopamínu) premeneného za 1 minútu mililitrom plazmy. Hodnoty sú ako priemery $\pm$ SE.

B Statistická významnosť porovnaná s kontrolným odberom;
NS = nesignifikantná zmena

Tabuľka 2

Vplyv zoskoku z lietadla na exkréciu katecholamínov močom

	$\mu\text{g}/3$ hod.	
	Adrenalin	Noradrenalin
Kontrola	1,30 $\pm$ 0,23	3,86 $\pm$ 0,41
Po zoskoku	2,56 $\pm$ 0,27 §	6,63 $\pm$ 0,61 §

Hodnoty predstavujú priemernú exkréciu u 22 parašutistov $\pm$ S.E. Moč sa zbieral v intervale troch hodín po zoskoku. Kontrolný moč bol zbieraný deň pred zoskokom v rovnakom čase.

§ $p < 0,001$ voči kontrole

torom aktivity sympatiku u ľudí. Schanberg a spol. (1974) tiež opísali pozitívnu koreláciu plazmatickej DBH a katecholamínov v moči. Koreláciu medzi hladinami DBH a noradrenalinu v plazme pacientov dokázali Geffen a spol. (1973).

Z tabuľky 1 ďalej vyplýva, že už 30 minút po zoskoku sa aktivita DBH znižuje na hodnoty, ktoré už nie sú významne zmenené oproti kontrolám. Rush a Geffen (1972) dokázali, že u oviec vyplavená DBH sa degraduje hlavne v pečeni, pľúcach a ľadvinách a že poločas vymiznutia DBH z cirkulácie je asi 3 hodiny.

U ľudí vystavených záťaži sa dokázal poločas vymiznutia DBH z cirkulácie kratší ako 30 minút (Planz a Palm, 1973), čo by vysvetľovalo rýchly pokles DBH v našom pokuse. Aj keď poločas vymiznutia DBH z krvi je okolo 30 minút, je to doba podstatne dlhšia, ako poločas samotného noradrenalinu (okolo minúty), a preto DBH možno považovať za vhodný indikátor merania aktivity sympatiku.

V posledných mesiacoch sa objavili práce, ktoré považujú aktivitu DBH v plazme dokonca za vhodný indikátor klinického odlišenia primárnej formy hypertenzie od sekundárnej (Schanberg a spol. 1974). Táto, ako aj vyššie citované práce, svedčí o nevšednom záujme o dopamín- β -hydroxylázu z klinicko-fyziologického aj patofyziologického hľadiska. Touto prácou chceme aj my prispieť k objasneniu týchto zaujímavých otázok.

Záver

Názor, že sympatický nervový systém seceruje iba neurotransmitery, je už prekonaný. Je dokázané, že po nervovej stimulácii sa spolu s noradrenalinom uvoľňujú do cirkulácie procesom exocytózy aj špecifické proteíny, ktorých biologické aktivity sú zatiaľ neznáme.

Jedným z týchto proteínov je enzým dopamín- β -hydroxyláza, ktorého zvýšenú aktivitu sme dokázali v plazme parašutistov po zoskoku z lietadla. Zvýšená aktivita tohoto enzýmu v plazme priamo koreluje so zvýšenou exkréciou katecholamínov v moči parašutistov.

Naše výsledky potvrdzujú názor, že aktivita enzýmu dopamín- β -hydroxylázy v krvi je významným indikátorom sympatickej aktivity u ľudí.

Literatúra

1. Axelrod, J.: Dopamine- β -hydroxylase: Regulation of its synthesis and release from nerve terminals. *Pharmacol. Rev.*, 24, 1972, s. 233—243.
2. Bloom, G. Euler, U.S.v., Frankenhauser, M.: Catecholamine excretion and personality traits in paratroop trainees. *Acta Physiol. Scand.*, 58, 1963, s. 77—89.
3. Euler, U.S.v.: Quantitation of stress by catecholamine analysis. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 5, 1964, s. 398—404.
4. Euler, U. S. v., Lishajko, F.: Improved technique for the fluorimetric estimation of catecholamines. *Acta Physiol. Scand.*, 51, 1961, s. 348—355.

5. Freedman, L. S., Ebstein, R. P., Park, D. H., Levitz, S. M., Goldstein, M.: The effect of cold pressor test in man on serum immunoreactive dopamine- β -hydroxylase and on dopamine- β -hydroxylase activity. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharm.*, 6, 1973, s. 873—878.
6. Frewin, D. B., Downey, J. A., Levitt, M.: The effect of heat, cold and exercise on plasma dopamine- β -hydroxylase activity in man. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 51, 1973, s. 986—989.
7. Geffen, L. B., Rush, R. A., Louis, W. J., Doyle, A. E.: Plasma catecholamine and dopamine- β -hydroxylase amounts in essential hypertension. *Clin. Sci.*, 44, 1973, s. 421—424.
8. Geffen, L. B., Rush, R. A., Louis, W. J., Doyle, A. E.: Plasma dopamine- β -hydroxylase and noradrenaline amounts in essential hypertension. *Clin. Sci.*, 44, 1973, s. 617—620.
9. Gewirtz, G. P., Kopin, I. J.: Release of dopamine- β -hydroxylase with norepinephrine during cat splenic nerve stimulation. *Nature (Lond.)*, 227, 1970, s. 406—407.
10. Goldstein, M., Freedman, L. S., Bonnay, M.: Assay for dopamine- β -hydroxylase activity in tissues and serum. *Experientia*, 27, 1971, s. 632—633.
11. Horwitz, D., Alexander, R. W., Lovenberg, W., Keiser, H. R.: Human serum dopamine- β -hydroxylase. Relationship to hypertension and sympathetic activity. *Circ. Res.*, 32, 1973, s. 594—599.
12. Kaufman, S., Friedman, S.: Dopamine- β -hydroxylase. *Pharmacol. Rev.*, 17, 1965, s. 71—100.
13. Kvetňanský, R.: Transsynaptic and humoral regulation of adrenal catecholamine synthesis in stress. In: *Frontiers in Catecholamine Research*, Ed. E. Usdin, S. Snyder, New York, Pergamon Press 1973, s. 223—229.
14. Kvetňanský, R., Mikulaj, L.: Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology*, 87, 1970, s. 738—743.
15. Langoš, J., Mikulaj, L., Blažíček, P., Kvetňanský, R., Vencel, P., Vražda, L.: Odpověď kóry a dřeve nadobliček člověka na opakovanou záťaž. *Voj. zdrav. Listy*, 41, 1972, s. 167—170.
16. Planz, G., Palm, D.: Acute enhancement of dopamine- β -hydroxylase activity in human plasma after maximum work load. *Europ. J. Clin. Pharmacol.*, 5, 1973, s. 255—258.
17. Potter, L., Axelrod, J.: Properties of norepinephrine storage particles of the rat heart. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 142, 1963, s. 299—305.
18. Rahwan, R. G., Borowitz, J. L., Hinsman, E. J.: Evidence for secretory tubules in the adrenal medulla. *Arch. Int. Pharm. Ther.*, 206, 1973, s. 345—351.
19. Roffman, M., Freedman, L. S., Goldstein, M.: The effect of acute and chronic swim stress on dopamine- β -hydroxylase activity. *Life Sci.*, 12, Pt. II, 1973, s. 369—376.
20. Rush, R. A., Geffen, L. B.: Radioimmunoassay and clearance of circulating dopamine- β -hydroxylase. *Circ. Res.*, 31, 1972, s. 444—452.
21. Schanberg, S. M., Stone, R. A., Kirshner, N., Gunnells, J. C., Robinson, R. R.: Plasma dopamine- β -hydroxylase: A possible aid in the study and evaluation of hypertension. *Science*, 183, 1974, s. 523—525.
22. Smith, A. D.: Secretion of proteins (chromogranin A and dopamine- β -hydroxylase) from a sympathetic neurone. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B.*, 261, 1971, s. 363—370.
23. Viveros, O. H., Arqueros, L., Kirshner, N.: Release of catecholamines and dopamine- β -hydroxylase from the adrenal medulla. *Life Sci.*, 7, 1968, s. 609—618.
24. Weinshilboum, R., Axelrod, J.: Serum dopamine- β -hydroxylase activity. *Circ. Res.*, 28, 1971a, s. 307—315.
25. Weinshilboum, R., Axelrod, J.: Serum dopamine- β -hydroxylase: decrease after chemical sympathectomy. *Science*, 173, 1971b, s. 931—934.
26. Weinshilboum, R., Kvetňanský, R., Axelrod, J., Kopin, I. J.: Elevation of serum dopamine- β -hydroxylase activity with forced immobilization. *Nature, New Biology*, 230, 1971, s. 287—288.
27. Wetterberg, L., Aberg, H., Ross, S. B., Frödén, Ö.: Plasma dopamine- β -hydroxylase activity in hypertension and various neuropsychiatric disorders. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 30, 1972, s. 283—289.
28. Wooten, G. F., Cardon, P. V.: Plasma dopamine- β -hydroxylase activity. *Arch. Neurol.*, 28, 1973, s. 103—106.