

Adatok a porphyria cutanea tarda biokémiájához
és patogeneziséhez

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A József Attila Tudományegyetem Természet-
tudományi Karához benyújtja

KISS MÁRIA

Készült a Szegedi Orvostudományi Egyetem Bőr-
és Nemikórtani Klinikáján

S z e g e d

1982.

Alkalmazott rövidítések

ALA	- δ -aminolevulinsav
PBG	- porfobilinogén
ALAS	- δ -aminolevulinsav szintetáz
ALAD	- δ -aminolevulinsav dehidratáz
URO	- uroporfirin
KOPRO	- koproporfirin
PROTO	- protoporfirin
UROGEN	- uroporfirinogén
KOPROGEN	- koproporfirinogén
IZOKOPRO	- izokoproporfirin
PCT	- porphyria cutanea tarda
CEP	- congenitalis erythropoietikus porphyria
EPP	- erythropoietikus protoporphyrin
AIP	- acut intermittens porphyria
PV	- porphyria variegata
HC	- hereditær coproporphyrin
GSH	- redukált glutation
NAD	- nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	- redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADP	- nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NADPH	- redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
G6PD	- glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
SGOT	- szérumb glutaminsav-oxálcetsav transzamináz
SGPT	- szérumb glutaminsav-piroszőlősav transzamináz
LAP	- leucin-aminopeptidáz
γ -GT	- γ -glutamil-transzpeptidáz
HCB	- hexaklórbenzol



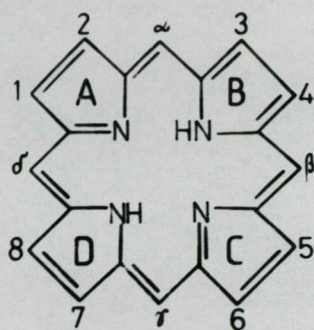
T a r t a l o m

Alkalmazott rövidítések	oldal
I. BEVEZETÉS	1
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
A hem kutatásának legismertebb állomásai	4
Porfirinkutatás Magyarországon	5
A hem bioszintézis rövid áttekintése	5
A porfirin anyagcsere betegségek jellemzése	11
Porphyria cutanea tarda /PCT/	15
III. SAJÁT VIZSGÁLATOK	24
Célkitűzések	24
Beteganyag és módszerek	27
Eredmények	30
Az eredmények értékelése; diszkusszió	40
1. A δ -aminolevulinsav dehidratáz enzimre	
1. vonatkozó vizsgálatok	40
2. Az ALAD aktivitás csökkenésének magya- rázata betegeink esetében	43
3. A redukált glutation szint csökke- nésének lehetséges okai a betegeknél	44
4. A szérum Zn^{2+} koncentráció csökkenése a betegekből	46
5. Betegeink δ -aminolevulinsav és porfirin ürítése	47
Eredményeink a betegség patogenezisére vonatkozó elképzelések tükrében	48
IV. ÖSSZEFOGLALÁS	51
Köszönetnyilvánítás	54
V. IRODALOM	55

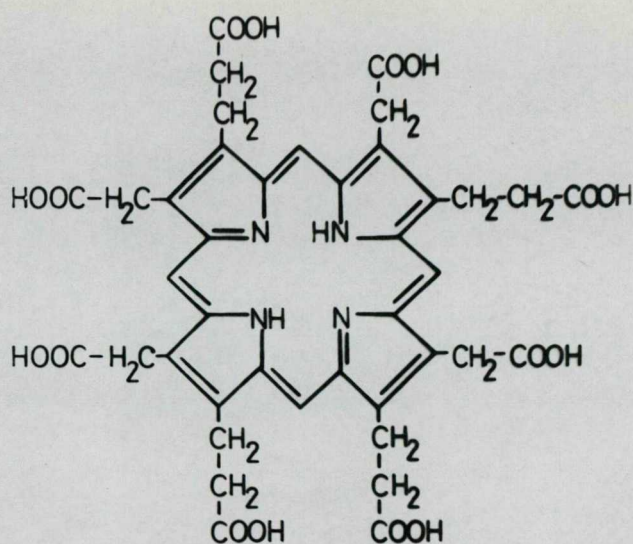
B e v e z e t é s

A porfirin vegyületcsoport általános előfordulása az élővilágban és nélkülözhetetlen bizonyos alapvető biokémiai mechanizmusok működéséhez.

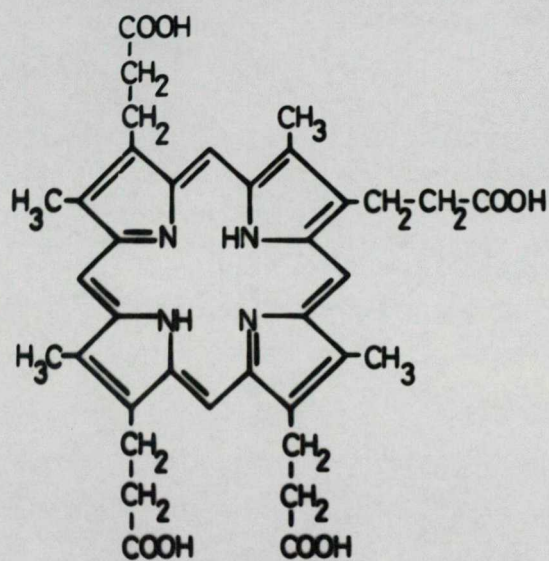
A porfirinek ciklikus tetrapirrol vegyületek, amelyekben a pirrol gyűrűk metén hidakkal kapcsolódnak össze α szénatomjaikon keresztül. Szabadon ritkán fordulnak elő, a különböző fémkomplexek a gyakoriak. A Mg-protoporfirin, amely a klorofill molekula központi része, a zöld növényekben a fotoszintézis biokémiai alapja. Az állati szervezetben a legfontosabb a ferro vas és a protoporfirin komplexe a hem. A hem részben az oxigént szállító és raktározó proteinek, a hemoglobin és a mioglobin alkotórészeként fordul elő, másrészt a különböző hemproteinek alkotórésze.



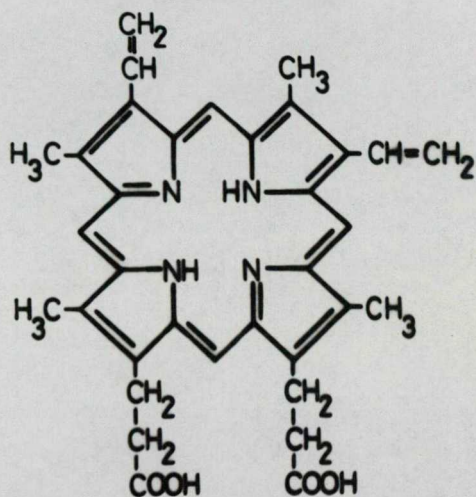
A porfirinváz
számozása



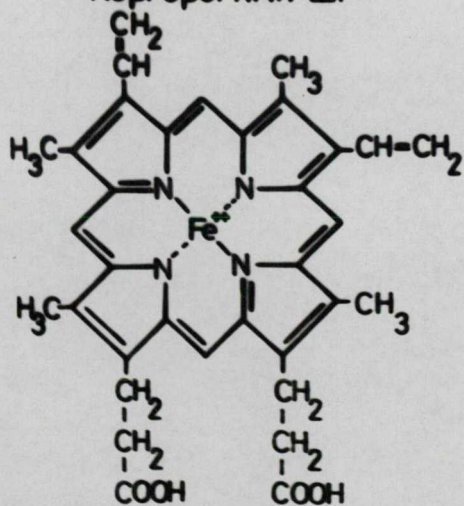
Uroporphirin III.



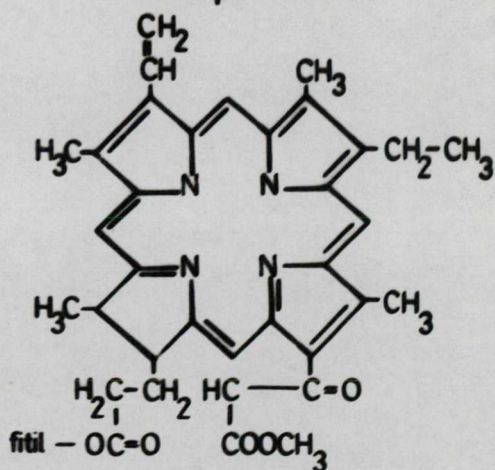
Koproporphirin III.



Protoporphirin IX.



Hem



Klorofill a

A többi hemprotein szintén nagy jelentőségű feladatokat látnak el. A katalázok, peroxidázok a hidrogén-peroxid eliminálásában vesznek részt. A különböző citokrómok a terminális oxidáció rendszerében lehetővé teszik a lépésenkénti energiahasznosítást, a máj mikroszómális oxidázai pedig a gyógyszerek, mérgek metabolizmusát biztosítják.

A hem és hemproteinek bioszintézisének és lebontási folyamatainak kutatását a múltban is és ma is az a cél vezeti, hogy megértsük azoknak a betegségeknek a természetét, amelyekben ezek a folyamatok károsodnak.

A hem és hemproteinek bioszintézisének és lebontásának kutatása, szabályozási mechanizmusok felderítése annál is időszerűbb, mert napjainkban egyre több betegségről és mérgezéses állapotról derül ki, hogy összefüggésben van a porfirin anyagcserével. Mindaddig míg a betegségek biokémiai alapjai nem tisztázódnak, oki terápia nem lehetséges.

A betegségek egyik csoportjánál, az ún. porfiriás kórképekben a zavar a porfirint szintetizáló enzimrendszer működésében keresendő. Ezekre a betegségekre jellemző, hogy a hemprotein képződés mértéke általában normális, de ugyanakkor a porfirinek és prekursoraik nagy mennyiségben szintetizálódnak és ürülnek a különféle exkrétumokkal.

A hem bioszintézis zavara emberben és állatban egyaránt bekövetkezhet különböző toxikus ártalmak hatására. Az ilyen szerek nagy része a vegyipar termékeként kerül forgalomba, és ha nem elég körültekintéssel alkalmazzák őket, az emberre is veszélyesek lehetnek. Gondoljunk a tömegmértű hexaklórbenzol mérgezésre Törökországban az 1950-es években, amely még 30 évvel később is érezteti hatását.

A környezetvédelmi szabályok be nem tartása szintén tragédiákhoz vezethet az ipari üzemek közelében. Ez történt 1976-ban az olaszországi Seveso-ban, ahol a 2,3,7,8-tetraklór-dibenz-P-dioxin /TCDD/ jutott ipari baleset következtében nagy mennyiségben a környezetbe, emberek tömegeit betegítve meg. Ez a szer a többi polihalogénezett aromás vegyülettel együtt szintén a hem bioszintézis zavarát okozza és porfiriás tüneteket idéz elő.

Az ólom, mint általános környezetszennyező, számos ponton támadja a porfirin anyagcserét is.

Mindezek alapján érhető, hogy a porfirin anyagcsere kutatása, az egyes porfiriás kórképek vizsgálata igen fontos terület.

Dolgozatomban a nálunk leggyakrabban előforduló porfiria tipussal, a "porphyria cutanea tarda" /PCT/ kórképpel szeretnék részletesebben foglalkozni. Előljáróban a legújabb irodalmi ismeretek alapján összefoglalni mindazt, amit a betegségről tudunk, majd saját vizsgálatok alapján néhány adattal kiegészíteni a PCT biokémiáját és patológiáját.

A hem kutatásának legismertebb állomásai

Scherer észlelte először 1841-ben /1/, hogy a hemoglobin tartalmaz egy piros színű, a fehérjerésztől elválasztható pigmentet.

A vasmentes pigmentnek a hemoglobinnal való előállítását Thudichum /2/ nevéhez fűződik /1867/, aki a pigment vörös fluoreszcenciáját is leírta és a pigmentet kristályosította. Ezek az eredmények átmenetileg feledésbe merültek, de pár évtized múlva újra felismerték jelentőségüket.

A klinikai porfirin kutatások Schultz /3/ munkásságával vették kezdetüket 1874-ben, aki bár téves diagnózist állapított meg, de egy örökletes porfiria tiszta kórképét írta le.

Soret /4/ 1883-ban felfedezte a porfirinek jellemző abszorpciós sávját a közeli UV-ben /400-405 nm/, ma ez Soret-sávként ismeretes.

A porfirinek pontos kémiai szerkezetére Hans Fischer munkássága derített fényt. Kutatásaiért 1930-ban kémiai Nobel díjjal jutalmazták.

A porfirin bioszintézis egyes lépéseinek tisztázása radioizotópok alkalmazásával Shemin és munkatársai nevéhez fűződik.

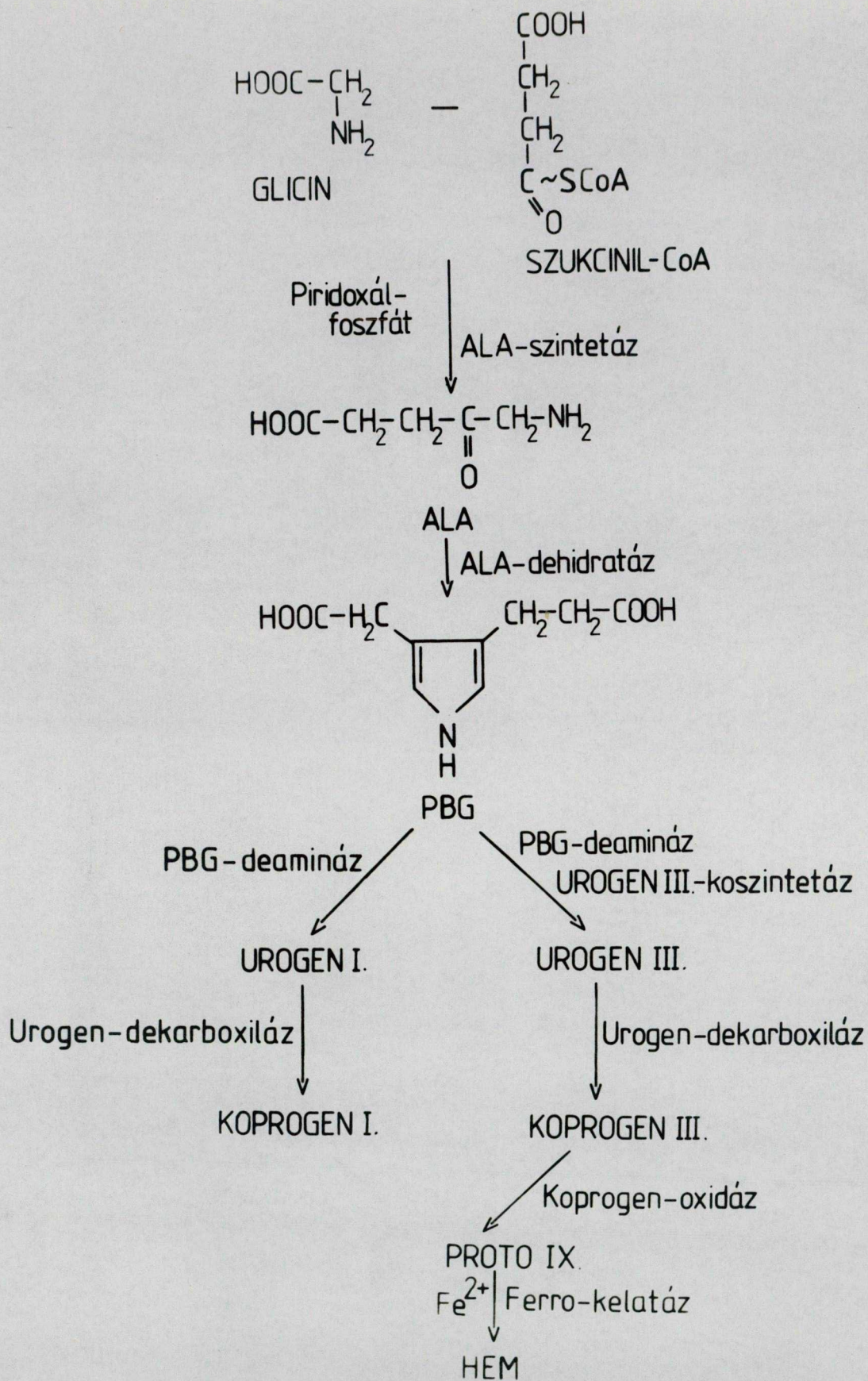
Porfirinkutatás Magyarországon

A porfirin anyagcsere betegségekkel kapcsolatos kutatások hazánkban Róth Imre és Udvardy László munkásságával vették kezdetüket. Ők 1931-ben /5/ ismertették első akut porfiriás esetüket. Az ólommérgezés során fellépő anyagcsere zavar kutatásában Róth Imre és Goreczky László fontos megállapításokat tettek. Goreczky építette ki a korszerű porfirin analízis hazai első centrumát.

A hem bioszintézis rövid áttekintése

A téma összefoglalását a 2. ábra mutatja.

A szintézisnek a glicin és a szukcinil - CoA a kiindulási anyagai. A glicin az aminosav anyagcseréből, a szukcinil-CoA a citrát körből áll rendelkezésre. A hem szintézis első specifikus közti terméke a δ -aminolevulinsav /ALA/, amely a Shemin-féle glicin-szukcinát ciklusban keletkezik a δ -aminolevulinsav szintetáz /ALAS/ /EC 2. 3. 1. 37./ enzim hatására. Az enzim működéséhez koenzimként piridoxál-foszfátot igényel. A reakció az α -amino- β keto-adipinsav közti termékén keresztül játszódik le.



2. ábra

Az emlős sejtekben az ALAS a mitokondriumokban található. Alacsony aktivitás más celluláris frakcióban is detektálható, de ez mitokondrium szétesés következménye is lehet. A fokozott porfirintermelést kiváltó anyagok hatására az aktivitás növekszik, ilyenkor jelentős aktivitás található a citoplazmában is. Mind a mitokondriális, mind a citoplazmatikus enzim a citoplazma riboszómáin szintetizálódik. Nukleinsav szintézist vagy protein szintézist gátló szerek jelenlétében az enzimaktivitás hirtelen lecsökken, jelezve, hogy az ALAS rövid életidejű.

Az ALAS enzimet a legkülönbözőbb szövetféleségekben mutatták ki, és sokáig az ALA képződés egyetlen útjának tartották. A zöld növényekben még nem sikerült kimutatni az ALA szintetázt, bár az bizonyított, hogy a klorofill szintézisének kiindulópontja szintén az ALA.

Varticovski és munkatársai /6/ 1980-ban egy olyan enzim működéséről számoltak be emlős máj mitokondriumokban, amely egy transzaminálási reakciót katalizál az alanin és a γ , δ -dioxo-valeriánsav között, ALA és piroszőlősav keletkezésével. Ez a mechanizmus az ALA képződés alternatív útja lehet, hiszen szubsztrátjai ugyanúgy rendelkezésre állnak a mitokondriumokban, mint az ALAS szubsztrátjai.

Az ALA útja az intermedier anyagcserében tovább haladhat a hem szintézis felé, vagy a Shemin ciklusban egyszerű deaminálási reakció során α -ketoglutaránszemialdehiden keresztül visszakanyarodik a citrát körbe.

A hem bioszintézis következő enzime a δ -aminolevulinsav dehidratáz /ALAD/ /EC 4. 2. 1. 24./ . Az ALAD katalizálja két molekula ALA kondenzációját egy molekula porfobilinogénné /PBG/, amely a különböző tetrapirrol vegyületek közvetlen prekurzora. Az ALAD természetét tekintve egy elég jól definiált enzim, számos fajból izolálták már és meghatározták fontosabb fizikai-kémiai tulajdonságait. Az enzim a citoplazmában lokalizált. Molekulasúlya nagyjából megegyezik a különböző fajok esetében, 240-280 ezer dalton.

Szintén általános tulajdonsága, hogy működéséhez -SH aktivátorok szükségesek, és -SH természeténél fogva a sejten belüli redoxváltozásokra igen érzékeny.

Az enzim hagyományos értelemben vett koenzimeket a működéséhez nem igényel. Nem metalloenzim, de in vitro adott Zn^{2+} az enzim aktivitását megnöveli /7/, sőt molekuláris biológiai kutatások során kiderült, hogy az aktív enzim maga is tartalmaz Zn^{2+} ionokat /8/.

Az enzim két specifikus inhibitora az Pb^{2+} /9/ és az etanol /10/. Széles irodalma van mindkettőnek. Hatásukat az enzim -SH csoportjainak blokkolásán keresztül fejtik ki. Az Pb^{2+} közvetlenül az -SH csoportokhoz kötődik, az etanol pedig egy átmeneti redoxpotenciál emelkedést idéz elő a sejtekben, így kedvezőtlen környezetet teremt az enzim működéséhez.

Az eritrocita ALAD aktivitás diagnosztikus jelentőségű a különböző fokú ólommérgezésekben.

Mivel az ALAD aktivitás a szövetekben általában sokkal nagyobb, mint az ALA szintetázé, feltételezhető, hogy ^{csekély} szerepe van a hem bioszintézis szabályozásában.



Ugy tűnik, hogy az ALA képződés a hemszintézis sebesség-meghatározó lépése /11/. Mégis az a tény, miszerint az ALAD optimális működéséhez erősen redukáló környezetet igényel, sejteti, hogy az intakt sejtek oxido-redukációs viszonyai befolyásolják az enzimaktivitást.

PBG-ből keletkezik az első porfirin termék az uroporfirinogén. A porfirinek a bioszintézis folyamán mint porfirinogének fordulnak elő, ezek a megfelelő porfirinek tetrahidro formái, a metén csoportok helyén metil csoportok vannak. A porfirinogén porfirin átalakulás nagyon könnyen, minden enzimműködés nélkül is végbemegy.

A természet által kitüntetett uroporfirinogén III. izomer képződése két enzim együttműködésének eredménye. Mindkét enzim a citoplazmában lokalizált. Ezt a porfobilinogénáz rendszert Booijs és Rimington fedezték fel 1957-ben /12/ emberi eritrocitákban. Ők mutatták ki, hogy két enzimből áll, a termotabilis PBG deaminázból, amely önmagában uroporfirinogén I-t készít, és a termolabilis izomerázból /uroporfirinogén III. kozintetáz/, a kettő együtt komplexet alkot.

A porfobilinogén deamináz /EC 4. 3. 1. 8./ katalizálja 4 molekula PBG kondenzációját, egy szimmetrikus tetrapirrol képződik és 4 molekula NH_3 szabadul fel. Az enzim működése során intermedierek nem izolálhatók, így arra következtethetünk, hogy a négy kondenzációs lépés

az enzim felületén történik egymásután, és az intermedierek is szorosan kötődve maradnak az enzimen.

Az uroporfirinogén III. koszintetáz nem reagál külön sem a PBG-vel, sem az uroporfirinogén I-el. Az uroporfirinogén III. koszintetázt olyan speciális enzimnek tekintik, amely valamilyen módon képes megváltoztatni az PBG deamináz által katalizált reakció mechanizmusát.

Az uroporfirinogén III. -ból koproporfirinogén III. képződik enzimatikusan, a négy karboxi-metil csoport metil csoporttá dekarboxileződik. Az enzim, amely a dekarboxilációs lépéseket katalizálja az uroporfirinogén dekarboxiláz /UD/ /EC 4. 1. 1. 37./, egyaránt megtalálható a bakteriális, a növényi és állati sejtekben. A citoplazmában fordul elő. Az enzim az I. izomer reakcióját is képes katalizálni, de a III. izomer esetén a legnagyobb a reakciósebesség.

A dekarboxilációs lépések után keletkező koproporfirinogén a koproporfirinogén oxidáz enzim szusztrátja. A koproporfirinogén oxidáz /EC 1. 3. 3. 3./ katalizálja az A és B gyűrűn lévő karboxi-etil oldalláncok oxidatív dekarboxilációját vinilcsoportokká. Az emlős sejtekben az enzim a mitokondriumokban található és a redukcióhoz molekuláris oxigént igényel /13/. A reakció végterméke a protoporfirinogén IX.

A protoporfirinogén minden különösebb enzim beavatkozás nélkül könnyen oxidálódik protoporfirinné a levegő

oxigénje hatására és sokan feltételezték, hogy in vivo is ez történik. Sano és Granick /13/ , valamint Porra és Falk /14/ közölték először 1961-ben, hogy az emlős máj-sejtek mitokondriumai tartalmaznak egy enzimet amely ezt a reakciót katalizálja. A protoporfirinogén oxidáz működéséhez koenzimeket nem igényel.

A hem bioszintézis végső enzime a hem szintetáz vagy más néven hem-ferrokelatáz /EC 4. 99. 1. 1./ elősegíti a Fe^{2+} inkorporációját a protoporfirinbe, hem keletkezik. Az enzim az állati sejtek mitokondriumaiban a belső membránhoz kötött /15/.

A porfirin anyagcsere betegségek jellemzése

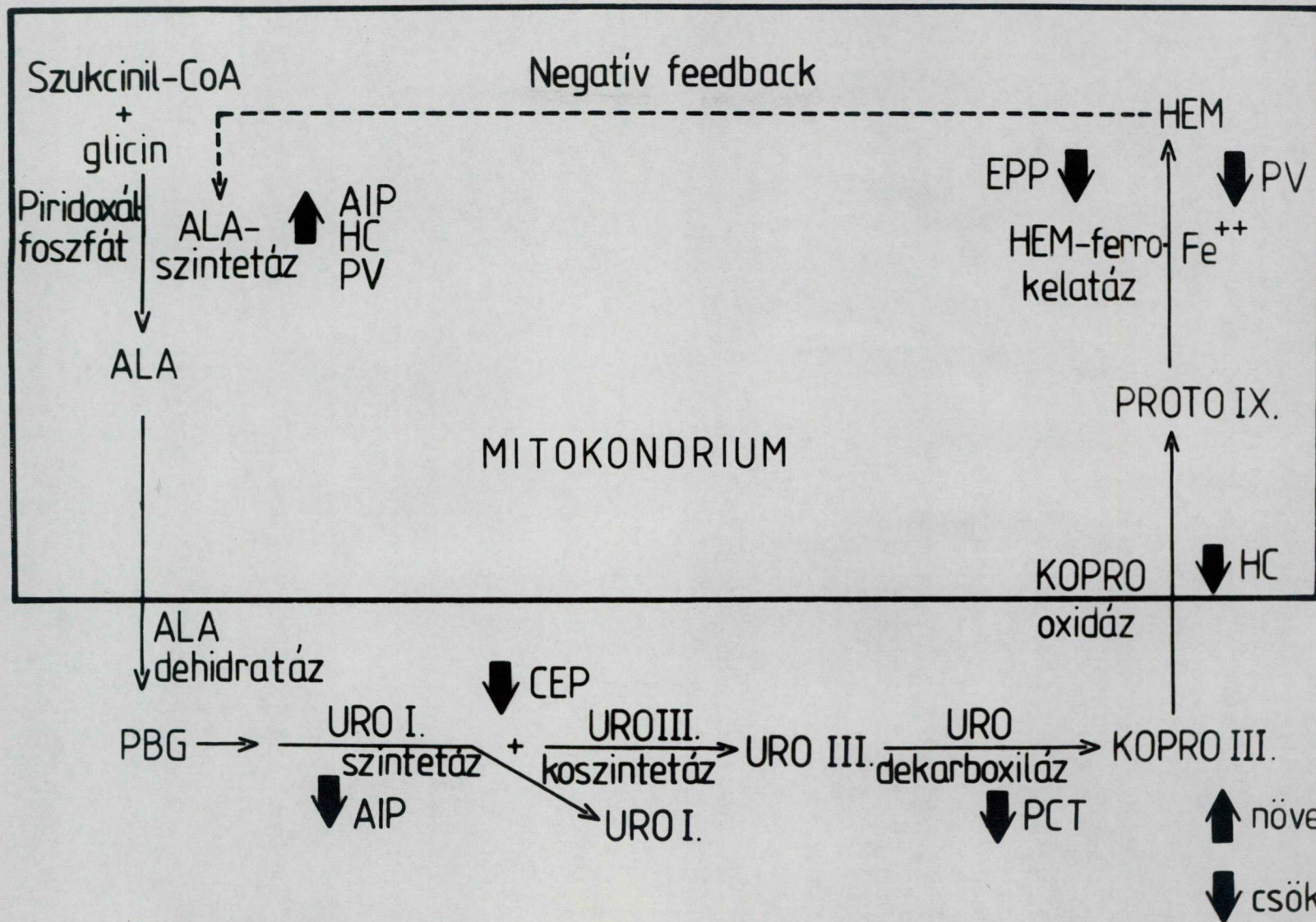
A porfiriák a hem anyagcsere zavarával összefüggő betegségek. A jellegzetes klinikai tünetek mellett jellemzi őket a hem bioszintézis közti termékeinek megjelenése a különböző exkrétumokban. Osztályozásuk nem egységes, mégis a Schmid és munkatársai /16/ által 1954-ben kidolgozott csoportosítás a legelfogadottabb az irodalomban. Attól függően, hogy a bioszintézis zavara melyik szervet érinti elsősorban, eritropoietikus és hepatikus porfiriákról szokás beszélni.

Mi magunk még sem ezt a csoportosítást követtük. Munkánk szempontjából célszerűbbnek láttunk különbséget tenni a bizonyítottan enzimdefektusokon alapuló kórképek

és az enzimzavarra egyértelműen vissza nem vezethető kórképek között.

A/ Enzimműködés csökkenésére egyértelműen visszavezethető porfiriás kórképek

Az enzimblokk következtében mindig az adott enzim előtti közti termék halmozódik fel és oldhatósági viszonyaitól függően megjelenik a különféle exkrétumokban. /A 3. ábra az egyes porfiriás betegségekben kimutatható enzim deficienciákat mutatja./ /17/



3. ábra

Ebbe a csoportba sorolható az egyik leggyakrabban előforduló porfiria az akut intermittens porphyria /AIP/, amelyet biokémiailag a PBG deamináz/ uroporfirinogén III. koszintetáz rendszer csökkent működése jellemez elsősorban. Így hem deficit jön létre. Másodlagos jelenséggént növekszik a hepatikus ALAS aktivitás, ennek következményeként a pirrol prekursorok, az ALA és a PBG nagy mennyiségben ürülnek a vizelettel.

A coproporphyria hereditaria-t /HC/ a koproporfirinogén oxidáz öröklött deficienciája okozza /18/. Ezzel a betegséggel is együttjár a hepatikus ALAS enzim indukciója és a következtében létrejövő masszív ALA és PBG ürítés.

Az eritropoietikus rendszert érintő, rendkívül ritka betegség a congenitalis erythropoietikus porphyria /CEP//19/ /Morbus Günther/, amelyet az I. izomer típusba sorolható porfirinek erőteljes felszaporodása jellemez az uroporfirinogén III. koszintetáz öröklött hipofunkciója következtében.

Az eritropoietikus hem-ferrokelatáz csökkent működésének /20,21/ következménye az erythropoietikus protoporphyria /EPP/, a protoporfirin kóros felszaporodása az eritrocitákban és a székletben. Hasonló kép alakul ki, ha a hem-ferrokelatáz enzim működését kémiai ágenesekkel bénítjuk. Elsősorban az -SH blokkolóknak van jelentőségük.

A porphyria variegata /PV/ a dél-afrikai fehér lakosság betegsége, családi előfordulása. A hem-ferrokelatáz

aktivitás csökkenése következtében a széklet protoporfirin állandóan emelkedett. Az ALAS indukciója pedig az ALA és PBG felszaporodásához vezet.

B/ Pusztán enzimműködés hiányára nem visszavezethető kórképek

Egyértelmű okként kezelhető enzimdefektust még nem sikerült bizonyítani. Ide sorolható a porphyria cutanea tarda /PCT/, amely ennél fogva sajátos helyet foglal el a porfiriák körében. Enzimanomáliák ebben a betegségben is kimutathatók, de bizonyított, és a tudományos közvélemény által elfogadott oki mechanizmus még nincs a birtokunkban. Így a betegségnek oki terápiája sincs.

Porphyria cutanea tarda /PCT/

Története

Günther eredeti osztályozásában /19/ 1911-ben a betegséget "haematoporphyrin chronica" néven említi, a porphyria cutanea tarda elnevezést Waldenström használta először 1935-ben /22/. With /23/, aki röviden áttekintette a PCT történetét a "porphyria cutanea chronica" elnevezést javasolta az eredeti Günther féle elnevezés emlékére.

Biokémiája

PCT-ben a hem bioszintézis három jellemző közti terméke halmozódik fel, a 8-karboxil-porfirinogén /UROGEN/,

a 7-karboxil-porfirinogén /HEPTA/ és a dehidro-izokopro-porfirinogén /IZOKOPROGEN/, ezek aztán irreverzibilisen oxidálódnak a megfelelő porfirinekké és az anyagcseréből kiküszöbölődnek. Az URO és a HEPTA a vizelettel, az IZOKOPRO a széklettel ürül. A vizelet az ürített porfirinektől vörös színű, és a közeli UV-ben /Wood fény/ intenzíven fluoreszkál. A vizelettel ürülő ALA és PBG mennyisége általában normál szinten marad.

1975-ben Kushner és munkatársai /24/ közölték első ízben, hogy PCT-s betegeknél és családtagjaiknál csökkent uroporfirinogén dekarboxiláz /UD/ aktivitást találtak. Logikai megfontolások alapján is ennek az enzimnek a defektusa volt várható a felhalmozódott közti termékek alapján. A betegeknél a májsejtek UD aktivitása 70 %-ban volt csökkent, az eritrocitákban 40 %-uknál. A tünetmentes családtagoknál ugyanabban a generációban szintén 40 %-ban volt csökkent az eritrocita UD aktivitás, a májat nem vizsgálták. Elder és munkatársai /25/ hasonló megfigyelést tettek a máj UD-re vonatkozóan, de ők az eritrocita UD aktivitást normálnak találták. Ez utóbbi munkacsoport az UD által katalizált mind a négy dekarboxilációs lépést megvizsgálta, míg az előbbieket csak az első lépést mérték.

Az UD enzimdefektus ellenére az összes hemszintézis mértéke a PCT-s betegekben normálnak tekinthető, valószínűleg

kompenzációs folyamatok eredményeként.

Ugy tűnik /26/, hogy az esetek egy részében, ahol családi halmozódás van, a betegség már fiatal korban megnyilvánul, az UD aktivitás csökkenés kimutatható mind a hepatocitákban, mind az eritrocitákban, valószínűleg az UD enzim öröklött deficienciája az elsődleges ok. Ez lenne a familiáris típusú PCT, amely az összes eseteknek csak töredékét alkotja. Topi és Gandolfo /27/ 1977-ben 200 eset közül 14 családi előfordulású esetet talált.

A másik, az un. szerzett forma sokkal problematikusabb. A betegség etiológiájában az esetek felében kimutatható az alkoholizmus és a vele összefüggésben lévő májkárosodás. Lehetségesnek tartják egyes szerzők, hogy ebben az esetben a betegséget az UD enzim szerzett deficienciája okozza.

Az UD enzimaktivitás csökkenésének mértéke azonban nem magyarázza az esetenként igen nagy fokú uroporfirin ürítést.

Klinikai megjelenés

A PCT szerte a világon előfordul. A férfiakon jóval nagyobb arányban, bár a hormonális antikonceptíviensek elterjedésével anőknön is egyre gyakrabban fordul elő.

A betegek a bőr fokozott fényérzékenységről panaszkodnak, elsősorban a kezeken. Sokuknál fokozott szőrnövekedés indul meg. A léziók leggyakrabban a kéz napnak kitett helyein, a nyak hátsó részén, a felső mellkason, a lábszáron és a lábon fordulnak elő. Az eróziók lassan,



hegesedéssel gyógyulnak. A hólyagok gyakran folyadékkal teltek. Akut fotoszenzitivitás ritkán észlelhető, de nyáron a tünetek súlyosbodnak.

Laboratóriumi vizsgálatok

Csak a klinikai kép alapján a diagnózis nem állítható fel, a kvalitatív és kvantitatív laboratóriumi vizsgálatok egyaránt fontosak.

Általában célszerű meghatározni a vizelet ALA és PBG mennyiségét, a vizelet összporfirint, a porfirin frakciókat, az izomerek mennyiségét és célszerű a széklet porfirin analízisét is elvégezni.

A vizelet ALA és PBG normál szokott lenni, a vizelet URO és HEPTA erősen emelkedett, az összporfirin mennyiség kb. 80 %-a. Ujabban az IZOKOPRO frakciót kimutatták a vizeletben is /28/. A széklet IZOKOPRO/KOPRO aránya emelkedett.

A vérképzésben semmiféle zavar nem észlelhető, az eritrociták protoporfirin szintje normál.

A májfunctiós értékek, a glutaminsav-oxálecetsav-transzamináz /GOT/, a glutaminsav-piroszőlősav-transzamináz /GPT/, a leucin-aminopeptidáz /LAP/, a γ -glutamil-transzpeptidáz / γ -GT/ aktivitások gyakran kórosak. A betegek több mint felénél megemelkedik a szérum vas / >160 ug/ml/, növekszik a százalékos vastelítés /55 % felett/.

A májbiopsziás mintákban a sziderózis megfigyelhető, a vas a májsejtekben és Kupfer sejtekben egyaránt felhalmozódik /29/.

Változó képű nekrozis, zsíros elváltozások, esetenként cirrhózis megfigyelhető, az utóbbi a betegek 5-20 %-ánál /30/.

Ultrastrukturális vizsgálatok a mitokondriumok károsodását, autofág vakuolumok megjelenését, a primer lizoszómák elvesztését és citoplazmatikus kristályokat mutatnak. A májminták Wood fényben vörösen fluoreszkálnak.

Környezeti faktorok

Alkohol, ösztrogének, vas, klórozott benzolok és fenolok provokálhatnak PCT-t.

ALKOHOL

Elsőként Szodoray és Sümegi /31/ 1944-ben hangsúlyozták az alkoholizmus szerepét a PCT patogenezisében. Az összes betegek kb. fele alkoholista. Mégis az alkoholistáknak csak 2 %-a PCT-s, ez feltétlenül valamiféle genetikai háttérrel sejtet. Az alkohol hatására vonatkozóan három lehetséges elképzelés adódhat. Az alkohol fokozott vasszorbírozást eredményez és a vas gátolja az UD aktivitást. Shanley és munkatársai /32/ megfigyelése szerint az alkohol megnöveli az ALA szintetáz aktivitást és így növekszik az UD rendelkezésére álló szubsztrát mennyisége. A harmadik elképzelés szerint az alkohol fokozott májsejtnekrozist eredményez, amelynek következtében a máj nem tudja kompenzálni a meglévő UD deficienciát.

Saját tapasztalataink szerint porfiriát kísérleti állatban alkohol adásával nem sikerült kiváltani /33/.

Az alkalmazott etanol koncentrációtól függetlenül csak a mérgezés klasszikus tünetei jelentkeztek, a vizelet koproporfirin szintje, a széklet kopro- és protoporfirin szintje emelkedett. Ezek alapján mi az alkoholt nem tartjuk direkt etiológiai faktornak. Bár az kétségtelen, hogy az alkohol szerepet játszik a PCT kiváltásában és súlyosbitásában.

ÖSZTROGÉNEK

Az újabb esetek mintegy felénél az ösztrogén előzmény megvan. Régebben is irtak a PCT előfordulásáról olyan férfiaknál, akiknek prostata carcinoma-ját dietilstilbesztrol-lal kezelték /34,35/.

Napjainkban a hormonális fogamzásgátlót szedő nők körében is előfordul a PCT, a tünetek a megszokott klinikai és biokémiai képet mutatják /36/.

Az ösztrogének PCT-t provokáló hatásának mechanizmusa egyelőre ismeretlen. Levere /37/ 1966-ban kimutatta, az ösztrogének stimulálják a hepatikus ALA szintetáz aktivitást. A májbiopsziák vizsgálata zsíros elváltozásokra, nekrozisokra derített fényt.

VAS

Alaposan vizsgált, de szintén nem tisztázott kérdés. A PCT-s betegek többségének megnövekedett vasraktára van, kb. kétszerese a normálnak.

Az alkoholizmussal összefüggő megnövekedett intestinális vASFelszívódás a betegek jó részénél beigazolódott.

A PCT-s állapot vasfelvételre súlyosbodik.

Ahol az alkoholizmus és a vastelítettség együtt fordul elő a PCT meglehetősen gyakori, például a bantu né-
gereknél.

KLÓROZOTT BENZOLOK ÉS FENOLOK

A legfontosabb PCT-vel összefüggő klórozott származék a hexaklórbenzol /HCB/. 1956 és 1961 között Törökországban mintegy 4000 esetet irtak le. Az ok egy fungicid volt, a

HCB, amelyet a gabona csávázására használtak, majd később ezt a gabonát is elfogyasztották. Kb. hat hónappal a táplálék elfogyasztása után az áldozatok gyengeségről, fáradékonyságról panaszkodtak, hólyagok jelentek meg a bőrükön és fényérzékenységet tapasztaltak. Később kiterjedt hipertrichózis és hiperpigmentáció fejlődött ki. A vizelet porfirin analízise tipikus, a PCT-re jellemző eloszlást mutatott.

Cripps és munkatársai a közelmúltban vizsgálat alá vettek 32 volt török porfiriás esetet /38/. Néhány beteg közülük még mindig emelkedett porfirin értékeket mutatott. A HCB szöveteikben még mindig kimutatható 20 évvel az expozíció után!

A különböző klórozott fenolok és bifenilek szintén erőteljes porfirinogén ágensek. Hatásuk erőssége szerkezet-től függő.

Szerencse a szerencsétlenségben, hogy 1961 óta a HCB-vel

mérgezett patkány kiváló modelljét képezi az emberi PCT-nek /39/. Az állatok táplálékához kevert HCB hatására néhány hét elteltével az állatokon megjelennek a PCT klaszikus tünetei, a vizelettel nagy mennyiségű uroporfirin ürül. A vasterhelés sietteti a PCT kialakulását, de nélkül is kiváltható.

A HCB hatásmechanizmusa még vitatott kérdés. In vitro vizsgálatok arra utalnak, hogy a HCB közvetlenül gátolja a hepatikus UD működését /40,41/. Nagyobb a valószínűsége a membrán-elképzelésnek, vagyis a HCB a természetes membránok rendezettségét csökkenti, így a membránok aktív és passzív transzportja károsodik /42, 43/.

Terápia

A PCT kezelése a kiváltó faktorok /amennyiben ezek ismertek/ eliminálódásával kezdődik. Ez természetesen nem elegendő. Amikor bevezető faktornak az alkohol tűnik, jó eredmény várható a teljes absztinenciától.

A legeredményesebb terápia a vérlebocsátás, a phlebotomia. Ezt a kezelési módot Ippen vezette be 1961-ben /44/, azóta széles körben alkalmazzák. A szokásos módszer az, hogy 500 ml vért vesznek le minden 1-3 hétben. A kezelést hónapokig folytatják, mindaddig míg a vizelet uroporfirin hirtelen lecsökken, vagy a hemoglobin szint egy bizonyos kritikus érték alá esik. A terápia oki mechanizmusa még nem tisztázott.

A vasraktárak ürülése valószínűleg szerepet játszik a gyógyulásban, mert az egyidejűleg adagolt vas a phlebotomia terápiás effektusát rontja /45/.

Bár a kezelés abbahagyása után a betegek 5-10 %-a visszaesik, az ismételt kurára jól reagálnak.

Egy alternatív terápia a kloroquin kezelés /7-kloro-4-4-dimetilamino-1-metilamino/quinolin/. A kloroquin egyike azoknak a gyógyszereknek, melyeket a II. világháború folyamán fejlesztettek ki maláriaellenes szerként. Később más betegségekben is jó hatásúnak bizonyult. 1957-ben London /46/ közölte először, hogy a PCT kezelésére használta a kloroquint.

A kezdeti próbálkozások során nagy, 500 mg napi dózisban adták a szert 5-8 napon keresztül. Ez a magas dózis egy ún. "kloroquin reakciót" hozott létre, amelyet hányás, láz, émelygés, hasi fájdalmak jellemeztek. A vizelet uroporfirin és a szérum transzaminázok aktivitása extrém módon megemelkedett. Ezt a rövid, de intenzív szakaszt pár hét múlva teljes klinikai és biokémiai remisszió követte. Napjainkban egyre inkább az alacsony dózisu kezelést alkalmazzák, éppen a mellékhatások kivédése céljából.

A kloroquin hatásának mechanizmusa még vitatott kérdés. Ugy tűnik, hogy a szer az uroporfirinnel komplexet a májban, amely aztán gyorsan kiválasztódik /47/. Taljaard és munkatársai /48/ 1972-ben kimutatták, hogy a kloroquin vasat köt meg a májsejtekben és növeli a vizelettel ürülő vas mennyiségét.

A kezelés egyéb módjai, az alkalinizáció, az E vitamin, a piridoxál-foszfát adagolás, a különböző kelátorok alkalmazása csak szűk körben elterjedtek. Egy-egy esetben jó eredmény érhető el velük, de korántsem annyira megalapozottak, mint az előbbieken ismertetett terápiák.

Saját vizsgálatok célkitűzései

Klinikánkon már hagyományai vannak a porfirin anyagcsere betegségek kutatásának. Tekintettel arra, hogy a környezetünkben leggyakrabban előforduló porfiria típus a porphyria cutanea tarda /PCT/ ezen betegség patogenezisének kutatása áll a középpontban. Mivel klinikánk ilyen irányú profilja országszerte ismert, viszonylag nagyszámú PCT-s beteganyagunk van.

A porfiriák tanulmányozásánál a hem bioszintézis enzimeinek tanulmányozása elsődleges fontosságú.

Elméleti megfontolások alapján PCT-ben az uroporfirinogén dekarboxiláz enzim csökkent működése várható. Ez az esetek egy részében kétségtelenül megvan, elsősorban a PCT viszonylag ritka, családi előfordulású eseteiben igazolódott. Az alkoholizmus, májkárosodás vagy toxikus ártalmak talaján kialakuló PCT eseteiben azonban önmagában nem tehető felelőssé valamennyi tünetért.

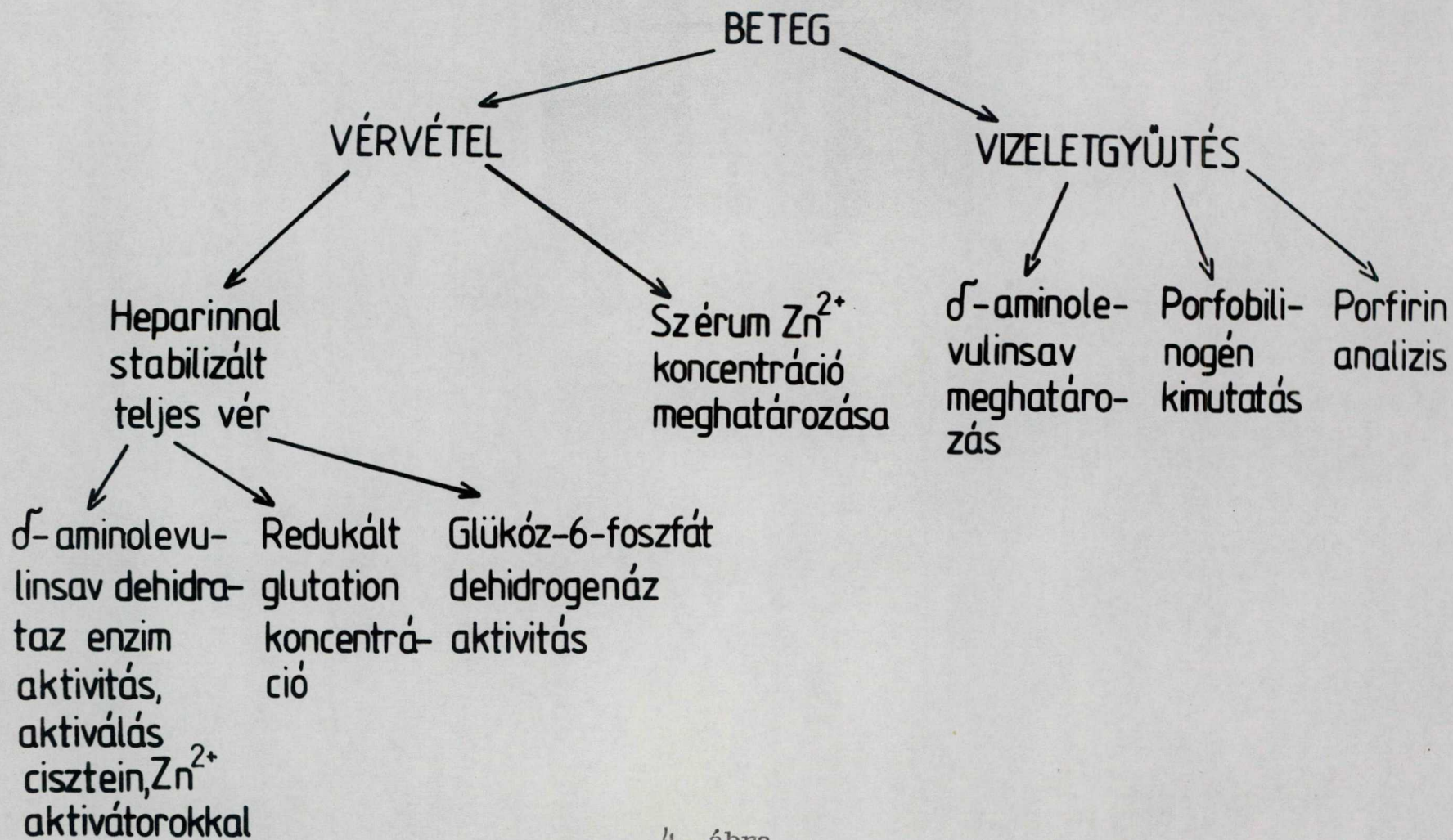
A kérdést mi egy másik oldalról közelítettük meg. Ismert ugyanis, hogy a bioszintézis láncban a porfirinek porfirinogén alakban vesznek részt, és ha a megfelelő porfirinekké oxidálódnak, metabolikusan inertté válnak, kiválasztódnak. Így a szervezet különböző szöveteiben bekövetkező redoxváltozások szintén figyelmet érdemelnek /49/. Ezt az elképzelést alátámasztani látszik az a megfigyelés, hogy a PCT terápiájában az E vitamin, talán mint antioxidáns, esetenként igen jó hatásúnak bizonyult. /50, 51/.

Az általunk kiválasztott enzim a δ -aminolevulinsav dehidratáz volt, amely a porfirin bioszintézis ritkán vizsgált enzimei közé tartozik. Sebességmeghatározó szerepet nem tulajdoníthatunk neki, de a redoxváltozásokra -SH természeténél fogva nagyon érzékeny.

Első kísérleti tapasztalatunk - az eritrocita ALAD aktivitás csökkenése a betegekben - indította meg további vizsgálatainkat. Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk mi állhat az enzimaktivitás csökkenésének hátterében.

Ezért megvizsgáltuk az enzim aktiválási viszonyait, a vérben természetesen jelenlevő enzimaktivátorok mennyiségét, valamint az eritrociták energiaháztartásában fontos szerepet játszó glükóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim aktivitását PCT-s betegeinkben. Összefüggést kerestünk a fenti tényezők, valamint a betegeink porfirin ürítése között.

Munkánk tematikáját a 4. ábra mutatja.



4. ábra

Beteganyag és módszerek

1. Kontroll csoport

A klinikánkon fekvő 36 porfirin anyagcsere betegségben nem szenvedő egyén alkotta.

2. PCT-s betegek

A csoportot frissen diagnosztizált bennfekvő betegek és régebben megállapított, ellenőrző vizsgálatokra rendszeresen visszajáró betegek alkották, 29-65 év közöttiek voltak. Nem szerinti megoszlásuk 39 férfi és 3 nő.

A PCT-re jellemző elváltozások minden betegnél fennálltak. Emelkedett GOT, GPT, LAP, γ -GT aktivitások, a májscintigráfiás kép alapján hepatomegália, néhányuknál mérsékelt zsírosodás és sziderózis megfigyelhető. Mivel betegeink nagy része rendszeres alkoholfogyasztó a saját bevallása szerint, számukra szigorúan megtiltottuk, hogy a vizsgálatot megelőző 12 órában szeszes italt fogyasszanak. Néhány esetben vér-alkoholszint vizsgálatot is végeztettünk ennek ellenőrzésére. A véralkohol vizsgálatot a SZOTE Igazságügyi Orvostani Intézetében végezték el számunkra.

Az ALAD enzim aktivitás mérése

Coleman /52/ Mitchell és munkatársai /53/ által módosított eljárását követtük. A vizsgálatához szükséges teljes vért vénapunkcióval nyertük. Antikoagulánsként heparint használtunk. A mintákat hűtve tároltuk és a vizsgálatot még aznap elvégeztük. A Mitchell és munkatársai által

közölt módszert annyiban módosítottuk, hogy aktiváló szerként ciszteint használtunk a redukált glutation helyett. Első lépésként meghatároztuk az aktiválószerrek optimális mennyiségét, és a továbbiakban ezzel dolgoztunk. A hozzáadott cisztein mennyiségét 10-100 /mmol/l/ között, a hozzáadott Zn^{2+} mennyiségét 10^{-8} - 10^{-1} /mol/l/ között változtattuk.

A reakcióelegyek összeállítása 0-4 °C -on történt.

Anyagok	Nem aktivált	Aktivált
Triton-X-100 /5 ml/1000 ml/	1,6 ml	1,2 ml
Teljes vér	0,2 "	0,2 "
Cisztein /10-100 mM/l/	-	0,2 "
Zn^{2+} / 10^{-8} - 10^{-1} M/l/	-	0,2 "
ALA szubsztrát /50 mM/l , oldva pH 6,7 foszfát pufferben/	0,2 "	0,2 "

A reakcióelegyek összeállítása után 50 °C-es vízfürdőben inkubáltunk 10 percig. Majd lehűtöttük a mintákat és mindegyikhez 2 ml fehérjekicsapó reagenst adtunk /10 %-os triklórecetsav, amely tartalmaz 27,2 g HgCl_2 -ot literenként/. A kicsapódott fehérje eltávolítása céljából centrifugáltunk. Utána a felülúszókból kivettünk 2 ml-t és 2 ml módosított Erlich reagenst adtunk hozzá.

/Az Erlich reagens összetétele: p-dimetil-amino-benzal-dehid 20 g/l , jégecet 14,6 mol/l , perklórsav 1,9 mol/l/

15 perc múlva mértük az oldatok extinkcióját 555 nm-en vakkal szemben /a vak ALA-t nem tartalmazott/.

Az enzimaktivitást μmol PBG /ml teljes vér h egységben fejeztük ki.

A teljes vér redukált glutation /GSH/ koncentráció mérése

A Beutler és munkatársai /54/ által közölt módszer alapján történt. Az előbbiekhöz hasonlóan szintén heparinnal alvadásgátolt teljes vérrel dolgoztunk. A hemolizált, majd metafoszforsavval fehérjementesített vérmintához foszfát-puffer jelenlétében adtuk a színreagenst /5,5'-ditiobisz-2-nitrobenzoesav/, amely a szulfhidril vegyületekkel stabil sárga színt ad. A cisztein is adja ezt a reakciót. Az extinkciót 412 nm-en mértük. A koncentrációt mmol GSH/l teljes vér egységben adtuk meg.

Eritrocita glükóz-6-foszfát dehidrogenáz /G6PD/ enzimaktivitás mérése

Marks /55/ módszere alapján dolgoztunk. Az enzim működéséhez NADP koenzimet igényel, a $\text{NADP} \rightarrow \text{NADPH}$ átalakulás sebességének mérése alapján határoztuk meg a G6PD aktivitást. Az eredményeket μmol NADPH/perc hemoglobin g egységben adtuk meg.

A szérum Zn^{2+} koncentráció mérése

Atomabszorpciós módszerrel végeztük Fernandez és Kahn /56/ leírása alapján. A koncentrációt $\mu\text{mol/l}$ szérum egységben adtuk meg.

A vizelet ALA koncentráció mérése

Az ALA meghatározására Mauzerall és Granick /57/ Berkó és Durkó /58/ módosított módszerét használtuk.

A vizelet PBG kimutatása

A klinikai diagnosztikában használatos Watson-Schwartz teszttel /59/ dolgoztunk.

A vizelet porfirin analizise

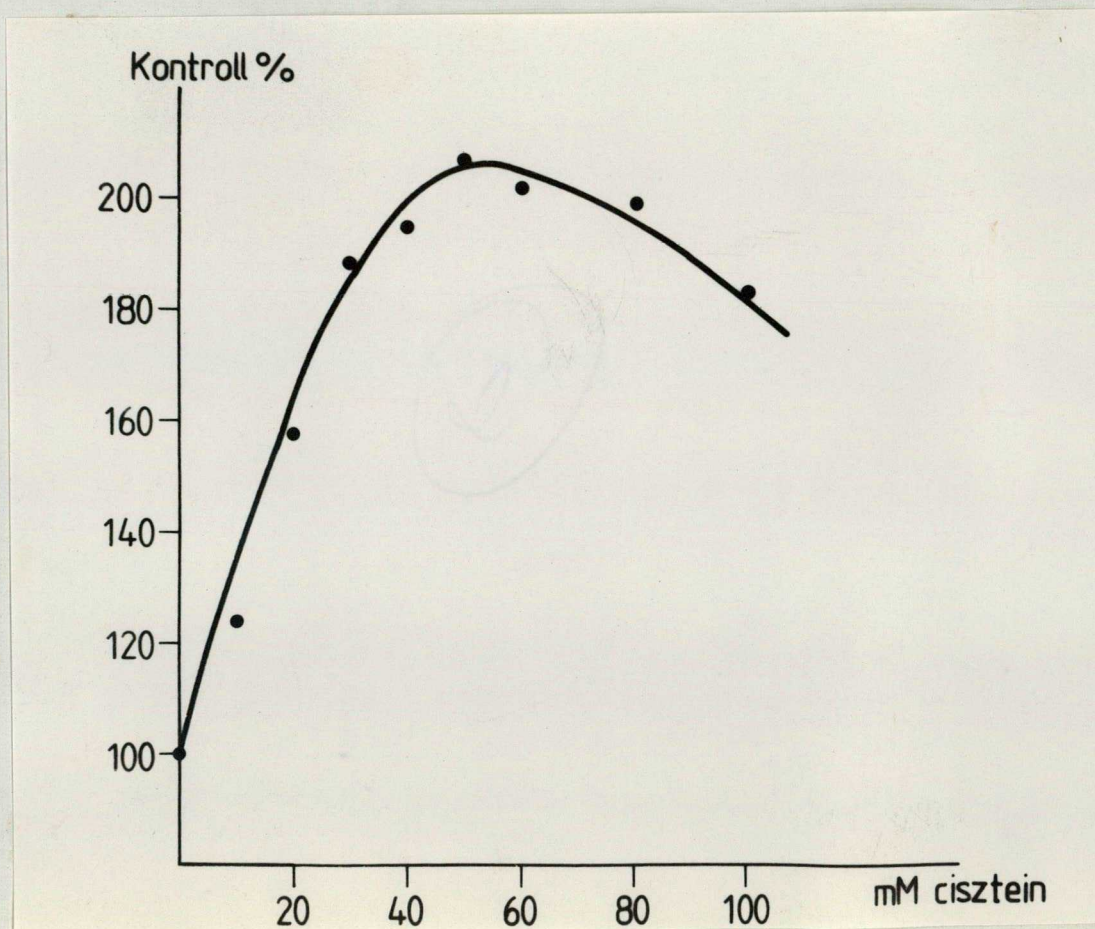
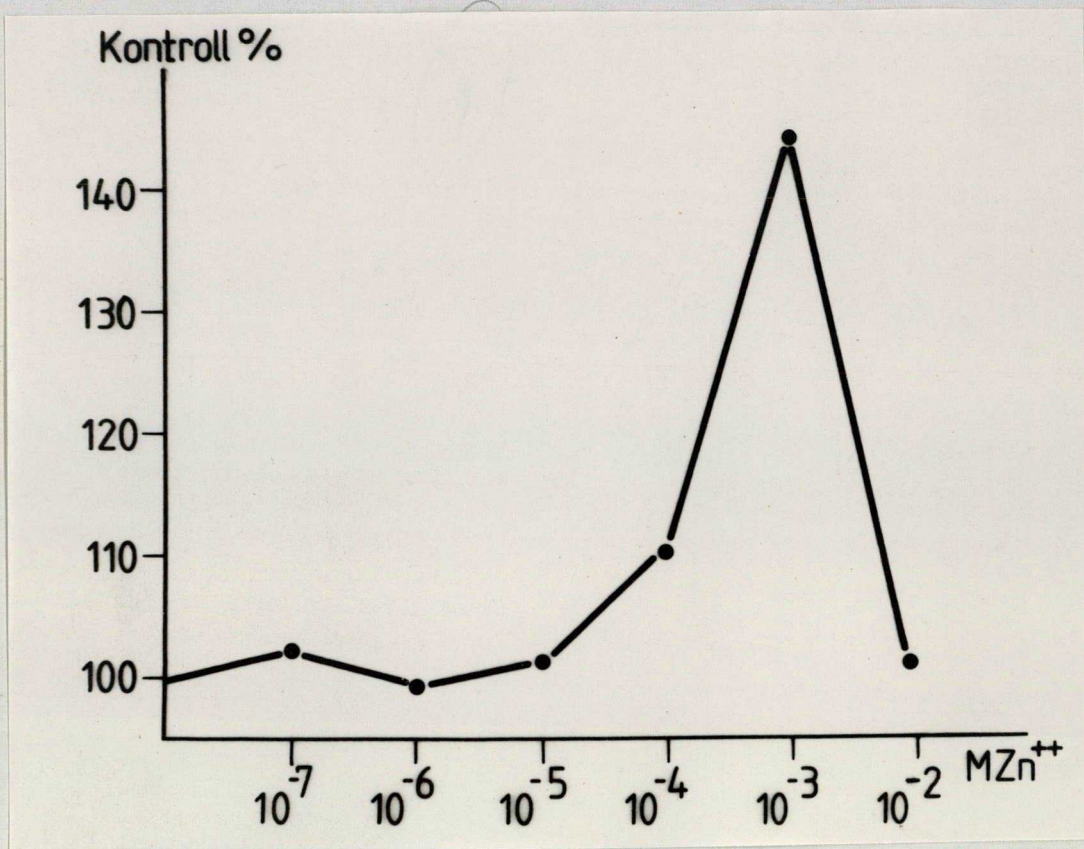
Doss /60/ nyomán rétegekromatográfiás eljárással történt. A vizsgálatot 24 h-s gyűjtött vizeletből végeztük. A porfirineket ecetsavas közegben talkumra adszorbeáltuk, majd a vizeletmaradéktól való átmosás után a porfirineket 10 %-os kénsavas metanollal oldottuk le a talkumról. Spektrofotometriásan meghatároztuk a porfirinek összmenyiségét.

A kromatografáláshoz a porfirineket a kénsavas metanolban egy éjszakán át állni hagytuk, észteresedés következett be. Majd a keletkezett porfirin észtereket kloroformos fázisba átvive szilikagélen megfuttattuk benzol:etilacetát:metanol 85 : 13,5 : 1,5 arányú elegyében. A kromatogramokat Wood fényben előhívtuk, az egyes porfirin frakcióknak megfelelő sávokat bejelöltük, lekapartuk, eluáltuk 5 N HCL-val, majd kvantitatív mérést végeztünk.

Eredmények

Először meghatároztuk az ALAD enzim aktivitásához szükséges cisztein és Zn^{2+} aktivátorok mennyiségét optimális mennyiségét.

Az eredményeket az 5. ábra szemlélteti.



Ezek ismeretében kontroll csoportunknál és PCT-ben szenvedő betegeinknél minden esetben megmértük a normál eritrocita ALAD aktivitást $/ALAD_{nem\ akt}/$, az ALAD aktivitást optimális mennyiségű cisztein $/50\text{ mM}/l/$ és $Zn^{2+}/10^{-3}\text{ M}/l/$ aktivátorok jelenlétében $/ALAD_{akt}/$ és megvizsgáltuk az $ALAD_{akt}$ és $ALAD_{nem\ akt}$ egymáshoz való viszonyát, képeztük az $\ln /ALAD_{akt}/ALAD_{nem\ akt}/$ hányadost. Az eredményeket a 6-8. ábrák mutatják.

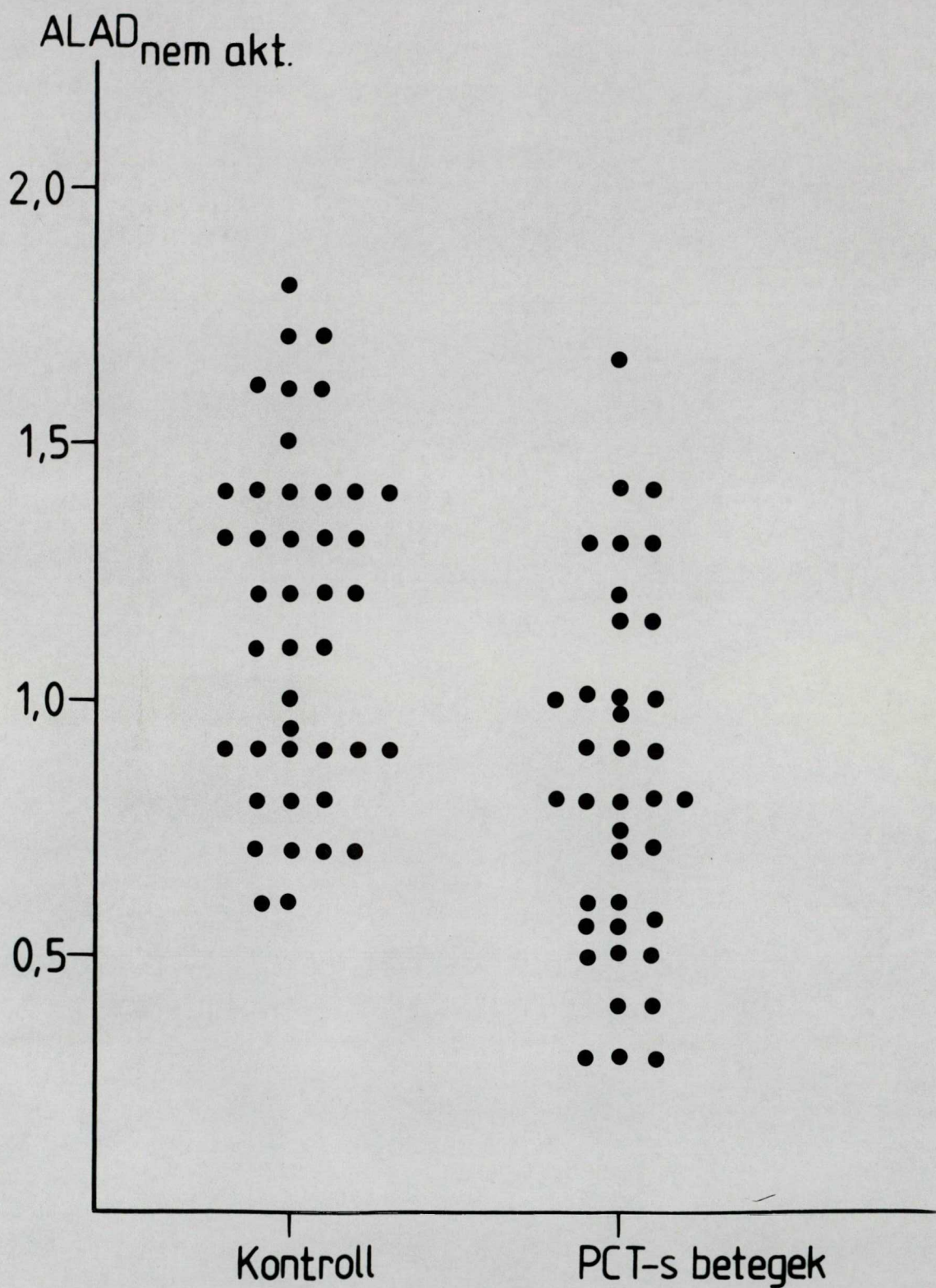
A vérben természetesen jelenlevő aktivátorok, a redukált glutation mennyiségét és a Zn^{2+} koncentrációt a 9-10. ábrák jelzik.

Hasonlóképpen ábráztuk az eritrocita glükóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitást a két vizsgálati csoportban /11. ábra/.

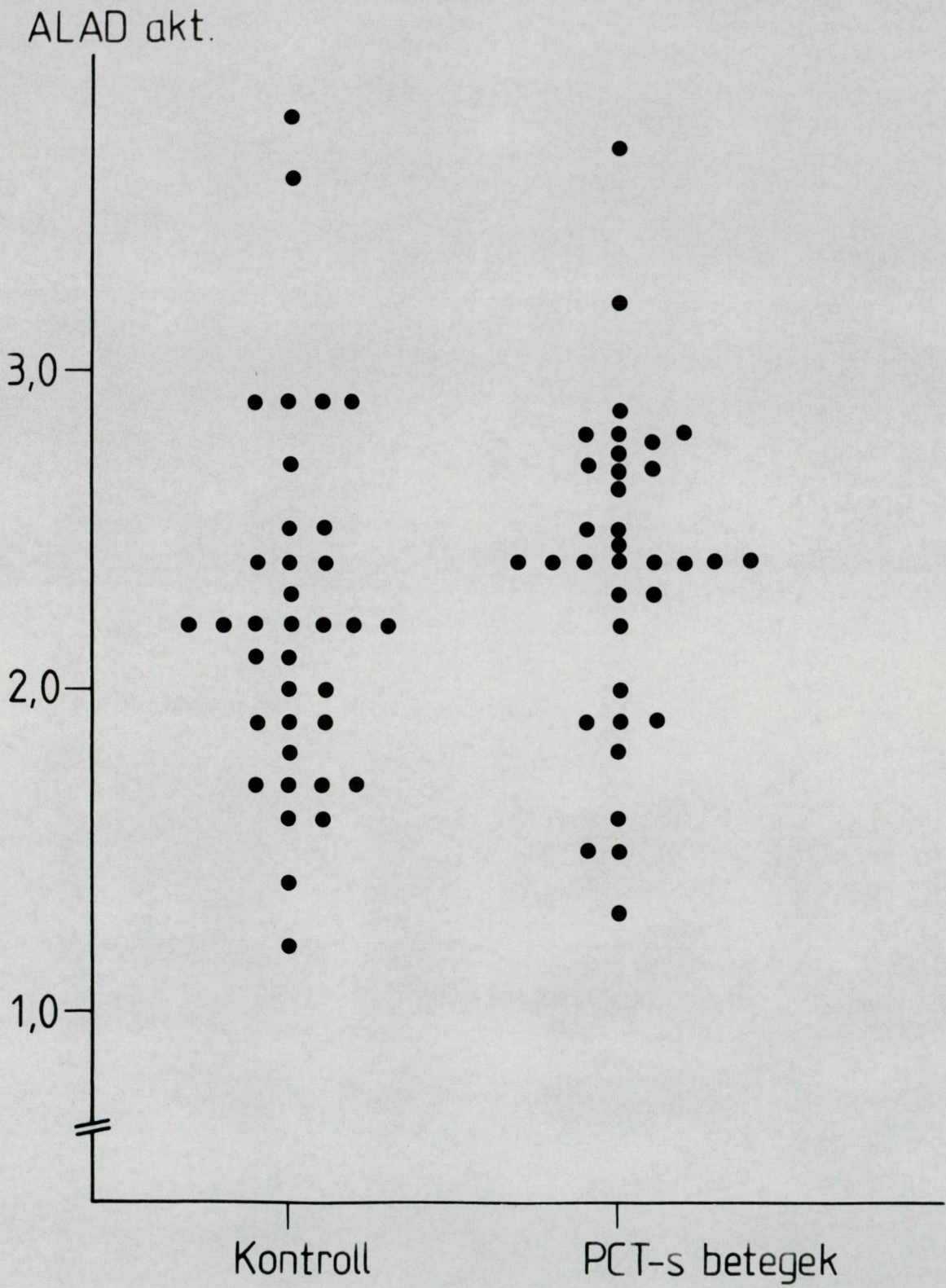
A vizelet ALA és porfirin analízisének eredményeit az I. táblázatban foglaltuk össze.

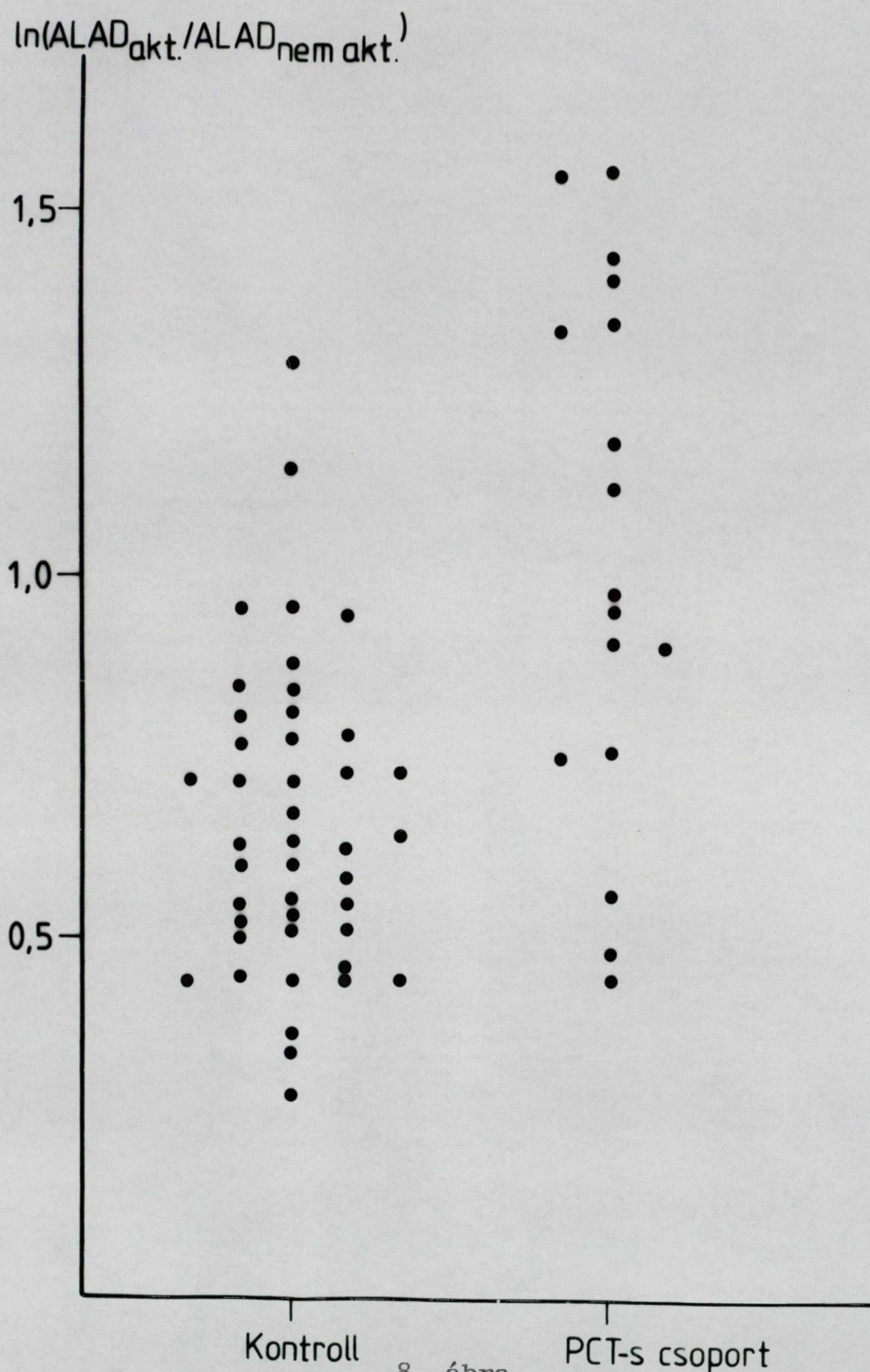
Betegeink vizeletében PBG-t nem lehetett kimutatni.

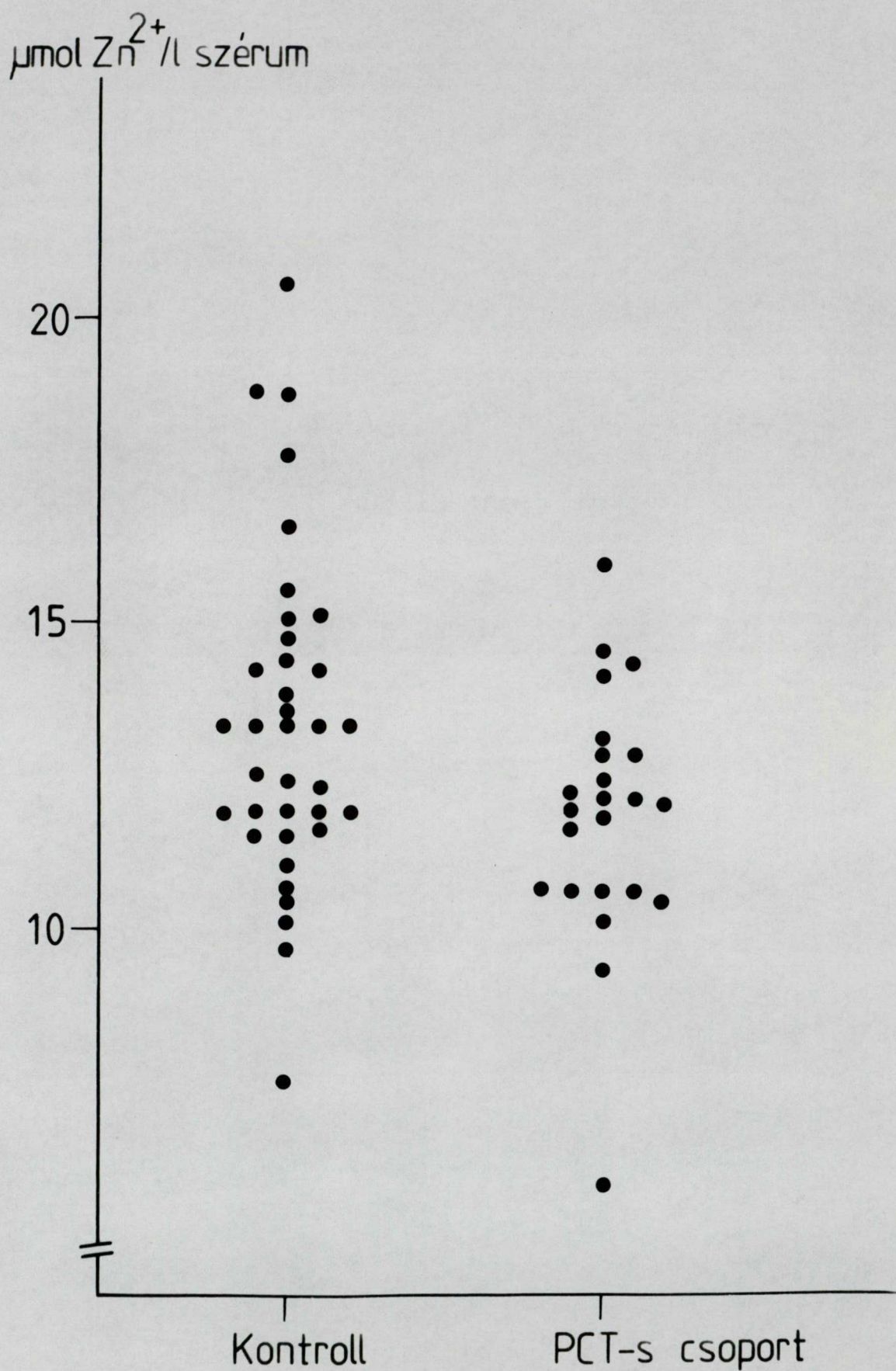
Normálértékek: vizelet összporfirin $250\text{ }\mu\text{g}/24\text{ h}$ értékig, uroporfirin nem mutatható ki. Az átlag normál porfirin ürítés $50\text{ }\mu\text{g}/24\text{ h}$. Az ALA ürítés $10\ 000\text{ }\mu\text{g}/24\text{ h}$ értékig önmagában nem kórjelző. A PBG egészséges vizeletből nem mutatható ki.



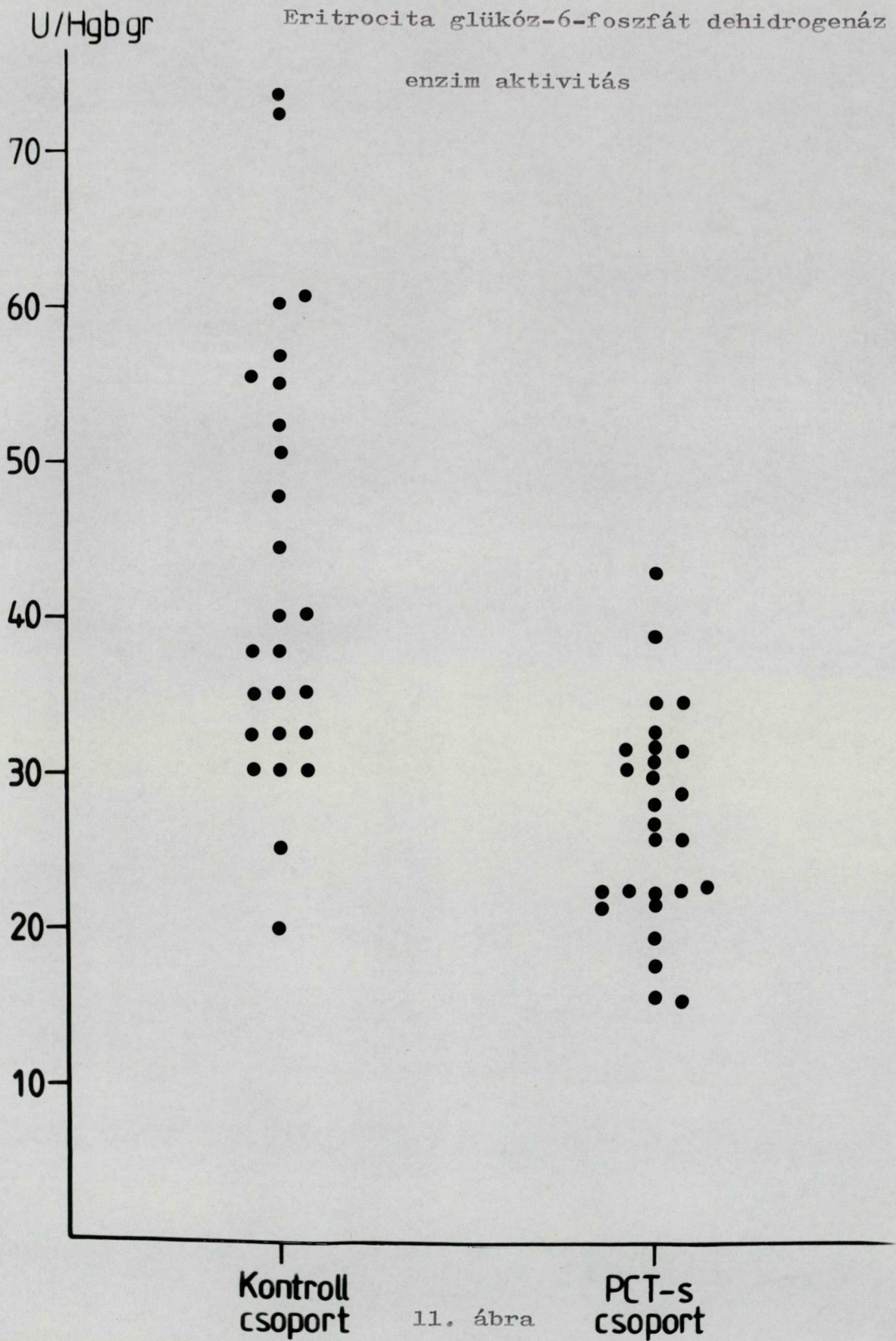
6. ábra







10. ábra



I. táblázat

PCT-s betegeink ALA és porfirin ürítése

Betegek	Vizelet	Vizelet	Porfirin analízis		
	ALA /µg/nap/	összporfirin /µg/nap/	URO /%/	HEPTA /%/	KOPRO /%/
1	6304	629	66,2	17,8	15,8
2	3374	1098	60,7	32,1	5,9
3	3720	401	83,5	15,7	0,5
4	3040	1266	53,8	37,0	3,7
5	4508	4180	72,2	23,6	1,9
6	3404	1782	53,4	37,7	5,2
7	1424	502	51,9	12,7	31,3
8	2922	302	53,0	25,0	19,3
9	3664	716	50,7	29,1	17,6
10	7617	1281	75,9	15,1	4,3
11	5449	4238	66,4	33,2	-
12	2774	2434	68,1	25,9	5,1
13	1835	121	-	-	-
14	1228	860	77,1	14,2	8,7
15	1136	735	72,8	22,3	4,1
16	2961	4038	77,1	14,2	8,7
17	4292	164	-	-	-
18	5815	1610	92,3	3,5	2,4
19	5712	3482	49,2	28,3	14,5
20	5667	11507	25,9	51,6	7,0
21	4356	667	85,7	5,0	9,3
22	8854	1387	73,5	20,5	6,1
23	2330	1188	65,7	16,0	15,8
24	912	2412	-	-	-
25	8910	4213	80,4	10,8	6,7
26	1600	402	67,7	8,8	23,5
27	5029	730	44,2	10,3	45,5
28	1650	832	58,2	25,0	16,8
29	2340	367	-	-	-



Az eredmények értékelése; diszkusszió

I. Az ALAD enzimre vonatkozó vizsgálatok

Az emberi PCT-ben az ALAD enzimre vonatkozó vizsgálatok szórványosak és egymásnak ellentmondóak.

Ezek az ellentmondások részben metodikai problémákból adódhatnak. Az eritrocita ALAD aktivitás mérésének optimalizálására vonatkozó próbálkozások száma azóta növekedett meg, mióta bebizonyosodott, hogy az ALAD aktivitás az ólommérgezettség nagyon érzékeny indikátora. A mérés elvégzésére alapvetően két módszer kínálkozik:

- a. Az ALA szubsztrát fogyás mérése
- b. A keletkezett PBG mérése

Mindkét módszernek megvannak az előnyei és természetes hibaforrásai. Az első esetben valamilyen módon gondoskodni kell a keletkező PBG eltávolításáról és a megfelelő kiszűrést biztosító iongyantás módszer meglehetősen munkaigényes. A második esetben figyelembe kell venni, hogy specifikus enzim inhibitorok hiányában a hem bioszintézis további lépéseit katalizáló enzimek is működnek, így a keletkezett PBG már azonnal fogy is. A PBG fogyás bizonyos mértékig csökkenthető, ha figyelembe vesszük, hogy az ALAD egy hőstabilis enzim. Egy gyors, magas hőmérsékletű aktivitásmérés csökkentheti a nem kívánatos PBG fogyást. Saját vizsgálatainkban ezen utóbbi módszert követtük.

Az érett keringő eritrocitákban az enzim már nem működik, de szemben a hem bioszintézis mitokondriális enzimeivel az eritrocita érés folyamán nem bomlik le és megfelelő körülmények között működésre bírható.

Mivel az ALAD enzim a keringő eritrocitákban már nem funkcionál, az in vitro mért aktivitás csak indikátora az eritrocitákban bekövetkező fiziológiás változásoknak. Az eredmények óvatos következtetésekre adnak lehetőséget.

Kísérleteink során mi szignifikáns különbséget találtunk a PCT-ben szenvedő betegek és a kontroll személyek eritrocita ALAD aktivitása között /ALAD_{nem akt}/, a betegké szignifikánsan csökkent /szignifikancia/szint: 95 %, $p=0,013$ / /6. ábra/

Hasonlóképpen aktivitás csökkenést mutattak ki Simon és munkatársai /61/ PCT-s betegekben. Kaufman és Marver azonban nem észleltek szignifikáns változást a májszövet ALAD aktivitásában egészséges kontrollokhoz viszonyítva /62/ Schuppli kísérletes porfiriában /63/ emelkedett eritrocita ALAD aktivitást talált, de emberi porfiriában ezt nem észlelte.

A legtöbb emberi eritrocita ALAD enzimaktivitás méréseiből származó adat az ólommérgezésekkel kapcsolatban áll rendelkezésünkre. Pb^{2+} expozícióban az eritrocita ALAD aktivitás erősen lecsökken /9/. Feltételezhetően az Pb^{2+} az enzim szulfhidril csoportjainak blokkolásával hat.

Felismerték /64/, hogy a negatív korreláció a vér ólomtartalma és az eritrocita ALAD aktivitás között tökéle-
tesebb, ha az enzimet egyidejűleg aktiválják valamilyen
-SH ágenssel /cisztein, redukált glutation, ditiotreitol,
stb./ és az $ALAD_{akt}/ALAD_{nem\ akt}$ hányadost veszik figyelem-
be. Valószínűleg az -SH ágens kiszorítja az Pb^{2+} -t az en-
zim -SH csoportjairól.

A Zn^{2+} , az ALAD enzim kofaktora szintén részt vesz az
 Pb^{2+} ionok kiszorításában is. /65/.

Saját vizsgálatainkban mi is megvizsgáltuk ezeknek az
aktivátoroknak a hatását és meglepő eredményre jutottunk.
Az aktivátorok hatására helyreállt az eredeti aktivitási
szint a betegeknél, a két csoport $ALAD_{akt}$ eredményei nem
különböztek egymástól. /95 %-os szinten szignifikáns el-
térés nincs/ /7. ábra/

Az előbbieket analógiájára mi is képeztünk egy faktort,
amely az $ALAD_{akt}$ és az $ALAD_{nem\ akt}$ egymáshoz való viszo-
nyát jellemzi, az $ln/ALAD_{akt}/ALAD_{nem\ akt}$ hányadost. Ez
Mitchell és munkatársai szerint a leginkább független a
pillanatnyi enzimaktivitási értékektől.

A PCT-s betegeknél ez a hányados szignifikánsan ma-
gasabb /szignifikancia szint 99 %; $p=0,001$ /. /8. ábra/
Ebből a szempontból betegeink hasonlóképpen viselkednek
az ólommérgezettségben szenvedőkkel.

Az eritrocita ALAD enzim másik specifikus inhibitora

az etanol, amely egy átmeneti redoxpotenciál emelkedést idéz elő. Emberi alkohol intoxikációban megfigyelték, hogy az eritrocita ALAD aktivitás reverzibilisen csökken, majd kb. 10 óra elteltével visszaáll az eredeti aktivitási szint /10/. Hasonló változást patkány modellkísérletben nem sikerült demonstrálni /66/.

Mivel betegeink nagy része rendszeres alkohol fogyasztó, az alkohol közvetett hatásával szinte valamennyi betegünkénél számolni kell. Az alkohol direkt hatása viszont vizsgálatainknál kizárható. /Véralkohol-ellenőrzés/.

II. Az ALAD aktivitás csökkenésének magyarázata betegeink esetében

Az ALAD enzim -SH igénye általános az élővilágban, így az aktivitás csökkenésére a legkézenfekvőbb magyarázat a sejt természetes redoxrendszereinek eltolódása, pl. a redukált glutation/oxidált glutation arány eltolódása.

Ezért találtuk érdekesnek megvizsgálni a természetesen jelenlevő GSH szintet PCT-s betegeinkben, ugyanakkor a Zn^{2+} koncentrációt is meghatároztuk.

A kísérletek folyamán kiderült, hogy az ALAD aktivitás csökkenése a betegeken egyértelműen az aktivátorok hiányára volt visszavezethető. A PCT-s betegek teljes vér GSH szintje szignifikáns csökkenést mutatott a kontroll csoporttal szemben /szignifikancia szint 99 %; $p=0,001$ / /9. ábra/

Bár kisebb mértékben, de ugyancsak csökkenést észleltünk a szérumban Zn^{2+} koncentrációjában is /szignifikancia szint: 95%; $p=0,184/$.

A statisztikai értékelés szerint a kontroll csoportban az aktuális GSH és Zn^{2+} koncentráció /független változók/ valamint az ALAD aktivitás /függő változó/ között korrelációt nem sikerült találni /korrelációs együttható 0,2543/. A porfiriás csoportban azonban összefüggést sikerült kimutatni a GSH és a szérumban Zn^{2+} szint változása, valamint az ALAD aktivitás között. Ezek az összefüggések sem voltak nagyon szorosak /korrelációs együttható 0,5898/.

III. A GSH csökkenés lehetséges okai a betegknél

Mint már említettük, az ALAD enzim aktivitási viszonyait elsősorban az ólommérgezettség indikátoraként szokás vizsgálni. A különbségek ellenére is indokolt a PCT-s betegek enzimviszonyait összehasonlítani az ólommérgezettekével. Pb^{2+} mérgezettség esetén a porfirin szintézis enzimeit is károsodnak, másodlagos tünetként koproporfirin és ALA ürítés növekedés észlelhető /67/.

Az irodalmi adatok alapján egyöntetűnek látszik az a vélemény, hogy a GSH szint is csökken /68, 69/ és ez kompozíciós mechanizmusok beindulását kezdeményezi. A megfigyelések szerint ilyenkor a glutation reduktáz enzim aktivitása fokozódik, ez az enzim felelős elsősorban az intracelluláris GSH szint fenntartásáért /70/.

A stabilizációs folyamat a benne részt vevő enzimek természetét tekintve számos energetikai jellegű összetevőre hívja fel a figyelmet, amelyeket érdemes lenne a PCT-ben is megvizsgálni.

Az eritrociták anyagcseréjének alapvető sajátossága, hogy a sejtmag és a mitokondriumok hiánya miatt teljesen hiányzik nukleinsav- és protein szintetizáló képességük, a citrát kör és a légzési lánc. Az eritrociták metabolikus energiaforrása a glükóz. A glükóz legnagyobb része az Embden-Meyerhof uton metabolizálódik, ATP és NADH keletkezik. Az így keletkező energia tartja fenn a Na^+/K^+ plazmagradienszt, tartja működőképese állapotban a hemoglobint.

A glükóz további része a glükóz direkt oxidációja során NADPH-t szolgáltat, amely többek között a glutation reduktáz enzim működéséhez is nélkülözhetetlen. Ez az enzim teszi lehetővé az intracelluláris GSH koncentráció szinten tartását. A GSH nélkülözhetetlen a sejten belüli redox állapot optimális szinten tartásában.

Ezek alapján kézenfekvő volt, hogy betegeinknél a GSH koncentráció csökkenéséért elsősorban két enzim tehető felelőssé a glutation reduktáz és a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz.

Mi az utóbbit vizsgáltuk betegeinknél és a kontroll csoportban. Az eredmények igazolták várakozásunkat, a PCT-s betegek G6PD aktivitása szignifikáns csökkenést mutatott a

kontroll csoporthoz viszonyítva /szignifikancia szint: 99 %, $p=0,001/. /11.$ ábra/

A csökkent G6PD enzimműködés a PCT-s betegekben összhangban van a GSH koncentráció csökkenésével, így a PCT-s betegek eritrocitáiban egy olyan redox eltolódás figyelhető meg, amely az oxidatív folyamatoknak kedvez.

IV. A szérumban Zn^{2+} szint csökkenése a betegekben

A Zn^{2+} tartalom és az ALAD aktivitás közötti összefüggés kevésbé szoros, mint a GSH és az ALAD viszonylatában. A Zn^{2+} ismereteink szerint az aktivátorok klasszikusaként van nyilvántartva, melynek kötődése bizonyos fehérjestrukturához igen jelentős térszerkezeti változásokat képes előidézni. Ez sok enzim esetében a működéshez feltétlen szükséges. Az ALAD enzimnél molekuláris biológiai kutatások során kiderült, hogy az enzim mindaddig aktív, míg az aktív helyen lévő -SH csoportok redukált formában maradnak. A Zn^{2+} nem abszolút szükséges, de kívánatos, mert megvédi az -SH csoportokat az autooxidációtól /8/.

A csökkent szérumban Zn^{2+} koncentráció okára nézve csak spekulációink lehetnek. Ismert néhány betegség, ahol a cinktartalom csökkenése a kórfolyamatban alapvető jelentőségű. Ilyen az acrodermatitis enteropathica. Ez a betegség enterális felszívódási zavarokkal is együttjár. Meg kell jegyeznünk, hogy a PCT-ben is irtak le malabszorpciót /71/, melyet ugyanúgy, mint a többi porfiriás állapotra

jellemző vonást, nem sikerült elkülöníteni az alkoholizmus betegséggel is összefüggő jelenségektől.

Ezek alapján lehetségesnek tartjuk, hogy a cinkszint csökkenés egy - az alkoholizmus betegségben közönséges - krónikus gastroenteritis következménye. Lehet, hogy újabb bizonyítékát tártuk fel annak a feltételezésnek, miszerint a PCT kialakulásában gastrointestinalis zavarokkal összefüggő hiányállapotnak is jelentősége lehet. Mindenesetre patkányokon tett megfigyelések szerint a hosszan tartó diétás vasterhelés vagy krónikus etanol fogyasztás hiánytáplálkozás esetén kifejezettebb súlyosbító hatást gyakorol a porfirin metabolizmusra /72, 73/.

V. Betegink ALA és porfirin ürítése

Az eredmények az I. táblázatban foglatuk össze.

A vizelet ALA és porfirin analizise alapján betegeink valamennyien mutatják a PCT biokémiai jegyeit. Sajnos az általunk vizsgált tényezők egyikét sem lehetett közvetlen kapcsolatba hozni a betegek porfirin ürítésével.

Ez az eredmény egyáltalán nem meglepő, mivel eddig még semmiféle biológiai-biokémiai tényezővel sem lehetett korrelációba hozni a porfirin ürítést. Valamennyi patogenezist magyarázó teóriának ez az egyik gyenge pontja.



Eredményeink a betegség patogenezisére vonatkozó elképzelések tükrében

A betegségre vonatkozó irodalmat áttekintve három lehetséges hipotézis adódik a PCT patogenezisére. A három teória nem zárja ki egymást, sőt részben egymást feltételezi, önmagában egyik sem tudná magyarázni a PCT klinikai és biokémiai tüneteit.

I. Uroporfirinogén dekarboxiláz /UD/ enzim deficiencia

A leglogikusabb elképzelésnek az UD enzim defektust tarthatjuk, ezzel egyértelműen magyarázni lehet a PCT biokémiai tüneteit, az URO és HEPTA felszaporodását a vizeletben, az IZOKOPRO felszaporodást a székletben. Bár ezt a vizsgálatot több szerző elvégezte a különböző betegeknél és a betegek családtagjainál, egyértelműen nem sikerült az aktivitás csökkenését minden betegnél kimutatni.

Az UD aktivitás csökkenésének mértéke /kb. 30 %/ nem magyarázza az esetenként igen nagy fokú porfirin ürítést.

Az UD enzim működéséhez szintén -SH aktivátort igényel, így az általunk kimutatott GSH csökkenés kapcsolatba hozható az UD deficienciával.

II. Rimington féle redox teória /49/

Rimington elképzelése szerint a hepatocitákban és az eritrocitákban egy olyan redox eltolódás történik ebben a betegségben, hogy a bioszintézis folyamatában résztvevő

porfirinogének a megváltozott redox környezet hatására nagy mennyiségben oxidálódnak porfirinekké, az anyagcsere szempontjából inertté válnak, kiválasztásra kerülnek. Saját vizsgálataink egyértelműen alátámasztják ezt az elképzelést. A G6PD aktivitás csökkenés, a GSH koncentráció csökkenés és az ezek következményeként fellépő ALAD aktivitás csökkenés a betegekben arra utalnak, hogy az eritrocitákban az oxidatív folyamatoknak kedvező változások zajlanak.

III. Membrán hipotézis

Ehhez az elképzeléshez az ötletet az a megfigyelés adta, hogy a hexaklórbenzol /HCB/ - amellyel provokálni lehet a PCT tüneteit a kísérleti állatokon és emberen toxikus porfiriát okoz - jó lipoid oldékonyságánál fogva súlyosan károsítja a természetes membránokat. Csökkenti a membránok molekuláris rendezettségét és erősen befolyásolja a membránokon keresztül zajló aktív és passzív transzportot /42, 43/.

A PCT etiológiájában előforduló alkohol, egyéb toxikus anyagok szintén fluidizáló hatásúak lehetnek a sejtmembránokra. A membrán károsodás következménye lehet, hogy a leginkább vízoldékony porfirinek /URO, HEPTA/ nagy mennyiségben lépnek ki a sejtközütti térbe, létrehozva a

PCT jellegzetes biokémiai tüneteit. Így egy komplex membrán károsodás is állhat a PCT tüneteinek hátterében.

A membrán károsodás másik következménye, hogy a sejten belüli redoxállapot szintén megváltozik, csökken a membránpotenciál /Kószó Ferenc, közlés alatt/. Saját kísérleti tapasztalataink, az oxidatív változások irányába történő eltolódás egyértelmű következményei lehetnek a fentieknek.

Összefoglalás

A porfiriák az anyagcsere betegségek egy sajátos csoportját alkotják, amelyekben a porfirin anyagcsere szenved zavart. Az egyes porfirin prekursorok felszaporodnak a vizeletben, a székletben, a vérben és bizonyos szövetekben. A porfirin bioszintézis út enzimeinek tanulmányozása a kórképek tisztázásához és az oki terápia kidolgozásához elsődleges fontosságú.

Az általunk vizsgált porfiria a nálunk leggyakrabban előforduló porphyria cutanea tarda /PCT/ volt, amely általában középkorú férfiakon fordul elő, karakterisztikus bőrtünetekkel jár, a vizelet vörös színe, a vizelettel nagy mennyiségben ürülő uroporfirin és 7-karboxi-porfirinek jellemeznek. A betegség etiológiájában az esetek több, mint felénél előfordul az alkoholizmus és a vele összefüggésben lévő májkárosodás. A betegség kóroktana egyelőre még nem tisztázott.

Egyszerű logikai megfontolások alapján az uroporfirinogén dekarboxiláz lenne az az enzim, amelynek csökkent működése magyarázná a masszív uroporfirin ürítést. Az irodalmi adatok alapján úgy tűnik, hogy az esetek egy részében ez valóban fennáll, de nem mutatható ki valamennyi betegnél. Így egyértelmű okként nem kezelhető.

A kérdés más oldalról is megközelíthető. Ismert ugyanis, hogy a bioszintézis láncban a porfirinek redukált formában - porfirinogén alakban - vesznek részt.

Ha megfelelő porfirinekké oxidálódnak /ez mindenféle enzimműködés nélkül könnyen végbemegy/ metabolikusan inertté válnak és kiválasztódnak. Így a szervezetben bekövetkező redox változások szintén figyelmet érdemelnek.

A kérdésnek ezt az oldalát tanulmányoztuk. Az általunk kiválasztott enzim a δ -aminolevulinsav dehidratáz /ALAD/ volt, amely bár nem sebességmeghatározó lépése a porfirin bioszintézisnek, de -SH természeténél fogva a redoxváltozásokra igen érzékeny. Összehasonlító vizsgálatokat végeztünk és megállapítottuk, hogy a PCT-s betegek eritrocita ALAD aktivitása csökkent az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. Az enzimaktivitás csökkenése egyértelműen az aktivátorok hiányára volt visszavezethető. Ugyanis optimális mennyiségű -SH /cisztein/ és Zn^{2+} aktivátorok hatására helyreállt az eredeti aktivitási szint. Ez késztetett bennünket arra, hogy a természetesen jelenlevő -SH és Zn^{2+} koncentrációt meghatározzuk betegeinkben.

A betegeknél elsősorban a redukált glutation /GSH/ koncentráció, de kis mértékben az in vivo Zn^{2+} szint is csökkent.

A továbbiakban még megvizsgáltuk az eritrocita glükóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim működését betegeinkben, amely a glutation reduktázzal együtt alapvető szerepet játszik a vörösvértestek GSH koncentrációjának megfelelő szinten tartásában.

Kimutattuk, hogy a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim aktivitása is csökkent a PCT-s betegek eritrocitáiban a kontroll személyekhez viszonyítva.

Sajnos az előbbieken említett biológiai paraméterek egyikét sem lehetett közvetlen kapcsolatba hozni betegeink porfirin ürítésével.

Munkánk érdemének tartjuk, hogy a hepatikus porfiriának tartott PCT-ben sikerült kimutatni olyan változásokat, amelyek az eritrociták enzimrendszereiben következnek be és újabb adatokkal egészítik ki a PCT patológiáját. Elsőként mutattuk ki, hogy a PCT-s betegek eritrocita ALAD aktivitása csökkent és ez aktivátorok adásával feloldható.

Eredményeinknek pillanatnyilag még nincs közvetlen terápiás jelentősége, de elméletileg megalapozzák bizonyos antioxidáns szerek pl. az E vitamin jó terápiás effektusát.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani dr. Simon Miklós professzor Urnak, az orvostudományok doktorának a magasszintű és sokoldalú szakmai irányításért, valamint dr. Siklósi Csaba tudományos munkatársnak és dr. Kószó Ferenc adjunktusnak hasznos gyakorlati tanácsaikért.

Irodalom

1. Scherer, J.:
Chemisch-physiologische Untersuchungen.
Liebigs Annalen Chem. u. Pharm. 40 1-64 /pp.30-31/
/1841/
2. Thudichum, J. L. W.:
10th Report of the Medical Officer.
Privy Council, Appendix 7: 200 227-233 /1867/
3. Schultz, J. H.:
Ein Fall von Pemphigus leprosus compliciert durch
Lepra visceralis.
Inanguraldissertation /Med./ Greifswald /1874/
4. Soret, J. -L.:
Recherces sur l'absorption des rayons ultraviolets
par diverses substances.
Arch. des. Sciences Phys. et Natur. 10 430-485 /484/
/1883/
5. Róth Imre és Udvardy László
Porphyrismus esete.
Orv. Hetil. 46 1102-1106 /1931/
6. Varticovski, L., Kushner, J. P. and Burnham, B.
Biosynthesis of porphyrin precursors
Purification and characterization of mammalian L-alanine:
 γ , δ -dioxovaleric acid aminotransferase.
J. Biol. Chem. 255 3742-3747 /1980/
7. Abdulla, M. and Haeger-Aronsen, B.
Delta-ALA-dehydratase activation by zinc.
Enzyme 12 708 /1971/
8. Tsukamoto, I., Yoshinaga, T. and Sano, S.
The role of zinc with special reference to the essential
thiol groups in δ -aminolevulinic acid dehydratase of
bovine liver.
Biochem. Biophys. Acta 570 167-178 /1979/
9. Bonsignore, D.
Delta-aminolevulinate dehydratase activity of erythrocytes
as a diagnostic test in occupational lead poisoning.
Med. Lav. 57 647 /1966/
10. Moore, M. R., Beattie, A. D., Thompson, G. G. and
Goldberg, A.
Depression of δ -aminolevulinic acid dehydratase acti-
vity by ethanol in man and rat.
Clin. Sci. 40 81-88 /1971/

11. Granick, S. and Sassa, S.
 δ -aminolevulinic acid synthetase and the control of heme and chlorophyll meta synthesis.
 In: Metabolic Pathways. /Vogel, H. J. ed./
 Vol. V. pp. 77-141
 New York - London Academic Press 1971.
12. Booiij, H. L. and Rimington, C.
 Effect of pre-heating on porphyrin synthesis by red cells.
 Biochem. J. 65 3 /1957/
13. Sano, S. and Granick, S.
 Mitochondrial coproporphyrinogen oxidase and protoporphyrin formation.
 J. Biol. Chem. 236 1173-1180 /1961/
14. Porra, R. J. and Falk, J. E.
 Protein-bound porphyrins associated with protoporphyrin biosynthesis.
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 5 179-184 /1961/
15. Jones, M. S. and Jones, O. T. G.
 The structural organization of heme synthesis in rat liver mitochondria.
 Biochem. J. 113 507-514 /1969/
16. Schmid, R., Schwartz, S. and Watson, C. J.
 Porphyrin content of bone marrow and liver in various forms of porphyria.
 Arch. Int. Med. 93 167-190 /1954/
17. Kramer, S., Becker, D. M. and Viljoen, J. D.
 Annotation
 Enzyme deficiencies in the porphyrias.
 Brit. J. Haemat. 37 439-445 /1977/
18. Heilmeyer, L.
 Disturbances in Heme Synthesis: Special considerations of the sideroachrestic anemias and erythropoietic porphyrias.
 /Charles C. Thomas ed./
 P. 198
 Springfield, Illinois /1966/
19. Günther, H.
 Hämatoporhyrie.
 /Deut. Med. Wschr. 37 1771 /1911/
20. Bonkowsky, H. L., Bloomer, J. R., Ebert, P. S. and Mahoney, H. L.
 Heme synthetase deficiency in human protoporphyria. Demonstration of the defect in liver and cultured skin fibroblasts.
 J. Clin. Invest. 56 1139 /1975/

21. Bottomley, S. S., Tanaka, M. and Everett, M. A.
Diminished erythroid ferrochelatase activity in
protoporphyrria.
J. Lab. Clin. Med. 86 136 /1975/
22. Waldenström, J.
Studien über Porphyrie.
Acta Med. Scand. Suppl. 82 120-121 /1937/
23. With, T. K.
A short history of porphyrins and porphyrias.
In: Porphyrins in Human Diseases
Report of the discussions
/Doss, M. and Pola Nawrocki, eds./
pp. 289-308
Karger, Basel /1976/
24. Kushner, J. P., Barbuto, A. J. and Lee, G. R.
An inherited enzymatic defect in porphyria cutanea
tarda. Decreased uroporphyrinogen decarboxylase
activity.
J. Clin. Invest. 58 1089 /1976/
25. Elder, G. H., Lee, G. B. and Tovey, J. A.
Decreased activity of hepatic uroporphyrinogen
decarboxylase in sporadic porphyria cutanea tarda.
New Engl. J. Med. 299 274 /1978/
26. Elder, G. H., Sheppard, M. D., De Salamanca, R. E.
and Olmos, A.
Identification of two types of porphyria cutanea
tarda by measurement of erythrocyte uroporphyrinogen
decarboxylase.
Clin. Sci. 88 58 477-484 /1980/
27. Topi, G. and Gandolfo, L. D.
Inheritance of porphyria cutanea tarda.
Analysis of 14 cases in 5 families.
Brit. J. Dermatol. 97 617 /1977/
28. Elder, G. H.
Differentiation of porphyria cutanea tarda symptomatica
form other types of porphyria by measurement of iso-
coproporphyrins in the fees.
J. Clin. Pathol. 28 601 /1975/
29. Lundwall, O., Weinfeld, A. and Lundin, P.
Iron storage in prophyria cutanea tarda.
Acta Med. Scand. 188 37 /1970/
30. Kordac, V.
Frequency of occurence of hepatocellular cancer in
patients with porphyria cutanea tarda in long-term
follow-up.
Neoplazma 19 135 /1972/

31. Szodoray, L., Sümegi, I.
Über die Nosologie der chronischen kutanen Porphyrrie.
Dermatologica /Basel/ 90 224 /1944/
32. Shanley, B. C., Zail, S. S. and Joubert, S. M.
Effect of ethanol on liver delta-aminolevulinate
synthetase activity and urinary porphyrin excretion
in symptomatic porphyria.
Brit. J. Haemat. 17 389 /1969/
33. Kószó, F., Siklósi, Cs. and Simon, N.
Effects of iron-loading and ethanol treatment on rat
porphyrin metabolism.
Pharmac. Biochem. Behav. 13 325 /1980/
34. Becker, F. T.
Porphyria cutanea tarda induced by estrogens.
Arch. Dermatol. 92 252 /1965/
35. Roegnigk, H. H. and Gottlob, M. E.
Estrogen-induced porphyria cutanea tarda.
Arch. Dermatol. 102 260 /1970/
36. Haberman, H. F., Rosenberg, F. and Menon, I. A.
Porphyria cutanea tarda: a comparison of cases pre-
cipitated by alcohol and estrogens.
Can. Med. J. 113 653 /1975/
37. Levere, R. D.
Stilbestrol-induced porphyria: Increase in hepatic
delta-aminolevulinic acid synthetase.
Blood 28 569 /1966/
38. Cripps, D. J., Peters, H. A. and Gocmen, A.
Porphyria turcica: hexachlorobenzene intoxication 20
years after.
J. Invest. Dermatol. 71 277 /1978/ /abstract/
39. Ockner, R. K. and Schmid, R.
Acquired porphyria in man and rat due to hexachloro-
benzene intoxication.
Nature 189 499 /1961/
40. Elder, G. H., Evans, J. O. and Matlin, S. A.
The effect of the porphyrinogenic compound hexachloro-
benzene on the activity of hepatic uroporphyrinogen
decarboxylase in the rat.
Clin. Sci. Mol. Med. 51 71 /1976/

41. Taljaard, J. J., Shanley, B. C., Deppe, W. M. and Joubert, S. M.
Porphyrin metabolism in experimental hepatic siderosis in the rat. III. Effect of iron overload and hexachlorobenzene on liver heme biosynthesis.
Brit. J. Haemat. 23 587 /1972/
42. Kószó, F., Siklósi, Cs. and Simon, N.
Liposome model experiment for the study of assumed membrane damage in porphyria cutanea tarda.
Biochem. Biophys. Acta 363 182 /1974/
43. Kószó, F., Horváth, L. I., Simon, N., Siklósi, Cs. and Kiss, M.
The role of possible membrane damage in porphyria cutanea tarda: A spin label study of rat liver cell membranes.
Biochem. Pharmacol. 31 11 /1982/
44. Ippen, H.
Beobachtungen bei der Aderlaßbehandlung der Porphyria cutanea tarda.
Arch. Klin. Exp. Dermatol. 213 863 /1961/
45. Lundvall, O.
The effect of phlebotomy treatment of porphyria cutanea tarda.
Acta Med. Scand. 189 33 /1971/
46. London, I. D.
Porphyria cutanea tarda.
Arch. Dermatol. 75 801 /1957/
47. Scholnick, P. L., Epstein, J. H. and Marver, H. S.
The molecular basis of the action of chloroquine in porphyria cutanea tarda.
J. Invest. Dermatol. 61 226 /1973/
48. Taljaard, J. J., Shanley, B. C., Stewart - Wynne, E. G., Deppe, W. M. and Olmos, A.
Studies on low-dose chloroquine therapy and the action of chloroquine in symptomatic porphyria.
Brit. J. Dermatol. 87 261 /1972/
49. Rimington, C.
Patterns of porphyrin excretion and their interpretation.
S. Afr. J. Lab. Clin. Med. 9 255 /1963/
50. Ayres, S. and Mihan, R.
Porphyria cutanea tarda: Response to vitamin E. A review and two case reports.
Cutis 22 50 /1978/



51. Nair, P. P., Mezey, E., Murty, H. S., Quartner, J. and Mendeloff, A. J.
Vitamin E and porphyrin metabolism in man.
Arch. Intern. Med. 128 411 /1971/
52. Coleman, D. L.
Purification and properties of δ -aminolevulinate dehydratase from tissues of two strains of mice.
J. Biol. Chem. 241 5511 /1966/
53. Mitchell, R. A., Drake, J. E., Thompson, G. G. and Rejent, T. A.
Erythrocyte porphobilinogen synthase /delta-aminolevulinate dehydratase/ activity: A reliable and quantitative indicator of lead exposure in humans.
Clin. Chem. 23 105 /1977/
54. Beutler, E., Duron, O. and Mikus-Kelly, B.
Improved method for the determination of blood glutathione.
J. Lab. Clin. Med. 61 882 /1963/
55. Marks, P. A.
Glucose-6-phosphate dehydrogenase; clinical aspects.
In: Methods in Enzymology
Carbohydrate Metabolism
/Wood, W. A. ed./
Academic Press New York and London 1966.
56. Fernandez, F. J. and Kahn, H. L.
Clinical methods for atomic absorption spectroscopy.
Clin. Chem. Newsletter 3 24 /1971/
57. Mauzerall, D. and Granick, S.
The occurrence and determination of delta-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine.
J. Biol. Chem. 219 435 /1956/
58. Berkó, Gy. and Durkó, I.
A new possibility for the demonstration of delta-aminolevulinic acid in urine on the basis of Mauzerall-Granick method.
Clin. Chim. Acta 37 443 /1972/
59. Watson, C. J. and Schwartz, S.
A single test for urinary porphobilinogen.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 47 393 /1941/

60. Doss, M.
Thin layer chromatography of porphyrins and
complementary analytical methods.
In: Progress in thin layer chromatography and re-
lated methods.
/Niederwieser, A. and Pataki, G. eds./
pp. 145-146
Ann Arbor Science Publishers Inc., Ann Arbor 1976.
61. Simon, M., Berkó, Gy. and Siklósi, Cs.
Enzimvizsgálatok porphyria cutanea tarda betegek-
nél és hexaklórbenzolos modellkísérlet.
A dermato-venerológia haladása 16 73 /1972/
62. Kaufman, L., Marver, H. S.
Biochemical defects of two types of human hepatic
porphyria.
New Engl. J. Med. 283 954 /1970/
63. Schuppli, R.
Weitere Untersuchungen über den Porphyrin-
Stoffwechsel.
Dermatologica /Basel/ 118 248 /1959/
64. Granick, J. L., Sassa, S. and Granick, S.
Studies in lead poisoning. II. Correlation between
the ratio of activated to inactivated δ -aminolevulinic
acid dehydratase of whole blood and blood lead level.
Biochem. Med. 8 149 /1973/
65. Finelli, V. N., Klander, D. S., Karaffa, M. A. and
Petering, H. G.
Interaction of zinc and lead on δ -aminolevulinate
dehydratase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 5 303 /1975/
66. Mezey, E., Quartner, J. and Nair, P. P.
The effect of vitamin E on porphyrinuria induced by
ethanol in the rat.
Biochem. Med. 5 30 /1971/
67. Heger-Aronsen, B.
Studies on urinary excretion of δ -aminolevulinic
acid and other haem precursors in lead workers and
lead-intoxicated rabbits.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 12 Suppl. 47 /1960/
68. Shiraishi, A.
Concentration of reduced glutathione in the blood
of lead-poisoned persons.
Nisshin Igaku 39 478 /1952/

69. Vasiliu, A., Stavri, G. and Freund, S.
Value of reduced glutathione determinations in
workers exposed to lead.
Revista Iasi 73 647 /1952/
70. Howard, J. K.
Human erythrocyte glutathione reductase and glucose-
6-phosphate dehydrogenase activities in normal
subjects and in persons exposed to lead.
Clin. Sci. Mol. Med. 47 515 /1974/
71. Siklósi, Cs. and Simon, N.
Lipoid malabsorption in porphyria cutanea tarda
hepatica.
In: Porphyrins in Human Diseases
/Doss, M. ed./
pp. 336-340
S. Karger Basel 1976.
72. Gillman, T., Cnham, P. A. and Hathorn, M.
Experimental nutritional siderosis.
Lancet, 2 557 /1958/
73. Shanley, B., Zail, S. S. and Joubert, S. M.
Porphyrin metabolism in experimental hepatic
siderosis in the rat.
Brit. J. Haemat. 18 79 /1970/



A doktori értekezés anyagából megjelent közlemények
és előadások

Közlemények:

1. Simon, N. and Kiss, M.
Study of erythrocyte δ -aminolevulinic acid dehydratase
activity in porphyria cutanea tarda
Arch. Derm. Res. 266 121 /1979/
2. Simon, N. and Kiss, M.
Reply to the letter by Goerz et al.:
Erythrocyte δ -aminolevulinic acid dehydratase in
porphyria cutanea tarda
Arch. Derm. Res. 268 111 /1980/

Előadások:

1. Simon M. és Kiss Mária
Eritrocita 5-aminolevulinsav dehidratáz aktivitás
vizsgálata porphyria cutanea tardában
XX. Biokémiai Vándorgyűlés
Siófok, 1980. szept. 30 - okt. 3.
2. Kiss Mária, Siklósi Cs., Kószó F. és Simon M.
Teljes vér glutation és szérum cink vizsgálatok
porphyria cutanea tardában
XXI. Biokémiai Vándorgyűlés
Veszprém, 1981. aug. 24 - 27.