

Aminotranszferáze izoenzimek.

A 2.6.1.1. L-aspartat-2-oxoglutarat-aminotransferase
és a

2.6.1.2. L-alanin-2-oxoglutarat-aminotransferase
izoenzimek vizsgálata emberi szérumban.

Doktori disszertáció.

1969.



Czabafy László.

B 504



E 1.49



R ö v i d i t é s e k :

GOT: 2.6.1.1. L-aspartat-2-oxoglutarat-aminotransferase.

GPT: 2.6.1.2. L-alanin-2-oxoglutarat-aminotransferase.

MDH: 1.1.1.37. L-malat:NAD oxidoreductase.

LDH: 1.1.1.27. L-lactate:NAD oxidoreductase.

NAD.H: nikotinsav-adenin-dinukleotida, redukált alakja.

Elfo.: elektroforezis.

PCMB: p-klórmerkuribenzoát.

Vvt.: Vörös-vérttest.

Ms.: molekula-súly.

DEAE: dietilamino-etiléter /származék/

ME /egység/: a Comission on Enzymes of the International Union of Biochemistry 1961. szimpozionján hozott határozata alapján 1 Nemzetközi Egység definíciója: 1 Egység az az enzim mennyiség, mely 25 C°-on 1 perc alatt 1 mikro-Mol. szubsztrátumot alakít át. 1 ME /1 milli-egység/ = 1 / 1000 Nemzetközi Egységgel.

Bevezetés.

Izoenzimek .

Az izoenzim kifejezés olyan enzim-aktiv fehérjék meghatározására használatos, melyek ugyanazon speciesben azonos reakciót katalizálnak, de fizikokémiai tulajdonságukban különböznek.

Bár az enzimek különböző formákban való előfordulása néhány évtizede ismert volt, mégis csak az elektroforetikus vizsgálatok bevezetése és a kromatográfiás technikák kidolgozása vezetett teljesebb kibontakozáshoz az utóbbi években. Amióta Wieland és Pfleiderer egyidőben Vesellel és Bearn-al 1957-ben kimutatták az LDH heterogenitását, az LDH enzimek különböző formáinak igen nagy irodalma született, és az általuk bevezetett technikai megoldások lehetővé tették az egyéb izoenzimek kísérletes felderítését is. Az izoenzimek, nevezetesen az LDH és alkálikus foszfátáze, a klinikai kémiában nyertek diagnosztikus alkalmazást, míg mások, mint a kolinszteráze és glukóze-6-P-dehidrogenáze a genetikában keltettek igen nagy érdeklődést.

1943-ban Warburg és Christian igazolták, hogy az élesztőből előállított aldoláze számos szempontból különbözik az állati szövetekből izolált aldolázétól. Más szerzők, különböző pepszin, kimotripszin, tripszin, xantin-dehidrogenáze és lizozim formákat írtak le. Különböző állatok azonos szöve-
teiből izolált enzimek eltérő tulajdonságait számos szerző figyelte meg. Például emberi nyálból izolált, és a pankreasz alfa-amiláze azonosak voltak, de különböztek oldékonyságukban, pH optimumban és egyéb vonatkozásokban a disznó-pankreaszban található azonos enzimtől. /Meyer, Fischer és Bernfeld, 1947./ Ezenkívül számos speciesben találhatók azonos katalitikus tulajdonságu enzimek, melyek egyéb aspektusban igen különbözőek. Human prostatából izolált savanyu foszfataze jelentősen eltér inhibitorait tekintve a human erythrocytákból nyert foszfatazétól, de mindkettő egyaránt katalizálja a foszfátészterek hidrolizisét. /Demuth, 1925.; Kutscher és Wolbergs, 1935.; Abul-Fadl és King, 1949./

Az acetilkolineszteráze a vvt.-ben és az idegszövetben könnyedén hidrolizálja az acetilkolint és az acetil-béta-metilkolint, de nem katalizálja a benzoilkolint, míg a máj-eredetű pseudokolineszteráze az interstitiumból, szívből és vérszérumból izolálttal együtt kissé, vagy egyáltalán nem hat az acetil-béta-metilkolinra, de könnyen hidrolizál-

ja a benzoilkolint sőt az acetilkolint is. /Mendel és Rudney, 1943./

Igy, bár azonos kémiai reakciók folynak le, az enzimek mégis különböznek szubsztrátspecifitásukban.

Warburg 1948-ban felvetette, hogy azonos reakciót katalizáló enzimek különböző szövetekben szervspecifikusnak kell hogy legyenek, Pfleiderer és Jeckel 1957-ben leírták, hogy patkányszívizomból és patkány-vázizmokból izolált LDH különböznek elektroforetikus mobilitásban és számos egyéb tulajdonságban is. Meisner 1950-ben előzetesen kimutatta, hogy a kristályos marhaszív-LDH két, elektroforetikusan eltérő, fehérjét tartalmaz, és Neilands 1952-ben azt találta, hogy mindkettő enzimatikusan aktív. Így világosan igazolást nyert, hogy egyetlen szervből egynél több formájú enzim is izolálható. Krebs 1953-ban közölte, hogy elektroforézissel élesztő-fehérjéből 4 alakot szeparált, amelyik közül mindegyik glicerín-aldehid-P-áze aktivitást mutatott. Még vitatott, hogy ezek a különböző enzim-alakok a hordozó fehérjék eltérő asszociációi révén keletkeznek-e, de a különböző frakciók kristályos alakban való előállítása ugylátszik elveti ezt a lehetőséget.

.--.

Az "isosyme" elnevezés, melyet Markert és Möller 1959-ben ajánlott, leírva a molekulárisan különböző, de azonos enzim-

aktivitást mutató fehérjét, elterjedt, de az "isoensyme" név, az előbbi alternatív formája, talán előnyösebb. Az "isoensyme" elnevezést ajánlja a Standing Committee on Enzymes of International Union of Biochemistry, leírva az egyetlen speciesben fellelhető különböző enzim-formákat. Mégis az "isosyme" közönségesen elfogadott alternatíva. /Webb, 1964/. A kifejezés precíz definíciója problematikus, mert míg az elektroforetikusan különböző LDH frakciók, egyetlen speciesből izolálva, leírhatók izoenzimként, mert ezek egyetlen szövetben fordulnak elő, addig az alkálikus és savanyú foszfatázet külön enzimnek tekintik, és ugyancsak külön enzimként kezelik az acetilkolineszterázét és a pseudokolineszterázét is. Markert és Möller 1959-ben tanulmányukban elhatárolták a laktát, malát és izocitrát dehidrogenázét, melyek közül mindegyik magas-foku szubsztát-specifitással rendelkezik. Ők úgy vélik, hogy a különböző molekuláris formájú alkálikus foszfatáze, peroxidáze és eszteráze nem kvalifikálja ezeket, hogy izoenzimként tekintség őket, mert csökkent specifikus tulajdonságaik miatt az enzimek olyan családjába tartoznak, melyeknek különböző, de átfedő tulajdonságaik vannak. /"have distinct, but overlapping specificities"/ Ujabb munkák azonban felvetették, hogy ezeket is izoenzimeknek kell elbírálni.

Az enzimek többféle formáinak klasszifikációját alaposan tár-

gyalja Wieland és Pfloderer 1962-ben megjelent munkája. Ők úgy vélik, hogy az izoenzimeket meg kell különböztetni a heteroenzimektől.

Az első meghatározást, az "isoenzyme"-t korlátozni kell azokra a formákra, melyek ugyanabból a szervből és szövetből származnak és izodinámiásak, azaz azonos katalitikus akciójuk van. A heteroenzimek szintén izodinámiásak, de különböző szervből, sőt különböző speciesből származnak. Általában a heteroenzimek közötti különbség sokkal nagyobb, mint az izoenzimek között, mivel számos heteroenzim molekula nagyságban is jelentékenyen különbözik. Pl.: élesztő alkoholdehidrogenáze Ms.: 150.000; ugyanez májból izolálva Ms.: 73.000 /Dixon és Webb, 1958;/ mások viszont feltűnően hasonlóak, pl.: marha, disznó és juh tripszin. /Withythil, Buck, Bier és Nord, 1961;/

Következésképp, a definíció problémája élesen jelentkezik, különösen akkor, ha mint az aszpartát-amino-transzferáze, az enzim különböző formában van jelen a mitochondriumokban és a sejtek supernatánsában. /Eichel és Bukovsky, 1961,; Boyd, 1961./

Nemcsak különböző speciesben, de ugyanazon állat különböző szerveiben, sőt a sejtek különböző részeiben fordulhatnak elő azonos biokémiai funkciót ellátó, de eltérő formában előforduló enzimek. Hovatovább, bizonyos enzimeket mester-

ségesen lehet különböző formába hozni, miközben megtartják eredeti katalitikus tulajdonságukat. Tisztított élesztő hexokináze DEAE cellulose oszlopon szeparálva 6 eltérő formában állítható elő: ezek közül 2, /a és b/ szukcinát pufferrel pH-gradiens eluálással választható le, /I. csoport, / míg a hátralevő maradékot /c, d, e és f/ NaCl gradienssel sikerült eluálni. /II. csoport./ - /Kaji, Trayser és Colowick, 1961./ Az I. csoportbelieket át lehet átkitani a II. csoportnak megfelelően, ha glukoz jelenlétében tripszin vagy kimotripszin hatásának tesszük ki. Mivel sem az I. sem a II. csoport enzimjei nem állnak egy "single protein entity"-ből, Wieland és Pflederer 1962-es közleményében nem tekinti izoenzimeknek.

Az a tény, hogy számos izoenzim különbözik a szubsztrátanalógokhoz való affinitásában, valamint koenzim-analógok és inhibitorokhoz való viszonyában, felveti a kérdést, hogy az "izo" prefix következetes-e, de mint elfogadható alternatíva feltétlen javasolható. A majdnem kimondhatatlan "homioensyme" nem talált elfogadásra. Így a Standard Committee on Enzymes határozata alapján ajánlott "isoensyme" kifejezés a legmegfelelőbb.

Transzamináze izoenzimek.

A számos enzim közül, melyek egy aminocsoport átvitelét katalizálják alfa-keto-savakra, legalaposabban a 2. 6. 1. 1. áspartat-aminotransferaset /GOT/ és a 2. 6. 1. 2. alanin-aminotransferaset /GPT/ tanulmányozták.

A két enzim a következő reakciót katalizálja:

A GOT:

alfa-keto-glutársav + aszparaginsav = Glutaminsav + oxalát-ecetsav.

A GPT:

Alfa-keto-glutársav + alanin = glutaminsav + piroszőlősav. Mindkét transzamináze enzim prosztetikus csoportja a piridoxál-5-foszfát. A transzaminálás két lépésben történik: először az amino-csoport transzportálódik a piridoxálra, ami piridoxaminná alakul. Második lépésként a piridoxamin reagál a ketosavval és visszaalakul piridoxállá. A reakció egy, a koenzimmel képzett Schiff-bázison, mint intermedieren keresztül zajlik le, egy Schiff bázison belüli protoneltolódás segítségével. /Velick és Vavra, 1962; /

Jenkins és munkatársai 1959-ben disznószívéből izolálták az GOT-ot, mielőtt még ismert lett volna, hogy ennek az enzim-

nek két molekuláris formája van. A készítmény 110.000 Ms.-nak bizonyult és két koenzim rezidiumot tartalmazott, predominantán piridoxal-5-foszfátot, per mol. enzim. Az enzim a koenzimet elgugedi melegítés, vagy sav vagy lug hozzáadására. /Velick és Vavra, 1962./ Sizer és munkatársai 1965-ben azt írják, hogy a GOT 116.000 Ms.-u, prosztetikus csoportot tartalmaz, valamint minden eznimmolekulának 2 aktiv centruma van. Mint azt a C^{14} -el jelzett glutaminsavval végzett kísérletek igazolták, a glutaminsav 1-2 molekulája reagál 1 mol. enzámmal. Egy mol. enzimre 12 tiol, és 24 szabad aminocsoport jut. A tiol csoportok közül háromnak van jelentősége az enzimaktivitás szempontjából. PCMB.-vel való blokkoláskor az enzimaktivitás 80-90 %-al csökken. /Krawczynski, 1967./

A GOT és GPT enzimek számos emberi és állati szövetben előfordulnak, és aktivitásuk változó. Szív, máj, vázizom és vese egyaránt gazdag GOT.-ban, de a máj és a vese bővebben tartalmaz GPT.-t. Noha a szövetek majdnem ezerszer nagyobb mennyiségben tartalmazzák ezeket, mint a vér-szérum, szövet-sérülés esetén megjelennek az enzimek a szérumban, és az így meghatározott szérum-enzim-aktivitás, kiterjedten alkalmazott diagnosztikai teszt. Myocardium infarctus után igen jelentős, de mulékony GOT aktivitás észlelhető, fertő-

z6 hepatitiskor mindk6t tranzaminaze szint jelent6sen meg-
n6 a sz6rumban, s aktivit6sukb6l a tapasztalatok szerint
diagnosztikai 6s prognosztikai t6nyekre lehet k6vetkeztetni.

**Az aspartat-aminotransferase /GOT/ izoenzimek
szeparálása.**

A GOT myocardium infarctus után, vagy fertőző hepatitisnél, egyaránt azonos mobilitást mutat, írta le Wroblewski, 1957., Pryse-Davies és Wilkinson, 1958., Sevala, 1958. Fentiek megfigyelték, hogy ugy az emberi szív, mint a máj gazdagon tartalmazza ezt az enzimet. Papír Elfo-val a GOT mint egy lassu alfa-2 globulin vándorol, míg a GPT a béta-globulinnal azonos mobilitásu. Jólehet a GOT homogen szubsztanciájú, mégis a tisztított szív- és máj-enzimek két elektroforetikusan elválasztható frakciót tartalmaznak. /Green, Leloir és Nocito, 1945., Jungner, 1957., Fleisher, Potter és Wakim, 1960., Boyd, 1961., Augustinsson és Erne, 1961./ Fleisher és munkatársai /1960/ bebizonyították, hogy ha a kutyaszív kivonatot pH 7,0 mellett 0,01 ionerősségű foszfátpufferben carboxymethylcellulose oszlopra vitték fel, az egyik izoenzim adsorbeálódott, míg a másik oldatban maradt. Eredményeiket megerősítették papír-Elfoval végzett vizsgálatukkal is, amikor pH 7,4-es foszfátpufferral doboztak, melyben 1 %-os bovin-albumint tettek, hogy ezzel megőrizték az enzim aktivitását. Az Elfo-grammot csikokra vágva eluálták, és az

enzimaktivitást Karmen szerint /Karmen, 1955./ határozták meg. Ugyanilyen eredményekre jutottak ember, disznó- és kutyasziv kivonatokkal is. A készítmények közül egy izoenzim mindig az anód felé, a másik a katód felé migrált. Nem találtak speciesbeli különbségeket a katód felé vándorló frakciók között, de az anódikus frakció értékelhető eltéréseket adott: a human izoenzim vándorolt a legmesszebb, utána a disznó-frakció, míg a kutyasziv-izoenzim a startvonal közelében maradt.

A két izoenzimet később jól tisztított formában állították elő kutyamájból, kromatográfiásan: hőkezeléssel és ammonium-szulfátos frakcionálással /Fleisher, 1960./ Ugyancsak jól szeparálható agar-gel Elfo-val, vagy zóna Elfoval, szukrózgrádiens oszlop-Elfoval. /Boyd, 1961., 1962./ Augustinsson és Erne 1961.-ben kromatográfiás eljárást írt le.

Boyd 1962-ben igen egyszerű technikát írt le a GOT aktivitás láthatóvátételére agar-gel-Elfo után, Wiem /1959/ eljárását módosítva. A szubsztrátumot, MDH-t valamint NAD. H-t tartalmazó gél kontaktusba hozza az enzimet tartalmazó gellel. A párosított geleket inkubálja. Inkubálás után UV fényben vizsgálja az enzymaktivitást, s azok sötét vonalak alakjában jelennek meg a fluoreszkáló gelben. UV fotóval maradandóan regisztrálható.



Boyd és Latner /1961/ jól használható tetrazonium festési technikát dolgozott ki a GOT kimutatására, keményítő-gel-Elfo után. Még egyszerűbb festési technika /Schwartz, Nisselbaum és Bodansky, 1963,. Decker és Rau, 1963/ az oxalacetatot 6-benzamido-4-metoxim-toluidin-diazoniumkloriddal /Azoene fast-violet B./ festik meg. Ez képezte a serum-GOT specifikus kolorimetriás meghatározásának alapját, melyel a gyakorlatban a serum-GOT-aktivitást határozzák meg. /Babson, Shapiro, Williams és Phillips, 1963/. Decker és Rau /1963/ közölték, hogy a diazonium-tehnika jobb eredményeket ad mint a tetrazoniumos eljárás.

A diazonium technika szintelen háttérben színes csíkot ad. Boyd /1962/ leírta, hogy a GOT izoenzimek szövethomogenizátumból butan-1-ol-al kivonhatók, s ezek tovább szeparálhatók ammoniumszulfátos frakcionálással. A 60 - 75 %-os telítettségű precipitátum tulnyomórészt anódikus izoenzimmet ad, míg a katódikus izoenzim csak magasabb koncentráció mellett precipitálható.

Az enzimfrakciók aktivitásának összehasonlításakor figyelembe kell venni, hogy az oxalacetat, mint reakciótermék, inhibitorikus hatása. Boyd /1961/ ezért ajánlja a Karmen /1955/ metodikát, mert ennél az eljárásnál a keletkező oxalecetsav olyan gyorsan bomlik el, mint amilyen gyorsan

keletkezik MDH és NADH hatására. Ez a reakció spektrofotometriásan követhető 340 nanométeren. A Reitmann és Frankel /1957/ kolorimetriás eljárása, valamint Cammarata és Cohen spektrofotometriás eljárása /1951/ kevésbé kielégítőek, mert ezeknél az oxalecetsav akkumulációja bonyolítja a reakciót.

A GOT izoenzimek tulajdonsága.

A GOT összaktivitás jelentős része patkánymájhomogenizátumban a mitochondriumokban marad, /Hird és Rowsel, 1950., Müller és Leuthardt, 1950./ és számos kutató közölte, hogy a szövethomogenizátum aktivitása tárolás közben növekszik, valószínűleg az enzim kiszabadulásával a mitochondriumokból. /Schmidt és Schmidt, Wildhirt, 1958., Rosenthal, Thind és Conger, 1960./

A mitochondriumokat dezintegráló eljárások, Waring blendor, vagy ultrahangos dezintegráció, minden esetben tetemes enzim-aktivitás növekedést okoztak, és a mitochondriális aktivitás minden esetben 2 - 4 szerte nagyobb volt, mint a szupernatans aktivitása. /Eichel és Bukovsky, 1961., Boyd, 1961./

Rosenthal et al. /1960/ igazolta, hogy a patkánymájából

izolált mitochondriális és szolubilis GOT hasonlóan viselkedik, mint az anódikus és katódikus forma; azaz a Boyd által 1961-ben leírt GOT I. az anódikus frakció, a szupernatanssal lenne azonos, míg a GOT II. a katódikus frakció, mitochondriális eredetű.

1962-ben Boyd ezt megerősítette patkánymáj butanolos extractummal végzett vizsgálatában, mikor a szupernatans csak anódikus, a mitochondriális frakció pedig csak katódikus izoenzimet tartalmazott.

A két izoenzim nemcsak Elfo-mobilitásban, vagy kromatográfiás viselkedésben különbözik, hanem pH érzékenységük valamint immunokémiai tulajdonságaik is eltérőek, mint ezt Nisselbaum és Bodansky 1964-ben igazolta.

Fleisher et al. /1960/ jelentős különbségeket közölt kutya-szív-izoenzim I. és II. különböző pH-nál történő aktivitás meghatározáskor. Ha a pH-t 7,4 alá csökkentjük, az Izoenzim I. aktivitása rohamosan csökken és pH 6,0-nál már csak 40 %-a marad meg az eredeti aktivitásnak. Hasonló körülmények között az Izoenzim II.-nél ilyen csökkenés nem tapasztalható. Boyd /1961/ patkánymájából előállított Izoenzimeivel hasonló eredményre jutott. Fleisher et al. /1960/ közölte, hogy a két izoenzim K_m -je is különbözik. /asparaginra és ketoglutarat szubsztrát koncentrációra vonatkoztatva./

pH 6,0-on a kutyasziv GOT I. K_M -je $38,4 \cdot 10^{-3}$ M.

pH 7,4-en $11,9 \cdot 10^{-3}$ M.

Az izoenzim II. ugyanebből a szövetből izolálva:

pH 6,0 $2,48 \cdot 10^{-3}$ M.

pH 7,4 $0,7 \cdot 10^{-3}$ M.

A katódikus izoenzimnek nagyobb az affinitása az aszparagin-savhoz, mint az anódikus frakciónak. Az anódos frakciónak viszont a ketoglutársavhoz nagyobb az affinitása, s így pH 6,0-nál, nagyobb koncentrációban a ketoglutársav gátolja a reakciót, /Boyd, 1961./

Tisztított GOT készítményekből izolált GOT-I.-et vizsgálva hasonló eredményre jutottak még: Green 1945., O'Kane és Gunsalus, 1947, Jenkins ésSizer, 1957., Jenkins, Yphantis ésSizer, 1959., Lis, 1958., Velick és Vavra 1962-ben mint Fleisher et al. valamint Boyd az Izoenzim I. /GOT I./-re vonatkozó megfigyelései az enzim nagy specifikus aktivitását illetően.

A két izoenzim különbözik még a vérből való eltűnési sebességükben is. Wakim és Fleisher /1963/ kutya-^{knak} iv. beadott Izoenzim I. sorsát figyelték, s ez csak 4 - 5 nap múlva tűnt el a keringésből, mint az Izoenzim II. 6 órán belül eliminálódott. Kontrasztként: a GPT 19-25 nap múlva is kimutatható volt az injectio után.

Wakim és Fleisher szerint a fentiekben a RES clearance játszik szerepet.

Boyd és Latner /1961/ tovább vizsgálták az Izoenzim I.-et és II.-öt, és nem találták homogennek. Myocardium infarctusnál és CCl_4 mérgezéskor találtak egy harmadik sávot is. Decker és Rau /1963/ különböző patkányszövetből izolált anódikus izoenzimet vizsgálva azt találták, hogy a máj, sziv, és vázizomból izolált enzim három csikra bontható, míg a vese-eredetű csak kettőre. Ugyanők mutatták ki, hogy a kereskedelmi forgalomban levő kristályos sertéssziv GOT /Boehringer/ 4 anódikus frakciót tartalmaz, és nincs benne katódos frakció.

Az emberi sziv anódikus izoenzime három frakciót tartalmaz, míg a kutyasziv GOT homogen. A szerzők szerint az ok az eltérő aminosav-összetételben, vagy más csoportok különbségében keresendő, pl.: sialinsav és az enzimfehérje kapcsolódásában. Boyd 1961-ben korrigálta előző közleményeit, mivel a leírt szövet-preparátumokból izolált GOT-aktivitás mérései tévesek voltak, mert utánvizsgálata szerint mint az extraktum, mint a homogenizátum egyaránt tartalmazza a mitochondriális és oldható formáját az enzimnek. Ez a kritika nem érinti az Izoenzim II. vérpályából való eliminálási sebességére vonatkozó megállapításokat. Ugyanekkor közölte, hogy a szérum

Alanin aminoszferáze.

Állati szövethomogenizátumban csak a szupernatansban találták meg. A kutatók egyöntetű véleménye szerint Elfoval csak egy sávot ad./Fleisher, 1960., Boyd, 1962., Segal és mtsai, 1962., és mások/.

Lang és Massarat 1965-ben szövethomogenizátumot vizsgáltak. Az előállított tisztított GPT enzim, a GOT-al ellentétben, véleményük szerint az ismertetett immunológiai és biokémiai vizsgálatok alapján nem mutatott többféle molekuláris formát, s így azt tételezték fel, hogy GPT izoenzimek nincsenek.

Egyedül Swick és mtsai írják 1965-ben, hogy sikerült patkánymáj-homogenizátumból az enzim mitokondriális formáját is izolálni, mely az összes GPT enzim kb. 8 %-át tette ki.

Igy a többség azt a konkluziót vont le, hogy minden állati szövetben, melyet tanulmányoztak, ez az enzim homogen.

Az áttanulmányozott, általam hozzáférhető irodalmi adatok alapján munkámban azt a célt tűztem ki, hogy egyrészt: igazoljam, hogy az alanin-aminotranszferáze /GPT/ is izoenzim alegységekből áll a GOT-hoz hasonlóan, másrészt pedig, az izoenzim vizsgálatára olyan könnyen hozzáférhető, nem túl nagy technikai berendezést igénylő, de használható módszert dolgozzak ki, mely biztosítaná az izoenzim kimutatását és a kapott eredmények értékelését biokémiai és klinikai szempontból egyaránt. A GPT izoenzim kimutatását oszlopkromatográfiával: DEAE Sephadex és DEAE Cellulose-oszlopon, Agar-gel Elfo-val, Cellogel-Elfoval, valamint papír-Elfoval kíséreltem meg.

Az elválasztáshoz minden esetben emberi serumot használtam, főleg olyan betegek serumát, kiknél magas transzamináze szintet találtunk a rutinvizsgálatok során.

Elválasztás DEAE Sephadex oszlopon.

24 órán át desztillált vízben duzzasztott DEAE Sephadex

A 50 anioncserélő gélt 2 x 15 cm.-es oszlopra vittem fel. 50 ml. 0,4 M. NaOH-val átmostam, majd dest.vizes mosás után 50 ml. 0,5 n. HCl.-el Cl^- ciklusba hoztam és desztillált vízzel ekvilibráltam.

4 ml. vizsgálandó szérumot az oszlopra pipettáztam, majd vizes elúció következett, 15 frakción át.

Cseppszám: 3 - 4 másodperc/csepp, 4 ml.-es frakciók.

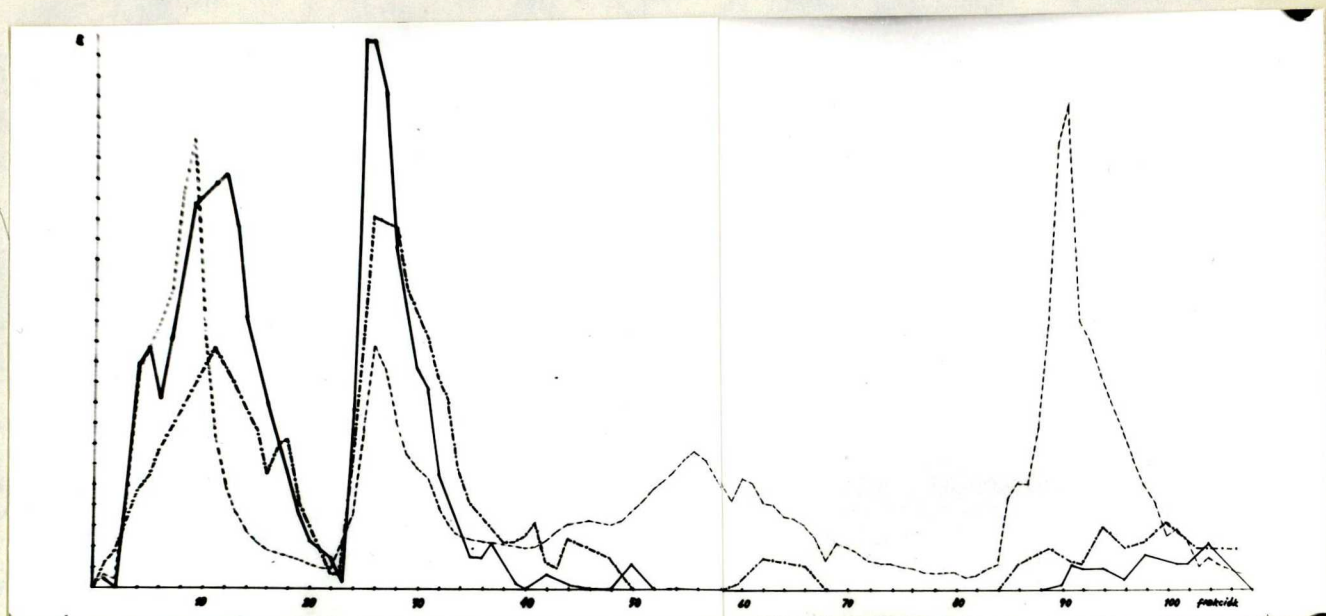
M / 15 pH 8,0 foszfát pufferrel a rendszer pH-ját 8,0-re állítottam be. Innen az eluálást pH gradienssel folytattam pH 8,0 - 6,0 között. A gradiens össztérfogata

200 ml. volt. Az eluálás utolsó szakasza pH 7,4-es

M / 15 foszfát pufferben oldott 0 - 0,5 M NaCl gradienssel történt. Ez az össztérfogat 100 ml. volt. 108 frakciót szedtünk le. Minden frakcióból fehérjemeghatározást végeztem 280 nanométeren, spektrofotométerrel mért UV abszorpció alapján és minden frakcióból meghatároztam a GOT és GPT aktivitást Reitmann és Frankel szerint.

A módszer részletes leírását a papirelektroforezises vizsgálatok ismertetésénél fogom megadni.

A közölt ábrán együtt ábrázoltam a GOT és GPT enzimek egyidejű elválasztását. /1.ábra./



1. ábra. - - - : 280 nanométeren mért fehérje E., — : GPT., -.-. GOT enzimaktivitás E.

Az akut hepatitisben szenvedő beteg szérumának GOT összaktivitása : 640 ME., GPT összaktivitása 820 ME. volt.

Mindkét enzim a deszt. vizes eluálásnál egy-egy határozott peak-et ad. A második, erősebb peak, a pH grá-

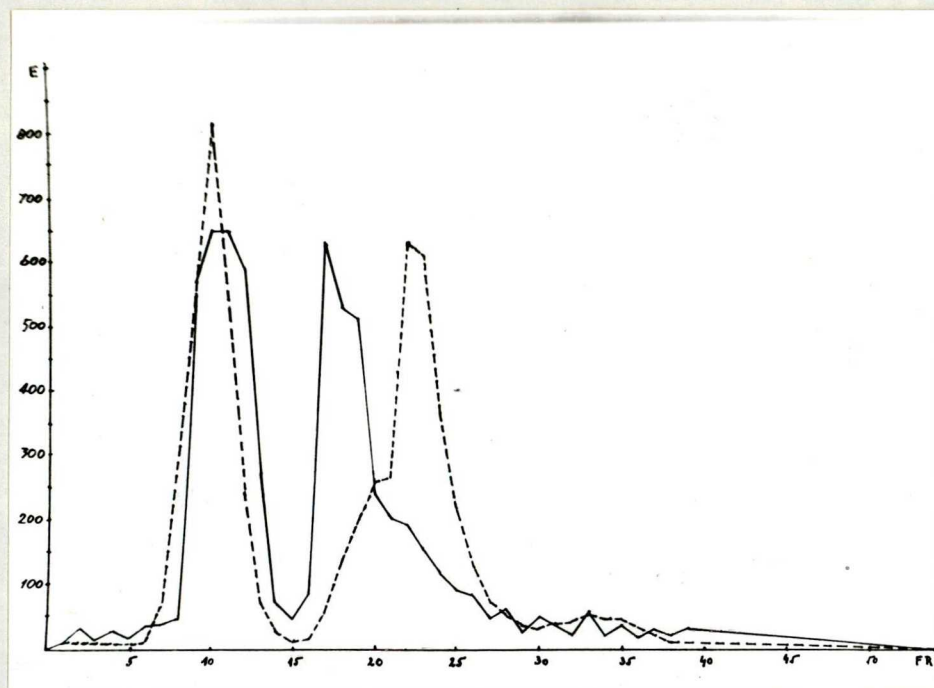
diens elején a pH 8,0-as tartományban még erőteljesebb. Néhány kisebb csucs mutatkozik a pH 7,6-os tartományban, majd a sógradiens mezejében is volt jól mérhető aktivitás.

A GOT ioncserélő kromatografiás elválasztása az irodalmi adatok alapján már ismert /Evangelopoulos, 1965/, de az ábrán látható, hogy a GPT is hasonlóképen alegységekre bontható.

Elválasztás DEAE Cellulose oszlopon.

Serva-DEAE-Cellulose-t megfelelő módon felszuszpendálva és ülepítve 0,5 n. HCl.-el kezelve, majd deszt.vizzel mosva és 0,4 M NaOH-val aktiválva, újra semlegesre mostuk, s 1 x 15 cm. oszlopot öntöttem belőle. 0,05 M. pH 8,0-as Tris-pufferrel ekvilibráltuk. 24 órán át. Az így előkészített oszlopra 3 ml. szérumot vittünk fel. A hepatitis epidemica diagnózisú beteg szérumának GOT aktivitása: 760 ME., GPT aktivitása 440 ME. volt. A felvitt szérumot 10 ml. Tris-pufferrel utánmostam. Az eluálás folyamatos NaCl gradienssel történt, 0 - 0,8 M között, 0,05 M. pH 8,0-as Tris-pufferben. A gradiens összetér-

fogata 80 ml. 1,5 ml.-es frakciókat szedtem. A leszedett 60 frakció mindegyikéből GPT enzim-aktivitás meghatározást végeztem Reitmann-Frankel szerint. Minden frakció fehérje-koncentrációját is meghatároztam 280 nanométeren, spektrofotométerrel mért UV abszorpció alapján. Ezzel a módszerrel az alanin-aminotranszferáze enzim határozott alegységekre volt bontható. /2.ábra./



2. ábra. - - - : 280 nm. fehérje E. — : GPT enzim-aktivitás E.

A 10.-ik frakcióban maximumot adó első izoenzim alegység a katódos vagy mitokondriális izoenzimnek felel meg. A másik csucs a 16 - 19. frakciókban jelentkezett az anódos, vagy citoplazmatikus, másnéven a szolubilis frakció. Ez a béta globulinokkal migrál elfo-kor. Az albuminnal lejövő kisebb intenzitású frakció papír elfo-val ugyancsak kimutatható.

Összegezve: DEAE Cellulose-oszlopon kromatografálva a GPT enzim is izoenzimre bontható. A peakek nagysága és elhelyezkedése diagnosztikai jelentőségű lehet, azonban ennek bizonyítására további sorozatos vizsgálatok szükségesek.

Agar-gel Elfo.

22 x 5 cm. üveglapra öntött 0,1 M.-os foszfátpufferben oldott 1 %-os Difco-Agar-ból 4 mm. vastagságú lemezt öntöttem. A lemez közepén kiképzett vályuba 0,4 ml. szérumot mértem be.

Horizontális elektroforezis 220 V. feszültséggel, 10 mA áramerősségen 18 órán át. Hőmérséklet 10 C°. Puffer: 0,05 M. pH 7,4 foszfát puffer, Whatman 1. papírhidak.

Az elektroforezis után az agarlemezt még nedvesen a közepén hosszában kettévágtam, majd mindkét részt 0,5 cm-es csikokra vágtam fel. Ezeket kis kémcsőben 0,5 ml. 0,05 M. pH 7,4-es foszfátpufferben, megfelelő szétmorzsolás után eluáltam. Az eluálás 24 órán át jégszekrényben történt. A lemez egyik részéből kapott frakciókból Folin-szerint fehérjemeghatározást ~~végeztem~~, a másik részéből pedig enzimaktivitás mérést végeztem.

A fenti módszer szerint nem sikerült az izoenzimek kielégítő frakcionálása, mert az adott pH-n és ionerősségen sem a fehérjék, sem pedig az enzim frakciók nem váltak el megfelelően. Az alfa-béta globulinok területén mindkét enzim adott egy maximális peak-et, de a kisebb csucok nem váltak el egyértelműen és tisztán.

A nehézkes és munkaigényes oszlópkromatográfiás vizsgálatok helyett egyszerűbb módszert kerestem, ami lehetővé tenné az izoenzim rutinvizsgálatok elvégzését.

Munkahelyemen a mátraházai Állami Tüdőgyógyintézet laboratóriumában évek óta végzek rutinszerűen szérum GOT és GPT aktivitás-vizsgálatokat. Az eddig végzett több ezer vizsgálat tapasztalatai alapján sikerült egy mikro-módszert kidolgozni, melynek segítségével 10-30 mikroliter mennyiségű szérumból is elvégezhető a vizsgálat. /Czabafy, 1966./ Ez tette lehetővé, hogy kipróbáljam az izoenzimiek szeparálását papir-Elfo-val eluálósos módszerrel.

Papir Elfo-t GOT és GPT izoenzimiek vizsgálatára Boyd/1961/ valamint Fleisher et al./1960/ használt többek között, de főleg szövethomogenizátumot szeparáltak. Karmen vizsgálta egyedül az emberi szérumot papir-Elfoval, de az enzimaktivitást saját módszerével határozta meg. A Karmen metódus igen pontos, azonban sorozat-vizsgálatokra nehezen alkalmazható, mert NAD-al működő rendszert használva minden frakciót a fotometer küvettájában kell startoltatni, s ez egy vizsgálatra 40 csövet véve, igen nehezen kivihető. Boyd 1961-ben közölt munkájában összehasonlítja a Reitmann-Frankel /1957/ a Karmen /1955/ és a Cammarata-Cohen /1951/ módszereket. Patkánymáj homogenizátumot vizsgált papir-

Elfoval, s azt találta, hogy az aktivitás-meghatározási módszerek közül a Karmen-eljárás adta a maximális értékeket.

Block et al. 1964-ben összehasonlította szérum GOT-aktivitás meghatározásánál keményítő gélen a Steinberg /módosított Karmen/ és a Reitmann-Frankel eljárást. Utóbbit eluálásos módszerrel végezte, és véleménye szerint mindkét eljárás azonos eredményeket adott. A Reitman-Frankel módszert Pollock és mtsai 1969-ben utánvizsgálták C^{14} -el jelzett szubsztrátummal, s megállapították, hogy igen kielégítő és megbízható eljárás.

Fentiek ismeretében, hosszas kísérletezés után alakítottam ki eljárásom, mely könnyen kivihető, és pontos, reprodukálható eredményeket ad.

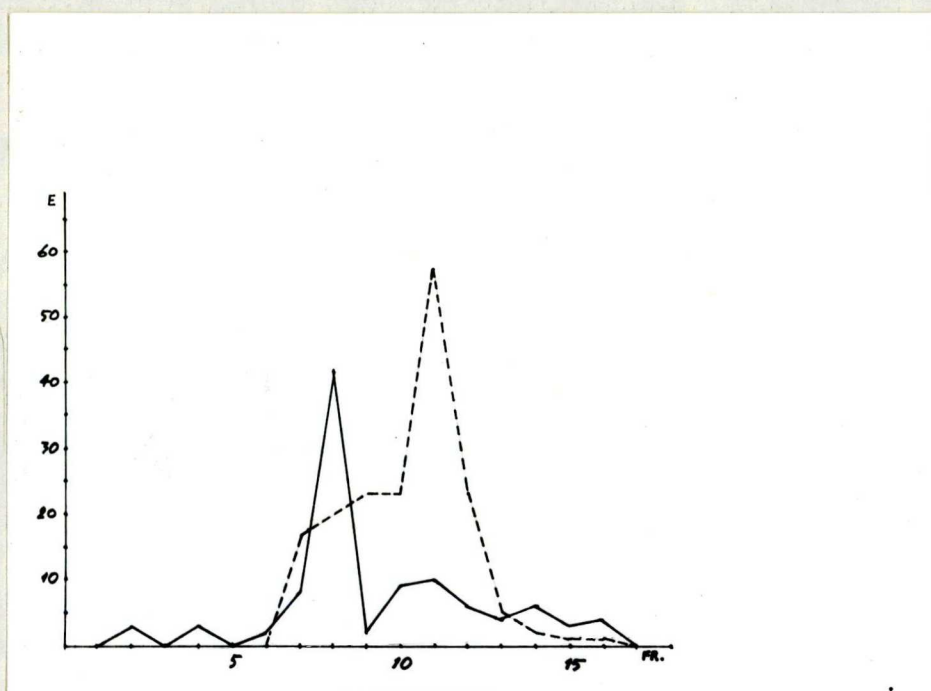
A számos szóbjöhethő módszer közül a papír-Elfo-s elválasztás bizonyult a legkézenfekvőbbnek.

A leggyorsabb eredményt a Cellogel membránon végzett Elfo adta. A futtatás 90 percig tart, s eluálásös módszerrel végezve a vizsgálatot nagy enzimkoncentráció mellett kielégítő eredményeket adott. A GPT enzim izoenzim alegységekre volt bontható.

Azonban az igen kis felvihető szérummennyiség, /1,5 mikroliter /cm./ kisebb enzimkoncentráció esetén már nem



elegendő, hogy a kapott frakciók értékelhetőek legyenek. A magas enzimkoncentráció mellett kapott eredmények azonban igen biztatóak, s a folyamatban levő módosítással, valószínűleg sikerülni fog ezt a módszert rutinvizsgálatra alkalmassá tenni, s kiterjeszteni a normális enzim-szintű szérumok vizsgálatára is.



3. ábra. Cellogel-elfo. - - - : fehérje E., — : GPT-enzim-aktivitás E. GPT összaktivitás: 760 ME.

Papir-elektroforezis.

A vizsgálat menete:

50 x 4 cm-es Macherey-Nagel 214. papírcsikot hosszában két részre osztottam grafitceruzás jelöléssel, majd a hasznos futási teret 1 cm-es darabokra osztottam be. A futtatás után a hosszanti vonal mentén a csikot két darabra vágtam, az egyikből az enzim-aktivitást határoztam meg, a másik feléből pedig a fehérje frakciókat mutattam ki.

A felvitt szérum mennyiség minden esetben 40 mikroliter volt. A futtatáshoz használt puffer 0,06 M.-os pH 7,4-es foszfát puffer, ionerősség: $\mu = 0,42$. A futtatási feszültség 180 V. Futási idő: 18 óra, hőmérséklet 10-14 °C.

Az elektroforezis befejeztekor a papírcsikot két félre vágva a fehérjemeghatározáshoz használt részt 110 °C-os szárítószekrényben fixáltam, majd savanyu fukszinnal történt festés és ecetsavas differenciálás után megszáritottam. A megfestett csikokat az előre bejelölt 1 cm.-es osztások mentén eldaraboltam és n/4 NaOH-val eluáltam. Az eluátumot 3 n HCl-el visszadifferenciálva a csövek tartalmát fotometerrel 1 cm-es küvettában deszt.viz ellen 533 nanométeren megmér-

tem. Az így kapott fehérje frakciók relatív értékeit az enzimaktivitási görbékkel együtt görbe alakjában regisztráltam.

A kapott szérumfehérje-frakciók a magas ionerősségű puffer és a fehérjék elektroforezisénel használt pH 8,6-os puffer helyett használt pH 7,4-es puffer miatt nem váltak el olyan szeparáltan, mint normális körülmények között, hanem az alfa 1. frakció rátorlódott az albumin frakcióra és a gamma-globulin frakció pedig elnyújtottabb sávot adott. Az előzetes próbacsikok értékelése azonban azt mutatta, hogy az izoenzim frakciók csak a fentebb leírt pufferrel és ionerősséggel váltak el tisztán és értékelhetően. 0,06 ionerősségű pH 8,6-os Veronálpuffert alkalmazva, az izoenzimfrakciók elmosódtak, s az enzimaktivitás is csökkent a lugos pH miatt.

Az enzimaktivitás meghatározása:

Az elektroforetikus futtatás leteltével, a még nedves csíkot az előre bejelölt 20 egyenlő 1 cm-es darabokra vágtam. Minden egyes darabot apróra összevagdálva 1-1 kémcsőbe tettem, s az így kapott 20 frakciót 0,37 ml. 0,1 M-os

pH 7,4-es foszfátpufferrel eluáltam. Az eluátumhoz a Reitmann-Frankel módszer előírása szerint elkészített szubsztrátumból 0,37 ml-t mértem. A beméréseket bekalibrált Takátsy-féle cseppentővel végeztem, így gyorsan és pontosan lehetett kis mennyiségeket sorozatban bemérni. /Czabafy, 1966/

Mivel minden anyagból mindkét enzim, a GOT és a GPT szeparálását el kívántam végezni, minden vizsgált anyagból két parallel csíkot futtattam.

A GOT vizsgálatnál használt szubsztrátum:

0,1 M. foszfátpuffer, pH: 7,4. 0,1 M. L-aszparaginsav, $2 \cdot 10^{-3}$ M. alfa-keto-glutársav.

A GPT aktivitás meghatározására szolgáló szubsztrátum:

0,1 M. foszfát-puffer, pH : 7,4. 0,2 M. d-L-alanin, $2 \cdot 10^{-3}$ M. alfa-keto-glutársav.

A szubsztrát hozzáadás után az eluát-szubsztrát keveréket GOT vizsgálatnál 60 percre, GPT vizsgálatnál pedig 30 percre 37°C -os vízfürdőben inkubáltam.

Az inkubációs idő letelte után mindkét enzim-vizsgálatnál

a reakciót sósavas kromogen oldattal állítottam le, mely egyben a színreakciót is biztosította.

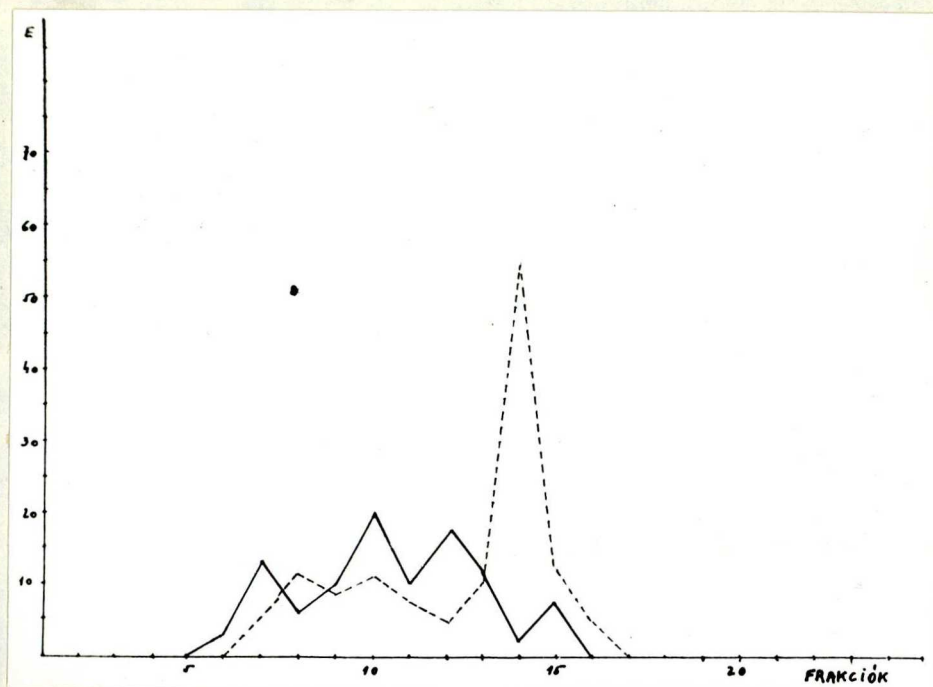
A kromogen oldat: $1 \cdot 10^{-3}$ M. 2,4-dinitrofenilhidrazin normál sósavas oldat.

A felhasznált vegyszerek a Boehringer gyár készítményei voltak. Ezzel a reagenssel a keletkezett oxalecetsavat, illetve piruvátot lehet meghatározni. A reakcióelegyhez hozzáadott 0,4 n.NaOH oldat biztosítja az alkálikus miliót, melyben a keletkezett hidrazon-szín propercionális a keletkezett oxalecetsavval, illetve piruváttal, /Reitmann-Frankel, 1957./ azaz ilyen módon az enzimaktivitás meghatározható.

A kapott színintenzitást 546 naometeren, 1 cm.-es küvetában deszt.víz ellen mértem. Az így nyert értékekből a vakot levonva a fehérje frakciókkal közös ábrán grafikusán ábrázoltam. A kapott értékeket nem számoltam át nemzetközi egységekre /ME/, mert a vizsgálatok célja az enzimfrakciók egymáshoz való viszonyának a tisztázása, s ezt a relatív értékek összehasonlításával, az extinkciós értékek ábrázolásával jobban lehetett ábrázolni.

Eredmények.

Az izoenzim frakciókat betegek szérumból kíséreltem meg elektroforetikusan izolálni. Csak olyan betegek szérumát vizsgáltam, kiknél a rutinszerűen végzett májfunkciós vizsgálatok során emelkedett transzamináze aktivitást találtam. Normál transzamináz-aktivitást mutató egyének keverék szérumát futtattam normál kontrollként. A normál-kontroll keverék szérumok GOT aktivitási görbéje: /4.ábra/



4.ábra: - - - : fehérje E., — : GOT enzim akt.E. Normál keverék szérum.

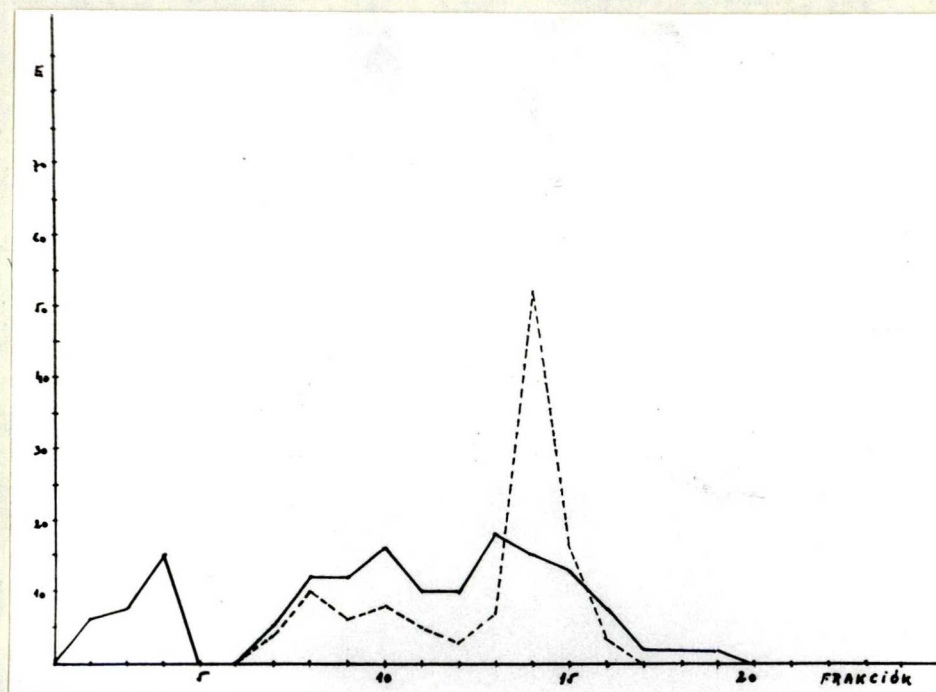
Az ábrán látható, hogy az alkalmazott módszerrel a GOT normál egyéneknekél három anódos peak-et ad, és egy katódos csucst.

Az izoenzim frakciók peak-jeit az ábécé nagybetűivel jelöltem. A két katódos frakció a katód felől elindulva A és B, míg az anódos frakciókat C D és E betűkkel jelöltem. Vizsgálataimmál az A frakció a gamma globulin előtt, a katód felé helyezkedett el, a B, a gamma-globulinnal futott. Az anódos frakciók közül a C a béta-globulinok magasságában, a D, mely legtöbbször a maximális peak-et adta, az alfa 1-2 frakcióval futott. Az E pedig az albuminnal migrált együtt. Egyes kóros esetekben még egy GOT frakció is kimutatható volt, az F, mely postalbuminos mobilitást mutatott, azaz ennek volt a legnagyobb migrálási sebessége.

Tehát normál keverék-szérumban a GOT izoenzim vizsgálatkor 4 frakció volt kimutatható: B, C, D és E. Megoszlásukat tekintve az első három közel azonos aktivitást mutatott, míg az E frakció az előbbiekből kb. 50 %-a.

A GPT izoenzimeknél más a helyzet. A normál-keverék szérumban egy igen határozott A frakció volt kimutatható,

míg a többi frakciók a gamma globulintól az albuminig terjedő szakaszon nagyjából egybeolvadt nagy blokkból állanak. Feltehetően ez az oka, hogy az idézett szerzők homogen enzimként írták le a GPT-t, lévén, hogy csak az anódos frakciót sikerült kimutatniok.



5. ábra. Normál keverék szérum. - - - : fehérje E.,
 — : GPT aktivitás E.

Az egyes izoenzim frakciók részaránya és kimutathatósága változik, ha az összaktivitás a szérumban valamilyen betegség következtében megnő. Ez mindkét enzimre, a GOT-ra és GPT-re egyaránt vonatkozik. Megjelennek olyan frakciók is, melyek a normál-szerumban nem voltak kimutathatók, feltehetően a kis enzimkoncentráció miatt.

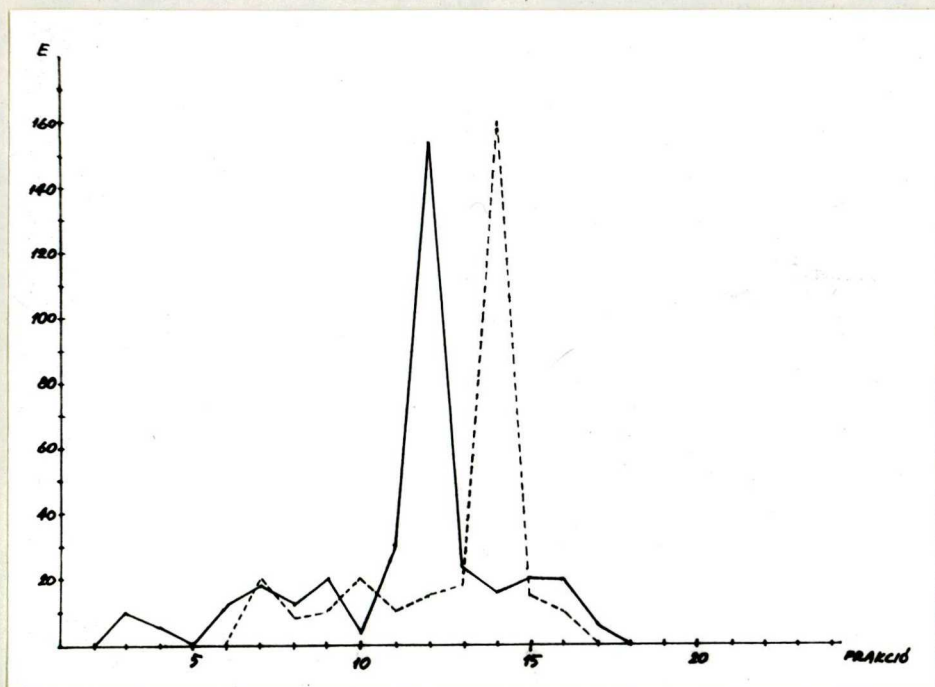
40 beteg szérumának izoenzim vizsgálata volt értékelhető. Minden betegnél az összaktivitás meghatározása után, mindkét transzamináze-izoenzim frakcionálását elvégeztem. A kapott értékek jól összhangban voltak a diagnózissal, mert betegség szerint csoportosítva a vizsgált betegeket, izoenzim görbéik jól egyeztek.

40 beteg közül 34 szenvedett valamilyen májbetegségben. 34 közül 21 hepatitis epidemica, acuta, a többi 13 pedig krónikus májgyulladás, vagy cirrhosis volt.

6 beteg szív, illetve pulmonális infarctus miatt került vizsgálatra.

A vizsgált 21 hepatitis epidemica-s eset GOT izoenzim görbéit összevetve a jellemző görbe a következő volt:

/6.ábra./



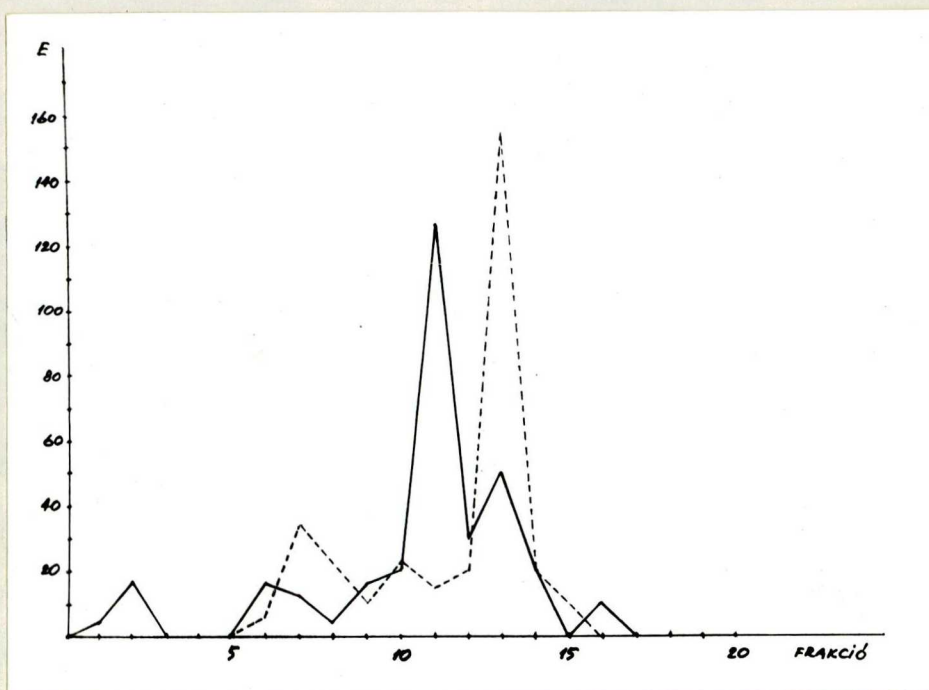
6.ábra. T.B. hepatitis epidemica. GOT összaktivitás:
1500 ME. - - -: fehérje E., GOT enzim akt.:—

Az A frakció minden esetben kimutatható volt, s átlagban 6 - 8 %-át képviselte az összintenzitásnak. Az anód frakciók közül az alfa-1.-el futó D frakció adta következetesen a maximális peak-et, az intenzitás 60 - 75 %-át

képviselve. A B frakció 5 - 10 % a C és E hasonló intenzitásban fordult elő. Az F frakció, mely postalbuminos elhelyezkedésű minden kóros esetben megjelent, de intenzitása változó volt: 2 - 6 %.

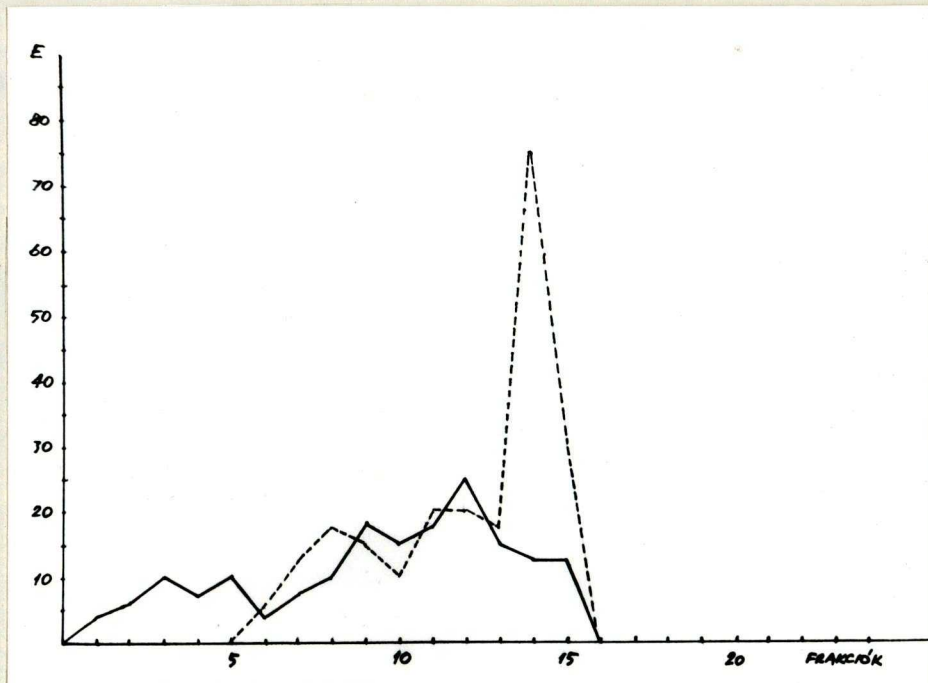
A frakciók nagyságának eloszlása és a betegség stádiuma közötti összefüggés jól tanulmányozható, ha különvesszük azokat a betegeket, akiknél a GOT 1000 ME. egység felett volt. Ezek aktivitási görbéi csaknem teljesen egybevágóak. Viszont a betegség krónikus formájában, mikor az összak-tivitás 200-600 egység között volt, megváltozik az izo-enzim frakciók aránya: az A frakció élesebben elválík, a C frakció beleolvad a még mindig maximális peaket adó D frakcióba, de ennek mértéke 45 - 60 %-ra csökken, s erőteljes csucst ad az albuminnal futó E frakció, s ennek intenzitása a betegség krónikussá válásával arányosan nő, a vizsgált cirrhotikus eseteknél már 30 - 40 %-ra fokozódik.

/7.ábra./



7. ábra. B.J. hepatitis chronica, cirrhosis. GOT összakti-
vítás: 260 ME. - - -: fehérje E., —: GOT enzim akt.E.

Szívinfarctus után a GOT összaktivitás nem emelkedik
olyan nagy mértékben mint hepatitiskor, de az izoenzim
frakciók tipikus képet adnak. /8. ábra./



8.ábra. O.I. myocardium infarctus, exit. GOT összaktivitás: 240 ME. - - -: fehérje E., —: GOT enzim akt.E.

Bár a vizsgált 6 eset kis számánál fogva nem jogosít fel arra, hogy végleges következtetést vonjak le, mindenesetre a kapott kép teljesen karakterisztikus, s egyöntetű volt a frakciók elhelyezkedése és intenzitása. Az összaktivitás 80 és 260 ME. között mozgott.

A közölt módszerrel az aszpartat-aminotranszferáze izoenzimek jól tanulmányozhatók, s az eddig leírt 5 izoenzim frakciót sikerült kimutatni. Az egyes izoenzim frakciók megjelenése, intenzitása és a betegségek között, tipikus összefüggések vannak. További vizsgálatokkal szeretném az észlelteket megerősíteni, esetleg egyéb módszerekkel kiegészítve.

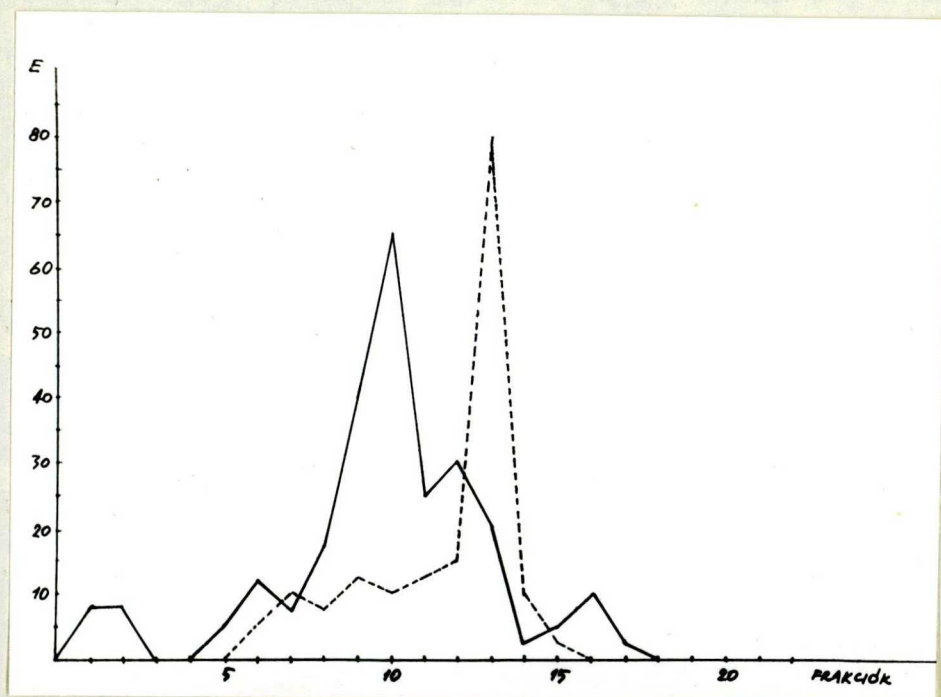
Tényi M. és mtsai 1961-ben közölt cikkükben más módszerrel /kontinuus elfo-val/ dolgozva hasonló eredményre jutottak. A kapott frakciókat még nem nevezik izoenzimeknek, de megállapítják az egyes frakciók eltérő elfo-mobilitását, s a frakciók eloszlását egyes szervek ártalma esetén különbözőnek találták.

GPT izoenzimek.

A legszembevetőbb eltérés a GOT-hoz viszonyítva az, hogy a maximális intenzitást mutató frakció itt nem az alfa globulinnal migrál, hanem mindig a béta globulinnal. A katódos frakciók minden esetben kimutathatók, de a B

frakció néha kissé eltolódik a katód felé. Az anód frakciókból 3 állandó Peak regisztrálható: a C frakció itt beleolvad az erős D frakcióba, mely a legtöbb esetben a maximális peak-et adja. Az E frakció csúcsa sem esik egybe az albumin maximum pontjával, s jelentkezik a post-albuminos F frakció is. A megbetegedéssel összefüggő jelenségek a GOT izoenzimekhez hasonlóan itt is kimutathatók. Akut hepatitisnél a D frakció 65 - 75 %-a az össz-intenzitásnak, a B és E frakciók nagyjából azonos intenzitásúak, s ugyancsak közel egyenlő az A és F frakció.

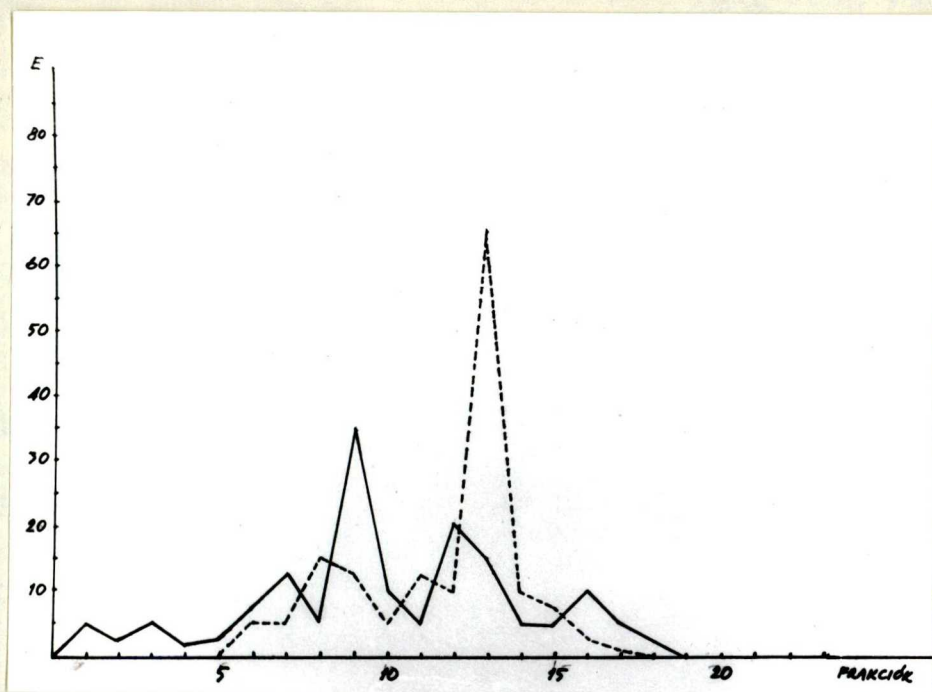
/9.ábra./



9.ábra. B.A. hepatitis acuta, epidemica. GPT összakt. 820 ME.
 ---: fehérje E. —: GPT enzim akt.E.



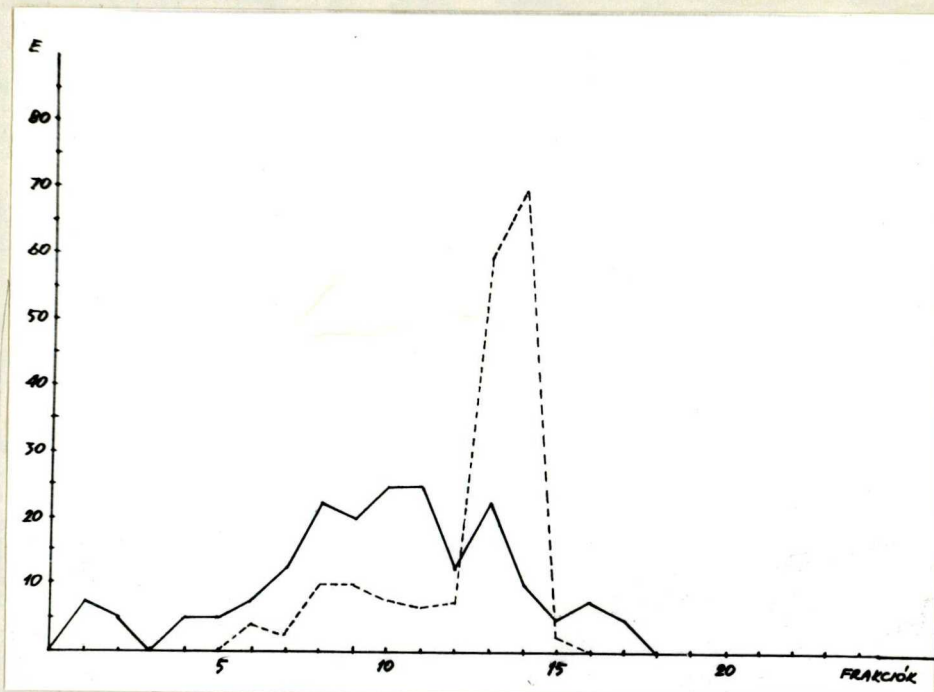
A krónikussá váló májbetegségeknél csökken a maximális D frakció intenzitása, viszont emelkedik az E és F frakciók értéke. A katódos A és B frakció közelebb kerül egymáshoz, s élesen elkülönül a C. /10. ábra./



10. ábra. D.K. hepatitis chronica, ulcus ventriculi.

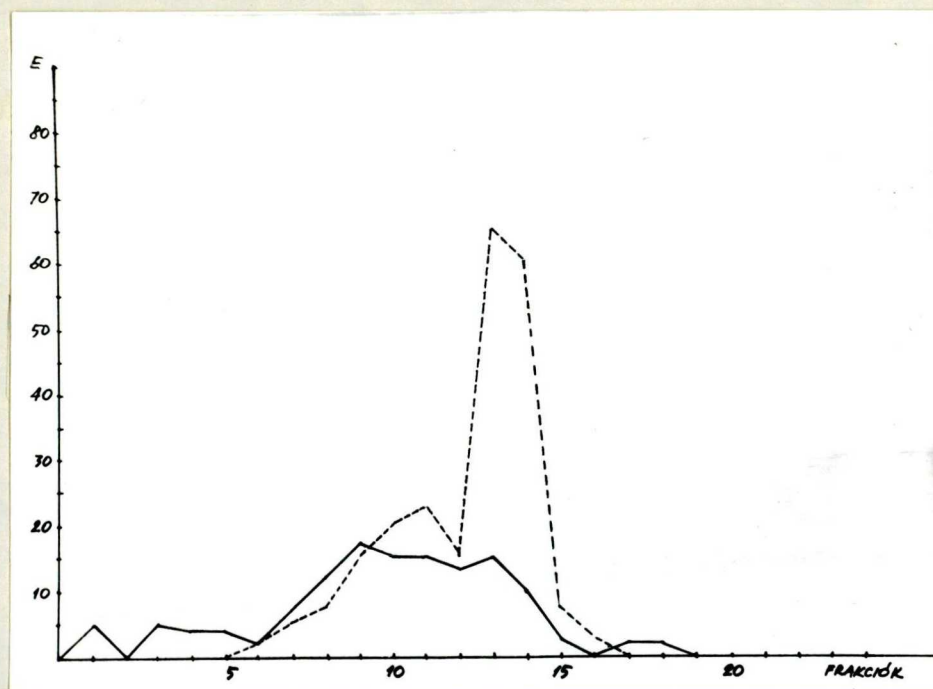
GPT összakt. 120 ME. - - -: fehérje E. —: GPT enzim-akt. E.

A májcomában /atrophia hepatitis flava/ elpusztult beteg szérumából vizsgált GPT-izoenzim eloszlás azt mutatja, hogy bár némi hasonlóság mutatkozik a normál szérumok izoenzim eloszlásához, a jellegzetes csucok azonban mind fellelhetők. Az anódos frakciók jól elválnak. A C, D, E frakciók közel azonos intenzitásúak, a katódos A, B, és a postalbuminos F frakciók is egymásközt egyenlőek. Ez a kép jellemző a májcomára. /11.ábra./



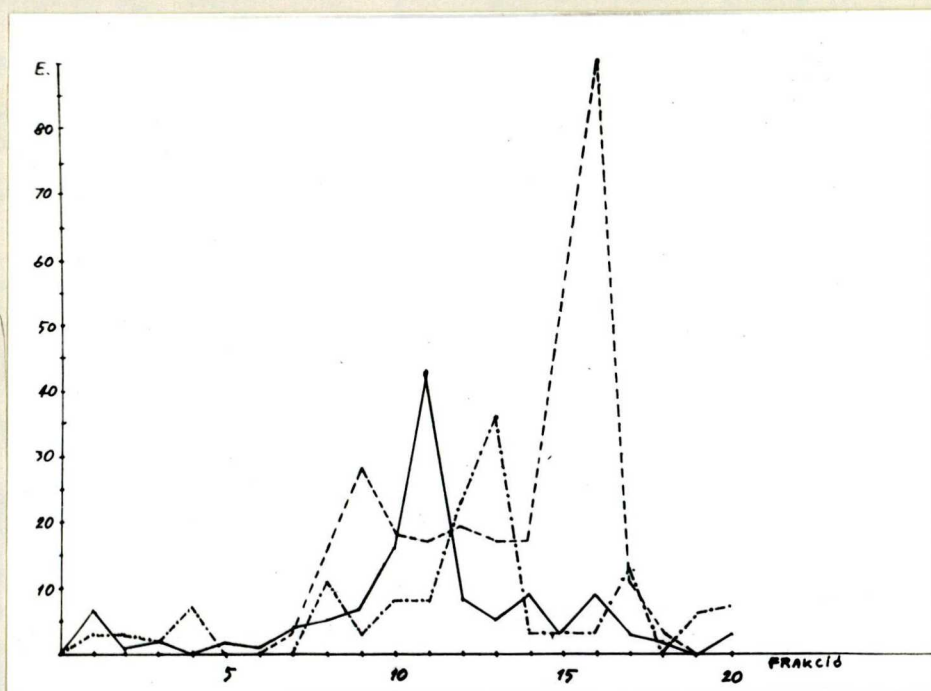
11.ábra. P.F. Atrophia hepatitis flava, coma hepaticum, exit.
GPT összakt. 620 ME. - - - :fehérje E., —: GPT enzim-akt.E.

Krónikus májbetegségeknél, különösen idült alkoholisták máj-cirrrosisánál hasonló jelenségeket tapasztaltam. A D frakció dominanciája úgy tűnik, megszűnik tartós májkárosodásnál, s csak az akut szövetpusztulás tünete. Hasonló görbét adott a szívinfarktusban elhalt beteg szérumának vizsgálata, ami kérdésessé teszi azt az irodalomban fellelhető megállapítást, hogy a GPT inkább máj-specifikus enzim, s szívizom-sérüléskor nem diagnosztikus értékű a vizsgálata. /12.ábra./



12.ábra. O.I. Infarctus cordis, cardiosclerosis, exit.
GPT összakt. 80 ME. - - -: fehérje E., —: GPT enzim-akt.E.

Összefoglalva a GPT-re vonatkozó adatokat: a szakirodalomban általánosan elfogadott megállapítás, hogy a GPT enzim homogen, nem állja meg a helyét, mert a leírt módszerekkel sikerült elválasztani az izoenzimeket. Ezek aránya a betegség természetétől függően változik, s jellemző képet ad. Megállapítható volt az egyes frakciók Elfo-migrálási sebessége a szérum-fehérjéhez viszonyítva, s ezek eltértek a GOT izoenzimek vándorlásától./13.ábra./



GOT összaktivitás 230 ME. GPT összaktivitás 360 ME.
 --- : fehérje E. -.-: GOT akt. E. —: GPT akt.E.

Ö s s z e f o g l a l á s.

Jelen munkámban az emberi szérum aszpartát-aminotranszferáze és az alanin-aminotranszferáze izoenzimek tulajdonságait kíséreltem meg vizsgálni.

A bevezető irodalmi összefoglalásban taglaltam az eddig elért legfontosabb eredményeket, s hasznosítva az ott közölt technikai megoldásokat, kíséreltem ki az alkalmazott eljárást. Olyan módszert dolgoztam ki, mely könnyen hozzáférhető és egyszerű eszközökkel kivitelezhető, mégis jól értékelhető eredményeket ad.

Papir-elektroforezises elválasztással sikerült az aszpartát aminotranszferáze izoenzimeket elválasztani, a talált frakciók száma nagyjából megegyezett az irodalmi adatokkal, s migrálási sebességük is megfelelt az eddig közlteknek.

A frakciók százalékos megoszlása vizsgálataim szerint szoros összefüggésben van a betegség természetével. Az egyes frakciók megléte vagy eltünése is karakterisztikus.

Mindenesetre további vizsgálatok szükségesek, nagy anyagon, egyéb módszerekkel is kombinálva, hogy teljesen tiszta kép alakuljon ki az izoenzim frakciók és a klinikai vonatkozások összetartozásában.

Az alanin aminotranszferáze enzimről vizsgálataim során kiderült, hogy az irodalmi adatokkal ellentétben, ez az enzim is inhomogen, izoenzim frakciókra bontható. A GOT-hoz hasonlóan a frakciók elhelyezkedése és intenzitása diagnosztikus következtetéseket enged meg. Az egyes frakciók vándorlási sebessége eltér a GOT enzim hasonló frakcióitól, ami az enzim és az egyes izoenzim frakciók eltérő molsúlyára és aminosav összetételére utal.

Mindkét transzamináze enzim további részletes vizsgálatát kívánom folytatni, mert úgy hiszem, hogy ezekből talán mint a biokémia, mint a klinikai diagnosztika egyaránt profitálhat majd.

I r o d a l o m

- Abul-Fadl, M.A.M., and King, E.J. Biochem.J. 1949. 45. 51.
- Augustinsson, K.B. and Erne, K. Experientia, 1961. 17. 396.
- Babson, A.L., Shapiro, P.O., Williams, P.A.R. and Phillips, G.E. Clin.Chim.Acta. 1962. 7. 100.
- Block, W.D., Carmichael, R. and Jackson, C.E. Proc.Soc.exp. Biol.N.Y. 1964. 115. 941.
- Bodansky, O., Schwartz, M.K. and Nisselbaum, J.S. Advances in Enzyme Reg. 1966. 4. 299.
- Boyd, J.W. Clin.chim.Acta, 1962. 7. 424.
- Boyd, J.W. Biochem.J. 1961. 81. 434.
- Boyd, J.W. Biochem.J. 1962. 84. 14.P.
- Boyde, T.R.C., and Latner, A.L., Biochem.J. 1961. 82. 51.P.
- Cammarata, P.S., and Cohen, P.P.J. Biol.Chem. 1951. 193. 53.
- Czabafy, L. Proc.VI-th Annual Meet. of Biochem. Budapest, 1966. 337.
- Decker, L.E., and Rau, E.M. Proc.Soc.exp. Biol.N.Y. 1963. 112. 144.
- Eichel, H.J. and Bukovsky, J. Nature. London. 1961. 191. 243.

- Evangelopoulos, A.E., and Sizer, J.W., J.Biol.Chem. 1965.
240. 2983.
- Fleisher, G.A., Potter, C.S., and Wakim, K.G. Proc.Soc.exp.
 Biol.N.Y. 1960. 103. 229.
- Fleisher, G.A., and Wakim, K.G., Proc.Soc.exp.Biol.Med.
 1961. 106. 283.
- Fleisher, G.A., and Wakim, K.G. J. Lab.clin.Med. 1963. 61. 98.
- Green, D.E., Leloir, L.F. and Nocito, V.J. Biol.Chem. 1945.
161. 559.
- Henson, C.P., and Cleland, W.W. Biochemistry. 1964. 3. 338.
- Hird, F.J., and Roesoll, E.V. Nature.London. 1950. 166. 517.
- Jenkins, W.T., and Sizer, I.W. J.Amer.chem.Soc. 1957.
79. 2655.
- Jenkins, W.T., Yphantis, D.A., and Sizer, I.W. J.Biol.Chem.
 1959. 234. 51.
- Jungner, G. Scand.J.clin.Lab.Invest, 1957. 10. supp.
31. 280.
- Kaji, A., Trayser, K.A. and Colowick, S.P. Ann. N.Y. Acad.
 Sci. 1961. 94. 798.
- Karmen, A.J. clin. Invest. 1955. 34. 131.
- Krebs, E.G. J. biol.Chem. 1953. 200. 471.
- Krawczynski, E. Laboratornoje Djelo, 1967. 12. 707.

Kutscher, W., and Wolbergs, K. Z. physiol. Chem. 1935. 236.

237.

Lang, N. and Massarat, S. Klinische Wochenschrift 1965.

43. 597.

Lis, H. Biochim. biophys. Acta 1958. 28. 191.

Markert, C. L. and Möller, F. Proc. nat. Acad. Sci. Wash. 1959.

45. 753.

Meister, A. J. biol. Chem. 1950. 184. 117.

Mendel, B., and Rudney, H. Biochem. J. 1943. 37. 53.

Meyer, K. H., Fischer, E. H., and Bernfeld, P. Helv. chim.

Acta. 1947. 30. 64.

Müller, A. F., and Leuthardt, F. Helv. chim. Acta. 1950.

33. 268.

Neilands, J. E. J. biol. Chem. 1952. 199. 373.

Nisselbaum, J. S. and Bodansky, O. J. Biol. Chem. 1964. 239. 4232.

Nisselbaum, J. S. and Bodansky, O. J. Biol. Chem. 1966. 241. 2661.

O'Kane, D. E., and Gunsalus, I. C. J. Biol. Chem. 1947. 170. 425.

Pfleiderer, G., and Jeckel, D. Biochem. Z. 1957. 329. 371.

Plegemann, P. G. W., Gregory, K. F. and Wróblewski, F. J. Biol.

Chem. 1960. 235. 2282.

Pollock, A. L., Loehr, E., Roberts, D. J. Lab. et Clin. Med.

1969. 1. 166.



- Pryse-Davies, J. and Wilkinson, J.H. Lancet. 1958. i. 1249.
- Reitman, S. and Frankel, S. Amer.J.clin.Path. 1957. 28. 56.
- Rosenthal, O., Thind, S.K., and Conger, N. Abstr. 138-th.
Meet.Amer.Chem.Soc.New.York., 10 c.
- Sayre, F.W., and Hill, B.R. Proc.Soc.exp.Biol.N.Y.1957. 96. 695.
- Schmidt, E., Schmidt, F.W. and Wildhirt, E. Klin.Wschr.1958.
36. 172.
- Schwartz, M.K., Nisselbaum, J.S. and Bodansky, O. Amer.J.
Clin.Path.1963. 40. 103.
- Segal, J.P. et al.J.Biol.Chem. 1962. 237. 1914.
- Sevela, M. Nature.London. 1958. 181. 915.
- Swick, R.W. et al. J.Biol.Chem. 1965. 240. 3534.
- Tényi, M., Varga, L., Lehotai L., Orvosi Hetilap, 1961.
102. 2517.
- Velick, S.F. and Vavra, J. In the Enzymes, 2-nd.ed.,
ed.Boyer, et al.1962.N.Y.Acad.Press.Vol.6.p.219.
- Vessel, E.S. and Bearn, A.G. Proc.Soc.exp.Biol.N.Y. 1957.
94. 96.
- Vithayathil, A.J., Buck, F., Bier, M. and Nord, F.F. Arch.
Biochem.Biophys. 1961. 92. 532.
- Wakim, K.G. and Fleisher, G.A. J.Lab.Clin.Med. 1963. 61. 86.
- Wakim, K.G. and Fleisher, G.A. J.Lab.Clin.Med. 1963. 61. 107.

Warburg, O. Wasserstoffübertragende Fermente, Berlin.

Säenger Verlag. 1948. p. 54.

Webb, E.C. Nature, London. 1964. 203. 821.

Wieland, T., and Pfeleiderer, G. Biochem. Z. 1957. 329. 112.

Wieme, R.J. Clin.Chim.Acta, 1959. 4. 317.

Wieme, R.J. Lancet.. 1962. i. 270.

Wróblewski, F. in Hepatitis Frontiers /Ford Fund.Symposium, ed.

Hartman et al. Boston. Mass. Little Brown. / 1957. p. 447.

