

DOKTORI DOLGOZAT

SZUPEROXID DIZMUTAZOK /SOD/ VIZSGÁLATA

Írta:

HANUSZ BÉLA

okl. gyógyszerész

Készült:

A JATE Biokémiai és Genetikai Csoportjánál

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés	1 old.
Irodalmi áttekintés	3 old.
Kísérleti rész	
Anyagok és módszerek	21 old.
Kísérleti eredmények és értékelés	29 old.
Összefoglalás	56 old.
Irodalom	58 old.

B E V E Z E T É S

Nagy jelentőségű volt azon felismerés, hogy az élő szervezetben lejátszódó biológiai oxidációkban a molekuláris oxigén ekvivalens lépésekben redukálódik. A redukcióban szabad gyök keletkezésére van lehetőség, melynek eltávolítását I. Fridovich a korábban már izolált réz tartalmu proteinekkel hozta összefüggésbe.

Munkámmal a Biokémiai Csoportnál évek óta folyó szuperoxid dízmutáz /SOD/ vizsgálatokba kapcsolódtam be.

Munkám két célkitűzésnek kívánt elegendő tenni:

A./ Először; az egészséges és diabeteszes humán vér SOD és az azzal két szorosan kapcsolatban levő enzim, a kataláz és peroxidáz aktivitását vizsgáltuk és hasonlítottuk össze. Eredményeinket olyan irányban kívánjuk felhasználni, hogy mélyebb betekintést nyerjünk a diabetesz elsősorban másodlagos tüneteinek értelmezésére, olyanok, mint a sejt oxido-redukciós állapotának a változása diabeteszben, valamint - többek között - fokozott szklerotikus elváltozások és az azt előidéző anyagcsereváltozások.

B./ Másrészt; az előzőekben említett két vérmintából, humán placentából, macskaagyból, borsóból és két babfajtából izoláltunk SOD-okat, melyet gélikromatográfiás módszerrel tisztítottunk molekuláris saját-ságaik vizsgálata és összehasonlítása érdekében - tekintettel pl. az általunk megfigyelt, nem specifikus kataláz, illetve peroxidáz hatásaikra stb. Meghatároztuk a fent felsorolt SOD-ok molsúlyát. Ugyanakkor megvizsgáltuk és összehasonlítottuk a SOD-ok aminosav összetételét elvégezve az enzim hidrolízisét. Az eredményeinket összevetettük részben

az azonos eredetű mintáknál egymásközt /így az egészséges és diabeteszes vér/, illetve az irodalomban fellelhető, saját korábbi és új eredményeinkkel.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az utóbbi időben több szerző arra a megállapításra jutott, hogy a biológiai oxidációban a molekuláris oxigén ekvivalens lépéseken keresztül redukálódik, és a redukció alatt szabad gyök intermedierek keletkezésére nyílik lehetőség. A szabad gyökök egyikét szuperoxid anionnak nevezik. Ezt sikerült több kutatónak kimutatni, így Bellou és munkatársai /1969/ /1/, Hirata és Hayaishi /1971/ /2/, Misra és Fridovich /1971/ /3/.

A szabad gyök keletkezésével kapcsolatban a molekuláris oxigén tulajdonságait kell elsősorban figyelembe venni. Az O_2 alapállapotban két páratlan elektront tartalmaz, és paramágneses. Ez a két elektronjával interakcióba léphet és ekkor jön létre egy elektromos lépéssel a már korábban említett szuperoxid gyök. Ez tulajdonképpen oxigén aktiváció, amikor a két oxigén atom között a kötési távolság megnyúlik. A molekuláris oxigén kötéstávolsága $1.11 \text{ \AA}$, a szuperoxid gyökben ez $1.28 \text{ \AA}$, a peroxidban viszont $1.48 \text{ \AA}$. A szuperoxid gyök igen nagy reaktivitást mutat, aminek tulajdonítható többek között a szervezetben a szövetkárosító hatás is. Igen nagy veszélyt jelent pl. a szervezet fehérjéi számára és azokban irreparábilis károsodást hozhat létre. De ugyanez vonatkozik a lipoproteid sejthártyákra stb.

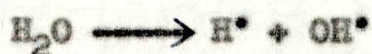
Ezen az alapon fel kellett tételezni, hogy minden olyan élő szervezetben, mely közvetlen kapcsolatban van molekuláris oxigénnel, vagyis aerob, szuperoxid gyök keletkezhet, és a szervezetben kell lenni olyan enzimnek,

ami az O_2^- gyököt olyan reakcióba viszi, ami a gyököt inaktiválja, tehát reakcióképtelen gyököt hoz létre, vagy olyan végterméket, ami a szervezetben egyébként is gyakran előfordul és ezért veszélytelen, vagy a szervezet enzimerendszere az eltávolítására aktív enzimekkel rendelkezik /4/.

Az O_2^- anion vizsgálata vezetett a SOD felfedezéséhez. Kiderült az is, hogy több enzimreakció szuperoxid gyököt produkál. Ilyen pl. xantin-hugysav átalakulást katalizáló xantinoxidáz, mely képes redukálni a citokró-m-c-t, megindítja a SO_3^- oxidációját O_2 és oxid. szubsztrát jelenlétében /5/. A SO_3^- oxidációja szabad gyökös láncreakción keresztül valósul meg. Az oxidáció elindításáért az O_2^- gyököt tesszük felelőssé. /6-8/

Hasonló a ferredoxin $NADP^+$ oxidoreduktáz által katalizált NADPH oxidációja /3/, vagy a NADPH-citokró-m-c reduktáz működése /9/ az oxihemoglobin methemoglobin átalakulás /10/ modellrendszerek közül pl. a fenazin metaszulfát és a molekuláris oxigén reakciója /11/ redukált flavin oxidációja /12/. Az O_2^- szerepet játszik az L-epinephrin spontán lúgos körülmények között lejátszódó autoxidációjában is, mely mérési lehetőséget nyújt a SOD aktivitás meghatározására /13/.

Az O_2^- gyök a biológia rendszerekben való keletkezésén kívül előállítható egyéb módszerekkel. Igen jó a pulse radiolysis /14/; O_2^- -ot sikerült előállítani a víz fotolízisével /15/, valamint ionizáló sugárzással. A második reakció átalakulás egyenlete:



A fenti folyamatban keletkező $\text{OH}^\bullet$ gyök mannitollal megköthető és ezzel az O_2^- gyök keletkezésére kifejtett gátló hatás megszűnik.

Az O_2^- gyök redox potenciálja: $\text{E}_{\text{O}_2^-/\text{O}_2} = +0.59 \text{ V /pH=7.0/}$. /29/ Az O_2^- gyököt dizmutáló enzimet csak igen későn azonosították. A Cu tartalmu fehérjéket már részben izolálták, de szerepüket, működésüket nem ismerték /Cu proteinek, caeruloplazmin/.

Először Mann és Keilin izolált emlős eritrocitákból és májból Cu tartalmu proteineket /16/. Funkcióját nem tudták megállapítani, csak annyit, hogy rozet tartalmaznak, ami triklórecetsavval kioldható. Az izolálás helyéről és Cu tartalma miatt hemocupreinnek, ill. hepatocupreinnek nevezték el. Később agyból is előállították, hasonló fehérjét, ezt cerebropcuprein névvel jelölték. Carico és Deutsch /1969/ citokuprein névvel foglalta össze az említett réztartalmu fehérjéket, amelyeket aztán lassan minden szervből izoláltak /17/.

Fridovich és munkatársai 1969-ben az O_2^- gyök biológiai átalakulásait tanulmányozták, amikor rájöttek arra, hogy a korábban már izolált, de biológiai funkcióra nézve teljesen ismeretlen fehérje a szuperoxid szabad gyök eliminációban játszik szerepet. /18/ Az említett szerzők nevezték el az izolált réztartalmu fehérjét az O_2^- gyök eliminálása miatt a SOD-nak /EC.1.15.1.1/, a koráb-

ban használt karbonsav anhidráz név helyett /EC.4.2.1.1/.

Az enzim által katalizált reakció:



Az $O_2^{\cdot -}$ gyök keletkezésének lehetséges útja az O_2 -ből:



A SOD nagymértékben meggyorsítja az $O_2^{\cdot -}$ gyök dismutációját, főleg a szervezet pH-jánál /a szuperoxid gyök maga ugyanis csak alacsony pH értékeken stabil pH 4.8 körül!/.

Még az enlitett gyök spontán bomlása 30 mp-re tehető, addig SOD jelenlétében az eliminációs idő 2-3 mp-re csökken /19/.

Megállapították, azt is, hogy az enzimhez kötött Cu reverzibilis átalakulások során vezet a végeredményhez: /19/



Az enzimet később növényekből, baktériumokból is izolálták /23-28/.

Az eddigi vizsgálatok alapján két hasonló típusu enzimet tartanak számon:

Az egyik típus: az emlős, növényi és élesztő enzim, mely 2Cu és 2Zn atomot tartalmaz. Ms-a: 32.000 D.

Két alegységből épül fel. /30/ Két egyenlő alegység kevés aromás aminosavat tartalmaz. Az emberi enzimben tirozin is van.

A másik típust bakteriális enzim képezi, ami a Cu atom mellett a Zn atomok helyett Mn-t tartalmaz. Ms-a: 40.000 D. Az alegységek közel egyenlők, azokat SH csoportok kapcsolják össze. Az enzim aromás aminosavakat nagyobb mennyiségben tartalmaz.

Az emlős vörösvértestekből izolált SOD izolálásának egy-egy lépése az enzimnek különleges sajátosságára utal. Az enzimen valószínűleg hidrofób csoport van jelen. Ha a hemoglobint CHCl_3 -EtOH kicsapással eltávolítjuk, kicsentrifugáljuk és az oldatot K_2HPO_4 -tal kimoszuk, az enzim az organikus fázisba kerül és abból acetonnal kicsapható.

/31/

A SOD két alegységre bontható, mely két azonos résznek látszik. Ureával szemben stabil, neutrális oldatban 9.0 M-os ureával szemben is megtartja stabilitását. Guanidín HCl /6.0 M/ inaktiválja. 75 °C-on 0.1 M-os K_2HPO_4 1×10^{-4} M EDTA jelenlétében in inaktiválódik. /31/

Alacsony pH- EDTA oldattal szemben dializálva, rezet veszt és inaktiválódik, de Cu-só hozzáadására reaktiválódik, a reaktiválódás azonban nem teljes mértékű. Hisztidin vesztés következtében az enzim irreverzibilisen inaktiválódik. Valószínűleg a Cu és Zn védő szerepet tölt be az inaktiválódással szemben és hisztidinhez kötődik. /32/

Az enzim elektron spin rezonancia spektruma azt mutatja, hogy az enzim szerkezetében négy imidazol gyűrű van, melyből három a Cu-hez, a negyedik vegyértékével az O_2^- vagy a HO_2^- ionokhoz kapcsolódik. /33/

Az enzim működésével kapcsolatban felfigyeltek arra, hogy az enzim nemcsak az O_2^- gyök dismutációját végzi, hanem azt létre is hozhatja, tehát a reakciót megfordíthatónak tartják. A keletkezés H_2O_2 és O_2 egymásra hatásából látszik valószínűnek SOD jelenlétében. /34/

Az enzim aktivitása 4.8 és 9.7 pH tartományban lényegesen nem változik, csak ezen pH-értékek alatt vagy felett változik.

A SOD KCN-dal, NaF-dal és NaN_3 -dal gátolható. A KCN a Cu-zel lép reakcióba, ami szintén a Cu igen fontos szerepére utal az enzimben. /35/

A H_2O_2 ugyancsak gátló hatással van az enzim aktivitására. A H_2O_2 az enzim Cu atomját redukálja, viszont a Cu csak két vegyértékű formában tudja biztosítani az enzim normál aktivitását. /36, 37/

A SOD aktivitás mérésére több lehetőség van. A módszer direkt és indirekt. A módszerek azon alapulnak, hogy O_2^- gyök fejlesztő rendszerhez adott SOD a keletkezett O_2^- gyököket elbontja. A módszereknél mérhető a citokró-m-redukciója, az adrenalin autooxidációja /31/ és a trifenil-tetrozolium --- formázán átalakulás. /31/

Az enzim egységet azzal az enzim mennyiséggel definiálják általában, mely 50 %-os gátlást okoz. /31/

A SOD-nak igen fontos fiziológiai szerepet tulajdonítanak, ugyanis csak jelenlétében lehet elképzelni az aerob életműködést. /4/ Az O_2^- gyök károsítja a fehérjéket. Irreparabilis roncsoló hatása révén a gyök elősegíti az öregedést, és ezt a SOD hatás fokozásával csökkenteni lehetne. /31/

Az oxigén sátorban tartott betegek szervezetében szintén O_2^- gyök keletkezik, ami káros hatású, mint azt korábban említettük.

A placentában a SOD jelenléte az embriót védi. /38/

A SOD jelenlétéhez kapcsolódik a kataláz és peroxidáz detoxikáló hatása is, hiszen a H_2O_2 is mérgező. /39/

Az O_2^- gyök Klebanhoff és mások szerint szerepel a fagocitózisban, mint biológiai védő baktericid ágens, /40, 44/ és a polimorfmagvú leukociták érzékenyítésében. /43/

Az O_2^- gyök fokozza az etilén termelést, mely a növényekben fontos érési hormon. /31, 42/

Az O_2^- gyök keletkezik az ionizáló sugárzás következményeként. /31/

Az O_2^- gyök legfontosabb hatásterületei közül néhányat kiemelhetünk:

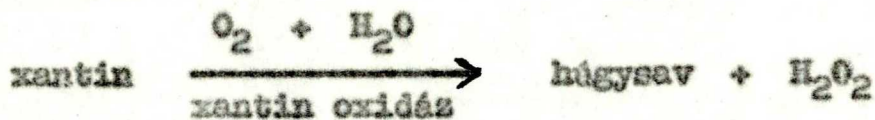
- a./ Redukált ferredoxin oxidációja
- b./ Redukált kinonok és flavonok aerob oxidációja
- c./ O_2 -től függő hidroxilálás
- d./ Triptofán pirroláz gátlása
- e./ Epinephrin autooxidációja
- f./ Streptomycin baktericid hatásának mechanizmusában is szerepet játszik.

SOD AKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSA

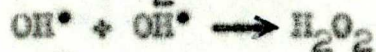
- 1./ Xantinoxidáz, citochrom-c-redukció felhasználásával;
- 2./ Adrenalin $\longrightarrow$ adrenokrom átalakulás felhasználásával;
- 3./ $K_4/Fe/CN/6/$ oxidálásán alapuló mérés.

1./ A xantinoxidáz felhasználásán alapuló mérés /45/

A xantin $\longrightarrow$ húgysav átalakulást a xantin oxidáz /EC.1.2.3.2/ katalizálja, az átalakulás alatt $O_2^{\cdot-}$ -anion keletkezik. Az $O_2^{\cdot-}$ gyök redukáló hatása a Fe^{+++} -citokrom-c-re. A redukciót a SOD gátolja. A Fe^{+++} -citokrom-c redukció során csökken, az oxidált spektrum tartományban 520 nm-nél mért elnyelése, amit spektrofotométerrel jól lehet követni.



A keletkező gyökök átalakulási lehetőségei:



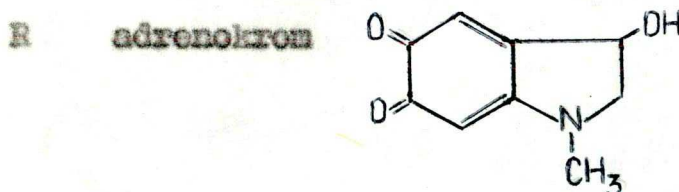
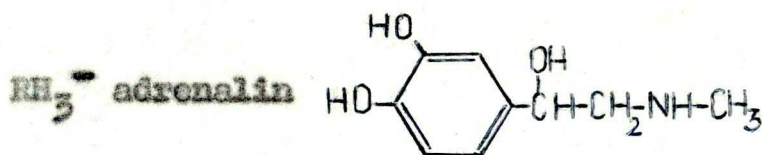
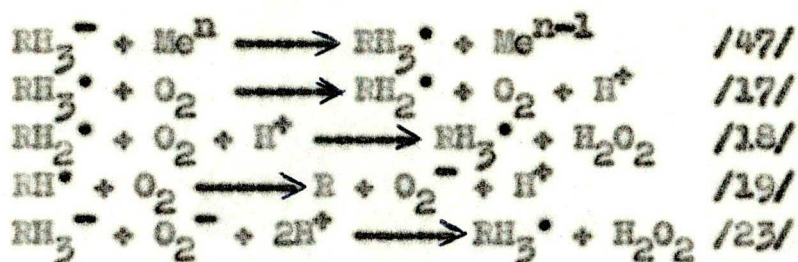
/46/

A mérés alapját képező reakció:



2./ Adrenalin $\longrightarrow$ adrenokrom spontán oxidáció
gátlásán alapuló mérés

Magas pH-n /pH=10.2/ az L-adrenalin /epinephrin/ spon-
tán adrenokrommá oxidálódik, amit az O_2^- gyök láncreak-
ciója indít el. Az oxidáció 480 nm-nél spektrofotometri-
ásan jól követhető. /13/ Az oxidáció sebessége az adre-
nalin koncentráció emelkedésével növekszik. Az oxidáció
mechanizmusa - figyelembe véve a mechanizmusban a fel-
tételezések szerint szereplő /Me/ fémiont - a következő:



KATALÁZ / $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ oxidoreduktase/
/EC.1.11.1.6/

Az enzim által katalizált reakció:



O. Loew 1901-ben mint a természetben igen elterjedten előforduló enzimet írta le a katalázt, bár Thenard már 1819-ben több szövetben kimutatták a működését. A katalázt először marhamájából, majd a vérből izolálta és kristályos formában állította elő Summer és Dounce.

/1937/

Az enzim négy ferriprotoporfirin gyűrűt tartalmaz molekulánként. Molekulasúlya: 240.000. A protohem tartalmát 1.1 %-nak, a vas tartalmát 0.09 %-nak találták.

A vas koncentráció meghatározást 405 nm-nél lehet elvégezni. A moláris extinkciós együtthatója 380-400, 100 hematocrit egységreként. A tisztasági indexét a specifikus aktivitással és az E_{405}/E_{280} értéknél mérhető együtthatóval lehet megadni.

Az aktivitása különböző szövetekben igen eltérő; a legnagyobb a májban és a vesében, és legkisebb a kötőszövetekben. A sejtekben a mitokondriumokhoz és a peroxisómákban kötött, az eritrocitákban szabadon fordul elő. A vér kataláz aktivitását kizárólag az eritrocitákból kimutatható aktivitásra lehet visszavezetni. Az emberi eritrociták normál állapotban tartalmazzák a katalázt, a kacs eritrociták ezzel szemben katalázmentesek. Az elválasztása a hemoglobintól elvégezhető etanolos kloroformos kivonattal vagy DEAE cellulózon gélsterilizációval. A kataláznak több funkciója van, ezek közül a legfontosabbak; katalizálja a következő reakciókat:

a./ A H_2O_2 -t H_2O -ra és O_2 -re bontja /katalitikus aktivitás/, amit már korábban leírtunk.

b./ Különböző H_2 -donorokat oxidál, olyanokat, mint a metanol, etanol, hangyasav, fenol.

Ekkor 1 mol peroxidot használ fel:



ROOH peroxid

AH_2 H_2 donor

ROH oxidált H_2 donor.

A reakció sebessége függ a H_2 -donor koncentrációtól és a H_2O_2 koncentrációtól a rendszerben. A reakció során egy aktív kataláz H_2O_2 komplex /komplex I./ keletkezik. A másik H_2O_2 molekula mint H -donor szerepel a komplex-I. számára. A sebességi konstans: $k \sim 10^{17} \text{ sec}^{-1} \text{ Mol}^{-1}$, a peroxidatív hatás ezzel szemben relative hosszú; $k \sim 10^2 - 10^3 \text{ sec}^{-1} \text{ Mol}^{-1}$.

A kinetikája eltérő a megszokott reakciókinetikáktól. Egyrészt nagy cc.-ju H_2O_2 nem használható, mert enzim-szubstrát telítés lép fel, másrészt a 0.1 M-os H_2O_2 erősen inaktiváló hatású a katalázra, amikor az aktív enzim H_2O_2 komplex /komplex I./ az inaktív komplex-II. és komplex-III-ba megy át. Szubsztrát telítettség esetén a k_s meghatározása nem lehetséges. Szubsztrát telítettség esetén a reakció kinetikusan elsőrendű. /48/

Fiziológiai funkciója elég homályos, és különbözőképpen megítélt. Valószínű a sejterganellumokhoz lokalizált kataláz szerepe specifikus peroxidáz hatás. A peroxiszó-

mák enzimei H_2O_2 -ot termelnek, mint pl. az aminosav-oxidáz, urikáz; amint a kataláz elbont. A vörösvértestekben szerepe hasonló, mint a glutathion peroxidázé. Oxidáltató ágensek jelenlétében a kataláz aktivitás megemelkedik; így aszkorbinsav, metilhidrazin, vagy a röntgen besugárzásnál keletkező methemoglobin jelenlétében. Daganatos betegségeknél a vér kataláz aktivitása 80-90%-kal csökken. /49/

Az enzim hővel szemben érzékeny, szerves oldószerekkel szemben stabil, ami lehetőséget ad az izolálás során extrakciókénti felhasználásra. /49/ Legismertebb gátlói: CN^- , N_3^- , NH_2OH , stb.

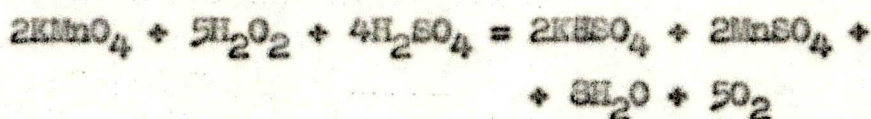
Valószínű, kiegészíti a citokrom-c működését, energiát szolgáltat az O_2 és a Szentgyörgyi-Krebs-ciklus intermediárisjainak interakciójában. /50/

Aktivitás mérésére több lehetőség is van, ezek közül kiemeljük a következőket:

- 1./ Titrimetriás módszer az el nem bontott H_2O_2 visszamérésével;
- 2./ Spektrofotometriás módszer 240 nm-en;
- 3./ Manometriás módszer

Titrimetriás módszer /59/

Viszonylag nagy feleslegben alkalmazott H_2O_2 kataláz hatására elbomlik, s a feleslegben maradt H_2O_2 -ot $KMnO_4$ -tal vagy jodometriásan lehet visszamérni. Az elbontott H_2O_2 -ot időegységre adják meg.



Spektrofotometriás módszer /48/

A H_2O_2 240 nm-nél erős elnyelést mutat, melynek csökkenésével nyomon lehet követni a szubsztrát kataláz általi bontását, mely esetben az egységnyi idő alatti extinkciós differencia E_{240} a kataláz aktivitás mértékét jelenti. Az optimális szubsztrátkoncentrációnak 10 mM H_2O_2 -ot tekintenek, ugyanis a szubsztrát koncentráció és a bontási sebesség nagymértékben összefügg. A mérés szobahőmérsékleten elvégezhető, ami kb. 20 °C-t jelent, a pH optimum 6.8-7.5 intervallumba esik, így a mérésnél használt pH=7.0-tel.

A kataláz aktivitást több módon meg lehet adni:

Bergmeyer-egység: Egy egység az az enzim mennyiség, mely 1000 mg H_2O_2 -ot bont el 1 perc alatt, 25 °C-on.

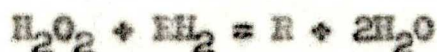
Internethözi-egység: Az az enzim mennyiség 1 iu, mely 25 °C-on 1 Mol H_2O_2 -ot bont el.

Kataláz szám: /51/ mg-ban kifejezett H_2O_2 mennyiség, amelyet 1 l vér elbont.

Kataláz index: A kataláz szám és az 1 ml vizsgált vér millióban kifejezett eritrocita szám hányadosa.

PEROXIDÁZ /H₂O₂ oxidoreductase/
/EC.1.11.1.7/ /48/

Az enzim által katalizált reakció egyenlete:



Theorell 1941-ben állította elő először kristályosan a torma gyökérből. Theorell és Akesson vizsgálatai szerint az enzim prosztetikus csoportja ferriprotoporfirin. Molekulasúlya: 40.000. /50/

A peroxidázok csoportjába több erősen specifikus enzim is tartozik, olyanok mint NAD-peroxidáz, NADP peroxidáz, zsírsavperoxidáz, citokrom-c-peroxidáz és glutathion peroxidáz stb. Ezek a peroxidázok külön csoportját jelentik. A fenti reakciót katalizáló peroxidázok több izozimből állnak. A peroxidázok számos szerves vegyület oxidációját katalizálják, mint főleg az egyszerű fenolok, di- és tripolifenolok mono-, di- stb. aminok és származékaik stb. A felsorolt vegyületcsoportok közül konkrétan néhány: o-krezol, o-toluidin, guajakol, pirogallol, homovanilinsav, o-hidrokinon, o- és p-feniléndiamin, leukomalachit-zöld, redukált 2.6.-diklórfenolindofenol, 4.4'-diaminodifenilamin, benzidin, o-tolidin, di-o-anizidin.

A peroxidázok a H-donorról aerob körülmények között H₂O₂-ra viszik át a H-t, a peroxidázok mint oxidázok /SH₂ + O₂ → S + H₂O₂/ és mint monooxygenázok /SH + O₂ + NADPH → S-OH + NADP + OH⁻/ működhetnek. A peroxidatikus reakciókban a tulajdonképpeni peroxidázok kataláz reakcióra is képesek, mint pl.: fenolokkal, alkoholokkal és néhány szervesetlen szubsztráttal képesek reakciót

katalizálni.

A peroxidázok képesek H_2O_2 -n kívül más peroxidokat is felhasználni, melyben $-O_2H$ előfordul, így az acetil, metil és etil hidrogénperoxidok és még sok peroxid jöhet számításba szubsztrátként.

A hemoproteid peroxidázok igen gyakran fordulnak elő a természetben, így növényekben: pl. torma, ananász, dohány, burgonya stb., élesztőben, baktériumokban és gombákban is. A legrégebben a tormaperoxidáz ismert. Állatokban a leukocitákban, tejben, tüdőben, uterusban, gyomorfalban, májban stb. fordul elő leggyakrabban. Az emlősök sejtjeiben a mikroszómákban, mitokondriumokban található.

Van több enzim, mely a peroxidázokhoz hasonlóan hemoprotein, és aktiválni tudják az oxigént: lakkáz, tirozináz, citokró-m-c-oxidáz stb.

A peroxidázok több csoportra oszthatók:

a./ Protohem peroxidázok

1. Növényi: torma, japán gyökér, fehér répa;
2. Állati: triptofán-pirroláz, jodid peroxidáz, mely a pajzsmirigyben fordul elő;
3. Mikroorganizmusok peroxidázai: citokró-m-c peroxidáz élesztőből.

b./ Verdoperoxidázok

1. Mielocitákból: $FeSO_4$ gátló hatásu, O_2 jelenlétében a gátlás megszűnik. Kelátképzők vagy cisztein gátlás szintén megszünteti.
2. Laktoperoxidáz: tejből izolálható. Prosztetikus csoportja ismeretlen.

3. Miscelláris szövetekben: májban, uterusban. Szerkezete ismeretlen.

c./ Flavoprotein peroxidázok

1. Streptococcus peroxidáz: Prosztetikus csoportja a FAD, hematin és fém nincs bennük. A NADH is jelen van, de csak fiziológiai reduktásként szerepel. A redukcióban jön létre a NADH-HOOH komplex. A C_1-C_4 zsírsavak serkentik a működést.
2. Glutathion peroxidáz: DEAE cellulózon jól elválasztható a kataláztól. A p-toluidint vagy pirogallolt nem képes oxidálni. Optimális pH = 8.0. CN^- és H_2S erősen gátol. Leggyakrabban és legnagyobb mennyiségben a májban fordul elő. A többi szervek csak kisebb mennyiségben tartalmaznak. /48/

A peroxidázok fiziológiai szerepe:

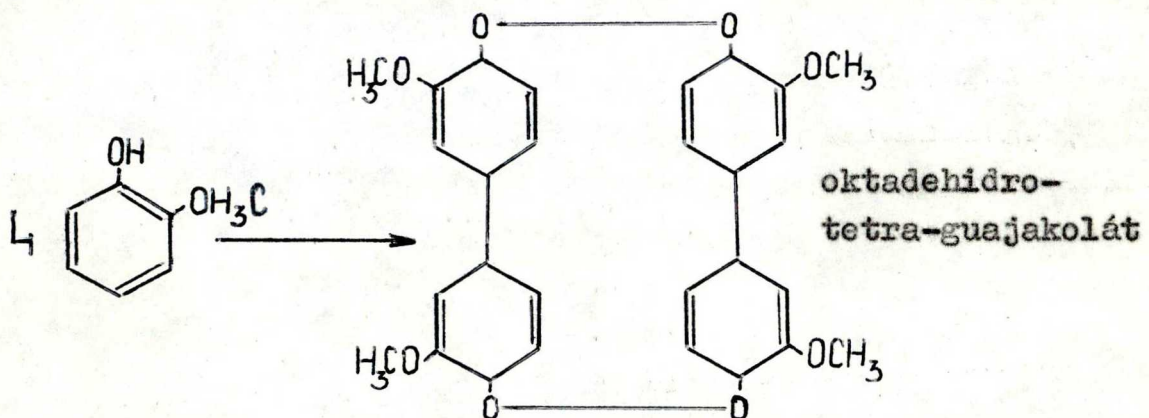
A peroxidázok fő hatásai közé sorolhatók, hogy a hormonok aktivitására befolyással vannak. Előmozdítják a hormonok aktivitását és inaktiválását. Citosztatikumok csökkentik az enzim aktivitását. Mérgezések esetén, malignus tumorokban jelentősen lecsökken az aktivitásuk. A hisztokémiában a fehérvérsejtek megkülönböztetésére használják stb.

Aktivitás mérése:

A peroxidáz aktivitása a H_2O_2 felhasználás, vagy a keletkező legtöbbszor színes oxidációs termékek mennyiségi mérése alapján határozható meg. Leggyakrabban az utób-

bit használják. A szubsztrátként ujabban di-o-anizidint használnak, de a régóta ismert guajakol ma már igen elterjedten használt.

Méréseket guajakollal lehet legegyszerűbben elvégezni /pirokatechin monometiléter/. Mi is ezt a mérést alkalmaztuk. Az enzim katalizálta reakció a következő az aromás szubsztrátra nézve:



A mérést 470 nm-en kell végezni. Egysége a következő képlettel fejezhető ki:

$$\frac{4 \cdot \Delta \text{Ext}}{26.6} = E \text{ peroxidáz.}$$

néhány szóban meg kell itt emlékezni a diabetesz, mint betegség néhány tünetéről, mert a kapott eredmények alapján esetleg összefüggést lehet találni a tünetek és a peroxidáz, kataláz és SOD aktivitások között.

A diabetes mellitus a régi elképzelések szerint elsősorban szénhidrát anyagcserezavar. Az utóbbi időkben mindinkább kiderült, hogy a fehérje és zsiranyagcsere zavara is, ami azt mutatja, hogy általános anyagcserezavar. A tünetek egyik oka az inzulin viszonylagos vagy abszolút hiánya, vagy az inzulin hatás elmaradása a ha-

tás helyeken.

A diabetesz létrejöttét legtöbbször a pankreass béta-sejteinek degenerációja okozza, ami az inzulin mint anyagcserehormon részleges v. teljes termelés kiesésére vezet.

Diabetesznél pl.: fokozott bőrérzékenység jöhet létre, ami a kórokozók megtapadását előmozdítja, ez másodlagos infekciók keletkezését mozdíthatja elő.

Állandó szomjúság és nagymértékű diuresis figyelhető meg. Kiemelkedően fontos szövődménynek tekinthetők az érmegbetegedések. Szívinfarktus szintén az érmegbetegedésekre vezethető vissza.

Az agyi károsodások okául elsősorban az erek fokozott szklerózisa fogható fel, ez egyaránt okozhat vérzést és trombozist.

A szemben korneahomályosodás jöhet létre. Csökken a sebgyógyulási képesség.

A perifériás szklerózis végtag gangrénát eredményez stb.

Ezen felsorolt tünetek összekapcsolhatók azon eredményekkel, melyeket a méréseink során kaptunk, miként a diabeteses vérben a SOD szintje csökkent, így az O_2^- gyök felszaporodására nyílik lehetőség. Az ismert, hogy az O_2^- gyök baktericid ágens lehet a szervezetben, de ugyanakkor a károsító hatás sokkal nagyobb és anyagcsere hatásai révén előmozdíthatja többek között a destrukciót a hasnyálmirigyben, az érmegbetegedéseket és a kornea homályosodást.

KISÉRLETI RÉSZ

Anyag és módszer

Kísérleteink során felhasznált anyagok jelentős része a Reanal készítmény, az L-adrenalin Merck, a Polin reagens Merck, a Sephadex Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, az Aquacide Calbiochem, California készítmények voltak.

A SOD preparálásához használt egészséges humán vért a SZOTE Vérttranszfúziós Állomásáról, a diabeteszes vért az SZTK szegedi Laboratóriumából szereztük be.

SOD előállítása

1./ Emberi vörösvértestekből /vvt/:

Mc.Cord és Fridovich /54/ által közölt és az általunk kissé módosított módszerrel történt.

A friss embervért citrát-dextróz oldattal és egy más esetben EDTA oldattal kezeltük, mellyel a véralvadást gátoltuk meg. A citrát-dextróz oldat összetétele: 2 g Na-citrát + 3 g dextróz + 120 ml desztillált víz. Ebből 2.5 ml-t használtunk 7.5 ml vérhez. Az EDTA oldat 10 %-os volt. Ebből 3 normál cseppet tettünk 1 ml vízhez.

A friss véralvadás-gátolt vért lecentrifugáltuk, így elválasztottuk a plazmát a vvt.-ktől, amelyeket 0.9 %-os

NaCl-ban reszuszpendálunk, majd ismét centrifugáltuk. A mosást 2x megismételtük. A kapott vvt. szuszpenziót kb. azonos térfogatu hideg desztillált vízzel hemolizáltuk. A hemolizátumhoz 0.25 térfogat abszolút etanolt és 0.15 térfogat kloroformot adtunk állandó keverés mellett. A keverés során az elegy sűrűbbé vált, ezért 0.1 térfogat arányban hideg desztillált vízzel tovább hígítottuk, majd centrifugáltuk. Ekkor gyengén sárgás szupernatánst kaptunk. Az oldatot felmelegítettük szobahőmérsékletre, majd 300 g/l arányban szilárd K_2HPO_4 -ot adtunk az elegyhez, ilyenkor két folyadékfázis különült el. A sűrű vizes fázis tartalmazza a legtöbb sót, a könnyű vizes etanoles felső fázis kevés sót tartalmaz. A felső fázison barnás precipitátum különül el. Ezt ismét centrifugáljuk, és a szupernatánst használjuk a továbbiakban. A szupernatánst lehűtjük 4 °C-ra és 0.75 hideg acetont adunk hozzá. Ekkor egy fehér precipitátumot kapunk, amit centrifugálva és hideg vízben oldva dializálhatunk 0.1 M-os KCl-dal szemben. A dializált enzimoldatot Sephadex-G-75-ös /2.8 x 46 cm/ oszlopon gélkromatográfiás módszerrel tisztítottuk. Eluáló szerként 0.1 M-os KCl oldatot használtunk. Az enzimtartalmu frakciókat desztillált vízzel szemben dializáltuk, majd Aquacide-I-el bekonzentráltuk. A kapott tisztva fehérjét használtuk molsúly meghatározáshoz és aminosavanalizishez. /Az eredményeket bemutató részben a leírtakat részben ábrán, részben a tisztítás és bekonzentrálás mértékét táblázatosan közöljük./

2./ SOD izolálása humán placentából:

A SOD izolálásához a humán placentából Keele és munkatársai módszerét használtuk fel. /27/ A placentákat kötőszövettől és más járulékos szövettől megtisztítottuk. A finom pelyhes állományból a vért alaposan kimosztuk előbb vízzel, majd 0.9 % NaCl oldattal. A kimosott maradék szövetet 0.9 % NaCl-ban 5.0 ml/g szövet/Potter homogenizátorral, hűtés mellett homogenizáltuk. A homogenizátumból a nagyobb méretű szövetmaradékokat kis fordulatszám melletti centrifugálással eltávolítottuk. A felüluszóhoz /szupernaténs -I/ 0.3 térfogat etanol-kloroform /5:1/ hideg elegyét adtuk, állandó rázás mellett. /Ekkor a maradék hemoglobin és egyéb fehérjék nagy része kicsapódott./ 15 perc múltán az elegyet lecentrifugáltuk és a csapadékot eldobtuk, a kapott felüluszt /szupernaténs-II/ használtuk a további tisztításhoz. A szupernaténs-II-ből szobahőmérsékletre való felmelegítés után szilárd K_2HPO_4 -tal kisóztuk a szerves fázist. Ekkor az enzim a szerves fázisba megy át, melyet elválasztottunk és a felszínén kivált csapadékot centrifugálás után eldobtuk. A szupernaténs-III-t 4 °C-ra hűtöttük le és 0.75 térfogat hideg acetonnal kicsaptuk az enzimet. A kapott csapadékot desztillált vízben oldva 0.1 M KCl-dal szemben dializáltuk hűtőszekrényben. Dialízis után Sephadex-G-75-ön /2.8 x 46 cm/ oszlopon gélkromatográfiásan tisztítottuk. Az oszlopot 0.1 M KCl-dal ekvilibráltuk. A fehérjekfrakciókat fehérjetartalom és enzimaktivitás szempontjából mértük, majd a SOD aktivitást tartalmazókat összegyűjtöttük. Desztillált vízzel szemben hűtőszekrényben dializáltuk, majd liofilizáltuk. A fehérjetartalom meghatározását Folin-reagenssel, Lowry és munkatársai /55/ szerint végeztük, az aktivitást az adrenalin autooxidációjának gátlása alapján mértük. /13/

A módszer végén leírt Folin-reagenssel végzett fehérje meghatározást és aktivitásmérést minden leírt izolálásnál elvégeztük.

3./ SOD izolálása macskaagyból:

Az enzimet Keele, Mc.Cord és Fridovich által marhaszívra kidolgozott módszerével preparáltuk, amit már mi is korábbi placenta SOD tanulmányaink során használtunk és módosítottunk. /27/

A macskaagyat a koponyából való kivétel után cseppfolyós levegőbe dobtuk és ott tartottuk feldolgozásig. Az agyról a vért hideg 0.9 %-os NaCl oldattal lemostuk, majd 0.05 M-os KH_2PO_4 pufferrel /pH 7.8/ kezeltük, az oldat tartalmazott 1×10^{-4} M EDTA-t, ebben homogenizáltuk kvarc homokkal dörzsmozgásban. 4 °C-on fél óráig állni hagytuk, majd centrifugáltuk. A szupernatánshoz 0.25 térfogat abszolút etanolt és 0.05 térfogat kloroformot adtunk. Hidegen tartva az elegyet, 20-25 perc múlva ismét centrifugáltuk. Ezután szobahőmérsékletre felmelegítettük, és szilárd K_2HPO_4 -ot adtunk a szupernatánshoz 300 g/l arányban. Ekkor az oldat két fázisra különült, az alsó sűrűbb fázis tartalmazta a sok sót, mint korábban, a felső szerves fázis az enzimet. A felső fázist választótölcsérrel választottuk el, és centrifugáltuk. Ekkor sárga szupernatánst kaptunk. Ezt 0 °C-ra hűtöttük, majd 0.75 térfogat hideg acetonnal kicsaptuk az enzimet. A csapadékos oldatot centrifugáltuk és a csapadékot hideg desztillált vízen oldottuk, és 0.1 M-os ECK-dal szemben dializáltuk. A dializátumot vittük fel a Sephadex-G-75-re /2.8 x 46 cm/ oszlopra. Az eluciót

0.1 M-os KCl-dal végeztük. A fehérjetartalmu frakciók elnyelését 280 nm-nél mértük. /Spektromom 201.MOM/. A fehérjetartalmu frakciókat desztillált vízzel szemben dializáltuk, majd Aquacide-dal bekonzentráltuk, és ezt használtuk mólsúly meghatározáshoz és aminosavanalízishez.

4./ Babból és borsóból:

A SOD enzimet Sawada által zöldborsóra leírt módszert /26/ - amit már mi is korábban kipróbáltunk - alkalmaztunk.

A száraz babszemeket /illetve borsószemeket/ 24 óráig desztillált vízben duzzasztottuk. A nedves, megduzzadt babaszemeket /borsószemeket/ turmix-géppel feldaraboltuk 0.1 M-os Na_2HPO_4 oldatot adva hozzá.

Az oldat végső pH-ja 7.3 volt. A homogenizátumot többrétegű gaze-n átpréseltük, majd a préslevet 35 %-ig $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -tal telítettük. Az oldatot 1 óráig 4°C -on tartottuk, és centrifugálással tisztítottuk. A szupernatánszhoz ismételten $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -ot adtunk az 55 %-os telítés eléréséig, 1 óráig ismételten 4°C -on tartottuk. A kivált csapadékot összegyűjtöttük, és kevés vízben oldva dializáltuk desztillált vízzel szemben. A dialízis után a csapadékos oldatot centrifugáltuk. A szupernatánszhoz 0°C -os 0.5 térfogatu acetont adtunk. Az aceton hozzáadást ismételt centrifugálás követte. A csapadékot eldobtuk. A szupernatánszhoz ismét azonos térfogatu acetont adunk. A csapadékot ismét lecentrifugáljuk és 5 térfogatnyi 2.5 mM-os káliumfoszfát pufferben /pH=7.8/

oldjuk. Ismét centrifugálunk és a csapadékot elűbujuk. A pufferolt oldatot 65 %-ig telítjük $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$ -tal. Ilyenkor a SOD főtömege lecsapódott, amint centrifugáltunk és kevés vízzel oldottunk, 0.1 M-os KCl oldattal szemben dializáltunk, majd Sephadex-G-75-ös /2.8x46 cm/ oszlopon tisztítottuk, 0.1 M-os KCl elmóló alkalmazásával. A fehérjefrakciókat 280 nm-en mértük /Spektromon 201. MOM/.

Az enzim tartalmu frakciókat dializáltuk és Aguacide-dal bekonzentráltuk. A tiszta fehérjét használtuk a mólusly meghatározáshoz és az aminosavenalizishoz.

5.a./ SOD aktivitás mérése adrenalin $\rightarrow$ adrenokrom /autooxidáció/ alakulásának gátlása alapján /13/

Reakció elegy: 3.0 ml 0.05 MNa_2CO_3 pufferben
pH=10.2;
 5.5×10^{-7} M L-adrenalin
 3.0×10^{-7} M EDTA. Na_2 -t

és az enzinkivonatok megfelelő mennyiségét tartalmazta. Az autooxidációt 480 nm-en /Spektromon 360, MOM/ fotometriáson mértük, 1 cm-es kúvettában 25 °C-on.

Kontrollként hőinaktivált enzimet tartalmazó Na_2CO_3 puffert használtunk, mely 3×10^{-7} M EDTA. Na_2 -t is tartalmazott.

b./ Peroxidáz aktivitás mérése guajakolos módszerrel /48/

Reakció elegy: 0.5 ml guajakol /0.22 ml guajakol 100 ml vízben/
0.2 ml H_2O_2 /0.16 ml 30 %-os H_2O_2 100 ml vízben/
szükséges mennyiségű enzim oldat

3.0 ml-re kiegészítve 0.01 M-os pH=7.0
foszfátpufferrel.

1 cm-es küvettában mértük /Spektromom 360, MOM/ 470 nm-
en, 25 °C-on.

Kontroll: 2.5 ml puffer

0.5 ml guajakol

A leolvasást 0.5 percenként végeztük, és 3 percig mértük.

c./ Kataláz aktivitás mérése az el nem bontott H_2O_2
oxidimetriás/permanganometriás/ mérésével /59/

100 ml 0.005 M-os pH26.8 foszfátpufferbe 1 ml 30 %-os
 H_2O_2 . Ebbe tettünk olyan mennyiségű enzimet, hogy 12 perc
után is tartalmazzon el nem bontott H_2O_2 -ot. Ebből 3 per-
cenként 10 ml-t 5 ml 10 % H_2SO_4 -ba tettünk, és 0.1 M
 $KMnO_4$ -tal titráltuk.

6./ Fehérjetartalom meghatározása Folin fenolreagens-
sel Lowry és munkatársai módszerével /51, 55/

Szükséges oldatok:

1. 2 %-os Na_2CO_3 0.1 N NaOH oldatban.

2.a./ 0.5 % $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

b./ 1 % KNa tartarát /Seignette só/

1 ml fehérjeoldathoz 4 ml 1. és 2. oldatot adunk, mely
50 ml 1. oldat + 0.5 ml 2.a + 0.5 ml 2.b oldatból készül.
10 percig állni hagytuk, majd 0.5 ml Folin reagenst adunk
hozzá, 30 percig állni hagytuk és 675 nm-en /Spektromom
360 MOM/ mérjük. Kontrollként desztillált vizet használ-
tunk.

Általános fehérjemérés 280 nm-nél /48/

1 cm-es kvare kvettában mérjük, 0.1 M-os KCl-dal szemben. A mérés abszolút fehérjetartalmat nem ad, mivel a 280 nm-en az aromás aminosavak adnak elnyelést és az a fehérjékben tartalmilag változó.

7./ Molekulasúly meghatározása /57/

Sephadex-G-100-Superfine-gélből 0.6 mm vastag réteget készítettünk előzőleg zsírtalanított 20x20 cm-es üveglapon. 0.9 %-os NaCl oldatban futtatjuk 4 óráig, leszálló kromatográfiával. Az enzimet desztillált vizes oldatban vittük fel. Előhíváshoz replika technikát alkalmaztunk /56/. Rétegről a foltokat Whatmann MN 214 papírra vittük át, melyen a fehérjefoltokat 0.4 g brómfenolkék 100 ml metanol és 100 ml 7 %-os ecetsavas eleggyel tettük láthatóvá, majd a fölös mennyiségű előhívót 7 %-os ecetsav oldattal kimostuk. Ekkor a megfestett fehérje foltok állandósultak, és a későbbi kiértékelés lehetővé vált.

8./ Aminosav analízis

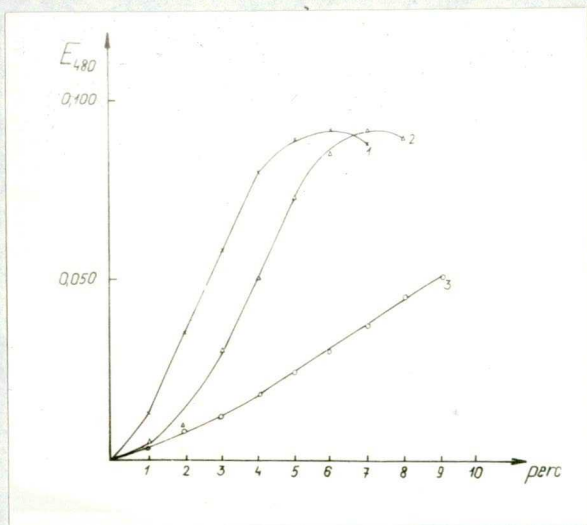
Az aminosav analízisre tisztított, dializált és liofilizált mintákat használtunk. A fehérjéket 6 N HCl-val 22 óráig 120 °C-on hidrolizáltuk. A hidrolizátumot vákuumban szárazra pároltuk. A száraz maradékot pH=2.2 0.05 M citrát pufferben oldottuk, és ezt használtuk az analízishez. Az analízist Biochrom-BC-200 automata aminosav-analizátorral végessük, Aminex-A- 6-os gyantán.

KISÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

1./ Egészséges és diabeteszes humán vér SOD, kataláz, és peroxidáz aktivitás összehasonlítása

2./ Vér SOD aktivitás mérések és összehasonlítások

Az enzimet a már korábban részletezett módszerrel állítottuk elő. A méréseket hemolizátumból és kloroform-etanolos kivonat centrifugátumából végeztük. Az enzim aktivitás mérésére egy kiragadott példát az 1. ábrán mutatunk be. Az ábrán összehasonlítottuk a diabeteszes és nem diabeteszes vér SOD aktivitás értékeit.



1. Kontroll
2. Diabeteszes vér SOD
3. Egészséges vér SOD

/1. ábra/

I. táblázat: Egészséges és diabeteszes humán vér CHCl_3 -
-EtOH-os kivonatából 0.001 ml-t, a hemolizátumból 0.01
ml-t mértünk a reakcióelegyhez, és a végeredményt 1 ml
vértérfogatra számítottuk. /A későbbekben is a nyert
enzim értékeket 1 ml térfogatra számítottuk át./

Az aktivitási méréseket a hemolizátumból végezve fi-
gyelembe kellett venni, hogy az egészséges humán vér-
nél két különböző véralvadésgátlót használtunk, ami je-
lentős mértékben befolyásolta a mért enzim aktivitási
értékeket.

Az I. táblázatból kitűnik, hogy a normál vér CHCl_3 -EtOH-
os extraktuma éppen úgy, mint a hemolizátum, közel öt-
ször annyi SOD-ot tartalmaz a diabeteszes hasonló anyag-
gal összehasonlítva.

A II. táblázatban a Na-citráttal, ill. EDTA-val alva-
dásgátolt normál hemolizátum SOD aktivitás változást
mutatjuk be a használt alvadésgátló tükrében. A reak-
cióelegybe 0.01 ml hemolizátumot mértünk.

A táblázat eredményeiből látható, hogy a Na-citrát va-
lamilyen módon gátolja a SOD aktivitást az adrenokromos
mérésnél.

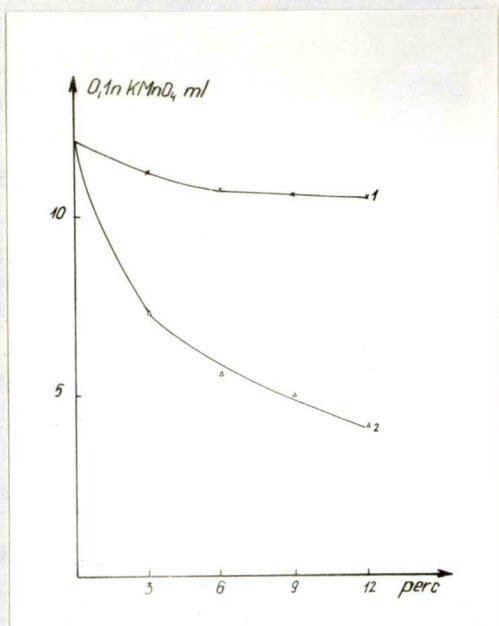
A SOD méréseket vér plazmából is elvégeztük, de a plaz-
mában SOD aktivitást nem volt kimutatható.

11. Táblázat: Normál emberi vér hemolizátum SOD aktivitásainak összehasonlítása Na-citrát és EDTA
verőoldószerrel alkalmazásánál.

Sorszám	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Átlag értékek	Signifi- kancia
Alvadásgetlő Na-citrát	500	✓	✓	✓	✓	250	✓	160	✓	✓	303	143,8 47,4%
Sorszám	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
Alvadásgetlő EDTA	1500	1500	1160	1230	660	830	1000	1330	1330	1080	1161	262,3 22,6%

b./ Vér kataláz aktivitás mérések és összehasonlítások

A kísérleti részben részletezett módszerrel végeztük a mérést ugyancsak egészséges és diabeteszes humán vér min-
tákból. Mindkét minta esetén elvégeztük a mérést CHCl_3 -
-EtOH-os kivonatból, a hemolizátumból és a szérumból.
Az aktivitási viszonyokat a 2. ábra mutatja. /Itt is
kiregadott példa esetén, amit ábrázoltunk mindkét eset-
ben 0.01 ml enzim tartalmu anyagot mértünk be/.



1. Egészséges humán vér
2. Diabetoszes humán vér

A mérési eredményeket Bergmeyer-egységekben és nemzetközi egységekben adtuk meg, mint korábban 1 ml vértér-fogatra számítva.

A $CHCl_3$ -EtOH-os kivonatból és a hemolizátumból egyaránt 0.01 ml-t mértünk a rendszerbe.

Eredményeket a III. táblázatban részletezzük, összehasonlítva az egészséges és diabetoszes vérnél kapottakat, melyekből kitűnik, hogy a diabetoszes vér $CHCl_3$ -EtOH-os extraktumának kataláz aktivitása közel huszszorososa a normál vér $CHCl_3$ -EtOH-os extraktumának, míg ez az eltérés hemolizátum esetén ötszörös értékkülönbséget jelent, ugyancsak a diabetoszes hemolizátum javára.

III. Táblázat: KATALÁZ AKTIVITÁSI ÉRTÉKEK NORMÁL ÉS DIABETESZES VÉR CHOL.-STOH-OS EXTRAKTUMÁBAN ÉS HEMOLIZÁTUMÁBAN EDTA-t HASZNÁLVA ALVADÁSGÁTLÓRAK

Sorrend	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		Átlag érték	Signifi- kancia
Normál vér CHOL.-STOH extr. Bergmeyer e.	0,100	0,177	0,046	0,141	0,270	0,269	0,074	0,210	0,190	0,194		0,147	0,059 55,3%
Hemolitikai egységben	32	52	13	41	79	79	23	60	55	54		49,8	45,92 22,4%
Normál vér hemol. Bergmeyer egységben	0,109	0,177	0,093	0,177	0,192	0,171	0,192	0,151	0,156	0,124		0,152	0,028 18,4%
Hemolitikai egységben	32	52	24	52	53	50	56	44	45	36		44,9	0,99 22,2%
Sorrend	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Diabeteszes vér CHOL.-STOH extr. B. e.	2,30	2,14	2,60	3,76	2,64	4,03	3,64	3,35	1,56	4,21	3,47	1,12	2,64
Hemolitikai egységben	676	629	764	1100	776	1185	1073	985	458	1240	1020	329	776
Diabeteszes vér hemol. Bergmeyer egységben	0,660	0,792	0,723	0,391	1,462	0,660	0,792	1,465	1,120	0,510			
Hemolitikai egységben	194	230	214	115	430	194	230	430	330	150			

A hemolizátumból végzett kataláz méréseknél szintén figyelembe kellett venni a két különböző alvadésgátló használatát, és ezt a IV. táblázatban mutatjuk be.

20. Táblázat: NORMÁL VÉR KATALÁZ AKTIVITÁS ÖSSZEHASONLÍTÁSA Na-CITRÁT ÉS EDTA VÉRALVADÁSGÁTLÓ ALKALMAZÁSA MELLETT

Sorszám	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Átlag érték	Signifi- kancia
Na-citrát alvadás- gátló Bernsayer egységben	0,306	0,340	0,426	0,170	0,392	0,442	0,392	0,392	0,426	0,442	0,390	0,053 13,7%
Normál egységben	90	100	125	50	115	130	115	115	125	129	109,4	23,19 21,2%
Sorszám	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
EDTA alvadásgátló Bernsayer egységben	0,109	0,177	0,083	0,177	0,182	0,171	0,192	0,151	0,156	0,124	0,152	0,028 18,6%
Normál egységben	37	52	24	52	53	50	56	44	45	36	49,8	10,65 21,3%

Itt viszont szembeötlő, hogy az EDTA használata kb. felére csökkenti a kataláz meghatározási értékeket.

A kataláz aktivitás mérés a SOD-zal ellentétben az egészséges és diabeteszes humán vér plazmából is elvégezhető volt. Az V. táblázatban ezeket az eredményeket hasonlítjuk össze.

V. Táblázat: Kataláz aktivitási értékek normál és diabeteses vérplazmából EDTA elválasztó jelenlétében.

Sorszám	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Átlag érték	Signifikancia
Normál vérplazma Reaktivátor 0,01%	1×10^{-4}	5×10^{-5}	$6,8 \times 10^{-5}$	1×10^{-4}	2×10^{-4}	1×10^{-4}	$1,53 \times 10^{-4}$	1×10^{-4}	2×10^{-4}	1×10^{-4}	$1,17 \times 10^{-4}$	$4,03 \times 10^{-5}$ 24,4%
Hemolitikai egységben	3,0	1,5	2,0	3,0	6,0	3,0	4,0	3,0	6,0	3,0	3,45	1,13 52,7 %
Sorszám	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Diabeteses vérplazma Reaktivátor 0,01%	$1,42 \times 10^{-4}$	$1,55 \times 10^{-4}$	1×10^{-4}	2×10^{-4}	$2,2 \times 10^{-4}$	1×10^{-4}	$2,2 \times 10^{-4}$	$1,07 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-4}$	2×10^{-4}	$1,72 \times 10^{-4}$	0,448 26,0 %
Hemolitikai egységben	3,0	4,0	3,0	6,0	6,26	3,0	6,26	3,6	6,2	6,0	4,93	1,346 27,3 %

A reakcióelegybe 1.5 ml plazmát mértünk és az aktivitásokat 1 ml vérré számítottuk. Véralvadásgátlóként mindig EDTA-t használtunk.

Az V. táblázat összehasonlító adatai szerint nem mutatkozik lényeges eltérés a normál és diabeteses vérplazma esetén.

Az aktivitás mérésekor plazma esetében is tekintettel kellett lenni a kétféle véralvadásgátló alkalmazására, amit a VI. táblázatban hasonlítottunk össze.

VI. Táblázat: Normál vérplazma katalis aktivitása Na-citrát és EDTA véralvadásgátló alkalmazása esetén.

Sorszám	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Átlag érték	Signif. kényszer
Na-citrát alvadásgátló Hermeser egys.	$7,8 \times 10^{-6}$	$6,8 \times 10^{-6}$	$6,5 \times 10^{-6}$	$10,4 \times 10^{-6}$	$8,3 \times 10^{-6}$	$9,3 \times 10^{-6}$	$6,3 \times 10^{-6}$	$5,2 \times 10^{-6}$	$9,3 \times 10^{-6}$	$6,8 \times 10^{-6}$	$6,58 \times 10^{-6}$	$1,796$ 27,6%
Nemzetközi egységben	21,7	14,1	19,1	31,5	25,5	19,5	12,6	15,5	28,6	14,1	19,82	5,60 28,2%
Sorszám	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
EDTA alvadásgátló Hermeser egys.	1×10^{-6}	$5,1 \times 10^{-5}$	$6,8 \times 10^{-5}$	1×10^{-6}	2×10^{-6}	1×10^{-6}	$1,5 \times 10^{-6}$	1×10^{-6}	2×10^{-6}	1×10^{-6}	$1,17 \times 10^{-6}$	$4,02$ 34,3%
Nemzetközi egységben	3,0	1,5	2,0	3,0	0,0	3,0	4,0	3,0	6,0	3,0	3,45	1,13 32,7%

A VI. táblázat adatai azt mutatják, hogy a plazmában végzett méréseknél viszont az EDTA fejt ki gátlást a meghatározásoknál.

c./ Peroxidáz aktivitás mérése

A diabeteszes és egészséges humán vérből is elvégeztük a peroxidáz méréseket, de értékelhető aktivitást egyetlen esetben sem sikerült kimutatni. Az extinkció-változások olyan kicsik voltak, hogy mérési hibának tekinthetők.

2./ SOD enzimek tisztítása gélkromatográfiás módszerrel

Az előzőekben már ismertetett módszerek segítségével sikerült humán vvt.-ből, humán placentából, macskaagyból, borsóból és babból a SOD enzimet megtisztítani. Az így nyert tiszta preparátumokat használtuk fel molekulasúly meghatározásra és az aminosav analízishez.

Az alábbiakban 3.-8. ábrán a tisztítási folyamatok eluciókromatogramjai láthatók. A SOD jelenlétét a frakciók enzimaktivitás mérésével követtük. /Ezt az ábrákon szaggatott vonallal jelöltük./

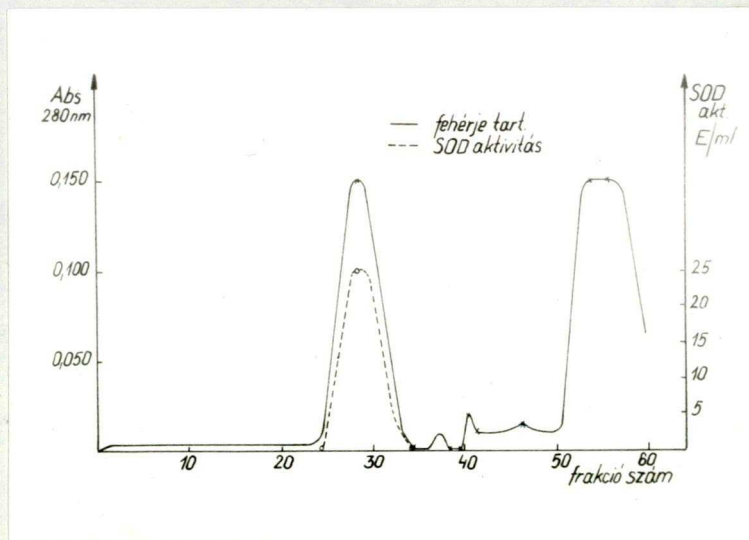
Eluensként: 0.1 M KCl oldatot használtunk. Az eluens átfolyási sebesség 30 ml/óra volt.

A tisztítási folyamat egyes fázisainak mértékét az alábbi táblázatban foglaltuk össze.

A n y a g	Össz- térfogat /ml/	Össz- fehérje koncentr. /mg/	Protein koncentr. /mg/ml/	Össz enzim ak- tivitás az oldat- ban	Speci- fikus ak- tivitás /Egység/ ml/	Tisza- sági faktor
Vér	75	945.0	12.60	19 200	20.3	-
CHCl ₃ -EtOH-os szupernatáns	65	211.2	3.25	12 415	58.8	2.9
Acetonos csapadék vizes oldata	16	36.8	2.30	5 312	144.0	7.1
Sephadex-G-75 kromatografálás után	72	18.0	0.25	11 520	640.0	31.5

VII. táblázat: Egészséges humán vér SOD tisztítása

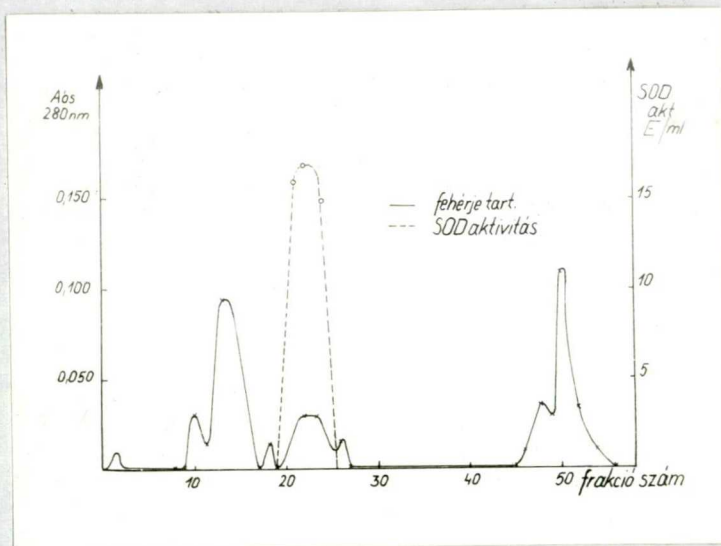
3. ábra: Egészséges humán vér SOD tisztítás elúciós kromatogramja



A n y a g	Össz- térfogat	Össz- fehérje koncentr.	Protein koncentr.	Össz enzim ak- tivitás az oldat- ban	Speci- fikus ak- tivitás /Egység/ ml/	Tisza- sági faktor
	/ml/	/mg/	/mg/ml/			
Vér	150	1 890	12.60	2 700	1.42	-
CHCl ₃ -EtOH-os szupernatáns	180	630	3.50	1 988	3.15	2.2
Acetonos csapadék vizes oldata	58	174	3.0	8 700	50.00	35.2
Sephadex-G-75 kromatografálás után	35	22.7	0.65	4 665	205.50	144.7

VIII. táblázat: Diabetoszes humán vér SOD tisztítása

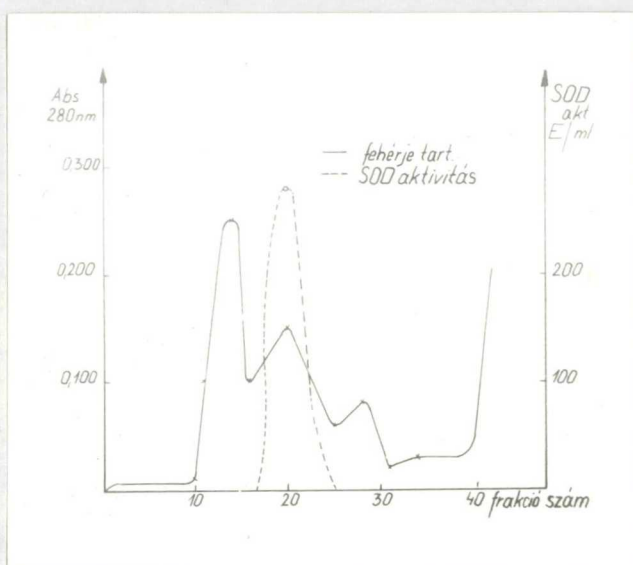
4. ábra: Diabeteszteses humán vér SOD tisztítás
elúciós kromatogramja



A n y a g	Össz- térfogat /nl/	Össz- fehérje /mg/	Protein koncentr. /mg/ml/	Össz en- zim akti- vitas	Specifi- kus akti- vitas /E/ml/	Tiszta- sági faktor
Szupernatans I.	420.0	26 544.0	63.20	28 600	1.1	-
Szupernatans II.	432.0	885.6	2.05	28 600	32.5	30
Szupernatans III.	115.0	146.1	1.27	16 500	113.0	100
Acetonos csap. vizes oldata	8.2	9.02	1.10	5 570	610.0	556
Sephadex G-75 kromatogr. után	9.2	1.44	0.16	3 380	2 350	2 136

IX. táblázat: Humán placenta SOD tisztítása

5. ábra: Humán placenta SOD tisztítás elució kromatogramja

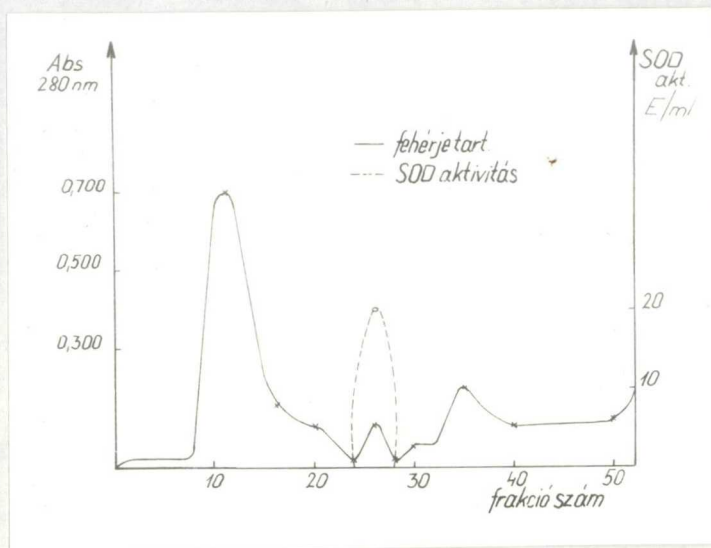


A n y a g	Össz- térfogat	Össz- fehérje koncentr.	Protein koncentr.	Össz enzim ak- tivitás az oldat- ban	Speci- fikus ak- tivitás	Tiszta- sági faktor
	/ml/	/mg/	/mg/ml/		/E/ml/	
Vér	90	1 620.0	18.00	300	0.18	-
CHCl ₃ -EtOH-os szupernatáns	62	151.9	2.45	250	1.63	9.05
Acetones csapadék vizes oldata	20	29.0	1.45	316	10.90	60.50
Sephadex-G-75 kromatografálás után	30	13.5	0.45	500	33.60	186.00

X. táblázat: Macskaagy SOD tisztítása

Macskaagy súlya: 202.5 g volt.

6. ábra: Macskaagy SOD tisztítás elúciós kromatogramja

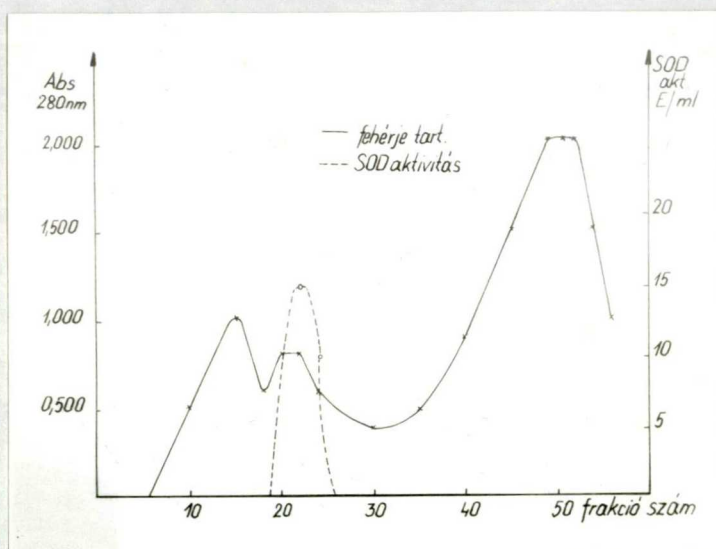


A n y a g	Össz- térfogat /ml/	Össz- fehérje /mg/	Protein koncentr. /mg/ml/	Össz- enzim ak- tivitás	Specifi- kus akti- vítás /E/ml/	Tízta- sági faktor
Homogenizátum	590	6 726.0	11.40	3 000	0.45	-
Dializátum	70	903.0	12.90	1 000	1.10	2.44
Acetonos csap. vizes oldata	20	49.2	2.46	510	10.30	22.90
Sephadex G-75 kromat. után	30	24.0	0.80	416	17.00	37.70

XI. táblázat: Fehér gyöngybab SOD tisztítása

A feldolgozott bab száraz súlya: 500 g.

7. ábra: Fehér gyöngybab SOD tisztítása eluciós kromatogramja



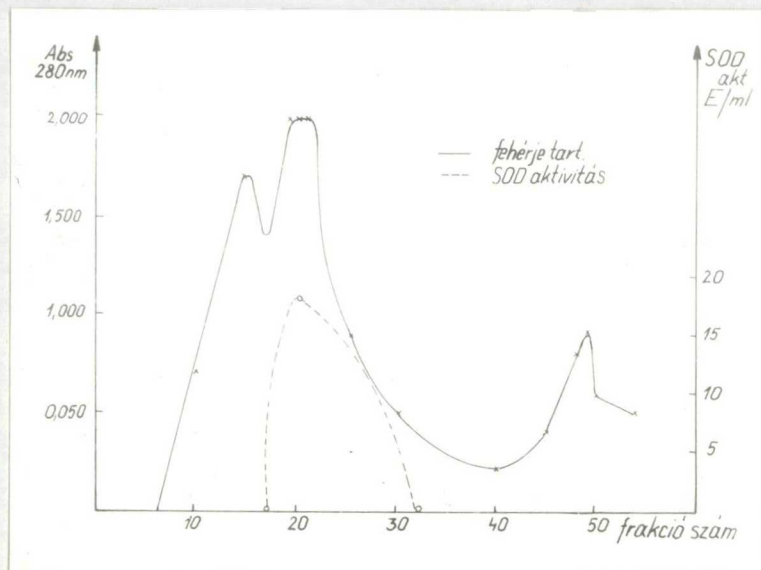
A n y a g	Össz- térfogat /ml/	Össz- fehérje /mg/	Protein koncentr. /mg/ml/	Össz- enzim ak- tivitás	Specifi- kus akti- vítás /E/ml/	Tishta- sági faktor
Homogenizátum	600	7000	11.60	3500	0.50	-
Dializátum	80	900	11.25	1400	1.55	3.10
Acetonos csap. vizes oldata	20	60	3.00	600	10.00	20.00
Sephadex G-75 kromat. után	35	30	0.85	550	18.30	36.60

XII. táblázat: Fűzj bab SOD tisztítása

A feldolgozott bab száraz súlya: 500 g.

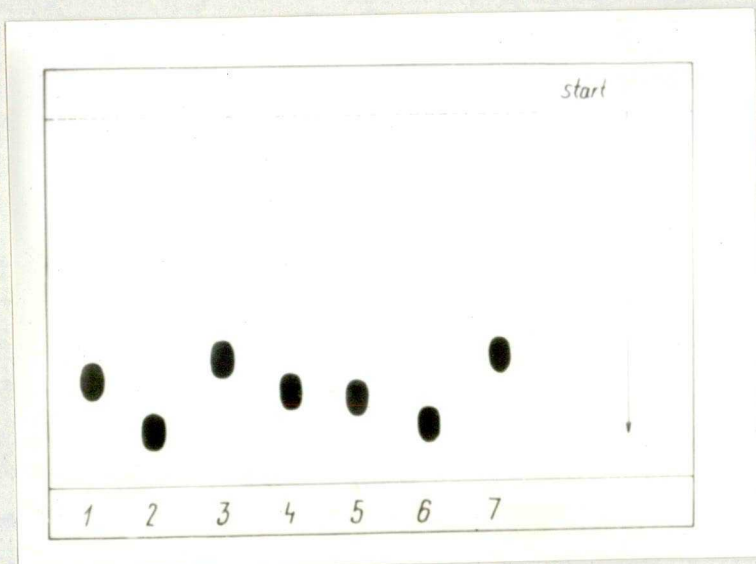


8. ábra: Fűrj bab SOD tisztítás elució kromatogramja



3./ SOD enzim mólsúly meghatározása vékonyréteg gélkromatográfia segítségével

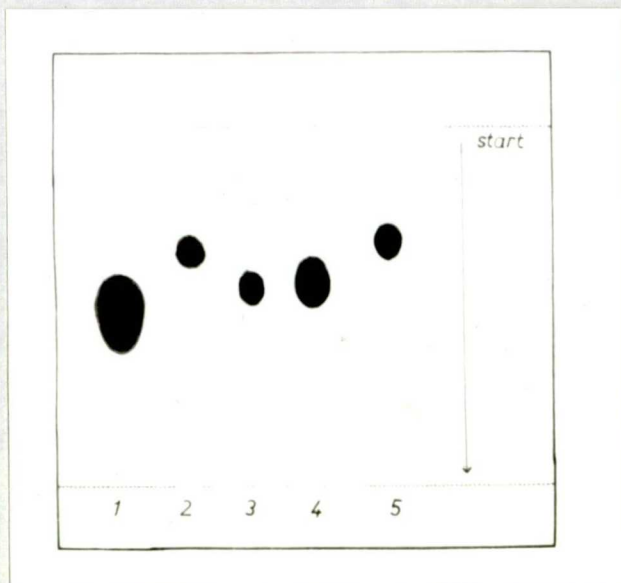
A meghatározáshoz összehasonlító anyagként más forrásból izolált már ismert molekulasúly SOD-okat használtunk. Összehasonlítóként zöldborsó SOD-t, marhavörsvértest SOD-t használtunk. A zöldborsó SOD molekulasúlya 31.500 D, a marha vvt. SOD molekulasúlya 32.600 D. Ezenkívül még ismert a humán vvt. molekulasúlya: 33.600 D.



- | | |
|--|------------------------|
| 1. Marha vvt. SOD: /32600 D/ | 5. Fehér gyöngybab SOD |
| 2. Zöldborsó SOD: /31500 D/ | 6. Fűz bab SOD |
| 3. Egészséges humán vér SOD: /33600 D/ | 7. Macskaagy SOD |
| 4. Diabetoszes humán vér SOD | |

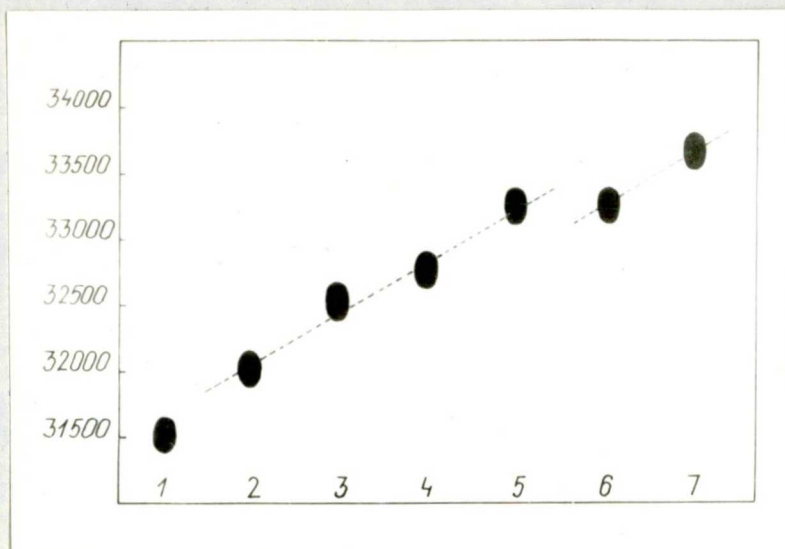
Összehasonlításképpen közöljük a megtisztított humán placenta SOD kromatogramját és mólsúlyát.

A humán placenta SOD általunk meghatározott mólsúlya: 31-33000 D között van.



1. Zöldborsó SOD: Ms: 31500 D
2. Marha vvt. SOD: Ms: 32600 D
3. Humán placenta SOD.
4. Humán placenta SOD.
5. Humán vvt. SOD: Ms: 33600 D

Molekulasúly szerint sorbaállítva és az ismert mólsúlyokkal összehasonlítva megkapjuk az ismeretlen SOD-ok körülbelüli mólsúlyát:



- | | |
|-------------------|------------------------------|
| 1. Zöldborsó SOD | 5. Fehér bab SOD |
| 2. Fűrj bab SOD | 6. Diabeteszes humán vér SOD |
| 3. Marha vvt. SOD | 7. Egészséges humán vér SOD |
| 4. Macskaagy SOD | |

Az ábra alapján az eddig még nem izolált SOD-ok hozzávetőleges molsúlyai:

Diabeteszes humán vér SOD:	33 300 D
Macskaagy SOD:	32 800 D
Fehér gyöngybab SOD:	33 300 D
Fűrj bab SOD:	32 000 D

4./ Az összehasonlító aminosavanalízis eredményei

Az analiziskor kb. 0,2 mg fehérjének megfelelő hidrolizátumot vittünk fel az oszlopra, 0,403 ml pufferben /pH 2,2/ oldva. Az oszlop 52-53 °C-ra volt temperálva.

A kapott kromatogramok regisztrált logaritmikus csúcsainak félértékénél számolt pontok és a félmagasságának szorzatát a Leu-faktorral szoroztuk, majd ezt a nor-Leu-faktorral, így megkaptuk az aminosavak mennyiségét úmólban. Ezekből az értékekből mol.% értékeket számítottunk és a táblázatban ezeket az adatokat foglaltuk össze /XIII. táblázat/.

/Itt foglaljuk össze a folyamatosság érdekében a táblázat értékelését is./

A könnyebb áttekinthetőség érdekében az első három oszlop a három növényi SOD hidrolizátum aminosav értékeit tartalmazza, amit a három humán SOD összehasonlítása követ, majd az utolsó oszlop foglalja össze a macska agy SOD aminosav mol.% értékeit.

A növényi SOD-k közül egyedül a borsó SOD-t tisztították meg korábban. A két különböző bab-féleség SOD fehérje hidrolizátuma is eléggé eltérő aminosav mol.% értékeket mutat. Az eltérés a legnagyobb Lys, Asp, Pro, Val és kiemelkedően magas a Tyr esetén.

A táblázatból kiemelkedően fontosaknak mondhatók a normál és diabeteszes humán vér SOD aminosav analízis értékeinek az összehasonlításai. Humán anyagot képvisel még a placenta.

Az előbbiekre visszatérve elmondhatjuk, hogy a hasonlóság mellett nagyobb eltérés figyelhető meg a Hys, Arg, Pro, Gly, Tyr és Phe esetében is.

A normál vörösvértestek és placenta SOD közötti eltérés lényeges a Lys, Hys, Arg, Asp, Ser, Glu, Pro, Gly, Leu, Tyr és Phe-nál.

A macska agy SOD-t teljes agy homogenizátumból izoláltuk.

XIII. Táblázat

	Zöldborsó	Fehér gyöngy- bab	Fürjbab	Normál hu- mán vér	Diabetoszes humán vér	Humán pla- centa	Macska agy
Lys	6,40	6,27	8,55	5,40	5,30	7,00	7,60
Hys	4,90	3,48	3,10	3,80	2,80	5,10	4,80
Arg	6,80	4,70	5,40	3,00	5,30	1,40	4,80
Asp	8,00	11,50	10,38	9,80	10,20	10,80	8,00
Thr	5,20	4,61	4,73	6,60	6,00	5,90	3,30
Ser	5,20	7,98	9,32	7,70	7,00	5,90	7,30
Glu	5,80	8,06	6,90	6,20	5,80	8,40	4,20
Pro	9,00	13,40	15,00	15,00	14,00	9,40	6,70
Gly	8,20	3,88	3,68	7,00	5,50	6,00	7,70
Ala	8,20	3,96	4,32	6,10	5,70	6,60	7,60
Val	6,70	4,92	6,40	6,70	6,70	6,20	7,50
Met	2,20	8,50	8,10	2,50	3,00	2,80	5,00
Ileu	5,90	2,90	2,84	4,93	4,40	4,80	9,30
Leu	6,40	5,60	5,50	4,30	5,70	6,20	6,50
Tyr	4,40	4,93	1,75	3,10	6,10	3,40	2,10
Phe	2,60	2,58	2,50	3,15	5,50	4,40	3,20
Trp	1,40	1,50	1,40	1,60	1,60	1,60	1,60
Cys	2,50	1,60	1,53	2,50	1,00	1,90	2,50

Itt nem kívánunk összehasonlítást tenni, csak néhány szóban kitérnénk a kiemelkedő értékekre.

Magas Lys, Asp, Ileu értékeket kell itt kiemelni.

Összefoglalva az aminosav mennyiségi meghatározásokkal kapcsolatos eredményeink elmondhatjuk, hogy értékes alapot szolgáltatnak eredményeink a növényi és állati SOD-k szerkezetére nézve. A vörösvérttest SOD mol. %-os aminosav különbségei arra utalnak, hogy diabetesben az azonos enzim funkciót ellátó fehérjék szerkezetében is lényeges eltérés következhet be, ami már az enzim fehérjék örökletes szintézis különbségébe enged betekintést.

ÖSSZEFOGLALÁS

Két különböző növényi /kereskedelmi bab-féleség/ és négy állati SOD-t izoláltunk és megtisztítottunk.

Ezen SOD-k közül főleg a normál emberi vér SOD és diabeteszes SOD összehasonlító vizsgálatának van nagy gyakorlati jelentősége.

A normál és diabeteszes vér analizisét és összehasonlítását is elvégeztük a peroxid bontó enzimekre /kataláz, peroxidáz/ nézve, valamint a peroxid termelő SOD-ra.

Ezen összehasonlítások igen érdekes megállapításokat tesznek lehetővé /lásd I.-VI. táblázatot/, az említett enzimekre vonatkozóan:

a./ A normál vér CHCl_3 -EtOH-os szupernatansának SOD tartalma kb. ötszöröse a diabeteszes vér hasonló módon kezelt szupernatans enzimtartalmának.

/Ez összefüggésbe hozható a diabeteszesek csökkent védekezőképességével az infekciókkal szemben/.

Nátrium-citrát véralvadástgátló használata negatív irányba befolyásolja az SOD mérést az adrenochromos módszerénél.

b./ Vér kataláz meghatározását elvégeztük a CHCl_3 -EtOH-os extraktumból, hemolizátumból és plazmából, normál és diabeteszes esetekben.

Azt tapasztaltuk, hogy a diabeteszes vér kataláz aktivitása a CHCl_3 -EtOH-os szupernatansnál kb. hátszor, a hemolizátumoknál kb. ötször magasabb értéket mutatott, mint a normál vérből nyert hasonló anyagok.

A két plazma kataláz értékei megegyeztek.

Az EDTA - mint véralvadástgátló - kb. felére csökkenti a kataláz értékeket.

c./ A diabeteszes és normál vérben nem volt mérhető mennyiségű peroxidáz kimutatható.

Az összehasonlító adatokat feltüntető táblázatoknál

/I.-VI. táblázat/ meghatároztuk a méréseink szórását és a variációs koefficienseket.

Meghatároztuk az általunk izolált SOD-k molekulasúlyát Sephadex gél rétegen.

Stein-Moore módszerrel elvégeztük a növényi és állati SOD-k hidrolizisét és kvantitatív aminosav analízisét.

Az értékek összehasonlítása azt az érdekes eredményt mutatta, hogy a normál és diabeteszes vörösvértest SOD-k mennyiségi aminosav értékei lényegesen eltérnek egymástól.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Ballou, D., Palmer, G., Massey, V.:
Biochem. Biophys. Res. Comm., 36, 898. /1969/
2. Hirata, F., Hayaishi, O.:
J. Biol. Chem., 264, 7825. /1971/
3. Misra, H.P., Fridovich, I.:
J. Biol. Chem., 246, 6886. /1971/
4. McCord, J.M., Bernard, B., Keele, J.B., Fridovich I.:
Proc. Nat. Acad. Sci., 68, 1024. /1971/
5. Fridovich, I., Handler, P.:
J. Biol. Chem., 233, 1575. /1958/
6. Handler, P., Fridovich, I.:
J. Biol. Chem., 233, 1581 /1958/
7. Fridovich, I., Handler, P.:
J. Biol. Chem., 236, 1836 /1961/
8. McCord, J.M., Fridovich, I.:
J. Biol. Chem., 243, 1753 /1968/
9. Aust, S.D., Reering, D.L., Pederson, T.C.:
Biochem. Biophys. Res. Comm., 42, 1133 /1972/
10. Misra, P.H., Fridovich, I.:
J. Biol. Chem., 247, 6960 /1972/
11. Nishikimi, M., Rac, N.A., Yagi, K.:
Biochem. Biophys. Res. Comm., 46, 849 /1972/
12. Ballou, D., Palmer, G., Massey, V.:
Biochem. Biophys. Res. Comm., 36, 898 /1969/
13. Misra, H.P., Fridovich, I.:
J. Biol. Chem., 247, 3170 /1972/
14. Rotilio, G., Bray, C.P., Fielden, M.:
Biochem. Biophys. Acta, 268, 605 /1972/
15. McCord, J.M., Fridovich, I.:
Photochem. Photobiol. 17, 115 /1973/

16. Mann, T., Keilin, D.:
Proc. Roy. Soc., Series B., 126, 303 /1959/
17. Corrico, B.J., Deutsch, H.P.:
J. Biol. Chem., 244, 6087 /1969/
18. McCord, J.M., Fridovich, I.:
J. Biol. Chem., 244, 6049 /1969/
19. Klug, D., Rabani, J., Fridovich, I.:
J. Biol. Chem., 247, 4839 /1972/
20. Fridovich, I., Handler, P.:
J. Biol. Chem., 233, 1578 /1958/
21. Horecker, B.L., Heppel, L.A.:
J. Biol. Chem., 237, 916 /1962/
22. Fridovich, I., Handler, P.:
J. Biol. Chem., 243, 5753 /1968/
23. Vance, P.G., Keele, B.B. Jr. Rajagopalan, K.V.:
J. Biol. Chem., 247, 4782 /1972/
24. McCord, J.M., Keele, B.B. Jr., Fridovich, I.:
Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 1024 /1971/
25. Strobel, H.W., Coon, M.J.:
J. Biol. Chem., 246, 7826 /1971/
26. Sawade, Y., Ohima, T., Yamazaki, I.:
Biochem. Biophys. Acta, 268, 305 /1972/
27. Keele, B.B. Jr. McCord, J.M. Fridovich, I.:
J. Biol. Chem., 246, 2875 /1971/
28. Vesper, U., Fretzdorff, A., Printz, R.:
FEBS Letters, 27, 267 /1972/
29. Rao, P.S., Hayon, B.:
Biochem. Res. Comm., 51, 468 /1973/
30. Hartz, J.W. Deutsch, H.P.:
J. Biol. Chem., 247, 7043 /1972/
31. Fridovich, I.:
Accounts. Chem. Res., 5, 310 /1972/
32. Forman, H.J., Evans, H.J., Hill, R.L., Fridovich, I.:
Biochemistry, 12, 823 /1973/

33. Rotilio, G.:
Biochem.Soc.Frans., /Metalloenzymes Conference,
Oxford/ 1, 51 /1973/
34. Hodgson, E.K., Fridovich, I.:
Biochem.Biophys.Res.Comm. 54, 270 /1973/
35. Rotilio, G., Calabrese, L., Bossa, F., Barra, D.,
Finazzi, Agro, A., Mondovi, B.:
Biochemistry, 11, 2182 /1972/
36. Fielden, E.M., Roberts, P.B., Bray, R.C., Rotilio, G.:
Biochim.Biophys.Acta, 268, 605 /1972/
37. Bränden, R., Malmström, Bo.G., Vångård, T.:
Eur.J.Biochem., 36, 195 /1973/
38. Phan Van Hien: Diplomadolgozat /1973/
39. Fridovich, I.:
Accounts, Chem.Res., 5, 321 /1972/
40. Fridovich, I.:
J.Biol.Chem., 242, 1445 /1967/
41. Maugh, Th.H.:
Science, 182, 44 /1973/
42. Beauchamp, Ch., Fridovich, I.:
J.Biol.Chem., 245, 4641 /1970/
43. Fee, A.J., Teitelbaum, H.D.:
Biochem.Biophys.Res.Comm., 49, 150 /1972/
44. Barrier, M.B., Kipnes, R.S., Curnette, J.T.:
J.Clon,Invest., 52, 541 /1973/
45. McCord, J.M., Fridovich, I.:
J.Biol.Chem., 237, 5753 /1968/
46. Mohamed, M.S., Greenberg, D.M.:
J.Gen.Phys., 37, 433 /1953/
47. Porter, H., Folch, J.:
J.Neurochem., 1, 260 /1957/
48. Methoden der enzymatischen Analyse Band.I.:
Herausgegeben: Bergmeyer, H.U.
Akad.Verlag., Berlin /1970/

49. Boyer, P.O., Myrbäck, K., Lardy, H.:
The Enzymes. /sec.Edition/ Vol.8., Chap.6.
Academic Press, London /1963/
50. Saunders, B.C., Holmes-Siedle, HG., Stark, B.P.:
Peroxidase, Butterworths, London /1964/
51. Mühlrad András: Biokémiai gyakorlatok
Egységes Jegyzet, Tankönyvkiadó, Bp., /1967/
52. Boyer, P.O., Myrbäck, K., Lardy, H.:
The Enzymes. VII., 567. /1963/
Academic Press, London /1963/
53. Magyar Imre, Petrányi Gyula: A belgyógyászat alap-
vonalai, I. kötet. Medicina Könyvkiadó, Bp./1970/
54. McCord, J.M., Fridovich I.:
J.Biol.Chem., 244, 6049 /1969/
55. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. Randall, J.:
J.Biol.Chem, 193, 265 /1951/
56. Radola, B.J., J. Chromatogr., 38, 61 /1968/
57. Thin Layer gel filtration with the Pharmacia
TLG Apparatus:
A Pharmacia Fine Chemicals A.G. /1971/
58. Dévényi Tibor: Az aminosav analitika újabb eredményei
Országos Fejlesztési Bizottság és a MÉM Informá-
ciós Központjának kiadványa, Bp. /1972/
59. Euler-Josephson módszer. Methods in Enzymology. II.
Chap. 137., 779. oldal
Academic Press, London /1955/

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Matkovics Béla docens úrnak, hogy irányításával a Biokémiai Csoportnál a kísérleteket elvégezhettem, és a dolgozatot elkészíthettem;

Dr. Kerese István kandidátus úrnak, a molekulahúly meghatározásban és az aminosav analízisben nyújtott hasznos tanácsaiért, valamint; Dr. Kovács Katalin gyakor-
noknak, a kísérletek kivitelezésében nyújtott tanácsaiért és segítségéért.

Ugy szintén köszönöm Le Huu Hieu egyetemi hallgató értékes munkáját, akivel az enzimek preparálásának egy részét közösen végeztük.

